



Induktion und Detektion des VBNC-Zustandes in  
*Pseudomonas aeruginosa*

Dissertation

zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von  
Darko Andre Babić, M.Sc.  
aus Wuppertal

Wuppertal  
Februar 2017

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Mai 2014 bis Oktober 2016 am Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie der Bergischen Universität Wuppertal durchgeführt.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20170620-091826-3

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade3Ahbz3A468-20170620-091826-3>]

Referent/in: Priv. Doz. Dr. E. Schmidt  
Korreferent/in: Prof.'in Dr. A. Preisfeld

Abgabe der Arbeit: 15.02.2017  
Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017

43°43'47.2"N 19°23'51.7"E

## **Danksagung**

Größter Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt für die Betreuung und für die Möglichkeit, diese Arbeit im Arbeitskreis der Chemischen Mikrobiologie verfassen zu dürfen. Ich hoffe, dass ich dem entgegengebrachten Vertrauen gerecht wurde.

Ich bedanke mich außerordentlich bei Frau Prof.'in Dr. Angelika Preisfeld, die bereitwillig das Korreferat für diese Arbeit übernahm.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Dr. Andrea Franck-Mokroß bedanken, die in vielen wissenschaftlichen Fragestellungen eine große Hilfe war. Darüber hinaus durfte ich Frau Dr. Andrea Franck-Mokroß als die wohl liebenswürdige Person kennenlernen, mit der ich ein Büro teilen durfte.

Auch möchte ich Frau Jessica Czirr meinen Dank aussprechen. Sie war stets die gute Seele im Arbeitskreis und hatte für viele schwierige Sachverhalte immer eine Lösung parat.

Ohne Frau Melanie Möller wären große Teile dieser Arbeit nicht verwirklicht worden. Meine Dankbarkeit dafür kann ich nicht in Worte fassen.

Frau Natalie Fabis brillierte nicht nur durch ihre umfangreiche Berufserfahrung, sondern auch sie stand stets mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Sarah Rau übernahm immer die lästigen Verwaltungsaufgaben. An dieser Stelle bedanke ich mich dafür vielmals.

Die „a.p.f. Aqua Systems AG“ aus Wuppertal erlaubte durch ihre finanzielle Unterstützung das Bereitstellen von Gebrauchsmaterialien, ohne die eine praktische Durchführung nicht möglich gewesen wäre. Dafür bedanke ich mich.

Herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die in meinem Leben immer eine riesige Stütze waren. Mein Bruder hielt mir immer den Rücken frei, wodurch ich mich auf wichtigere Sachen konzentrieren konnte.

Ich bedanke mich bei allen weiteren Personen, die nicht einzeln genannt werden können, die aber zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung .....</b>	<b>1</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Trinkwasser relevanter Keim .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Einflussfaktoren auf eine Desinfektion .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Inokulumeffekt .....	10
2.2.2 Stringent response .....	11
2.2.3 VBNC-Zellen .....	12
<b>2.3 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material und Methode.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Mikroorganismen .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Software.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Material .....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Chemikalien .....	17
3.3.2 Nährmedien .....	18
3.3.2.1 Flüssignährmedien.....	19
3.3.2.2 Feste Nährmedien.....	20
3.3.3 Lösungen.....	21
3.3.4 Gebrauchsgegenstände .....	23
3.3.5 Geräte .....	23
<b>3.4 Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.4.1 Allgemeines Vorgehen.....	25
3.4.1.1 Stammeskontrolle, Anzucht und Aufbewahrung der Testkeime .....	25
3.4.1.2 Zellernte, Ansetzen der Zellsuspension und Trübungsmessung .....	25
3.4.1.3 Ultraschallbehandlung der Bakteriensuspensionen .....	25
3.4.1.4 Lebendzellzahlbestimmung .....	26
3.4.1.5 Wasserstoffperoxidquantifizierung.....	27
3.4.1.6 Pyruvatquantifizierung .....	27
3.4.1.7 Zellaufschluss und Proteinquantifizierung .....	29
3.4.1.8 Katalasevolumenaktivitätsbestimmung .....	30
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung .....	31
3.4.2.1 CTC-Färbung.....	31
3.4.2.2 Live/Dead-Färbung.....	32
3.4.3 Orientierungsversuche.....	33
3.4.3.1 Wachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Flüssigmedien .....	33
3.4.3.2 Zentrifugation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen .....	34
3.4.3.3 Ultraschallbehandlung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen nach Langzeitinkubation .....	34
3.4.3.4 Wasserstoffperoxidzerlegung durch Pyruvatzusatz.....	35

3.4.4	Langzeitinkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 und <i>Escherichia coli</i> K12.....	35
3.4.5	Wasserstoffperoxidbehandlung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1.....	35
3.4.5.1	Einsatz von Zellkulturen unterschiedlicher Anfangstrübung.....	36
3.4.5.2	Einsatz von Wasserstoffperoxidlösungen unterschiedlicher Konzentration.....	36
3.4.5.3	Einsatz von Nährböden mit unterschiedlichen Supplementen.....	37
3.4.5.4	Desinfektion mit Chlordioxid und Einsatz von mit Pyruvat supplementierten Nährböden.....	37
3.4.5.5	Zusatz von Pyruvat und Acetat.....	37
3.4.5.6	Einsatz von Zellkulturen unterschiedlichen Inkubationsalters.....	39
3.4.6	Vitalitätsbestimmung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidbehandlung.....	39
3.4.7	Inkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser nach Wasserstoffperoxidbehandlung.....	40
3.4.7.1	Langzeitinkubation nach Wasserstoffperoxidzugabe in geringer Konzentration.....	40
3.4.7.2	Langzeitinkubation nach Wasserstoffperoxidzugabe in hoher Konzentration.....	40
3.4.7.3	Lebendzellzahlbestimmung mittels Membranfiltration und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Wasserstoffperoxidbehandlung.....	40
3.4.7.4	Inkubation mit niedriger Ausgangslebendzellzahl nach Zusatz von abgetöteten Zellen.....	41
3.4.8	Desinfektion von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxid-behandlung und Langzeitinkubation.....	41
3.4.9	Katalaseaktivität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen.....	43
3.4.9.1	Langzeitinkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1.....	43
3.4.9.2	SHX-Zugabe zu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen.....	43
3.4.10	Wasserstoffperoxidbehandlung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen nach SHX-Zugabe.....	44
3.4.11	Anzucht von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Mineralmedium nach Wasserstoffperoxidzusatz.....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
4.1	Wasserstoffperoxidquantifizierung (Methodenvalidierung).....	46
4.2	Pyruvatquantifizierung (Methodenvalidierung).....	47
4.3	Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung.....	49
4.3.1	Zelltiter einer <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kultur nach CTC-Färbung.....	49
4.3.2	Zelltiter einer <i>Escherichia coli</i> K12-Kultur nach Live/Dead-Färbung.....	52
4.4	Orientierungsversuche.....	52
4.4.1	Wachstumskinetische Parameter von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Flüssigmedien.....	53
4.4.2	Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Zentrifugation.....	58
4.4.3	Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Langzeitinkubation und Ultraschallbehandlung..	60
4.4.4	Wasserstoffperoxidzehrung durch Pyruvat-Zusatz.....	62
4.5	Langzeitinkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 und <i>Escherichia coli</i> K12 in chemisch definiertem Leitungswasser.....	63
4.6	Wasserstoffperoxidbehandlung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1.....	65
4.6.1	Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Ausgangstrübung.....	66
4.6.2	Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration.....	67
4.6.3	Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von den eingesetzten Nährböden.....	69
4.6.4	Wiederfindungsraten der Testkeime nach Chlordioxidbehandlung und Kultivierung auf supplementierten Nährböden.....	71
4.6.5	Wiederfindungsrate nach Pyruvat- und Acetatzusatz.....	72
4.6.6	Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Zellkulturalter.....	74
4.7	Vitalitätsbestimmung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidbehandlung.....	77
4.7.1	Zellüberleben von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung und Langzeitinkubation.....	82
4.7.1.1	Zellüberleben nach Wasserstoffperoxidzugabe mit geringer Konzentration.....	82

4.7.1.2	Zellüberleben nach Wasserstoffperoxidzugabe mit hoher Konzentration .....	87
4.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung und die Wiederfindungsraten nach Membranfiltration .....	91
4.7.3	Wiederfindungsrate bei niedriger Ausgangslebendzellzahl nach Zusatz Hitze abgetöteter Zellen .....	94
<b>4.8</b>	<b>Wiederfindungsrate nach Desinfektion von mit Wasserstoffperoxid versetzten und inkubierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen .....</b>	<b>95</b>
<b>4.9</b>	<b>Katalaseaktivität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 .....</b>	<b>96</b>
4.9.1	Katalaseaktivität und Proteingehalt nach Langzeitinkubation .....	97
4.9.2	Katalaseaktivität, Proteingehalt und Lebendzellzahl nach SHX-Zugabe .....	99
<b>4.10</b>	<b>Wiederfindungsrate von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach SHX-Zusatz und Wasserstoffperoxidbehandlung .....</b>	<b>102</b>
<b>4.11</b>	<b>Anzucht von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Mineralmedium nach Wasserstoffperoxidzusatz .....</b>	<b>104</b>
4.11.1	Optimale Animpfmenge .....	104
4.11.2	Lebendzellzahl und optische Dichte der Kulturen .....	106
4.11.3	Pyruvatgehalt und Wasserstoffperoxidkonzentration in den Kulturen .....	107
4.11.4	Katalaseaktivität der Kulturen .....	108
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Induktion und Detektion des VBNC-Zustandes in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 .....</b>	<b>109</b>
<b>5.2</b>	<b>Resuszipation von VBNC-Zellen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 und die Rolle des Pyruvat bei der chemisch induzierten Resuszipation .....</b>	<b>114</b>
<b>5.3</b>	<b>Verknüpfung mit der stringenten Kontrolle .....</b>	<b>119</b>
5.3.1	Katalaseaktivität als Nachweis der stringenten Kontrolle .....	119
5.3.2	Erhöhte Resistenz von lang inkubierten Kulturen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 gegenüber Wasserstoffperoxid .....	120
5.3.3	Induktion der Pyruvatproduktion als erster Abwehrmechanismus .....	123
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
	<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>154</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:	Bedeutung:
Einheiten	
μmol	Mikromol
mmol	Millimol
mol	Mol
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
μL	Mikroliter
mL	Milliliter
L	Liter
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
X g	Xfach mittlere Erdbeschleunigung
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
U	Unit (μmol/min)
kU	Kilounits
h	hour (Stunde(n))
d	day (Tag(e))
s	Sekunde(n)
min	Minute(n)
kHz	Kilohertz
A	Ampere
rel. E.	relative Einheit
W	Watt
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/mL	Unit pro Milliliter
g/100 g	Gramm pro 100 Gramm
g/100 mL	Gramm pro 100 Milliliter
g/cm <sup>3</sup>	Gramm pro Kubikzentimeter
g/L	Gramm pro Liter
μmol/L	Mikromol pro Liter
mmol/L	Millimol pro Liter
mol/L	Mol pro Liter
mM	millimolar [mmol/L]
KBE/mL	Kolonie bildende Einheiten pro Milliliter
KBE/250 mL	Kolonie bildende Einheiten pro 250 Milliliter
rpm	revolutions per minute
ΔE/min	Absorptionsdifferenz pro Minute
Symbole	
α	Alpha
β	Beta

$\lambda$	Wellenlänge (Lambda)
$\zeta$	Membranpotential (Zeta)
>	größer als
<	kleiner als
$\geq$	größer gleich als
$\leq$	kleiner gleich als
=	gleich
$\approx$	entspricht
~	ca.
$\pi$	Pi
10 x	zehnfach
®	Rechtsschutz
t	Zeit/-punkt
TM	Trade Mark
Akronyme	
ALZZ	Aktivität pro Lebendzellzahl
As	spezifische Aktivität
Av	Volumenaktivität
AhpC	Untereinheit C der Alkylhydroperoxidreduktase
<i>ahpC1/2(-Gene)</i>	Untereinheit C 1/2 der Alkylhydroperoxidreduktase-Gene
AI-2	autoinducer 2
ATP	Adenosintriphosphat
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
bidest.	bidestilliert
BG	Bestimmungsgrenze
BM	Bakterienmasse
BHI-Agar	brain-heart infusion agar
BZ	Bakterienzahl
ca.	circa
CASO	Tryptic Soy Broth
CD	compact disc
Cetrimid	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CFU	colony forming unit
ClpP	Clp protease proteolytic subunit
CTC	5-Cyano-2,3-di-( <i>p</i> -tolyl)tetrazoliumchlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIN	Deutsche Industrie Norm
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPD	<i>N,N</i> -Diethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
DskA-Protein	ubiquitin-binding protein A
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVC	direct viable count
et. al.	et alii
EN	Europäische Norm
EMA	Ethidiummonoazid(bromid)
F	Faktor
g	Generationszeit
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat

---

GDP	Guanosindiphosphat
HPLC	high performance liquid chromatography
HT29	adhärente Zellkultur (HT29-Zelllinie)
i.d.R.	in der Regel
ISO	Internationale Organisation für Normung
KatA	Katalase A
KatB	Katalase B
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LB	lysogeny broth
Log	Logarithmus/logarithmiert (10er-Potenz)
LZZ	Lebendzellzahl
MCR	mixed culture recovery
Mn-SOD	Mangan enthaltende Superoxiddismutase
MPN	most probable number (Titerverfahren)
MRP	Multidrug Resistance-Related Proteine
NWG	Nachweisgrenze
NADH	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
pH	potentia Hydrogenii
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PI	Propidiumiodid
ppGpp	Guanosin-5',3'-tetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
PSM	phenol soluble modulins (phenollösliche Moduline)
relA	relaxed control (relaxierte Kontrolle)
PMA	Propidiummonoazid
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Rpf	resuscitation-promoting factor
R	Wiederherstellungsfaktor
<i>rrn</i> (-Gene)	ribosomal RNA-Gene
rRNA	ribosomal RNA
SHX	D/L-Serinhydroxamat
sp.	species (Spezies)
spoT(-Protein)	bifunctional (p)ppGpp synthase/hydrolase
<i>stx</i> (-Gene)	Shigatoxin-Gene
$t_d$	Verdopplungszeit
TEA	Triethanolamin
tRNA	transfer RNA
TSB	Tryptic Soy Broth
o.Ä.	oder Ähnliche[s]
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
VBNC	viable but nonculturable
vgl.	vergleiche
v/v	volume to volume (Volumenanteil zu Volumenanteil)
w/v	weight to volume (Massenanteil zu Volumenanteil)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
$\mu$	Wachstumsrate
$\upsilon$	Teilungsrate

---

## 1 Abstract

Aim of this study was to examine, whether and how it could be able to transfer *Pseudomonas aeruginosa* WR1 into the VBNC-state. The VBNC-state is defined as the loss of culturability of laboratory strains on respectively in the established culture media. The VBNC-state in *Pseudomonas aeruginosa* is of great interests for modern research, because this germ is a well-known human pathogen bacterium occurring ubiquitously because of its low nutrition claims. Bacterial cells in the VBNC-state retain their virulence or regain it after multiplication. Furthermore, cells in the VBNC-state prove themselves as resistant against disinfection or the immune defence.

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 was transferred by a multistage process into the VBNC-state. Because of its low nutrition claims incubation under oligotrophic conditions did not induce the VBNC-state. As an additional lethal factor hydrogen peroxide was used. For the disinfection-procedure, a defined ratio between the basic number of cells and initial concentration of the disinfection agent was determined, in which hydrogen peroxide did not damage irreparably the whole population of a suspension of *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  for a suspension with  $\text{OD}_{546} = 0,5$ ).

The VBNC-state was detected by the relative comparison of recoveries determined by two different techniques. Besides the classical enumeration based on culturing, living cells were recovered by the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. This vital staining using SYTO 9 and propidium iodide was shown to be more effective than staining with CTC.

In an additional experiment the occurrence of VBNC-cells was demonstrated by the resuscitation of these cells using pyruvate. Depending on the age of cultures 50 to 200 % more cells were recovered than in the controls by adding pyruvate to the breeding ground that was used for quantification.

The role of pyruvate as an agent achieving resuscitation was examined. As a central metabolite, it functioned as a great energy source and it also disabled reactive oxygen species by reacting with that compounds.

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 developed additional defence mechanism while multiplying in presence of hydrogen peroxide. *Pseudomonas aeruginosa* WR1 secreted more pyruvate into media than the control samples incubated without hydrogen peroxide. The probes challenged with hydrogen peroxide also showed an increased activity of catalase per living cell [U/CFU].

The catalase was mainly responsible for the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* WR1 against hydrogen peroxide. With increased incubation duration in an oligotrophic environment the specific activity of catalase rose. The activity of catalase per living cell in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 was also accreted by adding SHX to the cell culture during the beginning log phase.

Cells incubated with SHX and attacked by hydrogen peroxide also entered the VBNC-state. These cells were also resurrected by adding pyruvate to the breeding ground.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* als Trinkwasser relevanter Keim

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, durch polare Geißeln und Typ IV Pili bewegliches Stäbchen (MATTICK (2002) und STOVER et al. (2000)), das positiv auf Oxidasetests reagiert (COBOS-TRIGUEROS et al. (2016)) und über Wasserstoffperoxid spaltende Enzyme verfügt (HASSETT et al. (1992) und MA et al. (1999)). Nach PALLERONI et al. (1972) wird *Pseudomonas aeruginosa* in die Familie der *Pseudomonadaceae* klassifiziert. Dieses Bakterium lebt fakultativ aerob, ist aber aufgrund von Nitratreduktasen (ZUMFT (1997)) dazu befähigt, unter anaeroben Bedingungen Stoffwechsel zu betreiben. Die Bildung bläulich-grün fluoreszierender Pyocyanine ist ein weiteres Charakteristikum (HOWARTH und DEDMAN (1964)).

*Pseudomonas aeruginosa* kommt ubiquitär vor (RINGEN und DRAKE (1952) und YUNIS (1980)) und konnte so auch auf Nahrungsmitteln und in Trinkwasser isoliert werden (HARDALO und EDBERG (1997)). Aufgrund seiner geringen Nahrungsansprüche war dieser chemoorganotrophe Keim in der Lage, in oligotrophen Umgebungen wie beispielsweise in destilliertem Wasser (FAVERO et al. (1971)) oder in Mineralwasser (LEGNANI et al. (1999)) zu überleben bzw. sich zu vermehren. So war die Gattung der *Pseudomonas* u.a. verantwortlich für die Kontamination für Mineralwasser (BUTTIAUX (1959) und WARBURTON et al. (1994)). Leitungssysteme waren weitere typische aquatische Standorte für *Pseudomonas aeruginosa* (GROBE et al. (1995)), mit dem Ergebnis, dass dieser Keim sich in sanitären Einrichtungen o. Ä. vermehren konnte und dann ganze Wassersysteme besiedelte (DÖRING (1991) und AUMERAN et al. (2007)). Als Konsequenz wurde ein Zusammenhang zwischen der Kontamination der Wassersysteme mit *Pseudomonas aeruginosa* und dem verstärkten Auftreten von Infektionen mit diesem Bakterium beschrieben (TRAUTMANN et al. (2009)).

Mehrere Überlebensstrategien sind mit dem Wachstum bzw. der Vermehrung in einem oligotrophen Umfeld assoziiert und erlauben diesem Keim die menschliche Immunabwehr besser zu überstehen. So wurde *Pseudomonas aeruginosa* als hervorragender Biofilmbildner beschrieben (WAGNER und IGLEWSKI (2008) und RYDER et al. (2007)). Diese Tatsache wird vor allem im Zusammenhang mit dem Aufkommen nosokomialer Infektionen kritisch gesehen (MACVANE (2017)). Als humanpathogener Mikroorganismus kam *Pseudomonas aeruginosa* im Zahnplaque (SOUTO et al. (2014)), in dem Respirationstrakt (WILSON et al. (2016) und ASHKENAZI-HOFFNUNG et al. (2016)) und in den Harnwegen vor, wobei der Befall von Kathetern (LADD et al. (1987)) und das Auslösen pulmonaler Infektionen vor allem bei Menschen mit zystischer Fibrose (MAY et al. (1991)) zuerst beschrieben wurden. *Pseudomonas aeruginosa* gilt demnach als ein typisches Beispiel für ein opportunistisches pathogenes Bakterium, das immungeschwächte Patienten infiziert (ARGENTA et al. (2016) und NAYAK et al. (2016)). Die Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* beruht auf den unterschiedlich wirkenden Virulenzfaktoren und entsprechenden Sekretionssystemen (ADER et al. (2005)). Extrazelluläre Enzyme wie Proteasen, Hämolyisin, Lipase und Exotoxin A und Exotoxin S sind Beispiele dafür (ABBAS (2015) und AL-SSUM (1992)). Die bereits beschriebene Biofilmbildung, die Ausscheidung von Pigmenten (vor allem Pyocyanin und Pyoverdin) und die Mobilität sind weitere typische pathogene Eigenschaften (ABBAS (2015)). Gängige Therapie ist die Gabe von Antibiotika wie beispielsweise  $\beta$ -Lactam-Antibiotika oder Cephalosporine (PINES et al. (1970)), wobei eine mögliche Resistenzbildung früh als ernstzunehmende Gefahr beschrieben wurde (REYNOLDS et al. (1975)). Intrinsische Resistenzen bildet *Pseudomonas aeruginosa* durch eine eingeschränkte Permeabilität der äußeren Membran für diverse Antibiotika, einen aktiven Transport durch „Multidrug Resistance-Related Proteine“ (MRP) und/oder die Expression diverser  $\beta$ -Lactamasen (CIOFU (2003)) aus.

Der VBNC-Zustand ist für *Pseudomonas aeruginosa* als ein weiterer Überlebensmechanismus beschrieben. Der Keim übersteht dadurch ungünstige Umweltparameter bzw. Nährstoffmangel bei

eingeschränkter Stoffwechselaktivität aber verbliebender Virulenz. Potentielle Induktoren waren dafür Kupfersalze, Chlor (BÉDARD et al. (2014)) und UV-Strahlung (ZHANG et al. (2015)). Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in Kombination mit den geringen Nährstoffansprüchen und der besonderen pathogenen Eigenschaften darf nach Trinkwasserverordnung (TRINKWV (2001)) für „Trinkwasser, das zur Abgabe in verschlossenen Behältnissen bestimmt ist,“ ein Zelltiter für *Pseudomonas aeruginosa* von 0 KBE/250 mL nicht überschritten werden. Der Nachweis bzw. die Quantifizierung erfolgt nach DIN EN ISO 16266:2008-05 durch Kultivierung auf Cetrimid-Agar und anschließender Bestätigungsreaktion.

## 2.2 Einflussfaktoren auf eine Desinfektion

Unter dem Begriff der Desinfektion wird die „weitgehende Abtötung oder Inaktivierung [...] von Infektionserregern [...] auf unbelebten Objekten oder Oberflächen“ verstanden und ist von dem Begriff der Sterilisation abzugrenzen. „Die Entkeimung von Trinkwasser und Nahrungsmittel“ wird dagegen ebenfalls als Desinfektion beschrieben. Diese kann entweder durch physikalische Verfahren (ionisierende Strahlung, Ultraschall, Ultraviolettstrahlung, Einwirkung tiefer oder hoher Temperatur, Wasserdampf und Membranfiltration) oder durch den Einsatz chemischer Desinfektionsmittel erfolgen (BEHLER und GÄNZLE (2007)). Nach § 11 der Trinkwasserverordnung (TRINKWV (2001)) „müssen die [zur Desinfektion] eingesetzten Aufbereitungsmittel hinreichend wirksam sein und dürfen keine vermeidbaren oder unvermeidbaren Auswirkungen auf die Gesundheit oder Umwelt haben.“ Die entsprechende Liste wird vom Umweltbundesamt geführt und aktualisiert. Die für die Trinkwasserdesinfektion zulässigen Verbindungen sind Substanzen mit einem hohen Oxidationspotential wie Chlor, Chlordioxid und Ozon bzw. Präkursoren dieser Verbindungen. Dagegen sind schwächere Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid nicht als Desinfektionsmittel für Trinkwasser zugelassen und dienen ausschließlich dem Zweck der Oxidation (LISTE DER AUFBEREITUNGSMITTEL UND DESINFIZIERUNGSMITTEL GEMÄß § 11 TRINKWASSERVERORDNUNG, UMWELTBUNDESAMT (Oktober 2015)). Allerdings wird Wasserstoffperoxid neben Chlor bzw. Hypochlorit und Chlordioxid zur Reinigung und Desinfektion von Trinkwasser-Installationen empfohlen (WRICKE (2013)) bzw. vorgeschrieben (REINIGUNG UND DESINFIZIERUNG VON TRINKWASSERVERTEILUNGS- UND TRINKWASSERSPEICHERSYSTEMEN IN SCHIENENFAHRZEUGEN UND ORTSFESTEN SOWIE MOBILEN TRINKWASSERBEFÜLLUNGSANLAGEN, EISENBAHN-BUNDESAMT (Oktober 2013)).

### 2.2.1 Inokulumeffekt

Früh wurde die Abhängigkeit der keimreduzierenden Wirkung einer Substanz von der Desinfektionsmittelkonzentration und der Temperatur beschrieben (vgl. dazu HUGO (1991)). Dies gipfelte in der Konstruktion zahlreicher kinetischer Modelle (CHICK (1908) und WATSON (1908) und HOM (1972)), die die Keimreduktion ausgehend von der Anfangszellzahl abhängig von der Desinfektionsmittelkonzentration und der Zeit bei isothermen Bedingungen beschreiben. Als mechanistische Grundlage dient die Annahme, dass eine Desinfektion als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angesehen werden kann, bei der das Desinfektionsmittel im Überschuss vorliegt (LAMBERT und JOHNSTON (2000)). Dieser lineare Abtötungsverlauf wurde nach CERF (1977) bzw. MURANYI (2008) durch „ungleichmäßige Behandlung, unterschiedliche Wirk- bzw. Resistenzmechanismen, Mischpopulationen, Agglomeraten oder Messverfahren“ gestört. Im Gegensatz dazu steht die so genannte vitalistische Theorie, nach der in einer Population unterschiedliche Resistenzen gegenüber einem Lethalfaktor auftreten. Die keimreduzierende Wirkung ist folglich in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Vorkommens der unterschiedlich resistenten Keime zu sehen (WITHELL (1942) und CERF (1977)) und für jeden Keim bzw. für jede Subpopulation wird eine unterschiedliche Abtötungswahrscheinlichkeit angenommen. Im Gegensatz dazu wurde in der

mechanistischen Theorie die Abtötungswahrscheinlichkeit als konstant beschrieben (MURANYI (2008)). Der Einfluss der Ausgangszellzahl auf die bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung eines Desinfektionsmittels wird in der Literatur als Inokulumeffekt beschrieben. STEELS et al. (2000) definierten den Inokulumeffekt als den „Anstieg in der minimalen Hemmkonzentration (MKH, Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) eines Inhibitors, wenn das mikrobielle Inokulum erhöht wird“. In der Konsequenz bedeutet dies, dass „mehr Inhibitor benötigt wird, um eine größere mikrobielle Belastung zu inhibieren“. Andere Veröffentlichungen (JOHNSTON et al. (2000), LAMBERT und JOHNSTON (2000) und KLOTZ et al. (2007)) interpretierten den Begriff des Inokulumeffekts als die Abhängigkeit der Desinfektionsleistung einer keimreduzierenden Substanz von der Größe des Inokulums. So zeigte BROOK (1989), dass der Inokulumeffekt auftrat, wenn  $\beta$ -Lactamasen produzierende Bakterien mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika versetzt wurden. JOHNSTON et al. (2000) wiesen den Inokulumeffekt für *Staphylococcus aureus* bei Umsetzung mit Natriumdodecylsulfat nach und KARAPINAR und GÖNÜL (1992) für *Yersinia enterocolitica* mit Essig- und Weinsäurezusatz.

## 2.2.2 Stringent response

Unter stringent response bzw. stringente Antwort wird die „durch Mangel einzelner Substrate hervorgerufene Adaption des Katabolismus, Anabolismus und des Proteinsyntheseapparates verstanden mit dem Ergebnis, dass das Wachstum verlangsamt wird und sich Schutz- und Resistenzmechanismen bilden.“ Die stringente Antwort ist von der generellen Stressantwort abzugrenzen, die ebenfalls bei ungünstigen Umweltbedingungen wie z.B. Oligotrophie und Endproduktakkumulation eintritt (UNDEN (2014)).

Für *Escherichia coli* erwiesen sich die Alarmone Guanosin-5',3'-tetrphosphat (ppGpp) bzw. das korrespondierende Vorläufermolekül Guanosinpentaphosphat (pppGpp) als die Schlüssel-moleküle für die Induktion dieser Reaktionskaskade (CASHEL et al. 1996). Die Synthese wird entweder durch konkreten Aminosäuremangel (*relA*-Weg) oder durch generellen Stress bzw. durch Nährstofflimitierung (*spoT*-Weg) induziert (MECHOLD et al. (1996)). Bei Aminosäuremangel akkumuliert sich ungeladene Transfer-RNA (tRNA), die sich Codon-spezifisch an die Aminoacyl-Position der Ribosome anlagert. Dadurch läuft die *relA* abhängige Guanosinpentaphosphat-Synthese an, in dem das korrespondierende Protein RelA an der 50S-Untereinheit die Pyrophosphorylierung von GTP bzw. GDP unter Verwendung von ATP als Donor katalysiert (HASELTINE und BLOCK (1973) und COCHRAN und BYRNE (1974)). Der *spoT* abhängige Syntheseweg von Guanosinpentaphosphat wurde von HERNANDEZ und BREMER (1991) und XIAO et al. (1991) durch *relA*-Mangelmutanten nachgewiesen bzw. bestätigt. Dabei wiesen die Proteine RelA (~ 84 kDa) und SpoT (~ 79 kDa) in *Escherichia coli* nach METZGER et al. (1989) eine hohe Homologie untereinander in der Aminosäuresequenz auf. Guanosinpentaphosphat wird nach Synthese und Akkumulation durch eine Phosphohydrolase zu Guanosintetrphosphat dephosphoryliert (UNDEN (2014)).

Neben der Transferasenaktivität katalysiert das SpoT-Protein durch eine 3'-Pyrophosphohydrolaseaktivität auch die Degradation von Guanosinpentaphosphat bzw. -tetrphosphat in GTP bzw. GDP und Diphosphat (HEINEMEYER et al. (1978)) und inaktiviert damit die „stringent response“ auslösende Eigenschaft dieser Alarmone. GALLANT et al. (1972) zeigten, dass die Degradation abhängig von der Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen war und bei Nährstofflimitierung nicht erfolgte.

Der Wirkmechanismus von Guanosintetrphosphat ist bekannt und gut beschrieben. Dieses Molekül lagert sich durch Diffusion durch den sekundären Kanal (vgl. NICKELS et al. (2004)) nahe des aktiven Zentrums der RNA-Polymerase (ARTSIMOVITCH et al. (2004)) ein. „Dadurch werden der Zutritt der Nukleosidtriphosphate zum aktiven Zentrum und die Katalyse behindert (UNDEN (2014))“. Guanosintetrphosphat kann außerdem drastisch die Halbwertszeit der offenen Komplexe aus den Promotorregionen und dem RNA-Polymerase-Holoenzym reduzieren, wodurch vor allem Promotorregionen mit geringer Halbwertszeit des offenen Komplexes wie beispielsweise die RNA-

Gene (*rrn*-Gene) (BARKER et al. (2001a)) in ihrer Transkription herunterreguliert werden. Durch die entstandene Limitierung von rRNA bewirkt die stringente Antwort eine Herabregulation des Translationsapparates (PAUL et al. (2004)). Durch die Störung und Freisetzung des RNA-Polymerase-Komplexes bei der Transkription der Translationsgene, die vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wurden, wurde nach TRAXLER et al. (2008) außerdem passiv die Transkription von Promotoren hochreguliert, die die Gene der stationären Phase aktivierten (vgl. dazu BARKER et al. (2001a) und BARKER et al. (2001b)). So bewirkte Guanosintetraphosphat gemeinsam mit dem DskA-Protein eine verstärkte Transkription von Promotoren der Gene, die die Aminosäurebiosynthese codieren (Paul et al. (2005)). Die durch die stringente Antwort ausgelöste Stoffwechselantwort erlaubt das längere Überleben der bakteriellen Zelle in der stationären Phase bzw. unter ungünstigen Umweltparametern und ist somit mitverantwortlich für die bakterielle Resistenz bzw. Persistenz.

Die stringente Antwort wurde erstmalig für die Familie der *Enterobacteriaceae* bzw. genauer für *Escherichia coli* beschrieben (CASHEL und KALBACHER (1970)), obwohl zahlreiche andere Organismen die Möglichkeit zur Bildung von Guanosinpentaphosphat besitzen (SILVERMAN und ATHERLY (1979)). Durch Mangelmutanten konnte beispielsweise die Bildung von Guanosinpentaphosphat früh in *Vibrio* sp. (FLARDH et al. (1994)), *Bacillus subtilis* (SWANTON und EDLIN (1972)) und in *Streptomyces* sp. (OCHI (1987)) nachgewiesen werden. So regulierte die stringente Antwort in *Vibrio cholerae* die Biofilmbildung (He et al. (2012)) und induzierte in *Staphylococcus aureus* die Expression interzellulärer phenollöslicher Moduline (PSM) (GEIGER et al. (2012)). Erstmals konnten GREENWAY und ENGLAND (1999) für *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* eine durch Nährstofflimitierung induzierte stringente Antwort nachweisen. Dabei zeigten die Autoren, dass ein zum RelA-Protein homologes Enzym eine Schlüsselrolle einnahm. In der Literatur wurde die Tatsache beschrieben, dass die stringente Antwort das Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen auslöste (VAN DELDEN et al. (2001) und BAYSSE et al. (2005)), das die Abwehrreaktion auf ungünstige biotische Faktoren initiierte (LEE et al. (2013)).

In zahlreichen Untersuchungen wurde Serinhydroxamat (SHX) als Induktor der stringenten Antwort nachgewiesen und eingesetzt (VAN DELDEN et al. (2001), NGUYEN et al. (2011) und KHAKIMOVA et al. (2013)). So wirkt es als Serinderivat hemmend auf die Seryl-tRNA-Synthetase (RIESENBERG et al. (1984)) und signalisiert damit der bakteriellen Zelle Aminosäure- bzw. Serinmangel. In *Pseudomonas aeruginosa* bewirkt die stringente Antwort die verstärkte Expression des Sigma-Faktors RpoS, der in der stationären Phase für die Zelldichte abhängige Produktion zahlreicher Virulenzfaktoren notwendig ist (VAN DELDEN et al. (2001) und ERICKSON et al. (2004)). NGUYEN et al. (2011) zeigten für ausgehungerte Zellen und Biofilmzellen von *Pseudomonas aeruginosa* eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika, die nicht nur auf eine veränderte Zellwandzusammensetzung zurückzuführen war (vgl. dazu VIDUCIC et al. (2006) und UNDEN (2014)). KHAKIMOVA et al. (2013) beschrieben eine direkte Kontrolle der Katalaseaktivität in *Pseudomonas aeruginosa* durch den stringent response und damit eine erhöhte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid.

### 2.2.3 VBNC-Zellen

Der bakterielle VBNC-Zustand („viable but nonculturable“) beschreibt das Phänomen, dass vitale Bakterienstämme in Laborversuchen durch die herkömmlichen auf Kultivierung basierenden Methoden nicht erfasst werden können, da eine Vermehrung auf den Nährmedien ausbleibt. Ihre metabolische Aktivität bleibt allerdings erhalten. (RICE et al. (2000) und RAMAMURTHY et al. (2014)). Erstmals beschrieben XU et al. (1982) für die aus Gewässern isolierten Keime *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* den VBNC-Zustand. Der VBNC-Zustand wird durch ungünstige Umweltparameter ausgelöst und stellt so eine weitere bakterielle Überlebensstrategie dar, mit der eine Bakterienpopulation sich an ihren Standort anpasst (OLIVER et al. (1993)). Der Mechanismus, durch den der VBNC-Zustand induziert wird und der die folgende Stoffwechselanpassung bewirkt,

ist noch unaufgeklärt (vgl. dazu RICE et al. (2000) und RAMAMURTHY et al. (2014)). In der Literatur setzt sich die Annahme durch, dass der VBNC-Zustand eine aktive bakterielle Antwort ist, die mit der Sporulation in beispielsweise *Bacillus* oder mit der Dormanz in *Micrococcus luteus* vergleichbar ist (AERTSEN und MICHIELS (2004)). Der zweifelsfreie Beweis steht noch aus. Erst die Identifizierung der für den VBNC-Zustand verantwortlichen Gene erlauben nach MCDUGALD et al. (1999) eine Aussage darüber. So lassen die momentanen Forschungsschwerpunkte nach RICE et al. (2000) in drei Kategorien unterteilen. Einerseits verfolgen Untersuchungen das Ziel, den VBNC-Zustand in Bakterienzellen zu detektieren und andererseits diese Anpassung durch gezielte Kultivierungsmethoden umzukehren. Im Anschluss darauf versuchen zahlreiche Autoren, die für den VBNC-Zustand verantwortlichen Gene und Stoffwechselwege zu bestimmen. Im VBNC-Zustand werden die Synthese von Makromolekülen und die Zellatmung eingeschränkt, während das intrazelluläre ATP-Niveau und das Membranpotential erhalten bleiben (RAHMAN et al. (1994)). Nach HUA und HO (1996) produzierte *Helicobacter pylori* mehr alkalische Phosphatasen und reduzierte im Gegenzug die Synthese von Ureasen, Leucin-Arylamidasen und spezieller Phosphohydrolasen. Ebenfalls kann sich die Fettsäure- und Proteinzusammensetzung der Lipiddoppelmembran ändern (DAY und OLIVER (2004) und MUELA et al. (2008)). Neben der veränderten Zusammensetzung der Cytoplasmamembran wird die bakterielle Zellwand während des VBNC-Zustandes modifiziert. MAGNET et al. (2008) und SIGNORETTO et al. (2002) berichteten von einer L/D-Transpeptidase vermittelten Verknüpfung zwischen den 2,6-Diaminopimelinsäurebausteinen (DAP) der Peptidoglycankette in *Escherichia coli*.

Neben der Nährstofflimitierung (XU et al. (1982) und WU et al. (2016)) im Falle von *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* (YAMAMOTO et al. (1996)) oder *Listeria monocytogenes* (BESNARD et al. (2000a)) erwiesen sich ungünstige Inkubationstemperaturen für beispielsweise *Aeromonas hydrophila* (MARY et al. (2002)) als Induktoren. Der Salz- (ROTH et al. (1988)) und Sauerstoffgehalt (GAUTHIER (2000)) waren weitere Einflussgrößen. ROLLINS und COLWELL (1986) zeigten sogar, dass die durch Schütteln des Behälters verursachte Bewegung in der Suspension das Ausprägen des VBNC-Zustandes in *Campylobacter jejuni* beeinflusste.

In der neueren Forschung sind die durch Desinfektion induzierten VBNC-Zustände und die anschließende Resuszipation von besonderem Interesse. Grund hierfür ist die Tatsache, dass Zellen im VBNC-Zustand ihre Virulenz behalten oder nachdem sie ihre Kultivierbarkeit wiedererlangen, als pathogener Keim wieder wirken können. So war *Shigella dysenteriae* Typ I nach RAHMAN et al. (1996) in der Lage, im VBNC-Zustand die Shigatoxin codierenden Gene (*stx*) zu exprimieren und damit die eigene Virulenz aufrechtzuerhalten. ALLERON et al. (2013) überführten *Legionella pneumophila* mittels Monochloraminbehandlung in den VBNC-Zustand und wiesen nach, dass durch die Proteinbiosynthese weiterhin Virulenzfaktoren wie das ClpP-Protein produziert wurden. Dagegen verlor nach MAALEJ et al. (2004) *Aeromonas hydrophila* nach Induktion des VBNC-Zustandes durch Langzeitinkubation im Niedrigtemperaturbereich (5 °C) die Fähigkeit zur Bildung von Hämolyisin und zur Adhäsion an McCoy-Zellen. Erst durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur und die damit verbundene Kultivierbarkeit erlangte der Testkeim seine Virulenz zurück. Ähnliches zeigten CAPPELIER et al. (2007) für *Listeria monocytogenes*. Nach Überführen in den VBNC-Zustand ( $LZZ \leq 1$  KBE/mL) durch Aushungern mittels Langzeitinkubation in destilliertem Wasser wurde für diesen Testkeim keine Virulenz mehr nachgewiesen. Erst durch Resuszipation nach Kultivierung in Hühnerembryokulturen bildeten die *Listeria monocytogenes*-Zellen Plaques in Darmzellen (HT29) und besiedelten Mausmilzen.

Die Fähigkeit zur Resuszipation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Das größte Problem besteht darin, den Wiederanstieg in der Lebendzellzahl einer Population als Ursache einer Reaktivierung von VBNC-Zellen fehlzuinterpretieren, obwohl sich stattdessen nur die verbliebenen vitalen Zellen vermehrten (BOGOSIAN et al. (2000)). YAMAMOTO (2000) differenzierte die Resuszipationsfaktoren in drei Kategorien. Im einfachsten Fall genügt die Umkehrung des negativen Umweltfaktors. Beispiele dafür waren der Nährstoffzusatz zu *Vibrio harveyi* und *Vibrio fischeri* nach Aushungern (RAMAIAH et al. (2002)) und die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf das Optimum (MAALEJ et al. (2004) und MAGARIÑOS et al. (1997)). In die zweite Klasse der

Resusztionsfaktoren gehörten Substanzen, die Zellschäden reparieren konnten oder den Replikationsapparat wieder aktivierten. WAI et al. (1996) und KUOKAWA et al. (1999) beschrieben die Wiedererlangung der Kultivierbarkeit von *Vibrio vulnificus* und *Helicobacter pylori* durch Ammoniumchlorid bzw. -sulfat nach Hitzeinaktivierung. Zuletzt wurde der Zusatz von zelleigenen bzw. zelltypischen Signalmolekülen als Notwendigkeit der Resusztion besprochen (KELL und YOUNG (2000)). Nach MUKAMOLOVA et al. (1998) sekretierten vitale Zellen von *Micrococcus luteus* Botenstoffe, die das Wachstum von VBNC-Zellen ermöglichen. So wurde in VBNC-Zellen dieses Bakteriums das so genannte RpF-Protein (resuscitation-promoting factor) identifiziert, das erstmalig als sekretorisches Protein in *Micrococcus luteus* beschrieben wurde (MUKAMOLOVA et al. (2002)) und autokrine oder parakrine Funktionen übernahm. Die Resusztion durch eine parasitäre Lebensweise wird ebenfalls diskutiert. DUCRET et al. (2014) konnten VBNC-Zellen von *Legionella pneumophila* durch die Koinkubation mit Akanthamoeben wieder kultivieren. Das zentrale Stoffwechselprodukt Pyruvat wird in der Literatur als wichtiger Resusztionsfaktor beschrieben, der für verschiedene Bakterien eine reaktivierende Wirkung erzielte (CALABRESE und BISSON-NETTE (1990), LLEÓ et al. (2001), MORISHIGE et al. (2013) und DUCRET et al. (2014)). Allerdings konnten nicht alle Keime, die in den VBNC-Zustand überführt wurden, diesen verlassen. *Enterococcus faecalis* wurde nach Antibiotikabehandlung nachweisbar in den VBNC-Zustand überführt, konnte allerdings nicht wiederbelebt werden (LLEÓ et al. (2007)). *Escherichia coli* konnte durch Supplementzusatz ebenfalls nicht wieder kultiviert werden (ARANA et al. (2007)). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Resusztion vom Induktor abhängig sein kann.

Resistenzen waren mit Eintreten in den VBNC-Zustand assoziiert. LLEÓ et al. (2007) wiesen darauf hin, dass Antibiotika, die eine Wirkung auf den Vermehrungsapparat hatten, keine bzw. nur eine geringe Wirkung auf VBNC-Zellen hatten. Nach EHRlich et al. (2002) erwies sich *Haemophilus influenzae* im VBNC-Zustand als resistent gegenüber Antibiotika und löste weiterhin chronische Ohreninfektionen aus. Nach PASQUAROLI et al. (2013) wirkten *Staphylococcus aureus*-Zellen trotz Biofilmverbund infektiös und nahmen in Anwesenheit von Vancomycin, Quinupristin bzw. Dalfopristin den VBNC-Zustand ein. Dieser fließende Übergang kann nach HU et al. (2012) als wesentliche Ursache dafür angenommen werden, dass Antibiotikabehandlungen nicht anschlagen. Als Beispiel nannten die Autoren Infektionen durch *Mycobacterium tuberculosis*.

In einer Übersicht fasste OLIVER (2010) mögliche Detektionsverfahren für den VBNC-Zustand zusammen. Die „Direct Viable Count“-Methode (DVC) nach KOGURE et al. (1979) erwies sich früh als Referenzverfahren zur klassischen Vitalitätsbestimmung durch Kultivierung. Die zu quantifizierende Zellkultur wird mit einem Antibiotikum (Nalidixinsäure) und Nährstoffen inkubiert. Durch den zugesetzten Gyrasehemmer wird der Replikationsapparat ausgeschaltet, wobei die zelluläre metabolische Aktivität erhalten bleibt. Lebende Bakterien sind als große bzw. verlängerte Zellen direkt auszählbar. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren, die die Vitalität einer Zelle anhand spezieller Merkmale wie beispielsweise einer intakten Cytoplasmamembran (BOULOS et al. (1999)) oder der Anwesenheit von funktionsfähigen Dehydrogenasen (RODRIGUEZ et al. (1992)) bestimmen, stellen mit heutigem Stand der Forschung die Methode der Wahl dar. Zunehmende Bedeutung erfahren die molekularbiologischen Verfahren. Da die Quantifizierung mittels qPCR auch tote Zellen erfasst (MACHADO und BORDALO (2014)), werden mit Ethidium- (EMA), Propidiummonoazid (PMA) oder Propidiumiodid (PI) modifizierte qPCR-Verfahren eingesetzt. Diese Nukleinsäurefarbstoffe sind in der Lage, die geschädigte Cytoplasmamembran toter Zellen zu penetrieren, während die DNA lebender Zellen unzugänglich bleibt. Durch Interkalation in die DNA werden die Azidgruppen lichtinduziert kovalent gebunden. Dadurch wird bei einer DNA-Extraktion die DNA nicht mehr erfasst (NOCKER et al. (2006)). Weitere Methoden zur selektiven Quantifizierung lebender Zellen wie etwa die ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoffen modifizierte Durchflusszytometrie (RAMAMURTHY et al. (2014)) sind beschrieben, finden in der Praxis aber weniger Verwendung (OLIVER (2010)) als die bereits genannten Verfahren.

Für über 60 Bakterienspezies wurde der VBNC-Zustand beschrieben, wobei der Fokus vor allem auf pathogen wirkende Keime gelegt wurde. SALMA et al. (2013) wiesen den VBNC-Zustand sogar in *Saccharomyces cerevisiae* nach.

**Tabelle 1: Bakterien, die den VBNC-Zustand einnehmen können nach OLIVER (2005) und OLIVER (2010)**

<i>Aeromonas hydrophilia</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>Camphylobacter coli</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Camphylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Camphylobacter lari</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Vibrio natriegens</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Vibrio proteolytica</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio shiloi</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Heliobacter pylori</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>citri</i>

Tabellarisch dargestellt sind die in der Literatur genannten Bakterienspezies, die den VBNC-Zustand einnehmen können.

Die mit dem VBNC-Zustand assoziierten Resistenzen von Keimen und die Tatsache, dass ein großer Anteil humanpathogener Keime ihre Virulenz behält oder nach Resusztation wiedererlangt, lassen den VBNC-Zustand als ernstzunehmende Gefahr für die öffentliche Gesundheit erscheinen (RAMAMURTHY et al. (2014)) und sind deswegen Untersuchungsgegenstand zahlreicher Forschungen.

## 2.3 Ziele der Arbeit

Für die vorliegende Arbeit war die grundlegende Fragestellung, ob *Pseudomonas aeruginosa* WR1 dazu befähigt war, den VBNC-Zustand einnehmen zu können. Eine besondere Herausforderung stellte dabei die Bestimmung der Induktoren, durch die dieser Testkeim in den VBNC-Zustand überführt wurde. Anschließend sollte bewertet werden, ob *Pseudomonas aeruginosa* WR1 intrinsisch oder extrinsisch resusziert werden konnte. In Hinblick darauf wurden folgende Aspekte untersucht:

### a. Induktion des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Der Mechanismus, durch den der VBNC-Zustand ausgelöst und auf zellulärer Ebene durchgesetzt wird, ist noch unbekannt (RAMAMURTHY et al. (2014)). Es stellte sich demnach die Frage, ob ein Lethalfaktor ausreichte, um *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in seiner Kultivierbarkeit zu beeinträchtigen oder, ob die Induktion in Abhängigkeit von den Keimeigenschaften multifaktoriell ablief (BOGOSIAN und BOURNEUF (2001)). So wurde die Nährstofflimitierung früh als ein Induktor des VBNC-Zustandes beschrieben (XU et al. (1982)). *Pseudomonas aeruginosa* galt dagegen als besonders inert gegenüber Aushungerung (vgl. dazu LEGNANI et al. (1999)). Ein zusätzlicher Selektionsdruck musste deswegen gefunden werden. Die durch den Lethalfaktor verursachte Schädigung bzw. Beeinträchtigung der Zelle musste allerdings reparabel sein.

### b. Detektion des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Mikroskopische Verfahren, die auf der visuellen Bestätigung stoffwechselaktiver Zellen beruhten, waren schon länger beschrieben (KOGURE et al. 1979). In der neueren Forschung wurde die Methode des DVC durch Vitalfärbung und Fluoreszenzmikroskopie zunehmend verdrängt. Im Vergleich zu anderen nicht mikroskopischen Vitalitätsbestimmungen erlaubten fluoreszenzmikroskopische Verfahren einen direkten Vergleich mit den durch Kultivierung ermittelten Lebendzellzahlen. Neben der Vitalfärbung mit CTC (RODRIGUEZ et al. (1992)) wurde in der neusten Forschung das fluoreszenzmikroskopische Verfahren mit SYTO 9 und Propidiumiodid verwendet (BOULOS et al. (1999)). Beide Verfahren sollten in ihrer Eignung bei der Vitalitätsbestimmung verglichen werden. Im Anschluss daran sollte das effektivere Verfahren für die Detektion von VBNC-Zellen neben der klassischen Kultivierungsmethode angewendet werden.

### c. Resusztation der VBNC-Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Die Fähigkeit, die Vermehrungsfähigkeit nach Annahme des VBNC-Zustandes wiederzuerlangen, wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (OLIVER (2010)). Nicht alle Bakterien konnten den VBNC-Zustand wieder verlassen (ARANA et al. (2007) und LLEÓ et al. (2007)). Für die Resusztation wurden zwei Vorgehensweisen beschrieben. Entweder nach Beseitigung des Induktors (RAMAIAH et al. (2002), MAALEJ et al. (2004) und MAGARIÑOS et al. (1997)) oder durch chemische Stimuli (PINTO et al. (2011)) wurden Zellen wieder kultiviert. Für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 sollte die Fähigkeit zur Resusztation untersucht werden.

### d. Verknüpfung mit dem stringent response

Induktoren, die in der bakteriellen Zelle den VBNC-Zustand auslösten, wirkten ebenfalls als Stressfaktoren. Die Stressantwort auf bakterieller Ebene ist gut dokumentiert (UNDEN (2014)). Aminosäuremangel führte in der Bakterienzelle zum stringent response. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellen, in denen künstlich mittels SHX-Zugabe Serinmangel (RIESENBERG et al. (1984)) provoziert wurde und die mit Wasserstoffperoxid inkubiert wurden, ebenfalls in den VBNC-Zustand überführt und mit Pyruvat reaktiviert werden konnten.

### 3 Material und Methode

Dargestellt sind die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden.

#### 3.1 Mikroorganismen

Die Testkeime wurden der Stammsammlung des Arbeitskreises der Chemischen Mikrobiologie der Universität Wuppertal entnommen. Eingesetzt wurden *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas aeruginosa* WR1.

**Tabelle 2: Testkeime und Herkunftsbezeichnung**

Testkeim:	Herkunft:
<i>Escherichia coli</i> K12	DSMZ (DSM-Nummer: 498)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1	Isolat der Arbeitsgruppe (Dennis Fischer)

Tabellarisch dargestellt sind die verwendeten Testkeime.

#### 3.2 Software

Tabellarisch aufgeführt sind die für diese Arbeit eingesetzten Computerprogramme.

**Tabelle 3: Verwendete Software**

Programm:	Version:	Entwickler:
UV Kinlab	2.80.02	Perkin-Elmer Corporation
Chromeleon	6.40.SP1, Build 711	Dionex
VisiCam Image Analyser	7.1	VWR International

Tabellarisch dargestellt ist die eingesetzte Software.

#### 3.3 Material

Die hier aufgelisteten Chemikalien und Nährmedien stammen aus dem Bestand des Arbeitskreises der Chemischen Mikrobiologie der Universität Wuppertal.

##### 3.3.1 Chemikalien

Tabellarisch aufgeführt sind die Hersteller der in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Enzyme und der übrigen Materialien.

**Tabelle 4: Übersicht über die Herkunft der genutzten Chemikalien bzw. Medienbestandteile**

Substanz:	Hersteller (Ort):
Chemikalien, (Laborqualität)	Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
Medienbestandteile	Difco (Detroit (USA)), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe), VWR (Langenfeld)
D/L-Serinhydroxamat (SHX)	Sigma-Aldrich (St. Louis (USA))
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
5-Cyano-2,3-di-( <i>p</i> -tolyl)tetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tabellarisch zusammengefasst sind die Hersteller der eingesetzten Chemikalien.

Dargestellt sind die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme, ihre Spezifikationen und die Hersteller.

**Tabelle 5: Übersicht über die eingesetzten Enzyme und ihre Spezifikationen**

Enzym:	Spezifikation:	Hersteller (Ort):
Desoxyribonuklease (DNase)	Typ I, bovine pancreas, ≥ Kunitz units/mg	Sigma-Aldrich (St. Louis (USA))
Peroxidase	Typ II, horseradish, 150 – 250 U/mg	
Katalase	Bovine liver, 2000 – 5000 U/mg	
L-Lactat-Dehydrogenase	Typ II, rabbit muscle, 876 U/mg	

Tabellarisch zusammengefasst sind die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme.

### 3.3.2 Nährmedien

Die genutzten Nährmedien wurden entsprechend ihres Verwendungszweckes angesetzt und dann nach einer Sterilisation durch einen Autoklaven und/oder durch Sterilfiltration bis zu dem voraussichtlichen Gebrauch kühl (7 °C) und dunkel gelagert.

## 3.3.2.1 Flüssignährmedien

Aufgelistet sind die Zusammensetzungen der verwendeten Flüssigmedien.

**Tabelle 6: Produktbeschreibung und Inhaltsangabe des verwendeten TSB-Mediums**

Produktbezeichnung:	CASO-Boullion (TSB)	
Inhaltsangabe:	Substanz:	Konzentration am Nährmedium [g/L]:
	Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat)	17
	Pepton aus Soja (Papainhydrolysat)	3
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
	NaCl	5
	Glucose-Monohydrat	2,5
pH-Wert:	7,2 ± 0,2	
eingesetzte Lösung:	Konzentration [g/L]:	Gesamtvolumen (Lösungsmittel) [L]:
	30	1 (Wasser)

Tabellarisch dargestellt sind die Herstellerangaben des TSB-Mediums.

Mineralmedium nach DORN et al. (1974) wurde zur verbesserten pH-Stabilisierung mit der zweifachen Pufferkonzentration angesetzt und in Anlehnung an BIGNUCOLO et al. (2013) mit D-Glucose in einer Endkonzentration von 7,5 mmol/L als Kohlenstoffquelle versetzt.

**Tabelle 7: Grundbestandteile des Mineralmediums**

Substanz:	Einwaage (Lösungsmittel) [g]:
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,05
(NH <sub>4</sub> )Fe(III)-Citrat	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
10 x Spurenelementlösung SL6 nach PFENNIG und LIPPERT (1966)	0,1 mL
D-Glucose	1,35
Gesamtvolumen	ad. 1 L (H <sub>2</sub> O <sub>bidestilliert</sub> )
pH-Wert	7,3 ± 0,2

Tabellarisch dargestellt sind die Grundbestandteile des verwendeten Mineralmediums.

## 3.3.2.2 Feste Nährmedien

## a. TSB-Nährböden

Aufgelistet ist die Zusammensetzung des verwendeten festen Nährmediums. Für die Herstellung wurden zu 30 g des oben beschriebenen TSB-Mediums 15 g Agar-Agar (CASO-Agar-Agar-Kobe-I) gegeben und dieses Gemisch wurde in einem Liter Wasser suspendiert. Nach der Sterilisation mittels eines Autoklaven wurde die leicht abgekühlte Lösung gleichmäßig auf 40 sterile Petrischalen verteilt.

## b. TSB-Nährböden mit Pyruvatzusatz (1 % (w/v))

30 g des oben beschriebenen TSB-Mediums wurden mit 15 g Agar-Agar (CASO-Agar-Agar-Kobe-I) versetzt und in 940 mL Wasser suspendiert. Nach der Sterilisation mittels eines Autoklaven wurde die leicht abgekühlte Lösung mit 50 mL einer sterilfiltrierten Pyruvatlösung (200 g/L) versetzt und nach pH-Werteinstellung mit steriler NaOH-Lösung (120 g/L) wurde auf 1 L mit sterilem Wasser (bidestilliert) aufgefüllt. Anschließend wurde diese Nährlösung ebenfalls gleichmäßig auf 40 sterile Petrischalen verteilt.

## c. TSB-Nährböden mit Acetatzusatz (0,74 % (w/v))

30 g des TSB-Mediums wurden mit 15 g Agar-Agar (CASO-Agar-Agar-Kobe-I) versetzt und in 940 mL Wasser gelöst. Nach der Sterilisation wurde der leicht abgekühlten Lösung 50 mL einer sterilfiltrierten Acetatlösung (148 g/L) zugesetzt. Nach pH-Werteinstellung mit steriler NaOH-Lösung (120 g/L) wurde auf 1 L mit sterilem Wasser (bidestilliert) aufgefüllt und diese Nährlösung wurde danach auch gleichmäßig auf 40 sterile Petrischalen verteilt.

## d. Cetrimid-Nährböden

Analog erfolgte die Herstellung der nach DIN EN ISO 16266:2008-05 definierten Nährböden (VWR Chemicals).

Tabelle 8: Produktbeschreibung und Inhaltsangabe des verwendeten Cetrimid-Agars

Produktbezeichnung:	<i>Pseudomonas</i> Selektivagar/CN-Agar	
Inhaltsangabe:	Substanz:	Zusammensetzung [g]:
	Pepton aus Gelatine (Pankreashydrolysat)	20
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
	MgCl <sub>2</sub>	1,4
	Agar	14
CN-Zusatz (nach Sterilisation):	Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid)	0,3
	Nalidixinsäure	0,015
	Glycerin	10 mL
sonstige Parameter:	Gesamtvolumen	ad. 1 L (H <sub>2</sub> O <sub>bidestilliert</sub> )
	pH-Wert	7,1 ± 0,2

Tabellarisch dargestellt sind die Herstellerangaben bzw. notwendigen Einwaagen für die Herstellung der Cetrimid-Nährböden.

### 3.3.3 Lösungen

Aufgelistet sind die verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzungen. Die phosphatgepufferte Salzlösung stellte in dieser Arbeit chemisch genau definiertes Leitungswasser dar und wurde nach DIN EN ISO 11731-2:2008-06 angesetzt.

**Tabelle 9: Grundbestandteile der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)**

Substanz:	Einwaage (Lösungsmittel) [g]:
NaCl	0,12
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,004
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,05
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,142
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,136
Gesamtvolumen	ad. 1 L (H <sub>2</sub> O <sub>bidestilliert</sub> )

Tabellarisch dargestellt sind die Grundbestandteile der verwendeten phosphatgepufferten Salzlösung.

Die Schwermetalllösung SL6 nach PFENNIG und LIPPERT (1966) wurde zehnfach konzentriert angesetzt und dann dafür im zehnfach reduzierten Volumen zu den benötigten Nährlösungen hinzugegeben.

**Tabelle 10: Bestandteile der Schwermetalllösung (10 x konzentriert)**

Substanz:	Einwaage (Lösungsmittel) [mg]:
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	30
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	30
Gesamtvolumen	ad. 1 L (H <sub>2</sub> O <sub>bidestilliert</sub> )

Tabellarisch dargestellt sind die Grundbestandteile der verwendeten zehnfach konzentrierten Supplementlösung nach PFENNIG und LIPPERT (1966).

Tabellarisch dargestellt sind die nach BADER et al. (1988) einzusetzenden Lösungen für die Wasserstoffperoxidquantifizierung.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der für die Wasserstoffperoxidbestimmung eingesetzten Lösungen**

Lösung:		Peroxidaselösung
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mg/mL]:
Peroxidase	PBS	1
Lösung:		DPD-Lösung
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mg/mL]:
<i>N,N</i> -diethyl- <i>p</i> -phenylendiamin (DPD)	0,05 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
Lösung:		Phosphatpuffer
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mol/L]:
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	0,1 (pH = 6,0)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		

Tabellarisch dargestellt sind die Konzentrationen [mg/mL] der für die Wasserstoffperoxidquantifizierung verwendeten Lösungen.

Tabellarisch dargestellt sind die nach LAMPRECHT und HEINZ (1985) und in Anlehnung an GERHARZ (2003) einzusetzenden Lösungen für die enzymatische Pyruvatquantifizierung.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der für die enzymatische Pyruvatbestimmung eingesetzten Lösungen**

Lösung:		L-Lactat-Lösung
Substanz:	Lösungsmittel:	Aktivität [kU/L]:
L-Lactat-Dehydrogenase-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	225
Lösung:		NADH-Lösung
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mg/mL]:
Nicotinsäureamidadenindinucleotid (NADH, Dinatriumsalz)	0,5 g/L NaHCO <sub>3</sub>	5
Lösung:		Triethanolaminpuffer
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mol/L]:
Triethanolamin · HCl (TEA)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	0,5 (pH = 7,6)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Natriumsalz)		0,005

Tabellarisch dargestellt sind die Konzentrationen [mg/mL] der für die enzymatische Pyruvatquantifizierung verwendeten Lösungen.

Die Proteinquantifizierung erfolgte photometrisch nach BRADFORD (1976) mit Coomassie Brilliant Blue G-250.

**Tabelle 13: Zusammensetzung des für die Proteinbestimmung eingesetzten BRADFORD-Reagenzes**

Lösung:		BRADFORD-Reagenz
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mg/mL]:
Coomassie Brillant Blue G-250 (Natriumsalz)	4,7 % (w/v) Ethanol 8,5 % (w/v) $H_3PO_4$	0,1

Tabellarisch dargestellt ist die Zusammensetzung des für die photometrische Proteinquantifizierung eingesetzten BRADFORD-Reagenzes.

Dargestellt sind die verwendeten Lösungen für die Katalasevolumenaktivitätsbestimmung.

**Tabelle 14: Phosphatpuffer für die Volumenaktivitätsmessung**

Lösung:		Phosphatpuffer
Substanz:	Lösungsmittel:	Konzentration [mol/L]:
$K_2HPO_4$	$H_2O_{\text{bidest.}}$	0,05 (pH = 6,5)
$KH_2PO_4$		

Tabellarisch dargestellt ist die Zusammensetzung des für die Katalasevolumenaktivitätsmessung eingesetzten Phosphatpuffers.

### 3.3.4 Gebrauchsgegenstände

Tabellarisch aufgelistet sind die für diese Arbeit notwendigen, verwendeten Gebrauchsgegenstände. Alle sonstigen im Labor üblichen Verbrauchsmaterialien wurden hier nicht separat aufgeführt.

**Tabelle 15: Auflistung der zusätzlich verwendeten Materialien**

Material:	Spezifikation:	Hersteller:
Polycarbonatfilter	hydrophil; schwarzbraun; 25 mm Durchmesser; 0,2 $\mu\text{m}$ Porengröße; glatt	Merck Millipore (Darmstadt)
UV-transparente Einmal-Küvette	50 $\mu\text{L}$ Mindest-Probenvolumen; 10 mm Schichtdicke; 12,5 mm x 12,5 mm x 45 mm	Sarstedt (Nümbrecht)

Tabellarisch dargestellt sind die benötigten spezifischen Verbrauchsmaterialien.

### 3.3.5 Geräte

Tabellarisch aufgelistet sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte bzw. Apparaturen. Alle im Labor üblichen Kleingeräte wurden hier nicht separat aufgeführt.

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät:	Hersteller:	Model/Spezifikation:
Autoklav	Geringe Infection Control (Rastatt)	HS6606
Vortexer	VWR International LLS (Bruchsal)	VV3
Brutschrank	Heraeus (Hanau)	B 50090 E
Brutkasten	Heraeus (Hanau)	B15
Feinwaage	Kern und Sohn GmbH (Balingen)	ABS80-4
Grobwaage	OHAUS (China)	Ranger 3000
Magnetrührer	Janke & Kunkel (Staufen)	IKAMAG RCT und IKA-COMBIMAG RCT
	Heidolph (Schwabach)	MR 2002
pH-Elektrode	Mettler Toledo	Inlab Routine pH
Spektrometer (1)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)	Genesys 10s UV-Vis
Spektrometer (2)	Perkin Elmer Instruments (Überlingen)	Lambda 40 UV/Vis
Rundschüttler (1)	New Brunswick Scientific (Edison, N.J. (USA))	Gyrotory Water Bath Shaker G76
Rundschüttler (2)	Infors AG (Bottmingen)	Aquatron
Sterilisationsschrank	Memmert (Schönaich)	Typ U40
Ultraschallsonde	Bandelin electronic (Berlin)	Typ UW60
Koloniezähler	Stuart (Stone (UK))	SC 6+
Werkbank	Nunc GmbH (Wiesbaden)	20229 e
UV-Lampe	Degasa-GmbH (Heidelberg)	MinUVIS
Fluoreszenzmikroskop	Olympus (Hamburg)	Olympus BH2-RFC
Mikroskopkamera	VWR International LLS (Bruchsal)	VisiCam 3.0 (½" colour CMOS)
Phasenkontrastmikroskop	Nikon (China)	Nikon Eclipse E 100
Tiefkühltruhe	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)	HFC 286 Basic
Kühlzentrifuge	Sigma Laboratory (Osterode am Harz)	Centrifuges 4K15
Wasserbad	GFL (Brugwedel)	1003
Schüttelwasserbad	VWR International LLS (Bruchsal)	462-0355
French-Press	American Instruments Company (Silver Spring (USA))	French Pressure Cell Press
Tischzentrifuge	Hitachi Koki Co., Ltd. (Neihu District (Taiwan))	CT15E
Thermoblock	Labnet International, Inc. (Woodbridge (USA))	D1200
Vakuumpumpe	VWR International LLS (Bruchsal)	PM20404-8203
Wasserbad	Mechanische Werkstatt (Wuppertal)	Eigenbau („Wuppi“)

Tabellarisch dargestellt sind die eingesetzten Gerätschaften aus dem Bestand des Arbeitskreises der Chemischen Mikrobiologie.

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Allgemeines Vorgehen

Beschrieben sind die allgemeinen Vorgehensweisen und die dazugehörigen Parameter.

#### 3.4.1.1 Stammeskontrolle, Anzucht und Aufbewahrung der Testkeime

Die Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen erfolgte ausschließlich von einer Reinkultur, die nach einem Verdünnungsaufstrich Vermehrung auf einem nach DIN EN ISO 16266:2008-05 definierten Nährboden zeigte. Zusätzlich wurden die bewachsenen CN-Agarplatten kurz unter einer UV-Lampe (366 nm) auf Fluoreszenz der Kolonien hin überprüft. In Flüssigkulturen erfolgte die Stammkontrolle auch durch Überprüfung der Einheitlichkeit der Zellen im mikroskopischen Präparat.

Bei mittelfristigen Standzeiten wurden Reinkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 auf CN-Agarplatten bei 7 °C gelagert. In einem Abstand von maximal 3 Wochen wurden die Organismen auf frisches Medium überimpft.

Für die Langzeitaufbewahrung wurden 0,5 mL einer Übernachtskultur (ca. 16 h, TSB-Medium (30 g/L)) in einem Kryoröhrchen mit 0,5 mL sterilem Glycerin versetzt, sorgfältig vermischt und in einer Tiefkühltruhe bei - 80 °C gelagert.

Zur Beseitigung möglicher Spülmittelreste wurden alle verwendete Anzuchtgefäße bzw. Schikanekolben vor ihrer Sterilisation mehrmals gründlich mit 50 °C heißem Leitungswasser gespült und anschließend sorgfältig mit destilliertem Wasser ausgespült. Die Anzucht und Aufbewahrung von *Escherichia coli* K12 erfolgte parallel auf TSB-Nährböden und in TSB-Flüssigmedium.

#### 3.4.1.2 Zellernte, Ansetzen der Zellsuspension und Trübungsmessung

Eine Flüssigkultur (Tryptic Soy Broth (TSB)-Vollmedium; Inkubation von ca. 16 h) des Testkeimes wurde um den Faktor 10 bzw. 100 mit TSB-Flüssigmedium auf ein definiertes Endvolumen verdünnt und bei 37 °C unter ständigem Schütteln 60 bis 120 Minuten inkubiert. Die Zellernte erfolgte in der (beginnenden) exponentiellen Wachstumsphase. Dafür wurde die Zellsuspension aliquotiert und mittels Zentrifugation (5500 U/min; 10 min; 4 °C) und Resuspendierung der Zellpellets in steriler, phosphatgepufferter Salzlösung insgesamt dreimal gewaschen. Die so erhaltene Zellsuspension stellte die Stammsuspension dar.

Die Trübungsmessung der Bakteriensuspensionen erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm gegen PBS als Nullwert. Dafür wurden die Zellsuspensionen auf maximal OD = 0,3 herunterverdünnt und aus dem Messwert und dem Verdünnungsfaktor wurde die wahre Trübung der Zellsuspension berechnet, die dann für die weiteren Untersuchungen auf die gebrauchte optische Dichte und auf das benötigte Volumen eingestellt werden konnte.

#### 3.4.1.3 Ultraschallbehandlung der Bakteriensuspensionen

Um durch die möglichen gebildeten Zellaggregate entstehenden Ungenauigkeiten bzw. Artefakte in der Lebendzellzahlbestimmung auszuschließen, wurden die Zellsuspensionen mittels einer Sonde mit Ultraschall behandelt (Bandelin electronic Typ UW60). Dafür wurde die in einem 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß vorgelegte Zellsuspension unter Kühlung in einem mit Eis gefüllten Becherglas einer einminütigen Ultraschallbehandlung mit einer Intensität von 20 bis 100 % (100 %  $\approx$  48 Watt)

bei einer Frequenz von 20 kHz und einer Stromaufnahme von 0,3 A unterworfen. Dabei wurde die Ultraschallsonde so in die Zellsuspension getaucht, dass erstens eine homogene Verteilung der Schallwellen garantiert war und ein schlagartiges Entweichen der Flüssigkeit in Form von kleinen Tropfen vermieden wurde. Diese mit Ultraschall behandelten Suspensionen wurden dann in den weiteren Arbeitsschritten untersucht.

#### 3.4.1.4 Lebendzellzahlbestimmung

Die klassische Lebendzellzahlbestimmung durch Auszählen der entstandenen Kolonien nach Kultivierung auf Nährböden stellte in dieser Arbeit das Referenzverfahren für die Beurteilung des mikrobiologischen Zustandes dar. Dabei wurden im Wesentlichen zwei Verfahren angewendet, die sich vor allem in Hinblick auf ihre Bestimmungsgrenze unterschieden.

##### a. Lebendzellzahlbestimmung nach dekadischer Verdünnung

Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte in Anlehnung an DIN 10161-1:1984-02 nach dekadischer Verdünnung der Probensuspensionen in phosphatgepufferter Salzlösung. Jeweils 100 µL der entsprechend benötigten Verdünnungen wurden je ein- oder zweimal auf eine TSB-Agar-Platte ausplattiert und mindestens 24 bis 48 h bei 37 °C bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurden mittels eines Koloniezählers ausgezählt und aus der getätigten Verdünnung, dem eingesetzten Volumen und der Anzahl der ausgezählten Kolonien wurde nach Wichtung gemäß DIN 10161-1:1984-02 der Zelltiter in KBE/mL berechnet.

##### b. Lebendzellzahlbestimmung nach Membranfiltration

Die Lebendzellzahlbestimmung nach Auszählen der entstandenen Kolonien auf dem auf einem Nährboden kultivierten Filter erfolgte nach DIN EN ISO 16266:2008-05. Dafür wurden die Probensuspensionen bei einem Unterdruck von 950 mbar mittels einer Vakuumfiltrationseinheit (Edelstahl, Sartorius (Göttingen)) auf einen Cellulosenitratfilter (47 mm Durchmesser; 0,45 µm Porengröße; Whatman (Japan)) gezogen. Abweichend zur zitierten Norm wurden die Filter dann luftblasenfrei mittels einer sterilen Filterpinzette auf TSB-Agarplatten (TSB/CASO-Agar (30 g/L); Roth (Karlsruhe)) gelegt und 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert.

##### c. Lebendzellzahlbestimmung mittels Zählkammer

Als drittes Verfahren für die Bestimmung der Zellzahl von einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Suspensionen wurde die mikroskopische Zählung der Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer herangezogen. Ein Aliquot einer Suspension bzw. einer Verdünnung der Stammsuspension wurde in die Netzteilung der Kammer (0,05 mm x 0,05 mm x 0,01 mm (Brand)) gegeben und mit einem eingeschlifften Deckglas belegt. Insgesamt wurden die Zellen eines Ansatzes in drei Großquadraten (GQ) mit jeweils 16 Kleinquadraten (KQ) ausgezählt. Der Zelltiter als Zellzahl pro 1 mL (= 1000 mm<sup>3</sup>) berechnete sich wie in Formel 1 beschrieben:

#### Formel 1: Zelltiterbestimmung mittels Zählkammer nach Neubauer

$$\begin{aligned} \text{Zelltiter} \left[ \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} \right] &= \overline{\text{Zellen}_{\text{KQ}}} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{\text{Länge}_{\text{KQ}} \cdot \text{Breite}_{\text{KQ}} \cdot \text{Höhe}} \cdot \text{VF} \\ &= \frac{1000 \text{ mm}^3}{0,05 \text{ mm} \cdot 0,05 \text{ mm} \cdot 0,01 \text{ mm}} \cdot \text{VF} \\ &= 4 \cdot 10^7 \cdot \text{VF} \end{aligned}$$

VF = Verdünnungsfaktor

$$\text{Länge}_{\text{KQ}} = \text{Breite}_{\text{KQ}} = \text{Seitenlänge}_{\text{Kleinquadrat}} = 0,05 \text{ mm}$$

$$\text{Höhe} = \text{Abstand Kleinquadrat und Deckglas} = 0,01 \text{ mm}$$

$$\overline{\text{Zellen}}_{\text{KQ}} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Kleinquadrat}$$

### 3.4.1.5 Wasserstoffperoxidquantifizierung

Mittels Zentrifugation (13000 U/min; 10 min) wurden die Zellen der Probensuspensionen als Pellet abgetrennt und der klare Überstand wurde in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt und in Abhängigkeit von der erwarteten Restkonzentration dekadisch verdünnt. In einer Küvette (Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$ ) wurden  $635 \mu\text{L}$  der Probe mit  $75 \mu\text{L}$  Phosphatpuffer versetzt und anschließend wurden  $12,5 \mu\text{L}$  *N, N*-diethyl-*p*-phenylendiamin (DPD)-Lösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einer Peroxidase-Lösung gestartet und nach kurzem Rühren (10 s) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 551 \text{ nm}$  gemessen. Als Referenz diente ein externer Standard bekannter Konzentration, der parallel aufgearbeitet wurde. Für die Konzentrationsberechnung wurde für das entstehende Semichinondiimin-Radikal-Kation ein molarer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{551} = 21.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BADER et al. (1988)) herangezogen.

