

# Spezies-Interaktionen in einer definierten bakteriellen Mischkultur mit und ohne Antibiotikumbehandlung

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieur**

**(Dr.-Ing.)**

von Dipl.-Ing. Christian Riedele

geb. am 19. September 1978 in Memmingen

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

Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. Kai Sundmacher

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl

Prof. Dr. Susann Müller

Prof. Dr. Thomas Bley

eingereicht am: 3. Juli 2012

Promotionskolloquium am: 7. März 2013



## Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>I</b>    |
| <b>ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS</b> .....   | <b>VI</b>   |
| <b>Abkürzungen</b> .....   | <b>VI</b>   |
| <b>Symbole</b> .....   | <b>VIII</b> |
| <b>Griechische Symbole</b> .....   | <b>IX</b>   |
| <b>Indizes</b> .....   | <b>X</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>XI</b>   |
| <b>KURZFASSUNG</b> .....   | <b>XIII</b> |
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....   | <b>1</b>    |
| <b>2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....  | <b>5</b>    |
| <b>2.1. Bakterielle Dreier-Mischkultur aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> und <i>Staphylococcus aureus</i></b> ..... | <b>5</b>    |
| Vorkommen als opportunistische Infektionserreger im Zusammenhang mit Cystischer Fibrose .....  | 5           |
| Herausforderungen an die Antibiotikumbehandlung .....  | 7           |
| Glucosestoffwechsel von <i>P. aeruginosa</i> und <i>B. cepacia</i> .....   | 8           |
| <b>2.2. <i>In-vitro</i>-Methoden zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika</b> .....  | <b>10</b>   |
| Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) als Standardkenngröße der Antibiotikumwirksamkeit .....   | 10          |
| Dynamische Methoden .....  | 11          |
| Die Plattenausstrichmethode in der Kritik .....  | 15          |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.3. <i>In-vitro</i> Tests zur Untersuchung der Antibiotikumsirksamkeit in Mischkulturen ..</b> | <b>16</b> |
| <b>2.4. Speziesspezifische Bakterienquantifizierung mittels qT-RFLP Methode .....</b>              | <b>18</b> |
| <b>2.5. Ceftazidim .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.6. Pharmacodynamische Modelle .....</b>   | <b>20</b> |
| Parameterschätzung und Parametervarianzen.....   | 22        |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.1. Puffer und Lösungen .....</b>  | <b>25</b> |
| NaOH-Lösung (0,6 M) .....  | 25        |
| NTA-Lösung (0,25 M) .....  | 25        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Stocklösung (1,5 M) .....  | 25        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Stocklösung (1,5 M).....  | 25        |
| Na/K-Phosphatpuffer (1,5 M; pH 7,0) .....  | 25        |
| Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline - PBS) .....                         | 25        |
| Ceftazidimlösung .....   | 26        |
| <b>3.2. Medien.....</b>  | <b>26</b> |
| Standardmedium M199.....   | 26        |
| LB-Agar (lysogeny broth) .....   | 26        |
| <b>3.3. Mikroorganismen .....</b>  | <b>27</b> |
| Bakterienstämme .....  | 27        |
| Kontrollkeime für MHK-Bestimmung .....   | 27        |
| Interner Quantifizierungsstandard für die qT-RFLP- Analyse.....                                    | 27        |
| Stammhaltung .....   | 27        |
| <b>3.4. Kultivierungsmethoden .....</b>  | <b>28</b> |
| Schüttelkolbenkultivierung.....  | 28        |
| <b>3.5. Analysemethoden .....</b>  | <b>29</b> |
| Trübungsmessung.....   | 29        |
| qT-RFLP-Analyse .....  | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration .....                                 | 31        |
| Ceftazidim .....   | 33        |
| <b>3.6. Substrate und Produkte des Metabolismus .....</b>                        | <b>35</b> |
| Glucose, Glutamin, Glutamat .....  | 35        |
| Gluconat, 2-Ketogluconat, Acetat und Pyruvat.....                                | 36        |
| <b>3.7. Mathematische Modellierung .....</b>                                     | <b>37</b> |
| Modelltypen und Modellierungsmethode .....                                       | 37        |
| Modellanpassung.....   | 38        |
| Parametervarianzen .....   | 39        |
| Simulationsvarianz.....  | 42        |
| Nichtlineares Bestimmtheitsmaß .....   | 43        |
| Berechnung des <i>P</i> -Wertes .....  | 43        |
| <b>4. ERGEBNISSE.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>4.1. Time-kill Experimente .....</b>  | <b>45</b> |
| Reinkultur vs. Mischkultur mit und ohne Ceftazidim.....                          | 45        |
| Zweier-Mischkulturen mit und ohne Antibiotikum.....                              | 50        |
| Mischkultur mit variierten Ceftazidimkonzentrationen.....                        | 54        |
| Mischkultur mit variiertem Ceftazidimbehandlungsschema .....                     | 62        |
| <b>4.2. Mathematische Modellierung der <i>time-kill</i>-Experimente .....</b>    | <b>65</b> |
| Modell für limitiertes Wachstum .....  | 65        |
| Mischkultur ohne Ceftazidimbehandlung .....                                      | 66        |
| Mischkultur mit Ceftazidimbehandlung .....                                       | 72        |
| Modellierung einer zweiten Wachstumsphase.....                                   | 76        |
| Resistente und empfindliche Subpopulationen .....                                | 81        |
| Mischkultur mit variierten Ceftazidimkonzentrationen.....                        | 83        |
| <b>5. DISKUSSION .....</b>   | <b>87</b> |
| <b>5.1. Speziesspezifische Wachstumscharakteristika in der Mischkultur .....</b> | <b>87</b> |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.2.  | Nahrungskette in der unbehandelten Mischkultur .....                                 | 89  |
| 5.3.  | Die qT-RFLP-Methode als analytisches Werkzeug für <i>time-kill</i> -Experimente..... | 91  |
| 5.4.  | Interspezies Effekte in ceftazidimbehandelten Mischkulturen.....                     | 92  |
| 5.5.  | Lactamaseaktivität .....   | 94  |
| 5.6.  | Die wiederholte Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim.....                       | 97  |
| 5.7.  | Wachstum und Lyse in Abhängigkeit von der Ceftazidimkonzentration.....               | 98  |
| 5.8.  | Metabolismus in ceftazidimbehandelten Rein- und Mischkulturen .....                  | 100 |
| 5.9.  | Mathematische Modellierung der <i>time-kill</i> -Experimente .....                   | 101 |
| 5.10. | Parameterschätzung und Parametercharakterisierung .....                              | 103 |
| 5.11. | Ceftazidimbehandlung der Mischinfektion im Patienten.....                            | 107 |
| 6.    | FAZIT .....  | 108 |
| 6.1.  | Interspezieseffekte.....   | 108 |
| 6.2.  | Ceftazidimbehandlung der Mischkultur.....  | 109 |
| 6.3.  | Modellierung.....  | 110 |
| 7.    | AUSBLICK.....  | 111 |
| 8.    | ABBILDUNGEN .....  | 114 |
| 9.    | TABELLEN.....  | 118 |
| 10.   | LITERATURVERZEICHNIS .....   | 120 |
|       | APPENDIX.....  | 127 |
|       | Mischkultur mit Ceftazidimbehandlung .....   | 127 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Lösungen zur Verwendung in der qT-RFLP-Analyse .....</b> | <b>129</b> |
| <b>Chemikalien und Geräte .....</b>                         | <b>130</b> |
| <b>Medienzusammensetzung .....</b>                          | <b>133</b> |
| <b>Arbeitsanweisung qT-RFLP-Methode .....</b>               | <b>136</b> |
| <b>PUBLIKATIONSLISTE.....</b>                               | <b>141</b> |
| <b>KONFERENZBEITRÄGE .....</b>                              | <b>141</b> |
| <b>Vorträge .....</b>                                       | <b>141</b> |
| <b>Poster .....</b>   | <b>141</b> |
| <b>LISTE DER BETREUTEN ARBEITEN.....</b>                    | <b>142</b> |
| <b>Studienarbeiten .....</b>                                | <b>142</b> |
| <b>CURRICULUM VITAE CHRISTIAN RIEDELE.....</b>              | <b>143</b> |

# Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

## Abkürzungen

|                   |   |
|-------------------|---|
| 2KDG              | 2-Keto-D-gluconat   |
| ACN               | Acetonitril   |
| ATCC              | american type culture collection  |
| ATP               | Adenosintriphosphat   |
| AU                | arbitrary unit  |
| <i>B. cepacia</i> | <i>Burkholderia cepacia</i>   |
| cAMP              | zyklisches Adenosinmonophosphat   |
| CF                | Cystische Fibrose   |
| DSMZ/DSM          | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH                     |
| FIM               | Fisher-Informationsmatrix   |
| FQS               | Fehlerquadratsumme  |
| GC                | Gaschromatographie  |
| ge                | Genomäquivalente  |
| Glc               | Glucose   |
| Gln               | Glutamin  |
| Glu               | Glutamat  |
| HPLC              | Hochdruckflüssigchromatographie ( <i>high pressure liquid chromatographie</i> ) |
| IQS               | interner Quantifizierungsstandard   |
| KBE               | koloniebildende Einheit   |
| LB-Medium         | <i>lysogeny broth</i> -Medium   |



|                      |   |
|----------------------|---|
| LMG                  | Belgische Mikroorganismensammlung                                 |
| M199                 | Standardmedium (kommerzieller Name)                               |
| min                  | Minuten   |
| MHK                  | minimale Hemmkonzentration  |
| mL                   | Milliliter  |
| MS                   | Massenspektrometer  |
| NTA                  | Nitriloacetat (nitrilo triacetic acid)                            |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                     |
| PBP                  | penicilinbindendes Protein ( <i>penicilin binding protein</i> )   |
| PCR                  | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )     |
| PD                   | Pharmacodynamik   |
| pH                   | potentia Hydrogenii   |
| PK                   | Pharmacokinetik   |
| PMMA                 | Polymethylmetacrylat  |
| PS                   | Polystyrol  |
| qT-RFLP              | quantitativer terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| <i>S. aureus</i>     | <i>Staphylococcus aureus</i>                                      |
| SOP                  | Arbeitsanweisung (standard operation procedure)                   |
| U                    | Umdrehungen   |

## Symbole

| Symbol            | Einheit               | Erläuterung  |
|-------------------|-----------------------|--|
| $A$               |                       | Peakfläche im Elektropherogramm der qT-RFLP-Analyse  |
| $B$               | -                     | Anzahl der simulierten Probenahmen der <i>bootstrap</i> - Analyse                                |
| $b$               |                       | Steigung einer linearen Regression   |
| $\hat{B}$         | -                     | Bestimmtheitsmaß   |
| $c$               | -                     | Genkopienzahl im Genom   |
| $C$               | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Antibiotikumskonzentration   |
| $D$               | [-]                   | Anzahl Zellverdopplungen   |
| $EC_{50}$         | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Antibiotikumskonzentration bei halbmaximaler Sterbe- bzw. Abtötungsrate                          |
| $f$               | -                     | Korrekturfaktor  |
| $FG$              | -                     | Anzahl an Freiheitsgraden  |
| $F_T$             |                       | Verteilungsfunktion  |
| $fT_{>MHK}$       | h                     | Zeitintervall mit einer freien Antibiotikumskonzentration (im Überstand) überhalb des MHK-Wertes |
| $g$               | -                     | Erdbeschleunigung  |
| $H$               | -                     | Hill-Koeffizient   |
| $k_c$             | $\text{h}^{-1}$       | Spezifische Zerfallsrate von Ceftazidim  |
| $k_L$             | $\text{h}^{-1}$       | Spezifische Lyserate   |
| $k_{replik}$      | $\text{h}^{-1}$       | Spezifische Replikationsrate   |
| $k_{replik, max}$ | $\text{h}^{-1}$       | Spezifische maximale Replikationsrate  |
| $k_{tot}$         | $\text{h}^{-1}$       | Spezifische Sterberate   |
| $k_{tot, max}$    | $\text{h}^{-1}$       | Maximale spezifische Sterberate  |
| $\%L$             | -                     | Relative Breite eines Konfidenzintervalls  |
| $MHK$             | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Minimale Hemmkonzentration   |
| $N$               | $\text{ge mL}^{-1}$   | Zellkonzentration  |
| $n$               | -                     | Anzahl   |
| $N^*$             | $\text{ge mL}^{-1}$   | Variable Zellkonzentration des Nelder-Mead Simplexalgorithmus                                    |
| $N_{50}$          | $\text{ge mL}^{-1}$   | Halbmaximale Zellkonzentration   |
| $N_{max}$         | $\text{ge mL}^{-1}$   | Maximale Zellkonzentration   |

|            |                     |  |
|------------|---------------------|--|
| $OD$       | AU                  | Optische Dichte  |
| $P$        | -                   | P-Wert   |
| $Q$        |                     | Quartilgrenzen   |
| $Q_x$      |                     | Summe der Abweichungsquadrate der unabhängigen Regressionsvariablen        |
| $s$        | $mL^{-1}$           | Genkopienzahl  |
| $sh$       | -                   | shape  |
| $sp$       | -                   | spread   |
| $t$        | h                   | Zeit   |
| $T_{>MHK}$ | h                   | Zeitintervall mit einer Antibiotikumskonzentration überhalb des MHK-Wertes |
| $t_{lag}$  | h                   | Zeitversatz  |
| $WR_{max}$ | $ge mL^{-1} h^{-1}$ | maximale Wachstumsrate   |
| $x$        |                     | Unabhängige Variable einer Regression - Messwert                           |
| $\bar{x}$  |                     | Unabhängige Variable einer Regression - Mittelwert                         |
| $y$        |                     | Abhängige Variable einer Regression - Messwert                             |
| $\hat{y}$  |                     | Abhängige Variable einer Regression - Schätzwert                           |

### Griechische Symbole

| Symbol         | Einheit  | Erläuterung                             |
|----------------|----------|---|
| $\alpha$       | -        | Signifikanzniveau                       |
| $\rho$         | -        | Linearer Korrelationskoeffizient        |
| $\sigma$       |          | Standardabweichung                      |
| $\sigma_{y,x}$ |          | Standardabweichung der $\hat{y}$ -Werte |
| $\theta$       | -        | Parameter                               |
| $\hat{\theta}$ | -        | Geschätzter Parameterwert               |
| $\bar{\theta}$ | -        | Mittelwert eines Parameters             |
| $\mu$          | $h^{-1}$ | Spezifische Wachstumsrate               |

## Indizes

|           |   |
|-----------|---|
| 0         | zum Zeitpunkt $t = 0$ h   |
| C         | Ceftazidim  |
| D         | Modalwert   |
| i         | Spezies; <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> oder <i>S. aureus</i> |
| Korrektur | Korrekturfaktor der Inokulumseinstellung                                |
| L         | Lyse  |
| lag       | Zeitversatz   |
| M         | Messwerte   |
| m         | Zählindex   |
| max       | maximal   |
| n         | Zählindex   |
| N         | normalverteilt  |
| np        | nicht-parametrische Verteilung  |
| o         | oben  |
| Ref       | Referenz  |
| u         | unten   |
| VK        | Vorkultur   |

## Abstract

For *in-vitro* studies, single bacterial isolates are commonly used for testing antibiotic susceptibilities. However, inter-species effects that may arise when mixed infections are treated with antibiotics obviously cannot be investigated by this approach. In the study presented here, the effect of ceftazidime against a model microbial community consisting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus* was studied in order to reveal effects that only may appear in ceftazidime-treated mixed culture. The work was based on a quantitative terminal restriction fragment length polymorphism (qT-RFLP), which allowed for species-specific and absolute cell enumeration. Also, the major substrates and metabolic products were measured for considering substrate competition. Dynamic effects of the species-specific cell concentration in the observed time range of 24 h (“time-kill experiment”) were described and evaluated by mathematical modelling.

Time-kill experiments were conducted with mixed and pure cultures in a defined medium containing 30 mg L<sup>-1</sup> ceftazidime. Inter-species effects were revealed by comparing growth and kill dynamics from experiments with treated and untreated mixed and pure cultures. The absolute and species-specific cell enumeration was done via qT-RFLP. For higher statistical significance three shake flasks were cultivated in parallel and each sample was analysed in a duplicate. The metabolites glucose, glutamine and glutamate were quantified with an automated enzyme detector. Ceftazidime as well as gluconate and 2-keto-gluconate (2KDG) were measured by HPLC.

The presented study revealed that *B. cepacia* has a growth advantage during the ceftazidime treatment in the mixed culture for various reasons. The microorganism develops a resistance against the antibiotic, induced by the antibiotic itself during exposure. This allowed for an extended growth phase while the other bacterial species were affected by the antibiotic. Even in the time interval when growth of *B. cepacia* was affected by the antibiotic, glucose was converted to 2-keto-gluconate, which cannot be taken up by *S. aureus*. Furthermore, *B. cepacia* actively lysed its competitor *P. aeruginosa* in mixed culture. However, this effect became only evident with the application of ceftazidime. Without ceftazidime-treatment *P. aeruginosa* lysed *S. aureus*.

It was also shown that *B. cepacia*, in contrast to the other two microorganisms, was able to produce one or more lactamases that could degrade ceftazidime. The lactamase production was induced by ceftazidime in a concentration dependent manner and it increased dramatically with replenishing fresh medium.

Model simulations suggested that the regrowth phase observed with *B. cepacia* did not result from the decreasing ceftazidime concentration caused by the lactamase activity. Instead, it is likely to be a consequence of a resistant subpopulation of *B. cepacia* that was selected during antibiotic exposure.

## Kurzfassung

Zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit werden meist Bakterienisolate eingesetzt. Durch diesen Ansatz werden jedoch keine Speziesinteraktionen berücksichtigt, wie sie bei der Antibiotikabehandlung von tatsächlichen Infektionen auftreten können. In der hier präsentierten Studie wurde die Wirkung von Ceftazidim auf eine Modellmischgemeinschaft bestehend aus den Keimen *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus* im Hinblick auf mögliche relevante Interaktionen untersucht. In erster Linie beruhte die Arbeit auf einer neuen molekularbiologischen Analysemethode zur absoluten und speziesspezifischen Bestimmung der Zellkonzentration. Daneben wurden die Substrate Glucose, Glutamin, Glutamat und die Produkte Gluconat und 2-Keto-D-gluconat (2KDG) bestimmt, um Substratkonkurrenz, als die einfachste der möglichen Interaktionsmöglichkeiten, berücksichtigen zu können. Dynamiken der speziesspezifischen Zellkonzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 h (sogenannte *time-kill* Experimente) wurden mit Hilfe mathematischer Modelle beschrieben und analysiert.

Die *time-kill* Experimente wurden mit Rein- und Mischkulturen im Schüttelkolben und einem definierten Medium mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim durchgeführt. Speziesinteraktionen wurden durch den Vergleich der Wachstums- und Abtötungsdynamiken in behandelten und unbehandelten Rein- und Mischkulturen aufgedeckt. Zur speziesspezifischen Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Methode des quantitativen terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (qT-RFLP) eingesetzt. Um die statistische Signifikanz zu erhöhen, wurden alle Versuche in drei parallelen Kolben durchgeführt und jede Probe zweifach bestimmt. Die Substratkonzentration von Glucose, Glutamin und Glutamat wurden mit einem automatischen Enzymdetektor bestimmt und die Konzentrationen von Gluconat und 2KDG, sowie die Konzentration von Ceftazidim mittels HPLC bestimmt.

Die vorliegende Studie zeigte, dass *B. cepacia* sich aufgrund überlegener Wachstumseigenschaften in der ceftazidimbehandelten Mischkultur gegenüber den anderen zwei Keimen durchsetzen konnte. Dies hatte mehrere Ursachen. Zum einen entwickelte *B. cepacia* innerhalb des Versuchszeitraums eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum. Zum anderen war das Bakterium selbst dann noch in der Lage das Substrat Glucose in 2KDG umzuwandeln, als er selbst durch das Antibiotikum beeinträchtigt war. In der Folge führte das

zu einem Substratentzug für *S. aureus*, da dieser 2KDG nicht verstoffwechseln konnte. Weiterhin lysierte *B. cepacia* aktiv den Konkurrenten *P. aeruginosa*. Hingegen trat dieser Effekt nur bei der Anwendung von Ceftazidim auf. In der unbehandelten Kultur lysierte hingegen *P. aeruginosa* den Konkurrenzkeim *S. aureus*.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *B. cepacia* im Gegensatz zu den beiden anderen Keimen in der Lage war, eine oder mehrere Lactamasen zu bilden, die Ceftazidim abbauen konnten. Die Induktion der Lactamasebildung war abhängig von der Ceftazidimkonzentration. Durch Zuführung neuer Substrate konnte die Abbauaktivität nochmal deutlich gesteigert werden.

Die Auswertung der mathematischen Modelle deutet daraufhin, dass die zweite Wachstumsphase von *B. cepacia* nicht die Folge der abnehmenden Ceftazidimkonzentration war, sondern vielmehr auf die Selektion einer resistenten Subpopulation zurückzuführen ist.



## 1. Einleitung

Einer der größten Erfolge in der Medizin wird von vielen auf den 28. September 1928 datiert. Damals bemerkte Alexander Fleming eher zufällig eine keimabtötende Wirkung des Schimmelpilz *Penicillium* in einer seiner *Staphylokokken*-Kulturen (Fleming 1929). Bis der daraus isolierte Wirkstoff (Penicillin G) zum ersten Mal für eine lebensrettende Behandlung eingesetzt werden konnte, vergingen jedoch noch 12 weitere Jahre (1940). In der Zwischenzeit führten 1932, in Anlehnung an die Vorgehensweise und Entdeckungen von Paul Ehrlich, Untersuchungen von künstlichen Farbstoffen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung zur Entdeckung der Sulfonamide durch Gerhard Domagk 1932. Schon im Jahr 1933 gelang die erste lebensrettende Behandlung mit dem unter dem Namen Prontosil bekannten Wirkstoff. Der große Erfolg beider Antibiotika leitete sich einerseits natürlich aus der hohen Wirksamkeit gegen bakterielle Infektionen ab, andererseits spielte aber auch die geringe Toxizität für den Menschen eine ausschlaggebende Rolle. Beides war damals umso bemerkenswerter, da es in dieser Ausprägung und in dieser Kombination bis dato bei keinem anderem Wirkstoffe bekannt war (Greenwood 2008).

Der Begriff Antibiotikum wurde früher ausschließlich für natürlich produzierte Stoffe verwendet. Heute hingegen wird der Begriff weiter gefasst und bezeichnet alle niedermolekulare Stoffe, die schon bei geringer Konzentration das Wachstum und die Vermehrung von Bakterien oder Pilzen hemmen (Koolmann and Röhm 2003). Das schließt somit auch Verbindungen aus der Stoffklasse der Sulfonamide (chemisch synthetisiert) ein, welche früher noch - weil chemisch synthetisiert - als Chemotherapeutika bezeichnet wurden (Greenwood 2008).

In der Klassifizierung von Antibiotika wird einerseits nach chemischer Stoffklasse unterschieden, andererseits nach dem Wirkungsmechanismus. Letzterer basiert zumindest bei den meisten Antibiotika auf einer Enzymhemmung in der Bakterienzelle. Dabei greifen die effektivsten Antibiotika ausschließlich bakterienspezifische Eigenschaften an, wodurch nur der Erreger und nicht der Wirt getroffen wird (Madigan and Martinko 2006).

Beispielweise blockieren  $\beta$ -Lactamantibiotika das aktive Zentrum von Enzymen, die an der Quervernetzung der bakteriellen Zellwand beteiligt sind (Schlegel 2007). Andere Stoffe, wie etwa die Aminoglykoside, blockieren das bakterielle Ribosom und somit die Translation von

Proteinen (Koolmann and Röhm 2003). Die Sulfonamide blockieren die ausschließlich bei Mikroorganismen vorkommende Synthese der Folsäure, einer Vorstufe des für die Bakterienzelle unentbehrlichen Coenzym Tetrahydrofolats (Schlegel 2007).

Schon kurz nach der Einführung von Antibiotika in die klinische Praxis erschienen die ersten resistenten Keime (1935). Eines der frühesten Beispiele war die Resistenz von *Neisseria gonorrhoeae* gegenüber Sulphonamid (Gillespie 2001). Heutzutage dominieren in öffentlichen Diskussionen zum Thema Antibiotikaresistenzen methicillinresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA, wird mittlerweile auch als „multiresistenter *S. aureus*“ interpretiert). Diese Bakterienspezies zeigte sich als die bisher anpassungsfähigste. Die ersten Stämme, die gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig resistent waren, gehörten zu dieser Spezies (Barrett 1968). Allein die Bezeichnung „methicillinresistent“ zeigt nicht nur eine Resistenz gegen Methicillin an, sondern impliziert gleichzeitig Resistenzen gegen alle weiteren  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Kommen noch Resistenzen gegen Antibiotika anderer Stoffklassen hinzu, wird eine erfolgreiche Behandlung schwierig und im schlimmsten Fall unmöglich. Dies ist umso bedrohlicher, als epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass die Verbreitung multiresistenter Keime immer weiter zunimmt. Ähnliche Tendenzen sind für eine Vielzahl von Bakterienspezies zu beobachten, so dass mittlerweile die Euphorie zu Beginn des Antibiotikazeitalters gewichen ist und manche sogar schon vom aufkommenden der „post-antimikrobiellen“ Ära ohne wirksame Heilmittel sprechen (Cohen 1992). Man muss diese pessimistische Sichtweise nicht teilen, jedoch besteht kein Zweifel daran, dass auch weiterhin Forschung und Entwicklung weitergeführt werden müssen, um den bakteriellen Krankheitserregern immer einen Schritt voraus zu sein.

In besonderem Maße sind Patienten mit „Cystischer Fibrose“ (CF) auf effektive Antibiotika-Therapien angewiesen. Ein genetischer Defekt führt bei diesen Menschen letztlich zu einer chronischen Besiedelung der Lunge durch verschiedene Bakterien. Nur durch eine Kombinationstherapie, in der Antibiotikakuren eine zentrale Rolle spielen, ist es möglich, das Leben dieser Patienten mittlerweile auf durchschnittlich 40 Jahre zu erhöhen (George et al. 2009). Die Patienten können in jungen Jahren meist noch relativ leicht durch entsprechende Antibiotikagabe von Bakterienbesiedelungen der Lunge geheilt werden (Burns et al. 2001). Jedoch kommt es bei vielen Patienten später oft zu Infektionen mit multiresistenten Keimen, die deutlich schwieriger zu behandeln sind (Hurley et al. 1995; MacLeod et al. 2000).

Spätestens hier können genau abgestimmte Antibiotikakuren entscheidend zu einem Behandlungserfolg beitragen (Gloede et al. 2010). Zu den relevanten Aspekten, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, gehört die Wahl eines wirksamen Antibiotikums gegen den Infektionskeim, die wirksame Antibiotikamenge, die notwendige Behandlungsdauer, die zeitliche Änderung der Antibiotikakonzentration am Infektionsherd und die Entscheidung über kontinuierliche oder intermittierende Antibiotikagabe. Gerade im Vorfeld einer individuellen Behandlungsweise können nur *in-vitro* Experimente kurzfristig die notwendigen Daten als Grundlage einer Entscheidungshilfe liefern. Diese werden bisher jedoch in der klinischen Praxis anhand reiner Isolate durchgeführt (Amsterdam 2005). Infektionen, insbesondere in der Lunge von CF-Patienten, treten aber oft in Konsortien von mehreren Spezies auf (Mischinfektion). Dieser Umstand wird in *in-vitro* Experimenten mit reinen Isolaten nicht berücksichtigt. In der hier vorgestellten Arbeit sollte daher beispielhaft *in-vitro* die Wirkung eines Antibiotikums auf eine bakterielle Mischkultur untersucht werden. Die einzelnen Aspekte der Arbeit umfassten folgende Punkte:

- ▶ Charakterisierung des bakteriellen Wachstums in Rein- und Mischkultur
- ▶ Charakterisierung der Antibiotikumwirkung in Rein- und Mischkultur mit Antibiotikungabe
- ▶ Beschreibung der experimentellen Ergebnisse anhand mathematischer Modelle
- ▶ Auswertung der Modellierungsergebnisse unter Berücksichtigung des Messfehlers
- ▶ Identifizierung relevanter Bakterieninteraktionen

Als definierte Modellkultur wurde *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus* gewählt; drei Keime, die auch in der Lunge von CF-Patienten vorkommen können. Das verwendete Medium war chemisch definiert, so dass auch Untersuchungen auf Ebene der Metabolite möglich waren. Da in einer Mischkultur meist eine indirekte Interaktion über Substratkonkurrenz stattfindet, sollte dieser Aspekt als möglicher Einflussfaktor bei der Bewertung der Antibiotikumbehandlung miteinbezogen werden. Das verwendete Antibiotikum war Ceftazidim, ein Cephalosporin mit einer hohen Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* (Washington et al. 1993). Für die speziesspezifische Zellquantifizierung wurde eine neue Quantifizierungsmethode eingesetzt, die auf einem molekularbiologischen Ansatz beruht (Trotha et al. 2002; Schmidt et al. 2007). Erst dadurch wurde es möglich die Dynamik der Zellkonzentration nach einem Antibiotikapuls spezifisch

für jeden Keim innerhalb der Mischkultur zu verfolgen. Mit automatisierten Enzymsensoren wurden die Substrate Glucose, Glutamin und Glutamat quantifiziert. Mit einer HPLC-Methode, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, konnten die metabolischen Zwischenprodukte Gluconat und 2-D-Ketogluconat (2KDG) quantifiziert werden. Das verwendete Ceftazidim ist in wässriger Lösung instabil. Zudem sind die verwendeten Bakterien potentiell in der Lage Lactamasen zu bilden, die Ceftazidim enzymatisch hydrolysieren können. Beide Effekte können zu einer Verringerung der Antibiotikumswirkung führen und somit die Versuchsergebnisse entscheidend beeinflussen. Daher wurde eine weitere HPLC-Methode entwickelt, mit der die freie Ceftazidimkonzentration in Kulturproben bestimmt werden konnte, um eventuelle Auswirkung sinkender Antibiotikumskonzentrationen quantitativ berücksichtigen zu können.

Die Ergebnisse der experimentellen Studien waren dynamische Verläufe von speziesspezifischen Zellkonzentrationen, von Metabolit- und Ceftazidimkonzentrationen. Die Auswertung und der Vergleich dieser Ergebnisse sollte durch die Beschreibung anhand mathematischer Modelle unterstützt werden, in denen auch der individuelle Messfehler einzelner Proben quantitativ berücksichtigt wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Bootstrap-Methode angewendet (Joshi et al. 2006b).

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Bakterielle Dreier-Mischkultur aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus*

Als Modell-Mischkultur wurde in dieser Arbeit ein definiertes Konsortium aus den Stämmen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Burkholderia cepacia* DSM 7288 und *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 verwendet. Motiviert ist diese Auswahl einerseits durch deren Vorkommen in der Lunge von CF-Patienten (wie im nächsten Abschnitt näher ausgeführt wird), andererseits wurden in einer vorangegangenen Arbeit speziell die genannten Stämme der jeweiligen Spezies aufgrund ähnlicher Wachstumsdynamiken ausgewählt (Schmidt 2008). Letzteres war notwendig, um unter normalen Wachstumsbedingungen eine ausgeglichene Konkurrenzsituation in der Mischkultur zu gewährleisten, in der keiner der Keime dominiert.

#### **Vorkommen als opportunistische Infektionserreger im Zusammenhang mit Cystischer Fibrose**

Wie schon in vorherigen Kapiteln erwähnt, gehören *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* zu den Haupterregern bakterieller Mischinfektionen im Zusammenhang mit Cystischer Fibrose. Diese Krankheit tritt in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von ca. 1 von 2500 auf (Campana et al. 2004). Die Ursache sind Mutationen auf dem CF *transmembrane conductor regulator gene* (*cftr*). Das CFTR-Protein ist ein cAMP-regulierter Chloridkanal, der darüber hinaus auch als Regulator für andere Kanäle wirkt (Dorwart et al. 2004). Der Defekt dieses Transportkanals führt zu einer verringerten Chloridsekretion in die Atemwege und zu einer erhöhten Natriumaufnahme aus den Atemwegen. Die Kombination aus beiden Effekten bedingt einen Atemwegsschleim mit relativ geringer Feuchte. Dies wiederum führt zu einer verringerten Klärung des Schleims und einer erhöhten Schleimretention, was die Besiedelung durch Bakterien befördert. Im Laufe des Krankheitsverlaufs kommt es immer wieder zu Infektionen bis schließlich die Lunge chronisch infiziert ist (Boucher 2002). Auch bei geringer Eigenaktivität der vorhandenen Bakterien entsteht so ein dauernder Entzündungs- und Infektionsreiz, der für eine permanente Aktivität des Immunsystems in der Lunge sorgt. Letztlich wird die Lunge so geschädigt, dass ohne Lungentransplantation Lungenversagen und Tod des Patienten folgt. Jedoch konnte in den letzten Jahrzehnten die Lebenserwartung auf mittlerweile ca. 40 Jahre

verlängert werden. Dazu trugen verbesserte Therapiemaßnahmen bei, die unterem anderem auch aggressive Antibiotikakuren vorsehen (George et al. 2009).

Typischerweise ändert sich die Zusammensetzung der Mischinfektion einer CF-Lunge im Laufe der Zeit. Im Allgemeinen ist *Haemophilus* die erste Bakterienart, der die Infektion in der Lunge dominiert. Er wird meist abgelöst von *S. aureus*-Stämmen, die wiederum später von *P. aeruginosa* abgelöst werden (Gilligan 1991). Danach ist eine vollständige Beseitigung von *P. aeruginosa* meist nur noch vorübergehend möglich. Anfangs ist dies noch einfacher, da die meist noch harmloseren nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Stämme erscheinen, welche noch durch gezielte Antibiotikatherapien vollständig beseitigt werden können. Nach und nach treten jedoch häufig Stämme mit erhöhten Resistenzen auf, die deutlich schwerer zu behandeln sind (Burns et al. 2001). Somit manifestiert sich eine chronische Lungeninfektion durch *P. aeruginosa*, die als Hauptgrund für das Lungenversagen gelten muss (George et al. 2009).

Als opportunistische Infektionskeime im Zusammenhang mit Cystischer Fibrose treten die verschiedenen Spezies des *B. cepacia*-Komplexes (Unterteilung in neun verschiedene *genomovare* (Vandamme et al. 1997)) zwar nicht so häufig auf wie *P. aeruginosa*, jedoch ist ihr Erscheinen mit einer raschen Verschlechterung der Lungenfunktion verbunden (Liou et al. 2001). Zudem sind *B. cepacia*-Infektionen aufgrund ihrer intrinsischen Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika am schwierigsten zu behandeln (George et al. 2009). Die verschiedenen Resistenzmechanismen werden neben der hohen Bandbreite an unterschiedlichen Substraten, die diese Spezies zu verstoffwechseln vermag, und der zahlreichen Virulenzfaktoren oft in Zusammenhang mit dem relativ großen Genom gebracht. So wurde bei der Sequenzierung des *B. cenocepacia*-Stammes J1215 ein Genom mit einer Gesamtlänge 8.01 Mb gefunden, das sich auf drei ringförmige Chromosomen und ein Plasmid verteilt (Holden et al. 2009).

*S. aureus* ist neben *P. aeruginosa* der häufigste Keim, der aus CF-Lungen isoliert werden kann (Goerke and Wolz 2010). Durch zahlreiche Adaptionsmechanismen ist der Keim in der Lage, CF-Lungen für Monate und sogar Jahre trotz entsprechender Therapien zu kolonisieren (Kahl et al. 2003). In diesem Zusammenhang scheint sich unter anderem eine Interaktion mit *P. aeruginosa* positiv auszuwirken: *P. aeruginosa* produziert Atmungsketteninhibitoren, die die

Atmung von *S. aureus* zu inhibieren. Aus der gedrosselten Atmung folgt zwar Wachstumsinhibierung aber eben auch eine geringer Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden, die häufig bei anti-Staphylococccen-Therapien eingesetzt werden (Goerke and Wolz 2010).

Insgesamt rücken Interaktionen zwischen einzelnen Spezies in der infizierten CF-Lunge zunehmend in den Fokus der Forschung (Brogden et al. 2005; Mashburn et al. 2005; Pedron and Sansonetti 2008). Guss et al. (Guss et al. 2011) konnten beispielsweise mehr als 60 verschiedene Mikroorganismuskulturen in Sputumproben von CF-Patienten entdecken, von denen einige nicht-kultivierbare Organismen enthielten (Pedron and Sansonetti 2008), die bisher kaum berücksichtigt wurden. Weiterhin gibt es Hinweise, daß der Rückgang der mikrobiellen Diversität mit verschlechterten Lungenfunktion korreliert (Zemanick et al. 2011).

### **Herausforderungen an die Antibiotikumbehandlung**

Eine der größten Herausforderungen bei der Antibiotikabehandlung von Sekundärinfektionen im Zusammenhang mit CF stellt das Aufkommen resistenter und multi-resistenter Erreger dar. Antibiotikaresistenzen gehen auf verschiedene Mechanismen zurück (Fisher et al. 2005). Dazu gehört die Verringerung der Permeabilität der äußeren Zellmembran (Gram-negative Bakterien) bzw. der Zellwand (Gram-positive Bakterien), Überexpression des Antibiotikumzielproteins, Veränderung des Antibiotikumzielproteins, die vermehrte Expression von Transporter Systemen (sogenannte: *Efflux*-Pumpen) zur Reduktion der intrazellulären Antibiotikumkonzentration durch „Abpumpen“, sowie die Expression von  $\beta$ -Lactamasen, ein Enzym welches  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hydrolysiert und damit unwirksam macht.

Die ständig fortschreitende Zunahme und Ausbreitung resistenter Keime macht eine ständige Anpassung von Antibiotikatherapien notwendig. Dies ist insofern wichtig, da immer weniger neue Antibiotika entwickelt werden (Krause 1992). Bei CF-Patienten kommt hinzu, dass sie einerseits lebenslang immer wieder auf erfolgreiche Antibiotikatherapien angewiesen sind und andererseits besonders durch resistente Bakterien gefährdet werden, die durch die wiederholten Antibiotikatherapien selektiert werden. So wurden in einer Studie mit 1075 nicht-CF-assoziierten *P. aeruginosa*-Stämmen in 26 % davon eine

Impermeabilität als alleiniger Resistenzmechanismus gegen Amikacin gefunden, während in CF-Isolaten Impermeabilität der am meisten vorkommende Mechanismus gegen Amikacin war (Hurley et al. 1995; MacLeod et al. 2000; George et al. 2009). Weiterhin stellt die Ausbreitung genetisch codierter Antibiotikaresistenzen durch horizontalen Gentransfer ein Problem dar, das ständige epidemiologische Überwachung erfordert. Insofern ist die Anpassung der Behandlung bakterieller Infektionen ein fortdauernder Anpassungsprozess an die sich stets ändernden natürlichen Gegebenheiten ohne Aussicht auf ein Ende.

### **Glucosestoffwechsel von *P. aeruginosa* und *B. cepacia***

Bei der Untersuchung von Mikroorganismen in Mischkultur ist die am häufigsten auftretende Interaktion die Konkurrenz um die limitierenden Substrate. Bei der Auswertung der experimentellen Ergebnisse hinsichtlich Mikroorganismeninteraktion wird dieser Umstand soweit wie möglich berücksichtigt. Dazu soll an dieser Stelle eine Besonderheit des Glucosestoffwechsels von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* erläutert, der dazu führt, dass infolge des Glucoseabbaus weitere Substrate, wie Gluconat und 2KDG zwischenzeitlich im Medium angereichert werden können.

Der Glucosestoffwechsel von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (früher *Pseudomonas cepacia*) kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege erfolgen (Lessie and Phibbs 1984). Der sogenannte oxidative Stoffwechsel umfasst die Oxidation von Glucose zu Gluconat und 2-D-Ketogluconat durch eine membrangebundene Glucosedehydrogenase und eine Gluconatdehydrogenase im Periplasma (Abbildung 1). Alternativ kann Glucose direkt in das Cytoplasma über den sogenannten phosphorylativen Stoffwechselweg aufgenommen werden. Dieser beinhaltet die Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat, gefolgt von der Oxidation zu Gluconat-6-Phosphat und des weiteren Katabolismus im Entner-Doudoroff-Weg (Lessie and Phibbs 1984). Ebenso können Gluconat und 2KDG über die entsprechenden Transportsysteme direkt in das Cytosol aufgenommen werden und über 6-Phosphogluconat im Entner-Doudoroff-Weg abgebaut zu werden. In welchem Umfang der jeweilige Stoffwechselweg genutzt wird, um Glucose in 6-Phosphogluconat umzuwandeln, wird durch die Genexpression der beteiligten Enzyme gesteuert (Tlemcani et al. 2008). In der Folge ist es möglich, dass sich durch den bevorzugten Abbau von Glucose über den oxidativen Stoffwechsel Gluconat oder 2KDG im Medium anreichern. Die Aktivierung der beteiligten Enzyme wird wiederum durch die Konzentration der verfügbaren Metabolite (Glucose,



Gluconat, 2KDG) beeinflusst und kann zwischen verschiedenen Spezies variieren (Vicente and Canovas 1973; Swanson et al. 2000; Tlemcani et al. 2008).

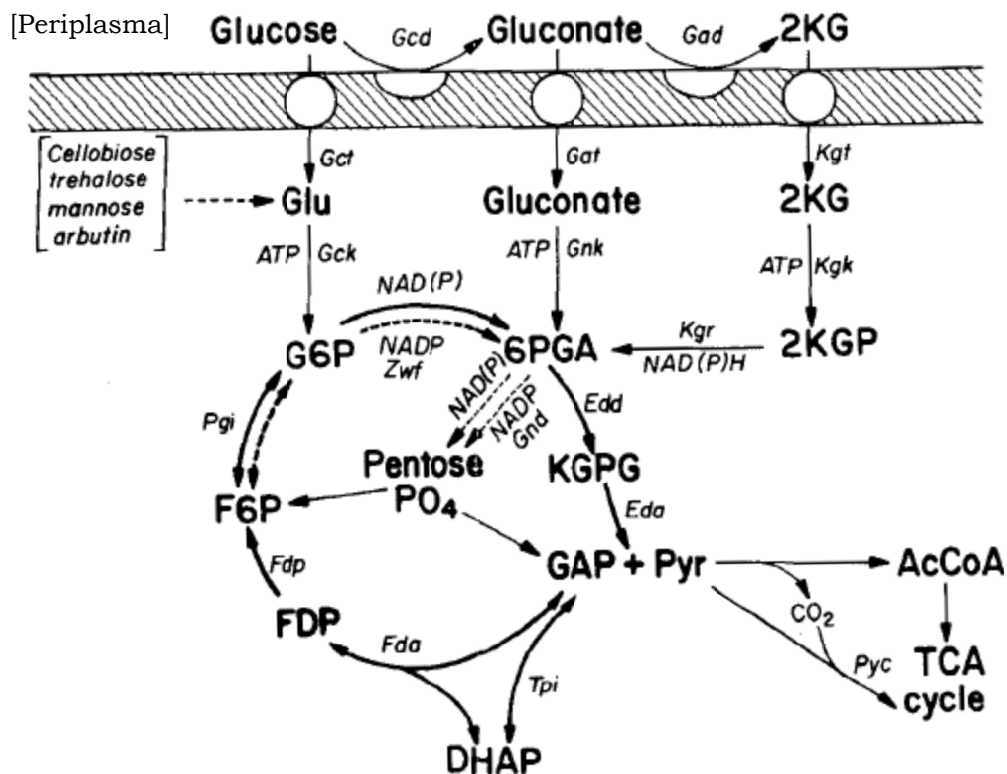


Abbildung 1: Glucosestoffwechsel der Pseudomonaden nach (Lessie and Phibbs 1984). Die gepunkteten Linien zeigen spezielle Charakteristika von *Burkholderia cepacia* (früher *Pseudomonas cepacia*) an. Alle anderen Reaktionen wurden für *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Abkürzungen: Gcd und Gad: membrangebundene Glucose- und Gluconatdehydrogenase; Gct, Gat, Kgt und Gck, Gnk, Kgk bezeichnen das jeweilige Transportsystem und die ATP-abhängigen Kinasen für Glucose, Gluconat und 2-Keto-D-gluconat (hier: 2KG); Kgr, 2-keto-6-Phosphogluconatreduktase; Zwf und Gnd, Glucose-6-Phosphat (G6P) und 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6PGA); Edd und Eda, 6PGA-Dehydratase und KDPG-Aldolase (KDPG: 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat); Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP); Tpi, Triosephosphatisomerase; Fda, Fructose-1,6-Diphosphataldolase; Fdp, Fructose-1,6-Diphosphatase; Pgi, Phosphoglucoisomerase; Pyc, Pyruvatcarboxylase

## **2.2. *In-vitro*-Methoden zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika**

### **Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) als Standardkenngröße der Antibiotikumwirksamkeit**

Die Abtötungseffizienz eines Antibiotikums ist eine entscheidende Größe in der evidenzbasierten Behandlung von Bakterien. Diese muss in jedem medizinischen Einzelfall neu bestimmt werden und ist damit Bestandteil der Standardanalytik in vielen medizinischen Einrichtungen. Die Notwendigkeit beruht auf der Tatsache, dass die Wirkung eines Antibiotikums nicht nur zwischen den Bakterienspezies, sondern auch von Bakterienstamm zu Bakterienstamm der gleichen Spezies stark variieren kann und somit für ein optimales Ergebnis keine allgemein gültige Behandlungsgrundlage existiert (Zhanel et al. 2008).

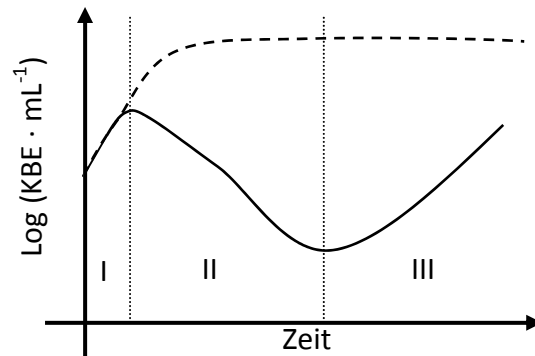
Gewöhnlich wird die Antibiotikumseffizienz in der sogenannten „Minimalen Hemmkonzentration (MHK)“ angegeben. Definiert ist der MHK-Wert als die geringste Antibiotikumskonzentration bei der gerade kein sichtbares Wachstum des Bakterienisolates nach 18 – 24 h Inkubation mehr auftritt (DIN58940-81 ; NCCLS 2000). Bestimmt wird der MHK durch Titration, in der die Hemmwirkung von Antibiotikumskonzentrationen in 1:2-Verdünnungsschritten getestet wird. Das dabei verwendete Medium wird in Abhängigkeit vom Testkeimen gewählt, für die meisten Keime wird jedoch Müller-Hinton-Brühe empfohlen (DIN58940-81 ; NCCLS 2000). In seiner Art ist der MHK-Wert eine eher willkürlich gewählte Größe. Seine Bedeutung als Standardkenngröße zur Charakterisierung der antibakteriellen Wirkung leitet sich aus seiner relativ einfachen und billigen experimentellen Bestimmung, seiner relativ guten Reproduzierbarkeit und der weiten Verbreitung und damit der guten Datenvergleichbarkeit ab (Turnidge 1998; Czock and Keller 2007).

Die Verwendung des MHK-Werts als alleinige Kenngröße zur Beschreibung der Antibiotikumseffizienz stößt jedoch schnell an Grenzen. So wird der MHK-Wert als Schwellenwert verstanden. Dabei zeigt sich, dass einerseits bei Konzentrationen unterhalb des MHK-Wertes antimikrobielle Wirkung auftreten kann und andererseits bei Konzentrationen entsprechend des MHK-Wertes nicht die maximale Abtötungsrate erreicht wird (Ebert ; Craig 1990). Weiterhin bleiben alle zeitlich veränderlichen Effekte während der Inkubationsdauer von 24 h verborgen (Yano et al. 1998). Um diese Limitierung zu umgehen

wurden Methoden zur detaillierteren Untersuchungen der Wechselwirkung Antibiotikum – Bakterien entwickelt (siehe nächste Kapitel „Dynamische Methoden“).

### **Dynamische Methoden**

Die Beobachtung dynamischer Effekte bei der Behandlung von Bakterien mit einem Antibiotikum erfolgt in sogenannten *time-kill*-Experimenten. Hierbei wird nicht ein einzelner Messwert innerhalb eines standardisierten Messverfahrens ausgelesen (siehe „Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) als Standardkenngröße der Antibiotikumwirksamkeit“), sondern mehrere Proben werden während des gesamten Versuchszeitraums (meist 24 h) analysiert (Yano et al. 1998). Die Auftragung der Daten erfolgt in der Anzahl „koloniebildender Einheiten (KBE)“ in Abhängigkeit der Zeit. Diese Einheit entspricht einer Zellkonzentration, die mit dem Plattenausstrichverfahren bestimmt wurde. Dabei wird ein bestimmtes Probenvolumen auf Agarplatten ausgestrichen, inkubiert und anschließend die sichtbaren Kolonien ausgezählt. Die ausgezählten Kolonien werden dann auf ein Probenvolumen von 1 mL hochgerechnet und in  $\text{KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$  angegeben. Mit dieser Quantifizierungsmethode werden nur vermehrungsfähige (= vitale) Zellen, nicht aber tote Zellen erfasst (Bast 1999). Demnach ist die Zellkonzentration in der Einheit  $\text{KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$  eine „Summengröße“, welche sich aus mehreren Eigenschaften, hier Anzahl und Vitalität, zusammensetzt. Weitere Methoden zur Untersuchung von antibiotikabehandelten Bakterienkulturen wurden von Lehtinen et al. (Lehtinen et al. 2006) anhand von genetisch veränderten *Escherichia coli*-Stämmen verglichen. So wurde neben der bekannte Plattenausstrichmethode auch eine Fluoreszenz- und eine Biolumineszenzmethode verwendet. Mit der Fluoreszenzmethode konnte, basierend auf der Bildung von GFP (*green fluorescence protein*), die Gesamtzellzahl (lebend + tot) erfasst werden, während mit der Biolumineszenzmethode aufgrund der zugrundeliegenden ATP-abhängigen Reaktion allein die vitalen Zellen erfasst werden konnten. Da jedoch genetisch veränderte Bakterien mit GFP-Expression für die genannten optischen Methoden eine Grundvoraussetzung darstellen, eignen sich diese eher als Modell zur Charakterisierung von Bakterien-Antibiotikum-Interaktion. Direkte Informationen über die Antibiotikumswirkung auf Wildtyp-Bakterien können damit nicht gewonnen werden.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines typischen *time-kill* Experiments (durchgezogene Linie) und unbehandelte Kontrolle (gestrichelte Linie). Phase I: Wachstum bzw. *Lag*-Phase, Phase II: Abtöten, Phase III: erneutes Wachstum.

In Abbildung 2 ist beispielhaft der Verlauf eines typischen *time-kill* Experiments dargestellt (Brown and Garrett 1964; Li 1996; Yano et al. 1998; Chung et al. 2006; Katsube et al. 2008; Bulitta et al. 2009; Katsube et al. 2010). Es werden drei Phasen unterschieden: die erste Phase (I) beinhaltet die Wachstumsphase oder *Lag*-Phase (d.h. Zeitversatz von Inokulation bis Eintreten der Antibiotikumswirkung), die zweite Phase (II) wird als Abtötungsphase bezeichnet und die dritte Phase beschreibt eine erneute Wachstumsphase. Inwieweit die einzelnen Phasen überhaupt auftreten bzw. wie stark sie ausgeprägt sind, hängt vom einzelnen Experiment (Bakterienstamm, Antibiotikum, Antibiotikumskonzentration) ab und kann stark variieren.

### ***Lag*-Phase (Phase I)**

Die *Lag*-Phase zu Beginn einer *time-kill*-Kurve beschreibt einen Zeitversatz zwischen Inokulation und Beginn der Abtötungsphase. Während einer *Lag*-Phase ist meist Wachstum zu beobachten, was jedoch eine Folge aus dem Versuchsansatz selbst ist, da *time-kill*-Experimente gewöhnlich mit exponentiell wachsenden Bakterienpopulationen inokuliert werden. Die Ursache für den Verzögerungseffekt ist im Detail noch unbekannt. Letztlich geht man einerseits davon aus, dass ein Transportproblem vom Eindringen des Antibiotikums bis zum Vordringen zum Zielprotein vorliegt. So stellt beispielsweise die Zellwand und die Zellmembran eine Barriere für den Stofftransport des Antibiotikums in das Cytosol dar und kann somit zur Verzögerung der Antibiotikumswirkung (Absterben oder Lyse) beitragen (Li 1996). Andererseits erscheint eine Verzögerung zwischen der molekularen Wirkung des

Antibiotikums bis zum Eintreten eines makroskopisch messbaren Effekts. So kommt es zur Bindung an das Zielprotein nach dem das Antibiotikum in das Cytosol (oder auch nur in das Periplasma) gelangt ist, was aber nicht zum sofortigen Zelltod führt. Erst am Ende vieler Zwischenschritte stirbt die Zelle und lysiert (Giesbrecht et al. 1998; Li 2000) (siehe auch „Ceftazidim“). Somit trägt auch das zum Zeitversatz bei.

Unabhängig vom exakten Mechanismus kann durch die Erhöhung der Antibiotikumskonzentration die *Lag*-Phase verkürzt werden, da ein hoher Konzentrationsgradient die Diffusion des Antibiotikums in die Zelle positiv beeinflusst und gleichzeitig für eine höhere Bedeckung der Rezeptorbindungsstellen auf der Zelloberfläche sorgt (Li 2000).

### ***Abtötungsphase (Phase II)***

In der Abtötungsphase ist eine Reduktion der vitalen Zellkonzentration zu beobachten. Damit dies geschieht, muss jedoch - zumindest in der einfachsten Modellvorstellung - ein Schwellenwert (MHK-Wert) überschritten werden (Barger et al. 2003), so dass eine minimalen Abtötungsrate erreicht wird. Soll die Abtötungsrate weiter gesteigert werden, kann die Antibiotikumskonzentration erhöht werden (Czock et al. 2009). Dieser Zusammenhang gilt in erster Linie nur für gewisse Antibiotikumstoffklassen wie Aminoglykoside und Quinolone. Die Konzentrationsabhängigkeit von Glykopeptid- oder  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist dagegen weniger stark ausgeprägt (Turnidge 1998). So wird bei letzterem meist schon nach der drei- bis vierfachen MHK-Konzentration die maximale Abtötungsrate erreicht, die sich auch durch weitere Konzentrationserhöhung nicht mehr steigern lässt (Craig 1990). Eine Steigerung der Abtötungswirkung ist somit nur mehr durch Verlängerung der Wirkdauer möglich. Die relevante Kenngröße hierfür ist die Zeitspanne in der die Antibiotikumskonzentration über der MHK liegt, abgekürzt mit  $T_{>MHK}$  (Barger et al. 2003) (in einigen Fällen wird alternativ auch der Wert  $fT_{>MHK}$  angegeben, um explizit die Zeitspanne anzugeben, in der die *freie*, also im Medium messbare, Antibiotikumskonzentration über dem MHK-Wert liegt (Sevillano et al. 2008; Katsube et al. 2010)). So ist es beispielsweise die Aufgabe eines Mediziners die Antibiotikumsdosierung so einzustellen, dass ein optimaler  $T_{>MHK}$ -Wert für das entsprechende Antibiotikum im Organismus erreicht wird.

