



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

## **Effekt der Gefriertrocknung auf Enterococcus faecium**

Verfasser:

**Milan Batar**

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, im April 2011

Studienkennzahl: A 449

Studienrichtung: Pharmazie

Betreuer: O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

**Meiner Familie.**

Beskrajno se zahvaljujem svojoj porodici, majci Dušanki, ocu Jovanu i bratu Mirku za njihovu ljubav, podršku i vjeru u mene svih ovih godina.

## **Danksagung**

Sehr herzlich möchte ich mich für die Unterstützung dieser Diplomarbeit bei Herrn O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich besonders bei meiner Diplomarbeitbetreuerin Frau Mag. Dr. Sharareh Salar-Behzadi und bei Herrn Mag. Dr. Stefan Tögel für ihre Beratung und Hilfe während meiner praktischen Arbeit.

# Zusammenfassung

Lebende Keime des Stammes *Enterococcus faecium* M-74 sind in verschiedenen derzeit am Markt befindlichen Probiotika enthalten. Während der industriellen Verarbeitung von probiotischen Kulturen werden die Mikroorganismen getrocknet. Eine der häufigsten für Probiotika angewendeten Trocknungsverfahren ist die Gefriertrocknung. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde der Effekt von der Gefriertrocknung auf die zelluläre Aktivität und Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 untersucht. Für diese Zwecke wurde die Gefriertrocknung in ihre zwei Komponenten: Einfrieren und Trocknung eingeteilt und der Einfluss der einzelnen Komponenten auf die zelluläre Aktivität und Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 untersucht. Die zelluläre Aktivität wird durch die Zugabe von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen mittels Fluorimetrie und Flowzytometrie untersucht. Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Lage, die Änderungen der lebenswichtigen Funktionen zu zeigen.

Die Bakterienkulturen wurden bei folgenden Temperaturen eingefroren:

-80 °C

kontinuierliche Temperatursenkung -1 °C/Minute bei -80 °C in Isopropanol und -196 °C (in flüssigem Stickstoff).

Die zunehmende Propidiumiodid-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei -80 °C bzw in flüssigem Stickstoff (-196 °C) im Vergleich zu nicht-gefrorenen Zellen zeigte, dass die Zellmembranschädigung bei niedrigeren Temperaturen entstanden ist. Die Zellmembranschädigung ist bei in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefrorenen Zellen im Vergleich zu bei -80 °C eingefrorenen Zellen höher. Die Messungen nach der Gefriertrocknung zeigen eine höhere Membranschädigung im Vergleich zu den Werten nach dem Einfrieren.

Die verringerte Fluoreszenz von FDA bei Zellen, gefroren bei -80 °C und bei -80 °C im Isopropanol im Vergleich zu nicht-gefrorenen Zellen, weist auf eine schwächere Aktivität der Esterasen hin. Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) zeigte keine Verschlechterung der Enzymaktivität. Die relative FDA-Intensität hat sich nach der Gefriertrocknung im Vergleich zum Einfrieren nicht signifikant erniedrigt und dadurch erscheint die Enzymaktivität von *Enterococcus faecium* M-74 nicht zusätzlich reduziert.

Im nächsten Schritt wird der Effekt von Protektanten: Glukose, Saccharose, Trehalose und Magermilch in der Konzentrationen 10%, 50% und 100% (bezogen auf der nassen Masse der Zellen) auf Einfrieren und Trocknung der Zelle überprüft.

Saccharose zeichnet sich, besonders in 50%- und 100% -iger Konzentration beim Einfrieren als geeigneter Protektant sowohl für den Schutz der Zellmembranen als auch für die Erhaltung der Enzymaktivität, aus. Auch bei der Gefriertrocknung hat Saccharose protektive Eigenschaften gezeigt.

Magermilch zeigte in 10% -iger Konzentration gute Einfrier-Eigenschaften in Bezug auf den Schutz der Zellmembran und Enzymaktivität von *E. faecium* M-74. Bei der Trocknung hat die verwendete Magermilch keine protektiven Eigenschaften gezeigt.

Glukose als Protektant zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Sie wies beim Einfrieren keine guten Eigenschaften für die Protektion der Zellmembran von *Enterococcus faecium* M-74 auf, aber zeichnete sich in 50% -iger Konzentration als guter Schutz für die Erhaltung der Enzymaktivität aus. Während der Gefriertrocknung zeigte Glukose in 50% -iger Konzentration vollen Schutz für die Erhaltung der Enzymaktivität, allerdings keinen für die Zellmembran.

In meiner Untersuchung verhält sich Trehalose schlechter als alle anderen Protektanten. Sie zeigte keine guten Eigenschaften beim Einfrieren sowohl bei der Protektion der Zellmembran als auch bei der Erhaltung der Enzymaktivität.

Die Vermehrungsfähigkeit wird durch die Keimzahlbestimmung auf Petrischalen durchgeführt. Beim Einfrieren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C wurde die Anzahl der KBE nicht signifikant reduziert, woraus geschlossen werden kann, dass die angewendete Methoden des Einfrierens keinen Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 hat. Nach der Gefriertrocknung waren nur 54% der Zellen vermehrungsfähig. Daraus ergibt sich, dass die Trocknung während der Gefriertrocknung schlechtere Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 hat als das Einfrieren.

Die Zugabe von Protektanten hatte keinen nachweisbaren schützenden Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *E. faecium* M-74 nach der Gefriertrocknung.

Die detaillierte Untersuchung des Einflusses der Gefriertrocknung auf die Viabilität von *Enterococcus faecium* M-74 ist eine gute Grundlage für die Entwicklung und den Vergleich weiterer Stabilitätsmethoden für probiotische Bakterien.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1. Darmflora .....	8
1.2. Probiotika .....	9
1.3. Effekte von Probiotika .....	9
1.4. Die Anforderungen an Probiotika .....	12
1.5. Die Gattung <i>Enterococcus</i> .....	12
1.6. <i>Enterococcus faecium</i> .....	13
1.7. In Österreich im Handel befindliche Präparate mit <i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i> (wörtlich aus Austria-Codex übernommen).....	14
1.8. Stabilisierung von probiotischen Mikroorganismen .....	16
1.9. Gefriertrocknung .....	17
1.10. Protektanten.....	18
1.11. Ziele der Studie .....	19
2. Materialien und Methoden .....	21
2.1. Materialien .....	21
2.1.1. Liste der verwendeten Materialien.....	21
2.1.2. Liste der verwendeten Geräte.....	21
2.1.3. Nährmedium: MRS-Broth.....	22
2.1.4. Agar.....	22
2.1.5. Phosphatpuffer .....	23
2.2. Methoden .....	24
2.2.1. Kultivierung von <i>Enterococcus faecium</i> M-74 .....	24

2.2.2. Ernten und Waschen von <i>Enterococcus faecium</i> M-74 .....	24
2.2.3. Einfrieren.....	24
2.2.4. Gefriertrocknung .....	25
2.2.5. Analytische Methoden .....	25
2.2.5.1. Keimzahlbestimmung .....	25
2.2.5.2. Untersuchung der zellulären Aktivität .....	26
2.2.6. Fluoreszenzfarbstoffe .....	26
2.2.7. Fluorimetrie.....	29
2.2.8. Durchflusszytometrie (Flow cytometry) .....	29
2.2.9. Die statistische Analyse .....	31
3. Ergebnisse .....	32
3.1. Einfrieren.....	32
3.1.1. Einfluss auf die zelluläre Aktivität.....	32
3.1.2. Keimzahlbestimmung .....	48
3.2. Trocknung .....	49
3.2.1. Einfluss auf die zelluläre Aktivität.....	49
3.2.2. Keimzahlbestimmung .....	53
4. Diskussion.....	55
4.1. Einfluss des Einfrierens und der Trocknung auf die Zellviabilität von nicht- geschützten Zellen .....	55
4.2. Einfluss von Protektanten auf die Zellviabilität nach dem Einfrieren und nach der Gefriertrocknung.....	57
5. Abkürzungsverzeichnis .....	61
6. Literaturverzeichnis.....	62
7. Lebenslauf.....	70

# 1. Einleitung

## 1.1. Darmflora

Die Feststellung „Der Schlüssel zur Gesundheit liegt im Darm“ [1] ist heutzutage sehr aktuell. Der finnische Wissenschaftler Aere Waerland trennte die menschliche Darmflora in nützliche Gärungsbazillen und schädlichen Fäulnisbazillen. Nützliche Bazillen werden durch pflanzliche Nahrungsmittel und schädliche Bazillen durch tierische Nahrungsmittel gefördert [1].

Der Darm hat eine Oberfläche von etwa 400 m<sup>2</sup> und stellt so eine große Kontaktfläche zwischen der Außenwelt und dem menschlichen Organismus dar. Aufgrund dessen wird das Darmimmunsystem ständig mit einer großen Zahl an körperfremden Stoffen wie z.B. Nahrungsbestandteilen, Bakterien und der eigenen Darmflora konfrontiert. Das Darmimmunsystem hat eine sehr große Aufgabe und zwar muss es zwischen pathogenen Keimen und apathogenen Keimen unterscheiden. Die apathogenen Keime werden vom Darmimmunsystem nicht angegriffen. Diesen Vorgang bezeichnet man als „orale Toleranz“ [2].

Auf der Darmschleimhaut leben mehr als 500 verschiedene Bakterienspezies, die wie ein dichter Rasen die Darmschleimhaut überziehen und dadurch eine Barriere für die Krankheitserreger bilden. Weiterhin ist zu erwähnen, dass viele Bakterien der Darmflora biologische Waffen mit antimikrobieller Wirkung produzieren, um so schädliche Bakterien abzutöten. Eine gute Wirkung der Darmflora auf den Stoffwechsel von Cholesterin wurde bestätigt. Bei einigen Darmbakterien ist es sogar bekannt, dass sie Vitamine produzieren können. Die Darmbakterien sind allgemein für die Körperabwehr von großer Bedeutung, z.B. stehen sie mit den Schleimhäuten der Atemwege oder Harnwege in Verbindung [3].

„Die Darmgesundheit im Allgemeinen ist in der heutigen wissenschaftlichen Medizin noch kaum anerkannt, dabei leiden etwa 10% der Bevölkerung an Reizdarm, 15% sind von Nahrungsmittelunverträglichkeit und 20% von chronischer Obstipation betroffen. Mittlerweile konnte an klinischen Studien gezeigt werden, dass Probiotika für viele dieser Krankheitsbilder präventiv oder therapeutisch wirksam sind“ [2].

## **1.2. Probiotika**

Der russische Immunologe Ilja Metschnikow vermutete schon am Anfang des 20. Jahrhunderts, dass das hohe Lebensalter und die Gesundheit von bulgarischen Hirten auf den ausreichenden Konsum von fermentierter Milchprodukte zurückzuführen sei. Metschnikow erklärte seine Aussage so, dass in fermentierten Milchprodukten enthaltenen Milchsäurebakterien die schädlichen Fäulniserreger verdrängen oder sie in ihren Aktivitäten vollkommen hemmen [8].

„Der Begriff Probiotika leitet sich aus dem Griechischen ab (pro bios) und bedeutet für das Leben“ [8].

Nach heutiger Definition sind Probiotika nichtpathogene, lebende Mikroorganismen, die in ausreichend hoher Zahl aufgenommen einen präventiven oder therapeutischen Effekt auf den Makroorganismus haben, ihm also einen gesundheitlichen Nutzen bringen [5].

Die meisten Produkte enthalten Bakterien der Gattung Lactobacillus oder Bifidobakterium, aber auch andere Gattungen, wie z.B. Escherichia, Enterococcus und Saccharomyces werden als Probiotika vermarktet [6].

## **1.3. Effekte von Probiotika**

Die Rolle der Probiotika wird immer wichtiger, da Wissenschaftler von Tag zu Tag mehr über diese Organismen in Erfahrung bringen.

Folgende Anwendungsgebiete von Probiotika werden beschrieben:

### **a) Regeneration der Darmflora nach oder während einer Antibiotika-Therapie:**

Die menschliche Darmflora wird durch eine Behandlung mit Antibiotika verändert. In einer Studie wurde der Einfluss von Stamm Lactobazillus auf die Darmflora während der Behandlung mit dem Antibiotikum Ampicillin untersucht. Bei den Personen, die neben Antibiotika zusätzlich Lactobazillus-Präparate genommen haben, erholten sich die anaeroben Grampositiven Kokken, Clostridien und Eubakterien schneller, als in der Gruppe, die keine Lactobazillen genommen haben [7].

## **b) Stimulation der Immunabwehr**

Die Verabreichung von Laktobazillen oder Bifidobakterien führt zur Steigerung der Aktivität wichtiger immunkompetenter Zellen. Die „Fresszellen“ des menschlichen Immunsystems, die krankheitserregende Keime erkennen und entsorgen, sowie die „Killerzellen“, die Krebszellen aufspüren und vernichten, werden durch die Probiotika stimuliert [8].

## **c) Unterstützung bei Allergien**

Die Entstehung von Allergien bei kleinen Kindern werden durch die Einnahme von Probiotika reduziert. Eine Studie, die an einer Universitätsklinik in Finnland durchgeführt wurde, zeigte, dass die Mütter, die vor der Geburt und während des Stillens die Milchsäurebakterien erhalten haben, das Risiko für Neurodermitis bei Säuglingen um 50% reduziert wurde [9].

## **d) Verbesserung von Laktoseintoleranz**

Die Symptome einer Laktoseintoleranz, wie Vollgefühl, Durchfall und Blähungen können durch Probiotika gelindert werden. Diese Wirkung basiert auf der Gegenwart von Enzym  $\beta$ -Galactosidase in den Probiotika.  $\beta$ -Galactosidase steigert die Hydrolyse der Laktose im Dünndarm [4].

## **e) Prophylaxe und Behandlung von unterschiedlichen Durchfallerkrankungen**

Eine Analyse von mehr als 30 randomisierten, placebokontrollierten Humanstudien zeigte, dass Probiotika Durchfälle signifikant reduziert werden können: das Risiko akuter Durchfälle wurde bei Erwachsenen um 26% und bei Kindern um 57% gesenkt [4].

## **f) gegen Obstipation**

Durch eine placebokontrollierte Studie stellte man fest, dass sich der Schweregrad der Obstipation nach 2 Wochen, durch die tägliche Einnahme von Probiotika, reduziert hat.

Über die Hälfte der Studienteilnehmer in der Probiotikagruppe berichteten über ein angenehmes Wohlbefinden. Weiterhin stieg die Stuhlfrequenz von drei auf sechs Stuhlgänge pro Woche in der Probiotikagruppe. Bei der Placebogruppe waren es drei bis vier Stuhlgänge pro Woche. Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich das Stuhlvolumen durch die Aufnahme von Probiotika erhöht hat, denn ca. die Hälfte der Stuhltrockensubstanz besteht aus den Darmbakterien. Diese produzieren Propionat, Acetat und Laktat als Produkte des Stoffwechsels, welche die Schleimhaut des Darms ernähren und die Darmmotilität steigern [12].

#### **g) Vorbeugung von Dickdarmkrebs**

Probiotika senken die  $\beta$ -Glukuronidase und Karzinogene wie Aflatoxin im Darmlumen, ebenso wie die aggressiven, sekundären Gallensäuren, die im Darm aus den primären Gallensäuren gebildet werden. Diese schädigen die Zellen der Darmschleimhaut und begünstigen die Krebsentstehung. Es gibt auch viele Studien, die beweisen, dass Stoffwechselprodukte von Probiotika, wie z.B. Butyrat oder Laktat, gegen die Krebsentstehung wirken. Diese Studien wurden jedoch bisher nur an Tieren getestet [13].

#### **h) Unterstützung bei der medikamentösen Eliminierung von *Helicobacter pylori***

Probiotika können laut Tierversuchen das Wachstum von *Helicobacter pylori* und das Enzym Urease in seiner Funktion hemmen. Der Harnstoff geht mit der Hilfe des Enzyms Urease in Kohlendioxid und Ammoniak über. Ammoniak neutralisiert die Säure im Magen und ermöglicht dadurch dem Heliobacter das Überleben im Magen [7].

In einer randomisierten Studie wurden mehr als 200 Patienten mit einer *H. pylori* Infektion untersucht. Die Hälfte der Patienten bekamen zur Eradikation eine Tripeltherapie (Clarithromycin, Amoxicillin und Esomeprazol). Die zweite Hälfte der Patienten bekam neben der Tripeltherapie auch Lactoferrin und Probiotika. In der Gruppe mit Tripeltherapie hatten 72,5% und in der Gruppe mit der Tripeltherapie plus Lactoferrin und Probiotika 88,6% der behandelten Patienten erfolgreich *H. pylori* eliminiert [14].

## **1.4. Die Anforderungen an Probiotika**

- Der Stammursprung muss bekannt sein
- Probiotika müssen oral aufgenommen werden
- Sie müssen ihren Wirkungsort, den Darm, in ausreichender Menge lebend erreichen. Deswegen müssen die Bakterien hinreichend resistent gegen Magensäure und pankreatische Sekrete sein
- Gewährleistung einer hohen Anzahl probiotischer Kulturen bis zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums
- Nachweise des gesundheitlichen Nutzens, wie Wiederaufbau einer geschädigten Darmflora oder Produktion von antibakteriell wirksamen Substanzen
- Jede probiotische Kultur besitzt eigene, stammspezifische Effekte und es ist notwendig, für jede Kultur bzw. für jedes Produkt die Wirkung durch die wissenschaftlichen Studien nachzuweisen
- Es dürfen keine krankheitserregende Bakterien vorhanden sein [15]

## **1.5. Die Gattung Enterococcus**

Enterokokken, ursprünglich als D-Streptokokken bezeichnet, sind grampositive, fakultativ anaerobe Kokken, die in Paaren oder kurzen Ketten angeordnet sind. Diese sind Bestandteile der normalen Darmflora von Mensch und Tier. Weiteres kommen sie auf der Haut, auf Pflanzen, im Erdboden und im Abwasser vor. Auch in Milch oder Milchprodukten können Enterokokken vorhanden sein. In manchen Käsesorten sind Enterokokken dominierende Mikroorganismen und tragen zu deren Aromaentwicklung bei. Enterokokken werden in jenen Nahrungsmitteln gefunden, die händisch hergestellt werden. Das Vorkommen von Enterokokken in Nahrung und Wasser kann ein Hinweis auf fäkale Verunreinigungen sein [16].