Zur Methodvalidierung wurden Wasserstoffperoxidlösungen bekannter Konzentration in einer Verdünnungsreihe angesetzt ( $c \sim 7 - 60 \mu\text{mol/L}$ ) und nach dem oben beschriebenen Verfahren inklusive des vorherigen Zentrifugationsschrittes quantifiziert. Als Vergleich wurden dieselben Standards direkt photometrisch vermessen. Nach BIENERT et al. (2007) wurde für Wasserstoffperoxid ein molarer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ ) angenommen.

### 3.4.1.6 Pyruvatquantifizierung

In Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration wurden die Pyruvatgehalte in den Probensuspensionen enzymatisch mittels der L-Lactat-Dehydrogenase oder per HPLC bestimmt.

Die Pyruvatquantifizierung per HPLC erfolgte in Anlehnung an AMARITA et al. (2001) (C18-Säule; isokratisch ( $2 \text{ g/L H}_3\text{PO}_4$ )) unter Einbezug eines Korrekturfaktors durch externe Kalibrierung ( $c = 0 - 8 \text{ mmol/L}$ ).

**Tabelle 17: HPLC-Geräteparameter**

Pumpe mit Degasser und Gradientensystem:	P580 Pump (Dionex)
Autosampler:	ASI-100 Automated Sample Injector (Dionex)
UV/Vis-Detektor:	UVD340S (Dionex)
Trennsäule:	Knauer; Eurospher-100 Eurospher-100; RP-18; $5 \mu\text{m}$ ; 250-4,6; endcapped

Dargestellt sind die HPLC-Geräteparameter.

**Tabelle 18: Chromatographische Bedingungen für die Pyruvatquantifizierung**

Trennsäule:	100 RP-18; 5 µm, 250-4,6; endcapped
mobile Phase	2 g/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (isokratisch)
Fluss:	1 mL/min
Detektion:	UV-Detektion bei einer Detektionswellenlänge λ = 210 nm
Temperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	10 µL

Dargestellt sind die chromatographischen Parameter für die Quantifizierung von Pyruvat per HPLC.

Die photometrisch-enzymatische Pyruvatquantifizierung erfolgte in Anlehnung an GERHARZ (2003) nach LAMPRECHT und HEINZ (1985) unter Einsatz der L-Lactat-Dehydrogenase. Unter Einbezug eines Korrekturfaktors wurde die Pyruvatkonzentration in den Überständen der abgetrennten Zellsuspension enzymatisch ermittelt. Für den Korrekturfaktor wurde eine Pyruvatlösung bekannter Konzentration ( $c \sim 3 \text{ mg/mL}$ ) in Mineralmedium mit zugesetztem Rinderserumalbumin (2 mg/mL RSA; Fraktion V) analog zu den Proben aufgearbeitet und gelagert. Die Sensitivität dieser Methode wurde abweichend von den Autoren bezogen auf das eingesetzte Photometer (Genesys 10s UV-VIS; Thermo Fisher Scientific) auf  $\Delta E = 0,01 \text{ rel. E.}$  verschärft. Messgröße war der Verbrauch an NADH, der photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 6.300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BERGMEYER (1975)) verfolgt wurde. Dargestellt ist das Pipettierschema in Anlehnung an LAMPRECHT und HEINZ (1985).

**Tabelle 19: Pipettierschema und Arbeitsanweisungen zur photometrisch-enzymatischen Pyruvatquantifizierung**

Substanz:	Volumen [mL]:	Konzentration im Ansatz:
Probe/Standard	0,5	maximal 0,12 mmol/L
Triethanolaminpuffer	0,25	0,160 mol/L (TEA) 1,18 mmol/L (EDTA)
NADH	0,02	0,179 mmol/L
Durchmischung mittels Spatel, 1. Absorptionsmessung E <sub>1</sub>		
L-LDH	0,01	5,76 kU/L
Durchmischung mittels Spatel, nach 10 min 2. Absorptionsmessung E <sub>2</sub>		
L-LDH	0,01	5,76 kU/L
Durchmischung mittels Spatel, 3. Absorptionsmessung E <sub>3</sub>		

Tabellarisch dargestellt sind das Pipettierschema und die Arbeitsanweisungen nach LAMPRECHT und HEINZ (1985) für die enzymatische Pyruvatquantifizierung.

Der Pyruvatgehalt  $c_{\text{Probe}}(\text{Pyruvat})$  [mol/L bzw. mmol/L] in der für die Messung aufbereiteten Probe wurde wie in Formel 2 berechnet.

**Formel 2: Enzymatisch - photometrische Pyruvatquantifizierung**

$$\begin{aligned}
 c_{\text{Probe}}(\text{Pyruvat}) &= \frac{[(E_1 - E_2) - E_3]}{(\epsilon \cdot d)} \cdot \frac{(V_{\text{Probe}} + V_{\text{Puffer}} + V_{\text{NADH}} + V_{\text{L-LDH}})}{V_{\text{Probe}}} \\
 &= \frac{\Delta E}{\left(6300 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}\right)} \cdot \frac{(0,5 \text{ mL} + 0,25 \text{ mL} + 0,02 \text{ mL} + 0,01 \text{ mL})}{0,5 \text{ mL}} \\
 &= \frac{\Delta E}{\left(6300 \frac{\text{L}}{\text{mol}}\right)} \cdot 1,56 = \frac{1,56 \cdot \Delta E \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]}{6300} = \frac{1,56}{6,3} \cdot \Delta E \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right]
 \end{aligned}$$

$E_x$  = Absorptionswert bei der x. Messung

$V_x$  = Volumen der Komponente x in mL

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (NADH) bei  $\lambda = 340 \text{ nm} = 6300 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$

$d$  = Schichtdicke der Küvette = 1 cm

$\Delta E$  = Absorptionswertdifferenz

Zur Methodvalidierung wurden in Anlehnung an GERHARZ (2003) Pyruvatlösung bekannter Konzentration ( $c = 0,006 - 0,16 \text{ mmol/L}$ ) nach dem oben beschriebenen Verfahren quantifiziert. Anschließend wurden dieselben Proben in einem Thermoblock 20 min auf  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und dann durch Lagerung auf Eis auf Raumtemperatur gebracht. Der Pyruvatgehalt der Standards wurde erneut mit demselben Verfahren quantifiziert. Nach eintägiger Lagerung der Standards bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden diese mittels eines Wasserbades auf Raumtemperatur gebracht und die Pyruvatgehalte wieder photometrisch erfasst.

#### 3.4.1.7 Zellaufschluss und Proteinquantifizierung

Ein definiertes Volumen der Probensuspensionen wurde mittels Zentrifugation ( $5500 \text{ U/min}$ ; 20 min;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und anschließender Resuspendierung der Zellpellets in phosphatgepufferter Salzlösung auf ein gewünschtes Endvolumen eingengt. Nach Desoxyribonuklease-Zusatz (ca.  $0,3 \text{ mg}$  oder  $0,1 \text{ mL}$  einer Stammlösung mit  $c = 3 \text{ mg/mL}$ ) wurden die Zellen mittels French-Press bei  $8 \text{ MPa}$  aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation ( $5500 \text{ U/min}$ ; 20 min;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) abgetrennt.

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode nach BRADFORD (1976) durch Coomassie Brilliant Blue G-250-Zugabe und Absorptionmessung bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  unter Berücksichtigung der zugegebenen Enzymmenge. Der Rohextrakt wurde dafür mittels phosphatgepufferter Salzlösung für die Messung geeignet in Abhängigkeit von der erwarteten Proteinkonzentration verdünnt.  $100 \text{ } \mu\text{L}$  dieser Verdünnungen wurden zu  $1000 \text{ } \mu\text{L}$  BRADFORD-Reagenz gegeben. Nach Durchmischung und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min wurden die Proben nach erneuter Durchmischung in Küvetten überführt und photometrisch vermessen. Für die externe Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin ( $c = 0,005 - 0,11 \text{ mg/mL}$ ); RSA; Fraktion V) verwendet. Die lineare Regression aus den Analysewerten liefert die Kalibriergerade der Form  $y = 6,2404 x - 0,0013$  ( $R^2 = 0,9876$ ).

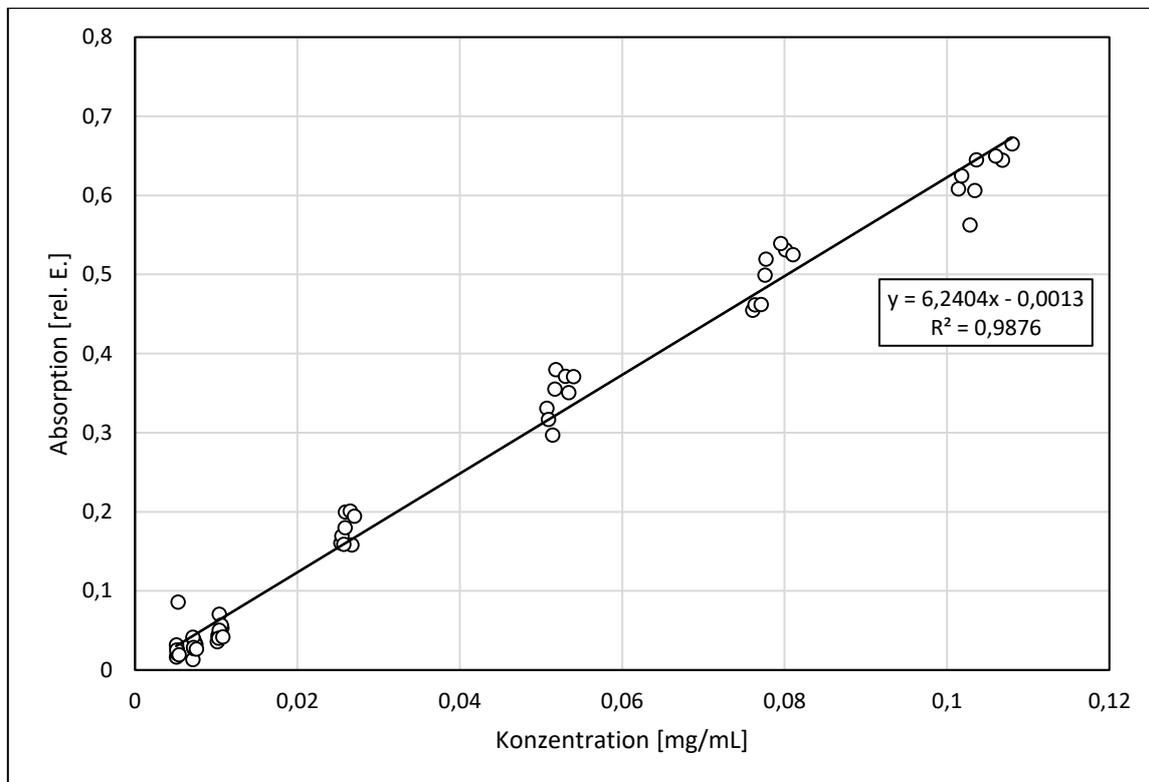


Abbildung 1: Kalibriergerade für die Quantifizierung des Proteingehaltes nach BRADFORD (1976)

100  $\mu\text{L}$  von Proteinlösungen bekannter Konzentration ( $c = 0,005 - 0,11 \text{ mg/mL}$ ) wurden mit 1000  $\mu\text{L}$  BRADFORD-Reagenz versetzt und 2 min bei Raumtemperatur nach Durchmischen inkubiert. Anschließend wurden die Standards nach erneuter Durchmischung photometrisch ( $\lambda = 546 \text{ nm}$ ) vermessen.

### 3.4.1.8 Katalasevolumenaktivitätsbestimmung

Die Katalasevolumenaktivitätsbestimmung erfolgte nach LEßING (2008) in Anlehnung an THÖN et al. (2007). Die Messung fand bei Raumtemperatur aus dem Rohextrakt statt. Dafür wurden 50  $\mu\text{L}$  des Rohextraktes in 950  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer gegeben und mit 2  $\mu\text{L}$  Wasserstoffperoxidlösung (35 % (v/v)) (Konzentration im Ansatz von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 25 \text{ mM}$ ) versetzt. Durch Messen der Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 240 \text{ nm}$  wurde mittels einer Auswertesoftware (UV Kinlab, Perkin Elmer) aus dem linearem Anfangsbereich der Absorptionskurve die Absorptionsdifferenz pro Minute ( $= \Delta E/\text{min}$ ) ermittelt. Für Wasserstoffperoxid wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ ) (BIENERT et al. (2007)) angenommen. Als Blindprobe wurden 50  $\mu\text{L}$  einer Rinderserumalbuminlösung ( $c = 0,26 \text{ mg/mL}$ , Fraktion V, Roth) in den Phosphatpuffer pipettiert und ebenfalls mit 2  $\mu\text{L}$  konzentrierter Wasserstoffperoxidlösung (Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 25 \text{ mmol/L}$ ) versetzt. Anschließend wurde wie oben bereits beschrieben die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 240 \text{ nm}$  für 2 min verfolgt. Die Katalasevolumenaktivität  $A_V$  der Suspension wurde wie in Formel 3 berechnet:

#### Formel 3: Berechnung der Katalasevolumenaktivität

$$A_V \left[ \frac{\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{L}} \right] = \frac{\Delta E}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot \text{min}} \cdot \frac{V_P + V_{ZE} + V_{\text{H}_2\text{O}_2}}{V_{ZE}} \cdot \frac{V_{EV}}{V_{AV}}$$

$$A_V \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right] = A_V \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = A_V \left[ \frac{\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{L}} \right] \cdot \frac{1000 \cdot 1000}{1000} \left[ \frac{\mu\text{mol} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{mL}} \right]$$

$$\frac{\Delta E}{\text{min}} = \text{Absorptionsdifferenz pro Minute}$$

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$  = molare Extinktionskoeffizient ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bei  $\lambda = 240 \text{ nm}$

$V_p$  = Volumen Puffer in Küvette [mL]

$V_{\text{ZE}}$  = Volumen Zellextrakt in Küvette [mL]

$V_{\text{H}_2\text{O}_2}$  = Volumen  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Küvette [mL]

$V_{\text{EV}}$  = Endvolumen (Suspension) nach Zentrifugation [mL]

$V_{\text{AV}}$  = Anfangsvolumen (Suspension) nach Zentrifugation [mL]

Die spezifische Katalaseaktivität  $A_S$  [U/mg] der Suspension wurde aus der ermittelten Volumenaktivität  $A_V$  und dem Proteingehalt  $\beta$  errechnet.

**Formel 4: Berechnung der spezifischen Katalaseaktivität**

$$A_S \left[ \frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{A_V \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right]}{\beta \cdot \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]} = \frac{A_V \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right]}{\beta \cdot \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

### 3.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung

In Vorversuchen wurden die ausgewählten fluoreszenzmikroskopischen Methoden in Hinblick auf ihre Zuverlässigkeit und ihre Wiederfindung überprüft. Als Referenzverfahren diente die klassische Lebendzellzahlbestimmung nach DIN 10161-1:1984-02.

#### 3.4.2.1 CTC-Färbung

Die Vitalfärbung mit 5-Cyano-2,3-ditoly-tetrazoliumchlorid (CTC) erfolgte in Anlehnung an RODRIGUEZ et al. (1992). Ausgehend von Stammsuspensionen mit einer optischen Dichte von  $\text{OD}_1 = 2,0$  und  $\text{OD}_2 = 0,2$  (siehe Punkt 3.3.1.2.) wurden für die Vitalfärbung jeweils  $100 \mu\text{L}$  der  $10^0$ - oder der  $10^{-1}$ -Verdünnung zu  $100 \mu\text{L}$  einer 5-Cyano-2,3-ditolytetrazoliumchloridlösung (Endkonzentration von  $c = 1,6 \text{ mg/mL}$ ) gegeben und 4 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz quantitativ über einen mit PBS angefeuchteten Cellulose-nitratfilter (Porengröße  $0,2 \mu\text{m}$ ; effektive Filterfläche von  $A = 1007 \text{ mm}^2$  (Sartorius stedim)) mittels eines Vakuumfiltrationsgefäßes filtriert und dann mit 10 mL PBS nachgespült. Der Filter wurde in eine Petrischale überführt und im Dunkeln bei Raumtemperatur in einem Exsikkator getrocknet. Anschließend wurde ein Teilstück des Filters zwischen einem Deckglas und einem Objektträger in Immersionsöl eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch (Olympus BH2; Filterkombination G, Anregungsfilter BP 545, Teilerspiegel DM570, Sperrfilter 590) bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels einer Mikroskopkamera (VisiCam 3.0 (½" colour CMOS), VisiCam) und einer Analysesoftware (VisiCam Image Analyser; VWR International, LLC (Darmstadt)) wurden von beliebig ausgewählten Bildausschnitten ( $0,06 \text{ mm} \times 0,045 \text{ mm}$ ) Aufnahmen gemacht und die rot fluoreszierenden Partikel ausgezählt. Aus der Multiplikation des arithmetischen Mittels der roten Partikel pro Gesichtsfeld (GF) mit dem Mikroskopfilterflächenfaktor ( $3,7 \cdot 10^5$  (Quotient aus der effektiven Filterfläche und der Gesichtsfeldfläche)), dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenfaktor wurde der Lebendzelltiter in Lebendzellzahl pro mL bestimmt.

**Formel 5: Zelltiterbestimmung nach CTC-Färbung**

$$\begin{aligned} \text{Zelltiter} \left[ \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} \right] &= \overline{\text{Partikel}}_{\text{GF}} \cdot \frac{A_{\text{Filterfläche}}}{\text{Länge}_{\text{GF}} \cdot \text{Breite}_{\text{GF}}} \cdot \text{VF} \\ &= \frac{\pi \cdot r_{\text{Fritte}}^2}{0,06 \text{ mm} \cdot 0,045 \text{ mm}} \cdot \text{VF} = \frac{\pi \cdot (17,9 \text{ mm})^2}{0,06 \text{ mm} \cdot 0,045 \text{ mm}} \cdot \text{VF} \\ &= \frac{1007 \text{ mm}^2}{2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2} \cdot \text{VF} \\ &= 3,7 \cdot 10^5 \cdot \text{VF} \end{aligned}$$

VF = Verdünnungsfaktor

Länge<sub>GF</sub> = Seitenlänge<sub>Gesichtsfeld</sub> = 0,06 mmBreite<sub>GF</sub> = Seitenbreite<sub>Gesichtsfeld</sub> = 0,045 mm $\overline{\text{Partikel}}_{\text{GF}}$  = durchschnittliche Partikelzahl pro Gesichtsfeld $A_{\text{Filterfläche}}$  = effektive Filterfläche = Fläche<sub>Fritte</sub> =  $\pi \cdot r_{\text{Fritte}}^2$  $r_{\text{Fritte}}$  = Radius<sub>Fritte</sub> = 17,9 mm**3.4.2.2 Live/Dead-Färbung**

Um den eventuellen Einfluss von Zellaggregate auf die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung auszuschließen, wurde für die Methodvalidierung der Vitalfärbung mittels des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight™ Bacterial Viability Kits mit dem Laborstamm *Escherichia coli* K12 gearbeitet. Die dargestellte Methode wurde dann auf Arbeiten mit *Pseudomonas aeruginosa* WR1 übertragen. In Abhängigkeit von der Ausgangslebenszellzahl wurde die 10<sup>-1</sup>- oder die 10<sup>-2</sup>-Verdünnung angefärbt. In Anlehnung an BOULOS et al. (1999) wurde modifiziert nach JOYNER (aufgerufen am 21. Januar 2015) ein Aliquot der Stammsuspension nach einfacher dekadischer Verdünnung mit den Farbstoffen Propidiumiodid (Wirkkonzentration von  $c = 30 \mu\text{mol/L}$ ) und SYTO 9 (Wirkkonzentration von  $c = 5,6 \mu\text{mol/L}$ ) versetzt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 20 min inkubiert. Anschließend wurde die angefärbte Bakteriensuspension auf einen braun-schwarzen Polycarbonatfilter der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert und auf dem Filter ca. 16 h in einer verschlossenen Petrischale in einem Exsikkator unter Lichtausschluss getrocknet. Ein Teilstück des Filters wurde zwischen einem Deckglas und einem Objektträger in Öl (mounting oil) eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch (Olympus BH2; Filterkombination B, Anregungsfilter BP 490, Teilerspiegel DM500, Sperrfilter 515) bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels einer Mikroskopkamera (VisiCam 3.0 (1/2" colour CMOS), VisiCam) und einer Analysesoftware (VisiCam Image Analyser; VWR International, LLC (Darmstadt)) wurden Aufnahmen von den angefärbten Bakterien erfasst. Von insgesamt 40 Gesichtsfeldern (0,06 mm x 0,045 mm) wurden die grün fluoreszierenden Stäbchen (= Lebendzellen) ausgezählt. Aus der Multiplikation des arithmetischen Mittels der Stäbchen pro Gesichtsfeld mit dem Mikroskopfilterflächen- (=  $1,2 \cdot 10^5$ ), dem Volumen- und dem Verdünnungsfaktor wurde der Lebendzelltiter in Lebendzellzahl pro mL bestimmt.

**Formel 6: Zelltiterbestimmung nach LIVE/DEAD-Färbung**

$$\begin{aligned} \text{Zelltiter} \left[ \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} \right] &= \overline{\text{Zellen}}_{\text{GF}} \cdot \frac{A_{\text{Filterfläche}}}{\text{Länge}_{\text{GF}} \cdot \text{Breite}_{\text{GF}}} \cdot \text{VF} \\ &= \frac{\pi \cdot r_{\text{Fritte}}^2}{0,06 \text{ mm} \cdot 0,045 \text{ mm}} \cdot \text{VF} = \frac{\pi \cdot (10 \text{ mm})^2}{0,06 \text{ mm} \cdot 0,045 \text{ mm}} \cdot \text{VF} \end{aligned}$$

$$= \frac{314 \text{ mm}^2}{2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2} \cdot \text{VF}$$

$$= 1,2 \cdot 10^5 \cdot \text{VF}$$

VF = Verdünnungsfaktor

$$\text{Länge}_{\text{GF}} = \text{Seitenlänge}_{\text{Gesichtsfeld}} = 0,06 \text{ mm}$$

$$\text{Breite}_{\text{GF}} = \text{Seitenbreite}_{\text{Gesichtsfeld}} = 0,045 \text{ mm}$$

$\overline{\text{Zellen}}_{\text{GF}}$  = durchschnittliche Anzahl grünfluoreszierender Zellen pro Gesichtsfeld

$$A_{\text{Filterfläche}} = \text{effektive Filterfläche} = \text{Fläche}_{\text{Fritte}} = \pi \cdot r_{\text{Fritte}}^2$$

$$r_{\text{Fritte}} = \text{Radius}_{\text{Fritte}} = 10 \text{ mm}$$

### 3.4.3 Orientierungsversuche

Die dargestellten Versuche dienten der Bestimmung wachstumskinetischer Parameter und dem Ausschluss von Artefakten, die durch die durchgeführte Zellernte bzw. -präparation entstehen und sich negativ auf die Bestimmung der Lebendzellzahl auswirken konnten.

#### 3.4.3.1 Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Flüssigmedien

##### a. TSB-Flüssigmedium:

Eine Flüssigkultur (TSB-Vollmedium; Inkubation von ca. 16 h) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde um den Faktor  $F = 50$  mit TSB-Flüssigmedium auf ein Endvolumen von 100 mL verdünnt und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. In einem Abstand von 30 min wurde ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  min ein definiertes Volumen der Bakteriensuspension entnommen, in ein 2 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt, bis für die Lebendzellzahlbestimmung eine dekadische Verdünnung stattfand. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte wie bereits beschrieben in Anlehnung an DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.1.4).

Parallel wurde die optische Dichte der entnommenen Bakteriensuspension zu den jeweiligen Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung gemessen (siehe Punkt 3.4.1.2).

##### b. Mineralmedium nach DORN et al. (1974) und BIGNUCOLO et al. (2013):

Eine Flüssigkultur (Mineralmedium nach DORN et al. (1974) und BIGNUCOLO et al. (2013)) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde um den Faktor  $F = 5, 10$  oder 100 mit dem gleichen Mineralmedium auf ein Endvolumen von 20 mL oder 200 mL verdünnt und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. In einem Abstand von 15 min wurde ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  min ein definiertes Volumen der Bakteriensuspension entnommen und von diesem Aliquot wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung gemessen. Aus den gewonnenen Ergebnissen der Lebendzellzahlbestimmung wurden die Teilungsrate  $v$  und die Generationszeit  $g$  ermittelt. Die Wachstumsrate  $\mu$  und die Verdopplungszeit  $t_d$  wurden anhand der Zunahme der optischen Dichte als indirektes Maß der Bakterienmasse berechnet.

**Formel 7: Vermehrungsparameter (Bakterienzahl (BZ)):**

$$\text{Teilungsrate } v = \frac{\log N_2 - \log N_1}{(t_2 - t_1) \log 2} = \frac{m_{\text{BZ}}}{\log 2} \left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$$

$$\text{Teilungsrate } v \left[ \frac{1}{\text{h}} \right] = 60 \cdot v \left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$$

$$\text{Generationszeit } g = \frac{1}{v} \text{ [min]}$$

$$\text{Generationszeit } g \text{ [h]} = \frac{g}{60} \text{ [min]}$$

$N_{2/1}$  = Lebendzellzahl zum Zeitpunkt 2/1

$t_{2/1}$  = Zeitpunkt 2/1 [h]

$m_{\text{BZ}}$  = Steigung der linearen Regression für die Bakterienzahl

**Formel 8: Wachstumsparameter (Bakterienmasse (BM)):**

$$\text{Wachstumsrate } \mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} = m \left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$$

$$\text{Wachstumsrate } \mu \left[ \frac{1}{\text{h}} \right] = 60 \cdot \mu \left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$$

$$\text{Verdopplungszeit } t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{m} \text{ [min]}$$

$$\text{Verdopplungszeit } t_d \text{ [h]} = \frac{t_d}{60} \text{ [min]}$$

$x_{2/1}$  = Bakterienmasse zum Zeitpunkt 2/1

$t_{2/1}$  = Zeitpunkt 2/1 [h]

$m_{\text{BM}}$  = Steigung der linearen Regression für die Bakterienmasse

**3.4.3.2 Zentrifugation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen**

Von einer unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Zellkultur von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 wurde zur Lebendzellzahlbestimmung vor und nach jedem Zentrifugations-schritt (5500 U/min; 10 min; 4 °C) eine Aliquot entnommen und auf Eis gekühlt. Die Proben wurden ebenfalls gekühlt und abweichend zur oben beschriebenen Durchführung in demselben Überstand wieder suspendiert. Die *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen wurden zusätzlich unter Phasenkontrast nach Motic bei 1000facher Vergrößerung betrachtet und von zufällig ausgewählten Bildaufschnitten wurden Aufnahmen genommen.

**3.4.3.3 Ultraschallbehandlung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen nach Langzeitinkubation**

Eine unter Punkt 3.4.1.2 beschriebene Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer anfangs eingestellten optischen Dichte von OD = 0,2 wurde in einem Volumen von 20 mL in sterile 100 mL-Schikanekolben überführt, mit 5 mL steriler PBS verdünnt und bei 37 °C unter ständigem

Schütteln inkubiert. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und mit Ultraschall nach Punkt 3.4.1.3 unterschiedlicher Intensität behandelt. Anschließend erfolgte die Lebendzellzahlbestimmung nach DIN 10161-1:1984-02. Parallel wurde die optische Dichte der Zellsuspension vor der Ultraschallbehandlung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm ermittelt. Es wurden insgesamt drei Suspensionen in 3 Schikanekolben untersucht. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden die *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen zusätzlich unter Phasenkontrast bei 1000facher Vergrößerung betrachtet und von zufällig ausgewählten Bildaufschnitten wurden Aufnahmen genommen.

#### 3.4.3.4 Wasserstoffperoxidzehrung durch Pyruvatzusatz

Eine Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration von  $c_0 = 2$  mmol/L wurde um den Faktor  $F = 2$  mit einer Pyruvatlösung ( $c_0 = 14$  mmol/L) verdünnt und bei Raumtemperatur permanent geschüttelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Aliquot dieses Reaktionsansatzes entnommen und anschließend die Wasserstoffperoxidkonzentration direkt oder nach dekadischer Verdünnung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) photometrisch mittels des enzymatischen DPD-Verfahrens (siehe Punkt 3.4.1.5) bestimmt.

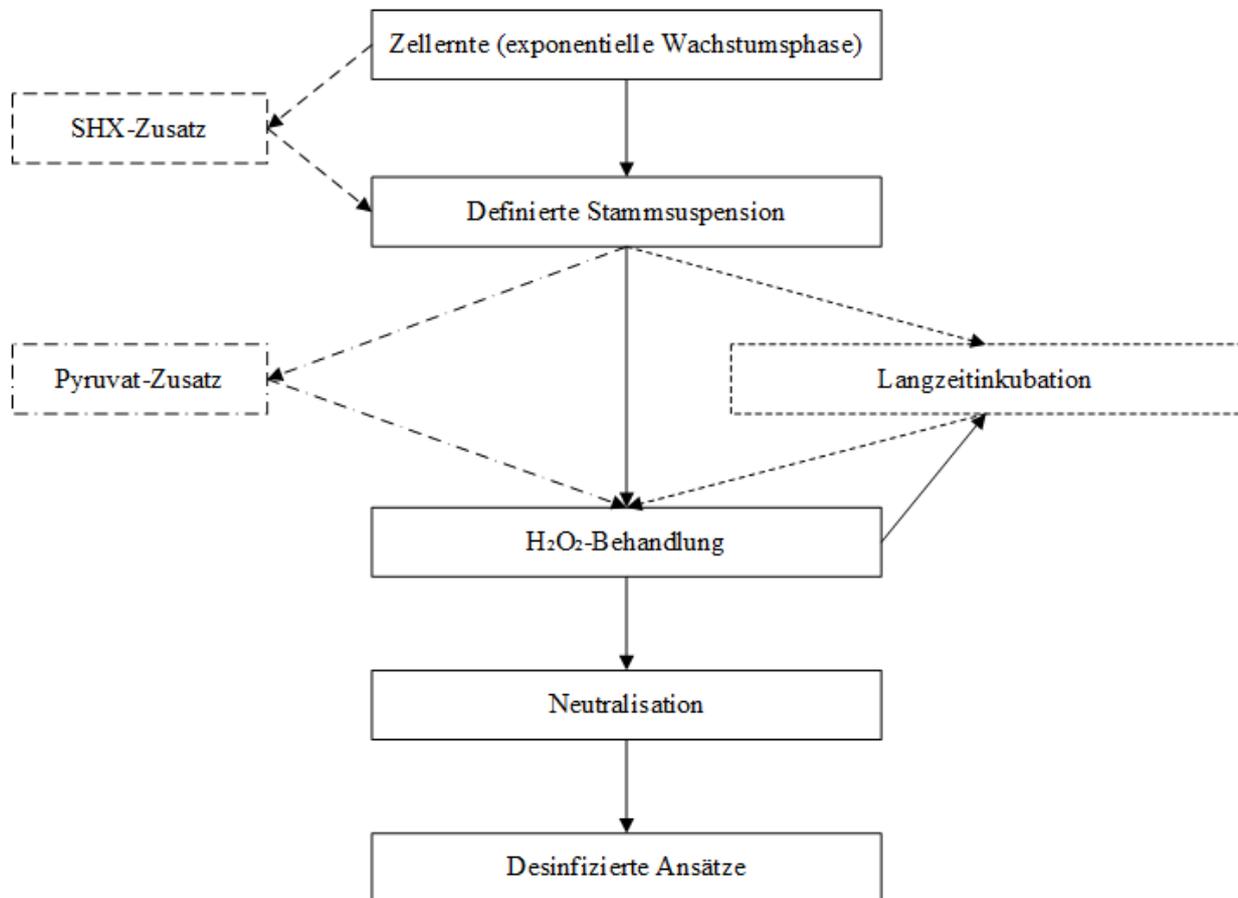
Für die Bestimmung der Pyruvatkonzentration wurde zu dem jeweiligem Untersuchungszeitpunkt ein Aliquot des Reaktionsansatzes ebenfalls entnommen und mit Katalaselösung ( $c = 10$  mg/mL) versetzt. Nach Hitzefällung ( $80$  °C; 20 min), Abkühlung mit Eis und anschließender Abtrennung des präzipitierten Enzyms durch Zentrifugation (5500 U/min; 20 min;  $4$  °C) wurde die Pyruvatkonzentration per HPLC (C18-Säule; isokratisch (0,2 %  $H_3PO_4$ ); Raumtemperatur; siehe Punkt 3.4.1.6) bestimmt.

#### 3.4.4 Langzeitinkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12

Die unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 mit einer eingestellten optischen Dichte von  $OD = 0,2$  wurden in einem Volumen von 20 mL in insgesamt 9 100 mL-Schikanekolben überführt. Jeweils 3 Schikanekolben wurden mit 5 mL steriler physiologischer NaCl-Lösung (0,85 % (w/v)), 5 mL steriler PBS oder 5 mL sterilem, bidestilliertem Wasser versetzt. Anschließend wurden die Proben unter ständigem Schütteln (160 rpm) unter Lichtausschluss bei  $37$  °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden von allen neun Proben Aliquote zur Lebendzellzahlbestimmung nach Punkt 3.4.1.4 und zur Ermittlung der optischen Dichte nach Punkt 3.4.1.2 genommen.

#### 3.4.5 Wasserstoffperoxidbehandlung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Grundlegend wurde eine nährstofffreie bzw. -arme Zellkultur von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in ihrer Ausgangslebendzellzahl definiert angesetzt und dann mit Wasserstoffperoxid versetzt. Nach Neutralisation des Desinfektionsmittels durch Verdünnung oder Katalasezusatz wurde der bakteriologische Zustand der Suspension erfasst. Grafisch dargestellt ist der grundlegende Versuchsdurchlauf der beschriebenen Desinfektionsversuche.



**Abbildung 2: Beurteilung des bakteriologischen Zustandes nach Wasserstoffperoxidbehandlung**

Eine Bakteriensuspension des Testkeimes wurde in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation und Resuspendierung geerntet und dann auf eine definierte optische Dichte eingestellt. Alternativ wurden zu den Proben in der exponentiellen Wachstumsphase zusätzlich D/L-Serinhydroxamat (SHX) zugesetzt. Direkt, nach Zusatz von Pyruvat oder nach Langzeitinkubation wurden die Suspensionen mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) versetzt und inkubiert. Nach Neutralisation des Desinfektionsmittels wurde in den desinfizierten Ansätzen der Rückgang der Lebendzellzahl (LZZ) und der Verbrauch an Wasserstoffperoxid ( $c(\text{H}_2\text{O}_2)$ ) verfolgt.

#### 3.4.5.1 Einsatz von Zellkulturen unterschiedlicher Anfangstrübung

Zu  $850 \mu\text{L}$  einer Versuchssuspension beschrieben nach 3.4.1.2 mit einer anfänglichen optischen Dichte von  $\text{OD}_1 = 2$ ;  $\text{OD}_2 = 1$ ;  $\text{OD}_3 = 0,5$  oder  $\text{OD}_4 = 0,25$  wurden in einem  $2 \text{ mL}$ -Mikroreaktionsgefäß  $850 \mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung mit einer Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,15 \text{ mg/mL}$  gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Schütteln ( $160 \text{ rpm}$ ) wurden für die Lebendzellzahlbestimmung und zur Neutralisierung überschüssigen Wasserstoffperoxids Verdünnungsreihen in phosphatgepufferter Salzlösung angesetzt. Es wurden dann wie unter Punkt 3.4.1.4 beschrieben die Lebendzellzahl und wie unter Punkt 3.4.1.5 die Wasserstoffperoxidkonzentration bestimmt. Jeder Versuchsansatz wurde für die entsprechende Ausgangslebendzellzahl vierfach durchgeführt.

#### 3.4.5.2 Einsatz von Wasserstoffperoxidlösungen unterschiedlicher Konzentration

$850 \mu\text{L}$  einer unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Bakteriensuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer optischen Dichte von  $\text{OD} = 1,0$  wurden in einem  $2 \text{ mL}$ -Mikroreaktionsgefäß mit  $850 \mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung unterschiedlicher Konzentration ( $c = 0 - 2,2 \text{ mg/mL}$ ) versetzt. Danach wurden die Zellsuspensionen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Schütteln ( $160 \text{ rpm}$ ) inkubiert. Nach

einstündiger Inkubation wurden für die Lebendzellzahlbestimmung und zur Neutralisierung überschüssigen Wasserstoffperoxids Verdünnungsreihen in phosphatgepufferter Salzlösung angesetzt. Der Zelltiter wurde dann wie bereits unter Punkt 3.4.1.4 beschrieben bestimmt. Jeder Versuchsansatz wurde für die entsprechende Wasserstoffperoxidkonzentration dreifach durchgeführt. Die Wasserstoffperoxidrestkonzentration wurde nach Punkt 3.4.1.5 quantifiziert.

#### 3.4.5.3 Einsatz von Nährböden mit unterschiedlichen Supplementen

850  $\mu\text{L}$  einer unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Bakteriensuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer optischen Dichte von  $\text{OD} = 2$  wurden in einem 2 mL-Mikroreaktionsgefäß mit 850  $\mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,2 \text{ mg/mL}$  versetzt. Danach wurden die Zellsuspensionen bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Nach einstündiger Inkubation wurden für die Lebendzellzahlbestimmung und zur Neutralisierung überschüssigen Wasserstoffperoxids Verdünnungsreihen in phosphatgepufferter Salzlösung angesetzt. Der Zelltiter wurde dann wie bereits unter Punkt 3.4.1.4 beschrieben bestimmt. Als Nährböden wurden neben TSB-Agarplatten (30 g/L) TSB-Agarplatten, die mit Pyruvat (1 % (w/v)) oder Acetat (0,74 % (w/v)) versetzt wurden (siehe Punkt 3.3.2.2), eingesetzt.

Jeder Versuchsansatz wurde für die entsprechende Wasserstoffperoxidkonzentration dreifach durchgeführt. Die Restkonzentration an Wasserstoffperoxid wurde nach Punkt 3.4.1.5 quantifiziert.

#### 3.4.5.4 Desinfektion mit Chlordioxid und Einsatz von mit Pyruvat supplementierten Nährböden

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an DUCRET et al. (2014). 50 mL der unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Bakteriensuspensionen von *Escherichia coli* K12 oder *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer Anfangstrübung von  $\text{OD} = 0,2$  wurden in sterile 200 mL-Schikanekolben überführt und mit 1 mL einer Chlordioxidlösung ( $c_0(\text{ClO}_2) = 10,2 \text{ mmol/L}$ ) versetzt. Anschließend wurden die Proben 1 h unter ständigem Schütteln (160 rpm) und Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert. Als Referenz dienten nur mit sterilem Wasser (bidestilliert) verdünnte Proben. Vor den Probennahmen für die Lebendzellzahlbestimmung wurden zu allen Ansätzen 5 mL einer steril filtrierten Natriumthiosulfatlösung ( $c_0(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,4 \text{ mmol/L}$ ) gegeben. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur durchmischt. Als Nährböden wurden neben TSB-Agarplatten (30 g/L) TSB-Agarplatten, die mit Pyruvat (1 % (w/v)) versetzt wurden, verwendet. Die Lebendzellzahlen der mit Chlordioxidlösung versetzten Kulturen und der Kontrollansätze wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Insgesamt wurden pro Testkeim 8 Versuchsdurchläufe durchgeführt.

#### 3.4.5.5 Zusatz von Pyruvat und Acetat

In Anlehnung an TROXELL et al. (2014) wurden wie unter Punkt 3.4.1.2 beschrieben definierte Suspensionen mit einer optischen Dichte von  $\text{OD}_1 = 0,5$  oder  $\text{OD}_2 = 0,1$  angesetzt. Die Suspensionen wurden dann in 2 mL-Mikroreaktionsgefäßen mit Wasserstoffperoxid, Pyruvat, Acetat und/oder als Kontrolle nur mit PBS versetzt. Dargestellt ist das Pipettierschema für das Ansetzen der unterschiedlichen Versuchsansätze. Für jeden Versuchsansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

**Tabelle 20: Pipettierschema für den Zusatz von Pyruvat zur Wasserstoffperoxidbehandlung**

Proben:							
eingesetztes Volumen /Bezeichnung:	Zell-suspension (OD = 0,1; OD = 0,5) [μL]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (12 mmol/L) [μL]:	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6 mmol/L) [μL]:	Pyruvat (42 mmol/L) [μL]:	Pyruvat (12 mmol/L) [μL]:	Acetat (12 mmol/L) [μL]:	PBS [μL]:
Kontrolle	1000	0	0	0	0	0	500
1 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000	0	250	0	0	0	250
2 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000	250	0	0	0	0	250
2 mmol/L Pyruvat	1000	0	0	0	250	0	250
7 mmol/L Pyruvat	1000	0	0	250	0	0	250
1 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mmol/L Pyruvat	1000	0	250	0	250	0	0
2 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mmol/L Pyruvat	1000	250	0	0	250	0	0
2 mmol/L Acetat	1000	0	0	0	0	250	250
Externer Standard: 1 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0	250	0	0	0	1250
Externer Standard: 2 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	250	0	0	0	0	1250
Externer Standard: 1 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mmol/L Pyruvat	0	0	250	0	250		1000
Externer Standard: 2 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mmol/L Pyruvat	0	250	0	0	250	0	1000

Tabellarisch dargestellt ist das Pipettierschema für Wasserstoffperoxidbehandlung und die Inkubation mit Pyruvat und Acetat.

### 3.4.5.6 Einsatz von Zellkulturen unterschiedlichen Inkubationsalters

Die unter Punkt 3.4.1.2 beschriebenen Zellsuspensionen mit einer optischen Dichte von  $OD = 1$  wurden in einem Volumen von 100 mL in vier sterile 500 mL-Schikanekolben überführt und bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln (160 rpm) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 d, 1 d, 4 d, 8 d und 12 d) wurden jeweils 850  $\mu\text{L}$  der vier Suspensionen entnommen und separat in 2 mL-Mikroreaktionsgefäße mit jeweils 850  $\mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung einheitlicher Konzentration ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2\text{ g/L}$ ) versetzt. Anschließend wurden die Probenansätze 1 h bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln (160 rpm) inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze, die nur mit sterilem Wasser versetzt wurden.

Für die Lebendzellzahlbestimmung wurden nach Zusatz von 5  $\mu\text{L}$  einer Katalaselösung ( $c = 10\text{ mg/mL}$ ) und nach geeigneter dekadischer Verdünnung (siehe Punkt 3.4.1.4) dieselben Zellsuspensionen zusätzlich zu dem Standard-TSB/CASO-Agar (30 g/L) auch auf supplementiertem Agar (TSB-Pyruvatagar (1 % (w/v); siehe Punkt 3.3.2.2) aufgetragen.

Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde nach Punkt 3.4.1.5 mittels des enzymatischen DPD-Verfahrens bestimmt.

### 3.4.6 Vitalitätsbestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidbehandlung

Eine unter Punkt 3.4.1.2 definierte Stammsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer eingestellten optischen Dichte von  $OD = 1,0$  wurde in einem Volumen von 10 mL jeweils in insgesamt 4 sterile 100 mL-Schikanekolben überführt. Die vier Probensuspensionen wurden dann unter Lichtausschluss bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln inkubiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten (0 d, 2 d, 6 d und 8 d) wurden separat aus den unterschiedlichen Schikanekolben 850  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspensionen in 2 mL-Mikroreaktionsgefäße überführt, mit 850  $\mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2\text{ g/L}$ ) versetzt und erneut 1 h unter ständigem Schütteln (160 rpm) unter Lichtausschluss bei  $37\text{ °C}$  inkubiert (= Desinfektion). Als Kontrolle dienten Versuchsansätze, die statt der Wasserstoffperoxidlösung steriles Wasser enthielten (= Kontrolle). Der externe Standard für die Wasserstoffperoxidquantifizierung bestand aus 850  $\mu\text{L}$  steriler PBS und 850  $\mu\text{L}$  der oben beschriebenen Wasserstoffperoxidlösung.

Vor der Lebendzellzahlbestimmung nach Punkt 3.4.1.4 wurden 250  $\mu\text{L}$  aller Bakteriensuspensionen (Desinfektion und Kontrolle) mit 5  $\mu\text{L}$  einer steril filtrierten Katalaselösung ( $c = 10\text{ mg/mL}$ ) versetzt. Parallel wurden 600  $\mu\text{L}$  der oben genannten Suspensionen mit 12  $\mu\text{L}$  der bereits beschriebenen Katalaselösung versetzt. Anschließend wurden die zweifach dekadischen Verdünnungen dieser mit Katalase versetzten Probensuspensionen in Anlehnung an BOULOS et al. (1999) und modifiziert nach JOYNER (aufgerufen am 21. Januar 2015) mittels des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit nach Punkt 3.4.2.2 fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert.

### 3.4.7 Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser nach Wasserstoffperoxidbehandlung

Die beschriebenen Versuchsdurchführungen untersuchten das Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Langzeitinkubation in nährstoffarmer/ -freier Umgebung.

#### 3.4.7.1 Langzeitinkubation nach Wasserstoffperoxidzugabe in geringer Konzentration

10 mL der unter Punkt 3.4.1.2 definierten Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit unterschiedlichen optischen Dichten ( $OD_1 = 0,1$ ;  $OD_2 = 0,25$  oder  $OD_3 = 0,5$ ) wurden in einen sterilen 100 mL-Schikanekolben überführt und jeweils mit 10 mL einer Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration von  $c(H_2O_2) = 2 \text{ mg/mL}$  versetzt. Anschließend wurden diese Versuchsansätze unter ständigem Schütteln (160 rpm) bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  6 d lang inkubiert. Für jede unterschiedliche Ausgangslebenszellzahl wurden 3 Ansätze angefertigt. Nur mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnte (1:2) Stammsuspensionen stellten die Kontrollen (positive Blindprobe) dar. Als Referenz für die Wasserstoffperoxidzehrung wurden 10 mL der oben genannten Wasserstoffperoxidlösung mit 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt und unter den gleichen Bedingungen ebenfalls inkubiert.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten die Ermittlung der Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den Ansätzen nach Punkt 3.4.1.5 und die Bestimmung der optischen Dichten der Bakterien-suspensionen nach Punkt 3.4.1.2. Die Lebendzellzahlquantifizierung erfolgte nach dem Spatelverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.1.4) mit TSB-Agarplatten und mit Pyruvat supplementierten (1 % (w/v)) TSB-Agarplatten.

#### 3.4.7.2 Langzeitinkubation nach Wasserstoffperoxidzugabe in hoher Konzentration

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bereits unter Punkt 3.4.7.1 beschrieben. Abweichend dazu wurde die Ausgangskonzentration an Wasserstoffperoxid im Ansatz auf  $c(H_2O_2) = 10 \text{ mg/mL}$  hochgesetzt und die Kulturen 8 Tage lang inkubiert. Ferner wurden definierte Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit den optischen Dichten von  $OD_1 = 0,1$  und  $OD_2 = 0,5$  eingesetzt.

#### 3.4.7.3 Lebendzellzahlbestimmung mittels Membranfiltration und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Wasserstoffperoxidbehandlung

In einer zweiten Versuchsdurchführung wurden definierte Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (siehe Punkt 3.4.1.2) mit einer eingestellten optischen Dichte von  $OD_1 \approx 0,125$  dreifach separat mit Wasserstoffperoxid nach Punkt 3.4.7.1 behandelt und anschließend ebenfalls inkubiert.

Zu den 20 mL der mit Wasserstoffperoxid versetzten Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden nach der einstündigen Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss 5 mL steril filtrierte Katalaselösung ( $c = 20 \text{ mg/mL}$ ) gegeben. Anschließend erfolgte die Lebendzellzahlbestimmung mittels Membranfiltration auf Cellulosenitratfilter und mittels dekadischer Verdünnung nach Punkt 3.4.1.4. Von einem Aliquot der mit Wasserstoffperoxid behandelten Suspensionen wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mittels des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits nach Punkt 3.4.2.2 angefertigt und für eine qualitative Aussage betrachtet. Als Kontrolle dienten ebenfalls Ansätze, die statt mit Wasserstoffperoxid mit PBS versetzt wurden.

#### 3.4.7.4 Inkubation mit niedriger Ausgangslebenszellzahl nach Zusatz von abgetöteten Zellen

a. Hitzeinaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen definierten Zelltiters  
Eine auf eine optische Dichte von  $OD = 0,14$  (siehe Punkt 3.4.1.2) eingestellte Zellsuspension wurde in einem Volumen von 100 mL in einen vortemperierten 500 mL-Schikanekolben überführt und in einem Wasserbad unter ständigem Schwenken auf eine Temperatur von  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebracht und dann bei dieser Temperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem Eis-Wassergemisch auf Raumtemperatur gebracht.

b. Präparation der Bakteriensuspension mit niedriger Ausgangslebenszellzahl

Parallel wurde ausgehend von der oben genannten Stammsuspension mit einer optischen Dichte von  $OD = 0,14$  eine Verdünnung angesetzt. Dafür wurde durch Zählung mittels einer Zählkammer nach Neubauer (0,05 mm x 0,05 mm x 0,01 mm (Brand)) die Zellzahl aus der getätigten Verdünnung, der durchschnittlichen Zellzahl pro Großquadrat und dem Kammerfaktor ( $4 \cdot 10^7$ ) approximiert. Anschließend wurde in 8 Verdünnungsschritten diese Zellsuspension um den Faktor  $2 \cdot 10^7$  auf eine ungefähre Zelldichte von 50 KBE/20 mL verdünnt.

c. Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 geringen Ursprungszelltiters nach Zugabe hitzeinaktivierter Zellen

Zu 10 mL der auf eine Zelldichte von  $LZZ = 50\text{ KBE}/20\text{ mL}$  gebrachten Suspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden 10 mL der mittels Hitze inaktivierten Zellsuspension gegeben und 21 h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Lebendzellzahlbestimmung mittels Ausplattieren nach DIN 10161-1:1984-02 und mittels Membranfiltration in Anlehnung an DIN EN ISO 16266:2008-05 nach dem bereits beschriebenen Schema (siehe Punkt 3.4.1.4).

Als Kontrolle dienten zwei verschiedene Versuchsansatztypen. Für die erste Kontrolle wurden 10 mL der Hitze inaktivierten Zellsuspension mit 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt. Für die zweite Kontrolle wurden 10 mL der auf eine Zelldichte von  $LZZ = 50\text{ KBE}/20\text{ mL}$  gebrachten Suspension mit 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung versetzt. Jeder Versuchs- und Kontrollansatz wurde dreifach angesetzt.

#### 3.4.8 Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung und Langzeitinkubation

a. Inkubation nach Wasserstoffperoxidbehandlung

10 mL der jeweiligen nach Punkt 3.4.1.2 definierten Stammsuspensionen ( $OD_1 = 0,15$  und  $OD_2 = 0,5$ ) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden jeweils in 3 sterilen 100 mL-Schikanekolben überführt und jeweils mit 10 mL einer Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration von  $c = 20\text{ mg/mL}$  versetzt. Anschließend wurden diese Versuchsansätze unter ständigem Schütteln (160 rpm) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  14 d lang inkubiert. Nur mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnte (1:2) Stammsuspensionen stellten die Kontrollen (positive Blindprobe) dar. Als Referenz für die Wasserstoffperoxidzehrung wurden 10 mL der oben genannten Wasserstoffperoxidlösung mit 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt und unter den gleichen Bedingungen ebenfalls inkubiert. Die Ermittlung der Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den Ansätzen bzw. die Bestimmung der optischen Dichten der Bakteriensuspensionen erfolgten separat von der Lebendzellzahlbestimmung nach den bereits beschriebenen Schemata (siehe Punkt 3.4.7.1).

b. Probennahmen für die Lebendzellzahlbestimmung und Neutralisierung des überschüssigen Wasserstoffperoxids

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 500 µL der jeweiligen Bakteriensuspensionen aus den Schikanekolben entnommen, zu 10 µL einer steril filtrierten Katalaselösung ( $c = 10 \text{ mg/mL}$ ) gegeben und mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte mittels dekadischer Verdünnung nach DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.1.4). Parallel zu den TSB-Agarplatten (30 g/L) wurden die geeigneten Verdünnungen auch auf TSB-Agarplatten mit Pyruvatzusatz (1 % (w/v)) aufgetragen.

c. Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen

850 µL der mit Wasserstoffperoxid versetzten und inkubierten Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten erneut in einem 2 mL-Mikroreaktionsgefäß mit 850 µL einer Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration  $c = 2 \text{ mg/mL}$  versetzt und 1 h unter ständigem Schütteln (160 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte wie bereits beschrieben auf TSB-Agarplatten (30 g/L) und auf TSB-Agarplatten mit Pyruvatzusatz (1 % (w/v)) (siehe Punkt 3.4.7.1).

Die Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid wurde durch die Darstellung des Abtötungsquotientens  $A_q$  beschrieben. Der Abtötungsquotient  $A_q$  ist definiert als der Quotient aus der abgetöteten Anzahl an Bakterien und der dafür verbrauchten Stoffmenge an Wasserstoffperoxid.

**Formel 9: Berechnung des Abtötungsquotientens**

$$A_q = \frac{\Delta \text{KBE}}{\Delta n(\text{H}_2\text{O}_2)} = \frac{(\text{KBE}_1 - \text{KBE}_0)}{(n_1(\text{H}_2\text{O}_2) - n_0(\text{H}_2\text{O}_2))} = \frac{(\text{LZZ}_1 \cdot V_B - \text{LZZ}_0 \cdot V_{BA})}{(c_1(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot V_1 - c_0(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot V_0)}$$

$$= \frac{(\text{LZZ}_1 \cdot 0,85 \text{ mL} - \text{LZZ}_0 \cdot 0,85 \text{ mL})}{(c_1(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot 0,85 \text{ mL} - c_0(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot 0,85 \text{ mL})} = \frac{(\text{LZZ}_1 - \text{LZZ}_0) \cdot 0,85 \text{ mL}}{(c_1(\text{H}_2\text{O}_2) - c_0(\text{H}_2\text{O}_2)) \cdot 0,85 \text{ mL}} = \frac{(\text{LZZ}_1 - \text{LZZ}_0)}{(c_1(\text{H}_2\text{O}_2) - c_0(\text{H}_2\text{O}_2))}$$

$\Delta \text{KBE}$  = Differenz der kultivierbaren Zellen im Ansatz [KBE]

$\Delta n(\text{H}_2\text{O}_2)$  = Stoffmengendifferenz von Wasserstoffperoxid im Ansatz [mmol]

$\text{KBE}_x$  = Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten zum Zeitpunkt x [KBE]

$n_x(\text{H}_2\text{O}_2)$  = Wasserstoffperoxidstoffmenge im Ansatz zum Zeitpunkt x [mmol]

$\text{LZZ}_x$  = Lebendzellzahl zum Zeitpunkt x  $\left[ \frac{\text{KBE}}{\text{mL}} \right]$

$c_x(\text{H}_2\text{O}_2)$  = Wasserstoffperoxidkonzentration zum Zeitpunkt x  $\left[ \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \right]$

$V_{A/B}$  = eingesetztes Suspensionsvolumen für den Ansatz [mL] = 0,85 mL

$V_{0/1}$  = eingesetztes Lösungsvolumen für den Ansatz [mL] = 0,85 mL

### 3.4.9 Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen

Die Katalasevolumenaktivität wurde nach Zellaufschluss nach Punkt 3.4.1.7 im Zellextrakt durch Absorptionsmessung nach Punkt 3.4.1.8 ermittelt.

#### 3.4.9.1 Langzeitinkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Jeweils 120 mL einer nach Punkt 3.4.1.2 angesetzten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer optischen Dichte von  $OD = 1$  wurden in insgesamt 24 sterile 500 mL-Schikanekolben überführt und bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln (160 rpm) maximal 20 d im Dunkeln inkubiert. Für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden jeweils von 3 Versuchsansätzen 100 mL der inkubierten Suspension entnommen und mittels Zentrifugation (5500 U/min; 20 min;  $4\text{ °C}$ ) und Resuspendierung auf ein Endvolumen von  $V_2 = 10\text{ mL}$  aufkonzentriert. Die Rohextraktgewinnung erfolgte nach der beschriebenen Vorgehensweise (siehe Punkt 3.4.1.7). Die Volumenaktivität der Katalase wurde bei Raumtemperatur aus dem Rohextrakt bestimmt (siehe Punkt 3.4.1.8). Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode nach BRADFORD (1976) durch Coomassie Brilliant Blue G-250-Zugabe und Absorptionsmessung bei  $\lambda = 595$  (siehe Punkt 3.4.1.7). Von dem verbliebenen Restvolumen der Probensuspensionen in den Schikanekolben wurde die optische Dichte mittels Trübungsmessung (siehe Punkt 3.4.1.2) erfasst.

#### 3.4.9.2 SHX-Zugabe zu *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen

Mit Mineralmedium nach DORN et al. (1974) mit 1,35 g/L D-Glucose (siehe Punkt 3.3.2.1) wurde *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase (optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546\text{ nm}$  von ca.  $OD = 0,3 - 0,4$ ) angezogen. Serinhydroxamat (SHX; D/L (Sigma-Aldrich)) wurde dann in einer Endkonzentration von  $c = 500\text{ }\mu\text{mol/L}$  zum Ansatz hinzugegeben und die Kultur wurde bis zur Zellernte 75 min weiter bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln inkubiert (= SHX). Zellkulturen mit Wasserzugabe stellten die Kontrolle (= Kontrolle) dar. Für die Trübungsmessung wurden Aliquote der Zellsuspensionen auf maximal  $OD = 0,3$  herunterverdünnt und aus dem Messwert und dem Verdünnungsfaktor wurde die wahre Trübung der Zellsuspension berechnet (siehe Punkt 3.4.1.2). Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte nach DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.1.4). Parallel zu den TSB-Agarplatten (30 g/L) wurden dieselben geeigneten Verdünnungen auch auf TSB-Agarplatten mit Pyruvatzusatz (1 % (w/v)) aufgetragen.

100 mL der oben beschriebenen Kulturen wurden mittels Zentrifugation (5500 U/min; 20 min;  $4\text{ °C}$ ) und anschließender Resuspendierung der Zellpellets in phosphatgepufferter Salzlösung auf 3 mL eingeeengt. Nach Desoxyribonuklease-Zusatz (ca. 3 mg) wurden die Zellen per French-Press aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5500 U/min; 20 min;  $4\text{ °C}$ ) abgetrennt (siehe Punkt 3.4.1.7).

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode nach BRADFORD (1976) durch Coomassie Brilliant Blue G-250-Zugabe und Absorptionsmessung bei  $\lambda = 595\text{ nm}$  (siehe Punkt 3.4.1.7).

Die Volumenaktivität der Katalase wurde bei Raumtemperatur aus dem Rohextrakt nach THÖN et al. (2007) bzw. LEßING (2008) bestimmt (siehe Punkt 3.4.1.8) und mittels des Proteingehaltes und der Volumenaktivität wurde die spezifische Katalaseaktivität  $A_S$  berechnet. Die Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl  $A_{LZZ}$  [U/KBE] ergab sich in Anlehnung an die Berechnung der spezifischen Katalaseaktivität  $A_S$  als Quotient aus der Volumenaktivität  $A_V$  [U/mL] und der Lebendzellzahl LZZ [KBE/mL].

**Formel 10: Berechnung der Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl**

$$A_{LZZ} \left[ \frac{U}{KBE} \right] = \frac{A_v \left[ \frac{U}{mL} \right]}{LZZ \left[ \frac{KBE}{mL} \right]}$$

**3.4.10 Wasserstoffperoxidbehandlung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen nach SHX-Zugabe**

Die nach Punkt 3.4.9.2 mit SHX inkubierte Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden mittels Zentrifugation (5500 U/min; 20 min; 4 °C) und anschließender Resuspendierung der Zellpellets in phosphatgepufferter Salzlösung dreimal gewaschen und anschließend auf eine definierte optische Dichte eingestellt. Diese Suspensionen stellten je nach ausgewählter optischer Dichte (OD<sub>1</sub> = 0,1; OD<sub>2</sub> = 0,25; OD<sub>3</sub> = 0,5 oder OD<sub>4</sub> = 1,0) die Stammsuspensionen dar.

850 µL der jeweiligen, definierten Stammsuspensionen wurden jeweils in 3 separaten Ansätzen mit 850 µL einer Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration  $c = 2 \text{ mg/mL}$  versetzt und 1 h unter ständigem Schütteln (160 rpm) bei 37 °C inkubiert. Mittels dekadischer Verdünnung wurde mögliches, überschüssiges Desinfektionsmittel inaktiviert und die Lebendzellzahl durch Ausplattieren nach Punkt 3.4.1.4 auf TSB-Agarplatten (30 g/L) und auf TSB-Agarplatten mit Pyruvatzusatz (1 % (w/v)) ermittelt. Nicht mit Wasserstoffperoxid behandelte Stammsuspensionen stellten die Kontrolle dar. Die Restkonzentration an Wasserstoffperoxid wurde nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation nach BADER et al. (1988) (siehe Punkt 3.4.1.5) ermittelt. Als Referenz diente ein externer Standard mit definierter Wasserstoffperoxidkonzentration.

**3.4.11 Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium nach Wasserstoffperoxidzusatz****a. Vorversuch für die Ermittlung geeigneter Ansätze (1/10)**

Um abschätzen zu können, welches Inokulum notwendig war, damit bei der gewählten Ausgangskonzentration von Wasserstoffperoxid ( $c = 500 \text{ µmol/L}$ ) ein Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 noch gerade stattfand, wurden Versuchsansätze hergestellt, die sich in ihrer Animpfmenge unterschieden. Dafür wurde *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in einer Übernachtskultur (ca. 16 h; 37 °C; 160 rpm) aus Mineralmedium nach DORN et al. (1974) mit 1,35 g/L Glucose angezogen, mittels Zentrifugation und Resuspendierung der Pellets mit steriler, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) dreimal gewaschen und dann auf eine optische Dichte von OD = 0,1 ( $\lambda = 546 \text{ nm}$ ) eingestellt. Nach dem unten aufgelisteten Pipettierschema wurden dann in 100 mL-Schikanekolben die unterschiedlichen Versuchsansätze (1 - 5) angefertigt.

**Tabelle 21: Pipettierschema der unterschiedlichen Ansätze für den Vorversuch**

Schikanekolben (Bezeichnung):	Mineralmedium [mL]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (3,5 %) [µL]	Suspension (OD = 0,1) [mL]	PBS (steril) [mL]
1 (0,1)	15	7,5	0,1	0,9
2 (0,2)			0,2	0,8
3 (0,4)			0,4	0,6
4 (0,8)			0,8	0,2
5 (1,0)			1,0	0

Mineralmedium mit einer anfänglichen Wasserstoffperoxidkonzentration von  $c = 500 \text{ µmol/L}$  wurde mit unterschiedlichen Volumina einer definierten Stammlösung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 angeimpft. Die einzelnen Volumina der unterschiedlichen Lösungen bzw. der Suspension sind in den Spalten vermerkt.

Das Wachstum der verschiedenen Versuchsansätze wurden anhand der Lebendzellzahl nach Punkt 3.4.1.4 und der optischen Dichte nach Punkt 3.4.1.2 verfolgt. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde nach Punkt 3.4.1.5 quantifiziert.

b. Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium nach Wasserstoffperoxidzusatz

Eine Übernachtskultur (ca. 16 h) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium (siehe Punkt 3.3.2.1) wurde mittels Zentrifugation und Resuspendierung der Pellets dreimal gewaschen und mit steriler, phosphatgepufferter Salzlösung auf eine optische Dichte von  $OD = 0,1$  ( $\lambda = 546 \text{ nm}$ ) eingestellt. Die vier Versuchsansätze wurden mit dieser Suspension beimpft.

150 mL des Mineralmediums wurden jeweils in vier sterile 500 mL-Schikanekolben überführt und separat mit 7,5  $\mu\text{L}$  einer Wasserstoffperoxidlösung (35 % (v/v)) versetzt. Anschließend wurden pro Ansatz 4 mL der Stammsuspension und 6 mL sterile, phosphatgepufferte Salzlösung hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei 37 °C unter ständigem Schütteln (160 rpm) und Lichtausschluss inkubiert.

Als Kontrolle dienten vier Zellkulturansätze, zu denen statt des Wasserstoffperoxids 7,5  $\mu\text{L}$  steriles, destilliertes Wasser zugesetzt wurden. Durch einen Leerwert wurde das Quenching an Wasserstoffperoxid ohne Bakterien in den Ansätzen nachvollzogen.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 d, 1 d, 2 d, 3 d, 6 d und 8 d) wurden von jedem Ansatz separat 5 mL entnommen, mit 0,1 mL einer steril filtrierten Katalaselösung ( $c \leq 20 \text{ kU/mL}$ ) versetzt und nach 20 min wurden je 4,5 mL von diesen insgesamt 8 unterschiedlichen Suspensionen zentrifugiert (5500 U/min; 20 min; 4 °C). Die Überstände wurden vorsichtig entnommen und in Anlehnung an GERHARZ (2003) 20 min lang auf 80 °C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Die Proben wurden zentrifugiert und die dadurch entstandenen Überstände wurden bis zur Pyruvatquantifizierung bei -18 °C gelagert. Die Pyruvatquantifizierung erfolgte in Anlehnung an GERHARZ (2003) nach LAMPRECHT und HEINZ (1985) unter Einsatz der L-Lactat-Dehydrogenase wie unter Punkt 3.4.1.6 beschrieben.

Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte in den verbliebenen 0,5 mL der mit Katalaselösung versetzten Suspensionen nach dekadischer Verdünnung mittels Ausplattieren auf Nährböden nach DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.1.4).

Von den 4 Versuchsproben und den 4 Kontrollproben wurden jeweils 20 mL durch Zentrifugation (5500 U/min; 20 min; 4 °C) und anschließender Suspendierung in phosphatgepufferter Salzlösung auf ein Endvolumen von je  $V = 0,5 \text{ mL}$  eingengt. Nach Desoxyribonuklease-Zusatz (0,1 mL einer Stammlösung mit  $c = 2,5 \text{ mg/mL}$ ) wurden aus den eingengten Zellsuspensionen per French-Press Rohextrakte gewonnen (siehe Punkt 3.4.1.7). Aus den insgesamt 8 unterschiedlichen Rohextrakten heraus erfolgten die Proteinbestimmung in Anlehnung an BRADFORD (1976) (siehe Punkt 3.4.1.7) und die Ermittlung der Katalaseaktivität nach THÖN et al. (2007) bzw. LEßING (2008) (siehe Punkt 3.4.1.8).

Die Quantifizierung des Analyten Wasserstoffperoxids erfolgte wie bereits beschrieben in Anlehnung an BADER et al. (1988) unter Berücksichtigung eines externen Standards (siehe Punkt 3.4.1.5). Bei hohen erwarteten Analytkonzentrationen mussten die Proben nach der Zentrifugation dekadisch verdünnt werden, damit die eingesetzte DPD-Menge im Überschuss verblieb.

## 4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt dargestellt und beschrieben sind die Ergebnisse der unter Punkt 3.4 dargestellten Versuche.

### 4.1 Wasserstoffperoxidquantifizierung (Methodenvalidierung)

Die enzymatisch-photometrische Quantifizierung von Wasserstoffperoxid nach BADER et al. (1988) beruht auf der durch die Peroxidase katalysierten Umsetzung von *N, N*-diethyl-*p*-phenylendiamin. Die Messgröße war das dabei entstehende Semichinondiimin-Radikal-Kation, das photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 551 \text{ nm}$  mit einem hohen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 21.000 \text{ L}^1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  erfasst wurde.

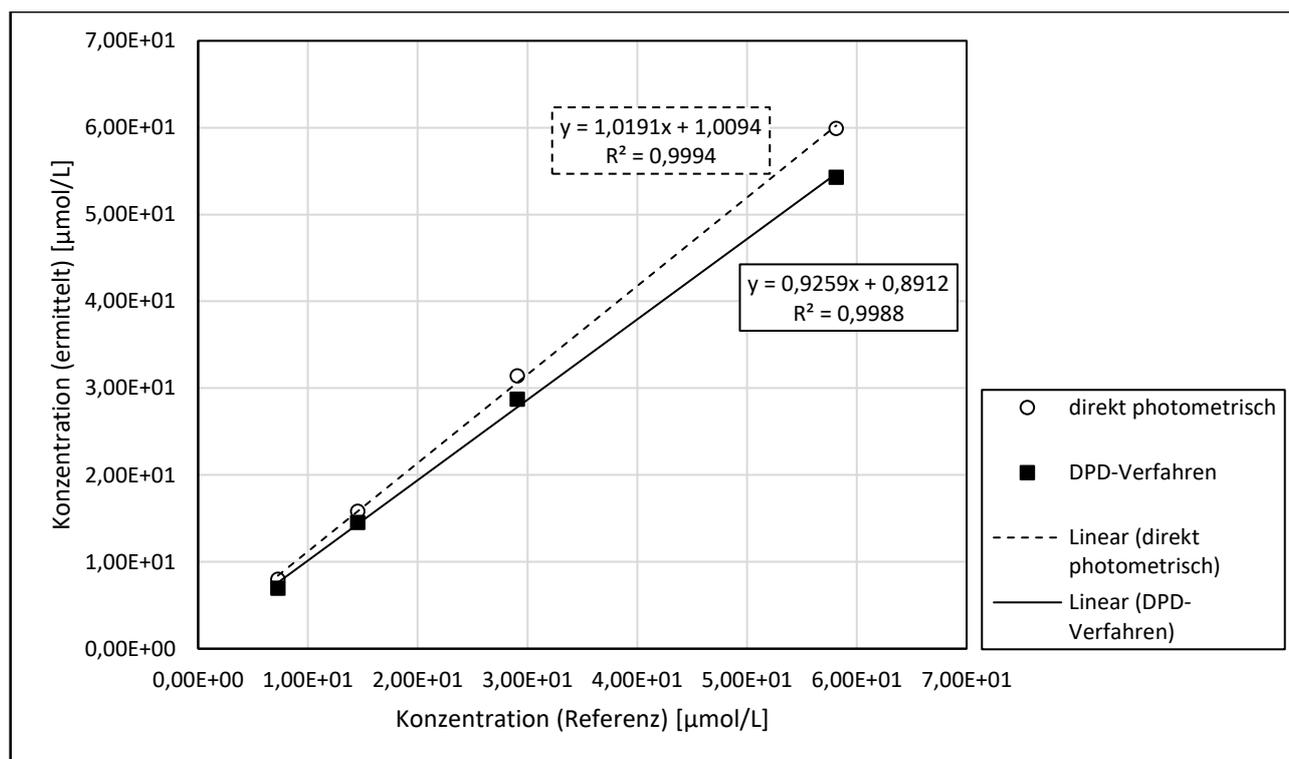


Abbildung 3: Quantifizierung von Wasserstoffperoxid (Methodenauswahl)

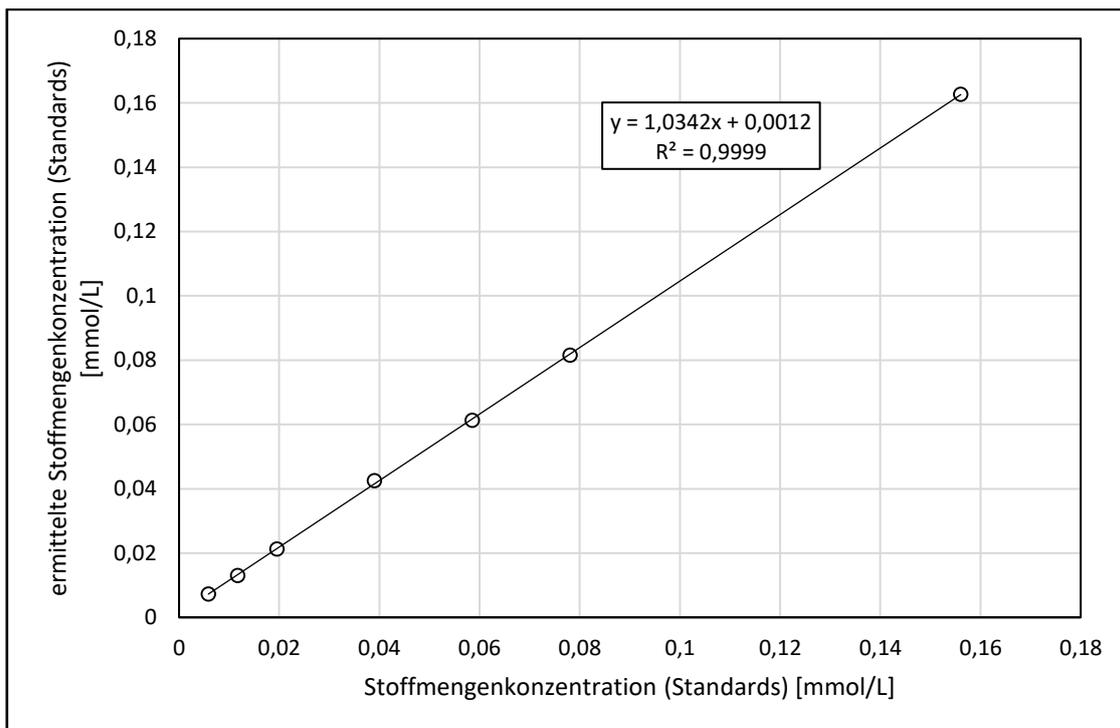
Als Vergleichsverfahren zum oben dargestellte DPD-Verfahren diene die direkte photometrische Messung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 240 \text{ nm}$ . Die Analyseergebnisse beider Verfahren wurden ins Verhältnis zu den Herstellerangaben (Referenz) gesetzt. Dargestellt ist die photometrisch ermittelte Wasserstoffperoxidkonzentration in ausgewählten Standards in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode. Ausgehend von einer Wasserstoffperoxidlösung (35 % (v/v)) wurden verschiedene Verdünnungen angesetzt, deren Analytgehalt mittels der zwei Verfahren quantifiziert wurde.