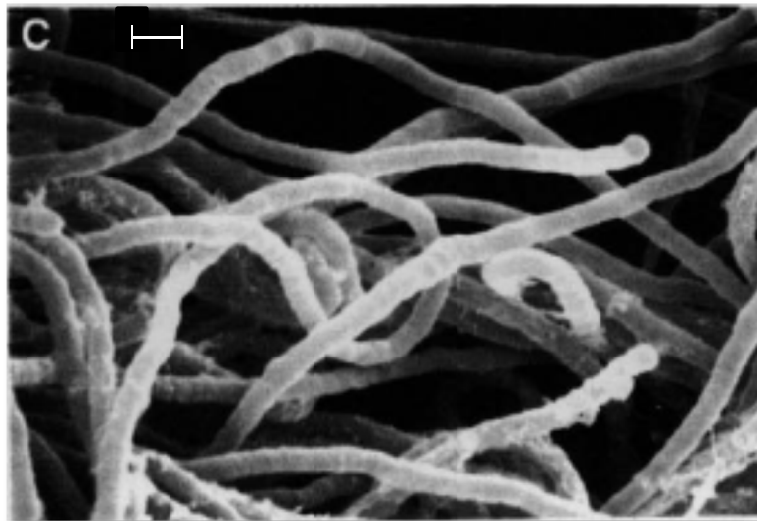
### ***Erneute Wachstumsphase (Phase III)***

In der zweiten Wachstumsphase zeigt sich die Eigenschaft der Bakterien, sich an den Antibiotikumsangriff anzupassen (Li 2000). Grundlage hierfür sind Antibiotikumsresistenzmechanismen wie: (1) Veränderung/Abbau des Antibiotikums, (2) Mutationen der Antibiotikumbindestelle, (3) verringerte Anreicherung in der Zelle (verringerte Aufnahme, erhöhte Ausscheidung), (4) Etablierung alternativer Stoffwechselwege mit Hilfe insensitiver Enzyme (McDermott et al. 2003) (siehe auch „Herausforderungen an die Antibiotikumbehandlung“). Als Ursache für die erneute Wachstumsphase eines typischen 24 h *time-kill* Experiments kommen jedoch nur Resistenzmechanismen in Frage, welche kurzfristig aktiviert werden können. So ist bekannt, dass die Induktion von  $\beta$ -Lactamasen schon 4 h nach Beginn einer Antibiotikumbehandlung das Maximum erreichen kann (Dalhoff and Cullmann 1984). Lactamasen sind Enzyme, die dem Aktivitätszentrum der Zielproteine der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ähneln, und in der Lage sind, nach erfolgter Bindung, den  $\beta$ -Lactamring des Antibiotikums zu hydrolysieren und dadurch zu neutralisieren. Dies entspricht dem Mechanismus (1) aus obiger Aufzählung. Im Vergleich mit den anderen Mechanismen gilt die Expression von  $\beta$ -Lactamasen als wirksamster Resistenzmechanismus gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (McDermott et al. 2003).

Andererseits wird häufig mit der Annahme gearbeitet, dass schon zu Beginn eines *time-kill*-Experiments verschiedene Populationen der gleichen Spezies mit jedoch unterschiedlichen Antibiotikumsresistenzen vorhanden sind (Czock and Keller 2007). Durch die Antibiotikumbehandlung kommt es dann zu einer Selektion, welche dazu führt, dass die antibiotikumsensible und anteilmäßig größte Population dezimiert wird und die anteilmäßig sehr geringe Population der resistenten Bakterien wächst und im Zeitverlauf zur zahlenmäßig dominierenden Population wird. Für einige  $\beta$ -Lactamantibiotika konnte gezeigt werden, dass mit erhöhter Antibiotikumskonzentration die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer resistenten, also gegenüber dem Antibiotikum unempfindlichen, Subpopulation geringer ist (Li et al. 1994), bzw. wenn die Konzentration hoch genug ist, dass selbst resistente Bakterien abgetötet werden und folglich das Auftreten einer zweiten Wachstumsphase unterbleibt, bzw. verzögert wird.

### Die Plattenausstrichmethode in der Kritik

Die Standardmethode zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl zur Untersuchung der Abtötungsdynamik von Antibiotika ist die Plattenausstrichmethode (siehe „Dynamische Methoden“). Wie im Kapitel „Ceftazidim“ beschrieben, führt die Anwendung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nicht zur sofortigen Zellyse. Gerade bei der Anwendung von Ceftazidim gegen Gram-negative Bakterien lässt sich die sogenannte Filamentbildung in starker Ausprägung beobachten. Dies hat Konsequenzen auf die Quantifizierung mit der Plattenausstrichmethode. So wird die tatsächliche Anzahl der Bakterien, wegen deren Anordnung als Vorkommen in Filamenten unterschätzt (Mattie 1981; Hanberger et al. 1991; Mackenzie et al. 1994; Steel et al. 2004). Ein Filament ist eine fadenförmige, stabile Aneinanderreihung von wenigen oder vielen Bakterien (Abbildung 3). Nach Ausstrich auf einer Agarplatte bildet dieses Filament jedoch nur eine Kolonie, was natürlich nicht der Anzahl der tatsächlich vorhandenen Bakterien entspricht.



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* MB3286 nach der Inkubation mit  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim für 7 h. Weiße Linie =  $1 \mu\text{m}$ . (Jackson and Kropp 1996)

Weiterhin ist mit der Verwendung der Plattenausstrichmethode ein hoher Aufwand verbunden. Für ein quantitatives Ergebnis mit dieser Methode wird der Ausstrich einer Probe in mehreren Verdünnungsstufen (meist vier), idealerweise auch in Dreifachbestimmung gefordert, um die statistische Signifikanz zu erhöhen. Die so schon hohe Anzahl von Plattenausstrichen pro Probe ( $3 \cdot 4 = 12$ ) wird durch die für

Mischkulturproben benötigten unterschiedlichen Plattenmedien sogar noch multipliziert ( $3 \cdot 4 \cdot 3 = 36$ ) (siehe dazu auch „*In-vitro* Tests zur Untersuchung der Antibiotikumwirksamkeit in Mischkulturen“). Weiterhin müssen die Proben direkt nach der Probenahme weiterverarbeitet werden und können nicht ohne Auswirkung auf das Analyseergebnis zwischengelagert werden.

### **2.3. *In-vitro* Tests zur Untersuchung der Antibiotikumwirksamkeit in Mischkulturen**

Für *in-vitro* Tests zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika werden typischerweise Bakterienisolate verwendet. Dies hat natürlich den Vorteil, dass das beobachtete Ergebnis dem jeweiligen Keim eindeutig zugeordnet werden kann. Jedoch kommen Bakterien in der Natur in den seltensten Fällen als Reinkultur vor, sondern meist in Konsortien mit anderen Spezies oder anderen Mikroorganismen. Auch aus der Medizin sind bakterielle Mischinfektionen bekannt (Costerton et al. 1999). Zu den bedeutendsten und bekanntesten gehören Lungeninfektionen bei Patienten mit CF und innere Unterleibsinfektionen als Folge von Verletzungen des Darmes. In der Lunge von Patienten mit CF findet man Konsortien, die hauptsächlich aus folgenden Keime bestehen: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia* (Gilligan 1991; Harrison 2007; George et al. 2009). Bei inneren Infektionen des menschlichen Unterleibs kennt man folgende Bakterienspezies: *Escherichia coli*, *Clostridium clostridioforme*, *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* (Goldstein and Snyderman 2004).

Aufgrund der medizinischen Bedeutung waren Mischkulturen, die als repräsentativ für Unterleibsinfektionen betrachtet wurden, schon Gegenstand einiger Untersuchung mit dem Ziel die Wirkung unterschiedlicher Antibiotika zu testen und daraus Behandlungsempfehlungen abzuleiten (Soriano et al. 1983; Ponte et al. 1984; Soriano and Ponte 1984; Heizmann et al. 1990; Nagy et al. 1990; Stearne et al. 2001; Pendlan et al. 2002; Hermsen et al. 2005; Schaumann et al. 2005; dos Santos et al. 2007; Sevillano et al. 2010). Eine Studie von McDermid et al. (McDermid et al. 1987) untersuchte die Wirkung von



Chlorhexidin bei der Behandlung einer bakteriellen Mischkultur, die als repräsentativ für die Mundflora gilt. In dieser Studie wurden folgende Keime verwendet: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus anguis*, *Streptococcus mitior*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *Neisseria* sp. A1078, *Veillonella parvula*, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*.

Weitere Studien befassten sich mit Antibiotikumwirkungen auf Modellkulturen, welche Konsortien abbilden sollten, die in der Nasopharynx zu finden sind (Sevillano et al. 2006; Cafini et al. 2008; Sevillano et al. 2008; Gonzalez et al. 2009). Diese bestanden hauptsächlich aus Bakterien der Spezies *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*.

Vergleichbare Studien mit Modellmischkulturen im Zusammenhang der Cystischen Fibrose sind dem Autor jedoch nicht bekannt, was die Signifikanz der vorliegenden Arbeit unterstreicht.

Die oben zitierten Studien untersuchten die Antibiotikumwirksamkeit im Prinzip wie in Punkt „Dynamische Methoden“ beschrieben. Zur Quantifizierung von Zellkonzentration und Vitalität nutzten sie das Plattenausstrichverfahren. Um einen Mehrwert an Information gegenüber Reinkulturuntersuchungen zu erhalten, war es jedoch erforderlich die Zellkonzentration speziesspezifisch zu bestimmen. Dies wurde in den genannten Studien mit selektiven Plattenausstrichen erreicht, die nur das Wachstum von Spezies mit bestimmten Wachstumseigenschaften zuließen. Zum Beispiel wurden in der Studie von Sevillano et al. (Sevillano et al. 2008) insgesamt vier Bakterienstämme auf drei verschiedenen Plattenmedien quantifiziert. Auf einer Platte konnten zwei Keime anhand ihrer optisch sichtbaren Hämolyseeigenschaften unterschieden werden ( $\alpha$ -Hämolyse: *S. pneumoniae*,  $\beta$ -Hämolyse: *Streptococcus pyogenes*), auf der zweiten Platte konnten die Bakterien anhand der Gattungen unterschieden werden (*Streptococcus* und *Haemophilus*) und auf der dritten Platte wuchs nur einer der beiden verwendeten *Haemophilus*-Stämme aufgrund einer Resistenz gegenüber Trimethoprim, welches dem Plattenmedium zugesetzt wurde. Die Konzentration des zweiten *Haemophilus*-Stammes wurde als Differenz zwischen Gesamtkonzentration bei der *Haemophilus*-Stämme und der Konzentration des ersten *Haemophilus*-Stammes ermittelt. In anderen Studien wurde darauf verzichtet jeden Keim innerhalb der Mischkultur zu quantifizieren. So wurde in der Studie von Nagy et al. (Nagy et al. 1990) nur eine Spezies über Selektivplatten bestimmt; die anderen Keime in der Mischkultivierungen blieben unbestimmt. Dies hatte vermutlich mit dem enormen

experimentellen Aufwand zu tun, der mit der Plattenausstrichmethode verbunden ist (siehe „Die Plattenausstrichmethode in der Kritik“).

## 2.4. Speziesspezifische Bakterienquantifizierung mittels qT-RFLP

### Methode

In der hier präsentierten Studie wurde für die speziesspezifische und absolute Zellkonzentrationsbestimmung ein quantitativer terminaler Restriktionslängen-Polymorphismus (qT-RFLP) verwendet (Trotha et al. 2002; Schmidt et al. 2007). Die Methode basiert auf molekularbiologischen Techniken und wird in ähnlicher Weise häufig zur Charakterisierung der Diversität von komplexen Konsortien in der Umweltbiologie eingesetzt (Spiegelman et al. 2005).

Bei der Analyse wird die komplette genomische DNA einer Mischkulturprobe extrahiert, davon das 16S-RNA-Gen mittels PCR und fluoreszent markierten *Primern* amplifiziert, mit einem Restriktionsenzym verdaut und die DNA-Stränge mittels Kapillargelgelelektrophorese aufgetrennt und über die Fluoreszenzintensität quantifiziert (siehe auch „qT-RFLP-Analyse“). Durch den Verdau entstehen in Abhängigkeit der DNA-Sequenz des 16S-Gens Stränge unterschiedlicher Länge, die im Idealfall getrennte Peaks im Elektropherogramm liefern. Peaks (= DNA-Fragmentlänge) unbekanntes Ursprungs lassen sich mit Hilfe einer entsprechenden Datenbank mehreren Bakterienspezies zuordnen. Die Identifizierung ist in etwa gattungsspezifisch bzw. umfasst eine Gruppe von verschiedenen Bakterienspezies, sie ist jedoch nicht speziesspezifisch (Spiegelman et al. 2005). In Untersuchungen mit definierten Mischkulturen ist es indes ein Leichtes die Signale anhand von Positivkontrollen den einzelnen Spezies zuzuordnen. Die Quantifizierung erfolgt über einen internen Quantifizierungsstandard (IQS), der aus einer weiteren Bakterienspezies (hier: *Campylobacter jejuni*) besteht. Der IQS wird in bekannter Konzentration der Probe zugesetzt und zusammen mit dieser aufgearbeitet und analysiert. Durch das Verhältnis des Speziessignals zum IQS-Signal kann dann auf die Konzentration der jeweiligen Bakterienspezies zurückgerechnet werden (siehe „qT-RFLP-Analyse“).

## 2.5. Ceftazidim

Ceftazidim ist das in dieser Arbeit verwendete Antibiotikum. Als sogenanntes Cephalosporin gehört es zur Gruppe der  $\beta$ -Lactamantibiotika und besitzt eine auffallend hohe Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* (Washington et al. 1993). Wie alle  $\beta$ -Lactamantibiotika, wirkt es als Inhibitor gegen Enzyme (penicillinbindende Proteine - PBP), die an der Quervernetzung der bakteriellen Zellwand beteiligt sind (Coulson 1984; Schlegel 2007). Dabei bindet der  $\beta$ -Lactamring des Antibiotikums irreversibel an das aktive Zentrum des Zielproteins und inaktiviert es damit (Koolmann and Röhms 2003).

Es wurden bisher neun verschiedene PBPs identifiziert (Spratt et al. 1977; Spratt 1980). Als Zielproteine für eine bakterizide Wirkung sind jedoch nur die drei relevant (PBP-1, PBP-2, PBP-3)(Neu 1985). Die Inhibierung von PBP1 führt bei Gram-negativen Bakterien zu raschem Zelltod und Lyse, die Inhibierung von PBP-2 verändert die Morphologie, so dass die eigentlich stäbchenförmigen Bakterien rundlich werden (engl. *spheroblast*) und schließlich ebenfalls lysieren. Die Inhibierung von PBP-3 führt ebenfalls zu starken morphologischen Veränderungen bei Gram-negativen Bakterien, jedoch zeigt sich hier die sogenannte Filamentbildung (siehe auch „Die Plattenausstrichmethode in der Kritik“). Diese Erscheinung leitet sich aus der Wirkungsweise von PBP-3 ab, das an der Ausbildung des Zellwandseptums zwischen sich teilenden Bakterien beteiligt ist. Die Inhibierung von PBP-3 hat zur Folge dass eine vollständige Trennung der Bakterien nach der Teilung nicht mehr gelingt, so dass das Filament anfangs aus zwei unvollständig getrennten Bakterien besteht und bei jeder Zellteilung länger wird. Die einzelnen Bakterien innerhalb eines Filament können jedoch noch anhand der Chromosomen unterscheiden werden (Steel et al. 2004).

$\beta$ -Lactamantibiotika binden nicht spezifisch nur an ein PBP, sondern haben eine mehr oder weniger hohe Affinität zu allen PBPs. Entsprechend ist der antimikrobielle Effekt die Summe aus allen drei oben beschriebenen Einzeleffekten. Es gibt jedoch einzelne Antibiotika mit relativ hohen Affinitäten gegen ein spezielles PBP. In solch einem Fall dominiert der jeweilige oben beschriebene Effekt. Zum Beispiel ist Imipenem ein typischer Vertreter für ein Antibiotikum mit einer hohen Affinität für PBP-2 (*Spheroblast*-Bildung), während Ceftazidim ein typischer Vertreter für ein Antibiotikum mit hoher Affinität gegen PBP3 (Filamentbildung) ist (Jackson and Kropp 1996).

## 2.6. Pharmacodynamische Modelle

Die mathematische Beschreibung der Abtötungswirkung von Antibiotika ist hauptsächlich medizinisch motiviert: Man möchte eine möglichst optimale Dosierung bei der Behandlung bakterieller Infektionen erreichen (Schmidt et al. 2008). Um dies zu erreichen müssen Antworten auf folgende Fragestellung gefunden werden: Wie viel Antibiotikum muss über welchen Zeitraum, in welchen Abständen (oder kontinuierlich) verabreicht werden, um eine möglichst hohe Effektivität zu erreichen ohne gleichzeitig zu überdosieren mit der Folge von möglichen Nebenwirkungen. Bei dieser Zielsetzung ist es nicht ausreichend auf Grundlage der relevanten Effekte zu argumentieren. Man muss die Dynamik, also das Ausmaß und die zeitliche Änderung, dieser Effekte abschätzen, um die richtigen Schlussfolgerungen für einen beabsichtigten Behandlungserfolg ziehen zu können (Nolting et al. 1996; Drusano 2004; Schuck and Derendorf 2005). Zu diesem Zweck wurde die pharmacokinetische - pharmacodynamische Modellierung (PK-PD) entwickelt.

Die pharmacodynamische Modellierung zielt darauf ab den antimikrobiellen Effekt als Resultat der Interaktion von Wirkstoff und Bakterium zu beschreiben (Yano et al. 1998), während die pharmacokinetische Modellierung versucht die zeitlich veränderliche Antibiotikumskonzentration im Organismus abzubilden (Dost 1953; Yano et al. 1998). Für Voraussagen in Hinblick auf Patientenbehandlung ist also die Kombination aus beiden Aspekten erforderlich (PK-PD-Modelle). Dabei wird davon ausgegangen, dass nur mechanismusbasierte Modelle zu wirklichen Voraussagen über die Effektivität eines Antibiotikums ermöglichen (Levy 1994). Dazu gehört dass im pharmacodynamischen Teil des Modells mindestens bakterielles Wachstum sowie der antimikrobielle Effekt berücksichtigt sind (Czock and Keller 2007). Die in dieser Arbeit dargestellten Modelle sind ausschließlich dem Bereich der pharmacodynamischen Modellierung zuzuordnen. Detaillierte Informationen zur Pharmacokinetik können in folgenden Arbeiten nachgelesen werden: (Czock et al. 2009; Gloede et al. 2010)

Czock und Keller (Czock and Keller 2007) fassen in ihrem *Review*-Artikel die bisher in der Literatur publizierten mechanismusbasierten Modelle zusammen und kategorisieren sie anhand ihrer Komplexität und der berücksichtigten Effekte. Hier werden nur auszugsweise die für diese Arbeit adaptierten Modelle dargestellt.

Das einfachste Modell ist in Gleichung 1 gegeben. Es beschreibt das bakterielle Wachstum und den Zelltod anhand von spezifischen Raten 1. Ordnung mit gewöhnlichen Differentialgleichungen. Neben der einzigen Zustandsgröße  $N(t)$  (Zellkonzentration [ $\text{ge mL}^{-1}$ ]) (Erläuterung zur Einheit [ $\text{ge mL}^{-1}$ ] siehe „qT-RFLP-Analyse“), enthält das Modell zwei Parameter, die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] für das Wachstum der Bakterien und die spezifische Sterberate  $k_{tot}$  [ $\text{h}^{-1}$ ] für die Wirkung des Antibiotikums.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot N(t) - k_{tot} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 1}$$

Um limitiertes Wachstum zu berücksichtigen, wird die logistische Funktion verwendet (Gleichung 2). In diesem Modell wurde mit  $N_{max}$  (maximale Zellkonzentration [ $\text{ge mL}^{-1}$ ]) ein Parameter als obere Grenze für das Zellwachstum eingeführt. Als alternatives Modell präsentieren Czock und Keller (Czock and Keller 2007) das Modell in Gleichung 3 bzw. Gleichung 5 mit der entsprechenden Erweiterung um einen Abtötungsterm. Statt durch eine maximalen Zellkonzentration, wie im logistischen Modell wird hier das Wachstum durch die maximale Wachstumsrate  $WR_{max}$  [ $\text{ge mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] und der Zellkonzentration  $N_{50}$  [ $\text{ge mL}^{-1}$ ] bei der die halb-maximale Wachstumsrate gilt, limitiert.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 2}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \frac{WR_{max}}{(N_{50} + N(t))} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 3}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} \cdot N(t) - k_{tot} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 4}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \frac{WR_{max}}{(N_{50} + N(t))} \cdot N(t) - k_{tot} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 5}$$

Wachstum bzw. Abtöten ist meist abhängig von der Konzentration des Antibiotikums.

Mathematisch wird dieser Zusammenhang häufig in Form von Gleichung 6 berücksichtigt, die eine Erweiterung von Gleichung 4 darstellt, in der noch eine konzentrationsunabhängige Abtötungsrate angenommen wurde. So stimuliert die Konzentration des Antibiotikums die

Sterberate ähnlich der Monodgleichung, in der die Substratkonzentration die Wachstumsrate moduliert: eine hohe Antibiotikumskonzentration führt zur Ausbildung der maximalen spezifischen Abtötungsrate  $k_{tot, max}$  [ $h^{-1}$ ]. In dieser Arbeit wurde  $k_{tot, max}$  durch die spezifische Lyserate  $k_L$  ersetzt, aus Gründen, die in Kapitel „Wachstum und Lyse in Abhängigkeit von der Ceftazidimkonzentration“ näher erläutert werden. Der Parameter  $EC_{50}$  [ $\mu g mL^{-1}$ ] gibt die Antibiotikumskonzentration bei halb-maximaler Abtötungsrate an. Der Parameter  $H$  [-] muss als empirische Komponente im ansonsten mechanistischen Modellansatz betrachtet werden, da sich ihm kein physiologischer Effekt oder eine physikalische Größe zuordnen lässt. Mathematisch interpretiert verändert  $H$  den Kurvenverlauf der Sättigungskurve  $f(C) = \frac{C(t)^H}{EC_{50}^H + C(t)^H}$ . Die Konzentration des Antibiotikums  $C$  [ $\mu g mL^{-1}$ ] wird in dieser Arbeit als zeitabhängige Variable modelliert, um etwaige Zerfalls und Abbauprozesse berücksichtigen zu können.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} \cdot N(t) - k_L \cdot \frac{C(t)^H}{EC_{50}^H + C(t)^H} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 6}$$

### Parameterschätzung und Parametervarianzen

Die Methode der Parameterbestimmung ist durch Eigenschaften des Modells bestimmt. Für lineare Modelle existieren Formeln zur Berechnung der Modellparameter und deren Varianzen (Sachs and Hedderich 2009). Für nichtlineare Modelle, die in ihren Parametern linear sind, existieren ebenfalls analytische Methoden zur Berechnung der Modellparameter (nichtlineare Regression oder Polynomregression)(Haefner 2005). Für nichtlineare Modelle, die in ihren Parameter nichtlinear sind, müssen jedoch iterative Methoden angewendet werden. Hier in dieser Arbeit werden unter anderem dynamische nichtlineare Modelle, die in ihren Parametern nichtlinear sind angewendet. Ein Beispiel dafür ist das Modell aus Gleichung 6 mit limitiertem Wachstum und Abtöten, das von der Antibiotikakonzentration abhängig ist.

Das Modell für limitiertes Wachstum (Gleichung 2) hat lineare Parameter ( $\mu, N_{max}$ ), welche noch anhand einer Linearisierung durch Transformation (im Beispiel: Division mit  $N$ ) und anschließender linearen Regression bestimmten werden können (abhängige Variable:  $\frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt}$ ). Nach dieser Methode (Linearisierung und lineare Regression) können jedoch nur jeweils

zwei Parameter bestimmt werden, so dass in erweiterten Modellen mit mehr als zwei Parameter (z.B. Gleichung 4) ergänzende Methoden zur Parameterbestimmung für den einzelnen Fall entwickelt und angewendet werden müssten. Weiterhin werden die Parameterwerte in nichttransformierter Form benötigt, das heißt in physikalisch sinnvollen Einheiten. Durch die Rücktransformation der Parameterwerte kann es jedoch zu Abweichungen vom exakten Wert kommen (Seber 2003). Um diese und weitere Nachteile (Haefner 2005) der Linearisierung zu umgehen, wurden in dieser Arbeit ausschließlich iterative Methoden zur Schätzung linearer und nichtlinearer Parameter angewendet. Der dafür verwendete Algorithmus beruht auf der Parameterschätzmethode nach Nelder und Mead (Nelder and Mead 1965). Das Funktionsprinzip beruht kurzgesagt auf einem Algorithmus, der einen Simplex (spezielles Polygon) im Parameterraum so bewegt, dass eine Zielfunktion minimiert wird. In dieser Arbeit dient als Zielfunktion die Fehlerquadratsumme (FQS)(Gleichung 7), welche ein Maß für die Abweichung zwischen Werten der Regressionskurve ( $\hat{y}_i$ ) und Messwerten ( $y_i$ ) darstellt.

$$\text{FQS} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Parameterschätzung erfolgte, indem ein Modell mit Hilfe des Nelder-Mead Algorithmus durch Minimierung der FQS an einen Datensatz angepasst wurde. Der Algorithmus ist jedoch auf Startwerte der zu schätzenden Parameter angewiesen. Mit diesen erzeugt der Algorithmus den ersten Simplex, der in den folgenden Iterationsschritten im Parameterraum bewegt wird. Es kann allerdings vorkommen, dass in Abhängigkeit der verwendeten Parameterstartwerte das globale Minimum der Zielfunktion nicht gefunden wird. Um dies zu überprüfen können beispielsweise die Startwerte variiert werden oder aber es wird der Nelder-Mead-Simplex Algorithmus durch einen genetischen Optimierungsalgorithmus ersetzt, der eventuell ein anderes Minimum findet. Auf diese Methoden wurde hier verzichtet, da einige der angewendeten Modelle vergleichsweise einfach sind (z. B. Modell mit zwei Parameter, Gleichung 2) und die Konvergenz des Nelder-Mead-Simplex Algorithmus zum globalen Minimum daher sehr wahrscheinlich war. In der Entwicklung von den einfachen Modellen zu den komplexeren (fünf Parameter, Gleichung 6) wurden dann bestimmte Parameterwerte aus vorangegangenen Anpassungen verwendet, so dass der Parameterraum für die jeweilige Anpassung auf wenige Parameter beschränkt blieb und die Konvergenz zum globalen Minimum eher wahrscheinlich war.

Mit der beschriebenen mathematischen Parameterschätzmethode wird ein Parametersatz mit exakten Werten erzeugt. Tatsächlich lagen der Parameterschätzung jedoch fehlerbehaftete Messwerte zugrunde, so dass folglich die geschätzten Parameterwerte ebenfalls fehlerbehaftet waren. Diesem Umstand wurde Rechnung getragen, indem die Parametervarianzen als Maß für die Unsicherheit der Parameterschätzung bestimmt wurden. Eine Möglichkeit dies zu tun, ist die Berechnung der Parametervarianzen als Diagonalelemente der inversen Fisher'schen-Informationsmatrix (FIM). Für Modelle, die linear in ihren Parametern sind, ist diese Methode ohne Einschränkung anwendbar, da die Parametervarianzen symmetrisch und mittelwertzentriert sind (Heine 2004; Joshi et al. 2006b). Bei Modellen, die in ihren Parametern nichtlinear sind, ist dies jedoch nicht notwendigerweise gegeben. Des Weiteren stellt die Parametervarianz der FIM nur eine untere Grenze der tatsächlichen Parametervarianz dar (Goodwin and Payne 1977). Beides stellt eine Einschränkung dar, die mit der in dieser Arbeit verwendeten *Bootstrap*-Methode (Joshi et al. 2006b) umgangen werden konnte. Dieses Vorgehen simuliert nach einem Monte-Carlo-Verfahren (siehe „Material und Methoden“) neue Datensätze und passt daran das entsprechende Modell an. Die damit erzeugten Parameterwerte werden auf Grundlage der Häufigkeitsverteilung (Histogramm) ausgewertet und charakterisiert. Unter anderem kann das 95%-Konfidenzintervall des jeweiligen Parameters berechnet werden (siehe „Parametervarianzen“).



### 3. Material und Methoden

Die Bestellnummern und Lieferanten der Chemikalien und Geräte für die nachfolgend beschriebenen Lösungen, Medien und Methoden sind im Appendix aufgelistet.

#### 3.1. Puffer und Lösungen

##### **NaOH-Lösung (0,6 M)**

24 g NaOH (Natriumhydroxid) ( $M = 40 \text{ g/mol}$ ) wurde in 1 L ultrareinem Wasser gelöst

##### **NTA-Lösung (0,25 M)**

47,8 g Nitriloacetat (NTA) ( $M = 191,14 \text{ g/mol}$ ) wurde in 900 mL NaOH-Lösung (0,6 M) gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit weiterer NaOH-Lösung (0,6 M) auf 1 L aufgefüllt.

##### **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Stocklösung (1,5 M)**

41,4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat) ( $M = 137,99 \text{ g/mol}$ ) wurde in 200 mL ultrareinem Wasser gelöst.

##### **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Stocklösung (1,5 M)**

104,51 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dikaliumhydrogenphosphat) ( $M = 174,18 \text{ g/mol}$ ) wurde in 400 mL ultrareinem Wasser gelöst.

##### **Na/K-Phosphatpuffer (1,5 M; pH 7,0)**

Die Stocklösung von NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 M) und K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,5 M) wurden im Verhältnis 1:2 gemischt; also beispielsweise 200 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 M) + 400 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,5 M). Falls eine Titration nötig war, um den pH-Wert auf genau 7,0 einzustellen, wurden dafür die schon genannten Lösungen verwendet.

##### **Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline - PBS)**

8 g NaCl (Natriumchlorid) ( $M = 58,44 \text{ g/mol}$ ); 0,2 g KCl (Kaliumchlorid) ( $M = 74,55 \text{ g/mol}$ ); 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden in 1 L ultrareinem Wasser gelöst und im Autoklaven (121 °C, 20 min) sterilisiert.

### **Ceftazidimlösung**

Ceftazidim lag als Pentahydrat in Pulverform vor ( $M = 638,6 \text{ g mol}^{-1}$ ). Alle im Folgenden verwendeten und angegebenen Ceftazidimkonzentrationen beziehen sich allerdings auf wasserfreies Ceftazidim ( $M = 548,6 \text{ g mol}^{-1}$ ). Dazu musste die eingewogene Menge des wasserhaltigen Ceftazidim so korrigiert werden, dass sie der gleichen Stoffmenge wasserfreien Ceftazidims entsprachen. Als Lösungsmittel diente das Standardmedium M199 (siehe "Standardmedium M199").

Der chemische Zerfall von Ceftazidim unter Versuchsbedingungen (Standardmedium M199,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,8) wurde einmal bestimmt. Die daraus ermittelte Zerfallsrate (1. Ordnung)  $k_c = -0,0072 \text{ h}^{-1}$  wurde verwendet, um den Zerfall in allen anderen Versuchen abzuschätzen.

## **3.2. Medien**

### **Standardmedium M199**

16,06 g des kommerziell erhältlichen Mediums M199 (Pulverform) wurden in 800 mL ultrareinem Wasser gelöst. Anschließend wurden in dieser Reihenfolge 16 mL NTA-Lösung (0,25 M) und 25 mL Na/K-Phosphatpuffer (1,5 M; pH 7,0) zugegeben, um die Lösung dann mit ultrareinem Wasser auf 1 L aufzufüllen. Der pH-Wert sollte 6,8 betragen. Zum Schluss wurde das Medium durch Filtration ( $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ ) sterilisiert und bis zum Gebrauch bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in Dunkelheit gelagert.

### **LB-Agar (lysogeny broth)**

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 15 g Agar wurden in 1 L ultrareinem Wasser gelöst. Das flüssige Medium wurde im Autoklaven sterilisiert ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min) und noch in der Abkühlphase nach 10 minütigem Rühren unter der Sterilwerkbank in sterile Petrischalen gegossen.

### 3.3. Mikroorganismen

#### Bakterienstämme

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Magdeburg, Deutschland).

*Burkholderia cepacia* DSM 7288 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland).

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Institut für Mikrobiologie, TU München, Deutschland).

#### Kontrollkeime für MHK-Bestimmung

*Escherichia coli* DSM 1103 (DSMZ)

*Escherichia coli* DSM 5923 (DSMZ) (entspricht *Escherichia coli* ATCC 35218)

#### Interner Quantifizierungsstandard für die qT-RFLP- Analyse

*Campylobacter jejuni* (klinisches Isolat) (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Magdeburg, Deutschland).

#### Stammhaltung

Glycerinkulturen der Stämme wurden bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 20 mL Zellsuspension aus einer Übernachtskultur im Schüttelkolben (flüssiges LB-medium) pelletiert (15 min, 4000 U/min). Das Pellet wurde anschließend in 4 mL frischem LB-Medium resuspendiert. Davon wurde wiederum 1 mL zusammen mit 0,8 mL sterilem Glycerin (87 %) in ein Kryoröhrchen abgefüllt. Nach 30 minütiger Lagerung auf Eis (zur Homogenisierung) wurden die Röhrchen bei -80 °C weggefroren.

Arbeitskulturen wurden hergestellt, indem Zellsuspensionen einer angetauten Glycerinkultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Gelagert wurden die Agarplatten bei 4 °C in Dunkelheit. Nach spätestens 2 Wochen wurden die Kulturen entsorgt. Für jedes *time-kill*-Experiment wurden neue Arbeitskulturen hergestellt.

### 3.4. Kultivierungsmethoden

#### Schüttelkolbenkultivierung

Für Schüttelkolbenexperimente wurden Weithals-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit einem Volumen von 250 mL verwendet. Mit Wattestopfen wurden die Kolben steril aber luftdurchlässig verschlossen. Mit Alufolie auf den Stopfen wurde der ganze Kolben bei 121 °C für 20 min mit feuchter Hitze autoklaviert. Die Inkubation beimpfter Kolben erfolgte in einem feuchte-reguliertem Orbital-Schüttler bei 37 °C, 200 U/min und einer relativen Luftfeuchte von 80 %. Der exzentrische Radius betrug 5,0 cm. Für Probenahmen wurde der jeweilige Kolben aus dem Schüttler genommen, unter der Sterilwerkbank geöffnet und das jeweilige Probenvolumen mit einer Pipette in bereitstehende Gefäße überführt. Sofort im Anschluss wurden die Kolben wieder in den Schüttler zurückgestellt. Proben für Metabolitmessungen wurden direkt nach der Probenahme durch Zentrifugation (5 min, 13000 U min<sup>-1</sup>, 4 °C) und Filtration (Spritzenfilter; 0,2 µm) von Zellmaterial getrennt und bei 4 °C gelagert. Proben für die qT-RFLP-Analytik wurden wie beschrieben (siehe „qT-RFLP-Analyse“) aufgearbeitet.

In Versuchen, die der Bestimmung von Wachstums- oder Abtötungsdynamiken (*time-kill* Experimenten) dienen, wurde die Inokulierung wie folgt durchgeführt: das Zellmaterial wurde von einer frischen Agarplatte unter der Sterilwerkbank in einen sterilen Schüttelkolben mit 20 mL sterilem Medium überführt und bei Standardbedingungen (siehe oben) über Nacht kultiviert. Danach wurden die Zellen in einem sterilem 50 mL Falcontube gesammelt und bei 4800 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit sterilem PBS gewaschen, in 20 mL frischem Medium aufgenommen, in einen neuen, sterilen Kolben überführt und für weitere 1,5 h unter Standardbedingungen (siehe oben) im Schüttler inkubiert bis die Zellen die exponentiellen Wachstumsphase erreichten. Um im eigentlichen Experiment eine *Lag*-Phase zu vermeiden, wurden aus der exponentiell wachsenden Kultur heraus die eigentlichen Versuchskolben angeimpft. Diese wurden noch vor dem Animpfen mit 50 mL frischem, sterilem Medium befüllt und im Brutraum bei 37 °C zum Anwärmen abgestellt. Das Antibiotikum wurde als konzentrierte Stocklösung (2000 µg mL<sup>-1</sup>) ebenfalls noch vor dem Animpfen zugegeben. Nach der 1,5 h Wachstumsperiode der Vorkultur wurde die OD (optische Dichte) gemessen und das Inokulationsvolumen nach Gleichung 8, Gleichung 9 und Gleichung 10 berechnet:

Reinkultur:  $Inokulationsvolumen = 0,208mL \cdot f_{Korrektur,i}$  **Gleichung 8**

Mischkultur:  $Inokulationsvolumen = 0,625mL \cdot f_{Korrektur,i}$  **Gleichung 9**

Korrekturfaktor:  $f_{Korrektur,i} = \frac{OD_{Ref,i}}{OD_{VK,i}}$  **Gleichung 10**

|                    |                      |                   |                  |
|--------------------|----------------------|-------------------|------------------|
| Referenz OD für... | <i>P. aeruginosa</i> | <i>B. cepacia</i> | <i>S. aureus</i> |
|                    | 1,77 AU              | 3, 31 AU          | 1,94 AU          |

Diese Art der Inokulumseinstellung ergab als Konsequenz, indem ein Experiment zum Referenzversuch erklärt wurde und alle nachfolgenden Versuche mit der gleichen Zellmenge angeimpft werden sollten. Des Weiteren wurde als Animpfverhältnis für die Mischkultur ein Verhältnis von 1:1:1 gewählt, wobei gleichzeitig die Gesamtzellzahl in Rein- und Mischkultur identisch sein sollte. Damit sollte sichergestellt werden, dass sich die Wirkung des Antibiotikums unter beiden Kulturbedingungen (bei gleicher Antibiotikumskonzentration) nicht durch einen Konzentrationseffekt, wie er in der Literatur beschrieben wird, beeinflusst wird. unterscheidet. Dort wird berichtet, dass die Wirkung eines Antibiotikum vom Verhältnis von Bakterienkonzentration zu Antibiotikumskonzentration abhängen kann (Craig et al. 2004; Bulitta et al. 2009). In der Folge war die Absolutkonzentration des einzelnen Keims in der Reinkultur etwa dreimal höher als in der Mischkultur. Wo es angebracht war, wurden daher Rein- und Mischkulturen auf Ebene des relativen Wachstums verglichen (siehe „Ergebnisse“). Dazu wurden die absoluten Zellkonzentrationen  $N_t$  in die entsprechende Anzahl Zellverdopplungen  $D_t$  umgerechnet (Gleichung 11).

$$D_t = \log_2 \left( \frac{N_t}{N_{t=0}} \right) \quad \text{Gleichung 11}$$

### 3.5. Analysemethoden

#### Trübungsmessung

Die Trübung als Maß für die Biomasse (Chmiel et al. 2006) wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 650 nm in Einwegküvetten (Material: PMMA oder PS) gemessen. Grundlage der Messung bildet die Lichtauslöschung (Extinktion) des monochromatischen Lichts beim Durchdringen der Zellsuspension auf einer normierten Länge (1 cm). Die Extinktion (optische dichte – OD) wurde in sogenannten *arbitrary units* (AU) angegeben.

Unverdünnte Proben mit einem Wert über 0,40 AU wurden mit PBS soweit verdünnt, dass sie in den linearen Bereich der Methode fielen (0,01 AU bis 0,40 AU). Als Referenzprobe der Messung diente steriles unverdünntes Medium. Eine Verdünnung der Referenz entsprechend der Probenverdünnung war nicht notwendig, weil PBS ebenso wie das Medium keine Absorption bei 650 nm zeigten.

### **qT-RFLP-Analyse**

Die Methode des quantitativen Restriktions-Längen-Polymorphismus (qT-RFLP) wurde zur Bestimmung der absoluten und speziesspezifischen Zellkonzentration in Rein- und Mischkulturen eingesetzt. Die Details zu Entwicklung (Trotha et al. 2002) und Validierung (Schmidt et al. 2007) (Validierungsparameter siehe Tabelle 1) der Methode wurde von den genannten Autoren veröffentlicht. Das Analysenprotokoll ist anhand der SOP (*standard operation procedure*) im Anhang (siehe „Arbeitsanweisung qT-RFLP-Methode“) wiedergegeben. Hier soll nur eine kurze Zusammenfassung gegeben werden:

Aliquotierte (100 µL) Suspensionen eines *Campylobacter jejuni* Stammes mit einer Konzentration von  $5,0 \cdot 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup> wurden als interner Quantifizierungsstandard (IQS) eingesetzt. Standardmäßig wurden zu jedem Probenahmezeitpunkt zwei Proben analysiert (technisches Duplikat). Bei jeder Probenahme wurde 1 mL Zellsuspension in ein Aliquot mit IQS pipettiert. Die Probe wurde anschließend zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Es wurde ein enzymatischer Aufschluss durchgeführt, gefolgt von einer DNA-Aufreinigung mit einem kommerziell erhältlichen Kit (QIAmp DNA Blood Mini Kit). Das 16S rRNA-Gen der extrahierten und gereinigten DNA wurde mit einem fluoreszent markiertem *Primer* mittels PCR (*Polymerase chain reaction*) amplifiziert. Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts über ein Agarosegel, wurde das Amplifikat mit der Restriktionsendonuklease Hha I verdaut. Die Auftrennung der speziesspezifischen DNA-Fragmentlängen erfolgte mit einem Sequenzierautomaten (Genetic Analyzer ABI Prism 3100Avant, Applied Biotech), dem das Trennprinzip der Kapillargelelektrophorese zugrunde lag. Die quantitative Detektion der einzelnen Fragmentlängen erfolgte durch laserinduzierte Fluoreszenz und führte im Elektropherogramm zu einem *Peak* für jedes detektierte Fragment. Die absolute Zellzahl  $N_i$  der einzelnen Spezies berechnet sich aus dem Verhältnis der Peakfläche der jeweiligen Spezies zur Peakfläche des internen IQS ( $A_i/A_{IQS}$ ) nach Gleichung 12 und Gleichung 13 (Trotha et al. 2002; Schmidt et al. 2007). Weitere Parameter der Berechnung sind die PCR-

Zyklenzahl  $n$ , die PCR-Effizienzquotienten  $f_i$  und  $f_{IQS}$ , die absolute Zellkonzentration  $N_{IQS}$  des IQS und die Genkopienzahl im Genom des jeweiligen Keimes  $c_i$  sowie des IQS  $c_{IQS}$ . Bei den hier verwendeten Keimen wurden für  $c_i$  und  $c_{IQS}$  folgende Werte verwendet: *P. aeruginosa* vier Kopien, *B. cepacia* sechs Kopien, *S. aureus* fünf Kopien und *C. jejuni* drei Kopien (Schmidt et al. 2007). Für die Effizienzquotienten wurden folgende Werte verwendet  $\frac{f_{Pa}}{f_{IQS}} = 0,9363$ ;  $\frac{f_{Bc}}{f_{IQS}} = 0,9522$  und  $\frac{f_{Sa}}{f_{IQS}} = 0,8777$  (Schmidt et al. 2007).

$$\ln s_i = \ln \left( \frac{A_i}{A_{IQS}} \right) - n \left[ \ln \left( \frac{f_i}{f_{IQS}} \right) \right] + \ln(N_{IQS} \cdot c_{IQS}) \quad \text{Gleichung 12}$$

$$N_i = \frac{S_i}{c_i} \quad \text{Gleichung 13}$$

Das Ergebnis für  $N_i$  wurde in  $\text{ge mL}^{-1}$  (*genome equivalents pro mL*) angegeben. In Experimenten ohne Antibiotikum ist diese Angabe gleichbedeutend mit  $\text{KBE mL}^{-1}$ . Die Unterscheidung war notwendig, weil die starken morphologischen Veränderungen, ausgelöst durch das Antibiotikum, zu Fehlinterpretationen führen könnten (siehe „Die Plattenausstrichmethode in der Kritik“).

**Tabelle 1: Validierungsparameter der qT-RFLP-Methode (Schmidt et al. 2007)**

| Organismus           | Unteres                            | Oberes                             | Standardabweichung         |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|                      | Quantifizierungslimit <sup>1</sup> | Quantifizierungslimit <sup>1</sup> |                            |
|                      | KBE $\text{mL}^{-1}$               | KBE $\text{mL}^{-1}$               | $\log(\text{KBE mL}^{-1})$ |
| <i>P. aeruginosa</i> | $10^5$                             | $10^{10}$                          | 0.39                       |
| <i>B. cepacia</i>    | $10^4$                             | $10^9$                             | 0.39                       |
| <i>S. aureus</i>     | $10^6$                             | $10^{10}$                          | 0.39                       |

### Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) folgte den Empfehlungen der Deutschen Norm DIN5890-8 und DIN5890-81 zur „Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“ nach der „Mikrodilutionsmethode – Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien“. Im Folgenden wird nur eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Aspekte wiedergegeben.

Das Prinzip der Methode ist die Bestimmung der Titerkonzentration des zu testenden Antibiotikums, bei der kein sichtbares Wachstum des getesteten Bakterienstammes mehr auftritt. Die Prozedur wurde in *96-well* Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei die Menge der

inokulierten Bakteriensuspension in jeder Vertiefung identisch war und die Menge des Antibiotikums durch 1:2-Verdünnungen sukzessive von Vertiefung zu Vertiefung geringer wurde. Das verwendete Medium war Müller-Hinton-Bouillon (MHB). Zur Qualitätssicherung wurde der entsprechende Keim in parallel kultivierten Verdünnungsreihen (1 Reihe = 12 Vertiefungen von links nach rechts) getestet. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Reihe als Negativkontrolle mit ausschließlich sterilem Medium und eine weitere Reihe als Positivkontrolle mit inokuliertem Medium ohne Antibiotikum getestet. Abhängig vom jeweiligen Antibiotikum müssen bestimmte Kontrollstämme mitgeführt werden, deren Testergebnis in vorgegebenen Spezifikationsgrenzen liegen müssen. Für das hier verwendete Ceftazidim waren dies die Kontrollstämme *Escherichia coli* DSM 1103 mit dem Grenzkontrollbereich  $0,06 - 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Escherichia coli* ATCC 35218 (= *E. coli* DSM 5923) mit dem Grenzkontrollbereich  $0,06 - 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mit einem Grenzkontrollbereich von  $0,25 - 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die Inkubation erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  für ca. 20 h.

Alle Bakterienstämme sollten mit einer Konzentration von  $1 - 5 \cdot 10^5$  KBE  $\text{mL}^{-1}$  inokuliert werden. Diese wurde über eine OD-Messung und der folgenden Beziehung abgeschätzt (Schmidt et al. 2007).

|                      |  |
|----------------------|--|
| <i>S. aureus</i>     | $(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^9$ KBE $\text{mL}^{-1}$ AU <sup>-1</sup> ; |
| <i>B. cepacia</i>    | $(1,9 \pm 0,7) \cdot 10^8$ KBE $\text{mL}^{-1}$ AU <sup>-1</sup> ; |
| <i>P. aeruginosa</i> | $(4,2 \pm 1,8) \cdot 10^8$ KBE $\text{mL}^{-1}$ AU <sup>-1</sup> ; |

Für die beiden *E. coli* Stämme lagen keine entsprechenden Umrechnungen vor. Bei beiden Stämmen wurde daher die höchste Inokulations-OD angenommen, die sich aus der Berechnung für die drei zu testenden Keime ergab (*B. cepacia*).

Die MHK-Bestimmung für Ceftazidim nach der beschriebenen Methodik lieferte unter Einhaltung der Signifikanzgrenzen der Kontrollkeime folgende MHK-Werte:

|                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| MHK ( <i>P. aeruginosa</i> PAO1):   | $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  |
| MHK ( <i>B. cepacia</i> DSM 7288):  | $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ |
| MHK ( <i>S. aureus</i> ATCC 29213): | $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  |



Die Werte für *P. aeruginosa* PAO1 und *B. cepacia* DSM 7288 (= *B. cepacia* LMG 1222) entsprechen den Werten, die in anderen Studien bestimmt worden sind (Lubasch et al. 2003; Bulitta et al. 2009; Peeters et al. 2009). Ein entsprechender Wert für *S. aureus* ATCC 29213 ist nicht bekannt.

### Ceftazidim

Ceftazidim, das hier verwendete Antibiotikum, wurde mittels Flüssigchromatographie quantifiziert (Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4). Die Analytikmethode wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und validiert. Die Schwierigkeit bestand darin, ein Elutionsprofil zu finden, das einen Ceftazidimpeak ohne Überlagerung mit den zahlreichen Produktpeaks zeigte, die in den unterschiedlichen Kultivierungsexperimenten (Rein- und Mischkulturen, mit und ohne Ceftazidim) sehr variabel auftreten können.

Die Detektion erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 256 nm. Die Berechnung der Konzentrationen aus den gemessenen Peakflächen erfolgte über eine Kalibrationsgerade, die für jede Messung einzeln anhand externer Ceftazidimstandards ermittelt wurde. Die Konzentrationen der Standards wurden so gewählt, dass sie den linearen Messbereich der Methode abdeckten (Tabelle 3). Die Standards wurden vor jedem Experiment frisch hergestellt (in M199 gelöst) und unter gleichen Bedingungen wie die Proben gelagert. Direkt nach der Probenahme wurde jede Probe einzeln mit einem Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert und bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 2: HPLC-Methode zur Detektion von Ceftazidim**

| <b>Säule (Umkehrphase)</b> | <b>Hypersil Gold 150 × 4.6 mm</b>  |
|----------------------------|--|
| Detektionswellenlänge      | 256 nm   |
| Eluent                     | 5 g L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 3.90 (mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)<br>Acetonitril (ACN) |
| Flussrate                  | 1 mL min <sup>-1</sup>   |
| Temperatur                 | 40 °C  |
| Injektionsvolumen          | 10 µL  |

Tabelle 3: Elutionsprofil der HPLC-Methode aus Tabelle 2

| Modus             | Eluentzusammensetzung  | Gesamtzeit |
|-------------------|--|------------|
| isokratisch       | 1.8 % ACN + 98.2 %<br>(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 10 min     |
| linearer Gradient | bis: 10 % ACN + 90 %<br>(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 25 min     |
| isokratisch       | 10 % ACN + 90 % (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 30 min     |
| isokratisch       | 1.8 % ACN + 98.2 %<br>(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 35 min     |

Tabelle 4: Validierungsparameter der Ceftazidimquantifizierung

|                   | Detektionslimit <sup>1</sup> | Quantifizierungslimit <sup>1</sup> | Standardabweichung der Methode <sup>1</sup> |
|-------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
|                   | µg mL <sup>-1</sup>          | µg mL <sup>-1</sup>                | µg mL <sup>-1</sup>                         |
| <b>Ceftazidim</b> | 0,592                        | 1,796                              | 0,180                                       |

<sup>1</sup>nach Standardvalidierungsberechnung für ungewichtete Regression (Ver. 1.1) der Gruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut Magdeburg

Tabelle 5: Konzentrationen der verschiedenen Kalibrationslevel für Ceftazidim

| Kalibrationslevel | Ceftazidim<br>µg mL <sup>-1</sup> |
|-------------------|-----------------------------------|
| 1                 | 40                                |
| 2                 | 30                                |
| 3                 | 20                                |
| 4                 | 15                                |
| 5                 | 5                                 |

Ceftazidim ist in wässriger Lösung instabil und zerfällt mit der Zeit. Um diesen Effekt in den Experimenten berücksichtigen zu können, wurde einmal unter Versuchsbedingungen (T = 37 °C; pH = 6,8; gelöst in Medium M199) der chemische Zerfall durch eine Zerfallsrate 1. Ordnung (nichtlineare Regression) bestimmt (Abbildung 4).

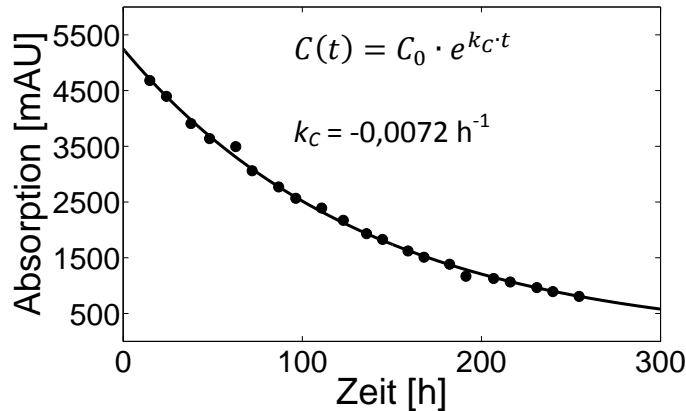


Abbildung 4: Chemischer Zerfall von Ceftazidim unter Versuchsbedingungen. Gemessen mit HPLC-Methode (siehe oben). Nichtlineare Regression

### 3.6. Substrate und Produkte des Metabolismus

#### Glucose, Glutamin, Glutamat

Die extrazelluläre Konzentrationsbestimmung von Glucose, Glutamin und Glutamat beruhte auf einer automatisierten enzymatischen Messung mit dem Gerät Bioprofile 100 Plus der Firma Nova Biosciences.