Enterokokken können nützlich als auch schädlich sein. Vertreter werden in der Human- und Tiermedizin als Probiotika eingesetzt. Jedoch ist ihre Verwendung sehr umstritten, weil sie als zweithäufigste Erreger nosokomialer Infektionen nach *Escherichia coli* gelten. Enterokokken können eine Vielzahl von Erkrankungen, wie Bakteriämie, Harnwegsinfektionen, Endokarditis, Bauchfellentzündungen sowie Infektionen im Bereich des Zentralnervensystems verursachen. Es sind vor allem Patienten mit

Abwehrschwäche (Hämatologie, Onkologie, Transplantationschirurgie, Nephrologie) oder längerem Krankenhausaufenthalt betroffen. Viele Stämme sind resistent gegenüber einem breiten Spektrum von Antibiotika wie z.B. gegen Ampicillin und Aminoglykosiden sowie gegen Glykopeptiden (Vancomycin und Teicoplanin). Die zwei wichtigsten Vertreter sind *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* [17].

## **1.6. Enterococcus faecium**

Der am besten untersuchte probiotische Enterococcus-Stamm *E. Faecium* ist ein apathogener Kommensale des Menschen. Er ist resistent gegen Magensäure und Gallensalze, wenig empfindlich gegen zahlreiche Antibiotika, vermehrt sich rasch (Generationszeit 19 Minuten) und bildet L-Milchsäure. Er hemmt in vitro das Wachstum zahlreicher Darmpathogene wie *Escherichia coli*, Salmonellen, Shigellen, und Clostridien. Deswegen wird die Behandlung von Durchfallerkrankungen als Alternative zu Antibiotika eingesetzt. Es besteht eine hohe Toleranz zu diesem Stamm beim Menschen [11].

In einer Analyse der Cochrane Collaboration wurden 23 Studien mit fast 2000 Teilnehmern durchgeführt. Das Ergebnis dieser Studien ergab, dass *Enterococcus faecium* SF 68 das Risiko für eine anhaltende Diarrhoe deutlich reduzierte. Bei Teilnehmern, die Probiotika einnahmen, war am dritten Tag die Diarrhoe deutlich weniger zu erkennen. Die Dauer der Diarrhoe sowie die Stuhlfrequenz wurden durch Probiotika reduziert [18].

*E. faecium* wird auch bei Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe, beim Reizdarmsyndrom, zur Senkung des Serumcholesterinspiegels und zur Immunregulation eingesetzt [17].

## **1.7. In Österreich im Handel befindliche Präparate mit E. faecium und E. faecalis (wörtlich aus Austria-Codex übernommen)**

### **a) „Bioflorin – Kapseln (wörtlich aus Gebrauchsinformation übernommen)**

Wirkstoff: Lebende Keime von Enterococcus faecium, Stamm Cernelle 68 (SF 68)

Z.Nr.: 2-00143

#### **Zusammensetzung:**

1 Kapsel enthält mindestens 75 Mio. lebende Keime von Enterococcus faecium, Stamm Cernelle 68 (SF 68) in Trockenkultur.

**Arzneiform:** Hartkapseln

#### **Eigenschaften und Wirkungsweise:**

Im gesunden menschlichen Darm sind zahlreiche Bakterienarten angesiedelt. Sie bilden die biologische Gemeinschaft der Darmflora und tragen zur Nahrungsverwertung und Vitamin-produktion bei.

Mit BIOFLORIN wird ein natürlicher Bewohner des menschlichen Darms zugeführt, der durch seine rasche Vermehrung, seine Vitalität sowie durch seine Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotika und andere Einflüsse gekennzeichnet ist.

BIOFLORIN unterstützt die natürliche Darmbesiedlung bei unspezifischen Durchfällen. Krankheitserregende Keime werden in ihrem Wachstum gehemmt und rasch aus dem Darm verdrängt.

**Zulassungsinhaber und Hersteller:** SANOVA PHARMA GesmbH, Wien

#### **Anwendungsgebiete:**

Zur symptomatischen und unterstützenden Therapie bei akuten, unkomplizierten Durchfallerkrankungen bei Erwachsenen und Kindern über 12 Jahren, bei Kindern von 2 - 12 Jahren nur auf Anweisung eines Arztes.

Bei Störungen der Darmflora zur Unterstützung des Wiederaufbaues natürlicher Verhältnisse einer gestörten Darmflora wie z.B. nach antibakterieller Therapie (Antibiotika oder andere).

#### **Gegenanzeigen:**

Nicht anwenden bei bekannter Überempfindlichkeit gegen einen Bestandteil oder Störungen des Immunsystems (Immunsuppression, z.B. HIV-Infektion).

Bei Autoimmunerkrankungen oder bei bestehenden ernsten Magen-Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Geschwüre, Tumore) nur nach ärztlicher Anweisung anwenden.  
Schwangerschaft und Stillzeit:

Eine Anwendung ist möglich. Über eine Anwendung in der Schwangerschaft entscheidet der Arzt.

**Vorsichtsmaßnahmen für die Verwendung:**

Bei Anhalten des Durchfalls über 48 Stunden ist ehestens eine ärztliche Beratung erforderlich, ebenso bei ernsten Durchfallerkrankungen mit Verdacht auf spezifische Erreger wie Salmonellen, Shigellen oder andere.

Die bei Durchfallerkrankungen notwendigen allgemeinen Maßnahmen wie ausreichende Mineralstoffzufuhr (Elektrolytersatz), Flüssigkeitsaufnahme und Diät sollten beachtet werden.

Werden Antibiotika zum Einnehmen gleichzeitig verordnet, so soll die Einnahme im Abstand von 2 Stunden erfolgen.

Sind Schluckimpfungen vorgesehen, so ist BIOFLORIN nicht gleichzeitig einzunehmen.

Bei Fortbestand der Beschwerden oder wenn der erwartete Erfolg durch die Anwendung nicht eintritt, ist ehestens eine ärztliche Beratung erforderlich.

**HINWEIS FÜR DEN ARZT:** Der Keim ist empfindlich gegen Tetracycline, Amoxicillin und Ampicillin. Mit diesen Antibiotika kann bei einer unabsichtlichen Überdosierung oder Fehlanwendung therapiert werden.

Wenn Nebenwirkungen auftreten, teilen Sie diese umgehend dem Arzt mit. Informieren Sie Ihren Arzt vom Eintritt einer Schwangerschaft.

Für Kinder unerreichbar aufbewahren.

**Wechselwirkungen:**

Durch Antibiotika kann die Wirkung vermindert werden. Bei einer Schluckimpfung nicht gleichzeitig anwenden.

**Dosierung und Art der Anwendung:**

Falls nicht anders verordnet, Dosierung genau einhalten.

Erwachsene 3 mal täglich 1 Kapsel; Kinder von 2 - 12 Jahren 2 mal täglich 1 Kapsel.

Im allgemeinen ist eine Einnahme während 7 Tagen angezeigt. Eine längere Einnahme kann im Einzelfall nach ärztlicher Beratung zweckmäßig sein.

Zu den Mahlzeiten mit etwas Flüssigkeit (Wasser, Milch, Fruchtsaft, KEINE heißen Getränke) einnehmen.

Bei Schluckschwierigkeiten können die Kapseln auch geöffnet und der Inhalt mit Milch, Fruchtsaft o.ä. verrührt, eingenommen werden; dabei ist darauf zu achten, daß die Flüssigkeit nach dem Zumischen nicht mehr erwärmt werden darf.

**Nebenwirkungen:** Sind nicht bekannt.

**Verfalldatum und Lagerung:**

Verfalldatum beachten. Nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwenden.

Lagerungshinweise: Trocken und nicht über 21°C lagern. Bei höheren Umgebungstemperaturen ist eine Lagerung im Kühlschrank vorzusehen, da *Enterococcus faecium* Cernelle 68 (SF 68) bei Temperaturen von über 40 °C rasch abgetötet wird.

Lichtschutz erforderlich.

**Stand:** Februar 2000

Bei Unklarheiten fachliche Beratung einholen“ [19]

## **b) Reflor-Kapseln**

**Zusammensetzung:**

gleich wie bei Bioflorin-Kapseln

## **c) „Symbioflor 1 Enterococcus-Tropfen (wörtlich aus Gebrauchsinformation übernommen)**

**Zusammensetzung:**

1,0 ml (= 12 Tropfen) Suspension enthalten *Enterococcus faecalis*-Bakterien (Zellen und Autolysat von  $10^7$  Bakterien).

**Anwendungsgebiete:**

Zur Verminderung der Rezidivrate bei wiederkehrenden Infektionen der oberen und unteren Atemwege, besonders bei Entzündungen der Nebenhöhlen (Sinusitis) und der Bronchien (Bronchitis)“ [20].

## **1.8. Stabilisierung von probiotischen Mikroorganismen**

Die industrielle Verarbeitung von probiotischen Kulturen hängt stark von den eingesetzten Technologien, die eine erforderliche langfristige Lagerung von stabilen

Kulturen gewährleisten, ab. Der Überlebensgrad von Probiotika sollte während der Verarbeitung und der anschließenden Lagerung so hoch wie möglich sein und ist sowohl von technologischer als auch wirtschaftlicher Bedeutung [22].

„Die meisten derzeit am Markt befindlichen Probiotika werden entweder als Joghurts oder mit Hilfe pharmazeutischer Standardtechniken in Form von Tabletten, Kapselfüllungen oder Sachets produziert. Die Bakterienkulturen werden dabei getrocknet und können so in konzentrierter Form verabreicht werden“ [13]. Das Überleben der Zelle während der Trocknung und Lagerung hängt von vielen Faktoren ab, einschließlich der anfänglichen Konzentration der Mikroorganismen, der Wachstumsbedingungen, des Wachstumsmediums, des Trocknungsmediums und den Rehydrierungsbedingungen.

Die häufigsten für Probiotika angewendeten Trocknungsverfahren sind Sprühtrocknung und Gefriertrocknung [22]. In meiner Studie wird *Enterococcus faecium* M-74 gefriergetrocknet und deswegen wird diese Trocknungsmethode ausführlicher beschrieben.

## **1.9. Gefriertrocknung**

Die Gefriertrocknung wird für die Herstellung probiotischer Pulver seit Jahrzehnten genutzt. Die Gefriertrocknung besteht aus drei Phasen: Einfrieren, primäre und sekundäre Trocknung. Typischerweise werden die Zellen zunächst gefroren und dann unterhalb des Gefrierpunktes im Vakuum getrocknet. Dabei geht die Feuchte aus dem gefrorenen Produkt direkt vom festen in den dampfförmigen Zustand über und wird somit dem Gut entzogen. Dadurch ist das Wasser im flüssigen Zustand ausgeschaltet und es können während des Trocknungsprozesses keine enzymatischen, kolloidchemischen Reaktionen im Trockengut ausgelöst werden. Da die Verarbeitungsbedingungen im Vergleich zur Sprühtrocknung milder sind, werden in der Regel höhere probiotische Überlebensraten erreicht.

Die Bildung von extrazellulärem Eis während des Einfrierens verursacht eine Zunahme der extrazellulären Osmolarität, und somit fängt die Zelle zu entwässern an.

Es gibt zwei Arten von Gefrierverfahren: langsames und schnelles Einfrieren. Es wurde berichtet, dass durch das langsame Einfrieren und die allmähliche Entwässerung, das Eis außerhalb der Zelle langsam gebildet wird und zu umfangreichen zellulären Schäden führt. Durch das schnelle Einfrieren können diese Effekte vermieden werden.

Es wurde berichtet, dass je größer die Oberfläche der Zelle ist, desto höher ist die Membranschädigung aufgrund der extrazellulären Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens.

Enterokokken (kleine kugelige Zellen) sind offenbar widerstandsfähiger gegen Frost und Gefriertrocknung als größere Bakterien wie Laktobazillen.

Gebundenes Wasser spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung struktureller und funktioneller Integrität der biologischen Makromoleküle, der Zellwand bzw. der Zellmembran durch verschiedene Formen der schwachen Bindung. Folglich kann Wasserentzug während der Austrocknung zur Destabilisierung der strukturellen Integrität dieser zellulären Komponenten führen und dadurch Verlust oder Beeinträchtigung der Funktion verursachen. Es kann zu unerwünschten Wirkungen kommen, wie Denaturierung von empfindlichen Proteinen, Änderung der Membranlipiden, Hemmung des aktiven Transportes, Zurückhalten von Nährstoffen und verringerte Entwicklungsfähigkeit vieler Zellarten. Der Verlust der Lebensfähigkeit von getrockneten Kulturen ist eine Folge der Zellschädigung an mehreren Stellen, nämlich der Zellwand, der Zellmembran und der DNA, sowie eine Folge von Oxidation der Zellmembran [5].

## **1.10. Protektanten**

Eine Vielzahl von Schutzmitteln (Protektanten) sind zum Schutz der Lebensfähigkeit von Probiotika während der Dehydratisierung vor der Gefriertrocknung oder Sprühtrocknung hinzugefügt; nur wenige der Protektanten wurden bisher mit zufrieden stellenden Ergebnissen eingesetzt.

Viele Faktoren beeinflussen die Wirksamkeit von Protektanten in Mikroorganismen, z. B. Art, Stamm, Zellgröße und Form von Bakterien, die Wachstumsphase und -rate, Inkubationstemperatur, Zusammensetzung des Wachstumsmediums, pH, Osmolarität, Belüftung, Zellenwasser, Lipidgehalt und Zusammensetzung der Zellen, Dichte beim Einfrieren, Zusammensetzung des Einfriermediums, Abkühlungsgeschwindigkeit, Lagertemperatur und Dauer der Lagerung, Erwärmungsrate und Wiederaufnahmemedium [21].

Der Zeitpunkt der Entdeckung, dass Glycerin und DMSO eukaryotische Zellen (einschließlich bestimmter mikrobieller Zellen) gegen Frostschäden schützen, bezeichnet den Beginn der modernen Kryotechnik.

Verschiedene Protektanten sind anders durchlässig zu den Zellen, was den Mechanismus ihrer Schutzwirkung beeinflusst. Drei Kategorien von Protektanten können folglich identifiziert werden:

- a) durchdringen sowohl die Zellwand als auch die cytoplasmatische Membran (z.B. DMSO und Glycerin)
- b) durchdringen die Zellwand, aber nicht die cytoplasmatische Membran (z.B. Mono- und Disaccharide, Aminosäuren und Polymere mit niedrigem Molekulargewicht)
- c) durchdringen nicht die Zellwand oder haben keine direkte Interaktion mit der Zellwand oder Membran (z.B. Polymere mit hohem Molekulargewicht, wie Proteine und Polysaccharide).

Durchlässigen Mitteln bietet die Zellmembran mehr Plastizität und Bindungswasser an und dadurch unterdrücken sie überschüssige Dehydratisierung während des Einfrierens. Halbdurchlässige Mittel schützen die Zellen vor dem Einfrieren durch Konzentrierung zwischen der cytoplasmatischen Membran und der Zellwand als Pufferschicht. Dadurch bieten sie der Membran mechanischen Schutz.

Nicht-durchlässige Mittel reichern sich an der Oberfläche von Mikroorganismen an, bilden eine zähflüssige Schicht, hemmen die Rate des Eiswachstums über die Erhöhung der Lösungsviskosität und halten so die formlose Struktur des Eises in der unmittelbaren Nähe der Zelle [22].

Wenn sich passende Protektanten innerhalb der Zellen akkumulieren, wird die osmotische Differenz zwischen den internen und externen Umgebungen reduziert [58].

## **1.11. Ziele der Studie**

Das Ziel dieser Studie ist die genaue Untersuchung des Effekts von Gefriertrocknung auf die zelluläre Aktivität und Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74. Für diese Zwecke wurde die Gefriertrocknung in ihre 2 Komponenten: Einfrieren und Trocknung eingeteilt und der Einfluss der einzelnen Komponenten auf die zelluläre Aktivität und Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 untersucht. Die zelluläre Aktivität wird durch die Zugabe von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt, die in der Lage sind, die Änderungen in der Membranpermeabilität, Esteraseaktivität, Superoxid-Bildung, Membranpotential und interzellulärer pH-Wert zu zeigen. Die zellulären Charakteristika wurden sowohl mit Hilfe von Methoden der Fluorimetrie als auch der Durchflusszytometrie untersucht. Die Vermehrungsfähigkeit

wird durch die Keimzahlbestimmung auf Petrischalen durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Änderungen während des Einfrierens und im zweiten während des Trocknungsvorganges untersucht. Im nächsten Schritt wird der Effekt von Protektanten auf Einfrieren und Trocknung der Zelle überprüft.

In der Studie wurden 4 unterschiedliche Protektanten eingesetzt: Glukose, Saccharose, Trehalose und Magermilch in den Konzentrationen 10%, 50% und 100% (bezogen auf die nasse Masse der Zellen).