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde anhand der Geradengleichung ( $y = mx + b$ ) der linearen Regression nachvollzogen. In dem ausgewählten Konzentrationsbereich wiesen beide Verfahren eine gleich gute Korrelation zur tatsächlich eingesetzten Wasserstoffperoxidkonzentration auf, was anhand der Bestimmtheitsmaße mit  $R^2 \sim 1$  deutlich wurde. Während die direkte photometrische Messung zu leichten Überbefunden neigte (Steigung  $m > 1$ ), wurde durch das DPD-Verfahren die Analytkonzentration geringfügig unterschätzt ( $m < 1$ ). Insgesamt waren die dargestellten Abweichungen allerdings so minimal, dass zunächst von zwei gleichwertigen Verfahren ausgegangen wurde. Die in der Literatur beschriebenen Vorteile (BADER et al. (1988)), insbesondere die hohe Spezifität infolge des Peroxidaseinsatzes, die niedrige Grenze des praktischen Arbeitsbereichs aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten und die einfache Durchführbarkeit des Verfahrens

fürten zu der Entscheidung, dass bei Wasserstoffperoxidquantifizierung das enzymatisch katalysierte DPD-Verfahren eingesetzt wurde.

## 4.2 Pyruvatquantifizierung (Methodenvalidierung)

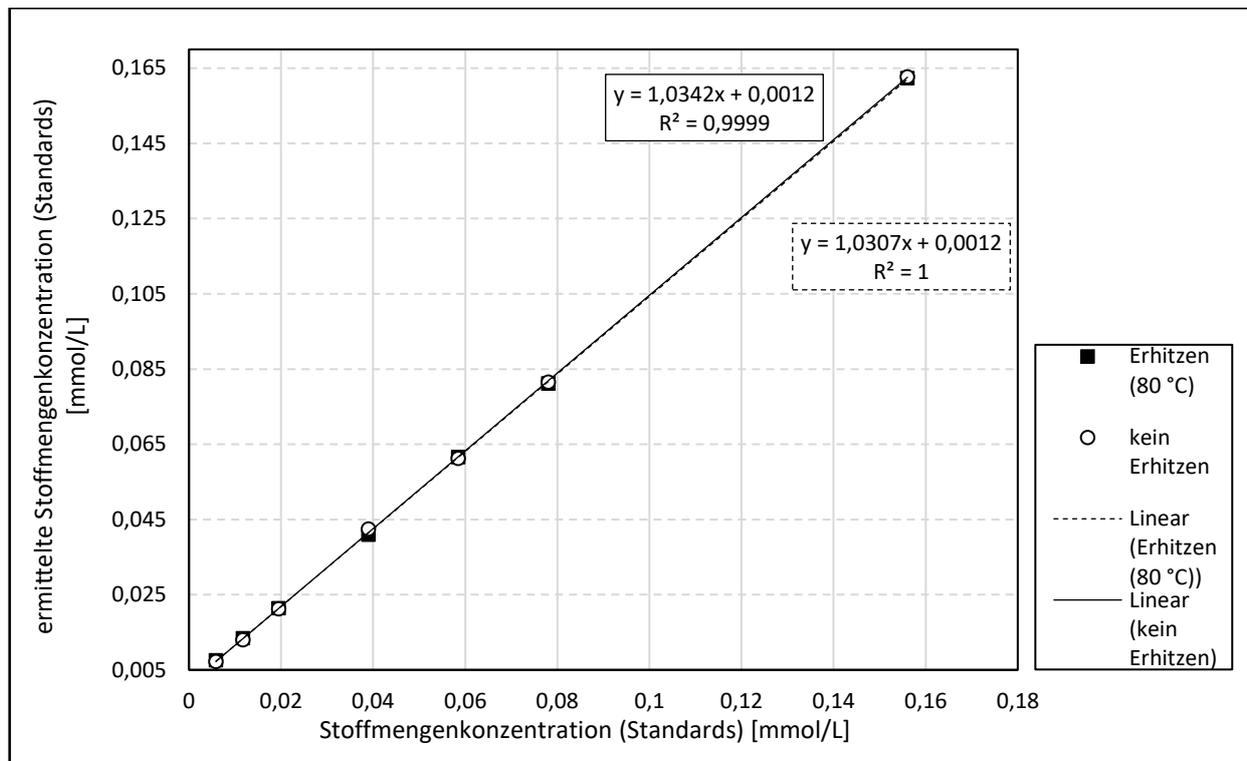
Um die Richtigkeit der Methode bei der Anwendung auf weitere Versuche zu gewährleisten, wurden die Pyruvatgehalte in den definierten Standards direkt, nach Erhitzung (80 °C) und Abkühlen und nach Erhitzung, Einfrieren (- 18 °C) und Entfrostung bestimmt und gegen die getätigte Einwaage aufgetragen. Vor allem niedrige Konzentrationsbereiche mussten exakt ermittelt werden. Als Referenz für die Analytausbeute mit Vorbehandlung der Standards diente die Korrelation zwischen der theoretischen Stoffmengenkonzentration und der durch die photometrische Vermessung ermittelten Stoffmengenkonzentration.



**Abbildung 4: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte mit der getätigten Einwaage**

Eine definierte Menge an Pyruvat wurde in Mineralmedium solvatisiert, zweifach dekadisch mit demselben Medium verdünnt und in 2 Ansätze aliquotiert. Aus diesen zwei Pyruvatverdünnungen wurden dann zwei Verdünnungsreihen (ca.  $c = 0,005 - 0,15$  mmol/L im Ansatz) angesetzt, die enzymatisch nach GERHARZ (2003) in Anlehnung an LAMPRECHT und HEINZ (1985) quantifiziert wurden (siehe Punkt 3.4.1.6). Dargestellt sind die enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte [mmol/L] in Mineralmedium in Abhängigkeit von der aus der Einwaage berechneten Stoffmengenkonzentration [mmol/L].

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde auch hier anhand der Geradengleichung ( $y = mx + b$ ) der linearen Regression nachvollzogen. Steigungen ( $m$ ) mit einem Wert von  $m \sim 1$  und Ordinatenabschnitte mit  $b \sim 0$  bestätigten die korrekte Analytausbeute durch die Methode. Es kam nur zu geringfügigen Überbefunden. Darüber hinaus konnte anhand dieser externen Kalibrierung die Grenze des praktischen Arbeitsbereiches abgeschätzt werden. Die Richtigkeit der Methode für den gewählten Konzentrationsbereich wurde darüber hinaus durch das Bestimmtheitsmaß mit  $R^2 \sim 1$  überprüft.



**Abbildung 5: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte in einem erhitzten und nicht erhitzten Mineralmedium**

Die unter Abbildung 4 beschriebenen Pyruvatstandards wurden vor ihrer photometrischen Vermessung für 20 min auf 80 °C erhitzt, anschließend auf Eis gekühlt und dann auf Raumtemperatur gebracht. Als Bezugsgrößen wurden wieder die auf Grundlage der Einwaage berechneten Stoffmengenkonzentrationen herangezogen. Dargestellt sind die enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte [mmol/L] in Mineralmedium in Abhängigkeit von der aus der Einwaage berechneten Stoffmengenkonzentration [mmol/L] und der vorgeschalteten Temperierung bei 80 °C.

Die thermische Beanspruchung der Standards führte zu keiner signifikanten Änderung in der Geradengleichung der linearen Regression. Die Steigung  $m$  und der Ordinatenabschnitt  $b$  blieben in ihren Werten nahezu unverändert, was auch anhand des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  deutlich wurde.

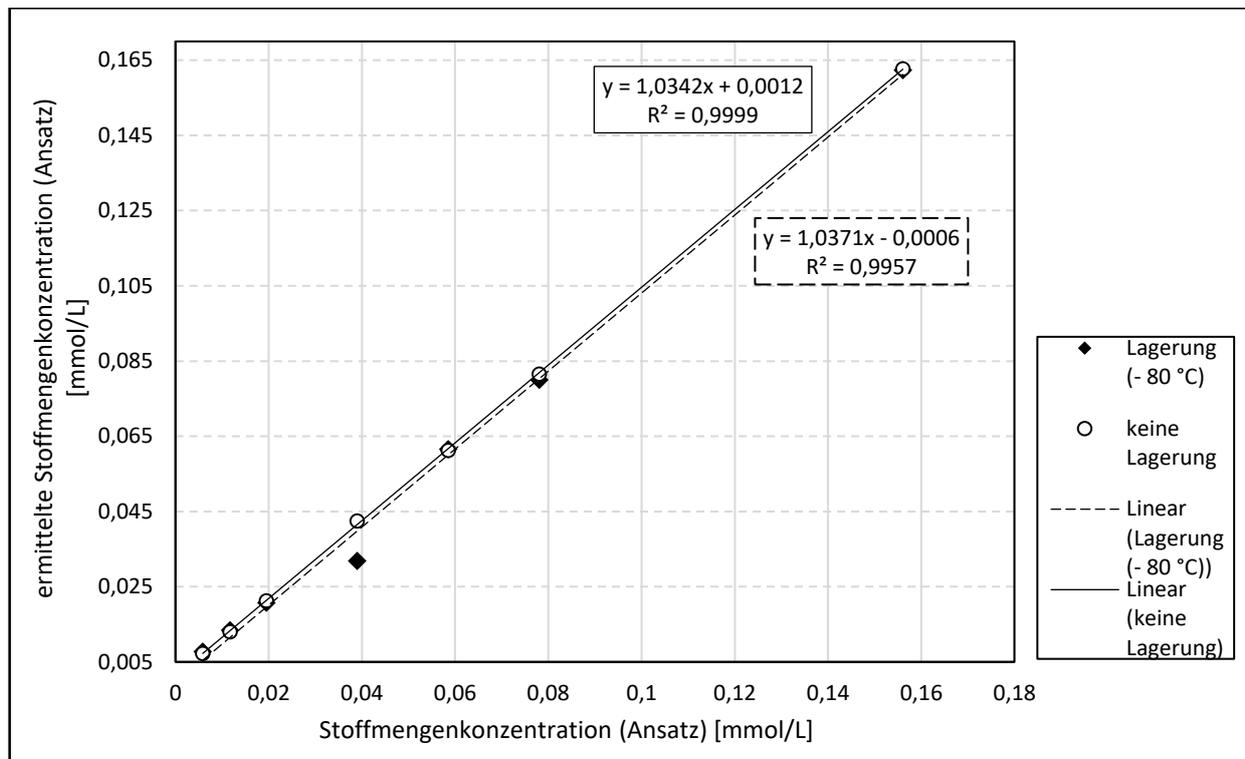


Abbildung 6: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte nach Lagerung bei - 18 °C

Die oben bereits beschriebenen Verdünnungsreihen (ca.  $c = 0,005 - 0,15$  mmol/L im Ansatz) wurden nach ihrer Vermessung über Nacht (16 h) bei - 18 °C gelagert und anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Es folgte dann ebenfalls nach dem oben beschriebenen Schema (siehe Punkt 3.4.1.6) die Quantifizierung des Pyruvats in den Standards. Dargestellt sind die enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte [mmol/L] in Mineralmedium in Abhängigkeit von der aus der Einwaage berechneten Stoffmengenkonzentration [mmol/L] und der Lagerung bei - 18 °C.

Der bereits beschriebene Trend, dass eine Vorbehandlung der Proben keinen Einfluss auf die Wiederfindung hatte, zeigte sich auch bei der Lagerung der Standards bei - 18 °C. Die Steigung  $m$  der Geradengleichung und der Ordinatenabschnitt  $b$  der linearen Regression waren annähernd konstant mit den Werten  $m \sim 1$  und  $b \sim 0$ . Die Güte der Methode litt über den gewählten Konzentrationsbereichen nicht unter der gewählten Vorbehandlung der Proben bzw. Standards, so dass für niedrige, erwartete Analytkonzentrationen die enzymatische Pyruvatquantifizierung eingesetzt wurde.

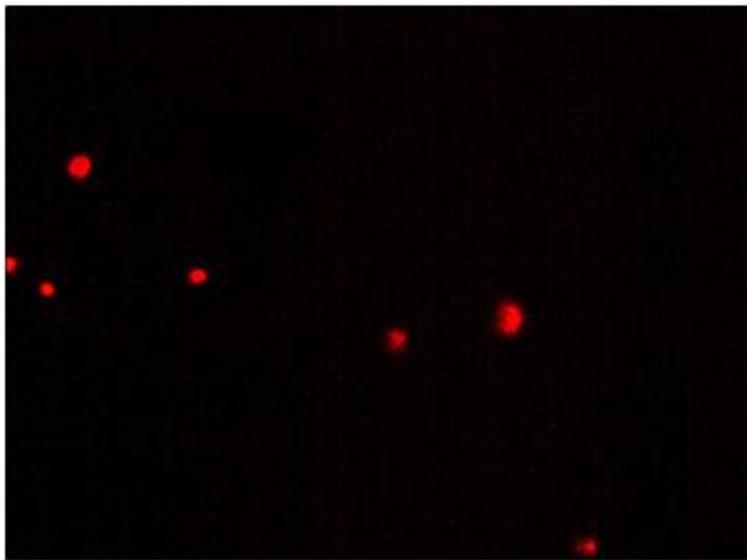
### 4.3 Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung

Die fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung fungierte als qualitatives oder quantitatives Referenzverfahren für die klassische Lebendzellzahlbestimmung durch Kultivierung (siehe Punkt 3.4.1.4). Darüber hinaus erlaubte die fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung aufgrund ihrer Verfahrensweise einen direkten Vergleich mit der Kultivierungsmethode.

#### 4.3.1 Zelltiter einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kultur nach CTC-Färbung

Durch den Einsatz einer Zellkultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein Anteil an vitalen Zellen von nahezu 100 % angenommen. Die Güte der Lebendzellzahlquantifizierung nach Anfärben mit 5-Cyano-2,3-di-(*p*-tolyl)-tetrazoliumchlorid wurde anhand der Keimausbeute nachvollzogen.

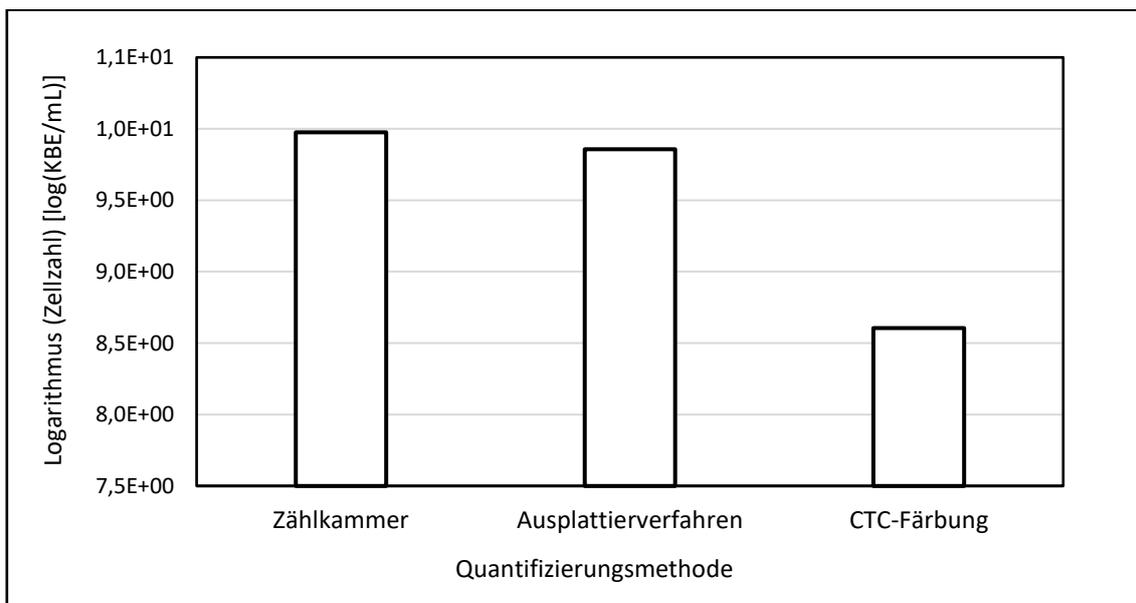
Exemplarisch wird ein zufällig ausgewählter Bildausschnitt gezeigt. Jedes rot fluoreszierende Partikel wurde dabei als eine angefärbte und damit auch als vitale Zelle angesehen.



**Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von mit CTC angefärbten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1**

Dargestellt ist ein zufällig ausgewählter Bildausschnitt von einem mit gefärbten *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellen belegten Filter. Die Dimensionen des Gesichtsfeldes (Bildausschnittes) wurden zuvor für das eingesetzte Okular (12,5 x) und Objektiv (100x) nach einer Kalibrierung mit Hilfe einer Analysesoftware und einem Kalibrierungsdiagramm (Motic) bestimmt. Für die dargestellte Fotografie wurde ein Teilstück des Filters zwischen einem Deckglas und einem Objektträger in Immersionsöl eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels einer Mikroskopkamera und einer Analysesoftware wurde die Aufnahme durchgeführt.

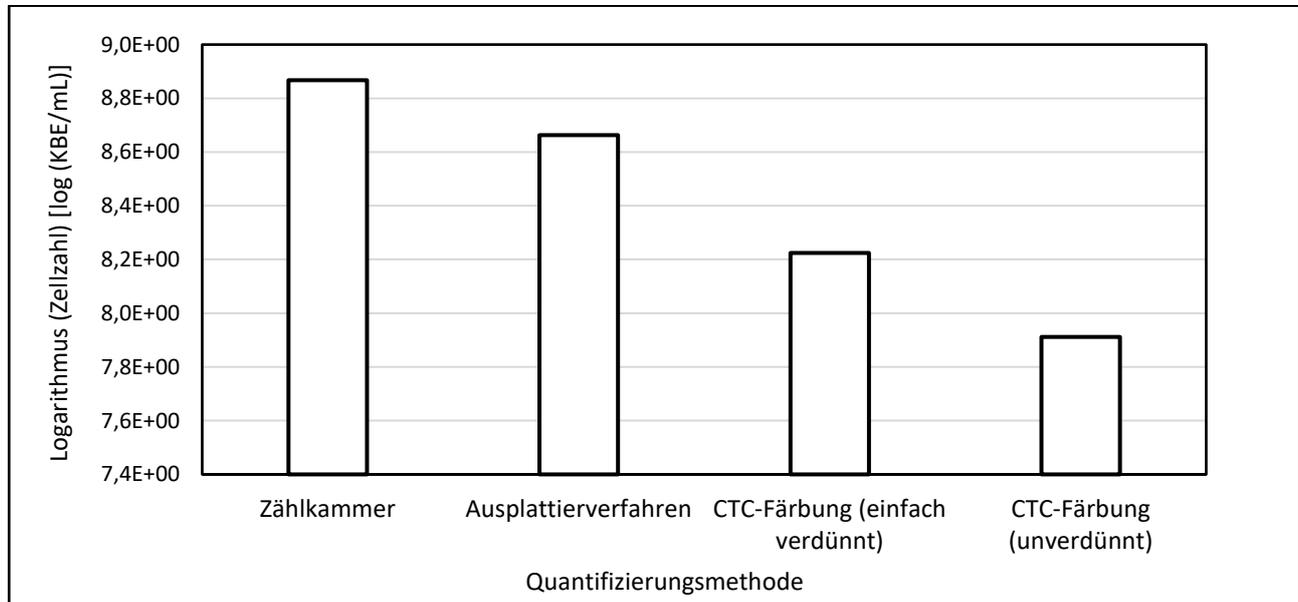
Ausgehend von einer Stammsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer optischen Dichte von  $OD = 2,0$  wurden die in Abbildung 8 dargestellten Zelltitere ermittelt.



**Abbildung 8: Zelltiter einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension ( $OD = 2,0$ ) bestimmt durch unterschiedliche Quantifizierungsmethoden**

Von einer eingestellten Stammsuspension ( $OD = 2,0$ ) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (siehe Punkt 3.4.1.2) wurde der Zelltiter per Zählkammer nach Neubauer, durch Kultivierung nach dekadischer Verdünnung (siehe Punkt 3.4.1.4) und mittels fluoreszenzmikroskopischer Zählung nach CTC-Färbung (siehe Punkt 3.4.2.1) ermittelt. Dargestellt ist der Logarithmus der (Lebend)zellzahl [log(KBE/mL)] einer definierten Zellsuspension ( $OD = 2,0$ ) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode.

Die Quantifizierung mittels der CTC-Färbung unterlag deutlich in ihrer Wiederfindung der klassischen Ausplattiermethode und der Zählung mittels Zählkammer. Ungefähr nur ein Zehntel der durch die Ausplattiermethode ermittelten Lebendzellzahl wurde durch die fluoreszenzmikroskopische Methode nach CTC-Färbung wiedergefunden. Im Gegensatz dazu entsprach die durch Kultivierung untersuchte Lebendzellzahl annähernd der durch die Zählkammer erfassten Gesamtzellzahl. Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit bei der Zellzahlbestimmung durch CTC-Färbung zu überprüfen, wurde die Ausgangszellzahl reduziert.



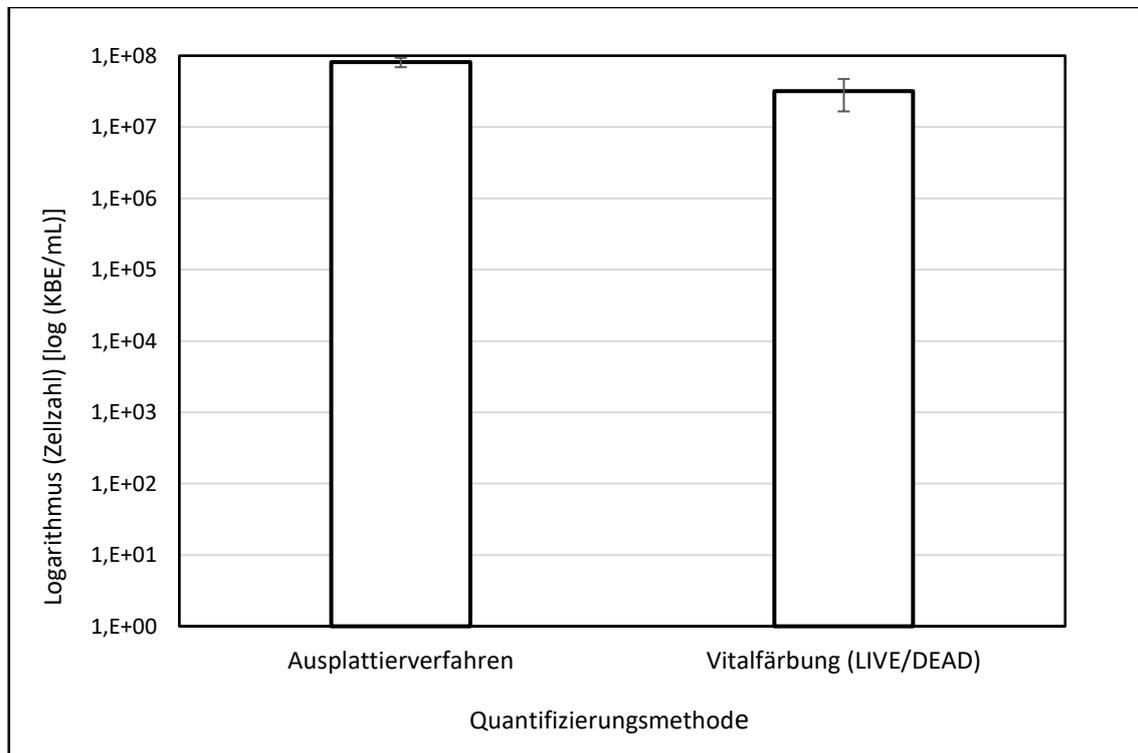
**Abbildung 9: Zelltitel einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension (OD = 0,2) bestimmt durch unterschiedliche Quantifizierungsmethoden**

Abweichend zu der oben beschriebenen Versuchsdurchführung (siehe Abbildung 8) stellte eine auf eine optische Dichte von OD = 0,2 eingestellte Bakteriensuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 die Stammsuspension dar. Bei der Lebendzellzahlbestimmung mittels der CTC-Färbung wurde die Stammsuspension direkt (unverdünnt) oder nach zehnfacher Verdünnung angefärbt. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor F = 10 wurde auf die ursprüngliche Zellzahl zurückgerechnet. Dargestellt ist der Zelltitel [KBE/mL] einer definierten Zellsuspension (OD = 0,2) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode und dem Ursprungszelltitel.

Deutlich war eine Konzentrationsabhängigkeit der CTC-Färbung vom Ursprungszelltitel zu erkennen. Wurde die Bakteriensuspension erst um den Faktor F = 10 verdünnt, dann mit CTC angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht, wurden unter Berücksichtigung dieses Verdünnungsschrittes doppelt so viele Zellen gefunden wie beim direkten Anfärben der Testsuspension. Dennoch unterlag die Färbemethode in ihrer Keimausbeute der klassischen Kultivierungsmethode ca. um einen Faktor von F = 3. Die durch Kultivierung bestimmte Lebendzellzahl entsprach bei der auf ein Zehntel verringerten Ausgangslebendzellzahl ungefähr zu zwei Drittel der durch die Zählkammer erfassten Gesamtzellzahl. Die lange Inkubationsdauer, die geringe Wiederfindung und die in der Literatur beschriebenen Nachteile (OLTMANN (1999)) führten zum Entschluss ein fluoreszenzmikroskopisches Alternativverfahren einzusetzen (siehe Punkt 4.3.2).

### 4.3.2 Zelltiter einer *Escherichia coli* K12-Kultur nach Live/Dead-Färbung

Die Methodenentwicklung für die Lebendzellzahlbestimmung mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits wurde abweichend zur CTC-Färbung mit *Escherichia coli* K12 als Modellkeim durchgeführt. Grund dafür war der Ausschluss von möglichen Zellclustern, die bei *Pseudomonas aeruginosa* WR1 lichtmikroskopisch beobachtet wurden.



**Abbildung 10: Unterschiedliche Quantifizierung von *Escherichia coli* K12-Zellen**

Das klassische Ausplattierverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 und die fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung mit dem LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit in Anlehnung an BOULOS et al. (1999) bzw. modifiziert nach JOYNER (aufgerufen am 21. Januar 2015) wurden in ihrer Wiederfindung verglichen (siehe Punkt 3.4.1.4 und Punkt 3.4.2.2). Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl einer definierten *Escherichia coli* K12-Suspension in Abhängigkeit von der getätigten Quantifizierungsmethode.

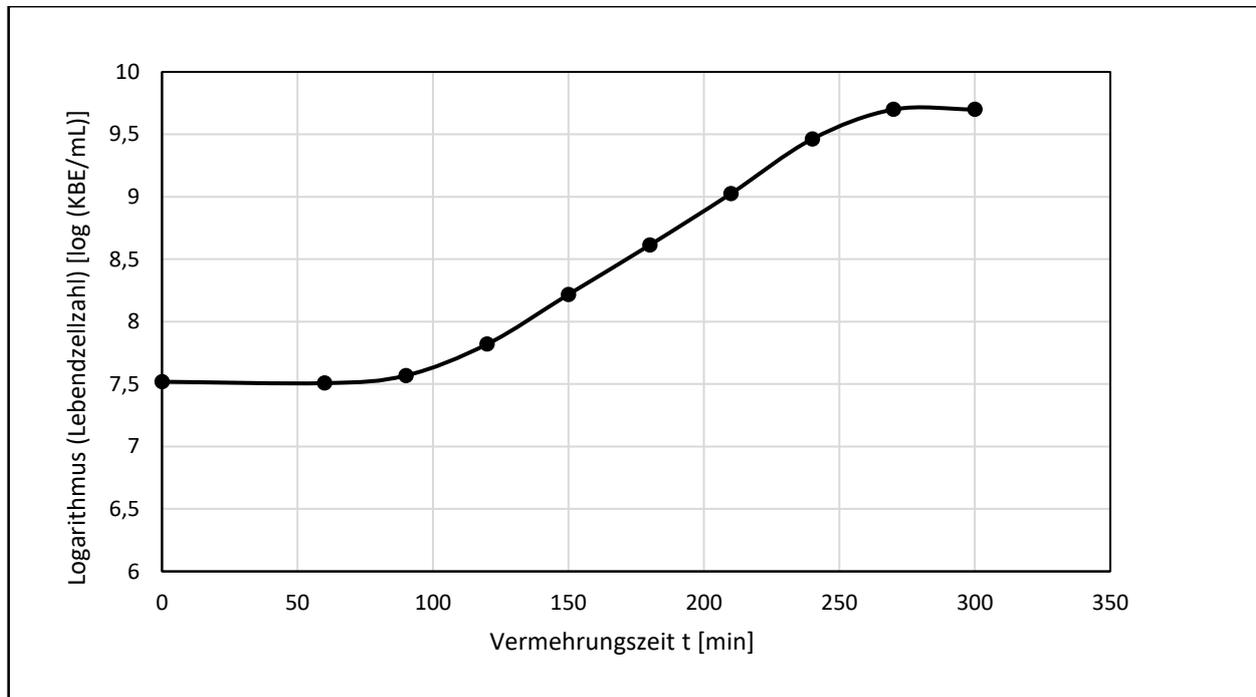
Die Quantifizierung mittels der Farbstoffe SYTO 9 und Propidiumiodid lieferte einen Zelltiter, der ungefähr zur Hälfte dem durch Kultivierung ermittelten Zelltiter entsprach. Auch in Hinblick auf die Fehlergrenzen unterlag die fluoreszenzmikroskopische Methode der Kultivierungsmethode. In Anbetracht der einfachen und schnellen Durchführung und der besseren Keimausbeute als das CTC-Verfahren wurde für die fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsbestimmung das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit eingesetzt.

## 4.4 Orientierungsversuche

Die in diesem Kapitel zusammengefassten Versuchsergebnisse lieferten Parameter, die für weitere Versuchsansätze notwendig waren und die Aussagekraft weiterer gewonnener Versuchsergebnisse belegten.

#### 4.4.1 Wachstumskinetische Parameter von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Flüssigmedien

Die Ermittlung der wachstumskinetischen Parameter von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 verfolgte den Zweck, die typischen Wachstumsphasen bzw. den exponentiellen Verlauf zu erfassen.

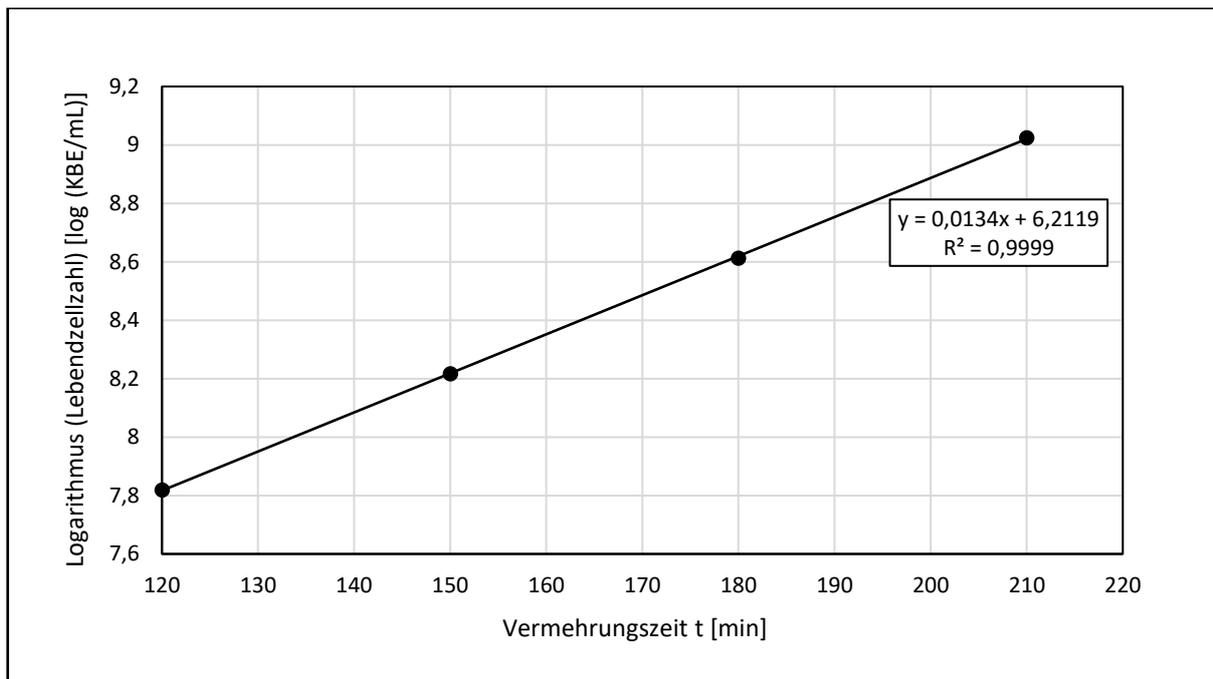


**Abbildung 11: Vermehrungskurve von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in TSB-Vollmedium**

Eine Flüssigkultur (TSB-Vollmedium und Inkubation von ca. 16 h) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde um den Faktor 50 mit TSB-Flüssigmedium verdünnt und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot der inkubierten Suspension entnommen und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Punkt 3.4.3.1). Dargestellt ist die logarithmierte Lebendzellzahl [log (KBE/mL)] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit t [min].

Nach einer Anlaufphase von ca. 90 min folgte in dem ausgewählten Medium und der Inkubationstemperatur von 37 °C die exponentielle Wachstumsphase, die ca. 180 min andauerte. Anschließend verlangsamte sich das Wachstum, bis ab 270 min nach Beginn der Inkubation die statische Wachstumsphase eintrat.

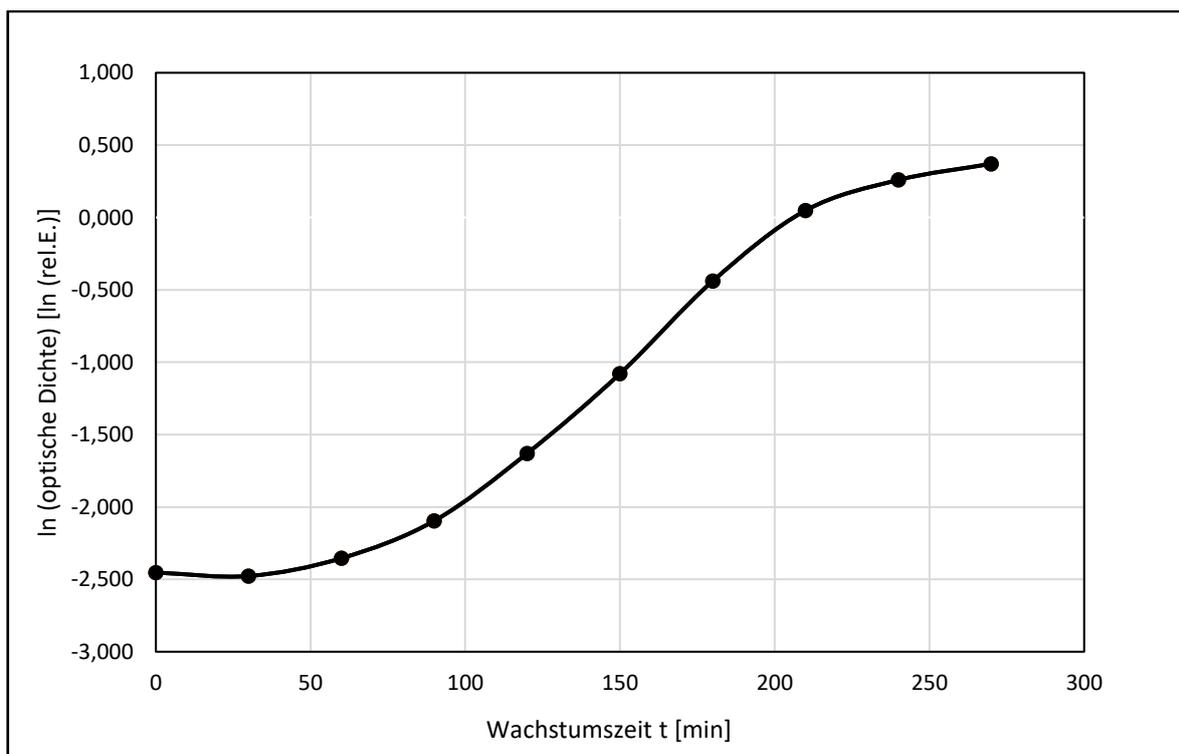
Aus den Werten der exponentiellen Wachstumsphase wurden mittels der linearen Regression die Teilungsrate  $\nu$  und die Generationszeit  $g$  bestimmt.



**Abbildung 12:** Logarithmierte Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in der exponentiellen Wachstumsphase

Dargestellt ist die logarithmierte Lebendzellzahl [log (KBE/mL)] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit t [min] in der exponentiellen Wachstumsphase. Die hier abgedruckte Abbildung stellt einen Ausschnitt der oben abgebildeten Vermehrungskurve (Abbildung 11) dar.

Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,999$  lieferte die lineare Regression der logarithmierten Lebendzellzahl [log (KBE/mL)] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [min] die Geradengleichung mit  $y = 0,0134 x + 6,2119$ .

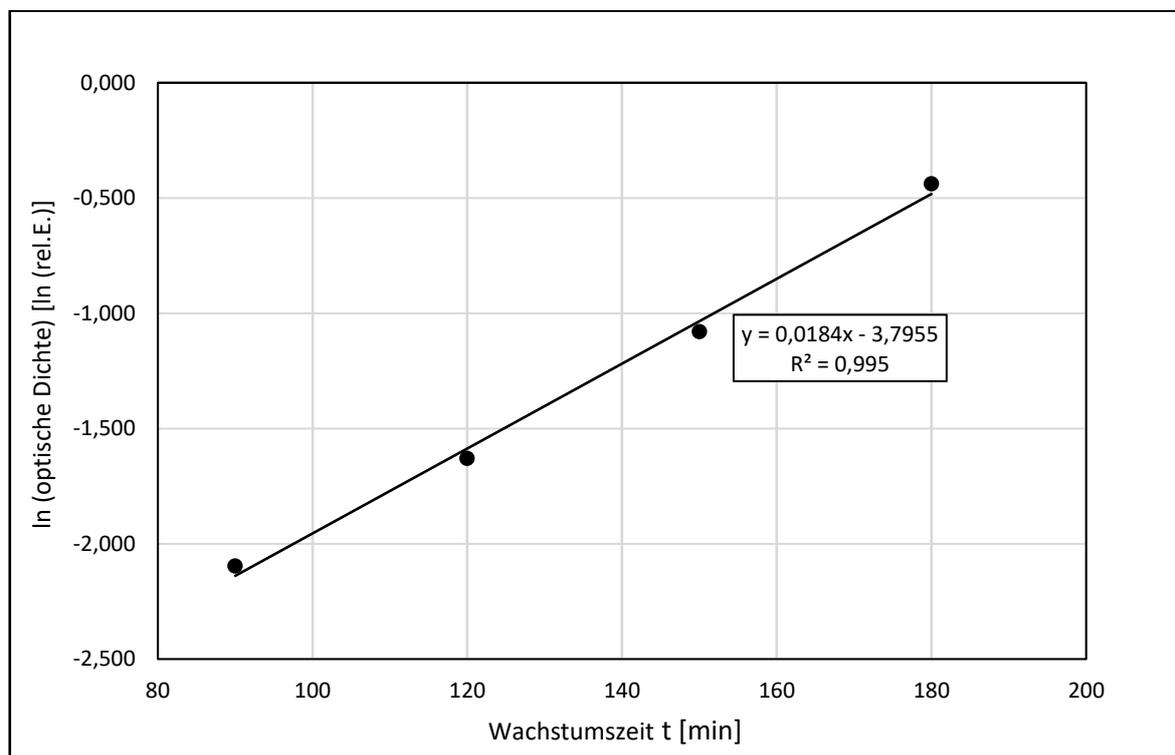


**Abbildung 13:** Wachstumskurve von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in TSB-Vollmedium

Parallel zur oben beschriebenen Versuchsdurchführung (siehe Abbildung 12) wurde die optische Dichte der entnommenen Bakterien-suspension zu den jeweiligen Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 546$  nm gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung gemessen (siehe Punkt 3.4.1.2). Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der optischen

Dichten [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit  $t$  [min].

Ca. 60 min nach Start der Inkubation folgte auf die Anlauf- die exponentielle Wachstumsphase, die ca. 150 min andauerte. Danach verlangsamte sich das Wachstum, bis die Messungen beendet wurden. Das Eintreten der stationären Phasen wurde nicht beobachtet.



**Abbildung 14: Logarithmierte optische Dichte einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension in der exponentiellen Wachstumsphase**

Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der optischen Dichte [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit  $t$  [min] in der exponentiellen Wachstumsphase. Die hier abgedruckte Abbildung stellt einen Ausschnitt der oben abgebildeten Wachstumskurve (Abbildung 13) dar.

Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,998$  lieferte die lineare Regression des natürlichen Logarithmus der optischen Dichte [rel. E.] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [min] die Geradengleichung mit  $y = 0,0189 x + 3,8961$ .

Die in Tabelle 22 dargestellten wachstumskinetischen Parameter konnten so anhand der Geradensteigung der linearen Regressionen der Wachstums- und Vermehrungskurve ermittelt werden.

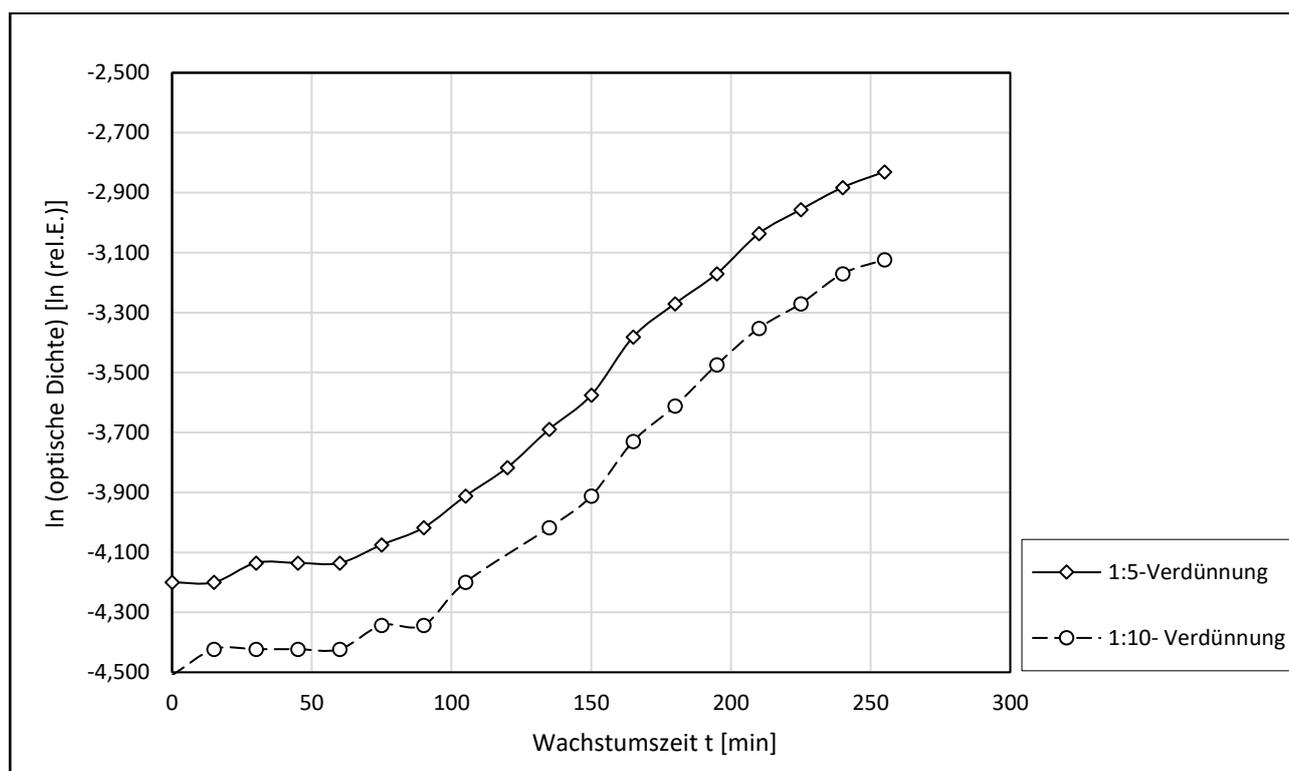
**Tabelle 22: Wachstumskinetische Parameter von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in TSB-Vollmedium (37 °C)**

Vermehrung (Bakterienzahl (BZ)):	Wachstum (Bakterienmasse (BM)):
Steigung $m_{BZ} = 0,0134$ [ $\log(\text{KBE/mL}) \cdot \text{min}^{-1}$ ]	Steigung $m_{BM} = 0,0189$ [rel. E. $\cdot \text{min}^{-1}$ ]
Teilungsrate $v = 0,044 \text{ min}^{-1} = 2,7 \text{ h}^{-1}$	Wachstumsrate $\mu = 0,19 \text{ min}^{-1} = 1,1 \text{ h}^{-1}$
Generationszeit $g = 23 \text{ min} = 0,38 \text{ h}$	Verdopplungszeit $t_d = 36 \text{ min} = 0,61 \text{ h}$

Die Wachstums- und Vermehrungskurve einer *Pseudomonas aeruginosa* WR-Zellkultur in TSB-Vollmedium (37 °C) wurden aufgenommen und aus den linearen Bereichen wurden die wachstumskinetischen Parameter berechnet.

Für die Versuchsdurchführungen wurde bei der gewählten Animpfmenge ein Beginn der frühen exponentiellen Wachstumsphase nach 60 min nach Start der Inkubation angenommen.

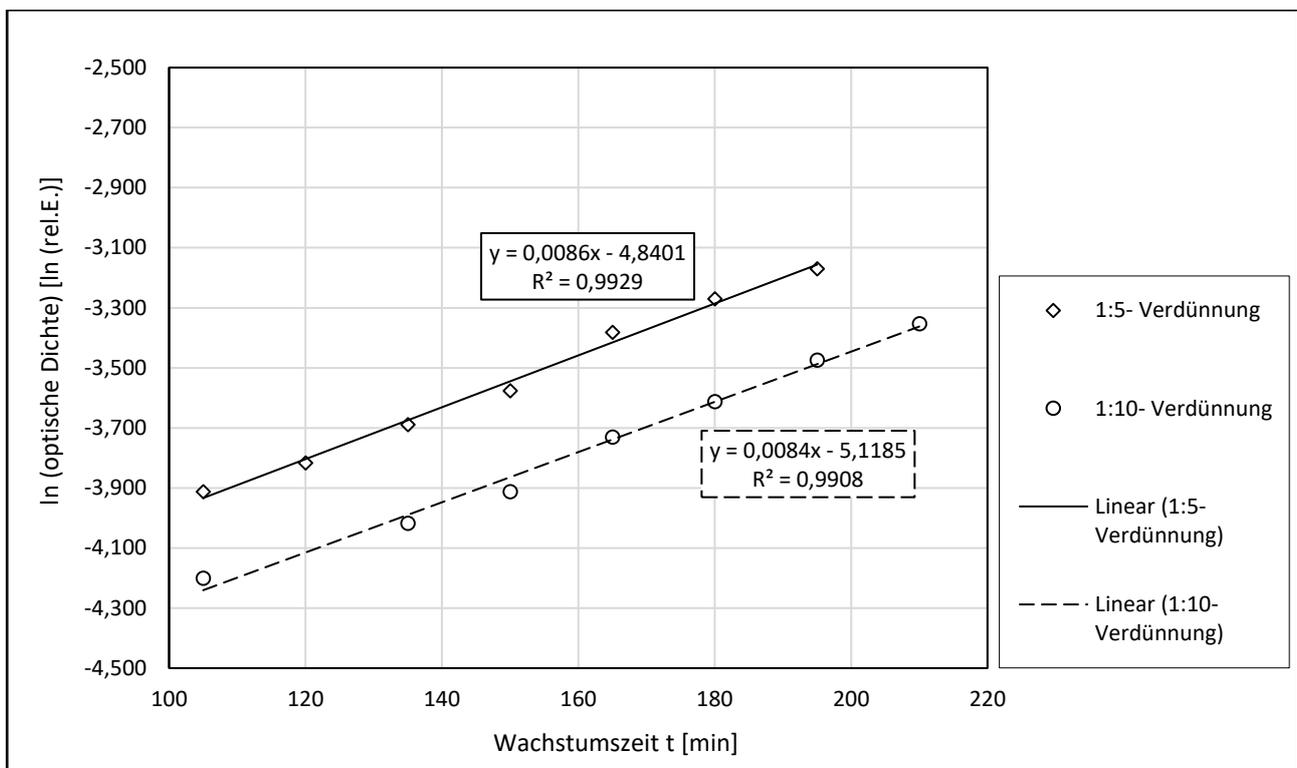
Für die Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$  und der Verdopplungszeit  $t_d$  von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium wurde ein größeres Inokulum eingesetzt (siehe Punkt 3.4.3.1).



**Abbildung 15: Wachstumskurve von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium**

Eine Flüssigkultur (Mineralmedium, Inkubation von ca. 16 h) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde um den Faktor  $F_1 = 5$  oder  $F_2 = 10$  mit frischem Medium verdünnt und bei  $37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot der inkubierten Suspensionen entnommen und die optischen Dichten wurden bestimmt (siehe Punkt 3.4.1.2). Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der optischen Dichten [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit  $t$  [min] und der Inokula.

Nach einer Anlaufphase von ca. 75 bis 90 min trat bei beiden Ansätzen die exponentielle Wachstumsphase ein, die 100 bis 125 min andauerte. Danach nahm Trübung der beiden Zellkulturen nur schwächer zu. Die stationäre und die Absterbephase konnten erwartungsgemäß (siehe Abbildung 13) nicht beobachtet werden.



**Abbildung 16: Logarithmierte optische Dichte einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension in der exponentiellen Wachstumsphase**

Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der optischen Dichte [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in der exponentiellen Wachstumsphase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit  $t$  [min] und der Inokula. Die hier abgedruckte Abbildung stellt einen Ausschnitt der oben abgebildeten Wachstumskurve (siehe Abbildung 15) dar.

Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,993$  für die 1:5-Verdünnung und von  $R^2 = 0,991$  für die 1:10-Verdünnung lieferte die lineare Regression des natürlichen Logarithmus der optischen Dichte [rel. E.] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [min] die Geradengleichung mit  $y = 0,0086 x + 4,8401$  für die 1:5-Verdünnung und  $y = 0,0084 x - 5,1185$  für die 1:10-Verdünnung. Die in Tabelle 23 dargestellten wachstumskinetischen Parameter wurden so anhand der Steigung der linearen Regressionen der Wachstumskurven berechnet.

**Tabelle 23: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium (37 °C)**

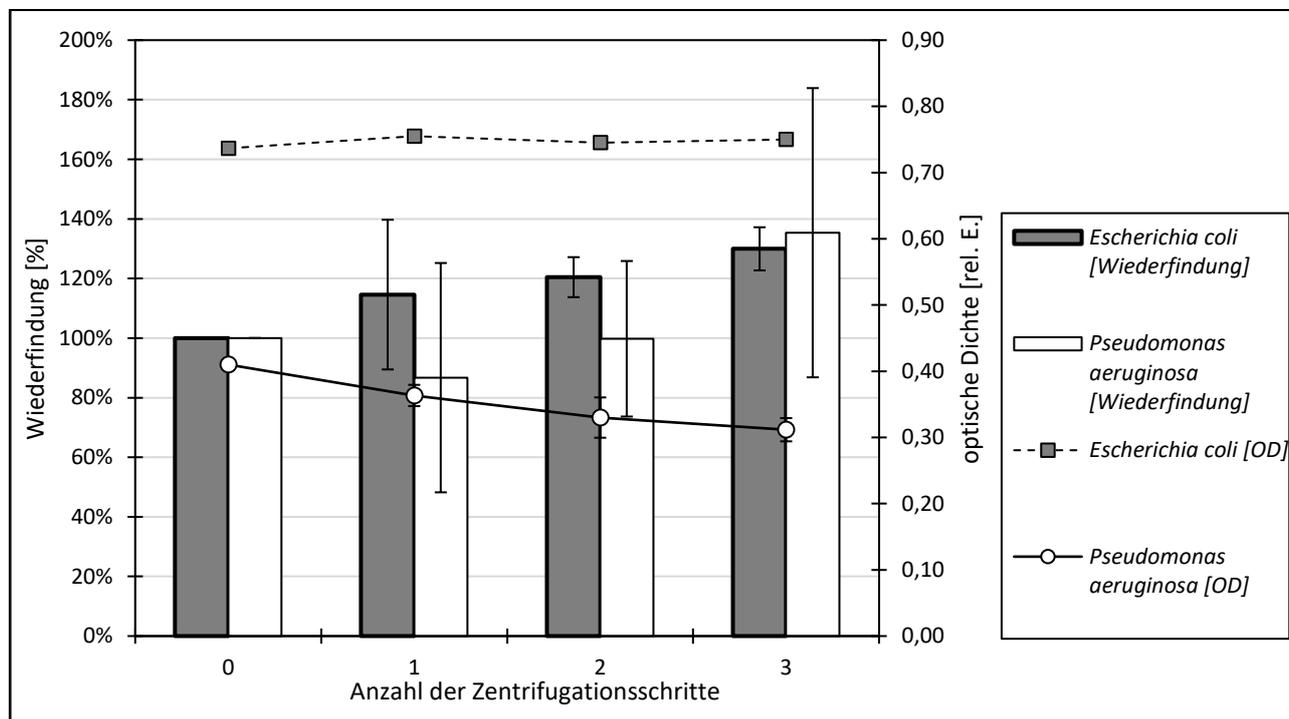
1:5-Verdünnung:	1:10-Verdünnung:
Steigung $m_{1:5} = 0,0086$ [rel. E. · min <sup>-1</sup> ]	Steigung $m_{1:10} = 0,0084$ [rel. E. · min <sup>-1</sup> ]
Wachstumsrate $\mu = 0,0086$ min <sup>-1</sup> = 0,52 h <sup>-1</sup>	Wachstumsrate $\mu = 0,0084$ min <sup>-1</sup> = 0,50 h <sup>-1</sup>
Verdopplungszeit $t_d = 80$ min = 1,3 h	Verdopplungszeit $t_d = 83$ min = 1,4 h

Die Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen mit unterschiedlichen Anfangszelltitern wurden in Mineralmedium (37 °C) aufgenommen und aus den linearen Bereichen (= exponentielle Wachstumskurve) wurden die Wachstumsrate  $\mu$  und die Verdopplungszeit  $t_d$  berechnet.

Erwartungsgemäß wurden unabhängig von der eingesetzten Verdünnung für beide Kulturansätze ähnliche wachstumskinetische Parameter ermittelt. Für die Teilungsrate  $\mu$  wurden Werte von  $\mu_{1:5} = 0,52$  h<sup>-1</sup> bzw.  $\mu_{1:10} = 0,50$  h<sup>-1</sup> und für die Verdopplungszeit  $t_d$  von  $t_{d1:5} = 0,52$  h bzw.  $t_{d1:10} = 0,50$  h ermittelt. Ebenfalls bestätigte sich die Annahme, dass in dem vorliegenden Minimalmedium *Pseudomonas aeruginosa* WR1 deutlich schwächer wuchs als im TSB-Vollmedium. Für weitere Versuche wurde in Abhängigkeit von der gewählten Animpfmenge ein Beginn der frühen exponentiellen Wachstumsphase für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium nach 75 bis 100 min nach Start der Inkubation angenommen.

#### 4.4.2 Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Zentrifugation

Die vorliegende Untersuchung sollte ausschließen, dass die bei der Zellernte notwendige Zentrifugation einen Einfluss auf die Kultivierbarkeit bzw. auf die Lebendzellzahl der Suspension hatte. Als Referenz wurde *Escherichia coli* K12 herangezogen, um das Vorhandensein und Aufbrechen von möglichen Zellaggregaten durch die Zentrifugation auszuschließen. Anhand der optischen Dichte sollte potentiell Wachstum während des Versuches verfolgt werden.

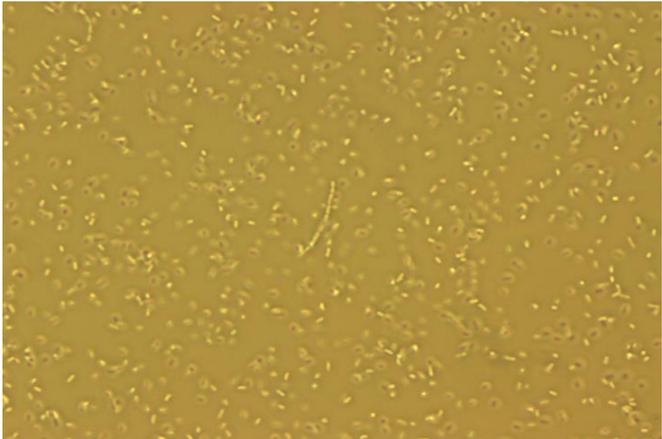
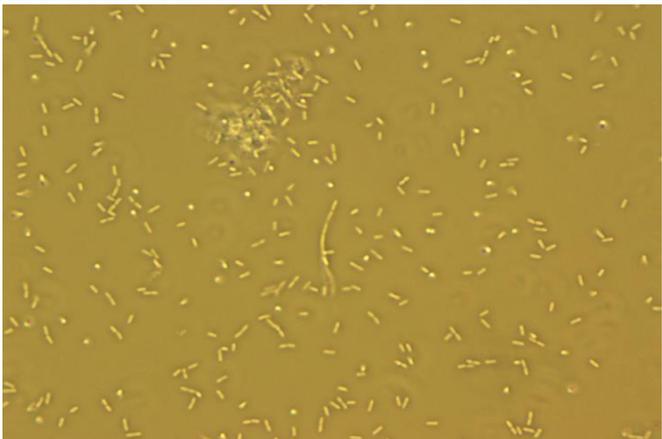
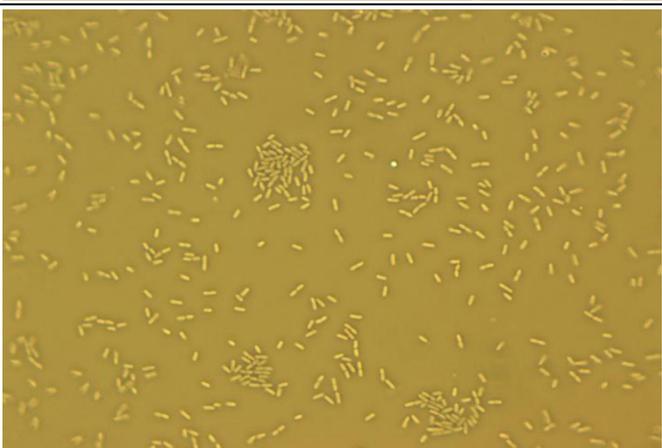


**Abbildung 17: Wiederfindung und optische Dichten von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 in TSB-Flüssigkulturen nach mehreren Zentrifugationsschritten.**

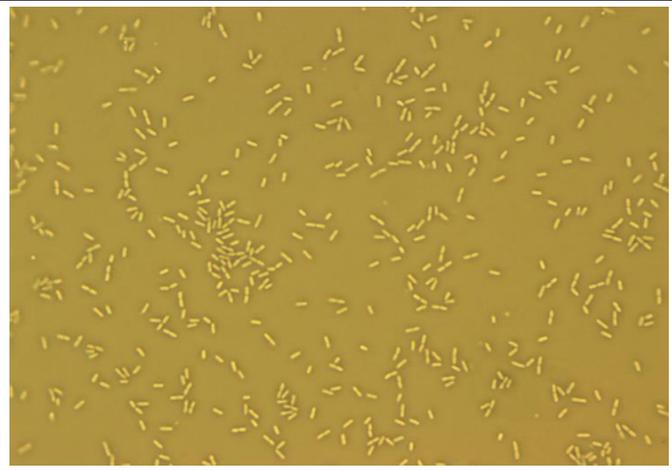
Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] und die optische Dichte [rel. E.] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1- und *Escherichia coli* K12-Flüssigkulturen wurden graphisch in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Zentrifugationsschritte dargestellt. Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (100 %) wurde die Lebendzellzahl der Ausgangssuspension vor der Zentrifugation definiert. Die Säulen kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen (grau: *Escherichia coli* K12, weiß: *Pseudomonas aeruginosa* WR1), die unterschiedlich vielen Zentrifugationsschritten unterworfen wurden (siehe Punkt 3.4.3.2). Die durch Linien verbundenen Punkte stellen die dazugehörigen optischen Dichten dieser Bakteriensuspensionen dar (siehe Punkt 3.4.3.2). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung. Für jeden Testkeim wurden jeweils drei separate Ansätze untersucht.

Für *Escherichia coli* K12 nahmen im Mittel und unter Betrachtung der Fehlerbalken über alle Zentrifugationsschritte die Wiederfindungsraten zu, bis bei der letzten Probennahme sogar 20 % mehr Zellen wiedergefunden wurden als zu Beginn der Messung. Die Trübung der *Escherichia coli* K12-Flüssigkulturen blieb mit einem Anfangswert von  $OD_{\text{Zentrifugationsschritt}} = OD_0 = 0,7$  annähernd konstant. Im Gegensatz dazu wurden bei den *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen im Durchschnitt immer gleich viele Zellen wiedergefunden. Auffallend war dabei die größere Streuung um den Mittelwert im Vergleich zu den Wiederfindungsraten von *Escherichia coli* K12. Dagegen nahm die Trübung der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Flüssigkulturen innerhalb der 3 Zentrifugationsschritte von  $OD_0 = 0,4$  bis  $OD_4 = 0,3$  ab. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass dieser Testkeim in kleinen Zellaggregaten heranwuchs, die eine erhöhte Streuung des Lichts im Photometer verursachten und dann bei der Zentrifugation teilweise aufgebrochen wurden. Diese Annahme wurde mittels der mikroskopischen Aufnahmen erhärtet.

**Tabelle 24: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen (Phasenkontrast nach Motic (1000fach))**

Untersuchte Suspension:	Lichtmikroskopische Aufnahmen:
Übernachtskultur (ca. 16 h, TSB-Flüssigmedium)	
Flüssigkultur in der exponentiellen Wachstumsphase (120 min, TBS-Flüssigmedium)	
Suspension in exponentieller Wachstumsphase nach Zellernte und einfacher Zentrifugation (s.o.)	

Suspension in exponentieller Wachstumsphase nach Zellernte und dreifacher Zentrifugation (s.o.)

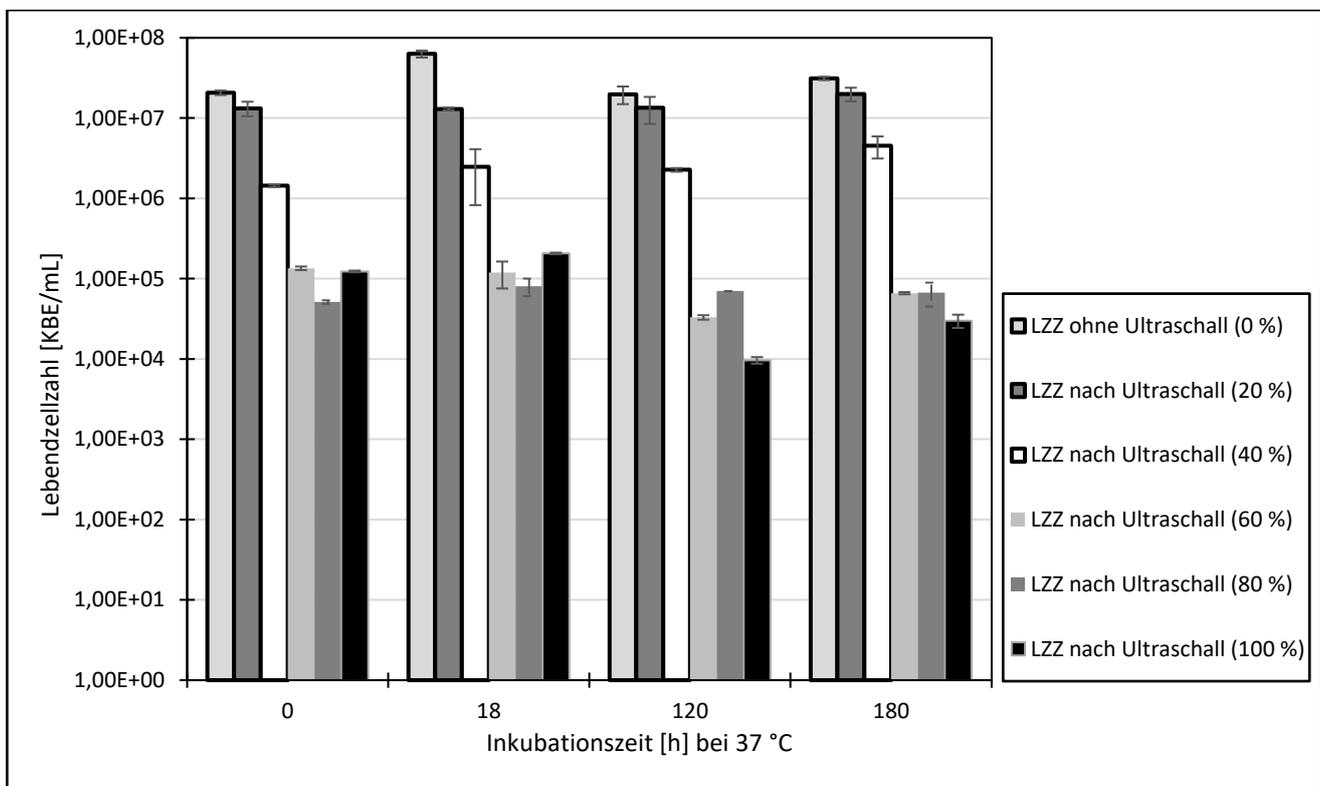


Eine Übernachtskultur von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in TSB-Vollmedium wurde mit frischem Medium verdünnt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte und dreifache Zentrifugation. Vor jedem Arbeitsschritt wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und lichtmikroskopisch (Phasenkontrast nach Motoc (1000fach)) untersucht. Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen unterschiedlichen Inkubationsalters und unterschiedlicher Präparation.

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 neigte wie im mikroskopischen Präparat erkennbar zur Ausbildung von kettenförmigen Zellaggregaten, die während der exponentiellen Wachstumsphase sogar erhalten blieben. Auffallend war, dass Cluster bestehend aus zwei Zellen zahlenmäßig dominierend auftraten. Nach der einfachen Zentrifugation wurden keine langen Zellketten mehr beobachtet. Stattdessen wurden kleinere Zellansammlungen durch die Zentrifugation erzeugt. Die Verbunde aus zwei Zellen blieben allerdings überwiegend erhalten. Nach dreifacher Zentrifugation wurden die durch unzureichende Suspendierung gebildeten Zellaggregate kaum festgestellt. Neben den Einzelstäbchen lagen aber auch hier wieder die Zellcluster aus zwei Zellen in der Suspension vor. D.h. Manipulationen in den Lebendzellzahlen durch diese kleineren Zellaggregate mussten für weitere Versuche berücksichtigt werden.

#### 4.4.3 Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Langzeitinkubation und Ultraschallbehandlung

Zur Überprüfung der unter Punkt 4.4.2 genannten und durch die Literatur (SCHLEHECK et al. (2009)) gestützten These, dass *Pseudomonas aeruginosa* WR1 Zellaggregate bildet bzw. sich teilende Zellen nicht vollständig voneinander trennen, wurde versucht, diese mittels Ultraschallbehandlung aufzubrechen und anhand der Lebendzellzahl zu verfolgen.



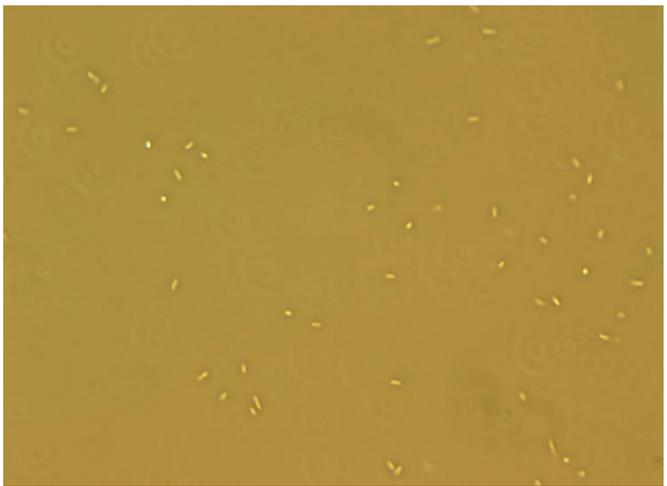
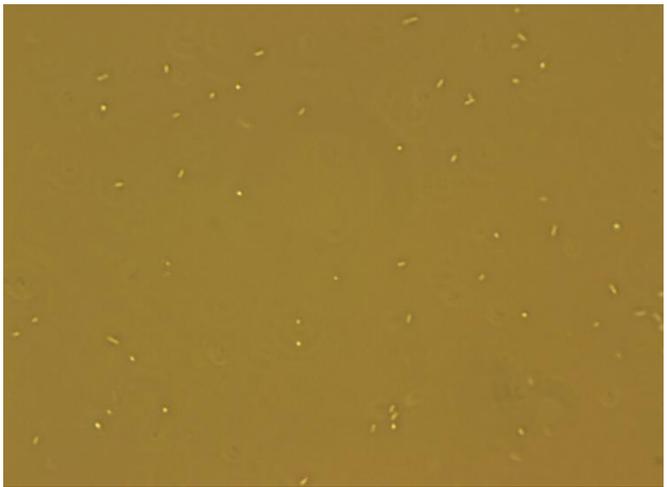
**Abbildung 18: Quantifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser nach Ultraschall**

Ein Aliquot der Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Inkubationsdauer wurde jeweils in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und mit Ultraschall unterschiedlicher Intensität (100 % = 60 W) behandelt. Die genaue Vorgehensweise ist unter Material und Methoden beschrieben (siehe Punkt 3.4.3.3). Dargestellt ist die Lebendzellzahl [KBE/mL] (logarithmische Auftragung) nach unterschiedlich starker Ultraschallbehandlung [%] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zu unterschiedlichen Inkubationszeiten [h] bei 37 °C.

Die Säulen kennzeichnen die ermittelten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakteriensuspensionen in Abhängigkeit von der eingesetzten Intensität des Ultraschalls. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Bei allen ausgewählten Intensitäten übertraf zu keinem Zeitpunkt die Lebendzellzahl der mit Ultraschall behandelten Suspensionen den Zelltitel der unbehandelten Suspension. Mit Zunahme der Ultraschallintensitäten wurden sogar deutlich weniger Zellen wiedergefunden. Dabei konnte für die Ultraschallintensitäten von 20 % und 40 % ein direkter Zusammenhang zwischen Zellreduktion und gewählter Intensität festgestellt werden. Auffallend war der signifikante Anstieg der Lebendzellzahl der unbehandelten Suspension nach 18 stündiger Inkubation in chemisch definiertem Leitungswasser. Im Gegensatz dazu nahmen die optischen Dichten der eingesetzten Suspensionen vor Ultraschallbehandlung über den gesamten Beprobungszeitraum von  $OD_{0h} = 0,16$  bis ca.  $OD_{180h} = 0,06$  ab. Die Lebendzellzahlen der Suspensionen zum Zeitpunkt  $t_2 = 18h$  nach Ultraschallbehandlung erreichten dagegen annähernd das Niveau im Zelltitel wie die behandelten Suspensionen zum Zeitpunkt  $t_1 = 0h$ . Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die ausgewählten Ultraschallintensitäten zu stark waren und eher bewirkten, dass Zellen zertrümmert wurden. Nach eintägiger Inkubation der Suspension kam es in Übereinstimmung mit der zitierten Literatur (SCHLEHECK et al. (2009)) zu einem selbstständigen Loslösen der Zellen, was anhand der erhöhten Lebendzellzahl zum Zeitpunkt  $t_2 = 18h$  deutlich wurde. Diese Beobachtungen wurden durch die Betrachtung der lichtmikroskopischen Präparate bestätigt.

**Tabelle 25: Mikroskopische Betrachtung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Flüssigkultur in unterschiedlichen Suspensionen und zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten**

Untersuchte Suspension:	Lichtmikroskopische Aufnahmen:
18 ständig inkubierte (37 °C) Zellsuspension	
180 ständig inkubierte (37 °C) Zellsuspension	

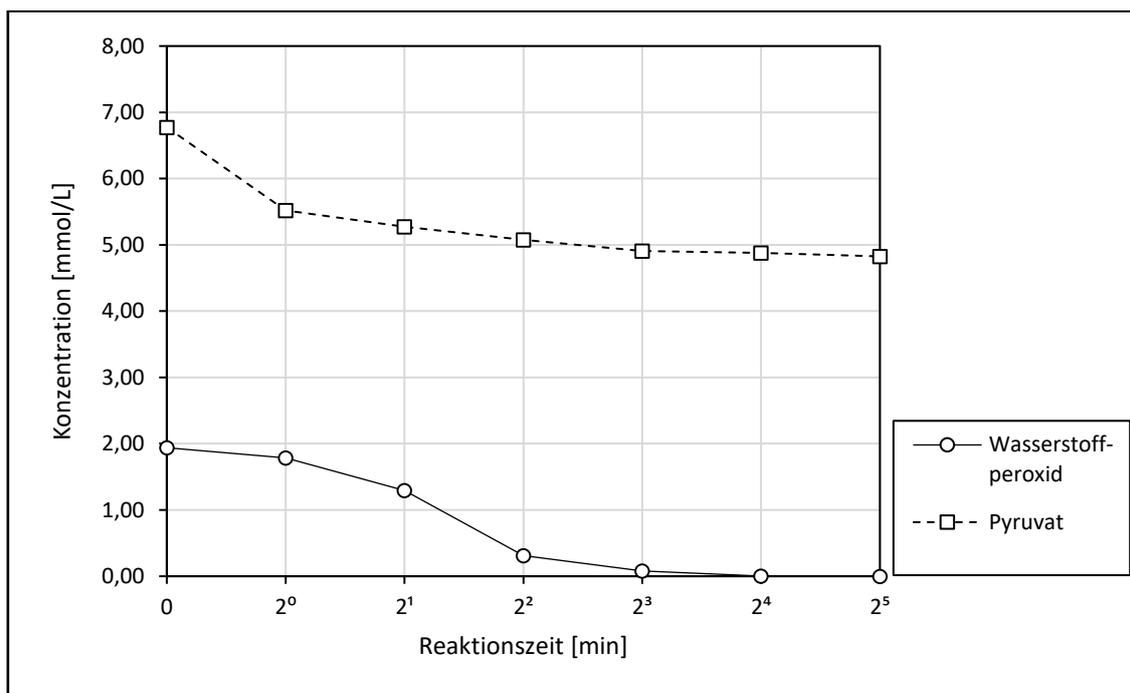
Fotographisch dargestellt sind die unter Punkt 3.4.3.3 beschriebenen Zellsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bei 1000facher Vergrößerung im Phasenkontrast nach Motic. Zu sehen waren längliche, größtenteils bewegliche Stäbchen, die als planktonische Zellen nach Betrachtung keine Aggregate bildeten.

