

1 Einleitung

1.1 Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen

Zum besseren Verständnis der Infrarotspektren von mikrobiellen Zellen benötigt man eine Grundkenntnis der zwei zellulären Haupttypen, der Zusammensetzung und der chemischen Struktur von Mikroorganismen. Sehr einfach beschrieben, bestehen alle biologischen Systeme aus Wasser, Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten. Die molekulare Zusammensetzung von Bakterien (Prokaryoten) und Hefen (Eukaryoten) ist in Tabelle 1.1 wiedergegeben.

Tabelle 1.1: Zusammensetzung von pro- und eukaryotischen Zellen [1, 2]

| | Bakterien | Hefen |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Durchmesser (μm) | ~ 1 | ~ 10 |
| Generationszeit (h) | 0,2-1 | 2-10 |
| DNA Basenpaare | $\sim 4 \times 10^6$ | $\sim 20 \times 10^6$ |
| Anzahl der Gene | ~ 4000 | $\sim 20\,000$ |
| DNA (% ,w/w) ^b | 2-4 | 1-3 |
| RNA (% ,w/w) ^b | 5-15 | 3-10 |
| Proteine (% ,w/w) ^b | 40-60 | 40-50 |
| Lipide (% ,w/w) ^b | 10-15 | 5-20 |
| Kohlenhydrate (% ,w/w) ^b | 10-20 | 10-25 |

^abei allen Angaben handelt es sich um relativ grobe Schätzwerte, die vom Organismus, den Wachstumsbedingungen, Stadium des Zellzyklus und anderen Faktoren abhängen

^bInhalt in % des Zelltrockengewichtes

1.1.1 Die prokaryotische Zelle

Die prokaryotische Bakterienzelle ist wesentlich kleiner als die eukaryotische Pilz- oder Hefezelle (siehe Tabelle 1.1). Bakterien besitzen nur ein einziges zirkuläres Chromosom aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), in dem sämtliche für Zellfunktion und -replikation erforderlichen Informationen enthalten sind. Zusätzlich können ein bis mehrere extrachromosomale, sich autonom replizierende genetische Elemente (Plasmide) vorhanden sein.

1 Einleitung

Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen existieren Bakterien nur in einer begrenzten Anzahl von Formen, den Kokken, Stäbchen und den Spirillen (gekrümmte Stäbchen). Ihre chemische Zusammensetzung und Strukturen variieren jedoch beträchtlich. Die Kompartimentierung der prokaryotischen Zelle ist erheblich weniger ausgeprägt als bei den Eukaryoten. Bei den Prokaryoten ist weder die DNA von einer Kernmembran umgeben, noch sind Organellen von der Art der Mitochondrien und Chloroplasten vorhanden. Die meisten Bakterien lassen sich basierend auf der Zusammensetzung ihrer Zellwand zwei Kategorien zuordnen, den GRAM-positiven oder den GRAM-negativen Bakterien. Der Unterscheidung zwischen GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien liegt das Färbeverfahren nach GRAM (1884) zugrunde, auf das in Abschnitt 1.1.3 noch näher eingegangen werden wird. GRAM-positive und GRAM-negative Zellen unterscheiden sich deutlich im Aussehen ihrer Zellwände (siehe Abbildung 1.1). Die prokaryotische Zellhülle besteht aus der Cytoplasmamembran, einer Phospholi-

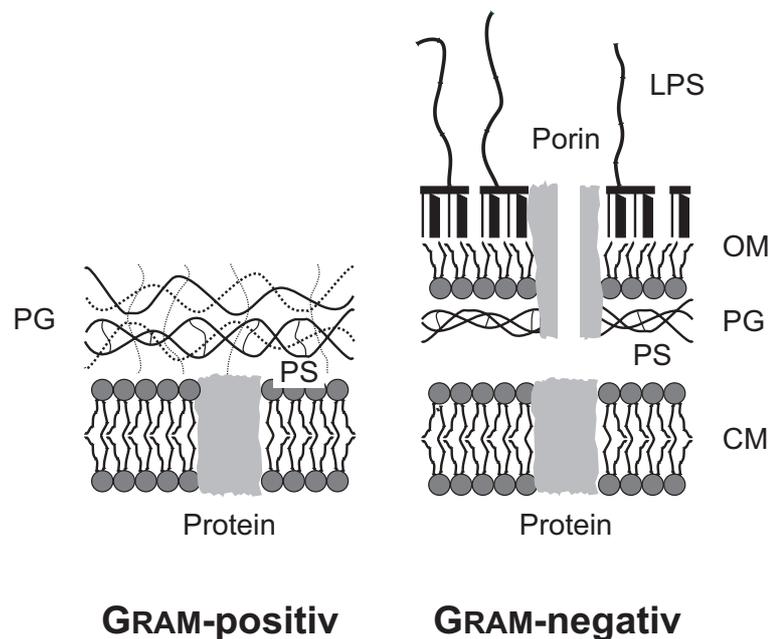


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Zellhülle von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien. Das Innere der Zelle, das Cytoplasma, wird von der Cytoplasmamembran (CM) umgeben. Darauf aufgelagert sind weitere Schichten, wie das Periplasma (PS) und das Peptidoglykan (PG). Bei GRAM-negativen Bakterien tritt noch eine zusätzliche Wandschicht auf, die äußere Membran (OM), die aus einer inneren Phospholipidschicht und einer äußeren Lipopolysaccharidschicht (LPS) besteht.

piddoppelschicht, und einer darauf aufgelagerten Zellwand aus Peptidoglykan. Die Zellwände GRAM-positiver und GRAM-negativer Bakterien unterscheiden sich maßgeblich dadurch, dass letztere nach außen durch eine weitere äußere Membran be-

1.1 Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen

grenzt werden. Die Peptidoglykanschicht ist ein flexibles, hochmolekulares Netzwerk, das der Bakterienzelle ihre Form und osmotische Stabilität verleiht. Bei den GRAM-negativen Bakterien ist diese Schicht viel dünner, da sie nur einschichtig ist. Zudem ist sie auch etwas anders aufgebaut als bei den GRAM-positiven Bakterien. Peptidoglykan (Murein) ist ein Heteropolymer, das aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin besteht, die in alternierender Folge β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Diese Ketten sind untereinander durch bakterienspezifische Aminosäuren (z. B. L-Alanin) peptidisch (meistens über tetra-Peptidketten) verbunden. Das Peptidoglykan bildet auf diese Weise ein dreidimensionales Makromolekül, das eine sackförmige Gestalt hat (Murein-Sacculus) und sich über die gesamte Zelloberfläche erstreckt. Charakteristisch für einige GRAM-positive Bakterien, wie z. B. die Gattung *Staphylococcus*, ist das Vorhandensein von Teichonsäuren, die kovalent an das Peptidoglykan gebunden sind. Hierbei handelt es sich um Glycerin- oder Ribitmoleküle, die über Phosphatbrücken miteinander verestert sind. Die GRAM-negativen Bakterien besitzen zusätzlich zur Mureinschicht noch eine äußere, ebenfalls aus zwei Schichten bestehende Membran, die mit wassergefüllten Proteinporen (Porine) durchsetzt ist [3]. Diese äußere Membran (OM *outer membrane*) ist asymmetrisch aufgebaut. Die Innenseite wird durch die gleichen Phospholipide gebildet wie sie in der Cytoplasmamembran vorkommen, während die Außenseite durch ein besonderes Membranphosphoglykolipid, das Lipopolysaccharid (LPS) stabilisiert wird. Diese zusätzliche Membran, die nicht nur aus Phospholipiden, sondern auch aus Polysacchariden und Proteinen besteht, stellt eine Penetrationsbarriere dar, die den GRAM-negativen Bakterien einen besonders wirksamen Schutz vor hydrolytischen Enzymen, wie z. B. Lysozym verleiht und darüber hinaus auch die Wirkung von Antibiotika beeinflusst und begrenzt.

Vertreter der Gattungen *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* und andere verwandte Bakterien haben sehr ungewöhnliche Zellhüllen, da sie eine zusätzliche dicke wachsähnliche Schicht um die äußere Zellwand aufweisen. Diese zweitäußerste Schicht der Zellhülle basiert auf einer monomeren Schicht von charakteristischen Mycolsäuren, die über Esterbindungen mit der darauffolgenden Peptidoglykan- und Arabinogalactanschicht verknüpft sind. Bei Nährstoffmangel bilden einige Gattungen (z. B. *Bacillus*) widerstandsfähige Dauerformen, die sog. Endosporen, die von impermeablen Hüllen umschlossen sind. Als sporenspezifische Substanz wird Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-dicarbonsäure) gebildet. In den reifen Sporen liegt die Säure als Calciumchelatkomplex vor. In vegetativen Zellen kommt diese Säure nicht vor.

1.1.2 Die eukaryotische Zelle

Im Vergleich zu den Prokaryoten sind Eukaryoten größer und haben eine komplexere Struktur. Einer der grundlegenden Unterschiede ist, dass eukaryotische Zellen eine Kernmembran haben. Hierbei handelt es sich um eine besondere, membranumschlossene Struktur, in der sich die DNA befindet. Eukaryoten enthalten auch im Gegensatz zu Prokaryoten Organellen, wie z. B. Mitochondrien, in der die Zellen ihre Energie erzeugen.

Im weiteren Verlauf dieses Abschnitts soll der prinzipielle zelluläre Aufbau von Hefen, die zu den Eukaryoten zählen, exemplarisch beschrieben werden. Hierbei wird

1 Einleitung

vor allem ein Schwerpunkt auf der Gattung *Candida* liegen, die in der vorliegenden Arbeit mittels schwingungsspektroskopischer Techniken untersucht wurde.

Die Gattung *Candida* zählt zu den asporogenen Hefen, die auch als Sprosspilze bezeichnet werden [3]. Diese Klasse von Pilzen bestehen aus runden oder eiförmigen Einzelzellen, die ähnlich den Bakterien, auf festen Nährmedien ausplattiert, zu runden Kolonien heranwachsen. Ihre Fortpflanzung erfolgt ungeschlechtlich durch Sprossung. In flüssigem Medium sind sie zur Ausbildung eines Pseudomyzels befähigt.

Die Proteine, Lipide und Polysaccharide aus denen die Membran, Zellwand und Kapseln von Hefen bestehen sind von großer Bedeutung für die Taxonomie und die Phylogenie von Hefen [4]. Bislang ist nur eine geringe Anzahl an Hefe Spezies (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) eingehend untersucht worden und in noch geringerem Ausmaß waren bislang strukturelle Details Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Hefemembranen enthalten eine Anzahl von Lipiden und Pigmenten, die in prokaryotischen Zellen nicht vorkommen. Darunter fallen z. B. Sterole, Ergosterine, Melanine und einige Glykolipide. Ergosterin ist ein typisches Membranlipid, das strukturell dem Cholesterin ähnelt und zur Gruppe der Sterole gehört. Andere Komponenten, die man häufig in den Membranen von Hefen findet sind Melanine, bei denen es sich um schwarze Pigmente handelt, die aus Tyrosinderivaten aufgebaut sind.

Die Zellwand von Hefen erfüllt ähnliche Aufgaben wie die von Bakterien. Sie unterscheidet sich jedoch in ihrer strukturellen Beschaffenheit beträchtlich von der bakteriellen Zellhülle. Die Zellwände von Hefen bestehen im Wesentlichen aus langen Polysaccharidfäden und daran komplex gebundenen Proteinen. Die Grundbausteine der Polysaccharide sind Glukose, Mannose, außerdem Galaktose, Xylose, N-Acetyl-D-Glucosamin, Harnsäure und andere eher unbedeutende Komponenten [5]. Die qualitative Zusammensetzung der Zellwand ist charakteristisch für jede Hefe Spezies und kann daher als taxonomisches Merkmal dienen. Hingegen können die quantitativen Proportionen der individuellen Komponenten in der Zellwand, abhängig von den Kultivierungsbedingungen und dem Alter der Zelle, variieren. In Hefen, aber auch in anderen Pilzen, bildet β -Glucan, ein Polysaccharid bestehend aus Glukose- Monomereinheiten, die in alternierender Weise über β -glykosidische 1,6-,1,3- und 1,2-Bindungen verknüpft sind, das Stützgerüst der Zellwand. Mannane kommen in Hefen kovalent gebunden an Proteine vor.

In Hefen ist Glycogen das prinzipiell schnell zu mobilisierende Reservepolysaccharid. Glycogen ist im Cytoplasma und im Kernplasma vorhanden, entweder in gelöster Form oder als Aggregat in Form von kugelförmigen Partikeln mit einem Durchmesser von 40-50 nm. Der Glycogengehalt von Hefezellen ist hochgradig abhängig vom physiologischen Status und kann bis zu 20 % des Trockengewichts der Zelle betragen.

1.1.3 Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen

Die traditionelle Identifizierung von Mikroorganismen beginnt mit der Prüfung der Koloniemorphologie nach Kultivierung der Zellen auf einem festem Nährmedium. Daran schließt sich eine mikroskopische Untersuchung der Zellen nach Durchführung des Färbeverfahrens nach GRAM an. Mit Hilfe dieser Färbung lassen sich prokaryoti-

1.1 Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen

sche Zellen in die zwei bereits erwähnten großen Gruppen, nämlich in GRAM-positive und GRAM-negative Bakterien einteilen, basierend auf ihrer Eigenschaft den Farbstoff Kristallviolett bleibend zu binden bzw. nicht zu binden. Dies ist abhängig vom Aufbau der Zellwand und führt bei GRAM-positiven Bakterien zu einer bleibenden violetten Anfärbung, während sich GRAM-negative Bakterien durch Alkohol entfärben lassen. Sie werden durch Gegenfärbung mit Safranin (rote Färbung) sichtbar gemacht. Neben dem GRAM-verfahren, existieren noch weitere Differentialfärbungen, wie z. B. die ZIEHL-NEELSEN-Färbung, die dem Nachweis von so genannten säurefesten Mikroorganismen wie z. B. der Gattung *Mycobacterium* dient. Darüber hinaus kann mittels einer mikroskopischen Untersuchung eine erste Einteilung der Bakterien in Gruppen basierend auf den bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnten Zellformen und der Zellformierung erfolgen. So ist z. B. die Trauben- oder Haufenform für Staphylokokken charakteristisch.

