HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

MASTERARBEIT

ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES

MASTER OF SIENCE

„CHARAKTERISIERUNG POTENTIELL PATHOGENER VIBRIO SPP. VIA FTIR-SPEKTROSKOPIE“

„CHARACTERIZATION OF POTENTIALLY PATHOGENIC VIBRIO SPP. VIA FTIR-SPECTROSCOPY“

Vorgelegt von:
Annabell Marlen Sigrid Hillenbrand
Geboren am 19. Juli 1988 in Aschaffenburg

Extern angefertigt in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Ökologie
am Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung

In Betreuung durch:
Prof. Franz Bartl, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité Berlin
Prof. Peter Hegemann, Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik, Institut für Biophysik,
Humboldt Universität zu Berlin

Berlin, xx. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Vibrionen ... 2
1.1.1 Risiko von Vibrionen als Humanpathogene ... 2
1.1.2 Das Verbundprojekt VibrioNet ... 4

1.2 Identifizierung von Mikroorganismen mittels FTIR-Spektroskopie ... 6
1.2.1 Entstehung von Infrarotspektren ... 6
1.2.2 Aufbau eines FTIR-Spektrometers ... 8
1.2.3 Identifizierung von Mikroorganismen auf Basis ihrer Infrarotspektren ... 9

2 Material ... 11

2.1 Chemikalien ... 11

2.2 Technische Geräte ... 12

2.3 Verbrauchsmaterialien ... 13

2.4 Aufbau FTIR-Spektrometer und Zubehör ... 13

2.5 Zelllinien und deren Kultivierung ... 15

2.6 Medienrezepturen ... 15

2.7 Lösungen für Fixierungsversuche ... 16

3 Methoden ... 17

3.1 Fixierungsmethoden im Vergleich ... 18
3.1.1 Natriumazid-Bariumchlorid-Nickelchlorid-Lösung, Formaldehyd und Micropur forte ... 19
3.1.2 Ethanol und destilliertes Wasser ... 21
3.1.3 UV-Bestrahlung ... 22
3.1.4 Kontrolle an potentiell pathogenen *Vibrio*-Stämmen ... 24

3.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie ... 25
3.2.1 Assay zur standardisierten Aufnahme von FTIR-Spektren an Vibrionen ... 25
3.2.2 Auswahl von Referenzspektren ... 26
3.2.3 Clusteranalyse ... 27

4 Ergebnisse ... 28

4.1 Fixierungsmethoden im Vergleich ... 28
4.1.1 Fixierungseffizienz der verschiedenen Methoden an *Vibrio alginolyticus* ... 29
4.1.2 Einfluss der Fixierungsvarianten auf FTIR-Spektren ... 29
4.1.3 UV-Fixierung von potentiell pathogenen *Vibrio*-Spezies ... 33

4.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie ... 34
4.2.1 Analyse der Spektren in den Wellenzahlfenstern W_1-W_5 ... 35
4.2.2 Clusteranalyse unter Kombination der charakteristischen Wellenzahlbereiche ... 42

5 Diskussion ... 45

5.1 Fixierungsmethoden im Vergleich ... 45
5.1.1 Fixierungswirksamkeit ... 45
5.1.2 Auswirkungen der Fixierung auf Infrarotspektren ... 47

5.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie ... 49

6 Zusammenfassung und Ausblick 53

I Literaturverzeichnis 55

II Abbildungsverzeichnis 58

III Tabellenverzeichnis 60

IV Abkürzungsverzeichnis 61

V Eigenständigkeitserklärung 62

1 Einleitung

"Es ist zu fürchten, dass die Cholera ihren furchtbaren Tour de l'Europe machen werde, langsamen Fußes einherschreitend, wie bisher, gleich einem Geharnischten mit geschlossenem Visier (...)" - Prof. C. J. H. Elsner, dt. Arzt, 1777-1834 (Briese 2003)

Dank verbesserter Hygienestandards konnten in Europa seit Beginn des 20. Jahrhunderts Choleraausbrüche, wie Prof. C. J. H. Elsner sie 1831 beschrieb, verhindert werden. Heute ist bekannt, dass die Seuche Cholera durch pathogene Stämme des Bakteriums *Vibrio cholerae* verursacht wird. Allerdings ist *V. cholerae* nicht die einzige Vibriospezies, die für den Menschen schwerwiegende gesundheitliche Folgen hervorrufen kann. Weitere pathogene Vibrionen wie *Vibrio vulnifiucus* oder der pandemische Stamm SO3:K6 der Art *Vibrio parahaemolyticus* sind inzwischen auch in Europa auf dem Vormarsch. In Abschnitt 1.1 wird zunächst ein Überblick über die Gattung Vibrio und im Speziellen über deren humanpathogene Vertreter geben. Um Vibrionen näher zu erforschen und das Risiko durch potentiell pathogene Spezies an den deutschen Küsten besser einschätzen zu können wurde 2010 das Verbundprojekt VibrioNet initiiert. Dieses wird in Kapitel 1.1.2 vorgestellt und insbesondere die Rolle des Alfred-Wegener-Instituts erläutert. Neben molekularbiologischen Methoden und der Identifizierung der Bakterien durch MALDI-TOF-Messungen soll im Rahmen des Verbundprojekts auch die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie zur Charakterisierung von Vibrionen getestet werden.

Daraus ergeben sich die zwei Hauptfragestellungen der vorliegenden Arbeit:

i. Wie lassen sich potentiell pathogene Vibrionen für die Messung im FTIR-Spektrometer fixieren, ohne dass die Infrarotspektren der Zellen zu stark beeinflusst werden?
ii. Ist es generell möglich, Vibrionen auf Art- und Stammebene mittels FTIR-Spektroskopie zu identifizieren?

Die zur Klärung dieser Sachverhalte durchgeführten Versuche und dazu verwendete Materialien werden in den Kapiteln 2 und 3 näher beschrieben. Anschließend werden die Ergebnisse in Kapitel 4 ausführlich dargestellt und diskutiert (Kapitel 5). Zum Abschluss wird einen Ausblick gewährt, in welchen weiteren Gebieten die in dieser

Arbeit gewonnene Erkenntnisse potentiell Anwendung finden und wie sie zukünftig speziell im Rahmen des Vibriomonitoring erweitert und genutzt werden können.

1.1 Vibrionen

Als kommaförmige, gramnegative Gammaproteobakterien besiedeln Vertreter der Gattung Vibrio die unterschiedlichsten aquatischen Lebensräume. Die motilen, begeißelten Stäbchen finden sich häufig frei lebend aber auch assoziiert mit anderen marinen Organismen. Beispielsweise leben die zur Biolumineszenz fähigen *Vibrio fischeri* in symbiontischer Beziehung mit Tintenfischen. Im bauchseitigen Leuchtorgan von *Euprymna scolopes* fungieren sie als Gegenlichttarnung, um den Schatten des nachtaktiven, räuberischen Mollusken im Mondschein zu minimieren (Jones and Nishiguchi 2004). Andere Vibrionen wiederum bilden komplexe Biofilme aus oder befallen als Pathogene u.a. Korallen, Fische oder Krebstiere (Thompson, Iida et al. 2004; Austin 2010). Dies hat ernstzunehmende Konsequenzen für die Züchtung bestimmter Spezies in Aquakultur und wird auch in Relation mit dem weltweiten Korallensterben gesehen. Insgesamt umfasst die Gattung Vibrio über 63 Arten, von denen 12 humanpathogen sein können (Morris 2003; Eiler, Johansson et al. 2006). Besonders hervorzuheben sind *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus*, welche für den Menschen schwerwiegende gesundheitliche Folgen auslösen.

1.1.1 Risiko von Vibrionen als Humanpathogene

Der wohl bekannteste Vertreter der Gattung Vibrio, *Vibrio cholerae*, wurde erstmals 1854 vom italienischen Arzt Filippo Pacini während eines Choleraausbruchs in Florenz beschrieben. Er erkannte in Cholera eine von Bakterien übertragbare Infektionskrankheit. Doch in der damaligen Zeit dominierte die sogenannte miasmatische Theorie, eine Übertragung von Krankheiten durch „schlechte Lüfte“, die Meinung der führenden Wissenschaftler und Ärzte. Erst 30 Jahre später gelang es Robert Koch in Indien Reinkulturen des tödlichen Erregers auf Gelatineplatten zu züchten. (Thompson, Iida et al. 2004) Bisher wurden in der Menschheitsgeschichte sieben Cholerapandemien, an denen hauptsächlich die drei Serotypen O1, O1 El Tor und der nur in Südasien vorkommende O139 beteiligt waren, beschrieben. Noch heute, in der seit über 40 Jahren andauernden siebten Pandemie, fordert die Krankheit laut WHO jährlich weltweit ca. 100.000 bis 120.000 Todesopfer (Wang and Chen 2012; WHO

2012). Die Infektion erfolgt über die Aufnahme von verunreinigten Nahrungsmitteln oder kontaminiertes Trinkwasser. Durch das von den Bakterien produzierte Choleratoxin wird eine starke Gastroenteritis mit wässrigem Durchfall hervorgerufen, im schwerwiegendsten Fall führt dies zum Tod durch Dehydrierung (Morris 2003).

Eine Infektion durch pathogene Stämme von *Vibrio parahaemolyticus* äußert sich durch ein ähnliches Krankheitsbild und erfolgt ebenfalls über eine orale Aufnahme der Erreger. Es wird vermutet, dass das thermostabile direkte Hämolysin (TDH) sowie das THD-verwandte Hämolysin TRH beim Infektionsprozess eine ausschlaggebende Rolle spielen (Thompson, Iida et al. 2004). Raimondi et al. beschreibt, dass TDH in Plasmamembranen als Porin fungiert und den Einstrom der Kationen Ca^{2+}, Na^{+} und Mn^{2+} in die befallenen Zellen verstärkt. Hierdurch kommt es zu einem osmotischen Ungleichgewicht. (Raimondi, Kao et al. 2000) Neben zunächst sporadisch auftretenden Einzelfällen kam es ab 1996, mit dem Auftauchen des Serovars SO3:K6, sowohl in Asien, Amerika als auch in Europa zu pandemischen Ausbrüchen der Krankheit durch den Verzehr von rohen oder unzureichend gegartem Fisch und Meeresfrüchten (DePaola, Kaysner et al. 2000; Matsumoto, Okuda et al. 2000; Martinez-Urtaza, Lozano-Leon et al. 2004; Drake, DePaola et al. 2007). Desweiteren wurden vereinzelt Fälle von Wundinfektionen durch *V. parahaemolyticus* beschrieben.

Vertreter der Art *Vibrio vulnificus* können beim Menschen schwere Wundinfektionen und Septikämien auslösen, die oftmals tödlich verlaufen. Kommen offene Wunden z.B. beim Baden mit verunreinigtem Wasser oder mit kontaminierten Fischereiprodukten in Kontakt, können Bakterien ins Gewebe oder die Blutbahn gelangen. Selbst die Behandlung mit Antibiotika kann hier keinen Heilungserfolg garantieren, was in vielen Fällen das Herausschneiden des infizierten Gewebes oder sogar die Amputation betroffener Gliedmaßen nötig macht. (Drake, DePaola et al. 2007) Hauptursache für das Auftreten von Septikämien ist der Verzehr von rohen Meeresfrüchten, in erster Linie von Austern. Die Mortalitätsrate ist hier die höchste unter allen Lebensmittel-infektionen und liegt bei ca. 50% aller betroffenen Patienten. Erfolgt keine Behandlung mit Antibiotika, steigt sie auf 100%. Ein erhöhtes Risiko, sich mit *V. vulnificus* über die Aufnahme kontaminierter Speisen zu infizieren, trifft u.a. Menschen mit Immunkrankheiten, Diabetes, Leber- oder Nierenschäden. (Oliver 2013)

Im Zusammenhang mit klimatischen Veränderungen, wie dem Ansteigen der Temperatur von Oberflächengewässern, und dem zunehmenden Verzehr sowie internationalem Handel von Fischereizeugnissen ist ein Ansteigen der Zahl von Vibrioinfektionen auch in Europa zu befürchten (Baker-Austin, Stockley et al. 2010). Der intensive Einsatz von Antibiotika in Aquakulturen fördert zudem die Evolution antibiotikaresistenter Vibrionen (Wang and Chen 2012).

1.1.2 Das Verbundprojekt VibrioNet

Um ein potentielles Gesundheitsrisiko in besser einschätzen und rechtzeitig entgegenwirken zu können, ist es notwendig, einen Überblick über den Status Quo der Präsenz der verschiedenen Vibriospezies in Umwelt und Lebensmittelketten sowie deren Vorkommen als Krankheitserreger in Deutschland zu gewinnen. Im Verbundprojekt VibrioNet kooperieren daher Institute, Universitäten und Unternehmen aus dem klinischen, diagnostischen und ökologischen Bereich sowie aus der Fischereibranche (siehe Abbildung 1).

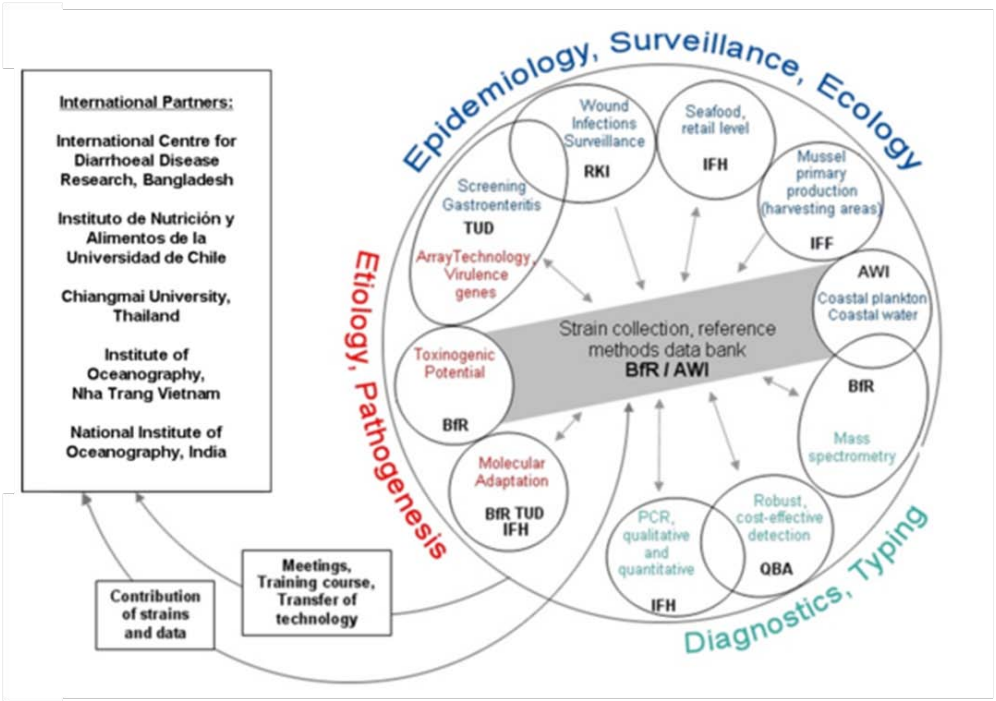

Abbildung 1: Organisation und Verantwortlichkeiten innerhalb des Verbundprojektes VibrioNet (www.vibrionet.de)

Während alle Stämme aus klinischen und Lebensmitteluntersuchungen und in der nationalen Referenzbibliothek des BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) aufgenommen werden, erfolgt die Sammlung der Vibriostämme aus Umweltproben an der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred-Wegener-Instituts (AWI). Hier soll das

Vorkommen potentiell pathogener Vibrionen in deutschen Gewässern und Einflüsse durch Umweltfaktoren wie beispielsweise Salinität oder veränderte klimatische Bedingungen bewertet werden (Alter, Appel et al. 2011). Zur Analyse der neuisolierten Vibriostämme werden präzise und schnell durchführbare Nachweismethoden benötigt. Neben molekularbiologischen Verfahren und Massenspektrometrie in Form von MALDI-TOF soll auch die Identifizierung von Vibriostämmen mittels FTIR-(Fourier-Transformations-Infrarot)-Spektroskopie erprobt werden. Vor allem die schnelle und unkomplizierte Probenpräparation und daraus resultierende kurze Zeiten bis zur Bestimmung eines Stammes macht diese Methode so interessant für die Messung der potentiellen Pathogenen. Außerdem sind bereits FTIR-Spektrometer mit relativ kompaktem und robustem Aufbau kommerziell erhältlich. Ein Einsatz direkt an Bord eines Forschungsschiffes wäre im Gegensatz zur MALDI-TOF-Technik also durchaus denkbar.

1.2 Identifizierung von Mikroorganismen mittels FTIR-Spektroskopie

Seit Ende des 19. Jahrhunderts wird die Infrarotspektroskopie zur Untersuchung von Festkörpern und Gasen eingesetzt. Inzwischen zählt sie in der Materialforschung zu den ältesten und weitest verbreiteten Analysetechniken. Erstmals wurde 1911 von W.W. Coblentz vorgeschlagen, auch biologische Proben infrarotspektroskopisch zu untersuchen. Infolgedessen wurden in den 1950er Jahren erste Versuche an z.B. Hefen, Virusisolaten und Bakterien durchgeführt (Riddle, Kabler et al. 1956). Doch erst mit der Verfügbarkeit rechenstarker Computer, und der damit möglichen Entwicklung der **F**ourier-**T**ransformations-**I**nfra**r**ot-(FTIR)-Spektroskopie konnten bis dahin limitierende Faktoren wie der zeitliche Messaufwand, die Auflösung oder die Auswertung der Spektren durch Mustererkennung und multivariate Analysen, ausreichend verbessert werden.

1.2.1 Entstehung von Infrarotspektren

Die Entstehung von Infrarotspektren basiert auf der Absorption von elektro-magnetischer Strahlung durch Materie. Der energetische Zustand eines beliebigen Moleküls lässt sich beschreiben durch:

$$E_{Ges} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans}$$

Die translatorische Energie (E_{trans}) ist bedingt durch die thermische Bewegung der Moleküle im jeweiligen Stoff. Höhere Niveaus der Rotationsenergie (E_{rot}) eines Moleküls werden hauptsächlich durch Absorption von Lichtquanten aus dem Mikrowellenbereich angeregt, während Übergänge zwischen Niveaus der Vibrationsenergie (E_{vib}) durch Infrarotstrahlung verursacht werden. Für das Anheben von Elektronen in höhere elektronische Zustände (E_{el}) ist die Absorption von Strahlung aus dem UV/VIS-Bereich nötig (Coates 2000). Die Energiedifferenz zwischen den diskreten Energieniveaus entspricht dabei der Energie des absorbierten Photons.

$$\Delta E = h\nu = hc\bar{\nu}$$

mit h: Planck'sches Wirkumsquantum, c: Lichtgeschwindigkeit, ν: Frequenz in s^{-1}, $\bar{\nu}$: Wellenzahl in cm^{-1}

IR-spektroskopische Messungen erfolgen üblicherweise im mittleren Infrarotbereich (MIR) zwischen 400-4000 cm^{-1} und zeigen das Vibrationsspektrum der untersuchten

Substanz. Bedingung für die Anregung eines Vibrationsniveaus ist die Wechselwirkung eines Dipolmomentes mit dem elektrischen Feldvektor des eingestrahlten Lichtes. Moleküle, wie das Homodimer N_2, die ausschließlich zum Symmetriezentrum symmetrische Schwingungen aufweisen, also kein veränderliches Dipolmoment haben, sind demnach IR-inaktiv.

