

## VBNC-Zustand

# Resistenzbestimmung nicht-kultivierbarer Bakterien

SUSANNE FLEISCHMANN<sup>1</sup>, CHRISTIAN ROBBERN<sup>2</sup>, PATRICK MESTER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT UND -HYGIENE, FU BERLIN

<sup>2</sup> INSTITUT FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT, LEBENSMITTELTECHNOLOGIE UND ÖFFENTLICHES GESUNDHEITSWESEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN, ABTEILUNG FÜR LEBENSMITTELMIKROBIOLOGIE, VETERINÄRMEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN, ÖSTERREICH

**To cope with environmental stress, bacteria can enter resistant dormancy states such as the viable but non-culturable (VBNC) state, in which cells do not divide but remain alive with the potential to resuscitate. Present in both food and clinical environments, VBNC cells are a serious health risk and a challenge for conventional analytical methods. By detecting growth-independent viability parameters, it is possible to investigate resistance of VBNC cells and identify effective antimicrobials.**

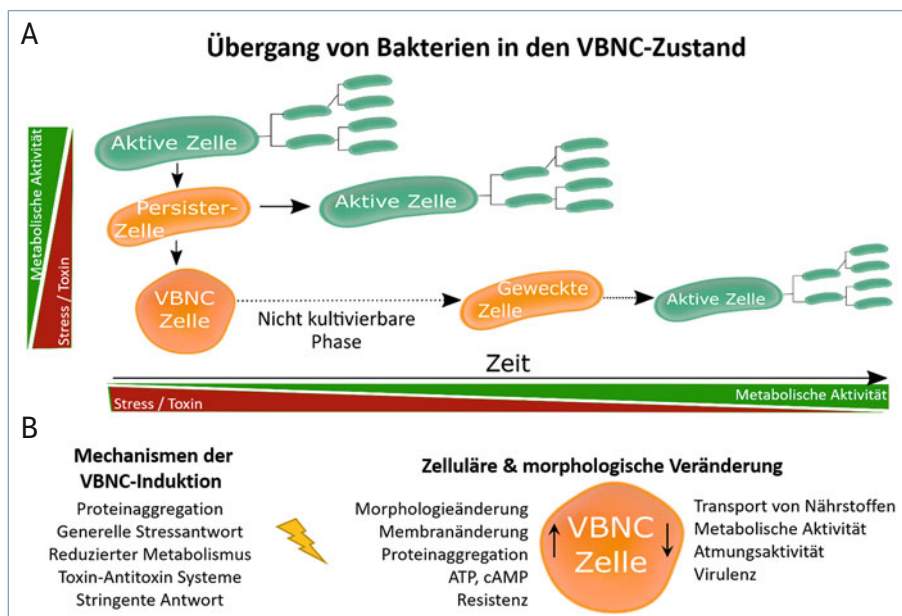
DOI: 10.1007/s12268-022-1727-4

© Die Autorinnen und Autoren 2022

Um die Lebensfähigkeit unter sich ständig ändernden Umweltbedingungen zu erhalten, haben Bakterien verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich anzupassen. Hierzu können sie von einem vegetativen in einen nicht teilungsfähigen, aber metabolisch aktiven, sehr widerstandsfähigen und persistenten Zustand wechseln. Dieser lebensfähige, aber nicht-kultivierbare (*viable but non-culturable*, VBNC) Zustand ist meist eine Reaktion auf Stressbedingungen und wurde erstmals 1982 für *Vibrio cholerae* beschrieben [1].

Den Eintritt in den VBNC-Zustand rufen Umweltfaktoren wie Nährstoffmangel, Temperaturschwankungen, UV-Strahlung oder Exposition von Antibiotika und Desinfektionsmitteln hervor. Zellen im VBNC-Zustand weisen sowohl eine veränderte Morphologie als auch Physiologie auf (Abb. 1, [2]). Im Gegensatz zu Antibiotika-Persister-Zellen, die sich ebenfalls nicht oder nur sehr langsam teilen, sind VBNC-Zellen nicht direkt wieder kultivierbar, sobald der jeweilige Stress endet. VBNC-Zellen benötigen daher entweder eine längere Erholungsphase unter stabilen Umweltbedingungen oder einen externen „Weckruf“ über Signalmoleküle, um wieder Zellteilung zu betreiben.

Bereits bekannte Mechanismen, die zur Induktion des VBNC-Zustands führen, sind Toxin-Antitoxin-Systeme, stringente Antwort, Proteinaggregation, generelle Stressantwort sowie ein reduzierter Metabolismus [2, 3]. Die Abnahme von Translation, Replikation und Zellwachstum erhöht dabei die antimikrobielle Resistenz der Bakterien dramatisch. Wird der induzierende Stress beseitigt, kann der vegetative Zustand wiedererlangt werden, indem das Toxin-Antitoxin-Verhältnis normalisiert und oxidative Schäden repariert werden [4, 5].