1.1.3.1 Kriterien zur Bewertung von Identifizierungstechniken

Bevor in den folgenden Abschnitten die Labormethoden, die zur Identifizierung von Mikroorganismen in der diagnostischen Mikrobiologie Anwendung finden, näher erläutert werden, sollen zunächst die wichtigsten Kriterien, die bei der Bewertung von Identifizierungstechniken eine Rolle spielen, kurz beschrieben werden:

- Die *Reproduzierbarkeit* einer Methode erfordert, dass sie das selbe Ergebnis erzielt, wenn der gleiche Stamm wiederholt gemessen wird. Dieses Kriterium kann durch Tag-zu-Tag-Variationen in den Ergebnissen der jeweiligen Methode beeinflusst werden oder auch durch Variationen in der Stabilität des jeweiligen bakteriellen Merkmals beeinträchtigt werden.
- Die *Differenzierungsfähigkeit* einer Methode gibt die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei aus einer Spezies-Population zufällig ausgewählte Isolate, die genetisch nicht verwandt sind, auch zwei verschiedenen Stämmen zugeordnet werden. Die Diskriminierungsfähigkeit umfasst also die Fähigkeit des Systems, nicht verwandte Stämme unterscheiden zu können.
- Die *Typisierbarkeit* entspricht der Fähigkeit eines Systems, eindeutige Ergebnisse für jedes getestete Isolat zu erbringen. Nicht-typisierbare Isolate sind solche für die die Typisierung gar kein oder zumindest kein interpretierbares Ergebnis liefert.

1.1.3.2 Phänotypische Techniken

Basierend auf den morphologischen Eigenschaften der Mikroorganismen folgt eine Serie von Tests, die durchgeführt werden, um die biochemischen und physiologischen Eigenschaften eines Organismus zu überprüfen. Diese klassischen Verfahren zur Differenzierung von Mikroorganismen werden routinemäßig angewandt und umfassen das so genannte Biotyping, Antibiotika-Empfindlichkeitstests, Serotypisierung, Phagentypisierung und Immunoblottechniken [6]. All diese auf phänotypischen Merkmalen

1 Einleitung

basierenden Verfahren sind durch die Fähigkeit der Mikroorganismen limitiert, die Expression des zu bewertenden Merkmals in unvorhersehbarer Weise zu ändern. Daher können unabhängige Isolate desselben Stammes phänotypisch variieren. Hinzu kommt, dass einige dieser Methoden dadurch in ihrer Anwendbarkeit begrenzt sind, dass eine relativ große Anzahl an Stämmen phänotypisch ununterscheidbar und damit nicht typisierbar sind. Darüber hinaus sind all diese traditionellen Tests arbeitsaufwendig, schwierig zu standardisieren und es dauert ungefähr 2 bis 3 Tage bis die meisten klinisch relevanten Mikroorganismen identifiziert werden können. Dabei wird ein beträchtlicher Teil der Zeit dafür benötigt durch Kultivierung genügend Zellmasse bzw. Biomaterial zu erhalten, um die nachfolgenden Tests durchführen zu können. Ungefähr 10^6 bis 10^8 Zellen einer Reinkultur werden für die meisten konventionellen Identifizierungsverfahren benötigt.

Biotypisierung Bei der Biotypisierung macht man sich die Tatsache zunutze, dass sich Mikroorganismen vielfältig in ihrer Enzymausstattung unterscheiden und damit in der Ab- und Umbaufähigkeit organischer und anorganischer Verbindungen [7]. Traditionsgemäß werden für dieses auf individuellen mikrobiellen Stoffwechselleistungen beruhende Verfahren eine Reihe von festen und/oder flüssigen Nährmedien kombiniert, die dann mit Bakterien beimpft und nach einer bestimmten Inkubationsdauer interpretiert werden. Man spricht auch von der so genannten „Bunten Reihe“, da viele dieser Stoffwechselleistungen durch Indikatorreaktionen sichtbar gemacht werden können. Außerdem werden in der Regel mehrere Eigenschaften gleichzeitig überprüft, die, je nach positiver oder negativer Reaktion der Bakterienspezies, zu recht bunten Kulturen führen. Hierbei werden so genannte *differenzielle Medien* (Differenzialmedium) eingesetzt, die einen Indikator (meistens einen Farbstoff) enthalten, der es dem Mikrobiologen ermöglicht, die An- oder Abwesenheit von Enzymen zu bestimmen, die an der Dissimilation von dem differenziellen Medium zugefügten Substraten beteiligt sind. Die Vergärung von Zuckern misst man z. B. durch Hinzufügen von pH-Indikatorfarbstoffen, die ihre Farbe bei Ansäuerung verändern. Die Kohlenhydratvergärung dient beispielsweise zur Unterscheidung von Enterobakterien (*Bacillus* (+) von *Clostridium* (-)). Für den klinischen Gebrauch wurden Hunderte von verschiedenen Tests entwickelt, aber nur etwa 20 werden routinemäßig verwendet.

Kommerzielle Identifizierungssysteme In den letzten Jahren ist eine zunehmende Anzahl von kommerziellen Testsystemen auf den Markt gekommen, die im wesentlichen miniaturisierte Systeme, der im vorigen Abschnitt beschriebenen biochemischen Verfahren darstellen [7]. Diese kommerziellen Systeme haben den Vorteil, dass sie das Prozedere vereinfachen und das Identifizierungsergebnis schneller vorliegt. Zu den bekannten Systemen zählen z. B. API und VITEK (BIOMERIEUX, Frankreich), die zwar auf den traditionellen Tests basieren, für die aber weniger Biomasse benötigt wird. Die miniaturisierten Systeme können in solche unterteilt werden, deren Interpretation manuell erfolgt und solche, die mittels automatischer Systeme interpretiert werden. Mittlerweile sind auch Schnelltests erhältlich, die bereits nach 2-4 h zu ei-

1.1 Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen

nem Ergebnis führen, sobald die Starterkultur genügend Biomasse (normalerweise zwischen 16 und 24 h) geliefert hat.

Antibiotika-Empfindlichkeitstests Die Überprüfung der Antibiotika-Empfindlichkeit wird im klinischen Diagnostiklabor routinemäßig durchgeführt. Hierzu stehen mehrere Methoden zur Verfügung, wobei der Diskdiffusionstest am häufigsten Anwendung im Routinelabor findet. Für diesen Test werden feste Nährmedien so mit Bakterien beimpft, dass konfluentes Wachstum auftritt. Vor der Inkubation werden antibiotikahaltige Disks, bei denen es sich um Filterpapierscheiben handelt, die jeweils ein anderes antimikrobielles Agens in definierter Konzentration enthalten, auf der Agaroberfläche platziert. Während der Bebrütung diffundiert das Antibiotikum in die Zone um die runde Disk, so dass sich in dem Agar ein Konzentrationsgradient ausbildet. Nach der Inkubation kann das Ausmaß der Inhibition an der Größe des so genannten Hemmhofs, bei der es sich um eine Zone handelt, in der gar kein Koloniewachstum stattgefunden hat, abgelesen werden. Dieser Test setzt eine standardisierte Verfahrensweise voraus, um zu gewährleisten, dass das Ergebnis qualitativ interpretiert werden kann, und eine Einteilung in sensitiv, intermediär oder resistent erfolgt. Quantitative Ergebnisse anhand von effektiven Antibiotikakonzentrationen, kann man mit anderen Methoden erzielen, wie dem Röhrendilutionsverfahren (auch Mikrodilutionsverfahren, das mittels einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird). Hier wird eine Antibiotikakonzentrationsreihe mit der gleichen Zellzahl des betreffenden Keimes als Inokulum beimpft und anschließend inkubiert. Die durch Bakterienwachstum bewirkte Trübung kann nephelometrisch bestimmt werden und steht in inverser Beziehung zur Wirkstoffkonzentration. Mittels dieser Technik kann die Konzentration ermittelt werden, bei der das Bakterienwachstum gerade noch inhibiert wird, auch minimale Hemmkonzentration (MHK) genannt [8].

Serotypisierung Die Lipopolysaccharide (LPS), die sich in der äußeren Membran von GRAM-negativen Bakterien befinden, verfügen in ihrem Polysaccharidanteil über wichtige antigene Eigenschaften. LPS haben daher in der bakteriologischen Diagnostik große Bedeutung erlangt, da man z. B. verschiedene Stämme von *Salmonella typhimurium* anhand der so genannten O-spezifischen Seitenketten, die die äußere Schicht der Zellwand darstellen, unterscheiden kann. Hierbei handelt es sich um alternierende Oligosaccharid-Einheiten, bestehend aus 2-4 Monosacchariden. Die O-spezifischen Seitenketten können eine große Variation in Struktur und Zusammensetzung aufweisen und werden als *antigene Determinanten* bezeichnet [9]. Die Detektion dieser Unterschiede, also die Klassifizierung in verschiedene Serotypen, gelingt mittels immunologischer Techniken und hat sich vor allem für epidemiologische Studien von verschiedenen GRAM-negativen Bakterien, wie *E. coli* und *Neisseria meningitidis*, aber auch für GRAM-positive Bakterien, wie *Streptococcus pneumoniae* bewährt. Für die Evaluierung bestimmter Organismen hat sich die Serotypisierung als schnelle und einfach zugängliche Methode erwiesen. Jedoch ist die Serotypisierung nicht als eine generelle Technik in der klinischen Diagnostik geeignet, da sie einige kritische Li-

1 Einleitung

mitationen aufweist. So sind z. B. die verwendeten Agenzien, wie polyklonale Seren und monoklonale Antikörper meist nur schwer erhältlich und zudem sehr kostspielig. Darüber hinaus ist die Diskriminierungsfähigkeit dieser Technik als eher gering einzustufen, da viele Stämme nur einige wenige Serotypen umfassen.

Phagentypisierung Bei der Phagentypisierung handelt es sich um ein recht altes Verfahren, bei dem Isolate danach charakterisiert werden, ob sie gegen Lyse durch standardisierte Bakteriophagen (kleine Viren) empfindlich oder resistent sind [10]. Das Verfahren hat den Nachteil, dass eine große Anzahl von Isolaten, z. B. Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), mit den international standardisierten Bakteriophagen nicht typisierbar sind und die Fähigkeit zur Diskriminierung variabel ist. Die Phagentypisierung kann nur von Speziallaboren (Referenzlaboren) mit einer sehr personal- und zeitaufwendigen Vorhaltung der Bakteriophagenstämme durchgeführt werden. Außerdem ist diese Methode technisch sehr aufwendig und bedarf einiger experimenteller Erfahrung.

Immunoblots Immunoblot Techniken werden zur Detektion von bakteriellen Proteinen eingesetzt. Hierzu werden die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten zellulären Proteine auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und dann mit Hilfe von Antiseren, die als Quelle von aktiven Antikörpern dienen, detektiert [10]. Praktisch alle Stämme können mit dieser Technik typisiert werden. Nachteilig an dem Verfahren ist, dass das Proteinbandenmuster nach der gelelektrophoretischen Auftrennung sehr komplex ist, so dass die Interpretation des Ergebnisses sehr schwierig sein kann.

1.1.3.3 Genotypische Techniken

Aufgrund der Probleme, die bezüglich der Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und auch der Differenzierungsfähigkeit bei der Anwendung von vielen phänotypischen Techniken auftreten, sind als Folge zahlreiche molekulargenetische Verfahren entwickelt worden. Die Vielzahl dieser Methoden zielt auf DNA-Sequenzen, die eine Spezies-spezifische Identifizierung ermöglichen oder das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen belegen [11–13]. Die wesentlichen Vorteile von molekulargenetischen Diagnoseverfahren sind die hohe Sensitivität, Spezifität und die potenzielle Geschwindigkeit (für die Detektion von Bakterien direkt in einer Probe wurde von einer Dauer von nur 7 min. berichtet) [14]. Zur Bestimmung von Mikroorganismen wird theoretisch nur eine Kopie der bakteriellen DNA für die DNA-Amplifizierungstechnik, die PCR genannt wird, benötigt. Aufgrund dieser Sensitivität der Methode ist es möglich Organismen zu detektieren, die gar nicht oder nur schwer kultivierbar sind. Ein besonders vielversprechender Ansatz auf dem Gebiet der molekulargenetischen Diagnoseverfahren, stellen die so genannten DNA-Chips dar [15]. Hierbei werden auf einem festen Trägermaterial Tausende verschiedener DNA-Fragmente bekannter Sequenz befestigt, gegen die eine Probe auf einmal getestet wird. Die vielleicht nur vorübergehenden Nachteile molekularbiologischer Techniken liegen jedoch in den relativ hohen Kosten und dem Bedarf an hochqualifizierten Personal begründet. Die

1.1 Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen

wirklich fundamentalen Probleme sind hingegen falsch-positive Reaktionen aufgrund von DNA Kontaminationen und falsch-negative Reaktionen, die durch die Einführung von Inhibitoren während der Probenpräparation auftreten können.

Plasmidanalyse Die Plasmidanalyse gehört zu den ersten praktizierten und auch einfachsten DNA-basierenden Techniken. Plasmide sind DNA-Elemente, die man auch als extrachromosomale DNA bezeichnet, da sie getrennt vom bakteriellen Chromosom vorliegen. In bestimmten Bakterien Spezies können mehrere Plasmide vorhanden sein, während andere Spezies nur auf ein einziges oder gar kein Plasmid beschränkt sind. Die Plasmidanalyse beinhaltet die Isolierung der Plasmid-DNA vom Bakterium bzw. Isolat, woran sich die Auftrennung nach Größe und Anzahl in einem Agarosegel mittels Gelelektrophorese anschließt [6]. Die Plasmidanalyse hat sich für eine Reihe von Bakterien, wie z. B. *Listeria* und *Staphylococcus* als schnelle und zuverlässige Methode erwiesen. Die offensichtliche Beschränkung dieser Technik liegt darin, dass viele Bakterien Spezies gar keine Plasmid-DNA besitzen. Darüber hinaus können Bakterien spontan Plasmide verlieren oder neue hinzubekommen. Insbesondere der starke Selektionsdruck, Antibiotikaresistenzen zu entwickeln, dem nosokomiale Organismen ausgesetzt sind und die Häufigkeit mit der solche resistenztragenden Plasmide ausgetauscht werden, kann dazu führen, dass sich solche Plasmide von einem Stamm zum anderen horizontal und vertikal verbreiten und dadurch für eine lange Zeit in Krankenhäusern oder ähnlichen Einrichtungen persistieren.

