Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 40

Christian Riedele

Spezies-Interaktionen in einer definierten bakteriellen Mischkultur mit und ohne Antibiotikum

Shaker Verlag
Aachen 2013

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2013

Copyright Shaker Verlag 2013
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2105-9
ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

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^{-1} 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.

Zusammenfassung

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 µg 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 Restriktions-fragmentlängenpolymorphismus (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 Wachstums-eigenschaften 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 umwandeln, 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.