Vor jeder Probenserie wurden verschiedene Standards (Tabelle 6) gemessen mit deren Hilfe die Probenmesswerte korrigiert wurden. Die Korrektur erfolgte über eine 2-Punktgerade, die aus dem jeweiligen Maximalwert (Glc: 5,56 mM; Gln: 0,69 mM; Glu: 0,46 mM) und einem Minimalwert (0 mM) erstellt wurde. Alle Standards wurden mit einer Hintergrundmatrix gemessen, die entweder identisch zum Standardmedium M199 war oder ihr annähernd entsprach. Dies war insofern notwendig, da die Erfahrung zeigte, dass Messwerte allein aufgrund von Veränderung der Matrix variierten.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kalibrationsstandards der Metabolitmessung

| Bezeichnung                       | Glucose | Glutamin | Glutamat | Matrix   |
|-----------------------------------|---------|----------|----------|--|
|                                   | mM      | mM       | mM       |  |
| M199                              | 5,56    | 0,69     | 0,46     | Siehe "Standardmedium M199"                    |
| glucosefreies Medium <sup>1</sup> | 0       | 0,69     | 0,46     | siehe "Standardmedium M199"                    |
| Glutamin-, glutamatfreies Medium  | 5,56    | 0        | 0        | reduziertes Medium, siehe "Anhang: Tabelle 32" |

<sup>1</sup> kundenspezifisch hergestellte Mediumsvariante: wie Standardmedium, nur ohne Glucose

Auf Grundlage der oben beschriebenen Kalibrierung wurde eine Validierung durchgeführt, deren Ergebnis in Tabelle 7 aufgeführt wurde. Der lineare Konzentrationsbereich jedes Metaboliten umfasst den Bereich des jeweiligen Quantifizierungslimits bis zur jeweiligen Maximalkonzentration (Glc: 5,56 mM; Gln: 0,69 mM; Glu: 0,46 mM). In diesem Bereich konnten jeweils homogenen Varianzen nachgewiesen werden.

**Tabelle 7: Validierungsparameter des BioProfile 100 Plus**

| <b>Metabolit</b> | <b>Detektionslimit<sup>1</sup></b> | <b>Quantifizierungslimit<sup>1</sup></b> | <b>Standardabweichung der Methode<sup>1</sup></b> |
|------------------|------------------------------------|--|---|
|                  | mM                                 | mM                                       | mM  |
| Glucose          | 0,339                              | 1,022                                    | 0,100   |
| Glutamin         | 0,053                              | 0,162                                    | 0,016   |
| Glutamat         | 0,084                              | 0,254                                    | 0,025   |

<sup>1</sup>nach Standardvalidierungsberechnung für ungewichtete Regression (Ver. 1.1) der Gruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut Magdeburg

### **Gluconat, 2-Ketogluconat, Acetat und Pyruvat**

Gluconat, 2-Keto-D-gluconat (2KDG), Acetat und Pyruvat wurden mittels Flüssigchromatographie bestimmt, mit einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und validierten Methode (RezexOA-Methode, Tabelle 8, Tabelle 9).

Die Detektion erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 210 nm. Die Berechnung der Konzentrationen aus den gemessenen Peakflächen erfolgte über Kalibrationsgeraden, die für jede Messung einzeln anhand externer Standards ermittelt wurde. Die Konzentrationen der Standards wurden so gewählt, dass sie den linearen Messbereich des einzelnen Metabolits abdeckten (Tabelle 10). Einmal hergestellte Standards (sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert) konnten drei Monate lang verwendet werden. Direkt nach einer Probenahme wurde jede Probe einzeln mit einem Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert und bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 8: HPLC-Methode zur Detektion von Gluconat und 2KDG**

|  |  |
|--|--|
| <b>Säule (Anionenaustausch-Ionenausschluß)</b> | <b>Rezex-ROA <i>organic acids</i> 300 × 7.6 mm</b>   |
| <b>Detektionswellenlänge</b>                   | 210nm  |
| <b>Eluent</b>                                  | 0,075 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , isokratisch |
| <b>Flussrate</b>                               | 0,5 mL min <sup>-1</sup>                             |
| <b>Laufzeit</b>                                | 43 min   |
| <b>Temperatur</b>                              | 45 °C  |
| <b>Injektionsvolumen</b>                       | 10 µL  |

Tabelle 9: Validierungsparameter der RezexOA-Methode

| Metabolit | Detektionslimit <sup>1</sup> | Quantifizierungslimit <sup>1</sup> | Standardabweichung der Methode <sup>1</sup> |
|-----------|------------------------------|------------------------------------|---|
|           | mM                           | mM                                 | mM  |
| Gluconat  | 0,087                        | 0,267                              | 0,026                                       |
| 2KDG      | 0,052                        | 0,155                              | 0,016                                       |
| Acetat    | 0,075                        | 0,229                              | 0,023                                       |
| Pyruvat   | 0,039                        | 0,118                              | 0,012                                       |

<sup>1</sup>nach Standardvalidierungsberechnung für ungewichtete Regression (Ver. 1.1) der Gruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut Magdeburg

Tabelle 10: Konzentrationen der verschiedenen Kalibrationslevel für Gluconat, 2KDG, Acetat und Pyruvat

| Kalibrationslevel | Gluconat          | 2KDG              | Acetat            | Pyruvat |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
|                   | g L <sup>-1</sup> | g L <sup>-1</sup> | g L <sup>-1</sup> | mM      |
| 1                 | 1,25              | 1,25              | 1,25              | 5,00    |
| 2                 | 1,00              | 1,00              | 1,00              | 3,00    |
| 3                 | 0,75              | 0,75              | 0,75              | 2,00    |
| 4                 | 0,50              | 0,50              | 0,50              | 1,00    |
| 5                 | 0,25              | 0,25              | 0,25              | 0,25    |
| 6                 | 0,10              | 0,10              | 0,10              | 0,10    |

### 3.7. Mathematische Modellierung

#### Modelltypen und Modellierungsmethode

Zur Beschreibung der Pharmacodynamic der durchgeführten Experimente wurde ein deterministischer Modellierungsansatz auf Basis gewöhnlicher Differentialgleichungen gewählt. Die Modelle zur Beschreibung der Mischkultur (siehe „Mathematische Modellierung der *time-kill*-Experimente“) waren unstrukturiert und segregiert. Die Modelle für die Reinkulturen (siehe „Mathematische Modellierung der *time-kill*-Experimente“) waren unstrukturiert und nichtsegregiert. Die unabhängige Variable war die Zeit  $t$ . Die abhängige Variable war die Zellkonzentration  $N_i$ . Die Parameter der Modelle waren die spezifische Wachstumsrate  $\mu_i$ , die maximale Zellkonzentration  $N_{max,i}$ , der Zeitversatz  $t_{lag,i}$  von Inokulation bis zum Einsetzen der Antibiotikumswirkung, die maximale spezifische Lyserate  $k_{L,max,i}$ , die Antibiotikumskonzentration  $EC_{50}$  bei halb-maximaler Abtötungsrate, die Zellkonzentration  $N_{50}$  bei halb-maximaler Wachstumsrate und ein Faktor für Sigmoidität  $H$ . Der Index  $i$  bezeichnet die Spezies *P. aeruginosa*, *B. cepacia* oder *S. aureus*.

## Modellanapassung

Für numerische Berechnungen, Parameterschätzungen und Simulationen wurde Matlab (Ver 7.11) mit den *Toolboxen* für Optimierung, Statistik und Kurvenanpassung verwendet. Die Parameterwerte der Modelle wurden bestimmt, indem mit Hilfe des Nelder-Mead Simplex Algorithmus (implementiert in Matlab-Befehl *fminsearch*) an experimentelle Daten angepasst wurden (siehe auch „Parameterschätzung und Parametervarianzen“). Die Zielfunktion war das Minimum der Fehlerquadratsumme (FQS). Schmidt et al. (Schmidt et al. 2007) wiesen bei der Validierung der qT-RFLP-Methode homogene Varianzen im linearen Messbereich nach, so dass keine Skalierung der Messwerte im oberen oder unteren Messbereich zur Berechnung der FQS notwendig war (siehe auch „qT-RFLP-Analyse“). Die Parameteroptimierung wurde automatisch gestoppt, wenn sich die Parameterwerte in der 4. Nachkommastelle nicht weiter veränderten, bzw. wenn sich die Zielfunktion in der 8. Nachkommastelle nicht mehr veränderte. Die Startwerte für die Parameteroptimierung wurden nach Tabelle 11 ermittelt.

Tabelle 11: Vorgehen bei der Bestimmung der Startwerte zur Parameteroptimierung

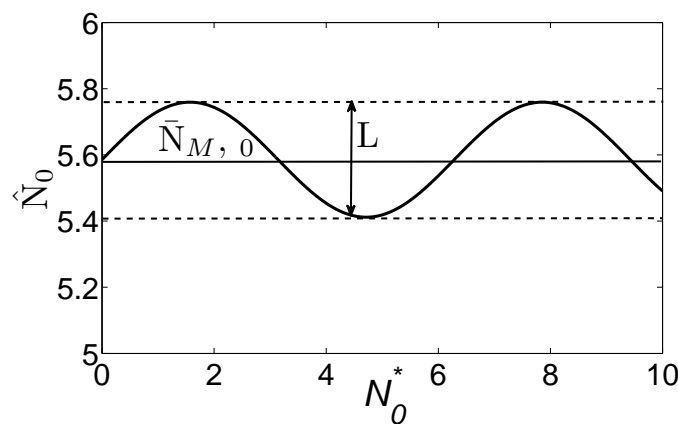
| Parameterbezeichnung | Vorgehen zur Bestimmung eines Startwertes   |
|----------------------|---|
| $\mu$                | Achsenabschnitt der linearen Regression nach Auftragung von $\frac{1}{\bar{N}} \frac{\Delta N}{\Delta t}$ über $\bar{N}$ (Linearisierung des logistischen Wachstumsmodells Gleichung 2), mit $\bar{N}$ als Mittelwert der Zellkonzentration im Zeitintervall $\Delta t$                   |
| $N_{max}$            | Mittelwerte aller gemessener Zellkonzentrationen in der stationären Phase des Zellwachstums   |
| $k_L$                | $k_L = \mu - \text{Achsenabschnitt}$ , der linearen Regression nach Auftragung von $\frac{1}{\bar{N}} \frac{\Delta N}{\Delta t}$ über $\bar{N}$ im Bereich der Lysephase (Linearisierung von Gleichung 4), mit $\bar{N}$ als Mittelwert der Zellkonzentration im Zeitintervall $\Delta t$ |
| $t_{lag}$            | Ablesen des Scheitelpunktes zwischen Wachstum und Lyse aus entsprechendem <i>time-kill</i> -Diagramm  |
| $EC_{50}$            | MHK-Wert des jeweiligen Keimes  |
| $N_{50}$             | $0,5 \cdot N_{max}$   |
| $H$                  | Wurde auf den Wert 1 festgelegt   |

Bei jeder Modellanapassung wurde die Zellkonzentration  $N_{t=0h}$  zur Anpassung freigegeben. Es wurden im Rahmen der *Bootstrap*-Analyse (siehe „Parametervarianzen“) jedoch oft Startkonzentrationen ermittelt deren Wert außerhalb des tatsächlichen gemessenen Fehlerbereichs für das jeweilige  $N_{t=0h}$  lag. Da also der mathematische „Parameter“  $N_{t=0h}$

eine höhere Varianz aufweisen konnte, als die direkt vergleichbare gemessene Startzellkonzentration, wurde die Priorität auf den Messwert gelegt und die Optimierung des mathematischen Werts auf das 95 %-Intervall des experimentell Messwert beschränkt. Mathematisch wurden diese Beschränkung durch eine Sinusfunktion (Gleichung 14 ) im Optimieralgorithmus implementiert. Dabei bezeichnet  $L$  die Breite des Konfidenzintervalls,  $\bar{N}_{M,0}$  den Mittelwert der Messwerte bei  $t = 0$  h,  $\hat{N}_0$  den Schätzwert mit dem die Zielfunktion (FQS) berechnet wird und  $N_0^*$  den Wert, den der Optimieralgorithmus (Nelder-Mead-Simplex, *fminsearch*) variiert, um die Zielfunktion zu minimieren.

$$\hat{N}_0 = \frac{L}{2} \cdot \sin(N_0^*) + \bar{N}_{M,0} \quad \text{Gleichung 14}$$

Beispielhaft wurde die Sinusfunktion in Abbildung 5 dargestellt. Unabhängig vom Wert den der Algorithmus auf der X-Achse wählt, wird zur Berechnung der Zielfunktion immer ein Wert im Bereich der Intervallgrenzen verwendet. Dadurch wird die Parameteroptimierung nicht in ihrem Ablauf gestört, aber dem Parameter, hier  $N_0$ , können trotzdem Grenzen gesetzt werden.



**Abbildung 5:** Beispiel für eine Sinusfunktion nach Gleichung 14.  $L$ : vorgegebene Intervallgrenzen in denen sich der Schätzwert  $\hat{N}_0$  bewegen darf,  $N_0^*$  für den Optimieralgorithmus frei wählbarer Parameterwert,  $\bar{N}_{M,0}$  Mittelwert der mehrfach bestimmten Messwerte

### Parametervarianzen

Die Bestimmung der Parametervarianzen erfolgte auf dem Prinzip der *Bootstrap*-Methode von Joshi et al. (Joshi et al. 2006a; Joshi et al. 2006b). Zunächst wurden  $B = 2000$  neue Datensätze simuliert. Grundlage hierfür war die Generierung eines Zufallswert als neuer

Messwert aus einer Normalverteilung, die durch den individuellen Messfehler der mehrfach (drei- oder sechsfach) bestimmten Messwerte bei jedem Probenahmezeitpunkt definiert war. Die Annahme einer Normalverteilung wurde durch einen Test auf Normalität (Kolmogorow-Smirnow-Test) mit den Mehrfachbestimmungen aus der Methodvalidierung (Schmidt et al. 2007) bestätigt. Für jeden simulierten Datensatz wurde das entsprechende Modell angepasst (siehe „Modellanapassung“), so dass für die Berechnungen der Parametervarianz  $B = 2000$  Realisierungen des einzelnen Parameters ausgewertet werden konnten. 2000 Parameterwerte reichten in allen Fällen aus, damit der Mittelwerte des Histogramms konvergierte.

In wenigen Fällen wurden durch den Zufallsprozess Datensets erzeugt, die bei der Anpassung zu extremen Parameterwerten führten. Da diese Einzelwerte die Verteilungsparameter, wie beispielsweise das Konfidenzintervall, maßgeblich beeinflussten, wurden diese Werte als Ausreißer zunächst aus den einzelnen Histogrammen entfernt. Als Ausreißer wurden Parameterwerte definiert, die kleiner oder größer als  $Q_1 - 1,5 \cdot sp$  bzw.  $Q_3 + 1,5 \cdot sp$  waren (Sachs and Hedderich 2009). Dabei ist der *spread* ( $sp = Q_3 - Q_1$ ) ein Maß für die Breite eines Histogramms, während  $Q_1$ ,  $Q_2$  und  $Q_3$  die Grenzen der Quartile bezeichnen, die jeweils 25 % aller Histogrammwerte enthalten (1. Quartil:  $x < Q_1$ , 2. Quartil:  $Q_1 < x < Q_2$ , 3. Quartil:  $Q_2 < x < Q_3$ , 4. Quartil:  $Q_3 < x$ ,  $Q_2 = \text{Median}$ ).

Für die weitere Auswertung der Histogramme wurden die 95 % Konfidenzintervalle herangezogen. Deren Grenzen wurden mit dem Matlabbefehl *icdf* (*inverse cumulative probability function*) berechnet, dem eine nichtparametrische Verteilungsanpassung (*kernel density estimation* – dt. Kerndichteschätzung, implementiert im Matlab-Befehl *ksdensity* oder *fitdist*) vorausging, mit der nahezu jedes beliebiges Histogramm durch eine mathematische Verteilungsfunktion angenähert werden kann.

Das Histogramm eines einzelnen Parameters war nur in den wenigsten Fällen normal verteilt. Daher wurden die Parameterhistogramme anhand verschiedener Charakteristika ausgewertet.

- Schätzwert  $\hat{\theta}$ : Parameterwert der minimal FQS-Schätzung
- Modalwert  $\theta_D$ : Parameterwert mit der höchsten Häufigkeit im Histogramm.
- Mittelwert  $\bar{\theta}$ : arithmetisches Mittel aller Histogrammwerte



- Oberer und unterer Wert des 95%-Konfidenzintervalls  $\theta_o$  und  $\theta_u$
- *Shape sh*: Schiefe der Verteilung nach Gleichung 15

$$sh = \frac{\theta_o - \bar{\theta}}{\bar{\theta} - \theta_u} \quad \text{Gleichung 15}$$

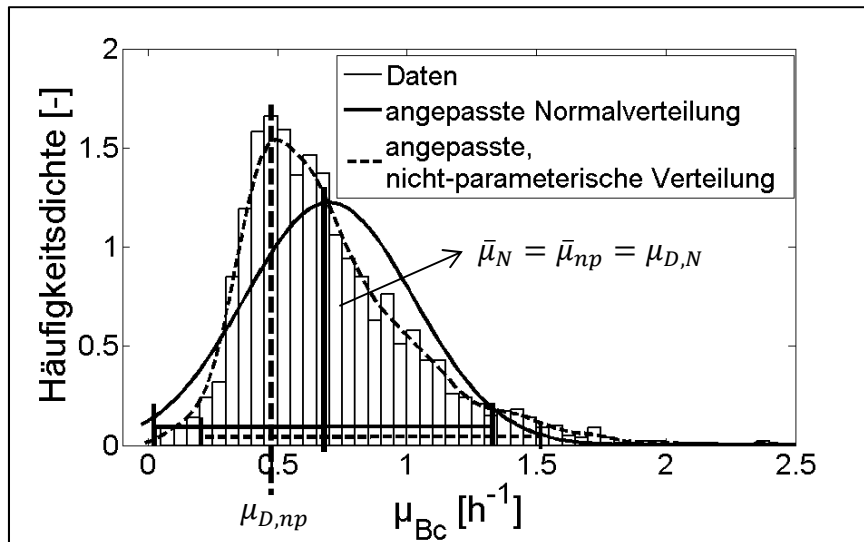
Der Abstand der oberen 95% Konfidenzintervallgrenze  $\theta_o$  vom Mittelwert  $\bar{\theta}$  wird ins Verhältnis gesetzt zum Abstand der unteren Konfidenzintervallgrenze  $\theta_u$  zum Mittelwert  $\bar{\theta}$ . Ein Wert von 1 charakterisiert eine absolut symmetrische Verteilung mit der Symmetrieachse beim Mittelwert. Ein Wert größer oder kleiner als 1 charakterisiert eine asymmetrische Verteilung.

- Relative Breite %L (*length*) nach Gleichung 16

$$\%L = \frac{\theta_o - \theta_u}{\bar{\theta}} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die Breite des 95%-Konfidenzintervalls wird mit dem Mittelwert normiert.

Ein typisches Parameterhistogramm aus der den *Bootstrap*-Analysen dieser Arbeit ist in Abbildung 6 gegeben. Daran wurde eine nichtparametrische Verteilung und zum Vergleich eine Normalverteilung angepasst. Die Normalverteilung zeigte systematische Abweichungen vom zugrundeliegenden Histogramm, während die nicht-parametrische Verteilungsfunktion das Histogramm eindeutig abbildet. Charakteristisch ist, dass bei der Normalverteilung der Mittelwert  $\bar{\mu}_N$  und Modalwert  $\bar{\mu}_{D,N}$  identisch sind, ebenso ist der Mittelwert der nicht-parametrischen Verteilung  $\bar{\mu}_{np}$  identisch mit dem Mittelwert der Normalverteilung (und dem Modalwert).



**Abbildung 6:** Beispielverteilung einer spezifischen Wachstumsrate nach einer *Bootstrap*-Analyse mit 2000 Anpassungen.  $\mu_{D,N}$  bzw.  $\mu_{D,np}$  : Modalwert der angepassten Normalverteilung bzw. der nichtparametrischen Verteilung,  $\bar{\mu}_N$  bzw.  $\bar{\mu}_{np}$  Mittelwert der angepassten Normalverteilung bzw. der nichtparametrischen Verteilung

Ein Maß für den linearen Zusammenhang zweier Parametern ist der Korrelationskoeffizient, der sich nach Gleichung 17 berechnet. Darin geht die Kovarianz  $Cov$  der Parameter und deren Standardabweichung  $\sigma$  ein.  $\rho$  ist dimensionslos und nimmt Werte im Bereich von -1 bis +1 an, wobei 0 keine und -1 oder +1 eine vollständige negative oder positive (lineare) Abhängigkeit zweier Parameter voneinander anzeigt.

$$\rho = \frac{Cov(\theta_m, \theta_n)}{\sigma_m \sigma_n}$$

Gleichung 17

### Simulationsvarianz

Mit Hilfe der *Bootstrap*-generierten Parametersets (siehe „Parametervarianzen“) war es möglich Konfidenzintervalle der Simulationsverläufe zu berechnen. Dazu wurden mit jedem einzelnen in der Monte-Carlo-Simulation erzeugten Parameterset die Zustandsgröße  $N(t)$  simuliert. Es wurden jedoch nur solche Parametersets verwendet, in denen der einzelne Parameter innerhalb des 95 %-Intervalls der Parameterverteilung lag (siehe „Parametervarianzen“). Parametersets in denen ein oder mehrere Parameter außerhalb des jeweiligen 95 %-Intervalls lagen wurden für die weiteren Berechnung bzw. Simulationen

nicht berücksichtigt. Aus den Simulationen für  $N(t)$  wurde anschließend an beliebigen Zeitpunkten der maximale bzw. minimale Simulationswert bestimmt. Im Diagramm wurden dann jeweils die Maximalwerte und die Minimalwerte miteinander verbunden dargestellt. Das Ergebnis waren zwei Kurven, die eine verlief über, die andere unterhalb der Simulationskurve der minimalen FQS-Schätzung (ein Beispiel: Abbildung 20). Das so dargestellte Intervall bildet den Bereich der Extremwerte der Simulationsverläufe dar und ist ein Maß für die Unsicherheit der FQS-Schätzung.

### **Nichtlineares Bestimmtheitsmaß**

Als eine einfache Näherung für das Bestimmtheitsmaß nichtlinearer Regressionen gilt Gleichung 18 (Montgomery et al. 2001; Sachs and Hedderich 2009). Der Term im Zähler  $\sum(y_i - \hat{y}_i)^2$  ist ein Maß für die Abweichung der Regressionskurve von den Messwerten (= FQS). Der Term im Nenner  $\sum(y_i - \bar{y})^2$  beschreibt die Abweichung des Nullmodells (Mittelwert aller Messwerte auf der y-Achse) von den Messwerten. In einfachen Worten gibt das Bestimmtheitsmaß den Anteil der Varianzen an, der durch das Regressionsmodell erklärt werden kann.

$$\hat{B} = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Gleichung 18}$$

### **Berechnung des P-Wertes**

Zum Vergleich ähnlicher und fehlerbehafteten Werte wurde statistische Hypothesentest angewendet und daraus ein  $P$ -Wert berechnet, um die Wahrscheinlichkeit einer Hypothese beurteilen zu können. Bei Werten, die als unabhängige Zufallsstichproben betrachtet werden konnten, wurde ein  $t$ -Test nach Gleichung 19 angewendet. Sollten die Steigungen zweier Regressionsgeraden verglichen werden, wurde ein  $t$ -Test nach Gleichung 20 angewendet. Für beide Tests wurde die jeweilige Nullhypothese ( $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$  bzw.  $b_1 = b_2$ ) für ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  getestet.

$$\hat{t} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}, \text{FG} = n_2 - 1 \text{ für } n_2 > n_1 \quad \text{(Sachs and Hedderich 2009)} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$\hat{t} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_{y_1.x_1}^2(n_1-2) + \sigma_{y_2.x_2}^2(n_2-2)}{n_1+n_2-4} \left[ \frac{1}{Q_{x_1}} + \frac{1}{Q_{x_2}} \right]}} \quad (\text{Sachs and Hedderich 2009}) \quad \text{Gleichung 20}$$

$$\sigma_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad \text{Gleichung 21}$$

$$Q_x = \sum (x - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 22}$$

Der  $P$ -Wert berechnet sich für einen zweiseitigen Test nach Gleichung 23, wobei  $F_T$  die Verteilungsfunktion des zugrundeliegenden Tests darstellt (meist:  $t$ -Test). Bei einem Wert von  $P > 0,05$  wurde die jeweilige zu grundliegende Nullhypothese akzeptiert, bzw. für  $P < 0,05$  wurde sie verworfen.

$$P = 2 \cdot \min\{F_T(\hat{t}), 1 - F_T(\hat{t})\} \quad \text{Gleichung 23}$$

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Time-kill Experimente

#### Reinkultur vs. Mischkultur mit und ohne Ceftazidim

Im Folgenden sind Versuchsergebnisse aus Kultivierungsexperimenten mit den drei Keimen *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Rein- und Mischkultur mit und ohne Zugabe von Ceftazidim im Schüttelkolben dargestellt. Die Inokulation und Durchführung der Experimente erfolgte wie beschrieben (siehe „Schüttelkolbenkultivierung“). Jeder Ansatz wurde dreifach parallel kultiviert. Für die qT-RFLP Analyse wurden zu jedem Zeitpunkt zwei Proben analysiert. Da sich wegen der gewählten Inokulationsmethode (siehe „Schüttelkolbenkultivierung“) unterschiedliche absolute Zellkonzentrationen zwischen Rein- und Mischkultur für den einzelnen Keim ergaben, erfolgte die Umrechnung der absoluten Zellkonzentrationen in eine Zellverdopplungszahl (Gleichung 11), die in folgenden Diagrammen dargestellt ist und anhand derer die Ergebnissauswertung vorgenommen wurde. Somit konnten trotz unterschiedlicher absoluter Startzellkonzentrationen beide Versuche auf Ebene des relativen Wachstums verglichen werden. Darüber hinaus sind die maximalen Zellkonzentrationen in Tabelle 12 dargestellt.

#### Ohne Ceftazidim

##### Zellverdopplungen

Da aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft wurde, zeigte sich bei *P. aeruginosa* keine initiale Lag-Phase in der Reinkultur (Abbildung 7a). Der Keim verdoppelte sich ca. 6-mal innerhalb der ersten 7 h. Das waren deutlich mehr Verdopplungen als bei *B. cepacia* und *S. aureus*, die sich beide ca. 3,5-mal während der ersten 9 h teilten. In der Mischkultur (Abbildung 7b) zeigte *P. aeruginosa* verbessertes Wachstum mit ca. 7,6 Verdopplungen in einer etwas längeren Wachstumsphase (exponentielle Wachstumsphase + Übergangsphase) von 9 h. Im Gegensatz dazu zeigte *S. aureus* eine geringere maximale Verdopplungszahl (ca. 2) als in der Reinkultur. Gegen Ende des Experiments sank die Zellverdopplungszahl sogar fast wieder auf den Startwert. Der dritte Keim, *B. cepacia* wuchs in Reinkultur wie auch in der Mischkultur ohne signifikante Unterschiede.

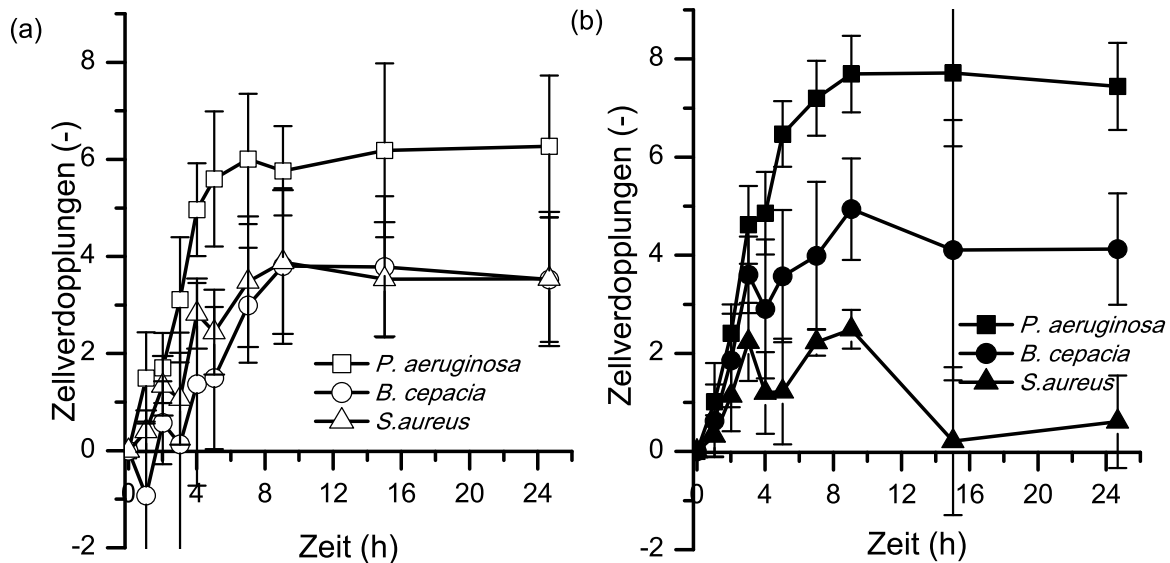
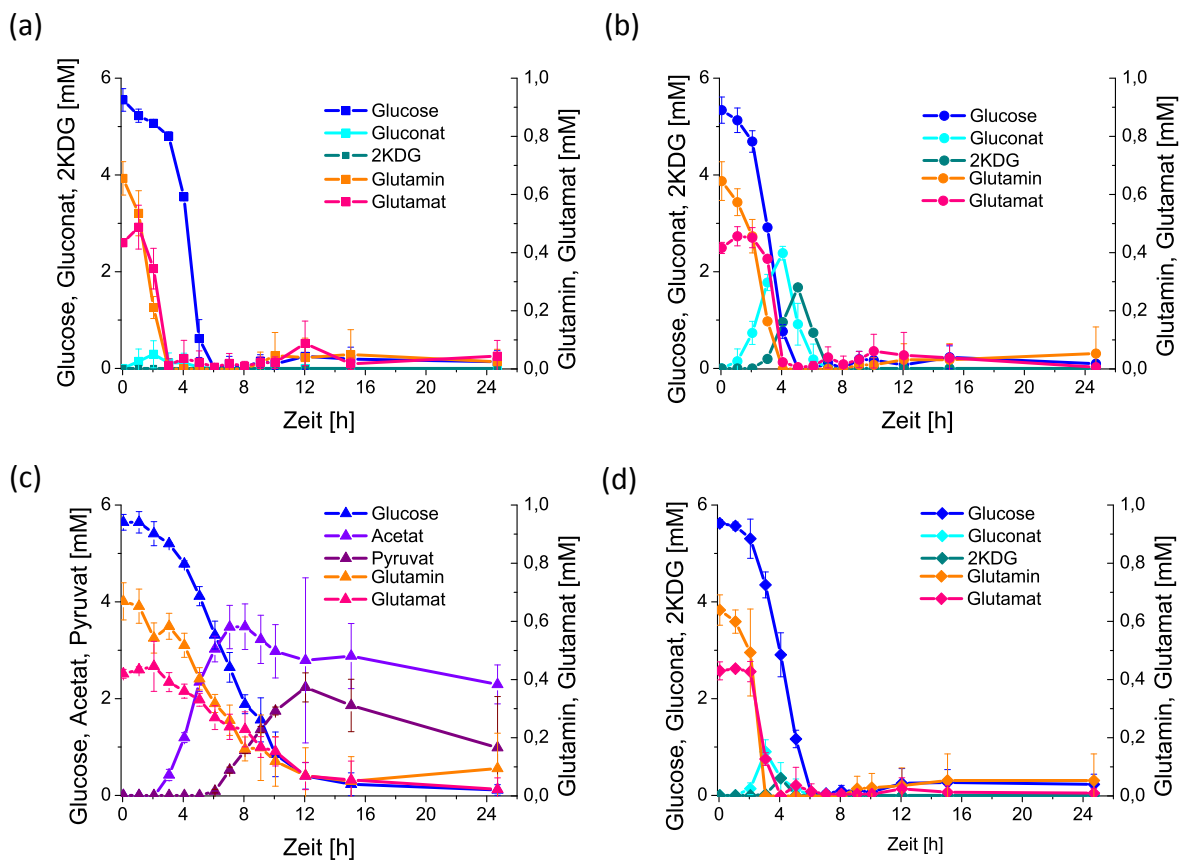


Abbildung 7: Wachstum von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Reinkulturen (a) und in der Dreier-Mischkultur (b) ohne Ceftazidim. Die Zellverdopplungen wurden nach Gleichung 11 berechnet (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme aus drei parallelen Kultivierungen)).

## Metabolismus

Die Metabolismusverläufe zeigen einen etwas geringeren Verbrauch von Glucose in der Reinkultur von *P. aeruginosa* im Vergleich zur Reinkultur von *B. cepacia* (Abbildung 8a und b). Während bei *P. aeruginosa* die Glucosekonzentration bei 3 h knapp unter 5 mM lag, ist die Konzentration bei *B. cepacia* zum gleichen Zeitpunkt schon auf 3 mM gesunken. Der Verlauf der Glucosekonzentration in der Dreier-Mischkultur ähnelte am meisten dem Verlauf von *P. aeruginosa* (vgl. Wert bei 2, 3 und 4 h). Dagegen schien bei *P. aeruginosa* die Verstoffwechslung von Glutamin schneller abgelaufen zu sein, als bei *B. cepacia*: Glutamin war nach 3 h vollständig verstoffwechselt, bei *B. cepacia* wurde dies erst nach 4 h erreicht. Das Gleiche galt für Glutamat. Auch dieses Substrat wurde von *P. aeruginosa* schneller abgebaut (nach 3 h), als von *B. cepacia* (nach 4 h). In der Dreier-Mischkultur bewegten sich beide Kurven zwischen den Kurven von *P. aeruginosa* (schnelle Verstoffwechslung) und *B. cepacia* (langsame Verstoffwechslung). Ein sehr deutlicher Unterschied der Metabolismusprofile zeigte sich bei Gluconat und 2KDG: Bei *P. aeruginosa* waren die Metabolite sehr gering konzentriert (Gluconat) bzw. nicht nachweisbar (2KDG). Bei *B. cepacia* dagegen waren beide Metabolite in vergleichsweise hohen Konzentrationen

messbar. So erreichte Gluconat (ca. 2,5 mM) zwischenzeitlich eine Konzentration von etwa der Hälfte der Glucosekonzentration (5,55 mM). Derselbe Trend trat in der Dreier-Mischkultur auf, jedoch auf geringerem Konzentrationsniveau als bei *B. cepacia*. Bei *S. aureus* wurden weder Gluconat noch 2KDG detektiert, jedoch produzierte der Keim signifikante Mengen Acetat und Pyruvat (Abbildung 8c). Insgesamt war der Stoffwechsel langsamer als bei *P. aeruginosa* oder *B. cepacia*. So konnten nach 12 h noch immer geringe Mengen der Substrate bestimmt werden. Die beiden Stoffwechselprodukte von *S. aureus* konnten in der Dreier-Mischkultur nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 8:** Verlauf der Metabolite in den Reinkulturexperimenten von *P. aeruginosa* (a), *B. cepacia* (b), *S. aureus* (c) und in der Dreier-Mischkultur (d) ohne Ceftazidim. Glucose - blau, Gluconat - cyan, 2KDG - dunkelgrün, Glutamin - orange, Glutamat - rot. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messwerten (Einfachbestimmung aus drei parallelen Kultivierungen).

## Mit Ceftazidim

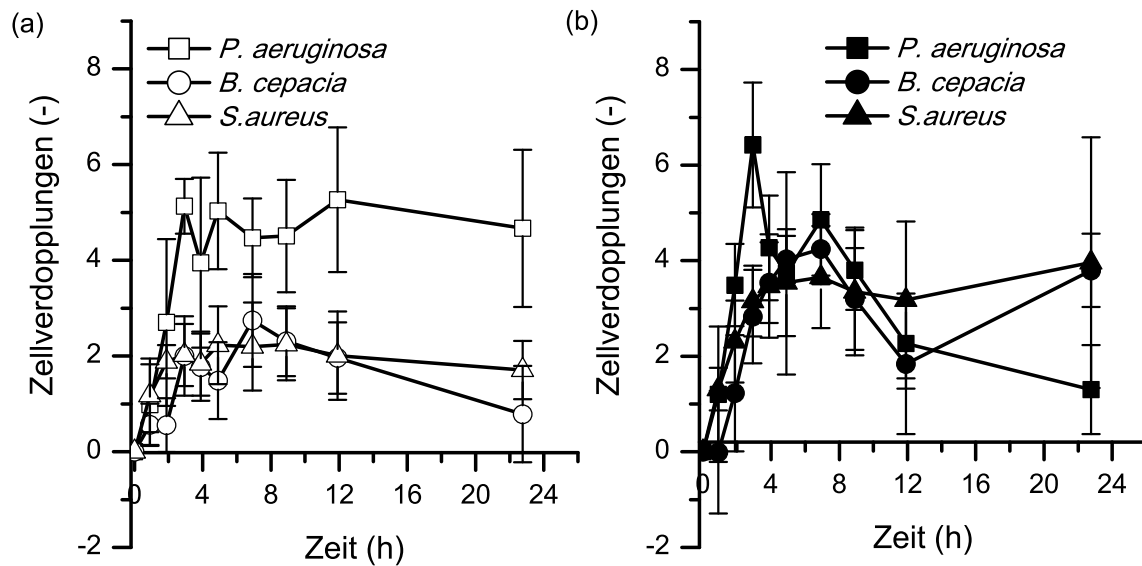


Abbildung 9: Wachstum von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Reinkulturen (a) und in der Dreier-Mischkultur (b) mit jeweils  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim. Die Zellverdopplungen wurden nach Gleichung 11 berechnet (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme aus drei parallelen Kultivierungen)).

Die Ergebnisse aus der Behandlung der jeweiligen Reinkultur mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim sind in Abbildung 9a aufgetragen. Bei *P. aeruginosa* folgte die Verlauf der Zellverdopplungen dem gleichen Schema wie in der Reinkultur ohne Antibiotikum (Abbildung 7a). Jedoch war die Wachstumsphase in der ceftazidimbehandelten Reinkultur kürzer (ca. 3 h) als in der unbehandelten Reinkultur. Nach ca. 5 Verdopplungen blieb die Zellkonzentration konstant (unbehandelten Reinkultur ca. 6 Verdopplungen); es folgte keine Lysephase. Bei *B. cepacia* konnte kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wachstumsphase (ca. 8 h) zwischen behandelter (Abbildung 9a) und un behandelter Reinkultur (Abbildung 7a) festgestellt werden. Allerdings trat in der antibiotikumbehandelten Kultur ein geringer aber signifikanter Rückgang der Verdopplungszahl (von 4 auf 2 Verdopplungen) auf. Dies entsprach einem Rückgang der Zellkonzentration und kann als Lyse interpretiert werden. Die antibiotikumbehandelte Reinkultur von *S. aureus* zeigte eine vergleichsweise geringe Wachstumsphase von ca. 2 h (Abbildung 9a). Dies führte folglich auch zu einer geringeren maximalen Verdopplungszahl von ca. 2 im Vergleich zur un behandelten Reinkultur



(Reduktion um ca. 1,5 Verdopplungen, Abbildung 7a). Anzeichen von Lyse konnten nicht festgestellt werden.

In der ceftazidimbehandelten Mischkultur zeigte *P. aeruginosa* zu Beginn eine 3 h dauernde Wachstumsphase, die sich in ihrer Länge nicht von der unbehandelten Mischkultur oder von der ceftazidimbehandelten Reinkultur unterschied. Ein deutlicher Unterschied zu den angesprochenen Referenzexperimenten erschien jedoch im Bereich 3 – 24 h: Die Verdopplungszahl sank kontinuierlich. *B. cepacia* teilte sich in der ceftazidimbehandelten Mischkultur viermal. Im Bereich 7 bis 12 h war ein stärkerer Rückgang der Verdopplungszahl zu beobachten als in der behandelten Reinkultur. Außerdem zeigt sich eine zweite Wachstumsphase (Abbildung 9b: 12 - 24 h, Anstieg von ca. 2 auf ca. 4 Verdopplungen), die nur in der behandelten Mischkultur auftrat, nicht aber in der behandelten Reinkultur. *S. aureus* erreichte eine maximale Verdopplungszahl von ca. 3,5 in der ceftazidimbehandelten Mischkultur (Abbildung 9b). Das war eine signifikant höhere Verdopplungszahl (P-Wert = 0,014) als in der behandelten Reinkultur (Abbildung 9a), in der lediglich eine Verdopplungszahl von ca. 2 erreicht wurde. Eine Lysephase, wie in der unbehandelten Mischkultur (Abbildung 7b) konnte nicht beobachtet werden.

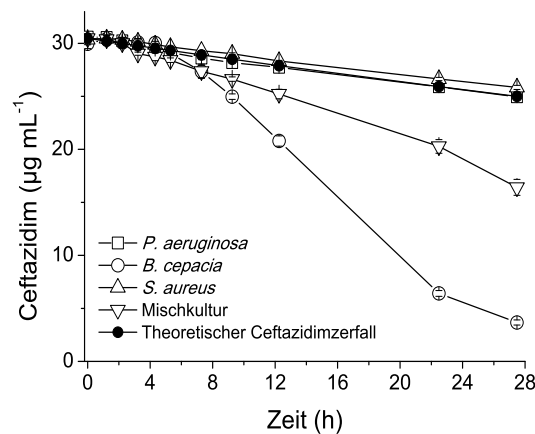
Vergleicht man das Wachstum unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen anhand der maximalen Zellkonzentrationen, zeigt sich eine klare Dominanz von *P. aeruginosa* (Tabelle 12). Unabhängig von der Mischkultursituation oder von der Ceftazidimbehandlung erreichte dieser Keim die höchsten Konzentrationen. Nur in der ceftazidimbehandelten Dreier-Mischkultur handelte es sich um ein lokales Maximum, während in den anderen Experimenten die maximalen Zellkonzentrationen in der stationären Phase annähernd konstant blieben (Abbildung 7 und Abbildung 9).

**Tabelle 12: Maximale Zellkonzentrationen ± Standardabweichung.**

| Stamm                | Reinkultur                | Mischkultur               | Reinkultur<br>+ 30 µg mL <sup>-1</sup><br>Ceftazidim | Mischkultur<br>+ 30 µg mL <sup>-1</sup><br>Ceftazidim |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|--|---|
|                      | [ge mL <sup>-1</sup> ]    | [ge mL <sup>-1</sup> ]    | [ge mL <sup>-1</sup> ]                               | [ge mL <sup>-1</sup> ]                                |
| <i>P. aeruginosa</i> | 10 <sup>8.54 ± 0.58</sup> | 10 <sup>8.24 ± 0.29</sup> | 10 <sup>7.71 ± 0.36</sup>                            | 10 <sup>8.81 ± 0.51</sup>                             |
| <i>B. cepacia</i>    | 10 <sup>7.68 ± 0.35</sup> | 10 <sup>6.81 ± 0.49</sup> | 10 <sup>7.12 ± 0.19</sup>                            | 10 <sup>7.02 ± 0.25</sup>                             |
| <i>S. aureus</i>     | 10 <sup>8.15 ± 0.29</sup> | 10 <sup>6.81 ± 0.27</sup> | 10 <sup>7.36 ± 0.10</sup>                            | 10 <sup>6.85 ± 0.28</sup>                             |

## Ceftazidimzerfall & Ceftazidimabbau

In den parallel kultivierten und ceftazidimbehandelten Rein- und Mischkulturexperimenten (Abbildung 7 und Abbildung 9) wurde die Ceftazidimkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum von 28 h gemessen (siehe „Ceftazidim“). Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 10 aufgetragen. In den Reinkulturen von *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurde eine Abnahme der Ceftazidimkonzentration gemessen, die der Abnahme durch chemischen Zerfall entsprach (Abnahme um 8 %). Der stärkste Rückgang der Ceftazidimkonzentration trat in der behandelten Reinkultur von *B. cepacia* auf (Rückgang um 88 %) gefolgt von der Mischkultur (Rückgang um 45 %).



**Abbildung 10:** Ceftazidimkonzentrationen in den *time-kill*-Experimenten aus Abbildung 7 und Abbildung 9. Der theoretische Konzentrationsverlauf auf Grund von chemischem Zerfall wurde theoretisch berechnet (siehe „Ceftazidimlösung“).

## Zweier-Mischkulturen mit und ohne Antibiotikum

Als Ergänzung zu den Versuchen im vorherigen Kapitel (siehe „Reinkultur vs. Mischkultur mit und ohne Ceftazidim“) wurden die drei Keime in jeder zweier Kombination jeweils mit Antibiotikum und ohne Antibiotikum kultiviert (Abbildung 11 und Abbildung 12). Die Inokulation und Durchführung des Experiments erfolgte wie beschrieben (siehe „Schüttelkolbenkultivierung“). Jeder Ansatz wurde dreifach parallel kultiviert. Für die qT-RFLP Analyse wurden zu jedem Zeitpunkt zwei Proben analysiert.

### Ohne Ceftazidim

Die Zellkonzentration von *P. aeruginosa* in der Co-Kultur mit *B. cepacia* ohne Zugabe von Ceftazidim nahm während der ersten 10 h zu und erreichte eine maximale Zellkonzentration von  $10^{8,34 \pm 0,28}$  ge mL<sup>-1</sup> (Abbildung 11a). Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug  $0,57 \pm 0,06$  h<sup>-1</sup> (durch lineare Regression, Matlab<sup>®</sup> Version 7.9, *curve fitting toolbox* 2.1). Im Zeitintervall zwischen 10 – 24 h blieb die Zellkonzentration in etwa konstant. Daneben zeigte *B. cepacia* ein nahezu identisches Wachstumsprofil. Die Konzentration nahm während der ersten 10 h kontinuierlich zu und erreichte eine maximalen Zellkonzentration von  $10^{7,42 \pm 0,27}$  ge mL<sup>-1</sup> mit einer geringeren maximalen spezifischen Wachstumsrate von  $0,41 \pm 0,05$  h<sup>-1</sup>.

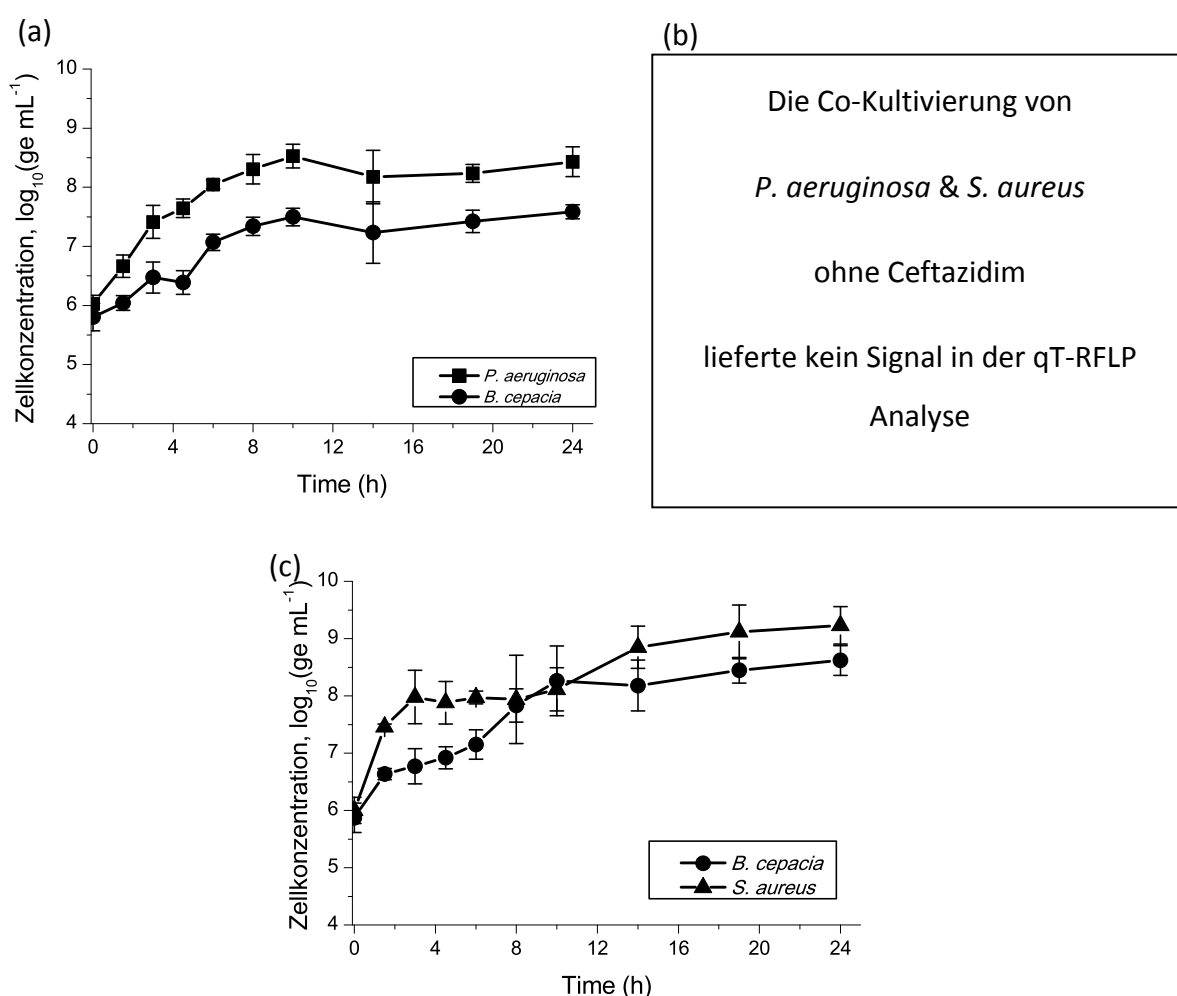


Abbildung 11: Wachstum der Keime in der jeweiligen Zweier-Mischkultur ohne Zugabe von Ceftazidim: (a) *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, (b) *P. aeruginosa* und *S. aureus*, (c) *B. cepacia* und *S. aureus*. Die Auswertung der Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* lieferte auch bei dreimaligem Wiederholen des ganzen Versuchs kein verwertbares Ergebnis in qT-RFLP. Die Werte sind in absoluten Zellkonzentrationen gegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme und aus drei parallelen Kultivierungen).

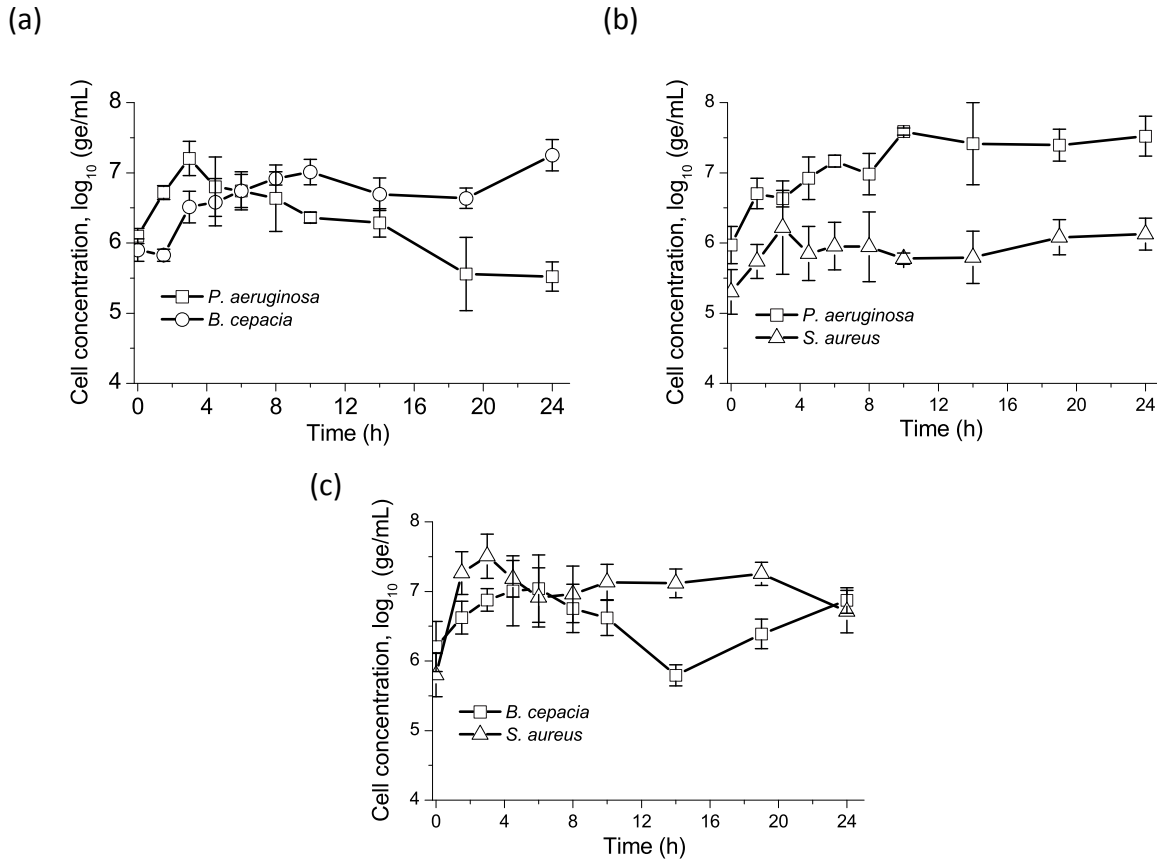
Die Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* mit *S. aureus* führte zu keinem verwertbaren Signal in der qT-RFLP-Analytik. Dieser Umstand war reproduzierbar in der Analyse der parallel kultivierten Schüttelkolben, sowie in einer unabhängigen Versuchswiederholung. Durch Variation der Extraktionsbedingungen konnte ebenfalls keine Verbesserung erreicht werden. In den ersten zwei Probennahmen war der PCR-Schritt der qT-RFLP-Analyse (siehe „qT-RFLP-Analyse“) reproduzierbar erfolgreich, während alle späteren Probennahmen reproduzierbar zu keinem PCR-Produkt führten. Vergleichbare Schwierigkeiten traten in keinem anderen Versuch auf.

Bei der Co-Kultivierung von *B. cepacia* und *S. aureus* (Abbildung 11c) war die Wachstumsphase von *B. cepacia* mit 10 h so lang wie in der Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (Abbildung 11a). Dabei erreichte *B. cepacia* jedoch eine höhere maximale Zellkonzentration von  $10^{8,4 \pm 0,4}$  ge mL<sup>-1</sup> bei einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von  $0,50 \pm 0,10$  h<sup>-1</sup>. *S. aureus* wuchs während der ersten 3 h mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $1,52 \pm 0,56$  h<sup>-1</sup> und erreichte eine Zellkonzentration von  $10^{7,9 \pm 0,4}$  ge mL<sup>-1</sup>. Im Bereich von 10 – 19 h stieg die Zellkonzentration ein weiteres Mal bis auf  $10^{9,2 \pm 0,4}$  ge mL<sup>-1</sup> an. Diese zweite Wachstumsphase von *S. aureus* erschien in keinem weiteren Experiment. Die Tatsache, dass dieses Wachstum nicht mit dem Verbrauch der bekannten Metabolite korrelierte (Daten nicht gezeigt), könnte auf einen Analytikfehler in der qT-RFLP-Methode hinweisen. Jedoch ergab sich bei der Durchsicht der qT-RFLP-Zwischenergebnisse (Konzentration extrahierter DNA, Menge an PCR Produkt, Peakflächen im Elektropherogramm) keine Auffälligkeiten, die auf einen Fehler hindeuteten. Somit wird von einem korrekten Ergebnis ausgegangen.