RAPD-PCR–Random Amplification of Polymorphic DNA–PCR RAPD-PCR oder auch AP-PCR genannt, basiert auf der Vervielfältigungstechnik der Polymerasekettenreaktion. Alle auf der Polymerasekettenreaktion basierenden Typisierungstechniken, von denen die RAPD beispielhaft als ein möglicher Ansatz vorgestellt werden soll, zeichnet eine hohe Sensitivität und Schnelligkeit aus, da es theoretisch möglich ist, ein einziges DNA-Fragment innerhalb von wenigen Stunden 10^6 Mal zu amplifizieren. Bei der RAPD-PCR wird durch einen so genannten Zufallsprimer, der mit einer Länge von 9 bis 10 Basen relativ kurz ist, kein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert, sondern die vervielfältigten DNA-Abschnitte hängen von den Bindungsstellen auf der DNA-Sequenz ab. Daher ergeben Stämme mit identischer DNA-Sequenz, bei der auf die Amplifizierung folgenden Separation der Produkte durch Gelelektrophorese, auch identische Bandenmuster [16]. Aufgrund der allgemeinen Anwendbarkeit und der relativen Einfachheit des Verfahrens, hat sich RAPD-PCR als Typisierungsmethode für eine breite Auswahl von Bakterien und Hefen bewährt. Jedoch weist auch diese Technik Schwächen auf, die hauptsächlich die geringe Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Methode betreffen. Da die Primer auf keinen bestimmten DNA-Abschnitt zielen, kann es auch zu vielen so genannten imperfekten Hybridisierungen zwischen den Primern und der Ziel-DNA kommen. Daher ist der Amplifizierungsprozeß extrem empfindlich gegenüber geringen Schwankungen in der Hybridisierungstemperatur, die Veränderungen im Bandenmuster zur Folge haben kann [17].

PFGE – Pulsfeld-Gelelektrophorese der gesamten chromosomalen DNA

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese basiert auf der vollständigen Isolierung der DNA nach der Zellyse und der Auftrennung durch so genannte selten schneidende Restriktionsenzyme. Typische selten schneidende Restriktionsenzyme zerschneiden die gesamte chromosomale DNA in ~ 20 DNA-Fragmente. Die spezielle Form der Pulsfeld-Elektrophorese, bei der die Polarität des Stromes in bestimmten Intervallen wechselt, ermöglicht auch die Trennung sehr großer DNA-Fragmente, nämlich bis zu 800 kb, wie sie nach der Behandlung der Zellysate mit einem Restriktionsenzym vorliegen. Die resultierenden elektrophoretischen Banden, die man auch als molekulare Fingerabdrücke bezeichnet, werden mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, wie z. B. Ethidiumbromid visualisiert. Die Gele können dann fotografiert und zum Aufbau von Datenbanken bestehend aus PFGE-Mustern für alle Organismen verwendet werden. Zur Identifizierung eines neuen Stammes wird dann dessen Bandenmuster gegen alle in der Datenbank vorhandenen Muster verglichen, so dass seine phylogenetische Verwandtschaft zu ähnlichen Stämmen bestimmt werden kann. Dieses Verfahren ist zwar technisch aufwendig und man benötigt eine spezifische und teure Ausstattung, dafür liefert die PFGE reproduzierbare Restriktionsprofile, die sehr distinkte und gut aufgelöste Banden zeigen, die wiederum die gesamte bakterielle DNA in einem einzigen Gel repräsentieren. Neben ihrer hohen Reproduzierbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit hat die Methode allerdings den Nachteil, dass sie sehr zeitintensiv ist. Im günstigsten Fall dauert die Bestimmung ca. eine Woche, ein Zeitrahmen, der gerade in kritischen Fällen, wie z. B. bei Sepsis Patienten viel zu langwierig ist.

Nukleotidsequenzanalyse Da alle molekulargenetischen Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen auf der Detektion von Unterschieden in der DNA basieren, sollte zwangsläufig die Sequenzierung von DNA die beste Möglichkeit darstellen, um Bakterien bzw. Hefen zu differenzieren. Jedoch trifft diese Vermutung, wie im folgenden erläutert wird, nicht uneingeschränkt zu.

Die DNA-Sequenzierung beginnt in der Regel mit der Amplifizierung mittels PCR eines bestimmten dafür geeigneten DNA-Abschnittes, worauf sich Sequenzierungsreaktionen mit den PCR-Produkten anschließen. Gegenwärtige Sequenzierungsprotokolle sehen die Markierung der DNA mit fluoreszierenden Nukleotiden vor. Die Sequenz wird dann anschließend mit einem automatischen Sequenzierungsgerät gelesen. Das Verfahren kann aber auch so modifiziert werden, das man anstelle von DNA RNA als Ausgangsmaterial verwenden kann.

Bevor man die DNA-Sequenzierung zur Typisierung von Mikroorganismen anwenden kann, müssen jedoch verschiedene Punkte in Betracht gezogen werden. So muss z. B. in einem klinischen Diagnoselabor schon allein aus praktischen Erwägungen die DNA-Sequenzierung auf eine möglichst kleine chromosomale Region des betreffenden Organismus begrenzt werden. Die DNA-Sequenzanalyse untersucht also im Gegensatz zu Techniken, die das gesamte Chromosom analysieren, nur einen relativ kleinen Anteil der Bereiche, die potenziell variieren können zwischen Bakterien- bzw. Hefestämmen. Darüber hinaus sollte dieser kleine DNA-Abschnitt verschiedene Kriterien

erfüllen, bevor er zur Differenzierung von Spezies/Stämmen sinnvoll genutzt werden kann. Die Struktur der ausgewählten DNA-Region sollte so beschaffen sein, dass sie aus einer variablen Sequenz besteht, die von einer hoch-konservierten Region flankiert wird. Diese Voraussetzungen ermöglichen die PCR-Amplifizierung und die Typisierung aller Mitglieder einer Gattung. Darüber hinaus sollte die Variabilität innerhalb der ausgewählten Region ausreichen, um auch eine Differenzierung auf Stammebene zu gewährleisten. Außerdem sollte gewährleistet sein, dass die selektierte Region nicht horizontal übertragbar ist zwischen den Stämmen einer Spezies [18]. Jedoch erfüllen für Bakterien und Hefen nur wenige Sequenzen alle diese Kriterien. Während sich die 16S-rRNA-Gene als geeignet für die Speziesidentifizierung eines Organismus erwiesen haben, zeigen sie nur eine begrenzte Variabilität zwischen den Stämmen einer Spezies. Die Region zwischen den 16S- und den 23S-rRNA-Genen (intergenic region) ist mit schwankenden Ergebnissen zu diesem Zweck verwendet worden [19]. Kritische Punkte, die alle DNA-Verfahren zur Typisierung von Bakterien und Hefen betreffen, sind zum einen die für die Analyse am besten geeigneten genetischen Bereich zu identifizieren und die Größe des zu sequenzierenden DNA-Fragments so zu wählen, dass genügend Daten zur Differenzierung zur Verfügung stehen. Zur Feststellung der phylogenetischen Beziehungen von Mikroorganismen ist die DNA-Sequenzanalyse sicherlich der „Goldstandard“, da sie sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und Differenzierungsfähigkeit auszeichnet und generell auf alle Organismen angewendet werden kann. Nachteilig für Identifizierungen im Routinelabor wirken sich allerdings die hohen Kosten und auch die hohen technischen Ansprüche, die mit dieser Methode verbunden sind, aus.

1.2 Wirkungsweise von β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika und die mikrobiellen Resistenzmechanismen

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.2 beschrieben wurde, gehört die Bestimmung der Antibiotikasensitivität von Mikroorganismen zu den Routineaufgaben eines klinisch diagnostischen Labors, da sie für eine erfolgreiche Antibiotikatherapie essenziell ist. Jedoch sind die in Kapitel 1.1.3.2 vorgestellten konventionellen Sensitivitätstests häufig sehr zeit- und arbeitsintensiv. In der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob die FTIR-Spektroskopie dazu geeignet ist, das antibiotische Empfindlichkeitsverhalten von Mikroorganismen zu detektieren. Dazu wurden umfangreiche FTIR-spektroskopische Untersuchungen sowohl an Vancomycin-resistenten und sensitiven *E. faecium* (VRE bzw. VSE) Stämmen als auch an Methicillin-resistenten und sensitiven *S. aureus* (MRSA bzw. MSSA) Stämmen durchgeführt. Im folgenden Abschnitt sollen die Wirkungsweisen dieser beiden Antibiotika und die Resistenzmechanismen, die für die Vancomycinresistenz bei *E. faecium* und die Methicillinresistenz bei *S. aureus* verantwortlich sind, erläutert werden, um später die Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Messungen mit dem Antibiotikawirkungsmechanismus bzw. dem Resistenzmechanismus zu korrelieren.

Wirkungsweise von Glykopeptidantibiotika Vancomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum, dessen bakterizide Wirkungsweise darin besteht, dass es in die Zellwandsynthese GRAM-positiver Bakterien inhibierend eingreift. Glykopeptide verhindern die Verknüpfung der im Cytoplasma synthetisierten und an die äußere Oberfläche der Zellmembran transportierten Peptidoglykanvorstufen. Die Inhibierung der Zellwandsynthese durch Glykopeptide resultiert aus der Bildung eines Komplexes zwischen dem Antibiotikum Vancomycin und dem terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Pentapeptids der Peptidoglykanvorläufer [20, 21]. An der Bindung zwischen dem Vancomycin und dem terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Pentapeptids sind fünf Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Die Bindung des Glykopeptids an dieser Stelle der Peptidoglykansynthese hat eine Hemmung der Transglycosilierung zur Folge. Diese Hemmung wird durch die sterische Behinderung, die von dem großräumigen Vancomycin ausgeht, das sich quasi über das Pentapeptid „stülpt“, verursacht. Der Einbau der Disaccharidpentapeptid-Untereinheit in das naszierende Peptidoglykanerüst wird infolgedessen blockiert. In stärkerem Ausmaß wird auch die von D,D-Transpeptidasen und D,D-Carboxypeptidasen katalysierte Transpeptidierung unterbunden, d. h. die Quervernetzung über tetra-Peptidketten, die zur Verknüpfung von zwei heteropolymeren Ketten und damit zur Bildung des charakteristischen Mureinsacculus führt (vergleiche auch Abschnitt 1.1.1), wird gehemmt. Ohne die Quervernetzung wird die Zellwand jedoch mechanisch instabil, so dass die Zellen durch den osmotischen Druckunterschied, der zwischen dem Zellinneren und der äußeren Umgebung der Zelle existiert, lysieren. Glykopeptide sind ausschließlich gegenüber GRAM-positiven Bakterien wirksam. Aufgrund ihrer Molekülgröße sind sie nicht in der Lage, die in der äußeren Zellwand befindlichen Porene von GRAM-negativen Bakterien zu durchdringen.

Resistenzmechanismus von Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VRE) Antibiotikaresistenzen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: intrinsische und erworbene Resistenzen. Dabei resultieren die intrinsischen Resistenzen aus dem normalen genetischen, strukturellen oder physiologischen Zustand eines Mikroorganismus, der z. B. bei den meisten GRAM-negativen Bakterien zu einer „natürlichen“ Undurchlässigkeit für das Antibiotikum Penicillin G führt. Erworbene Resistenzen hingegen sind durch Modifikationen in den zellulären Strukturen und/oder der Zellphysiologie, die aus der Veränderung der normalen genetischen Zusammensetzung eines Mikroorganismus resultiert, gekennzeichnet. Genetische Modifikationen können durch Mutationen, den Erwerb von Genen von anderen Organismen via Gentransfermechanismen (horizontal oder vertikal) oder einer Kombination aus beidem auftreten. Erworbene Resistenzen sind im Gegensatz zu den intrinsischen Resistenzen unvorhersehbar, weswegen ihre Detektion in der klinischen Praxis am wichtigsten ist. Insgesamt lassen sich die biochemischen Mechanismen der erworbenen Antibiotikaresistenzen in fünf Kategorien unterteilen: [22, 23]:

1. *Inaktivierung des Antibiotikums.* Dabei wird das Antibiotikum durch vom Mikroorganismus produzierte Resistenzenzyme in eine inaktive Form umgewan-

1.2 Wirkungsweise von β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika

delt. Das am besten bekannte Beispiel für diesen Resistenzmechanismus sind die z.B. in Staphylokokken häufig vorkommenden β -Lactamasen, die den β -Lactamring der meisten Penicilline spalten.

2. *Veränderung des Angriffsortes.* Bei diesem Resistenzmechanismus modifiziert der Mikroorganismus den Angriffsort des Antibiotikums, wie z.B. bei der chemischen Veränderung der PBP's (Penicillinbindungsproteine).
3. *Entwicklung eines resistenten Stoffwechselweges.* Durch eine genetische Veränderung wird der Stoffwechselweg modifiziert, den das antimikrobielle Agens blockiert, wie es z.B. bei der VanA-Typ vermittelten Resistenz bei *E. faecium* der Fall ist.
4. *Herauspumpen des Antibiotikums.* Der Mikroorganismus ist dazu in der Lage, ein in die Zelle eindringendes Antibiotikum herauszupumpen. Dieser Mechanismus tritt z.B. bei Tetracyclin-resistenten Bakterien auf.
5. *Reduzierte Permeabilität.* Dieser Resistenzmechanismus liegt dann vor, wenn die äußere Membran von GRAM-negativen Bakterien durch genetische Mutation für ein Antibiotikum undurchlässig wird, d. h. der Aufbau der äußeren Membran verändert sich, z.B. durch verminderte Expression oder den vollständigen Verlust von Porinen wie OmpF (*outer membrane porin F*).