Saccharose, Glukose und Trehalose sind Disaccharide und gehören zu der zweiten Kategorie von Protektanten, d.h. sie können die Zellwand, aber nicht die cytoplasmatische Membran durchdringen. Magermilch gehört zur dritten Kategorie der Protektanten, d.h. es kann weder die Zellwand, noch die cytoplasmatische Membran durchdringen.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Liste der verwendeten Materialien**

*Enterococcus faecium* M74, Chr. Hansen (Schweden)

MRS-Broth, Merck (Deutschland)

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar, Merck (Deutschland)

Petrischalen, Bibby Sterilin Ltd. Stone (Großbritannien)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, Merck (Deutschland)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, Merck (Deutschland)

Propidiumiodid, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

Fluoresceindiacetat, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

Dihydrorhodamin 123, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

3,3'-Dihexyloxycarbocyanin Iodid, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

„Mr. Frosty“, Krackeler Scientific, Inc (USA)

Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 ml, Eppendorf AG (Deutschland)

Saccharose, Fluka (Deutschland)

Trehalose, Merck (Deutschland)

Magermilch, Merck (Deutschland)

Glukose, SigmaAldrich Chemie GmbH (Deutschland)

96 well polystyrene microplate, transparent (Greiner Bio-One, Österreich)

Zitronensäure, Merck (Deutschland)

#### **2.1.2. Liste der verwendeten Geräte**

Autoklav: Varioklav Typ 400 H+P, Labortechnik GmbH (Deutschland)

Laminar-Air-Flow: Variolab Mobilien W90 Typ SWB, Waldner Electronics (Deutschland)

Trockenschrank: Modell 500, Memmert GmbH + Co KG (Deutschland)  
Zentrifuge: High Speed Zentrifuge Typ RC5C, Sorvall Instruments (Schweiz)  
Vortex (Heidolph REAX 2000, Deutschland)  
Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Deutschland)  
Microplate reader: Infinite®200, Tecan Österreich GmbH (Österreich)  
Durchflusszytometer: EPICS® XL-MCL™, Beckman Coulter (USA)  
Incubator shaker innov 4000, New Brunswick Scientific Co. Inc. (USA)  
Lyophilisator: Heto Power Dry LL 3000, Thermo Electron Corporation (USA)

### **2.1.3. Nährmedium: MRS-Broth**

#### **Zusammensetzung (g/l):**

Caseinpepton 10,0  
Fleischextrakt 8,0  
Hefeextrakt 4,0  
D(+) - Glukose 20,0  
Dikaliumhydrogenphosphat 2,0  
Diammoniumhydrogencitrat 2,0  
Natriumacetat 5,0  
Tween®80 1,0  
Magnesiumsulfat 0,2  
Mangansulfat 0,04

**Zubereitung:** 52,2 g der Substanz wurde in 1L destilliertem Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

**Lagerung:** bei +2 bis +8 °C

### **2.1.4. Agar**

#### **Zusammensetzung:** Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (g/l):

Caseinpepton 20,0  
Hefeextrakt 5,0  
Natriumchlorid 5,0

Natriumcitrat 1,0  
Natriumazid 0,15  
Kanamycinsulfat 0,02  
Äsculin 1,0  
Ammoniumeisen(III)citrat 0,5  
Agar 5,0

**Zubereitung des Nährmediums:** 47,5 g der Substanz wurden durch Erhitzen gelöst und anschließend für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Das heiße Nährmedium wurde mit Hilfe einer sterilen, auf 10,0 ml eingestellten Pipette unter dem Laminar-Airflow, um keimarme Arbeit zu gewährleisten, in Petrischalen gegossen.

### **2.1.5. Phosphatpuffer**

Es wurde Phosphatpuffer mit Zitronensäure (pH=6,8) zum Verdünnen bei der Keimzahlbestimmung und zum Waschen bei der Ernte der Bakterien verwendet.

#### **Zusammensetzung:**

Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) x  $2\text{H}_2\text{O}$  13,7 g/l  
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ ) x  $2\text{H}_2\text{O}$  3,65 g/l

**Zubereitung:** Die Bestandteile wurden in 1L destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Diese Lösung wurde mit Zitronensäure auf pH=6,8 eingestellt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von *Enterococcus faecium* M-74

*E. faecium* M-74 wurde in 10,0 ml des flüssigen Nährmediums MRS-Broth bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden Wachstum wurden 100,0 µl der Bakteriensuspension auf 10,0 ml MRS-Broth übertragen.

### 2.2.2. Ernten und Waschen von *Enterococcus faecium* M-74

Nach 24 h Wachstum wurde die Suspension bei 8000 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit Phosphatpuffer (pH=6,8) gewaschen und anschließend in 10,0 ml desselben Phosphatpuffers resuspendiert. Dadurch wurde die erste Verdünnung hergestellt. Protektanten wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (10%, 50% und 100%, bezogen auf der nassen Masse der Zellen) hinzugefügt, nachdem man die Bakterien gewaschen und im Phosphatpuffer erneut suspendiert hatte.

### 2.2.3. Einfrieren

1,0 ml der ersten Verdünnung wurden in „Safe-Lock Reaktionsgefäße“ pipettiert und bei folgenden Temperaturen eingefroren: -80 °C, kontinuierliche Temperatursenkung -1 °C/Minute bei -80 °C in Isopropanol und -196 °C (in flüssigem Stickstoff).

Die kontinuierliche Temperatursenkung wurde mittels „Mr. Frosty“ durchgeführt. „Mr. Frosty“ ist ein Behälter aus Polycarbonate mit sicherem Verschluss. Er besitzt einen Röhrenhalter und einen Schaumstoff-Einsatz. Der Behälter wird mit Isopropanol (100%) gefüllt und beim Einfrieren im Gefrierschrank (bei -80 °C) erfolgt eine kontinuierliche -1 °C/Minute Abkühlung,



**Abb. 1:** „Mr. Frosty“

die für eine erfolgreiche Aufbewahrung der Zellen in den „Safe-Lock Reaktionsgefäßen“ erforderlich ist. Der Röhrenhalter verhindert den Kontakt mit Isopropanol und die Entfernung von Etiketten auf den Röhren [10,30].

Die Bakterien wurden zuerst 3 Stunden in „Mr. Frosty“ im Tiefkühlschrank bei -80 °C und danach 21 Stunden ohne Mr. Frosty bei -80 °C gelagert.

Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgt folgendermaßen: Die Bakterien wurden zuerst 1 Stunde in flüssigem Stickstoff (-196 °C) und anschließend 23 Stunden bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.2.4. Gefriertrocknung**

Hier wurde zusätzlich nach dem Einfrieren 1,0 ml unaufgetaute Probe (Zellen ohne bzw. mit Protektanten) 12 Stunden mit dem Lyophilisator getrocknet. Das Standardprogramm mit folgenden Parametereinstellungen (Kondensatortemperatur -50 °C und 0,3 mbar Druck) wurde verwendet.

#### **2.2.5. Analytische Methoden**

##### **2.2.5.1. Keimzahlbestimmung**

Um die Menge der lebensfähigen Bakterien in den frischen, gefrorenen und gefriergetrockneten Proben zu bestimmen wurden die Kolonien auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar-Platten gezählt.

Die erste Verdünnung wurde durch das Einbringen von 1,0 ml bzw. das Pulver entsprechend 1,0 ml Probe der Bakteriensuspension in 9,0 ml des Phosphatpuffers durchgeführt, wobei diese mit einem Vortex-Mischer gemischt wurde. Mit dieser Methode wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet. Für die Übertragung der Bakterien auf die Nährmediumplatten wurde 0,1 ml der geeigneten Verdünnungen entnommen und unter Verwendung eines Drigalski-Spatels auf der gesamten Oberfläche verteilt. Drei Agarplatten wurden nach diesem Verfahren von jeder geeigneten Verdünnung vorbereitet. Die Platten wurden bei 37 °C für 72 Stunden inkubiert und schließlich die koloniebildenden Einheiten gezählt.

## **2.2.5.2. Untersuchung der zellulären Aktivität**

### **Färben von frischen Zellen**

1,0 ml der ersten Verdünnung von frischen Zellen wurden in 9,0 ml Phosphatpuffer erneut resuspendiert. 500,0 µl dieser Verdünnung wurden in „Safe-Lock Reaktionsgefäße“ pipettiert. Dann wurden 500,0 µl der Arbeitslösung der Fluoreszenzfarbstoffe jeder der Proben hinzugefügt und mit einem Vortexer gemischt. Danach wurde 1 h (bei Verwendung von Propidiumiodid betrug die Inkubation 15 Min.) bei 37 °C vor Licht geschützt inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Aktivität durch Fluorimetrie und Durchflusszytometrie gemessen.

Die „Safe-Lock Reaktionsgefäße“ wurden mit Aluminiumfolie bedeckt, um sicher zu gehen, dass die Stabilität der Fluoreszenzfarbstoffe nicht durch Licht beeinflusst werden.

### **Färben von gefrorenen Zellen**

Nach 24 Stunden des Einfrierens wurden alle Proben aufgetaut und 1,0 ml davon wurde in 9,0 ml Phosphatpuffer suspendiert. Von jeder dieser Verdünnungen wurden 500,0 µl in „Safe-Lock Reaktionsgefäße“ pipettiert und 500,0 µl der Arbeitslösung der Fluoreszenzfarbstoffe hinzugefügt. Alle weiteren Schritte waren gleich wie beim Färben von frischen Zellen.

### **Färben von gefriergetrockneten Zellen**

Nach 24 Stunden des Einfrierens und 12 Stunden der Trocknung wurde die getrocknete Probe in 10,0 ml Phosphatpuffer suspendiert und die Bestimmung der zellulären Aktivität wie oben bzw. unter Keimzahlbestimmung beschrieben, durchgeführt.

## **2.2.6. Fluoreszenzfarbstoffe**

Fünf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei der Studie verwendet: Propidiumiodid (PI), Fluoresceindiacetat (FDA), Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), 3,3'-Dihexyloxycarbocyanin iodid (DiOC6(3)) und Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE).

Die Arbeitslösungen der Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Phosphatpuffer vorbereitet.

### **Propidiumiodid (PI)**

Propidiumiodid wird sehr oft verwendet, um den DNA-Gehalt quantitativ festzustellen.

PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer molekularen Masse von 668,4.

Da Propidiumiodid eine nicht membranpermeable Substanz ist, dringt die unbehandelte und intakte Zellen nicht durch. Es passiert jedoch die geschädigten Zellmembranen. PI wird allgemein zur Identifizierung von geschädigten und intakten Zellen verwendet.

Propidiumiodid bindet sich an die DNA durch das Einschieben zwischen die Basen mit weniger oder keiner Reihenfolgenpräferenz. PI bindet genauso an die RNA. Wenn der Farbstoff an eine Nukleinsäure gebunden ist, dann verstärkt sich seine Fluoreszenz auf das 20-30fache. Bei einer Bindung an die Nukleinsäure liegt das Absorptionsmaximum für PI bei 535 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 617 nm [23].

Eine 1,5 mM Stammlösung wurde durch das Lösen von PI in entionisiertem Wasser hergestellt und bei 4 °C und vor Licht geschützt gelagert. Die Arbeitslösung wurde durch das Lösen von 1,2 µl der Stammlösung in 1,0 ml Phosphatpuffer frisch vor Gebrauch hergestellt.

### **Fluoresceindiacetat (FDA)**

FDA (MW 416,38) ist ein nicht fluoreszierendes hydrophobes Fluorescein-Derivat, das Membranen passieren kann, woraufhin die intrazellulären Esterasen die Diacetatgruppe des Farbstoffes hydrolysieren und das stark fluoreszierende Produkt Fluorescein entsteht. Die Fluoresceinmoleküle häufen sich in Zellen mit intakten Membranen, somit kann der grün fluoreszierende Farbstoff als Marker für lebende Zellen verwendet werden. Zellen ohne intakte Zellmembran oder ohne aktiven Metabolismus können das fluoreszierende Produkt nicht anhäufen und weisen daher diese grüne Fluoreszenz nicht auf.

Die Substanz kann in DMSO oder Aceton gelöst werden. Das Absorptionsmaximum für FDA ist 494 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 521 nm [24].

Die Stammlösung enthält 5 mg FDA pro ml. Für die Arbeitslösung wurden 2,0 µl der Stammlösung in 1,0 ml Phosphatpuffer frisch vor Gebrauch gelöst.

### **Dihydrorhodamin 123 (DHR)**

DHR 123 ist selbst nicht fluoreszierend, aber es wird von den meisten Zellen aufgenommen und dort durch oxidierende Spezies oder durch zelluläre Redoxsysteme zum stark fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert, welches in den Mitochondrienmembranen angehäuft wird.

Dihydrorhodamin 123 wird für den Nachweis von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid, Hypochlorsäure, Peroxynitrite und Superoxide (in Anwesenheit der Peroxydase oder Zellfarbstoff c) verwendet.

DHR 123 ist in DMSO löslich und muss bei -20 °C vor Luft und Licht geschützt gelagert werden, besonders in gelöster Form [25].

Das Absorptionsmaximum für DHR 123 ist bei 500 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum liegt bei 536 nm.

Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 5 mM in DMSO. Für die Arbeitslösung wurden 5,0 µl der Stammlösung in 1,0 ml Phosphatpuffer frisch vor Gebrauch gelöst.

### **3,3' - Dihexyloxacarbocyanin iodid (DiOC6(3))**

DiOC6(3) (MW 572,53) ist eine membranpermeable Substanz. „In geringeren Konzentrationen akkumuliert es aufgrund des hohen negativen Potentials hauptsächlich in den Mitochondrien. In höheren Konzentrationen kommt es zusätzlich zur Anreicherung in Membranen, wie auch im endoplasmatischen Retikulum.“ Durch die Ansammlung kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Es wird zur Messung des Membranpotentials der Zellen verwendet [26].

DiOC6(3) ist löslich in DMSO und DMF. Das Absorptionsmaximum liegt bei 484 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 501 nm. Es muss bei 4 °C gelagert und vor Licht geschützt werden, besonders in gelöster Form.

Die Stammlösung hat eine Konzentration von 1 mM in DMSO. Für die Arbeitslösung wurden 20,0 µl der Stammlösung in 1,0 ml Phosphatpuffer frisch vor Gebrauch gelöst.

### **Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE)**

CFDA-SE passiert die Zellmembran und sammelt sich in den lebenden Zellen. Durch intrazelluläre Esteraseenzyme wird es gespalten und ein fluoreszierendes Produkt

entsteht. Dieses Produkt bindet kovalent an intrazelluläre Lysinrückstände und andere Aminquellen. CFDA-SE wird für die Messung des intrazellulären pH-Werts verwendet, da seine Fluoreszenzintensität stark vom pH-Wert abhängt [27].

CFDA-SE ist in DMSO löslich. Das Absorptionsmaximum liegt bei 492 nm und das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 517 nm.

Die Stammlösung enthält 4 mg CFDA-SE pro ml DMSO. Für die Arbeitslösung wurden 5,5 µl der Stammlösung in 1,0 ml Phosphatpuffer frisch vor Gebrauch gelöst.

### **2.2.7. Fluorimetrie**

96-Well-Platten wurden für die Messung der Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Reader verwendet. 50,0 µl jeder Probe wurden sechsfach in die Mikrotiterplatten pipettiert, um zuverlässigere Daten zu erhalten. Der sterilisierte Phosphat-Puffer, in dem die zu untersuchende Substanz gelöst war, musste als Leerwert berücksichtigt werden.

„Bei der Fluorimetrie erfolgt die quantitative Bestimmung einer Substanz durch das von ihr emittierte Fluoreszenzsignal. Dazu wird die Probe zunächst mit Licht einer bestimmten, von der Struktur der Substanz abhängigen Wellenlänge, angeregt. Die Energie des eingestrahnten Lichts wird absorbiert, wodurch Elektronen auf höhere Energieniveaus gehoben werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Excitation. Da diese Zustände aber sehr instabil sind, kehren die Elektronen nach kurzer Zeit wieder in den ursprünglichen Energiezustand zurück. Dabei geben sie einen Teil der zuvor aufgenommene Energie in Form von längerwelligem Licht wieder ab. Man spricht in diesem Fall von Emission. Man spricht in diesem Fall von Emission. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei der Menge der fluoreszierenden Substanz proportional“ [28].

### **2.2.8. Durchflusszytometrie (Flow cytometry)**

Für die Messung der Fluoreszenz wurde 1,0 ml des sterilisierten filtrierten Phosphatpuffers in ein zur Verfügung gestelltes Rohr pipettiert und 50,0 µl der Probe hinzugefügt. Nachdem man mit einem Vortex gemischt hatte, konnte die Probe gemessen werden. Der Durchflusszytometer wurde auf 3000 Zellen pro Probe eingestellt und jede Probe wurde 4-mal gemessen.

„Die Durchflusszytometrie ist eine Methode für die Quantifizierung der Bestandteile oder der strukturellen Besonderheiten der Zellen hauptsächlich durch optische Mittel. Der Name Durchflusszytometrie kommt daher, dass bei dieser Technik verschiedene Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen untersucht werden, während diese Zellen hintereinander (im "Gänsemarsch") durch eine dünne Messkammer fließen. Im Englischen heißt die Technik "Flow Cytometry" und die Messkammer "Flow Cell", also Flusszelle. Für die meisten Anwendungen der Durchflusszytometrie ist diese Flusszelle aus Glas und die zu untersuchenden Zellen werden beim Durchfließen von der Seite von einem Laserlicht angestrahlt. Die Geräte, mit denen man durchflusszytometrische Analysen durchführt, heißen Durchflusszytometer, auch "FACS-Geräte" (=fluorescence activated cell sorting) oder kurz "FACS" genannt, die Analysen "FACS-Analysen".

#### **Das Streulicht** (engl. Light Scatter)

Eine Eigenschaft einer Zelle, die in der Durchflusszytometrie gemessen wird, ist das Streulicht. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Somit erhält man durch Messung des Streulichts auf einfache Weise wichtige Informationen über die Zelle. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen.

#### **Das Vorwärtsstreulicht** (engl. Forward Light Scatter oder Low Angle Scatter)

Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes.

#### **Das Seitwärtsstreulicht** (engl. Side Scatter, Orthogonal Scatter oder Right Angle Scatter)

Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark von der Oberflächenbeschaffenheit und Zellgranularität einer Zelle ab.

Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einer Graphik, einem sog. Dot-Plot, dargestellt. Dabei wird meist auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen.

#### **Das Fluoreszenzsignal:**

Ein modernes Durchflusszytometer kann auch das von zellgebundenen Fluoreszenzmarkern emittierte Licht messen. Dadurch wird erlaubt, eine Vielzahl von Merkmalen auf den Zellen zu untersuchen“ [29].

Die Durchflusszytometrie wird in der Medizin meist für die Untersuchung von Zellen des Blutes oder Knochenmarks eingesetzt. Die dabei gewonnenen Informationen dienen vor allem der Diagnose und Verlaufsbeobachtung von Leukämien (Blutkrebs) und Immunschwächekrankheiten (HIV-Infektion) [9].