Grundsätzlich kann zwischen zwei Schwingungstypen mit diversen Unterformen unterschieden werden: Valenz- (oder Streck-) und Deformationsschwingungen. Beide Schwingungsarten sind in Abbildung 2 anhand der Methylengruppe schematisch dargestellt. Deformationsschwingungen, bei denen sich der Bindungswinkel ändert, werden im Vergleich zu Valenzschwingungen, bei denen sich die Bindungslänge ändert, bereits bei niedrigeren Energien, bei geringeren Wellenzahlen angeregt. (Beyer 1981; Hesse 2005)

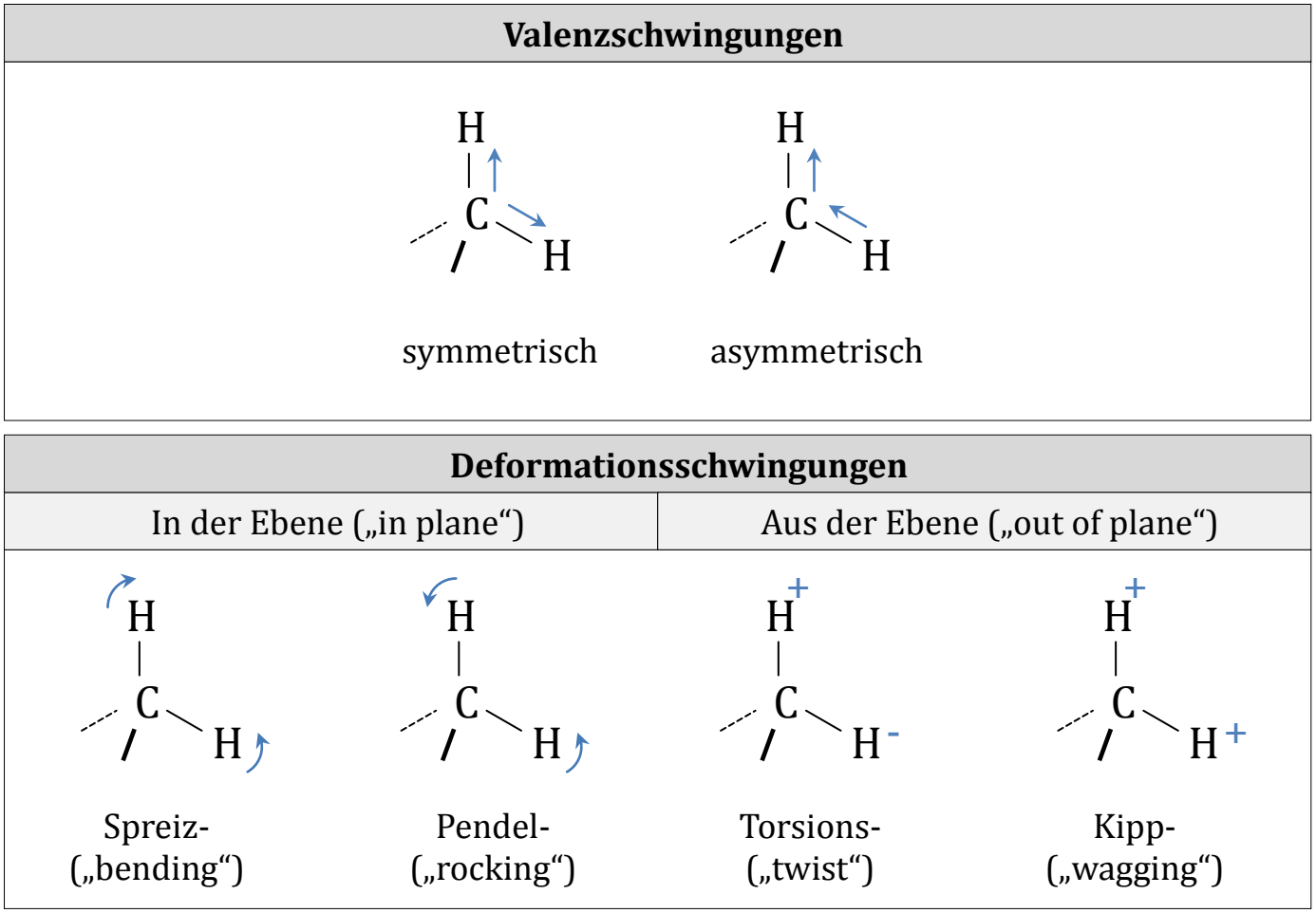

Abbildung 2: Schwingungstypen der Methylengruppe; +: Schwingungen vor die Papierebene, -: Schwingungen hinter die Papierebene; modifiziert nach (Hesse 2005)

1.2.2 Aufbau eines FTIR-Spektrometers

In der dispersiven IR-Spektroskopie werden die einzelnen Frequenzen nacheinander z.B. mittels eines Monochromators oder eines durchstimmbaren Lasers, vermessen. Im Unterschied dazu kann bei der FTIR-Spektroskopie in jedem Messpunkt der volle Wellenzahlbereich registriert werden. Der Aufbau eines FTIR-Spektrometers zur Messung im Absorptions-/Transmissions-Modus ist im Folgenden beschrieben.

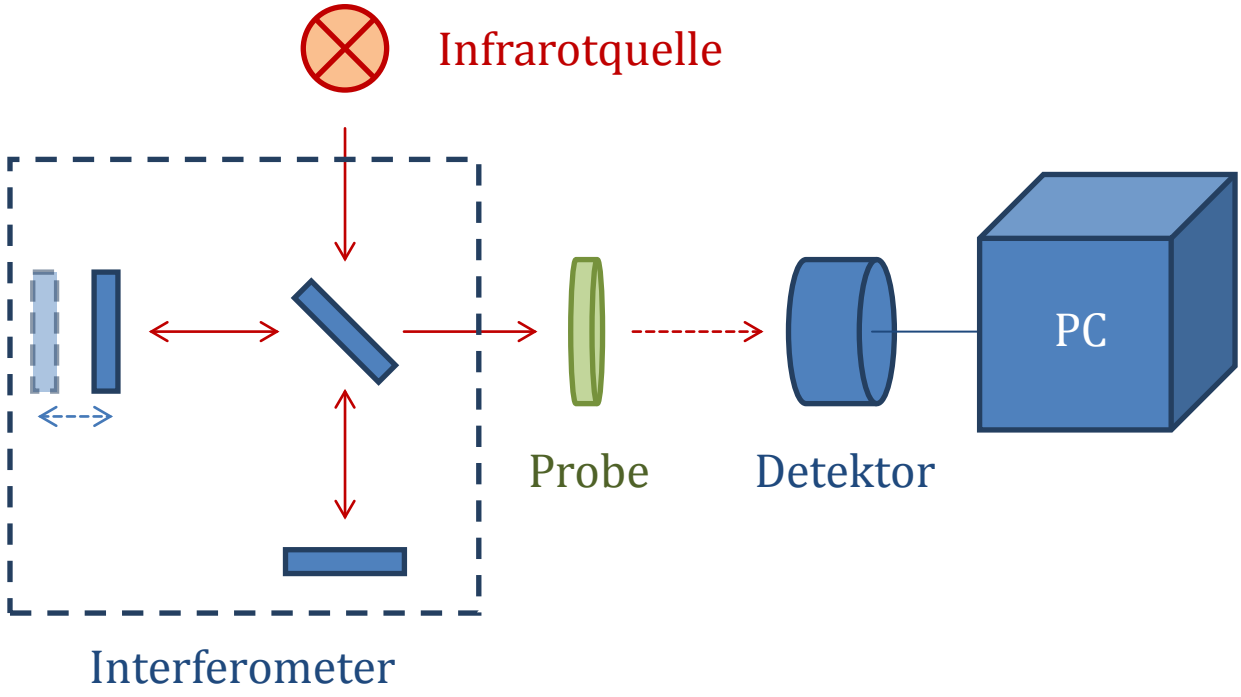

Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers

Von einer Lichtquelle, z.B. einem schwarzen Strahler, wird ein Infrarotspektrum ausgesendet. In einem Interferometer wird daraus ein Interferogramm I(x) erzeugt. Dies kann idealisiert beschrieben werden als eine Fouriertransformation des Spektrums S(ν) aus dem Frequenz- in den Ortsraum:

$$I(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} S(\nu) e^{i\nu x} d(\nu)$$

Das Messprinzip eines Interferometers ist in Abbildung 3 in der sogenannten Michelson-Anordnung dargestellt. Der von der Quelle ausgehende Strahl trifft auf einen Strahlteiler, z.B. einen halbdurchlässigen Spiegel und wird in zwei Lichtbündel gespalten. Im

optimalen Fall durchlaufen 50% des Lichtes den Spiegel, um auf einen festmontierten Spiegel zu treffen. Das andere Lichtbündel wird reflektiert und auf einen beweglichen Spiegel gelenkt. Nach Reflektion an beiden Spiegeln werden die beiden Lichtbündel nach wiederholtem Durchlauf des Strahlteilers rekombiniert – es kommt zur Interferenz. Über die Variation der Distanz des beweglichen Spiegels zum Strahlteiler werden Weglängendifferenzen zwischen den Teilstrahlen realisiert. Abhängig vom Gangunterschied und Wellenlänge kommt es durch Interferenz zur Auslöschung bzw. Verstärkung der Intensität. Im Falle von monochromatischem Licht erhält man als Interferogramm eine Kosinusfunktion mit Maxima bei Weglängendifferenzen Δs von ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge: $\Delta s_{max} = n\lambda$. Wird eine polychrome Strahlungsquelle eingesetzt, kommt es zur Superposition der Einzelinterferogramme der beteiligten Wellenlängen.

Das erzeugte Interferogramm trifft nun auf die zu untersuchende Probe. Je nach Zusammensetzung werden bestimmte Frequenzen absorbiert. Der die Probe verlassende Strahl wird anschließend auf einen Detektor geleitet und digitalisiert an einen Computer weitergegeben. Mittels mathematischer FT wird das Interferogram in ein Spektrum rücktransformiert. Das Absorptionsspektrum $A(\bar{\nu})$ ergibt sich über das Transmissionsspektrum $T(\bar{\nu})$ durch:

$$A(\bar{\nu}) = -\log\, T(\bar{\nu}) \qquad \text{mit} \qquad \mathrm{T}(\bar{\nu}) = \frac{S_P(\bar{\nu})}{S_H(\bar{\nu})}$$

Wobei S_P die Intensitäten des Infrarotstrahls nach Durchlaufen der Probe und S_H das Hintergrundspektrum bezeichnet (Naumann 2006). Im Hintergrundspektrum ist das Lampenspektrum enthalten aber auch optische Charakteristiken der Messanordnung.

1.2.3 Identifizierung von Mikroorganismen auf Basis ihrer Infrarotspektren

Je komplexer die zu messenden Strukturen sind, desto mehr Absorptionsbanden überlagern einander. Bei der Messung kompletter Zellen tragen also alle Zellbestandteile und Metabolite zum Absorptionsspektrum bei.

Zur Charakterisierung der FTIR-Spektren von Mikroorganismen wurden von Helm et al. fünf spektrale Fenster, die spezifische Stoffgruppen umfassen, identifiziert (Helm, Labischinski et al. 1991). Diese sind zusammen mit zwei Beispielspektren in Abbildung 4 dargestellt.

W_1 (3000-2800cm^{-1}) die **Fettsäureregion**, umfasst symmetrische und asymmetrische CH_3-, CH_2- und CH-Streckungsschwingungen. Diese herrschen als funktionelle Gruppen in Lipiden der Zellmembranen vor.

W_2 (1800-1500cm^{-1}) die **Amidregion**, wird dominiert durch die sogenannten Amid-I- und Amid-II-Banden. Diese werden erzeugt durch Carboxyl-, Carbonyl- und Keto-gruppen der unterschiedlichen Proteine und Peptide.

W_3 (1500-1200cm^{-1}) wird in der Literatur als **„mixed region“** bezeichnet. In diesem Bereich liegen die Banden der asymmetrischen Schwingungen der P=O-Bindung. Diese werden von z.B. Phospholipiden der Membran, den Phosphatanteilen der Nukleotide oder Polysacchariden, die Phosphate enthalten, beigetragen. Zudem absorbieren in diesem Spektralbereich auch symmetrische C=O-Vibrationen aus Carboxylgruppen.

W_4 (1200-900cm^{-1}) die **Polysaccharidregion** enthält vorrangig die spektralen Muster in der Zelle enthaltener Oligo- und Polysaccharide. Dieses charakteristische Profil entsteht durch C-O-C und C-O-P Streckschwingungen.

W_5 (900-700cm^{-1}), genannt **„Fingerprint“-Region**, setzt sich aus vielen Banden zusammen, welche bisher nicht klar zu Zellbestandteilen zugeordnet werden konnten. Diese Muster sind für Mikroorganismen hochspezifisch und daher für die Identifizierung wertvoll.

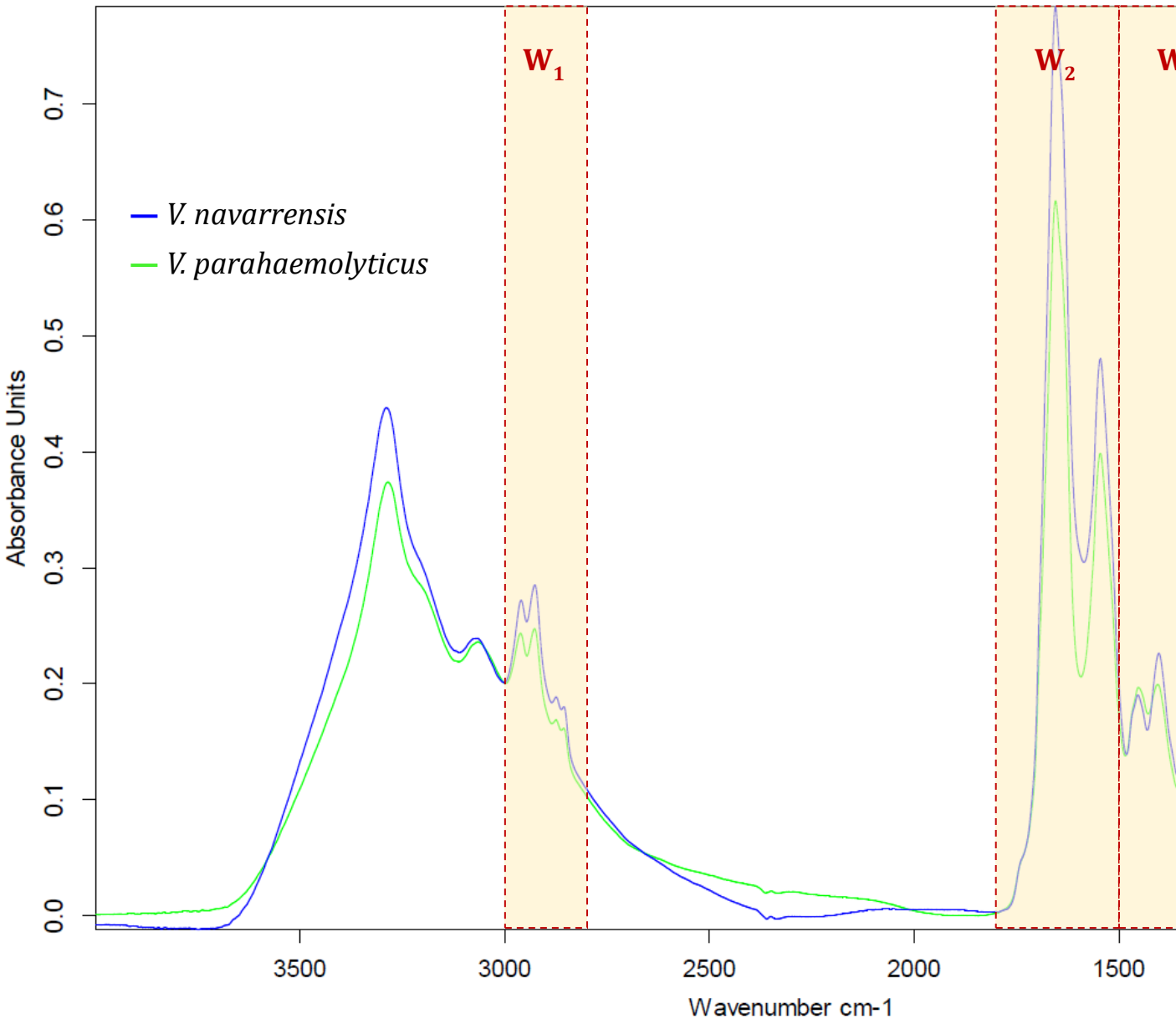

Abbildung 4: IR-Spektren von *Vibrio navarrensis* und *Vibrio parahaemolyticus* mit Markierung der Wellenzahlbereiche zur Identifizierung von Mikroorganismen nach Helm et al.; W_1: 3000-2800 cm^{-1}, W_2: 1800-1500 cm^{-1}, W_3: 1500-1200 cm^{-1}, W_4: 1200-900 cm^{-1}, W_5: 900-700 cm^{-1}

2 Material

2.1 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Agar	BD
Bacillol 25	Bodechemie Hamburg
Bariumchlorid Dihydrat	Merck
Chromagar™ Vibrio	CHROMagar
Eisen(III)-phosphat (geglüht)	

Ethanol	Merck
Hefeextrakt	Difco
Isopropanol	AppliChem
Micropur Forte	Katadyn
Natriumazid	Merck-Schuckardt
Natriumchlorid	Merck
Nickel(II)-chlorid, wasserfrei	Merck-Schuckardt
Formaldehyd-Lösung (>36%)	Sigma
PBS 10x, pH 7,4	Ambion
Pepton	BD
Seewasser, gealtert	BAH Helgoland
Trypton	BD
Wasser MilliQ	
Wasser reinst	

2.2 Technische Geräte

Gerät	**Bezeichnung**	**Hersteller**
Agar-Abfüllmaschine	IQ 2000	Zinsser Analytic
Autoklav	SanoClav	Adolf Wolf
Autoklav	5075 ELV	Tuttnauer
Autoklav	VX 75	Systec
Bechergläser	verschiedene Größen	Duran
Brutschrank 18°C	Incubator CFC Free	Sanyo
Brutschrank 28°C	Incubator	Sanyo
Brutschrank 37°C	Incubator	Sanyo
Bunsenbrenner	Fuego basic	WLD-Tech
Drehinkubator	SP 3 rotator	Stuart
Elektronische Waage	BP 2100 S	Sartorius
Feinwaage	LE 225 D	Sartorius
FTIR-Spektrometer	Tensor 27	Bruker
Gazeabdeckung	-	Eigenbau BAH
Hybridisierungsschrank	OV 5	Biometra
Kompressor	OF302-25+4MD3	JunAir
Kühlraum 8°C	-	Viessmann
Magnetrührer	M22/1	Franz Morat
Microplate Reader	HTS-XT	Bruker
Mikroskop	Hyperion 3000	Bruker
pH-Meter	pH 27	Knick
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	100µl, 1ml, 10ml	Gilson
Pipette	25µl	Eppendorf
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore
SCHOTT-Flaschen	verschiedene Größen	Duran
Schüttler	Promax 1020	Heidolph
Sterilbank	Mars Safety Class 2	Scanlaf

Sterilbank	HERAsafe	Thermo Electron
Transilluminator	UVT 20 M, 312nm	Herolab
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin
Vibrierende Impföse	-	Bruker
Vortexer	Genius 3	IKAVortex
Wasserbad	Typ 3034	Köttermann
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus
ZnSe-Platte	-	Bruker

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	**Bezeichnung**	**Hersteller**
Aluminiumfolie	Gut & Günstig	EDEKA
Autoklavierband	Steam Indicator Tape	3M Comply
Deckgläser	20x20mm	Menzel-Gläser
Einmalküvetten	1,5ml	Brand
Falcon Tubes	15ml, 50ml	Sarstedt
Handschuhe Latex	rotiprotect-LATEX	Roth
Handschuhe Nitril	rotiprotect-NITRIL	Roth
Impfösen	1µl, steril	Sarstedt
Impfösen	1µl, steril	Greiner Bio-One
Objektträger	Polysine™	Menzel-Gläser
Papiertücher fusselfrei	Precision Wipes	Kimberly Clark
Petrischalen	92x16mm	Sarstedt
Petrischalen	35x10mm, steril	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	100µl, 1ml, 10ml	Sarstedt
Safe Lock Tubes	1,5ml	Eppendorf

2.4 Aufbau FTIR-Spektrometer und Zubehör

Zur Durchführung der FTIR-Messungen wurde der folgende Messaufbau von Bruker Optics verwendet.

Abbildung 5: Messaufbau bestehend aus dem FTIR-Spektrometer „Tensor 27“, dem Mikroskop „Hyperion 3000“ und dem Microplate Reader „HTS-XT“(von links nach rechts)

Der Aufbau besteht aus den drei optisch miteinander verbundenen Einheiten „Tensor 27“, „Hyperion 3000“ und dem „HTS-XT“-Microplate Reader. Im FTIR-Spektrometer „Tensor 27“ dient ein Globar zur Generierung des Infrarotstrahls, aus welchem im Interferometer wiederum das Interferogramm erzeugt wird. Das Mikroskop „Hyperion 3000“ ist für die hier durchgeführten Messungen ohne Belang, der Strahl wird in die „HTS-XT“-Einheit weitergeleitet.

Im „HTS-XT“-Microplate Reader trifft der Strahl wahlweise auf einen infrarottransparenten Probenträger im 96-, 384- oder 1536-Well-Format. In den durchgeführten Experimenten wird eine ZnSe-Platte entsprechend dem 96-Well-Format verwendet. Die Positionen der ZnSe-Platte können bei der Messung einzeln angesteuert werden. Nach Durchlaufen der Probe trifft der resultierende Strahl auf einen **r**aum-**t**emperierten **d**euterierten **L**-**A**lanin-**d**otierten **T**ri**g**lycin**s**ulfat (RT-DLaTGS)-Detektor. Das digitalisierte Signal wird zur Auswertung an einen Computer mit der Software OPUS 7.0 weitergeleitet.

Alle drei Geräteeinheiten werden durch einen Kompressor mit Trockenluft bei einer

Durchflussrate von ca. 400l/h gespült. Dies verhindert eine Störung der Probenspektren durch die Infrarotsignatur von Wasser, in Form von Luftfeuchtigkeit im Geräteinneren.

Nach erfolgter Messung wurde die Reinigung der ZnSe-Platte, wie von Bruker Optics empfohlen, mit destilliertem Wasser und Isopropanol durchgeführt. Hierbei wurde

zunächst der Film aus getrockneten Bakterien mit einem fusselfreien, in destilliertem Wasser angefeuchteten Papiertuch von den Probenpositionen abgerieben. Im Anschluss erfolgt ein Reinigen der Platte mit Isopropanol, gefolgt von einem erneuten Spülen mit destilliertem Wasser, um Rückstände von Isopropanol auf der Platte zu entfernen.