Das Grundprinzip der VanA vermittelten Resistenz bei *E. faecium* basiert wie bereits unter Punkt 2 erwähnt auf der Entwicklung eines resistenten Stoffwechselweges. Dabei wird der terminale D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Pentapeptids der Peptidoglykanvorstufe durch das Depsipeptid D-Alanyl-D-Lactat ersetzt [24]. Dieses Depsipeptid wird zwar effizient in die Zellwand eingebaut, stellt aber ein schlechteres Substrat für Glykopeptidantibiotika dar. Hierfür ist die Substitution eines D-Ala-Rests gegen einen D-Lac-Rest verantwortlich, die die Ausbildung einer (von insgesamt fünf) Wasserstoffbrückenbindung zwischen der NH Gruppe der D-Ala-D-Ala-Amidbindung und einem Carboxylsauerstoff am Vancomycin verhindert, die für die Bindung des Antibiotikums essenziell ist. Dadurch ist die Synthese der Zellwand bei VRE auch in Gegenwart von Glykopeptiden möglich. Die Gene der für die Ausprägung der Glykopeptidresistenz wichtigen Enzyme sind auf einem mobilen genetischen Element, einem Transposon (*Tn1546*) lokalisiert [25]. Es handelt sich bei der VanA-Typ Resistenz um einen induzierbaren Resistenzmechanismus, der durch die Gegenwart von z. B. Vancomycin angeschaltet wird. Das Glykopeptid Vancomycin induziert die Expression einer Dehydrogenase (VanH), die Pyruvat zu D-Lactat reduziert und einer Ligase (VanA) mit breiter Substratspezifität, die die Bildung der Esterbindung zwischen D-Ala und D-Lac katalysiert.

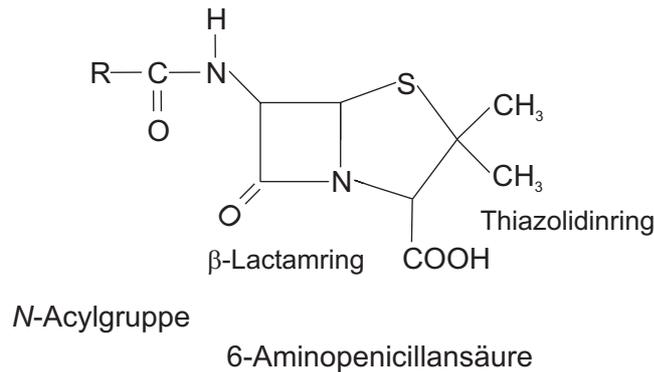


Abbildung 1.2: Strukturformel des Grundbausteins von Penicillinen. Durch Modifikation der Seitenkette (R) am 6. Kohlenstoffatom der 6-Aminopenicillansäure kann man verschiedene halbsynthetische Penicilline, wie z. B. Methicillin synthetisieren, die viele signifikante klinische Vorteile hinsichtlich ihres Aktivitätsspektrums aufweisen.

Wirkungsweise von β -Lactamantibiotika β -Lactamantibiotika stellen sowohl aus medizinischer, als auch aus historischer Sicht eine der wichtigsten Antibiotikagruppen dar. Zu den β -Lactamantibiotika gehören die Penicilline, die Cephalosporine und die Cephamycine. Sie alle haben eine charakteristische Strukturkomponente gemeinsam, den β -Lactamring. Die β -Lactamantibiotika sind potente Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese [26]. Dabei greifen diese Antibiotika in die für die Zellwandsynthese essenzielle Transpeptidierungsreaktion ein, die zur Vernetzung zweier glykangebundener Peptidketten führt. Die Enzyme, die diese Aufgabe erfüllen, die Transpeptidasen binden außerdem an Penicillin oder andere strukturverwandte Antibiotika, die einen β -Lactamanring besitzen¹. Daher werden die Transpeptidasen auch als Penicillinbindungsproteine (PBPs) bezeichnet. Die PBPs binden sehr fest (kovalent) an das Penicillin, da aufgrund der Spaltung der β -Lactamanbindung eine stabile Antibiotikum-Enzym Zwischenstufe entsteht, und können infolgedessen die Transpeptidasereaktion nicht mehr katalysieren. Die Zellwand wird zwar weiterhin gebildet, aber nicht mehr vernetzt, so dass die Stabilität des Peptidoglykangerüsts so stark herabgesetzt wird, dass die Zellen dem eigenen osmotischen Innendruck nicht mehr standhalten können. Zusätzlich stimuliert der Antibiotikum-PBP-Komplex die Freisetzung von Autolysinen, welche die bestehende Zellwand verdauen. Als Ergebnis beider Prozesse kommt es zu der unter Penicillingabe beobachteten Bakteriolyse.

Resistenzmechanismus von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Unmittelbar nach der Einführung des zuerst entdeckten, natürlichen β -Lactamantibiotikums Penicillin G, traten sehr schnell Resistenzen auf, die das Penicillin durch bakterielle β -Lactamasen inaktivieren. Daher wurden so genannte halbsynthetische

¹Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Penicillin dem Acyl-D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Pentapeptids der Peptidoglykanvorstufe strukturell analog ist [27].

Penicilline entwickelt, die strukturelle Unterschiede in den *N*-Acylgruppen (vergleiche Abbildung 1.2) aufweisen, die in signifikanten Veränderungen der Antibiotikaeigenschaften resultieren. Halbsynthetische Penicilline, wie z. B. Methicillin und Oxacillin sind therapeutisch sehr nützlich, weil sie aufgrund ihrer sperrigen Seitengruppen gegen Hydrolyse des β -Lactamrings durch β -Lactamasen resistent sind. Bei Methicillinresistenten *S. aureus* Stämmen muß die Antibiotikaresistenz demzufolge auf einem anderen Mechanismus beruhen. Das Grundprinzip der Methicillinresistenz basiert hier auf der Veränderung des Angriffsorts von β -Lactamantibiotika, nämlich dem Vorhandensein eines zusätzlichen PBPs, das auch als PBP2a oder PBP2' bezeichnet wird und eine extrem geringe Affinität gegenüber Methicillin oder anderen β -Lactamantibiotika aufweist [28, 29]. Die Bildung des Penicillinbindepoteins PBP2a wird von dem Gen *mecA* kodiert, das chromosomal vorliegt und eine Kreuzresistenz gegenüber allen β -Lactamantibiotika einschließlich der Cephalosporine bedingt. PBP2a wird im Gegensatz zum normalen PBP in großen Mengen exprimiert und kann sogar das häufigste Membranprotein darstellen. Dabei kann das Auftreten von PBP2a sowohl zu einer heterogenen, als auch zu einer homogenen Ausprägung der Methicillinresistenz führen². Weiterhin kann das PBP2a konstitutiv gebildet werden oder seine Produktion wird durch β -Lactamantibiotika induziert. Letzteres kommt jedoch in den meisten Fällen nur bei Stämmen vor, die ein β -Lactamaseplasmid tragen.

1.3 Schwingungsspektroskopische Techniken

Molekülschwingungen und -rotationen werden durch die Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums angeregt. Dieser schließt sich an den sichtbaren Bereich nach längeren Wellenlängen an und reicht von $\lambda = 1 \mu\text{m} - 1 \text{mm}$ bzw. $\bar{\nu} = 10000 \text{cm}^{-1} - 10 \text{cm}^{-1}$. Heute hat sich nämlich die so genannte Wellenzahl $\bar{\nu}$ (Reziproke der Wellenlänge) als Einheit durchgesetzt. Der Zahlenwert von $\bar{\nu}$ gibt an, wieviele Wellen der Infrarot-Strahlung auf einen Zentimeter kommen. Wellenzahlen haben den Vorteil, dass sie der Frequenz ν und damit der Energie der absorbierten Strahlung direkt proportional sind. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten Molekülschwingungen bzw. -rotationen zu messen:

- als Absorption im Infrarot-Spektrum
- als Streustrahlung im RAMAN-Spektrum

Da diese beiden schwingungsspektroskopischen Techniken in der vorliegenden Arbeit Verwendung gefunden haben, werden die physikalischen Grundlagen in den folgenden Abschnitten erläutert.

²Heterogene Resistenz bedeutet, dass nur eine Minderheit der Zellen unter einer gegebenen Antibiotikakonzentration überleben kann, während die Zellen eines homogen resistenten Stammes ein einheitliches Resistenzverhalten aufweisen [30].

1.3.1 FTIR-Fourier Transform Infrarot Spektroskopie

Der gesamte Infrarotbereich wird per Konvention in drei Teile unterteilt: nahes (NIR), mittleres (MIR) und fernes (FIR) Infrarot. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der MIR-Bereich, der etwa von 700 bis 4000 cm^{-1} reicht, verwendet. Die Anregung einer Schwingung kann man sich so vorstellen, dass das Molekül unter Absorption eines Lichtquants vom Schwingungszustand mit der Quantenzahl n in einen höheren, z. B. mit $n + 1$, übergeht. Die Energiedifferenz der beiden Zustände entspricht dabei der Energie des Lichtquants (Resonanzbedingung). Außer von Quantenbedingungen hängen Auftreten und Intensität von Absorptionsbanden noch vom Dipolmoment eines Moleküls ab. Absorption der infraroten Strahlung tritt nur auf, wenn das oszillierende Dipolmoment der Molekülschwingung mit dem elektrischen Vektor des Lichtes in Wechselwirkung tritt. Infrarot-aktiv und damit im Infrarotspektrum beobachtbar, sind nur diejenigen Schwingungsmoden, die mit einer Änderung des Übergangsdipolmoments verbunden sind [31]. Je stärker sich das Dipolmoment während der Schwingung ändert, desto höher ist die Absorption. Das IR Spektrum einer Probe erhält man, indem man die IR-Strahlung vor und nach Durchtritt durch die Probe aufnimmt. Das IR-Spektrum stellt dann die Transmission oder die Absorption als Funktion der Wellenzahl dar. Meistens wird die Auftragung der Absorption (auch Extinktion E genannt) bevorzugt, da sie nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz der Konzentration direkt proportional ist:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d. \quad (1.1)$$

wobei c für die Konzentration einer homogenen Probe der Schichtdicke d steht. Bei ϵ handelt es sich um eine stoffspezifische Größe, den molaren Extinktionskoeffizienten, der molekülspezifisch ist und von der Frequenz der Strahlung abhängt. I_0 und I sind die Lichtintensitäten vor und nach dem Probendurchgang.

1.3.1.1 Der harmonische Oszillator

Um die Vorgänge beim Entstehen eines IR-Spektrums verständlich zu machen, bedient man sich eines einfachen Modells aus der klassischen Mechanik. Betrachtet man z. B. in einem zweiatomigen Molekül die Atome als Punktmassen, m_1 und m_2 , die durch eine elastische Feder verbunden sind, dann ist die rücktreibende Kraft, wenn man den Gleichgewichtsabstand der beiden Massen verändert, nach dem HOOK'schen Gesetz in erster Näherung proportional der Auslenkung:

$$F = -ky. \quad (1.2)$$

Für die Änderung der potenziellen Energie $dE = -F dy$ ergibt sich deshalb

$$dE = ky dy. \quad (1.3)$$

Eine anschließende Integration

$$\int_0^E dE = k \int_0^y y dy \quad (1.4)$$

1.3 Schwingungsspektroskopische Techniken

liefert die *Potenzialkurve* des harmonischen Oszillators

$$E = \frac{1}{2}ky^2. \quad (1.5)$$

Aus obiger Gleichung lässt sich die Schwingungsfrequenz ν_m eines zweiatomigen Moleküls nach dem mechanischen Modell ausrechnen als

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (1.6)$$

wobei die Masse m durch die *reduzierte Masse* $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ ersetzt ist. Die Schwingungsfrequenz ν_m ist danach umso höher, je größer die Kraftkonstante k ist, das heißt je stärker die Bindung ist. Weiterhin folgt: je kleiner die schwingenden Atommassen sind, umso höher liegt die Frequenz ν_m der Schwingung.

In den Gleichungen 1.5 und 1.6 findet jedoch die diskrete Natur der molekularen Schwingungsenergien keine Berücksichtigung. Die quantenmechanische Wellenfunktion zur Beschreibung der potenziellen Energie, die hierfür eine bessere Näherung darstellt, lässt sich aus dem einfachen Konzept des harmonischen Oszillators ableiten und ergibt sich nach

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1.7)$$

Hierbei sind h die PLANCKSche Konstante und v die Schwingungsquantenzahl, die neben Null nur positive ganze Zahlen annehmen kann. Mit Gleichung 1.6 ergibt sich

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu_m. \quad (1.8)$$

Schwingungsübergänge sind nur zwischen benachbarten Energieniveaus möglich (Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$) und können nur dann herbeigeführt werden, wenn die eingestrahlte Energie ΔE exakt der Energiedifferenz der Schwingungsquantenzustände entspricht.

1.3.1.2 Der anharmonische Oszillator

Jedoch lassen sich nicht alle Phänomene mit dem Modell des harmonischen Oszillators erklären, wie z. B. die Dissoziation des Moleküls bei genügend hoher Energie. Eine bessere Beschreibung liefert das Modell des anharmonischen Oszillators. Seine Potenzialkurve hat einen asymmetrischen Verlauf und die Schwingungsniveaus haben nicht mehr equidistante Abstände wie beim harmonischen Oszillator. Der wichtigste Unterschied gegenüber dem harmonischen Oszillator ist aber durch die Auswahlregel gegeben:

$$\Delta v = \pm 1, 2, 3, \dots \quad (1.9)$$

Während beim harmonischen Oszillator nur Übergänge in das nächsthöhere bzw. nächsttiefere Niveau erlaubt sind, sind beim anharmonischen Oszillator ausgehend

1 Einleitung

vom Grundzustand $\nu = 0$ neben dem Übergang nach $\nu = 1$ auch Übergänge in höhere Zustände, allerdings mit stark abnehmender Wahrscheinlichkeit, möglich. Diese werden als Oberschwingungen oder als Obertöne bezeichnet, da sie einen vielfachen Wert der Grundschiwingung aufweisen.