**▲ Abb. 1:** Morphologische und physiologische Veränderung von Bakterienzellen. **A**, Darstellung der phänotypischen und metabolischen Veränderung von Bakterienzellen unter Stressbedingungen sowie des Übergangs in den VBNC-Zustand (*viable but non-culturable*). Metabolisch aktive Zellen, die zur Zellteilung befähigt sind, sind grün, Persister-Zellen oder Zellen im VBNC-Zustand orange dargestellt. Der reversible Übergang in die nicht-kultivierbare Phase, als Reaktion auf zunehmenden Stress (rot), geht einher mit einer Abnahme der metabolischen Aktivität (grün). **B**, Auflistung zellulärer Veränderungen während des VBNC-Zustands sowie Auflistung der Mechanismen zur Induktion des VBNC-Zustands.

### Bakterien im VBNC-Zustand sind schwer zu untersuchen

Für die meisten diagnostischen Nachweis- und Analyseverfahren stellen Bakterien im VBNC-Zustand eine besondere Herausforderung dar. Dies liegt daran, dass die meisten

derzeitigen Methoden wachstumsabhängig sind und entweder mindestens einen Kultivierungsschritt erfordern oder vollständig kulturbasiert sind. Im Fall von kulturbasierten Nachweisverfahren ist folglich die Abwesenheit von Wachstum keine Garantie für die Abwesenheit lebensfähiger Krankheitserreger, wie z. B. in der Antibiotikaresistenzbestimmung. Als Alternative zur Zellteilung/Kultivierbarkeit sind weitere anerkannte Parameter für die Beurteilung der Lebensfähigkeit von Bakterien ein aktiver Stoffwechsel sowie eine intakte Zellmembran [2]. Da Stoffwechselaktivität und Membranintegrität unabhängig vom Zellwachstum analysiert werden können, messen die meisten aktuellen Methoden zum Nachweis oder zur Untersuchung von VBNC als Ergänzung zu kulturellen Verfahren mindestens einen dieser Parameter.

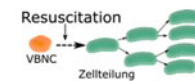
Ein weiteres Problem bei der Untersuchung von Bakterien im VBNC-Zustand ist das häufige Vorkommen von Mischkulturen aus wachstumsfähigen, VBNC- und toten Zellen, da die Signale der jeweiligen Zellen eindeutig voneinander unterschieden werden müssen. Es ist daher von großem Vorteil, wenn eine bakterielle Kultur vollständig in den VBNC-Zustand gebracht werden kann.

### Resistenzuntersuchung von Bakterien im VBNC-Zustand

Für die Resistenzbestimmung von Bakterien im VBNC-Zustand ist eine Analyseverfahren einer der drei Viabilitätsparameter sowie eine stabile und reproduzierbare Methode zur Induktion notwendig. Eine vielversprechende Methode zur Untersuchung des VBNC-Zustands, ohne auf stabile Resuscitation-Bedingungen angewiesen zu sein, ist der VBNC-MIC-Assay (V-MIC). Die Methode basiert auf dem Nachweis zellulärer Energie (Neuproduktion von ATP), der schon seit langem zur Bestätigung lebensfähiger Bakterienzellen verwendet wird, jedoch noch nicht zur Resistenzbestimmung. Für eine stabile Induktion des VBNC-Zustands entwickelte unsere Gruppe im Vorfeld ein Screeningverfahren, mit dem stabile Bedingungen für diverse Pathogene wie *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* identifiziert werden können und das für weitere Spezies adaptierbar ist [7, 9]. Bei der Durchführung des V-MIC-Assays werden, vergleichbar dem Titerverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK), VBNC-Zellen dem zu untersuchenden antimikrobiellen Mittel zugegeben und

### Viabilitätsparameter und was eigentlich gemessen wird

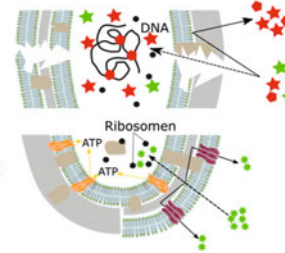
#### A Proliferation Zellwachstum



Quantitative Resuscitation [KBE]; Elongation

#### B Zellmembran Integrität

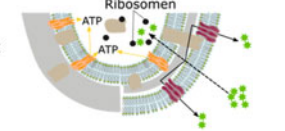
Ausschluss von Molekülen durch intakte Membran