### **Mit Ceftazidim**

In der Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (Abbildung 12a) stieg die Konzentration von *P. aeruginosa* trotz Ceftazidimanwendung innerhalb der ersten 3 h auf einen maximalen Wert von  $10^{7,2 \pm 0,2}$  ge mL<sup>-1</sup>, was etwa 4 Verdopplungen und einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,85 \pm 0,16$  h<sup>-1</sup> entspricht. Danach sank die Zellkonzentration mit einer nahezu konstanten Rate auf einen Endwert von  $10^{5,5 \pm 0,4}$  ge mL<sup>-1</sup> (bei 19 und 24 h unterhalb der Startzellkonzentration). Daneben teilte sich *B. cepacia* nach einer Lag-Phase von 1 h für weitere 9 h und erreichte damit eine maximale Zellkonzentration von  $10^{7,0 \pm 0,2}$  ge mL<sup>-1</sup>. Die spezifische Wachstumsrate in diesem Zeitraum betrug

$0,25 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ . Es folgte ein geringer aber doch signifikanter (t-test zum Vergleich zweier Mittelwerte,  $P$ -Wert = 0,093) Rückgang auf  $10^{6,7 \pm 0,2} \text{ ge mL}^{-1}$  (10 – 14 h). Danach stieg die Zellkonzentration wieder auf  $10^{7,3 \pm 0,2} \text{ ge mL}^{-1}$  an (19 – 24 h).



**Abbildung 12: Wachstum der Keime mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim in der jeweiligen Zweier-Mischkultur: (a) *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, (b) *P. aeruginosa* und *S. aureus*, (c) *B. cepacia* und *S. aureus*. Die Werte sind in absoluten Zellkonzentrationen gegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme und aus drei parallelen Kultivierungen).**

In der ceftazidimbehandelten Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* (Abbildung 12b) teilte sich *P. aeruginosa* innerhalb der ersten 10 h, was deutlich länger war als in der Co-Kultivierung mit *B. cepacia* (Abbildung 12a). Die spezifische Wachstumsrate in diesem Zeitraum war jedoch mit  $0,29 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$  signifikant geringer. Nach Erreichung des Maximalwertes bei 10 h blieb die Zellkonzentration im Gegensatz zur Co-Kultivierung mit *B. cepacia* (Abbildung 12a) konstant. Die Zellkonzentration von *S. aureus* nahm nur innerhalb

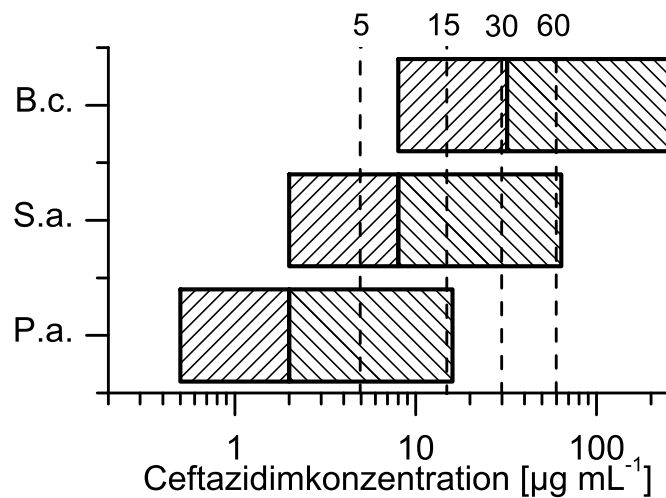
der ersten 3 h zu und blieb im weiteren Verlauf der Kultivierung konstant auf einem Wert von etwa  $10^{5,9 \pm 0,3}$  ge mL<sup>-1</sup> (Abbildung 12b).

*B. cepacia* erreichte in der ceftazidimbehandelten Co-Kultur mit *S. aureus* eine maximale Zellkonzentration von  $10^{7,0 \pm 0,5}$  ge mL<sup>-1</sup> innerhalb der ersten 4,5 h (Abbildung 12c). Dies entsprach einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,41 \pm 0,28$  h<sup>-1</sup>. Die Wachstumsperiode war deutlich kürzer als im entsprechenden Experiment mit *P. aeruginosa* (Abbildung 12a), obwohl die maximale Zellkonzentration identisch war. Dies lässt auf eine höhere spezifische Wachstumsrate schließen, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (*P*-Wert = 0,19), was sich wiederum auf den relativ großen Fehler bei der Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate von *B. cepacia* im Co-Kultivierungsexperiment mit *S. aureus* zurückführen ließ (relative Standardabweichung: 67 %). Die folgende Lysephase war in der Co-Kultivierung mit *S. aureus* stärker ausgeprägt als im Experiment mit *P. aeruginosa*. So dauerte der Trend über 8 h an (6-14 h) und führte zu einer Reduktion der Zellkonzentration von  $10^{7,0 \pm 0,5}$  auf  $10^{5,8 \pm 0,2}$  ge mL<sup>-1</sup>. Im Zeitintervall 14 bis 24 h konnte eine weitere Wachstumsphase festgestellt werden, in der die Zellkonzentration wieder auf einen Wert von  $10^{6,9 \pm 0,2}$  ge mL<sup>-1</sup> zunahm. *S. aureus* erreichte im selben Experiment eine maximale Konzentration von  $10^{7,5 \pm 0,3}$  ge mL<sup>-1</sup> innerhalb der ersten 3 h. Dieser Wachstumsphase folgte eine Abnahme der Zellkonzentration, welche sich dann bei  $10^{7,1 \pm 0,3}$  ge mL<sup>-1</sup> einpegelte und bis 19 h konstant blieb. Der letzte Datenpunkt markierte einen weiteren Rückgang auf  $10^{6,7 \pm 0,3}$  ge mL<sup>-1</sup>.

### **Mischkultur mit variierten Ceftazidimkonzentrationen**

In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von Ceftazidim auf die 3er-Mischkultur bei unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Für das einzelne Bakterium leitet sich der wirksame Konzentrationsbereich für  $\beta$ -Lactam Antibiotika vom jeweiligen MHK-Wert ab (siehe „Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) als Standardkenngröße der Antibiotikumwirksamkeit“). Bezogen auf eine Mischkultur mit unterschiedlichen Spezies und MHK-Werten leitet sich der wirksame Konzentrationsbereich für die Gesamtpopulation vom Bakterium mit dem höchsten MHK-Wert ab. Bei der Anwendung von Antibiotikumskonzentrationen unterhalb dieses Bereichs kann eine verminderte Wirkung bezüglich einzelner Bakterien innerhalb der Mischkultur auftreten. Die im folgenden Experiment angewendeten Ceftazidimkonzentrationen wurden so gewählt, dass die

Wirkunterschiede, wie oben genannt, zumindest theoretisch auftreten konnten (Abbildung 13).



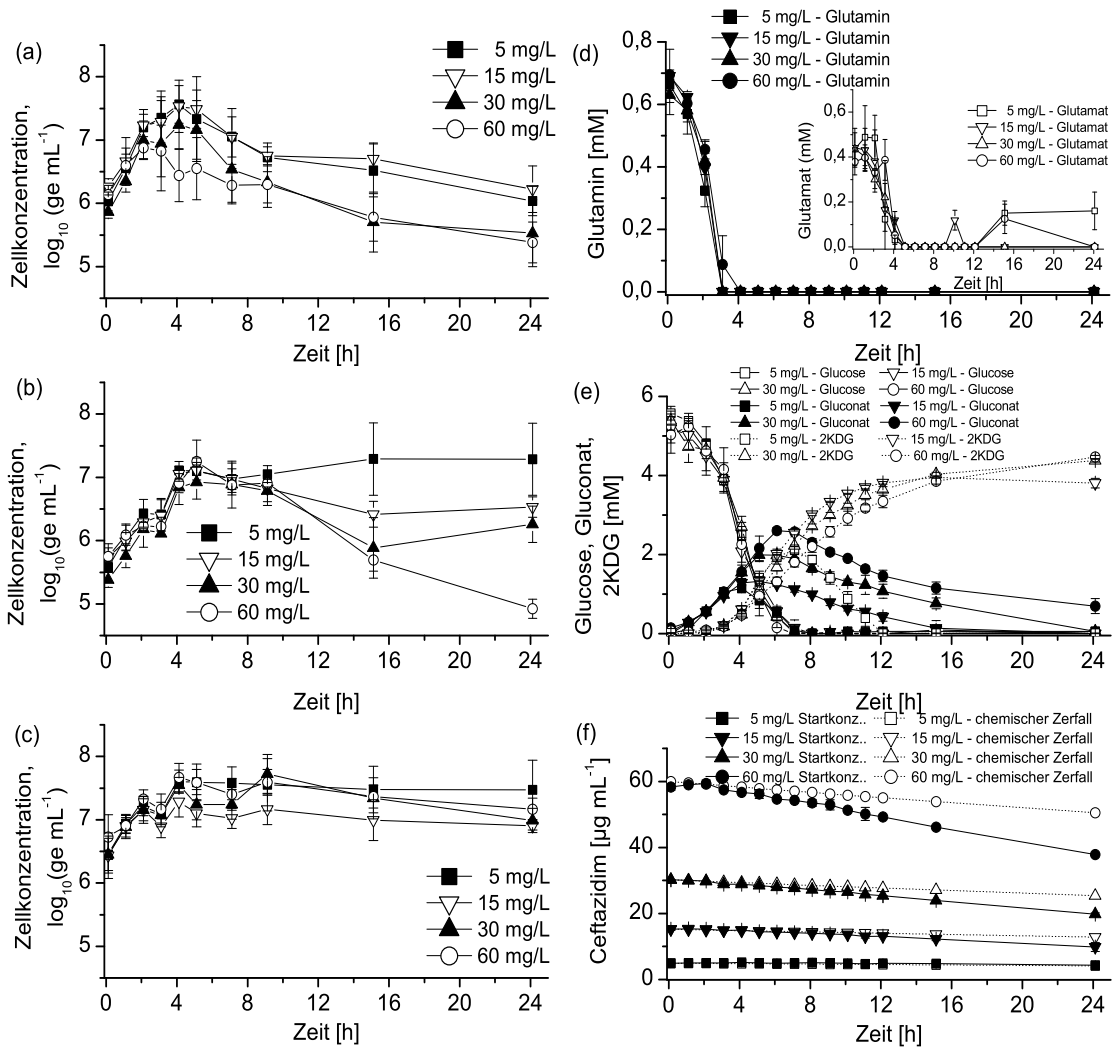
**Abbildung 13: Optimale Wirkungsbereiche von Ceftazidim für das jeweilige Bakterium anhand des MHK-Wertes. Mittelstrich der jeweiligen Box: MHK-Wert; linke bzw. rechte Grenze der Box entspricht  $\pm 4 \times$  MHK-Wert). Die im Experiment (Abbildung 14) angewendeten Ceftazidimkonzentrationen (5, 15, 30 und 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sind als senkrechte gestrichelte Linien eingezeichnet.**

Abbildung 14a zeigt die zeitliche Änderung der Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa* für die verschiedenen Ceftazidimkonzentrationen. Die Wachstumsphase war gefolgt von einer Übergangsphase, die in eine Lysephase mit annähernd konstantem Trend mündete. Die spezifische Wachstumsrate von *P. aeruginosa* war in allen vier Fällen im Mittel mit  $0,50 \text{ h}^{-1} \pm 0,07$  annähernd identisch, ebenso wie die Lyserate von  $-0,07 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$ . Die zeitlichen Verläufe für 5 und 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim variierten nur im Bereich des bekannten Fehlers und sind daher über den gesamten Versuchszeitraum als identisch zu betrachten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den anderen Kurven erschien in der Übergangsphase. In der Mischkultur, welche mit 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  behandelt wurde, ließ sich der Beginn der Lysephase bei 2,1 h ausmachen, während diese bei den 30, 15 und 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Kolben erst 2 h später (ca. 4 h) einsetzte. Jedoch war die maximale Zellkonzentration des 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiments signifikant geringer ( $P$ -Wert = 0,16; t-test zum Vergleich zweier Stichproben) als im 5 und 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiment.

Unabhängig von der verwendeten Ceftazidimkonzentration folgte die Zellkonzentration von *B. cepacia* in der Mischkultur während der ersten ca. 9 h dem gleichen Trend (Abbildung 14b). Alle vier Kurven variierten in diesem Zeitraum im Bereich des bekannten Messfehlers und sind daher als identisch zu betrachten. Der Anstieg der vier Kurven innerhalb der ersten 5 h entsprach einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,69 \text{ h}^{-1} \pm 0,05$ . Es folgte eine stationäre Phase im Bereich von 5 – 9 h, in der die Zellkonzentrationen annähernd konstant waren. Erst ab 9 h zeigten sich unterschiedliche Trends in Abhängigkeit von der angewendeten Ceftazidimkonzentration. So nahm die Zellkonzentration in den  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Kolben kontinuierlich bis zum Ende (24 h) hin ab und erreichte eine Endkonzentration von  $10^{4,9 \pm 0,2} \text{ ge mL}^{-1}$ , die sogar geringer war als die Startkonzentration von  $10^{5,8 \pm 0,1} \text{ ge mL}^{-1}$ . Mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  war der Lysetrend bis 15 h identisch mit dem des  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Kolbens. Allerdings folgte dann im Gegensatz zu diesen ein Anstieg bis zum Ende bei 24 h. Der Lysetrend in den  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Kolben war vergleichsweise schwach ausgeprägt. Dem folgte ein leichter Anstieg gegen Ende (24 h) hin. In den  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Kolben war kein Einfluss mehr des Ceftazidims im Sinne von Lyse zu beobachten: *B. cepacia* behielt, in Anbetracht des Messfehlers, eine konstante Zellkonzentration im Bereich 5 – 24 h.

Die Dynamik der Zellkonzentration von *S. aureus* war bei allen vier Ceftazidimkonzentrationen nahezu identisch (Abbildung 14c). Der Organismus wuchs innerhalb der ersten 4,1 h nach Animpfen und ging anschließend in eine stationäre Phase über ohne weitere signifikante Veränderungen in der Zellkonzentration.



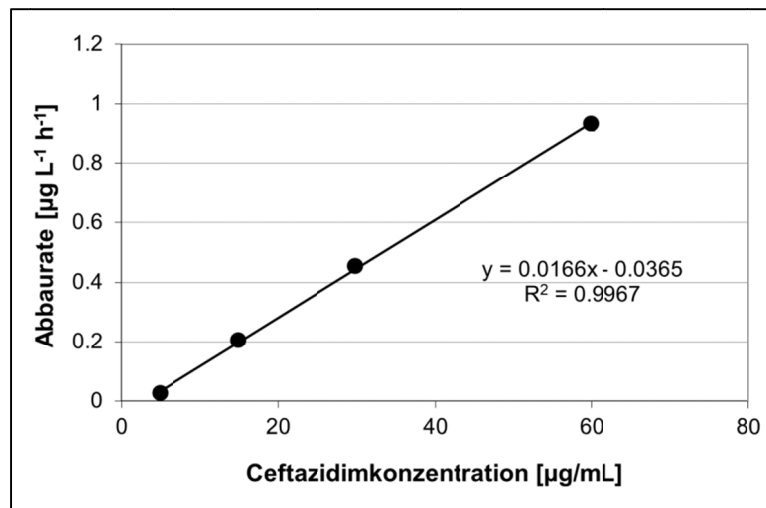


**Abbildung 14: Time-kill Experiment mit der 3er-Mischkultur und unterschiedlichen Cefprozidimkonzentrationen (5, 15, 30 und 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Jedes Konzentrationsexperiment wurde in drei parallelen Schüttelkolben kultiviert (jeder Datenpunkt: Mittelwert  $\pm$  Std.-abw.). Die Zellkonzentrationen wurden doppelt bestimmt. Zellkonzentrationen ( $\text{ge mL}^{-1}$ ) von *P. aeruginosa* (a), *B. cepacia* (b) und *S. aureus* (c). Metabolitkonzentrationen (mM) von Glutamin und Glutamat (d) ; Glucose, Gluconat und 2KDG (e). Cefprozidimkonzentrationen und chemischer Zerfall von Cefprozidim (f) („siehe Cefprozidim“).**

Die Substrate Glutamin und Glutamat wurden von Beginn an verstoffwechselt (Abbildung 14d). Jedoch wurde Glutamin schneller verstoffwechselt und war daher nach ca. 3 h vollständig verbraucht, während Glutamat nach ca. 4 h verbraucht war. Glucose war nach etwa 7 h vollständig verbraucht (Abbildung 14e). Der Trend aller drei genannten Substrate war jeweils identisch und damit unabhängig von der verwendeten Cefprozidimkonzentration. Im Verlauf der Gluconat- und 2KDG-Konzentrationen zeichnete sich jedoch eine Korrelation mit der Cefprozidimkonzentration ab. Je höher die eingesetzte Cefprozidimkonzentration war,

desto höher war die Maximalkonzentration des produzierten Gluconats und desto später wurde diese erreicht. Von 5 bis 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzten Ceftazidims wurden folgende maximalen Gluconatkonzentration gemessen: 0,21 mM (3 h); 0,25 mM (4 h); 0,39 mM (5 h) und 0,51 mM (6 h). Diese Maximalkonzentrationen stellten jeweils ein lokales Maximum dar mit einem anschließenden Rückgang der Konzentration. Mit 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim war Gluconat schon nach kurzer Zeit (7 h) vollständig verbraucht. Bei 15 und 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim war Gluconat nach 15 h und 24 h vollständig verbraucht. Bei 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim wurde ein vollständiger Verbrauch innerhalb des Versuchszeitraums nicht erreicht. Allerdings lässt der Trend darauf schließen, dass dies bei längerer Kultivierung der Fall sein würde. 2KDG, welches aus Gluconat produziert wird (siehe „Glucosestoffwechsel von *P. aeruginosa* und *B. cepacia*“), wurde in signifikanter Menge zum ersten Mal bei 3 h gemessen. Mit 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim wurde ein Maximalwert von 2,21 mM 2KDG bei 7 h erreicht, gefolgt von einer Abnahme bis zum vollständigen Verbrauch bei 12 h. Bei höheren Ceftazidimkonzentrationen war 2KDG auch bei Versuchsende in noch relativ hohen Konzentrationen (ca. 4 mM) vorhanden. Der Anstieg der 2KDG-Konzentration korrelierte mit der eingesetzten Ceftazidimmenge. So wurde der schnellste Anstieg bei 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim gemessen, gefolgt von 30 und 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Bei 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim verlief der relativ kurze Anstieg der 2KDG-Konzentration identisch mit dem aus den 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Kolben.

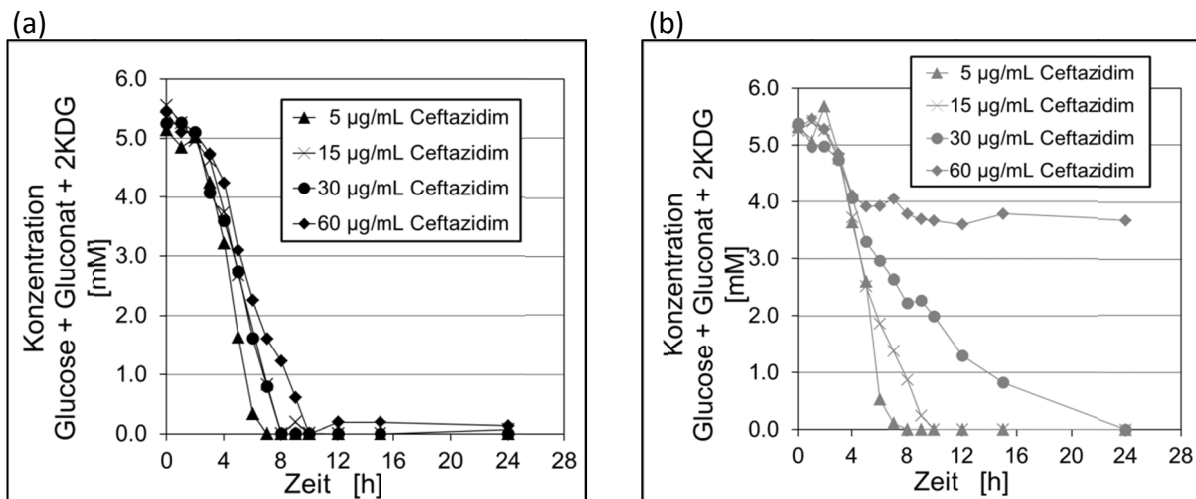
Die Abnahme der Ceftazidimkonzentration wurde mittels HPLC-Messung erfasst (Abbildung 14f). In den Experimenten mit 60, 30 und 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidims war die tatsächliche Abnahme des Antibiotikums schneller als es der chemische Zerfall (siehe „Ceftazidim“) allein erwarten ließ. Für den Versuch mit 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim konnte kein signifikanter Unterschied zwischen chemischen Zerfall und tatsächlicher Abnahme festgestellt werden ( $P$ -Wert = 0,242). Indes konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Ceftazidimkonzentration und der tatsächlichen Ceftazidimabbaurate festgestellt werden (Abbildung 15). Die Abbauraten wurde mittels linearer Regression aus den Ceftazidimkurven (Abbildung 14f) bestimmt.



**Abbildung 15:** Darstellung der linearen Korrelation zwischen eingesetzter Ceftazidimkonzentration in der 3er-Mischkultur und der Abbaurrate des Antibiotikums. Jeder Punkt ergibt sich als Steigung aus einer linearen Regression (Matlab® Ver7.9, *Statistic Toolbox*™ Ver7.2, Befehl: *robustfit*) der in Abbildung 14f dargestellten Ceftazidimkonzentrationen. Die Fehlerbalken (Standardfehler) der bestimmten Steigungen sind so klein, dass sie im Diagramm nicht mehr zu erkennen sind. Die abgebildete (Linie) lineare Regression von Ceftazidimkonzentration und Abbaurrate wurde mit Excel durchgeführt.

### ***Metabolismus + Ceftazidim***

Ergänzend zu dem vorgestellten Experiment mit variierten Ceftazidimkonzentrationen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem die gleichen Konzentrationsstufen (5, 15, 30 und 60 µg mL<sup>-1</sup>) auf die Reinkulturen und - als Kontrolle - auf eine parallel kultivierte Dreier-Mischkultur angewendet wurden. Die analytische Auswertung des Experiments umfasste nur die Metabolite, aber keine Zellkonzentrationen. Aufgrund der relativ geringen Quantifizierungsfehler der HPLC-Messung wurde jeder Versuchsansatz daher nur einfach durchgeführt. Im Folgenden sind die Gesamtkonzentrationen von Glucose, Gluconat und 2KDG in der *B. cepacia*-Reinkultur und der Dreier- Mischkultivierung aufgetragen. Alle weiteren Ergebnisse (*S. aureus*-, *P. aeruginosa*-Kultivierung, Glutamin-, Glutamat-Daten) zeigten keine Auffälligkeiten und werden daher nicht gezeigt.



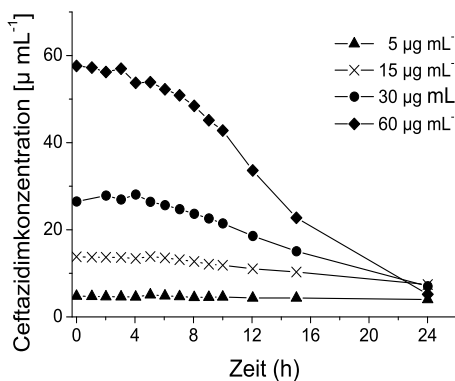
**Abbildung 16: Gesamtkonzentrationen von Glucose+Gluconat+2KDG in der Reinkultur von *B. cepacia* (a) und der Dreier-Mischkultur (b), jeweils mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen (5, 15, 30 und 60 µg mL<sup>-1</sup>) behandelt.**

In der Reinkultur von *B. cepacia* wurde Glucose teilweise in Gluconat und 2KDG umgesetzt (Daten der Einzelkonzentrationen nicht gezeigt). Letztlich wurden diese Metabolite vollständig und unabhängig von der angewendeten Ceftazidimkonzentration (Abbildung 16a) verbraucht. Bei 60 µg mL<sup>-1</sup> Ceftazidim war dieser Zeitpunkt nach 10 h erreicht. Die Trends bei Anwendung von 30 und 15 µg mL<sup>-1</sup> Ceftazidim waren identisch und führten zu vollständigem Verbrauch der Metabolite nach 8 h. Bei 5 µg mL<sup>-1</sup> war schon nach 7 h alle Glucose und deren Folgeprodukte verbraucht. Im parallelen Mischkulturexperiment zeigte sich ein deutlich anderer Trend (Abbildung 16b). Bei der höchsten Ceftazidimkonzentration von 60 µg mL<sup>-1</sup> nahm die Gesamtkonzentration nach 5 h nicht mehr weiter ab, sondern blieb konstant bis zum Ende des Experiments. Mit abnehmender Ceftazidimkonzentration (30, 15, 5 µg mL<sup>-1</sup>) setzte sich die Abnahme der Glucosemetabolite bis zum vollständigen Verbrauch fort. Dies trat umso früher ein, je geringer die Ceftazidimkonzentration war. Vom Ansatz her war das Mischkulturexperiment (Abbildung 16b) eine Reproduktion des in Abbildung 14e gezeigten Experiments, jedoch war der Verlauf der Gesamtkonzentration von Glc+Gn+2KDG nicht exakt derselbe (Summenwert der Glucose-, Gluconat- und 2KDG-Konzentration von Abbildung 14e nicht gezeigt). Der Trend war jedoch reproduzierbar: Je geringer die Ceftazidimkonzentration, desto höher die Stoffwechselleistung.

Die im selben Experiment gemessenen Ceftazidimkonzentrationen sind in Abbildung 17 abgebildet. Wie schon in Abbildung 10 gezeigt wurde, waren auch in diesem *time-kill*-

Experiment die Abbauraten in der *B. cepacia*-Reinkultur (Abbildung 17a) tendenziell größer als in der Dreier-Mischkultur (Abbildung 17b). Der Unterschied war umso größer, je höher die verwendete Ceftazidimkonzentration im *time-kill*-Experiment war. Bei geringen Konzentrationen trat weder in der *B. cepacia*-Reinkultur, noch in der Mischkultur ein signifikanter Ceftazidimabbau auf. Wie in Abbildung 15 folgten die Abbauraten in Abhängigkeit der zugegebenen Ceftazidimkonzentration einem linearen Trend (Abbildung 18). Dieser Trend war für die Dreier-Mischkultur nahezu identisch mit dem aus der Mischkultur in Abbildung 15 (Steigung: 0,017 vs. 0,018 h<sup>-1</sup>).

(a)



(b)

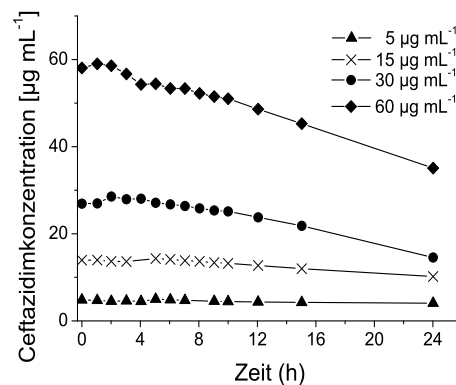


Abbildung 17: Ceftazidimkonzentration in der Reinkultur von *B. cepacia* (a) und der Dreier-Mischkultur (b), jeweils mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen (5, 15, 30 und 60 µg mL<sup>-1</sup>) behandelt.

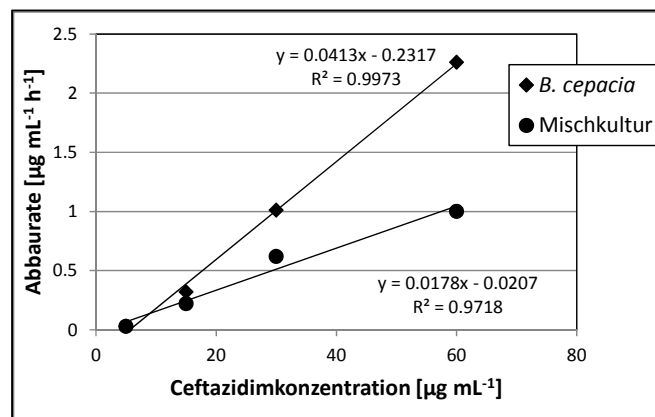
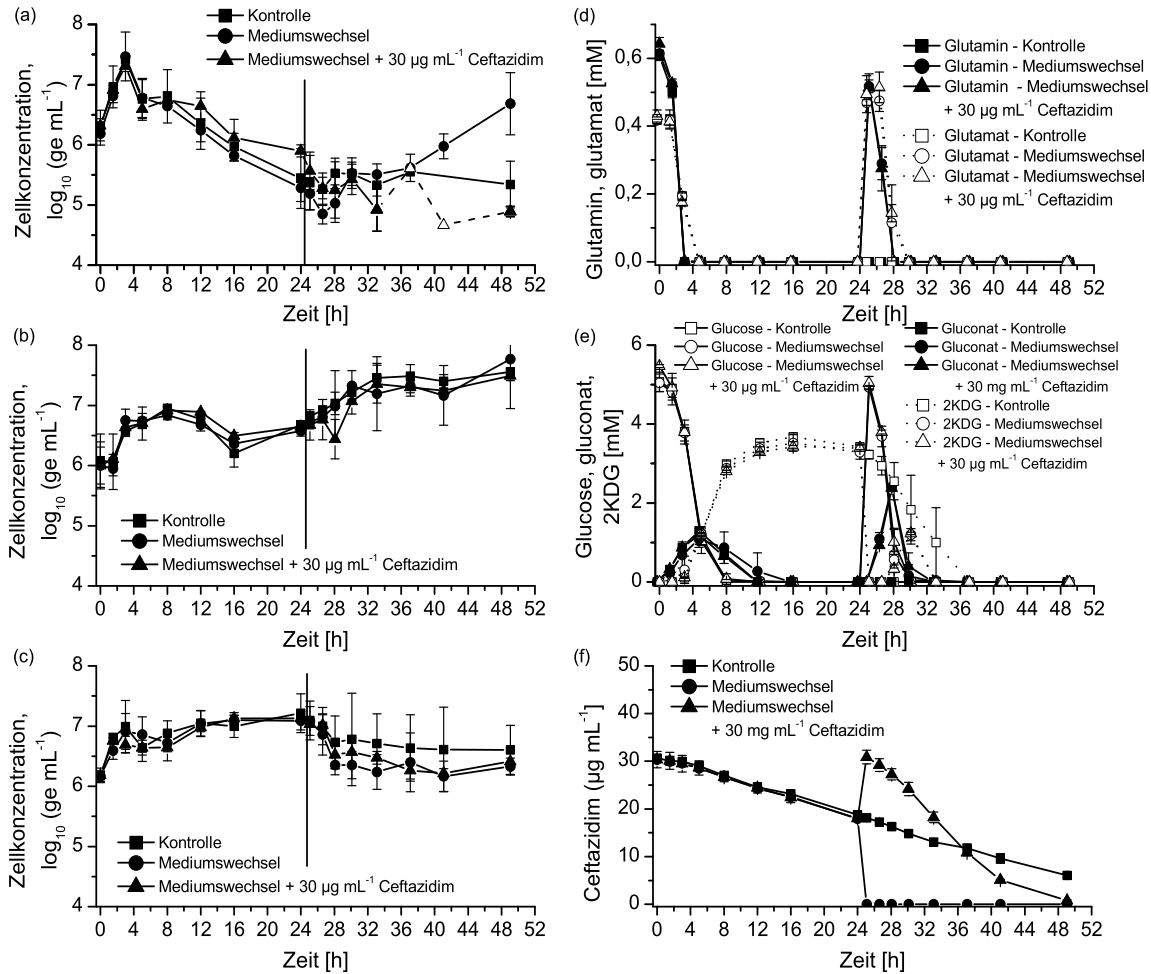


Abbildung 18: Lineare Korrelation der eingesetzten Ceftazidimkonzentration und der Abbauraten des Antibiotikums. (a) *B. cepacia*-Reinkulturen, (b) Dreier-Mischkultur. Jeder Punkt ergibt sich als Steigung aus einer linearer Regression (Matlab® Ver7.9, *Statistic Toolbox*™ Ver7.2, Befehl: *robustfit*) der in Abbildung 17 dargestellten Ceftazidimkonzentrationen. Die Fehlerbalken (Standardfehler) der bestimmten Steigungen sind so klein, dass sie im Diagramm nicht mehr zu erkennen sind. Die abgebildete (Linie) lineare Regression von Ceftazidimkonzentration und Abbauraten wurde mit Excel durchgeführt.

### **Mischkultur mit variiertem Ceftazidimbehandlungsschema**

Im folgenden Experiment wurde die Wirkung eines wiederholten Ceftazidimpulses (jeweils  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) auf die Dreier-Mischkultur untersucht. Jeweils drei parallel kultivierte Kolben wurden für einen Versuchsansatz verwendet. In allen Ansätzen wurde zu Beginn warmes Medium M199 mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim vorgelegt und mit den drei Keimen *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* nach Standardverfahren (siehe „Schüttelkolbenkultivierung“) inokuliert. Ein Ansatz diente als Kontrolle und wurde über den gesamten Versuchszeitraum ohne weitere Modifikation von außen beprobt. Im zweiten Ansatz sollte die Erholungsfähigkeit der Mischkultur nach der ersten Ceftazidimbehandlung untersucht werden. Bei diesem wurde nach 24 h das verbrauchte Medium zusammen mit dem Antibiotikum entfernt und durch frisches, vorgewärmtes Medium (ohne Ceftazidim) ersetzt. Im letzten Ansatz wurde die Wirkung des zweiten Antibiotikumpulses untersucht. Dazu wurde nach 24 h das verbrauchte Medium mit frischen, vorgewärmten Medium ersetzt und erneut Ceftazidim mit einer Endkonzentration von  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim zugegeben. Bei allen Medienwechseln wurden die Zellen abzentrifugiert ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min, 4860 g), der Überstand abgegossen und durch dieselbe Menge frischen Mediums ersetzt.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Time-kill-Experiment mit der 3er-Mischkultur.** Nach 24 h wurden die bis dahin identischen Versuchsansätze unterschiedlich behandelt. In einem Ansatz wurde verbrauchtes Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. In einem weiteren Ansatz wurde neben dem frischen Medium auch erneut 30 µg mL<sup>-1</sup> Cefprozid zugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der über 49 h ohne weiteres Eingreifen kultiviert wurde. Jeder Ansatz wurde in drei parallelen Schüttelkolben kultiviert (jeder Datenpunkt: Mittelwert ± Standardabweichung). Die Zellkonzentrationen wurden doppelt bestimmt. Die offenen Symbole in Abbildung (a) bezeichnen die Proben, die in der qT-RFLP-Analyse jeweils nur einen Datenpunkt lieferten. Zellkonzentrationen in (ge mL<sup>-1</sup>): *P. aeruginosa* (a), *B. cepacia* (b) und *S. aureus* (c). Metabolitkonzentrationen (mM): Glutamin und Glutamat (d); Glucose, Gluconat und 2KDG (e). Cefprozidkonzentration und chemischer Zerfall von Cefprozid (f).

Der Verlauf der speziesspezifischen Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa* (Abbildung 19a), *B. cepacia* (Abbildung 19b) und *S. aureus* (Abbildung 19c) war in allen Kolben während der ersten 24 h jeweils identisch in Anbetracht des bekannten Messfehlers. Dies trifft ebenso auf die Konzentrationen der gemessenen Metabolite (Glutamin, Glutamat, Glucose, Gluconat,

2KDG in Abbildung 19d und Abbildung 19e) zu, wie auch auf die Konzentration von Ceftazidim (Abbildung 19f). Dies zeigt, dass die Reproduzierbarkeit der antibiotikumbehandelten Mischkultur gegeben ist.

Bei *P. aeruginosa* setzte sich in allen Ansätzen unabhängig vom Mediumswechsel der abnehmende Trend der ersten 24 h für weitere 3 h fort (bis 26,6 h). Danach zeigten sich Unterschiede im Verlauf der Zellkonzentrationen. Während in der unbehandelten Kontrolle die Zellkonzentration bis zum Ende des Versuchs in etwa konstant blieb, war nach Entfernung des Antibiotikums und Zugabe frischen Mediums ein deutlicher Anstieg der Zellkonzentration von *P. aeruginosa* zu verzeichnen. Die Zellkonzentration erreichte gegen Ende des Experiments einen Wert von  $10^{6,7 \pm 0,5}$  ge mL<sup>-1</sup>. Die spezifische Wachstumsrate von  $0,07 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$  in diesem Zeitraum (26,6 – 49,1 h) war allerdings deutlich geringer als noch zu Beginn des Experiments (0 – 3 h) mit einer Wachstumsrate von  $0,43 \text{ h}^{-1} \pm 0,07$ . Die Reaktion von *P. aeruginosa* auf eine erneute Zugabe von Ceftazidim wäre vermutlich eine weitere Abnahme der Zellkonzentration gewesen, tatsächlich war aber eher ein konstanter Trend zu beobachten. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelte, da die gemessene Zellkonzentration nah am unteren Messbereich der Methode ( $\sim 10^{5,0}$  ge mL<sup>-1</sup>, (Schmidt et al. 2007) ) lag und es bekannt ist, dass dann weiterhin Konzentrationswerte des unteren Messbereichs bestimmt werden, selbst wenn die tatsächliche Zellkonzentration darunter liegt. Die Tatsache, dass nicht alle analysierten Proben ein Ergebnis lieferten, ist ebenfalls ein Indiz für die genannte Vermutung (Abbildung 19a).

Die Verläufe der Zellkonzentrationen von *B. cepacia* können in Anbetracht des bekannten Messfehlers als identisch betrachtet werden (Abbildung 19b). Nach der typischen Wachstums- und Lysephase (siehe Abbildung 9b) stieg die Zellkonzentration im Zeitraum 16 - 33 h wieder an. Interessanterweise zeigten sich keine Unterschiede in den Konzentrationsverläufen. Weder der Mediumswechsel, noch die Zugabe von Ceftazidim beeinflussten das Wachstums- oder Abtötungsverhalten. Das gleiche galt für *S. aureus* (Abbildung 19c). Der Keim wuchs zu Beginn des Experiments auf eine Zellkonzentration von etwa  $10^{6,9 \pm 0,3}$  ge mL<sup>-1</sup>, die bis 24 h annähernd konstant blieb. Danach fiel die Zellkonzentration um 0,5 log-Stufen innerhalb von 4 h ab und blieb dann wieder konstant bis zum Ende des Experiments. Der Grund für die Abnahme ist nicht offensichtlich. Immerhin



kann ein Einfluss durch Mediumswechsel ausgeschlossen werden, da der gleiche Trend auch in den Kontrollkulturen auftrat, die in keiner Weise von außen beeinflusst wurden.

Glucose wurde von Beginn an relativ rasch verstoffwechselt (Abbildung 19e). Zum Teil wurde es in Gluconat umgesetzt, das wiederum teilweise in 2KDG umgesetzt wurde. 2KDG wurde mit einer Konzentration von ca. 3,5 mM innerhalb der ersten 24 h angereichert, was 63 % des Ausgangssubstrates Glucose entsprach. Im Kontrollexperiment wurde 2KDG im Zeitraum 24 – 37 h vollständig konsumiert. In den Ansätzen mit Mediumstausch wurde das angereicherte 2KDG mit dem verbrauchten Medium entfernt und durch neue Substrate ersetzt. Die neue Glucose wurde in beiden Ansätzen mit identischen Trends verbraucht unabhängig vom Ceftazidim, das nur in einem der Versuche zugesetzt wurde. Identisch waren ebenso die Trends des daraus produzierten Gluconats und 2KDGs.

Der Abfall des Ceftazidims während der ersten 24 h war stärker als es der rein chemische Zerfall vermuten ließe (Abbildung 19f). Der Trend im Kontrollexperiment setzte sich auch in der zweiten Hälfte des Experiments stetig fort. Nach Mediumstausch und erneuter Zugabe von Ceftazidim nahm die Abbaurate im Vergleich zu den ersten 24 h ( $-0,72 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) deutlich zu ( $-1,81 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

## 4.2. Mathematische Modellierung der *time-kill*-Experimente

### Modell für limitiertes Wachstum

Limitiertes Wachstum von Bakterien lässt sich wie in Abschnitt „Pharmacodynamische Modelle“ dargestellt, durch einen linearen, logistischen Ansatz (Gleichung 2) beschreiben, oder alternativ, durch einen nichtlinearen Ansatz (Gleichung 3). In der hier vorgestellten Arbeit sollte jedoch nur ein Modelltyp verwendet, weshalb eine Entscheidung zwischen beiden Varianten nötig wurde. Die beste Anpassung an die Wachstumskurven der verwendeten Keime sollte als Kriterium dienen. Als Kenngröße wurde das Bestimmtheitsmaß  $\hat{B}$  (siehe „Nichtlineares Bestimmtheitsmaß“) gewählt. Die Modellanpassungen wurden mit den Wachstumskurven aller drei Keime in Rein- und Mischkultur ohne Antibiotikabehandlung (siehe Abbildung 7) durchgeführt.

In beiden Modellen wurde die gleiche Anzahl an Parameter angepasst (jeweils drei:  $\mu$ ,  $N_{max}$  und  $N_0$  bzw.  $WR_{max}$ ,  $N_{50}$  und  $N_0$ ), so dass die Entscheidung der besseren Anpassung in erster Linie anhand des Bestimmtheitsmaß, aber auch anhand des optischen Vergleichs von Daten und Simulation im Diagramm (nicht gezeigt) getroffen werden konnte. In Tabelle 13 ist das jeweilige Bestimmtheitsmaß jeder Anpassung aufgelistet. Die resultierenden Parameterwerte und deren Varianzen werden im nächsten Abschnitt behandelt (siehe „Mischkultur ohne Ceftazidimbehandlung“).

**Tabelle 13: Bestimmtheitsmaße  $\hat{B}$  nach Anpassung des logistischen Modells (Gleichung 2) und des nichtlinearen Alternativmodells (Gleichung 3) und die Wachstumskurven aus Abbildung 7**

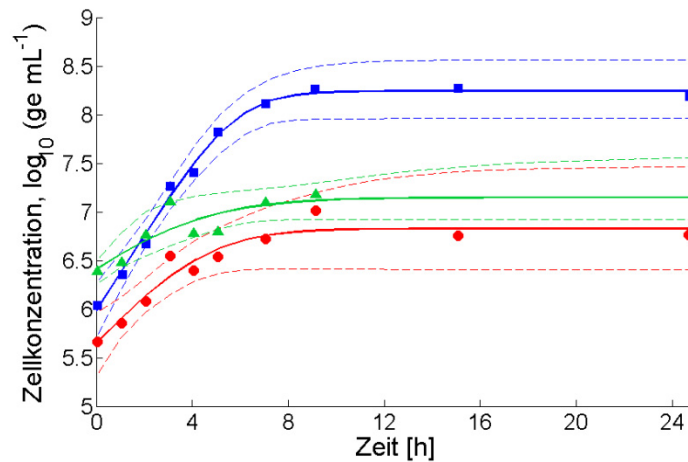
| Organismus           | Reinkultur          |                                | Mischkultur         |                                |
|----------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|
|                      | Logistisches Modell | Nichtlineares Alternativmodell | Logistisches Modell | Nichtlineares Alternativmodell |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0,765               | 0,705                          | 0,925               | 0,869                          |
| <i>B. cepacia</i>    | 0,599               | 0,545                          | 0,567               | 0,483                          |
| <i>S. aureus</i>     | 0,731               | 0,639                          | 0,467               | 0,481                          |

Das Bestimmtheitsmaß der Anpassung mit dem logistischem Modell war in nahezu allen Fällen höher als mit dem nichtlinearen Alternativ-Modell (Ausnahme: *S. aureus* in Mischkultur). Aufgrund dieses Ergebnisses diente in allen nachfolgend entwickelten Modellen das logistische Modell als Grundlage, um limitiertes Wachstum abzubilden.

### **Mischkultur ohne Ceftazidimbehandlung**

Da das logistische Wachstumsmodell bessere Anpassungen liefert als ein alternatives Modell, wurde im Folgenden nun das logistische Modell an die Daten jeder Spezies eines Mischkulturexperiments ohne Ceftazidimbehandlung angepasst (Abbildung 7b), um die spezifische Wachstumsrate und die maximale Zellkonzentration der einzelnen Spezies als Referenzwerte für den Vergleich mit anderen Versuchen (siehe nachfolgende Kapitel) zu bestimmen. Bei der Ermittlung der Parameterwerte und ihrer Verteilung wurden die Varianzen der Messdaten unter Verwendung der *Bootstrap*-Methode berücksichtigt. Die Kenngrößen der jeweiligen Parameterverteilung sind in Tabelle 14 wiedergegeben. Die Simulation des Konzentrationsverlaufs aller drei Keime unter Verwendung der Parameterwerte der minimalen FQS-Schätzung ( $\hat{\theta}$ ) ist zusammen mit den entsprechenden Konfidenzintervallen (aus der *Bootstrap*-Methode) in Abbildung 20 dargestellt.

Der Rückgang der *S. aureus*-Konzentration zwischen 9 und 24 h (Abbildung 7b) kann durch das logistische Wachstumsmodell nicht wiedergegeben werden. Daher wurden die letzten beiden Datenpunkte bei der Modellanpassung nicht berücksichtigt.



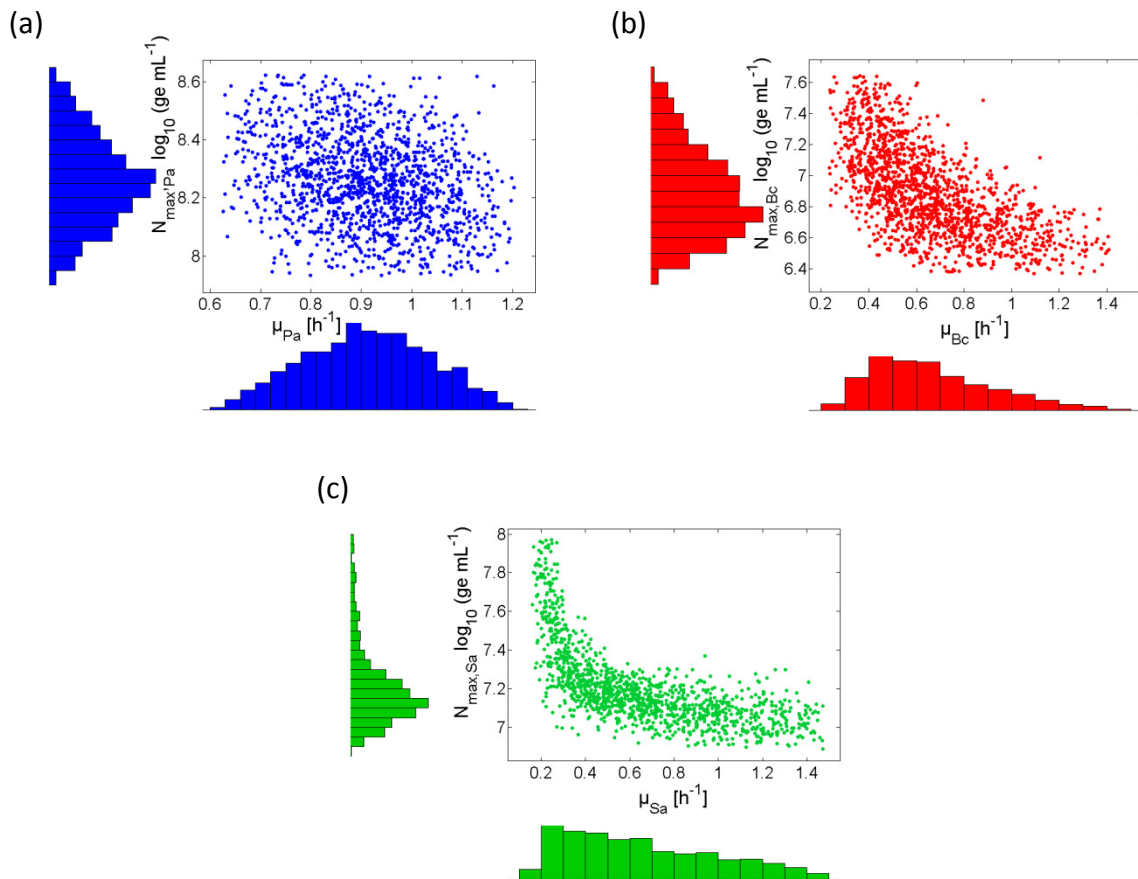
**Abbildung 20:** Anpassung des logistischen Wachstumsmodells an die Mischkultivierung der drei Keime ohne Ceftazidim. Linien: Simulationsverlauf mit den Parametern der minimale FQS-Schätzung  $\hat{\theta}$ . Gestrichelte Linien: 95 %-Konfidenzintervalle der Simulation (Bootstrap-Methode). Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte von *P. aeruginosa* (■), *B. cepacia* (●) und *S. aureus* (▲).

Die Simulationen geben den Verlauf der gemessenen Zellkonzentrationen aller drei Keime in der Mischkultur sehr gut wieder (Abbildung 20). Die Konfidenzintervalle umschließen alle Messpunkte und bilden auch die erhöhte Regressionsunsicherheit in Bereichen mit weniger Datenpunkten bzw. in Bereichen mit Datenpunkten, die eine größere Varianz aufweisen, ab. So verbreitert sich das Konfidenzintervall von *S. aureus* im Bereich ohne Messdaten (9h - Ende) deutlich und repräsentiert somit die Unsicherheit der Regression in diesem Bereich. Dies zeigt sich auch in den Konfidenzintervallen bei *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, die im Bereich geringerer Datendichte (9 h –Ende: 3 Datenpunkte) deutlich geweitet sind im Vergleich zum Intervall 0 – 9 h mit einer höheren Datendichte (7 Datenpunkte).

**Tabelle 14: Bootstrap-Modellparameter der Anpassung des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen des Mischkulturexperiments ohne Antibiotikum (Abbildung 19). Das Modell wurde für jeden Keim separat angepasst. (Da der dritte angepasste Parameter  $N_0$  künstlich auf das 95 %-Intervall der Messwerte beschränkt wurde (siehe „Modellanpassung“), erfolgte keine Auswertung in dieser Tabelle)**

| Stamm                | Parameter       | Einheit                     | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L    | sh   |
|----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|------------|----------------|------------|------------|-------|------|
| <i>P. aeruginosa</i> | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,90           | 0,90       | 0,91           | 1,20       | 0,62       | 63,44 | 0,98 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 8,24           | 8,25       | 8,25           | 8,61       | 7,92       | 8,31  | 1,09 |
| <i>B. cepacia</i>    | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,62           | 0,49       | 0,67           | 0,22       | 1,31       | 164,4 | 1,45 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 6,83           | 6,74       | 6,87           | 6,35       | 7,56       | 17,71 | 1,33 |
| <i>S. aureus</i>     | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,45           | 0,27       | 0,65           | 0,08       | 1,66       | 244,4 | 1,78 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 7,15           | 7,12       | 7,17           | 6,89       | 7,67       | 11,0  | 1,80 |

*P. aeruginosa* zeigt im Schnitt ( $\bar{\theta}$ ) die höchste spezifische Wachstumsrate  $\mu$  und die höchsten maximalen Zellkonzentrationen  $N_{max}$  (Tabelle 14) und konnte durch diese überlegenen Wachstumscharakteristika die Mischkultur klar dominieren (siehe auch Abbildung 20). Bei *B. cepacia* und *S. aureus* waren die mittleren spezifischen Wachstumsraten in etwa identisch ( $\bar{\mu}_{BC} = 0,67$ ;  $\bar{\mu}_{Sa} = 0,65$ ; Tabelle 14). Trotzdem scheint der Verlauf der beider Kurven zu Beginn der Kultivierung in Abbildung 20 unterschiedlich steil zu verlaufen. Dies ist auf die unterschiedliche Startzellkonzentration zurückzuführen, die bei *S. aureus* höher ist und damit näher an der maximalen Zellkonzentration liegt, was sich wiederum inhibierend auf die Wachstumsrate auswirkt (logistisches Wachstumsmodell). Im weiteren Verlauf der Kultivierung glichen sich die Zellkonzentrationen beider Keime soweit an, dass kein statistisch signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden konnte (vgl. überlappende Konfidenzintervalle gegen Ende der Kultivierung in Abbildung 20).



