

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

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

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS.....	VI
Abkürzungen	VI
Symbole.....	VIII
Griechische Symbole.....	IX
Indizes	X
ABSTRACT	XI
KURZFASSUNG	XIII
1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1. Bakterielle Dreier-Mischkultur aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	5
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
2.2. <i>In-vitro</i>-Methoden zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika	10
Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) als Standardkenngröße der Antibiotikumwirksamkeit	10
Dynamische Methoden	11
Die Plattenausstrichmethode in der Kritik	15

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

Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration	31
Ceftazidim	33
3.6. Substrate und Produkte des Metabolismus	35
Glucose, Glutamin, Glutamat	35
Gluconat, 2-Ketogluconat, Acetat und Pyruvat	36
3.7. Mathematische Modellierung	37
Modelltypen und Modellierungsmethode	37
Modellanapassung	38
Parametervarianzen	39
Simulationsvarianz	42
Nichtlineares Bestimmtheitsmaß	43
Berechnung des <i>P</i> -Wertes	43
4. ERGEBNISSE	45
4.1. Time-kill Experimente	45
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
4.2. Mathematische Modellierung der <i>time-kill</i>-Experimente	65
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
5. DISKUSSION	87
5.1. Speziespezifische Wachstumscharakteristika in der Mischkultur	87

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

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