Fluoreszenzfarbstoffe (Mikroskopie oder Durchflusszytometrie); Viabilitäts-PCR

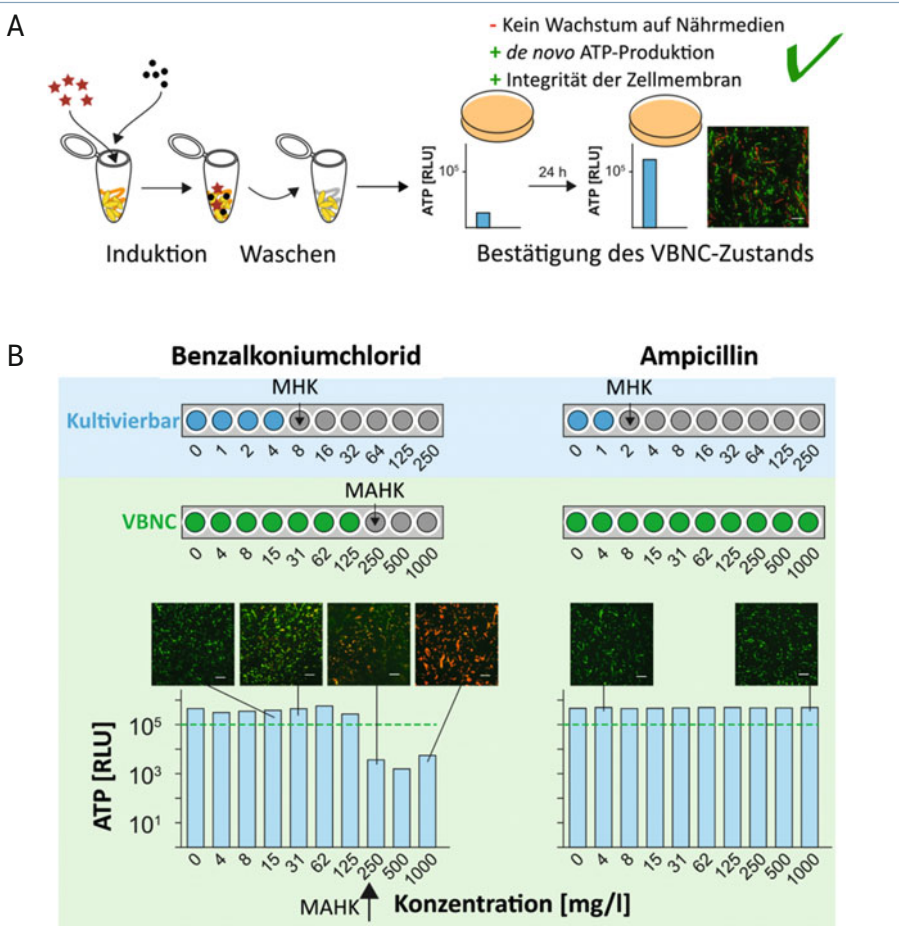
#### C Metabolische Aktivität

Energieproduktion; Aktivität von Effluxpumpen; Transkription; Translation; Enzymaktivität



De novo-ATP-Produktion; Fluoreszenzfarbstoffe; RT-qPCR; Proteinmarkierung; Markierte Substrate

▲ **Abb. 2:** Methoden zur Bestimmung bakterieller Lebensfähigkeit. **A,** Zellwachstum kann durch eine Auflösung (Resuscitation) des VBNC-Zustands mit einem angeschlossenen kulturellen Nachweis oder mittels Bestimmung von Zellelongation gemessen werden [6]. **B,** Membranintegrität als Viabilitätsparameter kann mittels differentiellen Fluoreszenzfärbungen, z. B. Nukleinsäurefarbstoffen mit unterschiedlicher Membranpermeabilität oder Polymerasekettenreaktion (PCR) in Kombination mit interkalierenden DNA-Farbstoffen analysiert werden [7]. **C,** Stoffwechselaktivität von bakteriellen Zellen kann durch den Abbau fluoreszenzmarkierter Substrate, Atmungsaktivität, Produktion von ATP oder aktiver Transkription/Translation bestimmt werden [8]. Abbildung aus [2].



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung des V-MIC-Assays. **A,** Der VBNC-Zustand wird durch Inkubation mit einem Chemikalienmix induziert und mittels Bestimmung der Membranintegrität und *de novo*-ATP-Produktion im Vergleich zu abgetöteten Zellen bestätigt. **B,** Die minimale Hemm-Konzentration (MHK) (wachstumsfähige Bakterien) von Ampicillin und Benzalkoniumchlorid wird im Vergleich zur minimalen ATP-Hemm-Konzentration MAHK (VBNC-Zellen) mittels *de novo*-ATP-Produktion bestimmt. Entsprechend des verbreiteten MHK-Tests wird auch bei dieser VBNC-MIC-Methode durch Unterschreiten eines Schwellenwerts in der ATP-Produktion die Konzentration ermittelt, die zum Absterben der VBNC-Bakterien führt [9]. Abbildung aus [9].

die minimale ATP-Hemm-Konzentration (MAHK) bestimmt (**Abb. 3**).