### **2.2.9. Die statistische Analyse**

Für jedes Experiment wurde eine Probe der nicht-gestressten Bakterien als Kontrolle hergestellt. Die Kontrolle wurde nach der erneuten Suspendierung im Phosphatpuffer hergestellt und gleichzeitig gemessen. Die im Ergebnisteil angeführten Berechnungen wurden mit den im Microsoft Excel XP integrierten Statistik-Funktionen durchgeführt.. Mittelwert und Standardabweichung wurden für jedes Experiment berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede in den resultierenden Daten wurde mit dem t-Test ausgewertet; p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Einfrieren**

#### **3.1.1. Einfluss auf die zelluläre Aktivität**

Die Gefriertrocknung besteht aus 2 hauptsächlichen Schritten, Einfrieren und Trocknung. Zuerst wurde das Einfrieren und der schützende Einfluss von Hilfsstoffen auf die Zelle während des Einfrierens untersucht.

Die zwei Fluoreszenzfarbstoffe PI und FDA wurden erfolgreich für fluorimetrische Messungen eingesetzt.

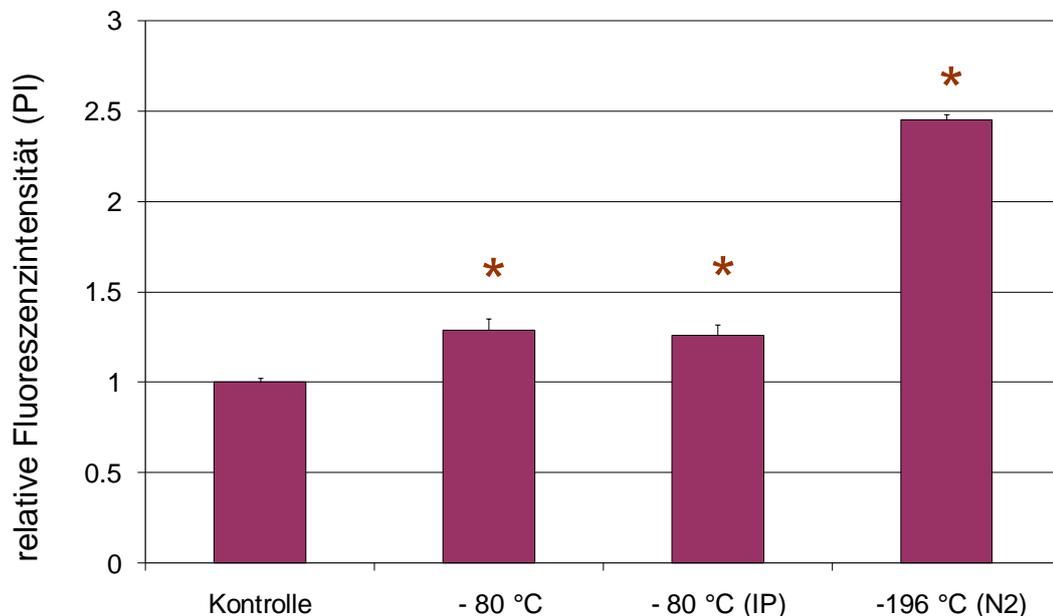
Die fluorimetrischen Messungen von DHR 123, DioC6 (3) und CFDA-SE lieferten keine signifikanten Werte. Deswegen werden diese Ergebnisse nicht gezeigt.

Die mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Informationen unterscheiden sich von denjenigen, die mit der Fluorimetrie erzielt werden. Während mit der Fluorimetrie die Intensität der Fluoreszenz bestimmt wird, kann man mit der Durchflusszytometrie neben der Intensität der Fluoreszenz auch die Anzahl von fluoreszierenden Zellen bestimmen. Die Unterschiede zwischen den relativen Intensitätsmengen der nicht - gefrorenen und der gefrorenen Bakterien, unabhängig von der Art des Einfrierens, waren nicht signifikant. Durch FACS wird der Mittelwert der Intensität von gefärbten Zellen gemessen. Ein geringe Anzahl weist auf eine hohe Intensität hin. Deswegen ist der Mittelwert der Intensität nicht aussagekräftig. Aus diesem Grund wird in den Abbildungen mit Durchflusszytometrie nur die relative Menge der Anzahl fluoreszierender Zellen gezeigt.

Bei den Versuchen mit dem Durchflusszytometer wurden keine signifikanten Daten für FDA, DHR 123, DiOC6 (3) und CFDA-SE erhalten. Aus diesem Grund werden nur die Messungen für PI vorgestellt.

## Änderung der PI-Intensität bzw. Anzahl der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren ohne Einsatz von Protektanten

### a) Fluorimetrie

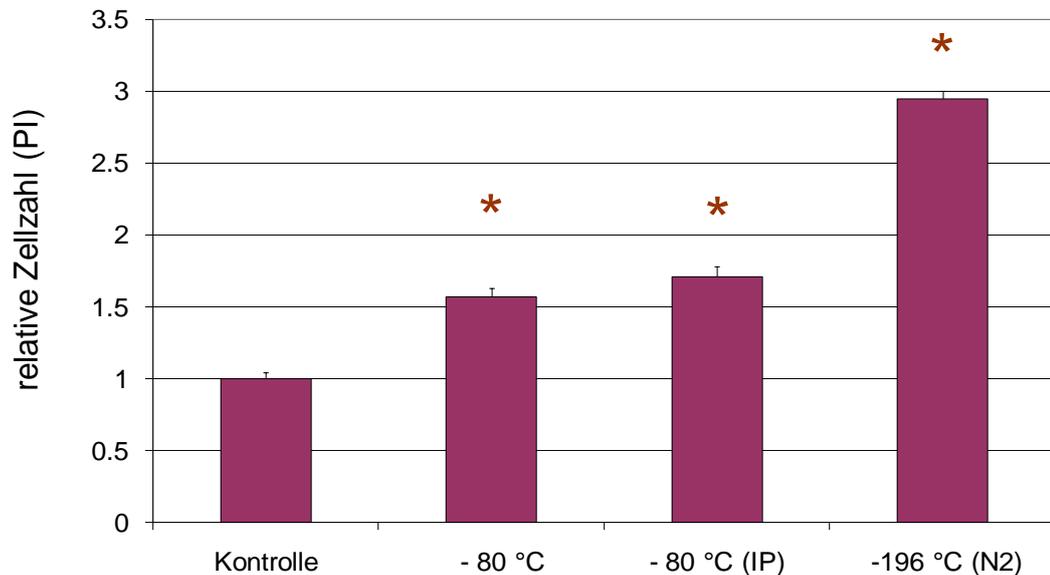


**Abb. 2: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Abb. 2 zeigt, dass die Membranschäden von *Enterococcus faecium* M-74 während des Einfrierens gut erkennbar sind. Die Unterschiede zwischen den nicht - gefrorenen und den gefrorenen Zellen waren in allen 3 Fällen signifikant. Dabei beträgt die relative Fluoreszenzintensität bei den gefrorenen Bakterien bei -80 °C 1,29 im Vergleich zu den nicht - gefrorenen Bakterien. Bei den gefrorenen Bakterien bei -80 °C (in Isopropanol) beträgt die relative Fluoreszenzintensität 1,26. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der relativen PI-Intensität von Zellen gefroren bei -80 °C und -80 °C (IP). Bei den Zellen in flüssigem Stickstoff war die relative Fluoreszenzintensität 2,45 ( $p < 0,05$ ). Damit ist die höchste Zellmembranschädigung beim Einfrieren in Stickstoff entstanden.

## b) Durchflusszytometrie



**Abb. 3: Vergleich der relativen Anzahl von fluoreszierenden frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid unter Verwendung der Durchflusszytometrie**

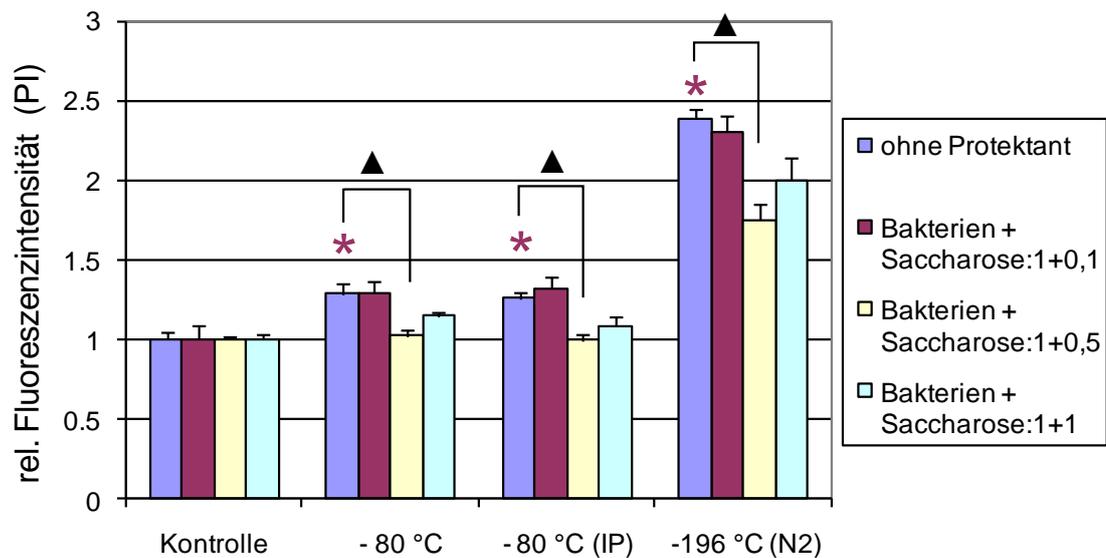
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Als *Enterococcus faecium* M-74 bei -80 °C eingefroren wurde, erhöhte sich die relative Anzahl der Zellen, die ihre Membrandurchlässigkeit geändert hatten um das 1,57-fache im Vergleich zu den nicht - gefrorenen Zellen. Beim Einfrieren bei -80 °C (Isopropanol) liegt diese relative Anzahl bei 1,71 und ist nicht signifikant höher als der Wert bei -80 °C ohne Isopropanol. Dadurch bestätigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie die von der Fluorimetrie. In flüssigem Stickstoff ist die Anzahl der Zellen, deren Zellmembran geschädigt wurde, um das 2,95-fache höher als die der nicht-gefrorenen Zellen.

## Änderung der PI-Intensität bzw. Anzahl der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Saccharose als Protektant

In der nachfolgenden Abbildung wurde die PI-Intensität der mit Saccharose geschützten und eingefrorenen Zellen dargestellt.

### a) Fluorimetrie



**Abb. 4: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Saccharose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

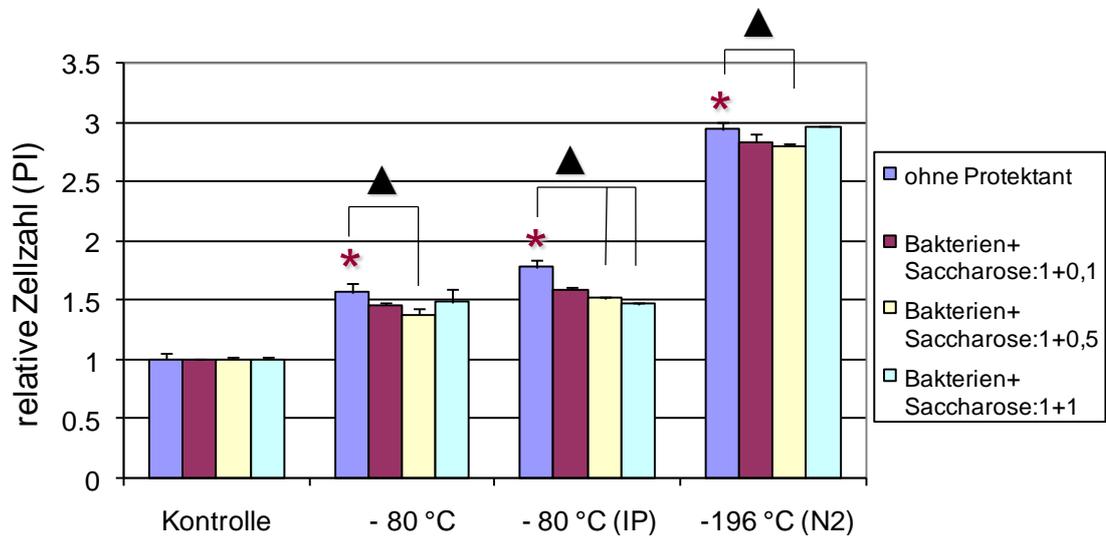
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Abbildung 4 zeigt, dass die Zugabe von Saccharose als Protektant in 50% -iger Konzentration Einfluss auf die Membranschädigung von Bakterien während des Einfrierens hat. Die Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität zwischen Bakterien ohne Protektant und Bakterien, die mit Saccharose bei 50% -iger Konzentration geschützt werden sind signifikant. Bei den gefrorenen Zellen bei -80 °C und bei -80 °C (in Isopropanol) hat sich die relative PI-Intensität der Zellen mit Zugabe 50% Saccharose im Vergleich zu nicht - gefrorenen Zellen kaum erhöht, was darauf hinweist, dass Saccharose in 50% -iger Konzentration vollen Schutz bietet. Die PI-

Intensität der eingefrorenen Zellen, geschützt mit 10% Saccharose, war vergleichbar mit der PI-Intensität von eingefrorenen Zellen ohne Protektant.

## b) Durchflusszytometrie



**Abb. 5: Vergleich der relativen Anzahl von fluoreszierenden frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Saccharose als Protektant unter Verwendung der Durchflusszytometrie**

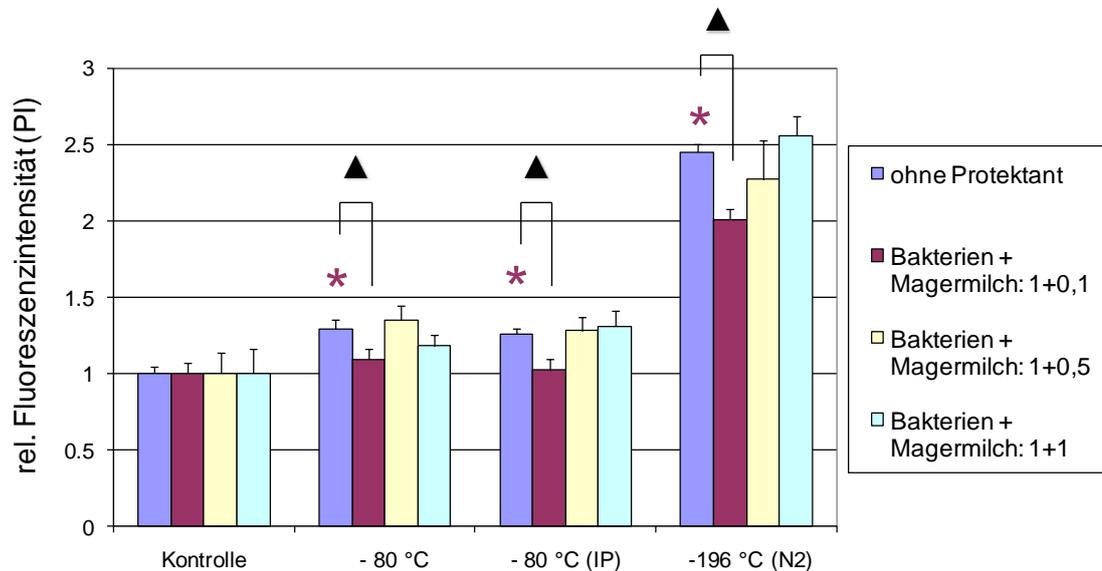
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die relative Menge an geschädigten Bakterien untersucht. Wie bei der Fluorimetrie hat sich die Zugabe von Saccharose in 50% -iger Konzentration als guter Schutz gezeigt, da die Anzahl der Bakterien, bei denen die Membran durch das Einfrieren geschädigt wurde, gesunken ist. Beim Einfrieren in Isopropanol hat sich die Zugabe von 100% Saccharose als guter Schutz gezeigt und lieferte signifikante Unterschiede der relativen Anzahl im Vergleich zu den nicht geschützten Zellen.

## Änderung der PI-Intensität bzw. Anzahl der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Magermilch als Protektant

### a) Fluorimetrie



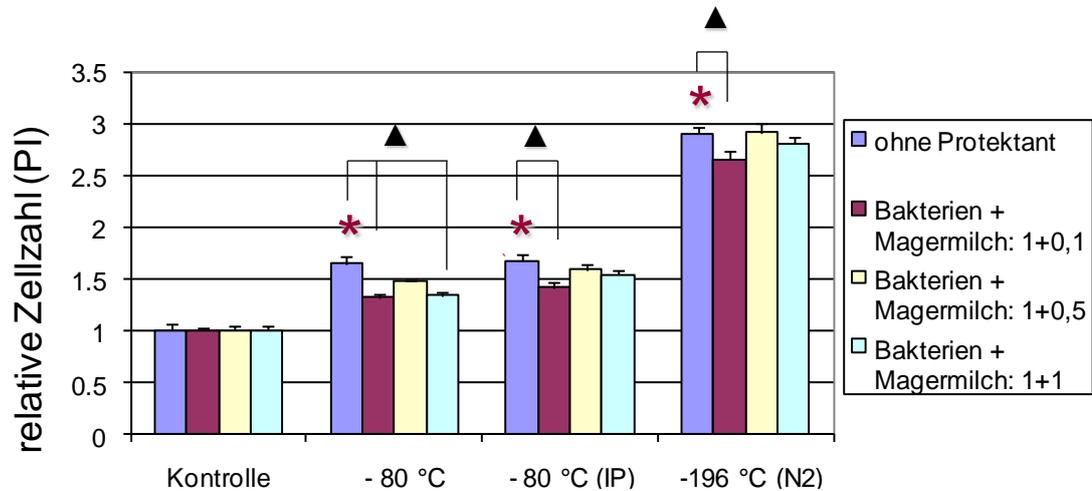
**Abb. 6: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Magermilch als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Abbildung 6 zeigt die PI-Intensität der eingefrorenen Zellen, geschützt mit Magermilch. In dieser Abbildung wird offensichtlich, dass Magermilch als Protektant für den Schutz der Zellmembran hilfreich ist. Im Gegensatz zu Saccharose, bei der die 50% -ige Konzentration das beste Ergebnis lieferte, hat sich bei Magermilch die geringste, also die 10% -ige Konzentration als am wirksamsten gezeigt. Bei den Proben mit 50% -iger und 100% -iger Magermilch - Konzentration sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Proben ohne Protektant zu erwähnen.