Nach Inkubation in nährstoffarmer Umgebung und Betrachtung des mikroskopischen Präparats trat *Pseudomonas aeruginosa* WR1 fast ausschließlich als Einzelzelle auf. Nur punktuell wurden Zellcluster aus zwei Zellen nach 18 oder 180 stündiger Bebrütung registriert. Längere Zellketten wurden gar nicht wahrgenommen. D.h. durch die ausgewählte Ultraschallbehandlung konnten die Zellaggregate nicht aufgebrochen werden. Stattdessen neigte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach eintägiger Inkubation in nährstoffarmer Umgebung zur selbstständigen Dispersion. Aufgrund der Zellaggregatbildung wurden in dieser Arbeit für alle klassischen Lebendzellzahlbestimmungen Kontrollansätze mitgeführt, durch die der Einfluss der Inkubation auf den Zelltiter berücksichtigt wurde.

#### 4.4.4 Wasserstoffperoxidzehrung durch Pyruvat-Zusatz

Pyruvat stellt nicht nur eines der zentralen Zwischenprodukte des bakteriellen Stoffwechsels dar, sondern es wird in der Literatur (u.a. LONG et al. (2000), LONG und HALLIWELL (2011)) als Inhibitor von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise Wasserstoffperoxid beschrieben. Daraus wurde eine protektive Wirkung von Pyruvat abgeleitet (GIANDOMENICO et al. (1997) und

TROXELL et al. (2014)). Die Eigenschaft von Pyruvat als ROS-Fänger wurde deswegen in diesem Versuch untersucht und bestätigt.



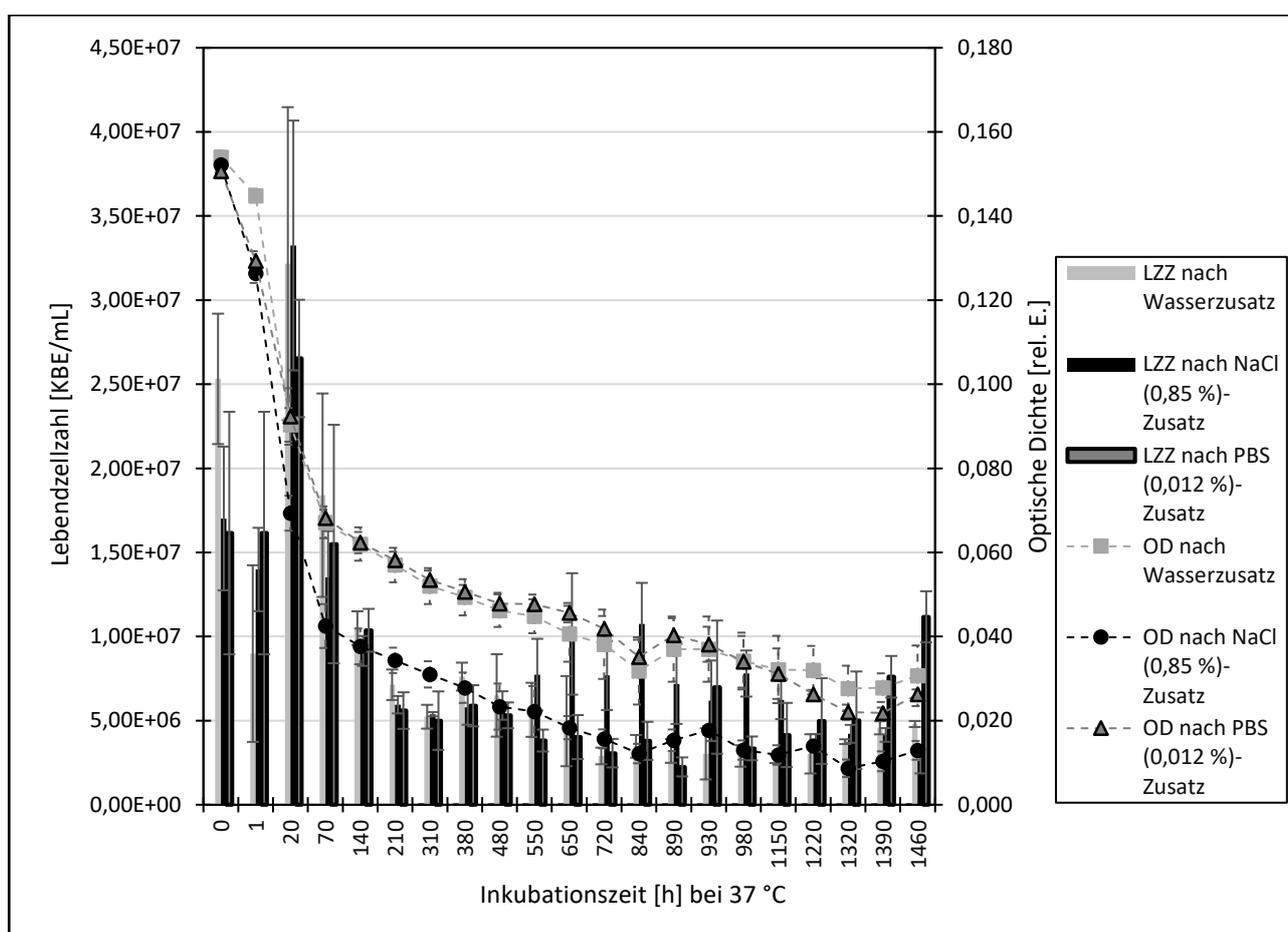
**Abbildung 19: Umsatz von Wasserstoffperoxid nach Zugabe von Pyruvat**

Eine Wasserstoffperoxidlösung der Konzentration von  $c_0 = 2$  mmol/L wurde 1:2 mit einer Pyruvatlösung ( $c_0 = 14$  mmol/L) verdünnt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Aliquot dieses Reaktionsansatzes entnommen und anschließend wurden die Wasserstoffperoxid- und die Pyruvatkonzentration bestimmt (siehe Punkt 3.4.3.4). Dargestellt sind die Wasserstoffperoxid- (Kreis) und Pyruvatkonzentrationen (Quadrat) [mmol/L] in einer phosphatgepufferten Salzlösung in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer [min] nach Zusatz von Pyruvat.

Die Konzentrationen beider Reaktanden nahmen über den gesamten Reaktionsverlauf ab. Pyruvat lag zu Beginn der Reaktion in einer Konzentration von  $c_0 = 7$  mmol/L im Überschuss vor und stagnierte dann nach 16 bis 32 min auf einem Niveau von ca.  $c = 5$  mmol/L. Wasserstoffperoxid konnte nach ca. 16 min nicht mehr nachgewiesen werden. Da es keine praktische Möglichkeit gab, Pyruvat im Reaktionsansatz sofort zu eliminieren, konnte bei der Probennahme der Verbrauch an Wasserstoffperoxid nicht gestoppt werden, so dass vor allem an den ersten Probennahmezeitpunkten deutlich geringere Wasserstoffperoxidkonzentrationen erfasst wurden. Wasserstoffperoxid reagierte folglich in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vollständig mit Pyruvat ab.

#### 4.5 Langzeitinkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 in chemisch definiertem Leitungswasser

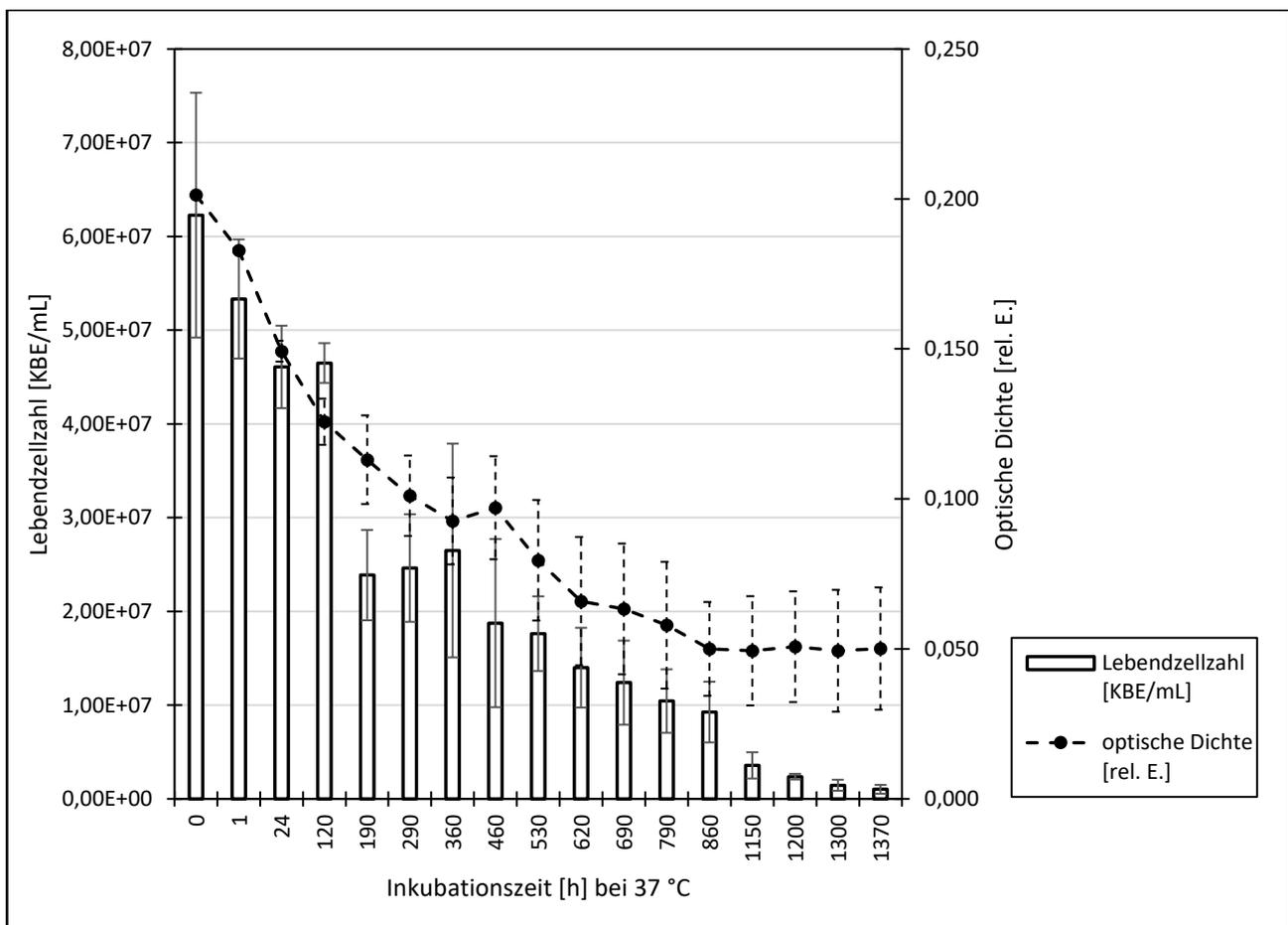
Die ersten Veröffentlichungen, die den VBNC-Zustand thematisierten, untersuchten Trinkwasser relevante Keime (XU et al. (1982)) bzw. Testkeime, die natürlich in Oberflächengewässern oder Seewasser vorkamen (ALLEN-AUSTIN et al. (1984) und COLWELL et al. (1985)). Ausschlaggebend war eine Langzeitinkubation in diesen nährstoffarmen Umgebungen bei ungünstigen Temperaturen. Diese Rahmenbedingungen wurden für die hier untersuchten Testkeime simuliert. So sollte in Abgleich mit der Literatur (FLINT (1987), LEGNANI et al. (1999) und ARANA et al. (2010)) das Überleben von *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in nährstoffarmer Umgebung nachverfolgt werden. Darüber hinaus sollte für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 der Salzgehalt als weiterer Einflussfaktor auf die Kultivierbarkeit nachvollzogen werden.



**Abbildung 20: Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser**

Dargestellt ist die Lebendzellzahl [KBE/mL] und die optische Dichte [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zu unterschiedlichen Inkubationszeiten [h] bei 37 °C nach Zusatz unterschiedlicher Salzlösungen. Die Säulen kennzeichnen die ermittelten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakteriensuspensionen, zu denen unterschiedliche sterile Salzlösungen (PBS oder NaCl (0,85 % (w/v))) oder Wasser pipettiert wurden (siehe Punkt 3.4.4). Die durch Linien verbundenen Punkte stellen die dazugehörigen optischen Dichten dieser Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Über den gesamten Beprobungszeitraum nahmen die Lebendzellzahl und die Trübung der untersuchten Suspensionen ab. Allerdings unterlag diese Abnahme einer gewissen Fluktuation, die sich vor allem in den letzten Messungen bemerkbar machte. Selbst nach ca. 2 Monaten konnte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nachgewiesen und quantifiziert werden. D.h. ein beträchtlicher Anteil der Population starb nicht ab bzw. verlor nicht seine Kultivierbarkeit. Die verhältnismäßig hohen Lebendzellzahlen zum Zeitpunkt  $t_3 = 20$  h ließen sich in Übereinstimmung mit Punkt 4.4.3 auf das Aufbrechen der Zellcluster zurückführen. Der Salzgehalt in den Flüssigkulturen hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben bzw. auf die Kultivierbarkeit von *Pseudomonas aeruginosa* WR1. Tendenziell wurden allerdings bei Zusatz physiologischer Kochsalzlösung (0,85 % (w/v)) höhere Zellzahlen wiedergefunden. Die Trübung der Suspensionen nahm kontinuierlich ab und stagnierte für die mit PBS oder Wasser versetzten Suspensionen auf einen Wert von  $OD_{1460\text{ h}} = 0,03$ . Die mit NaCl-Lösung versetzten Suspensionen hatten eine Endtrübung von ca.  $OD_{1460\text{ h}} = 0,02$  erreicht.



**Abbildung 21: Überleben von *Escherichia coli* K12 in chemisch definiertem Leitungswasser**

Dargestellt ist die Lebendzellzahl [KBE/mL] und die optische Dichte [rel. E.] einer definierten Zellsuspension von *Escherichia coli* K12 zu unterschiedlichen Inkubationszeiten [h] bei 37 °C. Die Säulen kennzeichnen die ermittelten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakteriensuspensionen zum entsprechenden Probenahmezeitpunkt (siehe Punkt 3.4.4). Die durch Linien verbundenen Punkte stellen die dazugehörigen optischen Dichten dieser Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Trotz annähernd gleicher Anfangstrübung waren die Ausgangslebendzellzahlen der eingestellten *Escherichia coli* K12-Suspensionen im Vergleich zu den Werten der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen fast doppelt bis dreifach so hoch. Dennoch nahmen über den Untersuchungszeitraum die beiden beobachteten Parameter stärker und kontinuierlich ab, bis nach ca. 2 Monaten nur noch annähernd 2 % der anfänglichen Lebendzellzahl wiedergefunden wurden. Die Trübung verharrte dagegen auf einen Endwert von ca.  $OD_{1370\text{ h}} = 0,05$ .

Sowohl *Pseudomonas aeruginosa* WR1 als auch *Escherichia coli* K12 überlebten eine Langzeitinkubation von ca. 2 Monaten in einem nährstoffarmen Milieu. *Pseudomonas aeruginosa* WR1 erwies sich allerdings als deutlich persistenter gegenüber Aushungern als *Escherichia coli* K12.

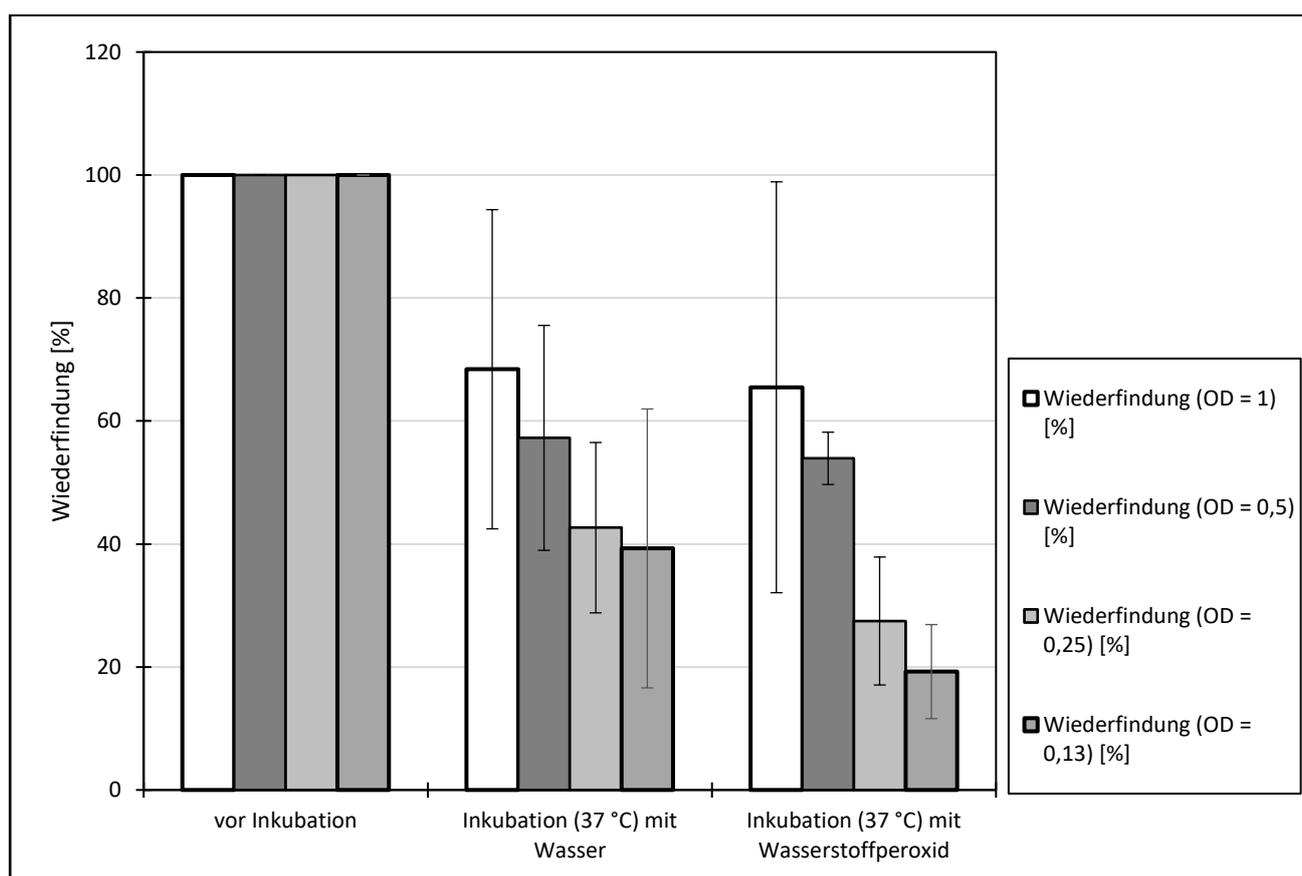
#### 4.6 Wasserstoffperoxidbehandlung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Die Nährstofflimitierung wurde in der Literatur (BESNARD et al. (2002), MARY et al. (2002), MCKAY et al. (1992), OLIVER (1993), ROLLINS und COLWELL (1986) und XU et al. (1982)) als der wesentliche Induktor des VBNC-Zustandes in bakteriellen Zellen beschrieben. Weitere Einflussfaktoren sind bekannt und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (vgl. BESNARD et al. (2002)). Oxidativ wirkende Desinfektionsmittel wie etwa Peroxide oder Hypochlorite wurden besonders in neueren Publikationen auf ihre VBNC auslösende Wirkung hin überprüft (BÉDARD et

al. (2014), MORISHIGE et al. (2013) und DUCRET et al. (2014)). Anhand der nun dargestellten Ergebnisse sollte die Desinfektionsleistung von Wasserstoffperoxid gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* WR1 grundsätzlich beurteilt werden. Gleichzeitig sollten die Parameter ermittelt werden, die die Desinfektionsleistung derart verringerten, dass nicht die gesamte Zellpopulation einer Suspension abgetötet wurde. Die Zellen sollten anteilmäßig geschädigt und so potentiell in den VBNC-Zustand verfallen.

#### 4.6.1 Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Ausgangstrübung

Die Effektivität des Desinfektionsmittels Wasserstoffperoxid wurde anhand des Rückganges der Lebendzellzahlen in den Desinfektionsansätzen ermittelt. Als Kontrolle dienten nur mit Wasser inkubierte Suspensionen, um den Zellverlust infolge der Inkubation (siehe Punkt 3.4.4) ebenfalls berücksichtigen zu können.



**Abbildung 22: Keimreduzierende Wirkung von Wasserstoffperoxid auf *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen unterschiedlicher Zelltiter**

Bakteriensuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit unterschiedlicher Ausgangstrübung wurden mit Wasserstoffperoxid versetzt ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,08 \text{ mg/mL}$ ) und 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Lebendzellzahlen und die Restkonzentration des Desinfektionsmittels in den Ansätzen bestimmt (siehe Punkt 3.4.5.1).

Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen wurden graphisch in Abhängigkeit von der anfänglich eingestellten optischen Dichte und der durchgeführten Präparation dargestellt. Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl vor der Inkubation definiert. Die Säulen kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation mit Wasser oder Wasserstoffperoxid. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

In Übereinstimmung mit den unter Punkt 4.5 beschriebenen Beobachtungen wurden alleine durch die einstündige Inkubation ein erheblicher Anteil an Zellen nicht wiedergefunden. Dabei nahm in Abhängigkeit vom Anfangszelltiter die Wiederfindungsrate vor allem bei den niedrigeren

Ausgangswerten stärker ab. Die Streuung um die Mittelwerte waren bei den nur mit Wasser inkubierten Ansätzen deutlich größer als bei den mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben, was auf das Vorhandensein der Zellcluster zurückgeführt wurde. Bei einer Ausgangstrübung von  $OD_1 = 1$  und  $OD_2 = 0,5$  hatte der Zusatz an Wasserstoffperoxid keine keimreduzierende Wirkung beim Vergleich der Wiederfindungsraten mit den Werten der unbehandelten Proben. Bei einer optischen Dichte von  $OD_3 = 0,25$  wurden nach der einstündigen Inkubation mit Wasserstoffperoxid nur noch ca. 30 % der Ursprungszellzahl wiedergefunden, während bei den Kontrollproben ca. 40 % erfasst wurden. Dieser Trend konnte auch bei der geringsten Ausgangstrübung ( $OD_4 = 0,13$ ) festgestellt werden. 20 % der Anfangslebendzellzahl wurden nach der Umsetzung mit Wasserstoffperoxid weniger registriert als bei den nur mit Wasser inkubierten Proben.

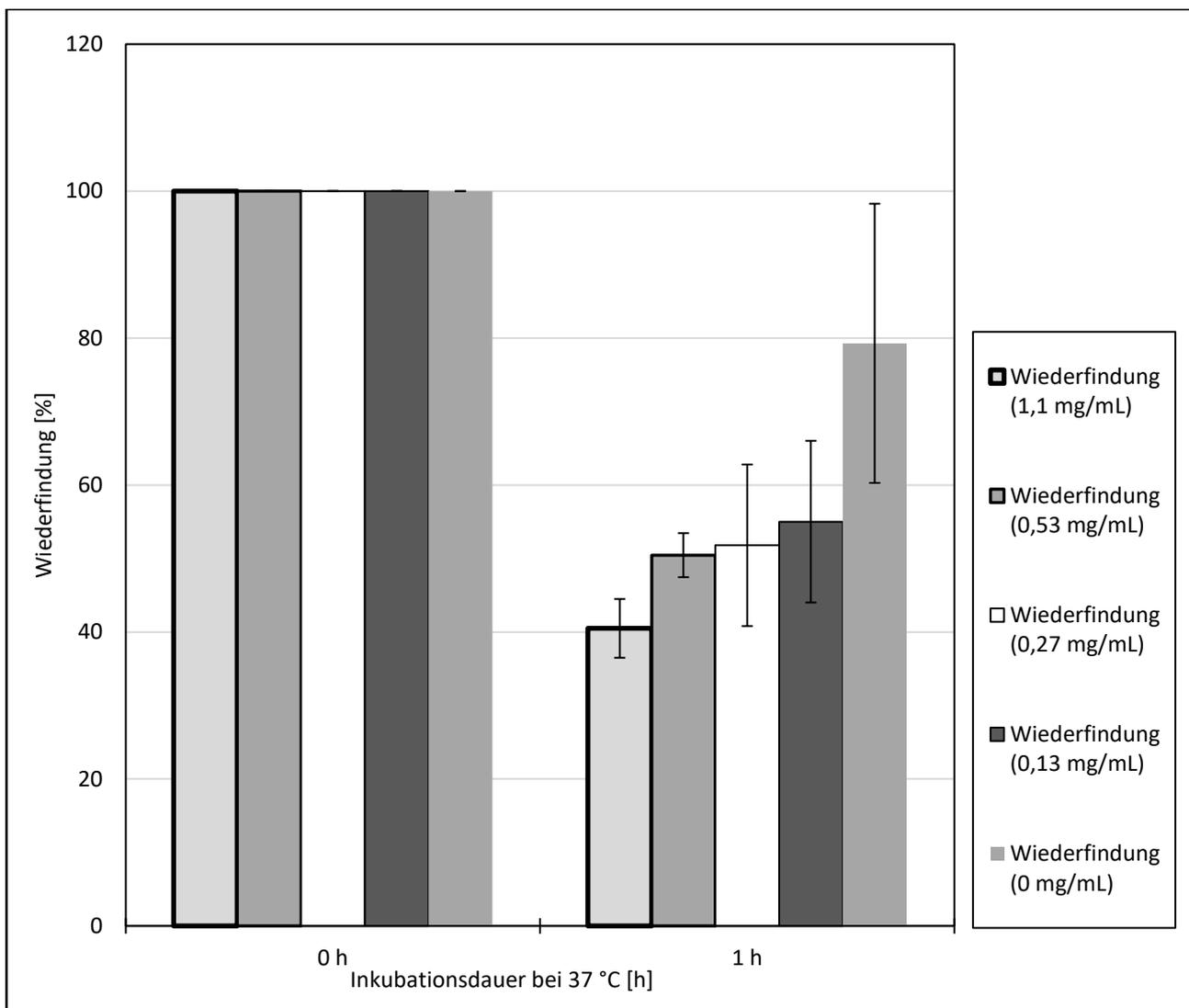
Die verhältnismäßig großen Schwankungen in den Wiederfindungsraten spiegelten sich auch in der Trübung wider. Auffallend war der große Rückgang der optischen Dichten bei den Suspensionen mit großer Ausgangstrübung. Im Gegensatz veränderten sich die Trübungen bei den optischen Dichten von  $OD_3 = 0,25$  und  $OD_4 = 0,13$  nach Inkubation mit Wasser oder Wasserstoffperoxid kaum.

Wasserstoffperoxid reagierte nach der Umsetzung mit den Bakteriensuspensionen vollständig ab. Bei allen Proben wurden annähernd Konzentrationen von  $c(H_2O_2) = 0$  mg/mL ermittelt.

Bei hohen Ausgangszellzahlen hatte Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von  $c(H_2O_2) = 2$  mmol/L keine bzw. nur eine sehr geringe keimabtötende Wirkung. Das Desinfektionsmittel reagierte vollständig ab. Die Inkubation mit Wasser führte allerdings ebenfalls zu Minderbefunden, wobei unter Betrachtung der Fehlerbalken dies vorwiegend nur für niedrige Ausgangstrübungen galt. Durch Wasserstoffperoxid wurde nur die Lebendzellzahlen von Suspensionen mit geringer Anfangstrübung verringert.

#### 4.6.2 Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration

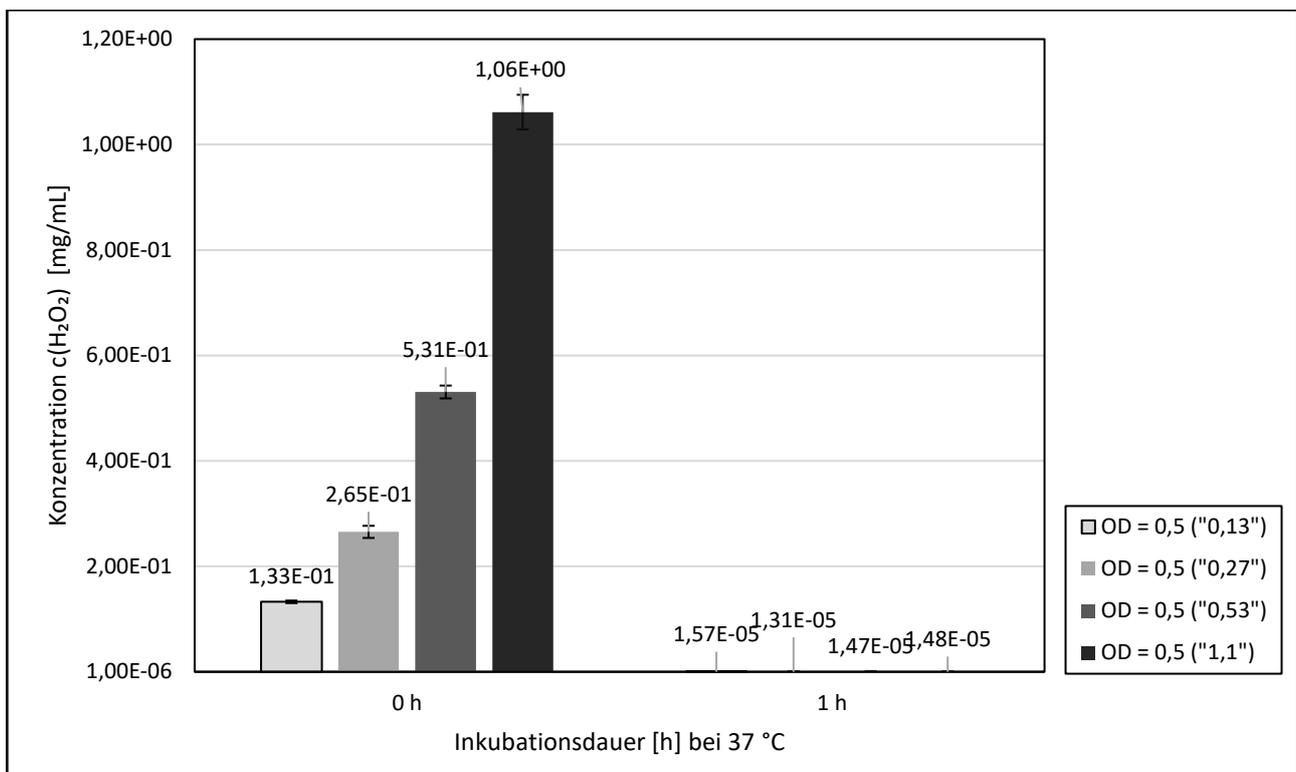
Durch die dargestellten Ergebnisse sollte der Konzentrationsbereich an Wasserstoffperoxid ermittelt werden, in dem in Abhängigkeit von der Ausgangslebendzellzahl keine Wirkung, nur eine geringe oder eine signifikant keimreduzierende Wirkung auftraten. Aufgrund dessen wurde die Anfangstrübung ausgewählt, bei der in den oben dargestellten Versuchsergebnissen (siehe Punkt 3.4.5.1) keine bzw. nur eine geringe keimreduzierende Wirkung auftrat.



**Abbildung 23: Konzentrationsabhängigkeit der keimreduzierenden Wirkung von Wasserstoffperoxid**

Abweichend zur oben beschriebenen Durchführung (siehe Abbildung 22) wurden die Zellsuspensionen auf eine feste optische Dichte von  $OD = 1$  eingestellt und in einer Verdünnung von 1:2 mit Wasserstoffperoxidlösungen unterschiedlicher Konzentrationen versetzt (siehe Punkt 3.4.5.2). Die ermittelten Wiederfindungsraten in Prozent [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden graphisch in Abhängigkeit von der anfänglich eingestellten optischen Dichte und der durchgeführten Präparation dargestellt. Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl vor Inkubation und/oder Desinfektion definiert. Die Säulen kennzeichnen die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakterien suspensionen vor bzw. nach der Inkubation mit Wasser (= 0 mg/mL) oder Wasserstoffperoxid ( $c = 0,13 - 1,1$  mg/mL). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Der Trend, dass die einstündige Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 im nährstoffarmen Milieu einen Einfluss auf die Wiederfindungsrate haben konnte, zeigte sich auch in dieser Untersuchung. Unter Betrachtung der Fehlerbalken konnte allerdings bei hohen Ausgangstrübungen nicht von einer grundsätzlichen Abnahme der Lebendzellzahlen ausgegangen werden. Die mit Wasserstoffperoxid versetzten Probensuspensionen zeigten alle eine geringere Wiederfindungsrate an als die der Kontrollansätze. Allerdings konnten nur die höchst konzentrierten Wasserstoffperoxidlösungen ( $c_1(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,1$  mg/mL und  $c_2(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,53$  mg/mL) nachweisbar die Lebendzellzahlen und damit die Wiederfindungsraten reduzieren. Im mittleren eingesetzten Konzentrationsbereich (0,13 mg/mL - 0,53 mg/mL) an Wasserstoffperoxid wurden für den Testkeim Wiederfindungsraten ermittelt, die unter Betrachtung der Fehlerbalken sich nicht stark voneinander unterschieden. Nach Inkubation mit Wasser oder Wasserstoffperoxid nahm die Trübung aller Probenansätze auf einen ähnlichen Endwert von  $OD = 0,35$  ab.



**Abbildung 24: Unterschiedliche Wasserstoffperoxidkonzentrationen nach Umsetzung mit *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen**

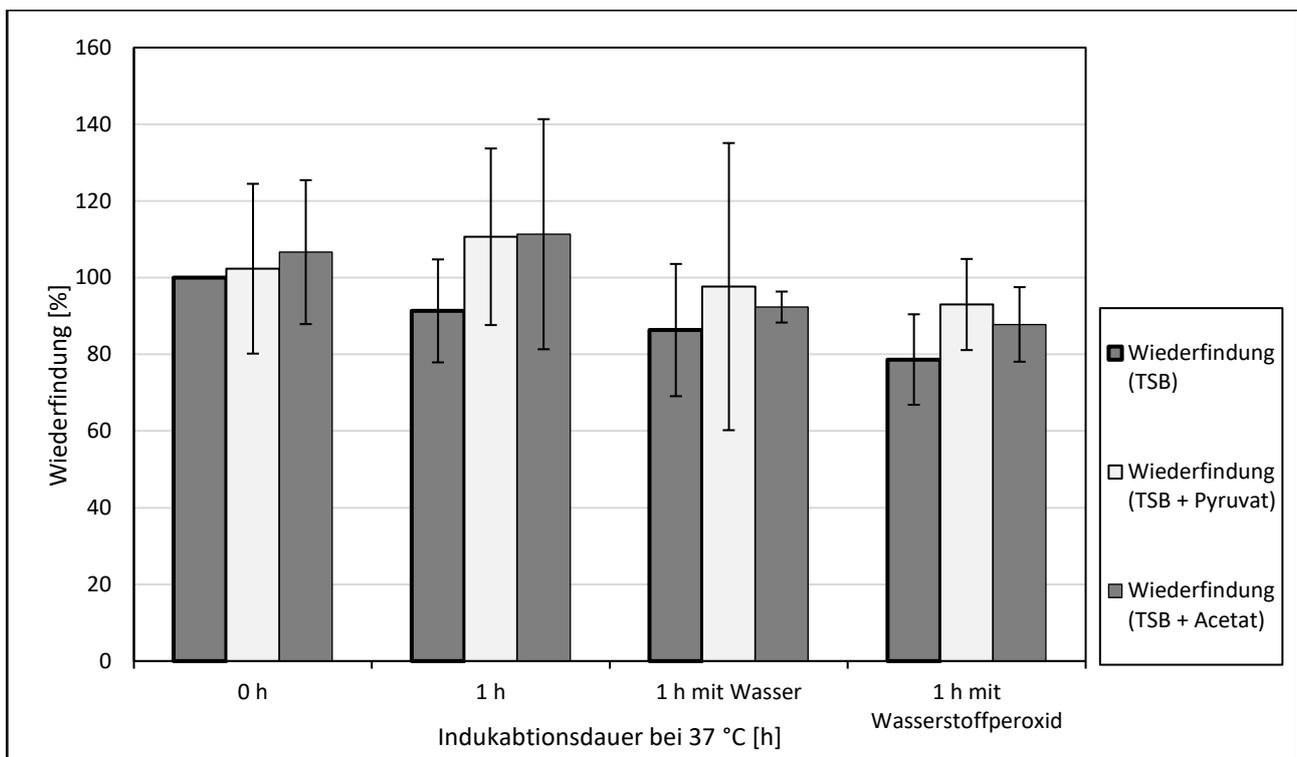
Nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid wurden die Zellen abgetrennt und im Überstand die Konzentration an Wasserstoffperoxid bestimmt (siehe Punkt 3.4.5.2 und Punkt 3.4.5.1). Dargestellt ist die Anfangskonzentration an Wasserstoffperoxid in den Reaktionsansätzen und die nach der Inkubation ermittelten Restkonzentrationen [mg/mL] in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration der Wasserstoffperoxidlösungen. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Unabhängig von der Ausgangskonzentration reagierte Wasserstoffperoxid nach Umsetzung mit *Pseudomonas aeruginosa* WR1 vollständig ab.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Wasserstoffperoxid bei genügend hoher Konzentrierung die Wiederfindungsraten der Probensuspensionen bei fest eingestellter Ausgangstrübung signifikant reduzieren konnte. Bei geringer eingesetzter Konzentration wurden die Zelltitel schwächer reduziert. Eine Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  inaktivierte nur einen Anteil von ca. 40 bis 60 % der Zellpopulation einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension mit einer definierten optischen Dichte im Desinfektionsansatz von  $\text{OD} = 0,5$ .

#### 4.6.3 Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von den eingesetzten Nährböden

Dieser vorliegende Versuchsteil sollte die unter Punkt 4.6.2 genannten Beobachtungen und den in der Literatur (JOHNSTON et al. (2000) und STEELS et al. (2000)) beschriebenen Umstand erhärten, dass eine keimreduzierende Wirkung einer Substanz nicht nur abhängig von der Konzentration des Desinfektionsmittels ist, sondern dass Effektivität in der Keimreduktion bei größeren Inokulum-mengen sogar abnimmt. Deswegen wurden zur Gegenprobe die Ausgangstrübung der zu desinfizierenden Bakteriensuspension von  $\text{OD}_1 = 0,5$  auf  $\text{OD}_2 = 1,0$  verdoppelt und die als wirksam beurteilte Wasserstoffperoxidkonzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  dagegen beibehalten. Parallel dazu sollte der publizierte Umstand (CALABRESE und BISSONNETTE (1990), LLEÓ et al. (2001) und MORISHIGE et al. (2013)) überprüft werden, ob durch Pyruvat- oder Acetatzusatz zu den Nährböden mehr Bakterien infolge einer Resuszipation von VBNC-Zellen wiedergefunden werden konnten.



**Abbildung 25: Reaktivierungsversuche von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mittels Supplementagar nach Stress**

Die Zellsuspensionen wurden auf eine optische Dichte eingestellt und mit Wasser oder Wasserstoffperoxid versetzt und dann inkubiert. Für die Lebendzellzahlbestimmung wurden die Ansätze zusätzlich zu dem Standard-TSB/CASO-Agar auch auf supplementiertem Agar (TSB-Pyruvatagar (1 % (w/v)) oder TSB-Acetatagar (0,74 % (w/v))) aufgetragen (siehe Punkt 3.4.5.3). Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden graphisch in Abhängigkeit von der durchgeführten Präparation und den eingesetzten Nährböden dargestellt.

Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl der Suspension vor Inkubation definiert. Die Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation mit Wasser oder Wasserstoffperoxid und die unterschiedliche Farbe der Balken die Art des eingesetzten Agars (dunkelgrau: TSB-Standardagar; weiß: Pyruvatzusatz und hellgrau: Acetatzusatz). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

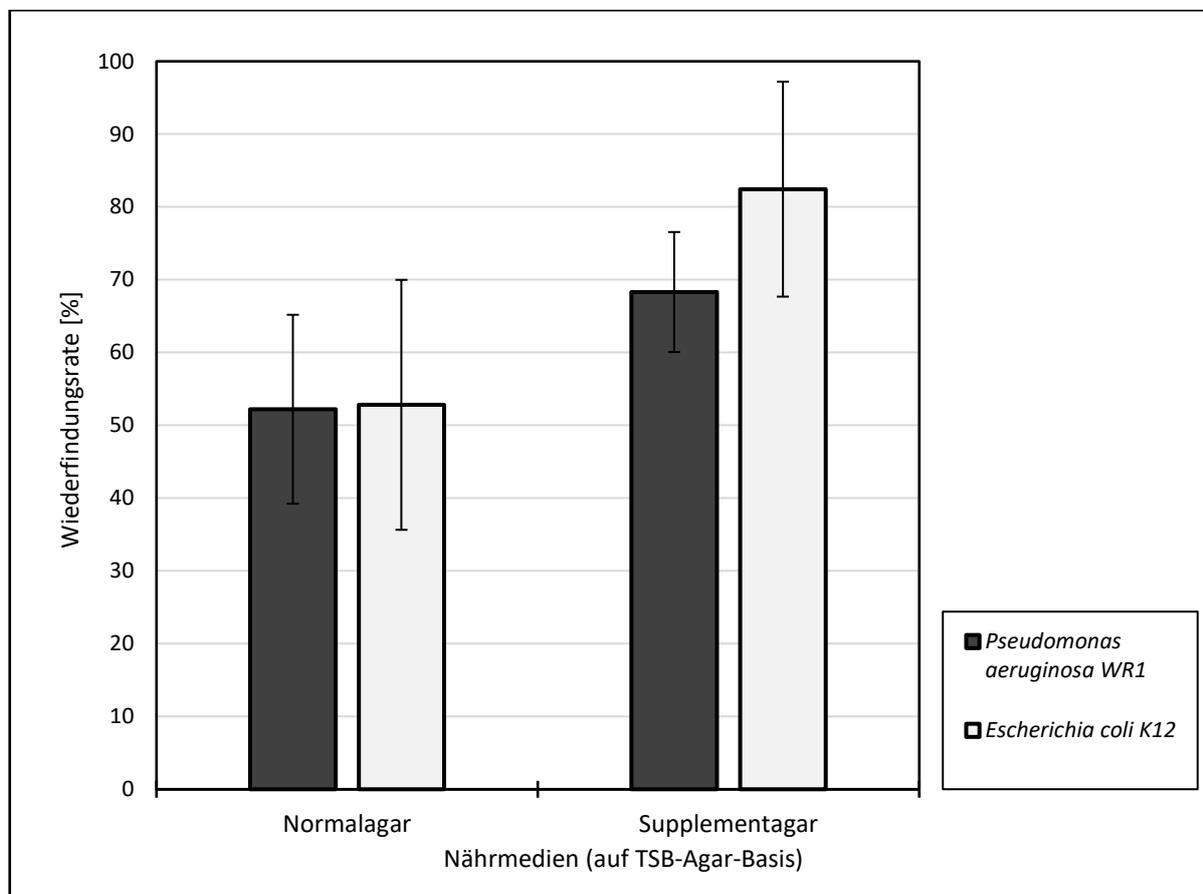
Die Wiederfindungsraten der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen nahmen nach der einstündigen Inkubation sowohl bei den Kontrollansätzen als auch bei den Desinfektionsansätzen unabhängig von den eingesetzten Nährböden leicht ab. Im Mittel wurden durch den Zusatz von Pyruvat oder Acetat mehr Zellen wiedergefunden und bei den mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben wurden die niedrigsten Wiederfindungsraten ermittelt. Es wurde allerdings unter Berücksichtigung der Fehlerbalken nicht von signifikanten Unterschieden in den Wiederfindungsraten ausgegangen. Die Trübungen der Versuchskulturen nahmen wieder nach der Umsetzung mit Wasser bzw. Wasserstoffperoxid ab und erreichten dann eine Endtrübung von  $OD_2 = 0,8$ .

Die anfänglich eingestellte Konzentration an Wasserstoffperoxid sank nach Inkubation mit den Zellsuspensionen auf einen Endwert von  $c(H_2O_2) = 0 \text{ mg/mL}$  ab.

Eine Verdopplung der Ausgangslebendzellzahl führte erwartungsgemäß zu einer drastischen Verminderung der keimreduzierenden Wirkung des Wasserstoffperoxids. Diese Tatsache wurde in der Literatur (vgl. dazu JOHNSTON et al. (2000) und STEELS et al. (2000)) als so genannter Inokulumeneffekt bereits beschrieben. Wasserstoffperoxid reagierte auch hier wie zuvor angenommen vollständig ab.

#### 4.6.4 Wiederfindungsraten der Testkeime nach Chlordioxidbehandlung und Kultivierung auf supplementierten Nährböden

In Vorversuchen (vgl. dazu CZIRR (2013)) wurde gezeigt, dass Chlordioxid in seiner keimreduzierenden Eigenschaft deutlich effektiver war als Wasserstoffperoxid. Aufgrund dessen wurde eine deutlich niedrige Wirkkonzentration von  $c_1(\text{ClO}_2) = 0,2 \text{ mmol/L}$  verwendet. Um dennoch einen ausreichend desinfizierenden Effekt unabhängig vom Inokulumeffekt feststellen zu können, wurden Bakteriensuspensionen niedriger Ausgangstrübung verwendet. Ferner diente dieser Versuch dazu, die reaktivierende Wirkung von Pyruvat anhand eines weiteren Desinfektionsmittels ( $\text{ClO}_2$ ) und eines anderen Testkeimes (*Escherichia coli* K12) validieren zu können.



**Abbildung 26: Überleben von *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Chlordioxidbehandlung**

Die Zellsuspensionen wurden auf eine optische Dichte eingestellt und mit Wasser oder Chlordioxid ( $c(\text{ClO}_2) = 0,2 \text{ mmol/L}$ ) versetzt und dann inkubiert. Für die Lebendzellzahlbestimmung wurden die Ansätze zusätzlich zu dem Standard-TSB/CASO-Agar auch auf supplementiertem Agar (TSB-Pyruvatagar (1 % (w/v))) aufgetragen (siehe Punkt 3.4.5.4). Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 wurden graphisch in Abhängigkeit von den eingesetzten Nährböden dargestellt.

Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl in den nur mit Wasser inkubierten Kontrollansätzen verwendet. Die Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Testkeime (dunkelgrau: *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und hellgrau: *Escherichia coli* K12) in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Agars. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Abweichend zu den bisherigen Darstellungen wurden die hier abgebildeten Wiederfindungsraten direkt auf die Lebendzellzahlen der Kontrollansätze (= 100 %) bezogen. Nach Chlordioxidgabe wurden nur noch 50 % der Zellen und damit deutlich weniger wiedergefunden als beispielsweise bei einer Wasserstoffperoxidzugabe in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich (Versuche beschrieben unter Punkt 3.4.5.1 oder Punkt 3.4.5.2). Bei beiden Testkeimen wurden auf TSB-

Nährböden niedrigere Lebendzellzahlen und damit niedrigere Wiederfindungsraten generiert als bei den zusätzlich mit Pyruvat versetzten Nährböden. Die Unterschiede in den Wiederfindungsraten betragen ca. 15 bis 20 %. Dies änderte sich auch nicht nach einer Gesamtkubationsdauer auf den Nährböden von 48 h. Im direkten Vergleich der Wiederfindungsraten erwiesen sich sowohl *Escherichia coli* K12 als auch *Pseudomonas aeruginosa* WR1 gleich anfällig gegenüber Chlordioxid. Durch den Zusatz an Pyruvat zu den für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden wurden ca. 15 % mehr Zellen wiedergefunden als bei den korrespondierenden Proben, die auf Standard-TSB-Agar ausplattiert wurden.

Die Streuungen um die Mittelwerte waren bei den Werten der nicht supplementierten Agarplatten größer als bei den supplementierten Nährböden. Unter Betrachtung der Fehlerbalken waren vor allem die Unterschiede in Wiederfindungsraten zwischen *Escherichia coli* K12 kultiviert auf TSB-Agar oder supplementiertem Nährboden besonders deutlich.

Insgesamt erwies sich Chlordioxid als potentes Desinfektionsmittel, das auch bei niedrigeren Konzentrationen effektiv keimreduzierend wirken konnte. Dabei waren die beiden Testkeime gleich resistent bzw. anfällig für diese Oxidationsmittel. Erst bei der Betrachtung der Wiederfindungsraten, die durch Kultivierung der Testkeime auf mit Pyruvat versetzten Agarplatten erhalten wurden, unterschieden sich *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas aeruginosa* WR1.

#### 4.6.5 Wiederfindungsrate nach Pyruvat- und Acetatzusatz

Pyruvat konnte in einem Vorversuch Wasserstoffperoxid effektiv inaktivieren (siehe Punkt 3.4.3.4). In der Literatur (GIANDOMENICO et al. (1997), LONG und HALLIWELL (2011) und TROXELL et al. (2014)) wurde die reaktivierende Wirkung dieses zentralen Stoffwechselproduktes möglicherweise auf die Eigenschaft als ROS-Fänger zurückgeführt. Der vorliegende Versuch sollte in Anlehnung an TROXELL et al. (2014) die protektive Wirkung von Pyruvat auf *Pseudomonas aeruginosa* WR1 gegen Wasserstoffperoxid verifizieren. Gleichzeitig sollte die physiologische Relevanz von Pyruvat für die bakterielle Zelle mit der von Acetat verglichen werden. Dafür wurden Bakteriensuspensionen mit relativ geringer ( $OD_{0A} = 0,05$ ) und mit höherer Ausgangstrübung ( $OD_{0B} = 0,25$ ) untersucht.

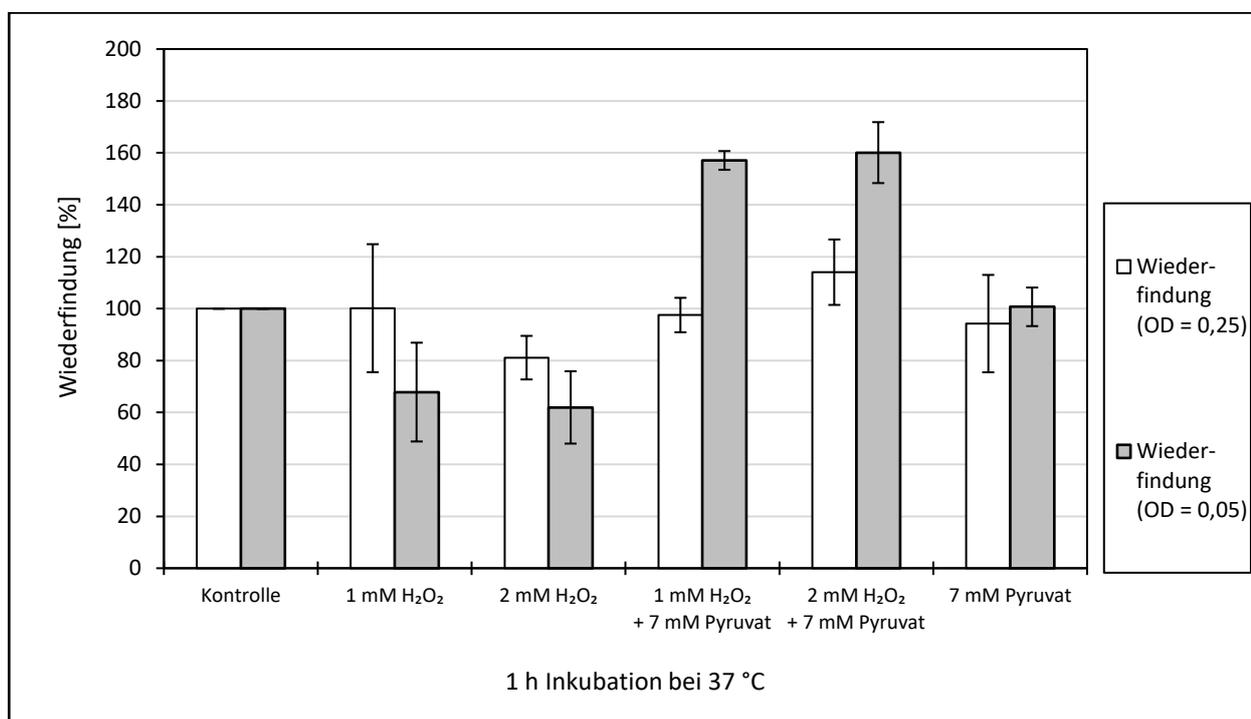


Abbildung 27: Pyruvatzusatz bei der Wasserstoffperoxidbehandlung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

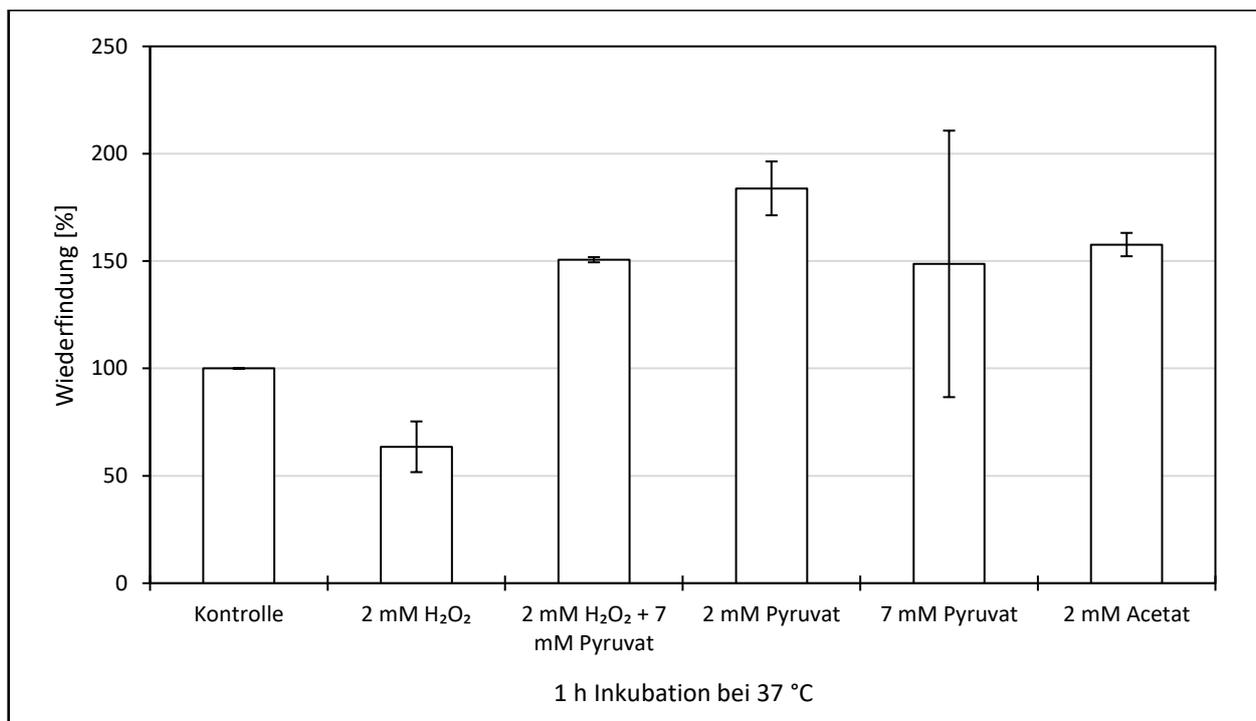
Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit unterschiedlichen Ausgangstrübungen ( $OD_A = 0,25$  und  $OD_B = 0,05$ ) wurden mit Wasserstoffperoxid ( $c = 0 - 2$  mmol/L) und Pyruvat ( $c = 7$  mmol/L) versetzt und 1 h bei  $37$  °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dargestellt sind die ermittelten Wiederfindungen [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Ab- und Anwesenheit von Pyruvat (7 mmol/L) und/oder Wasserstoffperoxid ( $c = 1 - 2$  mmol/L) in der Zellsuspension und dem eingesetzten Ausgangszelltiter ( $OD_A = 0,25$  und  $OD_B = 0,05$ ).

Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl in den nur mit Wasser inkubierten Kontrollansätzen ( $c(H_2O_2) = 0$  mmol/L) definiert. Die Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation mit oder ohne Pyruvat und mit oder ohne Wasserstoffperoxid. Die Füllung der Balken weist auf die unterschiedlichen Zelltiter (weiß:  $OD = 0,25$  und grau:  $OD = 0,05$ ) der Stammsuspensionen hin. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Durch die Wasserstoffperoxidkonzentrationen wurden vor allem die Keimzahlen von Suspensionen mit niedrigen Ausgangszellzahlen reduziert. Die Wiederfindungsraten sanken bei einer Anfangskonzentration von  $c(H_2O_2) = 1$  mmol/L oder  $c(H_2O_2) = 2$  mmol/L auf ca. 60 % der Ausgangslebenszellzahl. D.h. bei einer einstündigen Inkubationsdauer waren für die niedrigen Ausgangszellzahlen die gewählten Konzentrationen gleich effektiv in ihrer keimreduzierenden Wirkung. Dagegen wurden bei höheren Ausgangstrübungen ( $OD_{0B} = 0,25$ ) bei einer Konzentration  $c_{1B}(H_2O_2) = 2$  mmol/L eine geringe Abnahme der Wiederfindungsrate registriert (vgl. dazu den Versuch beschrieben unter Punkt 3.4.5.1). Durch den Zusatz von Pyruvat zu den Desinfektionsansätzen wurde unabhängig von der Anfangstrübung oder der Wasserstoffperoxidkonzentration keine Keimreduktion festgestellt. Stattdessen wurden Zelltiter nach der Inkubation der Ansätze mit einer optischen Dichte von  $OD_{0A} = 0,05$  wiedergefunden, die ca. 160 % der Ursprungszellzahl entsprachen. Dieser Effekt war in diesem Ausmaß nicht bei den Suspensionen mit höheren Ausgangstrübungen ( $OD_{0B} = 0,25$ ) erkennbar. Wasserstoffperoxid konnte in den Reaktionsansätzen nicht quantifiziert werden, da die Nachweisgrenze bei allen Desinfektionsansätzen erreicht wurde.

Pyruvat konnte auch in Kulturansätzen die Zellen vor Wasserstoffperoxid schützen. Anschließend fungierte Pyruvat oder das bei der Umsetzung entstehende Acetat (vgl. TROXELL et al. (2014)) als Kohlenstoffquellen, die für das bakterielle Wachstum herangezogen wurden. Die durch Wachstum hervorgerufene Änderung in der Lebendzellzahl machte sich vor allem bei sehr geringen Ausgangszellzahlen bemerkbar. Die optischen Dichten der verschiedenen Probensuspensionen stiegen bei allen Ansätzen nur leicht auf ein gleiches Niveau an bzw. stagnierten unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit.

Abschließend sollte bewertet werden, warum die Proben mit niedriger Ausgangszellzahl nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid und Pyruvat die höchsten Wiederfindungsraten zeigten.



**Abbildung 28: Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit unterschiedlichen Additiven**

Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer Trübung von OD = 0,05 wurden mit Wasserstoffperoxid ( $c = 0 - 2$  mmol/L), Acetat ( $c = 2$  mmol/L) und/oder Pyruvat ( $c = 7$  mmol/L) versetzt und 1 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dargestellt sind die ermittelten Wiederfindungen [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der Ab- und Anwesenheit von Pyruvat ( $c = 7$  mmol/L), Acetat ( $c = 2$  mmol/L) und bzw. oder Wasserstoffperoxid ( $c = 2$  mmol/L) in der Zellsuspension. Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl in den nur mit Wasser inkubierten Kontrollansätzen ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0$  mmol/L) definiert. Die Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation mit oder ohne Pyruvat bzw. mit oder ohne Wasserstoffperoxid oder mit Acetat. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

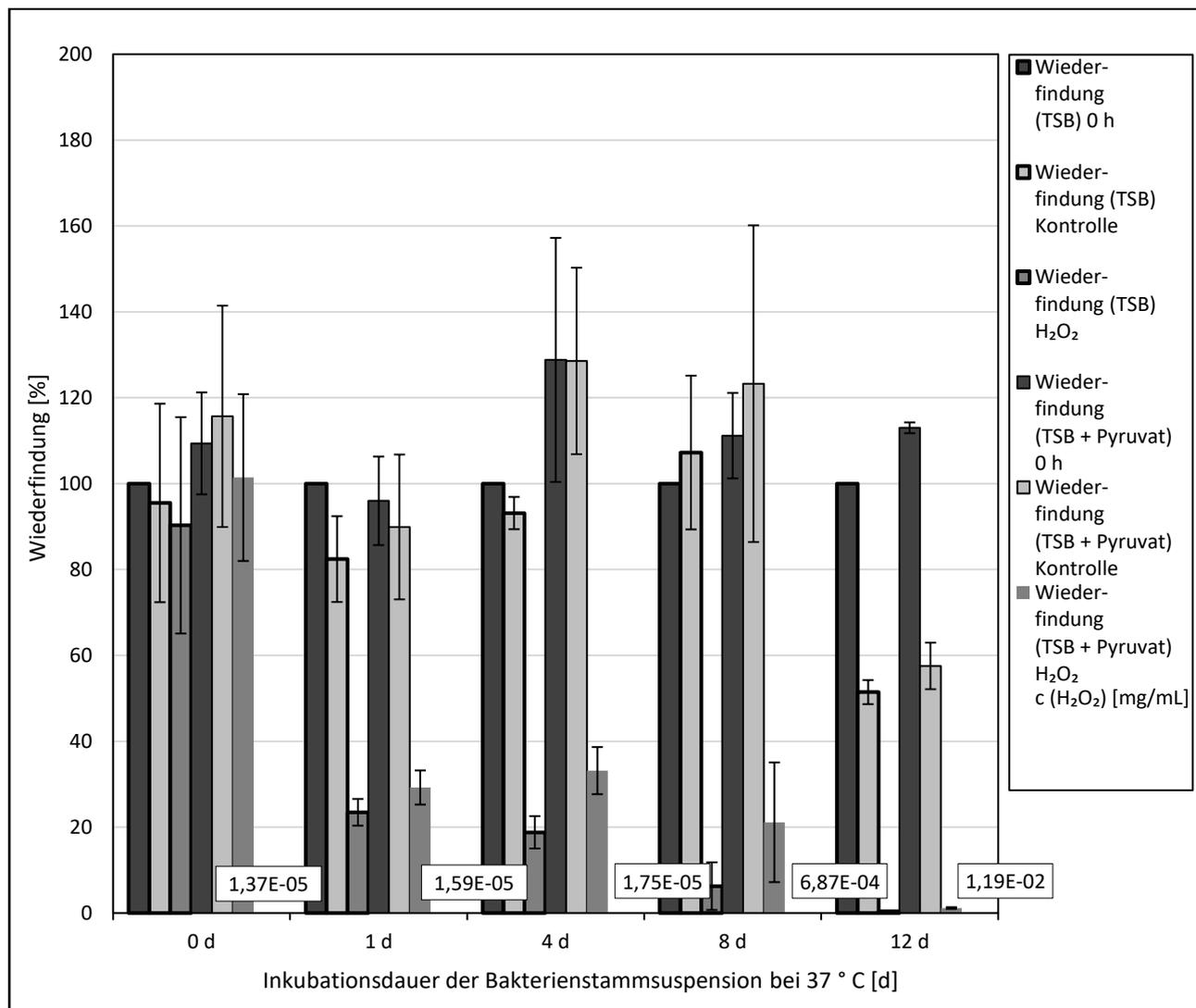
Durch den Folgeversuch wurden die niedrigen Wiederfindungsraten der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen nach Wasserstoffperoxidzusatz und die relativ hohen Wiederfindungsraten nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid und Pyruvat erneut ermittelt. Die meisten Zellen wurden nach Zusatz von Pyruvat oder Acetat gefunden. Ca. 1,5 so viele Zellen wie ursprünglich eingesetzt wurden erfasst. Auffallend war die Streuung um den Mittelwert bei den nur mit Pyruvat ( $c = 7$  mmol/L) inkubierten Ansätzen.

Sowohl Acetat als auch Pyruvat erlaubten in geringen Konzentrationen den Zellen eine Vermehrung. Die höhere Pyruvatkonzentration führte im Vergleich zur eingesetzten Menge an Acetat nicht zu einer höheren Wiederfindung. Ob höhere Pyruvatkonzentrationen sogar einen adversen Effekt aufwiesen, wie anhand der großen Schwankung vermutet werden konnte, wurde nicht weiter untersucht. Die Trübungen der Suspensionen blieben bei allen Ansätzen annähernd konstant.

#### 4.6.6 Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Zellkulturalter

Eine nachweisbare Desinfektionswirkung trat nur bei einem günstigen Verhältnis zwischen Ausgangstrübung bzw. -lebendzellzahl und Konzentration des Desinfektionsmittels auf (siehe Vorgehensweise beschrieben unter Punkt 3.4.5.1, Punkt 3.4.5.2 und Punkt 3.4.5.4). Erst dann konnte eine keimreduzierende Wirkung angezeigt und so oxidativer Stress provoziert werden (vgl. dazu GIANDOMENICO et al. (1997), DUKAN et al. (1999) und ZHOU et al. (2014)). Ferner wurden erfolgreiche Reaktivierungsversuche vorwiegend bei Zellkulturen erreicht, die in nährstoffarmer Umgebung unter ungünstigen Umwelteinflüssen langfristig inkubiert wurden (siehe Punkt 4.5). In

der hier vorliegenden Arbeit konnte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 über mehrere Wochen mittels Kultivierung nachgewiesen und quantifiziert werden. Pyruvat gilt als wirkungsvoller Antagonist von oxidativ wirkenden Substanzen, der als ROS-Fänger und/oder als Kohlenstoffquelle nach oxidativem Stress Wachstum und/oder Vermehrung erlaubte (siehe Punkt 4.4.4, Punkt 4.6.3, Punkt 4.6.4 und Punkt 4.6.5). Aufgrund der Quenching-Wirkung des Pyruvats und des Überlebens von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 unter oligotrophen Bedingungen wurden Zellsuspensionen dieses Testkeimes in phosphatgepufferter Salzlösung auf eine feste optische Dichte eingestellt, dann inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Wasserstoffperoxid versetzt. Der Desinfektionserfolg wurde anhand der Reduktion der Wiederfindungsraten beurteilt, wobei für die Lebendzellzahlbestimmung durch Kultivierung zusätzlich zu den TSB-Agarplatten auch die mit Pyruvat versetzten Nährböden eingesetzt wurden. Parallel dazu wurde der Verbrauch an Wasserstoffperoxid verfolgt.



**Abbildung 29: Reaktivierungsversuch von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mittels Supplementagar nach Aushungern und Wasserstoffperoxidbehandlung**

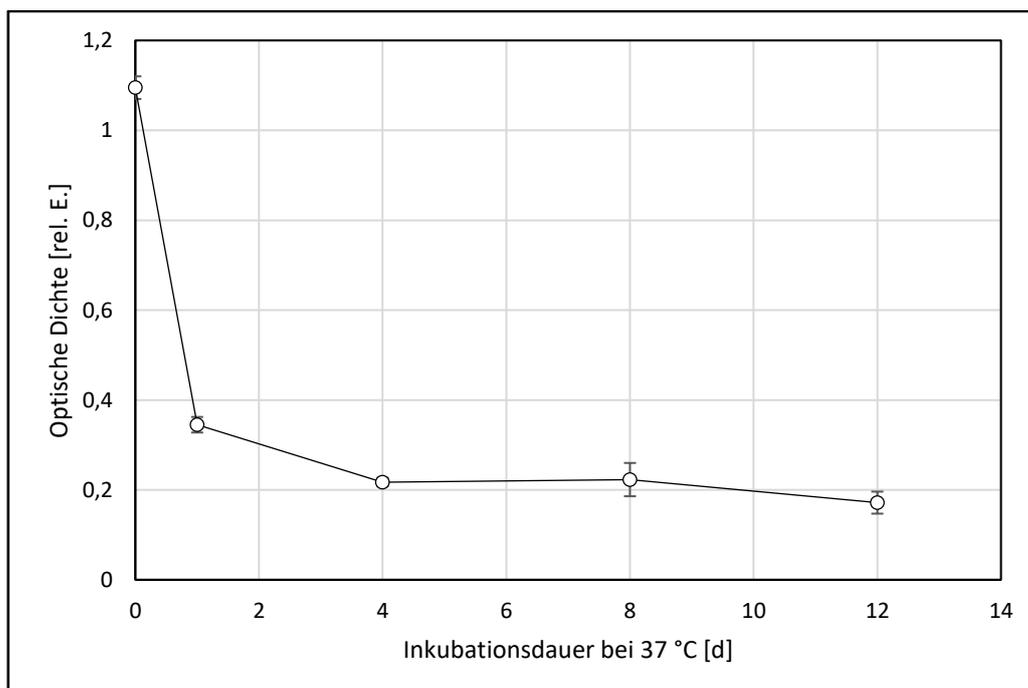
Definierte Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden unter ständigem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde von diesen inkubierten Suspensionen ein Aliquot entnommen und mit Wasserstoffperoxid ( $c = 0 - 30$  mmol/L) versetzt. Diese Aliquote wurden dann 1 h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Kultivierung auf TSB/CASO-Agar und auf supplementiertem TSB/CASO-Agar (TSB-Pyruvatagar) ermittelt. Die Restkonzentration an Wasserstoffperoxid in diesen Desinfektionsansätzen wurde durch das Peroxidase-DPD-Verfahren bestimmt (siehe Punkt 3.4.5.6).

Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden graphisch in Abhängigkeit von der durchgeführten Präparation, dem Alter der eingesetzten Zellsuspension und der für die Quantifizierung genutzten Nährböden dargestellt. Die im Ansatz verbliebenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid [mg/mL] werden im Diagramm direkt für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte (Quadrate) angezeigt.

Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl zum jeweiligen Beprobungszeitpunkt vor der Desinfektion definiert, die immer als linker Balken einer Säulengruppe dargestellt ist. Die weiteren Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen nach der Inkubation ohne (= Kontrolle) oder mit Wasserstoffperoxid (=  $H_2O_2$ ). Die unterschiedlichen Farben der Balken geben folglich die Zellbehandlung (dunkelgrau: keine Behandlung, hellgrau: Wasserzusatz und grau: Wasserstoffperoxidzusatz) wider. Die Rahmenstärke der Balken weist auf die unterschiedlich genutzten Agarsorten hin (TSB oder TSB mit Pyruvatzusatz (TSB+Pyruvat)). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Mit zunehmendem Alter der Suspensionen fielen nach dem Zusatz von Wasserstoffperoxid die Wiederfindungsraten stärker ab, bis bei den Proben zum Zeitpunkt  $t_5 = 12$  d nur noch 0,4 % (TSB) bzw. 1,2 % (TSB + Pyruvat) der Ursprungszellzahl wiedergefunden wurden. In den nur zur Kontrolle mit Wasser inkubierten Ansätzen wurden im Vergleich zur Referenzprobe (= 100 %) gleich viele Zellen wiedergefunden. Erst bei Zellkulturen mit einem Alter von 12 Tagen sanken auch bei den Kontrollansätzen durch die zusätzliche einstündige Inkubation die Wiederfindungsraten auf ca. 50 % bis 60 % des Ausgangswertes ab. Zu allen Probennahmezeitpunkten wurden bei allen Proben durch den Pyruvatzusatz höherer Wiederfindungsraten erzielt als bei den nur auf TSB-Agarplatten kultivierten Proben. Dieser Umstand war vor allem bei den Kulturen mit höherem Inkubationsalter bemerkbar. Die Konzentration an Wasserstoffperoxid, die nach der Umsetzung mit den Zellkulturen im Ansatz noch bestimmt werden konnte, lag bis zum Zeitpunkt  $t_3 = 4$  d nahe der Bestimmungsgrenze und wurde deswegen als  $c(H_2O_2) = 0$  mg/mL betrachtet.

Mehr Wasserstoffperoxid verblieb nach der einstündigen Inkubation in den Desinfektionsansätzen der 8 d bzw. 12 d alten *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen. Anhand der Wiederfindungsraten schienen die lang inkubierten Bakterienkulturen anfälliger für eine Desinfektion mit Wasserstoffperoxid. Dieser Eindruck wurde durch die höhere Restkonzentration des eingesetzten Desinfektionsmittels verstärkt. Allerdings musste berücksichtigt werden, dass durch die Langzeitinkubation (siehe Punkt 4.5) die gesamte Bakterienmasse abnahm und folglich das Verhältnis zwischen wirksamer Desinfektionsmittelkonzentration und Ausgangsmasse zugunsten der Wasserstoffperoxidkonzentration verschoben wurde. Die Abnahme der Gesamtbakterienmasse wurde mittels Turbiditätsmessung nachvollzogen.



**Abbildung 30: Trübung der Probensuspensionen bei Langzeitinkubation**

In der unter Abbildung 29 beschriebenen Stammsuspensionen, die bis zu 12 d inkubiert wurden, wurde die Trübung über den gesamten Beprobungszeitraum verfolgt. Dargestellt ist die optische Dichte [rel. E.] dieser Stammsuspensionen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d] nach Einstellung der ursprünglichen Trübung ( $OD_0 = 1,0$ ).

Die Trübungen der Probensuspensionen nahmen stark innerhalb eines Tages ab, sanken dann nur noch leicht auf eine optische Dichte von ca.  $OD_2 = 0,2$  ab und stagnierten auf diesem Wert für ca. 4 Tage. Bei der letzten Messung wurde eine Endtrübung von ca.  $OD_{12\text{ d}} = 0,17$  bestimmt.

Durch den Pyruvatzusatz zu den für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden wurden mehr Zellen wiedergefunden als bei den selben Proben, die ohne Pyruvatzusatz quantifiziert wurden. In Anlehnung an DUCRET et al. (2014) wurde dieser Mehrbefund als Wiederherstellungsrate R („restoration rate“) dargestellt.