2.5 Zelllinien und deren Kultivierung

16 Vibriostämme (siehe Tabelle 1) wurden auf MB (Marine Broth)-Medium bei 18°C kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte 14-tägig. Hierfür wurde je eine Impföse (1µl) Zellmasse auf einer Platte MB-Medium ausgestrichen. Alle neu ausplattierten Stämme wurden über Nacht im Brutschrank zunächst bei 28°C vor-, danach bei 18°C weiterinkubiert. Die einzelnen Zelllinien gehen auf unterschiedliche Quellen zurück – eine Owner Strain ID beginnend mit *HE* verweist beispielsweise auf während Fahrten des Forschungs-schiffs „Heincke“ gesammelte Stämme. Vibrionen mit dem Kürzel *DSM* wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Zur einfacheren und einheitlichen Handhabung wurden innerhalb des Verbundprojektes VibrioNet alle Stämme mit einer VibrioNet-Nummer versehen.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Vibrio-Stämme mit zugehöriger VibrioNet-Nummer und Owner Identification

VibrioNet-Nummer	Owner Strain ID	Vibrio Spezies
VN-2514	SO14	*V. alginolyticus*
VN-2756	SO202	*V. alginolyticus*
VN-0255	MV 66c2	*V. cholerae*
VN-3132	HE-32	*V. cholerae*
VN-3405	AU-105	*V. cholerae*
VN-3811	DSM-2604	*V. diazotrophicus*
VN-3176	HE-76	*V. fluvialis*
VN-3505	AU-209	*V. mimicus*
VN-2580	SO92	*V. navarrensis*
VN-2502	SO2	*V. parahaemolyticus*
VN-3321	AU-21	*V. parahaemolyticus*
VN-3858	V06/002	*V. parahaemolyticus*
VN-3933	43M1c2	*V. parahaemolyticus*
VN-0232	MV 9a3	*V. vulnificus*
VN-3114	HE-14	*V. vulnificus*
VN-3378	AU-78	*V. vulnificus*

2.6 Medienrezepturen

Das zur Kultvierung verwendete MB-Medium setzt sich wie folgt zusammen.

MB- Medium (Marine Broth) fest, pH 7,6	
Pepton	5 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Eisenphosphat (geglüht)	1 Spatelspitze/l
Agar	15,0 g/l
Destilliertes Wasser	0,5 l/l
Seewasser (0,2 µm-gefiltert)	0,5 l/l

Die Anzuchtbedingungen für Mikroorganismen, an denen FTIR-Messungen durchgeführt werden, müssen streng standardisiert sein, da hier die gesamte chemische Zusammensetzung, das Metabolom der Zellen, Einfluss hat. Seewasser, welches in der Rezeptur von MB-Medium enthalten ist, kann in seiner Zusammensetzung – z.B. im Salzgehalt – variieren. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden daher Vibrionen für FTIR-Messungen auf LB-Medium gezüchtet.

LB- Medium (Lysogeny Broth) flüssig/ fest, pH 7,0	
Trypton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l
Agar (für festes LB-Medium)	15,0 g/l
In destilliertem Wasser	

Die Einstellung des jeweiligen pH-Wertes erfolgte mittels Zugabe von NaOH bzw. HCl vor dem Autoklavieren des Mediums (20min bei 121°C). Pro Medienplatte wurden ca. 20ml Medium verwendet. Sowohl Flüssigmedien wie Agarplatten wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 8°C gelagert.

2.7 Lösungen für Fixierungsversuche

Na-Azid-$BaCl_2$-$NiCl_2$-Lösung, pH 7,0-7,5

Natriumazid	100,0 g/l	10%
Bariumchlorid Dihydrat	1,22 g/l	5 mM
Nickel(II)-Chlorid	0,65 g/l	5 mM
In PBS (Phosphate buffered saline)		
Formaldehyd (FA) 4,4%		
In PBS		
Micropur forte-Lösung		
Gesättigte Lösung In PBS		
Ethanol 70%		
In sterilem, destilliertem Wasser (Milli Q)		

3 Methoden

3.1 Fixierungsmethoden im Vergleich

Inhalt der Arbeit war es, potentiell krankheitserregende Vibrionen mittels Infrarotspektroskopie zu identifizieren. Der verwendete FTIR-Aufbau verfügt im Gegensatz zu seinem Vorgängermodell allerdings über keinen gegenüber der Umgebung abgeschlossenen Messträger (siehe Abbildung 6).

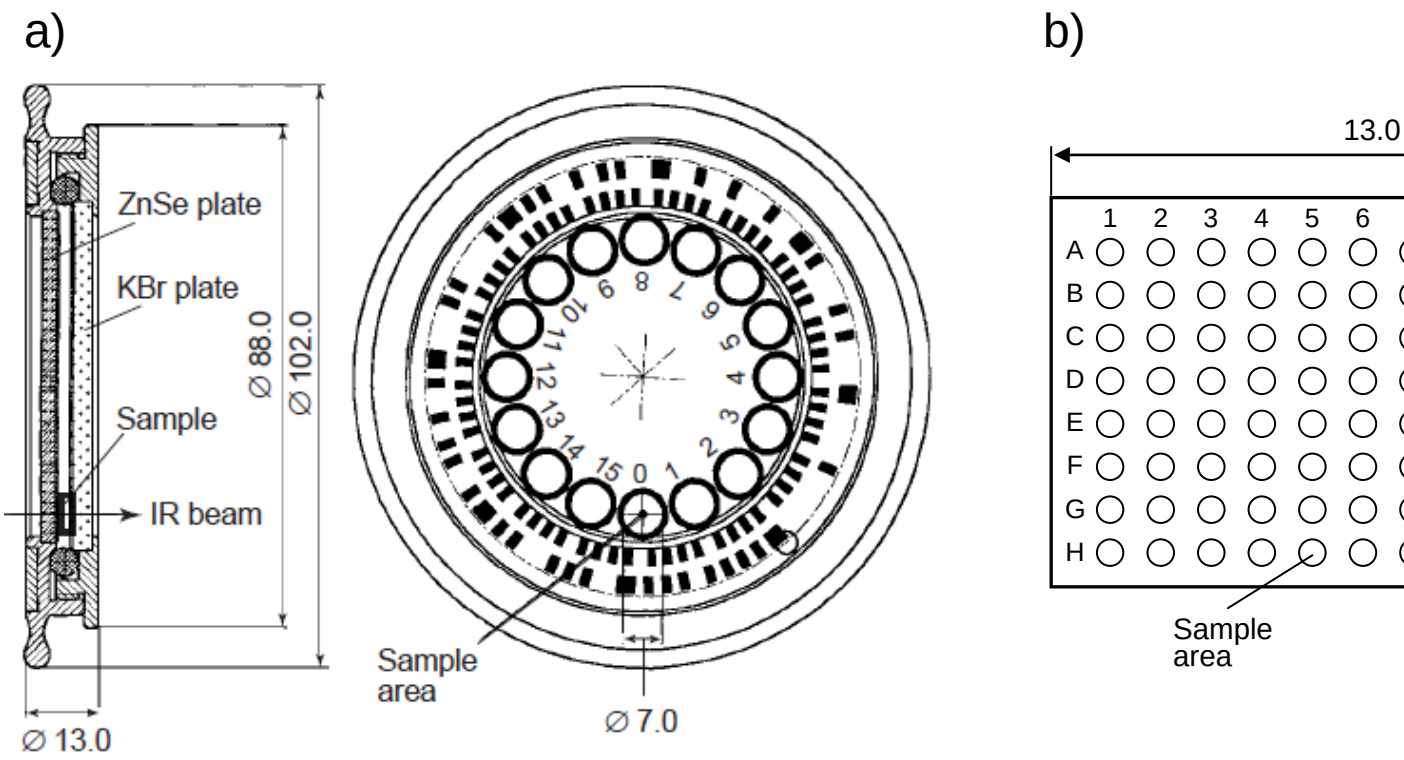

Abbildung 6: Technische Zeichnung des im Vorgängermodell IFS 28/B verwendeten Probenrades (a) (Naumann, 2006) gegenüber der im HTS-XT eingesetzten ZnSe-Platte (b)

Um die Laborsicherheit zu gewährleisten, müssen deshalb mit dem jetzigen Aufbau Pathogene vor der FTIR-Messung abgetötet werden. Wichtig ist dabei, die FTIR-Spektren der Bakterien durch die Fixierung möglichst nicht zu beinträchtigen. Die folgenden sechs Methoden zur Probenfixierung wurden getestet: Eine Natriumazid-Bariumchlorid-Nickelchlorid Lösung, Formaldehyd, Micropur forte – eine handelsübliche Substanz auf Basis von Silberionen zur Konservierung von Trinkwasser, Ethanol, destilliertes Wasser und die Bestrahlung mit UV-Licht. Der für den Menschen unbedenkliche *V. alginolyticus*-Stamm VN 2514 diente hierbei zunächst als Modellorganismus. Im Folgenden werden zunächst drei Fixierungsvarianten beschrieben, bei denen das Fixierungsmittel vor der FTIR-Messung aus der Probe entfernt werden muss. Danach folgt die Beschreibung der Probenpräparation mit destilliertem Wasser und

Ethanol, diese verflüchtigen sich beim Trocknen der Proben. Zuletzt wird auf die Fixierung der Zellen mittels UV-Strahlung auf der ZnSe-Platte eingegangen.

3.1.1 Natriumazid-Bariumchlorid-Nickelchlorid-Lösung, Formaldehyd und Micropur forte

Um die zu untersuchenden Zellen möglichst morphologisch sowie biochemisch stabil zu erhalten, bietet sich die Fixierung mit Natriumazid, einem Inhibitor der Cytochrom-c-Oxidase und damit einem Gift für die Atmungskette aller aeroben Organismen, an. In Kombination mit den Schwermetallen Barium und Nickel hat sich eine Natriumazid-Bariumchlorid-Nickelchlorid-Lösung (je 5mM) sowohl bei aeroben als auch anaeroben Bakterien als Fixierungsmittel bewährt (Gunther, Hubschmarm et al. 2008). Genau wie die ebenso getesteten Fixierungsvarianten mit 4%igem Formaldehyd (Kniggendorf, Gaul et al. 2011) und Micropur forte, verlangt die Probenpräparation bei diesen Chemikalien ein Entfernen der jeweiligen Substanz vor einer FTIR-Messung, um ein ungestörtes Infrarotspektrum zu erhalten. Die *V. alginolyticus*-Zellen wurden daher in den drei Varianten wie folgt behandelt.

Eine 1µl-Öse Zellmasse wurde in 10ml flüssiges LB-Medium überimpft, um für 24h bei 37°C und 6rpm in einem Drehinkubator auf eine optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) von ca. 1 heranzuwachsen. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 100µl Flüssigkultur auf einer LB-Agar-Platte mittels eines Drigalskispatels. Über 16h und bei 37°C wurde ein konfluenter Zellrasen gezüchtet.

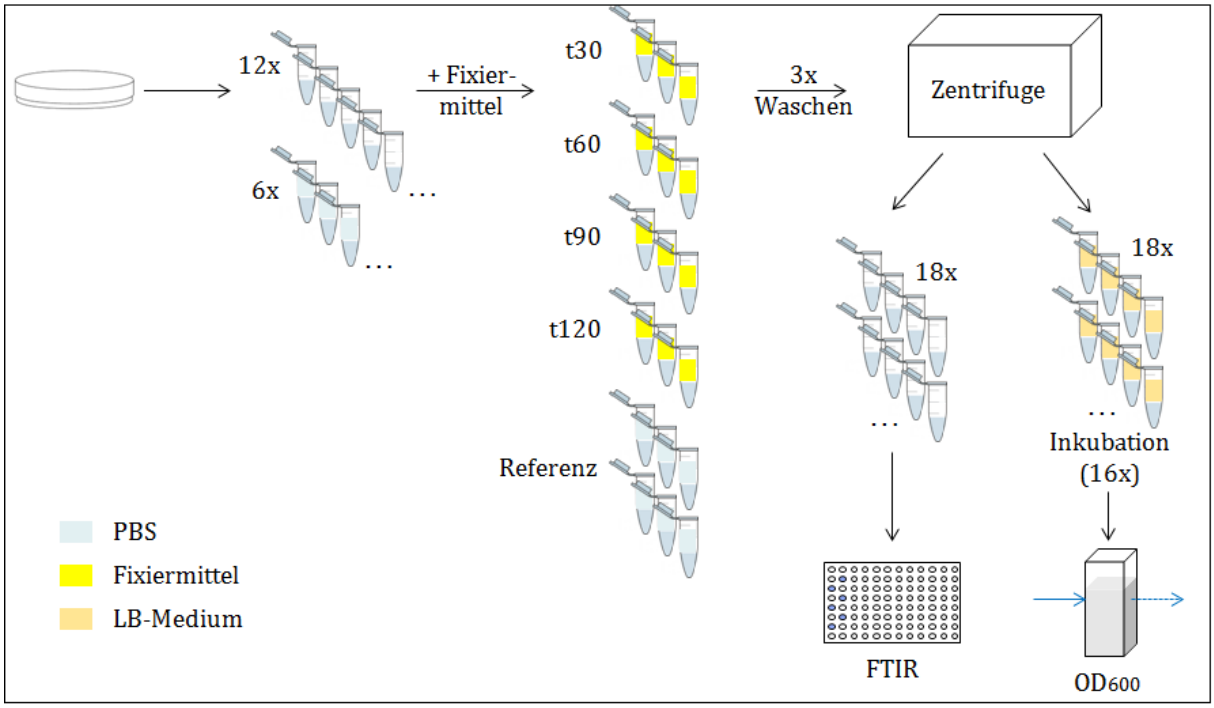

Abbildung 7: Schematischer Versuchsablauf zur Fixierung von *V. alginolyticus* mit Na-Azid-BaCl-NiCl, Formaldehyd oder Micropur forte

Mit der vibrierenden Impföse von Bruker wurde je eine volle Öse *V. alginolyticus* in 12 1,5ml Reaktionsgefäße mit je 100µl PBS sowie in sechs Gefäße mit je 1ml PBS überführt und mit einem Vortexer suspendiert. Zu den 100µl-Ansätzen wurde je 900µl Azid-BaCl-NiCl-Lösung (bzw. FA 4,4% oder gesättigte Micropur forte Lösung) zugegeben. In drei Replikaten wurden die Zellen für 30min, 60min, 90min und 120min inkubiert. Um das Fixierungsmittel zu entfernen, erfolgte ein Abzentrifugieren der Probe, das Abnehmen des Überstandes und zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS bei 1300rpm für 2min. Anschließend wurden die Zellen erneut in 1ml PBS resuspendiert. Sowohl von diesen 12 Proben als auch von den sechs unbehandelten Referenzproben wurden für Wachstums-tests 10µl Suspension zu jeweils 1ml LB-Medium in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert - für FTIR-Untersuchungen wurden die jeweils zurückbleibenden Proben in PBS weiterverwendet.

Die OD_{600} von drei der sechs Referenzproben in LB-Medium wurde umgehend gemessen. Über Nacht fand die Inkubation der restlichen 15 Proben bei 37°C statt. Im Anschluss wurde über eine erneute Messung der optischen Dichte bestimmt, ob eine Erhöhung der Zellzahl während der Inkubation erfolgt hatte. Die Referenzproben dienten hierbei zur Positivkontrolle für Wachstum ohne Behandlung mit Fixativen.

Parallel erfolgte die Messung der FTIR-Spektren. Die verbleibenden Proben in PBS wurden zunächst abzentrifugiert, um anschließend in je 100µl sterilem MilliQ resuspendiert zu werden. Um für die FTIR-Messungen homogene Suspensionen zu erhalten, wurden die Proben in einem Ultraschallbad behandelt und mit Hilfe eines Vortexers gemischt. Analog der Beschreibung des Bruker-Manuals zur IR-Messung von Mikroorganismen (Bruker) wurde auf die ZnSe-Platte je 25µl Probe aufgetragen. Im Hybridisierungsschrank trockneten die Proben bei 40°C für 15±2 min bis nur noch ein trockener Film auf der jeweiligen Probenposition der ZnSe-Platte zurückblieb. Um einer Verunreinigung der Probenplatte mit aufgewirbelten Staub-partikeln vorzubeugen, wurde diese während der Trocknung mit einem speziell angefertigten, mit Nylongaze (250µm) bespannten Aluminiumrahmen abgedeckt.

Die Platte wurde anschließend in den HTS-XT Microplate Reader eingelegt und mit den für Mikroorganismen optimierten und von Bruker im Messexperiment „HTS-microbio.XPM“ vorgegebenen Messparametern vermessen. Demnach wurden je Probenposition 32 Scans im Wellenzahlbereich 400-3000cm^{-1} bei einer Auflösung von 6cm^{-1} durchgeführt und gemittelt. Zur Apodisation wurde die Blackmann-Harris-3-Term-Funktion verwendet.

3.1.2 Ethanol und destilliertes Wasser

Weiterhin wurde getestet ob bereits die standardmäßig von Bruker beschriebene Präparationsmethode mit destilliertem Wasser zur Abtötung von Vibrionen durch Osmolyse genügt. Desweiteren wurde die Fixierung mittels 70%igem Ethanol, wie bereits durch Kniggendorf et al. für die Ramanspektroskopie beschrieben (Kniggendorf, Gaul et al. 2011), geprüft. Beide Varianten haben gemeinsam, dass das Fixierungsmittel – also Wasser oder Ethanol – nicht aus der Probe gewaschen werden muss. Zwar ist jede der Substanzen prinzipiell infrarotaktiv, jedoch verdunsten sie bei der Trocknung des Probenfilms auf der ZnSe-Platte.

Das Züchten eines konfluenten Zellrasens mit *V. alginolyticus* erfolgte analog den in 3.1.1 beschriebenen Versuchen. Anstatt die Zellen zunächst in PBS zu suspendieren, wurde die vibrierende Öse Bakterienmasse direkt in 100µl MilliQ bzw. 70%iges Ethanol überführt. Es wurden jeweils drei Replikate erstellt und diese wie in 3.1.1 beschrieben zu homogenen Suspensionen verarbeitet. Entsprechend den bereits beschrieben

Versuchen wurde die ZnSe-Platte mit je 25µl Suspension beprobt, getrocknet und im FTIR-Spektrometer vermessen.

Von jeder Probe wurden zudem zweimal 10µl abgenommen und in je 1ml LB-Medium pipettiert. Die optische Dichte (OD_{600}) der Hälfte der so erzeugten Suspensionen in LB-Medium wurde sofort gemessen und diente als Ausgangswert für die Wachstums-messung. Die zweite Hälfte der Proben wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 17h wurde die optische Dichte der inkubierten Proben erneut bestimmt.

3.1.3 UV-Bestrahlung

Um Fragen der Behandlung von Trink- und Abwasser zu klären, führten Chang et al. erfolgreich Desinfektionsversuche mit UV-Strahlung an z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhi* durch (Chang, Ossoff et al. 1985). Absorption von UV-Strahlung führt sowohl zu Brüchen der DNA-Doppelhelix (Madigan, Martinko et al. 2006) als auch zu Vernetzung von Mplekülen innerhalb der Zelle und damit zum Tod von Mikroorganismen. Die Eindringtiefe ultravioletter Strahlung in Materie ist aufgrund ihrer kurzen Wellenlänge sehr gering. Ein sterilisierender Effekt tritt daher grundsätzlich nur in UV-transparenten Materialien, an Oberflächen oder dünnen Zellschichten auf. Im Folgenden sollte getestet werden, ob im Fall der FTIR-Messung an dünnen, getrockneten Vibriofilmen UV-Bestrahlung zur Fixierung Wirkung zeigt.

Test der Fixierungseffizienz von UV-Strahlung

Ein konfluenter Zellrasen aus *V. alginolyticus* wurde wie beschrieben erzeugt und entsprechend 3.1.2 eine homogene Zellsuspension in MilliQ hergestellt (dreifaches Volumen).

Auf sieben sterile Deckgläschen wurden je 25µl Probe pipettiert und eine Fläche entsprechend einer Probenposition der ZnSe-Platte benetzt. Zusammen mit den sieben mit Proben versehenen Plättchen wurde ein nicht belegtes Deckgläschen für 20min bei 40°C im Hybridisierungsschrank getrocknet.

Glas ist für ultraviolette Strahlung zu einem großen Anteil intransparent. Deshalb wurden sechs der Deckgläschen mit der Probenseite nach unten auf einem Transilluminator (312nm, 6x8W) aufgelegt. Um einen direkten Kontakt der Proben mit der Oberfläche des UV-Tisches zu vermeiden, wurden die Deckgläschen seitlich durch

Objektträger abgestützt. Die Proben befanden sich also in einem Abstand von ca. 1mm über der Scheibe des Transilluminators. Das siebte mit Probe belegte Deckgläschen wurde nicht bestrahlt. Die Belegungen und Bestrahlungszeiten der Plättchen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bestrahlungszeiten und Belegung der Deckgläser mit *Vibrio alginolyticus*-Suspension

Belegung	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	leer
Bestrahlungs-dauer (min)	5	10	15	20	25	30	-	-

Anschließend wurden die Glasplättchen in Petrischalen mit je 2,5ml flüssigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C unter schwenken (60rpm) inkubiert.

Als Positivkontrolle wurde zusätzlich 25µl Zellsuspension direkt in 2,5ml LB-Medium inokuliert. 1ml der Suspension wurde zur Messung der optischen Dichte entnommen, der Rest der Positivkontrolle zusammen mit den acht Petrischalen inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte wiederum die Messung der optischen Dichte der Proben bei 600nm.

Test des Einflusses der UV-Bestrahlung auf FITR-Spektren

Die Herstellung homogener Vibrio-Suspensionen erfolgte in dreifacher Replikation analog dem Versuch zur Fixierungseffizienz von UV-Strahlung. Je 25µl Suspension wurden wie in Abbildung 8 dargestellt auf die ZnSe-Platte aufgetragen und unter der Gazeabdeckung bei 40°C getrocknet.