1.3.1.3 IR-Spektren vielatomiger Moleküle

Die Anzahl der möglichen Schwingungen von mehratomigen Molekülen lässt sich wie folgt ableiten: Ein System aus N Atomen verfügt über $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade wegen der drei unabhängigen Raumkoordinaten jedes Atoms. Die Zahl der eigentlichen Schwingungsfreiheitsgrade beträgt jedoch

$$Z = 3N - 6, \quad (1.10)$$

da drei dieser Freiheitsgrade auf die drei Translationsbewegungen des Moleküls entfallen und drei weitere auf Rotationen um die drei Hauptträgheitsachsen. Lineare Moleküle verfügen nur über zwei Rotationsfreiheitsgrade, so dass dieser Molekültyp über einen Schwingungsfreiheitsgrad mehr verfügt

$$Z = 3N - 5. \quad (1.11)$$

Die auf diese Weise berechenbare Gesamtheit aller Schwingungen eines Moleküls nennt man seine *Normalschwingungen*. Darüber hinaus unterscheidet man je nach Schwingungsform zwischen *Valenzschwingungen*, bei denen sich die Bindungslängen ändern und *Deformationsschwingungen*, bei denen sich die Bindungswinkel ändern während die Bindungslängen konstant bleiben. Das Symmetrieverhalten der jeweiligen Schwingungen führt zu einer weiteren Unterteilung, nämlich in symmetrische (vollständiger Erhalt der Molekülsymmetrie) und asymmetrische (Verlust einer oder mehrerer Symmetrieelemente) Schwingungen.

1.3.1.4 Fourier-Transform-Technik

Eine entscheidende Weiterentwicklung der IR-Spektroskopie stellt die FOURIER-Transform-Technik dar, bei der es sich um eine von der physikalischen Realisierung her völlig andere Methode handelt als bei der dispersiven Gerätetechnik. Die Grundlage bei der FT-Technik stellt die Erfassung des gesamten Spektrums über ein Interferenzverfahren dar. Die Generierung des Interferogramms wird durch das so genannte MICHELSON-Interferometer möglich, dessen Prinzip im folgenden Abschnitt erläutert wird. Bei diesem Interferometer handelt es sich um den von MICHELSON um 1880 entwickelten Prototyp, auf den die heutigen Interferometer in FTIR Spektrometern zurückgehen. Das so generierte Interferogramm hat zunächst nichts mit der Wellenlänge der IR-Strahlung zu tun, es wird als so genannte Zeitdomäne bezeichnet. Erst durch die FOURIER-Transformation wird das Interferogramm in die Frequenzen der einzelnen Schwingungen zerlegt. Das Ergebnis ist ein konventionelles IR-Spektrum (Frequenzdomäne). Die Vorteile der FTIR-Technik im Vergleich zur dispersiven Gerätetechnik umfassen dabei folgende Punkte [32]:

- Der JAQUINOT-Vorteil:

Da in einem Interferometer die Verwendung von Spalten, wie es bei dispersiven Spektrometern üblich war, nicht mehr notwendig ist, fallen die Verluste an Strahlungsenergie, die nur noch durch die verwendeten Materialien des Strahlteilers bestimmt werden, sehr gering aus. Dadurch, dass praktisch die ganze Intensität der Lichtquelle ausgenutzt wird, erzielt man eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses.

- Der FELGETT-Vorteil (Multiplex-Vorteil):

Da der Detektor alle Frequenzen gleichzeitig erfasst, reduziert sich die benötigte Zeit zur Aufnahme eines Spektrums im Vergleich zu dispersiven Geräten erheblich. Daher ist es möglich mehrere Interferogramme zu mitteln, so dass auf diese Weise eine erhebliche Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses erzielt wird.

- Der CONNES-Vorteil:

Die Position des sich bewegenden Spiegels wird mittels eines internen HeNe-Referenzlasers so genau bestimmt, dass die Wellenlängengenauigkeit der meisten FTIR-Spektrometer bei $0,01 \text{ cm}^{-1}$ liegt. Erst diese Genauigkeit ermöglicht exakte Wellenzahlbestimmungen, so dass auch die Anwendung von z. B. Differenzspektroskopie zulässig ist.

Darüber hinaus treten auch keine Streulichteffekte (*Streulicht-Vorteil*) auf, da jede Frequenz der polychromatischen IR-Strahlung separat moduliert wird, so dass Intensitäten (Extinktion bzw. Absorbanz) bis zu 3,0 AE linear gemessen werden können. Des Weiteren ermöglicht die Speicherung der Daten in digitalisierter Form (*Digitaldaten-Vorteil*), dass sie für die spätere Datenverarbeitung und Auswertung zur Verfügung stehen.

1.3.1.5 Das Michelson-Interferometer

Die Interferenztechnik basiert auf dem von MICHELSON entwickelten so genannten MICHELSON-Interferometer. Hierbei werden alle Wellenlängen mit dem Interferometer spezifisch moduliert und dann gleichzeitig auf den Infrarotdetektor eingestrahlt. Das Interferometer besteht aus drei Hauptbestandteilen: einem Strahlteiler, einem feststehenden und einem beweglichen Spiegel. Der prinzipielle Interferometeraufbau und seine Funktionsweise ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die gesamte kollimierte Strahlung (in diesem Beispiel die monochromatische Strahlung mit der Wellenzahl $\bar{\nu}_m$) trifft auf einen halbdurchlässigen Strahlteiler (Beamsplitter), der die IR-Strahlung in zwei Teilstrahlen mit gleicher Intensität aufteilt. Beide Strahlenanteile werden von jeweils einem parallel zum Strahlengang angeordneten Spiegel zurückreflektiert, treffen am Strahlteiler wieder zusammen und interferieren dort. Diese rekombinierte Strahlung wird wieder aufgeteilt, wovon ein Teil die jeweilige Probe durchtritt und dann auf den Detektor trifft, während der auf die Lichtquelle gerichtete Teil verloren geht. Die

1 Einleitung

Modulierung der IR-Strahlung wird durch die zeitabhängige Bewegung einer der beiden Spiegel erzeugt, die eine Phasenverschiebung aller Wellenlängen hervorruft. Beim Zusammentreffen beider Teilstrahlen erfolgt nun in Abhängigkeit von der Frequenz entweder verstärkende oder abschwächende Interferenz [33]. Am Detektor wird die Intensität der Strahlung als Funktion der Position des beweglichen Spiegels aufgezeichnet.

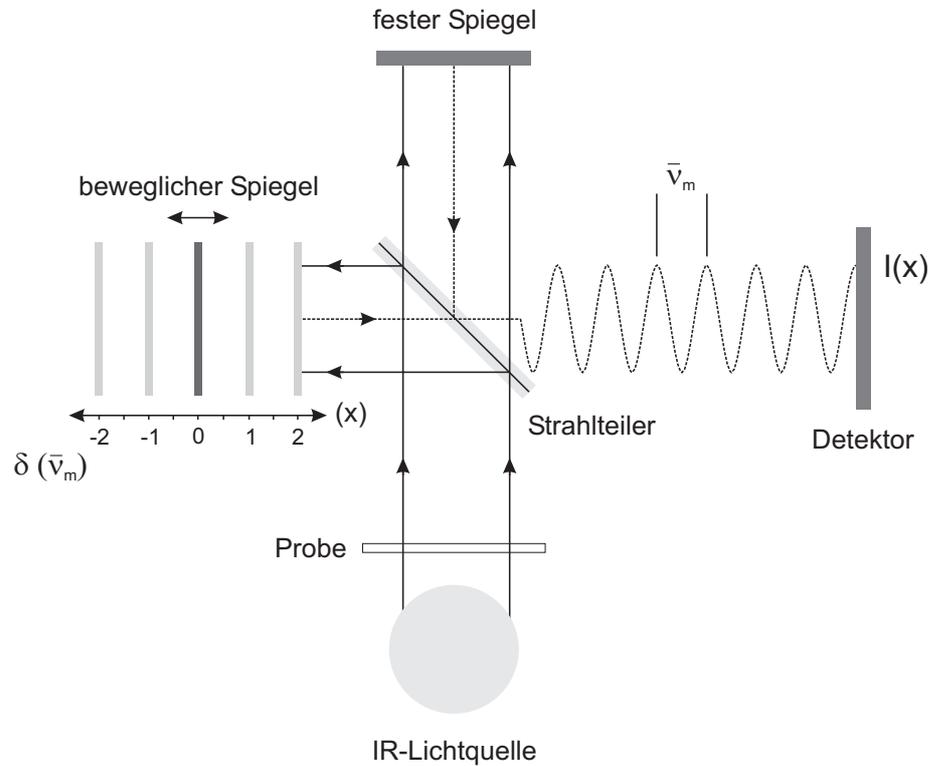


Abbildung 1.3: Aufbau und Funktionsweise eines MICHELSON-Interferometers.

1.3.1.6 Fourier-Transformation

Weitaus komplexere Interferenzerscheinungen entstehen, wenn polychromatisches Licht auf den Detektor trifft. Man bezeichnet die Intensitätsänderung in Abhängigkeit vom durchfahrenen Spiegelweg x bzw. der optischen Weglängendifferenz δ als Interferogramm. Die Position des Spiegels, bei der beide Teilstrahlen die gleiche optische Weglänge zurücklegen ($\delta = 0$), nennt man Weißlichtposition. In diesem speziellen Fall sind beide Teilstrahlen bei der Rekombination für alle Wellenlängen in Phase, wodurch konstruktive Interferenz und damit ein maximales Signal am Detektor auftritt. Mit zunehmendem Abstand von dieser Position wird die Zahl destruktiv interferierender Wellenzüge immer größer und die am Detektor registrierte Intensität nimmt ab.

Für eine polychromatische Strahlungsquelle kann man das Interferogramm durch folgende Gleichung beschreiben

$$I(n\Delta x) = S(k\Delta\bar{\nu}) \cdot \cos(2\pi \cdot k\Delta\bar{\nu} \cdot n\Delta x) \quad (1.12)$$

Durch die mathematische Operation der FOURIER-Transformation erhält man schließlich aus einem Interferogramm ein Spektrum. Dies geschieht mit Hilfe der diskreten Variante der FOURIER-Transformation (DFT)

$$S(k\Delta\bar{\nu}) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \frac{e^{i2\pi nk}}{N}. \quad (1.13)$$

1.3.1.7 Beeinflussung der spektralen Auflösung von FTIR-Spektren

Der Spiegelweg bestimmt maßgeblich die spektrale Auflösung eines FTIR-Spektrums. Je geringer der Abstand zwischen zwei Spektrallinien ist, desto größer ist der Abstand der modulierten, sich wiederholenden Muster im Interferogramm. Dieser Sachverhalt gibt das so genannte RAYLEIGH Kriterium wieder, welches besagt, dass zur Auflösung zweier Spektrallinien des Abstands d eine Weglänge von mindestens $1/d$ notwendig ist.

Die nun folgenden Abschnitte stellen einige mathematische Verfahren vor, mit denen die gerätetechnisch- und physikalisch bedingten Einschränkungen der spektralen Auflösung beeinflusst werden können.

Apodisierung In jedem Spektrometer ist der optische Weg des beweglichen Spiegels begrenzt. Daraus resultiert, dass jedes reale Interferogramm endlich ist. Das Interferogramm wird am Ende des Spiegelweges förmlich abgeschnitten, woraus sich im FT-Spektrum Banden ergeben, deren Flanken mit einer gedämpften Oszillation abklingen. Diese Seitenbanden beinhalten aber keine reale spektrale Information, sondern stellen lediglich Artefakte dar. Darüber hinaus ist die Gesamtintensität der spektralen Information auf die Hauptbande und diese Seitenbanden (*side lobes*) verteilt. Durch das mathematische Verfahren der Apodisierung kann das Auftreten solcher Seitenbanden im Spektrum signifikant vermindert werden. Hierzu wird das Interferogramm vor der FOURIER-Transformation mit einer geeigneten Apodisierungsfunktion multipliziert, die es mehr oder weniger flach abklingen lässt. Jedoch impliziert eine hohe Dämpfung immer auch eine Verminderung der spektralen Auflösung, so dass die Wahl der Apodisierungsfunktion einen Kompromiss zwischen der spektralen Auflösung und der Unterdrückung der Seitenbanden darstellt.

Zero Filling Die FOURIER-Transformation zerlegt das Interferogramm in die Frequenzen der einzelnen Schwingungen, woraus das konventionelle IR-Spektrum (Frequenzdomäne) resultiert. Infolge der diskreten FOURIER-Transformation kann es vorkommen, dass Banden mit einer sehr geringen Halbwertsbreite genau zwischen zwei Datenpunkten liegen und deshalb nur ungenügend aufgelöst werden. Im allgemeinen

1 Einleitung

erstrecken sich jedoch die Halbwertsbreiten der Banden über mehrere Datenpunkte und können ohne weiteres erfasst werden. Es ist jedoch möglich mit Hilfe des so genannten *zero filling* eine mathematische Erhöhung der Datenpunktauflösung zu erzielen. Hierbei wird das Interferogramm vor der FOURIER-Transformation mit Nullen aufgefüllt. Damit erzielt man eine Zunahme der Anzahl von Punkten („Messpunkten“) pro Wellenzahl im Spektrum. Das *zero filling* bewirkt also eine Interpolation des Spektrums, wodurch die spektrale Auflösung künstlich erhöht wird.