**Tabelle 26: Mehrbefund (Wiederherstellungsrate R) von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Anwesenheit von Pyruvat**

Inkubationsdauer unter nährstofffreien Bedingungen (37 °C) [d]:	Wiederherstellungsrate R [rel. E.]:	Fehler (einfache Standardabweichung) [rel. E.]:
0	1,1	± 0,1
1	1,2	± 0,07
4	<b>1,6</b>	± 0,10
8	<b>3,5</b>	± 1,5
12	<b>2,2</b>	± 0,3

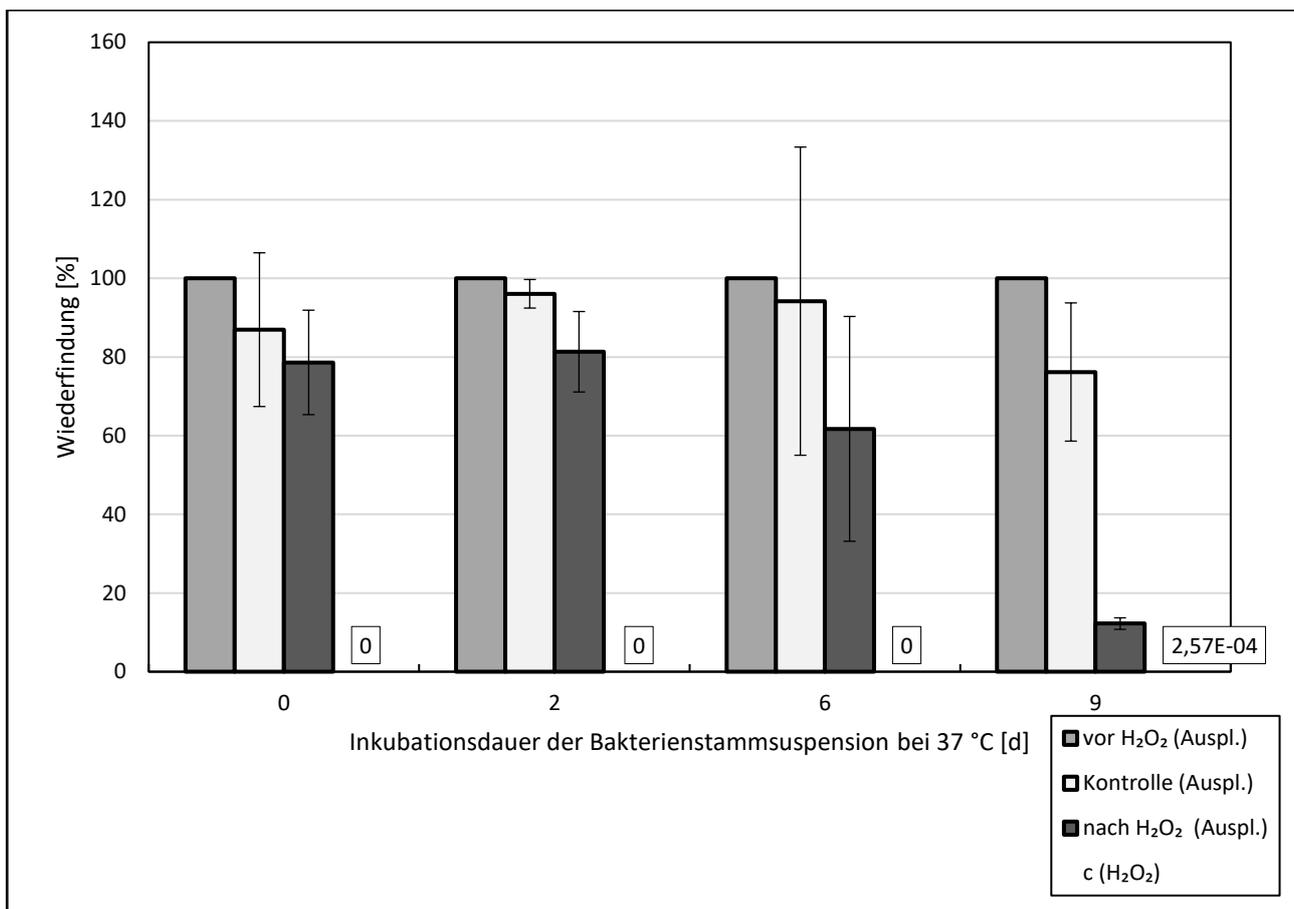
Die Vorgehensweise und die zugrundeliegenden Lebendzellzahlen bzw. Wiederfindungsraten wurden in Abbildung 29 dargestellt. Die Wiederherstellungsrate R ist demnach definiert als der Quotient der Lebendzellzahlen, die durch Kultivierung auf TSB-Agarplatten bestimmt wurden und die durch Kultivierung auf mit Pyruvat versetzten Nährböden ermittelt wurden.

Dargestellt ist das Verhältnis der Lebendzellzahlen [KBE/mL], die mittels Ausplattiermethode auf Standard-TSB/CASO-Agar (= 1) und auf supplementiertem Agar (TSB-Pyruvatagar (1 % (w/v))) bestimmt wurden. Wiederherstellungsraten  $R \geq 1,5$  wurden nach DUCRET et al. (2014) als signifikant angesehen und zur besseren Übersicht markiert. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Nach Langzeitinkubation in nährstoffarmer Umgebung sank erwartungsgemäß die bakterielle Gesamtmasse der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen. Durch den verringerten Zelltitel reduzierte Wasserstoffperoxid effektiver die Lebendzellzahl. Mittels Zusatz von Pyruvat zu den für die Kultivierung eingesetzten Nährböden wurden vor allem bei lang inkubierten Kulturen mehr Zellen wiedergefunden. Signifikant war der Unterschied in den Lebendzellzahlen und damit in den Wiederfindungsraten bei den lang inkubierten Proben, die mit Wasserstoffperoxid versetzt wurden.

#### 4.7 Vitalitätsbestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidbehandlung

Als Referenz für die Vitalitätsbestimmung durch Kultivierung boten sich fluoreszenzmikroskopische Verfahren an, da sie in Kontrast zu sonstigen relativen Quantifizierungsverfahren einen direkten Vergleich zuließen (vgl. dazu DAVIS (2014)). Ferner sind die Anfärbungen von Zellen mittels CTC und DAPI (CHAVEERACH et al. (2003) und MORISHIGE et al. (2013)) oder mit Propidiumiodid und SYTO 9 (ARANA et al. (2007), BÉDARD et al. (2014) und DUCRET et al. (2014)) die in diesem Kontext häufig beschriebenen Methoden. In der hier vorgelegten Arbeit wurde als Methode nach Punkt 3.4.2.2 das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit eingesetzt.



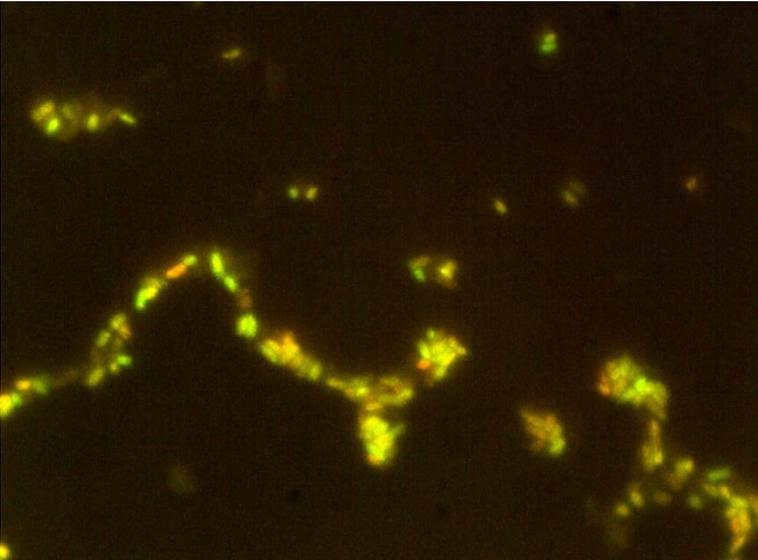
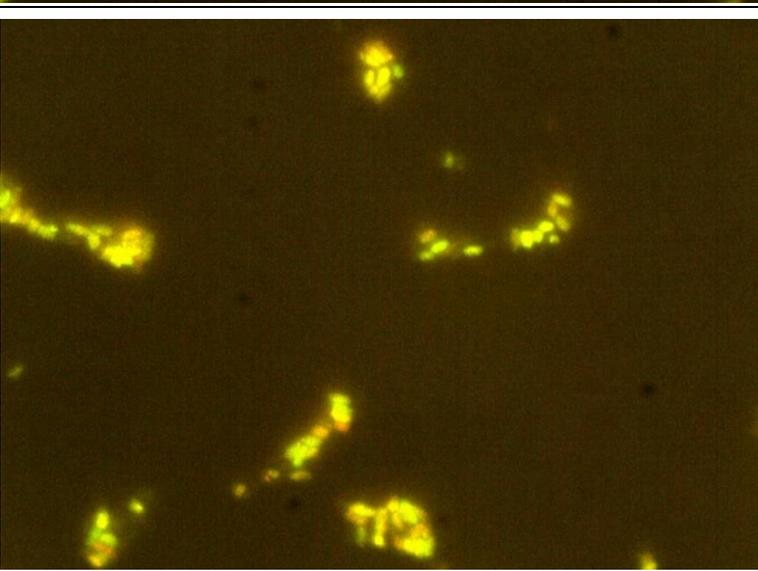
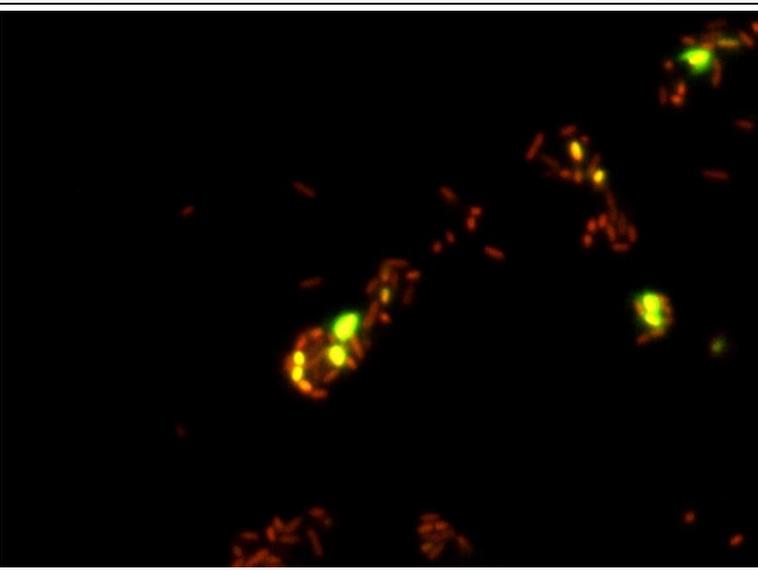
**Abbildung 31: Wiederfindung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Kultivierung**

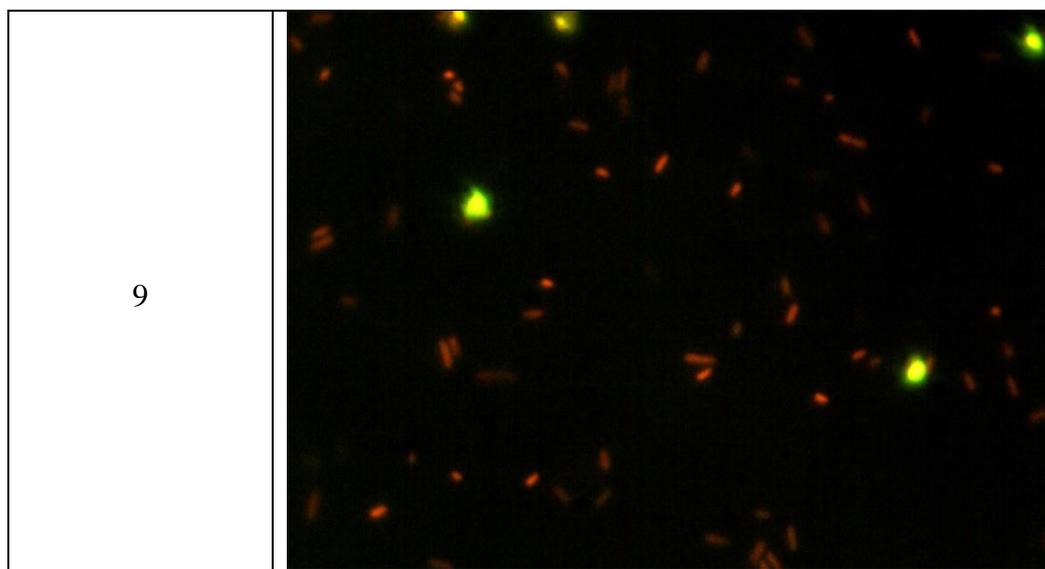
Definierte Stammsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden unter ständigem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde von diesen inkubierten Suspensionen ein Aliquot entnommen und mit Wasserstoffperoxid ( $c = 0 - 30$  mmol/L) versetzt. Diese Aliquote wurden dann 1 h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Kultivierung auf TSB/CASO-Agar ermittelt. Die Restkonzentration an Wasserstoffperoxid in diesen Desinfektionsansätzen wurde durch das Peroxidase-DPD-Verfahren bestimmt (siehe Punkt 3.4.6).

Die ermittelten Wiederfindungsraten [%] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden graphisch in Abhängigkeit von der durchgeführten Präparation, dem Alter der eingesetzten Zellsuspension und der für die Quantifizierung genutzten Nährböden dargestellt. Die im Ansatz verbliebenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid [mg/mL] werden im Diagramm direkt für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte (Quadrate) angezeigt. Als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl zum jeweiligen Beprobungszeitpunkt vor der Desinfektion definiert, die immer als linker Balken einer Säulengruppe dargestellt ist. Die weiteren Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen nach der Inkubation ohne (= Kontrolle) oder mit Wasserstoffperoxid (= H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden bei den Kontrollansätzen annähernd die gleiche Anzahl an Zellen wiedergefunden wie ursprünglich vor der Inkubation eingesetzt. Erst nach 6 d Inkubation unterschieden sich die Kontrollansätze und die Anfangsproben geringfügig in ihrem Zelltitel. Die Lebendzellzahlen eines Aliquotes der 9 Tage lang inkubierten Stammsuspension wurden durch Wasserstoffperoxid drastisch reduziert. Bei den 6 Tage alten Kulturen wurde eine Keimreduzierung unter Berücksichtigung der Fehlerbalken nur geringfügig beobachtet. Die Konzentration an Wasserstoffperoxid, die in den separaten Desinfektionsansätzen nach der Umsetzung mit den Zellkulturen noch enthalten war, lag für die ersten drei Beprobungszeitpunkte nahe der Bestimmungsgrenze. Erst bei der Wasserstoffperoxidbehandlung der 9 Tage alten Bakteriensuspension konnte eine Restkonzentration ermittelt werden. Trotz der zeitversetzten Beprobung ähnelte dieser Verlauf den unter Punkt 4.6.6 genannten Ergebnissen.

**Tabelle 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidzugabe**

Alter der mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandelten Suspension [d]:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme:
0	
2	
6	



Unterschiedlich alte Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden wie unter Abbildung 31 beschrieben mit Wasserstoffperoxid ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 30 \text{ mmol/L}$ ) inkubiert. Die Zellen wurden mittels des LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels einer Mikroskopkamera wurde die Aufnahme erfasst. Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen der unter Abbildung 31 beschriebenen Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung in Abhängigkeit vom Alter der Suspension.

Mit zunehmendem Alter der Zellsuspensionen sank rein visuell die Anzahl der Zellen, die anhand des Zustandes ihrer Cytoplasmamembran als vital definiert wurden.

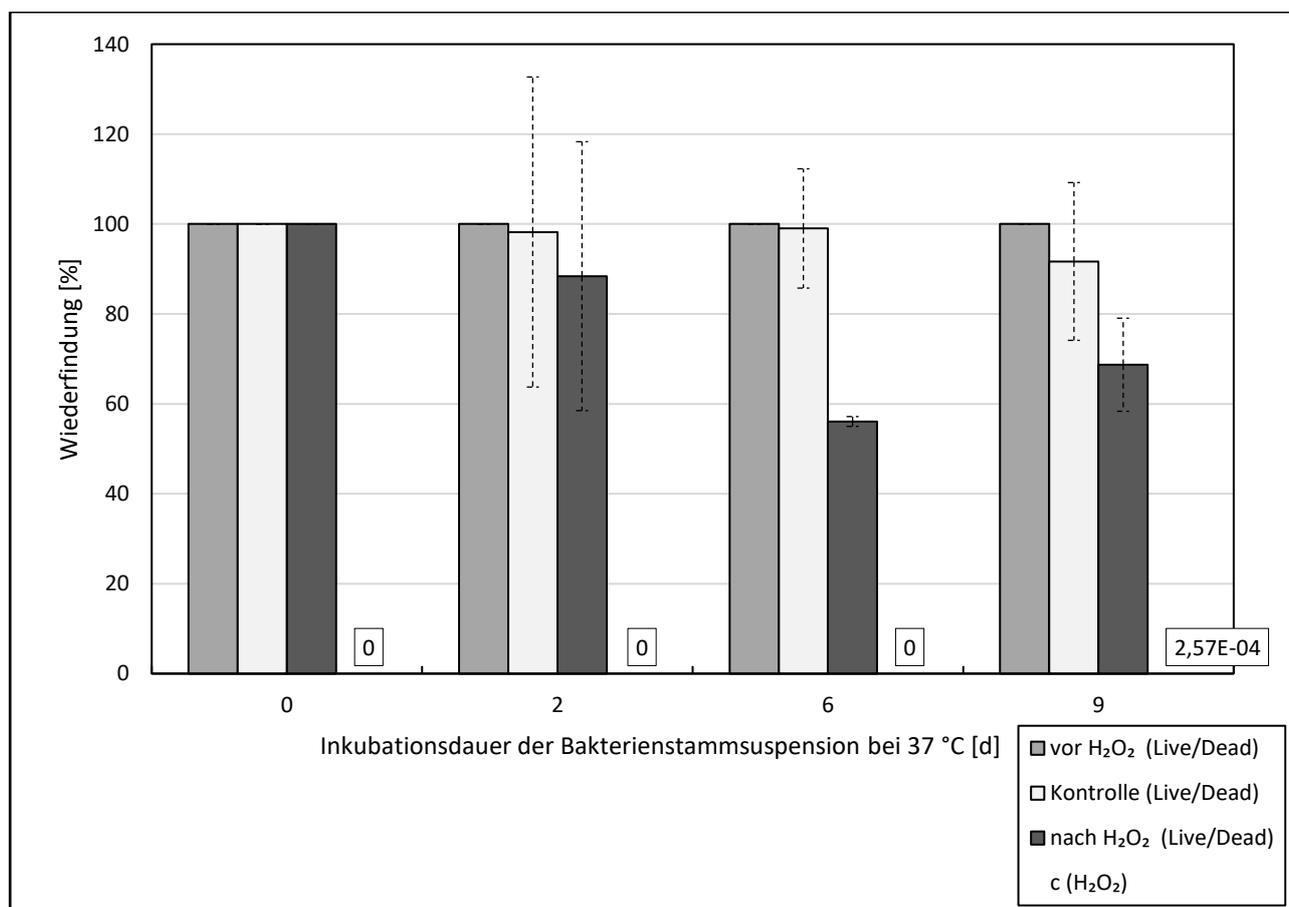


Abbildung 32: Wiederfindung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 durch Fluoreszenzmikroskopie (BacLight™ Bacterial Viability)

Parallel zur unter Abbildung 31 beschriebenen Lebendzellzahlbestimmung durch das Spatelverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 wurde auch der Lebendzelltiter fluoreszenzmikroskopisch mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit nach Punkt 3.4.6 ermittelt. D.h. als Bezugsgröße für die Wiederfindung (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl der Bakteriensuspension zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt definiert, die ebenfalls immer als linker Balken einer Säulengruppe dargestellt wird. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Die fluoreszenzmikroskopisch ermittelten Wiederfindungsraten ähnelten bis zum Zeitpunkt  $t_2 = 6$  d dem unter Abbildung 31 dargestellten Verlauf. Auffallend war die zeitversetzte Streuung um den Mittelwert am 6. Tag der Probennahmen hin zum 2. Tag. Die hier abgebildete Wiederfindungsrate für die mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben zum Zeitpunkt  $t_2 = 6$  d entsprach mit einem Wert von 60 % der korrespondierenden unter Abbildung 31 beschriebenen Wiederfindungsrate. Ein signifikanter Unterschied in den durch Kultivierung oder durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelten Wiederfindungsraten war zum letzten Probennahmenzeitpunkt ersichtlich. Der Zelltiter der desinfizierten Ansätze entsprach bei den mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmten Wiederfindungsraten ca. 70 % der Ursprungszellzahl. Im Gegensatz dazu wurden bei dem Kultivierungsverfahren nur ca. 15 % der Ursprungszellzahl wiedergefunden. Dieser Befund wurde anhand der absoluten Zellzahlen bestätigt. Zum Zeitpunkt  $t_4 = 8$  d wurden durch die klassische Lebendzellzahlbestimmung ein Zelltiter von  $LZZ = 2,4 \cdot 10^7$  KBE/mL und durch das fluoreszenzmikroskopische Verfahren von  $LZZ = 4,73 \cdot 10^7$  KBE/mL absolut quantifiziert.

D.h. es konnte gezeigt werden, dass ein großer Anteil an Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 durch die klassische Kultivierungsmethode nicht erfasst wurde, aber aufgrund einer intakten Cytoplasmamembran fluoreszenzmikroskopisch als vital erkannt wurde.

Im Vergleich zu den unter Punkt 4.6.6 beschriebenen Beobachtungen wurden in diesem Versuchsteil nach Wasserstoffperoxidzugabe durch die Kultivierungsmethoden weniger Zellen wiedergefunden. Dieser Umstand konnte dadurch erklärt werden, dass sich die Suspensionen trotz gleich eingestellter optische Dichte sich in ihrer Ausgangszellzahl unterschieden und die Aliquote für den Desinfektionsansatz zeitversetzt entnommen wurden.

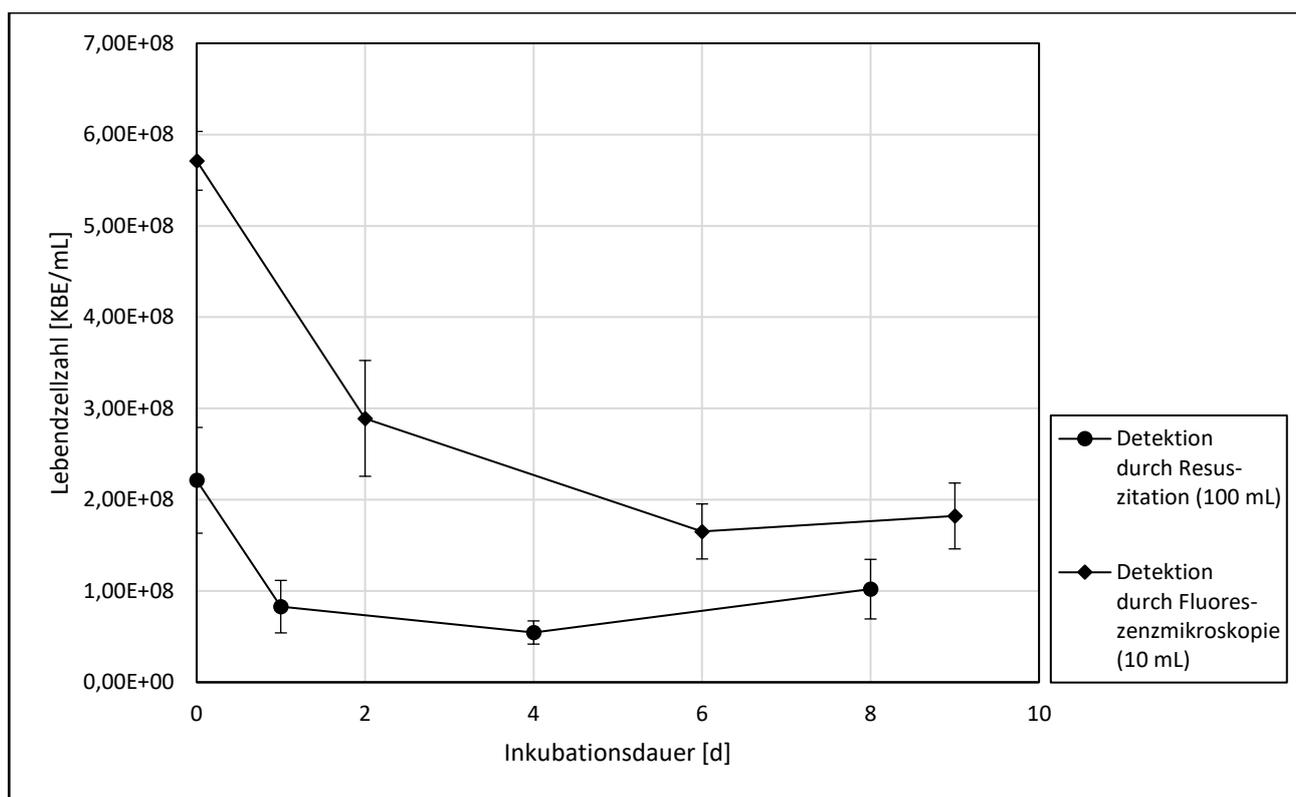


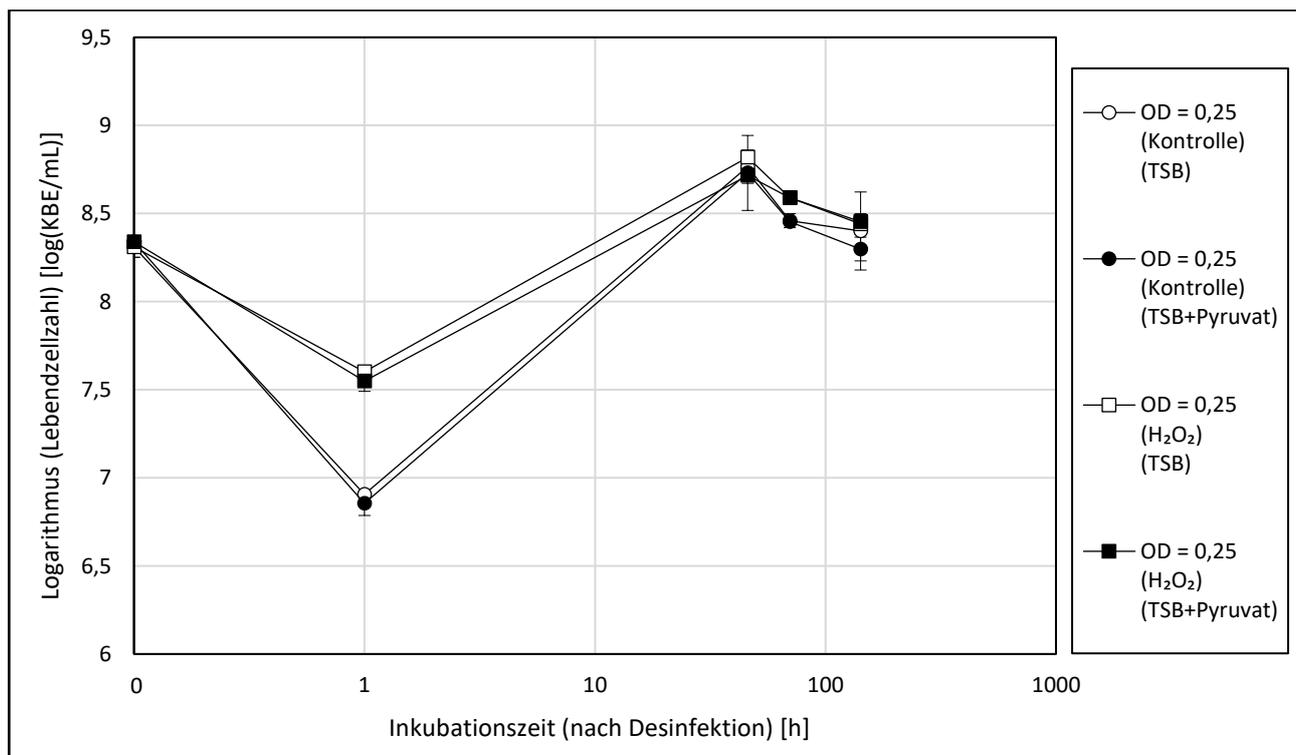
Abbildung 33: Lebendzellzahlen der Versuchsansätze in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Für zwei unabhängige Versuchsansätze (siehe Punkt 3.4.5.6 und Punkt 3.4.6) wurden jeweils 4 Bakteriensuspensionen in phosphatgepufferter Salzlösung auf eine optische Dichte von  $OD = 1,0$  eingestellt und anschließend unter Lichtausschluss bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Die Lebendzellzahl wurde nach DIN 10161-1:1984-02 durch Ausplattieren auf Nährböden nach dekadischer Verdünnung ermittelt. Dargestellt sind die Lebendzellzahlen [KBE/mL] dieser unterschiedlichen Versuchsansätze in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d] und dem Anfangsvolumen [100 mL und 10 mL (Legende)]. D.h. „Detektion durch Resusozitation (100 mL)“ beschreibt die unter Punkt 3.4.5.6 definierte *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension mit einem Volumen von  $V = 100\text{ mL}$  und „Detektion durch Fluoreszenzmikroskopie“ die unter Punkt 3.4.6 erläuterte Suspension mit einem entsprechenden Volumen von  $V = 10\text{ mL}$ . Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

#### 4.7.1 Zellüberleben von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung und Langzeitinkubation

In Anlehnung an BÉDARD et al. (2014) sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zur Selbstresusozitation befähigt war. Kerngedanke war die Hypothese, dass ein Bakterium, das den VBNC-Zustand annehmen kann, auch in der Lage sein muss, bei verbesserten Umweltbedingungen sich wieder vermehren zu können (LLEÓ et al. (2001) und WONG und WANG (2004)). Dafür wurden Suspensionen mit Wasserstoffperoxid versetzt und anschließend inkubiert. Danach wurden die Lebendzellzahlen und die Restkonzentrationen an Wasserstoffperoxid in den Versuchsansätzen verfolgt. Bei Abwesenheit des Lethalfaktors Wasserstoffperoxid wurde ein Anstieg der Kultivierbarkeit bzw. der Lebendzellzahl erwartet.

##### 4.7.1.1 Zellüberleben nach Wasserstoffperoxidzugabe mit geringer Konzentration

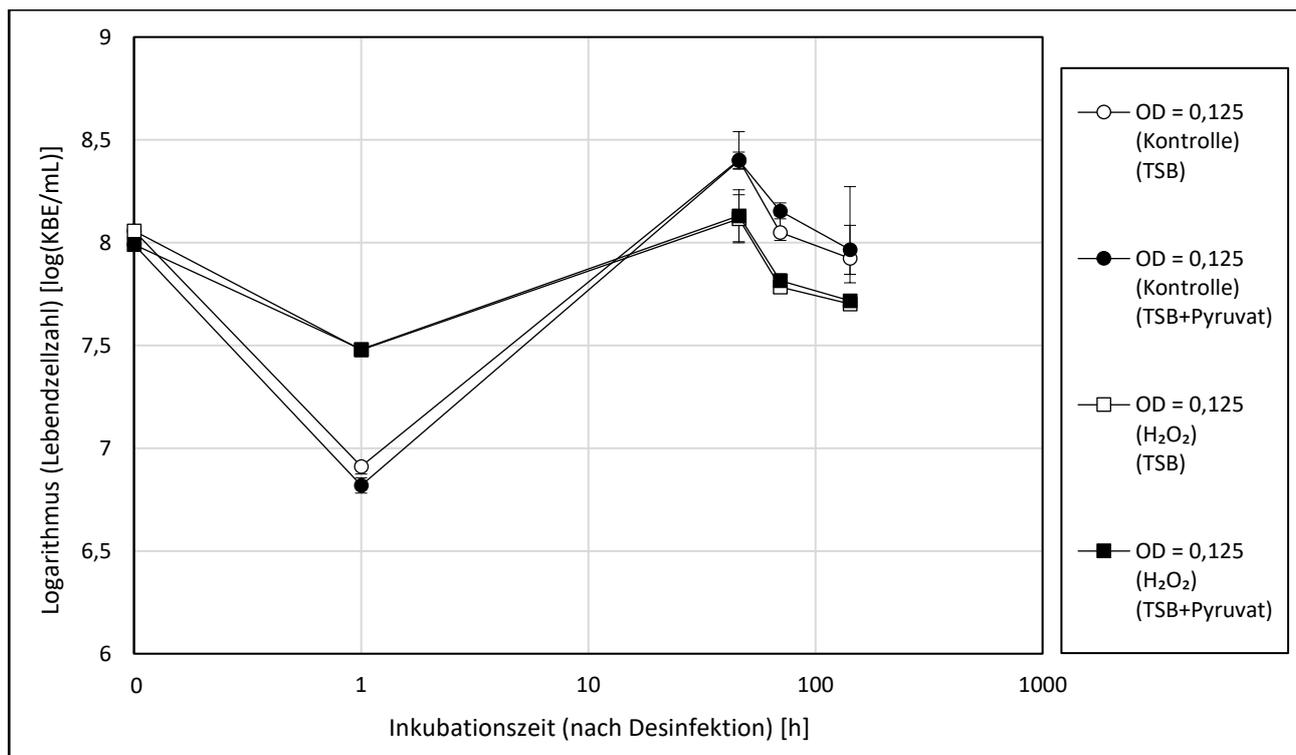


**Abbildung 34: Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ( $OD = 0,25$ ) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid**

Zellkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden in einer Trübung von  $OD_0 = 0,25$  mit Wasserstoffperoxid desinfiziert und dann unter Lichtausschluss bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Nur mit Wasser versetzte Proben dienten als Kontrolle (siehe Punkt 3.4.7.1). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Aliquot für die Lebendzellzahlbestimmung entnommen. Die Quantifizierung erfolgte nach dem Spatelverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 mit TSB-Agarplatten und mit Pyruvat supplementierten (1 % (w/v)) TSB-Agarplatten (siehe Punkt 3.4.7.1).

Dargestellt sind die logarithmierten Werte für die Lebendzellzahlen [ $\log(\text{KBE}/\text{mL})$ ] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h], dem für die Quantifizierung herangezogenen Nährboden (TSB (weiß) und TSB + Pyruvat (schwarz)) und der Vorgehensweise (Kontrolle (Kreis) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe (Quadrat)). Die Angabe OD gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die Abkürzungen TSB und TSB+Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

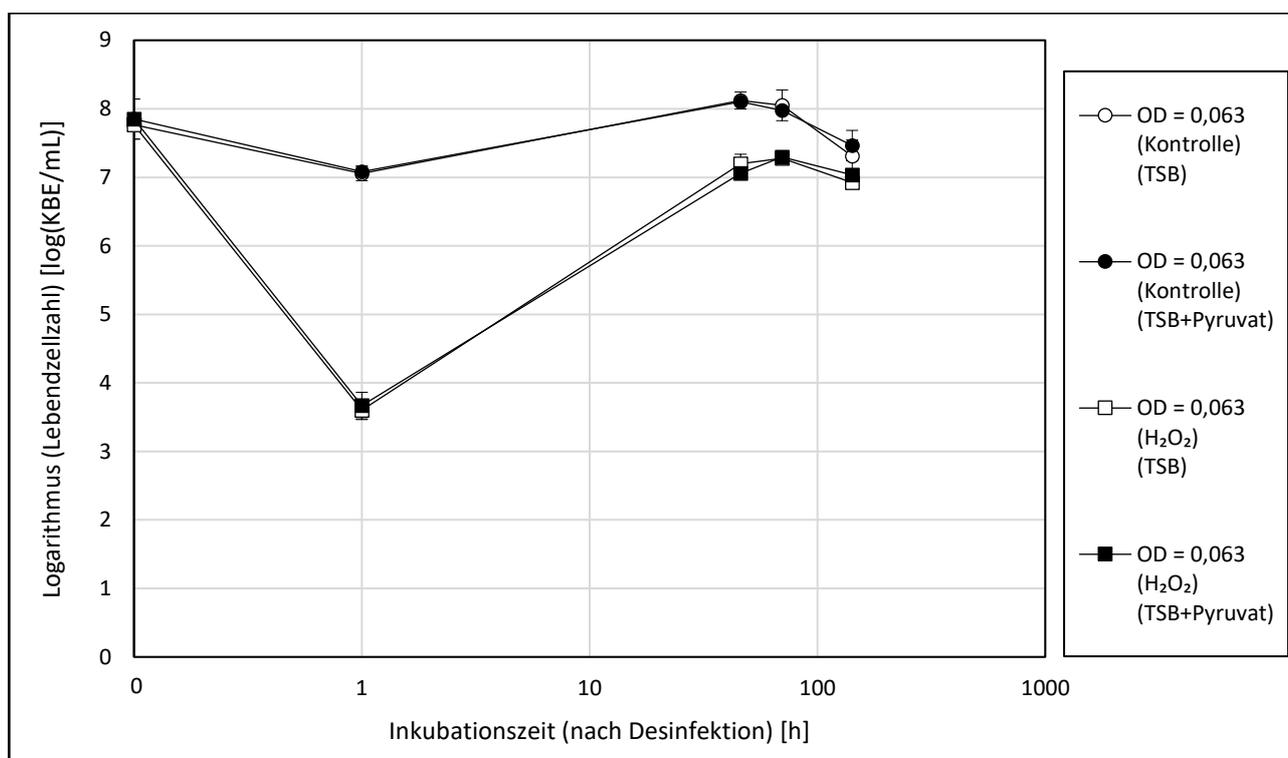
Nach Start der Inkubation nahmen die Lebendzellzahlen sowohl bei den Kontrollansätzen als auch bei den mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben ab. Dabei wurden nach 1 h bei den desinfizierten Kulturen ca. eine halbe 10er-Potenz weniger Zellen wiedergefunden als bei den nur mit Wasser inkubierten Ansätzen. Anschließend stiegen die logarithmierten Werte für die Lebendzellzahlen für beide Versuchsansätze auf ein höheres Niveau als ursprünglich eingesetzt. Zu den letzten beiden Probennahmezeitpunkten entsprachen die ermittelten Lebendzellzahlen ansatzweise dem Anfangszelltitel. Der Zusatz an Pyruvat zu den Nährböden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lebendzellzahlen.



**Abbildung 35: Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (OD = 0,125) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid**

Parallel zu der unter Abbildung 34 beschriebenen Vorgehensweise wurden auch Kulturansätze mit einer Trübung von  $\text{OD}_0 = 0,125$  untersucht. Dargestellt sind ebenfalls die logarithmierten Werte für die Lebendzellzahlen [ $\log(\text{KBE}/\text{mL})$ ] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h], dem für die Quantifizierung herangezogenen Nährboden (TSB (weiß) und TSB + Pyruvat (schwarz)) und der Vorgehensweise (Kontrolle (Kreis) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe (Quadrat)). Die Angabe OD gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die Abkürzungen TSB und TSB+Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

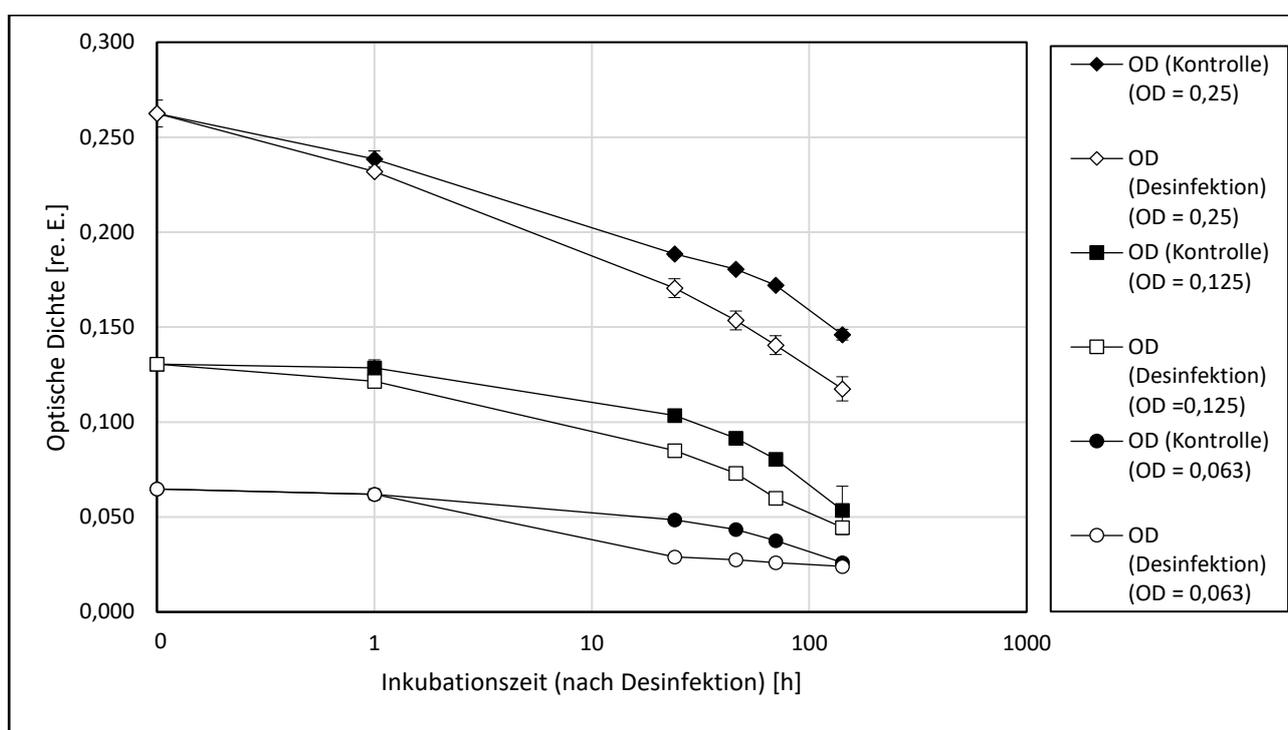
Die Kurvenverläufe der logarithmierten Lebendzellzahlen der Suspensionen mit einer anfänglichen optischen Dichte von  $\text{OD}_0 = 0,125$  entsprachen den bereits unter Abbildung 34 beschriebenen Ergebnissen. Nach Abfall der Lebendzellzahlen stiegen diese wieder auf ein höheres Niveau als ursprünglich eingesetzt an und normalisierten sich gegen Ende des Versuchs auf das Ausgangsniveau. Auch hier wurde bei den mit Pyruvat versetzten Agarplatten nicht mehr Zellen detektiert.



**Abbildung 36: Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (OD = 0,063) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid**

Suspensionen mit einer optische Dichte von  $OD_0 = 0,063$  im Ansatz waren auch Untersuchungsgegenstand der bereits unter Abbildung 34 genannten Durchführung. Dargestellt sind die logarithmierten Werte für die Lebendzellzahlen [log (KBE/mL)] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h], dem für die Quantifizierung herangezogenen Nährboden (TSB (weiß) und TSB + Pyruvat (schwarz)) und der Vorgehensweise (Kontrolle (Kreis) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe (Quadrat)). Die Angabe OD gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die Abkürzungen TSB und TSB+Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

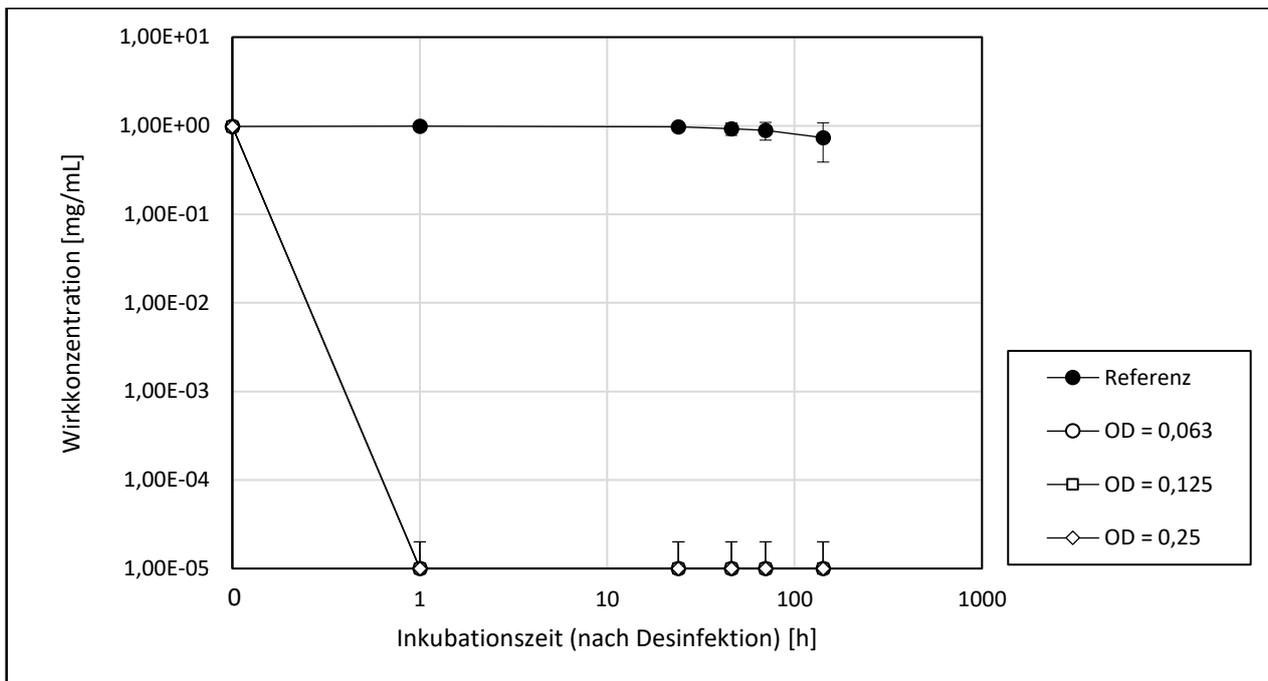
Bei den Versuchsansätzen mit den geringsten Ausgangszellzahlen wurden die Lebendzellzahlen mittels Wasserstoffperoxid im Vergleich zu den vorherigen Kulturen effektiver reduziert. Um ca. drei log-Stufen unterschieden sich die Kontroll- und die Probenkulturen in ihrem Wert für die Lebendzellzahlen. Danach stiegen wie zuvor beschrieben die Lebendzellzahlen bei den Kontrollansätzen und den desinfizierten Proben wieder an, bis sie sich gegen Ende des Versuchs auf das ursprüngliche Niveau normalisierten. Der Pyruvatzusatz hatte hier keinen Mehrbefund bewirkt.



**Abbildung 37: Trübung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen unterschiedlichen Anfangszelltiters nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid**

*Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in nährstoffreichem/-armen Puffer unterschiedlicher Ursprungstrübung wurden mit Wasserstoffperoxid versetzt und anschließend inkubiert. Die Kontroll suspensionen wurden dagegen um den gleichen Faktor mit Puffer verdünnt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Trübungen ( $\lambda = 546 \text{ nm}$ ) der jeweiligen Versuchsansätze bestimmt (siehe Punkt 3.4.7.1). Dargestellt sind die optischen Dichten [rel. E.] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen mit unterschiedlichen Anfangszelltitern (OD  $\sim 0,063$  (Kreis); OD  $\sim 0,125$  (Quadrat) und OD  $\sim 0,25$  (Raute)) in Abhängigkeit von den Probenahmezeitpunkten und der Probenbehandlung (schwarz: Kontrolle und weiß: Desinfektion). Die Angabe OD gibt die Anfangstrübung der Bakterien suspension an. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Durch den Zusatz an Wasserstoffperoxid verringerte sich bei allen Ansätzen kaum die Trübung der Suspensionen. Erst durch die Langzeitinkubation konnten größere Unterschiede festgestellt werden. Die zuletzt gemessenen Turbiditäten der desinfizierten und nicht desinfizierten Versuchsansätze mit den Anfangstrübungen von OD = 0,063 und OD = 0,125 näherten sich sogar jeweils untereinander an. Bei den Ansätzen mit der höchsten Ausgangstrübung (OD = 0,25) blieben die Trübungen nach einer Gesamtkubationsdauer von ca. 7 Tagen verschieden. Die Differenz in den Lebendzellzahlen zeigte sich nur geringfügig in den Trübungen, was durch die Anwesenheit von toten bzw. nicht vollständig lysierten Zellen erklärt werden konnte.



**Abbildung 38: Konzentrationsabnahme von Wasserstoffperoxid in den desinfizierten und anschließend inkubierten Versuchsansätzen**

*Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in nährstofffreiem/-armen Puffer wurden mit Wasserstoffperoxid versetzt und anschließend inkubiert. Für die Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid wurden die Bakterien mittels Zentrifugation abgetrennt und die Menge an Desinfektionsmittel in den klaren Überständen quantifiziert. Die Kontrolle stellten nur mit Puffer versetzte Wasserstoffperoxidlösungen dar (siehe Punkt 3.4.7.1).

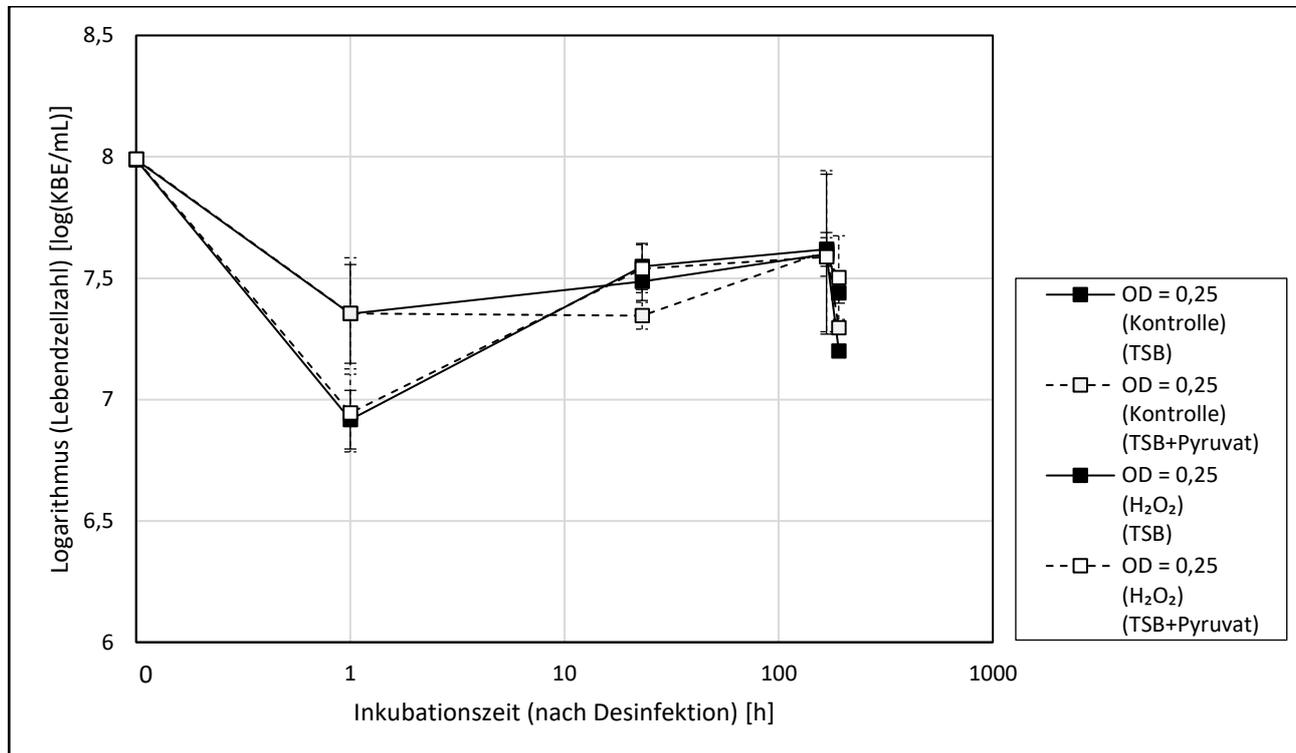
Dargestellt sind die Wasserstoffperoxidkonzentrationen [mg/mL] in den Versuchsansätzen (weiß: Proben (OD)) und in den Kontrollansätzen (schwarz: externer Standard) in Abhängigkeit von den Probenahmezeitpunkten und der Ausgangstrübung der Proben. Die Angabe OD in der Legende gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Bei allen Probenansätzen nahm nach der einstündigen Inkubation die Wasserstoffperoxidkonzentration einen Wert unter bzw. nahe der Bestimmungsgrenze von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0 \text{ mg/mL}$  an (vgl. dazu Punkt 3.4.5.2) an. Im Gegensatz dazu blieb in den Referenzansätzen über den gesamten Beprobungszeitraum die Wasserstoffperoxidkonzentration konstant. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Konzentrationsabnahme dieses Oxidationsmittels die direkte Folge eines Abreagierens mit den Testkeimen und nicht das Ergebnis anderer Quenching-Effekte (vgl. dazu LAMBERT und JOHNSTON (2000)) war.

Wie zuvor gezeigt konnte Wasserstoffperoxid mit der ausgewählten Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ mg/mL}$  bei Suspensionen mit hoher Ausgangstrübung die Lebendzellzahl nicht effektiv reduzieren (siehe Punkt 3.4.5.1 und Punkt 3.4.5.2). Erst Kulturen mit deutlich niedrigeren Ausgangszelltitern wiesen eine merklich reduzierte Zellzahl und damit ein reduziertes Zellüberleben auf. Innerhalb eines Tages konnte diese deutliche Differenz in den Lebendzellzahlen nicht mehr festgestellt werden. Die mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben und die korrespondierenden Kontrollansätze unterschieden sich nur punktuell in ihren Trübungen, die als indirektes Maß für die Bakterienmasse verfolgt wurden. Signifikantes Wachstum sollte dadurch angezeigt werden. Der Rückgang an Wasserstoffperoxid konnte als direkte Folge der Reaktion mit den zugesetzten Zellen interpretiert werden.

## 4.7.1.2 Zellüberleben nach Wasserstoffperoxidzugabe mit hoher Konzentration

Um die eingangs erwähnte Kausalität zwischen dem Verschwinden des negativen Umweltfaktors und der Wiedererlangung der Vermehrungsfähigkeit bzw. Kultivierbarkeit zu demonstrieren (siehe Punkt 4.7.1), wurde die für die Desinfektion eingesetzte Wasserstoffperoxidkonzentration verzehnfacht. Die Ausgangstrübungen der Probensuspensionen wurden so gewählt, dass Zellsuspensionen mit sehr geringem Ausgangszelltiter und mit relativ hohem Zelltiter vorhanden waren

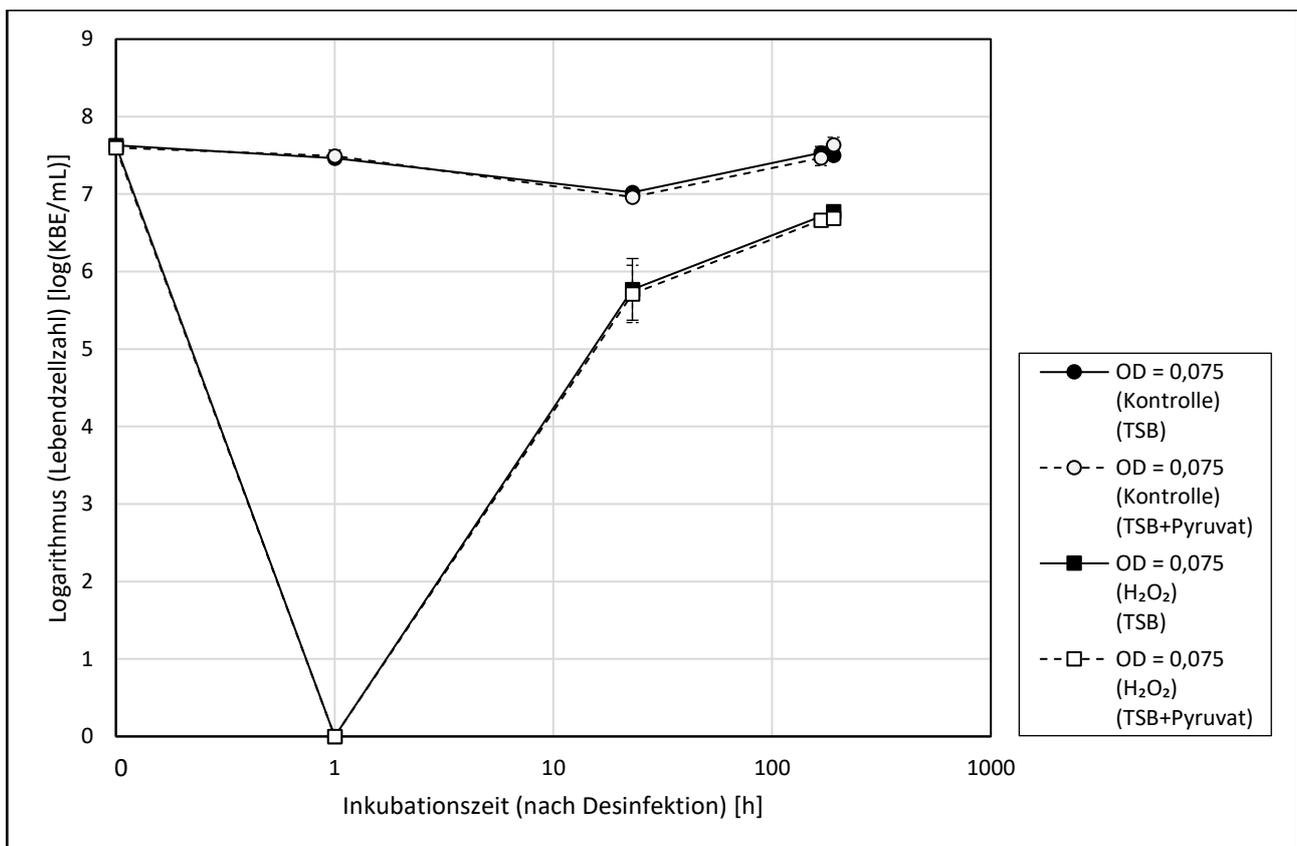


**Abbildung 39: Logarithmierte Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (OD = 0,25) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung**

In Anlehnung an Punkt 3.4.7.1 wurden Zellkulturen unterschiedlicher Ausgangszellzahl bzw. -trübung mit Wasser (Kreis) oder mit Wasserstoffperoxid höherer Konzentration (Quadrat) versetzt und anschließend inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Lebendzellzahlen nach dem Spatelverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 mit TSB-Agarplatten (schwarz) und mit Pyruvat supplementierten (1 %) TSB-Agarplatten (weiß) quantifiziert (siehe Punkt 3.4.7.2).

Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl [log (KBE/mL)] einer definierten Zellsuspension mit einer optischen Dichte von OD = 0,25 von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der logarithmierten Inkubationszeit [h] nach der Wasserstoffperoxidbehandlung und der für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden. Die Angabe OD in der Legende gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die Abkürzungen TSB und TSB+Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die in der Abbildung dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

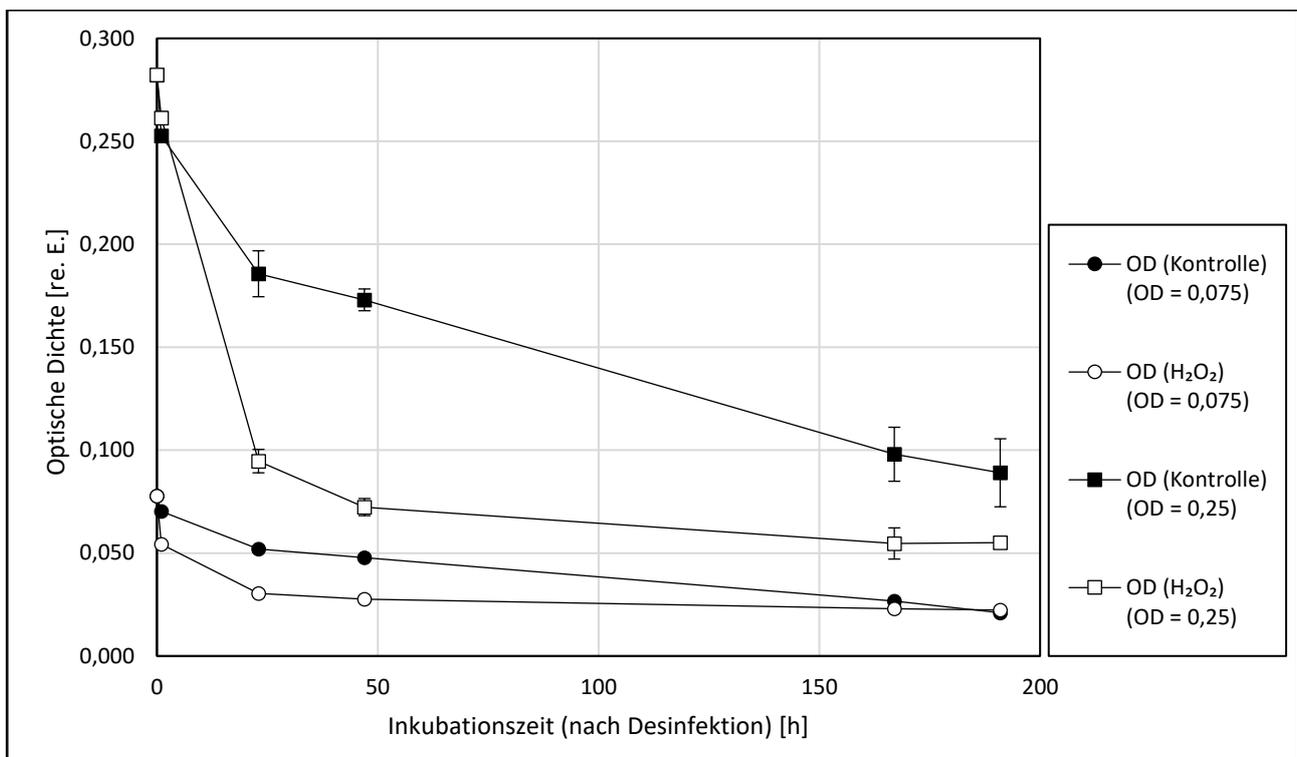
Die Kurvenverläufe der hier abgebildeten logarithmierten Zellzahlen glichen den Ergebnissen der vergleichbaren, unter Punkt 3.4.7.1 bereits beschriebenen Versuche. Trotz zehnfach höherer Wasserstoffperoxidkonzentration sank die Lebendzellzahl der desinfizierten Ansätze nur um eine 10er-Potenz ausgehend von der Ursprungszellzahl und unterschied sich nach der einstündigen Inkubation von den Werten für die Kontrollansätze nur um eine halbe 10er-Potenz. Anschließend stiegen bei beiden Kulturtypen die Lebendzellzahlen auf einen ähnlichen Wert von 7,5 [log (KBE/mL)] an und stagnierten bei den letzten beiden Probennahmen bei einem Wert für den Zelltiter von 7,6 [log (KBE/mL)]. Durch den Pyruvatzusatz zu den für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden wurden nicht höhere Lebendzellzahlen ermittelt.



**Abbildung 40: Logarithmierte Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (OD = 0,075) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung**

Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl [log (KBE/mL)] einer definierten Zellsuspension mit der optischen Dichte von OD = 0,075 von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der logarithmierten Inkubationszeit [h] nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung und der für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden. Die Vorgehensweise ist bereits unter Abbildung 39 beschrieben. Die Angabe OD in der Legende gibt die Anfangstrübung der Bakteriensuspension an. Die Abkürzungen TSB und TSB+Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

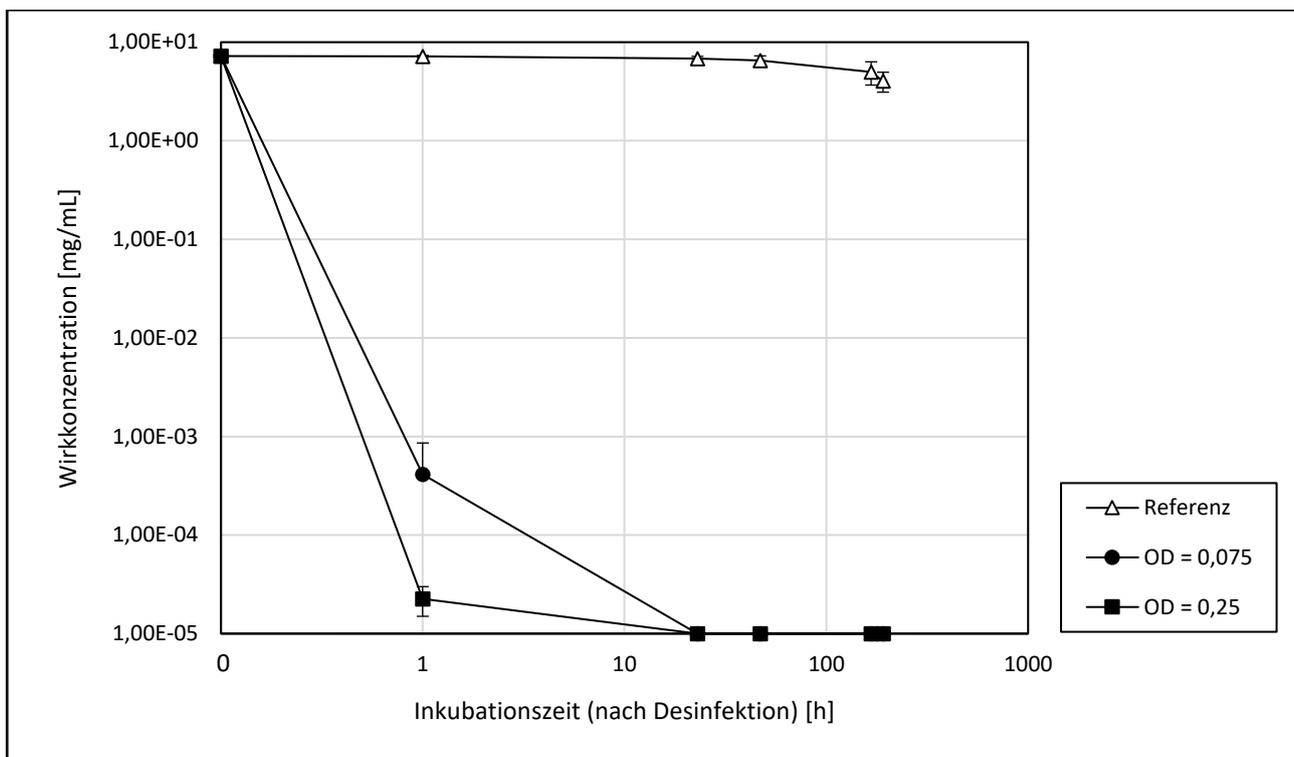
Nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid und einstündiger Inkubation verringerten sich die Lebendzellzahlen auf einen Wert, der unterhalb der Nachweisgrenze lag und mit 0 KBE/mL angegeben wurde. Nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 1 d wurde eine um sechs log-Stufen erhöhte Lebendzellzahl registriert, die gegen Ende des Beprobungszeitraumes sich auf einen Wert von ca. 6,7 [log (KBE/mL)] erhöhte. Die logarithmierten Lebendzellzahlen der Kontrollansätze sanken konstant nach einer Inkubationsdauer von 1 Tag auf ca. 7 [log (KBE/mL)] und erholten sich danach auf den Ursprungszelltitel.



**Abbildung 41: Trübung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen unterschiedlichen Anfangszelltiters nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid**

Dargestellt sind die optischen Dichten [rel. E.] der in Abbildung 39 und Abbildung 40 beschriebenen *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen unterschiedlichen Anfangszelltiters ( $OD \sim 0,075$  (Kreis) und  $OD \sim 0,25$  (Quadrat)) in Abhängigkeit von den Probennahmenzeitpunkten und der Probenbehandlung (schwarz: Kontrolle und weiß: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zusatz). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

Die Trübungen nahmen bei allen Suspensionen ab. Durch die Wasserstoffperoxidzugabe hatten die desinfizierten Ansätze immer eine geringere optische Dichte als ihre Kontrollkulturen. Aufgrund der Sensitivität der Trübungsmessung fiel diese Abnahme vor allem bei den Kulturen mit größerer Anfangstrübung auf. Mit zunehmender Inkubationszeit näherten sich dann auch die Kontrollkulturen in ihrer optischen Dichte jeweils ihren korrespondierenden desinfizierten Ansätzen an. So erreichten die Kulturen mit geringer Anfangstrübung eine Endtrübungsstärke von ca.  $OD_5 = 0,025$ , während die Suspensionen mit höherem Zelltiters sich noch unterschieden. ( $OD_{\text{Kontrolle},5} = 0,09$  und  $OD_{\text{H}_2\text{O}_2,5} = 0,05$ ).



**Abbildung 42: Konzentrationsabnahme von Wasserstoffperoxid in den Versuchsansätzen**

In den unter Abbildung 39 und Abbildung 40 beschriebenen Desinfektionsansätzen wurden die Restkonzentrationen an Wasserstoffperoxid bestimmt. Die Grenze des praktischen Arbeitsbereiches für dieses Quantifizierungsverfahren wurde auf ca.  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mg/mL}$  gesetzt. Dargestellt sind die Wasserstoffperoxidkonzentrationen [mg/mL] in den Versuchsansätzen (OD = 0,075 (Kreis) und OD = 0,25 (Quadrat)) und in den externen Standards (Referenz (Dreieck)) in Abhängigkeit von den Probenahmezeitpunkten. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

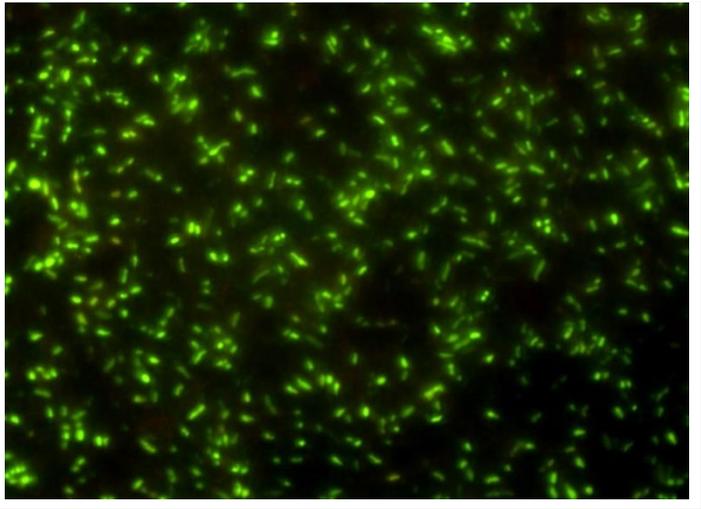
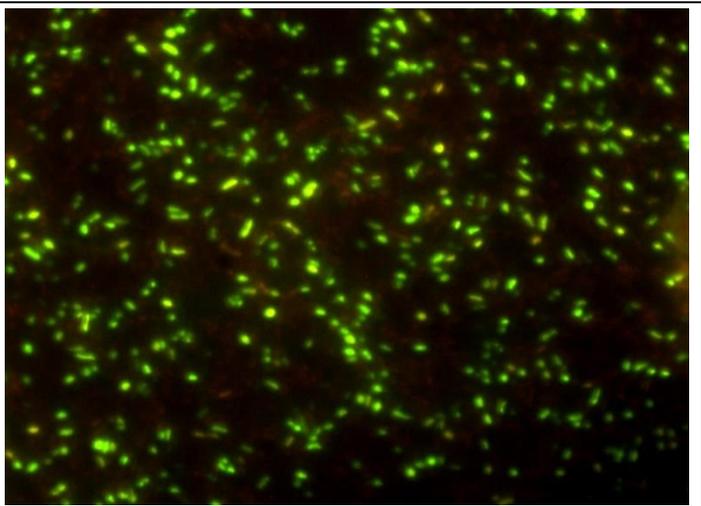
In Übereinstimmung mit den unter Punkt 4.7.1.1 genannten Beobachtungen blieb die Konzentration des externen Standards annähernd über den gesamten Beprobungszeitraum konstant und verringerte sich erst gegen Ende der Inkubation. Die Wasserstoffperoxidgehalte in den Versuchsproben fielen dagegen rasant, bis nach einstündiger Inkubation bei den Kulturen mit hoher Ausgangstrübung kein Wasserstoffperoxid bestimmt werden konnte. Bei den Suspensionen mit geringer Anfangszellzahl wurde noch eine Restkonzentration von ca.  $c_1(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$  quantifiziert. Für alle weiteren Beprobungszeitpunkte konnte kein Wasserstoffperoxid mehr in den Bakterienkulturen quantifiziert werden.

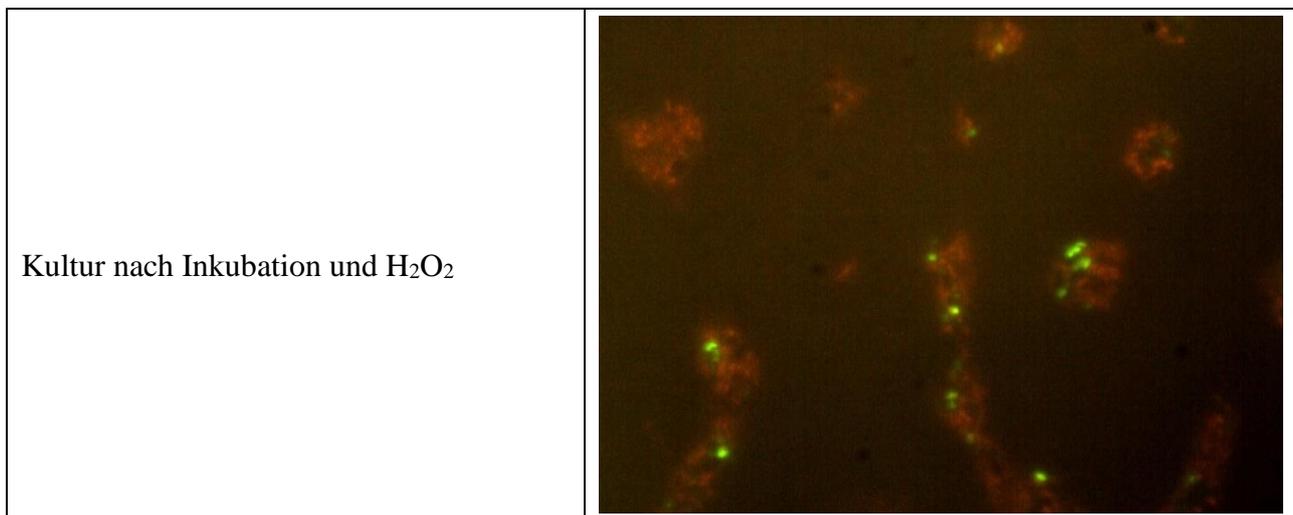
Durch die erhöhte Wirkkonzentration an Wasserstoffperoxid wurde bei den Suspensionen mit geringer Ausgangstrübung der Zelltitel derart reduziert, dass mit der ausgewählten Ausplattiermethode keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen wurden. Auffallend war der signifikante Anstieg der Lebendzellzahlen nach eintägiger Inkubation. Es wurde kein Wasserstoffperoxid mehr nachgewiesen und die Suspensionen erreichten eine um sechs 10er-Potenzen erhöhte Anzahl an vitalen Zellen. Die abnehmende Trübung ließ ein erneutes Wachstum nicht erkennen, was aber aufgrund der anfänglich höheren Ausgangstrübung auf abgetötete Zellen zurückgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Lebendzellzahlen der Kulturen mit hoher Ursprungszellzahl nur geringfügig durch das Desinfektionsmittel reduziert, stiegen aber ebenfalls nach einem Tag wieder an und erreichten das ursprüngliche Niveau. Pyruvat hatte bei dem vorliegenden Versuchsdesign keine nachweisbare reaktivierende Wirkung.

#### 4.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung und die Wiederfindungsraten nach Membranfiltration

Mittels des vorliegenden Versuches sollte beurteilt werden, in welchem Ausmaß der nach der Desinfektion und Inkubation eingetretene Wiederbefund von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 Folge einer Reaktivierung und/oder einer Vermehrung war (siehe Punkt 4.7.1.2). Dafür wurde das Membranfiltrationsverfahren als sensitivere Kultivierungsmethode herangezogen (siehe Punkt 3.4.7.3). Parallel sollte mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen eine rein qualitative Aussage getroffen werden.