## b) Durchflusszytometrie



**Abb. 7: Vergleich der relativen Anzahl von fluoreszierenden frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Magermilch als Protektant unter Verwendung der Durchflusszytometrie**

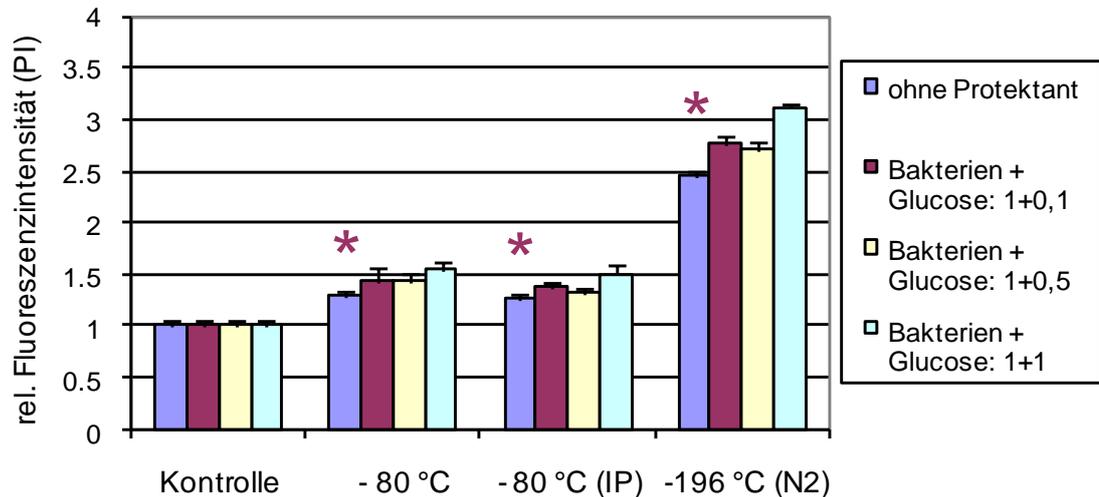
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Diese Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Fluorimetrie-Messungen. Im Vergleich zu den ungeschützten Zellen hat sich die relative Menge der Zellen mit geschädigter Membrane in den Proben mit 10% Magermilch erheblich verringert. Ebenso zeigte die 100% -ige Konzentration eine Besserung, besonders bei Zellen, die bei -80 °C eingefroren wurden. Das wird dadurch bestätigt, dass die Anzahl der fluoreszierenden Zellen geschützt mit 100% Magermilch und eingefroren bei -80 °C, einen signifikanten Unterschied zu den Zellen ohne Protektant aufweist.

## Änderung der PI-Intensität bzw. Anzahl der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Glukose als Protektant

### a) Fluorimetrie

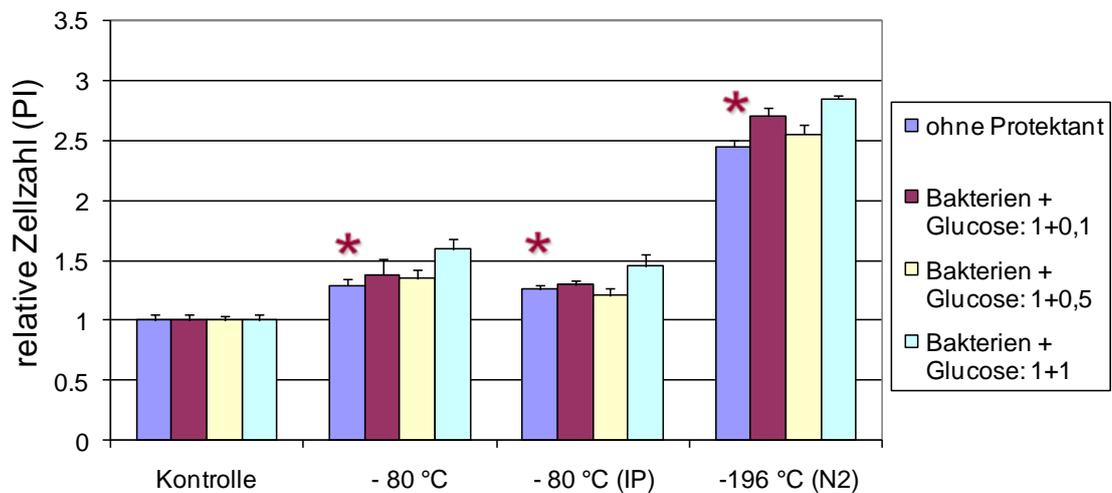


**Abb. 8: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Glukose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Als dritter Protektant wurde Glukose verwendet. Das Ergebnis der Fluorimetrie-Messungen zeigt, dass Glukose in allen drei Konzentrationen keine guten Eigenschaften als Kryoprotektant für *E.faecium* M-74 besitzt. Die relative Fluoreszenzintensität ist unter Verwendung von Glukose im Vergleich zu Zellen ohne Protektant nicht erniedrigt. Dadurch ergibt sich, dass Glukose keine Verringerung der Membranschädigungen bewirkt.

## b) Durchflusszytometrie



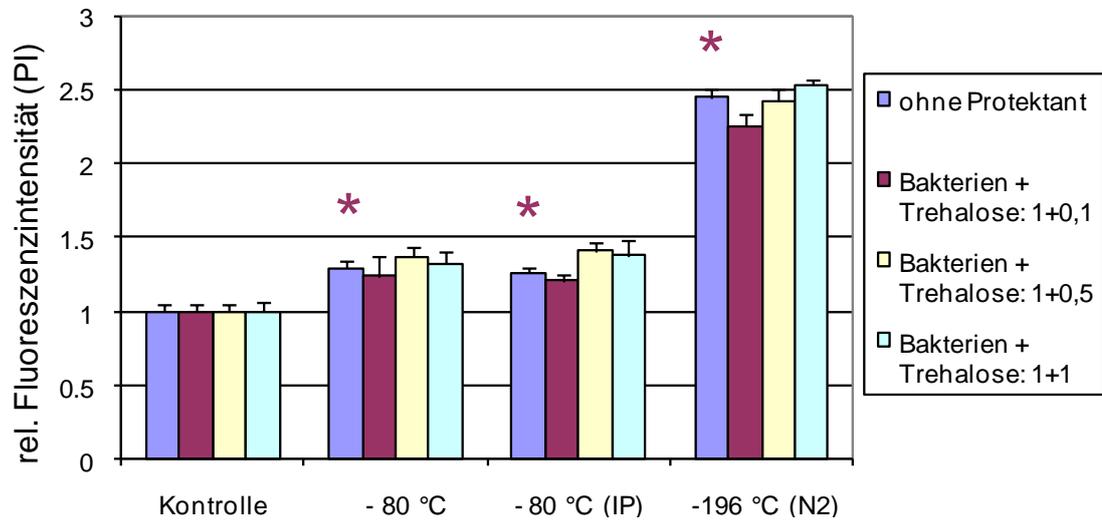
**Abb. 9: Vergleich der relativen Anzahl von fluoreszierenden frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Glukose als Protektant unter Verwendung der Durchflusszytometrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Die Messungen mit dem Durchflusszytometer lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Anzahl der Zellen mit geschädigten Membranen hat sich unter Verwendung von Glukose als Protektant im Vergleich zu den Zellen ohne Protektant nicht verringert.

## Änderung der PI-Intensität bzw. Anzahl der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Trehalose als Protektant

### a) Fluorimetrie

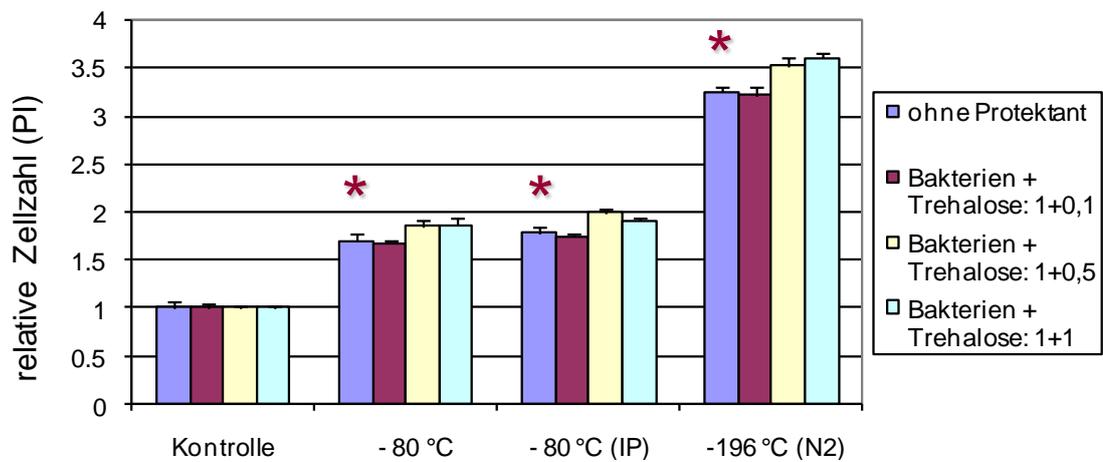


**Abb. 10: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Trehalose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Als vierter Protektant wurde Trehalose verwendet. Das Ergebnis der Messungen ist, dass Trehalose in 10% -iger, 50% -iger und 100% -iger Konzentration, basierend auf der nassen Bakterienmasse, die Zellmembran nicht schützen kann. Die relative Fluoreszenzintensität hat sich unter Verwendung von Trehalose bei allen 3 Konzentrationen im Vergleich zu nicht geschützten Zellen kaum verändert und es ergibt sich, dass Trehalose keinen protektiven Einfluss auf die Zellmembran hat.

## b) Durchflusszytometrie



**Abb. 11: Vergleich der relativen Anzahl von fluoreszierenden frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Trehalose als Protektant unter Verwendung der Durchflusszytometrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

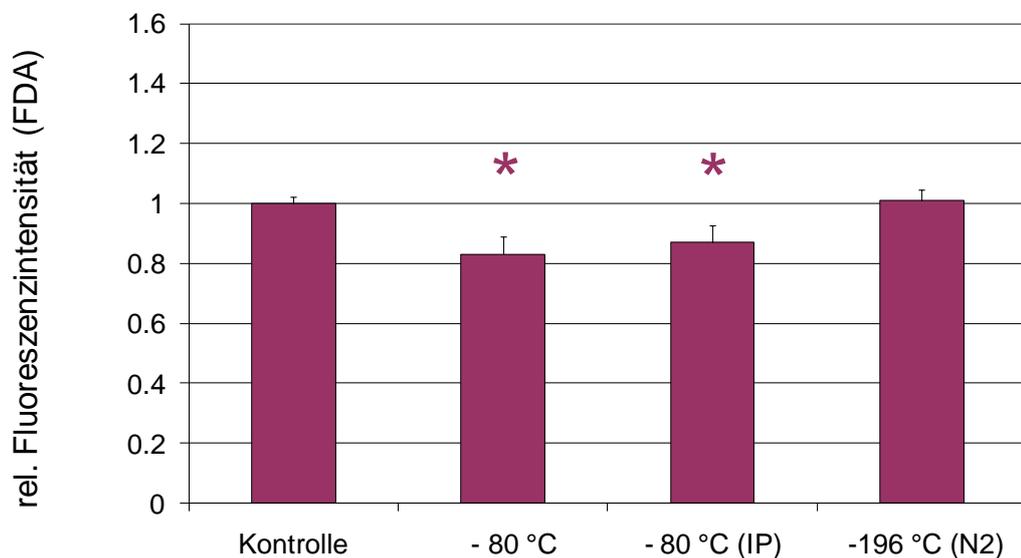
Die Messungen mit dem Durchflusszytometer bestätigen die oben genannten Ergebnisse. Es wurde festgestellt, dass sich bei den Proben mit 10% -, 50% - und 100% -iger Trehalose die Anzahl der Zellen mit Membranschädigung im Vergleich zu den Proben ohne Protektant nicht signifikant geändert hat. Daraus ergibt sich, dass Trehalose als Kryoprotektant die Zellmembran von *E. faecium* M-74 nicht schützen kann. Das wurde sowohl mit der Fluorimetrie als auch mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Fluoresceindiacetatmoleküle häufen sich in Zellen mit intakten Membranen, woraufhin intrazelluläre Esterasen die Diacetatgruppe des Farbstoffes hydrolysieren und das stark fluoreszierende Produkt Fluorescein entsteht. Somit kann der grün fluoreszierende Farbstoff als Marker für lebende Zellen verwendet werden. Zellen ohne aktiven Metabolismus oder ohne intakte Zellmembran sind nicht in der Lage das fluoreszierende Produkt anzuhäufen. Daher weisen sie eine geringere relative Fluoreszenzintensität im Vergleich zu gesunden Zellen mit normaler Enzymaktivität bei den Messungen auf. Das Ergebnis ist also im Vergleich zu Messungen mit

Propidiumiodid umgekehrt. Bei PI war die Fluoreszenzintensität durch die erhöhte Schädigung höher.

### **Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren ohne Einsatz von Protektanten (Fluorimetrie)**

Es wird zuerst der Unterschied der relativen Fluoreszenzintensität von Fluoresceindiacetat zwischen den nicht-gefrorenen und den gefrorenen Zellen ohne Protektant mit Hilfe der Fluorimetrie untersucht.



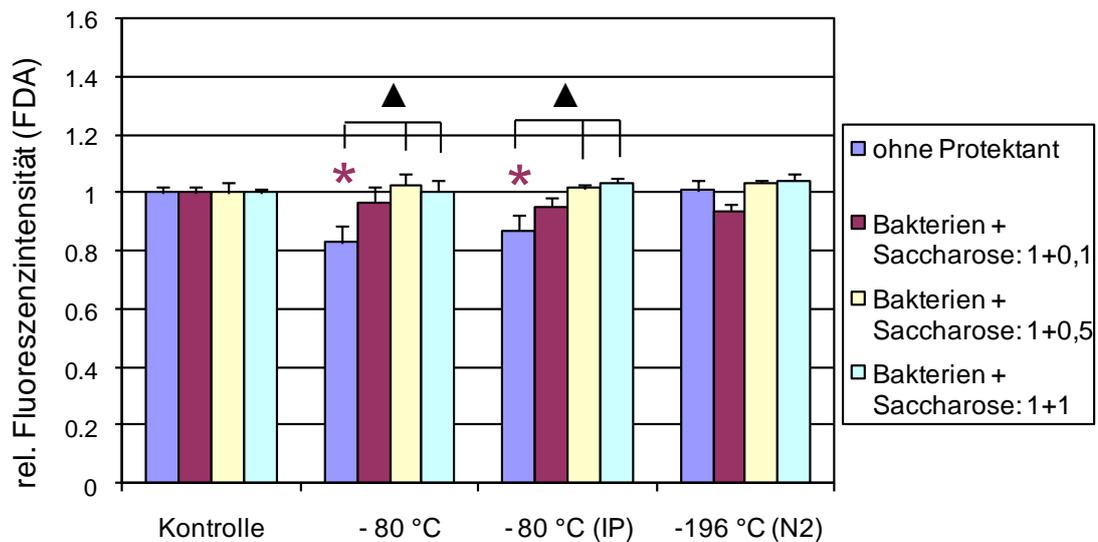
**Abb. 12: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Fluoresceindiacetat unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Aus Abbildung 12 geht hervor, dass sich die relative Fluoreszenzintensität der Zellen, die bei -80 °C und bei -80 °C (in Isopropanol) gefroren wurden, im Vergleich zu nicht-gefrorenen Zellen signifikant verringert hat und dadurch die Enzymaktivität gesunken ist. Die relative FDA-Intensität der Zellen, die bei -80 °C eingefroren wurden, hat sich im Vergleich zu den in Isopropanol eingefrorenen Zellen nicht signifikant geändert. Daraus ergibt sich, dass die kontinuierliche -1 °C/Minute Abkühlungsrate in Isopropanol für die Erhaltung der Enzymaktivität nicht von Bedeutung ist. Im

Gegensatz zu den Messungen mit PI, wo das Einfrieren bei  $-196\text{ °C}$  (in flüssigem Stickstoff) die höchste Membranschädigung verursacht hatte, hat sich die relative FDA-Intensität durch das Einfrieren der Bakterien bei  $-196\text{ °C}$  (in flüssigem Stickstoff) kaum verändert.

### Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Saccharose als Protektant (Fluorimetrie)



**Abb. 13: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei  $-80\text{ °C}$ , bei  $-80\text{ °C}$  (in Isopropanol) und bei  $-196\text{ °C}$  (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Fluoresceindiacetat, bei Zugabe von Saccharose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

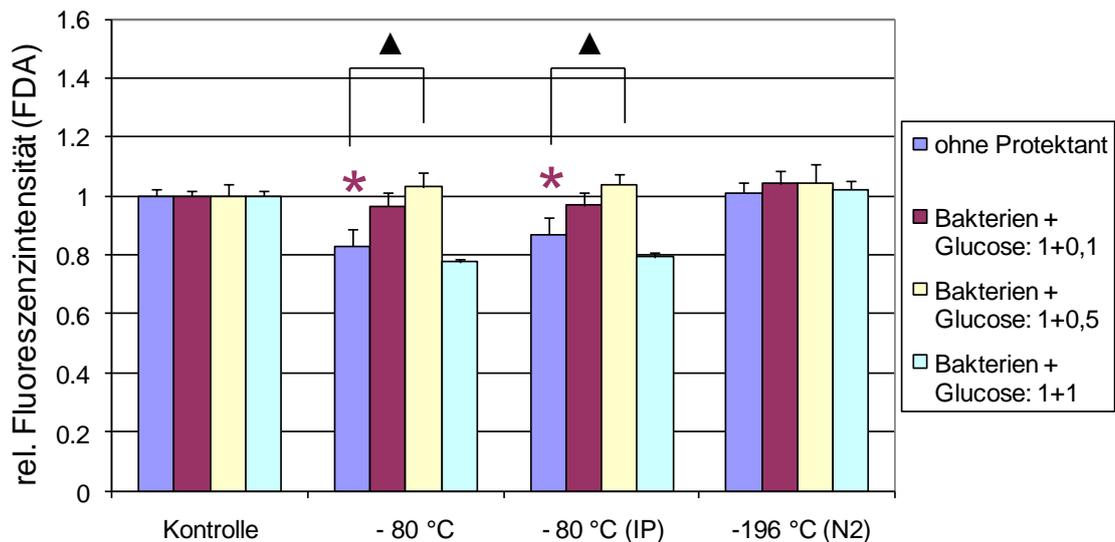
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Auch Saccharose hat Einfluss auf die zelluläre Aktivität während des Einfrierens. In den Proben mit 50% -iger und 100% -iger Konzentration von Saccharose, bezogen auf die nasse Masse, ist beim Einfrieren in  $-80\text{ °C}$  und in  $-80\text{ °C}$  (in Isopropanol) die relative FDA-Intensität erhöht und mit frischen Proben ausgeglichen. Damit bietet Saccharose in den erwähnten Konzentrationen, *Enterococcus faecium* M-74 guten Schutz hinsichtlich der Enzymaktivität. Die relative Fluoreszenzintensität ist auch in den Zellen mit 10% Saccharose gestiegen, aber der Unterschied zu den Zellen ohne Protektant war nicht signifikant.

## Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Magermilch als Protektant (Fluorimetrie)

In folgender Abbildung werden die Messungen mit Magermilch als Protektant dargestellt.



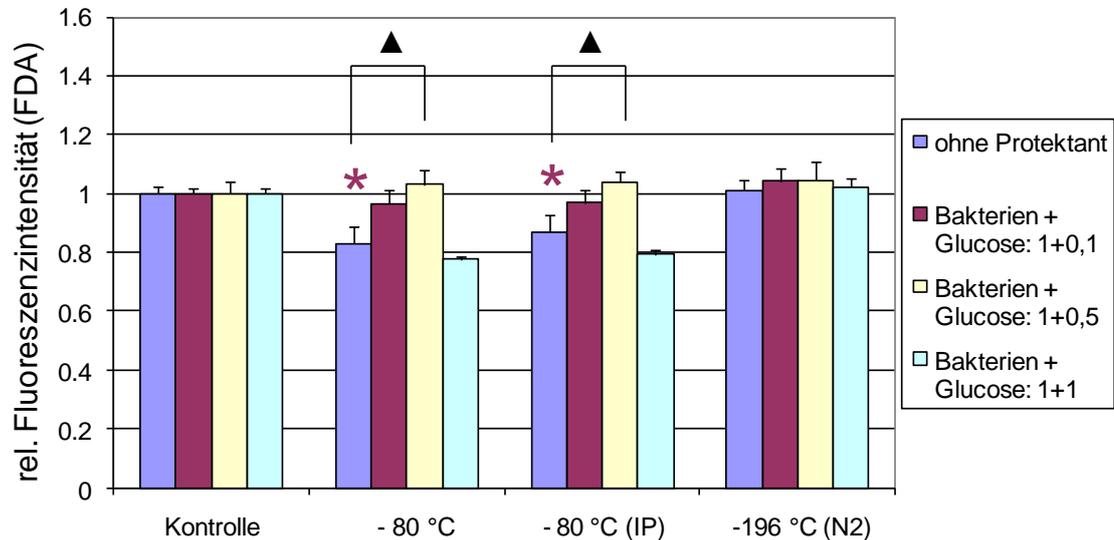
**Abb. 14: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Fluoresceindiaceetat, bei Zugabe von Magermilch als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Als bester Schutz hat sich die 10% -ige Magermilchkonzentration, bezogen auf die nasse Bakterienmasse, erwiesen. Die relative FDA-Intensität stieg in den Proben mit 10% Magermilch, im Vergleich zu den Proben ohne Protektant beim Einfrieren bei -80 °C und bei -80 °C (in Isopropanol), signifikant an. Magermilch in 50% - und 100% -iger Konzentration, bezogen auf die nasse Bakterienmasse, wies, verglichen mit den Proben ohne Protektant, keine Verbesserung der Enzymaktivität auf.

**Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Glukose als Protektant (Fluorimetrie)**



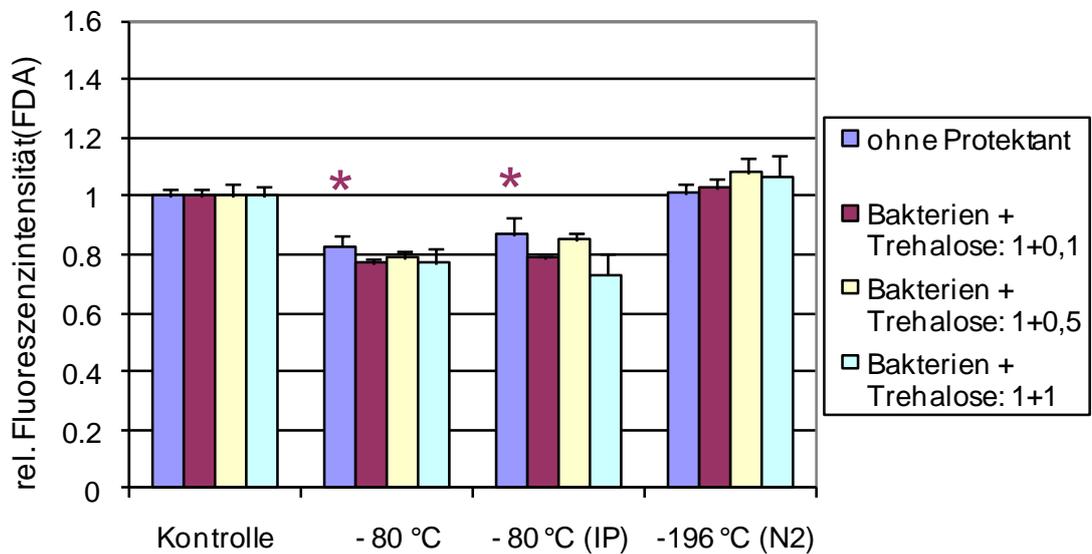
**Abb. 15: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Fluoresceindiacetat, bei Zugabe von Glukose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

▲ Signifikanz zwischen gefrorenen Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Im Gegensatz zu den Messungen mit PI wurde festgestellt, dass Glukose in 50% -iger Konzentration zur Erhaltung der Enzymaktivität hilfreich ist, weil die relative Fluoreszenzintensität gleich hoch wie die der nicht - gefrorenen Zellen ist.

**Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei Zugabe von Trehalose als Protektant (Fluorimetrie)**



**Abb. 16: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff), gefärbt mit Fluoresceindiaceetat, bei Zugabe von Trehalose als Protektant unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Wie bei den Messungen mit PI, als Trehalose keinen membranschützenden Effekt gezeigt hat, konnte die Enzymaktivität auch nicht erhalten bleiben.

### 3.1.2. Keimzahlbestimmung

Die Vermehrungsfähigkeit wird durch die Bestimmung der Keimzahl auf Petrischalen durchgeführt. Um den Einfluss des Einfrierens auf die Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 zu bestimmen, wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut und danach in bestimmten Verdünnungen auf Agarplatten, wie in Kapitel 2 beschrieben, verteilt. Anschließend wurden die koloniebildenden Einheiten nach 72h der Inkubation bei 37 °C gezählt.

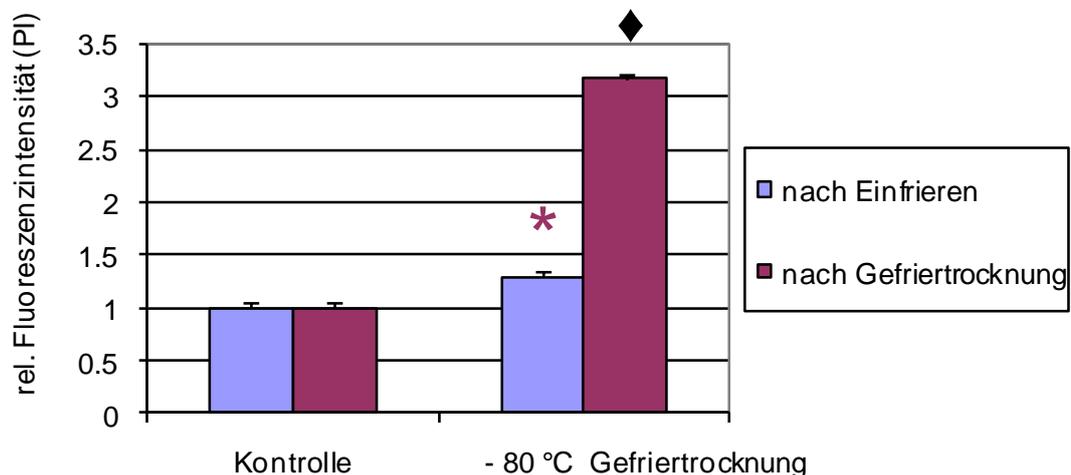
Als *Enterococcus faecium* M-74 bei -80 °C, bei -80 °C (in Isopropanol) und bei -196 °C (in flüssigem Stickstoff) eingefroren wurde, konnte nur eine geringe Wirkung auf die Zellteilung gesehen werden. Die Änderungen der koloniebildenden Einheiten waren in allen 3 Fällen des Einfrierens nicht signifikant.

## 3.2. Trocknung

Im zweiten Teil der Studie wurde die zelluläre Aktivität und die Vermehrungsfähigkeit von *E. faecium* M-74 während der Trocknung untersucht. Hierbei wurden die Bakterien zuerst 24 Stunden bei  $-80^{\circ}$  eingefroren und dann 12h in einem Lyophilisator getrocknet. Anschließend wurden die zelluläre Aktivität und die Vermehrungsfähigkeit untersucht.

### 3.2.1. Einfluss auf die zelluläre Aktivität

#### Änderung der PI-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Gefriertrocknen ohne Einsatz von Protektanten (Fluorimetrie)



**Abb. 17: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei  $-80^{\circ}$  C und gefriergetrocknet, gefärbt mit Propidiumiodid unter Verwendung der Fluorimetrie**

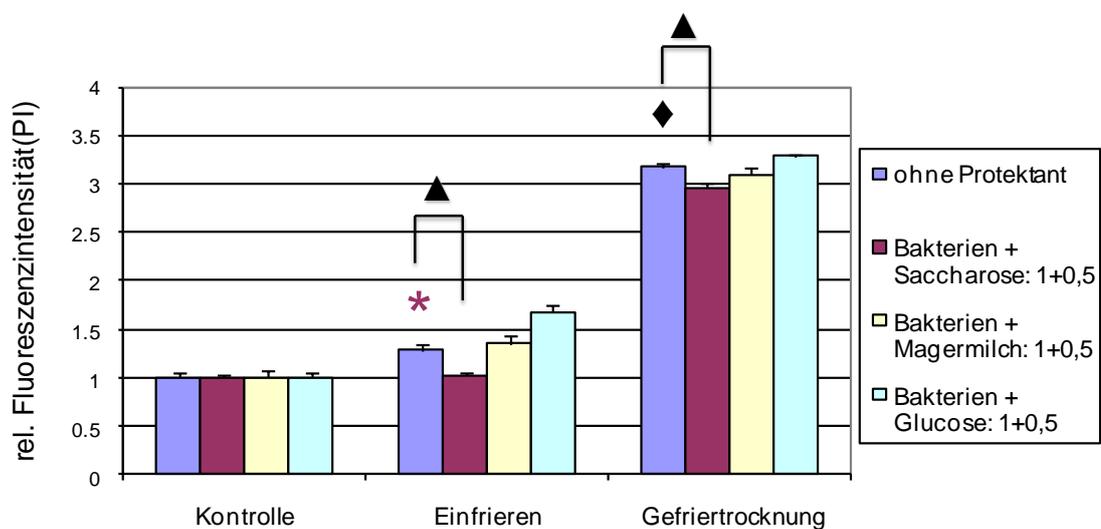
\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

♦ Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ( $p < 0,05$ )

Die Gefriertrocknung führte zu einem 3,18 fachen Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität, verglichen mit der relativen Fluoreszenzintensität der frischen Zellen. Die relative PI-Intensität von gefriergetrockneten Zellen war erheblich höher als die relative PI-Intensität von eingefrorenen Zellen. Dadurch kann man folgern, dass die Gefriertrocknung für 24 Stunden eine viel höhere Membranschädigung für *Enterococcus faecium* M-74 verursacht, als das Einfrieren alleine.

## Änderung der PI-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Gefriertrocknen bei Zugabe von Saccharose, Magermilch oder Glukose als Protektanten (Fluorimetrie)

Als nächster Schritt wurde der Einfluss von Protektanten während der Gefriertrocknung untersucht. Um Einheitlichkeit zu erhalten, wurde eine vergleichbare Konzentration von 50 % eingesetzt. Es wurden Saccharose, Magermilch und Glukose verwendet und keine Trehalose, da diese keinen Schutz während des Einfrierens zeigte. Der Effekt der erwähnten Protektanten wird in Abbildung 18 dargestellt:



**Abb. 18: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C und gefriergetrocknet, gefärbt mit Propidiumiodid, bei Zugabe von Saccharose, Magermilch oder Glukose als Protektanten unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

◆ Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ( $p < 0,05$ )

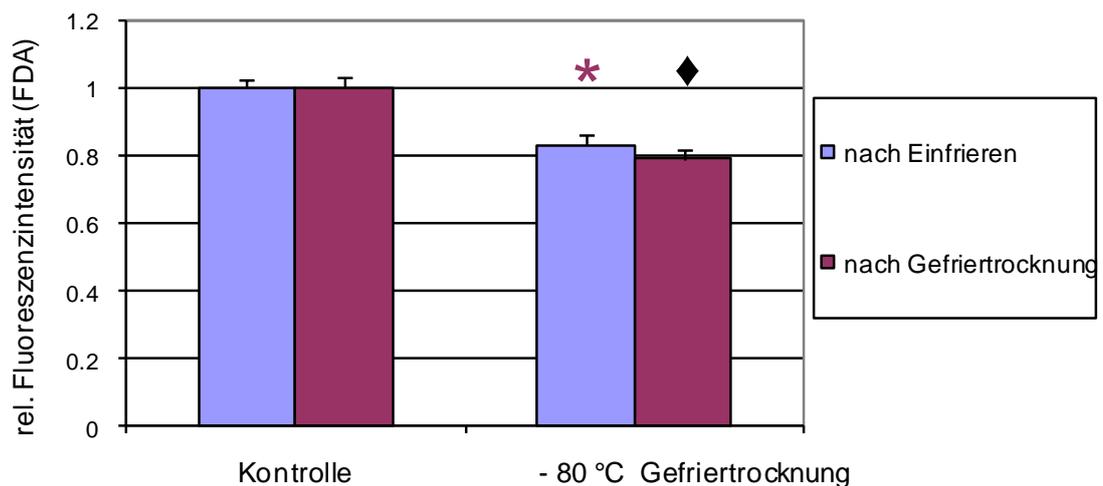
▲ Signifikanz zwischen gefrorenen bzw. gefriergetrockneten Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Saccharose zeigte wieder die besten Eigenschaften für den Schutz im Bezug auf Membranschädigung im Vergleich zu den anderen Protektanten. Die Verringerung der relativen PI-Intensität ist unter Verwendung von Saccharose als Protektant, verglichen mit den ungeschützten Proben, signifikant. Diese Verringerung der Intensität ist aber kleiner als während des Einfrierens, und dadurch ist der schützende Effekt von

Saccharose auf die Membran im Prozess der Gefriertrocknung von kleinerer Bedeutung. Magermilch bzw. Glukose in 50% -iger Konzentration lieferten keine gute Membranprotektion. Wie in der Abbildung gezeigt wurde, gab es keine signifikante Änderung in den relativen PI-Intensitäten der gefriergetrockneten Zellen mit Magermilch bzw. Glukose oder ohne genannten Protektanten.

### Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Gefriertrocknen ohne Einsatz von Protektanten (Fluorimetrie)

Die Änderung in der Enzymaktivität nach der Gefriertrocknung wurde durch die Färbung der Proben mit Fluoresceindiacetat bestimmt. Der Effekt der Gefriertrocknung auf die Enzymaktivität von *Enterococcus faecium* M-74 wird in Abbildung 19 dargestellt.



**Abb. 19: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C und gefriergetrocknet, gefärbt mit Fluoresceindiacetat, unter Verwendung der Fluorimetrie**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

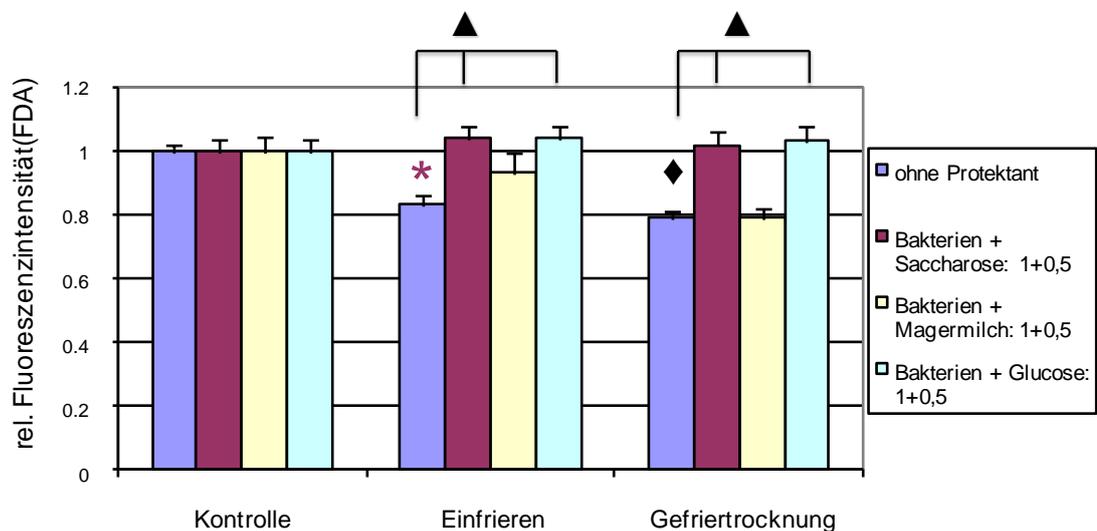
♦ Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )

Die relative FDA-Intensität nach der Gefriertrocknung ist im Vergleich zur relativen FDA-Intensität der frischen Zellen gefallen und dadurch die Enzymaktivität der gefriergetrockneten Bakterien. Die relative Fluoreszenzintensität nach der

Gefriertrocknung ist 0,79-fach niedriger, als die der nicht-gestressten Zellen ( $p < 0,05$ ). Die relativen Fluoreszenzintensitäten nach dem Einfrieren und nach der Trocknung waren vergleichbar.