1.3.2 Raman-Spektroskopie

Wenn man eine Probe mit monochromatischem Laserlicht, dessen Wellenlänge zwischen dem UV- und IR-Bereich liegt, bestrahlt dann treten drei verschiedenen Arten von Streustrahlung auf [34]:

- Ein geringer Teil des eingestrahnten Lichtes (Faktor 10^{-4}) wird in alle Raumrichtungen gestreut. Diese so genannte RAYLEIGH Streuung, die durch elastische Stöße der Lichtquanten mit den Molekülen entstehen, besitzt die Frequenz des eingestrahnten Lichtes.
- Ein noch geringerer Teil des eingestrahnten Lichts (Faktor 10^{-8}) wird inelastisch, d. h. unter Änderung der Frequenz gestreut (RAMAN-Streuung). Diese Frequenzverteilung bzw. das Spektrum des Streulichts weist Banden mit Frequenzdifferenzen zur Anregung auf, die den Schwingungsfrequenzen der Moleküle entsprechen. Dabei nennt man die auf der langwelligen Seite der RAYLEIGH Frequenz auftretenden RAMAN-Banden STOKES-Linien. Diese Banden entstehen, wenn ein Teil der Energie der Anregungsstrahlung auf ein Molekül übertragen und längerwellig gestreut wird, d. h. um den übertragenen Energiebetrag ärmer wieder aus der Probe austritt. Das Streulicht ist in diesem Fall um $-\Delta E$ energieärmer, wobei $-\Delta E$ der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem 1. Schwingungszustand entspricht.
- Trifft die eingestrahlte Lichtenergie hingegen auf ein Molekül, das sich bereits in einem angeregten Schwingungszustand befindet, so tritt bei gleicher Wechselwirkung energiereicheres Streulicht ($+\Delta E$) auf. Diese RAMAN-Banden, die auf der kurzwelligen Seite der RAYLEIGH Frequenz auftreten, nennt man ANTI-STOKES-Linien. Diese Banden sind weniger intensiv als die entsprechenden STOKES-Linien, da die Besetzung des angeregten Schwingungszustands bei Raumtemperatur viel weniger wahrscheinlich ist. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass man in der Praxis vorzugsweise nur den STOKES-Teil eines RAMAN-Spektrums zur Auswertung heranzieht.

Zur Absorption von IR-Strahlung ist eine Dipolmomentänderung während der Schwingung erforderlich (siehe Abschnitt 1.3.1). Hingegen sind für den RAMAN-Effekt andere physikalische Grundlagen verantwortlich. Für das Auftreten einer RAMAN-Bande muss sich die Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung ändern. Die Polarisierbarkeit ist ein Maß für die Deformierbarkeit der Elektronenwolke um

1.3 Schwingungsspektroskopische Techniken

ein Atom oder Molekül. Die unterschiedlichen Auswahlregeln, die bei der IR- und der RAMAN-Spektroskopie wirksam werden, haben eine wichtige Konsequenz: So sind beispielsweise zentrosymmetrische Schwingungen in Molekülen mit Inversionszentrum IR-inaktiv, da keine Änderung des Dipolmoments erfolgt, aber dafür RAMAN-aktiv. Umgekehrt sind Schwingungen, die nicht symmetrisch zum Symmetriezentrum erfolgen, im RAMAN-Spektrum inaktiv, im IR aber gewöhnlich aktiv. Als Beispiel ist die symmetrische und asymmetrische Valenzschwingung von CO_2 zu nennen: Während nur die symmetrische Valenzschwingung RAMAN-aktiv ist, da sich die Polarisierbarkeit ändert, ist nur die asymmetrische Valenzschwingung IR-aktiv, da sich hierbei das Dipolmoment ändert. Dieses Beispiel macht deutlich, dass die IR- und RAMAN-Spektroskopie komplementäre Bilder von den Schwingungen im Molekül liefern.

Beide schwingungsspektroskopischen Techniken unterscheiden sich hinsichtlich mehrerer Aspekte: So liegt zum Beispiel ein Vorteil der RAMAN-Spektroskopie in der Möglichkeit, ohne Einschränkungen Wasser als Lösungsmittel zu verwenden bzw. hydratisierte Proben zu messen. In der IR-Spektroskopie ist das Messen von wässrigen Proben schwieriger durchführbar, da Wasser eine starke Eigenabsorption aufweist. Das RAMAN-Spektrum von Wasser ist im Gegensatz zum IR-Spektrum linienschwach und wenig intensiv. Jedoch ist das Signal/Rausch-Verhältnis von RAMAN-Spektren generell wesentlich schlechter als das von IR-Spektren. Dies liegt daran, dass selbst die intensivsten RAMAN-Banden nur 0,001% der Intensität der Lichtquelle betragen.

Die Intensität der RAMAN-Streuung steigt mit der vierten Potenz der Frequenz des Anregungslichts an.

$$I_s \sim \nu^4 \quad (1.14)$$

Die Verwendung von Lasern, deren Wellenlänge im UV-Bereich liegt hat sich trotz dieser Abhängigkeit als nicht geeignet erwiesen. Meist kommt es aufgrund der hohen Strahlungsintensität zur Zersetzung der Probe. Hingegen hat sich der Einsatz von Nd:YAG-Lasern mehr und mehr durchgesetzt. Die nah-infrarote Strahlung bei 1064 nm, die dieser Lasertyp emittiert, bringt zwei Vorteile mit sich: Zum einen kann der Laser bei viel höheren Leistungen (bis zu 50 W) betrieben werden, ohne dass die Probe dabei zerstört wird. Zum anderen ist diese im nahen-infrarot Bereich liegende Strahlung nicht in der Lage elektronische Übergänge anzuregen. Es tritt daher keine Fluoreszenz auf, womit eines der größten Probleme, die bei der RAMAN-Spektroskopie auftreten können, umgangen wird. Diese Laser finden meist Verwendung in auf der FOURIER-Transform Technik (siehe Abschnitt 1.3.1.5) basierenden Spektrometern. Durch Nutzung der bereits in Abschnitt 1.3.1.4 genannten Vorteile wird die vierte Potenz-Beziehung (Gleichung 1.14) zwischen Lichtquelle und Bandenintensität teilweise ausgeglichen. Ein FT-RAMAN-Spektrometer wurde auch für die Messungen in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Bei allen bisher genannten Vorteilen der FT-RAMAN-Spektroskopie liegt einer der Nachteile dieser Technik in der im nahen IR-Bereich zur Verfügung stehenden Halbleiterdetektoren (InGaAs oder Ge). Diese weisen nicht die gleiche Empfindlichkeit auf, wie z. B. Photomultiplier und CCD (*Charge Coupled Device*)-Detektoren.

1.3.2.1 Schwingungsspektroskopie an Bakterien

Bereits um 1911 erkannte COBLENTZ als Erster, dass sich biologisches Material mit Hilfe der IR-Spektroskopie charakterisieren lässt. In den 50er und 60er Jahren wurden die Möglichkeiten der IR-Spektroskopie zur Differenzierung und Identifizierung von Bakterien [35, 36], aber auch von anderen biologischen Materialien intensiv erforscht. Allerdings wurde in einem kritischen Übersichtsartikel zu diesem Thema [37] die Schlussfolgerung gezogen, dass die Methode, obwohl die Bakterien individuelle, Fingerabdruck-ähnliche IR-Spektren liefern, nicht als praxisrelevant gelten kann, da das Verfahren zu zeitaufwendig und unpraktisch ist. Dabei ist es vor allem auf die Nachteile der dispersiven IR-Technik, wie geringe Empfindlichkeit, hoher Zeitbedarf für die Aufnahme der Spektren und schlechte Reproduzierbarkeit, zurückzuführen, dass Publikationen über die Einsatzmöglichkeiten der IR-Spektroskopie in der Mikrobiologie immer weniger wurden. In den 60er und 70er Jahren wurden solche Untersuchungen ganz eingestellt. Erst die Entwicklung der modernen interferometrischen IR-Spektroskopie in Verbindung mit leistungsstarken, preisgünstigen PCs, die neuen Algorithmen der multivariaten statistischen Analyse und die neuen Mustererkennungsverfahren (wie z. B. künstliche neuronale Netze), hatten zur Folge, dass die IR-Spektroskopie als Methode zur Charakterisierung von mikrobiellen Proben wieder aufgenommen wurde [38–40].

Im Vergleich zur FTIR-Spektroskopie, ist der RAMAN-Spektroskopie im Bereich der biologischen Wissenschaften nur eine geringe Aufmerksamkeit zuteil geworden. In den 50er und in den frühen 60er Jahren lieferte die RAMAN-Spektroskopie zwar ähnliche Informationen wie die IR-Spektroskopie, allerdings bei höheren Kosten, geringerer Geschwindigkeit und einer erheblich geringeren Empfindlichkeit. Zudem waren die Spektrometer relativ kompliziert. Erst mit den Entwicklungen in der Lasertechnologie setzte dann auch eine zunehmende Anwendung der RAMAN-Spektroskopie in biologischen Studien ein. Es dauerte allerdings bis in die späten 80er Jahre bis die ersten Publikationen in der Literatur erschienen, in denen erstmals über das Potenzial der RAMAN-Spektroskopie zur Identifizierung von Mikroorganismen berichtet wurde [41, 42].

Die Tatsache, dass schwingungsspektroskopische Verfahren Informationen über die molekulare Zusammensetzung von Zellen liefern, ohne diese dabei zu zerstören, eröffnet neue Möglichkeiten zur Untersuchung von Mikroorganismen. Es werden keine Labels, Farbstoffe oder andere Kontrastverstärkende exogene Verbindungen benötigt. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 erläutert wurde, sind die RAMAN- und die IR-Spektroskopie komplementäre Techniken, da die RAMAN- und die IR-Banden durch unterschiedliche Mechanismen verbunden mit verschiedenen Auswahlregeln zustande kommen. Zusammen liefern beide Techniken einen vollständigen und sehr spezifischen schwingungsspektroskopischen *Fingerabdruck* von mikrobiellen Zellen.

In der letzten Dekade haben RAMAN-, SERS³ (*Surface Enhanced Raman Scatte-*

³Bei SERS macht man sich den Effekt der oberflächenverstärkten RAMAN-Streuung zunutze. Hierbei werden Substanzen spektroskopiert, die an rauen Metalloberflächen oder Metallpartikeln aus Silber oder Gold angelagert sind. Die beobachteten Verstärkungsfaktoren liegen bei etwa 10^3 bis 10^6 [43].

ring) und FTIR-Techniken ein Empfindlichkeitsniveau erreicht, das es möglich macht, sogar Spektren von einzelnen lebenden Zellen zu erhalten. Daraus folgt, dass auch geringe Mengen an Mikroorganismen ausreichen (aus praktischen Erwägungen in der Größenordnung von 1000 Zellen), um spektroskopische Daten zu erhalten.

1.3.2.2 Spektrale Zuordnungen von mikrobiellen Zellbestandteilen

Die RAMAN- und IR-Banden, die sich in dem Bereich von ~ 600 bis 4000 cm^{-1} beobachten lassen, werden hauptsächlich von den Normalschwingungen bestimmt und können häufig bestimmten funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Generell kann man IR-Spektren in zwei Bereiche unterteilen: Oberhalb von 1400 cm^{-1} befinden sich Absorptionsbanden, die einzelnen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können, während der spektrale Bereich unterhalb von 1400 cm^{-1} von den Absorptionen der so genannten Gerüstschwingungen des Moleküls dominiert wird und das Molekül als Ganzes charakterisiert und deshalb quasi seinen Fingerabdruck darstellt. Dieser Bereich, der viele Banden enthält, wird deshalb auch als *fingerprint*-Region bezeichnet. Aufgrund der Komplexität der Banden in diesem Bereich, ist eine exakte Zuordnung bzw. Interpretation in der *fingerprint*-Region nur selten möglich. Andererseits ist es gerade dieses komplexe Bandenmuster, das die Einzigartigkeit jedes Spektrums bedingt, so dass sich diese Region potenziell für Identifizierungszwecke eignet.

Die meisten Ansätze, die schwingungsspektroskopischen Spektren von biologischen Molekülen zu interpretieren und dabei spezifische Banden Molekülstrukturen bzw. funktionellen Gruppen zuzuordnen, basieren auf der Analyse von bekannten Strukturen, der Normalkoordinatenanalyse oder Isotopenaustauschexperimenten. Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate sind immer, allerdings in unterschiedlichen Mengen, und in einer großen Vielfalt, in mikrobiellen Zellen vorhanden. In Abbildung 1.4 auf der nächsten Seite sind repräsentative FTIR- und FT-RAMAN-Spektren dieser Hauptbestandteile von mikrobiellen Zellen dargestellt. Um einen direkten Vergleich zwischen diesen einzelnen Zellkomponenten und den Spektren einer mikrobiellen Zelle anstellen zu können, sind in Abbildung 1.5 auf Seite 27 typische FTIR- und FT-RAMAN-Spektren, die von intakten dehydrierten Zellen von *E. faecalis* stammen, dargestellt. Das FTIR-Spektrum von *E. faecalis* zeigt die für biologische Materialien übliche breite Bandenstruktur, die darauf zurückzuführen ist, dass die mikrobiellen Infrarotspektren eine komplexe Überlagerung der vielen verschiedenen Schwingungen aller zellulären Bestandteile, wie DNS, RNS, Proteine, Membran- und Zellwandbestandteile, sind. Um diese breite, überlagerte Bandenstruktur besser aufzulösen, kann man beispielsweise die ersten bzw. zweiten Ableitungen der Originalspektren berechnen. Die Anwendung solcher auflösungsverstärkenden Technik lässt eine Beurteilung der Bandenfeinstruktur zu. Hingegen weist das entsprechende RAMAN-Spektrum (siehe Abbildung 1.5) ohne Anwendung solcher Techniken eine viel besser aufgelöste Bandenstruktur auf. Im Allgemeinen können etwa 50 bis 70 spektrale Eigenschaften in IR- und RAMAN-Spektren von mikrobiellen Zellen aufgelöst werden, die dann die Basis für die Zuordnung von funktionellen Gruppen, bekannten chemischen Verbindungen, Teilstrukturen oder auch verschiedenen Kon-