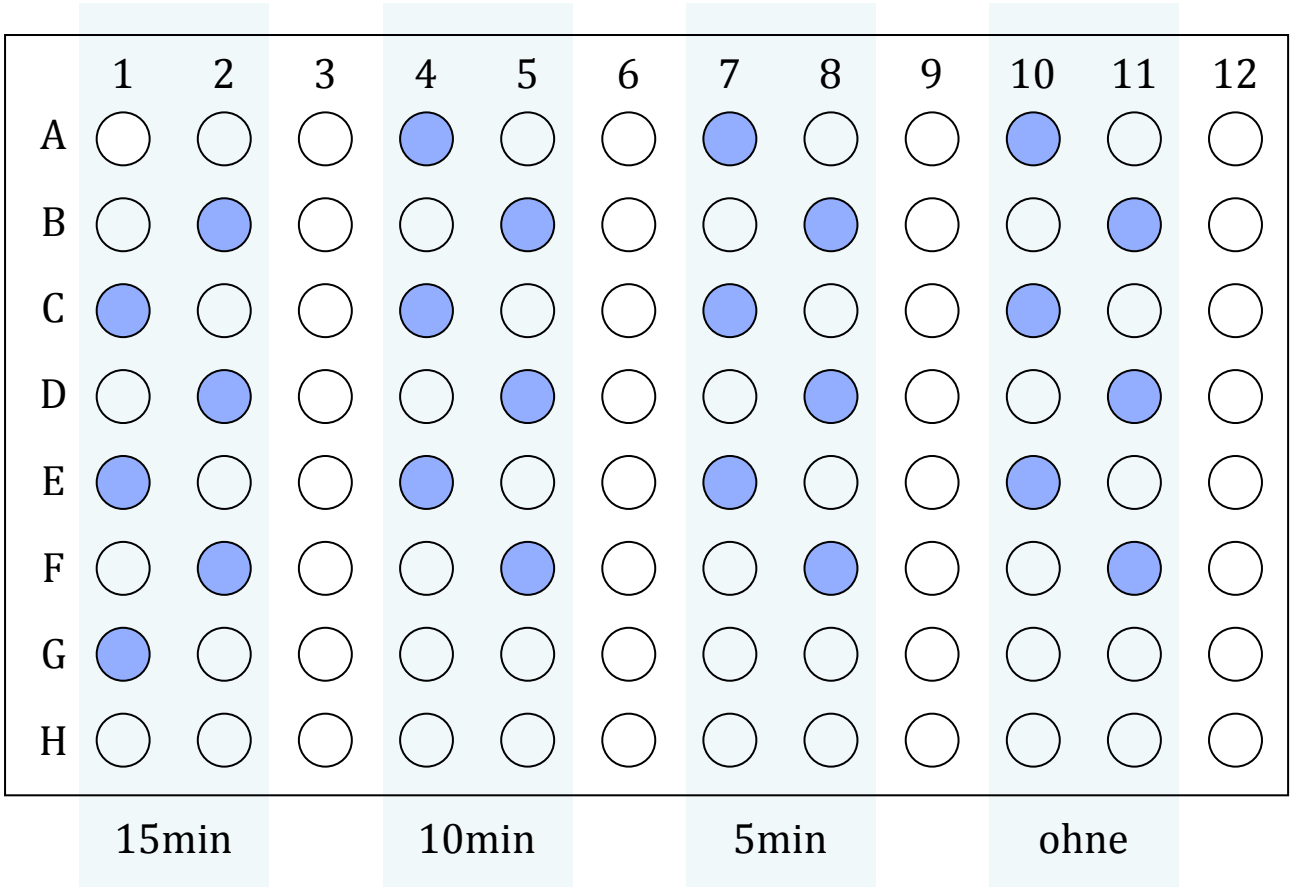

Abbildung 8: Belegung der ZnSe-Platte mit Vibriosuspension und zugehörige UV-Bestrahlungszeiten; Position A1 dient zur Hintergrundmessung, kann daher nicht mit Probe belegt werden.

Die getrocknete Platte wurde mit der Probenseite nach unten, gestützt durch Objektträger auf dem Transilluminator positioniert. Mittels eines Streifens Aluminiumfolie, der sich beweglich zwischen UV-Schirm und ZnSe-Platte befand, waren die Probenpositionen zunächst vor der UV-Strahlung geschützt. In 5min-Intervallen wurde der Streifen abschnittsweise unter der Platte hervorgezogen, so dass je sechs Replikate für die Bestrahlung über 5min, 10min und 15min entstanden. Als Referenz wurden sechs Probenpositionen immer mit Aluminiumfolie bedeckt gehalten – somit keiner UV-Strahlung ausgesetzt.

Entsprechend den bereits beschriebenen Versuchen wurde die FTIR-Messung der ZnSe-Platte im HTS-XT Microplate Reader durchgeführt.

3.1.4 Kontrolle an potentiell pathogenen *Vibrio*-Stämmen

Die effizienteste Fixierungsmethode mit den geringsten Auswirkungen auf das Infrarotspektrum wurde an drei potentiell pathogenen *Vibrio*-Stämmen auf Fixierungswirksamkeit geprüft. Hierfür wurden VN 3132 (*V. cholerae*), VN 2502 (*V. parahaemolyticus*) und VN 3114 (*V. vulnificus*) herangezogen. Die Probenpräparation und Messungen der optischen Dichte erfolgten analog der mit *V. alginolyticus* durchgeführten Versuche.

3.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie

16 verschiedene Stämme aus 8 Vibriospezies (siehe Tabelle 1) wurden im Rahmen dieser Arbeit FTIR-spektroskopisch vermessen. Unter Verwendung einer Clusteranalyse wurde untersucht, in wieweit Unterscheidungen der resultierenden Spektren auf Stamm- bzw. Artebene möglich sind.

3.2.1 Assay zur standardisierten Aufnahme von FTIR-Spektren an Vibrionen

Damit an Mikroorganismen gemessene FTIR-Spektren reproduzierbar und untereinander vergleichbar werden, sind streng standardisierte Bedingungen zur Probenpräparation unabdingbar (Naumann 2006). Daher wurde diese für die Messung der 16 Vibriostämme soweit möglich in Anlehnung an das Bruker Manual „IR Spectroscopic Analysis of Microorganisms“ durchgeführt (Bruker).

Wie von Bruker vorgeschrieben wurde ein konfluenter Zellrasen des zu untersuchenden Stamms gezüchtet. Es wurde dabei nach der in den Fixierungsversuchen bewährten Weise vorgegangen: 100µl einer 24h-Flüssigkultur wurden auf LB-Agar ausplattiert und über 16h bei 37°C inkubiert.

Mit Hilfe der vibrierenden Impföse wurde eine Öse Bakterienmaterial von der Platte abgenommen und in 100µl steriles MilliQ gegeben. Um bei allen untersuchten Vibriostämmen eine homogene Suspension zu erreichen, stellte sich als zielführend heraus, die Probe zweimal hintereinander zuerst 2min im Ultraschallbad und anschließend 20s im Vortexer zu behandeln.

Je Probe wurden 25µl der Suspension unter der Sterilbank auf zwei Positionen der ZnSe-Platte aufgetragen. Die Beprobung erfolgte doppelt, um im Fall von z.B. potentiell entstehenden Trocknungsfehlern wie Rissen, ungleichmäßiger Trocknung oder Inhomogenitäten in der Probe eine zweite Möglichkeit zur FTIR-Messung zu besitzen.

Bei 40°C wurde die mit Probe versehene ZnSe-Platte für 34±1min unter der Gaze-abdeckung getrocknet.

Die Probenfixierung erfolgte analog der Beschreibung im Versuch zur UV-Fixierung über 10±1min auf dem Transilluminator.

Im HTS-XT Microplate Reader wurde die ZnSe-Platte mit den Parametern aus „HTSmicrobio.XPM“ vermessen. Es wurde darauf geachtet, dass die Trockenluftspülung der Messapparatur mindestens eine Stunde Vorlaufzeit besaß, um in Form von Luft-feuchtigkeit ins Geräteinnere eingedrungenen Wasserdampf zu entfernen.

In Tabelle 3 sind die einzelnen Schritte der Probenpräparation kompakt zusammen-gefasst.

Tabelle 3: Kurzübersicht der Prärationsschritte zur FTIR-Messung an Vibrionen

	Schritt	**Parameter**
1.	Herstellung **Flüssigkultur**	24h bei 37°C, LB-Medium flüssig
2.	Wachstum **konfluenter Zellrasen**	16h bei 37°C, LB-Medium fest
3.	**Überimpfung** in 100µl MilliQ	1 Öse Zellmaterial
4.	Herstellung homogene **Suspension**	2x (2min Ultraschallbad & 20s Vortexer)
5.	Zweifache **Auftragung** auf ZnSe-Platte	Je 25µl
6.	**Trocknung** im Hybridisierungsofen	34min bei 40°C
7.	**UV-Fixierung** der Proben	10min
8.	**FTIR-Messung**	Nach „HTSmicrobio.XPM“

3.2.2 Auswahl von Referenzspektren

Um die spektrale Variabilität eines Mikroorganismus zu erfassen, müssen für jeden Stamm mindesten 5-10 Spektren vorliegen, die in unabhängigen Messungen unter standardisierten Bedingungen aufgenommen wurden (Bruker). Für die Vermessung der 16 Vibriostämme bedeutete dies, dass in einem Zeitraum von vier Wochen 10-20 Probenpräparationen je Stamm durchgeführt wurden. Für jedes Replikat wurde eine separate LB-Agar-Platte mit konfluentem Rasen des jeweiligen Stammes gezüchtet, um die größtmögliche Unabhängigkeit der Stammmessungen zu gewährleisten.

Alle so gemessenen FTIR-Spektren wurden im Anschluss einem Qualitätstest unterzogen. Ähnlich wie die 1991 von Helm et al. definierten Qualitätskriterien (Helm, Labischinski et al. 1991) sind im von Bruker weiterentwickelten Qualitätstest zur FTIR-Messung von Bakterien „bacteria.qt“ Grenzwerte u.a. für die maximale Absorption, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und den Wassergehalt der Proben vorgegeben (Bruker). Spektren die diesen Qualitätsanforderungen nicht entsprechen, wurden nicht weiter in die Betrachtung einbezogen. Eine Übersicht der Kriterien ist in Tabelle 4 gegeben.

Tabelle 4: Grenzwerte des Qualitätstests “bacteria.qt“

Spektralbereich (cm^{-1})	**Kriterium**	**Grenzwert**
2300 – 2000	Interferenzen	≤ $2{,}0 \times 10^{-4}$ AU
2100 – 1600	Absorption	≥ 0,2 AU; ≤ 2,0 AU
2100 – 2000	Rauschen	≤ $1{,}5 \times 10^{-4}$ AU
1847 – 1837	Wasserdampf	≤ $3{,}0 \times 10^{-4}$ AU
1700 – 1600	Signal/Rauschen Signal/Wasser	≥ 150 ≥ 100
1200 – 960	Signal/Rauschen Signal/Wasser	≥ 40 ≥ 20

In einem zweiten Schritt wurden nun die resultierenden Spektren eines jeden Stammes mit Hilfe einer Clusteranalyse untereinander verglichen, um Ausreißer zu detektieren und diese eventuell aus dem Datensatz zu entfernen.

3.2.3 Clusteranalyse

Für die Clusteranalyse wurden die Spektren vektornormiert, um unterschiedliche Schichtdicken der Proben auszugleichen, die z.B. während der Probentrocknung oder durch variierende Ausgangszellzahlen entstehen können. Eine Betrachtung der zweiten Ableitungen der Einzelspektren ist sinnvoll, da zur Untersuchung der Ähnlichkeit zwischen Spektren nicht in erster Linie die absolute Höhe eines Peaks ausschlaggebend ist, sondern vor allem dessen Form - also die relativen Unterschiede zwischen Wellenzahlbereichen, die auf eine unterschiedliche Stoffzusammensetzung hindeuten. Bei der Erzeugung der Cluster fand der Ward‘s Algorithmus Anwendung.

Die fünf von Helm et al. definierten Wellenzahlfenster zur Charakterisierung der Infrarotspektren von Mikroorganismen (siehe 1.2.3) wurden zur Clusteranalyse der selektierten Referenzspektren aller gemessenen Vibriostämme herangezogen. Die vektornormierten zweiten Ableitungen der Spektren wurden auf Ähnlichkeit in den Einzelfenstern getestet sowie in Kombination der Fenster untereinander. Hierdurch wurde ermittelt, in wie weit sich die unterschiedlichen Vibriostämme mittels Infrarotspektroskopie unterscheiden lassen.

4 Ergebnisse

4.1 Fixierungsmethoden im Vergleich

4.1.1 Fixierungseffizienz der verschiedenen Methoden an *Vibrio alginolyticus*

Im Kontrast zu den jeweils durchgeführten Positivkontrollen zeigten Proben, die mit Formaldehyd (4%), Micropur-forte-Lösung, Ethanol (70%) oder UV-Strahlung behandelt wurden, keine Steigerung der optischen Dichte nach der Inkubation. Die konstante optische Dichte vor und nach der Inkubation bei 37°C in LB-Medium zeigte eine stagnierende Zellzahl an, es erfolgte demnach kein Wachstum. Diese wachstumshemmende Wirkung zeigte sich hierbei über alle getesteten Inkubationszeiten im Fixiermittel bzw. über alle durchgeführten Bestrahlungszeiten. Auch bei der Probe, die auf einem Deckgläschen bei 40°C getrocknet, aber nicht UV-bestrahlt wurde, war kein Wachstum messbar. Möglicherweise genügte allein die Trocknung der *V. alginolyticus*-Zellen zur Fixierung.

Zellen, die mit Natriumazid-BaCl-NiCl-Lösung oder Destilliertem Wasser behandelt wurden, wiesen nach der Inkubation in LB-Medium Wachstum auf. Dies gilt für alle durchgeführten Behandlungsdauern. Die von Bruker standardmäßig für Mikroorganismen beschriebene Methode der Probenpräparation in destilliertem Wasser genügt demnach nicht um potentiell pathogene Vibrionen unschädlich zu machen.

In Tabelle 5 ist die Auswirkung der jeweiligen Fixierungsmethode auf das Wachstum von *V. alginolyticus* zusammengefasst.

Tabelle 5: Einfluss der unterschiedlichen Fixierungsmethoden auf das Wachstum von *V. alginolyticus*

Fixiermittel	Wachstum nach Inkubation
Na-Azid-BaCl-NiCl	**Ja**
Formaldehyd 4%	**Nein**
Micropur forte	**Nein**
Destilliertes Wasser	**Ja**
Ethanol 70%	**Nein**
UV-Strahlung	**Nein**

4.1.2 Einfluss der Fixierungsvarianten auf FTIR-Spektren

Die Replikate (n=3 bzw. n=6 bei UV-Bestrahlung) der gemessenen FTIR-Spektren zu bestimmten Fixierungsdauern wurden in Mittelwertspektren zusammengefasst. In

Abbildung 9 ist die für jede Fixierungsmethode beispielhaft eines der Mittelwert-spektren dargestellt. Als Kontrolle ist die Standard-Probenpräparation in destilliertem Wasser (n=6) aufgetragen. Für FA, Micropur forte und UV-Bestrahlung wurden niedrige Fixierungszeiten ausgewählt, da diese Methoden bereits bei diesen Zeiten hohe Wirksamkeit zeigten. Der Ansatz zur Fixierung mit Natriumazid-BaCl-NiCl wies auch nach 2h Einwirkzeit keine signifikante Wachstumshemmung auf, als Beispielspektrum wurde deshalb hier die Probe mit der höchsten Fixierdauer gewählt.

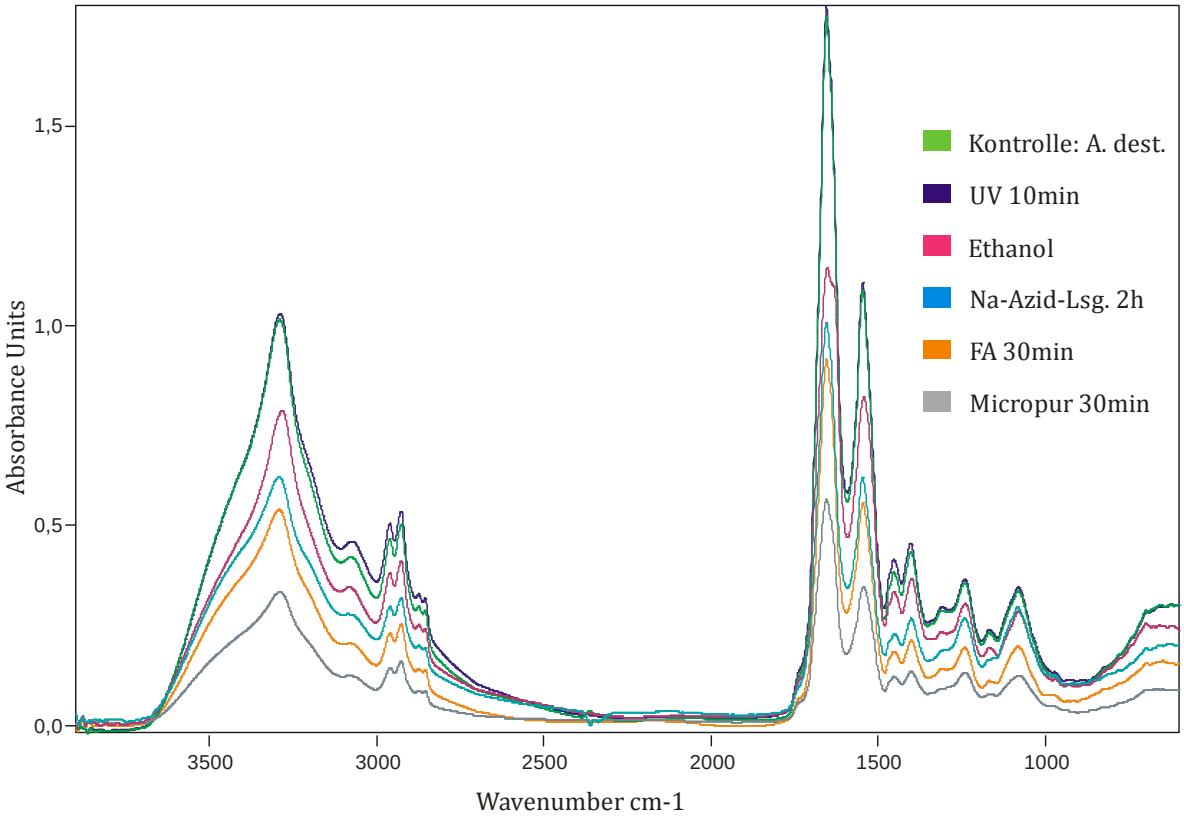

Abbildung 9: Ausgewählte FTIR-Mittelwertspektren von *V. alginolyticus* nach Behandlung der Proben mit verschiedenen Fixierungsmitteln

Bereits in den unbehandelten Originalspektren sind deutliche Unterschiede in der Form der Kurven zu beobachten. So zeigt sich der Amidpeak I (~1650cm^{-1}) bei Ethanol und bei Micropur forte hin zu kleineren Wellenzahlen verbreitert. Auch in der Polysaccharid-region, sind abweichende Kurvenverläufe erkennbar. Hier weist vor allem Natriumazid bei ca. 1200cm^{-1} einen im Gegensatz zur Kontrolle verschieden geformten Peak auf.