### Änderung der FDA-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Gefriertrocknen bei Zugabe von Saccharose, Magermilch oder Glukose als Protektanten (Fluorimetrie)

Die Zugabe von Protektanten (Saccharose, Magermilch oder Glukose) in 50% -iger Konzentration hatte unterschiedliche Effekte auf die Enzymaktivität, die in nachfolgender Abbildung gezeigt werden.



**Abb. 20: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von frischen Zellen zu Zellen, gefroren bei -80 °C und gefriergetrocknet, gefärbt mit Fluoresceindiacetat, bei Zugabe von Saccharose, Magermilch oder Glukose als Protektanten unter Verwendung der Fluorimetrie**

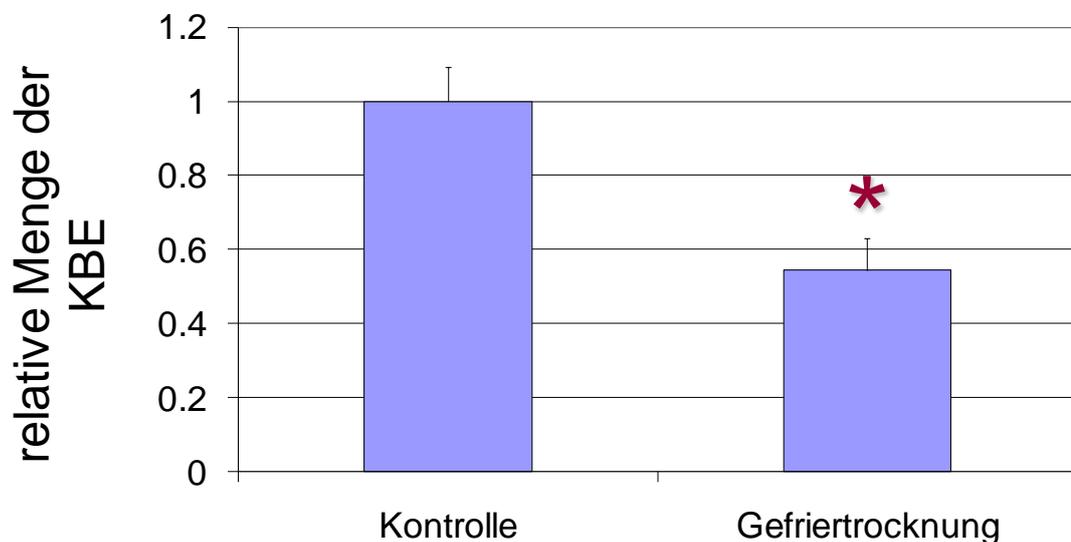
- \* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefrorenen Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )
- ◆ Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ohne Protektant ( $p < 0,05$ )
- ▲ Signifikanz zwischen gefrorenen bzw. gefriergetrockneten Zellen ohne und mit Protektant ( $p < 0,05$ )

Die relative FDA-Intensität ist nach der Gefriertrocknung bei den mit Glukose und Saccharose geschützten Zellen, im Vergleich zu nicht geschützten Zellen signifikant gestiegen. Dadurch ergibt sich, dass Glukose und Saccharose, wie bei den Einfrier-

Versuchen mit 50% -iger Protektanten-Konzentration, protektive Eigenschaften während der Gefriertrocknung zeigen. Die relative Fluoreszenzintensität wurde bei den Proben mit Glukose und Saccharose, verglichen mit den ungestressten Proben, nicht reduziert. Dadurch ergibt sich, dass die Enzymaktivität von *Enterococcus faecium* M-74 während der Gefriertrocknung, unter Verwendung von Glukose und Saccharose in 50% -iger Konzentration, nicht gestört wurde. Magermilch in 50% -iger Konzentration wies keine Veränderung der FDA-Intensität im Vergleich zu Zellen ohne Protektant auf und hatte somit keinen Einfluss auf die Enzymaktivität während der Gefriertrocknung.

### 3.2.2. Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Vermehrungsfähigkeit nach der Gefriertrocknung zeigte eine deutlich reduzierte Anzahl der lebenden Bakterien. Abbildung 21, die den Effekt der Gefriertrocknung auf die Keimzahl darstellt, zeigt einen dramatischen Abfall der Anzahl von koloniebildenden Einheiten.

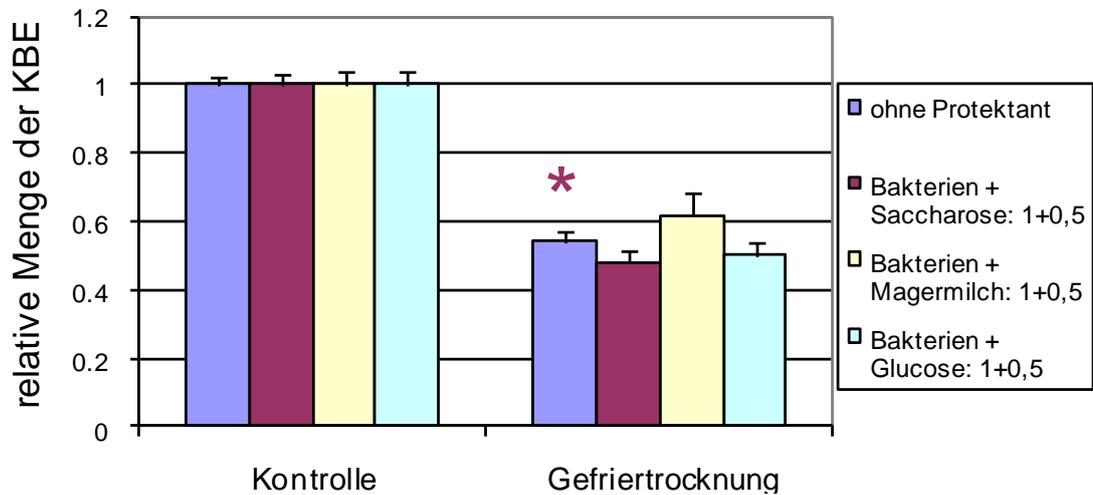


**Abb. 21: Änderung der relativen Menge der koloniebildenden Einheiten von frischen Zellen zu gefriergetrockneten Zellen**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ohne Protektant  
( $p < 0,05$ )

Die relative Menge der KBE nach der Gefriertrocknung ist im Vergleich zu den frischen Zellen von 1 auf 0,54 deutlich gesunken. Aus diesen Versuchen kann geschlossen

werden, dass die Gefriertrocknung einen starken Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 hat.



**Abb. 22: Änderung der relativen Menge der koloniebildenden Einheiten von frischen Zellen zu gefriergetrockneten Zellen, bei Zugabe von Saccharose, Magermilch oder Glukose als Protektanten**

\* Signifikanz zwischen Kontrolle und gefriergetrockneten Zellen ohne Protektant (p<0,05)

Der Einfluss der Protektanten: Saccharose, Magermilch und Glukose in 50% -iger Konzentration, auf die Vermehrungsfähigkeit nach der Gefriertrocknung wurde untersucht. Die Zugabe von oben genannten Hilfsstoffen hatte keinen nachweisbaren schützenden Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *E. faecium* M-74 nach der Gefriertrocknung.

## 4. Diskussion

Der Effekt der Gefriertrocknung auf die zelluläre Aktivität und Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 wurde studiert, wobei die 2 Abschnitte Einfrieren und Trocknung getrennt beurteilt wurden. Dabei gelangten protektive Zusatzstoffe wie Saccharose, Magermilch, Glukose und Trehalose zum Einsatz.

### 4.1. Einfluss des Einfrierens und der Trocknung auf die Zellviabilität von nicht-geschützten Zellen

Die zunehmende PI-Intensität der gefärbten Zellen nach dem Einfrieren bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff (-196 °C) im Vergleich zu nicht-gefrorenen Zellen zeigte, dass die Zellmembranschädigung bei niedrigeren Temperaturen entstanden ist. Die PI-Intensität und damit die Zellmembranschädigung ist bei in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefrorenen Zellen im Vergleich zu bei -80 °C eingefrorenen Zellen höher.

Die Messungen nach der Gefriertrocknung zeigen erheblich höhere PI-Intensitäten und damit eine höhere Membranschädigung im Vergleich zu den Werten nach dem Einfrieren.

Frühere Arbeiten berichten, dass die Membranschädigung während des Einfrierens aufgrund der extrazellulären Bildung von Eiskristallen entsteht [31].

Der Grund der Membranschädigung während der Gefriertrocknung ist die Entfernung des gebundenen Wassers während der Trocknung, das bei der Stabilisierung der funktionellen und strukturellen Integrität der Zellmembran eine wichtige Rolle spielt. Durch diesen Wasserentzug während der Austrocknung kommt es zur Beeinträchtigung der Zellmembranfunktion [5].

Die verringerte Fluoreszenz von FDA bei Zellen, gefroren bei -80 °C und bei -80 °C im Isopropanol im Vergleich zu nicht-gefrorenen Zellen, weist auf eine schwächere Aktivität der Esterasen hin. Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) zeigte keine Verschlechterung der Enzymaktivität.

Die relative FDA-Intensität hat sich nach der Gefriertrocknung im Vergleich zum Einfrieren nicht signifikant erniedrigt und dadurch erscheint die Enzymaktivität von *Enterococcus faecium* M-74 nicht zusätzlich reduziert. Es wurde daher festgestellt, dass

der Vorgang der Trocknung bei der Gefriertrocknung einen schlechten Effekt auf die Zellmembran und keinen auf die Enzymaktivität ausübt.

Schon Tsvetkov u. Brankova zeigten, dass zelluläre Inaktivierung größtenteils beim einfrierenden Schritt und nicht während der Trocknung auftritt [32].

Durch Einfrieren in Isopropanol kommt es durch das langsame Abkühlen der Proben um ca.  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Min}$  zu einem Eiskristallwachstum. Dadurch werden die Kanäle und Poren an der Oberfläche der Zellen gebildet und diese ermöglichen den leichteren Dampfausgang während der Trocknung [33].

Es wird aber während des langsamen Einfrierens durch die allmähliche Entwässerung das Eis außerhalb der Zelle langsam und in größerem Umfang gebildet und große Eiskristallbildung kann an den zerbrechlichen Zellmembranen erheblichen Schaden verursachen. Durch das schnelle Einfrieren können diese Effekte vermieden werden [33].

Meine Ergebnisse zeigten hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellmembranschädigung beim Einfrieren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (in IP) im Vergleich zu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Enzymaktivität von *E.faecium* M-74 ist beim Einfrieren mit bzw. ohne Isopropanol vergleichbar, womit keine signifikanten Veränderungen der relativen FDA-Intensität zwischen Einfrieren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Isopropanol und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  entstanden sind.

Die Vermehrungsfähigkeit wird durch die koloniebildenden Einheiten (KBE) quantitativ bestimmt, womit man die Fähigkeit der Zellen, sich im passenden Medium zu reproduzieren, untersucht.

In meiner Studie wurde die Anzahl der KBE beim Einfrieren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (in Isopropanol) und bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht signifikant reduziert, woraus geschlossen werden kann, dass die angewendete Methoden des Einfrierens keinen Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 hat.

Nach der Gefriertrocknung waren nur 54% der Zellen vermehrungsfähig. Daraus ergibt sich, dass die Trocknung während der Gefriertrocknung schlechtere Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 hat als das Einfrieren.

To und Etzel (1997) lieferten ähnliche Ergebnisse, da bei ihrer Untersuchung nur 60-70% der Zellen, die den einfrierenden Schritt überlebten, auch den Trocknungsschritt überlebten [34].

## 4.2. Einfluss von Protektanten auf die Zellviabilität nach dem Einfrieren und nach der Gefriertrocknung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde der Einfluss der Protektanten Saccharose, Magermilch, Glukose und Trehalose auf die zelluläre Aktivität nach dem Einfrieren und nach der Gefriertrocknung bestimmt.

Saccharose wurde in der Vergangenheit in Konzentrationen von 1-68% sehr häufig als Protektant von Mikroorganismen benutzt. Die schützende Wirkung der Saccharose beim Einfrieren und Gefriertrocknung wird durch die Vermeidung des schädigenden eutektischen Gefrierpunktes der Zellflüssigkeit durch Abfangen der Salze in hochviskoser oder glasartiger Phase hervorgerufen [21]. Die kryoprotektive Wirkung dieses Disaccharids wurde von Keith beschrieben [42], der das langfristige Überleben von *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Proteus* und *Micrococcus* spp. Kulturen beobachtet hat, wenn diese Bakterien mit 10% Saccharose bei -10 °C eingefroren wurden. Saccharose zeigte auch kryoprotektive Eigenschaften in verschiedenen Konzentrationen für *E. coli* [35, 36], *E. aerogenes* [54], *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [37], *L. delbrueckii* [38], *Methanococcus vannielii* [39]. Allerdings hatte Saccharose keine Wirkung bei vielen anderen Mikroben, darunter auch einige kryosensitive Organismen, wie das Cyanobakterium *Spirulina platensis* [40]; Saccharose (0,25 M) ist für *T. pyriformis* bei Raumtemperatur sogar giftig [41].

In meiner Studie stimmen die positiven Wirkungen von Saccharose mit den schon durchgeführten Studien überein. Saccharose zeichnet sich, besonders in 50%- und 100%-iger Konzentration (bezogen auf der nassen Masse der Zellen) beim Einfrieren als geeigneter Protektant sowohl für den Schutz der Zellmembranen als auch für die Erhaltung der Enzymaktivität, aus.

Bei der Gefriertrocknung hat die 50% -ige Saccharose Konzentration protektive Eigenschaften gezeigt, die sowohl die Membran als auch die Enzymaktivität von *E. faecium* M-74 bei der Gefriertrocknung schützen. Der Schutz der Zellmembran ist unter Verwendung von Saccharose ganz wenig signifikant wobei die Enzymaktivität vollständig geschützt wurde.

Magermilch wurde in einer Konzentration von 1-10% als Protektant bei der Gefriertrocknung vieler Mikroorganismen, manchmal auch in Kombination mit anderen Protektanten beschrieben [43]. Keith berichtete über die kryoprotektive Wirkung von

Magermilch für bei -20 °C eingefrorene *E. coli* [42]. Magermilch wurde weiters für die Kryoprotektion von *L. interrogans* [44], Mykoplasmen [45] und Milchsäurebakterien [46] verwendet. Magermilch in Kombination mit Glycerin war wirksam in der Kryoprotektion von phytopathogenen Bakterien [47] und Pilzen [48]. In der Milchindustrie wurde Magermilch als Protektant gewählt, weil es die zelluläre Verletzung durch Stabilisieren von Zellmembranbestandteilen verhindert [49], eine poröse Struktur im gefriergetrockneten Produkt erzeugt, welche die Rehydrierung einfacher macht und es Proteine enthält, die eine schützende Beschichtung für die Zellen zur Verfügung stellt [50].

In dieser Studie zeigte Magermilch, ebenso wie in den berichteten Studien in 10% -iger Konzentration, gute Einfrier-Eigenschaften in Bezug auf den Schutz der Zellmembran und Enzymaktivität von *E. faecium* M-74. In höheren, also in 50% -iger und 100% -iger Konzentration, ist keine zusätzliche Wirkung von Magermilch zu sehen.

Bei der Trocknung hat die verwendete Magermilch keine protektiven Eigenschaften gezeigt.

Glukose wurde als Protektant in der Mikrobiologie in Konzentrationen von 1-18% verwendet. Verbesserte Überlebensraten bestimmter Bakterienkulturen wurden unter Verwendung von Glukoselösungen sehr früh beschrieben [42]. Glukose wurde effektiv für T4-Phagen [52], *A. marginale* (in Kombination mit Saccharose) [53], *E. aerogenes* [54], Hefen [55], Puccinia-Sporen [56], *P. berghei* im Blut [57], *Babesia* spp. (in Kombination mit PVP) [58] verwendet. Einige Stämme kryosensitiver Pilze wie *Phytophthora palmivora*, *Entomophthora exitialis*, *Pythium sylvaticum* und *Pseudophaeolus baudonii* wurden von einer Mischung aus 10% -igem DMSO und 8% -iger Glukose besser geschützt als von 10% DMSO alleine [59]. Glukose (0.25 M) war für *T. pyriformis* (Protozoen) bei Zimmertemperatur giftig [41].

Glukose als Protektant in meiner Untersuchung zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Sie wies beim Einfrieren keine guten Eigenschaften für die Protektion der Zellmembran von *Enterococcus faecium* M-74 auf, aber zeichnete sich in 50% -iger Konzentration als guter Schutz für die Erhaltung der Enzymaktivität aus.

Während der Gefriertrocknung zeigte Glukose in 50% -iger Konzentration vollen Schutz für die Erhaltung der Enzymaktivität, allerdings keinen für die Zellmembran.

Trehalose ist in pflanzlichen Zellen und Hefezellen ein natürlicher Kryoprotektant und das einzige Disaccharid, das zwei Wassermoleküle in seiner Kristallstruktur hat.