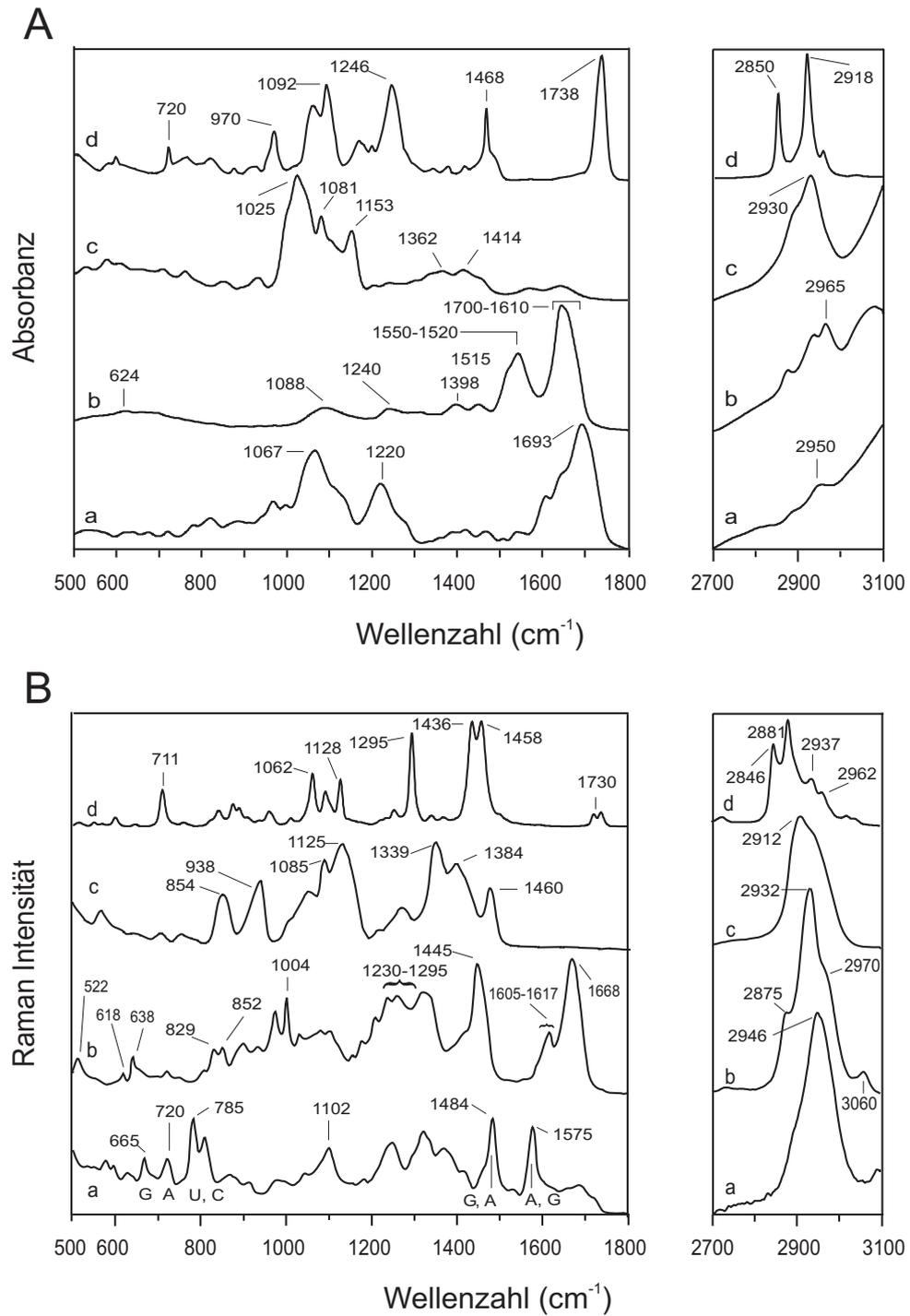


Abbildung 1.4: (A) FTIR- und (B) FT-RAMAN-Spektren der makromolekularen Hauptbestandteile, die in biologischen Proben vorhanden sind. (a) Nucleinsäuren, RNA aus Hefe; (b) Proteine, Ribonuclease A; (c) Kohlenhydrate, Glykogen; (d) Lipide, D- α -Dipalmitoylphosphatidylcholin (synthetisch).

1.3 Schwingungsspektroskopische Techniken

formationszuständen von bestimmten Makromolekülen, die in der Zelle vorkommen, liefern. Vorläufige Bandenzuordnungen basierend auf einem systematischen Vergleich von auflösungsverstärkten mikrobiellen IR- und RAMAN-Spektren mit den bekannten Hauptbestandteilen, die konstant in intakten Zellen vorkommen, sind in den Tabellen 1.2 auf der nächsten Seite und 1.3 auf Seite 29 aufgelistet.

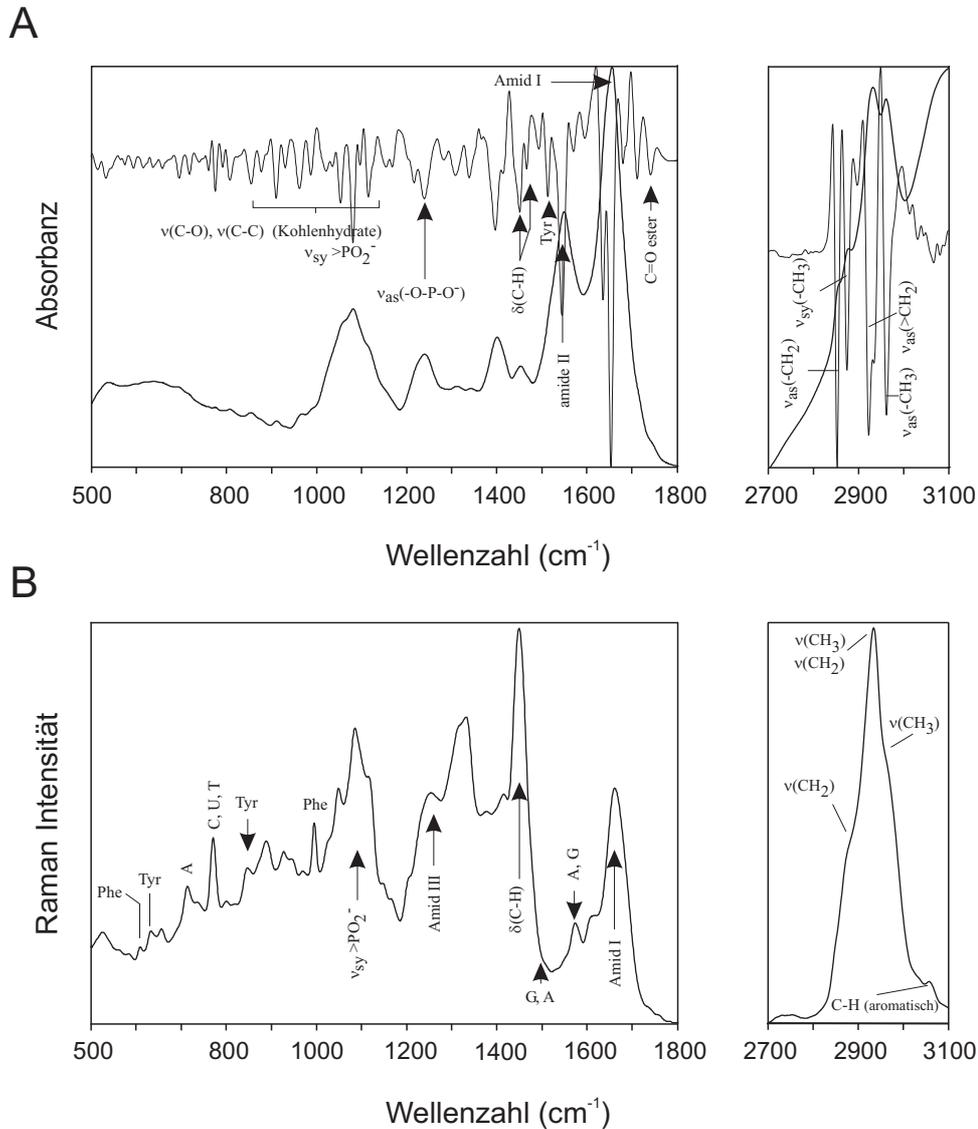


Abbildung 1.5: Bandenzuordnung für die Hauptbestandteile, die in den FTIR- und FT-RAMAN-Spektren von intakten mikrobiellen Zellen (*E. faecalis*) auftreten. (A) Unten: Originalspektrum einer getrockneten Bakterienfilmprobe von *E. faecalis* Zellen. Oben: zweite Ableitung des Spektrums. (B) FT-RAMAN-Spektrum von *E. faecalis* (ν : Valenzschwingung; δ : Deformationsschwingung).

1 Einleitung

Tabelle 1.2: Zuordnung von einigen Banden, die häufig in den RAMAN-Spektren von biologischen Proben auftreten

| Frequenz (cm^{-1}) | Bandenzuordnung ^a |
|-------------------------------|--|
| 3059 | (C=C-H) _(arom.) (s) |
| 2975 | CH ₃ (s) |
| 2935 | CH ₃ und CH ₂ (s) |
| 2870-2890 | CH ₂ (s) |
| 1735 | C=O ester (s) |
| 1650-1680 | Amid I |
| 1614 | Tyr |
| 1606 | Phe |
| 1575 | G,A ring (s) |
| 1440-1460 | C-H ₂ (def) |
| 1295 | CH ₂ (def) |
| 1230-1295 | Amid III |
| 1129 | C-N und C-C (s) |
| 1102 | PO ₂ ⁻ |
| 1098 | CC-Gerüst und COC (s) von glykosidischen Bindungen |
| 1085 | C-O (s) |
| 1061 | C-N und C-C (s) |
| 1004 | Phenylalanin |
| 897 | COC (s) |
| 858 | CC (s), COC 1,4 glykosidische Bindungen |
| 852 | „buried“Tyr |
| 829 | „exposed“Tyr |
| 785 | C, U Ringstreck |
| 720 | A |
| 665 | G |
| 640 | Tyr (Gerüst) |
| 620 | Phe (Gerüst) |
| 540 | COC glykosidische ring (def) |
| 520-540 | S-S (s) |

^a(s) Streck-, (def) Deformationsschwingung; (sym) symmetrische Schwingung

Die FT-RAMAN-Spektren von *E. faecium* Stämmen werden vor allem von den prominenten C-H-Streckschwingungsbanden im Bereich von 2700 bis 3000 cm^{-1} bestimmt, während die komplementäre C-H-Deformationsbande bei 1450 cm^{-1} auftritt. Diese Banden lassen sich auf die CH₃, CH₂ und C-H funktionellen Gruppen, die in Lipiden und Aminosäureseitenketten von Proteinen und Kohlenhydraten auftreten, zurückführen. Der Bereich von 1200 bis 1800 cm^{-1} wird von der Amid-I-Bande (um 1660 cm^{-1}) und der Amid-III-Bande (um 1250 cm^{-1}) der Proteine dominiert. Dabei kommt die Amid-I-Bande hauptsächlich durch eine C=O-Streckschwingung zustan-

1.3 Schwingungsspektroskopische Techniken

de, während an der Amid-III-Bande vor allem die C–N–Streckschwingung gekoppelt mit einer N–H-Deformationsschwingung beteiligt ist. Zusätzlich zeigen die RAMAN-Spektren eine Serie von sehr gut aufgelösten Banden, die sich den RNA/DNA-Nukleotid-Basenschwingungen von G, T, A, C und U und den Aminosäureseitengruppenschwingungen von Trp, Tyr und Phe von Proteinen zuordnen lassen [44–46].

Tabelle 1.3: Zuordnung von einigen Banden, die häufig in den FTIR-Spektren von biologischen Proben auftreten

| Frequenz (cm^{-1}) | Bandenzuordnung ^{a,b} |
|-------------------------------|--|
| 3500 | O–H (s) der Hydroxylgruppen |
| 3200 | N–H (s) Amid A in Proteinen |
| 2955 | C–H (s, asym) der CH_3 in Fettsäuren |
| 2930 | C–H (s, asym) der CH_2 |
| 2918 | C–H (s, asym) der CH_2 in Fettsäuren |
| 2898 | C–H (s) der C–H in Methingruppen |
| 2870 | C–H (s, sym) der CH_3 |
| 2850 | C–H (s, sym) der CH_2 in Fettsäuren |
| 1740 | C=O (s) Ester |
| 1715 | C=O (s) von Carbonsäuren |
| 1680-1715 | C=O in Nukleinsäuren |
| 1695, 1685, 1675 | Amid I-Banden (antiparallele β -Faltblättern und β -turns) |
| 1655 | Amid I der α -helikalen Strukturen |
| 1637 | Amid I der β -Faltblattstrukturen |
| 1550-1520 | Amid II |
| 1515 | Tyr Bande |
| 1468 | C–H def von CH_2 |
| 1400 | C=O (s, sym) von COO^- |
| 1310-1240 | Amid III-Banden in Proteinen |
| 1250-1220 | P=O (s, asym) PO_2^- von Phosphodiestern |
| 1200-900 | C–O, C–C (s), C–O–H, C–O–C (def) von Kohlenhydraten |
| 1090-1085 | P=O (s, sym) von PO_2^- |
| 720 | C–H rocking der CH_2 |
| 900-700 | „Fingerprintbereich“ |

^aPeakfrequenzen wurden abgeleitet aus den zweiten Ableitungen und FOURIER-dekonvolvierten Spektren [45–48]

^b(s) Streck-, (def) Deformationsschwingungen; (sym) symmetrische Schwingung; (asym) asymmetrische Schwingung

Die Berechnung der zweiten Ableitung des FTIR-Spektrums von *E. faecalis* (siehe Abbildung 1.5 A) ermöglicht eine Beurteilung der Bandenfeinstruktur, die zu der folgenden vorläufigen Interpretation führt [2]:

- Die Region zwischen 3100 und 4000 cm^{-1} wird von den ziemlich breiten spek-

1 Einleitung

tralen Banden, die aus den -OH und N-H Streckschwingungsmoden (Amid A $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ und Amid B $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$) resultieren, dominiert.