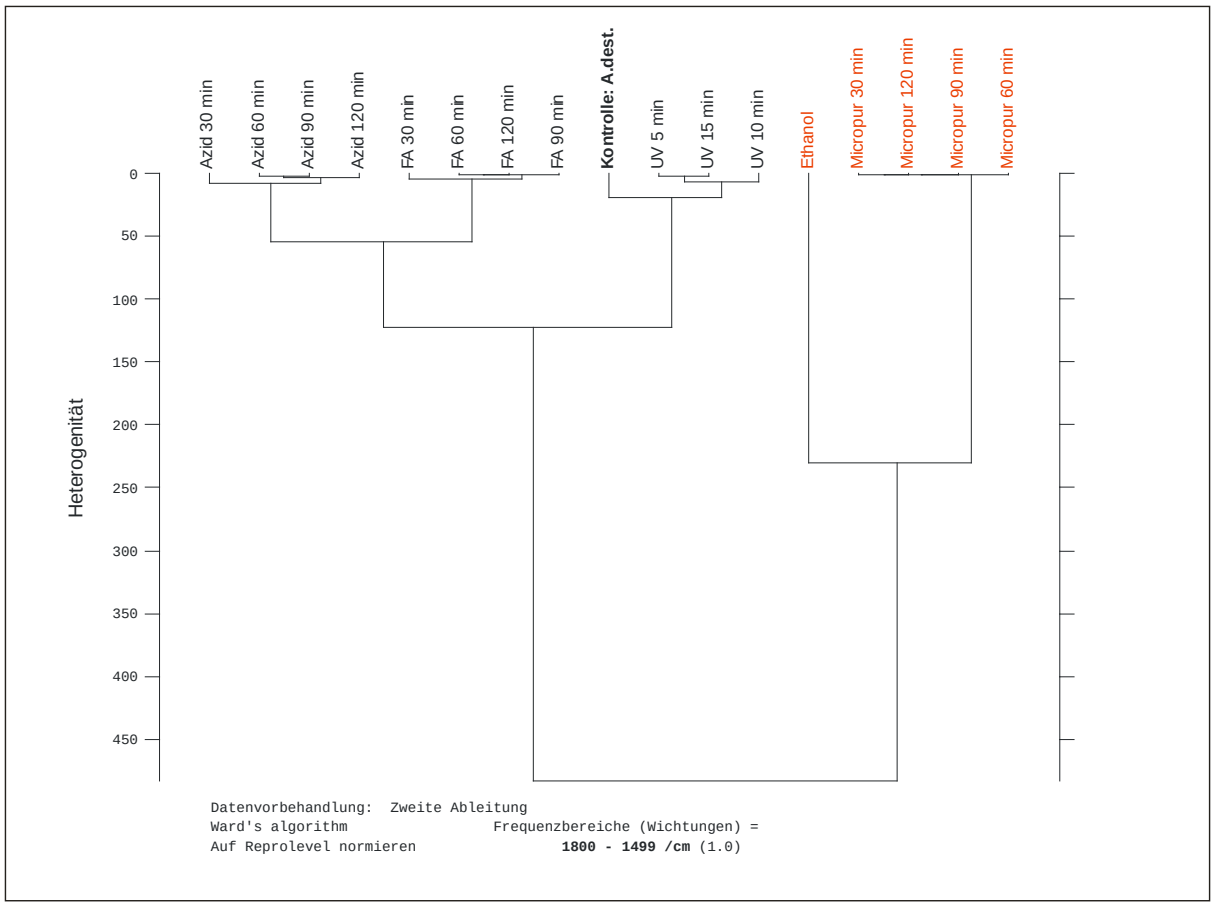

Abbildung 10: Clusteranalyse über die Amidregion W_2 an FTIR-Spektren der unterschiedlichen Fixierungsvarianten an *V. alginolyticus*

Clusteranalysen über den Amid- und den Polysaccharidbereich der zweiten Ableitungen der Mittelwertspektren bestätigen diese Beobachtungen. In den Dendrogrammen der Clusteranalyse ist die Heterogenität zwischen den Clustern als Maß der Unähnlichkeit aufgetragen. Spektren mit einer Heterogenität von 0 sind demnach identisch.

In Abbildung 10 wird deutlich, dass sich die Spektren von mit Ethanol oder Micropur forte behandelten Zellen in der Amidregion W_2 merklich abheben. Sie trennen sich bei einem Heterogenitätslevel von ca. 470 von den übrigen Spektren.

Die Clusteranalyse über das Polysaccharidfenster W_4 (Abbildung 11) zeigt, dass sich in diesem Spektralbereich – wie erwartet – Zellen, die mit der Na-Azid-BaCl-NiCl-Lösung behandelt wurden stark von der Kontrolle absetzen. Allerdings weisen hier auch die Spektren aus den Versuchen mit Micropur forte und Formaldehyd deutliche Unterschiede gegenüber den Spektren der mit destilliertem Wasser behandelten Zellen auf.

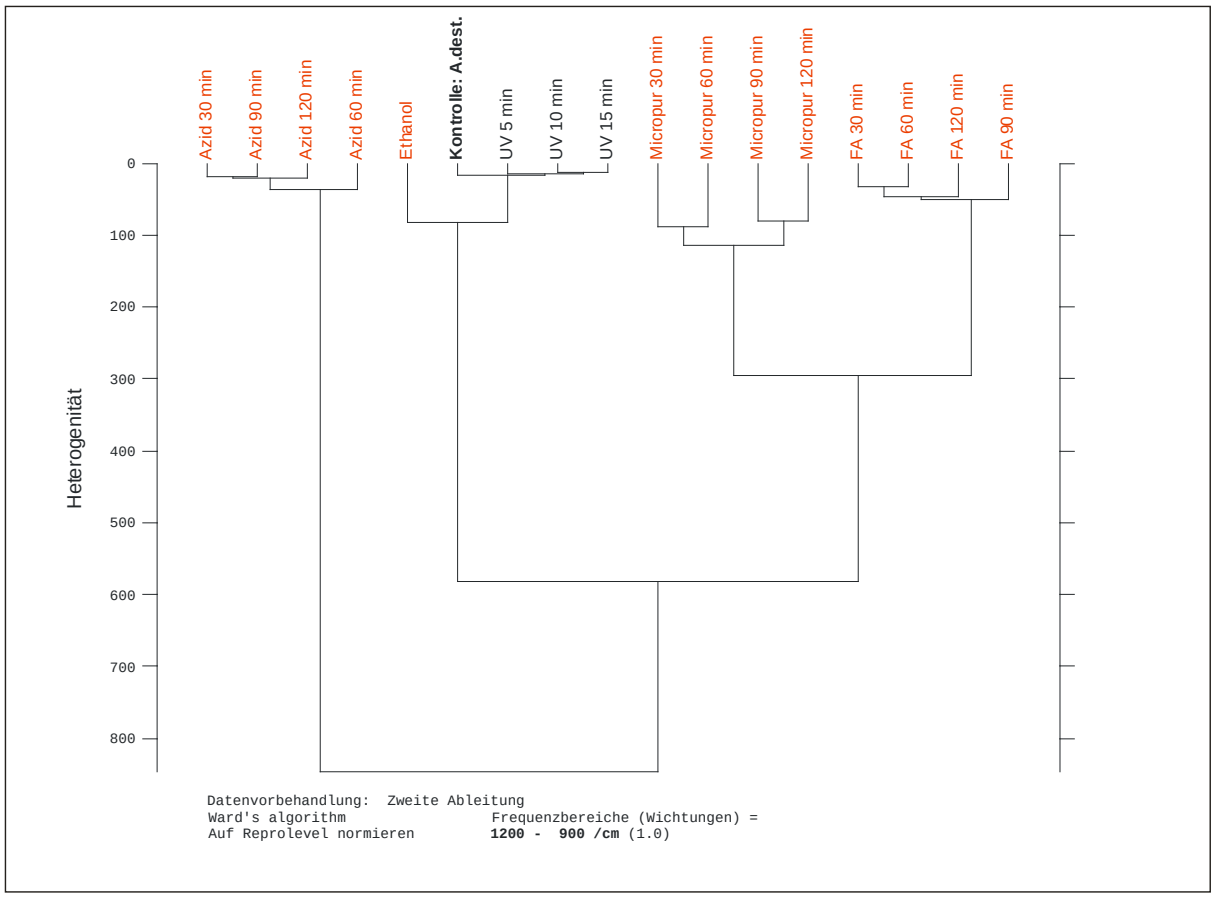

Abbildung 11: Clusteranalyse über die Polysaccharidregion W_4 an FTIR-Spektren der unterschiedlichen Fixierungsvarianten an *V. alginolyticus*

Abschließend wurde eine Clusteranalyse über alle fünf Wellenzahlbereiche W_1-W_5, die für die spätere Charakterisierung der unterschiedlichen Vibriostämme verwendet wurden, durchgeführt. Es ist wichtig, dass die Spektren der Vibrionen in diesen Fenstern möglichst wenig Information durch die Fixierung verlieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 gezeigt. Wie bereits in den zwei Analysen über den Amid- und den Polysaccharidbereich, weisen auch hier die Spektren, die aus den UV-Fixierungs-versuchen resultieren die größte Ähnlichkeit zur Kontrolle mit destilliertem Wasser auf.

Da die UV-Bestrahlung zur Fixierung von *V. alginolyticus*-Proben - bei hoher Fixierungseffizienz - die FTIR-Spektren in den fünf benötigten Wellenzahlfenstern am geringsten beeinflusste, wurde diese Methode an drei pathogenen Vibriovertretern auf Wirksamkeit geprüft.

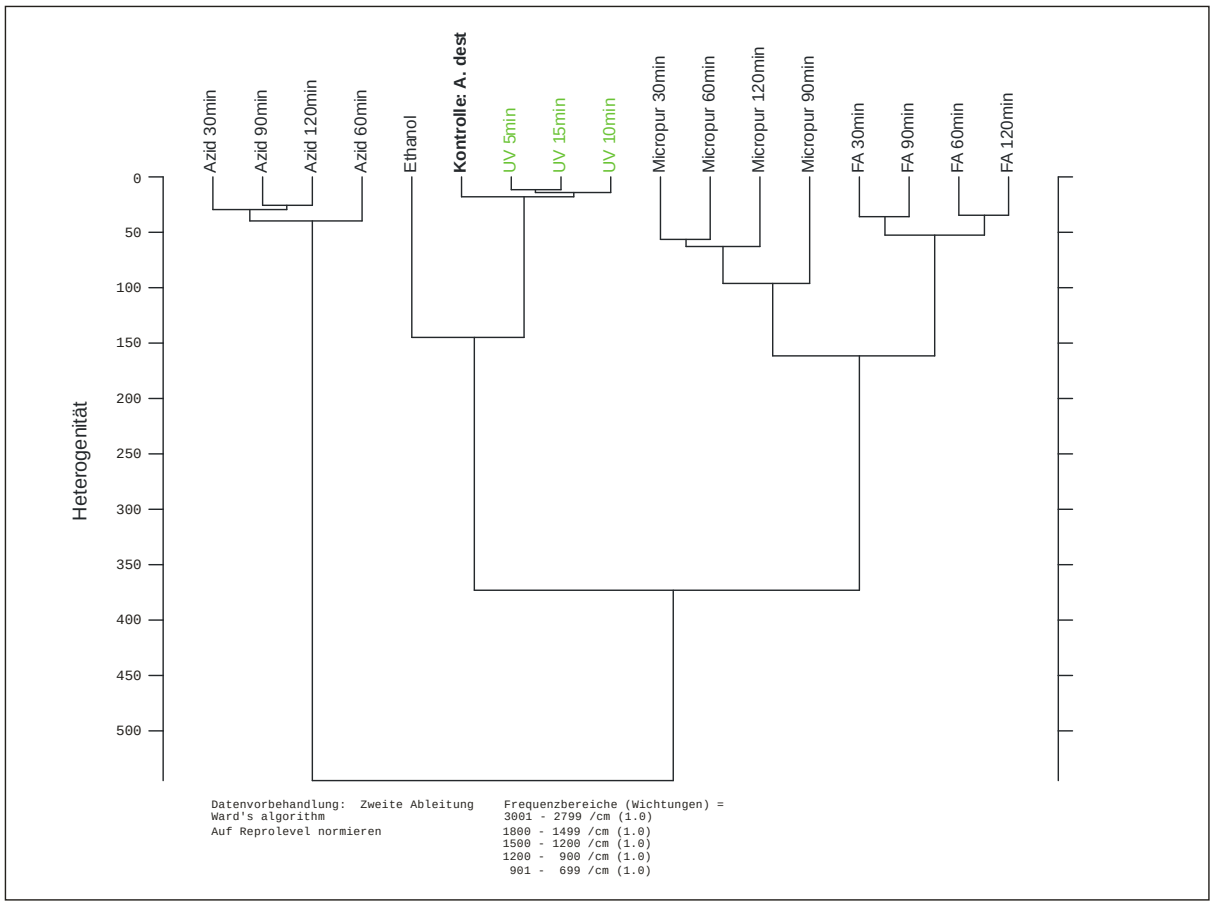

Abbildung 12: Clusteranalyse über die Wellenzahlbereiche W_1-W_5 der FTIR-Spektren von *Vibrio*-Proben der durchgeführten Fixierungsversuche

4.1.3 UV-Fixierung von potentiell pathogenen *Vibrio*-Spezies

In Abbildung 13 sind die optischen Dichten der potentiell pathogenen Vibriostämme VN3132 (*V. cholerae*), VN2502 (*V. parahaemolyticus*) und VN3114 (*V. vulnificus*) aus den UV-Bestrahlungsversuchen nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C in LB-Medium dargestellt. Zum Vergleich wurde unter der Bezeichnung „Start“ der jeweilige Ausgangswert der OD_{600} vor der Inkubation in die Graphik eingefügt.

Die Proben, die zwar im Hybridisierungsofen getrocknet und anschließend in Medium inkubiert aber nicht UV-bestrahlt wurden, wiesen im Fall von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* eine deutliche Steigerung der optischen Dichte auf. Um hier die optische Dichte messen zu können, wurden die Proben zunächst mit 1ml LB-Medium verdünnt. Selbst nach dieser Verdünnung lag die angezeigte OD in beiden Fällen noch über 2,0 – also über dem linearen Bereich der Messung. Die unbestrahlte Probe von *V. vulnificus* hingegen zeigte nur eine geringfügig höhere optischen Dichte

(OD_{600}=0,139±0,003) gegenüber dem Ausgangswert vor der Inkubation (OD_{600}=0,109±0,003).

Die optischen Dichten der Proben mit inkubierten, UV-bestrahlten Vibrionen waren über alle Fixierungsdauern hinweg kleiner oder gleich dem Startwert vor der Inkubation. Eine Vermehrung der Zellen hat demnach bei allen drei pathogenen Stämmen nach UV-Bestrahlung nicht mehr stattgefunden.

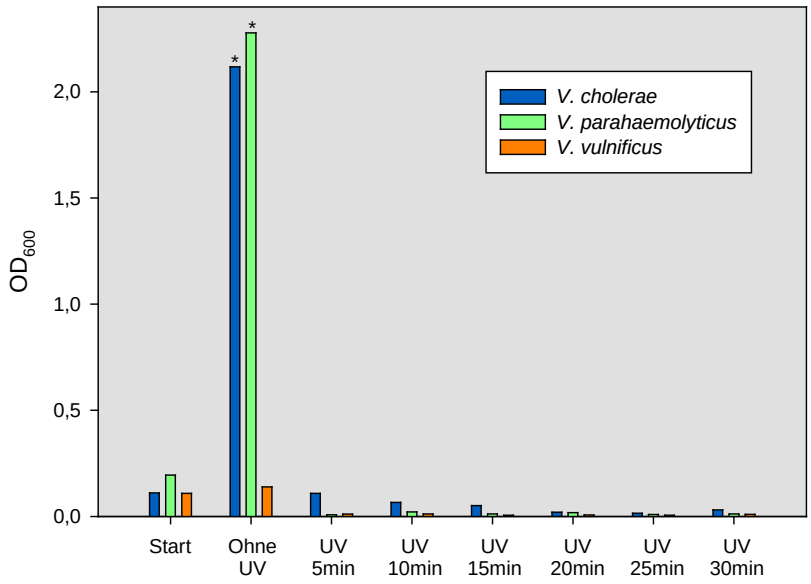

Abbildung 13: Wachstum dreier potentiell pathogener Vibrioproben nach unterscheidlichen UV-Bestrahlungszeiten: OD_{600} vor („Start“) und nach der Inkubation in LB-Medium, *optische Dichte nach Verdünnung der Probe

4.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie

Um je Stamm mindestens 5 Replikate zu erhalten, die den in 3.2.2. definierten Qualitätsanforderungen entsprechen, wurden die einzelnen Stämme über einen Zeitraum von vier Wochen bis zu 20 Mal präpariert und vermessen. Häufigste Ursache für das Nichtbestehen des Qualitätstests war hierbei das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Spektralbereich 1700-1600cm^{-1}. Bei den drei *V. vulnificus*-Stämmen trat im selben Wellenzahlabschnitt zudem in ca. 50% der Messungen ein zu niedriges Signal-zu-Wasser-Verhältnis auf. Dies scheint für *V. vulnificus* spezifisch zu sein. *V. vulnificus*-Spektren, die in mehreren, oder anderen Kriterien als Signal-zu-Rauschen oder dem Signal-zu-Wasser-Verhältnis die Qualitätsanforderungen nicht erreichten, wurden aus dem Datenpool entfernt, die Restlichen in die Ausreißeranalyse mit eingeschlossen. Im

Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Clusteranalysen über die resultierenden Vibriospektren in den einzelnen Wellenzahlbereichen, anschließend in Kombinationen verschiedener Wellenzahlabschnitte untereinander gezeigt.

4.2.1 Analyse der Spektren in den Wellenzahlfenstern W_1-W_5

In Abbildung 14 ist das Dendrogramm, welches aus der Clusteranalyse über den Wellenzahlbereich W_1 – also die Fettsäureregion - resultiert, dargestellt. Die Spektren mit der größten Abweichung in diesem spektralen Bereich trennen sich auf einem Heterogenitätslevel von ca. 270 von den übrigen Spektren. Die Größenordung der Heterogenitäten bei der Betrachtung in diesem Wellenzahlabschnitt ist vergleichsweise gering. Eine Clusterung in die jeweiligen Stämme ist nur vereinzelt oder ansatzweise zu beobachten. So tritt innerhalb der Stämme VN 3811 (*V. diazotrophicus*) und VN 3405 (*V. cholerae*) die Formung von vollständigen Clustern auf. Die Spektren von beispielsweise VN 3378 (*V. vulnificus*) gruppieren sich in ähnlichen Zweigen des Dendrogramms. Bei der Mehrzahl der Spektren übersteigt jedoch die Variabilität innerhalb des Stamms die Unterschiede zwischen den Stämmen. Eine Identifizierung der einzelnen Vibriostämme auf Basis der Infrarotsignatur in der Fettsäureregion ist also nicht möglich.

In der Clusteranalyse über das Wellenzahlfenster W_2, der Amidregion, zeigt sich insgesamt eine deutlich höhere Herterogenität der Spektren als in Fenster W_1 (siehe Abbildung 15). Eine klare Clusterung der einzelnen Stämme bleibt allerdings ebenfalls aus. Die Spektren teilen sich in zwei große Blöcke auf, die sich bei einer Heterogenität von ca. 700 trennen. Der in der Graphik untere Block beinhaltet den Großteil der Spektren von *V. fluvialis* und *V. alginolyticus*. Im oberen Block kann eine ansatzweise Gruppierung der *V. vulnificus*-Stämme VN 0232 und VN 3378 beobachtet werden. Desweiteren fallen der überwiegende Teil der Spektren von *V. cholerae* VN 0255 und VN 3405 zusammen mit *V. mimicus* in ein Cluster.

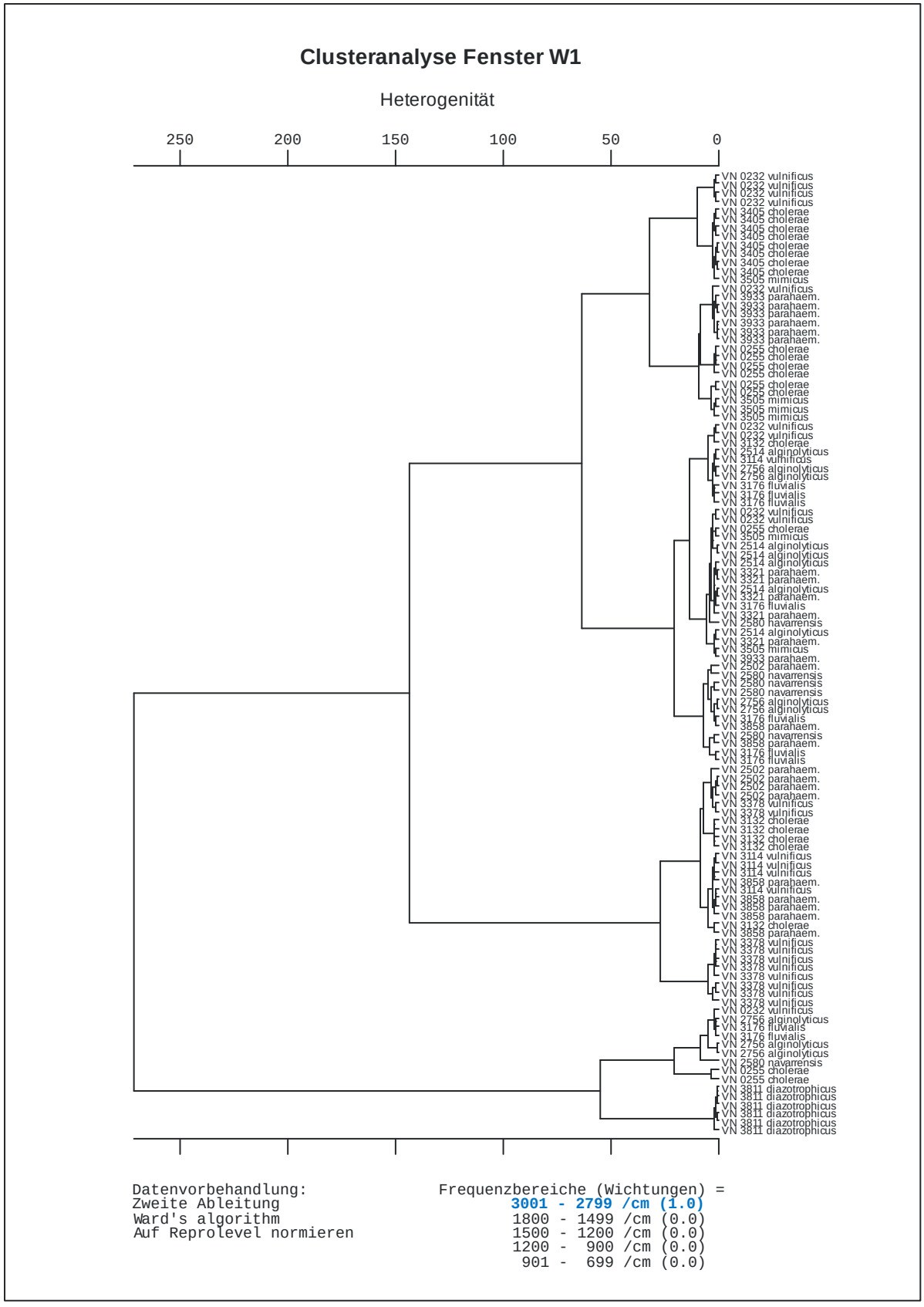

Abbildung 14: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Fettsäureregion W_1