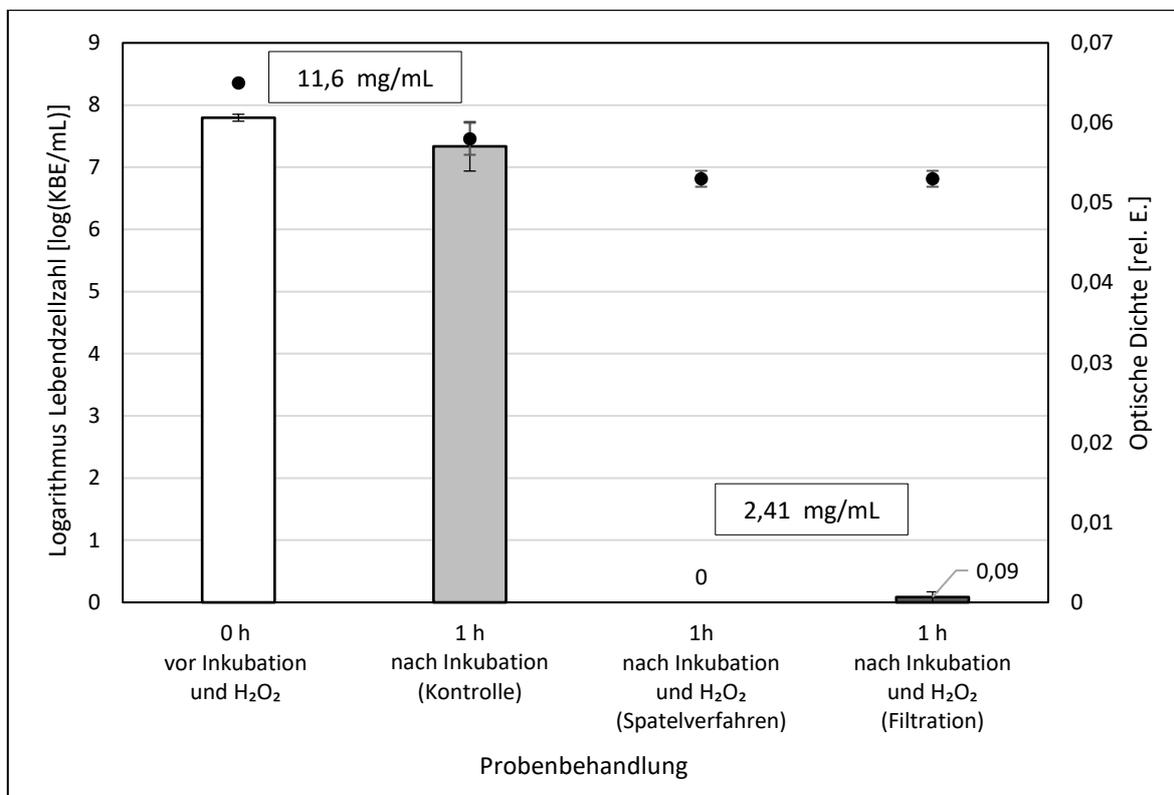
**Tabelle 28: Qualitative Vitalitätsbestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidzugabe**

Probenansatz:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme:
Kultur vor Inkubation und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Kultur nach Inkubation (Kontrolle)	



Tabellarisch dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen angefärbter Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxidbehandlung. Die Zellen wurden mittels des LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits markiert und fluoreszenzmikroskopisch bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet (siehe Punkt 3.4.7.3). Mittels einer Mikroskopkamera wurde die Aufnahme erfasst.

Die Stammsuspension zeigte erwartungsgemäß vor der Inkubation im fluoreszenzmikroskopischen Präparat volle Vitalität. Alle Zellen waren einheitlich grün gefärbt. Allein durch die einstündige Inkubation wurden bei einigen Zellen die Cytoplasmamembran für das zugesetzte Propidiumiodid permeabler, was durch Rotfärbung der Zellen angezeigt wurde und definitionsgemäß als totes bzw. abgetötetes Bakterium interpretiert wurde. Die mit Wasserstoffperoxid inkubierten Ansätze zeigten im mikroskopischen Präparat Abtötungserscheinungen in Form von zusammenhängenden Zellclustern aus rot gefärbten Zellen. In diesen Zellaggregaten zeigten sich verstärkt mehrmals grüne, d.h. vitale Stäbchen.



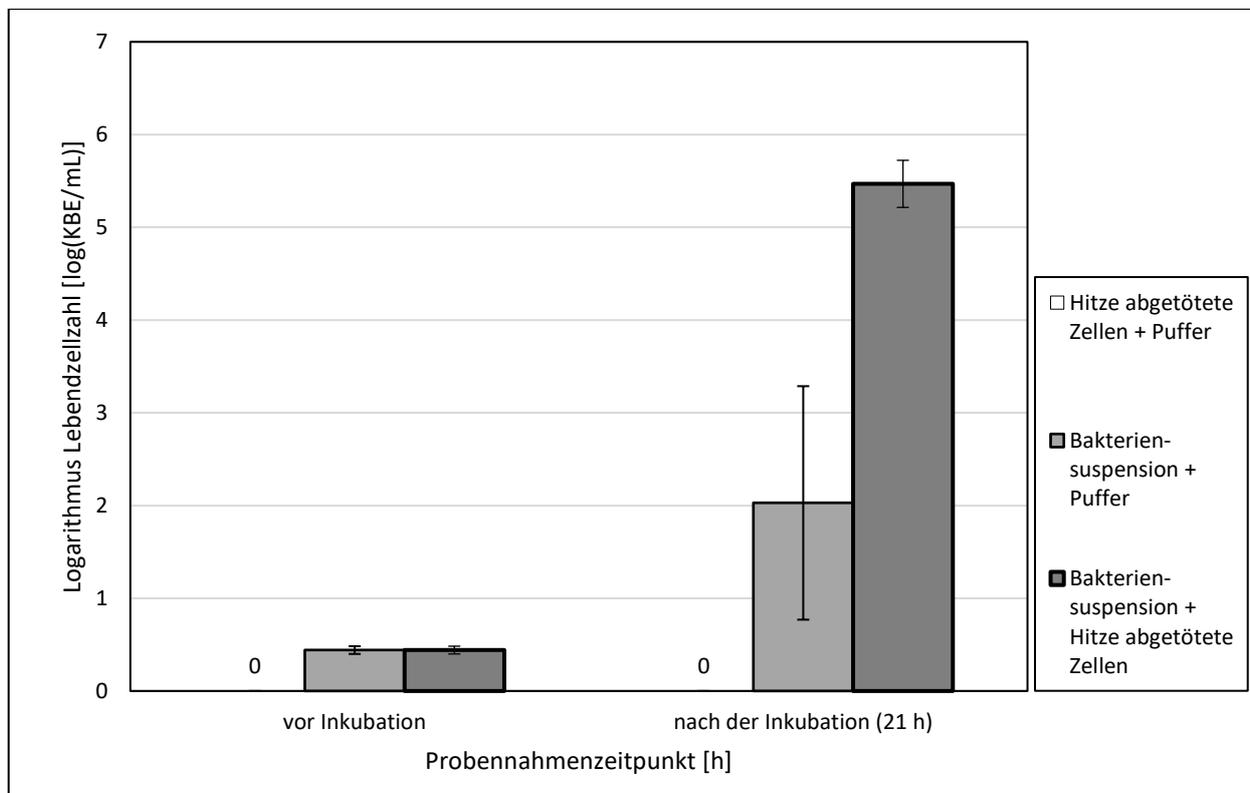
**Abbildung 43: Logarithmus der Lebendzellzahl und die optischen Dichten von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxiddesinfektion**

Definierte Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden mit Wasserstoffperoxid versetzt und 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Lebendzellzahlen durch Ausplattieren nach DIN 10161-1:1984-02 bzw. per Membranfiltration in Anlehnung an DIN EN ISO 16266:2008-05, die optischen Dichten [rel. E.] und die Wasserstoffperoxidkonzentration [mg/mL] bestimmt (siehe 3.4.7.3). Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 [log(KBE/mL)] nach Wasserstoffperoxidzugabe (ca. 11 mg/mL) in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode (Spatel- oder Membranfiltrationsverfahren) und die optischen Dichten [rel. E.] der jeweiligen Suspension. Die Balken kennzeichnen die ermittelten logarithmierten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor (= 0 h (weiß)) bzw. nach der Inkubation (= 1 h (Kontrolle) (hellgrau)) und der zusätzlich parallel durchgeführten Wasserstoffperoxidbehandlung (= Spatelverfahren oder Filtration (dunkelgrau)). Die eingesetzte Wirk- und die Restkonzentration [mg/mL] von Wasserstoffperoxid werden direkt im Diagramm in den Rahmen angezeigt. Die Einzelpunkte (Kreis) stellen die dazugehörigen optischen Dichten [rel. E.] der Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid in einer Endkonzentration von ca.  $c = 10$  mg/mL wurde die Zellzahl derart reduziert, dass durch das Spatelverfahren nach DIN 10161-1:1984-02 keine Zellen mehr detektiert und damit quantifiziert wurden. Dagegen erlaubte die Membranfiltration eine Zellzahlbestimmung der in den Desinfektionsansätzen erhaltenen Bakterien mit einem Wert von ca. 0,09 [log (KBE/mL)] bzw. ca. 1 KBE/mL. Die durch das Ausplattierverfahren erhaltene Zellzahl lag so unterhalb der in der Literatur gesetzten Grenze von  $LZZ \leq 0,1$  KBE/mL (LLEÓ et al. (2001), ARANA et al. (2007) und ZENG et al. (2013)) für eine Suspension aus nur nicht kultivierbaren Bakterien, während der durch die Membranfiltration bestimmte Zelltitel dieses Kriterium nicht erfüllte. Bei der geringen Ausgangszellzahl und der relativ hohen Anfangskonzentration wurden im Ansatz nach einstündiger Inkubation eine Wasserstoffperoxidrestkonzentration von ca.  $c = 2$  mg/mL ermittelt.

### 4.7.3 Wiederfindungsrate bei niedriger Ausgangslebendzellzahl nach Zusatz Hitze abgetöteter Zellen

In einem Gegenversuch sollte beurteilt werden, in welchem Ausmaß eine Zellkultur mit vergleichbarem Zelltitern ( $LZZ \approx 3 \text{ KBE/mL}$ ) durch Zusatz Hitze abgetöteter Zellen wachsen konnte. Die experimentelle Vorgehensweise wurde als Entwurf zu ähnlichen beschriebenen Versuchen (MUKAMOLOVA et al. (1998), KELL und YOUNG (2000) und ARANA et al. (2007)) entwickelt. Zur vollständigen Abtötung der Zellen wurden statt einer oxidativen bzw. chemischen Desinfektion thermisch die *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Flüssigkulturen sterilisiert. Dadurch wurde eine rückstandsfreie Suspension aus abgetöteten Zellen erhalten, zu der kein Neutralisierungsreagenz zugegeben werden musste.



**Abbildung 44: Logarithmus der Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wachstum durch Zusatz von durch Hitze inaktivierten Zellen**

Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einem Zelltitern von ca. 50 KBE/20 mL wurden mit einer Suspension aus Hitze inaktivierten Zellen desselben Bakteriums versetzt und 21 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Lebendzellzahlen bestimmt. Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 [ $\log(\text{KBE/mL})$ ] vor und nach der 21 stündigen Inkubation mit durch Hitze (70 °C) inaktivierten Zellen. Die unterschiedlichen Balken kennzeichnen die ermittelten logarithmierten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakterien-suspensionen (weiß: Ansatz mit den mittels Hitze abgetöteten Zellen, hellgrau: Kontrollansatz (Puffer) und dunkelgrau: Versuchsansatz). Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.

Die durch Hitze (70 °C) inaktivierten Suspensionen verloren vollständig ihre Vitalität und blieben auch nach eintägiger Inkubation steril. Die Kontrollsuspensionen zeigten entgegen den Erwartungen schwaches Wachstum. Die logarithmierte Zellzahl stieg von einem Wert von  $LZZ \approx 3 \text{ KBE/mL}$  auf einen Endwert von  $LZZ \approx 100 \text{ KBE/mL}$  und war einer großen Streuung unterworfen. Die Ansätze, die mit abgetöteten Zellen inkubierten wurden, wuchsen dagegen signifikant und erreichten eine um fünf log-Stufen erhöhte Lebendzellzahl. Dieses Wachstum wurde durch die Trübungsmessung nicht detektiert. Die optischen Dichten der Versuchsansätze veränderten sich nach eintägiger Inkubation kaum.

Durch die steril gebliebenen, mittels Hitze inaktivierten Kulturen konnte zusätzlich eine Fremdkontamination ausgeschlossen werden. Die leichte Vermehrung der Kontrollkulturen wurde auf die geringe Sensitivität der Kultivierungsmethoden bei sehr niedrigen Zellzahlen und auf das gute Vermehrungsvermögen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bei sehr geringen Konzentrationen von Salz und Kohlenstoffquellen zurückgeführt (vgl. dazu LEGNANI et al. (1999)). Die abgetöteten Zellen dienten den Kulturen als Nahrungsquelle, die eine deutlich nachweisbare Vermehrung zuließ. D.h. die unter Punkt 4.7.1.2 beschriebene Beobachtung, dass nach Abklingen der Wasserstoffperoxidkonzentration die Lebendzellzahl wieder signifikant anstieg, war vor allem das Ergebnis eines erneuten Wachstums bzw. einer Vermehrung.

#### 4.8 Wiederfindungsrate nach Desinfektion von mit Wasserstoffperoxid versetzten und inkubierten *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen

Durch den dargestellten Versuch sollte ermittelt werden, ob sich nach einer unzureichenden Desinfektion und anschließender Inkubation erhöhte Resistenzen gegenüber einer erneuten Desinfektion ableiten ließen (vgl. dazu LAKKIS und FLEISZIG (2001)) und diese erhöhte Resistenz nicht eher die Folge von den in der Kultur erhaltenen VBNC-Zellen waren (NOWAKOWSKA und OLIVER (2013)). D.h. der Verlust möglicher Anpassungserscheinungen aufgrund der Langzeitinkubation wurde gegen den Nachweis von VBNC-Zellen im Ansatz (siehe Punkt 4.6.6) abgewogen. In Anlehnung an Punkt 4.7.1.2 und Punkt 4.7.3 wurden Ansätze mit unterschiedlichen Ausgangstrübungen mit hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen inkubiert. Es wurde angenommen, dass bei hoher Ausgangstrübung die Zellpopulation nur geringfügig reduziert wurde (vgl. dazu Punkt 4.7.1.2), während bei niedrigeren Ausgangstitern die Zelldichte stark verringert wurde und dann Vermehrung auftrat (siehe Punkt 4.7.3).

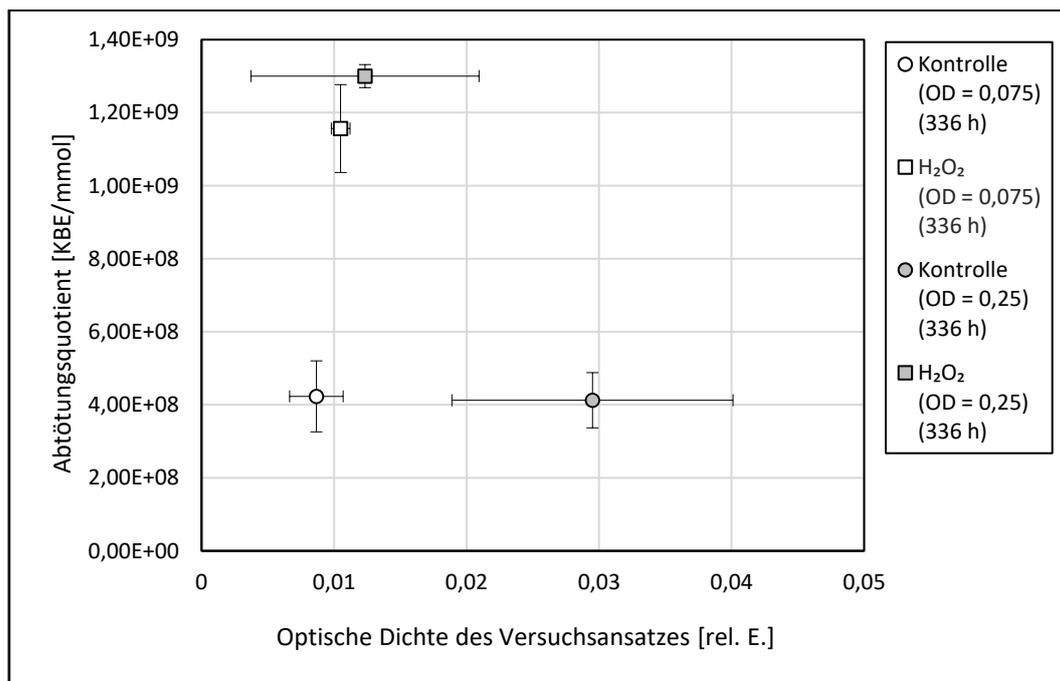
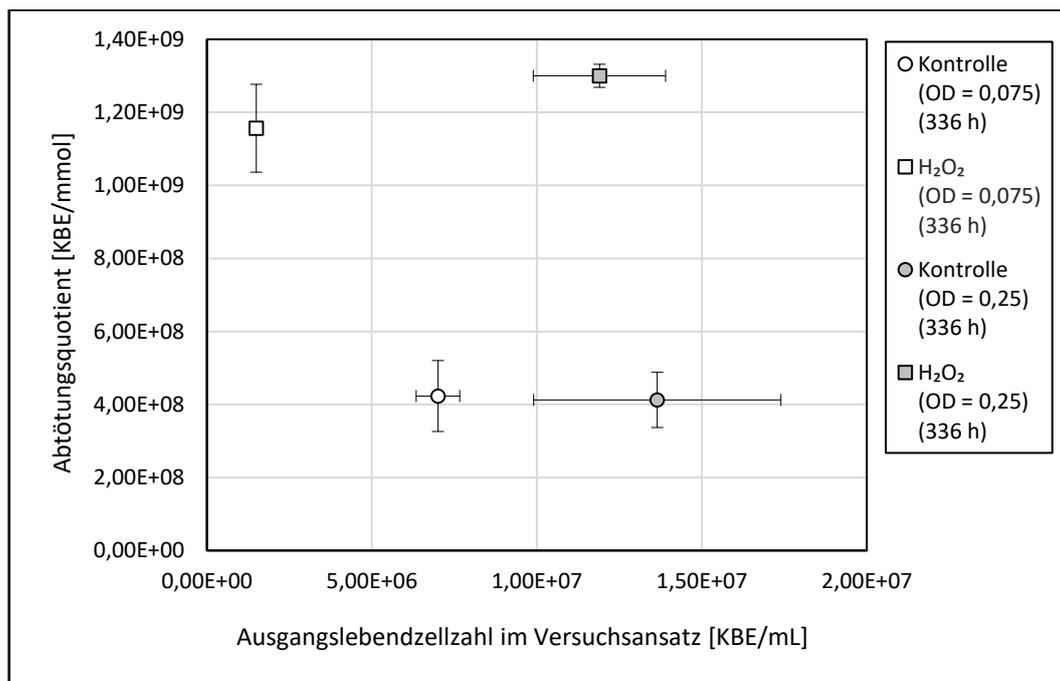


Abbildung 45: Abtötungsquotient für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (Trübung)

*Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen wurden mit Wasserstoffperoxid oder Wasser (= Kontrolle) versetzt und anschließend 14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut mit Wasserstoffperoxid geringerer Konzentration desinfiziert. Die Desinfektionswirkung wurde anhand des Rückganges der Lebendzellzahl und des Verbrauches an Wasserstoffperoxid beurteilt (siehe Punkt 3.4.8). Dargestellt ist demnach der Abtötungsquotient [KBE/mmol] für *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen in Abhängigkeit von der optischen Dichte [rel. E.] des zweiten Desinfektionsansatzes und der vorherigen Inkubation. Der Abtötungsquotient ist definiert als die reduzierte Anzahl an

Zellen [KBE] durch den dafür benötigten Verbrauch an Wasserstoffperoxid [mmol]. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel und die Fehlerbalken die einfachen Standardabweichungen.



**Abbildung 46: Abtötungsquotient für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (Ausgangszellzahl)**

Abweichend zu Abbildung 45 wurde hier der bereits dargestellte Abtötungsquotient [KBE/mmol] in Relation zur Ausgangslebenszellzahl im zweiten Desinfektionsansatz gesetzt.

Hohe Abtötungsquotienten wiesen darauf hin, dass eine hohe Anzahl an Zellen durch Wasserstoffperoxid abgetötet oder nicht kultivierbar wurden bzw. eine geringe Wasserstoffperoxidstoffmenge nur nötig war, um eine bestimmte Anzahl an Zellen zu desinfizieren. Die ermittelten Abtötungsquotienten wurden gegen die Anfangstrübung und die -lebenszellzahl im zweiten Desinfektionsansatz aufgetragen. Dadurch sollte berücksichtigt werden, dass infolge eines unterschiedlichen Ausgangszelltiters das Desinfektionsergebnis beeinflusst (siehe Punkt 4.6.1) und so die Abtötungsquotienten verzerrt wurden.

Unabhängig von der Anfangstrübung erwiesen sich die zuvor mit einer höheren Wasserstoffperoxidmenge versetzten Ansätze bei einer erneuten Desinfektion mit geringerer Konzentration nach Langzeitinkubation als anfälliger für das Oxidationsmittel als die korrespondierenden Kontrollansätze. Die Abtötungsquotienten unterschieden sich ca. um den Faktor  $F = 3$  unabhängig von der Ausgangstrübung oder -lebenszellzahl im zweiten Desinfektionsansatz. Resuszitationsversuche durch Zusatz von Pyruvat zu den Nährböden blieben ergebnislos, weil die Zellzahlen nachweislich auf  $LZZ = 0$  KBE/mL reduziert wurden. Auffallend waren die verhältnismäßig hohen Streuungen in den Lebenszellzahlen bzw. in den Turbiditäten der Ansätze mit einer Anfangstrübung von  $OD_{B,0} = 0,25$ . Eine erhöhte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid nach vorheriger Umsetzung mit diesem Oxidationsmittel konnte sowohl bei der sich neu vermehrten ( $OD_{A,0} = 0,075$ ) als auch bei der ursprünglichen ( $OD_{B,0} = 0,25$ ) Population nicht gezeigt werden. Stattdessen erwiesen sich diese *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen sogar als anfälliger.

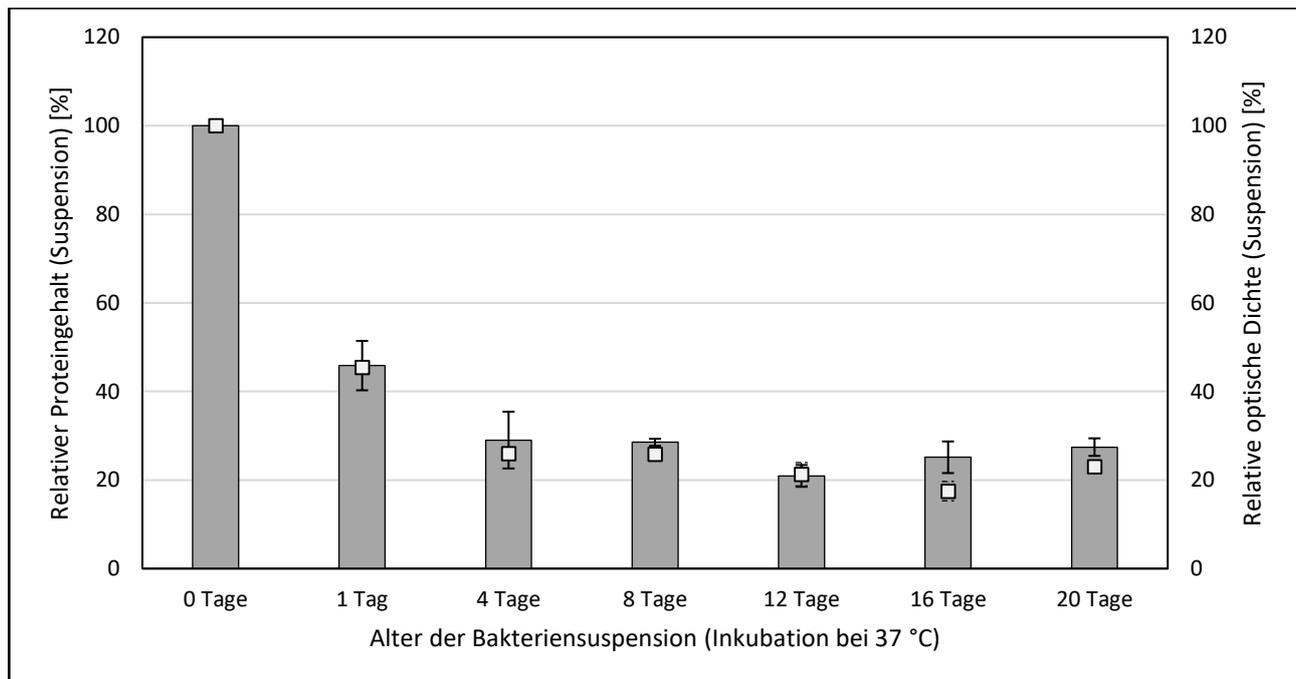
#### 4.9 Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Katalase hat eine zentrale Rolle in dem Abbau von Wasserstoffperoxid in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (vgl. dazu ITOH et al. (1992)) und wirkt so protektiv auf die bakterielle Zelle von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 (vgl. dazu ELKINS et al. (1999) und SHIN et al. (2008)). Aufgrund dessen sollte

die Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 untersucht werden, um so den Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid bewerten zu können.

#### 4.9.1 Katalaseaktivität und Proteingehalt nach Langzeitinkubation

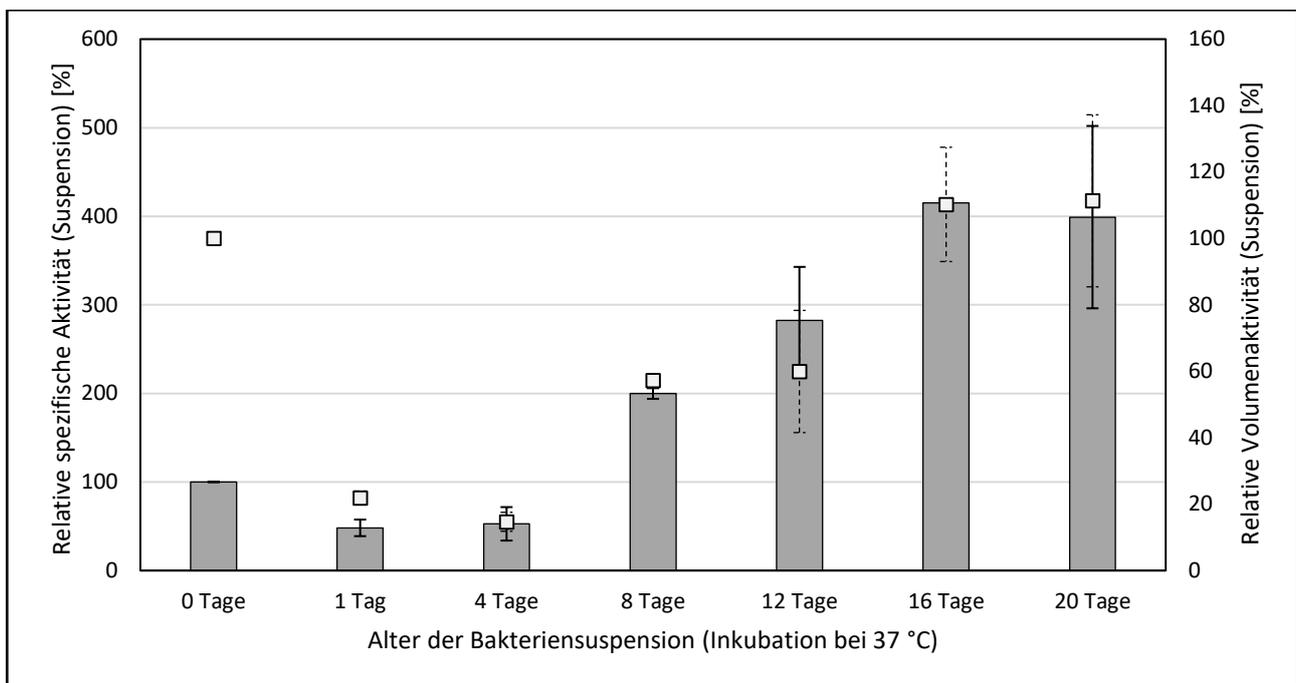
Die unter Punkt 4.6.6 und Punkt 4.7 beschriebene Reaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1, die verbliebene Restkonzentration an Wasserstoffperoxid in den Ansätzen und die relativ gesehen höhere Resistenz vergleichbarer Ansätze gegenüber Wasserstoffperoxid (siehe Punkt 4.8) sollten anhand der Katalasevolumenaktivität dieses Testkeimes nach Langzeitinkubation neu bewertet werden.



**Abbildung 47: Relativer Proteingehalt und relative optische Dichte von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Aushungern**

Definierte Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurden 20 d unter Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die optischen Dichten der Kulturen und aus dem Zellextrakt der eingengten Suspensionen die Katalasevolumenaktivität und der Proteingehalt bestimmt (siehe Punkt 3.4.9.1) und auf die nicht eingengte Suspension mittels des Verdünnungsfaktors zurückgerechnet. Dargestellt ist der relative Proteingehalt [%] und die optische Dichte [%] in Abhängigkeit von dem Alter einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension in nährstofffreiem, chemisch definiertem Leitungswasser. Die Säulen kennzeichnen demnach den relativen Proteingehalt [%] und die weißen Quadrate stellen der relativen optischen Dichte [%] der Bakteriensuspensionen dar. Als 100 % wurde der Proteingehalt und die optische Dichte der Bakteriensuspension zum Zeitpunkt  $t = 0$  d definiert. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Erwartungsgemäß sanken die Proteingehalte und in Korrelation auch die optischen Dichten der inkubierten Suspensionen. Damit wurde der unter Punkt 3.4.3.3 und Punkt 3.4.4 beschriebene Sachverhalt erhärtet, dass *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zur vollständigen Dispersion in Einzelzellen neigte und aufgrund dessen mehr Zellen nach eintägiger Inkubation wiedergefunden wurden. Der größte Abfall im Proteingehalt und in der optischen Dichte vollzog sich nach 24 h. Anschließend reduzierten sich die untersuchten Parameter wieder und stagnierten auf einen Endwert.



**Abbildung 48: Relative spezifische Katalaseaktivität und relative Volumenaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Aushungern**

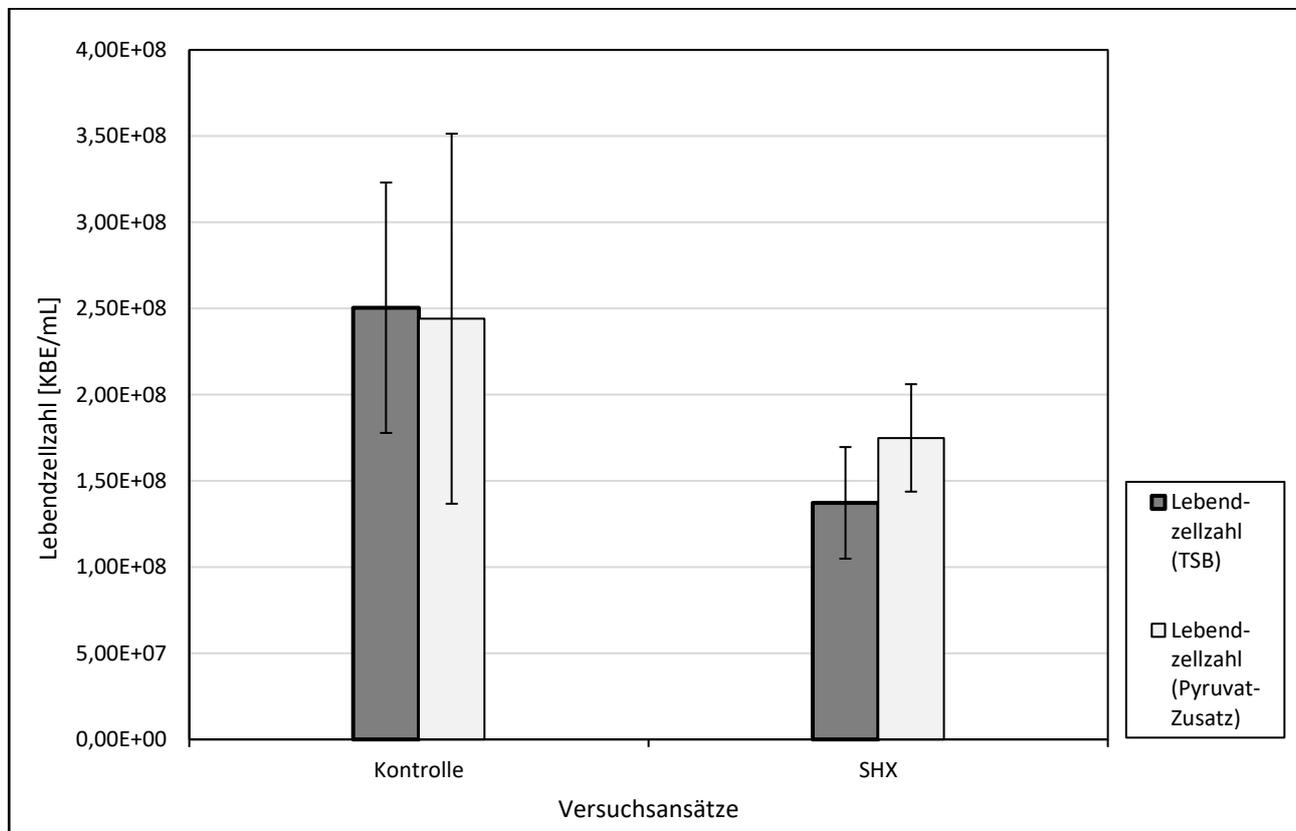
Aus dem unter Abbildung 47 beschriebenen Zellextrakt wurde wie unter Punkt 3.4.9.1 erläutert die Katalasevolumenaktivität und der Proteingehalt ermittelt und auf die nicht eingeeugte Suspension bezogen. Die spezifische Katalaseaktivität ergab sich als Quotient aus der ermittelten Volumenaktivität [U/mL] und dem ermittelten Proteingehalt [mg/mL]. Dargestellt ist die relative spezifische Katalaseaktivität [%] und die relative Volumenaktivität in Abhängigkeit von dem Alter einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension in nährstofffreiem, chemisch definiertem Leitungswasser. Als 100 % wurde die spezifische Katalaseaktivität und die relative Volumenaktivität der Bakteriensuspension zum Zeitpunkt  $t = 0$  d definiert. Die Säulen kennzeichnen demnach die relative spezifische Katalaseaktivität [%] in Abhängigkeit von dem Alter der eingesetzten Zellsuspension und die weißen Quadrate stellen die dazugehörigen relativen Volumenaktivitäten [%] der Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Die Katalasevolumenaktivität in den Versuchsansätzen sank innerhalb von 4 Tagen auf einen Minimalwert, der ca. 15 % des Ursprungswertes entsprach. Anschließend stieg die Volumenaktivität stetig an und erreichte zum letzten Probenamenzzeitpunkt nach 20 tägiger Inkubation einen Endwert, der unter Betrachtung der Fehlerbalken annähernd der Ausgangsaktivität entsprach. Die spezifische Katalaseaktivität fiel in den ersten Tagen der Inkubation aufgrund der stark abnehmenden Volumenaktivität ab und stieg dann infolge des sinkenden Proteingehaltes und der zunehmenden Volumenaktivität stark an. Der ermittelte Endwert nach 20 tägiger Inkubation übertraf den Ausgangswert um das Vierfache.

Die Langzeitinkubation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bewirkte erwartungsgemäß eine Abnahme der bakteriellen Zellmasse. Zeitgleich wurde eine Zunahme der absoluten Volumenaktivität und der spezifischen Katalaseaktivität nach anfänglicher Abnahme registriert. D.h. unter Berücksichtigung der unter Punkt 4.6.6 beschriebenen Ergebnisse war die abnehmende Wasserstoffperoxidkonzentration in einem Desinfektionsansatz nicht nur die Konsequenz des enzymatischen Abbaus, sondern des direkten chemisch-oxidativen Angriffes auf die bakterielle Zelle.

#### 4.9.2 Katalaseaktivität, Proteingehalt und Lebendzellzahl nach SHX-Zugabe

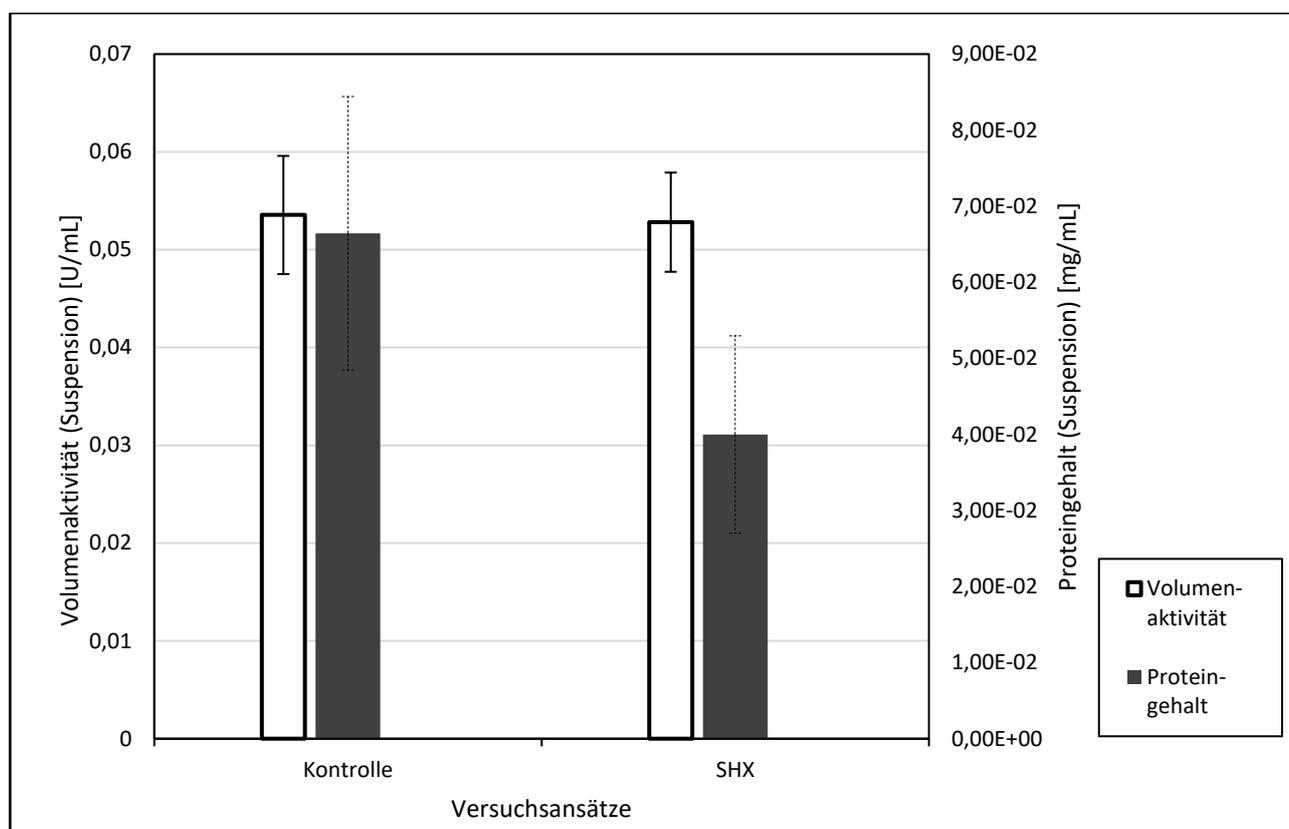
NGUYEN et al. (2011) zeigten, dass durch die bakterielle stringente Antwort (stringent response) (vgl. dazu TRAXLER et al. (2008)) ausgehungerte Bakterien bzw. Biofilmzellen von *Pseudomonas aeruginosa* resistenter gegenüber Antibiotika wurden. Die mittels D/L-Serinhydroxamatzugabe induzierte stringente Antwort erhöhte nach KHAKIMOVA et al. (2013) die Katalaseaktivität. Diese Untersuchung sollte für den in dieser Arbeit eingesetzten Testkeim *Pseudomonas aeruginosa* WR1 reproduziert werden.



**Abbildung 49: Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach D/L-Serinhydroxamat-Zugabe**

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde in Mineralmedium bis zur beginnenden exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Anschließend wurden die Kulturen mit Wasser (= Kontrolle) oder mit D/L-Serinhydroxamat versetzt (SHX) und bis zur mittleren bzw. späten exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Von diesen unterschiedlichen Suspensionen wurden die Lebendzellzahlen auf unterschiedlichen Nährböden bestimmt (siehe Punkt 3.4.9.2). Dargestellt sind die Lebendzellzahlen [KBE/mL] von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von einer D/L-Serinhydroxamat-Zugabe (SHX) zum Mineralmedium und dem eingesetzten Agar für die Lebendzellzahlbestimmung. Die Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Lebendzellzahlen der jeweiligen Bakteriensuspensionen mit bzw. ohne SHX-Zusatz zum Anzuchtmedium und die für die Lebendzellzahlbestimmung verwendeten TSB-Agarplatten. Die Abkürzungen TSB und Pyruvatzusatz zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

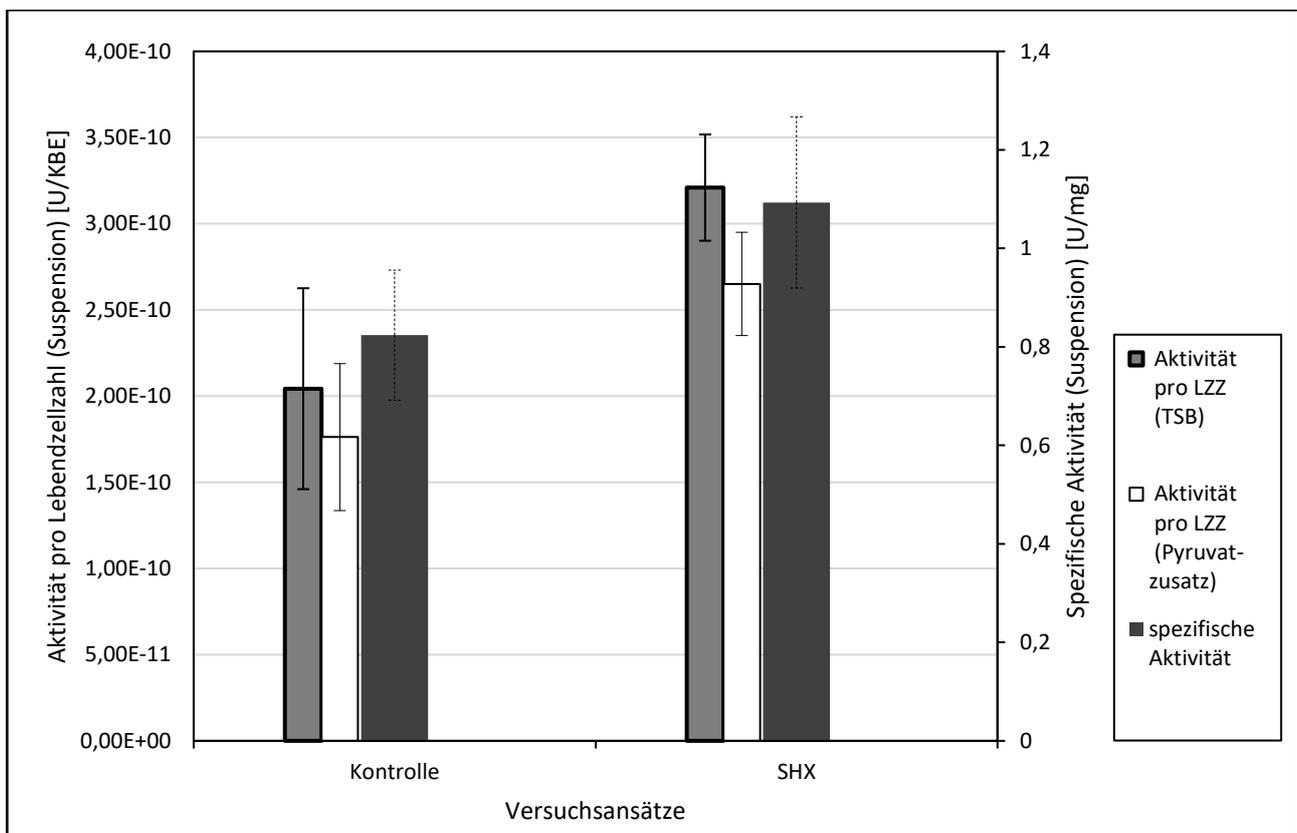
Durch den Zusatz von Serinhydroxamat zu den Zellkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Vermehrung ausgebremst. Die Lebendzellzahlen der künstlich ausgehungerten Zellen waren signifikant um ca. 30 % geringer als bei den korrespondierenden Kontrollansätzen. Auffallend waren die relativ hohen Schwankungen um den Mittelwert bei den Kontrollansätzen im Vergleich zu den geringen Abweichungen der mit SHX versetzten Kulturen. Dies wurde als ein Indiz für die gleichmäßige Wirkung dieser Verbindung auf die bakterielle Vermehrung interpretiert, während unbehandelte Kulturen trotz identischer Anzuchtbedingungen unterschiedlich stark wuchsen. Die Kultivierung auf mit Pyruvat versetzten Nährböden verursachte keinen Mehrbefund. Der unterschiedliche Zelltitert der zwei Ansatztypen spiegelte sich auch in der Trübung der Suspension wider.



**Abbildung 50: Katalasevolumenaktivität und Proteingehalt von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen nach D/L-Serinhydroxamat-Zugabe**

Dargestellt sind die Katalasevolumenaktivitäten [U/mL] und die Proteingehalte [mg/mL] der unter Abbildung 49 beschriebenen *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von der D/L-Serinhydroxamat-Zugabe (SHX) zum Mineralmedium. Die weißen Balken kennzeichnen demnach die ermittelten Volumenaktivitäten der Katalase der jeweiligen Bakteriensuspensionen mit bzw. ohne SHX-Zusatz zum Anzuchtmedium. Die dunkelgrauen, breiten Balken (Sekundärachse) stellen die ermittelten Proteingehalte dieser Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Der in Abbildung 49 dargestellte Sachverhalt, dass durch SHX-Zugabe Vermehrung und Wachstum eingeschränkt wurden, zeigte sich auch erwartungsgemäß im Proteingehalt der Proben. Auch hier wiesen die Kontrollansätze eine um ca. 30 % höhere Proteinmenge auf als die vergleichbaren Proben-suspensionen. Im Gegensatz dazu waren die Volumenaktivitäten beider Ansatztypen annähernd identisch.



**Abbildung 51: Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl und spezifische Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen nach D/L-Serinhydroxamat-Zugabe**

Aus den in Abbildung 49 bereits dargestellten Lebendzellzahlen [KBE/mL] und den in Abbildung 50 abgedruckten Katalasevolumenaktivitäten [U/mL] und Proteingehalten [mg/mL] wurden die hier visualisierten Katalaseaktivitäten pro Lebendzellzahl [U/KBE] und die spezifischen Katalaseaktivitäten [U/mg] berechnet. Dargestellt sind die Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl [U/KBE] und die spezifische Katalaseaktivität [U/mg] der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von der D/L-Serinhydroxamat-Zugabe (SHX) zum Mineralmedium und den eingesetzten Nährböden für die Lebendzellzahlbestimmung. Die schmalen Balken kennzeichnen folglich die ermittelten Katalaseaktivitäten pro Lebendzellzahl der jeweiligen Bakteriensuspensionen mit bzw. ohne SHX-Zusatz zum Anzuchtmedium und die Farbe dieser Balken die für der Lebendzellzahlbestimmung verwendeten TSB-Agarplatten. Die Abkürzungen TSB und Pyruvatzusatz zeigen entsprechend an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dunkelgrauen, breiten Säulen (Sekundärachse) stellen die ermittelten spezifischen Katalaseaktivitäten dieser Bakteriensuspensionen dar. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Durch SHX-Zugabe konnte das bakterielle Wachstum bzw. die Vermehrung eingeschränkt werden, während die Katalasevolumenaktivität der mit SHX versetzten Zellen trotz geringerer Gesamtzellzahl bzw. -masse auf einem vergleichbaren Niveau einer Kultur war, die einen ca. um 30 % höheren Zelltiters aufwies. Als Konsequenz der ähnlichen Volumenaktivität der Suspensionen und der unterschiedlichen Zelltiters bzw. der Proteingehalte hatten die mit SHX versetzten Kulturen eine höhere Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl und spezifische Katalaseaktivität von ca. 30 %. Durch den leichten Mehrbefund an Zellen, der durch Pyruvatzugabe zum Nährboden erreicht wurde, verringerte sich der Wert für die Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl entsprechend. D.h. eine induzierte Nährstofflimitierung führte bei *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zu einer höheren spezifischen Katalaseaktivität bzw. Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl. Dieses Ergebnis unterstützte die unter Punkt 4.9.1 beschriebene Beobachtung, dass eine tatsächliche Nährstofflimitierung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 mit einer höheren spezifischen Katalaseaktivität beantwortet wurde.

#### 4.10 Wiederfindungsrate von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach SHX-Zusatz und Wasserstoffperoxidbehandlung

Auf Grundlage der unter Punkt 4.6.6 und Punkt 4.7 dargestellten Ergebnisse sollte untersucht werden, ob der bakterielle Mehrbefund durch Pyruvatzusatz in den Nährböden nach Desinfektion von lang inkubierten Kulturen sich auf die stringente Antwort infolge einer Nährstofflimitierung zurückführen lies. Dafür wurden Kulturen mit SHX-Zugabe angezogen und unter Berücksichtigung der unter Punkt 4.6.1 bzw. Punkt 4.6.2 genannten Konzentrationsabhängigkeit der keimreduzierenden Wirkung des Wasserstoffperoxids auf unterschiedliche Zelltitern eingestellt und desinfiziert.

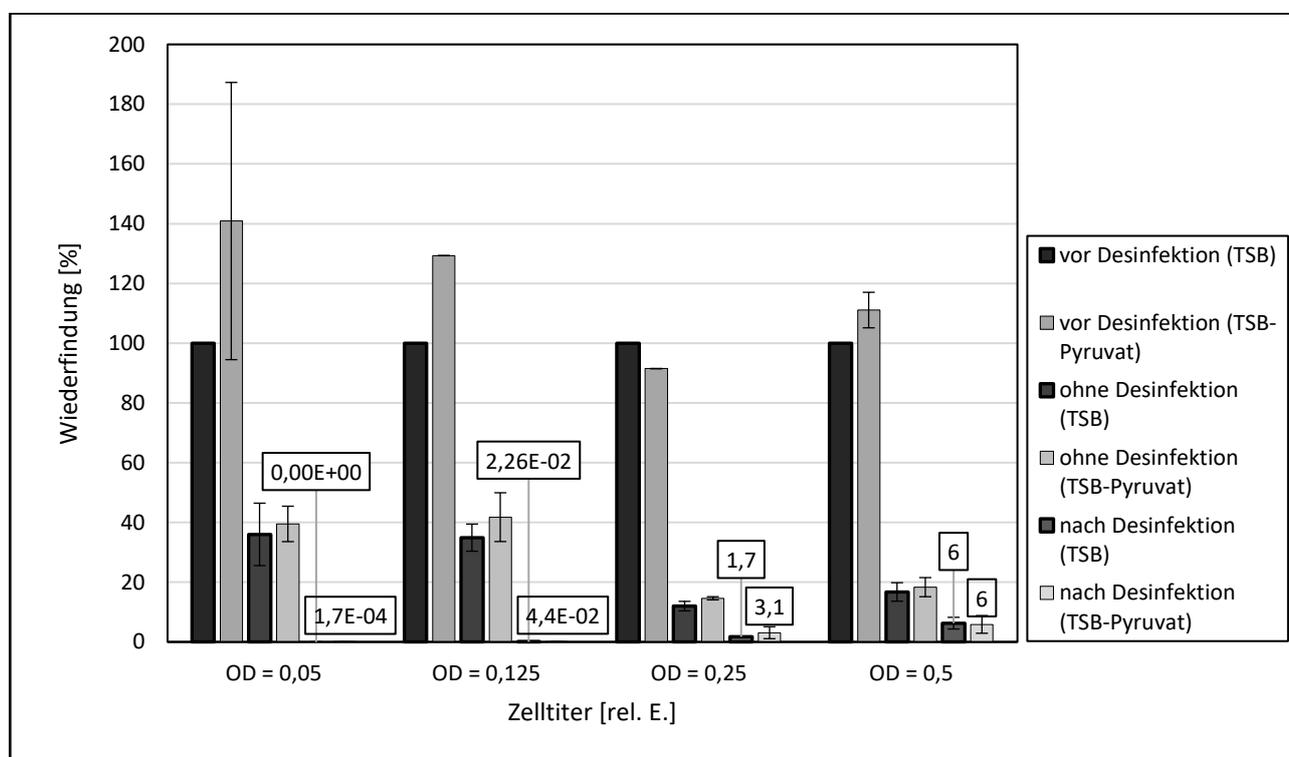
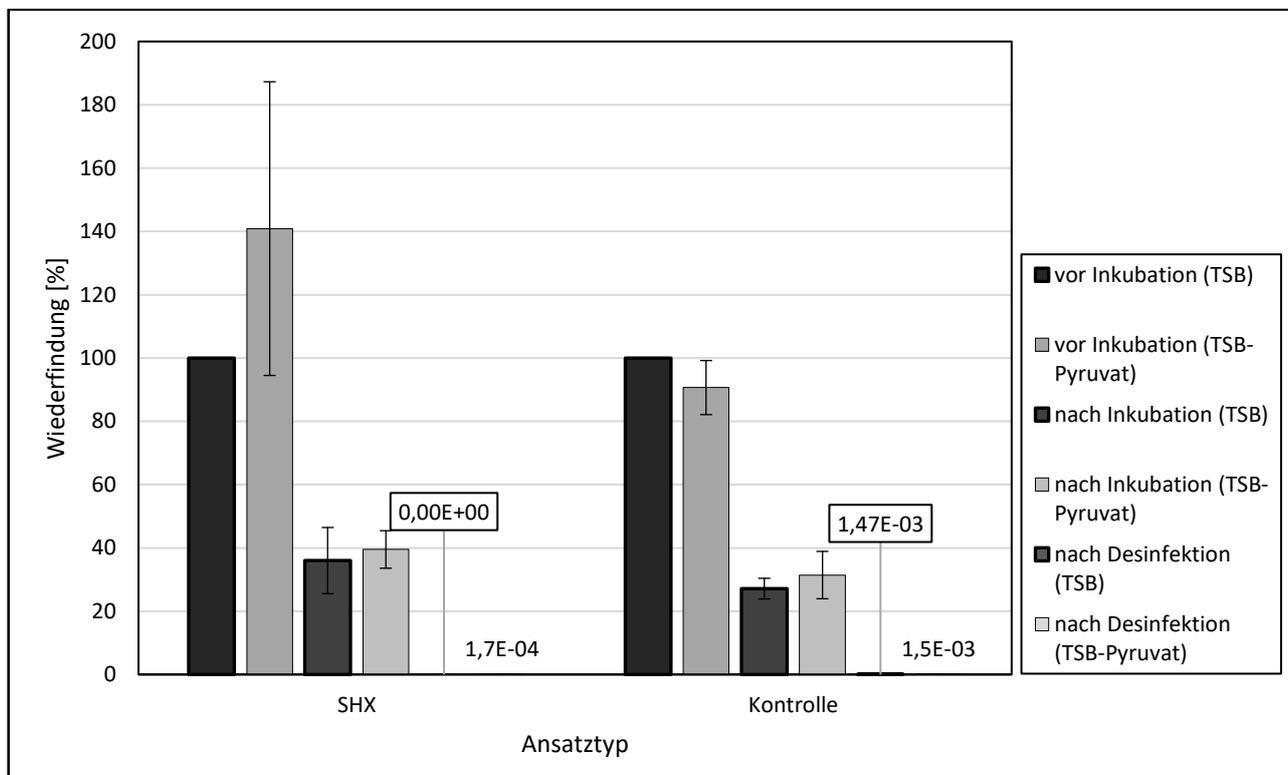


Abbildung 52: Desinfektion von künstlich ausgehungerten *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen

*Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellen wurden mit D/L-Serinhydroxamat (SHX) inkubiert und definierte Stammsuspensionen dieser Bakterien mit unterschiedlichen Zelltitern wurden 1 h mit Wasser bzw. Wasserstoffperoxid inkubiert. Die Desinfektionswirkung wurde anhand der Wiederfindungsraten abgebildet. Dargestellt sind die nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid erhaltenen Wiederfindungsraten [%] von mit SHX angezogenen *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von den eingesetzten Zelltitern und den für die Lebendzellzahlbestimmung verwendeten festen Nährmedien. Als Bezugsgröße für die Wiederfindungsrate (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl vor der Desinfektion definiert, die immer als linker Balken einer Säulengruppe dargestellt ist. Die Säulen kennzeichnen demnach die Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation und der zusätzlich parallel durchgeführten Wasserstoffperoxidbehandlung und die Balkenfarbe die für der Lebendzellzahlbestimmung verwendeten TSB-Agarplatten. Die Abkürzungen TSB und TSB-Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Nur durch die einstündige Inkubation wurden deutlich weniger Zellen wiedergefunden, als ursprünglich eingesetzt wurden. Dies entsprach den bereits unter Punkt 4.6.1 genannten Beobachtungen. Dabei wiesen die Ansätze mit der größeren Ursprungszellzahl die größte Abnahme der Wiederfindungsrate auf. Erwartungsgemäß sank mit steigendem Zelltitern die Anzahl der durch das Wasserstoffperoxid abgetöteten Bakterien. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass allein durch die Inkubation ein erheblicher Anteil an Zellen vor allem bei den Ansätzen mit hoher Ausgangszellzahl nicht quantifiziert werden konnte, wies Wasserstoffperoxid bei Kulturen mit geringerem Zelltitern eine effektivere keimreduzierende Wirkung auf (siehe Versuche beschrieben unter Punkt 3.4.5.1, Punkt 3.4.5.2 und Punkt 3.4.7.2). Durch den Pyruvatzusatz wurden bei den

Kontrollansätzen (ohne Desinfektion) nicht mehr Zellen registriert als bei der Kultivierung mit nicht supplementierten Nährböden. Bei den desinfizierten Ansätzen wurden durch den Pyruvatzusatz erst bei sinkenden Ausgangszellzahlen höhere Wiederfindungsraten erzielt als bei den korrespondierenden Proben ohne Pyruvatsupplementierung. Von Kulturen mit einer Trübung von  $OD_A = 0,5$  wurden bei beiden Kultivierungsmethoden 6 % der ursprünglich eingesetzten Zellzahl erfasst. Bei Turbiditäten im Desinfektionsansatz von  $OD_B = 0,25$  und  $OD_C = 0,125$  wurden durch Pyruvat in den Agarplatten annähernd doppelt so viele Zellen wiedergefunden wie bei der Lebendzellzahlquantifizierung ohne Pyruvatzusatz. Bei den Desinfektionsansätzen mit der geringsten Ausgangstrübung wurden durch Wasserstoffperoxid nicht nur die Zellzahlen am stärksten reduziert, sondern nur durch den Pyruvatzusatz in den Nährböden konnte im Vergleich zu den nicht supplementierten Proben erst eine Zellzahl ermittelt werden.



**Abbildung 53: Desinfektion von mit SHX angezogenen und von unbehandelten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1**

In Anlehnung an die unter Abbildung 52 beschriebene Vorgehensweise wurde aus einer in Mineralmedium angezogenen Kultur von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ohne SHX-Zusatz ein Desinfektionsansatz mit vergleichender Ausgangstrübung angesetzt. Dargestellt sind die nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid erhaltenen Wiederfindungsraten [%] von mit D/L-Serinhydroxamat (SHX) angezogenen und von unbehandelten *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von den für die Lebendzellzahlbestimmung verwendeten festen Nährmedien. Als Bezugsgröße für die Wiederfindungsrate (= 100 %) wurde die Lebendzellzahl vor der Desinfektion gesetzt, die immer als linker Balken einer Säulengruppe dargestellt wird. Als Kontrolle diente eine eingestellte Suspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellen, die nicht mit SHX inkubiert wurden. Die Säulen kennzeichnen demnach die Wiederfindungsraten der jeweiligen Bakteriensuspensionen vor bzw. nach der Inkubation und der zusätzlich parallel durchgeführten Wasserstoffperoxidbehandlung und die Balkenfarbe die für der Lebendzellzahlbestimmung verwendeten TSB-Agarplatten. Die Abkürzungen TSB und TSB-Pyruvat zeigen an, auf welchem Nährboden ausplattiert wurde. Die dargestellten Werte sind das arithmetische Mittel der Einzelwerte und die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung.

Die erhöhte Wiederfindung durch Pyruvatzusatz nach künstlichem Aushungern wurde durch einen Gegenversuch bestätigt. Zunächst wurden allein durch die Inkubation der Kulturen deutlich weniger Zellen wiedergefunden als ursprünglich eingesetzt. Die Desinfektionsansätze der nicht mit SHX angezogenen Bakterien, die auf TSB-Agar oder mit Pyruvat versetztem Nährboden quantifiziert wurden, unterschieden sich in Vergleich zu den korrespondierenden, mit SHX versetzten Zellen nicht in ihrer Wiederfindung. Auffallend war die Tatsache, dass bei den Desinfektionsansätzen der ohne

SHX angezogenen Zellen unerwartet (vgl. Punkt 4.9.2) mehr Bakterien wiedergefunden wurden als bei den Ansätzen der mit SHX kultivierten Bakterien. Eine erhöhte Wiederfindung durch Quantifizierung auf Nährböden mit Pyruvat ließ sich nur unter begrenzten Bedingungen feststellen. Die Zellen mussten durch Langzeitinkubation (siehe Punkt 3.4.5.6) oder durch SHX-Zugabe einer Nährstofflimitierung ausgesetzt und anschließend desinfiziert werden. Für die Desinfektion musste ein günstiges Verhältnis zwischen Ausgangszellzahl und Desinfektionsmittel (siehe Punkt 4.6.2) ausgewählt werden.

#### 4.11 Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium nach Wasserstoffperoxidzusatz

Untersuchungsgegenstand des vorliegenden Versuchs war die Fragestellung, ob und in welchem Ausmaß Wachstum bzw. Vermehrung bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid möglich war. Ferner sollte überprüft werden, ob diese ungünstigen Umweltbedingungen eine bakterielle Anpassung induzierten (vgl. dazu BIGNUCOLO et al. (2013)).

##### 4.11.1 Optimale Animpfmenge

Um abschätzen zu können, welches Inokulum notwendig war, damit bei der gewählten Ausgangskonzentration von Wasserstoffperoxid ( $c = 500 \mu\text{mol/L}$ ) eine Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 noch stattfand, wurden Versuchsansätze hergestellt, die sich in ihrer Animpfmenge unterschieden.

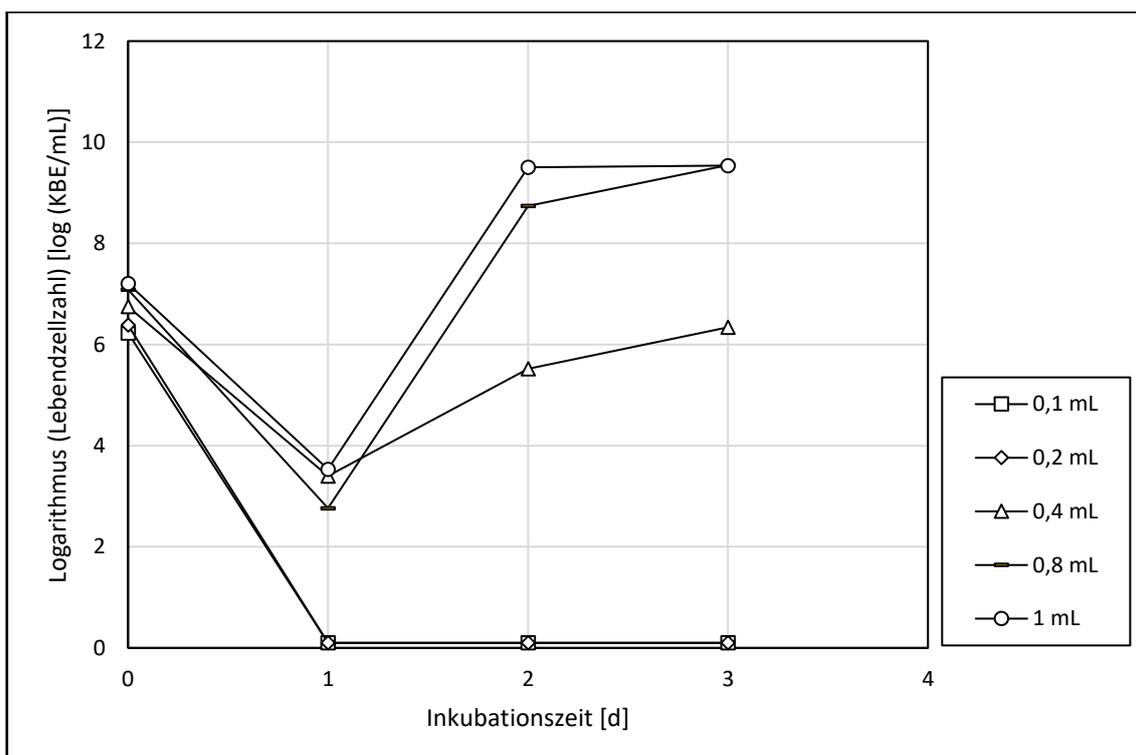
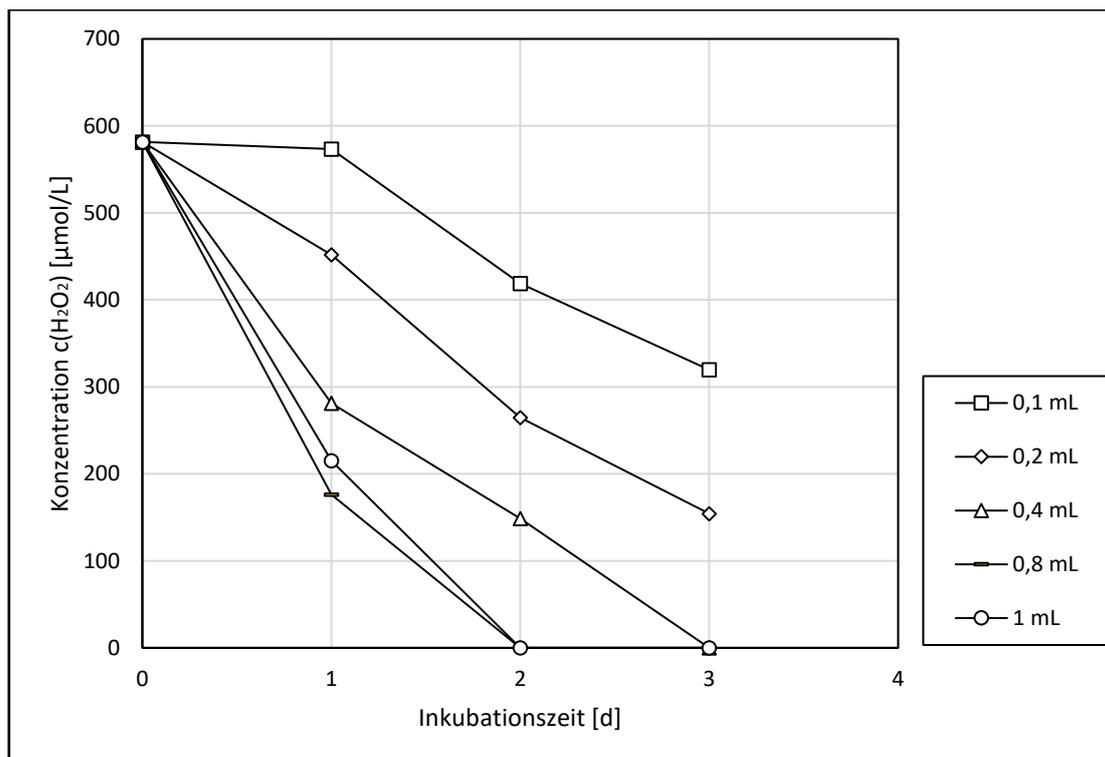


Abbildung 54: Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach Wasserstoffperoxid-Zugabe in Abhängigkeit vom Inokulum

Mineralmedium mit zugesetztem Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von  $c = 500 \mu\text{mol/L}$  wurde mit unterschiedlichen Volumina einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kultur angeimpft. Anschließend wurden die Suspensionen bis zu 3 d bei  $37^\circ\text{C}$  unter ständigem Schütteln inkubiert.

Dargestellt ist der Logarithmus der Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 [ $\log(\text{KBE}/\text{mL})$ ] in Mineralmedium, das Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von  $c = 500 \mu\text{mol}/\text{L}$  enthielt, in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d]. Variiert wurden die Animpfmengen in mL (Stamm suspension) (0,1 mL (Quadrat); 0,2 mL (Raute); 0,4 mL (Dreieck); 0,8 mL (Querstrich) und 1 mL (Kreis)), in der sich die einzelnen Proben unterschieden. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte mittels Ausplattieren auf Nährböden nach DIN 10161-1:1984-02 (siehe Punkt 3.4.11).

Nach eintägiger Inkubation fielen bei allen Ansätzen die Lebendzellzahlen um drei bzw. sieben log-Stufen ab. Bei geringem Inokulum sanken die Lebendzellzahlen auf  $\text{LZZ} = 0 \text{ KBE}/\text{mL}$  und es konnte über die weiteren Inkubationstage keine Vermehrung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stieg bei den hohen Ausgangszellzahlen nach weiterer eintägiger Inkubation der Zelltitel rasant an und stagnierte auf diesem hohen Niveau. Das Mineralmedium, das mit 0,4 mL einer Stammsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 angeimpft wurde, zeigte nach 2 Tagen eine Lebendzellzahl, die sich um eine log-Stufe von der Ursprungszellzahl unterschied. Am letzten Inkubationstag wurde in diesem Ansatz der Anfangszelltitel erreicht.

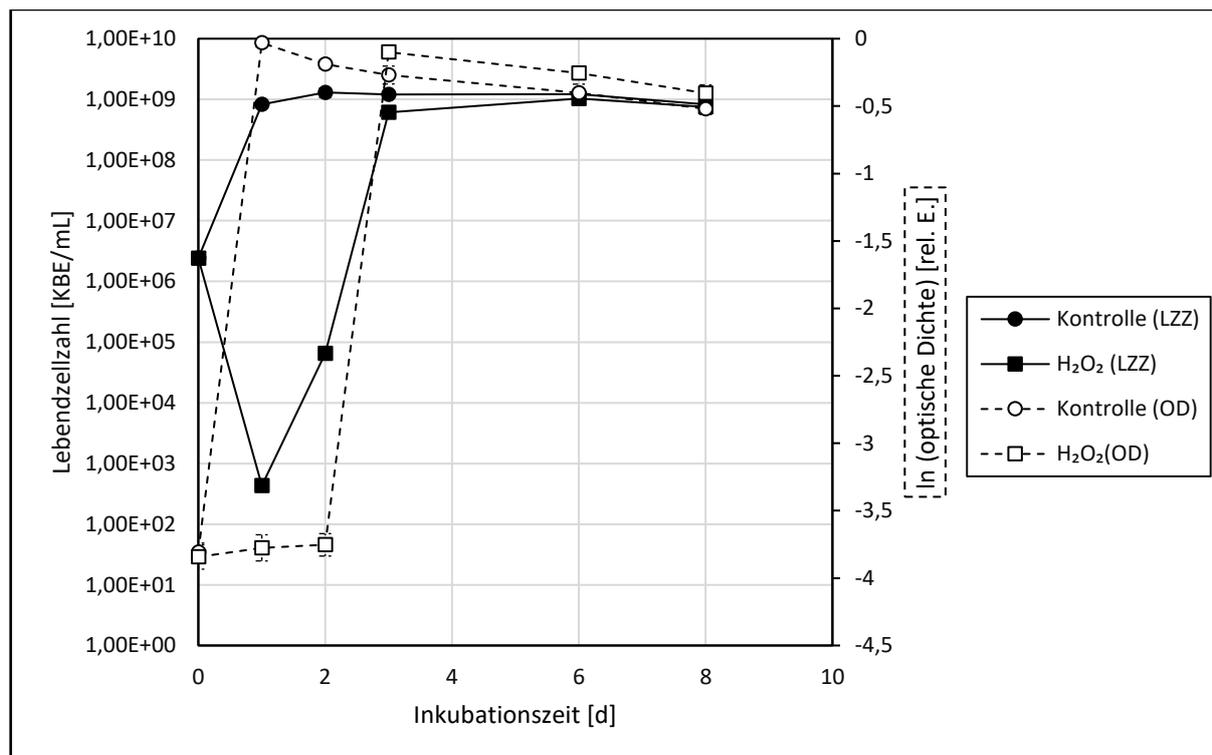


**Abbildung 55: Abnahme der Wasserstoffperoxidkonzentration in *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen**

Der Versuch ist in Abbildung 54 beschrieben. Dargestellt ist die Wasserstoffperoxidkonzentration [ $\mu\text{mol}/\text{L}$ ] in den *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d]. Die Wasserstoffperoxidquantifizierung wurde nach BADER et al. (1988) photometrisch durchgeführt (siehe Punkt 4.11.1).

Erwartungsgemäß sank bei hohen eingesetzten Inokula die Wasserstoffperoxidkonzentration in den Ansätzen ab, bis nach zweitägiger Inkubation kein Wasserstoffperoxid mehr quantifiziert wurde. Bei den Kulturen mit geringer Animpfmenge nahm die Wasserstoffperoxidkonzentration anfänglich geringfügig ab und reduzierte sich konstant bis Beprobungsende. Der Ansatz mit einer mittleren Animpfmenge wies zum Zeitpunkt  $t_4 = 3 \text{ d}$  zusätzlich eine Wasserstoffperoxidkonzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2)_{0,4 \text{ mL}, 3 \text{ d}} = 0 \mu\text{mol}/\text{L}$  auf. Ein mittleres Inokulum von ca.  $\text{LZZ} = 5,6 \cdot 10^6 \text{ KBE}/\text{mL}$  im Ansatz bzw. 0,4 mL einer Suspension der optischen Dichte  $\text{OD} = 0,1$  bei einem Endvolumen von  $V = 10 \text{ mL}$  erwiesen sich als geeignete Parameter für die gebremste Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium mit Wasserstoffperoxid.