Crowe, Reid und Crowe (1996) haben festgestellt, dass Trehalose effektiver als andere Zucker beim Schützen von Biosubstanzen während der Trocknung ist [60]. Weiters behaupteten Leslie et al. (1995), dass Trehalose Liposomen, isolierte biologische Membranen vor den nachteiligen Effekten des Einfrierens und der Trocknung schützen kann [61].

Diese Effekte sind zugeschrieben worden: Schutz der Proteinfunktionalität aufgrund der Bildung einer glasigen Matrix während der Gefriertrocknung [62,51,66].

Leslie et al. (1995) zeigte, dass Trehalose *Escherichia coli* und *Bacillus thuringiensis* während der Gefriertrocknung und der Lagerung schützt [63], während Linders et al. (1997c) berichteten, dass Trehalose keine besonderen positiven Effekte auf die Aktivität von *Lb. plantarum* während der Trocknung ausübt [64].

Trehalose hat sich auch in den Studien von Carvalho et al. (2002) als nicht effektiver Schutz von *Lb. plantarum* während der Gefriertrocknung gezeigt [65].

Im Fall von *Lb. rhamnosus*, benimmt sich die Trehalose sogar erheblich schlechter als die anderen Kohlenhydrate. Die Kristallisation von Trehalose verringerte die Verfügbarkeit des Zuckers für die Bildung von Wasserstoffbindungen mit dem Protein und dadurch auch die Möglichkeit die bakteriellen Zellen während der Gefriertrocknung zu schützen [65].

Trehalose wurde in Konzentrationen von 5-19% als Protektant für *S. cerevisiae* [67], psychrophile Hefen [68], *Lactobacillus bulgaricus* [69] und einem Mykorrhiza-Pilz [70] benutzt und die Ergebnisse mit eukaryotischen Organismen, außer die der letzten Studie, waren nicht sehr beeindruckend. Das hohe interne Reservoir von Trehalose in vielen Hefen (bis zu 8%) könnte eine Rolle beim Schutz der Zellen während des Einfrierens und insbesondere der Austrocknung (Trehalose ist wahrscheinlich ein Xeroprotektant statt ein Gefrierschutzmittel) ebenso gegen Hitzestress spielen [67].

In den berichteten Studien sind die Ergebnisse über die Wirkung von Trehalose als Protektant unterschiedlich. In meiner Untersuchung verhält sich Trehalose, wie bei *Lb. Rhamnosus* [65], schlechter als alle anderen Protektanten. Sie zeigte keine guten Eigenschaften beim Einfrieren sowohl bei der Protektion der Zellmembran als auch bei der Erhaltung der Enzymaktivität und wurde deswegen nicht bei der Gefriertrocknung verwendet.

Die Methode der Bestimmung der KBE hat drei wesentliche Nachteile; zunächst bedarf sie einer langen Inkubationszeit (abhängig von der Bakterienart, 72h für *E. faecium* M-74). Zweitens, führt es häufig zu einer Unterschätzung der Anzahl der lebensfähigen Zellen als Folge der Verklumpung und Kettenbildung von Zellen. Schließlich werden nur jene Bakterien gezählt, die sich unter den vorgegebenen Wachstumsbedingungen replizieren können [71].

Über die Validität der PI-Werte zur Bestimmung der zellulären Aktivität wurde bereits für viele Mikroorganismen berichtet und die hohe Korrelation zwischen koloniebildenden Einheiten und Durchflusszytometrie [72,73,74] wurde bereits beschrieben, einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass diese Methoden nicht gleiche Ergebnisse liefern [75,76].

Aus meinen Ergebnissen stellen die Fluorimetrie und Durchflusszytometrie schnelle und bequeme Methoden zur Charakterisierung des Verlustes der Lebensfähigkeit von *Enterococcus faecium* M-74 während der Gefriertrocknung dar. Die Bestimmungen mit Fluorimetrie und Durchflusszytometrie haben im Zusammenhang mit der Keimzahlbestimmung eine umfangreiche Beobachtung des zellulären Verhaltens von *E. faecium* M-74 nach dem Gefrierprozess ermöglicht.

Die Trocknung während der Gefriertrocknung hatte einen deutlich schlechteren Einfluss auf die Viabilität der Zellen als das Einfrieren bei nicht-geschützten *E. faecium* M-74 Zellen. Unter den verwendeten Protektanten hat sich Saccharose in 50% -iger Konzentration als bester Schutz erwiesen.

Die Mechanismen, wie Schaden und Schutz während der Gefriertrocknung entstehen, sind tatsächlich komplex und bis jetzt nicht völlig verstanden. Jedoch haben sich einige Protektanten als gut erwiesen und könnten in Zukunft ein erhebliches Potential für die physiologische Erforschung des Stresses während der Gefriertrocknung und zur Quantifizierung der Auswirkungen von Belastungen auf andere bakterielle Zellen haben.

Die detaillierte Untersuchung des Einflusses der Gefriertrocknung auf die Viabilität von *Enterococcus faecium* M-74 ist eine gute Grundlage für die Entwicklung und den Vergleich weiterer Stabilitätsmethoden für probiotische Bakterien.

## 5. Abkürzungsverzeichnis

CFDA-SE	Carboxyfluorescein <b>D</b> iacetat <b>S</b> uccinimidyl <b>E</b> ster
DHR 123	<b>D</b> ihydrorhodamin 123
DiOC6(3)	3,3` - <b>D</b> ihexyloxacarbocyanin iodid
DMF	<b>D</b> imethylformamid
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
<i>E. faecium</i> M-74	<i>Enterococcus faecium</i> M-74
ER	<b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
FDA	<b>F</b> luorescein <b>d</b> iacetat
g/l	<b>G</b> ramm pro <b>L</b> iter
H	Stunde
IP	<b>I</b> sopropanol
KBE	<b>k</b> olonie <b>b</b> ildende <b>E</b> inheiten
Min.	<b>M</b> inuten
MRS – Broth, MRS - Medium	de <b>M</b> an, <b>R</b> ogosa, <b>S</b> harpe
MW	<b>m</b> olecular <b>w</b> eight
PI	<b>P</b> ropidium <b>i</b> odid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
U/min	<b>U</b> mdrehungen pro Minute

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] **Hamm M.** (2000). Gesunder Darm Pre- und Probiotika, Mosaik Verlag München, 5-6
- [2] **Bischoff S.C.** (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, Georg Thieme Verlag KG, VI- 33
- [3] **Döll M.** (2007). Probiotika, Bakterien, die es gut mit uns meinen, F.A. Herbig Verlagsbuchhandlung GmbH, 29-30
- [4] **Bischoff S.C.** (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, Georg Thieme Verlag KG, 179-180
- [5] **Meng X.C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C., Ross R.P.** (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures; Food Chemistry, 106, 1406–1416
- [6] <http://www.becomenatural.com/blog/2006/11/probiotics/> (abgerufen am 1.11.2010)
- [7] **Unger F.M., Vierstein H.** (2004). Florale Gesundheit, Verlaghaus der Ärzte GmbH, 92-94
- [8] **Döll M.** (2007). Probiotika, Bakterien, die es gut mit uns meinen, F.A. Herbig Verlagsbuchhandlung GmbH, 55-61
- [9] **Kalliomaki M., Salminen S., Poussa T. et al.** (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. Lancet, 361, 1869-1871
- [10] <http://www.krackeler.com/products/1242-Miscellaneous-Items/12961-Nalgene-Cryo-1C-Freezing-Containers.htm> (abgerufen am 2.11.2010)

- [11] **Mafamane H.** (2008). Untersuchungen zu den immunmodulatorischen Eigenschaften des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF 68) auf die zelluläre Immunität beim Schwein während eines Experiments mit *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104, 39-43
- [12] [http://dgwt.de/docs/forum\\_ware\\_2006.pdf](http://dgwt.de/docs/forum_ware_2006.pdf) (abgerufen am 08.11. 2010)
- [13] **Unger F.M., Vierstein H.** (2004). Probiotika: Regenerierende, prophylaktische und adjuvant-therapeutische Anwendungen, Journal für Ernährungsmedizin 6 (2) (Ausgabe für Österreich), 24-29
- [14] [http://www.gastro.medline.ch/News/\\_Journalscreening/Magen\\_Darm/Peptisches\\_Ulkus/Peptisches\\_Ulkus.php?H\\_pylori\\_Eradikation\\_Lactoferrin\\_und\\_Probiotika\\_verbessern\\_Erfolgsrate&st=2&cid=17701](http://www.gastro.medline.ch/News/_Journalscreening/Magen_Darm/Peptisches_Ulkus/Peptisches_Ulkus.php?H_pylori_Eradikation_Lactoferrin_und_Probiotika_verbessern_Erfolgsrate&st=2&cid=17701) (abgerufen am 08.11.2010)
- [15] **Schulz S., Kunz C.** (2002). Probiotika, Präbiotika, Colonic food, Institut für Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität Gießen, Monatsschr Kinderheilkd, 150, 808–816
- [16] <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/Enterokokken.pdf> (abgerufen am 09.11. 2010)
- [17] **Bischoff S.C.** (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, Georg Thieme Verlag KG, 118-121
- [18] <http://www.aerztemagazin.at/dynasite.cfm?dsmid=74344&dspaid=578220> (abgerufen am 09.11. 2010)
- [19] [http://sanova.at/fileadmin/user\\_upload/products/bioflorin/GI\\_Bioflorin.pdf](http://sanova.at/fileadmin/user_upload/products/bioflorin/GI_Bioflorin.pdf) (abgerufen am 10.11.2010)
- [20] <http://www.pharmazie.com/graphic/A/22/1-23622.pdf> (abgerufen am 10.11. 2010)

- [21] **Hubalek Z.** (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology*, 46, 205–229
- [22] **Carvalho A.S., Silvaa J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., Gibbs P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 14, 835-847
- [23] <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/habil-online/06/06H012/habil.pdf> (abgerufen am 11.11.2010)
- [24] <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=22020> (abgerufen am 12.11.2010)
- [25] <http://www.scbio.de/datasheet-203027-dihydrorhodamine-123.html> (abgerufen am 12.11.2010)
- [26] **Pfaffel-Schubart G.** (2008). Wirkung von Hypericin-induzierter PDT auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration humaner Glioblastomzellen, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm, 28
- [27] [http://www.mobitec.de/de/products/bio/07\\_fluores\\_tec/index.php?mfp\\_cell.html](http://www.mobitec.de/de/products/bio/07_fluores_tec/index.php?mfp_cell.html) (abgerufen am 13.11.2010)
- [28] **Wagner M.** (2004) Drug Targeting mit Lektinen: Charakterisierung von Adhäsion, Internalisation und intrazellulärer Verteilung in 5637-Zellen, Zur Erlangung des akademischen Grades Magistra der Pharmazie, Universität Wien, 20
- [29] [www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef\\_durchflusszytometrie.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm) (abgerufen am 15.11.2010)
- [30] [www.wessingtoncryogenics.co.uk/MrFrosty.htm](http://www.wessingtoncryogenics.co.uk/MrFrosty.htm), (abgerufen am 08.11.2010)

- [31] **Fonseca F., Beal C., Corrieu G.** (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67, 83–90
- [32] **Tsvetkov T., Brankova R.** (1983). Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, 20, 318–323
- [33] **Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G.** (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review; *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193
- [34] **To B.C.S., & Etzel M. R.** (1997). Spray-drying, freeze-drying, freeze-drying or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*, 63, 576–585
- [35] **Calcott P.H., MacLeod R.A.** (1974). Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage, *Can. J. Microbiol.*, 20, 671–689
- [36] **Doebbler G.F.** (1966). Cryoprotective compounds: review and discussion of structure and function, *Cryobiology*, 3, 2–11
- [37] **Chavarri F.J., De Paz M., Nueez M.M.** (1988). Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains, *Biotechnol. Lett.*, 10, 11–16
- [38] **Panoff J.M., Thammavongs B., Gueguen M.** (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T, *Cryobiology* 40, 264–269
- [39] **Jones J.B., Stadtman T.C.** (1977). *Methanococcus vannielii*: culture and effects of selenium and tungsten on growth, *J. Bacteriol.*, 130, 1404–1406.
- [40] **Takano M., Sado J.I., Ogawa T., Terui G.** (1973). Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*, *Cryobiology*, 10, 440–444.

- [41] **Osborne J.A., Lee D.** (1975). Studies on the conditions required for optimum recovery of *Tetrahymena pyriformis* strain S (phenoset A) after freezing to, and thawing from, -196 °C, *J. Protozool.*, 22, 233–237
- [42] **Keith S.C.** (1913). Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water, *Science*, 37, 877–879
- [43] **Dahmen H., Staub T., Schwinn F.J.** (1983). Technique for longterm preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen, *Phytopathology*, 73, 241–246
- [44] **Shigekawa J.M., Stockton J.J.** (1955) Studies on the preservation of *Leptospira icterohemorrhagiae* by freezing, *Am. J. Vet. Res.*, 16, 619–622
- [45] **Jurmanova K., Machatkova M.** (1974). Preservation of *Mycoplasma* strains by freezing in solid carbon dioxide, liquid nitrogen and at -10 °C, *In Vitro v CSSR* 3 (no. 2)
- [46] **Cowman R.A., Speck M.L.** (1963). Activity of lactic streptococci following ultra-low temperature storage, *J. Dairy Sci.*, 46, 609
- [47] **Moore L.W., Carlson R.V.** (1975). Liquid nitrogen storage of phytopathogenic bacteria, *Phytopathology*, 65, 246–250.
- [48] **Dahmen H., Staub T., Schwinn F.J.** (1983). Technique for longterm preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen, *Phytopathology*, 73, 241–246.
- [49] **Castro H.P., Teixeira P.M., & Kirby R.** (1996). Changes in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, 18, 99–104
- [50] **Abadias M., Benabarre A., Teixido N., Usall J., & Vinas I.** (2001a). Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 173–182

- [51] **Bell L.N., & Hageman M.J.** (1996). Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. *Journal of Food Science*, 61(2), 372–374, 378
- [52] **Steele P.R.M.** (1976). Prevention of low temperature denaturation injury in T4Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives, *J. Hyg.*, 76, 453–458
- [53] **Hruska J.C., Brock W.E.** (1966). Cryogenic preservation of *Anaplasma marginale*, *Am. J. Vet. Res.*, 27, 1547–1550
- [54] **Postgate J.R., Hunter J.R.** (1961). On the survival of frozen bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, 26, 367–378
- [55] **Hayakawa K.** (1985). Storage of *Saccharomyces cerevisiae* in a eutectic mixture and effect of cryoprotective compounds on storage, *Hakkokogaku Kaishi*, 63, 23–30
- [56] **Bugbee W.M., Kernkamp M.F.**, (1966). Storage of pycniospores of *Puccinia graminis secalis* in liquid nitrogen, *Plant Dis. Rep.*, 50, 576–578
- [57] **J. Jadin, G. Timperman, F. de Ruysser**, Comportement d'une lignee de *P. berghei* apres preservation a basse temperature pendant plus de dix ans, *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 55 (1975); 603–608
- [58] **Dalgliesh R.J., Mellors L.T., Blight G.W.** (1980). Comparison of glucose, sucrose and dimethylsulfoxide as cryoprotective agents for *Babesia rodhaini*, with estimates of survival rates, *Cryobiology*, 17, 410–417
- [59] **Smith D.** (1983). Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 80, 360–363
- [60] **Crowe L.M., Reid D.S., & Crowe J.H.** (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71, 2087–2093

- [61] **Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., & Crowe L.M.** (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3592–3597
- [62] **Franks F., Hatley R.H.M, & Mathias S.F.** (1991). Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *Biopharm*, 4, 38–42
- [63] **Linders L.J.M., Wolkers W.F., Hoekstra F.A., & van't Riet K.** (1997c). Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, 35, 31–40
- [64] **Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X., & Gibbs P.** (2002). Effect of additives on survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage. *Biotechnology Letters*, 24(19), 1587–1591
- [65] **Carpenter J.F., Arakawa T., & Crowe J.H.** (1991). Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Developments in Biological Standardization*, 74, 225–239
- [66] **Bell L.N., & Hageman M.J.** (1996). Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. *Journal of Food Science*, 61(2), 372–374, 378
- [67] **Breierova E.** (1994). Cryoprotection of psychrophilic yeast species by the use of additives with cryoprotective media, *Cryo-Letters*, 15, 191–197.
- [69] **De Antoni G.L., Perez P., Abraham A., Anon M.C.** (1989). Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*, *Cryobiology*, 26, 149–153
- [70] **Declerck S., Angelo-van Coppenolle M.G.** (2000). Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *New Phytol.*, 148, 169–176

- [71] **Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Davey H.M., Kell D.B.** (1996). Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1311–1316
- [72] **Bouix M., Leveau J.Y.** (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation, *Journal of the Institute of Brewing*, 107, 217–225
- [73] **Bunthof C.J., Abee T.** (2002). Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2934–2942
- [74] **Bunthof C.J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F.M., Abee T.** (2001). Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2326–2335
- [75] **Ben A. K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F.M., Akkermans A.D.L., De Vos W.M., Abee T.** (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5209–5216
- [76] **Bunthof C.J., Van den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F.M., Abee T.** (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3681–3689

## **Abbildungen**

Abbildung 1: <http://www.krackeler.com/products/1242-Miscellaneous-Items/12961-Nalgene-Cryo-1C-Freezing-Containers.htm> (abgerufen am 2.11.2010)

## **7. Lebenslauf**

**Geburtsdatum:** 15.11.1984  
**Geburtsort** Banja Luka, Bosnien und Herzegowina

### **Ausbildung**

**WS 2004** Universität Wien, Studienrichtung Pharmazie  
**SS 2004** Vorstudienlehrgang Deutschsprachkurs Graz  
**WS 2003** Universität Banja Luka, Studienrichtung Pharmazie  
**1999-2003** Pharmazeutische Mittelschule Banja Luka,  
Matura mit Auszeichnung abgeschlossen

### **Berufserfahrung**

**Aug 2008 - Aug. 2009** Aushilfe in der „Per Albin Hansson Apotheke“,  
1100 Wien, 10 Std./ Woche