**Abbildung 21: Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $\mu_i$  und  $N_{\max,i}$  für den jeweiligen Stamm resultierend aus der *Bootstrap*-Analyse des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die speziesspezifischen Daten einer Mischkultivierung ohne Ceftazidimbehandlung. Gezeigt sind die jeweiligen 95 %-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau (a). *B. cepacia*: rot (b). *S. aureus*: grün (c).**

Die Parameterverteilung zeigt unterschiedliche Kennwerte für jeden Stamm (Tabelle 14, Abbildung 21). Die Parameter für *P. aeruginosa* wurden mit vergleichsweise geringen relativen Konfidenzintervallbreiten (%L, Tabelle 14) bestimmt, während diese bei *B. cepacia* und *S. aureus* deutlich breiter war (zum Vergleich: für eine normalverteilte Zufallsvariable mit einem Fehlerintervall von  $\pm 5\%$  gilt: %L = 10 %). Zudem waren die Parameterverteilungen von *P. aeruginosa* nahezu symmetrisch ( $sh \approx 1$ , Tabelle 14 und Abbildung 21), während der Grad der Asymmetrie bei *B. cepacia* größer und bei *S. aureus* am höchsten war ( $sh \approx 1,80$ ). Bei der Auftragung beider Parameterwerte gegeneinander (Parameterkorrelation) zeigte sich dadurch bei *P. aeruginosa* eine gleichmäßige Verteilungsfläche (Abbildung 21a), während sich bei *B. cepacia* eine gekrümmte Verteilungsfläche und bei *S. aureus* eine noch stärker gekrümmte Fläche ergaben (Abbildung

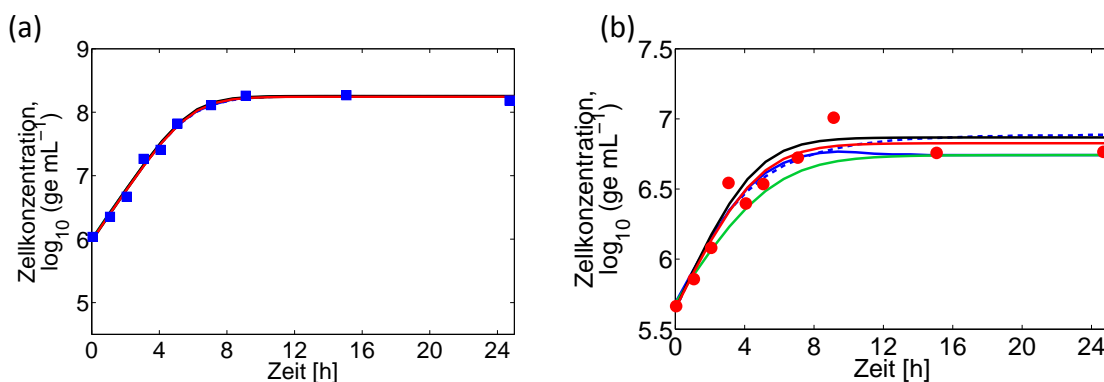
21b und c). Die Korrelationskoeffizienten betragen für die abgebildeten Parameterpaare (Abbildung 21)  $\rho_{Pa} = -0,30$ ;  $\rho_{Bc} = -0,63$  und  $\rho_{Sa} = -0,68$ . Somit besteht ein stärkerer linearer Zusammenhang zwischen den jeweiligen Parametern bei *B. cepacia* und *S. aureus* als bei *P. aeruginosa*. Umgekehrt verhält es sich bei der linearen Korrelation von  $N_0$  und  $\mu$  (Daten nicht gezeigt). Die zwei Parameter korrelieren sehr stark bei *P. aeruginosa* ( $\rho_{Pa} = -0,87$ ), weniger stark bei *B. cepacia* ( $\rho_{Pa} = -0,70$ ) und am wenigsten bei *S. aureus* ( $\rho_{Pa} = -0,35$ ). Nun lässt sich vermuten, dass sich die Varianz der Wachstumsrate  $\mu$  hauptsächlich aus der Varianz des jeweiligen  $N_0$  erklärt, da diese ausschließlich vom Messfehler beeinflusst ist und durch die starke Korrelation, zumindest bei *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, auf die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  übertragen wurde. Um diesen Sachverhalt zu veranschaulichen, wurde eine weitere *Bootstrap*-Analyse durchgeführt, wobei diesmal  $N_0$  nicht zur Anpassung freigegeben wurde (Fixwert = Mittelwert der sechsfach bestimmten Messwerte) und somit keiner Variation ausgesetzt war.

**Tabelle 15: *Bootstrap*-Modellparameter der Anpassung des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen des Mischkulturexperiments ohne Antibiotikum (Abbildung 19). Das Modell wurde für jeden Keim separat angepasst. Im Gegensatz zu den in Tabelle 14 dargestellten Werten wurde  $N_0$  nicht zur Anpassung freigegeben (Fixwert = Mittelwert der sechsfach bestimmten Messwerte.)**

| Stamm                | Parameter       | Einheit                     | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L    | sh   |
|----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|------------|----------------|------------|------------|-------|------|
| <i>P. aeruginosa</i> | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,87           | 0,88       | 0,87           | 0,74       | 0,99       | 29,24 | 0,91 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 8,25           | 8,25       | 8,26           | 7,94       | 8,61       | 8,21  | 1,08 |
| <i>B. cepacia</i>    | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,60           | 0,56       | 0,64           | 0,34       | 1,02       | 106,8 | 1,32 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 6,83           | 6,67       | 6,87           | 6,34       | 7,56       | 17,76 | 1,31 |
| <i>S. aureus</i>     | $\mu$           | [h <sup>-1</sup> ]          | 0,48           | 0,28       | 0,60           | 0,10       | 1,51       | 232,2 | 1,43 |
|                      | $\log(N_{max})$ | log([ge mL <sup>-1</sup> ]) | 7,13           | 7,13       | 7,16           | 6,85       | 7,60       | 10,43 | 1,44 |

Die relativen Intervallbreiten %L der spezifischen Wachstumsraten  $\mu$  von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* verringerten sich deutlich (Tabelle 15). Mit fixem  $N_{0, Pa}$  war die relative Intervallbreite von  $\mu_{Pa}$  nur noch etwa halb so groß (%L=29,24 %, Tabelle 15) wie bei der Anpassung mit variablem  $N_{0, Pa}$  (%L = 63,44 %, Tabelle 14). Bei der spezifischen Wachstumsrate von *B. cepacia* betrug die relative Intervallbreite nur noch etwa zwei Drittel des Wertes, welcher mit variablem  $N_{0, Bc}$  angepasst wurde (%L = 164,40 % versus %L = 106,84 %). Die relative Intervallbreite von  $\mu_{Sa}$  veränderte sich dagegen kaum.

Um die Bedeutung bzw. die Unterschiede der Kennzahlen ( $\theta_D, \hat{\theta}, \bar{\theta}$ ) der Parameterverteilung deutlich zu machen, wurden für *P. aeruginosa* und *B. cepacia* Simulationen mit verschiedenen Kennzahlen durchgeführt (Abbildung 22). Das logistische Wachstum (Gleichung 2) wurde mit den jeweiligen Modalwerten  $\theta_D$  und den Mittelwerten der Parameterverteilung  $\bar{\theta}$ , sowie mit den Parametern der minimalen FQS-Schätzung  $\hat{\theta}$  simuliert (Tabelle 14). Weiterhin wurden die  $B = 2000$  *Bootstrap*-Parametersätze einzeln simuliert und aus den 2000 Simulationen zu jedem Zeitpunkt  $t$  die Verteilung der Zustandsgröße  $N(t, \hat{\theta}_B)$  anhand des Mittelwertes und Modalwertes ausgewertet (Abbildung 22). Für eine Bewertung der Simulationen in Abbildung 22 wurden jeweils die FQS berechnet.



**Abbildung 22: Simulationen des logistischen Wachstums von *P. aeruginosa* (a) und *B. cepacia* (b) mit verschiedenen Parametersätzen: Simulation mit den Parameterwerten der minimalen FQS-Schätzung  $\hat{\theta}$  (rote Linie), Modalwerte der Parameterverteilungen  $\theta_D$  (grüne Linie), Mittelwerte der Parameterverteilungen  $\bar{\theta}$  (schwarze Linie), ausgewertete Verteilung der Zustandsvariablen nach Simulation mit den 2000 *Bootstrap* Parametersets: Mittelwert der Verteilung (blau gestrichelte Linie), Modalwerte der Verteilung (blaue Linie). Messwerte sind als Quadrate bzw. Punkte dargestellt.**

Die Simulationen mit den unterschiedlichen Parametern für *P. aeruginosa* liefern nahezu identische Kurvenverläufe (Abbildung 22a). Ebenso weichen die FQS-Werte mit maximal 10 % kaum voneinander ab (Tabelle 16). Dagegen zeigen sich bei *B. cepacia* verschiedene Kurvenverläufe, deren FQS bis zu 180 % voneinander abweichen. Der Kurvenverlauf der blauen Linie zeigt zudem ein lokales Maximum, das sich nicht mit logistischem Wachstumsmodell beschreiben lässt. Die Kurve selbst ist nicht parametrisiert, da sie sich aus der Auswertung der Zustandsgrößenverteilungen nach Simulationen der 2000 *Bootstrap*-Parameter ergibt. Prinzipiell ist somit eine höhere Flexibilität des Kurvenverlaufs möglich, trotzdem ergab sich daraus keine bessere Anpassung im Sinne einer geringeren FQS (Tabelle

16). Stattdessen zeigte die schwarze Kurve mit den Mittelwerten der Zustandsgrößenverteilung die geringste FQS, die sogar geringfügig kleiner war als bei der Simulation mit den optimierten Parametern  $\hat{\theta}$ .

**Tabelle 16: Fehlerquadratsumme FQS und die relative Fehlerquadratsumme für jede der Simulationen aus Abbildung 22.**

|   | <i>P. aeruginosa</i> |  | <i>B. cepacia</i> |  |
|---|----------------------|--|-------------------|--|
|   | FQS                  | $\frac{\text{FQS}}{\text{FQS}_{\hat{\theta}}}$ | FQS               | $\frac{\text{FQS}}{\text{FQS}_{\hat{\theta}}}$ |
| Simulation mit $\hat{\theta}$   | 0,043                | 1,00   | 0,064             | 1,00   |
| Simulation mit $\bar{\theta}$   | 0,043                | 1,01   | 0,135             | 2,10   |
| Simulation mit $\theta_D$   | 0,044                | 1,01   | 1,189             | 18,45  |
| Simulation mit $\hat{\theta}_B$ ,<br>Auswertung der Modalwerte der Verteilung von $N(t)$  | 0,047                | 1,10   | 0,401             | 6,22   |
| Simulation mit $\hat{\theta}_B$ ,<br>Auswertung der Mittelwerte der Verteilung von $N(t)$ | 0,044                | 1,03   | 0,063             | 0,98   |

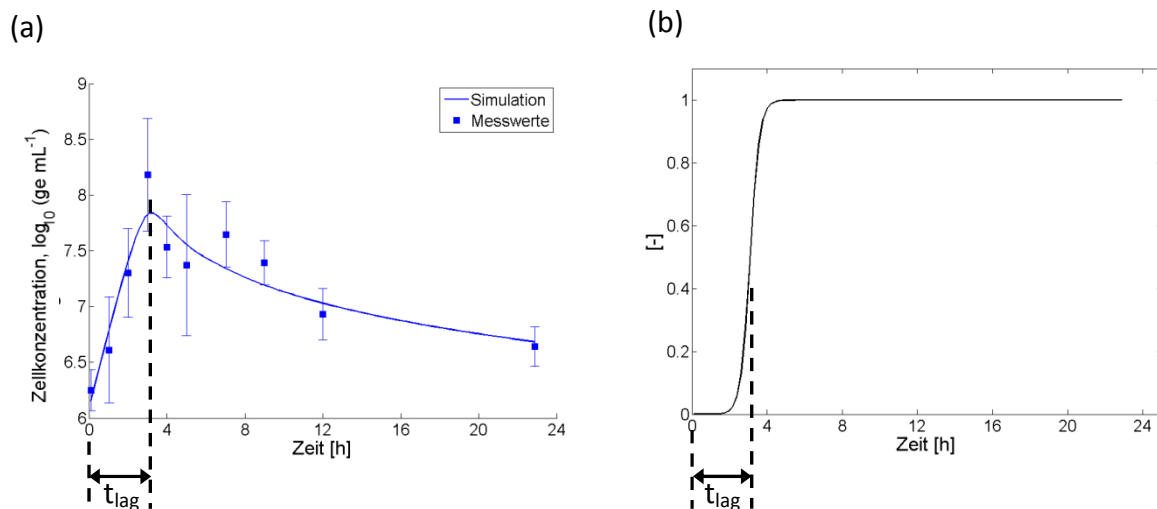
### Mischkultur mit Cefazidimbehandlung

Für ceftazidimbehandelte Mischkulturen war eine Modellerweiterung notwendig, um den Lyseeffekt des Antibiotikums zu berücksichtigen. Als Basis diente Gleichung 4 von Czock und Keller (2007), die neben dem limitierten Wachstum (logistisches Wachstum) noch eine Rate 1. Ordnung für das Abtöten bzw. für die Lyse der Bakterien beinhaltet. Weiterhin wurde der Gleichung ein Term hinzugefügt, um den Zeitversatz zwischen Antibiotikumgabe und Antibiotikumwirkung (Abbildung 9b; Abbildung 12c; Abbildung 14a, b, c; Abbildung 19a, b, c) abzubilden (Gleichung 24). Der Term entspricht einer logistischen Funktion  $\left(f(x) = \frac{e^x}{1+e^x}\right)$ , die in der Grundform eine sogenannte S-Kurve beschreibt mit Werten im Bereich von 0 bis 1. Dieser Term wurde in Erweiterung mit dem Lageparameters  $t_{lag}$  multiplikativ dazu benutzt die Lyserate  $k_L$  zu einem bestimmten Zeitpunkt „anzuschalten“ (Gleichung 24, Abbildung 23b). Weiterhin wurde die Breite des Übergangsbereichs der S-Kurve durch einen Faktor im Exponenten der e-Funktionen (entspricht der Steilheit im Wendepunkt) definiert. Dieser Faktor wurde auf einen Wert von 4 festgelegt, was einem Übergangszeitraum von Wachstum zu Lyse (= Breite der S-Kurve) von ca. 2 h entspricht (Gleichung 24). Dies ist in etwa das Zeitintervall das durch 3 Messpunkte beschrieben wird. Drei Messwerte sind die niedrigste Auflösung, um den Übergang von Wachstum zu Lyse in Form diskreter Messwerte



darzustellen (1. Ausgangsniveau, 2. *Peak*-Wert, 3. Rückgang). Ein Beispiel ist in Abbildung 23 gegeben. Das Modell aus Gleichung 24 wurde für *P. aeruginosa* (Mischkultur + 30 µg mL<sup>-1</sup> Ceftazidim) angepasst (Abbildung 23a). Analog zur Zellkonzentration ist in Abbildung 23b der Verlauf der S- Kurve wiedergegeben. Der Zeitversatz, der infolge der Parameteranpassung mit 2,96 h bestimmt wurde, ist in beiden Kurven eingezeichnet.

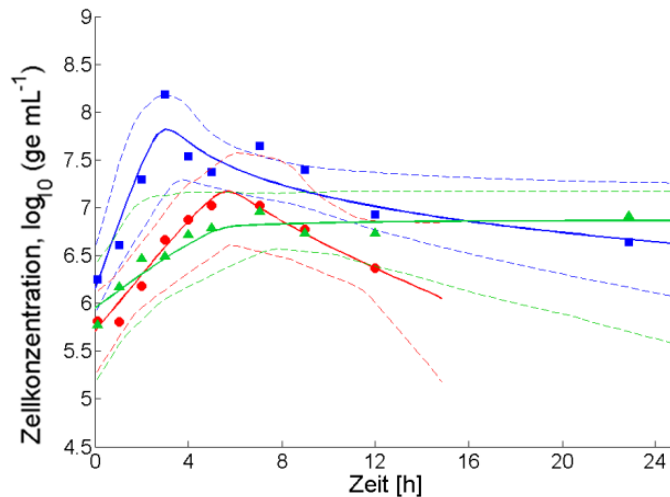
$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot N(t) \cdot \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} - k_L \cdot \frac{e^{4 \cdot (t-t_{lag})}}{1 + e^{4 \cdot (t-t_{lag})}} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 24}$$



**Abbildung 23: (a) Modellanpassung von Gleichung 24 an den Konzentrationsverlauf von *P. aeruginosa* in Dreier-Mischkultur mit 30 µg mL<sup>-1</sup> Ceftazidim (Quadrate: Mittelwert ± Std.-abw. aus 6 unabhängig**

**voneinander analysierten Proben). (b) Verlauf des Terms:  $f(t) = \frac{e^{4(t-t_{lag})}}{1+e^{4(t-t_{lag})}}$  in Gleichung 24.**

Das um den Zeitversatz erweiterte Modell (Gleichung 24) wurde auf alle drei Keime der antibiotikabehandelten Mischkultur (Abbildung 9b) angepasst.  $N_{max}$  wurde nicht angepasst, stattdessen wurden fixe  $N_{max}$ -Werte aus den minimalen FQS-Schätzungen des Mischkulturversuchs ohne Ceftazidim verwendet (siehe Tabelle 14). Bei *B. cepacia* zeichnete sich mit dem letzten Datenpunkt (24 h) eine weitere Wachstumsphase ab (Abbildung 9b), die mit dem Lysemodell nicht abgebildet werden konnte, weshalb dieser Punkt bei der Modellanpassung nicht berücksichtigt wurde.



**Abbildung 24:** Anpassung des Modells aus Gleichung 24 an die Mischkultivierung der drei Keime mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim. Linie: Simulationsverlauf mit Parametern der minimalen FQS-Schätzung  $\hat{\theta}$ . Gestrichelte Linien: 95 %-Konfidenzintervalle der Anpassung. Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte von *P. aeruginosa* (■), *B. cepacia* (●) und *S. aureus* (▲).

Die Anpassung der drei Parameter  $\mu$ ,  $k_L$  und  $t_{lag}$  (minimale FQS-Schätzung) für jeden der drei Keime der Co-Kultivierung resultierte in den Simulationskurven in Abbildung 24 und den Parameterwerten in Tabelle 17. Der Verlauf der Messdaten wird durch die Modellanpassung gut wieder gegeben und alle bis auf einen Datenpunkt liegen innerhalb der Konfidenzintervalle. Das breiter werdende Konfidenzintervall von *B. cepacia* ab 12 h, lässt sich auf den fehlenden Datenpunkt bei 24 h zurückführen und kann als zunehmende Regressionsunsicherheit in diesem Bereich interpretiert werden.

Die mittleren spezifischen Wachstumsraten  $\bar{\mu}$  aller drei Keime sind im Vergleich zur Mischkultivierung ohne Antibiotikum höher, bei *P. aeruginosa* sogar deutlich höher (Zunahme um 178 %, siehe Tabelle 14 und Tabelle 17). Bei den Verteilungscharakteristika gab es bei  $\mu_{Pa}$  ansonsten keine auffallenden Veränderungen. Bei  $\mu_{Bc}$  zeigte sich jedoch eine geringere relative Breite und eine höhere Symmetrie als in der unbehandelten Mischkultur.  $\bar{t}_{lag}$  ist bei *P. aeruginosa* kleiner als bei *B. cepacia*, was bedeutet, dass bei *P. aeruginosa* die Antibiotikumswirkung früher einsetzte.  $\bar{k}_{L,Pa}$  und  $\bar{\mu}_{Pa}$  von *P. aeruginosa* unterscheiden sich nicht, dagegen ist bei *B. cepacia*  $\bar{k}_{L,Bc}$  merklich größer als  $\bar{\mu}_{Bc}$  (Tabelle 17) und bei *S. aureus* ist es genau umgekehrt. Die relative Breite der Verteilung von  $k_{L,sa}$  und  $\mu_{sa}$  (*S. aureus*) ist mit über 230 % sehr groß, aber im gleichen Größenbereich wie die Wachstumsrate aus dem

unbehandelten Experiment (%L = 240 %). Das gleiche gilt für den Vergleich der Verteilungssymmetrie *sh*.

**Tabelle 17: Mischkultivierung mit Ceftazidim: Parameter-Schätzwerte ( $\pm 95$  %-Konfidenzintervalle) einer Anpassung (minimale FQS-Schätzung) des Lysemodells (aus Gleichung 24) an die Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte (Abbildung 7b). (Da der vierte angepasste Parameter  $N_o$  künstlich auf das 95 %-Intervall der Messwerte beschränkt wurde (siehe „Modellanpassung“), erfolgte keine Auswertung in dieser Tabelle)**

| Stamm                             | Parameter | Einheit            | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L     | sh   |
|-----------------------------------|-----------|--------------------|----------------|------------|----------------|------------|------------|--------|------|
| <i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup> | $\mu$     | [h <sup>-1</sup> ] | 1,59           | 1,59       | 1,62           | 0,90       | 2,37       | 90,45  | 1,03 |
|                                   | $k_L$     | [h <sup>-1</sup> ] | 1,60           | 1,60       | 1,62           | 0,95       | 2,31       | 83,70  | 1,02 |
|                                   | $t_{lag}$ | [h]                | 2,96           | 3,04       | 2,99           | 2,23       | 3,68       | 48,36  | 0,91 |
| <i>B. cepacia</i> <sup>a</sup>    | $\mu$     | [h <sup>-1</sup> ] | 0,70           | 0,73       | 0,73           | 0,36       | 1,16       | 109,48 | 1,13 |
|                                   | $k_L$     | [h <sup>-1</sup> ] | 0,92           | 0,96       | 0,98           | 0,58       | 1,38       | 81,45  | 1,02 |
|                                   | $t_{lag}$ | [h]                | 5,62           | 6,00       | 5,61           | 3,34       | 7,99       | 82,88  | 1,05 |
| <i>S. aureus</i> <sup>a</sup>     | $\mu$     | [h <sup>-1</sup> ] | 0,45           | 0,56       | 0,72           | 0,14       | 1,81       | 232,31 | 1,89 |
|                                   | $k_L$     | [h <sup>-1</sup> ] | 0,23           | 0,38       | 0,46           | 0,05       | 1,11       | 232,01 | 1,63 |
|                                   | $t_{lag}$ | [h]                | 5,48           | 6,20       | 4,96           | 0,34       | 10,14      | 197,77 | 1,12 |

<sup>a</sup>  $N_{max}$ -Werte wurden nicht angepasst. Als Fixwerte wurden die Parameterwerte ( $\hat{\theta}$ ) aus dem Mischkultur-Experiment ohne Ceftazidimbehandlung eingesetzt: Tabelle 14.

Die Parameter  $\mu$  und  $k_L$  von *P. aeruginosa* streuten in einem engen Bereich um die Winkelhalbierende (Abbildung 25a). Der entsprechende Korrelationskoeffizient betrug  $\rho = 0,99$ . Im Vergleich dazu lag die Streuung der Parameterwerte  $\mu$  und  $k_L$  von *B. cepacia* ( $\rho = 0,66$ ) ausschließlich über der Winkelhalbierenden und bei *S. aureus* ( $\rho = 0,77$ ) unterhalb (Abbildung 25b und c). Die entsprechenden Diagramme von  $\mu$  mit  $t_{lag}$  ( $\rho = -0,10$ ) und  $k_L$  und  $t_{lag}$  ( $\rho = -0,08$ ) zeigten bei *P. aeruginosa* eine gleichmäßige Streuung (siehe Anhang), was auf eine nicht vorhandene Korrelation schließen lässt. Dagegen waren  $k_L$  und  $t_{lag}$  bei *B. cepacia* schwach negative korreliert (Abbildung 25e,  $\rho = -0,54$ ). Das Streuungsdiagramm der Parameter  $\mu$  und  $t_{lag}$  von *S. aureus* zeigte neben der Hauptpopulation eine zweite Population bei  $t_{lag, Sa} \approx 2$  h (Abbildung 25d). Der entsprechende lineare Korrelationsparameter wurde zu  $\rho = -0,62$  berechnet. Alle weiteren hier nicht aufgeführten Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet.

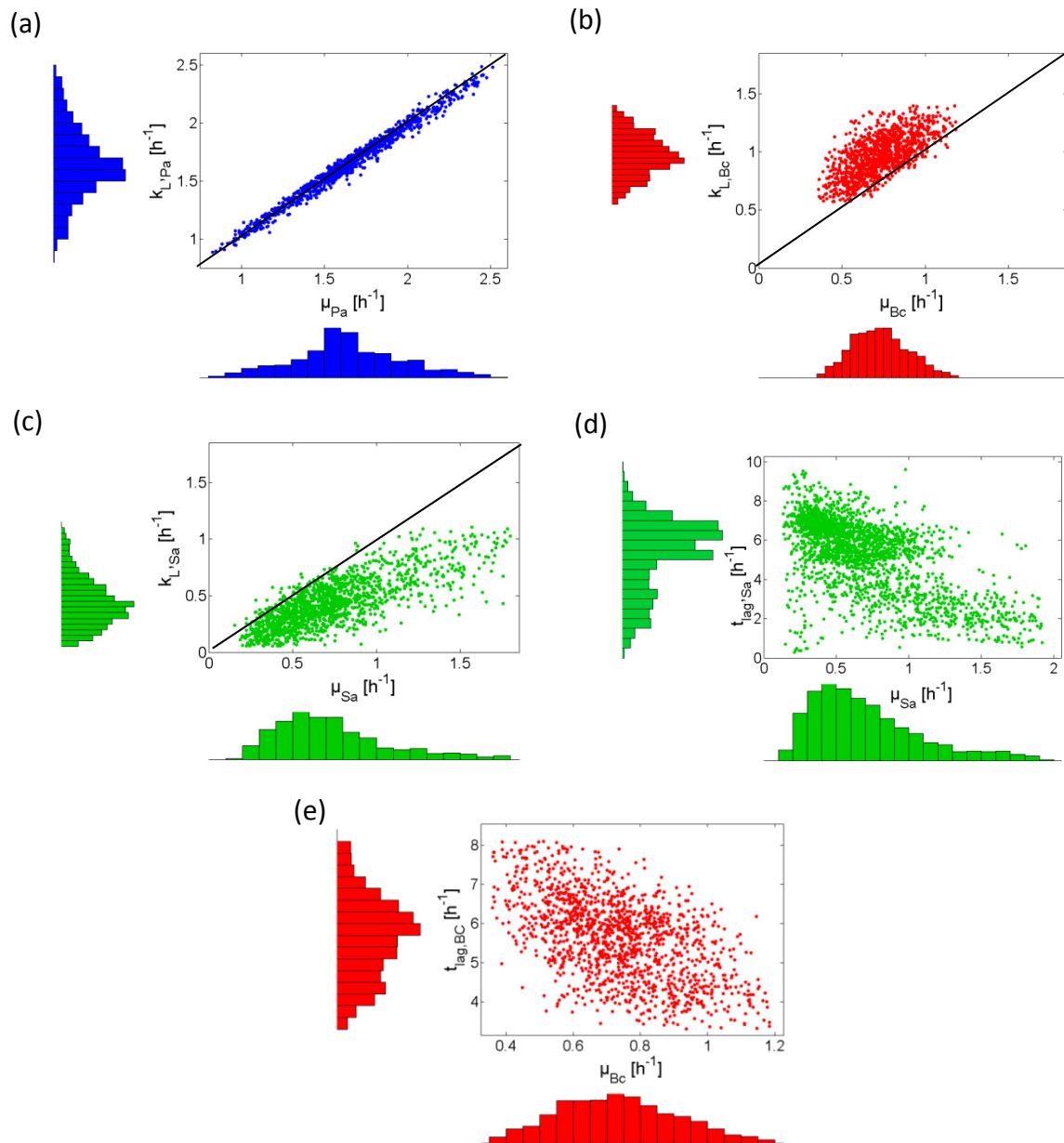


Abbildung 25: Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $\mu$ ,  $k_L$  und  $t_{lag}$  in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der Bootstrap-Analyse des Lysemodells (Gleichung 24) mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim). Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau. *B. cepacia*: rot. *S. aureus*: grün. Weitere Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet.

### Modellierung einer zweiten Wachstumsphase

Nachdem mit Gleichung 2 limitiertes Wachstum und mit Gleichung 24 Wachstum + Lyse aufgrund von Antibiotikumszugabe modelliert werden konnte, wird im Folgenden mit Gleichung 25 eine Modellerweiterung eingeführt, die es ermöglichte eine 2.

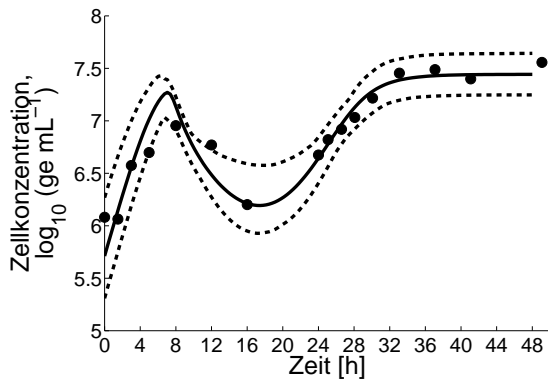
Wachstumsphase abzubilden. Die Gleichung enthält die Annahme, dass durch Rückgang der Ceftazidimkonzentration im Laufe eines Experiments die wirksame Konzentration unterschritten wird, so dass die Bakterien weiter wachsen können. Mathematisch wird dies durch die Einführung des Terms  $\frac{C(t)^H}{EC_{50}^H + C(t)^H}$  erreicht (siehe „Pharmacodynamische Modelle“). Im hier betrachteten Experiment (48 h Kultivierung der Mischkultur, Abbildung 19f) sank die Ceftazidimkonzentration nicht nur wegen des chemischen Zerfalls in wässriger Lösung, sondern auch aufgrund von Lactamaseaktivität ab. Für die mechanistische Modellierung des letzteren lagen jedoch keine Daten vor, die eine Parameterschätzung für den Effekt der Lactamaseproduktion und deren Aktivität bei der  $\beta$ -Lactamringhydrolyse von Ceftazidim zulassen würden. Aus diesem Grund wurde für die zeitvariable Ceftazidimkonzentration ein empirischer Zusammenhang verwendet, der aus einer linearen Regression (Excel) der gemessenen Ceftazidimkonzentrationen abgeleitet wurde (siehe Gleichung 25 und Abbildung 26).

Zur Parameterschätzung wurde das Modell aus Gleichung 25 an den Zellkonzentrationsverlauf von *B. cepacia* im Kontrollexperiment des 48 h *time-kill*-Experiments angepasst (siehe Abbildung 19b und Abbildung 26a). Der Grund für die Auswahl dieses Experiments war die 2. Wachstumsphase, die durch mehrere Datenpunkte beschrieben wurde. Dadurch lag im Gegensatz zu anderen Experimenten, ein sensitiver Bereich für die Parameterschätzung vor. Als Randbedingung der Parameterschätzung wurde die spezifische Wachstumsrate mit einem fixen Wert von  $\mu = 0,73 \text{ h}^{-1}$  verwendet. Dieser Wert wurde aus dem Mischkulturversuch mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim ermittelt (Tabelle 17, Abbildung 24), der innerhalb der ersten 24 h eine Reproduktion des hier modellierten Experiments darstellt.

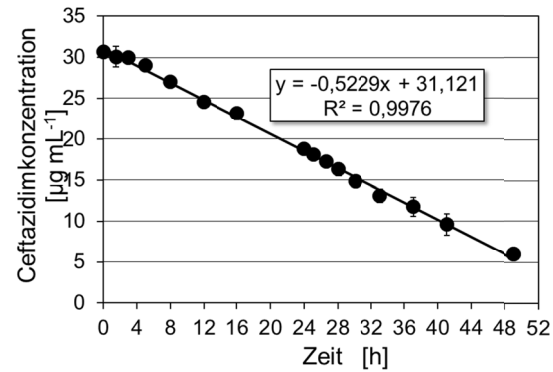
$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot N(t) \cdot \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} - k_L \cdot \frac{e^{4 \cdot (t-t_{lag})}}{1 + e^{4 \cdot (t-t_{lag})}} \cdot \frac{C(t)^H}{EC_{50}^H + C(t)^H} \cdot N(t) \quad \text{Gleichung 25}$$

$$C(t) = -0,5229 \cdot t + 31,121 \quad \text{Gleichung 26}$$

(a)



(b)



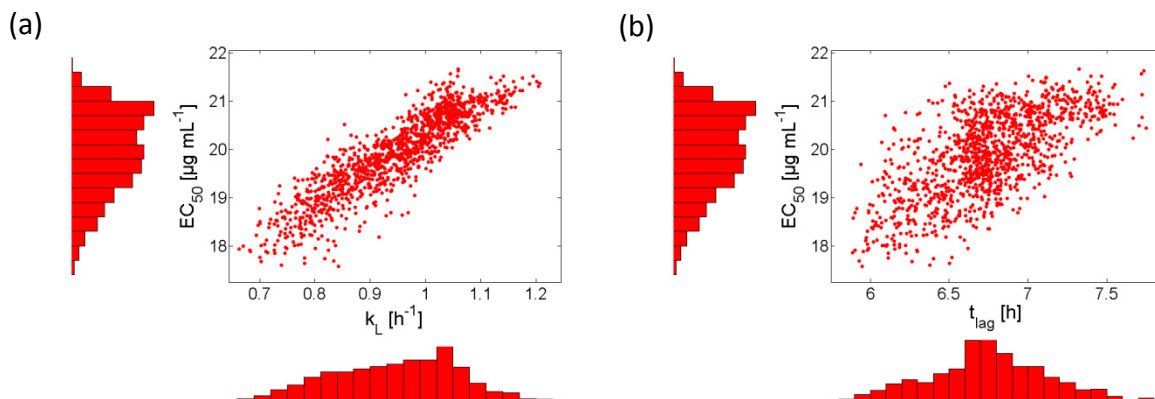
**Abbildung 26:** (a) Anpassung des Modells aus Gleichung 25 an die Zellkonzentrationsdaten von *B. cepacia* im Kontrollexperiment der 48 h-Kultivierung der Dreier-Mischkultur mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (Zugabe bei  $t = 0$  h, siehe auch Abbildung 19b). Linie: Simulationsverlauf mit Parameter der minimale FQS-Schätzung  $\hat{\theta}$ . Gestrichelte Linien: Konfidenzintervall der Simulation. Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte von *B. cepacia* (●). (b) Lineare Regression (Excel) der Messwerte des Ceftazidims im Kontrollexperiment (siehe auch Abbildung 19) (—). Dreifach-bestimmte Konzentration von Ceftazidim (drei parallele Kolben) (●).

Das Modell konnte an die gegebenen Daten auch im Bereich der 2. Wachstumsphase angepasst werden (Abbildung 26a). Im Vergleich mit dem analogen Reproduktionsexperiment (Abbildung 24, Tabelle 17) zeigt sich nur ein geringfügiger Unterschied der beiden mittleren Lyseraten  $k_L$  (- 6 %). Dagegen fiel die Zunahme des mittleren Zeitversatzes  $t_{lag}$  im 48 h-Experiment mit 32 % jedoch deutlich stärker aus. Beide Parameter zeigten zudem eine deutliche Schiefe (vgl.  $sh = 0,87$  bzw.  $1,13$ ; Tabelle 18), während im Reproduktionsexperiment die Parameterverteilungen nahezu symmetrisch waren (Tabelle 17). Die Parameterverteilungen von  $EC_{50}$ ,  $H$  und  $N_{max}$  zeigten ebenfalls eine deutliche Schiefe mit  $sh$ -Werten, die mehr als 5 % vom Symmetriewert 1,0 abweichen. Mit einer relativen Verteilungsbreite von  $\%L = 5$  % konnte  $N_{max}$  im Vergleich mit allen anderen Parametern am genauesten bestimmt werden. Dagegen war der Parameter  $H$  mit einer relativen Verteilungsbreite von  $\%L = 132$  % relativ unscharf bestimmt worden.

**Tabelle 18:** *Bootstrap*-Modellparameter der Anpassung von Modell in Gleichung 25 an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen von *B. cepacia* im Kontrollkolben des 48 h *time-kill*-Experiments (30 µg mL<sup>-1</sup> Ceftazidim bei  $t = 0$  h, Abbildung 19). Die spezifische Wachstumsrate wurde mit einem Wert von  $\mu = 0,70$  h<sup>-1</sup> (Tabelle 17) nicht zur Anpassung freigegeben. (Da der sechste angepasste Parameter  $N_0$  künstlich auf das 95 %-Intervall der Messwerte beschränkt wurde (siehe „Modellanpassung“), erfolgte keine Auswertung in dieser Tabelle)

| Stamm             | Parameter | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L     | sh   |
|-------------------|-----------|----------------|------------|----------------|------------|------------|--------|------|
| <i>B. cepacia</i> | $k_L$     | 1,07           | 1,02       | 0,92           | 0,60       | 1,21       | 65,70  | 0,87 |
|                   | $t_{lag}$ | 7,36           | 6,70       | 6,76           | 5,84       | 7,79       | 28,84  | 1,13 |
|                   | $EC_{50}$ | 20,86          | 20,57      | 19,88          | 17,47      | 21,70      | 21,32  | 0,76 |
|                   | $H$       | 8,15           | 8,24       | 8,49           | 3,92       | 15,10      | 131,57 | 1,44 |
|                   | $N_{max}$ | 7,44           | 7,48       | 7,45           | 7,24       | 7,64       | 5,37   | 0,94 |

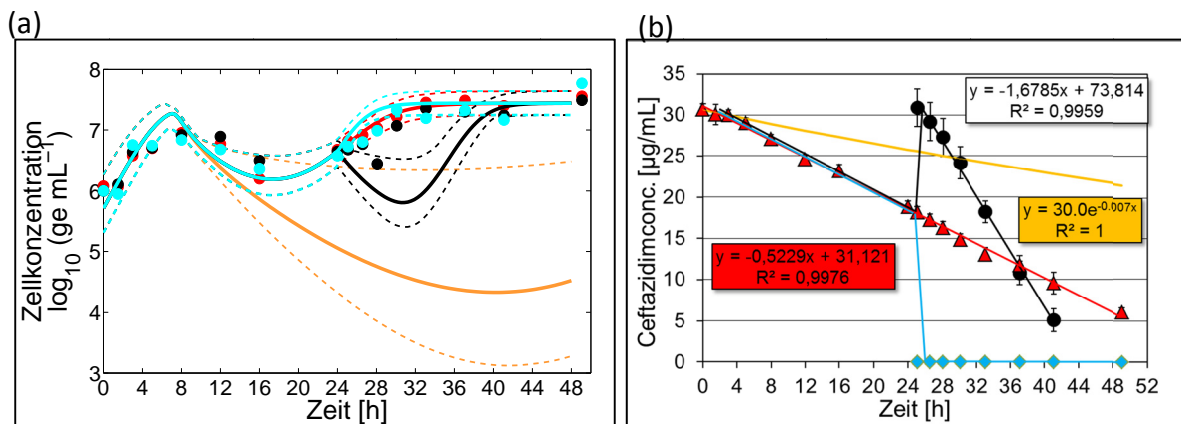
In Abbildung 27 sind Korrelationsdiagramme gezeigt, die eine positive lineare Korrelation der Parameter  $k_L$  und  $EC_{50}$  bzw.  $t_{lag}$  und  $EC_{50}$  vermuten lassen. Dies wird durch die relative hohen Werte des linearen Korrelationskoeffizienten mit  $\rho = 0,90$  bzw.  $\rho = 0,65$  bestätigt. Alle weiteren Parameterkorrelationen sind im Anhang abgebildet.



**Abbildung 27:** Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $k_L$  und  $EC_{50}$  (a) bzw.  $t_{lag}$  und  $EC_{50}$  (b) von *B. cepacia*. Die Daten resultieren aus der *Bootstrap*-Analyse des Modells aus Gleichung 25 mit den Messwerten des Kontrollkolbens des 48 h *time-kill*-Experiments. Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen.

In Abbildung 28a ist eine Simulationsstudie dargestellt, in der mit den *Bootstrap*-Parametersätzen aus der Anpassung an den Kontrollkolben (Tabelle 18) drei weitere Ceftazidim-Konzentrationsprofile simuliert wurden. Die Simulationsergebnisse wurden anhand von experimentellen Daten von *B. cepacia* überprüft (Abbildung 19b). In der orangen

Kurve wurde nur chemischer Zerfall des Ceftazidims angenommen (ohne Lactamaseaktivität), in der schwarzen Kurve wurde ein weiterer  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidimpuls nach 48 h simuliert und in der cyanen Kurve wurden eine Entfernung des Ceftazidim bei 24 h simuliert. In Abbildung 28b sind die entsprechenden Ceftazidim-Konzentrationsprofile aus dem Experiment dargestellt, die für die Simulation verwendet wurden (siehe auch Abbildung 19f).



**Abbildung 28:** (a) Simulationsstudie mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationsprofilen. Grundlage sind die Bootstrap-Parametersätze aus der Anpassung des Modells (Gleichung 25) an die Daten von *B. cepacia* des Kontrollkolbens (siehe Abbildung 26, Tabelle 18). Linien: Simulationsverlauf bzw. Regressionsgeraden. Gestrichelte Linien: Konfidenzintervall der Simulation. Rot: Simulationskurve der Modellanpassung des Kontrollkolbens (analog zu Abbildung 26), (●) Messwerte des Kontrollkolbens mit einer Ceftazidimzugabe ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) bei  $t = 0 \text{ h}$ , schwarz: gleiche Bootstrap-Parametersätze wie im Kontrollkolben, aber Simulation eines zweiten Ceftazidimpuls bei 24 h, (●) Messwerte bei Zugabe eines zweiten Ceftazidimpuls bei 24 h, cyan: gleiche Bootstrap-Parametersätze wie im Kontrollkolben, aber Simulation mit Ceftazidimkonzentrationen von  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ab 24 h, (●) Messwerte bei Entfernung von Ceftazidim bei 24 h, orange: gleiche Bootstrap-Parametersätze wie im Kontrollkolben, aber nur Ceftazidimzerfall wird berücksichtigt. (b) Ceftazidim-Konzentrationsprofile für die drei verschiedenen Simulationen: rot: Kontrollkolben, schwarz: Ceftazidimzerfall nach zweitem Ceftazidimpuls, cyan: Entfernung von Ceftazidim bei 24 h, orange: theoretischer Ceftazidimzerfall

Durch die höhere Ceftazidimkonzentration im Fall des langsamen chemischen Ceftazidimzerfalls folgt (vgl. Abbildung 28b), dass die Lyserate für lange Zeit höher ist und damit die Zellkonzentration über einen längeren Zeitraum abnimmt (orange Kurve, Abbildung 28). Die Simulation des zweiten Antibiotikumspulses (schwarze Linie) konnte die gemessenen Messwerte nicht abbilden. Anstatt eines weiteren Anstiegs wie im Experiment gezeigt (schwarze Punkte), knickt die Simulationskurve nach unten ab bevor sie bei 44 h



wieder das gemessene Niveau erreicht. Die Ceftazidimentfernung bei 24 h hatte in der Simulation zur Folge (cyane Kurve), dass die Kurve stärker anstieg als der Trend der tatsächlichen Messwerte (cyane Punkte) es erwarten ließ. Zusammengefasst lassen sich mit dem Modell der abnehmenden Ceftazidimkonzentration und den Parameterwerten eines Experiments die experimentellen Variationen nicht simulieren. Somit ist zu vermuten, dass die abnehmende Ceftazidimkonzentration nicht die ausschlaggebende Ursache für die zweite Wachstumsphase von *B. cepacia* ist. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen sind im nächsten Abschnitt dargelegt.

### Resistente und empfindliche Subpopulationen

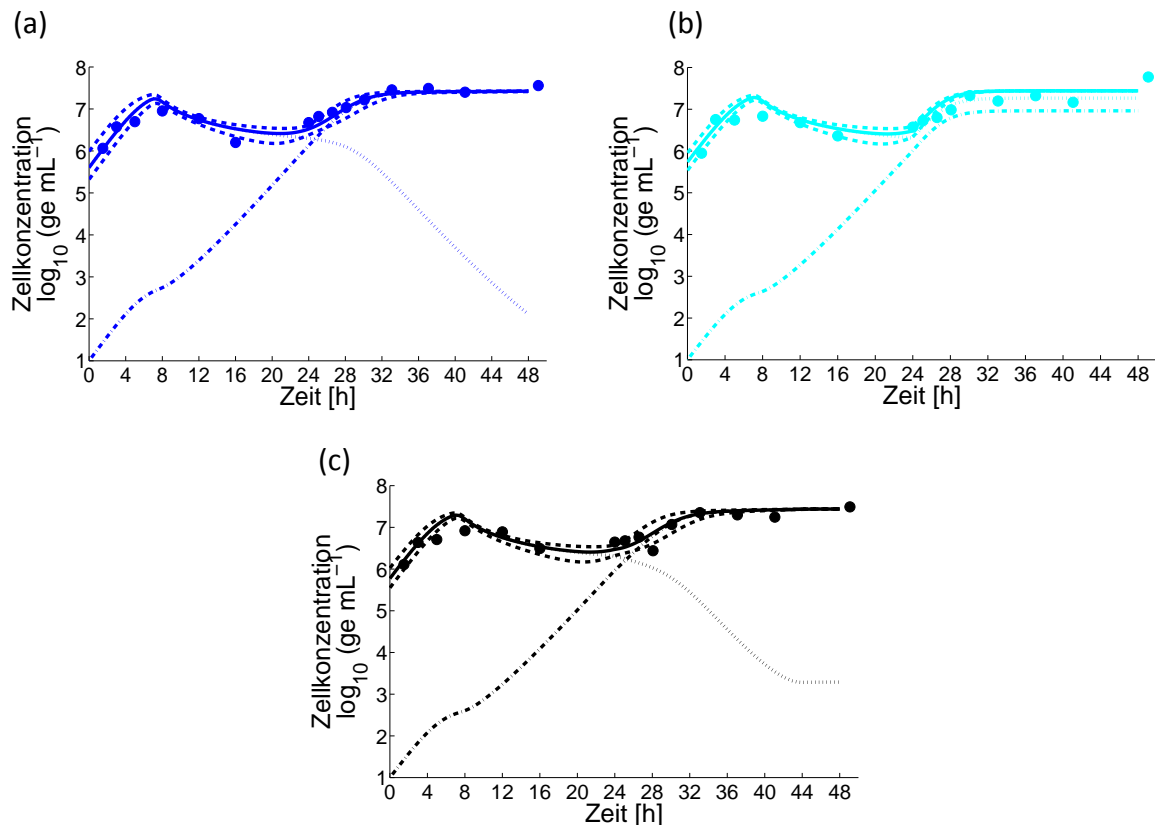
Da das vorherige Modell (Gleichung 25) nicht in der Lage war alle Zellkonzentrationsverläufe der variierten Ceftazidimdosierungen mit einem Parametersatz zu beschreiben, wurde das Modell um eine zweite, resistente Bakterienpopulation erweitert. Faktisch wird damit ein neuer Mechanismus zur Beschreibung der 2. Wachstumsphase von *B. cepacia* im Modell implementiert. Im neuen Modell beschreibt jeweils eine Gleichung eine antibiotikumsensible (Gleichung 27) und eine resistente Subpopulation (Gleichung 28). Die unterschiedlichen Resistenzen wurden dabei ausschließlich durch verschiedene  $EC_{50}$ -Werte berücksichtigt. Weiterhin wurde die Wachstumslimitierung (Erreichen einer maximalen Zellkonzentration) so angepasst, dass die Summe beider Populationen das Wachstum der einzelnen Population limitiert. Auf den Parameter  $H$  konnte in diesem Modell, im Gegensatz zum vorherigen Modell (Gleichung 25), verzichtet werden, da er kaum zu einer Verbesserung der Anpassung beitrug.

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = \mu \cdot N_1(t) \cdot \frac{N_{max} - (N_1(t) + N_2(t))}{N_{max}} - k_L \cdot \frac{e^{4 \cdot (t-t_{lag})}}{1 + e^{4 \cdot (t-t_{lag})}} \cdot \frac{C(t)}{EC_{50,1} + C(t)} \cdot N_1(t) \quad \text{Gleichung 27}$$

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = \mu \cdot N_2(t) \cdot \frac{N_{max} - (N_1(t) + N_2(t))}{N_{max}} - k_L \cdot \frac{e^{4 \cdot (t-t_{lag})}}{1 + e^{4 \cdot (t-t_{lag})}} \cdot \frac{C(t)}{EC_{50,2} + C(t)} \cdot N_2(t) \quad \text{Gleichung 28}$$

Bei der Parameteroptimierung wurde der gleiche Parametersatz simultan an die *time-kill*-Daten von *B. cepacia* (Messwerte in Abbildung 28) in der Mischkultur mit den drei unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationsprofilen (Abbildung 28b) angepasst. Die für die

Parameteroptimierung freigegebenen Parameter waren die beiden unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte und die Startzellkonzentrationen  $N_0$  der antibiotikumsensiblen Subpopulation. Die Startzellkonzentrationen der resistenten Subpopulation war nicht bekannt und wurde daher auf  $10^1$  ge  $\text{mL}^{-1}$  festgelegt. Dieses Vorgehen ist auch dadurch gerechtfertigt, dass sich bei der Variation des Startwertes (Faktor 100) nur geringfügige Änderungen in der Güte der Modellanpassung ergaben ( $\Delta\text{FQS} = -3\%$ ). Ansonsten wurden fixe Parameterwerte aus den vorherigen Modellanpassungen verwendet ( $t_{lag}$ ,  $N_{max}$ : Tabelle 18;  $\mu$ ,  $k_L$ : Tabelle 17).



**Abbildung 29:** Simulation der drei *B. cepacia*-Datensätze mit dem Modell aus Gleichung 27 & Gleichung 28, Linien: Simulierte Gesamtzellkonzentration; gestrichelte Linien: Grenzen der Konfidenzintervalle; gepunktete Linie: simulierte, antibiotikumsensible Subpopulation; Strichpunkt-Linie: simulierte antibiotikumresistente Subpopulation; Punkte: Mittelwerte der dreifach bestimmten Messwerte; blau (a): Kontrollkolben mit einem Ceftazidimpuls ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) bei 0 h. cyan (b): Ceftazidimpuls ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) bei 0 h und Entfernung des Ceftazidims nach 24 h. schwarz (c): zwei Ceftazidimpulse ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) bei 0 h und 24 h;

Obwohl nur zwei Parameterwerte zur Optimierung freigegeben wurden, konnte mit dem erweiterten Modell (Gleichung 27 und Gleichung 28) eine gute Anpassung des Modells an alle drei Datensätze erreicht werden: Die Modellsimulationen zeigen einen starken Anstieg der resistenten Zellkonzentration von Beginn an in allen drei Experimenten (Abbildung 29).

In den Versuchen mit messbarer Ceftazidimkonzentration bis zum Ende der Kultivierung (Abbildung 29a & c: Kontrollkolben, zweiter Puls bei 24 h) zeigt das Modell ein Überwachsen der sensiblen Population durch die resistente. Gleichzeitig nehmen die Zellkonzentrationen der sensiblen Populationen in beiden Experimenten bis zum Ende der Kultivierung stark ab. Die Gesamtpopulation (sensibel + resistent) gibt den Verlauf der tatsächlichen Messwert jedoch gut wieder. Im anderen Fall (Entfernung des Antibiotikums nach 24 h, Abbildung 29b) bleibt die antibiotikumsensible Population die dominierende, da sie zu allen Zeitpunkten die höhere Zellkonzentration aufweist. Die Gesamtpopulation wird im Vergleich mit den Messwerten jedoch leicht überschätzt. Die Konfidenzintervalle der *Bootstrap*-Analyse sind in allen drei Fällen vergleichsweise schmal (vgl. Abbildung 26a und Abbildung 29), was sich hier auf die geringe Anzahl von optimierten Parametern zurückführen lässt. Für die resistente Subpopulation wurden für die Konzentration bei halb-maximaler Lyserate  $EC_{50}$  mit  $223,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  ein deutlich höherer Wert ermittelt als für die antibiotikumsensible Population mit  $6,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

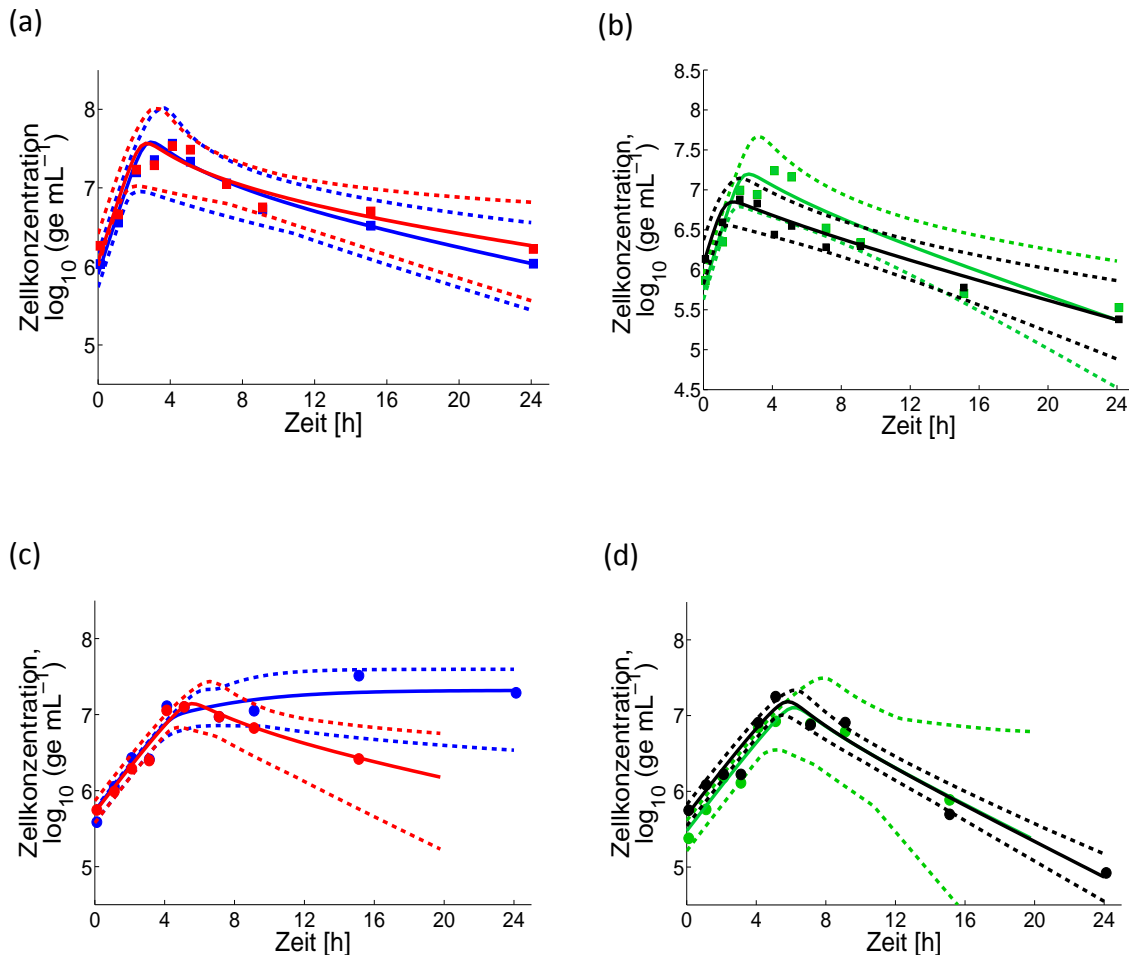
**Tabelle 19: *Bootstrap*-Modellparameter der simultanen Anpassung des Modells in Gleichung 27 und Gleichung 28 und an die drei Datensätze von *B. cepacia* im 48 h *time-kill*-Experiment: Ceftazidimpuls bei 0 h (Kontrollexperiment), zwei Ceftazidimpulse bei 0 h und 24 h (jeweils  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim) und einem Ceftazidimpuls ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit Entfernung des Ceftazidims nach 24 h (Abbildung 19). Folgende Parameter wurden nicht zur Anpassung freigegeben:  $\mu = 0,70 \text{ h}^{-1}$ ;  $k_L = 0,92 \text{ h}^{-1}$  (Tabelle 17),  $t_{lag} = 7,36 \text{ h}$ ;  $N_{max} = 10^{7,44} \text{ ge mL}^{-1}$  (Tabelle 18). (Da der dritte angepasste Parameter  $N_0$  künstlich auf das 95 %-Intervall der Messwerte beschränkt wurde (siehe „Modellanpassung“), erfolgte keine Auswertung in dieser Tabelle)**

| Stamm             | Parameter   | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L    | sh   |
|-------------------|-------------|----------------|------------|----------------|------------|------------|-------|------|
| <i>B. cepacia</i> | $EC_{50,1}$ | 6,71           | 6,43       | 6,23           | 3,23       | 8,96       | 91,98 | 0,91 |
|                   | $EC_{50,2}$ | 217,10         | 193,66     | 223,29         | 133,79     | 349,72     | 96,71 | 1,41 |

### Mischkultur mit variierten Ceftazidimkonzentrationen

Die parallel kultivierten Mischkulturexperimente mit variierten Ceftazidimkonzentrationen im Bereich von  $5 - 60 \mu\text{g mL}^{-1}$  („Mischkultur mit variierten Ceftazidimkonzentrationen“, Abbildung 14) wurden im Folgenden anhand des Lysemodells (Gleichung 24) weiter untersucht. Das Modell wurde jeweils an die Zellkonzentrationskurven von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* angepasst. Da sich bei *S. aureus* offensichtlich keine ceftazidimabhängigen Effekte darstellten (Abbildung 15), wurde auf eine Modellierung verzichtet. Die spezifischen Wachstumsraten  $\mu$  und die maximalen Zellkonzentration  $N_{max}$  wurden nicht zur Anpassung

freigegeben, stattdessen wurden nur die spezifische Lyserate  $k_L$  und der Zeitversatz  $t_{lag}$  angepasst. Nur diese beiden Parameter beschreiben direkt die Auswirkung der Antibiotikumbehandlung, die im Experiment variiert wurde. Es wird also angenommen dass die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  und die maximale Zellkonzentration  $N_{max}$  unabhängig von der Antibiotikumswirkung sind.