## 4.11.2 Lebendzellzahl und optische Dichte der Kulturen

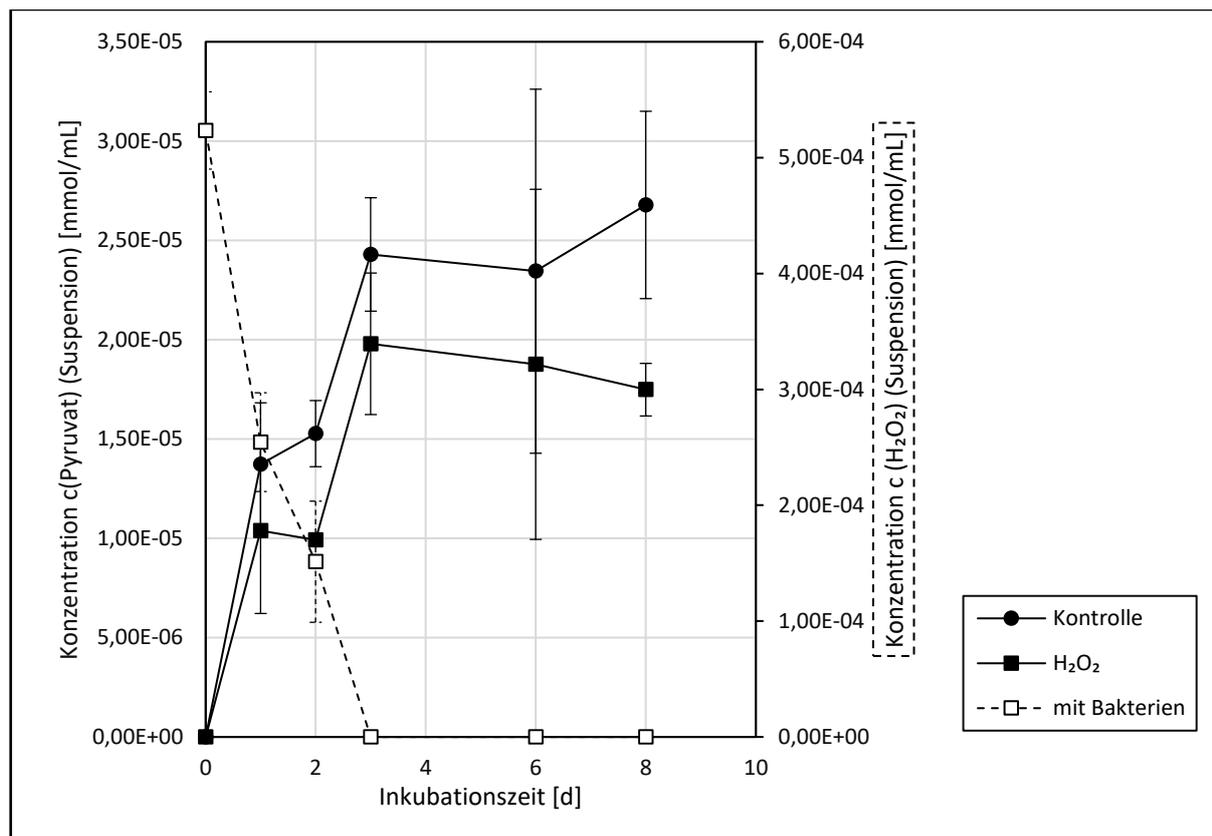


**Abbildung 56: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte von *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid**

In vier parallelen Ansätzen wurde Mineralmedium mit Wasserstoffperoxid versetzt, mit *Pseudomonas aeruginosa* WR1 angeimpft und bei 37 °C inkubiert (Quadrat). Als Kontrolle (Kreis) dienten 4 Ansätze, die nicht mit Wasserstoffperoxid versetzt wurden (siehe Punkt 3.4.11). Dargestellt sind die Vermehrung und das Wachstum dieser Kulturen in dem mit Wasserstoffperoxid versetzten Mineralmedium anhand des natürlichen Logarithmus der optischen Dichte der Flüssigkulturen [rel. E.] (weiß) und anhand der logarithmierten Auftragung der Lebendzellzahlen [log(KBE/mL)] (schwarz) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d]. Der Fehlerbalken kennzeichnet die einfache Standardabweichung um das arithmetische Mittel.

Erwartungsgemäß vermehrte sich *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Mineralmedium und erreichte eine Endlebendzellzahl von ca.  $LZZ = 1 \cdot 10^9$  KBE/mL. Mit dem Anstieg der Lebendzellzahl nahmen auch die Trübungen der Kontroll suspensionen zu. In Anlehnung an Punkt 4.11.1 sank die Lebendzellzahl nach eintägiger Inkubation in mit Wasserstoffperoxid versetztem Mineralmedium auf ca.  $LZZ = 1 \cdot 10^3$  KBE/mL und stieg dann nach einer weiteren eintägigen Inkubation auf einen Wert von einer log-Stufe unterhalb des Anfangsniveaus an. Dann nahm der Zelltitel rasant zu und erreichte so am dritten Inkubationstag das Niveau der Kontrollkulturen. Die Vermehrung bzw. das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach 2 Tagen wurde durch die Trübungsmessung nicht nachvollzogen. Erst signifikantes Wachstum wurde anhand der Trübung detektiert.

## 4.11.3 Pyruvatgehalt und Wasserstoffperoxidkonzentration in den Kulturen



**Abbildung 57: Konzentration an Pyruvat und Wasserstoffperoxid in den *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen**

Der Versuch ist in Abbildung 56 beschrieben. Dargestellt ist die Pyruvatkonzentration [mmol/mL] (schwarz) und die Restkonzentration an Wasserstoffperoxid [mmol/mL] (weiß) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d] (siehe Punkt 3.4.11). Der Fehlerbalken kennzeichnet die einfache Standardabweichung um das arithmetische Mittel.

Mit steigender Inkubationsdauer wurden zunehmende Pyruvatkonzentrationen im klaren Überstand der Suspensionen gemessen. Nach dreitägiger Bebrütung der Kulturen wurde der Maximalwert für alle Proben erreicht. Die Wasserstoffperoxidkonzentration nahm seit Beginn der Beimpfung kontinuierlich ab und erreichte am dritten Inkubationstag einen Wert von unterhalb der Bestimmungsgrenze.

## 4.11.4 Katalaseaktivität der Kulturen

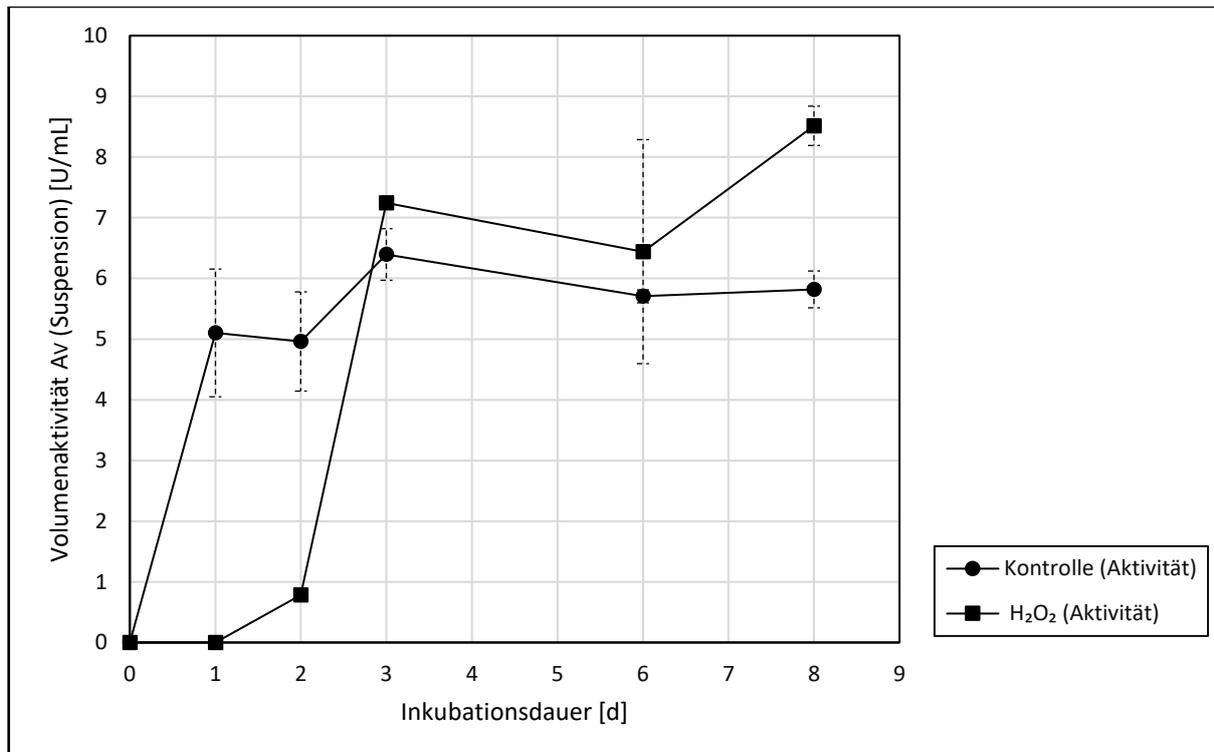


Abbildung 58: Volumenaktivität der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen nach Wasserstoffperoxidzugabe

Der Versuch ist in Abbildung 56 beschrieben. Dargestellt ist die Volumenaktivität [U/mL] der verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d]. Die hier angegebenen ermittelten Volumenaktivitäten wurden unter Berücksichtigung der getätigten Aufkonzentrierung und der durchgeführten Verdünnungsschritte bei der Zellextraktgewinnung auf die beprobten Zellsuspensionen zurückgerechnet (siehe Punkt 3.4.11). Der Fehlerbalken kennzeichnet die einfache Standardabweichung um das arithmetische Mittel.

Mit Anstieg der Lebendzellzahl nahm bei den Kontrollansätzen die Katalasevolumenaktivität der Suspensionen zu und stagnierte für 2 Tage auf einen Wert von ca.  $A_V = 5$  U/mL. Dann stieg die Aktivität leicht an und verharrte auf ein Endniveau von  $A_V = 6$  U/mL. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der mit Wasserstoffperoxid versetzten Kulturen nach eintägiger Inkubation gering und stieg nach einer Gesamtbebrütungsdauer auf  $A_V = 1$  U/mL an. Mit starker Vermehrung vergrößerte sich die Volumenaktivität und erreichte nach Stagnation wie bei den Kontrollansätzen dann einen Endwert von  $A_V = 8$  U/mL. Trotz geringer Lebendzellzahl zu Beginn der Inkubation und während der fortschreitenden Bebrütung wiesen die mit Wasserstoffperoxid versetzten Ansätze vergleichbare Pyruvatgehalte und Katalasevolumenaktivitäten auf wie die korrespondierenden Kontrollansätze. Mit Rückgang der Wasserstoffperoxidkonzentration und mit fortlaufender Inkubation glichen sich dann die Kulturen auch in ihrer Lebendzellzahl an. Die Volumenaktivität der mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben überrag die Aktivität der Kontrollansätze um 2 U/mL, während der Pyruvatgehalt um ca. 40 % kleiner war.

## 5 Diskussion

### 5.1 Induktion und Detektion des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas aeruginosa* WR1

Für den Nachweis des VBNC-Zustandes in einem Testkeim muss diese spezielle Überlebensform der bakteriellen Zelle im Laborversuch zuerst geschaffen werden. Mehrere Einflussgrößen sind beschrieben, die den VBNC-Zustand in unterschiedlichen Bakterien auslösen können. Langzeitinkubation und ungünstige Inkubationstemperatur waren die ersten beschriebenen Induktoren, die den VBNC-Zustand in *Vibrio cholerae* (XU et al. (1982)) oder in *Aeromonas salmonicida* (ALLEN-AUSTIN et al. (1984)) auslösten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, wie sich Kulturen des Testkeimes *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bei einer Langzeitinkubation unter Nährstofflimitierung in Hinblick auf ihre Vitalität bzw. Kultivierbarkeit verhielten. Nach 60 Tagen Inkubation in nährstoffarmer Umgebung konnten ca. 30 bis 50 % der Ursprungspopulation von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 noch quantifiziert werden. Dabei zeigten die Ansätze mit Zusatz an NaCl-Lösung leicht höhere Wiederfindungen. Auffallend bei der Langzeitinkubation war der sprunghafte Anstieg in der Lebendzellzahl nach eintägiger Inkubation, der durch Trübungsmessung nicht erfasst wurde. Diese Zunahme in der Lebendzellzahl wurde als das Ergebnis einer Dispersion von Zellaggregaten in Einzelzellen interpretiert. Nach SCHLEHECK et al. (2009) bildete *Pseudomonas aeruginosa* bei ausreichendem Nährstoffangebot Zellaggregate, die sich bei Nährstofflimitierung in Einzelzellen auftrennten. Die Aggregatbildung ist eng mit der Biofilmbildung assoziiert. Im mikroskopischen Präparat wurde dieser Umstand für den eingesetzten Testkeim *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nachvollzogen. Das Auftrennen dieser Aggregate durch Ultraschall nach HÜBEL (2013) wurde dagegen in dieser Arbeit nicht zufriedenstellend erreicht. Die niedrigsten ausgewählten Ultraschallintensitäten von 20 % (12 Watt) waren ausreichend, um eher eine zellabtötende Wirkung zu erzielen. Dies wurde als Indikator dafür interpretiert, dass die Aggregate von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 weniger stark agglomeriert waren als beispielsweise die von *Staphylococcus aureus*, dessen Zellaggregate nach HENSEL (2012) sogar eine protektive Wirkung auf die Einzelzelle aufwiesen. Das lange Überleben in nährstoffarmer Umgebung für *Pseudomonas aeruginosa* untersuchten bereits FAVERO et al (1971) in destilliertem Leitungswasser und LEGNANI et al. (1999) in Mineralwasser. Bei geringen Konzentrationen an organischem Material und Salz konnte *Pseudomonas aeruginosa* nach LEGNANI et al. (1999) bis zu 5 Jahren in Mineralwasser überleben. Auch in dieser Arbeit erwies sich *Pseudomonas aeruginosa* WR1 bei Langzeitinkubation in nährstoffarmen bzw. -freien Bedingungen äußerst inert gegenüber dem Aushungern. Ein großer Anteil der Populationen beider Testkeime war über den langen Beprobungszeitraum kultivierbar.

*Escherichia coli* K12-Kulturen wurde als Referenz ebenfalls unter Nährstofflimitierung bis zu 2 Monate lang bei 37 °C inkubiert. Für diesen Keim war auch ein Langzeitüberleben in oligotropher Umgebung beschrieben (FLINT (1987)). In dieser Arbeit wurden nach 57 Tagen nur noch ca. 2 % der Ursprungszellzahl quantifiziert, obwohl trotz gleicher Ausgangstrübung im Vergleich zu den *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen ein doppelt bis dreifach so hoher Zelltitel anfänglich eingesetzt wurde. Im direkten Vergleich reagierte demnach *Escherichia coli* K12 anfälliger auf Nährstofflimitierung. Nach ARANA et al. (2007) war *Escherichia coli* nach 20 Tagen Inkubation in steriler Salzlösung bei 37 °C bei einer Ausgangszellzahl von ca.  $LZZ = 10^7$  Zellen pro mL nicht mehr kultivierbar und bei Inkubation ohne Lichtausschluss sogar nach 4 Tagen. Ferner war nach MAALEJ et al. (2004) *Aeromonas hydrophila* innerhalb von 50 bis 55 Tage nicht mehr kultivierbar und trat in den VBNC-Zustand ein. Zahlreiche weitere Autoren (BESNARD et al. (2002), CHAVEERACH et al. (2003), ALLERON et al. (2008) und CAPPELIER et al. (2007)) setzten für vergleichbare Ursprungszellzahlen eine Grenze von  $LZZ = 1$  KBE/mL für eine Suspension aus nur toten und VBNC-Zellen. WHITESIDES und OLIVER (1997), LLEÓ et al. (2001) und MARY et al. (2002) verschärfte diese Nachweisgrenze von kultivierbaren Zellen bei ähnlichem Inokulum um das Zehnfache auf  $LZZ = 0,1$  KBE/mL. Diese Ergebnisse standen im Kontrast zu den hier abgebildeten Befun-

den. *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 waren bei ähnlichem Ausgangszelltitern noch nach 60 Tagen kultivierbar. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Induktion des VBNC-Zustandes durch Aushungern kein generelles Phänomen war, sondern abhängig vom untersuchten Keim war und multifaktoriell ablief (ZHANG et al. (2015) und OLIVER (2010)).

Die Langzeitinkubation einer Bakterienkultur und die Kontrolle der Kultivierbarkeit der Zellen haben zwei methodische Vorteile. Einerseits werden die Testorganismen in den VBNC-Zustand überführt und andererseits wird der Anteil an noch kultivierbaren Zellen drastisch reduziert, so dass diese Zellen nicht mehr die größte Subpopulation darstellen. Infolge des geringen Anteils lebender und kultivierbarer Zellen kann die Anwesenheit von VBNC-Zellen durch Resuszipation nachgewiesen werden. Allerdings besteht Gefahr, dass ein sprunghafter Wiederanstieg in der Lebendzellzahl nach Reduktion als Resuszipation von VBNC-Zellen fehlinterpretiert wird (OLIVER (2010)), obwohl es sich in Wirklichkeit nur um eine erneute Vermehrung weniger noch verbliebener, kultivierbarer Zellen handelte. Dass Inokula mit dieser geringen Anzahl an kultivierbaren Zellen noch eine pathogene Wirkung erzielen konnten, beschrieb beispielsweise OLIVER (1993) in einer Übersicht. Um sicherzustellen, dass keine kultivierbaren Zellen in einem Ansatz noch vorhanden waren, schlugen zahlreiche Autoren eine vorgeschaltete Verdünnung vor. Nach WHITESIDES und OLIVER (1997) bzw. in Anlehnung daran ZHANG et al. (2015) konnten durch diese weiteren dekadischen Verdünnungen einer Suspension ( $LZZ < 0,1$  bzw.  $1 \text{ KBE/mL}$ ) die kultivierbaren Zellen ausselektiert werden. Anschließend wurde Medium, das eine Resuszipation ermöglichen konnte, mit diesen Verdünnungen angeimpft. Bei Wachstum, das durch Trübung angezeigt wurde, wurde die Resuszipation und damit die Anwesenheit von VBNC-Zellen detektiert. Diese Vorgehensweise wird allerdings kontrovers diskutiert (vgl. dazu LINDEN et al. (2015) und GEHR (2015)) und kann nicht für Kulturen angewendet werden, die nach Langzeitinkubation einen Zelltitern von deutlich über  $LZZ = 1 \text{ KBE/mL}$  bzw.  $0,1 \text{ KBE/mL}$  aufweisen. Dies war für die in dieser Arbeit untersuchten Keime *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Escherichia coli* K12 der Fall. Eine Bakterienpopulation, die einem Induktor des VBNC-Zustandes ausgesetzt war, musste stets als eine Mischpopulation aus toten, kultivierbaren und VBNC-Zellen angesehen werden (BESNARD et al. (2000a) und BESNARD et al. (2000b)). Die VBNC-Zellen haben dabei einen geringeren Anteil an der Gesamtpopulation als kultivierbare Zellen, wie KHAN et al. (2010a) mittels VBNC selektiver Durchflusszytometrie für eine oligotrophe Wasserprobe demonstrierten. Demnach waren 1 bis 64 % der Zellen im VBNC-Zustand, 40 bis 98 % waren kultivierbare Zellen und 0,7 bis 4,5 % wurden aufgrund des Zustandes ihrer Cytoplasmamembran als tot definiert. Außerdem ist eine Resuszipation mit großer Wahrscheinlichkeit nicht quantitativ, da nur für einen Teil der VBNC-Population die Kultivierbarkeit wiederhergestellt wird (LLEÓ et al. (2007)).

Mehrere experimentelle Durchführungen wurden beschrieben, die diese methodischen Nachteile ausgleichen sollen. Eine auf Kultivierung und Resuszipation basierende Detektionsmethode, die den Umstand berücksichtigt, dass die zu untersuchende Bakteriensuspension neben VBNC-Zellen auch kultivierbare Zellen enthält, ist beispielsweise die „mixed culture recovery method“ (MCR) nach BOGOSIAN et al. (1998). Der bakterielle Zustand von Kulturen zweier leicht zu differenzierenden Stämme wurde nach Induktion des VBNC-Zustandes durch Acridinorange-Zählung und Lebendzellzahlbestimmung durch Kultivierung oder nach KOGURE et al. (1979) ermittelt. Anschließend wurden die beiden Kulturen miteinander gemischt, wobei von beiden Stämmen überwiegend VBNC-Zellen in der Kultur enthalten waren und von nur einem Stamm durch entsprechende vorherige Verdünnung der Kultur des anderen Stammes kultivierbare Zellen. Dieser Mischkultur wurden Nährmedien zugesetzt, die eine Resuszipation ermöglichten. Anschließend wurde die Wiederfindung durch Ausplattieren auf Festmedien, die die Differenzierung der beiden Stämme ermöglichten, bestimmt.

Statt des Einsatzes eines Referenzstammes wurde auch der Einsatz einer alternativen Vitalitätsbestimmung beschrieben. ARANA et al. (2007) kombinierten beispielsweise die Detektion des VBNC-Zustandes durch Resuszipation mit Alternativverfahren zur Vitalitätsbestimmung. *Escherichia coli* wurde durch Langzeitinkubation unter ungünstigen Bedingungen in den VBNC-Zustand überführt. Der Zelltitern dieser Suspensionen wurde durch Vitalfärbung und Ausplattieren

ermittelt. Bei einer Lebendzellzahl von  $LZZ = 0,1$  KBE/mL wurden die VBNC-Zellen über einen Urografin-Gradienten zentrifugiert und isoliert. Diese separierten Suspensionen wurden dann in Medien überführt, die ein Resusozitationspotential aufwiesen und Antibiotika zur Hemmung noch vorhandener kultivierbarer Zellen enthielten. Diese Kulturen wurden dann im Dunkeln inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde der Zelltiter durch Ausplattieren und Vitalfärbung mittels des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits bestimmt. Parallel wurden nach dem MPN-Verfahren Nährmedien ohne Antibiotikazusatz angeimpft. Beide Verfahren beruhten darauf, dass die eingesetzten Medien eine Resusozitation garantiert auslösen konnten und Referenzverfahren zur Vitalitätsbestimmung eingesetzt wurden. Gleichzeitig wurde angenommen, dass die zugesetzten Antibiotika aufgrund der fehlenden Vermehrungsfähigkeit der VBNC-Zellen nur auf die kultivierbaren Zellen wirkten (LLEÓ et al. (2007)). In dieser Arbeit wurde ebenfalls in Kombination mit der klassischen auf Kultivierung basierenden Ausplattiermethode ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren eingesetzt. Durch einen relativen Vergleich wurde der Anteil der VBNC-Zellen an der Gesamtpopulation approximiert. Der Nachweis der VBNC-Zellen durch Resusozitation erfolgte in einem separaten Versuch und wurde in Anlehnung an DUCRET et al. (2014) auch als Mehrbefund registriert. Dadurch wurde der Anteil an noch kultivierbaren Zellen im Ansatz automatisch berücksichtigt.

Negative Einflüsse auf die Kultivierbarkeit in Form von Artefakten, die beim Ansetzen der Zellsuspensionen entstehen können, wurden zuvor ausgeschlossen. Dass Zellpräparationen eine Veränderung in der Kultivierbarkeit bzw. Zelloberfläche bewirken, beschrieben beispielsweise PETERSON et al. (2012) und PEMBREY et al. (1999). Nach PETERSON et al. (2012) wurde bei *Staphylococcus aureus* durch die Wahl des Zentrifugationsbehälters und der -geschwindigkeit die Zelloberfläche manipuliert. Als Konsequenz verschlechterte sich durch die Zentrifugation das Anheftungsvermögen an Oberflächen und das Membranpotential ( $\zeta$ -Potential) nahm auf ca. 58 % des Ursprungswertes ab. Dieser Verlust an Eigenschaften, welche auf den Zustand der Zelloberfläche beruhen, erläuterten bereits PEMBREY et al. (1999). Die Autoren wiesen zudem nach, dass durch Luft- oder Gefriertrocknung der größte Anteil der Kulturen der Testkeime *Psychrobacter* sp., *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermis* nicht mehr kultiviert werden konnte. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zentrifugation bei 15.000 g zwar eine Veränderung in der Zelloberfläche der drei Testkeime, allerdings wurden die Lebendzellzahlen der Testkeime kaum bzw. für *Escherichia coli* nur geringfügig verringert. Für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde in eigenen Untersuchungen ebenfalls keine signifikante Reduzierung in der Anzahl kultivierbarer Zellen durch die Zentrifugation und Resuspendierung in phosphatgepufferter Salzlösung festgestellt. In Übereinstimmung mit der zitierten Literatur (PEMBREY et al. (1999)) wurde *Escherichia coli* K12 als Referenz eingesetzt und auch für diesen Testkeim wurde keine Abnahme in der Lebendzellzahl mit zunehmender Anzahl an Zentrifugationsschritten beobachtet.

Für die Induktion des VBNC-Zustandes existieren verschiedene Modelle. BOGOSIAN und BOURNEUF (2001) sahen den VBNC-Zustand als eine Akkumulation von Angriffen auf die bakterielle Zelle, durch die diese nicht kultivierbar wurde. Im Gegensatz dazu beschreiben AERTSEN und MICHIELS (2004) den VBNC-Zustand als genetisch programmiert und damit als Antwort der bakteriellen Zelle auf negative Umwelteinflüsse. Dadurch, dass ein Teil der Bakterienpopulation die eigene Zellteilung unterbindet und damit die eigenen Nährstoffansprüche reduziert, stehen mehr Substrate den noch vermehrungsfähigen Zellen zur Verfügung (LEWIS (2000)), die dann unter den widrigen Bedingungen länger überleben können. Eine Parallele mit der Sporulation wurde ebenfalls diskutiert (MCDUGALD et al. (1999) und KELL und YOUNG (2000)).

Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* WR1, die geringe Nährstoffansprüche haben, mussten neben Aushungerung einem weiteren Selektionsdruck ausgesetzt werden. D.h. neben der Langzeitinkubation unter Nährstofflimitierung wurde für diese Untersuchung ein weiterer Lethalfaktor gesucht, der den VBNC-Zustand in diesem Testkeim auslösen konnte. In der Literatur sind verschiedene Einflussgrößen für die Induktion des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas* sp. beschrieben (ZHANG et al. (2015) und KHAN et al. (2010b)). Für *Pseudomonas aeruginosa* ist vor

allein die durch Kupfersalze und Chlordesinfektion induzierte Annahme des VBNC-Zustandes untersucht (BÉDARD et al. (2014)). In Übereinstimmung mit der Trinkwasserverordnung (siehe § 11 der TRINKWV (2001)) finden Chlorverbindungen (BÉDARD et al. (2014), CHIAO et al. (2014) und DUCRET et al. (2014)) ihre Anwendung als Desinfektionsmittel. Wasserstoffperoxid darf dagegen ausschließlich zum Zwecke der Oxidation eingesetzt werden. Allerdings wurde in vergleichbaren Untersuchungen auch Wasserstoffperoxid (MORISHIGE et al. (2013)) zur Keimreduzierung eingesetzt. Die Schädigung, die dieser abiotische Faktor bewirken sollte, musste reparabel sein (WAI et al. (1996) und KUROKAWA et al. (1999)) oder durfte nicht zum vollständigen Abtöten der Zellen führen. Eine Depot- oder Remanenzwirkung durch Abbau- oder Reaktionsprodukte sollte in dieser Arbeit ebenfalls ausgeschlossen werden. Als desinfizierende Chlorverbindung wurde Chlordioxid zunächst eingesetzt. Im direkten Vergleich erwies sich Chlordioxid als potenteres Desinfektionsmittel. So erzielte Chlordioxid in einer deutlich geringeren Konzentration eine keimabtötende Wirkung gegenüber Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 als Wasserstoffperoxid in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich. Ähnliches zeigte bereits CZIRR (2013) bei der Desinfektion von *Pseudomonas* sp. B13. Die schwächere Desinfektionswirkung des Wasserstoffperoxids beruht u. a. auf dem schwächerem Oxidationspotential von 1,776 V im sauren Milieu und von 0,878 V bei pH-Werten > 7. Chlordioxid weist dagegen über den gesamten pH-Bereich ein Standardpotential von 0,95 V auf (KÜKE (2001)). Die Bildung von Chlorverbindungen nach der Desinfektion von Trinkwasser mit Chlordioxid ist bekannt (GORDON et al. (1972)) und wird kontrovers diskutiert (vgl. dazu ZHOU et al. (2014)). Im Gegensatz dazu reagiert Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser und Sauerstoff ab (MITCHELL und WYNNE-JONES (1952)).

Nach Auswahl des Desinfektionsmittels wurde in einem zweiten Schritt das Verhältnis der Desinfektionsmittelkonzentration zum Inokulum ermittelt, bei dem Wasserstoffperoxid eine nachweisbare, eine schwache oder keine keimreduzierende Wirkung erzielt. Ausgehend von einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension mit einer optischen Dichte von OD = 0,5 erreichte Wasserstoffperoxid mit einer Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) \geq 10$  mg/mL eine drastische keimreduzierende, von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) \geq 1$  mg/mL eine keimreduzierende, von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,53$  mg/mL eine geringfügige und von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) \leq 0,26$  mg/mL keine keimreduzierende Wirkung. Die abnehmende Desinfektionswirkung einer chemischen Substanz in Abhängigkeit von der Größe der Ursprungspopulation des zu desinfizierenden Keimes ist als Inokulumeffekt beschrieben (STEELS et al. (2000)). D.h. die Größe des Inokulums für die Induktion des VBNC-Zustandes ist insofern von weiterer Bedeutung, als dass die Gesamtzellzahl die keimreduzierende Wirkung einer chemischen Substanz abmildern kann (JOHNSTON et al. (2000)), wodurch der Zelltod verhindert wird und der VBNC-Zustand auftreten kann. Unabhängig einer vorgeschalteten Desinfektion zeigten beispielsweise BESNARD et al. (2002) den Einfluss der Inokulumgröße auf die Induktion des VBNC-Zustandes.

Neben der Wahl des Desinfektionsmittels beeinflusst die Kontaktzeit entscheidend das Desinfektionsergebnis. Für die Beurteilung der keimreduzierenden Wirkung eines Desinfektionsmittels wird in der Routineanalytik der Suspensionstest eingesetzt (DIN EN 1276:2010-01). Fest definierte Inokula des Testkeimes werden der Prüfsubstanz mindestens 1 min bis maximal 60 min ausgesetzt. Anschließend werden die Prüfsuspensionen in eine Lösung überführt, die einen Inhibitor gegen die Prüfsubstanz enthält. Die Lebendzellzahl der Prüfsuspensionen wird dann gegen den Wert der unbehandelten Proben abgeglichen. In Anlehnung an dieser Untersuchungsmethode wurden in dieser Arbeit die Keime 60 min dem Desinfektionsmittel ausgesetzt.

Verschiedene Theorien beschreiben die Keimreduktion als ein definiertes Modell. Nach HOM (1972) kann die Keimreduktion durch chemische Desinfektion als Zerfallsfunktion pseudo-erster Ordnung in Abhängigkeit von der Desinfektionsmittelkonzentration, der Kontaktzeit und einer empirischen Abtötungskonstante beschrieben werden. Diese mechanistische Theorie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Als Gegenmodell hat sich die vitalistische Desinfektionstheorie etabliert (CERF (1977)), die davon ausgeht, dass in einer Gesamtpopulation Subpopulationen mit unterschiedlichen Resistenzen vorkommen. Demnach ist die Häufigkeit des Vorkommens unterschiedlicher

Resistenzen ein weiterer Einflussfaktor auf die Desinfektionswirkung. LAMBERT und JOHNSTON (2000) versuchen die Aspekte beider Methoden zu vereinen, in dem die Autoren auf Grundlage der mechanistischen Theorie den permanenten Rückgang der Desinfektionsmittelkonzentration durch das Abreagieren mit den Mikroorganismen bei der Modellierung berücksichtigen. Die Autoren sehen in dieser permanenten Abnahme der Wirkkonzentration den eigentlichen Grund für Abweichungen von der Idealkurve („log-survivor/time“) einer Desinfektion. In Abhängigkeit von der Zeit nimmt die Wirkkonzentration eines Oxidationsmittels ab, wodurch die Absterbewahrscheinlichkeit eines Keimes im Desinfektionsmittelansatz, der noch nicht durch das Prüfereagenz angegriffen wurde, automatisch auch abnimmt (LAMBERT und JOHNSTON (2000)). Grund hierfür ist die Tatsache, dass Wasserstoffperoxid in seiner oxidativen Eigenschaft nicht zwischen lebenden und toten Zellen differenziert (JOHNSTON et al. (2000)) und für die Inaktivierung einer bakteriellen Zelle müssen nach PARDEY et al. (2005) ein oder mehrere überlebenswichtige Bestandteile in der Zelle zerstört werden. In der hier dargestellten Versuchsdurchführung sollte genau dies gezielt provoziert werden, um wie bereits erwähnt neben kultivierbaren und toten Zellen auch VBNC-Zellen entstehen zu lassen. Bereits abgetötete Zellen wirken als Quencher, wie JOHNSTON et al. (2000) für *Staphylococcus aureus* bei der Desinfektion mit Natriumdodecylsulfat zeigten. Im Gegensatz zur zitierten Literatur erwies sich Wasserstoffperoxid gegenüber einem intrinsischen Abbau äußerst inert. Die positiven Blindproben wiesen stets über der gesamten Inkubationsdauer eine annähernd konstante Konzentration auf. D.h. die Abnahme der Wasserstoffperoxidkonzentration war die direkte Folge des Reagierens mit den bakteriellen Zellen, die damit die Wirkkonzentration von Wasserstoffperoxid extrinsisch reduzierten.

Die Induktion des VBNC-Zustandes von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde in dieser Arbeit durch einen zweistufigen Prozess erzeugt. Zuerst wurden die Zellen in nährstoffarmen Puffer bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert und diese Suspensionen wurden dann mit Wasserstoffperoxid behandelt. Über die gesamte Inkubationsdauer nahm die Anzahl kultivierbarer Zellen wie bereits gezeigt ab. Die Gesamtmenge an organischem Material blieb unverändert. Die Zellzahl von Kulturen, die 2 d inkubiert und dann mit Wasserstoffperoxid versetzt wurden, wurde um den gleichen Anteil nur minimal reduziert wie die Zellzahlen von Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase. Erst 6 d alte Kulturen wurden durch das Oxidationsmittel stärker inhibiert. Eine drastische Abnahme in der Lebendzellzahl wurde bei der Desinfektion von 9 d lang inkubierten Kulturen registriert. Während für die Vitalitätsbestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie für dieselben Proben (0 d, 2 d, 6 d) ähnliche Wiederfindungsraten ermittelt wurden, unterschieden sich die Wiederfindungen bei den 9 d lang inkubierten und dann desinfizierten Ansätzen. Bei den basierend auf Kultivierung ermittelten Lebendzellzahlen wurden nach der Wasserstoffperoxidbehandlung nur noch ca. 12 % der Ursprungszellzahl wiedergefunden. In Kontrast dazu wurden durch die Fluoreszenzmikroskopie annähernd 70 % der Anfangszellzahl als vitale Zellen nach der Desinfektion erfasst. Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, dass durch das ausgewählte fluoreszenzmikroskopische Verfahren im direkten Vergleich mit der Kultivierungsmethode weniger Zellen erfasst wurden, wurde dieser Befund anhand der absoluten Zellzahlen bestätigt. Zum Zeitpunkt  $t_4 = 9$  d wurden durch die klassische Lebendzellzahlbestimmung ein Zelltiter von  $LZZ = 2,4 \cdot 10^7$  KBE/mL und durch das fluoreszenzmikroskopische Verfahren von  $LZZ = 4,73 \cdot 10^7$  KBE/mL absolut quantifiziert.

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 konnte durch Langzeitinkubation und Desinfektion mit Wasserstoffperoxid in den VBNC-Zustand überführt werden. Anhand des Zustands der Cytoplasmamembran wurde zwischen vitalen und toten Zellen differenziert (vgl. dazu DUCRET al. (2014) und ARANA et al. (2007))

## 5.2 Resusztation von VBNC-Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und die Rolle des Pyruvat bei der chemisch induzierten Resusztation

Das Resusztationsvermögen einer VBNC-Zelle ist für die Forschung von besonderem Interesse. Neben dem Erhalt der Virulenz wird die Wiedererlangung der Vermehrung nach Besiedlung des Wirts oder nach einer unzureichenden Desinfektion als große Gefahren für die öffentliche Gesundheit angenommen (RAMAMURTHY et al. (2014)).

Für den Vorgang der Resusztation werden drei Mechanismen angenommen. Neben der Beseitigung des Lethalfaktors (RAMAIAH et al. (2002), MAALEJ et al. (2004) und MAGARIÑOS et al. (1997)) genügte der Zusatz chemischer Stimuli (PINTO et al. (2011)), die entweder zur Reparatur von entstandenen Zellschäden beitrugen (WAI et al. (1996) und KUROKAWA et al. (1999)) oder als Signalmoleküle (KELL und YOUNG (2000) und MUKAMOLOVA et al. (1998)) wirkten.

Für das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* wurde die Fähigkeit zur Autoresusztation bereits untersucht (BÉDARD et al. (2014)). Die Autoren zeigten, dass bei unveränderten Parametern für die Gesamtzellzahl sich nach Zugabe von  $\text{Cu(II)SO}_4$  die Lebendzellzahl von *Pseudomonas aeruginosa* drastisch verringerte. Nach Chelatierung der Kupferionen stieg die Anzahl kultivierbarer Zellen wieder an. Parallel nahm die Lebendzellzahl in einem zweiten Ansatz nach Chlordesinfektion wieder zu, nachdem kein Desinfektionsmittel mehr in der Kultur nachgewiesen wurde. Als Bezugspunkt wurde die Lebendzellzahl vor der Desinfektion definiert.

Die Fähigkeit zur Autoresusztation sollte in Anlehnung an BÉDARD et al. (2014) auch für den in dieser Arbeit untersuchten *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm untersucht werden. Die Versuchsparameter wurden den Bedingungen angepasst, unter denen der VBNC-Zustand bereits nachgewiesen wurde. Abweichend zur zitierten Literatur wurde als Bezugsgröße die Lebendzellzahlen der Kontrollansätze definiert, um automatisch den durch Langzeitinkubation bedingten Verlust an kultivierbaren Zellen zu berücksichtigen. Bei der eingesetzten Konzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  erzielte Wasserstoffperoxid erwartungsgemäß nur bei geringen Inokula eine signifikante keimreduzierende Wirkung. Anhand der Trübungsmessung wurde indirekt die bakterielle Gesamtmasse verfolgt. Dabei reagierte das Oxidationsmittel nach einstündiger Inkubation vollständig ab. Folglich konnte wie durch RAMAIAH et al. (2002) beschrieben kein direkter Zusammenhang zwischen dem Verschwinden des Lethalfaktors Wasserstoffperoxid und dem beobachteten Wiederanstieg in der Lebendzellzahl geschlossen werden. Dass eine Wasserstoffperoxidkonzentration von  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  auf eine *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kultur keine signifikant keimreduzierende Wirkung entfaltet, wurde bereits in einem unabhängigen Versuch (siehe Punkt 4.7) dargestellt.

In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurde die Konzentration um das Zehnfache auf  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10 \text{ mg/mL}$  erhöht. Die Lebendzellzahlen der Suspensionen mit niedriger Ausgangszellzahl wurden durch das Oxidationsmittel auf  $\text{LZZ} = 0 \text{ KBE/mL}$  (Spatelverfahren) bzw. ca.  $1 \text{ KBE/mL}$  (Membranfiltrationsverfahren) herabgesetzt. Nach eintägiger Inkubation und völligem Abreagieren des Wasserstoffperoxids stiegen die Lebendzellzahlen um ca. sechs 10er-Potenzen an. Mittels der Trübungsmessung wurde beobachtet, dass die Gesamtzellmasse in diesem Zeitraum konstant blieb. Dies entsprach zunächst den von BÉDARD et al. (2014) aufgestellten Beobachtungen, dass nach Verschwinden des Lethalfaktors die Anzahl kultivierbarer Zellen wieder anstieg. Das Membranfiltrationsverfahren unterschied sich vom Spatelverfahren u.a. dadurch, dass ein größeres Probenvolumen eingesetzt wurde. Das Membranfiltrationsverfahren war demnach deutlich sensitiver, wodurch noch sehr geringe Zellzahlen erfasst wurden. Nicht alle Autoren wandten bei der Vitalitätsbestimmung einer Kultur mit VBNC-Zellen durch Kultivierung neben dem Spatelverfahren auch das Membranfiltrationsverfahren an (MARY et al. (2002) und BESNARD et al. (2002)).

In einem Gegenversuch wurde überprüft, ob der signifikante Anstieg in der Lebendzellzahl nach Reduktion bei konstanter Trübung der Suspensionen entweder die Folge einer erneuten Vermehrung verbliebener kultivierbarer Zellen war oder das Ergebnis der Resusztation von VBNC-Zellen. So wurde einerseits qualitativ der bakterielle Zustand der Desinfektionsansätze mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt, nach der die Kulturen nachweislich einen Anteil vitaler Zellen

aufwiesen. Andererseits wurde im Anschluss nachgewiesen, dass *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in einer sehr niedrigen Ausgangszellzahl bei Inkubation mit abgetöteten Zellen sich ebenfalls um sechs 10er-Potenzen vermehrte. Folglich wurde der Wiederanstieg der Lebendzellzahl nach Reduktion des Zelltiters durch Desinfektion vor allem als Vermehrung noch kultivierbarer Zellen interpretiert. Nach einer Desinfektion mit hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen bestand die Bakterienpopulation folglich vorwiegend aus toten Zellen und geringfügig auch aus vermehrungsfähigen Zellen. Es wurden keine VBNC-Zellen durch eine Resusztation nachgewiesen. Die Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* nach einer Desinfektion ist ein bekanntes Phänomen (ALONSO et al. (2004) und NAWAZ et al. (2012)). Abgetötete Zellen stellen dabei eine geeignete Nährstoffquelle dar. Dieser Umstand wird dadurch erhärtet, dass vergleichbare Ansätze als Resusztationsmittel in anderen Veröffentlichungen (KELL und YOUNG (2000) und MUKAMOLOVA et al. (1998)) eingesetzt wurden. Diese starke Vermehrung wurde außerdem auf die geringen Nährstoffansprüche von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 zurückgeführt (vgl. dazu FAVERO et al. (1971)), was sich in dieser Arbeit auch anhand des verhältnismäßig schnellen Wachstums bzw. der schnellen Vermehrung in Minimalmedium (vgl. dazu KHAKIMOVA et al. (2013)) zeigte.

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden mit der bereits zitierten Literatur verglichen. Während nach BÉDARD et al. (2014) Kupferionen nur die Kultivierbarkeit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur einschränkten, reduzierte das oxidativ wirkende Chlor sowohl die Vitalität als auch die Kultivierbarkeit der *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen in den Testansätzen. Durch höhere Konzentrationen von Chlordioxid erzielten die Autoren eher eine Abtötung der Testkeime, während bei geringeren Desinfektionsmittelkonzentrationen die Bildung von VBNC-Zellen provoziert wurde. Nach völligem Abreagieren des Desinfektionsmittels stiegen dann die Vitalität und Kultivierbarkeit der Kulturen drastisch an. D.h. die Autoren sehen im Wiederanstieg in der Lebendzellzahl nach Chlordesinfektion das Ergebnis von Vermehrung und einer Resusztation.

Eine erfolgreiche Reaktivierung von VBNC-Zellen zu kultivierbaren Zellen ist von mehreren Parametern abhängig. Das Ausmaß der zellulären Schädigung, die der Induktor verursacht, beeinflusst maßgeblich das Resusztationspotential (vgl. dazu PINTO et al. (2011)). Eine irreparable Schädigung der bakteriellen Zelle verhindert unabhängig vom postuliertem Modell, nachdem der VBNC-Zustand ausgelöst wird (siehe 5.1), eine Wiedererlangung der Vermehrungsfähigkeit ((WAI et al. (1996) und KUROKAWA et al. (1999))).

Das Ausmaß der Schädigung wird u.a. durch den Mechanismus bestimmt, mit dem die Substanz auf das Bakterium wirkt. Oxidativ wirkende Desinfektionsmittel wie Hypochlorit oder Chlordioxid inaktivieren Zellbestandteile wie Thiole (z.B. Glutathion), Nucleotide, DNA und andere organischen Substanzen (PRÜTZ (1996) und ZHOU et al. (2014)) unspezifisch, indem sie diese oxidieren. In Abhängigkeit von der Anzahl der betroffenen Zellorganellen wird das gesamte Bakterium damit irreversibel geschädigt bzw. abgetötet (PARDEY et al. (2005)). Metallionen wie Kupfer oder Silber bilden dagegen hauptsächlich koordinative Bindungen aus, mit denen sie sich an Zellbestandteile koppeln können und erst bei hohen Konzentrationen eine bakterizide Wirkung erzielen (NAWAZ et al. (2012)). So bindet Silber an negativ geladene Peptidoglycane, Elektronendonatorgruppen und die DNA. Durch den Zusatz eines Chelators konnten diese Reaktionen leicht aufgehoben werden (BÉDARD et al. (2014)).

Für mehrere Bakterien ist der Mangel zur Selbstresusztation beschrieben. BOGOSIAN et al. (1998) zeigten, dass *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* und *Salmonella choleraesuis* nach Induktion des VBNC-Zustandes nicht reaktiviert wurden. ARANA et al. (2007) bestätigten dies für *Escherichia coli* und LLEÓ et al. (2007) für *Enterococcus faecalis*.

Die Resusztation wird durch Supplementzusatz stimuliert. Dabei fungieren die Substanzen entweder in Form eines Signalmoleküls (KELL und YOUNG (2000)) oder sie werden zur Reparatur von Zellschäden (WAI et al. (1996) und KUROKAWA et al. (1999)) oder Inhibieren negativer Umwelteinflüsse (DUCRET et al. (2014)) eingesetzt. CAPPELLIER et al. (2007) inkubierten VBNC-Zellen von *Listeria monocytogenes* in Hühnerembryokulturen, wodurch diese ihre Vermehrungsfähigkeit zurückerhielten. GIAO und KEEVIL (2014) erreichten dies durch Hirn-Herz-Glucose-Agar

(BHI-Agar). MORRILL et al. (1990) konnten durch Albuminzusatz zum BCYE-Agar mehr Zellen von *Legionella micdadei* und *Legionella bozemanii* nach vorherigem Aushungern wiederfinden. ZHANG et al. (2015) überführten *Escherichia coli* vom VBNC-Zustand in die kultivierbare Form mittels Vollmedium (LB-Medium).

Neben dem Einsatz von Vollmedien bewährte sich auch die gezielte Supplementierung mit chemischen Verbindungen. PINTO et al. (2011) versetzten *Escherichia coli* durch Inkubation bei Niedrigtemperaturen in den VBNC-Zustand. Für das Aufheben des VBNC-Zustandes setzten die Autoren die Aminosäuren Methionin, Glutaminsäure, Threonin, Serin oder Asparagin und den Überstand einer Kultur, deren Zellen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, erfolgreich ein. CALABRESE und BISSONNETTE (1990) erzielten höhere Wiederfindungen durch den Zusatz von Katalase und Pyruvat zu Chlor gestressten coliformen Bakterien. MORISHIGE et al. (2013) wiesen nach, dass nur Pyruvat und als Analogon  $\alpha$ -Ketobutyrat eine Resuszitationswirkung auf *Salmonella* sp. erreichten. ZENG et al. (2013) ergänzten für die Reaktivierung von VBNC-Zellen von *Salmonella typhi* Tween 20 und Katalase als Resuszitationsmittel. *Legionella pneumophila* gewann nach Desinfektion mit Hypochlorit durch Zusatz von Glutamat und Pyruvat seine Vermehrungsfähigkeit zurück (DUCRET et al. (2014)).

In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an DUCRET et al. (2014) eine Kombination beider Vorgehensweisen (Vollmedium und Supplementierung) eingesetzt. *Pseudomonas aeruginosa* WR1 wurde erst unter den bekannten Parametern (siehe 5.1) in den VBNC-Zustand überführt. D.h. nach der Langzeitinkubation und Desinfektion mit Wasserstoffperoxid lag eine Mischpopulation aus toten, kultivierbaren und VBNC-Zellen vor. Diese Kulturen wurden zur Lebendzellzahlbestimmung dann sowohl auf TSB-Agarplatten als auch mit Pyruvat supplementierten Agarplatten aufgetragen. Mindestens 50 % bis 250 % mehr Zellen wurden durch den Pyruvatzusatz in Abhängigkeit vom Zellkulturalter wiedergefunden. Dies wurde nach DUCRET et al. (2014) anhand der Wiederherstellungsraten von  $R \geq 1,5$  dargestellt. Durch den direkten Vergleich derselben Probe, die nur auf dem Vollmedium aufgetragen wurde, wurde der Anteil der noch kultivierbaren Zellen automatisch berücksichtigt. Der Anteil an VBNC-Zellen von mindestens 50 % wurde in dieser Arbeit durch einen weiteren unabhängigen Versuch unter den gleichen Parametern bestätigt (siehe Punkt 5.1). Die Wiederfindungen, die entweder durch Fluoreszenzmikroskopie oder durch Kultivierung ermittelt wurden, wurden dafür miteinander verglichen. Die Größenordnung des Anteils der VBNC-Zellen an der Gesamtpopulation entsprach damit der von KHAN et al. (2010a) beschriebenen Verteilung in der Gesamtpopulation von 1 bis 64 % der Zellen im VBNC-Zustand und 40 bis 98 % kultivierbare Zellen. Dabei darf nicht unerwähnt bleiben, dass eine Resuszitation nicht quantitativ verläuft (LLEÓ et al. (2007)).

Das Potential des Pyruvats als Resuszitationsmittel wird auf verschiedene Funktionen zurückgeführt, die diese  $\alpha$ -Ketosäure übernehmen kann. Pyruvat ist ein wichtiges Zwischenprodukt im aeroben und anaeroben Stoffwechsel (ALHASAWI et al. (2016)). So fungierte es als hervorragende C-Quelle, die eine Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ermöglichte. Bei geringer Ausgangszellzahl nahm die Lebendzellzahl innerhalb einer Stunde bei Anwesenheit von Pyruvat als einziger Energieträger in einer Konzentration von 7 mmol/L um 50 % der Ursprungszellzahl zu.

Pyruvat wird in der Literatur auch als Inaktivator reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben (ROS-Fänger) (DUCRET et al. (2014) und TROXELL et al. (2014)). Aufgrund ihrer Oxidationspotentiale wirken diese reaktiven Verbindungen zytotoxisch. TROXELL et al. (2014) wiesen die protektive Wirkung von Pyruvat auf pathogene Spirochäten vor Wasserstoffperoxid nach. Pyruvat reduzierte aktiv die Wirkkonzentration von Wasserstoffperoxid, indem es mit diesem Desinfektionsmittel reagierte. Pyruvat stellte damit einen direkten Antagonisten zu oxidativ wirkenden Entkeimungsmitteln dar. Die Wasserstoffperoxid abbauende Wirkung des Pyruvats wurde in dieser Arbeit auch überprüft. Die daraus resultierende Schutzwirkung des Pyruvats für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 vor Wasserstoffperoxid wurde in Anlehnung an die zitierte Literatur reproduziert und ebenfalls bestätigt. Durch die Decarboxylierung von Pyruvat entstanden nach FEDOTCHEVA et al. (2006) Kohlenstoffdioxid und Acetat. In den Reaktionsansätzen lag bei Überschuss von Pyruvat im Vergleich zur Wasserstoffperoxidkonzentration neben verbliebendem Pyruvat folglich auch Acetat

vor. Ferner wiesen ESCHBACH et al. (2004) und SCHREIBER et al. (2006) nach, dass *Pseudomonas aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen durch Pyruvatfermentation länger überlebte.

Mehrere Synergieeffekte ergaben sich durch den Zusatz von Pyruvat zu einem Desinfektionsansatz mit Wasserstoffperoxid. Das zentrale Stoffwechselprodukt Pyruvat fungierte, nachdem es Wasserstoffperoxid inaktivierte (LONG und HALLIWELL (2011)), auch als gewöhnlicher Energieträger, der Wachstum und/oder Vermehrung zuließ. Dies galt auch für das mögliche Reaktionsprodukt Acetat. Unter der Annahme, dass beim simultanen Zusatz von Wasserstoffperoxid und Pyruvat auch ein Anteil der Zellpopulation durch das Desinfektionsmittel angegriffen wurde (vgl. dazu JOHNSTON et al. (2000) und LAMBERT und JOHNSTON (2000)), begrenzte das Additiv Pyruvat den dadurch ausgelösten Stress (vgl. TROXELL et al. (2014)) oder erlaubte trotz dieses oxidativen Stresses eine uneingeschränkte Vermehrung. Die erhöhte Kohlenstoffdioxidkonzentration, die beim oxidativen Abbau von Pyruvat entstand, wurde durch den naszierenden Sauerstoff, der bei der Reduktion des Wasserstoffperoxids (MITCHELL und WYNNE-JONES (1952)) gebildet wurde, nivelliert. In diesem Zusammenhang erwähnt KÜKE (2001), wie „im alkalischen Bereich das Redoxpotential von Wasserstoffperoxid soweit [...] herabgesetzt wird, dass es Sauerstoff freisetzt und Aerobier sich sogar vermehren können“.

Die reaktivierende Wirkung des Pyruvats aufgrund seiner Eigenschaften als ROS-Fänger ist nicht nur begrenzt auf die Anwendung oxidativ wirkender Substanzen als Induktoren des VBNC-Zustandes. KONG et al. (2004) überführten *Vibrio vulnificus* mittels Inkubation bei 5 °C in den VBNC-Zustand. Für die Resuszipation wählten die Autoren drei unterschiedliche supplementierte Agarsorten an. Hirn-Herz-Glucose-Agar wurde unversetzt, mit Katalase- oder Pyruvatzusatz zur Quantifizierung angewendet. Die supplementierten Nährböden erreichten einen Mehrbefund der Testkeime. MIZUNOE et al. (1999) setzten Nährstofflimitierung und niedrige Inkubations-temperaturen als Induktoren des VBNC-Zustandes in *Escherichia coli* O157 ein. Die Autoren stellten die Kultivierbarkeit der Zellen durch Zusatz von Katalase oder Pyruvat bzw.  $\alpha$ -Ketoglutarat wieder her. WAI et al. (2000) bestätigten dies für *Aeromonas hydrophila*. Als mögliche Erklärung postulieren WANG et al. (2013), dass durch die Stressfaktoren Aushungerung oder Temperatur-senkung auch die Aktivität von Enzymen beeinflusst wird, die Bestandteil der bakteriellen Antwort auf oxidativen Stress sind. In dieser Arbeit wurde durch die Supplementierung mit Pyruvat negativen Effekten entgegengewirkt, die entweder durch die Aushungerung oder durch die Desinfektion verursacht wurden.

Pyruvat kann in seiner dritten Funktion auch als Signalmolekül verstanden werden. Der Einsatz zellfreier Überstände einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase als Resuszipationsmittel wurde häufig beschrieben (KELL und YOUNG (2000), MUKAMOLOVA et al. (1998), PINTO et al. (2011) und ARANA et al. (2007)). Das RpF-Protein ist in dieser Eigenschaft genauer charakterisiert. AYRAPETYAN et al. (2014) etablierten für *Vibrio vulnificus* mit dem Autoinduktor AI-2 eine weitere Komponente, die über das Quorum Sensing eine Wiedererlangung der Kultivierbarkeit ermöglichte. BAYSSE et al. (2005) untersuchten in diesem Zusammenhang die von der Zelldichte unabhängige interzelluläre Kommunikation zwischen *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen nach Aushungerung. So wird Pyruvat trotz seiner physiologischen Relevanz für die bakterielle Zelle von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 im Laborversuch ins Medium abgegeben. GERHARZ (2003) zeigte dies für acetatauxotrophe *Escherichia*-Stämme und BIGNUCOLO et al. (2013) für *Pseudomonas fluorescens*. Die Anwesenheit mehrerer Sekretionssysteme (ADER et al. (2005)) in *Pseudomonas aeruginosa* unterstützen diese Beobachtung. Nach PETROVA et al. (2012) wurde durch die Pyruvatkonzentration im Medium die Mikrokoloniebildung beeinflusst.

Der Zelltitel einer *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspension wurde durch hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen signifikant reduziert. Durch diese Desinfektion waren kaum bzw. keine VBNC-Zellen im Ansatz vorhanden (vgl. dazu ARANA et al. (2007)). Der Wiederanstieg in der Lebendzellzahl nach Verschwinden des Lethalfaktors Desinfektionsmittel war hauptsächlich Folge einer Vermehrung noch vorhandener kultivierbarer Zellen, wie andere Autoren bei vergleichbarer Versuchsdurchführung übereinstimmend zeigten (BÈDARD et al. (2014) und BOGOSIAN et al. (2000)). Aufgrund der geringen Nährstoffansprüche war abgestorbenes Zellmaterial für das

---

Wachstum und die Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 vollkommen ausreichend. Der VBNC-Zustand wurde unter diesen Bedingungen nicht angenommen. Für das Auslösen des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 musste in dieser Arbeit ein komplexer Prozess aus Nährstofflimitierung, Langzeitinkubation und semi-effektiver Desinfektion angewendet werden. Dadurch wurden die Zellen reparabel geschädigt bzw. in ihrer Vermehrungsfähigkeit eingeschränkt (vgl. BOGOSIAN und BOURNEUF (2001)). Mittels Pyruvatzusatz zum Festmedium erlangten die VBNC-Zellen ihre Vermehrungsfähigkeit zurück, was andere Autoren bei vergleichbarer Vorgehensweise für beispielsweise *Vibrio vulnificus* (KONG et al. (2004)), *Escherichia coli* O157 (MIZUNOE et al. (1999)) oder *Aeromonas hydrophila* (WAI et al. (2000)) bereits beschrieben.

### 5.3 Verknüpfung mit der stringenten Kontrolle

In dieser Arbeit wurde der VBNC-Zustand in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 durch eine Kombination aus Langzeitinkubation in oligotropher Umgebung und Wasserstoffperoxidbehandlung erreicht (siehe Punkt 5.1). Die Nährstofflimitierung wurde einerseits für einige Bakterien als Induktor des VBNC-Zustandes beschrieben (XU et al. (1982), MAALEJ et al. (2004) und ARANA et al. (2007)). Andererseits löste der Nährstoffmangel bei Bakterien die stringente Kontrolle und/oder die generelle bakterielle Stressantwort aus (MECHOLD et al. (1996)). Die stringente Antwort ist die direkte Gegenreaktion der bakteriellen Zelle auf Aminosäuremangel und kann durch Serinhydroxamat (VAN DELDEN et al. (2001)) provoziert werden. Verschiedene Autoren untersuchten den Zusammenhang zwischen der bakteriellen Stressantwort und dem VBNC-Zustand. WANG et al. (2013) untersuchten den Einfluss der Untereinheit C der Alkylhydroperoxidreduktase (AhpC), die als der katalytisch wirksame Teil das Überleben von *Vibrio parahaemolyticus* unter Stress oder während des Infektionsvorganges sicherstellt. In Mutanten wurde die Expression der AhpC codierenden Gene variiert (*ahpC1* und *ahpC2*). Die Autoren stellten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust der Kultivierbarkeit und der Expression der Gene (*ahpC1* und *ahpC2*) fest. NOWAKOWSKA und OLIVER (2013) untersuchten die Expression der *relA*- und *spoT*-Gene in VBNC-Zellen von *Vibrio vulnificus*. Für das klinische Isolat wurde keine Differenz in der Expression der beiden Stressgene gefunden. Im Umweltisolat unterschied sich dagegen die Expression des *relA*-Gens in den VBNC-Zellen deutlich von der in den exponentiell wachsenden Zellen.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Zellen, die mit SHX künstlich ausgehungert wurden, auch in den VBNC-Zustand überführt werden konnten wie Zellen, die durch Langzeitinkubation einer Nährstofflimitierung ausgesetzt wurden. Das Auftreten von VBNC-Zellen sollte durch Resuszipation mittels Pyruvat detektiert werden. In Anlehnung an NOWAKOWSKA und OLIVER (2013) und NGUYEN et al. (2011) wurde dafür in dieser Arbeit im Wildisolat *Pseudomonas aeruginosa* WR1 durch SHX-Zugabe die *relA* katalysierte Produktion von Guanosinpentaphosphat induziert. Anschließend wurden die Proben mit Wasserstoffperoxid versetzt und ebenfalls zur Lebendzellzahlbestimmung auf TSB-Agar und mit Pyruvat supplementiertem Agar aufgetragen (vgl. DUCRET et al. (2014)). Durch den Zusatz von Pyruvat wurden 50 bis 100 % mehr Zellen wiedergefunden als bei den korrespondierenden Proben ohne Supplementierung. Bei den Zellansätzen mit niedrigster Ausgangszellzahl konnten erst durch den Pyruvatzusatz Zellen durch das Spatelplattenverfahren quantifiziert werden (vgl. Punkt 4.6.6). Durch einen Gegenversuch wurde festgestellt, dass der Mehrbefund durch Pyruvatzusatz nur bei Zellen auftrat, die zuvor mit SHX angezogen wurden. Die von NOWAKOWSKA und OLIVER (2013) beschriebene Verknüpfung zwischen der stringenten Antwort und dem Auftreten des VBNC-Zustandes für *Vibrio parahaemolyticus* auf molekularbiologischer Ebene konnte in dieser Arbeit anhand der Resuszipation von VBNC-Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1, die durch Wasserstoffperoxidbehandlung nach Langzeitinkubation oder SHX-Zugabe erhalten wurden, nachvollzogen werden.

#### 5.3.1 Katalaseaktivität als Nachweis der stringenten Kontrolle

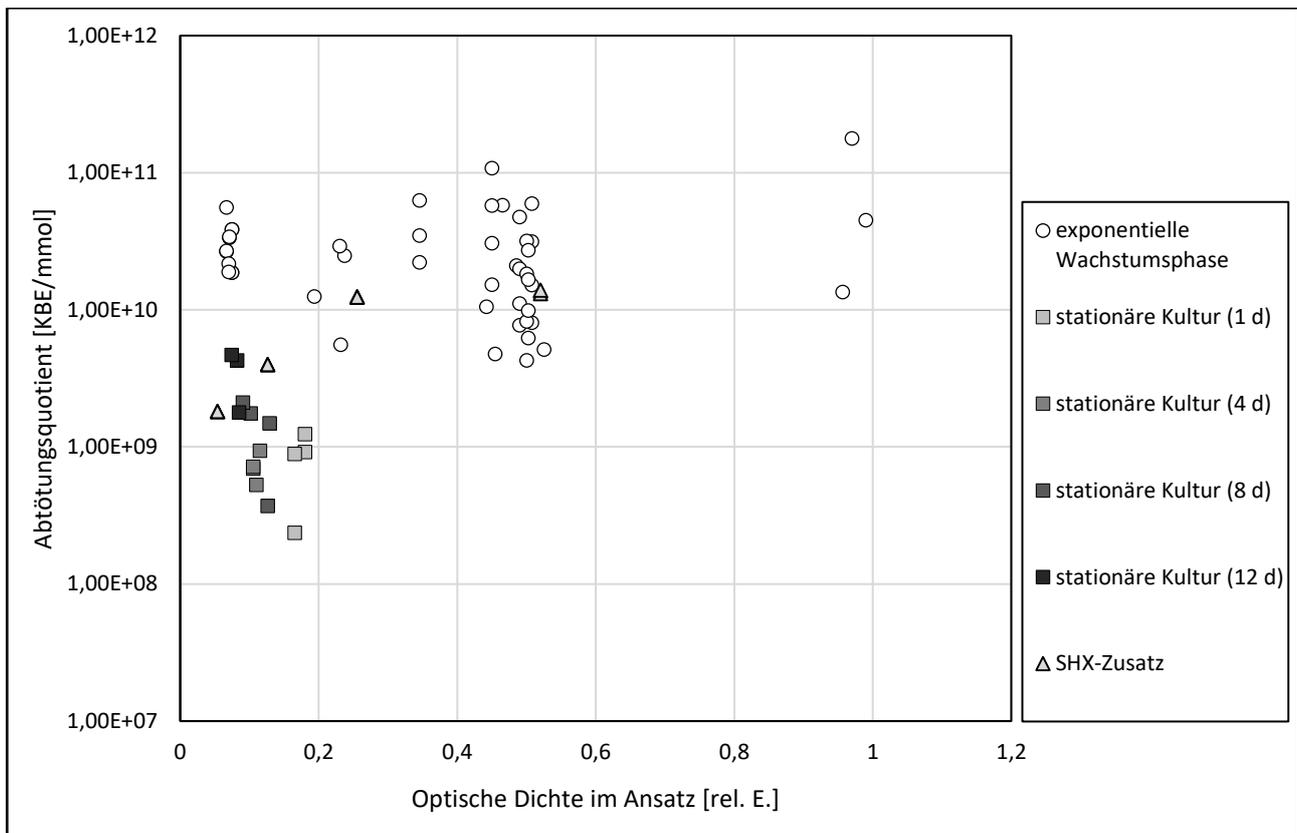
NGUYEN et al. (2011) lösten die stringente Kontrolle in *Pseudomonas aeruginosa* durch SHX-Zugabe aus. Dabei zeigten die Autoren, dass durch dieses Serinanalogon der Testkeim signifikant in seiner Vermehrung und in seinem Wachstum eingeschränkt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in dieser Arbeit anhand der Parameter Lebendzellzahl und Trübung beobachtet. Ferner wiesen KHAKIMOVA et al. (2013) die durch die stringente Antwort ausgeübte Regulation der Katalase in *Pseudomonas aeruginosa* nach. In dieser Regulation sahen die Autoren hauptsächlich den Grund für die erhöhte Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen im stringent response gegenüber Wasserstoffperoxid und Antibiotika. So wurde auch in dieser Arbeit für die mit SHX inkubierten Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 eine höhere spezifische Katalaseaktivität nachgewiesen als für die korrespondierenden Kontrollansätze. *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen, die bis zu

20 Tage unter Nährstoffmangel inkubiert wurden, hatten im Vergleich zu den Ansätzen am Start der Inkubation eine ähnlich hohe Katalasevolumenaktivität. Aufgrund abnehmender Lebendzellzahl und Zellmasse bzw. Proteinmenge stieg dagegen die spezifische Katalaseaktivität über die gesamte Inkubationsdauer an. Das Ausmaß dieses Anstiegs der spezifischen Katalaseaktivität übertraf allerdings die durch SHX-Zugabe provozierte Zunahme der spezifischen Katalaseaktivität. Grund hierfür waren einerseits die Kürze der Inkubationsdauer nach SHX-Zusatz bei der Betrachtung ähnlicher Ansätze (NGUYEN et al. (2011)) und andererseits die zusätzlich spoT katalysierte Produktion von Guanosinpentaphosphat bei unter Nährstofflimitierung inkubierten Ansätzen (UNDEN (2014)).

### 5.3.2 Erhöhte Resistenz von lang inkubierten Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 gegenüber Wasserstoffperoxid

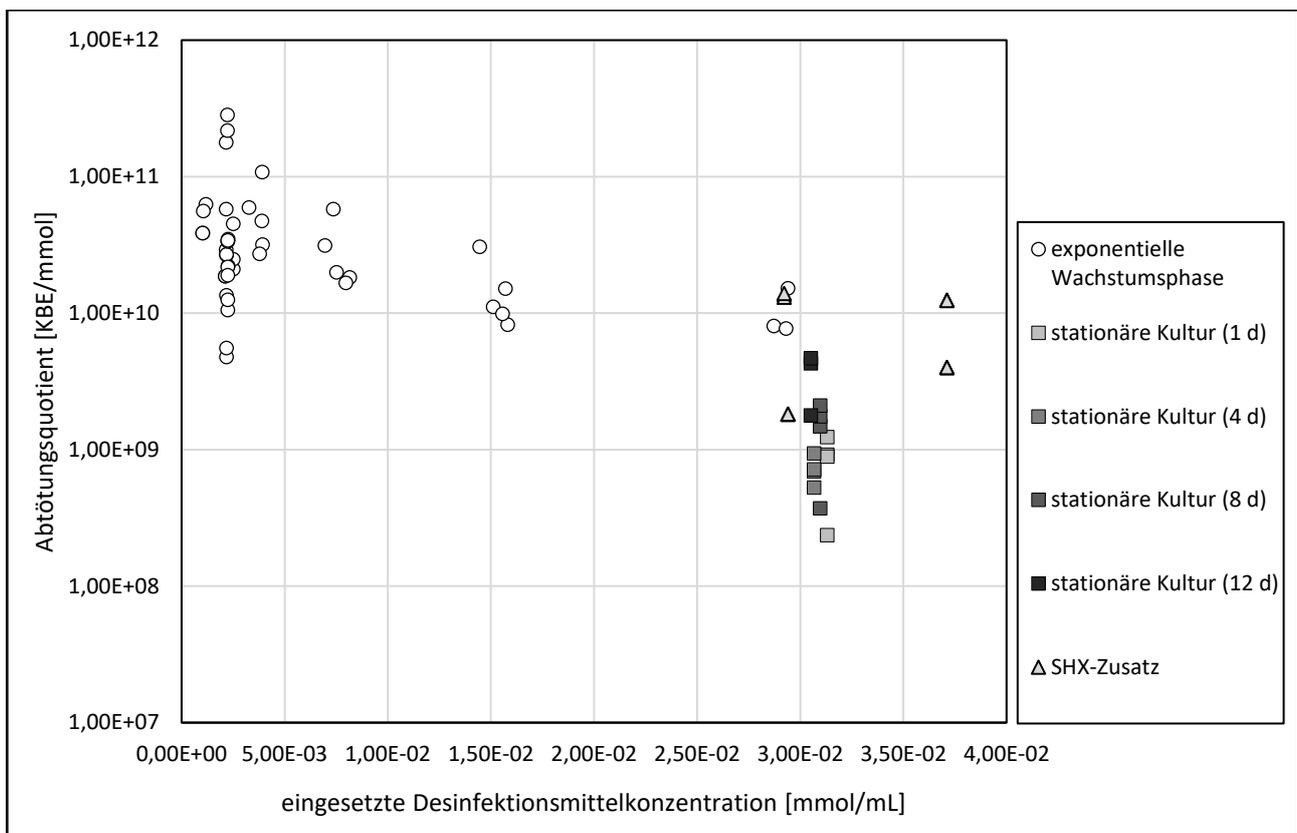
Für die Beurteilung der Effektivität der Desinfektion wurde als Prüfgröße in dieser Arbeit der Abtötungsquotient etabliert. Es wurde definiert als der Quotient aus der absoluten Anzahl der abgetöteten Zellen [KBE] und dem dafür benötigten Verbrauch an Wasserstoffperoxid [mmol]. Dadurch wurde die keimreduzierende Wirkung des Desinfektionsmittels nicht nur auf die Anfangskonzentration bezogen, sondern auf den absoluten Verbrauch während der einstündigen Inkubation. LAMBERT und JOHNSTON (2000) wiesen in ihrer Veröffentlichung darauf hin, dass mit zunehmender Inkubationsdauer die Konzentration des Desinfektionsmittels aufgrund intrinsischer und extrinsischer Faktoren abnahm. Damit verringerte sich im Desinfektionsansatz für noch nicht kritisch getroffene Keime (PARDEY et al. (2005)) die Absterbewahrscheinlichkeit. Bei kurzen Inkubationen wirkt dagegen auf die zu desinfizierenden Keime eine Wirkkonzentration, die annähernd der Anfangskonzentration des Entkeimungsmittels entspricht. Dadurch wird das Desinfektionsmittel in seiner keimreduzierenden Eigenschaft automatisch überbewertet, sofern es innerhalb der kurzen Inkubationsdauer keine vollständige Abtötung des Testkeims erzielt. Bei einer langen Inkubationsdauer reagiert das Desinfektionsmittel Wasserstoffperoxid nahezu vollständig ab und erreicht so für die Prüfsuspension seine absolute desinfizierende Wirkung. Der Suspensionstest, der routinemäßig für die Beurteilung der keimreduzierenden Eigenschaft eines Desinfektionsmittels eingesetzt wird, erlaubt sogar eine Prüfdauer von bis zu einer Stunde (DIN EN 1276:2010-01).

Durch die hohe Desinfektionsdauer wurde ein zusätzlicher Nebeneffekt provoziert. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg mit abnehmender Wasserstoffperoxidkonzentration der Anteil an toten Bakterien und VBNC-Zellen an der Gesamtpopulation. JOHNSTON et al. (2000) zeigten bei der Entkeimung von *Staphylococcus aureus* mit Natriumdodecylsulfat die inhibierende Wirkung bereits abgetöteter Zellen auf die Desinfektionsleistung des eingesetzten Tensids.



**Abbildung 59: Abtötungsquotient für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der optischen Dichte**

Sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Suspensionen wurden in phosphatgepufferter Salzlösung unterschiedlich lang (0 - 12 d) bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Parallel wurden Ansätze bis zur exponentiellen Wachstumsphase mit SHX inkubiert und dann in phosphatgepufferter Salzlösung resuspendiert. Anschließend wurden die Kulturen mit Wasserstoffperoxid desinfiziert. Die Desinfektionswirkung wurde anhand des Rückganges der Lebendzellzahl und des Verbrauches an Wasserstoffperoxid beurteilt. Dargestellt ist demnach der Abtötungsquotient [KBE/mmol] für *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Kulturen in Abhängigkeit von der optischen Dichte [rel. E.] der Desinfektionsansätze und der vorherigen Inkubationsdauer der Testsuspensionen. Der Abtötungsquotient ist definiert als die reduzierte Anzahl an Zellen [KBE] durch den dafür benötigten Verbrauch an Wasserstoffperoxid [mmol].



**Abbildung 60: Abtötungsquotient für *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in Abhängigkeit von der eingesetzten Desinfektionsmittelkonzentration**

Abweichend zur Abbildung 60 wurden die Abtötungsquotienten [KBE/mmoll] derselben Proben gegen die Anfangskonzentration des Wasserstoffperoxids im Desinfektionsansatz aufgetragen.

Bei der Auftragung der Abtötungsquotienten in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration oder der Trübung des Desinfektionsansatzes zeigten sich die Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1, die unter Nährstofflimitierung kultiviert wurden, resistenter als die korrespondierenden Ansätze, die Zellen enthielten, die in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Mittels des Parameters Trübung wurden auch tote Zellen im Ansatz erfasst. Tote Zellen können nach JOHNSTON et al. (2000) eine protektive Wirkung entfalten.

Die erhöhte Resistenz von lang inkubierten Kulturen beruhte demnach auf zwei unabhängigen Prozessen. Durch die Anwesenheit von Zellfragmenten im Ansatz wurde die aktive Konzentration von Wasserstoffperoxid, die auf eine vitale Einzelzelle wirkte, reduziert. Dies zeigte sich im Vergleich des Desinfektionserfolges von Wasserstoffperoxid bei Kulturen mit ähnlicher Trübung, die nur Zellen in der exponentiellen Phase enthielten.