### In der Ruhe liegt Kraft

Mittels des V-MIC-Verfahrens konnten wir zeigen, dass Bakterien im kultivierbaren sowie VBNC-Zustand durch die gleichen Bedingungen thermisch abgetötet werden können, jedoch letztere gegen verschiedene Antibiotika sowie wichtige Desinfektions- und Konservierungsmittel resistent sind (**Abb. 3**, [9]). Dies stimmt mit Studien überein, die zeigten, dass Bakterien im VBNC-Zustand durch ihre geringere Stoffwechselaktivität, ihren Wachstumsstillstand, eine verringerte Membranfluidität und höhere Efflux-Pumpen-Aktivität vor Antibiotika und Bioziden geschützt sind. Die im Vergleich zu kultivierbaren Zellen wesentlich höhere antimikrobielle Resistenz von Bakterien im VBNC-Zustand zeigt dabei klar die Notwendigkeit auf, Desinfektionsmittel und -strategien gezielt gegen Bakterien im VBNC-Zustand zu entwickeln und zu validieren.

### Desinfektionsmittel und Antibiotika gegen persistierende Bakterien

Viele Aspekte des VBNC-Zustands sind noch ungeklärt. Aufgrund der hohen Resistenz gegenüber antimikrobiellen Interventionsmaßnahmen ist es umso wichtiger, neue Mittel und Wege zu finden, pathogene Bakterien im VBNC-Zustand im Gesundheits-, Lebensmittel- und Pharmaumfeld zu bekämpfen. Neben der Umstellung auf molekulare Diagnostik im industriellen Umgebungsmonitoring und der Qualitätskontrolle ist der V-MIC-Assay ein hilfreiches Werkzeug bei der Suche nach geeigneten Desinfektionsmitteln und Antibiotika zur Bekämpfung persistierender Bakterien.

### Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch das Bundesministerium für Digitalisierung und Wirtschaftsstandorte und die Nationalstiftung für Forschung,

Technologie und Entwicklung der Republik Österreich sowie durch die Christian-Doppler-Forschungsgesellschaft. ■

### Literatur

- [1] Xu HS, Roberts N, Singleton FL et al. (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8: 313–323
- [2] Fleischmann S, Robben C, Alter T et al. (2021) How to evaluate non-growing cells – current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria. *Antibiotics* 10: 115
- [3] Ayrapetyan M, Williams TC and Oliver JD (2018) Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J Bacteriol* 200: e00249-18
- [4] Ayrapetyan M, Williams TC and Oliver JD (2015) Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol* 23: 7–13
- [5] Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 415–425
- [6] Roszak DB and Colwell RR (1987) Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *AEM* 53: 2889–2983
- [7] Robben C, Fister S, Witte A et al. (2018) Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci Rep* 8: 15132
- [8] Ye C, Lin H, Zhang M et al. (2020) Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC

*Escherichia coli* induced by low level chlorination. *Sci Rep* 10: 1957

[9] Robben C, Witte A, Schoder D et al. (2019) A fast and easy ATP-based approach enables MIC testing for non-resuscitating VBNC pathogens. *Front Microbiol* 10: 1365

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by University of Veterinary Medicine Vienna.

**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Patrick Mester  
Institut für Lebensmittelsicherheit,  
Lebensmitteltechnologie und öffentliches  
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,  
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien  
Veterinärplatz 1  
A-1210 Wien  
Patrick-Julian.Mester@vetmeduni.ac.at

### AUTORINNEN UND AUTOREN



#### Susanne Fleischmann

Studium der Lebensmitteltechnologie. 2014–2017 Doktorandin am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin. 2017–2018 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Bundesanstalt für Gewässerkunde Koblenz im *Vibrio*-Monitoring deutscher Küstenbadegewässer. 2019 Promotion. Seit 2018 Leiterin der Forschungsgruppen *Vibrio* und UVC am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der FU Berlin.



#### Christian Robben

Studium der molekularen Mikrobiologie und Immunologie an der Universität Wien, Österreich. 2019 Promotion an der Veterinärmedizinischen Universität Wien. 2019–2020 Postdoktorand am Christian-Doppler-Labor für Monitoring mikrobieller Kontaminanten, Wien. Seit 2020 Laborleiter in der QC Mikrobiologie bei Bayer Pharmaceuticals in Leverkusen.



#### Patrick Mester

Studium der Biologie mit Schwerpunkt Mikrobiologie. 2011 Promotion. 2011–2013 Postdoktorand am Christian-Doppler Labor für Molekulare Lebensmittelanalytik, Wien. 2013–2020 Gruppenleiter am Christian-Doppler Labor für Monitoring mikrobieller Kontaminanten. Seit 2020 Gruppenleiter am Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Universität Wien.