**Abbildung 30:** Messwert und angepasste Simulationskurven mit Konfidenzintervallen von *P. aeruginosa* mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (a)(blau), mit  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (a)(rot), mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (b)(grün) und mit  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (b)(schwarz), sowie von *B. cepacia* mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (c)(blau), mit  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (c)(rot), mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (d)(grün) und mit  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid (d)(schwarz)

Im Verlauf der Zellkonzentration von *P. aeruginosa* konnte kein Unterschied zwischen der mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Cefprozid behandelten Mischkultur festgestellt werden (Abbildung 30a): Die Simulationsverläufe verlaufen nahezu identisch und die Konfidenzintervalle überlappen größtenteils. Das bildet sich auch in den Charakteristika der Parameterverteilungen ab, die sehr ähnliche Werte aufweisen (Tabelle 20). Weiterhin lässt

sich bei beiden  $t_{lag}$ -Werten, im Gegensatz zu allen anderen Parameterverteilungen dieses *time-kill*-Experimentes, eine Asymmetrie feststellen. Die Zellkonzentrationen des 30 und 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiments mit *P. aeruginosa* (Abbildung 30b) sind fast über den gesamten Versuchszeitraum um ca. 0,5 log-Einheiten niedriger als das entsprechende 5 und 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiment (Abbildung 30a). Eine klare Unterscheidung ist jedoch nicht möglich, da sich die Konfidenzintervalle in weiten Teilen überlagern. Somit führte die variierte Ceftazidimkonzentration nicht zu signifikanten Änderungen des Zellkonzentrationsverlaufs. Allerdings lässt sich in den Parameterwerten ein Trend ausmachen, der dem der Ceftazidimkonzentrationen entspricht: Mit erhöhter Ceftazidimkonzentration nimmt die mittlere Versatzzeit  $\bar{t}_{lag}$  ab (von 2,59 h bis 1,19 h). Mit anderen Worten, die Lyse setzt bei höheren Ceftazidimkonzentrationen früher ein.

Bei *B. cepacia* wurde in der mit 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim behandelten Mischkultur eine Lyserate von  $k_L = 0,42 \text{ h}^{-1}$  ermittelt (Tabelle 20). Dieser Wert liegt unterhalb der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,70 \text{ h}^{-1}$ . Aus diesem Grund zeigte sich im Kurvenverlauf kein Rückgang der Zellkonzentration, sondern die Kurve näherte sich einem Sättigungspunkt an (siehe dazu „Parameterschätzung und Parametercharakterisierung“ und Abbildung 32), der allerdings unterhalb der vorgegebenen maximalen Zellkonzentration von  $N_{max} = 10^{7,73} \text{ ge mL}^{-1}$  lag (Abbildung 30c). Somit bewirkte die Lyserate hier eine effektive Verringerung der maximalen Zellkonzentration. Bei den höheren Ceftazidimkonzentrationen waren dagegen deutliche abnehmende Trends zu beobachten. Übertragen auf die Lyserate  $k_L$  konnte sukzessive eine Zunahme vom 15 zum 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiment festgestellt werden (Tabelle 20). Bei 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim war kein weiterer Anstieg der Lyserate zu beobachten. So waren auch die Konzentrationsverläufe bei 30 und 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim nahezu identisch (Abbildung 30c). Die deutlich unterschiedlichen Breiten der Konfidenzintervalle gehen auf die verschieden großen Varianzen der sechsfach bestimmten Messwerte zurück. Diese waren im 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiment deutlich geringer, als im 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Experiment.

Tabelle 20: Anpassung des Lysemodells (Gleichung 24) an die Mischkulturdaten von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* bei Behandlung mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen (siehe auch Abbildung 14a und b). Folgende Parameter wurden nicht zur Anpassung freigegeben:  $\mu_{Pa} = 1,59 \text{ h}^{-1}$  (Tabelle 17),  $N_{max, Pa} = 10^{8,25} \text{ ge mL}^{-1}$  (Tabelle 15),  $\mu_{Bc} = 0,70 \text{ h}^{-1}$  (Tabelle 17),  $N_{max, Bc} = 10^{7,74} \text{ ge mL}^{-1}$  (Tabelle 18),

| Stamm                | Ceftazidim-konzentration | Parameter | $\hat{\theta}$ | $\theta_D$ | $\bar{\theta}$ | $\theta_u$ | $\theta_o$ | %L    | sh   |
|----------------------|--------------------------|-----------|----------------|------------|----------------|------------|------------|-------|------|
| <i>P. aeruginosa</i> | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | $k_L$     | 1,74           | 1,74       | 7,74           | 1,66       | 1,81       | 9,15  | 0,96 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 2,69           | 2,52       | 2,59           | 1,64       | 3,77       | 82,33 | 1,24 |
|                      | 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 1,71           | 1,71       | 1,71           | 1,60       | 1,80       | 11,46 | 0,97 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 2,42           | 2,35       | 2,35           | 1,43       | 3,57       | 91,25 | 1,34 |
|                      | 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 1,81           | 1,82       | 1,81           | 1,68       | 1,94       | 14,37 | 1,01 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 2,22           | 2,10       | 2,26           | 1,33       | 3,25       | 84,96 | 1,05 |
|                      | 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 1,77           | 1,77       | 1,78           | 1,70       | 1,85       | 8,59  | 0,99 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 1,20           | 1,22       | 1,19           | 0,46       | 1,93       | 123,0 | 1,02 |
| <i>B. cepacia</i>    | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$  | $k_L$     | 0,42           | 0,41       | 0,42           | 0,18       | 0,69       | 120,7 | 1,10 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 4,43           | 4,40       | 4,64           | 3,39       | 6,14       | 59,23 | 1,21 |
|                      | 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 0,78           | 0,80       | 0,80           | 0,65       | 0,95       | 37,82 | 1,04 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 5,43           | 5,04       | 5,48           | 4,17       | 6,94       | 50,54 | 1,12 |
|                      | 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 0,95           | 0,96       | 0,96           | 0,63       | 1,33       | 73,15 | 1,12 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 6,13           | 6,27       | 6,16           | 4,21       | 8,24       | 65,50 | 1,08 |
|                      | 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $k_L$     | 0,96           | 0,96       | 0,96           | 0,91       | 1,00       | 9,29  | 1,04 |
|                      |                          | $t_{lag}$ | 5,81           | 5,80       | 5,80           | 5,33       | 6,30       | 16,77 | 1,07 |

## 5. Diskussion

### 5.1. Speziesspezifische Wachstumscharakteristika in der Mischkultur

Substratkonkurrenz ist eine indirekte Interaktion, die in den meisten Mischkultursystemen auftreten wird. Im Vergleich von Rein- und Mischkultur sollte in solch einem Fall die Biomasseausbeute der einzelnen Spezies in der Reinkultur höher ausfallen als in der Mischkultur (Annahme: gleiche Substratmenge in beiden Kultivierungen), da in letzterer mehrere Mikroorganismen gleichzeitig das oder die limitierenden Substrate verstoffwechseln. Der eben beschriebene Zusammenhang wurde für *P. aeruginosa* und *B. cepacia* beobachtet. So war die maximale absolute Zellkonzentration der beiden Keime in der Dreier-Mischkultur signifikant geringer (*P. aeruginosa*:  $P$ -Wert = 0,035; *B. cepacia*:  $P$ -Wert =  $1.4 \times 10^{-5}$ ) als in der Reinkultur (Tabelle 12). Eine genauere Betrachtung zeigte, dass bei *P. aeruginosa* die maximale Verdopplungszahl erhöht (Abbildung 7a und b) war. Dies lässt sich jedoch mit der geringeren Startzellkonzentration in der Mischkultur erklären (siehe „Schüttelkolbenkultivierung“), die eine höhere Anzahl von Zellteilungen zuließ bevor die Substratlimitierung eintrat. Im Gegensatz dazu zeigte *S. aureus* eine reduzierte maximale Verdopplungszahl in der Mischkultur im Vergleich zur Reinkultur (Abbildung 7a und b). Diese Beobachtung könnte durch die Substratkonkurrenz in der Mischkultur bedingt sein. Diese Interpretation wird gestützt durch die Tatsache, dass die Glukose- und Glutaminkonzentrationen innerhalb der ersten 3 bzw. 6 h unterhalb des Detektionslimit fielen (Daten nicht gezeigt), während die Verstoffwechslung beider Substrate in der Reinkultur wesentlich langsamer von statten ging (kontinuierlich über 9 h). Somit könnte *S. aureus* durch die beiden anderen Keime schon früh in eine Substratlimitierung gedrängt worden sein, was die geringere Verdopplungszahl in der Mischkultur erklären würde. Darüber hinaus ist natürlich auch eine unbekannte, direkte Interaktion mit *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* vorstellbar.

Im weiteren Kultivierungsverlauf stellte sich ein Rückgang der Verdopplungszahl bei *S. aureus* ein, der sich nicht mehr mit einer Substratkonkurrenz erklären lässt (9 – 24, Abbildung 7b) und der zudem in Kontrast zur konstanten Zellkonzentration von *S. aureus* in der Reinkultur (Abbildung 7a) steht. Dies lässt auf einen Interspezieseffekt schließen, der scheinbar auf einer Form von Zelllyse beruht. Damit erfüllt er die Kriterien des Amensalismus

oder der Eccrinolyse (Fredrickson 1983). Der erste Begriff bezeichnet eine Interaktion zwischen zwei Mikroorganismen, in denen ein Organismus eine toxische Substanz oder einen Inhibitor produziert, um den anderen negativ zu beeinflussen. Der zweite Begriff, Eccrinolyse, bezeichnet eine Interaktion, in der ein Mikroorganismus durch eine lytisch wirkende Substanz den zweiten lysiert und sich damit zusätzlich Wachstumssubstrate erschließt. Hier konnten jedoch keine positiven Effekte auf das Wachstum von *P. aeruginosa* oder *B. cepacia* festgestellt werden. Geringfügige Zunahmen der Zellkonzentration können wegen des relativ hohen Messfehlers bei der qT-RFLP jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz erfüllt die vermutete Interaktion, ohne nachgewiesenen Nutzen für ein „Räuber-Bakterium“, die Kriterien des Amensalismus.

Die Kultivierungsversuche von *S. aureus* in Zweier-Mischkulturen (mit *P. aeruginosa* oder *B. cepacia*) brachte keine weiteren eindeutigen Erkenntnisse zum vermuteten Interspezieseffekt (siehe oben) in der Dreier-Mischkultur. In der Kombination *S. aureus*-*B. cepacia*, zeigte sich sogar ein nahezu gegenteiliger Effekt (Abbildung 11c): *S. aureus* stellte sich als der dominante Keim heraus, der durch eine lange Wachstumsphase höhere Zellkonzentrationen als *B. cepacia* erreichte. Das lässt nur noch die Möglichkeit offen, dass sich der Lyseeffekt in der Zweier-Kombination mit *P. aeruginosa* finden sollte. Jedoch konnte in dieser Co-Kultivierung nur in den ersten beiden Proben (0 h und 1 h) eine Zellkonzentration ermittelt werden. In den weiteren Probenahmen wurde, in unabhängigen Versuchen reproduzierbar, keine DNA im PCR-Schritt der qT-RFLP-Analyse amplifiziert. Vermutlich wurden von den Bakterien inhibierende Substanzen gebildet, die im Standard-Analyseprotokoll (und in Variationen davon) nicht abgereichert werden konnten. Da dieser Effekt nur in der Mischkultur von *P. aeruginosa* und *S. aureus* auftrat, ist es wahrscheinlich, dass eine Interaktion der beiden Keime zur Störung der Analytik führte und somit Wert ist in zukünftigen Studien untersucht zu werden. Weitere Rückschlüsse auf den Lyseeffekt von *S. aureus* in der Dreier-Mischkultur, wie ursprünglich beabsichtigt, kann indes aus der Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* nicht abgeleitet werden. Immerhin ist es vorstellbar, dass *S. aureus* durch Enzyme mit zelllytischer Aktivität geschädigt wurde. Solche zellwandabbauenden Enzyme werden von Gram-negativen Bakterien produziert und über Membranvesikel freigesetzt (Lee et al. 2008). Insbesondere ist bekannt, dass *P. aeruginosa* *S. aureus* abzutöten vermag, indem sich die von *P. aeruginosa* produzierten Membranvesikel



an die Oberfläche des Gram-positiven Keims anlagern und die darin enthaltenen Enzyme freisetzen (MacDonald and Beveridge 2002). Unter anderem wird dabei eine zellwandabbauende 26 kDa Mureinhydrolase (Autolysin) und die LasA Protease freigesetzt (Kadurugamuwa and Beveridge 1996). Beide Enzyme üben eine lytische Aktivität gegenüber der Peptidoglycanschicht von *S. aureus* aus (Kessler et al. 1993; MacDonald and Beveridge 2002). Neben *P. aeruginosa* produziert auch *B. cepacia* Membranvesikel mit peptidoglycanabbauender Aktivität (Allan et al. 2003). Dies wurde zwar bis jetzt nur für Stämme aus dem Genomovar IIIa und V gezeigt, es ist aber nicht unwahrscheinlich, dass auch der in dieser Arbeit verwendete Keim (Genomovar I) dazu in der Lage ist. Allerdings scheint dies in den hier durchgeführten Co-Kultivierungen mit *B. cepacia* und *S. aureus* keine Rolle gespielt zu haben, da keine Lysephase von *S. aureus* festgestellt werden konnte.

Die Zweier-Mischkultur mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia* fügte sich in das Bild der zu erwartenden geringeren Biomasseausbeute einer Mischkultur im Vergleich zu den Reinkulturen. Die maximale Zellkonzentration war zudem bei beiden Keimen geringer als in der Reinkultur, aber größer als in der Dreier-Mischkultur. Bei *P. aeruginosa* war der Unterschied jedoch nicht signifikant ( $P$ -Wert = 0,260 und  $P$ -Wert = 0,128), bei *B. cepacia* hingegen schon ( $P$ -Wert = 0,015 und  $P$ -Wert = 0,018).

### 5.2. Nahrungskette in der unbehandelten Mischkultur

Abbildung 8 zeigt, dass nur *B. cepacia* Gluconat und 2KDG im Medium anreicherte, aber keiner der anderen Keime. *P. aeruginosa* ist zwar prinzipiell in der Lage, diese Stoffe zu bilden (Lessie and Phibbs 1984), jedoch führte das in den durchgeführten Experimenten zu keiner Anreicherung. Whiting et al. (Whiting et al. 1976b; a) konnten zeigen, dass bei hohen Glucosekonzentrationen und ausreichend Sauerstoff der Oxidative Stoffwechselweg gegenüber dem Phosphorylativen Stoffwechselweg bevorzugt wird. Da beide Voraussetzungen auch in den vorliegenden Experimenten gegeben waren (Abbildung 8), kann davon ausgegangen werden, dass zumindest im Bereich ohne Limitierungen der Oxidative Stoffwechselweg unter Bildung von Gluconat und 2KDG von *P. aeruginosa* genutzt wurde. Da es zu keiner Gluconatanreicherung im Medium kam, liegt der Schluss nahe, dass die gluconatverbrauchenden Reaktionen (Transport ins Cytosol, Oxidation zu 2KDG) eine

höhere Aktivität aufwiesen als die gluconatbildende Glucosedehydrogenase (siehe Glucosestoffwechsel von *P. aeruginosa* und *B. cepacia*“). Die Gluconatanreicherung im Medium der Dreier-Mischkultur (Abbildung 8d) ist somit allein auf die Stoffwechselaktivität von *B. cepacia* zurückzuführen. Nun ist aber die gebildete Gluconatmenge in der Dreier-Mischkultur geringer als die Gluconatmenge in der *B. cepacia*-Reinkultur, was die Frage nach dem Ursprung dieser Differenz aufwirft. Zunächst ist es möglich, dass aufgrund der geringeren Animpfzellkonzentration von *B. cepacia* in der Mischkultur weniger Gluconat gebildet wurde. Vergleicht man aber die Gluconatprofile der Zweier-Mischkulturen mit denen der Dreier-Mischkultur und der Reinkultur, ist eine andere Erklärung wahrscheinlicher.

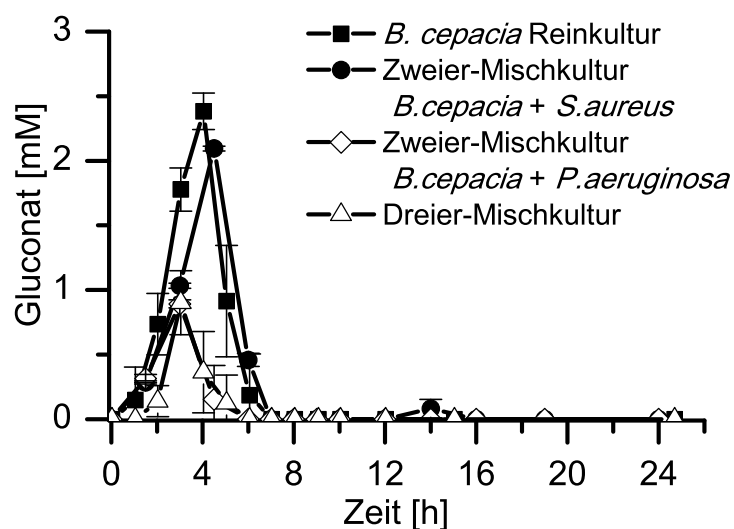


Abbildung 31: Vergleich der Gluconatkonzentrationsprofile in verschiedenen Kultivierungen mit *B. cepacia*.

Zunächst ist es wichtig zu wissen, dass in den Zweier-Mischkulturen dieselben absoluten Mengen angeimpft wurden, wie in der Dreier-Mischkultur und somit ein Inokulationseffekt beim Vergleich beider Kultivierungsvarianten ausgeschlossen werden kann. Wie sich in Abbildung 31 zeigt, wurden ähnliche hohe Gluconatmengen (2,0 – 2,5 mM) in der Reinkultur von *B. cepacia* und in der Zweier-Mischkultur von *B. cepacia* und *S. aureus* gebildet. Dagegen waren die Gluconatmengen in der Dreier-Mischkultur so wie in der Zweier-Mischkultur mit *B. cepacia* und *P. aeruginosa* deutlich geringer (ca. 1 mM), was den Schluss nahelegt, dass *P. aeruginosa* die Ursache für diese Differenz ist. Prinzipiell könnte eine Wachstums- oder Stoffwechselhemmung von *B. cepacia* durch *P. aeruginosa* dieses Ergebnis erklären. Dies

scheint jedoch unwahrscheinlich, da durch die physiologische Verwandtschaft beider Keime ein Hemmstoff auch *P. aeruginosa* selbst treffen könnte. Vielmehr scheint es wahrscheinlicher, dass *P. aeruginosa* das freie Gluconat aufnahm und verstoffwechselte, also eine Nahrungskette vorlag. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch versucht die Nahrungskette in kontinuierlichen Kulturen im Bioreaktor nachzuweisen. Allerdings war die Nahrungskette nicht eindeutig nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Andererseits konnte die postulierte Nahrungskette auch nicht widerlegt werden.

### **5.3. Die qT-RFLP-Methode als analytisches Werkzeug für *time-kill*-Experimente**

Die Wirkung von Ceftazidim auf die Reinkulturen war nicht, wie erwartet worden war (siehe „Dynamische Methoden“), durch eine Abtötungsphase oder Lysephase geprägt (Abbildung 9a). Stattdessen glich der Verlauf bei allen drei Spezies den jeweiligen Kurven der unbehandelten Reinkultur mit Wachstumsphase und stationärer Phase (Abbildung 7a). Sogar die spezifische Wachstumsraten waren unter Berücksichtigung der Messfehler identisch (siehe „Reinkultur vs. Mischkultur mit und ohne Ceftazidim“). Die Wirkung des Antibiotikums wurde lediglich in der Dauer der Wachstumsphasen deutlich. Diese waren in den antibiotikumbehandelten Kulturen kürzer als in den unbehandelten Reinkulturen, mit der Folge, dass die maximalen Zellkonzentrationen bzw. die Verdopplungszahlen geringer waren. Auf den ersten Blick mag das widersprüchlich erscheinen, wenn man die Ergebnisse anderer Autoren betrachtet, die in ceftazidimbehandelten Reinkulturen von *P. aeruginosa* und *S. aureus* eindeutige Abtötungsphasen feststellen konnten (Bulitta et al. 2009; Shrivastava et al. 2009). Jedoch wurde in den genannten Studien die Plattenausstrichmethode zur Zellquantifizierung verwendet, in der über die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf einer Agarplatte die Anzahl lebender Bakterien in der verdünnten, ausplattierten und inkubierten Probe berechnet werden. Wegen der Filamentbildung, ausgelöst durch die Ceftazidimbehandlung (siehe „Ceftazidim“), kann es aber zu einer systematischen Unterschätzung der vitalen Zellkonzentration kommen (siehe „Die Plattenausstrichmethode in der Kritik“). Da die Filamente durch Zellwachstum ständig länger werden können, nimmt die Diskrepanz zwischen KBE und tatsächlicher Lebendzellkonzentration während eines *time-kill*-Experiments ständig zu. Im Gegensatz dazu quantifiziert die hier verwendete qT-RFLP die

Zellkonzentration über die Anzahl der extrahierten Genomäquivalente ohne von morphologischen Veränderungen beeinträchtigt zu sein (siehe „qT-RFLP-Analyse“). Der Nachteil der qT-RFLP-Methode ist allerdings, dass keine Daten über die Vitalität der Zellen gewonnen werden konnten. Somit lässt sich der Rückgang der Zellkonzentration auch nicht als Abtöten sondern ausschließlich als Lyse interpretieren.

#### **5.4. Interspezies Effekte in ceftazidimbehandelten Mischkulturen**

Unter identischen Kultivierungsbedingungen tritt Zellyse bei *P. aeruginosa* in der antibiotikumbehandelten Dreier-Mischkultur auf (Abbildung 8b), nicht aber in der antibiotikumbehandelten Reinkultur (Abbildung 8a) oder in der unbehandelten Mischkultur (Abbildung 7b). Somit scheint die Lyse von *P. aeruginosa* nicht nur die Konsequenz aus der Ceftazidimbehandlung zu sein, sondern sie scheint auch notwendigerweise mit der Co-Kultivierung mit *B. cepacia* und *S. aureus* zusammenhängen, was folglich auf einen Interspezieseffekt schließen lässt. Durch unabhängige *time-kill*-Experimente in Zweier-Mischkulturen konnte dieser Interspezieseffekt einerseits bestätigt werden, andererseits weiter aufgeklärt werden. So trat die Lyse von *P. aeruginosa* nur in der antibiotikumbehandelten Zweier-Mischkultur mit *B. cepacia* auf, nicht aber mit *S. aureus* (Abbildung 12a, b). Dies lässt darauf schließen, dass *B. cepacia*, neben der Ceftazidimbehandlung, einen Einfluss auf die Lyse von *P. aeruginosa* hatte. Dass *P. aeruginosa*, wie schon erwähnt, unter Ceftazidimbehandlung nicht notwendigerweise lysiert, zeigte die ceftazidimbehandelte Reinkultur und die Zweier-Mischkultur mit *S. aureus*. Folglich kann man davon ausgehen, dass eine erhöhte effektive Lyseaktivität in den ceftazidimbehandelten Co-Kulturen mit *B. cepacia* das beschriebene Ergebnis herbeiführte. Nun lysierte *P. aeruginosa* in der unbehandelten Co-Kultur mit *B. cepacia* nicht (Abbildung 11a), so dass sich die Frage stellt, ob es durch die Ceftazidimbehandlung zur vermehrten Autolysinproduktion kam, oder aber *P. aeruginosa* den Schutz gegen eigene und/oder von *B. cepacia* intrinsisch produzierte Autolysine verlor (Allan et al. 2003) (siehe auch „Speziesspezifische Wachstumscharakteristika in der Mischkultur“)? Letztendlich können nur weitere Versuche, in denen die lytischen Enzyme und deren Aktivität bestimmt werden, Antworten bringen. Dennoch scheint beides nicht unwahrscheinlich zu sein, da ein ähnliches Ergebnis schon berichtet wurde. So konnten Kadurugamuwa und Beveridge (1996)

(Kadurugamuwa and Beveridge 1996) zeigen, dass die Behandlung von *P. aeruginosa* mit Gentamycin (Antibiotikum, Stoffgruppe der Aminoglykoside) die Bildung von Membranvesikeln erhöht und diese eine gesteigerte Autolyseaktivität besitzen und zudem geringe Mengen von Gentamycin enthalten.

*S. aureus* lysiert in der ceftazidimbehandelten Dreier-Mischkultur nicht. Dies steht in Kontrast zur unbehandelten Dreier-Mischkultur, in der Lyse von *S. aureus* nach 9 h festgestellt wurde (siehe „Speziesspezifische Wachstumscharakteristika in der Mischkultur“). Auch in den ceftazidimbehandelten Zweier-Mischkulturen trat keine eindeutige Lysephase auf (Abbildung 12b, c), die der in der unbehandelten Dreier-Mischkultur entsprechen würde. In der ceftazidimbehandelten Zweier-Mischkultur mit *B. cepacia* wurde indes ein Rückgang der Zellkonzentration von *S. aureus* zu einem frühen Zeitpunkt direkt nach der Wachstumsphase detektiert. Es scheint als würde mit Ceftazidimzugabe Lyse ähnlich der in der unbehandelten Dreier-Mischkultur verhindert werden.

Der Verlauf der Zellkonzentration von *B. cepacia* in der ceftazidimbehandelten Dreier-Mischkultur entsprach in etwa dem Verlauf der ceftazidimbehandelten Zweier-Mischkultur mit *S. aureus* (Abbildung 9b und Abbildung 12c). Der Wachstumsphase zu Beginn folgte eine Lysephase, der sich wiederum eine zweite Wachstumsphase anschloss. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Zellkonzentration von *B. cepacia* in der ceftazidimbehandelten Co-Kultivierung mit *P. aeruginosa*, allerdings mit schwächerer Ausprägung: Nach der Wachstumsphase, die mit 9 h ca. 3 h länger dauerte als bei den anderen beiden Kultivierungen, sank die Zellkonzentration geringfügig aber signifikant ( $P$ -Wert = 0,093), um im letzten Datenpunkt bei 24 h wieder anzusteigen (Abbildung 12a). In der ceftazidimbehandelten Reinkultur (Abbildung 9a) folgte auf eine geringe Wachstumsphase mit nur 2 Verdopplungen in 9 h eine schwach ausgeprägte Lysephase (Rückgang der Verdopplungszahl auf einen Wert von ca. 1) ohne zweite Wachstumsphase innerhalb der beobachteten 24 h. Die starke Ausprägung der Lysephase und der zweiten Wachstumsphase scheint somit vor allem in der Co-Kultur mit *S. aureus* aufzutreten. Auf welche Art und Weise *S. aureus* den Keim *B. cepacia* beeinflusst, ist nicht genau bekannt. Man weiß, dass auch *S. aureus* als Gram-positives Bakterium in der Lage ist Membranvesikel zu produzieren, die zumindest ein Autolysin enthalten (Lee et al. 2009). Jedoch ist nicht bekannt inwieweit diese Membranvesikel dazu in der Lage sind andere Bakterien zu lysieren. Die zweite

Wachstumsphase von *B. cepacia* wird in einem späteren Zusammenhang (siehe „Die wiederholte Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim“) diskutiert.

### 5.5. Lactamaseaktivität

Abhängig von Temperatur und chemischen Umgebungsbedingungen nimmt die Konzentration von Ceftazidim in wässriger Lösung auf Grund von chemischen Zerfall kontinuierlich ab (siehe Abbildung 4)(Zhou and Notari 1995). Davon abgesehen exprimieren viele Bakterien sogenannte Lactamasen, die den  $\beta$ -Lactamring eines  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums hydrolysieren und damit unwirksam machen können (Jacoby 2006). Im Einzelfall hängt es von der Kombination des Antibiotikums und der Lactamase ab, ob und mit welcher Rate die genannte Hydrolyse stattfindet. So ist bekannt, dass beispielsweise Ceftazidim eine relative hohe Stabilität gegen Lactamaseverdau (Matagne et al. 1998) aufweist. Andererseits ist ebenfalls bekannt, dass alle hier verwendeten Bakterienspezies prinzipiell in der Lage sind Lactamasen zu produzieren (Nielsen and Lampen 1982; Dalhoff and Cullmann 1984). Jedoch scheinen die Lactamasen von *P. aeruginosa* und *S. aureus*, so denn sie denn exprimiert worden sind, nicht in der Lage gewesen zu sein Ceftazidim zu hydrolysieren. Bei beiden Keimen konnte der Rückgang der Ceftazidimkonzentrationen allein durch den chemischen Zerfall erklärt werden (Abbildung 10). Dagegen wurde in Kulturen mit *B. cepacia* eine Abnahme der Ceftazidimkonzentration festgestellt, die über den chemischen Zerfall hinausging (Abbildung 10) und damit ein klarer Hinweis für die Existenz von Lactamasen darstellt. Diese war in der Reinkultur stärker ausgeprägt, als in der Mischkultur, was möglicherweise auf die höhere Inokulationskonzentration in der Reinkultur zurückführen war.

Durch den Unterschied des speziesspezifischen Ceftazidimabbaus ergibt sich die Möglichkeit eines Interspezieseffekts, bei dem *B. cepacia* durch Ceftazidimabbau einen Vorteil für das Überleben in der Mischkultur für alle Bakterien bereitstellt, den *P. aeruginosa* oder *S. aureus* allein nicht besäßen. Um die tatsächliche Relevanz dieser Vermutung beurteilen zu können, eignet sich der Vergleich des pharmacokinetischen Index  $T_{>MHK}$  (Barger et al. 2003). Dieser bezeichnet die Zeitdauer, in der ein Bakterium einer Antibiotikumskonzentration ausgesetzt ist, die über dem speziesspezifischen MHK-Werte liegt. Im 24 h – *time-kill*-Experiment der

Dreier-Mischkultur mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim erreichte  $T_{>MHK}$  von *P. aeruginosa* und *S. aureus* das Maximum von 24 h, so dass man trotz sinkender Antibiotikumskonzentration nicht von einem Schutzeffekt durch *B. cepacia* ausgehen kann. Im 48 h –time-kill-Experiment lagen, nach Mediumswechsel und erneuter Ceftazidimzugabe,  $T_{>MHK, Pa}$  auf 47 h und  $T_{>MHK, sa}$  auf 39 h, beide Werte knapp unter dem Maximalwert von 48 h (Abbildung 19f). So wurde also theoretisch aufgrund der Lactamaseproduktion von *B. cepacia* ein Wiederanwachsen für *S. aureus* ermöglicht, das ohne die Lactamaseaktivität nicht möglich gewesen wäre. Dass kein Wachstum von *S. aureus* zu beobachten war, muss demnach andere Ursachen gehabt haben. An der Antibiotikumskonzentration und der Lactamaseaktivität lag es vermutlich nicht (siehe „Die wiederholte Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim“). Somit ist auch ausgeschlossen, dass eine zeitlich verlängerte Kultivierung und damit eine deutliche Verringerung der Ceftazidimkonzentration auf Null einen Vorteil für *S. aureus* bedeutet hätte. Für *B. cepacia* mit einem MHK-Wert von  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $T_{>MHK, Bc} = 0 \text{ h}$ ) konnte der Ceftazidimabbau durch Lactamase sehr wohl einen Überlebensvorteil verschafft haben. So wurde die Antibiotikumskonzentration, die zu Beginn des Experiments (Abbildung 19) etwa dem Wert des MHK-Wertes entsprach, durch die Lactamaseaktivität weiter gesenkt. Damit ließe sich begründen, weshalb sich der Keim nach einer kurzen Lysephase weiter vermehrte. Dies wird auch durch das Modell in Gleichung 25 und Gleichung 26 bestätigt, in der die zweite Wachstumsphase allein durch die verringerte Antibiotikumskonzentration modelliert werden konnte. Jedoch konnte das gleiche Modell einen zweiten Ceftazidimpuls nicht abbilden. Dies gelang erst nach dem eine weitere resistente Subpopulation eingeführt wurde (Gleichung 27 und Gleichung 28). Damit konnten alle drei Experimente (nur ein Antibiotikumpuls, ein Puls + zweiter Puls mit Mediumswechsel, ein Puls mit späterem Mediumswechsel) mit dem gleichen Parametersatz beschrieben werden (Abbildung 27), was die Vermutung nahelegt, dass ein weiterer Resistenzmechanismus außer der Lactamaseproduktion und der damit verbundenen Ceftazidimverringern die Ursache für die zweite Wachstumsphase von *B. cepacia* ist.

Eine weitere Auffälligkeit wurde im 48 h –Experiment mit dem zweiten Ceftazidimpuls nach 24 h beobachtet. Die Abbaurrate war nach dem zweiten Puls und dem gleichzeitig vorgenommenen Mediumswechsel deutlich erhöht (Abbildung 19f), was auf eine erhöhte Lactamaseproduktion schließen lässt. Im durchgeführten Experimente (Gleichung 19f) führte

das sogar soweit, dass die  $2 \times 30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim insgesamt schneller abgebaut (nach ca. 44 h) wurden als bei der Zugabe von  $1 \times 30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (erst nach 49 h). Es ist bekannt, dass Lactamasebildung durch Antibiotika (spezifische Induktion) oder durch Mediumskomponenten wie etwa Aminosäuren (unspezifische Induktion) induziert werden kann (Wiedemann et al. 1998). In diesem Fall ist es jedoch fraglich, ob eine zweite Induktion unter Verwendung derselben Auslöser (erste Induktion: Medium M199 + Ceftazidim) nach 24 h hervorgerufen werden kann. Davon abgesehen ist es möglich, dass allein durch Zuführen neuer Substrate weitere Lactamase gebildet wurde. Zellwachstum allein, das ebenfalls Lactamasebildung erklären würde (Frere et al. 1989), scheint nicht die Ursache gewesen zu sein, da im gleichen Umfang auch im Kontrollexperiment, ohne entsprechende Erhöhung der Lactamaseaktivität, Zellwachstum stattgefunden hat, obwohl keine zusätzlichen Substrate zugegeben wurden (Abbildung 19b). Für die Lactamasebildung scheinen zudem bestimmte Substrate notwendig zu sein. So lagen im Kontrollexperiment im Zeitraum von 24 – 36 h ausreichende Mengen von 2KDG im Kontrollexperiment vor, die eigentlich als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen könnten, jedoch offensichtlich nicht zur Lactamasebildung eingesetzt wurden. Dies lässt vermuten, dass zusätzlich Aminosäuren, die zu diesem Zeitpunkt im genannten Experiment schon vollständig verstoffwechselt waren, für die Lactamaseproduktion benötigt werden. Im Parallelexperiment wurden mit dem Mediumswechsel auch Aminosäuren zugegeben, so dass hier keine Limitierung zu Beginn der zweiten Hälfte des Experiments (24 – 30 h) vorlag und Lactamaseproduktion möglich war.

Für das Prinzip „Lactamasebildung nach Induktion“ spricht das Ergebnis aus Abbildung 15 und Abbildung 18. Es zeigt eindeutig die Abhängigkeit der angewendeten Ceftazidimkonzentration und der daraus resultierenden Abbaurate des Antibiotikums in Form einer linearen Korrelation. Der Effekt war weiterhin nahezu exakt reproduzierbar (vgl. Graph der Dreier-Mischkultur aus Abbildung 18 mit Abbildung 15). In der Reinkultur führte die Anwendung der gleichen Ceftazidimkonzentrationen zu einer höheren Abbaurate, was aber ebenfalls linear korreliert war (Abbildung 18). Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wurde für Expression einer sogenannten AmpC  $\beta$ -Lactamase bei *P. aeruginosa* berichtet (Dalhoff and Cullmann 1984). Der Mechanismus hinter diesem Effekt funktioniert kurz zusammengefasst folgendermaßen: Die Behandlung mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika führt zu erhöhten Konzentration von Peptidoglykanabbauprodukten, die



wiederum die Expression der AmpC  $\beta$ -Lactamasen induzieren (Wiedemann et al. 1998). Eine höhere Antibiotikumkonzentration induziert also eine höhere Lactamaseproduktion. In Konsequenz führt der konzentrationsabhängige Antibiotikumbau zu einem Angleichen der Antibiotikums Mengen innerhalb eines engen Zeitfensters. Oder anders formuliert: egal wie viel Antibiotikum zu Beginn zugegeben wurde, innerhalb einer ähnlich langen Zeitspanne sind die Antibiotikumsendkonzentrationen gleich (niedrig). Unabhängig von weiteren Einflüssen ist es also nicht unbedingt empfehlenswert die Wirkungsdauer einer Antibiotikumsgabe durch eine erhöhte Dosis zu verlängern. Höhere Dosen sind nur dann sinnvoll, wenn dadurch eine höhere Abtötungs- bzw. Lyserate erreicht wird.

### **5.6. Die wiederholte Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim**

Nach einer 24-stündigen Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim und der daraufhin erfolgten Lyse, konnte eine zweite Wachstumsphase bei *P. aeruginosa* nur dann beobachtet werden, wenn nach 24 h ein Mediumswechsel vorgenommen wurde und dabei das restliche Ceftazidim entfernt wurde (Abbildung 19a). Jedoch startete diese zweite Wachstumsphase bei ca. 37 h. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits alle messbaren Metabolite verstoffwechselt (Abbildung 19d, e), so dass sich die Frage stellt welche Substrate zum Wachstum verstoffwechselt wurden? Es ist nicht klar, ob *P. aeruginosa* unbekannte, nicht-messbare Substrate aus dem Medium aufnahm oder ob es in einer früheren Wachstumsphase intrazelluläre Speicherstoffe anreicherte, die in dieser Phase als Wachstumssubstrate abgebaut wurden. Weiterhin erholte sich der Keim vom postulierten Mischkultureffekt durch die Entfernung des Ceftazidims (siehe „Interspezies Effekte in ceftazidimbehandelten Mischkulturen“), was die Vermutung bestätigt, dass nur mit Ceftazidim als Nebenbedingung der genannte Mischkultureffekt auftritt.

*B. cepacia* konnte dagegen in allen drei Experimenten in Abbildung 19 ohne signifikante Unterschiede wachsen. Nach einer kurzen Lysephase begann schon bei 16 h die zweite Wachstumsphase. Wie unter „Lactamaseaktivität“ beschrieben ist die verringerte Antibiotikumskonzentration eine mögliche Erklärung. Weiterhin ist es möglich, dass sich während der exponentiellen Wachstumsphase eine resistente Subpopulation bildete (Desai et al. 1998), die nicht mehr auf das Antibiotikum reagierte und daher unter den gegebenen

Bedingungen wachsen konnte. Der Trend der zweiten Wachstumsphase wurde weder von den Mediumswechseln beeinflusst, noch hatte die Zugabe von weiteren  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim einen Effekt auf das Wachstum von *B. cepacia*. Gleichzeitig mit dem Ende der zweiten Wachstumsphase bei 33 h waren die zusätzlichen (Mediumswechsel) und die verbliebenen (Kontrollexperiment) Metabolite vollständig verstoffwechselt, was vermuten lässt, dass die Metabolite, nicht nur wegen der vergleichsweise höheren Zellkonzentration, hauptsächlich von *B. cepacia* verstoffwechselt wurden.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Keimen zeigte *S. aureus* nicht einmal nach Entfernung des Antibiotikums eine zweite Wachstumsphase. Aufgrund des Abbaus von Ceftazidim durch die Lactamase von *B. cepacia*, ergab sich die theoretische Möglichkeit, dass *S. aureus* eine zweite Wachstumsphase zeigt (siehe „Lactamaseaktivität“). Es scheint aber als würde dies im vorliegenden System keine Rolle spielen, da die Substrate von *B. cepacia* und eventuell auch von *P. aeruginosa* innerhalb kürzester Zeit verstoffwechselt wurden (Abbildung 19d, e) und keine Substrate für ein Wiederauwachsen von *S. aureus* übrig blieben. Statt Wachstum trat bei *S. aureus* sogar Lyse im Bereich von 24 – 28 h direkt nach dem Mediumswechsel auf. Erstaunlicherweise zeigte sich im Kontrollkolben, der ohne weitere Beeinflussung von außen über 48 h kultiviert wurde, derselbe Effekt. Die Ursache hierfür liegt im Unklaren.

## **5.7. Wachstum und Lyse in Abhängigkeit von der Ceftazidimkonzentration**

Aus der Literatur ist bekannt, dass die spezifische Abtötungsrate bei Anwendung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Allgemeinen konzentrationsabhängig ist, mit einer oberen Konzentrationsgrenze, die etwa beim Drei- bis Vierfachen des MHK-Wertes liegt (Turnidge 1998). Hier ist die Abtötungsrate jedoch eine Unbekannte, allein die Lyserate kann aus den qT-RFLP-Daten bestimmt werden. Bei *P. aeruginosa* bewegten sich, bei Anwendung von  $5 - 60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim, die mittleren Lyseraten  $\bar{k}_L$  im Bereich von  $1,71 \text{ h}^{-1} - 1,81 \text{ h}^{-1}$  (Tabelle 20). Da die Differenz gerade mal 6 % beträgt, kann man nicht von einem signifikanten Unterschied der einzelnen Lyseraten ausgehen. Weiterhin ist damit gezeigt, dass ein Konzentrationseinfluss von Ceftazidim im Bereich über dem Drei- bis Vierfachen des MHK-Wertes auf die Lyserate nicht gegeben war und somit der oben genannte Zusammenhang

nicht nur für die Absterberate, sondern hier auch für die Lyserate gilt. Andererseits zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Ceftazidimwirkung auf *P. aeruginosa* bezüglich des Ceftazidims im Zeitversatz des Lysebeginns  $t_{lag}$ , dessen Mittelwerte mit zunehmender Ceftazidimkonzentration geringer wurden (Tabelle 20). Dieser Zusammenhang stimmt mit dem allgemeinen Trend überein, wonach eine höhere Antibiotikumskonzentration den Zeitversatz zum Beginn des Abtötens verringern kann („Lag-Phase (Phase I)“). Bulitta et al. (Bulitta et al. 2009) untersuchten ebenfalls die Wirkung von Ceftazidim auf *P. aeruginosa*, konnten aber keinen konzentrationsabhängigen Zeitversatz feststellen. Dieser vermeintliche Widerspruch kann jedoch auf unterschiedliche Analysemethoden zurückgeführt werden. Bulitta et al. verwendeten die Plattenausstrichmethode (siehe „Die Plattenausstrichmethode in der Kritik“), während hier die qT-RFLP-Methode verwendet wurde (siehe „Speziesspezifische Bakterienquantifizierung mittels qT-RFLP Methode“ und „Die qT-RFLP-Methode als analytisches Werkzeug für *time-kill-Experimente*“). Beide Verfahren quantifizieren die Zellzahl anhand verschiedener physiologischer Eigenschaften der Bakterienzellen, die vermutlich nicht gleichermaßen durch die angewendeten Ceftazidimkonzentration beeinflusst werden. Der Zeitversatz  $t_{lag}$  zum Beginn der Lyse von *B. cepacia* war im Gegensatz zu *P. aeruginosa* unabhängig von der Ceftazidimkonzentration. Zumindest zeigte sich kein Trend, der mit der Ceftazidimkonzentration korrelieren würde. Eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich Ceftazidim trat bei diesem Keim jedoch in der mittleren Lyserate  $\bar{k}_L$  auf. Sie nahm mit der Ceftazidimkonzentration im Bereich von 5 – 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  von 0,42  $\text{h}^{-1}$  auf 0,96  $\text{h}^{-1}$  zu (Tabelle 20). Das obere Limit von  $\bar{k}_L$  scheint bei 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (ca. 1  $\times$  MHK) erreicht worden zu sein, da keine weitere Erhöhung durch die Anwendung der doppelten Konzentration von 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim beobachtet werden konnte. Andererseits hatte die Erhöhung auf 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim jedoch Einfluss auf die zweite Wachstumsphase, die damit vollständig verhindert worden war, aber bei 15 und 30  $\text{mg mL}^{-1}$  Ceftazidim noch ausgebildet war (Abbildung 14b). Setzt man eine resistente (besser: eine resistenterere) Population als Ursache für die zweite Wachstumsphase voraus (siehe dazu „Mathematische Modellierung der *time-kill-Experimente*“), bedeutet das beschriebene Ergebnis, dass, trotz ihrer höheren Resistenz, diese Population auf eine Antibiotikumskonzentration von 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  noch reagiert (siehe auch „Erneute Wachstumsphase (Phase III)“).

Die Lyserate von *S. aureus* zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich Ceftazidim. Im gesamten Konzentrationsbereich ( $0,6 \times \text{MHK}$  bis  $7,5 \times \text{MHK}$ ) wuchs der Organismus für ungefähr 4 h und behielt anschließend die Zellkonzentration bis zum Ende des Experimentes bei. Und das obwohl die Experimente im zu erwartendem sensitiven Konzentrationsbereich durchgeführt wurden (Turnidge 1998).

### **5.8. Metabolismus in ceftazidimbehandelten Rein- und Mischkulturen**

Der zeitliche Verlauf von Glutamin, Glutamat und Glucose wurde durch die verschiedenen Ceftazidimkonzentrationen nicht beeinträchtigt (Abbildung 14d, e). Alle drei Substrate wurden vollständig (Glutamin, Glutamat) bzw. nahezu vollständig (Glucose) in der Wachstumsphase verstoffwechselt (die längste Wachstumsphase der drei Keime zeigte *B. cepacia* mit 4 – 6 h, Tabelle 20). Dagegen konnte im Verlauf der Gluconat- und 2KDG-Konzentrationen ein Konzentrationseinfluss des Ceftazidims nachgewiesen werden (Abbildung 14e). So wurde mit zunehmender Ceftazidimkonzentration mehr Gluconat im Medium angereichert. Dies lässt sich erklären, wenn man die Fähigkeit Gluconat zu bilden mit der Präsenz von vitalen Zellen gleichsetzt. Die Vitalität wird durch die Ceftazidimbehandlung natürlich reduziert, dementsprechend wird weniger Glucose in die Zelle aufgenommen und stattdessen im Periplasma über die membrangebundenen Enzyme (siehe „Glucosestoffwechsel von *P. aeruginosa* und *B. cepacia*“) in Gluconat umgewandelt und vorübergehend im Medium angereichert. Im nächsten Reaktionsschritt wird Gluconat in 2KDG umgewandelt und ebenfalls im Medium angereichert, wobei diese Reaktion schneller abläuft, wenn weniger Ceftazidim vorliegt (Abbildung 14). Es scheint also, dass die membrangebundenen Enzyme der Gram-negativen Bakterien durch das Antibiotikum nicht inaktiviert wurden und in Folge dessen, die Umwandlung von Glucose in 2KDG fortgesetzt wurde, während der Stofftransport in die Zelle zum Erliegen kam. Dem kommt eine besondere Bedeutung in der Mischkultur zu, da es einen Selektionsvorteil der Gram-negativen Bakterien gegenüber *S. aureus* darstellt. So verbessern die Gram-negativen ihre Stellung in der Konkurrenz um die vorhandenen Substrate gegenüber *S. aureus*, da letzterer nicht in der Lage ist Gluconat und 2KDG zu verstoffwechseln. Dadurch wird also eine potentielle zweite Wachstumsphase von *S. aureus* schon im Vorfeld durch Substratzug verhindert. Durch ein weiteres Experiment konnte der Verursacher des beschriebenen

Substratzugs auf *B. cepacia* eingeschränkt werden, da *P. aeruginosa* in ceftazidimbehandelter (5, 15, 30 und 60 mg mL<sup>-1</sup>) Reinkultur kein Gluconat oder 2KDG anreicherte (Daten nicht gezeigt). Im Gegenzug war es indes nicht möglich den Verlauf der Metabolitkonzentrationen in der Dreier-Mischkultur allein durch ein Reinkultorexperiment mit *B. cepacia* abzubilden (Abbildung 16). Insgesamt war die Verstoffwechslung von Glucose, Gluconat und 2KDG in Abhängigkeit von der Ceftazidimkonzentration in der Dreier-Mischkultur langsamer als in der Reinkultur mit *B. cepacia*, in der sich ebenfalls der Konzentrationseffekt bezüglich Ceftazidim abzeichnete, allerdings in schwächerer Ausprägung. Nun lässt sich einerseits ein Mischkultureffekt vermuten, um die verminderte Stoffwechselleistung zu erklären, andererseits könnten die unterschiedlichen Animpfzellkonzentrationen die unterschiedliche Stoffwechselrate erklären.

Die Anreicherung von 2KDG im Medium einer ceftazidimbehandelten Mischkultur ist dagegen kein abgeschlossenes Phänomen, sondern nur ein Zwischenzustand bis zur vollständigen Verstoffwechslung, wie das *time-kill*-Experiment in Abbildung 19 zeigte. In diesem Experiment wurden die Kontrollkolben über einen längeren Zeitraum von 48 h kultiviert. Es zeigte sich, dass, wie oben beschrieben (siehe auch Abbildung 14e), zwischenzeitlich 2KDG angereichert, aber später (nach 24 h) weiter verstoffwechselt wurde. Dies deckt sich mit der Beobachtung einer zweiten Wachstumsphase von *B. cepacia* in der Mischkultur (Abbildung 19b), die vermutlich die aktive Biomasse, beim 2KDG-Abbau darstellt. Wie in „Die wiederholte Behandlung der Mischkultur mit Ceftazidim“ diskutiert, scheint es sich hier um eine resistente Subpopulation von *B. cepacia* zu handeln.

### **5.9. Mathematische Modellierung der *time-kill*-Experimente**

Die vorliegenden Daten zum zeitlichen Verlauf der Zellkonzentrationen der *time-kill*-Experimente wurden mit Hilfe mathematischer Modelle abgebildet und eine Analyse der im Zuge dessen ermittelten Parameter durchgeführt.

Die Modellierung von *time-kill*-Experimenten in Reinkultur wird meist zum Zwecke der Vorhersagbarkeit zukünftiger Antibiotikaawendungen, auch beim Patienten, durchgeführt (siehe „Pharmacodynamische Modelle“). In der hier vorgestellten Arbeit wurde die mathematische Modellierung in erster Linie angewendet, um zu einem besseren Verständnis

der beobachteten Dynamiken zu gelangen. Insbesondere sollte eine objektive Vergleichbarkeit der Zellkonzentrationsverläufe der unterschiedlichen Bakterienspezies hergestellt werden. Dazu gehört die Abbildung der Gesamtdynamik bestehend aus Wachstum, Lyse, wiederholtes Wachstum und den jeweiligen Übergangszuständen. Der besondere Vorteil eines mathematischen Modells besteht nun in der synchronen Abbildung aller dieser Zustände, wobei die Abhängigkeit der genannten Abschnitte zueinander mit berücksichtigt werden, während bei der klassischen Auswertung von dynamischen Verläufen die einzelnen Teilabschnitte isoliert voneinander verglichen werden, eventuell unter Zuhilfenahme von abschnittsweiser linearer Regression. Weiterhin ermöglichte die mathematische Modellierung die Übertragung der individuellen Messfehler jeder Probenahme in den dynamischen Verlauf der Ausgleichskurve (= Simulationskurve), was es ermöglichte deren Signifikanz objektiv beurteilen zu können.

Im ersten Teil der Modellierungsarbeiten wurde aus zwei zur Verfügung stehenden Modellen für limitiertes Bakterienwachstum (Gleichung 2 und Gleichung 3) eines anhand der besten Anpassung (Bestimmtheitsmaß) an die Wachstumskurven der unbehandelten Kulturen ausgewählt (siehe „Modell für limitiertes Wachstum“). Das sogenannte logistische Wachstumsmodell lieferte in allen Fällen (außer in einem Fall, siehe Tabelle 13) eine bessere Anpassung und wurde daher als Grundlage für die weitere Modellbildung verwendet.

Die Modellanpassung des logistischen Wachstumsmodells an die Mischkultur ist in Abbildung 20 zusammen mit den 95 %-Konfidenzintervallen dargestellt. Die unterschiedlichen Intervallbreiten ergaben sich aus den Abweichungen der Datenpunkte von der Regressionskurve, aus der Messunsicherheit der einzelnen Datenpunkte und der Anzahl der gemessenen Proben im betrachteten Zeitraum (siehe auch „Parameterschätzung und Parametercharakterisierung“). So konnte die Wachstumskurve von *P. aeruginosa* mit relativ hoher Sicherheit bestimmt werden (enge Konfidenzintervalle), während die Kurve von *B. cepacia* hauptsächlich aufgrund des höheren Messfehlers mit geringerer Sicherheit bestimmt wurde.

Die Modellerweiterung zur Darstellung der Lyse als Folge der Antibiotikumsbehandlung erforderte zunächst die Einführung eines Terms mit dem der Zeitversatz bis zum Einsetzen der Lyse berücksichtigt werden konnte. Mit der Verwendung von  $\frac{e^{-4(t-t_{lag})}}{1+e^{-4(t-t_{lag})}}$  konnte dies

erreicht werden, wobei der besondere Vorteil dieser Gleichung in der scharfen Begrenzung des stetigen Übergangsbereichs von Wachstums zu Lyse war (siehe auch Abbildung 23), so dass der Einfluss des Terms auf die Schätzung der spezifischen Wachstums- und Lyserate minimiert werden konnte.