Unabhängig davon entwickelte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 eine höhere spezifische Katalaseaktivität, wenn dieser Keim ausgehungert wurde. Die mit SHX angezogenen Zellansätze erwiesen sich allerdings nur geringfügig resistenter gegenüber Wasserstoffperoxid. Diese Zellen hatten im Vergleich zu Zellen, die nicht mit SHX inkubiert wurden, nur eine ca. um 30 % höhere spezifische Katalaseaktivität. Tatsächlich ausgehungerte Zellen hatten dagegen eine bis zu vierfach so hohe spezifische Katalaseaktivität.

Beide Phänomene hatten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Persistenz bzw. Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* WR1. In einem direkten Vergleich war der Schutz durch den Quenching-Effekt, den die bereits abgetöteten Zellen verursachten, größer als die protektive Wirkung, die eine höhere Katalaseaktivität erreichte. Dies zeigte sich anhand der Desinfektion der SHX-Zellen. JOHNSTON et al. (2000) wiesen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass nicht die einzelne Zelle mit Wasserstoff reagiert, sondern die einzelnen Zellbestandteile. Bei einer genügend hohen Anzahl toter Zellen verschob sich demnach das Konzentrationsverhältnis von Wasserstoffperoxid und den Verbindungen, die mit Wasserstoffperoxid reagierten, zugunsten der Verbindungen. Bauten

stoffwechsel-aktive Zellen die in der Kultur erhaltenen Zellfragmente ab, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wurde automatisch die Gesamtpopulation anfälliger für oxidativ wirkende Substanzen. Gleichzeitig prägten die neu vermehrten Zellen keine erhöhte Katalaseaktivität aus. Auch dieser Umstand wurde in dieser Arbeit gezeigt. Für die nur einmal desinfizierten Ansätze wurden relativ niedrige Abtötungsquotienten ermittelt. Dagegen waren die zweifach desinfizierten Ansätze sogar anfälliger für Wasserstoffperoxid. MASCHER et al. (2000) beschrieben in diesem Zusammenhang, dass *Pseudomonas fluorescens*-Zellen, die mittels Antibiotikagabe in den VBNC-Zustand überführt wurden, ebenfalls nicht persistenter wurden. Dagegen sahen OLIVER et al. (1991) einen Zusammenhang zwischen den Zellen von *Vibrio vulnificus* im ausgehungerten Zustand und im VBNC-Zustand. Die Autoren wiesen für beide Zelltypen ähnliche persistente Eigenschaften nach. Als Ursache für die erhöhte Beständigkeit der bakteriellen Zelle gegen ungünstige Inkubationstemperaturen wurden funktionale Proteine genannt, die im stringent response gebildet wurden und den VBNC-Zustand ebenfalls auslösten.

### 5.3.3 Induktion der Pyruvatproduktion als erster Abwehrmechanismus

Nach einer Desinfektion mit Monochloramin in Heißwassersystemen eines Krankenhauses zeigten BARON et al. (2014), wie sich mit zunehmender Desinfektionsdauer die Zusammensetzung der mikrobiellen Belastung veränderte. Durch den zusätzlichen Selektionsdruck Monochloramin überlebten Keime mit einer höheren primären Resistenz oder mit einer besseren Besiedlungsstrategie. Pseudomonaden, *Acinetobacter* und *Rheinheimera* waren nach BECERRA-CASTRO et al. (2016) typische Beispiele für Rekontaminierer nach einer Desinfizierung.

Der Erwerb sekundärer Resistenzen infolge einer unzureichenden Desinfektion oder Antibiotikabehandlung wird als eine der größten Gefahren für die menschliche Gesundheit angenommen. Zahlreiche Autoren beschrieben die bakterielle Ausprägung neu erworbener Resistenzen gegen Antibiotika (NIKAIDO (1989), LECLEREQ und COURVALIN (1991), COLLIGNON und BELL (1996) und GOTTLIEB (1996)). Gegen den Konservierungsstoff Triclosan wurde ebenfalls eine bakterielle Überlebensstrategie dokumentiert (LEVY (1998)).

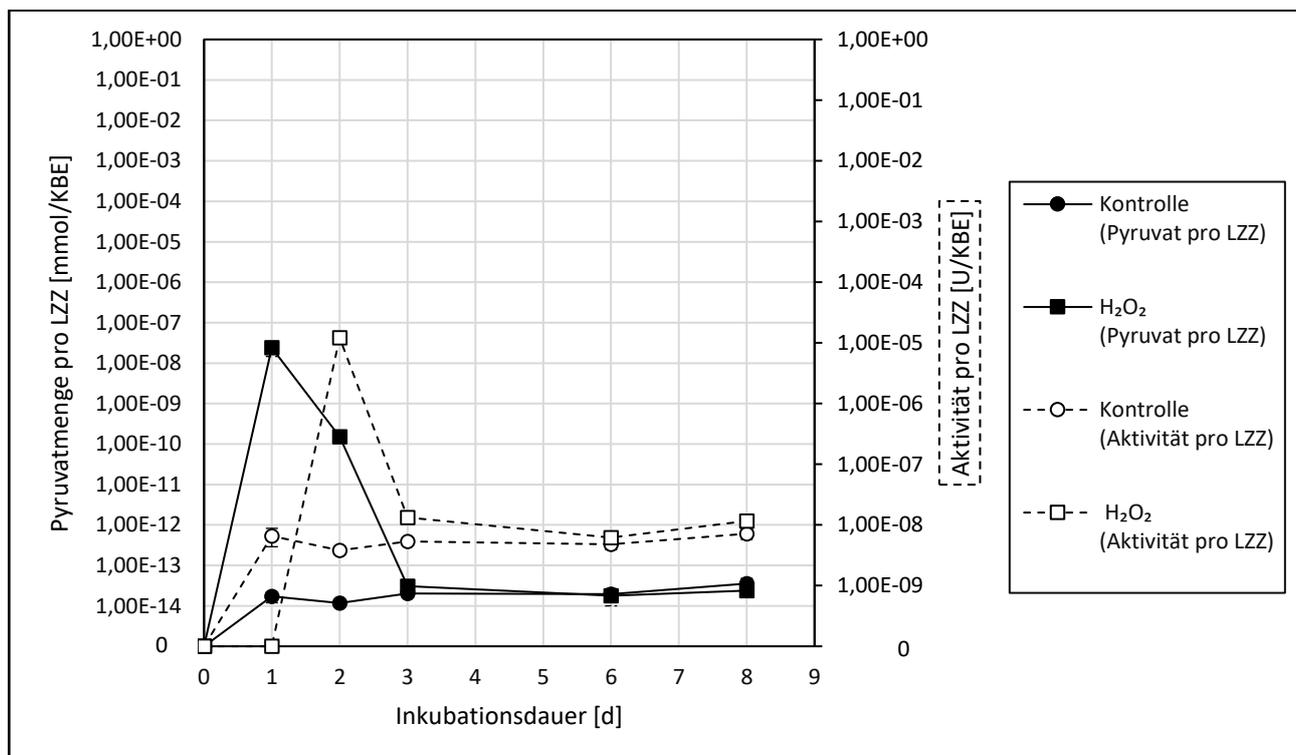
In dieser Arbeit wurde dagegen gezeigt, dass Zellkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung sich nach Langzeitinkubation bei einer erneuten Desinfektion mit dem gleichen Entkeimungsmittel nicht als resistenter erwiesen. Ähnliches bestätigten bereits LAKKIS und FLEISZIG (2001). Die Autoren desinfizierten in einem vergleichbaren Versuchsdesign mehrere *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme mit Spüllösungen für Kontaktlinsen.

Als Ursache für einen Resistenzmangel können im Wesentlichen zwei Gründe herangezogen werden. Der größte Anteil an der Zellpopulation wurde bei der ersten Desinfektion abgetötet. Während der Inkubation reagierte Wasserstoffperoxid völlig ab und die überlebten Zellen vermehrten sich in Wasserstoffperoxid freier Umgebung. VBNC-Zellen wurden unter diesen Bedingungen nicht gebildet. Dieser Umstand wurde in dieser Arbeit in einem Gegenversuch bestätigt. Die mit dem Desinfektionsmittel in Kontakt gebrachten Zellen waren dann in dieser neu gebildeten Mischpopulation unterrepräsentiert und die sich neu vermehrten Bakterien bildeten unter diesen Wachstumsbedingungen keine Resistenz aus. Eine höhere spezifische Katalaseaktivität und damit eine höhere Resistenz gegen Wasserstoffperoxid zeigte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 erst nach achttägiger Inkubation unter oligotrophen Bedingungen. In zwei unabhängigen Versuchen wurde dies in dieser Arbeit gezeigt (vgl. dazu die Kontrollproben unter Punkt 4.8). Bei viertägiger Bebrütung nahm die spezifische Aktivität sogar ab.

Eine bakterielle Adaption an oxidativen Stress kann auch nur temporär erfolgen und so nach einer Langzeit-inkubation nicht mehr nachgewiesen werden. Den Umstand erhärten die Ergebnisse von ALONSO et al. (2004). Die Verfasser dieser Studie untersuchten den Einfluss einer Desinfektion mit Ozon oder UV-Strahlung auf den bakteriellen Status von Abwässern innerhalb eines Zeitraumes von bis zu einem Monat. Bei wiederholter Desinfektion hatten trotz zeitlichen Abstandes Sulfid reduzierende Clostridien, pathogene Pilze und Fadenwürmer eine höhere Resistenz gegen UV-

Strahlung oder Ozonbehandlung. Dagegen konnten *Pseudomonas* mittels der beiden Desinfektionstechnologien weiterhin signifikant eliminiert werden.

Um abschließend klären zu können, ob *Pseudomonas aeruginosa* WR1 einen kurzfristigen Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress ausprägte, wurde Mineralmedium mit Wasserstoffperoxid versetzt und mit geringeren Inokula des Testkeimes beimpft. In einem Vorversuch wurden zuvor die Parameter bestimmt, mit denen sichergestellt wurde, dass einerseits die Zellen bei Beimpfung des Mineralmediums nicht vollständig abgetötet wurden und andererseits das im Medium enthaltene Wasserstoffperoxid nicht sofort vollständig abreagierte. Trotz signifikant geringer Lebendzellzahlen hatten die Zellkulturen, die mit Wasserstoffperoxid versetzt wurden, eine vergleichbare Katalasevolumenaktivität und eine Pyruvatmenge in das Medium abgegeben wie die korrespondierenden Kontrollansätze. Diese Messgrößen wurden aus Darstellungsgründen aufgrund des geringen Zellmaterials auf die Lebendzellzahl (LZZ) als Bezugsgröße bezogen.



**Abbildung 61: Katalaseaktivität und Pyruvatmenge pro Lebendzellzahl der *Pseudomonas aeruginosa* WR1-Zellkulturen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid**

Der Versuch ist bereits unter Abbildung 56 beschrieben. In 4 parallelen Ansätzen wurde Mineralmedium mit Wasserstoffperoxid versetzt, mit *Pseudomonas aeruginosa* WR1 angeimpft und bei 37 °C inkubiert (Quadrat). Als Kontrolle (Kreis) dienen 4 Ansätze, die nicht mit Wasserstoffperoxid versetzt wurden. Dargestellt sind der Quotient [mmol/KBE] (schwarz) aus der in Abbildung 57 dargestellten Pyruvatmenge [mmol/mL] und der in Abbildung 56 dargestellten Lebendzellzahl (LZZ) [KBE/mL] und der Quotient [U/KBE] (weiß) aus der in Abbildung 58 dargestellten Katalasevolumenaktivität [U/mL] und der in Abbildung 56 gezeigten Lebendzellzahl (LZZ) [KBE/mL] in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [d] der unterschiedlichen Zellkulturen. Der Fehlerbalken kennzeichnet die einfache Standardabweichung um den Mittelwert.

Als kurzfristigen Schutz vor oxidativem Stress sekretierte *Pseudomonas aeruginosa* WR1 verstärkt Pyruvat ins Medium. In einem zweiten Schritt wurde eine erhöhte Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl nachgewiesen. Mit Verschwinden des Lethalfaktors Wasserstoffperoxid und zunehmender Zellzahl wurden für die unterschiedlichen Ansatztypen ähnliche Ergebnisse für den Pyruvatgehalt und die Katalaseaktivität erhalten. BIGNUCOLO et al. (2013) wiesen bei vergleichbaren Versuchsparametern nach, dass *Pseudomonas fluorescens* bei durch Wasserstoffperoxid induzierten Stress auch verstärkt Pyruvat bildete. Den Einfluss oxidativen Stress auf den bakteriellen Stoffwechsel beschrieben beispielsweise SINHG et al. (2007). Die Autoren stellten eine verstärkte Produktion von NADPH und eine reduzierte Bildung von NADH in *Pseudomonas*

---

*fluorescens* fest. MAILLOUX et al. (2009) wiesen für  $\alpha$ -Ketoglutarat eine protektive Wirkung vor oxidativen Stress aufgrund seiner ROS inhibierenden Wirkung nach und beschrieben, dass die Enzyme, die dieses Stoffwechselprodukt zu- bzw. abführten, entsprechend reguliert wurden.

*Pseudomonas aeruginosa* besitzt eine hohe spezifische Katalaseaktivität (HASSAN und FRIDOVICH (1980) und HASSETT et al. (1992)). Neben dem Schlüsselenzym KatA übernehmen in diesem Organismus die Katalase KatB und die Mangan abhängige Superoxiddismutase (Mn-SOD) eine Schutzfunktion vor oxidativem Stress. Zahlreiche Isoenzyme der Katalase sind in *Pseudomonas aeruginosa* oder in *Pseudomonas syringae* beschrieben (HASSETT et al. (1992) und BROWN et al. (1995)). Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann die Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* extrinsisch erhöht werden. BROWN et al. (1995) wiesen nach, dass die verstärkte Produktion von KatB durch Wasserstoffperoxid induziert wurde. FREDERICK et al. (2001) maximierten beispielsweise die Katalaseaktivität in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen mittels FeCl<sub>3</sub>-Zusatz.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie *Pseudomonas aeruginosa* WR1 in den VBNC-Zustand überführt werden konnte. Der VBNC-Zustand in *Pseudomonas aeruginosa* ist für die Forschung von besonderem Interesse, weil dieser Keim als ein gefährlicher humanpathogener Keim gilt, der aufgrund geringer Nahrungsansprüche ubiquitär vorkommt (RINGEN und DRAKE (1952) und YUNIS (1980)). Bakterien in diesem Zustand behalten entweder ihre Virulenz oder sie erhalten diese nach Vermehrung wieder zurück. Andererseits erwiesen sich Zellen im VBNC-Zustand als besonders resistent gegenüber Desinfektionsmaßnahmen bzw. Immunantworten (RAMA-MURTHY et al. (2014)).

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 musste durch einen mehrstufigen Prozess in den VBNC-Zustand überführt werden. Aufgrund seiner geringen Nahrungsansprüche reichte eine Langzeitinkubation in nährstoffarmer Umgebung nicht als Induktor des VBNC-Zustandes aus. Als zusätzlicher Lethalfaktor wurde Wasserstoffperoxid eingesetzt. In Vorversuchen wurde zunächst ein geeignetes Verhältnis zwischen Ausgangszellzahl und Anfangskonzentration des Desinfektionsmittels bestimmt, in dem Wasserstoffperoxid nicht die gesamte Zellpopulation einer definierten Suspension von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ( $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \text{ g/L}$  bei einer Suspension mit  $\text{OD}_{546} = 0,5$ ) inaktivierte.

Der Nachweis des VBNC-Zustandes erfolgte über den relativen Vergleich der Wiederfindungsraten, die durch zwei unterschiedliche Verfahren bestimmt wurden. Neben der klassischen auf Kultivierung basierenden Quantifizierung wurde der bakterielle Zustand der Suspensionen, die VBNC-Zellen enthielten, mittels des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits bestimmt. Diese Vitalfärbung mittels SYTO 9 und Propidiumiodid erwies sich in Vorversuchen aufgrund der leichteren Durchführbarkeit, dem geringeren zeitlichen Aufwand und auch aufgrund der höheren ermittelten Wiederfindungen gegenüber der Vitalfärbung mittels CTC als überlegen.

In einem Gegenversuch wurde die Anwesenheit von VBNC-Zellen im Desinfektionsansatz durch eine Resuszipation mit Pyruvat nachgewiesen. In Abhängigkeit vom Kulturalter wurden durch die Supplementierung mit Pyruvat zu den für die Quantifizierung eingesetzten Nährböden ca. 50 % bis 200 % mehr Zellen wiedergefunden als bei den korrespondierenden Kontrollansätzen.

Die Rolle des Pyruvats als Resuszipationsmittel wurde untersucht. Als zentraler Metabolit fungierte es als hervorragender Energieträger und als Inaktivator reaktiver Sauerstoffspezies.

*Pseudomonas aeruginosa* WR1 entwickelte verstärkt Abwehrmechanismen, wenn dieser Keim in einer Umgebung mit Wasserstoffperoxid sich vermehren musste. *Pseudomonas aeruginosa* WR1 sekretierte mehr Pyruvat ins Medium als die korrespondierenden Kontrollansätze und es wurde bei den mit Wasserstoffperoxid versetzten Proben auch eine erhöhte Katalaseaktivität pro Zelle beobachtet.

Die Katalaseaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 ist hauptverantwortlich für die Resistenz dieses Keimes gegenüber Wasserstoffperoxid. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit zunehmender Inkubationsdauer unter Nährstofflimitierung die spezifische Katalaseaktivität anstieg. Durch Inkubation mit SHX wurde in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 die spezifische Katalaseaktivität und die Aktivität pro Zelle ebenfalls erhöht.

In Zellen, die zuvor mit SHX künstlich ausgehungert wurden, wurde durch eine anschließende Desinfektion mit Wasserstoffperoxid der VBNC-Zustand induziert. Der Nachweis erfolgte wie bereits beschrieben durch Resuszipation, die durch Pyruvatsupplementierung zu den Nährböden erreicht wurde.

## 7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Induktion des VBNC-Zustandes in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 multifaktoriell ablief (vgl. dazu GAUTHIER (2000)). Die Induktion des VBNC-Zustandes war dabei von den keimspezifischen Eigenschaften abhängig bzw. von den Abwehrmechanismen, die der Testkeim gegen die eingesetzten Lethalfaktoren besitzt. Diese Beobachtungen deckten sich mit der von BOGOSIAN und BOURNEUF (2001) beschriebenen Annahme, dass der VBNC-Zustand die Folge einer Akkumulation negativer Umweltfaktoren ist, die Bakterien in ihrer Vermehrung beeinträchtigen. Weitere Rahmenparameter, die die Kultivierbarkeit von Zellen beeinflussen können, müssen entdeckt und beschrieben werden. Für die Beurteilung der desinfizierenden Eigenschaften von Prüfsubstanzen wird nach heutigem Forschungsstand der Suspensionstest nach DIN EN 1276:2010-01 durchgeführt. Solche nur auf Kultivierung basierende Verfahren erfassen definitionsgemäß keine VBNC-Zellen. Diese standardisierten Methoden müssen in Hinblick auf ihre Aussagekraft des bakteriellen Zustandes optimiert oder ergänzt werden. RAMALHO et al. (2001) schlagen beispielsweise vor, dass Selektivmedien zur Quantifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* FeSO<sub>4</sub> zugesetzt werden soll.

Weitere Überlebensstrategien in *Pseudomonas aeruginosa* WR1 müssen entdeckt und untersucht werden. D.h. die explizite intrinsische Abwehr, die Bakterien gegen überlebensfeindliche Umwelteinflüsse besitzen, kann demnach maßgeblich darüber entscheiden, ob Zellen soweit geschädigt werden, dass sie entweder aktiv oder passiv den VBNC-Zustand annehmen. In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an KHAKIMOVA et al. (2013) gezeigt, dass eine Nährstofflimitierung mit einer höheren spezifischen Katalaseaktivität beantwortet wird. Außerdem sekretierte *Pseudomonas aeruginosa* WR1, wenn dieses Bakterium bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid sich vermehren musste, verstärkt Pyruvat als ROS-Fänger ins Medium ab (vgl. dazu BIGNUCOLO et al. (2013)).

Die Induktion des VBNC-Zustand muss nicht zwingend nur durch einen als Lethalfaktor wirkenden Umwelteinfluss erfolgen. Durch diesen wahrscheinlich multifaktoriell ablaufenden Prozess kann auch erklärt werden, warum für das Vorkommen einiger Bakterien in komplexen Matrices widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht wurden. COLWELL et al. (1996) infizierten in einer Humanstudie Freiwillige mit VBNC-Zellen von *Vibrio cholerae*. Bei nur einem Patienten wurden die klinischen Symptome der Cholera beobachtet, obwohl im Stuhl aller Probanden vermehrungsfähige *Vibrio cholerae*-Zellen entdeckt wurden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen müssen viele Untersuchungen, die den bakteriellen Zustand nur durch Kultivierung beurteilten, neu interpretiert werden. Die Gefahr, die tatsächliche Zelldichte durch die Anwesenheit von VBNC-Zellen zu unterschätzen, ist damit allgegenwärtig.

Auch der Mechanismus, mit dem eine Resuszipitation in einem Bakterium durchgesetzt wird, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (OLIVER (2010)). Das zentrale Stoffwechselprodukt Pyruvat nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderrolle ein. Diese Verbindung kann mehrere Funktionen erfüllen, durch die eine Wiederkultivierbarkeit von VBNC-Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 erreicht wurde. Ähnlich der Induktion konnte die Elimination des VBNC-Zustandes multifaktoriell ablaufen. In dieser Arbeit konnte nicht angemessen aufgeklärt werden, ob Pyruvat auch als Signalmolekül fungierte (vgl. dazu MUKAMOLOVA et al. (1998)), durch das eine Resuszipitation erreicht wurde.

## 8 Anhang

Im Folgenden dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Berechnungen und Formeln.

a. Formeln (Statistik) nach PRUSCHA und ROST (2008))

Der Mittelwert fasst die ermittelten Einzelwerte bzw. Zwischenergebnisse in ein Endergebnis zusammen. Der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung  $s$  wurden berechnet nach

**Formel 11: Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung**

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

und

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

mit  $n$  als die Anzahl der einzelnen Messwerte und

$x_i$  als der Wert des Einzelmesswertes

b. Analytische Größe

Nach PAETZ (2011) beschreibt der allgemeine Begriff „Wiederfindungsrate“ bzw. „Wiederfindung“ die geschätzte Zahl an bestimmten Partikeln in einer Untersuchungsmenge oder Probe mit der Vorstellung, dass eine wahre (aber unbekannte) Partikelzahl existiert, von der 100 % oder weniger durch das Nachweissystem „wiedergefunden“ werden. Sie wurde folgendermaßen berechnet.

**Formel 12: Berechnung der Wiederfindungsrate**

$$WF = \frac{\text{praktisch ermittelte Anzahl (KBE)}}{\text{theoretische Anzahl (KBE)}} \cdot 100 \%$$

c. Messwerte

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Messwerte wurden in digitaler Form als Anhang (CD) beigefügt.

## 9 Literaturverzeichnis

Aufgelistet sind die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten und zitierten Quellen.

### Beitrag:

Cashel, M.; Gentry, D. R.; Hernandez, V. J.; Vinella D. (1996): The stringent response. In: F. C. Neidhardt, R. III. Curtiss, J. L. Ingraham, E.C.C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, (Hg.): *Escherichia coli* and *Salmonella*. cellular and molecular biology. 2. Aufl. Washington, DC: American Society for Microbiology Press (1), S. 1458–1496.

Gauthier, M. J. (2000): Environmental Parameters Associated with the Viable but Nonculturable State. In: R. R. Colwell und D. J. Grimes (Hg.): Nonculturable Microorganisms in the Environment. Boston, MA: Springer US, S. 87–112.

Gordon, G.; Kieffer, R. G.; Rosenblatt, D. H. (1972): The Chemistry of Chlorine Dioxide. In: S. J. Lippard (Hg.): Progress in inorganic chemistry. Volume 15, Bd. 15. New York, N.Y: Wiley (Progress in Inorganic Chemistry), S. 201–286.

Lamprecht, W.; Heinz, F. (1985): Pyruvate. In: H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer und M. Gabi (Hg.): Methods of Enzymatic Analysis. 3. Aufl. New York: Academic Press (6), S. 570–577.

Oliver, J. D. (1993): Formation of Viable but Nonculturable Cells. In: S. Kjelleberg (Hg.): Starvation in bacteria. New York: Plenum Press, S. 239–272.

Uden, G. (2014): Regulation des Stoffwechsels und des Zellaufbaus von Bakterien. Stringente Kontrolle und Kopplung von Anabolismus und Katabolismus. In: G. Fuchs, H-G. Schlegel und T. Eitinger (Hg.): Allgemeine Mikrobiologie. 9., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, S. 514–515.

### Buch (Monographie):

Oltmanns, R. (1999): Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung von Mikroorganismen. Hamburg: Diplom.de.

Paetz, A. (2011): Wörterbuch Umweltuntersuchung. Begriffe, Definitionen und Erläuterungen aus den Bereichen Abfall, Boden, Wasser. Weinheim: Wiley-VCH Verl.

Pruscha, H.; Rost, D. (2008): Mathematik für Naturwissenschaftler. Methoden, Anwendungen, Programmcodes. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).

### Buch (Sammelwerk):

Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Gabi, M. (Hg.) (1985): Methods of Enzymatic Analysis. 3. Aufl. New York: Academic Press (6).

Colwell, R. R.; Grimes, D. J. (Hg.) (2000): Nonculturable Microorganisms in the Environment. Boston, MA: Springer US.

Fuchs, G.; Schlegel, H-G.; Eitinger, T. (Hg.) (2014): Allgemeine Mikrobiologie. 9., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Kjelleberg, S. (Hg.) (1993): Starvation in bacteria. New York: Plenum Press.

Lippard, S. J. (Hg.) (1972): Progress in inorganic chemistry. Volume 15. New York, N.Y: Wiley (Progress in Inorganic Chemistry).

Neidhardt, F. C., Curtiss R., III, Ingraham, J. L., Lin, E.C.C., Low, K. B., Magasanik, B. (Hg.) (1996): *Escherichia coli* and *Salmonella*. cellular and molecular biology. 2. Aufl. Washington, DC: American Society for Microbiology Press (1).

#### Gesetz / Verordnung:

Bundesministerium für Gesundheit (21.05.2001): Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. TrinkwV 2001, vom 10.03.2016. Fundstelle: 2126-13-1. In: *BGBl. I* 2016 (12), S. 459–460.

#### Graue Literatur/ Bericht/ Report:

Eisenbahn-Bundesamt (2013): Reinigung und Desinfektion von Trinkwasserverteilungs- und Trinkwasserspeichersystemen in Schienenfahrzeugen und ortsfesten sowie mobilen Trinkwasser-Befüllungsanlagen. Eisenbahn-Bundesamt.

Joyner, D. C. (2015): Protocol for LIVE/DEAD Staining. Lawrence Berkeley National Laboratory. Berkeley, Kalifornien. Online verfügbar unter [http://nature.berkeley.edu/soilmicro/methods/live\\_dead.PDF](http://nature.berkeley.edu/soilmicro/methods/live_dead.PDF).

Küke, F. (2001): Sichere Desinfektion von Trinkwasser und Möglichkeiten der Tränkwasserdesinfektion. Hg. v. F. Küke. Dr. Küke GmbH. Hannover.

Umweltbundesamt (2015): Bekanntmachung der Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 der Trinkwasserverordnung. Umweltbundesamt (18).

Wricke, B. (2013): Reinigung und Desinfektion von Trinkwasser-Installationen. Das neue DVGW-Arbeitsblatt W 557. Hg. v. DVGW energie|wasser-praxis. DVGW-Technologiezentrum Wasser. Karlsruhe/Dresden.

#### Hochschulschrift:

Czirr, J. (2013): Keimreduzierung in Wassersystemen mit Chlordioxid. Abschlussarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker/innen. Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal. Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie.

Gerharz, T. (2003): Pyruvat-Produktion durch acetatauxotrophe *Escherichia coli* - Stämme. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.

Hensel, V. (2012): Einfluss abiotischer Umweltfaktoren auf das Überleben von Problemkeimen auf Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen zur Klärung von möglichen Gefahren. Diplomarbeit. Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal. Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie.

Hübel, L. (2013): Keimreduzierung in Biofilmen. Abschlussarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker/innen. Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal. Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie.

Hübenbecker, P. (2010): Untersuchung zur Entstehung von Desinfektionsnebenprodukten bei der Aufbereitung von Trinkwasser an Bord schwimmender Marineeinheiten unter Anwendungsbedingungen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit.

Leßing, F. (2008): Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Stresstoleranz von *Aspergillus fumigatus* bei der Interaktion mit Immuneffektorzellen. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena. Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät.

Linke, S. (2012): Untersuchungen zur erhöhten Toleranz von biofilmassoziierten Mikroorganismen und die Ausbildung von vbnc-Zuständen bei *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber chlorabspaltenden Verbindungen. Dissertation. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.

Muranyi, P. (2008): Einsatz eines Atmosphärendruckplasmas zur Entkeimung von lebensmittelrelevanten Verpackungen aus Kunststoff. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik

#### Internetdokument:

Behler, A.; Gänzle, M. (2007): Desinfektion. Hg. v. U. Bornscheuer, W. Streit, B. Dill, F. Böckler, A. Kirschning, G. Eisenbrand, et al. Römpp Enzyklopädie Online. Stuttgart. Online verfügbar unter <http://www.roempp.com>, zuletzt aktualisiert im Dezember 2007.

#### Norm:

DIN 10161-1:1984-02: Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C Spatel- und Plattengußverfahren (Referenzverfahren).

DIN EN ISO 16266:2008-05: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* – Membranfiltrationsverfahren.

DIN EN ISO 11731:2008-06: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen – Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl.

DIN EN 1276:2010-01: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1).

## Zeitschriftenaufsatz:

Abbas, H. A. (2015): Inhibition of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Diclofenac Sodium. In: *Rumanian Archives of Microbiology and Immunology* 74 (3-4), S. 79–85.

Ader, F.; Le Berre, R.; Faure, K.; Gosset, P.; Epaulard, O.; Toussaint, B. et al. (2005): Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. In: *Infection and Immunity* 73 (7), S. 4263–4271.

Aertsen, A.; Michiels, C. W. (2004): Stress and how bacteria cope with death and survival. In: *Critical Reviews in Microbiology* 30 (4), S. 263–273.

Alhasawi, A.; Thomas, S. C.; Appanna, V. D. (2016): Metabolic networks to generate pyruvate, PEP and ATP from glycerol in *Pseudomonas fluorescens*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 85, S. 51–56.

Allen-Austin, D.; Austin, B.; Colwell, R. R. (1984): Survival of *Aeromonas salmonicida* in river water. In: *FEMS Microbiology Letters* 21 (2), S. 143–146.

Alleron, L.; Khemiri, A.; Koubar, M.; Lacombe, C.; Coquet, L.; Cosette, P. et al. (2013): VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. In: *Water Research* 47 (17), S. 6606–6617.

Alleron, L.; Merlet, N.; Lacombe, C.; Frere, J. (2008): Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. In: *Current Microbiology* 57 (5), S. 497–502.

Alonso, E.; Santos, A.; Riesco, P. (2004): Micro-organism re-growth in wastewater disinfected by UV radiation and ozone: a micro-biological study. In: *Environmental Technology* 25 (4), S. 433–441.

al-Ssum, R. M. (1992): Incidence and level of exotoxin A in proteolytic cell-free cultures of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. In: *Microbiologica* 15 (4), S. 355–359.

Amarita, F.; Requena, T.; Taborda, G.; Amigo, L.; Pelaez, C. (2001): *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. In: *Journal of Applied Microbiology* 90 (6), S. 971–978.

Arana, I.; Muela, A.; Orruno, M.; Seco, C.; Garaizabal, I.; Barcina, I. (2010): Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Ecology* 74 (3), S. 500–509.

Arana, I.; Orruno, M.; Perez-Pascual, D.; Seco, C.; Muela, A.; Barcina, I. (2007): Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. In: *FEMS Microbiology Ecology* 62 (1), S. 1–11.

Argenta, A.; Satish, L.; Gallo, P.; Liu, F.; Kathju, S. (2016): Local Application of Probiotic Bacteria Prophylaxes against Sepsis and Death Resulting from Burn Wound Infection. In: *Public Library of Science One* 11 (10), e0165294.

- Artsimovitch, I.; Patlan, V.; Sekine, S-I.; Vassilyeva, M. N.; Hosaka, T.; Ochi, K. et al. (2004): Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. In: *Cell* 117 (3), S. 299–310.
- Ashkenazi-Hoffnung, L.; Ari, A.; Bilavsky, E.; Scheuerman, O.; Amir, J.; Prais, D. (2016): *Pseudomonas aeruginosa* identified as a key pathogen in hospitalized children with aspiration pneumonia and a high aspiration risk. In: *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 105 (12), e588-e592.
- Aumeran, C.; Paillard, C.; Robin, F.; Kanold, J.; Baud, O.; Bonnet, R. et al. (2007): *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. In: *The Journal of Hospital Infection* 65 (1), S. 47–53.
- Ayrapetyan, M.; Williams, T. C.; Oliver, J. D. (2014): Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. In: *Applied and Environmental Microbiology* 80 (8), S. 2478–2483.
- Bader, H.; Sturzenegger, V.; Hoigné, J. (1988): Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD). In: *Water Research* 22 (9), S. 1109–1115.
- Barker, M. M.; Gaal, T.; Gourse, R. L. (2001b): Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. In: *Journal of Molecular Biology* 305 (4), S. 689–702.
- Barker, M. M.; Gaal, T.; Josaitis, C. A.; Gourse, R. L. (2001a): Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. In: *Journal of Molecular Biology* 305 (4), S. 673–688.
- Baron, J. L.; Vikram, A.; Duda, S.; Stout, J. E.; Bibby, K. (2014): Shift in the Microbial Ecology of a hospital hot water system following the introduction of an on-site monochloramine disinfection system. In: *Public Library of Science One* 9 (7), e102679.
- Baysse, C.; Cullinane, M.; Denervaud, V.; Burrowes, E.; Dow, J. M.; Morrissey, J. P. et al. (2005): Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 8), S. 2529–2542.
- Becerra-Castro, C.; Macedo, G.; Silva, A. M. T.; Manaia, C. M.; Nunes, O. C. (2016): Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. In: *Science of the Total Environment* 573, S. 313–323.
- Bédard, E.; Charron, D.; Lalancette, C.; Deziel, E.; Prevost, M. (2014): Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. In: *FEMS Microbiology Letters* (2), S. 226–234.
- Beers, R. F., JR; Sizer, I. W. (1952): A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. In: *Journal of Biological Chemistry* 195 (1), S. 133–140.
- Bergmeyer, H. U. (1975): New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories (author's transl). In: *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie* 13 (11), S. 507–508.

- Besnard, V.; Federighi, M.; Cappelier, J. M. (2000a): Evidence of Viable But Non-Culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. In: *Food Microbiology* 17 (6), S. 697–704.
- Besnard, V.; Federighi, M.; Cappelier, J. M. (2000b): Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. In: *Letters in Applied Microbiology* 31 (1), S. 77–81.
- Besnard, V.; Federighi, M.; Declerq, E.; Jugiau, F.; Cappelier, J-M. (2002): Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. In: *Veterinary Research* 33 (4), S. 359–370.
- Bienert, G. P.; Møller, A. L. B.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Møller, I. M.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. (2007): Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2), S. 1183–1192.
- Bignucolo, A.; Appanna, V. P.; Thomas, S. C.; Auger, C.; Han, S.; Omri, A.; Appanna, V. D. (2013): Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: enhanced production of pyruvate. In: *Journal of Biotechnology* 167 (3), S. 309–315.
- Bogosian, G.; Aardema, N. D.; Bourneuf, E. V.; Morris, P. J.; O'Neil, J. P. (2000): Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. In: *Journal of Bacteriology* 182 (18), S. 5070–5075.
- Bogosian, G.; Bourneuf, E. V. (2001): A matter of bacterial life and death. In: *European Molecular Biology Organization Reports* 2 (9), S. 770–774.
- Bogosian, G.; Morris, P. J.; O'Neil, J. P. (1998): A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5), S. 1736–1742.
- Boulos, L.; Prevost, 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. In: *Journal of Microbiological Methods* 37 (1), S. 77–86.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254.
- Brook, I. (1989): Inoculum effect. In: *Reviews of Infectious Diseases* 11 (3), S. 361–368.
- Brown, S. M.; Howell, M. L.; Vasil, M. L.; Anderson, A. J.; Hassett, D. J. (1995): Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. In: *Journal of Bacteriology* 177 (22), S. 6536–6544.
- Buttiaux, R. (1959): The value of the association *Escherichiae*-group D *Streptococci* in diagnosis of contamination in foods. In: *Journal of Applied Bacteriology* 22 (1), S. 153–158.

- Calabrese, J. P.; Bissonnette, G. K. (1990): Improved membrane filtration method incorporating catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (11), S. 3558–3564.
- Cappelletti, J. M.; Besnard, V.; Roche, S. M.; Velge, P.; Federighi, M. (2007): Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. In: *Veterinary Research* 38 (4), S. 573–583.
- Cashel, M.; Kalbacher, B. (1970): The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. In: *Journal of Biological Chemistry* 245 (9), S. 2309–2318.
- Cerf, O. (1977): Tailing of survival curves of bacterial spores. In: *Journal of Applied Bacteriology* 42 (1), S. 1–19.
- Chaiyanan, S.; Huq, A.; Maugel, T.; Colwell, R. R. (2001): Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. In: *Systematic and Applied Microbiology* 24 (3), S. 331–341.
- Chaveerach, P.; ter Huurne, A. A. H. M.; Lipman, L. J. A.; van Knapen, F. (2003): Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1), S. 711–714.
- Chiao, T-H.; Clancy, T. M.; Pinto, A.; Xi, C.; Raskin, L. (2014): Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection. In: *Environmental Science & Technology* 48 (7), S. 4038–4047.
- Chick, H. (1908): An Investigation of the Laws of Disinfection. In: *The Journal of Hygiene* 8 (1), S. 92–158.
- Ciofu, O. (2003): *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. In: *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Supplementum* (116), S. 1–47.
- Cobos-Triguero, N.; Zboromyrska, Y.; Morata, L.; Alejo, I.; La Calle, C. de; Vergara, A. et al. (2017): Time-to-positivity, type of culture media and oxidase test performed on positive blood culture vials to predict *Pseudomonas aeruginosa* in patients with Gram-negative bacilli bacteraemia. In: *Revista Española de Quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* 30 (1), S. 9–13.
- Cochran, J. W.; Byrne, R. W. (1974): Isolation and properties of a ribosome-bound factor required for ppGpp and ppGpp synthesis in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 249 (2), S. 353–360.
- Collignon, P. J.; Bell, J. M. (1996): Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: the beginning of the end for many antibiotics? Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). In: *The Medical Journal of Australia* 164 (2), S. 64–67.
- Colwell, R. R.; Brayton, P.; Herrington, D.; Tall, B.; Huq, A.; Levine, M. M. (1996): Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. In: *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12 (1), S. 28–31.

- Colwell, R. R.; Brayton, P. R.; Grimes, D. J.; Roszak, D. B.; Huq, S. A.; Palmer, L. M. (1985): Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment. Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. In: *Nature Biotechnology* 3 (9), S. 817–820.
- Davis, C. (2014): Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. In: *Journal of Microbiological Methods* 103, S. 9–17.
- Day, A. P.; Oliver, J. D. (2004): Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. In: *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 42 (2), S. 69–73.
- Döring, G.; Ulrich, M.; Müller, W.; Bitzer, J.; Schmidt-Koenig, L.; Müntz, L. et al. (1991): Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel, and its prevention by use of a new heating device. In: *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 191 (5-6), S. 494–505.
- Dorn, E.; Hellwig, M.; Reineke, W.; Knackmuss, H-J. (1974): Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. In: *Archives of Microbiology* 99 (1), S. 61–70.
- Ducret, A.; Chabalier, M.; Dukan, S. (2014): Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. In: *BioMed Central Microbiology* 14, S. 3.
- Dukan, S.; Belkin, S.; Touati, D. (1999): Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 367 (2), S. 311–316.
- Ehrlich, G. D.; Veeh, R.; Wang, X.; Costerton, J. W.; Hayes, J. D.; Hu, F. Z. et al. (2002): Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. In: *Journal of the American Medical Association* 287 (13), S. 1710–1715.
- Elkins, J. G.; Hassett, D. J.; Stewart, P. S.; Schweizer, H. P.; McDermott, T. R. (1999): Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), S. 4594–4600.
- Erickson, D. L.; Lines, J. L.; Pesci, E. C.; Venturi, V.; Storey, D. G. (2004): *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. In: *Infection and Immunity* 72 (10), S. 5638–5645.
- Eschbach, M.; Schreiber, K.; Trunk, K.; Buer, J.; Jahn, D.; Schobert, M. (2004): Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. In: *Journal of Bacteriology* 186 (14), S. 4596–4604.
- Favero, M. S.; Carson, L. A.; Bond, W. W.; Petersen, N. J. (1971): *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. In: *Science (New York, N.Y.)* 173 (3999), S. 836–838.
- Fedotcheva, N. I.; Sokolov, A. P.; Kondrashova, M. N. (2006): Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. In: *Free Radical Biology & Medicine* 41 (1), S. 56–64.
- Flardh, K.; Axberg, T.; Albertson, N. H.; Kjelleberg, S. (1994): Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *relA* gene. In: *Journal of Bacteriology* 176 (19), S. 5949–5957.

- Flint, K. P. (1987): The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. In: *Journal of Applied Bacteriology* 63 (3), S. 261–270.
- Frederick, J. R.; Elkins, J. G.; Bollinger, N.; Hassett, D. J.; McDermott, T. R. (2001): Factors affecting catalase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic cells. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (3), S. 1375–1379.
- Gallant, J.; Margason, G.; Finch, B. (1972): On the turnover of ppGpp in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* (19), S. 6055–6058.
- Gehr, R. (2015): Comment on "UV disinfection induces a Vbnc state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*". In: *Environmental Science & Technology* 49 (12), S. 7501.
- Geiger, T.; Francois, P.; Liebeke, M.; Fraunholz, M.; Goerke, C.; Krismer, B. et al. (2012): The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. In: *Public Library of Science Pathogens* 8 (11), e1003016.
- Giandomenico, A. R.; Cerniglia, G. E.; Biaglow, J. E.; Stevens, C. W.; Koch, C. J. (1997): The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. In: *Free Radical Biology & Medicine* 23 (3), S. 426–434.
- Giao, M. S.; Keevil, C. W. (2014): *Listeria monocytogenes* can form biofilms in tap water and enter into the viable but non-cultivable state. In: *Microbial Ecology* 67 (3), S. 603–611.
- Gottlieb, T. (1996): Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: the beginning of the end for many antibiotics? In: *The Medical Journal of Australia* 165 (4), S. 233–234.
- Greenway, D. L.; England, R. R. (1999): ppGpp accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* subjected to nutrient limitation and biocide exposure. In: *Letters in Applied Microbiology* 29 (5), S. 298–302.
- Grobe, S.; Wingender, J.; Trüper, H. G. (1995): Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. In: *Journal of Applied Bacteriology* 79 (1), S. 94–102.
- Hardalo, C.; Edberg, S. C. (1997): *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. In: *Critical Reviews in Microbiology* 23 (1), S. 47–75.
- Haseltine, W. A.; Block, R. (1973): Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (5), S. 1564–1568.
- Hassan, H. M.; Fridovich, I. (1980): Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. In: *Journal of Bacteriology* 141 (1), S. 156–163.
- Hassett, D. J.; Charniga, L.; Bean, K. A.; Ohman, D. E.; Cohen M. S. (1992): Antioxidant defense mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the redox-active antibiotic pyocyanin and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. In: *Infection and Immunity* 60 (2), S. 328–336.

- He, H.; Cooper, J. N.; Mishra, A.; Raskin, D. M. (2012): Stringent response regulation of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. In: *Journal of Bacteriology* 194 (11), S. 2962–2972.
- Heinemeyer, E. A.; Geis, M.; Richter, D. (1978): Degradation of guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate in vitro by the *spoT* gene product of *Escherichia coli*. In: *European Journal of Biochemistry* 89 (1), S. 125–131.
- Hernandez, V. J.; Bremer, H. (1991): *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (9), S. 5991–5999.
- Hom, L. W. (1972): Kinetics of Chlorine Disinfection in an Ecosystem. In: *Journal of the Sanitary Engineering Division* 98 (1), S. 183–194.
- Howarth, S.; Dedman, M. D. (1964): Pigmentation Variants of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 88, S. 273–278.
- Hu, Y.; Coates, A. (2012): Nonmultiplying bacteria are profoundly tolerant to antibiotics. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (211), S. 99–119.
- Hua, J.; Ho, B. (1996): Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? In: *Microbios* 87 (351), S. 103–112.
- Hugo, W. B. (1991): A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. In: *Journal of Applied Bacteriology* 71 (1), S. 9–18.
- Itoh, N.; Morinaga, N.; Nomura, A. (1992): A variety of catalases and bromoperoxidases in genus *Pseudomonas* and their characterization. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1122 (2), S. 189–195.
- Johnston, M. D.; Simons, E. A.; Lambert, R. J. (2000): One explanation for the variability of the bacterial suspension test. In: *Journal of Applied Microbiology* 88 (2), S. 237–242.
- Karapinar, M.; Gönül, S. A. (1992): Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. In: *International Journal of Food Microbiology* 16 (4), S. 343–347.
- Kell, D. B.; Young, M. (2000): Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. In: *Current Opinion in Microbiology* 3 (3), S. 238–243.
- Khakimova, M.; Ahlgren, H. G.; Harrison, J. J.; English, A. M.; Nguyen, D. (2013): The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. In: *Journal of Bacteriology* 195 (9), S. 2011–2020.
- Khan, M. M. T.; Pyle, B. H.; Camper, A. K. (2010a): Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15), S. 5088–5096.
- Khan, N. H.; Ahsan, M.; Taylor, W. D.; Kogure, K. (2010b): Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Microbes and Environments* 25 (4), S. 266–274.

- Klotz, B.; Pyle, D. L.; Mackey, B. M. (2007): New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (8), S. 2468–2478.
- Kogure, K.; Simidu, U.; Taga, N. (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. In: *Canadian Journal of Microbiology* 25 (3), S. 415–420.
- Kong, I-S.; Bates, T. C.; Hulsmann, A.; Hassan, H.; Smith, B. E.; Oliver, J. D. (2004): Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. In: *FEMS Microbiology Ecology* 50 (3), S. 133–142.
- Kurokawa, M.; Nukina, M.; Nakanishi, H.; Tomita, S.; Tamura, T.; Shimoyama, T. (1999): Resuscitation from the viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*. In: *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 73 (1), S. 15–19.
- Ladd, T. I.; Schmiel, D.; Nickel, J. C.; Costerton, J. W. (1987): The use of a radiorespirometric assay for testing the antibiotic sensitivity of catheter-associated bacteria. In: *The Journal of Urology* 138 (6), S. 1451–1456.
- Lakkis, C.; Fleiszig, S. M. (2001): Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to hydrogel contact lens disinfection correlates with cytotoxic activity. In: *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4), S. 1477–1486.
- Lambert, R. J.; Johnston, M. D. (2000): Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. In: *Journal of Applied Microbiology* 88 (5), S. 907–913.
- Leclercq, R.; Courvalin, P. (1991): Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (7), S. 1267–1272.
- Lee, J.; Wu, J.; Deng, Y.; Wang, J.; Wang, C.; Wang, J. et al. (2013): A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. In: *Nature Chemical Biology* 9 (5), S. 339–343.
- Legnani, P.; Leoni, E.; Rapuano, S.; Turin, D.; Valenti, C. (1999): Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. In: *International Journal of Food Microbiology* 53 (2-3), S. 153–158.
- Levy, S. B. (1998): The challenge of antibiotic resistance. In: *Scientific American* 278 (3), S. 46–53.
- Lewis, K. (2000): Programmed death in bacteria. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), S. 503–514.
- Linden, K. G.; Hull, N. M.; Rodriguez, R. A. (2015): Comment on "UV Disinfection Induces a VBNC State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*". In: *Environmental Science & Technology* 49 (17), S. 10750–10751.
- Lleó, M. M.; Benedetti, D.; Tafi, M. C.; Signoretto, C.; Canepari, P. (2007): Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. In: *Environmental Microbiology* 9 (9), S. 2313–2320.

- Lleó, M. M.; Bonato, B.; Tafi, M. C.; Signoretto, C.; Boaretti, M.; Canepari, P. (2001): Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. In: *Journal of Applied Microbiology* 91 (6), S. 1095–1102.
- Long, L. H.; Clement, M. V.; Halliwell, B. (2000): Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (1), S. 50–53.
- Long, L. H.; Halliwell, B. (2011): Artefacts in cell culture: alpha-Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406 (1), S. 20–24.
- Ma, J. F.; Ochsner, U. A.; Klotz, M. G.; Nanayakkara, V. K.; Howell, M. L.; Johnson, Z. et al. (1999): Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 181 (12), S. 3730–3742.
- Maalej, S.; Gdoura, R.; Dukan, S.; Hammami, A.; Bouain, A. (2004): Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. In: *Journal of Applied Microbiology* 97 (3), S. 557–565.
- Machado, A.; Bordalo, A. A. (2014): Diversity and dynamics of the *Vibrio* community in well water used for drinking in Guinea-Bissau (West Africa). In: *Environmental Monitoring and Assessment* 186 (9), S. 5697–5709.
- MacVane, S. H. (2017): Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. In: *Journal of Intensive Care Medicine* 32 (1), S. 25–37.
- Magariños, B.; Romalde, J. L.; Cid, A.; Toranzo, A. E. (1997): Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. In: *Letters in Applied Microbiology* 24 (2), S. 122–126.
- Magnet, S.; Dubost, L.; Marie, A.; Arthur, M.; Gutmann, L. (2008): Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 190 (13), S. 4782–4785.
- Mailloux, R. J.; Singh, R.; Brewer, G.; Auger, C.; Lemire, J.; Appanna, V. D. (2009): Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. In: *Journal of Bacteriology* 191 (12), S. 3804–3810.
- Mary, P.; Chihib, N. E.; Charafeddine, O.; Defives, C.; Hornez, J. P. (2002): Starvation survival and viable but nonculturable states in *Aeromonas hydrophila*. In: *Microbial Ecology* 43 (2), S. 250–258.
- Mascher, F.; Hase, C.; Moenne-Loccoz, Y.; Defago, G. (2000): The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), S. 1662–1667.
- Mattick, J. S. (2002): Type IV pili and twitching motility. In: *Annual Review of Microbiology* 56, S. 289–314.

- May, T. B.; Shinabarger, D.; Maharaj, R.; Kato, J.; Chu, L.; DeVault, J. D. et al. (1991): Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. In: *Clinical Microbiology Reviews* 4 (2), S. 191–206.
- McDougald, D.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. (1999): New perspectives on the viable but nonculturable response. In: *Biologia* 54 (6), S. 617–623.
- McKay, A. M. (1992): Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. In: *Letters in Applied Microbiology* 14 (4), S. 129–135.
- Mechold, U.; Cashel, M.; Steiner, K.; Gentry, D.; Malke, H. (1996): Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. In: *Journal of Bacteriology* 178 (5), S. 1401–1411.
- Metzger, S.; Sarubbi, E.; Glaser, G.; Cashel, M. (1989): Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (16), S. 9122–9125.
- Mitchell, A. G.; Wynne-Jones, W. F. K. (1956): The behaviour of mixtures of hydrogen peroxide and water. Part 3. The ionic products. In: *Transactions of the Faraday Society* 52, S. 824.
- Mizunoe, Y.; Wai, S. N.; Takade, A.; Yoshida, S. (1999): Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading compounds. In: *Archives of Microbiology* 172 (1), S. 63–67.
- Morishige, Y.; Fujimori, K.; Amano, F. (2013): Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*. In: *Microbes and Environments* 28 (2), S. 180–186.
- Morrill, W. E.; Barbaree, J. M.; Fields, B. S.; Sanden, G. N.; Martin, W. T. (1990): Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. In: *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3), S. 616–618.
- Muela, A.; Seco, C.; Camafeita, E.; Arana, I.; Orruno, M.; Lopez, J. A.; Barcina, I. (2008): Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. In: *FEMS Microbiology Ecology* 64 (1), S. 28–36.
- Mukamolova, G. V.; Kaprelyants, A. S.; Young, D. I.; Young, M.; Kell, D. B. (1998): A bacterial cytokine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15), S. 8916–8921.
- Mukamolova, G. V.; Turapov, O. A.; Kazarian, K.; Telkov, M.; Kaprelyants, A. S.; Kell, D. B.; Young, M. (2002): The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. In: *Molecular Microbiology* 46 (3), S. 611–621.
- Nawaz, M.; Han, M. Y.; Kim, T-I.; Manzoor, U.; Amin, M. T. (2012): Silver disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* in rooftop harvested rainwater for potable purposes. In: *Science of the Total Environment* 431, S. 20–25.
- Nayak, N.; Satpathy, G.; Prasad, S.; Thakar, A.; Chandra, M.; Nag, T. C. (2016): Clinical implications of microbial biofilms in chronic rhinosinusitis and orbital cellulitis. In: *BioMed Central Ophthalmology* 16 (1), S. 165.

- Nguyen, D.; Joshi-Datar, A.; Lepine, F.; Bauerle, E.; Olakanmi, O.; Beer, K. et al. (2011): Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6058), S. 982–986.
- Nickels, B. E.; Hochschild, A. (2004): Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. In: *Cell* 118 (3), S. 281–284.
- Nikaido, H. (1989): Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (11), S. 1831–1836.
- Nocker, A.; Cheung, C-Y.; Camper, A. K. (2006): Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. In: *Journal of Microbiological Methods* 67 (2), S. 310–320.
- Nowakowska, J.; Oliver, J. D. (2013): Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. In: *FEMS Microbiology Ecology* 84 (1), S. 213–222.
- Ochi, K. (1987): Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. In: *Journal of Bacteriology* 169 (8), S. 3608–3616.
- Oliver, J. D. (2005): The viable but nonculturable state in bacteria. In: *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 43 Spec No, S. 93–100.
- Oliver, J. D.; Nilsson, L.; Kjelleberg, S. (1991): Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. In: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (9), S. 2640–2644.
- Oliver, James D. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews* 34 (4), S. 415–425.
- Palleroni, N. J.; Ballard, R. W.; Ralston, E.; Doudoroff, M. (1972): Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. In: *Journal of Bacteriology* 110 (1), S. 1–11.
- Pardey, K. K.; Schuchmann, H. P.; Schubert, H.; Heinz, V.; Knorr, D. (2005): Wie gut sind unsere heutigen Entkeimungsverfahren? Abtöten von Mikroorganismen als stochastischer Vorgang. In: *Chemie Ingenieur Technik* 77 (8), S. 1186–1188.
- Pasquaroli, S.; Zandri, G.; Vignaroli, C.; Vuotto, C.; Donelli, G.; Biavasco, F. (2013): Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8), S. 1812–1817.
- Paul, B. J.; Berkmen, M. B.; Gourse, R. L. (2005): DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (22), S. 7823–7828.
- Paul, B. J.; Ross, W.; Gaal, T.; Gourse, R. L. (2004): rRNA transcription in *Escherichia coli*. In: *Annual Review of Genetics* 38, S. 749–770.
- Pembrey, R. S.; Marshall, K. C.; Schneider, R. P. (1999): Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7), S. 2877–2894.

- Peterson, B. W.; Sharma, P. K.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. (2012): Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (1), S. 120–125.
- Petrova, O. E.; Schurr, J. R.; Schurr, M. J.; Sauer, K. (2012): Microcolony formation by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* requires pyruvate and pyruvate fermentation. In: *Molecular Microbiology* 86 (4), S. 819–835.
- Pfennig, N.; Lippert, K. D. (1966): Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. In: *Archives of Microbiology* 55 (3), S. 245–256.
- Pines, A.; Raafat, H.; Siddiqui, G. M.; Greenfield, J. S. (1970): Treatment of severe *Pseudomonas* infections of the bronchi. In: *British Medical Journal* 1 (5697), S. 663–665.
- Pinto, D.; Almeida, V.; Almeida Santos, M.; Chambel, L. (2011): Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. In: *Journal of Applied Microbiology* 110 (6), S. 1601–1611.
- Prütz, W. A. (1996): Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 332 (1), S. 110–120.
- Rahman, I.; Shahamat, M.; Chowdhury, M. A.; Colwell, R. R. (1996): Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. In: *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1), S. 115–120.
- Rahman, I.; Shahamat, M.; Kirchman, P. A.; Russek-Cohen, E.; Colwell, R. R. (1994): Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. In: *Applied and Environmental Microbiology* 60 (10), S. 3573–3578.
- Ramaiah, N.; Ravel, J.; Straube, W. L.; Hill, R. T.; Colwell, R. R. (2002): Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. In: *Journal of Applied Microbiology* 93 (1), S. 108–116.
- Ramalho, R.; Cunha, J.; Teixeira, Paula; Gibbs, P. A. (2002): Modified *Pseudomonas* agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. In: *Journal of Microbiological Methods* 49 (1), S. 69–74.
- Ramamurthy, T.; Ghosh, A.; Pazhani, G. P.; Shinoda, S. (2014): Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. In: *Frontiers in Public Health* 2, S. 103.
- Reynolds, H. Y.; Levine, A. S.; Wood, R. E.; Zierdt, C. H.; Dale, D. C.; Pennington, J. E. (1975): *Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapies. In: *Annals of Internal Medicine* 82 (6), S. 819–831.
- Rice, S. A.; McDougald, D.; Kjelleberg, S. (2000): *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response. In: *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2), S. 115–120.
- Riesenberg, D.; Bergter, F.; Kari, C. (1984): Effect of serine hydroxamate and methyl alpha-D-glucopyranoside treatment on nucleoside polyphosphate pools, RNA and protein accumulation in *Streptomyces hygroscopicus*. In: *Journal of General Microbiology* 130 (10), S. 2549–2558.

- Ringen, L. M.; Drake, C. H. (1952): A study of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources. In: *Journal of Bacteriology* 64 (6), S. 841–845.
- Rodriguez, G. G.; Phipps, D.; Ishiguro, K.; Ridgway, H. F. (1992): Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 58 (6), S. 1801–1808.
- Rollins, D. M.; Colwell, R. R. (1986): Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. In: *Applied and Environmental Microbiology* 52 (3), S. 531–538.
- Roth, W. G.; Leckie, M. P.; Dietzler, D. N. (1988): Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. In: *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12), S. 3142–3146.
- Ryder, C.; Byrd, M.; Wozniak, D. J. (2007): Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. In: *Current Opinion in Microbiology* 10 (6), S. 644–648.
- Salma, M.; Rousseaux, S.; Sequeira-Le Grand, A.; Divol, B.; Alexandre, H. (2013): Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Public Library of Science One* 8 (10), e77600.
- Schleheck, D.; Barraud, N.; Klebensberger, J.; Webb, J. S.; McDougald, D.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. In: *Public Library of Science One* 4 (5), e5513.
- Schreiber, K.; Boes, N.; Eschbach, M.; Jaensch, L.; Wehland, J.; Bjarnsholt, T. et al. (2006): Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. In: *Journal of Bacteriology* 188 (2), S. 659–668.
- Shin, D-H.; Choi, Y-S.; Cho, Y-H. (2008): Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. In: *Journal of Bacteriology* (8), S. 2663–2670.
- Signoretto, C.; Lleó, M. M.; Canepari, P. (2002): Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. In: *Current Microbiology* 44 (2), S. 125–131.
- Silverman, R. H.; Atherly, A. G. (1979): The search for guanosine tetraphosphate (ppGpp) and other unusual nucleotides in eucaryotes. In: *Microbiological Reviews* 43 (1), S. 27–41.
- Singh, R.; Mailloux, R. J.; Puiseux-Dao, S.; Appanna, V. D. (2007): Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. In: *Journal of Bacteriology* 189 (18), S. 6665–6675.
- Souto, R.; Silva-Boghossian, C. M.; Colombo, A. P. V. (2014): Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. In: *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (2), S. 495–501.
- Steels, H.; James, S. A.; Roberts, I. N.; Stratford, M. (2000): Sorbic acid resistance. The inoculum effect. In: *Yeast* 16 (13), S. 1173–1183.

- Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warren, P.; Hickey, M. J. et al. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. In: *Nature* 406 (6799), S. 959–964.
- Swanton, M.; Edlin, G. (1972): Isolation and characterization of an RNA relaxed mutant of *B. subtilis*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46 (2), S. 583–588.
- Thön, M.; Al-Abdallah, Q.; Hortschansky, P.; Brakhage, A. A. (2007): The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (37), S. 27259–27269.
- Trautmann, M.; Halder, S.; Lepper, P. M.; Exner, M. (2009): Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation. Die Bedeutung des Wassers als Infektionsquelle. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 52 (3), S. 339–344.
- Traxler, M. F.; Summers, S. M.; Nguyen, H-T.; Zacharia, V. M.; Hightower, G. A.; Smith, J. T.; Conway, T. (2008): The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 68 (5), S. 1128–1148.
- Troxell, B.; Zhang, J-J.; Bourret, T. J.; Zeng, M. Y.; Blum, J.; Gherardini, F. et al. (2014): Pyruvate protects pathogenic spirochetes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killing. In: *Public Library of Science One* 9 (1), e84625.
- van Delden, C.; Comte, R.; Bally, A. M. (2001): Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 183 (18), S. 5376–5384.
- Viducic, D.; Ono, T.; Murakami, K.; Susilowati, H.; Kayama, S.; Hirota, K.; Miyake, Y. (2006): Functional Analysis of *spoT*, *relA* and *dkxA* Genes on Quinolone Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under Nongrowing Condition. In: *Microbiology and Immunology* 50 (4), S. 349–357.
- Wagner, V. E.; Iglewski, B. H. (2008): *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. In: *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 35 (3), S. 124–134.
- Wai, S. N.; Mizunoe, Y.; Takade, A.; Yoshida, S. (2000): A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. In: *Archives of Microbiology* 173 (4), S. 307–310.
- Wai, S. N.; Moriya, T.; Kondo, K.; Misumi, H.; Amako, K. (1996): Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. In: *FEMS Microbiology Letters* (2), S. 187–191.
- Wang, H-W.; Chung, C-H.; Ma, T-Y.; Wong, H-C. (2013): Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (12), S. 3734–3743.
- Warburton, D. W.; Bowen, B.; Konkle, A. (1994): The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon *salmonellae* in water. Methodology to test bottled water in Canada. In: *Canadian Journal of Microbiology* 40 (12), S. 987–992.
- Watson, H. E. (1908): A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. In: *The Journal of Hygiene* 8 (4), S. 536–542.

- Whitesides, M. D.; Oliver, J. D. (1997): Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3), S. 1002–1005.
- Wilson, R.; Aksamit, T.; Aliberti, S.; Soyza, A.; Elborn, J. S.; Goeminne, P. et al. (2016): Challenges in managing *Pseudomonas aeruginosa* in non-cystic fibrosis bronchiectasis. In: *Respiratory Medicine* 117, S. 179–189.
- Withell, E. R. (1942): The significance of the variation in shape of time-survivor curves. In: *The Journal of Hygiene* 42 (2), S. 124–183.
- Wong, H. C.; Wang, P. (2004): Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. In: *Journal of Applied Microbiology* 96 (2), S. 359–366.
- Wu, B.; Liang, W.; Kan, B. (2016): Growth Phase, Oxygen, Temperature, and Starvation Affect the Development of Viable but Non-culturable State of *Vibrio cholerae*. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 404.
- Xiao, H.; Kalman, M.; Ikehara, K.; Zemel, S.; Glaser, G.; Cashel, M. (1991): Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (9), S. 5980–5990.
- Xu, H. S.; Roberts, N.; Singleton, F. L.; Attwell, R. W.; Grimes, D. J.; Colwell, R. R. (1982): Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. In: *Microbial Ecology* 8 (4), S. 313–323.
- Yamamoto, H. (1996): Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. In: *FEMS Microbiology Ecology* 20 (3), S. 149–154.
- Yamamoto, H. (2000): Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. In: *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2), S. 112–114.
- Yunis, H. (1980): Weather Dependence, Yield Losses, and Control of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas tomato*. In: *Plant Disease Journal* 64 (10), S. 937.
- Zeng, B.; Zhao, G.; Cao, X.; Yang, Z.; Wang, C.; Hou, L. (2013): Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. In: *BioMed Research International* 2013, S. 907170.
- Zhang, S.; Ye, C.; Lin, H.; Lv, L.; Yu, X. (2015): UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Environmental Science & Technology* 49 (3), S. 1721–1728.
- Zhou, S.; Shao, Y.; Gao, N.; Li, L.; Deng, J.; Zhu, M.; Zhu, S. (2014): Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. In: *Science of the Total Environment* 482-483, S. 208–213.
- Zumft, W. G. (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4), S. 533–616.

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Bakterien, die den VBNC-Zustand einnehmen können nach OLIVER (2005) und OLIVER (2010).....	15
Tabelle 2: Testkeime und Herkunftsbezeichnung .....	17
Tabelle 3: Verwendete Software.....	17
Tabelle 4: Übersicht über die Herkunft der genutzten Chemikalien bzw. Medienbestandteile	18
Tabelle 5: Übersicht über die eingesetzten Enzyme und ihre Spezifikationen .....	18
Tabelle 6: Produktbeschreibung und Inhaltsangabe des verwendeten TSB-Mediums .....	19
Tabelle 7: Grundbestandteile des Mineralmediums .....	19
Tabelle 8: Produktbeschreibung und Inhaltsangabe des verwendeten Cetrimid-Agars .....	20
Tabelle 9: Grundbestandteile der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) .....	21
Tabelle 10: Bestandteile der Schwermetalllösung (10 x konzentriert) .....	21
Tabelle 11: Zusammensetzung der für die Wasserstoffperoxidbestimmung eingesetzten Lösungen.....	22
Tabelle 12: Zusammensetzung der für die enzymatische Pyruvatbestimmung eingesetzten Lösungen .....	22
Tabelle 13: Zusammensetzung des für die Proteinbestimmung eingesetzten BRADFORD-Reagenzes.....	23
Tabelle 14: Phosphatpuffer für die Volumenaktivitätsmessung .....	23
Tabelle 15: Auflistung der zusätzlich verwendeten Materialien.....	23
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte .....	24
Tabelle 17: HPLC-Geräteparameter.....	27
Tabelle 18: Chromatographische Bedingungen für die Pyruvatquantifizierung .....	28
Tabelle 19: Pipettierschema und Arbeitsanweisungen zur photometrisch-enzymatischen Pyruvat-quantifizierung .....	28
Tabelle 20: Pipettierschema für den Zusatz von Pyruvat zur Wasserstoffperoxidbehandlung	38
Tabelle 21: Pipettierschema der unterschiedlichen Ansätze für den Vorversuch .....	44
Tabelle 22: Wachstumskinetische Parameter von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in TSB-Vollmedium (37 °C) .....	55

---

Tabelle 23: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Mineralmedium (37 °C) .....	57
Tabelle 24: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspensionen (Phasenkontrast nach Motic (1000fach)) .....	59
Tabelle 25: Mikroskopische Betrachtung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Flüssigkultur in unterschiedlichen Suspensionen und zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten .....	62
Tabelle 26: Mehrbefund (Wiederherstellungsrate R) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Anwesenheit von Pyruvat.....	77
Tabelle 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Langzeitinkubation und Wasserstoffperoxidzugabe .....	79
Tabelle 28: Qualitative Vitalitätsbestimmung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxidzugabe .....	91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kalibriergerade für die Quantifizierung des Proteingehaltes nach BRADFORD (1976).....	30
Abbildung 2: Beurteilung des bakteriologischen Zustandes nach Wasserstoffperoxidbehandlung.....	36
Abbildung 3: Quantifizierung von Wasserstoffperoxid (Methodenauswahl) .....	46
Abbildung 4: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte mit der getätigten Einwaage .....	47
Abbildung 5: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte in einem erhitzten und nicht erhitzten Mineralmedium .....	48
Abbildung 6: Korrelationsvergleich der enzymatisch ermittelten Pyruvatgehalte nach Lagerung bei - 18 °C.....	49
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von mit CTC angefärbten Zellen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 .....	50
Abbildung 8: Zelltiter einer <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspension (OD = 2,0) bestimmt durch unterschiedliche Quantifizierungsmethoden .....	50
Abbildung 9: Zelltiter einer <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspension (OD = 0,2) bestimmt durch unterschiedliche Quantifizierungsmethoden .....	51
Abbildung 10: Unterschiedliche Quantifizierung von <i>Escherichia coli</i> K12-Zellen.....	52
Abbildung 11: Vermehrungskurve von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in TSB-Vollmedium	53
Abbildung 12: Logarithmierte Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in der exponentiellen Wachstumsphase .....	54
Abbildung 13: Wachstumskurve von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in TSB-Vollmedium...	54
Abbildung 14: Logarithmierte optische Dichte einer <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspension in der exponentiellen Wachstumsphase .....	55
Abbildung 15: Wachstumskurve von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Mineralmedium.....	56
Abbildung 16: Logarithmierte optische Dichte einer <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspension in der exponentiellen Wachstumsphase .....	57
Abbildung 17: Wiederfindung und optische Dichten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 und <i>Escherichia coli</i> K12 in TSB-Flüssigkulturen nach mehreren Zentrifugationsschritten. ....	58
Abbildung 18: Quantifizierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser nach Ultraschall .....	61
Abbildung 19: Umsatz von Wasserstoffperoxid nach Zugabe von Pyruvat.....	63

---

Abbildung 20: Überleben von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in chemisch definiertem Leitungswasser .....	64
Abbildung 21: Überleben von <i>Escherichia coli</i> K12 in chemisch definiertem Leitungswasser	65
Abbildung 22: Keimreduzierende Wirkung von Wasserstoffperoxid auf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspensionen unterschiedlicher Zelltiters .....	66
Abbildung 23: Konzentrationsabhängigkeit der keimreduzierenden Wirkung von Wasserstoffperoxid .....	68
Abbildung 24: Unterschiedliche Wasserstoffperoxidkonzentrationen nach Umsetzung mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspensionen .....	69
Abbildung 25: Reaktivierungsversuche von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 mittels Supplementagar nach Stress .....	70
Abbildung 26: Überleben von <i>Escherichia coli</i> K12 und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Chlordioxid-behandlung.....	71
Abbildung 27: Pyruvatzusatz bei der Wasserstoffperoxidbehandlung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 .....	72
Abbildung 28: Inkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 mit unterschiedlichen Additiven.....	74
Abbildung 29: Reaktivierungsversuch von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 mittels Supplementagar nach Aushungern und Wasserstoffperoxidbehandlung .....	75
Abbildung 30: Trübung der Probensuspensionen bei Langzeitinkubation .....	76
Abbildung 31: Wiederfindung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Kultivierung .....	78
Abbildung 32: Wiederfindung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 durch Fluoreszenzmikroskopie (BacLight™ Bacterial Viability) .....	80
Abbildung 33: Lebendzellzahlen der Versuchsansätze in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer .....	81
Abbildung 34: Inkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (OD = 0,25) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid .....	82
Abbildung 35: Inkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (OD = 0,125) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid .....	83
Abbildung 36: Inkubation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (OD = 0,063) nach Umsetzung mit Wasserstoffperoxid .....	84
Abbildung 37: Trübung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspensionen unterschiedlichen Anfangszelltiters nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid.....	85

---

Abbildung 38: Konzentrationsabnahme von Wasserstoffperoxid in den desinfizierten und anschließend inkubierten Versuchsansätzen.....	86
Abbildung 39: Logarithmierte Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (OD = 0,25) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung ....	87
Abbildung 40: Logarithmierte Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (OD = 0,075) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach einer Wasserstoffperoxidbehandlung ..	88
Abbildung 41: Trübung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Suspensionen unterschiedlichen Anfangszelltiters nach Desinfektion mit Wasserstoffperoxid.....	89
Abbildung 42: Konzentrationsabnahme von Wasserstoffperoxid in den Versuchsansätzen ....	90
Abbildung 43: Logarithmus der Lebendzellzahl und die optischen Dichten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxid-desinfektion.....	93
Abbildung 44: Logarithmus der Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wachstum durch Zusatz von durch Hitze inaktivierten Zellen .....	94
Abbildung 45: Abtötungsquotient für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (Trübung) .....	95
Abbildung 46: Abtötungsquotient für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 (Ausgangszellzahl)....	96
Abbildung 47: Relativer Proteingehalt und relative optische Dichte von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Aushungern .....	97
Abbildung 48: Relative spezifische Katalaseaktivität und relative Volumenaktivität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Aushungern.....	98
Abbildung 49: Vermehrung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach D/L-Serin-hydroxamat-Zugabe .....	99
Abbildung 50: Katalasevolumenaktivität und Proteingehalt von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen nach D/L-Serinhydroxamat-Zugabe .....	100
Abbildung 51: Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl und spezifische Katalaseaktivität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen nach D/L-Serinhydroxamat-Zugabe .....	101
Abbildung 52: Desinfektion von künstlich ausgehungerten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen .....	102
Abbildung 53: Desinfektion von mit SHX angezogenen und von unbehandelten Zellen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 .....	103
Abbildung 54: Lebendzellzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 nach Wasserstoffperoxid-Zugabe in Abhängigkeit vom Inokulum.....	104
Abbildung 55: Abnahme der Wasserstoffperoxidkonzentration in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen.....	105

---

Abbildung 56: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Kulturen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid .....	106
Abbildung 57: Konzentration an Pyruvat und Wasserstoffperoxid in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen .....	107
Abbildung 58: Volumenaktivität der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen nach Wasserstoffperoxidzugabe .....	108
Abbildung 59: Abtötungsquotient für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Abhängigkeit von der optischen Dichte .....	121
Abbildung 60: Abtötungsquotient für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1 in Abhängigkeit von der eingesetzten Desinfektionsmittelkonzentration .....	122
Abbildung 61: Katalaseaktivität und Pyruvatmenge pro Lebendzellzahl der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WR1-Zellkulturen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid .....	124

---

**Formelverzeichnis**

Formel 1: Zelltiterbestimmung mittels Zählkammer nach Neubauer .....	26
Formel 2: Enzymatisch - photometrische Pyruvatquantifizierung .....	28
Formel 3: Berechnung der Katalasevolumenaktivität .....	30
Formel 4: Berechnung der spezifischen Katalaseaktivität .....	31
Formel 5: Zelltiterbestimmung nach CTC-Färbung .....	32
Formel 6: Zelltiterbestimmung nach LIVE/DEAD-Färbung .....	32
Formel 7: Vermehrungsparameter (Bakterienzahl (BZ)): .....	34
Formel 8: Wachstumsparameter (Bakterienmasse (BM)):.....	34
Formel 9: Berechnung des Abtötungsquotientens.....	42
Formel 10: Berechnung der Katalaseaktivität pro Lebendzellzahl .....	44
Formel 11: Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung .....	128
Formel 12: Berechnung der Wiederfindungsrate .....	128

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

---

Darko Andre Babić, Wuppertal im Februar 2017