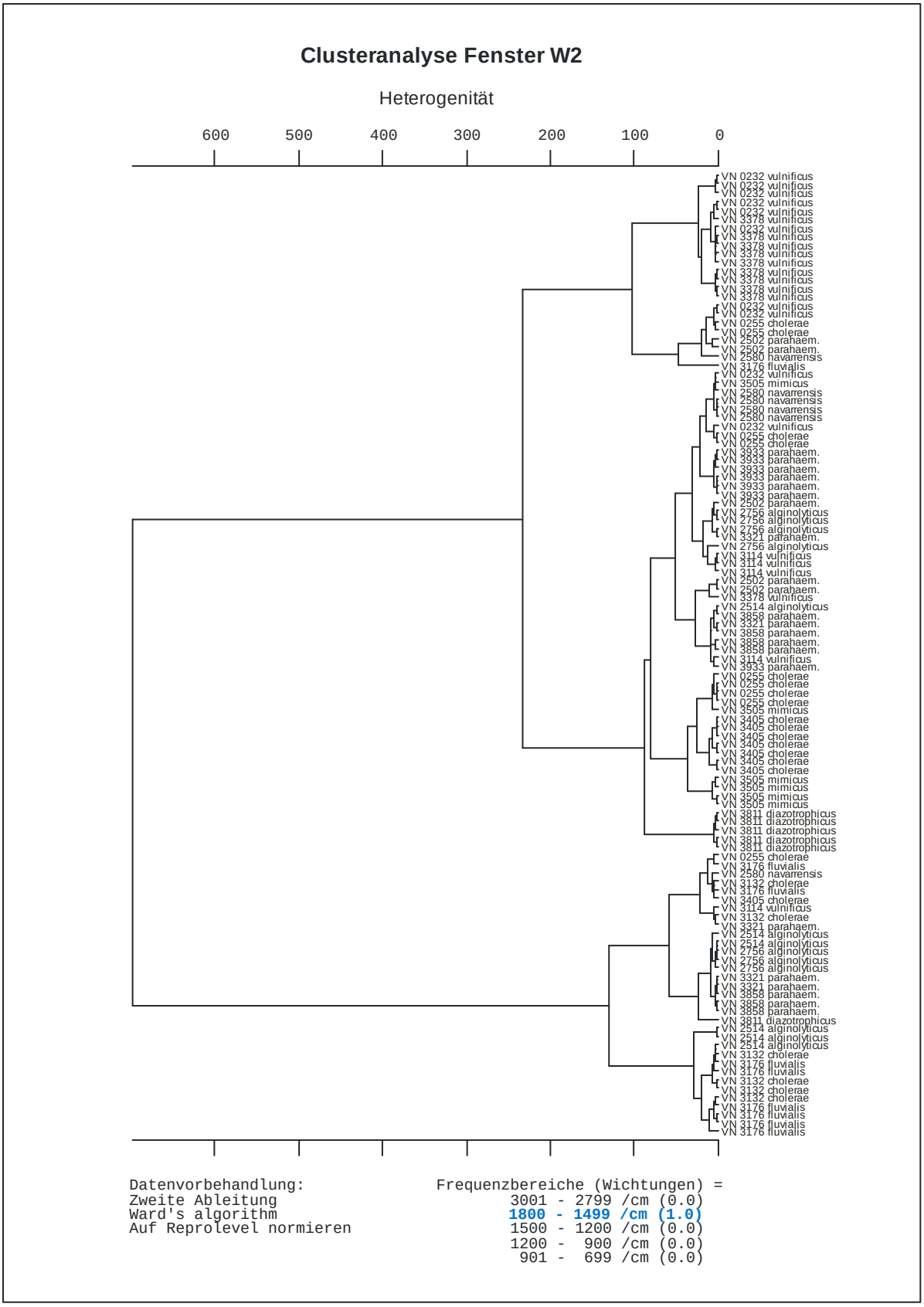

Abbildung 15: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Amidregion W_2

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse im Wellenzahlabschnitt W_3. In der Analyse über diese „Mixed Region“ lassen sich ebenfalls zwei Hauptblöcke ausmachen. Innerhalb dieser Hauptzweige erfolgt, außer in Einzelfällen, keine klare Clusterung auf Stammebene. Allerdings befinden sich alle Spektren der Stämme VN 2514 (*V. alginolyticus*), VN 3811 (*V. diazotrophicus*) und VN 3176 (*V. fluvialis*) im unteren Block, während die Spektren von VN 2580 (*V. navarrensis)*, VN 3505 (*V. mimicus)*, VN 3405 (*V. cholerae*) und bis auf ein Einzelspektrum alle *V. vulnificus*-Stämme im oberen Block angesiedelt sind. Im Gegensatz dazu verteilen sich z.B. die Spektren des *V. cholerae*-Stammes VN 0255 über beide Hauptzweige.

Wird das Dendrogramm aus Abbildung 17, das Resultat der Clusteranalyse im Fenster W_4 – der Polysaccharidregion – betrachtet, ist eine deutliche Abgrenzung aller Vibriostämme untereinander beobachtbar. Auf Basis dieser Analyse lassen sich also Vibrionen, zu welchen Referenzspektren aufgenommen wurden, den korrekten Stamm zuordnen. Im Fall der *V. vulnificus*-Stämme, im oberen Teil der Graphik, bildet sich zudem bei einem Heterogenitätslevel von ca. 1200 ein deutlich von anderen Vibriospezies getrenntes Cluster. Eine solche Gruppierung auf Artebene ist wünschenswert, da dies die Möglichkeit birgt, aufgrund von arttypischen Infrarotsignaturen noch nicht vermessene Vibriostämme der korrekten Art zuzuordnen.

Die Clusteranalyse über die Fingerprintregion (W_5) der Spektren zeigt ebenfalls eine Clusterung der *V. vulnificus*-Spektren auf Artebene. Eine Gruppierung auf Stammebene erfolgt allerdings nicht. In dieser Wellenzahlregion besitzt *V. vulnificus* demnach arttypische Infarotmerkmale, die jeweiligen Stämme sind aber nicht unterscheidebar. Bis auf VN 3176 (*V. fluvialis*), VN 2580 (*V. navarrensis*) und VN 3132 (*V. cholerae*) gruppieren sich auch die übrigen Stämme nicht in klar abgetrennten Clustern.

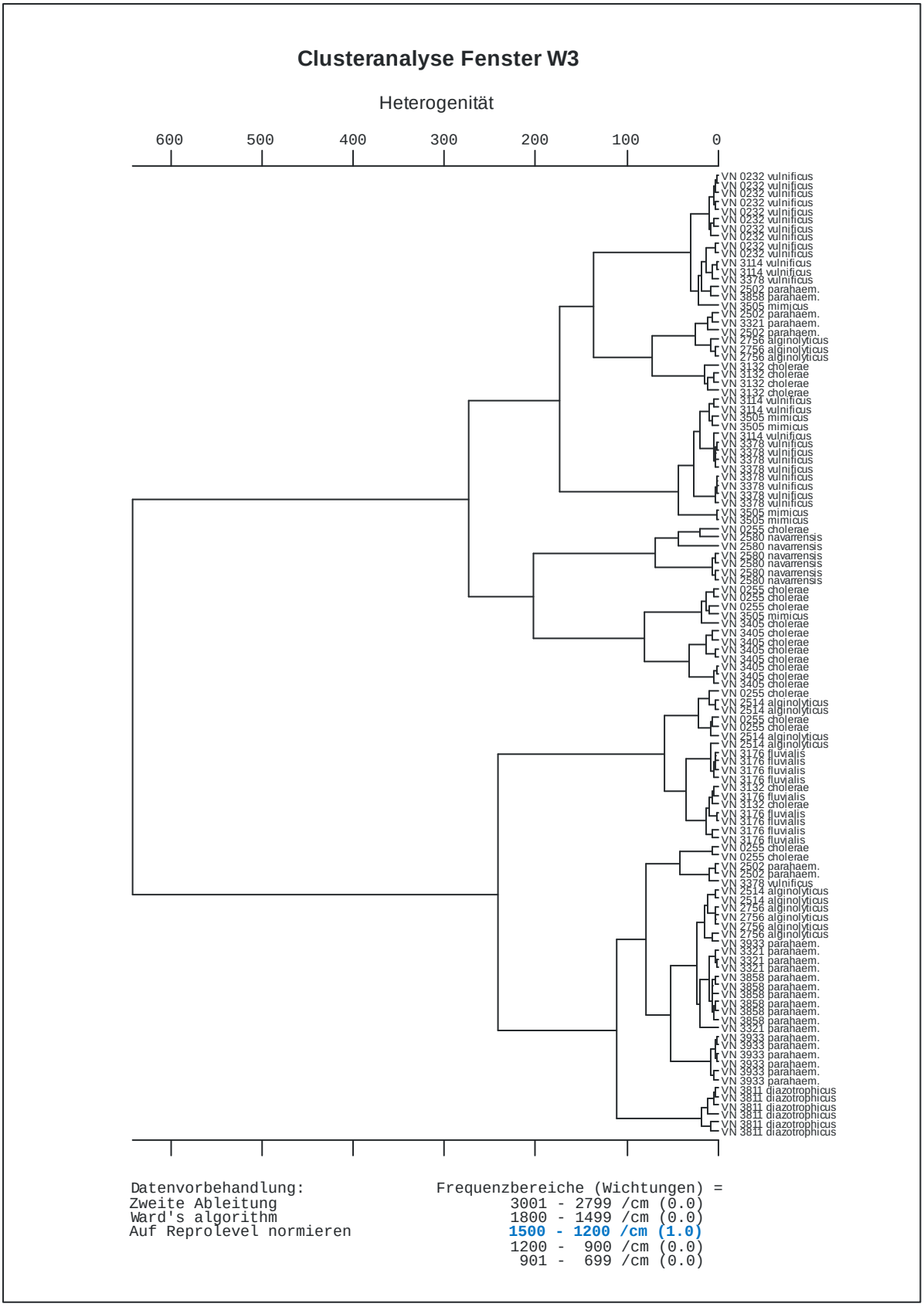

Abbildung 16: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der „Mixed Region“ W_3

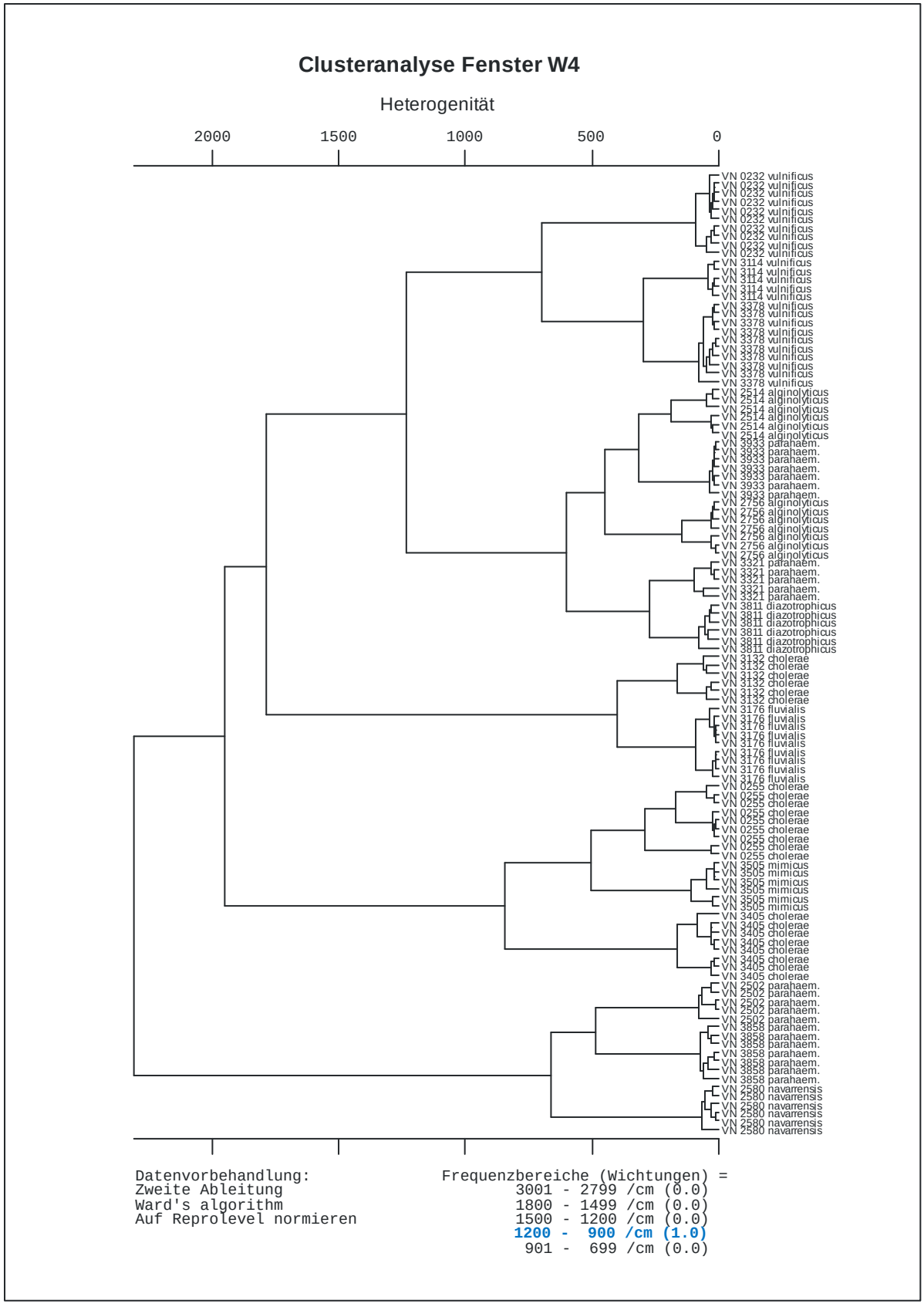

Abbildung 17: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Polysaccharidregion W_4

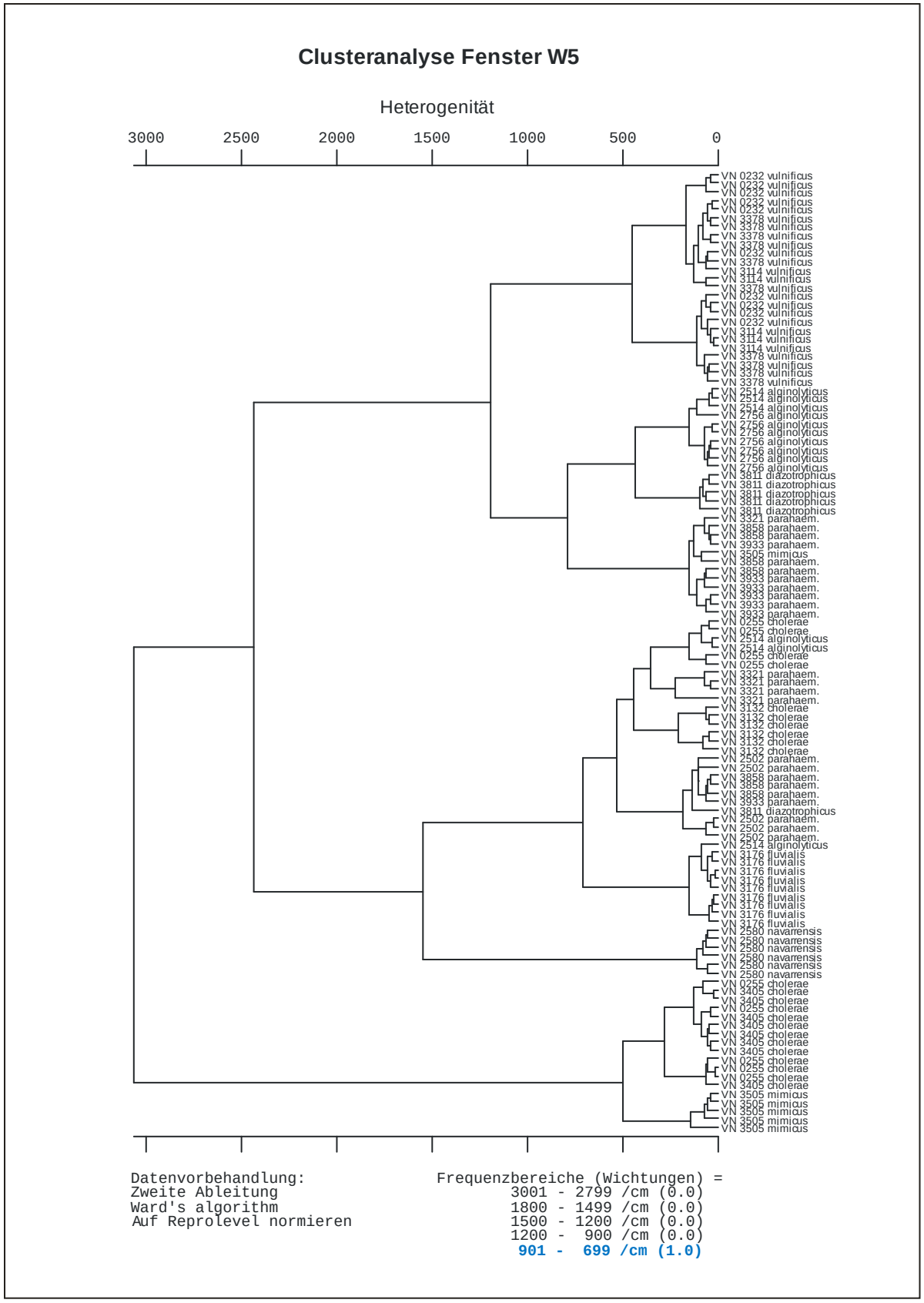

Abbildung 18: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Fingerprintregion W_5

4.2.2 Clusteranalyse unter Kombination der charakteristischen Wellenzahlbereiche

Um zu testen, in wie weit sich die mittels FTIR-Spektroskopie vermessenen Vibriostämme auf Artebene gliedern lassen, wurden desweiteren Clusteranalysen aller Permutationen der verschiedenen charakteristischen Wellenzahlbereiche durchgeführt.

Bei der Kombination aller fünf charakteristischen Fenster ergab die Clusteranalyse das in Abbildung 19 gezeigte Dendrogramm. Die Vibriostämme lassen sich bis auf VN 0255 (*V. cholerae*), welcher mit VN 3405 (*V. cholerae*) mischt, deutlich voneinander trennen. Desweiteren erfolgt eine Clusterung auf der jeweiligen Artebene. Hierbei treten folgende Ausnahmen auf (rot markiert):

- VN 3321 (*V. parahaemolyticus*) wird fälschlicherweise in das *V. alginolyticus*-Cluster eingordnet
- VN 3132 (*V. cholerae*) bildet zusammen mit VN 3176 (*V. fluvialis*) ein separates Cluster
- VN 3505 (*V. mimicus*) gruppiert im sonst *V. cholerae*-dominierten Cluster

Das beste Ergebnis für eine Gliederung der 16 Vibriostämme auf Artebene liefert eine Clusteranalyse über die Fenster W_3, W_4 und W_5 (siehe Abbildung 20). Im Gegensatz zur Analyse über alle fünf Fenster gruppiert sich hier VN 3321 korrekt mit den übrigen drei *V. parahaemolyticus*-Stämmen. Auf Stammebene jedoch tritt zusätzlich zur Vermischung der *V. cholerae*-Stämme VN 0255 und VN 3405 eine Fehlzuordnung innerhalb der *V. vulnificus*-Stämme von VN 3378 zu VN 3114 auf.