Die Lysephase von *B. cepacia* wurde in Abbildung 24 noch an einen künstlich verkürzten Datensatz angepasst, da sich eine zweite Wachstumsphase zeigte, die das einfache Lysemodell (Gleichung 24) nicht abbilden konnte. Für die Abbildung der zweiten Wachstumsphase wurde in der Modellerweiterung von Gleichung 25 die Lyserate von der Konzentration des Antibiotikums abhängig gemacht. Dies hatte zur Folge, dass durch die abnehmende Ceftazidimkonzentration die Lyserate verkleinert wird und es dadurch zu weiterem Wachstum kommen konnte. Dieses Modell konnte an *Cepacia*-Daten aus dem 48 h – Experiment mit einer ausgeprägten zweiten Wachstumsphase angepasst werden. Jedoch war das Modell nicht in der Lage mit dem gleichen Parametersatz, weitere Experimente (zweiter Ceftazidimpuls bzw. Entfernung des Ceftazidims) adäquat zu beschreiben. Erst durch Annahme einer zweiten, resistenten Subpopulation (Gleichung 25), war es möglich alle drei Experimente zu beschreiben (Abbildung 29, Tabelle 19). Die resistente Population wurde mit den gleichen Parametern, wie die sensible Population modelliert, lediglich der „Resistenzparameter“  $EC_{50}$  wurde zur Anpassung freigegeben. Je höher der Wert von  $EC_{50}$ , desto höher muss die Antibiotikumskonzentration sein, um eine wirksame Lyserate zu erreichen. Im vorliegenden Fall wurde für die sensible Population  $\overline{EC}_{50} = 6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  und für die resistente Population  $\overline{EC}_{50} = 223,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  bestimmt (Tabelle 19). Damit liegen beide Werte in einem Bereich für MHK-Werte, der typisch ist für „sensible“ bzw. „resistente“ Bakterien.

### 5.10. Parameterschätzung und Parametercharakterisierung

Mit Hilfe der *Bootstrap*-Methode konnte eine detaillierte Parametercharakterisierung anhand der ermittelten Parameterverteilungen durchgeführt werden. Eine von mehreren Verteilungskenngrößen war die Parametervarianz, die meist als Abbildung des experimentellen Messfehlers auf die Parameter interpretiert wird. Diese Vorstellung ist angebracht, wenn die Parametervarianzen durch Auswerten der FIM berechnet wurden

(„Parameterschätzung und Parametervarianzen“), da sie aufgrund ihrer Definition (lineare Näherung eines nichtlinearen Modells) Parameterverteilung liefert, die auf den Parameterschätzwert zentriert und symmetrisch sind (Joshi et al. 2006a). Diese Vereinfachung ignoriert jedoch, dass die tatsächlichen Parameterverteilungen in Lage, Breite und Form variabel sind und somit unsymmetrisch und nicht auf den Parameterschätzwert zentriert sind. Weiterhin sind diese Verteilungen nicht nur vom Messfehler abhängig, sondern werden darüber hinaus von der Nichtlinearität des Modells und der Parameter, der Anzahl der Messwerte und der Abweichung der Messwerte vom Modell (Anpassungsfehler) beeinflusst. Es ist daher die Stärke der *Bootstrap*-Methode die Parameterverteilung in genannter Variabilität darzustellen. Darüber hinaus liefert die Auswertung der FIM nur eine untere Grenze der Parametervarianz (Goodwin and Payne 1977), während die *Bootstrap*-Methode in der Lage ist die tatsächlich Variationsbreite eines Parameters zu erfassen (siehe „Parameterschätzung und Parametervarianzen“).

In Abbildung 20 wurde für das Wachstum der drei Mikroorganismen das gleiche Modell (logistisches Wachstum) an die jeweiligen Datensätze angepasst. Dennoch ergeben sich gravierende Unterschiede in Breite und Form der jeweiligen Parameterverteilungen, deren Ursache allein in den Datensätzen liegt (Abbildung 21). Die breitesten Parameterverteilungen (vgl. %L, Tabelle 15) und die stärkste Asymmetrie der Parameterverteilungen ( $sh$  ist größer oder kleiner als 1,0; Tabelle 15) von  $\mu$  und  $N_{max}$  traten bei *S. aureus* auf. Dies ist unter anderem der geringeren Anzahl der zur Modellanpassung verwendeten Datenpunkte von *S. aureus* geschuldet. So konnten Joshi et al. (Joshi et al. 2006b) zeigen, dass eine Verringerung der zur Anpassung verwendeten Datenpunkte die Nichtlinearität und damit die Asymmetrie und die Breite einer Parameterverteilung erhöht. Im Gegensatz dazu deuten die Parameterverteilungen von *P. aeruginosa* auf lineare Parameter (symmetrische Verteilung) mit geringer Verteilungsbreite hin, die auf Grundlage von mehr Messwerten ermittelt wurden.

Symmetrische Parameterverteilungen vereinfachen die Interpretation derselben, da Modal- und Mittelwert der Verteilung, sowie der Wert der minimalen FQS-Schätzung nahezu identisch sind. Im Gegensatz dazu weichen die genannten Verteilungscharakteristika einer unsymmetrischen Verteilung voneinander ab. Daher wurde die Auswertung bzw. der Parametervergleich in dieser Arbeit meist anhand des Mittelwertes einer Verteilung



durchgeführt, da dieser Wert als sogenannter Lageparameter am aussagekräftigsten ist für die Lage (Position) der gesamten Verteilung auf der Messskala. Den Modalwert könnte man fälschlicherweise als „wahrscheinlichsten“ Parameterwert interpretieren, im Sinne einer optimalen Modellanpassung unter Berücksichtigung der bekannten Messunsicherheit. Aber erstens handelt es sich hier um Häufigkeitsverteilungen, die per se noch keiner Aussage über Wahrscheinlichkeiten zu lassen. Zweitens kann die Fähigkeit eines Parameters zur Abbildung und Vorhersage von Messwerten nicht isoliert betrachtet werden, da eine Modellsimulation in der Regel von mehreren Parametern beeinflusst wird und die Verwendung der einzelnen Parametermodalwerte nicht notwendigerweise die beste Anpassung liefert (im Sinne einer minimalen FQS, siehe auch Abbildung 22), sondern nur die Parameter, die in Kombination am häufigsten auftreten (entspricht Modalwert einer multivariaten Parameterverteilung). Die Korrelation zweier Parameter lässt sich anhand der Streuungsfläche bei gegenseitiger Auftragung abschätzen (Abbildung 21) oder anhand der Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $\rho$ , der allerdings nur ein Maß für die lineare Korrelation zweier Parameter ist. Die konkave Punktwolke der gegeneinander aufgetragenen Parameter  $\mu$  und  $N_{max}$  von *S. aureus* (Abbildung 21c) zeigt eine Korrelation, die anstatt gleichmäßig über den gesamten Wertebereich beider Parameter zu streuen, nur in einem relativ engen Band streut. So ist die vollständige Streuung der  $N_{max}$ -Werte in einem relativ engen Wertebereich von  $\mu$  (ca.  $0,2 - 0,3 \text{ h}^{-1}$ ) zu finden. Gleiches gilt auch im umgekehrten Fall (weite Streuung von  $\mu$  im Wertebereich von  $N_{max} = 6,8$  bis ca.  $7,3 \text{ ge mL}^{-1}$ ), so dass man festhalten muss, dass die beiden Parameter mit der vorliegenden Datenlage nicht gleichzeitig bestimmbar sind. Im Gegensatz dazu ist die Korrelation von  $\mu$  und  $N_{max}$  bei *P. aeruginosa* sehr gering ausgeprägt, was sich durch eine Streuung im gesamten Wertebereich beider Parameter zeigt (Abbildung 21a).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Parameterverteilungen war die Startzellkonzentration  $N_0$ , die ebenfalls zur Anpassung freigegeben wurde. Dies zeigen die Parametercharakteristika  $\mu$  und  $N_{max}$  in Tabelle 15, welche ohne die Anpassung von  $N_0$  bestimmt wurden und in der Folge deutlich schmalere Verteilungsbreiten lieferten (Veränderung um 50 %), während der Einfluss auf Lage (Mittelwert) und Schiefe der Verteilung relativ gering war (Veränderung im Bereich 2 – 20 %). Folglich erhöht die Anpassung von  $N_0$  die Parametervarianz, sie hatte indes keinen Einfluss auf die Nichtlinearität der Parameter.

Im erweiterten Modell (Gleichung 24) wurde die Lyseaktivität aufgrund von Ceftazidimbehandlung mittels der Parameter  $k_L$  und  $t_{lag}$  berücksichtigt. Beide Parameter konnten für *P. aeruginosa* und *B. cepacia* vergleichsweise genau bestimmt werden (%L = 48 – 83 %, Tabelle 17) und zeigten eine geringe Schiefe bzw. Nichtlinearität. Eine positive Korrelation der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  und der spezifischen Lyserate  $k_L$  konnte für den Datensatz von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden und in geringerer Ausprägung auch für *B. cepacia* und *S. aureus* (vgl. Abbildung 25a, c und Korrelationskoeffizienten  $\rho_{Pa} = 0,99$ ;  $\rho_{Bc} = 0,66$ ;  $\rho_{Sa} = 0,77$ ). Die Ursache dieser Korrelation ist schon in der Modellstruktur angelegt (Gleichung 24). So muss in Bereichen abnehmender Zellkonzentration die Modellgleichung negative Werte annehmen ( $\frac{dN}{dt} < 0$ ). Im einfachsten Fall ist diese Bedingung erfüllt, wenn  $\mu$  kleiner als  $k_L$  ist. Im vorliegenden Beispiel ist dies bei (fast) allen Parametersätzen von *B. cepacia* der Fall (Abbildung 25b): (fast) alle  $k_L$ -Werte sind betragsmäßig größer als der jeweils korrelierte  $\mu$ -Wert. Folglich konvergiert  $N(t)$  für  $t \rightarrow \infty$  gegen 0 (Abbildung 32). Im umgekehrten Fall ( $k_L$ -Werte sind betragsmäßig kleiner als der jeweils korrelierte  $\mu$ -Wert) konvergiert  $N(t)$  für  $t \rightarrow \infty$  gegen einen Wert, der im Bereich  $0 - N_{max}$  liegt. Faktisch bedeutet dies die Konvergenz gegen eine neue stationäre Zellzahl, die geringer als  $N_{max}$  ist. Die Annäherung kann mit einem Rückgang oder mit einem Anstieg der Zellkonzentration verbunden sein. Das Beispiel in Abbildung 32 soll dies deutlich machen. Durch die Parameterwerte für *P. aeruginosa* für die gilt  $k_L < \mu$ , nimmt die Zellkonzentration nach der Wachstumsphase ab und konvergiert gegen einen stationären Wert, was mit einem Rückgang der Zellkonzentration verbunden ist. Die Länge des Übergangsbereichs kann variieren, was im selben Diagramm dargestellt ist: Obwohl bei *S. aureus* ebenfalls  $k_L < \mu$  gilt, tritt praktisch kein Rückgang der Zellkonzentration auf. Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass es bei einer Parameterkombination, bei der  $k_L < \mu$  gilt, faktisch zu einer Reduktion von  $N_{max}$  kommt. Ist der Übergangsbereich bis zur Konvergenz nur kurz genug (Schwellenwert kann definiert werden), wie beispielsweise für *S. aureus* in Abbildung 32 gezeigt, ist es vertretbar statt des Lysemodells das logistische Wachstumsmodell anzupassen und den Ceftazidimeffekt durch eine geringere  $N_{max}$  zu modellieren (Modellreduktion).

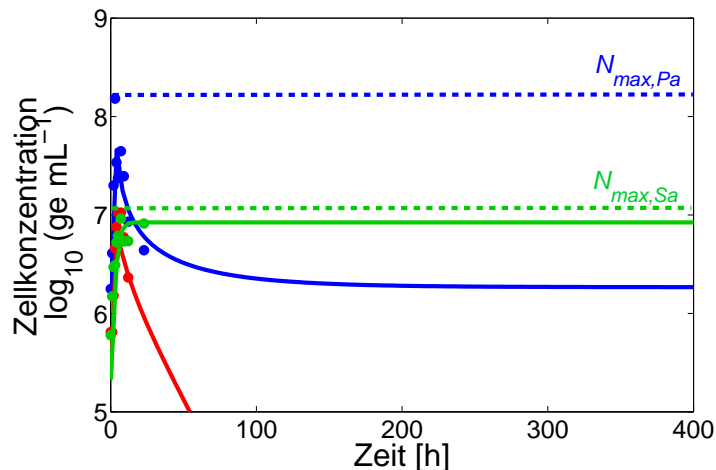


Abbildung 32: Simulation von *P. aeruginosa* (blau), *B. cepacia* (rot) und *S. aureus* (grün) mit Lysemodell (Gleichung 24). Zellkonzentration über längeren Zeitbereich mit beispielhaften Parameterwerten: *P. aeruginosa*:  $\mu = 1,67 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 1,17 \text{ h}^{-1}$ ; *S. aureus*  $\mu = 0,97 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 0,42 \text{ h}^{-1}$ ; *B. cepacia*  $\mu = 0,94 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 1,00 \text{ h}^{-1}$

### 5.11. Ceftazidimbehandlung der Mischinfektion im Patienten

Ohne Antibiotikum war *P. aeruginosa* durch überlegene Wachstumscharakteristika der dominierende Keim der Dreier-Mischkultur. In Folge der Behandlung mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim kam es durch oben beschriebene Effekte zu einer Selektion von *B. cepacia*. Die Anwendung von geringeren Ceftazidimkonzentrationen ( $5$  und  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) beschleunigte die Selektion von *B. cepacia*, da letzterer eine geringere Lyserate zeigte, während die Lyserate von *P. aeruginosa* unverändert blieb. *S. aureus* zeigte schon bei der geringsten Konzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  bakteriostatisches Verhalten. Höhere Ceftazidimkonzentrationen hatten keinen Einfluss mehr auf diese Beobachtung. Mit der Erhöhung der Ceftazidimkonzentration auf  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  konnte bei unveränderter Lyserate im Vergleich zu  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  die Lysephase von *B. cepacia* deutlich verlängert werden, so dass damit auch *B. cepacia* effektiv abgetötet werden könnte. Aus medizinischer Sicht sind solch hohe Ceftazidimkonzentrationen im Blut nur über einen sehr kurzen Zeitraum (1-2 h) zu erreichen, so dass ein nachhaltiger Behandlungserfolg unwahrscheinlich ist (Bulitta et al. 2010). Sinnvoller wäre daher eine Kombinationstherapie mit Ceftazidim und einem weiteren Antibiotikum. Ceftazidim sollte in geringer Dosierung angewendet werden, gerade ausreichend um *P. aeruginosa* und *S. aureus* abzutöten, während für die Behandlung von *B. cepacia* gleichzeitig ein anderes Antibiotikum mit einer höheren Wirksamkeit eingesetzt werden sollte. Ob dies tatsächlich zu

einem verbesserten Behandlungserfolg führt, könnte in weiteren *time-kill*-Experimenten ermittelt und *in-vivo* zum Beispiel in einem geeigneten Tiermodell kontrolliert werden.

## 6. Fazit

In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein neuartiger Ansatz entwickelt um *time-kill*-Experimente mit Mischkulturen durchzuführen. Er beruht auf der Verwendung einer molekularbiologischen Methode (qT-TFLP) zur speziesspezifischen Zellkonzentrationsbestimmung aus Mischpopulationen. Das Potential dieser Analysemethode liegt in der Verwendbarkeit mit Mischkulturen, die in Art und Anzahl der bakteriellen Spezies komplex sein können. Die Modellkultur in dieser Arbeit wurde aus drei Keimen zusammengestellt, die als Mischinfektion in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose vorkommen können und bisher in dieser Kombination noch nicht untersucht wurden (*P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus*). Als Antibiotikum wurde Ceftazidim aufgrund seiner hohen Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* verwendet. Der gesamte experimentelle Ansatz wurde im Vorfeld so gewählt, dass Interaktionen zwischen den Bakterien zu erwarten waren.

### 6.1. Interspezieseffekte

Durch den Vergleich von Experimenten in Rein- und Mischkulturen mit und ohne Ceftazidim konnten mehrere Interspezieseffekte aufgedeckt werden. Eine zentrale Rolle in diesem Zusammenhang spielte die Lyseaktivität. In Gegenwart von Ceftazidim lysierte *P. aeruginosa* nur in Co-Kultur mit *B. cepacia*, jedoch nicht in Reinkultur mit Ceftazidim oder in Mischkultur ohne Ceftazidim. Dies zeigt, dass beide Bedingungen, Ceftazidimbehandlung und Co-Kultur mit *B. cepacia*, erfüllt sein müssen, damit die Lyse von *P. aeruginosa* auftritt. *S. aureus* zeigte ebenfalls Lyseverhalten, allerdings nur in der Dreier-Mischkultur ohne Ceftazidim, nicht aber in Reinkultur oder in der Dreier-Mischkultur mit Ceftazidim. Dies deutet ebenfalls auf einen Interspezieseffekt hin. Durch die Zweier-Mischkulturexperimente konnte *B. cepacia* als Verursacher des genannten Effekts immerhin ausgeschlossen werden, nicht jedoch *P. aeruginosa*. Die qT-RFLP- Analyse der Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* führte reproduzierbar zu keinem Ergebnis, eventuell wegen Anreicherung Substanz, die den assay störte. Diese Tatsache wiederum lässt einen Interspezieseffekt vermuten, der nur in der

Mischkultivierung von *P. aeruginosa* mit *S. aureus* und in keiner anderen Mischkulturkombination aufgetreten ist (siehe auch „Diskussion“).

Auf Substratebene war die Interaktion von Substratkonkurrenz geprägt, die jeweils *P. aeruginosa* unter unbehandelten Bedingungen und *B. cepacia* unter ceftazidimbehandelten Bedingungen für sich entscheiden konnten (schnelleres Wachstums bzw. höhere Zellkonzentration). In der unbehandelten Mischkultur lassen die Messergebnisse zudem auf eine Nahrungskette schließen, in der *P. aeruginosa* von den Gluconatproduktion durch *B. cepacia* profitiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Interaktionseffekte in der untersuchten Mischkultur von Antagonismus und Konkurrenz dominiert waren.

### **6.2. Ceftazidimbehandlung der Mischkultur**

In der ceftazidimbehandelten Dreier-Mischkultur war *B. cepacia* der dominierende Keim. Aufgrund einer vergleichsweise geringen Empfindlichkeit gegenüber Ceftazidim, induzierbarer Resistenzmechanismen und überlegener Stoffwechselaktivität konnte sich der Keim weiter teilen, während die beiden anderen Bakterienarten durch das Antibiotikum getötet bzw. lysiert wurden. Insbesondere die Glucoseoxidation im Periplasma durch membrangebundene Glucose- und Gluconatdehydrogenase konnte durch die Ceftazidimbehandlung nicht gestoppt werden. So setzte der Keim selbst in der Lysephase weiterhin Glucose in die Oxidationsprodukte Gluconat und 2KDG um, ohne diese wieder aufzunehmen und zu katabolisieren. *S. aureus* ist nicht in der Lage die beiden Oxidationsprodukte zu verstoffwechseln und wurde somit im Verlauf des Experiments von der Substratversorgung abgeschnitten, die für eine zweite Wachstumsphase notwendig gewesen wäre. *P. aeruginosa* wurde wie oben schon beschrieben durch *B. cepacia* lysiert, was einer Verstärkung des Antibiotikumeffekts gleichkommt.

Die ceftazidimabbauende Aktivität in der Mischkultur, welche sehr wahrscheinlich durch Lactamaseproduktion hervorgerufen wurde, konnte eindeutig *B. cepacia* zugeordnet werden. Die beiden anderen Keime waren nicht in der Lage, Ceftazidim in signifikanten Mengen abzubauen. Ein Schutzeffekt der sich potentiell aus dieser Konstellation ergibt (ein

Keim baut das Antibiotikum für alle Keime ab), trat im beobachteten Zeitraum jedoch nicht auf.

Insgesamt führte die Behandlung der Mischkultur zu einer Selektion von *B. cepacia*. Ausreichende hohe Ceftazidimkonzentrationen, um auch *B. cepacia* abzutöten sind, bei Patienten vermutlich jedoch nicht zu erreichen, so dass die Kombination von Ceftazidim mit einem *B. cepacia*-wirksamen Antibiotikum für eine erfolgreiche medizinische Behandlung der Mischkultur notwendig sein wird.

### 6.3. Modellierung

Die verwendeten Modelle basieren auf etablierten, aus der Literatur bekannten Modellierungsansätzen zur Beschreibung von Abtötungsverhalten durch Antibiotikumseinwirkung. Ein neuer Aspekt konnte jedoch mit der Einführung eines logistischen Terms zu Beschreibung des Zeitversatzes bis zum Einsetzen der Zelllyse hinzugefügt werden, der in dieser Form noch nicht angewendet wurde.

Mit den hier verwendeten Modellen konnten die vorhanden experimentellen Daten detailliert ausgewertet werden. Durch Einbeziehung der Messfehler in die mathematische Modellierung mit Hilfe der *Bootstrap*-Methode war es einerseits möglich die Unsicherheit der dynamischen Simulationsverläufe und der ermittelten Parameterwerte abzubilden, andererseits konnte die Nichtlinearität und die Korrelation der Parameter erfasst werden. Die hohen Varianzen, die für die Simulationsverläufe und die Parameter ermittelt wurden sind zum einen auf das *Bootstrap*-Verfahren, das ohne vereinfachende Annahmen arbeitet, zum anderen auf den relativ hohen Messfehler der qT-RFLP-Methode zurückzuführen. Trotz dieser Einschränkungen zeigte sich durch die ermittelten Parameterwerten, dass eine höhere Antibiotikumskonzentration bei *B. cepacia* zu einer höheren Lyserate  $k_L$  führt und bei *P. aeruginosa* den Zeitversatz  $t_{lag}$  verringert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zweite Wachstumsphase, welche für verschiedene *B. cepacia*-Versuche beobachtet wurde, nur durch Erweiterung der Modelle und Annahme einer resistenten Subpopulation möglich war und nicht etwa durch eine abnehmende Ceftazidimkonzentration.

## 7. Ausblick

Die Modellierung hat gezeigt, dass sich die Messfehler der qT-RFLP-Methode in relativ breiten, überlappenden Konfidenzintervallen der Simulationsverläufe und der Parameterverteilungen niederschlagen. Um dem entgegenzuwirken, sollten weitere Anstrengungen unternommen werden die qT-RFLP-Methode hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Robustheit zu optimieren. Aussichtsreichster Ansatzpunkt ist die Weiterentwicklung des Zellaufschlusses und der DNA-Aufarbeitung zu Beginn der qT-RFLP-Arbeitsanweisung. Weiterhin war der zeitliche Aufwand der qT-RFLP-Analyse relativ hoch, was sich limitierend auf einen zügigen Fortschritt innerhalb des Forschungsvorhabens auswirkte. Eventuell kann auf die Aufreinigung des PCR-Amplifikat verzichtet werden ohne dass die nachfolgenden Schritte (Restriktionsverdau, Fragment Analyse) dadurch beeinträchtigt werden. Somit könnte erheblich Zeit eingespart werden.

Auf Basis der vorhandenen Arbeiten sind Forschungsprojekte denkbar, die sich derselben Herangehensweise bedienen, wobei aber verschiedene Aspekte variiert werden. So können unter Beibehaltung der gleichen Mischkultur und des gleichen Antibiotikums verschiedene Inokulationsverhältnisse oder auch verschiedene Absolutkonzentrationen des Inokulums getestet werden. Beides kann sich auf die Wachstums- und Lysedynamik auswirken, da die hier nachgewiesenen Interspezieseffekte scheinbar auf Virulenzmechanismen zurückgehen und diese wiederum durch das *quorum sensing* System reguliert sein können. Weiterhin können mit der gleichen Dreier-Mischkultur andere Antibiotika oder andere Antibiotikakombinationen mit und ohne Lactamaseinhibitoren (z.B. Clavulansäurem oder Sulbactam) getestet werden. Neben weiteren Bakterienspezies können auch andere Stämme der hier verwendeten Spezies mit anderen Antibiotikaempfindlichkeiten verwendet werden. So waren die hier vorgestellten Mischkulturergebnisse unter anderem durch die individuellen und unterschiedlichen Wirksamkeiten von Ceftazidim beeinflusst. Folglich stellt sich beispielsweise die Frage, ob die Lyse von *P. aeruginosa* in Mischkultur auch bei Stämmen mit geringerer Ceftazidimempfindlichkeit auftritt oder, ob sich ein resistenter *S. aureus*-Stamm in einer ceftazidimbehandelten Mischkultur durchsetzen kann.

Neben den oben beschriebenen Forschungsmöglichkeiten, die eher einer „Wissensverbreiterung“ dienen, können auch die Mechanismen der gefundenen

Interspezieseffekte weiter ergründet werden („Wissensvertiefung“). Die qT-RFLP- Methode quantifiziert Keime in Mischkultur anhand der extrahierten Genomäquivalente. Andere Quantifizierungsmethoden, die Plattenausstriche oder durchflußcytometrische Analysen zielen auf andere Zelleigenschaften ab (z.B. Vitalität). Insofern ist es wahrscheinlich, dass es zwischen den Methoden zu systematischen Abweichungen kommt. Das beinhaltet indes das Potential, dass sich die verschiedenen Methoden mit den individuellen Vor- und Nachteilen sich zu Gunsten eines besseren Einblicks in die Vorgänge einer Mischkultur ergänzen lassen. Beispielsweise ist die qT-RFLP-Methode im Gegensatz zur Plattenausstrichmethode gegenüber morphologischen Veränderungen durch Antibiotikumsbehandlung unempfindlich. Weiterhin sollten die Membranvesikel über separate analytische Methoden in den Fokus der Untersuchungen rücken, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zentrale Rolle in den hier gefundenen antagonistischen Interspezieseffekten spielen.

Wie im Theorieteil ausgeführt, ist das übergeordnete Ziel der *time-kill*-Experimente Bedingungen für einen Behandlungserfolg zu bestimmen. Der in dieser Arbeit durchgeführte erste Schritt zur Untersuchung der Mischkultur war die Kultivierung in statischer Kultur. Der nächste Schritt ist die Untersuchung der Mischkulturen in dynamischer Kultur mit zeitlich variabler Antibiotikumskonzentration, um so dem tatsächlichen Zustand im Patienten näher zu kommen (Pharmacokinetik). Dafür sind Änderungen des experimentellen Aufbaus notwendig, die einen kontinuierlichen Mediums- und Antibiotikumsaustausch zulassen, idealerweise bei gleichzeitiger Rückhaltung der Zellsuspension.

In Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* ohne Antibiotikum verursacht ein vermuteter Interspezieseffekt, eventuell durch Bildung einer Störsubstanz, die Analyse mit der qT-RFLP-Methode. Untersuchungen mit alternativen Quantifizierungsmethoden (z. B. Durchflußcytometrie) bzw. Anpassung des qT-RFLP-Protokolls erlauben eine Untersuchung der Interspezieseffekte auf Basis der Zellkonzentrationen oder mittels HPLC-MS bzw. GC-MS auf Basis der gebildeten Störstoffe.

Ganz allgemein lässt sich sagen, dass Mischkulturen im Bereich der Antibiotikumswirkung bisher wenig, und mit der hier vorgestellten Methode noch gar nicht untersucht wurden und sich allein daraus ein Potential für zahlreiche interessante Erkenntnisse in diesem Bereich



## Ausblick

ergeben. Welche Ergebnisse möglich sind, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Gleichzeitig blieben einige Fragen offen die darauf warten beantwortet zu werden.

## 8. Abbildungen

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Glucosestoffwechsel der Pseudomonaden nach (Lessie and Phibbs 1984). Die gepunkteten Linien zeigen spezielle Charakteristika von <i>Burkholderia cepacia</i> (früher <i>Pseudomonas cepacia</i> ) an. Alle anderen Reaktionen wurden für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nachgewiesen. ....   | 9  |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung eines typischen <i>time-kill</i> Experiments (durchgezogene Linie) und unbehandelte Kontrolle (gestrichelte Linie). Phase I: Wachstum bzw. <i>Lag</i> -Phase, Phase II: Abtöten, Phase III: erneutes Wachstum. ....  | 12 |
| Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>P. aeruginosa</i> MB3286 nach der Inkubation mit $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ceftazidim für 7 h. Weiße Linie = $1 \mu\text{m}$ . (Jackson and Kropp 1996) .....  | 15 |
| Abbildung 4: Chemischer Zerfall von Ceftazidim unter Versuchsbedingungen. Gemessen mit HPLC-Methode (siehe oben). Nichtlineare Regression .....  | 35 |
| Abbildung 5: Beispiel für eine Sinusfunktion nach Gleichung 14. <i>L</i> : vorgegebene Intervallgrenzen in denen sich der Schätzwert <i>NO</i> bewegen darf, <i>NO</i> * für den Optimieralgorithmus frei wählbarer Parameterwert, <i>NM</i> , 0 Mittelwert der mehrfach bestimmten Messwerte .....  | 39 |
| Abbildung 6: Beispielerverteilung einer spezifischen Wachstumsrate nach einer <i>Bootstrap</i> -Analyse mit 2000 Anpassungen. $\mu_{D,N}$ bzw. $\mu_{D,np}$ : Modalwert der angepassten Normalverteilung bzw. der nichtparametrischen Verteilung, $\mu_N$ bzw. $\mu_{np}$ Mittelwert der angepassten Normalverteilung bzw. der nichtparametrischen Verteilung .....  | 42 |
| Abbildung 7: Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>S. aureus</i> in Reinkulturen (a) und in der Dreier-Mischkultur (b) ohne Ceftazidim. Die Zellverdopplungen wurden nach Gleichung 11 berechnet (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme aus drei parallelen Kultivierungen)). ....  | 46 |
| Abbildung 8: Verlauf der Metabolite in den Reinkulturexperimenten von <i>P. aeruginosa</i> (a), <i>B. cepacia</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) und in der Dreier-Mischkultur (d) ohne Ceftazidim. Glucose - blau, Gluconat - cyan, 2KDG - dunkelgrün, Glutamin - orange, Glutamat - rot. Aufgetragen sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus drei Messwerten (Einfachbestimmung aus drei parallelen Kultivierungen). .... | 47 |
| Abbildung 9: Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>S. aureus</i> in Reinkulturen (a) und in der Dreier-Mischkultur (b) mit jeweils $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ceftazidim. Die Zellverdopplungen wurden nach Gleichung 11 berechnet (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme aus drei parallelen Kultivierungen)).....               | 48 |
| Abbildung 10: Ceftazidimkonzentrationen in den <i>time-kill</i> -Experimenten aus Abbildung 7 und Abbildung 9. Der theoretische Konzentrationsverlauf auf Grund von chemischem Zerfall wurde theoretisch berechnet (siehe „Ceftazidimlösung“). ....  | 50 |
| Abbildung 11: Wachstum der Keime in der jeweiligen Zweier-Mischkultur ohne Zugabe von Ceftazidim:. ....  | 51 |

- Abbildung 12: Wachstum der Keime mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim in der jeweiligen Zweier-Mischkultur: (a) *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, (b) *P. aeruginosa* und *S. aureus*, (c) *B. cepacia* und *S. aureus*. Die Werte sind in absoluten Zellkonzentrationen gegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander bestimmten Messwerten (doppelte Probenahme und aus drei parallelen Kultivierungen). ..... 53
- Abbildung 13: Optimale Wirkungsbereiche von Ceftazidim für das jeweilige Bakterium anhand des MHK-Wertes. Mittelstrich der jeweiligen Box: MHK-Wert; linke bzw. rechte Grenze der Box entspricht  $\pm 4 \times$  MHK-Wert). Die im Experiment (Abbildung 14) angewendeten Ceftazidimkonzentrationen ( $5, 15, 30$  und  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sind als senkrechte gestrichelte Linien eingezeichnet. .... 55
- Abbildung 14: *Time-kill* Experiment mit der 3er-Mischkultur und unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen ( $5, 15, 30$  und  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Jedes Konzentrationsexperiment wurde in drei parallelen Schüttelkolben kultiviert (jeder Datenpunkt: Mittelwert  $\pm$  Std.-abw.). Die Zellkonzentrationen wurden doppelt bestimmt. Zellkonzentrationen ( $\text{ge mL}^{-1}$ ) von *P. aeruginosa* (a), *B. cepacia* (b) und *S. aureus* (c). Metabolitkonzentrationen (mM) von Glutamin und Glutamat (d) ; Glucose, Gluconat und 2KDG (e). Ceftazidimkonzentrationen und chemischer Zerfall von Ceftazidim (f) („siehe Ceftazidim“)..... 57
- Abbildung 15: Darstellung der linearen Korrelation zwischen eingesetzter Ceftazidimkonzentration in der 3er-Mischkultur und der Abbaurate des Antibiotikums. .... 59
- Abbildung 16: Gesamtkonzentrationen von Glucose+Gluconat+2KDG in der Reinkultur von *B. cepacia* (a) und der Dreier-Mischkultur (b), jeweils mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen ( $5, 15, 30$  und  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) behandelt. .... 60
- Abbildung 17: Ceftazidimkonzentration in der Reinkultur von *B. cepacia* (a) und der Dreier-Mischkultur (b), jeweils mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen ( $5, 15, 30$  und  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) behandelt. .... 61
- Abbildung 18: Lineare Korrelation der eingesetzten Ceftazidimkonzentration und der Abbaurate des Antibiotikums..... 61
- Abbildung 19: *Time-kill*-Experiment mit der 3er-Mischkultur. Nach 24 h wurden die bis dahin identischen Versuchsansätze unterschiedlich behandelt. In einem Ansatz wurde verbrauchtes Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. In einem weiteren Ansatz wurde neben dem frischen Medium auch erneut  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim zugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der über 49 h ohne weiteres Eingreifen kultiviert wurde. Jeder Ansatz wurde in drei parallelen Schüttelkolben kultiviert (jeder Datenpunkt: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Die Zellkonzentrationen wurden doppelt bestimmt.. .... 63
- Abbildung 20: Anpassung des logistischen Wachstumsmodells an die Mischkultivierung der drei Keime ohne Ceftazidim. Linien: Simulationsverlauf mit den Parametern der minimale FQS-Schätzung  $\theta$ . Gestrichelte Linien: 95 %-Konfidenzintervalle der Simulation (Bootstrap-Methode). Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte von *P. aeruginosa* (■), *B. cepacia* (●) und *S. aureus* (▲). .... 67
- Abbildung 21: Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $\mu_i$  und  $N_{max,i}$  für den jeweiligen Stamm resultierend aus der *Bootstrap*-Analyse des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die

speziesspezifischen Daten einer Mischkultivierung ohne Ceftazidimbehandlung. Gezeigt sind die jeweiligen 95 %-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau (a). *B. cepacia*: rot (b). *S. aureus*: grün (c)... 69

Abbildung 22: Simulationen des logistischen Wachstums von *P. aeruginosa* (a) und *B. cepacia* (b) mit verschiedenen Parametersätzen..... 71

Abbildung 23: (a) Modellanpassung von Gleichung 24 an den Konzentrationsverlauf von *P. aeruginosa* in Dreier-Mischkultur mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim. .... 73

Abbildung 24: Anpassung des Modells aus Gleichung 24 an die Mischkultivierung der drei Keime mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim. .... 74

Abbildung 25: Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $\mu$ ,  $k_L$  und  $t_{lag}$  in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der Bootstrap-Analyse des Lysemodells (Gleichung 24) mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim). Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau. *B. cepacia*: rot. *S. aureus*: grün. Weitere Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet..... 76

Abbildung 26: (a) Anpassung des Modells aus Gleichung 25 an die Zellkonzentrationsdaten von *B. cepacia* im Kontrollexperiment der 48 h-Kultivierung der Dreier-Mischkultur mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (Zugabe bei  $t = 0$  h, siehe auch Abbildung 19b)..... 78

Abbildung 27: Parameterverteilung und Parameterkorrelation der Parameter  $k_L$  und  $EC_{50}$  (a) bzw.  $t_{lag}$  und  $EC_{50}$  (b) von *B. cepacia*. Die Daten resultieren aus der Bootstrap-Analyse des Modells aus Gleichung 25 mit den Messwerten des Kontrollkolbens des 48 h *time-kill*-Experiments. Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen. .... 79

Abbildung 28: (a) Simulationsstudie mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationsprofilen. Grundlage sind die Bootstrap-Parametersätze aus der Anpassung des Modells (Gleichung 25) an die Daten von *B. cepacia* des Kontrollkolbens (siehe Abbildung 26, Tabelle 18). Linien: Simulationsverlauf bzw. Regressionsgeraden. .... 80

Abbildung 29: Simulation der drei *B. cepacia*-Datensätze mit dem Modell aus Gleichung 27 & Gleichung 28, Linien: Simulierte Gesamtzellkonzentration..... 82

Abbildung 30: Messwert und angepasste Simulationskurven mit Konfidenzintervallen von *P. aeruginosa* mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (a)(blau), mit  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (a)(rot), mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (b)(grün) und mit  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (b)(schwarz), sowie von *B. cepacia* mit  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (c)(blau), mit  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (c)(rot), mit  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (d)(grün) und mit  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim (d)(schwarz) ..... 84

Abbildung 31: Vergleich der Gluconatkonzentrationsprofile in verschiedenen Kultivierungen mit *B. cepacia*. .... 90

Abbildung 32: Simulation von *P. aeruginosa* (blau), *B. cepacia* (rot) und *S. aureus* (grün) mit Lysemodell (Gleichung 24). Zellkonzentration über längeren Zeitbereich mit beispielhaften Parameterwerten: *P.*

*aeruginosa*:  $\mu = 1,67 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 1,17 \text{ h}^{-1}$ ; *S. aureus*  $\mu = 0,97 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 0,42 \text{ h}^{-1}$ ; *B. cepacia*  $\mu = 0,94 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_L = 1,00 \text{ h}^{-1}$

..... 107

**Abbildung 33:** Ergänzende Parameterverteilung und –varianzen zu Abbildung 25. Parameterkorrelation der Parameter  $\mu$ ,  $k_L$  und  $t_{lag}$  in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der *Bootstrap*-Analyse des Lysemodells (Gleichung 24) mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim). Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau. *B. cepacia*: rot. *S. aureus*: grün. Weitere Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet..... 127

**Abbildung 34:** Ergänzende Parameterverteilung und –varianzen zu Abbildung 27. Parameterkorrelation der Parameter  $k_L$ ,  $t_{lag}$ ,  $H$ ,  $EC_{50}$  und  $N_{max}$  des Keims *B. cepacia* in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der *Bootstrap*-Analyse des Modells gegeben durch Gleichung 25 mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .Ceftazidim) und einer verlängerten Kultivierungszeit von 48 h. Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen..... 128

## 9. Tabellen

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Validierungsparameter der qT-RFLP-Methode (Schmidt et al. 2007) .....   | 31 |
| Tabelle 2: HPLC-Methode zur Detektion von Ceftazidim .....   | 33 |
| Tabelle 3: Elutionsprofil der HPLC-Methode aus Tabelle 2 .....   | 34 |
| Tabelle 4: Validierungsparameter der Ceftazidimquantifizierung .....   | 34 |
| Tabelle 5: Konzentrationen der verschiedenen Kalibrationslevel für Ceftazidim .....  | 34 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung der Kalibrationsstandards der Metabolitmessung.....   | 35 |
| Tabelle 7: Validierungsparameter des BioProfile 100 Plus .....   | 36 |
| Tabelle 8: HPLC-Methode zur Detektion von Gluconat und 2KDG .....  | 36 |
| Tabelle 9: Validierungsparameter der RezexOA-Methode .....   | 37 |
| Tabelle 10: Konzentrationen der verschiedenen Kalibrationslevel für Gluconat, 2KDG, Acetat und Pyruvat ..  | 37 |
| Tabelle 11: Vorgehen bei der Bestimmung der Startwerte zur Parameteroptimierung.....   | 38 |
| Tabelle 12: Maximale Zellkonzentrationen $\pm$ Standardabweichung. ....  | 49 |
| Tabelle 13: Bestimmtheitsmaße $B$ nach Anpassung des logistischen Modells (Gleichung 2) und des nichtlinearen Alternativmodells (Gleichung 3) und die Wachstumskurven aus Abbildung 7 .....  | 66 |
| Tabelle 14: <i>Bootstrap</i> -Modellparameter der Anpassung des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen des Mischkulturexperiments ohne Antibiotikum (Abbildung 19). Das Modell wurde für jeden Keim separat angepasst. ....   | 68 |
| Tabelle 15: <i>Bootstrap</i> -Modellparameter der Anpassung des logistischen Wachstumsmodells (Gleichung 2) an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen des Mischkulturexperiments ohne Antibiotikum (Abbildung 19). ....  | 70 |
| Tabelle 16: Fehlerquadratsumme FQS und die relative Fehlerquadratsumme für jede der Simulationen aus Abbildung 22. ....  | 72 |
| Tabelle 17: Mischkultivierung mit Ceftazidim: Parameter-Schätzwerte ( $\pm$ 95 %-Konfidenzintervalle) einer Anpassung (minimale FQS-Schätzung) des Lysemodells (aus Gleichung 24) an die Mittelwerte der sechsfach bestimmten Messwerte (Abbildung 7b). ....   | 75 |
| Tabelle 18: <i>Bootstrap</i> -Modellparameter der Anpassung von Modell in Gleichung 25 an die sechsfach gemessenen Zellkonzentrationen von <i>B. cepacia</i> im Kontrollkolben des 48 h <i>time-kill</i> -Experiments ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ceftazidim bei $t = 0$ h, Abbildung 19). Die spezifische Wachstumsrate wurde mit einem Wert von $\mu = 0,70 \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 17) nicht zur Anpassung freigegeben. ....                                | 79 |
| Tabelle 19: <i>Bootstrap</i> -Modellparameter der simultanen Anpassung des Modells in Gleichung 27 und Gleichung 28 und an die drei Datensätze von <i>B. cepacia</i> im 48 h <i>time-kill</i> -Experiment: Ceftazidimpuls bei 0 h (Kontrollexperiment), zwei Ceftazidimpulse bei 0 h und 24 h (jeweils $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ceftazidim) und einem Ceftazidimpuls ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit Entfernung des Ceftazidims nach 24 h (Abbildung 19)..... | 83 |
| Tabelle 20: Anpassung des Lysemodells (Gleichung 24) an die Mischkulturdaten von <i>P. aeruginosa</i> und <i>B. cepacia</i> bei Behandlung mit unterschiedlichen Ceftazidimkonzentrationen (siehe auch Abbildung 14a und b). ....  | 86 |

## Tabellen

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabelle 21: Herstellung einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS).....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 22:Herstellung der Tris-HCl-Lösung (1 M; pH 8,0) .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 23: Herstellung einer EDTA-Lösung (0,5 M) .....</b>  | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 24: Herstellung des Lysispuffers.....</b>  | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 25: Herstellung einer Lysozymlösung (100 mgmL<sup>-1</sup>) .....</b>  | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 26: Herstellung einer Lysostaphinlösung (1 mgmL<sup>-1</sup>).....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 27: Herstellung einer RNAase A-Lösung (20 mgmL<sup>-1</sup>) .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 28: Herstellung von TPE-Puffer .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Tabelle 29: Herstellung des 5fachen Ladepuffers für die Gelelektrophorese eines PCR-Produktes.....</b>   | <b>130</b> |
| <b>Tabelle 30: Chemikalienliste .....</b>   | <b>130</b> |
| <b>Tabelle 31: Geräteliste.....</b>   | <b>132</b> |
| <b>Tabelle 32: Zusammensetzung des StandardmediumsM199 – nach Herstellerangaben. Für das „reduzierte Medium“ wurden die mit „*“ markierten Komponenten in der entsprechenden Konzentration in Wasser gelöst .....</b> | <b>133</b> |

## 10. Literaturverzeichnis

- Allan, N.D., Kooi, C., Sokol, P.A. and Beveridge, T.J. (2003) Putative virulence factors are released in association with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Canadian Journal of Microbiology* **49** 613-624
- Amsterdam, D. (2005) Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* ed. Lorian, V. pp.61-143. New York: Lippincott Williams &Wilkins.
- Barger, A., Fuhst, C. and Wiedemann, B. (2003) Pharmacological indices in antibiotic therapy. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 893-898.
- Barrett, F.F.M.J.R.F.F.M. (1968) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *New England Journal of Medicine* **279** 441-448
- Bast, E. (1999) *Mikrobiologische Methoden*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Boucher, R.C. (2002) An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 1359-1371.
- Brogden, K.A., Guthmiller, J.M. and Taylor, C.E. (2005) Human polymicrobial infections. *Lancet* **365**, 253-255.
- Brown, M.R.W. and Garrett, E.R. (1964) Kinetics + Mechanisms of Action of Antibiotics On Microorganisms I - Reproducibility of *Escherichia Coli* Growth Curves + Dependence Upon Tetracycline Concentration. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **53**, 179-183.
- Bulitta, J.B., Landersdorfer, C.B., Huttner, S.J., Drusano, G.L., Kinzig, M., Holzgrabe, U., Stephan, U. and Sorgel, F. (2010) Population Pharmacokinetic Comparison and Pharmacodynamic Breakpoints of Ceftazidime in Cystic Fibrosis Patients and Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **54**, 1275--1282.
- Bulitta, J.B., Ly, N.S., Yang, J.C., Forrest, A., Jusko, W.J. and Tsuji, B.T. (2009) Development and Qualification of a Pharmacodynamic Model for the Pronounced Inoculum Effect of Ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **53** 46-56.
- Burns, J.L., Gibson, R.L., McNamara, S., Yim, D., Emerson, J., Rosenfeld, M., Hiatt, P., McCoy, K., Castile, R., Smith, A.L. and Ramsey, B.W. (2001) Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 444-452.
- Cafini, F., Aguilar, L., Sevellano, D., Gimenez, M.J., Alou, L., Fenoll, A., Echevarria, O., Torrico, M., Gonzalez, N., Coronel, P. and Prieto, J. (2008) Decrease in bacterial load versus resistance selection of pneumococcal subpopulations by beta-lactam physiological concentrations over time: An in vitro pharmacodynamic simulation. *Microbial Drug Resistance* **14**, 13-21.
- Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., Repetto, T., Doring, G. and de Martino, M. (2004) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros* **3**, 159-163.
- Chmiel, H., Briechle, S., Fischer, L., Hilterhaus, L., Howaldt, M., Kempken, R., Klemptner, K.H., Liese, A., Otto, M.A., Röthig, T., Schnepfle, H., Sonnleitner, B. and Walitza, E.W.F. (2006) *Bioprozesstechnik*. Munich, Germany: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- Chung, P., McNamara, P.J., Champion, J.J. and Evans, M.E. (2006) Mechanism-based pharmacodynamic models of fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **50**, 2957-2965.
- Cohen, M.L. (1992) Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257** 1050-1055
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318 - 1322.
- Coulson, A.F.W. (1984) Proteins that bind the beta-lactam antibiotics. *Nature* **309**, 648.
- Craig, W.A., Bhavnani, S.M. and Ambrose, P.G. (2004) The inoculum effect: Fact or artifact? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **50**, 229-230.



- Craig, W.A.E.S.C. (1990) Killing and regrowth of bacteria in vitro: A review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement* **22**, 63-70.
- Czock, D. and Keller, F. (2007) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antimicrobial drug effects. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* **34**, 727-751.
- Czock, D., Markert, C., Hartman, B. and Keller, F. (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology* **5**, 475-487.
- Dalhoff, A. and Cullmann, W. (1984) Specificity of Beta-lactamase Induction In *Pseudomonas-aeruginosa*. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **14**, 349-357.
- Desai, M., Buhler, T., Weller, P.H. and Brown, M.R.W. (1998) Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **42** 153-160
- DIN58940-81 (2002) Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika ed. Normung, D.I.f.
- Dorwart, M., Thibodeau, P. and Thomas, P. (2004) Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**, 91-94.
- dos Santos, K.V., Diniz, C.G., Coutinho, S.C., Apolonio, A.C.M., de Sousa-Gaia, L.G., Nicoli, J.R., Farias, L.D. and de Carvalho, M.A.R. (2007) In vitro activity of piperacillin/tazobactam and ertapenem against *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* in pure and mixed cultures. *Journal Of Medical Microbiology* **56**, 798-802.
- Dost, F. (1953) *Der Blutspiegel: Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit*: G. Thieme-Verlag, Leipzig.
- Drusano, G.L. (2004) Antimicrobial pharmacodynamics: Critical interactions of 'bug and drug'. *Nature Reviews Microbiology* **2** 289-300
- Ebert, S.C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of irreversible drug effects. In *Handbook of Pharmacokinetic-pharmacodynamic Correlation* ed. H. Derendorf, G.H. pp.35-56. Boca Raton: CRC Press.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O. and Mobashery, S. (2005) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews* **105**, 395-424.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of culture of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **10**, 226-236.
- Fredrickson, A.G. (1983) Interactions of Microbial-populations In Mixed Culture Situations. *ACS Symposium Series* **207** 201-227
- Frere, J.M., Joris, B., Crine, M. and Martin, H.H. (1989) Quantitative Relationship Between Sensitivity To Beta-lactam Antibiotics and Beta-lactamase Production In Gram-negative Bacteria .2. Non-steady-state Treatment and Progress Curves. *Biochem Pharmacol* **38**, 1427-1433.
- George, A.M., Jones, P.M. and Middleton, P.G. (2009) Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *Fems Microbiology Letters* **300**, 153-164.
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H. and Wecke, J. (1998) Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1371-1414.
- Gillespie, S.H. (2001) *Antibiotic Resistance - Methods and Protocols*. New Jersey, US: Humana Press.
- Gilligan, P.H. (1991) Microbiology of Airway Disease In Patients With Cystic-fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 35-51.
- Gloede, J., Scheerans, C., Derendorf, H. and Kloft, C. (2010) In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **65**, 186--201.
- Goerke, C. and Wolz, C. (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology* **300** 520-525
- Goldstein, E.J.C. and Snyderman, D.R. (2004) Intra-abdominal infections: review of the bacteriology, antimicrobial susceptibility and the role of ertapenem in their therapy. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **53** ii29 -ii36

- Gonzalez, N., Aguilar, L., Alou, L., Gimenez, M.J., Sevillano, D., Torrico, M., Cafini, F., Coronel, P. and Prieto, J. (2009) Influence of different resistance traits on the competitive growth of Haemophilus influenzae in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different beta-lactams: an in vitro pharmacodynamic approach. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 1215-1222.
- Goodwin, G. and Payne, R. (1977) *Dynamic System Identification: Experimental Design and Data Analysis*. New York: Academic Press.
- Greenwood, D. (2008) *Antimicrobial Drugs - Chronicle of a Twentieth Century Medical Triumph*. Oxford: Oxfors University Press.
- Guss, A.M., Roeselers, G., Newton, I.L.G., Young, C.R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S. and Cavanaugh, C.M. (2011) Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *Isme Journal* **5** 20-29.
- Haefner, J.W. (2005) *Modeling Biological Systems*. New York, US: Springer.
- Hanberger, H., Nilsson, L.E., Nilsson, M. and Maller, R. (1991) Postantibiotic Effect of Beta-lactam Antibiotics On Gram-negative Bacteria In Relation To Morphology, Initial Killing and Mic. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **10** 927-934.
- Harrison, F. (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology-Sgm* **153**, 917-923.
- Heine, T. (2004) Modellgestützte Überwachung und Führung von Fed-Batch-Prozessen zur Antibiotikaproduktion: Technische Universität Berlin.
- Heizmann, W.R., Heilmann, F., Egeler, B. and Werner, H. (1990) Efficacy of Sulbactam In An Invitro Model of Mixed Aerobic Anaerobic Infections. *Infection* **18** 117-121.
- Hermesen, E.D., Hovde, L.B., Sprandel, K.A., Rodvold, K.A. and Rotschafer, J.C. (2005) Levofloxacin plus metronidazole administered once daily versus moxifloxacin monotherapy against a mixed infection of Escherichia coli and Bacteroides fragilis in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **49** 685-689
- Holden, M.T.G., Seth-Smith, H.M.B., Crossman, L.C., Sebahia, M., Bentley, S.D., Cerdeno-Tarraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E.P.C., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R., Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E. and Parkhill, J. (2009) The Genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an Epidemic Pathogen of Cystic Fibrosis Patients. *Journal Of Bacteriology* **191** 261-277
- Hurley, J.C., Miller, G.H. and Smith, A.L. (1995) Mechanism of Amikacin Resistance In Pseudomonas-aeruginosa Isolates From Patients With Cystic-fibrosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **22**, 331-336
- Jackson, J.J. and Kropp, H. (1996) Differences in mode of action of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vivo antibiotic efficacy. *Journal of Endotoxin Research* **3**, 201-218.
- Jacoby, G.A. (2006) beta-lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **50**, 1123-1129.
- Joshi, A., Kremling, A. and Seidel-Morgenstern, A. (2006a) Model based statistical analysis of adsorption equilibrium data. *Chemical Engineering Science* **61** 7805-7818
- Joshi, M., Seidel-Morgenstern, A. and Kremling, A. (2006b) Exploiting the bootstrap method for quantifying parameter confidence intervals in dynamical systems. *Metabolic Engineering* **8**, 447-455.
- Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J. (1996) Bacteriolytic effect of membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens: Conceptually new antibiotics. *Journal Of Bacteriology* **178** 2767-2774
- Kahl, B.C., Duebbers, A., Lubritz, G., Haeberle, J., Koch, H.G., Ritzerfeld, B., Reilly, M., Harms, E., Proctor, R.A., Herrmann, M. and Peters, G. (2003) Population dynamics of persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *Journal Of Clinical Microbiology* **41** 4424-4427
- Katsube, T., Yano, Y., Wajima, T., Yamano, Y. and Takano, M. (2010) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling and Simulation to Determine Effective Dosage Regimens for Doripenem. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **99** 2483--2491

- Katsube, T., Yano, Y., Yamano, Y., Munekage, T., Kuroda, N. and Takano, M. (2008) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation for bactericidal effect in an in vitro dynamic model. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **97** 4108-4117
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J.C. and Ohman, D.E. (1993) Secreted LasA of *Pseudomonas-aeruginosa* Is a staphylolytic Protease. *Journal Of Biological Chemistry* **10**, 7503-7508
- Koolmann, J. and Röhm, K.-H. (2003) *Taschenatlas der Biochemie*: Thieme.
- Krause, R.M. (1992) The origin of plagues: old and new. *Science* **257** 1073-1078.
- Lee, E.Y., Choi, D.S., Kim, K.P. and Gho, Y.S. (2008) Proteomics In Gram-negative Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Mass Spectrometry Reviews* **27**, 535-555
- Lee, E.Y., Choi, D.Y., Kim, D.K., Kim, J.W., Park, J.O., Kim, S., Kim, S.H., Desiderio, D.M., Kim, Y.K., Kim, K.P. and Gho, Y.S. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *PROTEOMICS* **9**, 5425-5436.
- Lehtinen, J., Jarvinen, S., Virta, M. and Lilius, E.M. (2006) Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *Journal Of Microbiological Methods* **66** 381-389.
- Lessie, T.G. and Phibbs, P.V. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonads*. *Annu Rev Microbiol* **38** 359-387
- Levy, G. (1994) Mechanism-based Pharmacodynamic Modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **56** 356-358
- Li, R.C. (1996) Simultaneous pharmacodynamic analysis of the lag and bactericidal phases exhibited by beta-lactams against *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **40** 2306-2310
- Li, R.C. (2000) New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. *International Journal Of Antimicrobial Agents* **13** 229-235
- Li, R.C., Nix, D.E. and Schentag, J.J. (1994) Pharmacodynamic Modeling Of Bacterial Kinetics - Beta-Lactam Antibiotics Against *Escherichia-Coli*. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **83**, 970-975
- Liou, T.G., Adler, F.R., FitzSimmons, S.C., Cahill, B.C., Hibbs, J.R. and Marshall, B.C. (2001) Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *American Journal of Epidemiology* **153** 345-352
- Lubasch, A., Luck, S., Lode, H., Mauch, H., Lorenz, J., Bolcskei, P. and Welte, T. (2003) Optimizing ceftazidime pharmacodynamics in patients with acute exacerbation of severe chronic bronchitis. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **51** 659-664
- MacDonald, K.L. and Beveridge, T.J. (2002) Bactericidal effect of gentamicin-induced membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on gram-positive bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 810-820.
- Mackenzie, F.M., Gould, I.M., Chapman, D.G. and Jason, D. (1994) Comparison of Methodologies Used In Assessing the Postantibiotic Effect. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **34** 223-230
- MacLeod, D.L., Nelson, L.E., Shwar, R.M., Lin, B.B., Lockwood, L.G., Dirks, J.E., Miller, G.H., Burns, J.L. and Garber, R.L. (2000) Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1180-1184.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006) *Brock - Biology of Microorganisms*. New York: Pearson Prentice Hall.
- Mashburn, L.M., Jett, A.M., Akins, D.R. and Whiteley, M. (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *Journal Of Bacteriology* **187** 554-566
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. and Frere, J.M. (1998) Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochemical Journal* **330** 581-598
- Mattie, H. (1981) Kinetics of Anti-microbial Action. *Reviews of Infectious Diseases* **3**, 19-27
- McDermid, A.S., McKee, A.S. and Marsh, P.D. (1987) A Mixed-culture Chemostat System To Predict the Effect of Antimicrobial Agents On the Oral Flora - Preliminary Studies Using Chlorhexidine. *Journal of Dental Research* **66** 1315-1320.