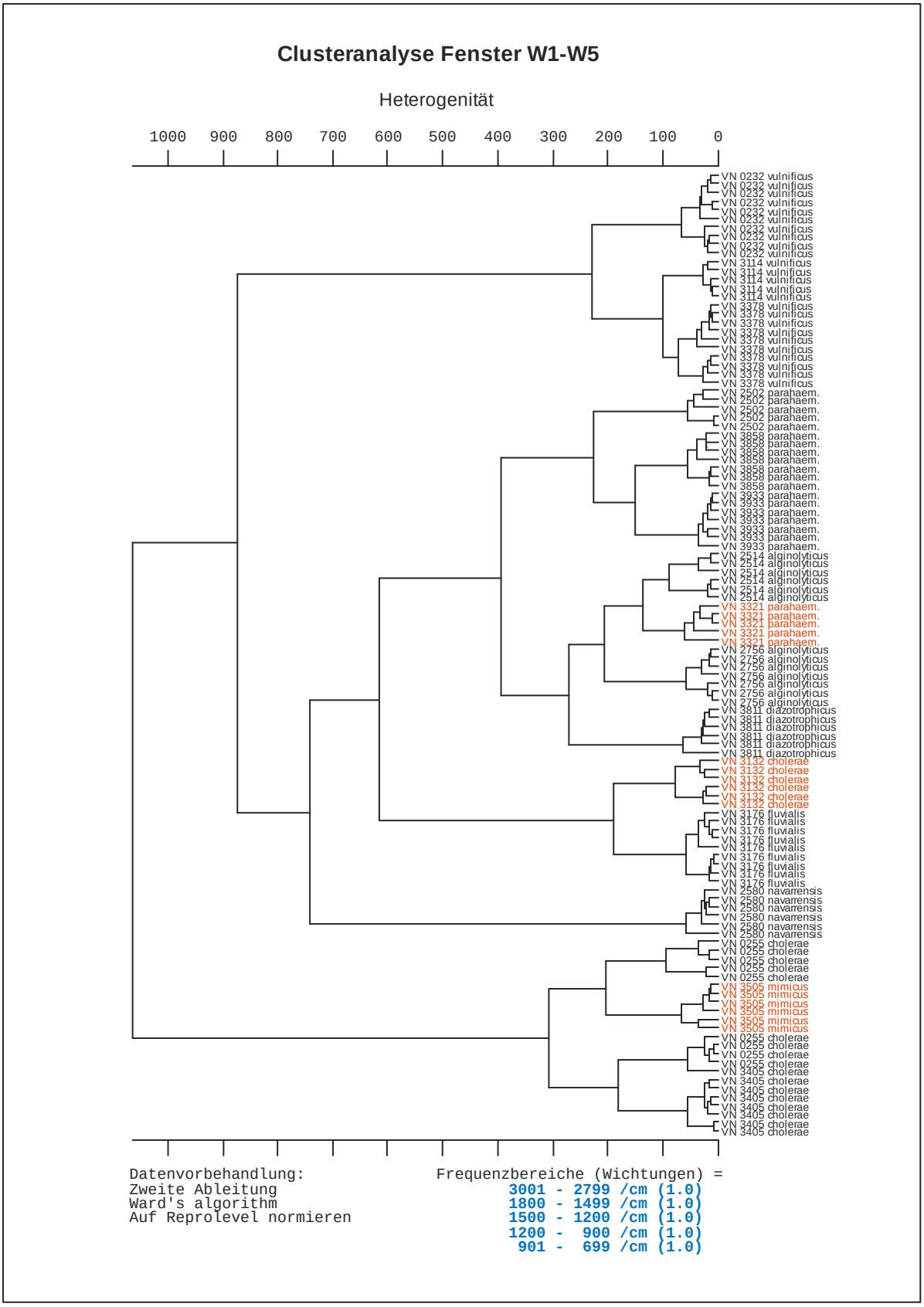

Abbildung 19: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die charakteristischen Wellenzahlbereiche W_1-W_5

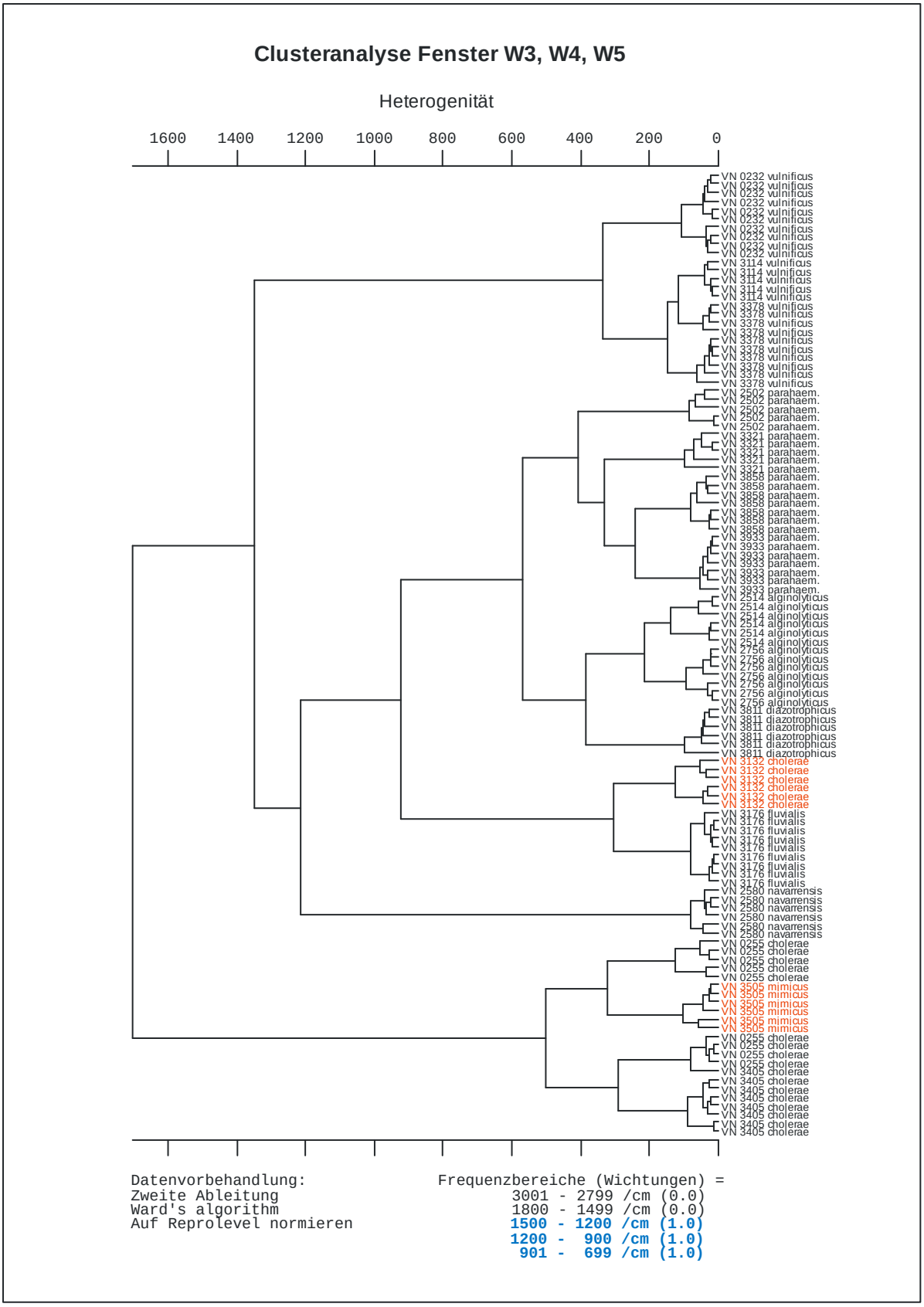

Abbildung 20: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die charakteristischen Wellenzahlbereiche W_3, W_4 und W_5

5 Diskussion

5.1 Fixierungsmethoden im Vergleich

Für die sechs verschiedenen Fixierungsmethoden:

- Natriumazid-BaCl-NiCl-Lösung
- Formaldehyd
- Micropur-forte-Lösung
- Destilliertes Wasser
- Ethanol
- UV-Bestrahlung

wurden die Wirksamkeit an Vibrionen und der Einfluss der Methode auf FTIR-Spektren getestet. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert.

5.1.1 Fixierungswirksamkeit

Ob die untersuchten Methoden Vibrionen wirkungsvoll töteten, wurde zunächst an *V. alginolyticus* getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche gelten daher grundsätzlich nur für den Modellorganismus. Trat keine Fixierung an *V. alginolyticus* - wie im Fall der Versuche mit der Na-Azid-BaCl-NiCl-Lsg. und mit destilliertem Wasser - auf, kann die Aussage getroffen werden, dass diese Methoden zumindest nicht für alle Vibriospezies tödlich sind. Sie scheiden daher als Fixierungsmethoden aus.

Für die Na-Azid-BaCl-NiCl-Lsg. wurde von Gunther et al. eine hohe Fixierungseffizienz an verschiedenen aeroben wie anaeroben Mikroorganismen nachgewiesen (Gunther, Hubschmarm et al. 2008). Die Wirksamkeit an Vibrionen wurde allerdings nicht getestet. Das Ziel der Arbeit von Gunther et al. war außerdem die Langzeitfixierung von Mikroorganismen. Die Versuche bezogen sich also auf andere Zeitskalen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden von Gunther et al. nicht Fixierungsdauern von maximal 2h betrachtet, sondern die Zellen bis zu 30 Tage in der Schwermetall-Azid-Lösung gelagert. Hieraus ergeben sich zwei Erklärungsmöglichkeiten für die nicht erfolgte Abtötung von *V. alginolyticus*. Da die Fixierungswirksamkeit der Na-Azid-BaCl-NiCl-Lsg. von Gunther et al. nicht an Vibrionen getestet wurde, besteht die Möglichkeit, dass diese Organismen grundsätzlich immun gegenüber dieser Methode sind. Mit Inkubationszeiten von mehreren Tagen könnte dies überprüft werden. Wahrscheinlicher ist

allerdings, dass eine Fixierungsdauer von 2h nicht zur vollständigen Abtötung aller Zellen genügt. Da Vibrionen als fakultative Anaerobier theoretisch auch mit inhibierter Cytochrom-c-Oxidase überleben können, beruht eine potentielle Fixierung auf der Wirksamkeit der Metalle Nickel und Barium. Die genauen Effekte dieser Agenzien beispielsweise auf die anaerobe Energiegewinnung oder auf Stoffwechselwege sind, wie selbst Gunther et al. erwähnen, noch weitgehend unbekannt. Eine Verlängerung der Fixierungsdauer auf möglicherweise mehrere Tage ist allerdings für die angestrebte, möglichst schnelle Identifizierung von Vibrionen mittels FTIR-Spektroskopie nicht zielführend. Desweiteren erfordert die Verwendung von Natriumazid als hochgiftige und explosive Substanz äußerst vorsichtiges Arbeiten und eine gesonderte Entsorgung. Eine einfache Handhabung, welche beispielsweise bei der Probenpräparation auf Ausfahrten eines Forschungsschiffes notwendig wäre, ist demnach nicht gegeben.

Ebenso wie bei der Behandlung mit Na-Azid-BaCl-NiCl trat auch nach dem von Bruker vorgeschlagenen Standardpräparationsverfahren mit destilliertem Wasser noch Wachstum der Vibrionen auf. Diese wurden also nicht restlos zur Osmolyse gebracht. Mehrere Faktoren können hierbei eine Rolle gespielt haben. Zum einen besitzen Vibrionen als gramnegative Bakterien zwar keine mehrschichtige Mureinhülle, aber im Gegensatz zu tierischen Zellen eine Zellwand. Diese kann die notwendige Stabilität gewähren und einer Osmolyse entgegenwirken. Desweiteren kann eine zu hohe Konzentration der Zellen im Wasser Grund für die unzureichende Fixierungswirksamkeit sein. Wenn einige Zellen aufbrechen, mischt sich der Zellinhalt mit dem destillierten Wasser – dessen osmolytisches Potential sinkt. Die Methode der Osmolyse zur Zerstörung von Zellen wird daher nur für Einzelzellen, die eine Zellmembran besitzen empfohlen (Geckeler and Eckstein 1998).

Die Behandlung der Zellen mit Micropur-forte-Lösung, Formaldehyd, Ethanol und UV-Strahlung zeigte jeweils eine wirksame Fixierung der Bakterien. Nach mindestens 17h Inkubation in LB-Medium bei 37°C zeigten diese kein Wachstum. Zwar kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, die Vibrionen seien tot – es besteht die Möglichkeit des Übergangs in einen VBNC (viable but nonculturable)-Zustand (Thompson, Iida et al. 2004) – doch ist eine Zeitspanne von 17h mehr als ausreichend um FTIR-spektroskopische Messungen durchzuführen.

In den UV-Fixierungsversuchen an *V. alginolyticus* wies auch die nur getrocknete aber nicht bestrahlte Probe kein Wachstum nach der Inkubation in LB-Medium auf. Dies legt die Vermutung nahe, eine ausschließliche Hitzefixierung der Vibrioproben könnte ausreichend sein. Die weiteren Untersuchungen der Fixierungseffizienz von UV-Strahlung an den drei pathogenen Vibriostämmen zeigten allerdings, dass sowohl *V. cholerae* als auch *V. parahaemolyticus* die Trockung des Zellfilms für 20min bei 40°C überlebten (siehe 4.1.3). Eine zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht ist demnach unabdingbar.

In Abbildung 13, der Darstellung des Wachstums der drei pathogenen Vibriostämme nach UV-Bestrahlung, fällt desweiteren auf, dass für alle drei Stämme mit Ansteigen der Bestrahlungsdauer die gemessene optische Dichte nach der Inkubation weit unter den Ausgangswert vor der Bestrahlung sank. Beim Abnehmen der Proben zur Messung der optischen Dichte zeigte sich, dass mit steigenden Bestrahlungszeiten die Zellfilme stärker an den Deckgläschen haften blieben und durch das Schwenken während der Inkubation nicht vollständig abgelöst wurden. Die Konzentration der Zellen im umgebenden LB-Medium muss demnach bei insgesamt konstanter Zellzahl niedriger als in kurz- oder nicht-bestrahlten Proben gewesen sein. Das stärkere Anhaften an der Glasoberfläche kann durch die Hitzeentwicklung auf dem UV-Tisch (> 40°C nach 15min Betrieb) oder/und durch die energiereiche ultraviolette Strahlung und eine damit eingehende Denaturierung der Proteine hervorgerufen worden sein.

5.1.2 Auswirkungen der Fixierung auf Infrarotspektren

Die Natriumazid-BaCl-NiCl-Lsg. zeigte neben einer ungenügenden Fixierungswirksamkeit an Vibrionen zusätzlich einen starken Einfluss auf ihre Infrarotspektrum in den für die Identifizierung von Mikroorganismen relevanten Wellenzahlbereichen (siehe Abbildung 12). Diese Methode kommt zu Fixierung von Vibrionen für die Messung im FTIR-Spektrometer demnach nicht in Frage.

Generell weisen die Absorptionspektren der mit Na-Azid-BaCl-NiCl, Formaldehyd und Micropur forte behandelten Zellen geringere Intensitäten als die Spektren der anderen Methoden auf (siehe Abbildung 9). Diese drei Methoden haben gemeinsam, dass das Fixierungsmittel vor der FTIR-Messung aus der Probe herausgewaschen werden musste. Eine verringerte Absorptionsintensität kann demnach dadurch entstanden sein, dass ein Anteil der Zellen oder - bei der Fixierung eventuell freigesetzte – Zellbestandteile beim

mehrmaligen Waschen mit PBS verloren gingen. Bei einer geringen Intensität leidet vor Allem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer Messung. Um Mikroorganismen auf Stamm- oder Spezieslevel anhand ihrer Infrarotspektren aufzutrennen, können jedoch auch sehr kleine aber charakteristische Absorptionsmuster von Bedeutung sein. Ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist also nötig, damit kleine Strukturen in den Spektren nicht vom Hintergrundrauschen überlagert werden.

Die Spektren mit Ethanol behandelter Vibrionen weisen hauptsächlich im Amidbereich deutliche Abweichungen gegenüber den standardmäßig mit destilliertem Wasser präparierten Zellen auf (Abbildung 10). Ethanol, als polares, organisches Lösungsmittel kann die, zur Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur von Molekülen nötigen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen stören. Eine Denaturierung vor allem der Proteine und Nukleinsäuren einer Zelle ist die Folge. In der Amidregion absorbieren aber gerade Strukturen wie β-Faltblätter oder α-Helizes. Werden diese Strukturen zerstört oder verändert, resultiert dementsprechend ein anderes Absorptionsmuster. Über die restlichen vier charakteristischen Wellenzahlbereiche erweisen sich die Spektren der Fixierungsmethode mit Ethanol als relativ stabil.

Allein die durch Fixierung mittels UV-Bestrahlung erzeugten Proben, liegen in den signifikanten Spektralbereichen noch näher als die anderweitig fixierten Proben an der Infrarotsignatur der unfixierten *V. alginolyticus*-Proben. Großer Vorteil dieser Fixierungsvariante ist, dass diese ohne Einsatz potentiell infrarotaktiver Chemikalien auskommt. Fixiermittel müssen weder durch Waschen der Proben noch durch Verdunstung entfernt werden. Eine solche Entfernung von Chemikalien kann zudem niemals restlos erfolgen. Rückstände in der Probe können durch Eindringen von Fixiermittel ins Innere der Zellen oder durch nicht vollständige Verdunstung/ Entfernung durch Verdünnung und Waschen entstehen. Bei der Bestrahlung mit UV-Licht kommt es durch Absorption energiereicher Photonen zu Brüchen und Vernetzungen der Moleküle. Unterschiede in der Kettenlänge oder in der Molekülfaltung haben zwar auch Einfluss auf das Infrarotspektrum, allerdings erfolgen diese UV-bedingten Prozesse ungerichtet und statistisch verteilt über unterschiedlichste Stoffe. Theoretisch sollte die Bestrahlung mit UV-Licht also höchstens in einem erhöhten Rauschen resultieren. In den gemessenen Spektren ist solch ein erhöhtes Rauschen allerdings nicht erkennbar. Vermutlich ist es im Vergleich zum Hintergrundrauschen,

welches z.B. durch Luftströme im Geräteinneren, die Beschaffenheit der ZnSe-Platte und durch optische Effekte im Messaufbau erzeugt wird, vernachlässigbar.

5.2 Identifizierung verschiedener Vibrio-Stämme mittels FTIR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 16 Vibriostämme aus 8 Spezies mit Hilfe eines FTIR-Spektrometers vermessen. Größte Schwierigkeit bei der Generierung der Referenzspektren zum Vergleich der unterschiedlichen Stämme war das überdurchschnittlich häufige Auftreten eines zu niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Der Vergleich der gemessenen Signal-zu-Rausch-Werte sowohl der Probenspektren als auch des Gerätes an sich mit Werten aus der Forschungsgruppe um Frau Dr. Mareike Wenning (TU München) ergab, dass der verwendete Messaufbau (siehe Kapitel 2.4) ein ca. um den Faktor 2 niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis als übliche FTIR-Einheiten von Bruker lieferte. Die Geräteeinheiten, die in Abbildung 5 dargestellt sind, wurden zuvor von Bruker in dieser Weise nur sehr selten kombiniert - exakte Vergleichswerte fehlen daher. Mögliche Gründe könnten der verlängerte optische Weg von der Einheit „Tensor 27“ zum Microplate Reader „HTS-XT“ durch das dazwischen eingebaute Mikroskop oder der RT-DLaTGS-Detektor sein.

Im Vergleich der Dendrogramme aus den Clusteranalysen über die einzelnen Wellenzahlbereiche W_1-W_5 (Abbildungen 14-18) fällt ins Auge, dass sich die Cluster in den Fenstern W_1-W_3 untereinander wesentlich ähnlicher sind als in den Wellenzahlbereichen W_4 und W_5. Die maximalen Heterogenitäten zwischen den Clustern liegen hier bei <700 gegenüber Unähnlichkeiten von >2000 in den zwei langwelligeren Fenstern. Vor allem in der Fettsäureregion (W_1) lassen sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren finden, geschweige denn stammcharakteristische Merkmale ausmachen. Vibrionen scheinen demnach, unabhängig ihrer Stamm- oder Artzugehörigkeit, einen ähnlichen Aufbau hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung zu teilen. Ähnliches gilt für die Fenster W_2 (Amidregion) und W_3 („Mixed Region“). Der Informationsgehalt zur Unterscheidung der Spektren auf Stammebene ist in der Polysaccharidregion (W_4) am größten. Die einzelnen Vibriostämme lassen sich hier klar voneinander trennen. Während sich *V. vulnificus*-Stämme in einem Cluster gruppieren, scheinen vor allem *V. parahaemolyticus*-Stämme eine hohe innerartliche Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung durch Substanzen, die in W_4 absorbieren, aufzuweisen.

Um noch nicht vermessene Vibriostämme, z.B. aus Umweltproben, mit Hilfe ihrer Infrarotsignatur der richtigen Spezies zuzuordnen, ist eine Gruppierung der Referenzspektren auf Artebene unabdingbar. Durch Permutation der Wellenzahlfenster W_1 – W_5 wurde die optimale Fensterkombination für eine Separation der gemessenen Vibrioarten ermittelt. Über eine Verknüpfung der Fenster W_3, W_4 und W_5 bilden bis auf zwei Stämme (VN 3132 *V. cholerae* und VN 3505 *V. mimicus*) alle gemessenen Vibrionen speziesspezifische Cluster (siehe Abbildung 20).

Die gleichen Vibriostämme wurden von René Erler (Alfred-Wegener-Institut, Helgoland) im Rahmen seiner Dissertation mittels MALDI-TOF, also der massenspektrometrischen Analyse des Proteoms der Zellen, gemessen. Eine Clusteranalyse dieser Daten zeigt, dass VN 3505 auch hier zusammen mit *V. cholerae* gruppiert (Abbildung 21). Dieser *V. mimicus*-Stamm scheint in seiner chemischen Zell- bzw. Proteinzusammensetzung sehr ähnlich wie *V. cholerae* aufgebaut zu sein.