- McDermott, P.F., Walker, R.D. and White, D.G. (2003) Antimicrobials: Modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology* **22** 135--143
- Montgomery, D.C., Runger, G.C. and Hubele, N.F. (2001) *Engineering Statistics*. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons, Inc.
- Nagy, E., Werner, H. and Heizmann, W. (1990) In-vitro Activity of Daptomycin-metronidazole Combinations Against Mixed Bacterial Cultures - Reduced Activity of Metronidazole Against Bacteroides Species In the Presence of Enterococcus-faecalis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **9** 287-291
- NCCLS (2000) Methods for dilution and antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard M7-A5.
- Nelder, J.A. and Mead, R. (1965) A simplex method for function minimization. *The Computer journal* **7(4)** 308-313
- Neu, H.C. (1985) Carbapenems: special properties contributing to their activity. *Am J Med* **78** 33-40
- Nielsen, J.B.K. and Lampen, J.O. (1982) Membrane-bound Penicillinases In Gram-positive Bacteria. *Journal Of Biological Chemistry* **257**, 4490-4495.
- Nolting, A., DallaCosta, T., Rand, K.H. and Derendorf, H. (1996) Pharmacokinetic pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin in vitro. *Pharmaceutical Research* **13** 91-96
- Pedron, T. and Sansonetti, P. (2008) Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: An intriguing menage a trois. *Cell Host & Microbe* **3**, 344-347.
- Peeters, E., Nelis, H.J. and Coenye, T. (2009) In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile Burkholderia cepacia complex bacteria. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **64** 801-809
- Pendland, S.L., Jung, R., Messick, C.R., Schriever, C.A. and Patka, J. (2002) In vitro bactericidal activity of piperacillin, gentamicin, and metronidazole in a mixed model containing Escherichia coli, Enterococcus faecalis, and Bacteroides fragilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **43** 149-156
- Ponte, C., Soriano, F. and Santamaria, M. (1984) Activity of Imipenem Against High Inocula of Bacteroides Species and Escherichia-coli Alone and In Mixed Culture. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **3**, 491-493.
- Sachs, L. and Hedderich, J. (2009) *Angewandte Statistik*. Heidelberg, Germany: Springer.
- Schaumann, R., Goldstein, E.J.C., Forberg, J. and Rodloff, A.C. (2005) Activity of moxifloxacin against Bacteroides fragilis and Escherichia coli in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model employing pure and mixed cultures. *Journal Of Medical Microbiology* **54** 749-753
- Schlegel, H.G. (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*: Thieme Verlag.
- Schmidt, J.K. (2008) *Quantitative Experimental Characterization and Mathematical Modeling of Mixed Culture Dynamics*. Aachen: Shaker Verlag
- Schmidt, J.K., König, B. and Reichl, U. (2007) Characterization of a three bacteria mixed culture in a chemostat: Evaluation and application of a quantitative terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for absolute and species specific cell enumeration. *Biotechnology And Bioengineering* **96** 738-756
- Schmidt, S., Barbour, A., Sahre, M., Rand, K.H. and Derendorf, H. (2008) PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. *Current Opinion In Pharmacology* **8** 549-556
- Schuck, E.L. and Derendorf, H. (2005) Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of anti-infective agents. *Expert review of anti-infective therapy* **3** 361-373
- Seber, G.A.F. (2003) *Nonlinear regression*. New York: Wiley-Interscience.
- Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., Gimenez, M.J., Echevarria, O., Cafini, F., Valero, E., Fenoll, A. and Prieto, J. (2006) Effects of antimicrobials on the competitive growth of Streptococcus pneumoniae: a pharmacodynamic in vitro model approach to selection of resistant populations. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **58** 794-801

- Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., Gimenez, M.J., Gonzalez, N., Torrico, M., Cafini, F., Coronel, P. and Prieto, J. (2008) beta-Lactam Effects on Mixed Cultures of Common Respiratory Isolates as an Approach to Treatment Effects on Nasopharyngeal Bacterial Population Dynamics. *Plos One* **3** e3846
- Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., Gimenez, M.J., Gonzalez, N., Torrico, M., Cafini, F., Garcia-Rey, C., Garcia-Escribano, N. and Prieto, J. (2010) Exposure-response analysis of tigecycline in pharmacodynamic simulations using different size inocula of target bacteria. *International Journal Of Antimicrobial Agents* **36** 137--144
- Shrivastava, S.M., Shukla, S.K. and Chaudhary, M. (2009) Comparison of antimicrobial efficacy of a fixed dose combination of ceftazidime plus sulbactam with ceftazidime and sulbactam alone against five bacteria. *Folia Microbiologica* **54**, 391-394.
- Soriano, F., Ponte, C. and Santamaria, M. (1983) Activity of Cefotaxime and Metronidazole Against Bacteroides and Escherichia-coli Alone and In Mixed Culture. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* **12** 89-92.
- Soriano, F. and Ponte, M.C. (1984) Comparative Activities of Aztreonam and Cefotaxime Against Escherichia-coli and Bacteroides Spp In Pure and Mixed Cultures. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **26** 39-41.
- Spiegelman, D., Whissell, G. and Greer, C.W. (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* **51** 355-386.
- Spratt, B.G. (1980) Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 273-283.
- Spratt, B.G., Jobanputra, V. and Zimmermann, W. (1977) Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12. *Antimicrob Agents Chemother* **12**, 406-409.
- Stearne, L.E.T., Kooi, C., Goessens, W.H.F., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M. and Gyssens, I.C. (2001) In vitro activity of trovafloxacin against Bacteroides fragilis in mixed culture with either Escherichia coli or a vancomycin-resistant strain of Enterococcus faecium determined by an anaerobic time-kill technique. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **45** 243-251.
- Steel, C., Wan, Q. and Xu, X.H.N. (2004) Single live cell imaging of chromosomes in chloramphenicol-induced filamentous Pseudomonas aeruginosa. *Biochemistry* **43**, 175-182.
- Swanson, B.L., Hager, P., Phibbs, P., Ochsner, U., Vasil, M.L. and Hamood, A.N. (2000) Characterization of the 2-ketogluconate utilization operon in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Molecular Microbiology* **37** 561-573.
- Tlemcani, L.L., Corroler, D., Barillier, D. and Mosrati, R. (2008) Physiological states and energetic adaptation during growth of Pseudomonas putida mt-2 on glucose. *Archives Of Microbiology* **190**, 141-150.
- Trotha, R., Reichl, U., Thies, F.L., Sperling, D., Konig, W. and Konig, B. (2002) Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. *Electrophoresis* **23**, 1070-1079.
- Turnidge, J.D. (1998) The pharmacodynamics of beta-lactams. *Clinical Infectious Diseases* **27**, 10-22.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. and Govan, J.R.W. (1997) Occurrence of multiple genomovars of Burkholderia cepacia in cystic fibrosis patients and proposal of Burkholderia multivorans sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47** 1188-1200
- Vicente, M. and Canovas, J.L. (1973) Regulation Of Glycolytic Enzymes In Pseudomonas-Putida. *Archiv Fur Mikrobiologie* **93** 53-64
- Washington, J.A., Jones, R.N., Gerlach, E.H., Murray, P.R., Allen, S.D. and Knapp, C.C. (1993) Multicenter Comparison of In-vitro Activities of Fk-037, Cefepime, Ceftriaxone, Ceftazidime, and Cefuroxime. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **37**, 1696-1700.
- Whiting, P.H., Midgley, M. and Dawes, E.A. (1976a) The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in Pseudomonas aeruginosa. *The Biochemical journal* **154**, 659-668.
- Whiting, P.H., Midgley, M. and Dawes, E.A. (1976b) The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa. *Journal Of General Microbiology* **92**, 304-310.

Wiedemann, B., Pfeifle, D., Wiegand, I. and Janas, E. (1998) beta-lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. *Drug Resistance Updates* **1** 223-226

Yano, Y., Oguma, T., Nagata, H. and Sasaki, S. (1998) Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics. *J Pharm Sci* **87**, 1177-1183.

Zemanick, E.T., Sagel, S.D. and Harris, J.K. (2011) The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Current Opinion In Pediatrics* **23** 319-324

Zhanel, G.G., Lam, A., Schweizer, F., Thomson, K., Walkty, A., Rubinstein, E., Gin, A.S., Hoban, D.J., Noreddin, A.M. and Karlowsky, J.A. (2008) Ceftobiprole - A review of a broad-spectrum and anti-MRSA cephalosporin. *American Journal of Clinical Dermatology* **9**, 245-254.

Zhou, M.X. and Notari, R.E. (1995) Influence of Ph, Temperature, and Buffers On the Kinetics of Ceftazidime Degradation In Aqueous-solutions. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **84**, 534-538.

## Appendix

## Mischkultur mit Ceftazidimbehandlung

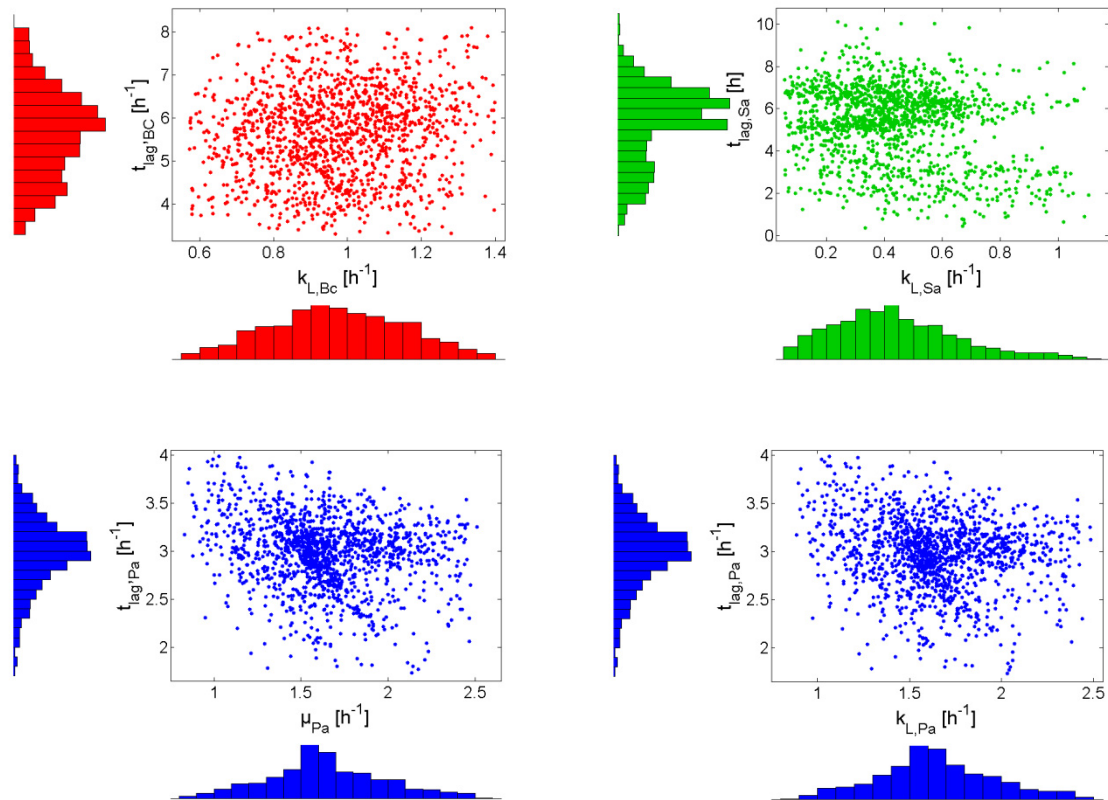
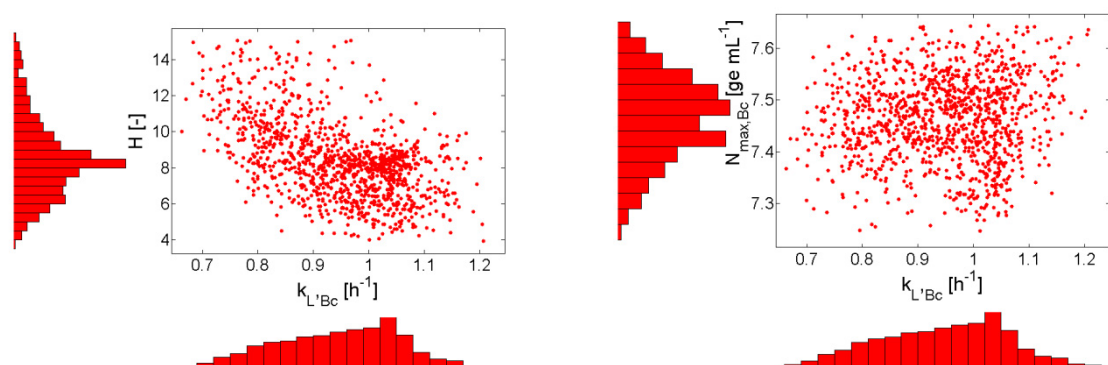
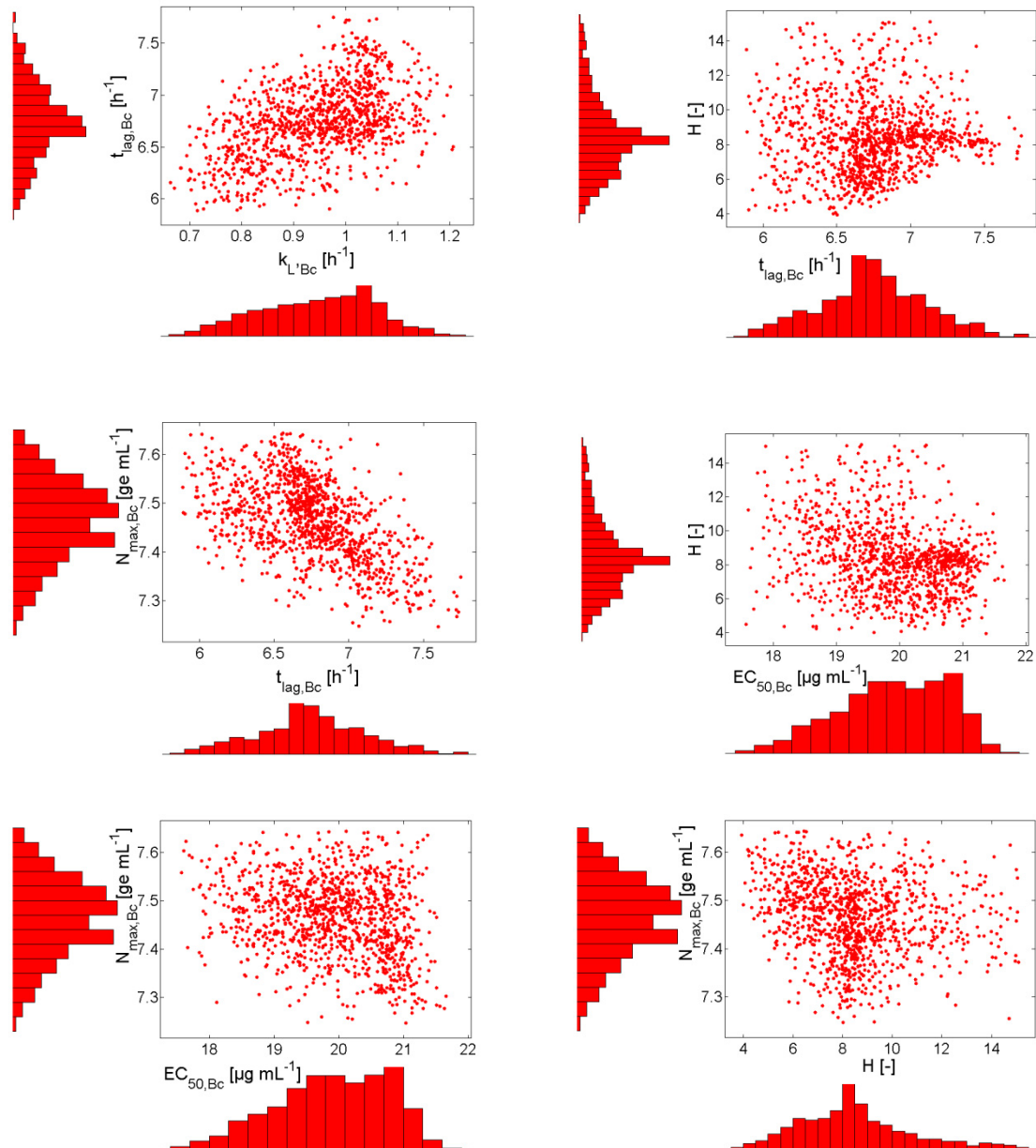


Abbildung 33: Ergänzende Parameterverteilung und –varianzen zu Abbildung 25. Parameterkorrelation der Parameter  $\mu$ ,  $k_L$  und  $t_{lag}$  in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der *Bootstrap*-Analyse des Lysemodells (Gleichung 24) mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim). Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen. *P. aeruginosa*: blau. *B. cepacia*: rot. *S. aureus*: grün. Weitere Korrelationsdiagramme sind im Anhang abgebildet.





**Abbildung 34:** Ergänzende Parameterverteilung und –varianzen zu Abbildung 27. Parameterkorrelation der Parameter  $k_L$ ,  $t_{lag}$ ,  $H$ ,  $EC_{50}$  und  $N_{max}$  des Keims *B. cepacia* in verschiedenen Kombinationen. Die gezeigten Daten resultieren aus der *Bootstrap*-Analyse des Modells gegeben durch Gleichung 25 mit den Messwerten einer ceftazidimbehandelten Mischkultivierung ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ceftazidim) und einer verlängerten Kultivierungszeit von 48 h. Gezeigt sind die jeweiligen 95%-Intervalle der Parameterverteilungen.



## Lösungen zur Verwendung in der qT-RFLP-Analyse

Alle folgenden Lösungen wurden nur mit ultrareinem Wasser hergestellt.

**Tabelle 21: Herstellung einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS)**

| Komponenten   | Molekulargewicht           | Zugabe: 1 L Wasser |
|---|----------------------------|--------------------|
| Natriumchlorid (NaCl)   | 58,44 g mol <sup>-1</sup>  | 8 g                |
| Kaliumchlorid (KCl)   | 74,55 g mol <sup>-1</sup>  | 0,2 g              |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 137,99 g mol <sup>-1</sup> | 1,15 g             |
| Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | 174,18 g mol <sup>-1</sup> | 0,2 g              |

**Tabelle 22: Herstellung der Tris-HCl-Lösung (1 M; pH 8,0)**

| Komponente | Molekulargewicht          | Zugabe: 1 L Wasser |
|------------|---------------------------|--------------------|
| Tris-HCl   | 157,6 g mol <sup>-1</sup> | 157,6 g            |

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von weiterem TRIS-Pulver auf pH=8,0 eingestellt.

**Tabelle 23: Herstellung einer EDTA-Lösung (0,5 M)**

| Komponente | Molekulargewicht           | Zugabe: 100 mL Wasser |
|------------|----------------------------|-----------------------|
| EDTA       | 372,24 g mol <sup>-1</sup> | 18,6 g                |

**Tabelle 24: Herstellung des Lysispuffers**

| Komponente             | Zugabe 1 L Wasser | Endkonzentration |
|------------------------|-------------------|------------------|
| Tris-HCl (1 M; pH 8,0) | 20 mL             | 20 mM            |
| EDTA (0,5 M)           | 4 mL              | 2 mM             |
| Triton X-100           | 12 mL             | 1,2 % (v/v)      |

**Tabelle 25: Herstellung einer Lysozymlösung (100 mg mL<sup>-1</sup>)**

| Komponente | Molekulargewicht | Zugabe: 1 mL 10 mM Tris-HCl (pH 8) |
|------------|------------------|------------------------------------|
| Lysozym    | 14 kDa           | 100 mg                             |

**Tabelle 26: Herstellung einer Lysostaphinlösung (1 mg mL<sup>-1</sup>)**

| Komponente  | Molekulargewicht | Zugabe: 1 mL 50 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl (pH 7,5) |
|-------------|------------------|---|
| Lysostaphin | -                | 1 mg  |

**Tabelle 27: Herstellung einer RNAase A-Lösung (20 mg mL<sup>-1</sup>)**

| Komponente | Molekulargewicht | Zugabe: 1 mL Wasser |
|------------|------------------|---------------------|
| RNAase A   | -                | 20 mg               |

**Tabelle 28: Herstellung von TPE-Puffer**

| Komponente | Molekulargewicht | Zugabe: 1 L Wasser | Endkonzentration |
|------------|------------------|--------------------|------------------|
|------------|------------------|--------------------|------------------|

|      |                            |         |        |
|------|----------------------------|---------|--------|
| TRIS | 121,14                     | 10,8 g  | 890 mM |
| EDTA | 372,24 $\text{g mol}^{-1}$ | 74,4 mg | 2 mM   |

Der pH-Wert wurde mit ca. 25 mL Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 % (v/v)) auf pH=7.5 eingestellt.

**Tabelle 29: Herstellung des 5fachen Ladepuffers für die Gelelektrophorese eines PCR-Produktes**

| Komponente     | Auf 1 L mit Wasser auffüllen | Endkonzentration |
|----------------|------------------------------|------------------|
| Glycerol       | 500 mL                       | 50 % (v/v)       |
| TPE-Puffer     | 500 mL                       | 50 % (v/v)       |
| Bromphenolblau | Einige Krümel                | -                |
| Xylencyanol    | Einige Krümel                | -                |

## Chemikalien und Geräte

**Tabelle 30: Chemikalienliste**

| Name  | Katalognummer/Zulieferer/Hersteller                            |
|---|--|
| qT-RFLP-Methode                                       |  |
| LiChrosolv® -Wasser                                   | Merck, Darmstadt, Deutschland                                  |
| TRIS-HCl  | Nr. 9090, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                    |
| TRIS Ultra Qualität                                   | Nr. 5429.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                  |
| EDTA (Titriplex® III)                                 | Nr. 1.08418, Merck, Darmstadt, Deutschland                     |
| Triton X-100  | Nr. 1.08603, Merck, Darmstadt, Deutschland                     |
| Ortho-Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 85 % | Nr. 1.00573, Merck, Darmstadt, Deutschland                     |
| Glycerol, 87 %  | Nr. 1.04094, Merck, Darmstadt, Deutschland                     |
| Bromphenolblau  | Nr. 114421, Sigma, Taufkirchen, Deutschland                    |
| Xylencyanol   | Nr. X-4126, Sigma, Taufkirchen, Deutschland                    |
| Lysozym   | Nr. L7651, Sigma, Taufkirchen, Deutschland                     |
| Lysostaphin   | Nr. L0761, Sigma, Taufkirchen, Deutschland                     |
| RNAase A  | Nr. 10109169001, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland      |
| Proteinase K (>600 mAU $\text{mL}^{-1}$ )             | Nr. 19133, Qiagen, Hilden, Deutschland                         |
| Ethanol (99,8 %)                                      | Nr. 9065.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                  |
| QIAamp DNA blood Mini Kit                             | Nr. 51106, Qiagen, Hilden, Deutschland                         |
| hhaI-Lösung (10 U $\mu\text{L}^{-1}$ )                | Nr. R0139 L, New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland |
| NEB Puffer 4  | New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland              |
| BSA Lösung (100x Konz.) (10 $\text{mg mL}^{-1}$ )     | New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland              |
| QIAquick Gel Extraktion Kit                           | Nr. 28706, Qiagen, Hilden, Deutschland                         |
| 10x PCR Puffer  | Takara Shiuzo, Cambrex Bioscience, Verviers,                   |

## Appendix

|   |   |
|---|---|
|   | Belgium   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                     | Takara Shiuzo, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium            |
| 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'                              | MWG, Ebersberg, Deutschland                                     |
| 5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'                                   | MWG, Ebersberg, Deutschland                                     |
| dNTPs (2,5 mM jeweils)  | Takara Shiuzo, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium            |
| Takara Ex Taq DNA Polymerase (5 U $\mu$ L <sup>-1</sup> )     | Nr. RR001, Takara Shiuzo, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium |
| 1 kb Leiter Größenstandard                                    | Nr. D-0428, Sigma, Taufkirchen, Deutschland                     |
| HiDi Formamid   | Nr. 4311320, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland         |
| Genescan <sup>®</sup> 500 ROX Größenstandard                  | Nr. 401734, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland          |
| Polymer 3100 POP-6  | Nr. 4316357, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland         |
| Medien  |   |
| Q-Guard 2 ultrareines Wasser                                  | Millipore, Schwalbach, Deutschland                              |
| $\alpha$ -D(+)-Glucose-Monohydrat                             | Nr. X997.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                   |
| Natriumacetatwasserfrei                                       | Nr. 71183, Fluka Chemie, Buchs SG, Swizerland                   |
| Natriumhydroxid (NaOH)  | Nr. 1.06482.1000 Merck, Darmstadt, Deutschland                  |
| Natriumhydrogencarbonat                                       | Nr. 1.06329.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland                 |
| Nitrilotriacetat (NTA)  | Nr. A1280, AppliChem, Darmstadt                                 |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | Nr. K300.2, Carl Roth, Karlsruhe                                |
| Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | Nr. T875.2, Carl Roth, Karlsruhe                                |
| Casaminoacids   | Nr. 0230-15-5, Difco  |
| L-Methionin   | Nr. 64320, Fluka Chemie, Buchs SG, Swizerland                   |
| M199 basal medium   | Nr. 10012, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland             |
| Agar  | Nr. 1.01616, Merck, Darmstadt, Deutschland                      |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Nr. 3957, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                     |
| Trypton   | Nr. 211705, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland           |
| Hefeextrakt   | Nr. 212750, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland           |
| Kaliumchlorid (KCl)   | Nr. 1.04936, Merck, Darmstadt, Deutschland                      |
| Kohle-Agarplatten ( <i>C. jejuni</i> )                        | Oxoid, Wesel, Deutschland                                       |
| CCDA Campylobacter-Platten                                    | Nr. P05091A, Oxoid, Wesel, Deutschland                          |
| Agarose   | Nr. 2267.4, Roth, Karlsruhe, Deutschland                        |
| Kultivierungen  |   |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Antischaummittel        | Contraspum 210, Zschimmer & Schwarz, Deutschland    |
| Analytik                |   |
| Natriumacetatwasserfrei | Nr. 71183, Fluka Chemie, Buchs SG, Switzerland      |
| Natriumpyruvat          | Nr. P-8574, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland |

**Tabelle 31: Geräteliste**

| <b>Name</b>                                      | <b>Katalognummer/Zulieferer/Hersteller</b>                        |
|--|---|
| T-RFLP-Methode                                   |   |
| Biofuge Fresco (1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße)    | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland                           |
| Biofuge Stratos (15 mL Zentrifugenröhrchen, MTP) | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland                           |
| Vortexer Reax Top                                | Heidolph Instruments, Kelheim, Deutschland                        |
| Varioclav  | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland                    |
| T3 Thermocycler                                  | Biometra, Göttingen, Deutschland                                  |
| Thermomixer                                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                                   |
| Genetic Analyzer ABI Prism 3100Avant             | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland                        |
| Ultrospec 3000 UV/VIS Spectrophotometer          | Pharmacia Biotech, Cambridge, UK                                  |
| DataCollection Software 2.0                      | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland                        |
| GeneMapper Software 3.5                          | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland                        |
| <b>Medien</b>                                    |   |
| CampyGen sachets                                 | Nr. CN0025; Oxoid, Wesel, Deutschland                             |
| Plastik Anaerobiertopf (2,5 L)                   | Oxoid, Wesel, Deutschland   |
| 0,2 µm sterile Membranfilter                     | Nalgene Nunc International, USA                                   |
| <b>Kultivierungen</b>                            |   |
| Filtrationseinheit                               | Nalgene Nunc International, Rochester, USA                        |
| Milligard Filterkerze                            | Millipore, Schwalbach, Deutschland                                |
| Medium- und Erntebehälter (25 L)                 | Nalgene Nunc International, Rochester, USA                        |
| Dasgip fedbatch pro®                             | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| StirrerPro® Reaktorgefäß (470 mL)                | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| Bioblock® Temperier- und Rührmodul               | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| PH4PO4® Überwachungmodul                         | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| MX4/4® Gasmischmodul                             | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| GA4® Abgasanalysemodul                           | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| MP8® multipump unit                              | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| Software EasyAccess®                             | Dasgip AG, Jülich, Deutschland                                    |
| Orbital Schüttelinkubator                        | ISF-W-1 mit Feuchtigkeitsregelung, Kuehner AG, Basel, Switzerland |

|   |   |
|---|---|
| Erlenmeyerkolben (ohne Schikanen)   | Schott, Mainz, Deutschland  |
| pH-Meter  | WTW inoLab, Weilheim, Deutschland   |
| Eppendorf Zentrifuge  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland   |
| Spectrophotometer Ultrospec 500   | Amersham, München, Deutschland  |
| Einweg Plastibrand 1,5 mL Halbmikro PMMA Küvetten   | Brand, Wertheim, Deutschland  |
| Vortexer Reax   | Heidolph, Kelheim, Deutschland  |
| Analytik  |   |
| HPLC –Anlage (Flüssigchromatographie)   | Agilent 1200 series, Agilent Technologies, USA                                    |
| Detector HPLC-Anlage: <i>Diode arraydetector</i>  | DAD G1315B, Agilent Technologies, USA   |
| Spritzenfilter Spartan 13/0,2 C: Porengröße 0,2 µm  | Whatmann Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland                              |
| HPLC software (RP column)   | ChemStation for LC 3d Rev. A. 09.03, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland |
| Säule Umkehrphase-Chromatographie: Hypersil Gold 150×4.6 mm                                     | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany                                       |
| Säule Anionenaustausch-Ionenausschlußchromatographie: Rezex-ROA <i>organic acids</i> 300×7.6 mm | Phenomenex, Aschaffenburg, Germany  |
| Metabolite (Glucose, Glutamin, Glutamat)  | Bioprofile 100 Plus der Firma Nova Biomedical, Waltham, USA                       |

## Medienzusammensetzung

**Tabelle 32: Zusammensetzung des Standardmediums M199 – nach Herstellerangaben. Für das „reduzierte Medium“ wurden die mit „\*“ markierten Komponenten in der entsprechenden Konzentration in Wasser gelöst**

| Komponente                                 | Molekulargewicht | Konzentration (mg/L) | Molarität (mM) |
|--|------------------|----------------------|----------------|
| <b>Aminosäuren</b>                         |                  |                      |                |
| Glycin*                                    | 75               | 50                   | 0.667          |
| L-Alanin*                                  | 89               | 25                   | 0.281          |
| L-Argininhydrochloride*                    | 211              | 70                   | 0.332          |
| L-Asparaginsäure*                          | 133              | 30                   | 0.226          |
| L-Cysteinhydrochlorid · H <sub>2</sub> O*  | 176              | 0.1                  | 0.000568       |
| L-Cystin·2HCl*                             | 240              | 26                   | 0.108          |
| L-Glutamat                                 | 165              | 75                   | 0.455          |
| L-Glutamin                                 | 146              | 100                  | 0.685          |
| L-Histidinhydrochlorid · H <sub>2</sub> O* | 210              | 21.88                | 0.104          |
| L-Hydroxyprolin*                           | 131              | 10                   | 0.0763         |

|  |     |       |           |
|--|-----|-------|-----------|
| L-Isoleucin*   | 131 | 40    | 0.305     |
| L-Leucin*  | 131 | 60    | 0.458     |
| L-Lysinhydrochlorid*   | 183 | 70    | 0.383     |
| L-Methionin*   | 149 | 15    | 0.101     |
| L-Phenylalanin*  | 165 | 25    | 0.152     |
| L-Prolin*  | 115 | 40    | 0.348     |
| L-Serin*   | 105 | 25    | 0.238     |
| L-Threonin*  | 119 | 30    | 0.252     |
| L-Tryptophan*  | 204 | 10    | 0.0490    |
| L-Tyrosin, Dinatriumsalz · 2H <sub>2</sub> O*                | 181 | 40    | 0.221     |
| L-Valin*   | 117 | 25    | 0.214     |
| <b>Vitamine</b>  |     |       |           |
| α-Tocopherolphosphat   | 702 | 0.01  | 0.0000142 |
| Ascorbinsäure  | 176 | 0.05  | 0.000284  |
| Biotin   | 244 | 0.01  | 0.0000410 |
| Cholinchloride   | 140 | 0.5   | 0.00357   |
| D-Calciumpantothenat   | 477 | 0.01  | 0.0000210 |
| Folsäure   | 441 | 0.01  | 0.0000227 |
| i-Inositol   | 180 | 0.05  | 0.000278  |
| Menadion   | 172 | 0.01  | 0.0000581 |
| Niacinamid   | 122 | 0.025 | 0.000205  |
| Nicotinsäure   | 123 | 0.025 | 0.000203  |
| Para-Aminobenzoläure   | 137 | 0.05  | 0.000365  |
| Pyridoxalhydrochlorid  | 204 | 0.025 | 0.000123  |
| Pyridoxinhydrochlorid  | 206 | 0.025 | 0.000121  |
| Riboflavin   | 376 | 0.01  | 0.0000266 |
| Thiaminhydrochloride   | 337 | 0.01  | 0.0000297 |
| Vitamin A (Acetat)   | 328 | 0.1   | 0.000305  |
| Vitamin D2 (Calciferol)                                      | 397 | 0.1   | 0.000252  |
| <b>Anorganische Salze</b>                                    |     |       |           |
| Calciumchloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)*               | 111 | 140   | 1.26      |
| Eisennitrat (Fe(NO <sub>3</sub> )·9H <sub>2</sub> O)         | 404 | 0.7   | 0.00173   |
| Magnesiumsulfate (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)*    | 246 | 97.67 | 0.397     |
| Kaliumchloride (KCl)*  | 75  | 400   | 5.33      |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )* | 136 | 60    | 0.441     |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )*               | 84  | 350   | 4.17      |
| Natriumchlorid (NaCl)*                                       | 58  | 7500  | 129.31    |
| Dinatriumhydrogenphosphat(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · | 268 | 90    | 0.336     |

## Appendix

|   |        |         |          |
|---|--------|---------|----------|
| 7H <sub>2</sub> O)*                     |        |         |          |
| Weitere Komponenten                     |        |         |          |
| Adeninsulfat                            | 404.00 | 10.00   | 0.02480  |
| Adenosin 5'-triphosphat - Dinatriumsalz | 605.00 | 1.00    | 0.00165  |
| Adenosinmonophosphat                    | 347.00 | 0.20    | 0.00058  |
| Cholesterol                             | 387.00 | 0.20    | 0.00052  |
| D-Glucose (Dextrose)*                   | 180.00 | 1000.00 | 5.56000  |
| Deoxyribose                             | 134.00 | 0.50    | 0.00373  |
| Glutathione (reduziert)                 | 307.00 | 0.05    | 0.00016  |
| Guaninhydrochlorid                      | 188.00 | 0.30    | 0.00160  |
| HEPES*                                  | 238.00 | 5960.00 | 25.04000 |
| Hypoxanthin-Na                          | 136.00 | 0.40    | 0.00294  |
| Phenolrot*                              | 376.40 | 20.00   | 0.05310  |
| Ribose                                  | 150.00 | 0.50    | 0.00333  |
| Natriumacetate*                         | 82.00  | 50.00   | 0.61000  |
| Thymin                                  | 126.00 | 0.30    | 0.00238  |
| Tween 80®                               |        | 20.00   |          |
| Uracil                                  | 112.00 | 0.30    | 0.00268  |
| Xanthin-Na                              | 152.00 | 0.34    | 0.00224  |

# Arbeitsanweisung qT-RFLP-Methode

Datum: 18.08.2009  
Bearbeiter: Liane Geisler  
Arbeitsbereich: Labor N 1.04  
Version: 8  
aktualisiert: 12.08.2010 / Corina Siewert

Max-Planck-Institut  
Bioprozesstechnik  
Sandtorstr. 1  
39106 Magdeburg

## Arbeitsanweisung: Methoden zur quantitativen t-RFLP-Analyse Basiert auf Version 5

### Verwendete Chemikalien/Reagenzien

| Reagenzien   | Konzentration | Firma/Bestellnummer             |
|--|---------------|---------------------------------|
| Lysozymlösung<br>(gelöst in 10mM Tris-HCl, pH 8)                                 | 100 mg/mL     | VWR/1.05281.0001                |
| Lysostaphinlösung<br>(gelöst in 50mM Tris-HCl, 145mM NaCl, pH 7.5)               | 1 mg/mL       | Sigma/L9043                     |
| RNase A Lösung<br>(gelöst in Wasser)   | 20 mg/mL      | Roche Diagnostics/10109169001   |
| Proteinase K   | 2 mL          | Qiagen/19131                    |
| Primer 8f FAM  | 100 pmol/µL   | MWG                             |
| Primer 1492r   | 100 pmol/µL   | MWG                             |
| TaKaRa Ex Taq Polymerase<br>(inkl. 10xPuffer mit MgCl <sub>2</sub> und dNTP-Mix) | 5 U/µL        | Lonza/FRRR001A                  |
| Hha I recombinant<br>(inkl. 10xPuffer 4 und BSA)                                 | 20 U/µL       | New England Biolabs/R0139L      |
| O'Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder<br>Wasser für die Molekularbiologie            |               | Fermentas/SM1343<br>ROTH/T143.4 |

### Primersequenzen/Herstellung der Lösungen

Primer 8f FAM 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'  
Primer 1492r 5'-TAG CTT GTT ACG ACT T-3'

Die Primer werden in Wasser für die Molekularbiologie gelöst. Es sollten hierfür gestopfte Spitzen verwendet werden. Das Aliquotieren der Primer in PCR-Tubes ist empfehlenswert, da dadurch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen vermieden werden (evt. je 11 µL, reicht für 20 Proben).

### Zusammensetzung der Puffer

Lysispuffer A: 20 mM TRIS-HCl, pH 8.0  
2 mM EDTA  
1.2 % Triton

Lysispuffer B: 20 mM TRIS-HCl, pH 8.0  
3.6 mM EDTA  
2,16 % (w/v) Triton

10xTPE-Puffer:  
(1L) 890 mM TRIS Ultra pure (=107,8 g/L)  
2 mM EDTA (=0,74 g/L)  
mit ca. 50 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %) auf pH 7,5 einstellen

5x Ladepuffer 50 % Glycerin (v/v)



50 % 10xTPE (v/v)  
je ein paar Krümel Bromphenolblau und Xylencyanol

## **(1) Extraktion der genomischen DNA aus Bakterien**

- möglichst für jede Probe eine Doppelbestimmung durchführen
- 1 mL Kulturbrühe auf den internen Quantifizierungsstandard pipettieren (i.q.s.-Eppis lagern bei -80°C)
- 50 µL Lysispuffer A zugeben
- 10 min bei 7000 rpm abzentrifugieren, bei 4 °C (Biofuge *fresco*) (siehe Zentrifugationsoptimierung vom 22.10.08, S201)
- Überstand abgießen, Pellett in 1 mL PBS resuspendieren
- w.o. zentrifugieren und Überstand verwerfen
- darauf achten, dass der Überstand vollständig entfernt wird ohne das Pellet oder Teile davon zu entfernen
- Zugabe von 100 µL Lysispuffer B zum Pellet (entweder -20°C oder weiter), vortexen
- Zugabe von je 40 µL Lysozym- und Lysostaphinlösung, vortexen
- 1,5 h bei 37°C inkubieren (Thermomixer Eppendorf, n=1000 rpm)
- Zugabe von 20 µL Proteinase K, vortexen
- 1 h bei 56°C inkubieren (Thermomixer Eppendorf, n=1000 rpm)
- zum Inaktivieren der Enzyme 5 min auf 95°C erhitzen (Thermomixer Eppendorf), abkühlen lassen
- Zugabe von 20 µL RNase A, vortexen
- 30 min bei 37°C inkubieren (Thermomixer Eppendorf, n=1000 rpm)
- Tubes leicht anzentrifugieren (ca. 20 sec bei 13000 rpm, Biofuge *fresco*)

## QIAamp DNA Blood Mini Kit (Bestell-Nr. 51106)

- alle folgenden Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur (T = 20°C) durchgeführt. (Zentrifuge vorwärmen)
- Zugabe von 200 µL Puffer AL, gut vortexen
- 10 min bei 70°C inkubieren (Thermomixer Eppendorf, n=1000 rpm)
- Tubes leicht anzentrifugieren (w.o.)
- Zugabe von 200 µL Ethanol (mind. 96%, unvergällt), gut vortexen
- Tubes leicht anzentrifugieren
- Ansatz auf eine QIAamp-Säule geben
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Biofuge *fresco*)
- Säule in ein neues 2 mL Tube stellen, altes verwerfen
- Zugabe von 500 µL Puffer AW1
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Biofuge *fresco*)
- Säule in ein neues 2 mL Tube stellen, altes verwerfen
- Zugabe von 500 µL Puffer AW2
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Biofuge *fresco*)
- Durchlauf verwerfen, in altes Sammeltube zurückstellen
- nochmals 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Biofuge *fresco*)
- Säule in ein neues, beschriftetes 1,5 mL Eppi stellen
- Zugabe von 200 µL Puffer AE
- 5 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Biofuge *fresco*)
- DNA bei -20°C lagern

## Messung der DNA-Konzentration (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, PeqLab)

- Nanodrop-Software starten
- „Nucleic Acid“ Modus auswählen
- Blank-Messung mit Elutionspuffer des Blood Mini Kits
- es müssen 2 µL Probe bzw. Blank aufgetragen werden
- Gerät nimmt ein Spektrum von 220 bis 350 nm auf
- bei der Messung wird die DNA-Konzentration über die Absorption bei 260 nm berechnet

Berechnung: 1 AU = 50 µg/mL

$$c = 50 \mu\text{g} / \text{mL} \cdot A_{\text{Probe}} \quad (A = \text{Absorption [AU]})$$

Alternativ:

NanoQuant-plate mit Tecan Reader

Vorteil: höherer Probendurchsatz

- Software starten, „Application“ wählen (links unten)
- dsDNA-Messmodus wählen
- Reinigen der Quartzgläser mit fusselfreiem Tuch.
- Abblasen der gereinigten Gläser an einem Druckluftanschluss -> kein Fussel auf der Optik
- Nullprobe: 2 µL Milli-Q-Wasser auf jedes Quartzglas  
„Individuellen Blanken“ wählen  
„Starten“ betätigen, (unterhalb drop-down Leiste)  
NanoQuant-plate einlegen, so dass „← open“ nach links zeigt
- Messen: Abwischen und Freiblasen der Quartzgläser  
2 µL der Probe auf das Quartzglas pipettieren  
Platte einlegen und „starten“ drücken.  
Excel-sheet mit Konzentrationsangabe wird automatisch erstellt

**(2) Ansatz der PCR**

|  |
|--|
| <p>1x Mix<br/>5µL 10x Puffer<br/>0,5µL Primer 8f FAM<br/>0,5µL Primer 1492r<br/>4µL dNTPs<br/>0,25µL TaKaRa Taq Polymerase</p> |
|--|

- Reagenzien auf Eis auftauen
  - Pipettieren des PCR-Reaktionsansatzes **auf Eis** durchführen, **Handschuhe tragen (Kontaminationsgefahr!)**
  - Für die Reagenzien und das Wasser sollten gestopfte Spitzen verwendet werden. Die template-DNA kann mit normalen Spitzen pipettiert werden.
  - Ansätze in spezielle PCR-tubes pipettieren
  - Herstellen eines Mastermix: x+1-faches der für eine Probe bestimmten Reagenzienzusammensetzung gut mischen und für jede Probe aliquotieren (je 10,25 µL)
  - Es werden 30 ng DNA für die PCR eingesetzt.
  - **10,25 µL Mastermix + x µL DNA + y µL H<sub>2</sub>O\* = 50 µL**  
(Das Ansatz-Volumen wird mit Wasser auf 50 µL ergänzt.)
  - gut mischen
- im PCR-Block: T3 Thermocycler (Biometra)
- Programm „PCRTRFLP“:  
2 min bei 94°C  
[30 sec bei 50°C  
1 min bei 72°C  
10 sec bei 94°C] **35 Zyklen**  
1 min bei 55°C  
5 min bei 72°C  
→ 4°C

Der Heizgradient im Thermocycler beträgt 2 K/sec.

\* Wasser für die Molekularbiologie

**(3) Agarose-Gelelektrophorese (analytisch und präparativ)**

- Analytisches Gel: 1%ige (w/v) Agarose-Lösung in 80 mL TPE herstellen (Erlenmeyer)
    - kleine Kammer, maximal 32 Proben mit Marker
    - in Mikrowelle aufkochen, bis Agarose vollständig gelöst ist
    - 8 µL des PCR-Produkts + 2 µL 5x Ladepuffer
    - 5 µL O'Gene Ruler (enthält bereits Probenpuffer)
    - Elektrophorese-Spannung 50 V
    - Dauer: ca. 1,0 h
  - Präparatives Gel: 2% (w/v) Agarose, 300 mL TPE
    - (am besten in 500 mL Schottflasche)
    - Kämme „10+“ reichen für 50 µL Probevolumen
    - Agarose vollständig lösen
    - 42µL Probe + 8µL 5x Ladepuffer
    - Elektrophorese-Spannung 90 V
    - Dauer: ca. 2 h
- kann ohne Marker laufen, sofern eine eindeutig starke Bande bei 1500 bp im analytischen Gel zu erkennen war
- Die Probenauftrennung mindestens bis zur Hälfte des Gels laufen lassen (nicht auslaufen lassen!!)
  - 15-20 min in Ethidiumbromidbad (Raum N 1.19) legen
  - Nach dem Herausnehmen mit Wasser abspülen
  - auf UV-Lichttisch untersuchen (Schutzbrille!)
  - Kamera mit Normallampe einstellen. Nach Belichtung mit UV-Licht verschwindet die Fluoreszenz sehr schnell
  - Banden sollten bei 1500 bp liegen, Foto ausdrucken und abspeichern (c:\Liane)
  - Präparatives Gel nur starten, wenn analytisches in Ordnung, muss nicht fotografiert werden
  - Banden aus präparativem Gel ausschneiden, in beschriftete 2 mL Eppis geben und aufreinigen (4)

#### **(4) Aufreinigung der DNA-Amplifikate aus dem Gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Best.-Nr. 28706)**

- DNA-Bande knapp aber vollständig aus dem Gel ausschneiden
- 750 µL Puffer QG zugeben
- 10 min bei 50°C inkubieren, (1000 rpm) zwischendurch vortexen (Agarose muss vollständig gelöst sein → gelbe Lösung)
- 250 µL Isopropanol zugeben, vortexen
- Probe fraktionsweise in Säule pipettieren
- 1 min bei 13000 rpm
- Durchlauf verwerfen, Säule in altes Sammelutube zurückstellen
- (optional für Sequenzierung: Zugabe von 500 µL Puffer QG, 1 min bei 13000 rpm)
- mit 750 µL Puffer PE waschen (optional für Sequenzierung: 5 min stehen lassen)
- 1 min bei 13000 rpm
- Durchlauf verwerfen, noch mal 1 min bei 13000 rpm
- Säule in sauberes, beschriftetes 1,5 mL Eppi setzen
- 30 µL Puffer EB in die Mitte der Membran pipettieren
- kurz (ca. 1 min) stehen lassen
- 1 min bei 13000 rpm
- DNA bei -20°C lagern

#### **(5) Restriktionsverdau der gereinigten DNA-Amplifikate**

1x Mix  
 3,4 µL HPLC-H<sub>2</sub>O  
 0,5 µL Hha I (NEB)  
 1 µL 4x Puffer  
 0,1 µL BSA

⇒ 5 µL Mix + 5 µL gereinigtes Amplifikat (4)

- im Thermocycler (Biometra)

- Programm „HHAI“ : 3 h bei 37°C  
20 min bei 65°C  
→ 8°C
- DNA bei -20°C lagern

#### **Langzeitlagerung der Proben**

Nach Abschluss eines Versuches (inklusive Auswertung durch den Doktoranden) wird nur die extrahierte genomische DNA bei -80°C für 10 Jahre aufgehoben.  
Alle anderen Zwischenprodukte (Gel-Extraktion, Restriktionsverdau) werden verworfen.

## Publikationsliste

C. Riedele und U. Reichl (2012) Time-kill studies with a ceftazidime-treated mixed culture consisting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus*, *Engineering in Life Sciences*, **12** (3), 1 - 10

J. K. Schmidt, C. Riedele, L. Regestein, J. Rausenberger, U. Reichl (2011) A Novel Concept Combining Experimental and Mathematical Analysis for the Identification of Unknown Interspecies Effects in a Mixed Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (8), 1900 - 1911

C. Riedele und U. Reichl (2011) Inter-Species Effects in Ceftazidime-Treated Mixed Culture of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus* – Analysis on the Single-Species Level, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**, 138 - 145

## Konferenzbeiträge

### Vorträge

C. Riedele and U.Reichl (2010) Growth Dynamics of a 3-Species Mixed Culture after an Antibiotic Pulse – Analyzed on the Single Species Level, *European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES)*, Bologna, Italien

C. Riedele, L. Geisler, U. Reichl (2008) Antibiotic Pulse Experiments of a 3-species Mixed Culture: Experimental Results and Mathematical Modelling, *Analysis of microbial cells on the single cell level*, Bad Schandau, Deutschland, 2008

C. Riedele, J.K. Schmidt, L. Regestein, L. Geisler, U. Reichl (2007) A Medically Relevant Three-Species Mixed Culture in a Chemostat: Mathematical Modelling and Experiments to Study Interaction Effects, *Bioperspectives*, Köln, Deutschland

### Poster

C. Riedele, L. Geisler, U. Reichl, (2009) Antibiotic Pulse Experiments in a 3-Species Mixed Culture, *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie*, Bochum, Deutschland

C. Riedele and U.Reichl (2008) Mathematische Modelle zur Analyse von Antibiotika-Pulsexperimenten einer 3-Spezies Mischkultur, *Dechema-Tagung "Modellierung: Von der Zelle zum Prozess"*, Bremen, Deutschland

C. Riedele and U. Reichl (2007) Analysis of Growth Dynamics in a Three-Species Chemostat by disturbing Coexistence with Antibiotic Pulse, *Bioperspectives*, Köln, Deutschland

C. Riedele, J.K. Schmidt, L. Regestein, U. Reichl (2007) Analysis of a Medically Relevant Microbial Community in a Bioreactor, *Microbial Community Networks*, Wernigerode, Deutschland

## **Liste der betreuten Arbeiten**

### **Studienarbeiten**

René Funke (2008) Entwicklung eines Minimalmediums zur Kokultivierung der Bakterienspezies *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia*, Lehrstuhl Bioprozesstechnik, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

## Curriculum vitae Christian Riedele

**NAME** Christian Riedele

**ANSCHRIFT** Bürgermeister-Jäger Strasse 1-2, 69214 Eppelheim

**GEBURTSDATUM** 19. September 1978

**GEBURTSORT** Memmingen (Deutschland)

### BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 10/2011 Entwicklungsingenieur BASF SE – industrielle Biotechnologie

2006 – 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion), am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg, Prof. Dr.-Ing. U. Reichl

Titel: „Spezies-Interaktionen in einer definierten bakteriellen Mischkultur mit und ohne Antibiotikumbehandlung“

### AUSBILDUNG

1999 – 2005 Studium des Chemie-Ingenieurwesens, Technische Universität, München

05 – 07/2004 Ingenieurspraktikum im Bereich Fertigarzneimittel, Sanofi-Aventis, Frankfurt Höchst

10/2002 – 03/2003 Auslandsaufenthalt, University of Cape Town, Kapstadt, Südafrika

Studienarbeit in der Forschungsgruppe "Catalysis" des *Chemical Engineering Departments*

06 – 08/1999 Studienvorbereitendes Grundpraktikum im Maschinenbau, Stetter GmbH, Memmingen

07/1998 – 04/1999 Wehrdienst, ABC-Abwehrlehrbataillon, Sonthofen

### SCHULISCHER WERDEGANG

1995 – 1998 Abitur, Strigel-Gymnasium, Memmingen

1989 – 1995 Rupert-Neß-Gymnasium, Ottobeuren