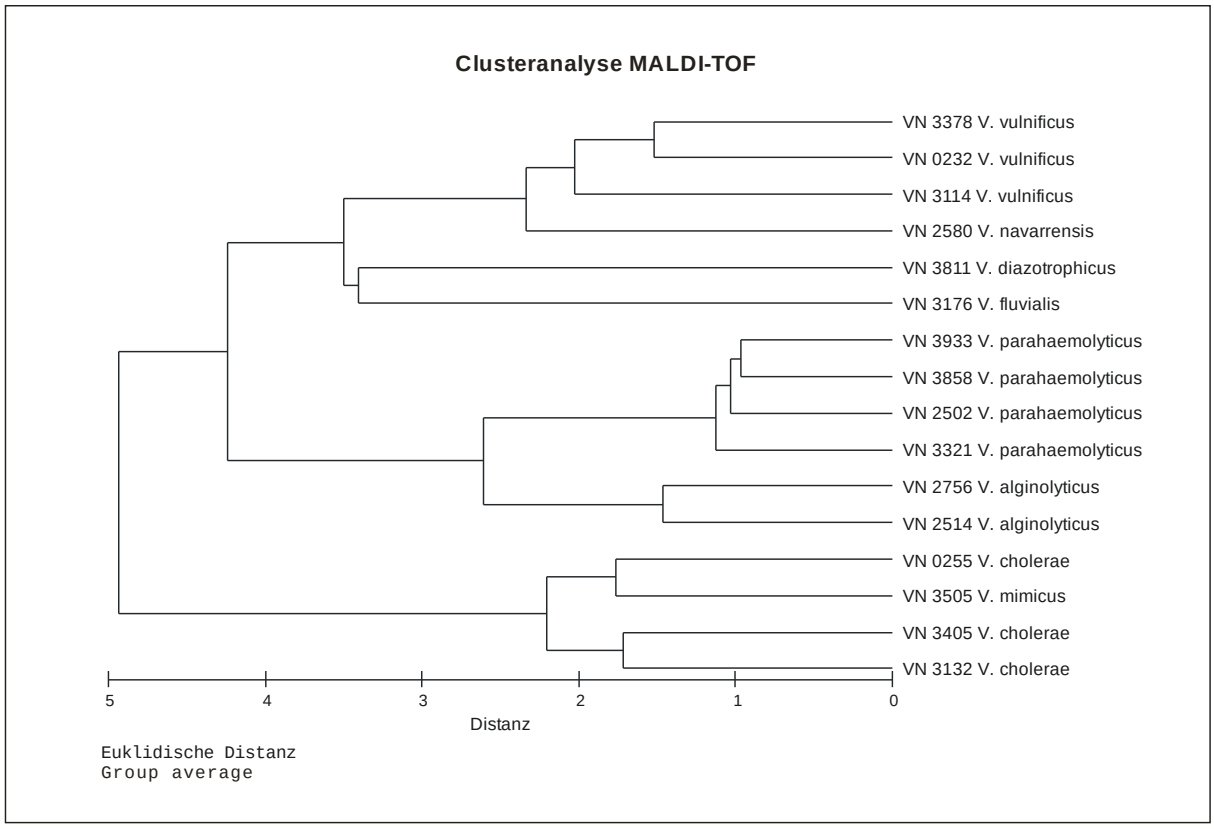

Abbildung 21: Clusteranalyse der MALDI-TOF-Daten ausgewählter Vibrio-Stämme (Erler, unveröffentlicht)

Durch die Messung von Referenzspektren weiterer *V. mimicus*-Stämme für die MALDI-TOF-Spektrenbibliothek konnte eine Abgrenzung der Art *V. mimicus* gegenüber *V.*

cholerae erreicht werden. Es bleibt zu prüfen ob eine Erweiterung der FTIR-Referenzspektren zum selben Effekt führt.

Das Ausreißen von VN 3132 aus dem *V. cholerae*-Cluster findet keine Analogie in der Untersuchung der Stämme mittels Massenspektrometrie. Eine hohe Abweichung in der Proteinzusammensetzung scheidet demnach aus. Auffällig ist allerdings, dass VN 3132 in einem Versuch von Thorben Schierhorn (Alfred-Wegener-Institut, Helgoland) kein Wachstum auf vibrioselektivem Chromagar zeigte. Probehalber wurden deshalb die beiden *V. cholerae*-Vertreter VN 3132 und VN 3405 zusammen auf Chromagar ausgestrichen und bei 37°C für 15h inkubiert.

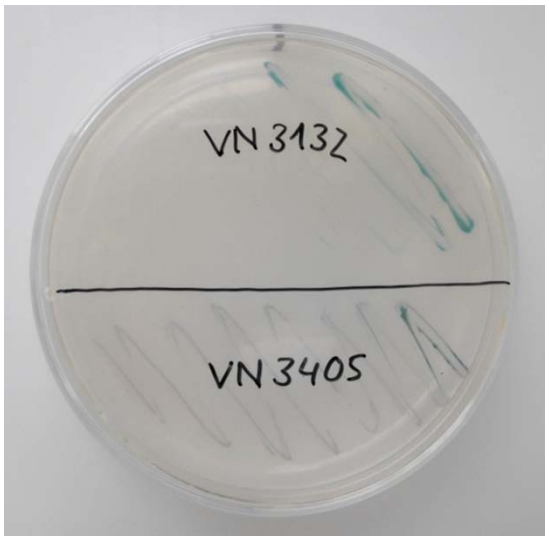

Abbildung 22: Vergleich des Wachstums der *V. cholerae*-Stämme VN 3132 und VN 3405 auf Chromagar nach 15h Inkubation bei 37°C

Wie in Abbildung 22 dokumentiert, wiesen beide *V. cholerae*-Stämme auf Chromagar die *V. cholerae*-typische Blaufärbung auf. Eine Kontamination des VN 3132-Stammes und eine daraus resultierende Abweichung von den übrigen *V. cholerae*-Spektren in der FTIR-Messungen kann demnach ausgeschlossen werden. Allerdings unterschieden sich die beiden ausgestrichenen Stämme deutlich in ihrem Wachstumsverhalten. Während sich bei VN 3405 nach 15h Inkubation Kolonien über die gesamte Ausstrichspur ausgebreitet hatten (im Bild unten), zeigten sich bei VN 3132 nur die bereits am Vortag ausgestrichenen Zellen blau gefärbt. Ein weiteres Wachstum war hier, wie zuvor auch durch T. Schierhorn beschrieben, nicht beobachtbar. Auf demselben Medium scheinen sich die zwei *V. cholerae*-Stämme also unterschiedlich zu verhalten. Eventuell erklärt sich dieser grundlegende Unterschied durch einen abweichenden Phänotyp und trägt auch im FTIR-Spektrum der Stämme zum Ausreißen von VN 3132 aus dem *V. cholerae*-Cluster bei.

Es erscheint sinnvoll, die FTIR-Spektrensammlung um weitere *V. cholerae*- und *V. fluvialis*-Stämme zu ergänzen. Eventuell kann dadurch die Brücke zwischen VN 3132 und anderen *V. cholerae*-Stämmen geschlossen bzw. die Unähnlichkeit gegenüber *V. fluvialis* stärker verdeutlicht werden.

Insgesamt ist in der Clusteranalyse über die Fensterkombination W_3, W_4 und W_5 zwar eine gute Zuordenbarkeit der gemessenen Vibriospektren auf Artebene, allerdings eine geringere Trennschärfe zwischen den verschiedenen Stämmen als im Einzelfenster W_4 zu beobachten. Dies hat als Konsequenz, dass eine potentielle Spektrenbibliothek über die sowohl Art als auch Stamm identifiziert werden soll, einen hierarchischen Aufbau verlangt. Das Spektrum eines beliebigen Vibriostammes würde hier zunächst über die spektralen Fenster W_3, W_4, W_5 einer Spezies zugeordnet, dann über stammspezifische Wellenzahlbereiche näher charakterisiert. Als Voraussetzung für die Erstellung einer sinnvollen Spektrenbibliothek ist allerdings die Vermessung weiterer Vibriostämme nötig.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Von allen untersuchten Fixierungsvarianten hat sich die Bestrahlung mit UV-Licht als bei Vibrionen wirksame Methode herausgestellt, welche die Infrarotsiganturen der Zellen in den fünf für Mikroorganismen charakteristischen Wellenzahlbereichen kaum beeinflusst. Hierdurch ist es nun also möglich, auch mit dem aktuellen FTIR-Gerätetyp „HTS-XT“ von Bruker potentiell pathogene Vibrionen zu vermessen. Da UV-Strahlung bei einer Vielzahl von Mikroorganismen eine sterilisierende Wirkung aufweist, ist das Potential groß, mit der beschriebenen Technik zudem gute Fixierungsergebnisse für infrarotspektroskopische Untersuchungen bei anderen Pathogenen zu erreichen. Der große Vorteil des neuen FTIR-Aufbaus gegenüber dem Vorgängermodell mit abgeschlossenem Probenrad ist die Erhöhung der Anzahl der Probenpositionen von ehemals 15 auf nun 96, 384 oder 1536 Positionen je Platte. Mit der Erweiterung durch einen Plattenwechsler könnten sogar automatisiert mehrere Platten nacheinander gemessen werden. Dieser Vorteil kann nun bei der Messung von Vibrionen und potentiell auch anderer Pathogene unter Gewährleistung der Laborsicherheit genutzt werden. Außerdem kommen bei der UV-Fixierung keine umweltschädlichen oder gesundheitsgefährdenden Fixierungsmittel wie beispielsweise Natriumazid zum Einsatz. Zudem ist die Methode vergleichsweise zeitsparend sowie unkompliziert in der Durchführung. Sie kann theoretisch also an beliebigen Einsatzorten durchgeführt werden, ohne dass eine aufwändige Laborausstattung oder die Entsorgung von Sondermüll von Nöten sind.

In den FTIR-Messungen der 16 vermessenen Vibriostämmen aus 8 Spezies zeigte sich, dass grundsätzlich sowohl eine Unterscheidung der Vibrionen auf Stamm- wie auch (bis auf wenige Ausnahmen) auf Artebene möglich ist. Gute Resultate in der Identifizierung auf Stammebene lieferte hierbei eine Clusteranalyse der aufgenommenen Spektren im Wellenzahlfenster W_4, der Polysaccharidregion. Auf Artebene erwiest sich eine Clusteranlayse über die Bereiche W_3, W_4 und W_5 am zielführendsten. Für den ausstehenden Aufbau einer Referenzspektrenbibliothek empfiehlt sich daher ein hierarchischer Aufbau mit unterschiedlichen Analysefenstern je Bibliotheksebene. Es bleibt zu prüfen, ob mit zunehmender Anzahl in der Bibliothek enthaltener Stämme und damit steigendem Informationsgehalt, analog der MALDI-TOF-Datenbank, eine noch genauere und vollständigere Clusterung der Stämme auf Artebene möglich wird. Zur

Verfügung für den weiteren Aufbau einer Datenbank stehen prinzipiell ca. 800 auf Helgoland in flüssigem Stickstoff gelagerte Vibriostämme. Allerdings sollte mit dem Start der Messungen von Referenzspektren gewartet werden, bis das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des FTIR-Aufbaus, möglicherweise durch den Austausch des Detektors, auf herkömmliche Werte korrigiert wurde. So lässt sich voraussichtlich die Zahl der zu messenden Replikate deutlich verringern und generell die Qualität der Bibliothek – durch aussagekräftigere Spektren – steigern.

Durch die Realisierung einer Vibrio-FTIR-Spektrenbibliothek ließe sich das Monitoring potentiell humanpathogener Vibrionen an Deutschlands Küsten stark vereinfachen. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Untersuchungen oder der Bakterienidentifizierung via MALDI-TOF, kommt die FTIR-Spektroskopie ohne (zeit-)aufwändige DNA- oder Proteinextraktionsschritte aus. Zudem werden neben sterilem destilliertem Wasser und in ihrer Zusammensetzung streng standardisierten Medienplatten keine weiteren Chemikalien benötigt. Laut Bruker wurde das verwendete FTIR-Spektrometer, welches mit einem vibrationsresistenten Interferometer ausgestattet ist, bereits erfolgreich in einem fliegenden Helikopter getestet. Prinzipiell könnte eine Bestimmung der Bakterien unter standardisierten Bedingungen also direkt an Bord eines Forschungsschiffes durchgeführt werden. Je nachdem wie sich die Vibriobelastung künftig an den deutschen Küsten entwickelt, könnte es zudem sinnvoll sein, ein „Frühwarnsystem“ über standardmäßige Wasseruntersuchungen mittels FTIR-Messungen z.B. an Stränden oder bei Fischaufzuchten in Aquakultur durchzuführen. Sollten potentiell pathogene Vibrionen in Küstennähe detektiert werden, wäre eine deutlich schnellere Einleitung von Maßnahmen wie die Sperrung von Stränden oder eine Warnung vor dem Verzehr von rohen Meeresfrüchten möglich.

I Literaturverzeichnis

Alter, T., B. Appel, et al. (2011). "Vibrio-Infektionen durch Lebensmittel und Meerwasser - Das Netzwerk "VibrioNet" stellt sich vor." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **54**(11): 1235-1240.

Austin, B. (2010). "Vibrios as causal agents of zoonoses." Veterinary Microbiology **140**(3-4): 310-317.

Baker-Austin, C., L. Stockley, et al. (2010). "Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus: a European perspective." Environmental Microbiology Reports **2**(1): 7-18.

Beyer, W. (1981). Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Briese, O. (2003). Angst in Zeiten der Cholera, Band 1: Über kulturelle Urspsrünge des Bakteriums. Berlin, Akademie Verlag.

Bruker IR Spectroscopic Analysis of Microorganisms - Sample Preparation, Measurement and Evaluation.

Chang, J. C. H., S. F. Ossoff, et al. (1985). "UV INACTIVATION OF PATHOGENIC AND INDICATOR MICROORGANISMS." Applied and Environmental Microbiology **49**(6): 1361-1365.

Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd**:** pp. 10815 – 10837.

DePaola, A., C. A. Kaysner, et al. (2000). "Environmental investigations of Vibrio parahaemolyticus in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998)." Applied and Environmental Microbiology **66**(11): 4649-4654.

Drake, S. L., A. DePaola, et al. (2007). "An overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **6**(4): 120-144.

Eiler, A., M. Johansson, et al. (2006). "Environmental influences on Vibrio populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas)." Applied and Environmental Microbiology **72**(9): 6004-6011.

Geckeler, K. E. and H. Eckstein (1998). Bioanalytische Und Biochemische Labormethoden, Vieweg Verlag.

Gunther, S., T. Hubschmarm, et al. (2008). "Fixation procedures for flow cytometric analysis of environmental bacteria." Journal of Microbiological Methods **75**(1): 127-134.

Helm, D., H. Labischinski, et al. (1991). "ELABORATION OF A PROCEDURE FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA USING FOURIER-TRANSFORM IR SPECTRAL LIBRARIES - A STEPWISE CORRELATION APPROACH." Journal of Microbiological Methods **14**(2): 127-142.

Hesse, M., Meier H., Zeeh, B. (2005). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Jones, B. W. and M. K. Nishiguchi (2004). "Counterillumination in the hawaiian bobtail squid, Euprymna scolopes Berry (Mollusca : Cephalopoda)." Marine Biology **144**(6): 1151-1155.

Kniggendorf, A.-K., T. W. Gaul, et al. (2011). "Effects of Ethanol, Formaldehyde, and Gentle Heat Fixation in Confocal Resonance Raman Microscopy of Purple NonSulfur Bacteria." Microscopy Research and Technique **74**(2): 177-183.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2006). Brock Mikrobiologie, Pearson Education.

Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, et al. (2004). "Characterization of pathogenic Vibrio parahaemolyticus isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates." Journal of Clinical Microbiology **42**(10): 4672-4678.

Matsumoto, C., J. Okuda, et al. (2000). "Pandemic spread of an O3 : K6 clone of Vibrio parahaemolyticus and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses." Journal of Clinical Microbiology **38**(2): 578-585.

Morris, J. G. (2003). "Cholera and other types of vibriosis: A story of human pandemics and oysters on the half shell." Clinical Infectious Diseases **37**(2): 272-280.

Naumann, D. (2006). Infrared Spectroscopy in Microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd.

Oliver, J. (2013). "Vibrio vulnificus: Death on the Half Shell. A Personal Journey with the Pathogen and its Ecology." Microbial Ecology **65**(4): 793-799.

Raimondi, F., J. P. Y. Kao, et al. (2000). "Enterotoxicity and cytotoxicity of Vibrio parahaemolyticus thermostable direct hemolysin in in vitro systems." Infection and Immunity **68**(6): 3180-3185.

Riddle, J. W., P. W. Kabler, et al. (1956). "Bacterial identification by infrared spectrophotometry." Jour Bact **72**((5)): 593-603.

Thompson, F. L., T. Iida, et al. (2004). "Biodiversity of vibrios." Microbiology and Molecular Biology Reviews **68**(3): 403-+.

Wang, S. and H. Chen (2012). Pathogenic Vibrio. Omics, Microbial Modeling and Technologies for Foodborne Pathogens, X. Yan, V. K. Juneja, P. M. Fratamico and J. L. Smith, DEStech Publications, Inc.

WHO. (2012). "Fact sheet N°107."
from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/index.html.

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation und Verantwortlichkeiten innerhalb des Verbundprojektes VibrioNet (www.vibrionet.de) *4*

Abbildung 2: Schwingungstypen der Methylengruppe; +: Schwingungen vor die Papierebene, -: Schwingungen hinter die Papierebene; modifiziert nach (Hesse 2005)..... *7*

Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers *8*

Abbildung 4: IR-Spektren von Vibrio navarrensis und Vibrio parahaemolyticus mit Markierung der Wellenzahlbereiche zur Identifizierung von Mikroorganismen nach Helm et al......*11*

Abbildung 5: Messaufbau bestehend aus dem FTIR-Spektrometer „Tensor 27“, dem Mikroskop „Hyperion 3000“ und dem Microplate Reader „HTS-XT“.....*14*

Abbildung 6: Technische Zeichnung des im Vorgängermodell IFS 28/B verwendeten Probenrades (a) (Naumann, 2006) gegenüber der im HTS-XT eingesetzten ZnSe-Platte (b) *18*

Abbildung 7: Schematischer Versuchsablauf zur Fixierung von V. alginolyticus mit Na-Azid-BaCl-NiCl, Formaldehyd oder Micropur forte.....*20*

Abbildung 8: Belegung der ZnSe-Platte mit Vibriosuspension und zugehörige UV-Bestrahlungszeiten; Position A1 dient zur Hintergrundmessung, kann daher nicht mit Probe belegt werden......*24*

Abbildung 9: Ausgewählte FTIR-Mittelwertspektren von V. alginolyticus nach Behandlung der Proben mit verschiedenen Fixierungsmitteln.....*30*

Abbildung 10: Clusteranalyse über die Amidregion W_2 an FTIR-Spektren der unterschiedlichen Fixierungsvarianten an V. alginolyticus.....*31*

Abbildung 11: Clusteranalyse über die Polysaccharidregion W_4 an FTIR-Spektren der unterschiedlichen Fixierungsvarianten an V. alginolyticus.....*32*

Abbildung 12: Clusteranalyse über die Wellenzahlbereiche W_1-W_5 der FTIR-Spektren von Vibrio-Proben der durchgeführten Fixierungsversuche.....*33*

Abbildung 13: Wachstum dreier potentiell pathogener Vibrioproben nach unterscheidlichen UV-Bestrahlungszeiten: OD_{600} vor („Start“) und nach der Inkubation in LB-Medium.....*34*

Abbildung 14: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Fettsäureregion W_1.....*36*

Abbildung 15: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Amidregion W_2.....37

Abbildung 16: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der „Mixed Region“ W_3.....39

Abbildung 17: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Polysaccharidregion W_4.....40

Abbildung 18: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die Wellenzahlen der Fingerprintregion W_5.....41

Abbildung 19: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die charakteristischen Wellenzahlbereiche W_1-W_5.....43

Abbildung 20: Clusteranalyse der FTIR-Spektren verschiedener Vibrio-Stämme über die charakteristischen Wellenzahlbereiche W_3, W_4 und W_5.....44

Abbildung 21: Clusteranalyse der MALDI-TOF-Daten ausgewählter Vibrio-Stämme (Erler, unveröffentlicht).....50

Abbildung 22: Vergleich des Wachstums der V. cholerae-Stämme VN 3132 und VN 3405 auf Chromagar nach 15h Inkubation bei 37°C.....51

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Vibrio-Stämme mit zugehöriger VibrioNet-Nummer und Owner Identification *15*

Tabelle 2: Bestrahlungszeiten und Belegung der Deckgläser mit Vibrio alginolyticus-Suspension *23*

Tabelle 3: Kurzübersicht der Präratiönsschritte zur FTIR-Messung an Vibrionen *26*

Tabelle 4: Grenzwerte des Qualitätstests "bacteria.qt" *27*

Tabelle 5: Einfluss der unterschiedlichen Fixierungsmethoden auf das Wachstum von V. alginolyticus *29*

IV Abkürzungsverzeichnis

AU	Absorbance Unit
AWI	Alfred-Wegener-Institut Helmoltz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung
BAH	Biologische Anstalt Helgoland
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FA	Formaldehyd
FTIR-Spektroskopie	**F**ourier-**T**ransformations-**I**nfra**r**ot-Spektroskopie
IFF	Institut für Fische und Fischereierzeugnisse Cuxhaven, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
IFH	Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin
IR	Infrarot
LB	Lysogeny Broth
Lsg.	Lösung
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer
MB	Marine Broth
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
QBA	Q-Bioanalytic GmbH
RKI	Robert Koch Institut
rpm	Rounds per minute
RT-DLaTGS-Detektor	**R**aum**t**emperatur **d**euterierter **L**-**A**lanin-**d**otierter **T**ri**g**lycin**s**ulfat-Detektor
TDH	Thermostable direct hemolysin
TRH	TDH-related hemolysin
TUD	Technische Universität Dresden
USA	United States of America
WHO	World Health Organization

V Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit erstmalig einreiche, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, xx. Mai 2011