- In dem Spektralbereich von 2800 bis 3000 cm^{-1} , der auch als „Fettsäurebereich“ (W_1) bezeichnet wird [40], absorbieren vor allem die asymmetrischen und die symmetrischen C-H Streckschwingungen der CH_3 und CH_2 -Gruppen, d.h. dieser Bereich wird von den spektralen Eigenschaften der Fettsäureketten der verschiedenen amphiphilen Membranbestandteile (z. B. Phospholipide) und von einigen Aminosäureseitengruppenschwingungen bestimmt. Die komplementären Deformationsschwingungen dieser funktionellen Gruppen treten in dem Spektralbereich von 1350 bis 1470 cm^{-1} auf. Eher selten tritt bei $\sim 3015\text{ cm}^{-1}$ eine Bande auf, die aus der Streckschwingung der =C-H-Doppelbindung von ungesättigten Fettsäuren resultiert.
- Der Bereich zwischen 1800 bis 1500 cm^{-1} (W_2 : „Amidbereich“) wird von den konformationssensitiven Amid-I und Amid-II-Banden zellulärer Proteine und Peptide bestimmt. In diesem Spektralbereich lassen sich zwei charakteristische, sehr intensive Banden beobachten: im Amid-I Bereich tritt eine Bande auf (1600 bis 1700 cm^{-1}), die von der Absorption der Carbonyle der Amidgruppen im Proteingerüst bestimmt ist. Weiterhin ist eine Bande um 1550 cm^{-1} auszumachen, die man auch als Amid-II Bereich bezeichnet. Diese Bande resultiert hauptsächlich aus der Absorption von N-H- Biegeschwingungen. Diese Amid-I- und Amid-II-Banden sind von allen Banden in Bakterienspektren am intensivsten. Der Amidbereich spiegelt die Sekundärstrukturelemente (z. B. α -Helix, β -Faltblatt, etc.) aller zellulären Proteine wider, die miteinander koppeln und sich aufgrund der großen Halbwertsbreite der einzelnen Banden überlappen, so dass immer breite unstrukturierte Banden resultieren. Das Auftreten einer charakteristischen Bande um 1740 cm^{-1} ist ein Indiz für das Vorliegen von Esterverbindungen, da diese Absorptionsbande von den C=O-Streckschwingungen von funktionellen Estergruppen in Lipiden herrührt. Des Weiteren treten in diesem Bereich Absorptionen auf, die durch Nukleinssäuren bedingt sind, basierend auf den C=O-, C=N- und C=C-Streckschwingungen von DNA oder RNA-heterozyklischen Basenstrukturen. Jedoch ist der Zellmasseanteil von DNA und RNA ($\sim 10\%$, siehe Tabelle 1.1 auf Seite 1) im Vergleich zu den zellulären Proteinen zu gering, so dass sie von der intensiven Amid-I-Bande meist überlagert werden. Schwache Banden werden von den Aminosäureseitengruppen hervorgerufen: Banden um $\sim 1498\text{ cm}^{-1}$ sind Phenylalanin, um 1516 cm^{-1} Tyrosin und zwischen 1585 und 1570 cm^{-1} Aspartat und Glutamat Carboxylat-Streckschwingungen zuzuweisen.
- Komplexe Absorptionsbanden treten im spektralen Bereich von 1300 bis 1500 cm^{-1} (W_3 : „gemischter Bereich“) auf, die in erster Linie von den Deformationsschwingungen der CH_2 - und CH_3 -Gruppen von Lipiden und Proteinen hervorgerufen werden.

- Die charakteristische breite Absorptionsbande um 1230 cm^{-1} rührt von der Überlagerung von verschiedenen asymmetrischen Streckschwingungen der P=O-Doppelbindungen von Phosphodiestergruppen her, die in den Phosphatgruppen der Nukleotide, der Phospholipide der Membran und in den phosphatenthaltenden Polysacchariden der Zellwandpolymere, wie den in GRAM-positiven Bakterien vorhandenen Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren, vorkommen.
- Der so genannte „Polysaccharidbereich“ (W_4) wird neben den symmetrischen Streckschwingungen der P O₂-Gruppen der Nukleinsäuren auch von komplexen Bandenmustern, die durch C–O–C- und C–O–P-Streckschwingungen von verschiedenen Oligo- und Polysacchariden bedingt sind, dominiert.
- Der Spektralbereich von 900 bis 700 cm^{-1} , der so genannte *Fingerprint*bereich (W_5) zeigt eine Vielfalt von schwachen, aber sehr charakteristischen spektralen Banden, die ein breite diesem Bereich zugrunde liegende Bandenkontur, überlagern. Diese Region kann schwache Banden, die von den aromatischen Ringschwingungen von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und den verschiedenen Nukleotiden herrührt, aufweisen. Ansonsten kann man von einigen Ausnahmen abgesehen, wie z. B. der auf die Pendelschwingungen der CH₂-Gruppen der Fettsäureketten („rocking“) zurückzuführenden Bande bei 720 cm^{-1} , kaum Bandenzuordnungen treffen. Da sich diese nicht zuzuordnenden charakteristischen Bandenmuster aber als sehr geeignet für die Identifizierung von Mikroorganismen erwiesen habe, wird dieser Bereich auch als „wahrer“ *Fingerprint*bereich bezeichnet [49].

1.4 Auswerteverfahren zur Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen

Unterschiedliche Mikroorganismen weisen auch unterschiedliche biochemische Zusammensetzungen auf, die sich in den FTIR- und RAMAN-Spektren widerspiegeln. Zu Charakterisierungs- und Identifizierungszwecken von Mikroorganismen, basierend auf schwingungsspektroskopischen Techniken, ist es nicht notwendig alle Bandenintensitäten, Frequenzen und Halbwertsbreiten auszuwerten und spezifischen molekularen Bestandteilen zuzuordnen. Die Spektren können in ihrer Gesamtheit als spektroskopische Fingerabdrücke der untersuchten Proben ausgewertet werden. Chemometrische oder multivariate statistische Auswerteverfahren können in einer ähnlichen Art und Weise wie Mustererkennungsverfahren für die Analyse des gesamten, komplexen Spektrums genutzt werden. Es lassen sich zwei Kategorien in den chemometrischen Verfahren, die zur mikrobiellen Identifizierung Anwendung finden, unterscheiden. Die erste Kategorie umfasst die so genannten nicht-überwachten oder objektiven Klassifizierungsmethoden. Solchen Verfahren liegt zugrunde, dass die natürlich auftretenden Gruppierungen im Datensatz ermittelt werden, ohne dass es einer *a priori* Kenntnis der Probenidentität bedarf. Zu den nicht-überwachten Verfahren zählen u. a. die Hauptkomponentenanalyse (PCA *principal component analysis*) und die hierarchische

1 Einleitung

Clusteranalyse. Die Bestimmung der Zugehörigkeit einer unbekannt Probe zu einer von diesen in einem Datensatz natürlich auftretenden Gruppen, erfolgt dann auf der Grundlage der objektiven Kriterien dieser Gruppenzugehörigkeit. Daher ermöglicht die Einbeziehung von gut definierten Proben (z. B. Referenzstämmen) in das Analysenschema, Gruppen, basierend auf den Eigenschaften/Identitäten dieser Referenzproben zu identifizieren.

Zur zweiten Kategorie der chemometrischen Verfahren, die bei der Identifizierung von Mikroorganismen Anwendung finden, zählen die so genannten überwachten Klassifizierungsverfahren, d. h. dass die Probenidentität *a priori* bekannt sein muss. Mit einem Datensatz bestehend aus gut definierten Proben wird ein Modell trainiert, das es dann ermöglicht, die Identität von unbekannt Proben vorherzusagen. Zu den überwachten Verfahren zählen z. B. die lineare Diskriminanzanalyse und künstliche neuronale Netze (ANN *artificial neural networks*). Die Verfahren, die in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.4.1 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse hat die Klassifizierung von Objekten zum Ziel, d. h. ausgehend von einer Distanzmatrix und einem Distanzmaß sollen die Objekte in Gruppen bzw. Klassen (Cluster) unterteilt werden. Dabei sollen die Gruppierungen derart erfolgen, dass Objekte derselben Klasse auch möglichst ähnliche Eigenschaften aufweisen, während Objekte, die verschiedenen Klassen zugeordnet werden, sich in ihren Eigenschaften möglichst weit voneinander unterscheiden. Clusteranalysen haben meist einen approximativen Charakter, da aus praktischen Erwägungen Klassifikationen erfolgen, die lokal optimal sind. Man unterscheidet zwischen hierarchischen und nicht-hierarchischen Verfahren. Innerhalb der hierarchischen Analyseverfahren findet eine weitere Einteilung zwischen divisiven (abbauenden) und agglomerativen (aufbauenden) Methoden statt. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich agglomerative, hierarchische Clusteranalysen verwendet wurden, wird nur auf diese Verfahren näher eingegangen. Prinzipiell erfolgt eine hierarchische Clusteranalyse nach folgendem Schema:

- In der nullten Stufe gibt es n zu klassifizierende Objekte, von denen anhand eines bestimmten Ähnlichkeitsmaßes die zwei ähnlichsten zu einem Cluster zusammengefasst werden.
- Daraufhin werden die Abstände zwischen diesem Cluster und allen verbleibenden Objekten ($n-2$) neu berechnet.
- Jetzt folgt erneut die Berechnung der zwei einander ähnlichsten Objekte, die wiederum in einem Cluster zusammengefasst werden.
- Dieser Prozess wird solange wiederholt bis alle Objekte in einem Cluster zusammengefasst sind.

Das Ergebnis einer Clusteranalyse wird in Form eines Dendrogrammes dargestellt. Die verschiedenen Clusteranalysemethoden (Algorithmen) unterscheiden sich in der

1.4 Auswerteverfahren zur Charakterisierung und Identifizierung

Art und Weise wie das Distanzmaß, d. h. der Abstand zwischen den Objekten berechnet wird. Zu den häufig verwendeten Distanzmaßen zählen Korrelationskoeffizienten, euklidische Distanzen und MAHALANOBIS-Distanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Clusteranalysen auf der Basis des PEARSONSchen Produktmoment-Korrelationskoeffizienten berechnet. Die Berechnung der spektralen Distanz zwischen zwei Spektren ergibt sich wie folgt

$$r_{y_1 y_2} = \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_{1i} y_{2i} \right) - n \overline{y_1} \overline{y_2}}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n y_{1i}^2 - n \overline{y_1}^2 \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^n y_{2i}^2 - n \overline{y_2}^2 \right)}}, \quad (1.15)$$

wobei y_{1i} und y_{2i} die Absorptionswerte bzw. Extinktionswerte der beiden Spektren und n die Anzahl der Datenpunkte im untersuchten Wellenzahlbereich bezeichnen, während $\overline{y_1}$ und $\overline{y_2}$ den arithmetischen Mittelwerten von y_1 und y_2 über alle Wellenzahlen entsprechen.

Aus dem PEARSONSchen Produktmoment-Korrelationskoeffizienten $r_{y_1 y_2}$ lässt sich dann die so genannte spektrale Distanz $D_{y_1 y_2}$ nach folgender Gleichung berechnen

$$D_{y_1 y_2} = (1 - r_{y_1 y_2}) \cdot 1000 \quad (1.16)$$

Die spektrale Distanz D , die oft auch als D -Wert bezeichnet wird, ist ein dimensionsloses Distanzmaß, das Werte zwischen 0 und 2000 annehmen kann. Für identische Spektren (oder Spektralbereiche) ist der Wert 0, für vollständig unkorrelierte Spektren 1000 und für vollständig negativ korrelierte Spektren 2000. Für die Einbeziehung von mehreren Spektralbereichen zur Berechnung der spektralen Distanz kann eine gewichtete spektrale Gesamtdistanz wie folgt bestimmt werden

$$\overline{D}_{y_1 y_2} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(D_{y_1 y_2 i} \cdot w_i \right)}{\sum_{i=1}^n w_i}, \quad (1.17)$$

$D_{y_1 y_2 i}$ ist dabei die spektrale Distanz für das i te spektrale Fenster und w_i der entsprechende Gewichtungsfaktor.

Für die Untersuchung von n Spektren lässt sich der Vergleich aller Spektren untereinander (Kreuzkorrelation) in Form einer symmetrischen Distanzmatrix D zusammenfassen

$$D = \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{1n} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{2n} \\ d_{31} & d_{32} & \dots & d_{3n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ d_{n1} & d_{n2} & \dots & d_{nn} \end{pmatrix} \quad (1.18)$$

1 Einleitung

Aus Gleichung 1.15 auf der vorherigen Seite folgt, dass d_{ij} die spektrale Distanz zwischen dem i ten und dem j ten Spektrum ist. Weiterhin gilt $d_{ij} = d_{ji}$ und $d_{ij} = 0$ für $i = j$.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die verschiedenen zur Clusteranalyse verwendeten Algorithmen in der Art und Weise wie die Distanzwerte zwischen dem neu konstruierten Cluster und allen anderen Clustern berechnet werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich *average linkage* und der WARDsche Algorithmus verwendet [50]. Die *average linkage*-Methode berechnet die Distanz des neuen Clusters d_{qi}^{neu} (der die alten Cluster q und p enthält) zu jedem Cluster i über eine ungewichtete Mittelwertbildung

$$d_{qi}^{neu} = \frac{1}{2} \cdot (d_{pi} + d_{qi}). \quad (1.19)$$

Hingegen erfolgt die Berechnung der Cluster nach der Methode von WARD gemäß

$$d_{qi}^{neu} = \frac{1}{n + n_i} \cdot \left[(n_p + n_i) d_{pi} + (n_q + n_i) d_{qi} - n_i d_{pq} \right] \quad (1.20)$$

Bei der WARD-Methode werden die Cluster fusioniert, deren Fusion den geringsten Zuwachs zu einem Heterogenitätsmaß bedeutet. Das Heterogenitätsmaß berechnet sich aus der Summe der quadrierten Abstände aller Elemente eines Clusters zum Zentrum dieses Clusters. Dieses Verfahren resultiert in sehr dichten Clustern.

1.4.2 Faktoranalyse

Die Faktoranalyse hat zum Ziel, die essentiellen Informationen eines Datensatzes zu extrahieren und dabei redundante Informationen zu entfernen, um auf diese Weise eine effektive Datenreduktion zu gewährleisten. Wie bei allen multivariaten Verfahren, betrachtet man bei der Faktoranalyse zunächst die Objekte (in diesem Fall die IR-Spektren) als Vektoren, die einen multidimensionalen Raum aufspannen, der so viele Dimensionen besitzt wie Merkmale (in diesem Fall sind das die Absorbanzwerte bei bestimmten Wellenzahlen) in diesem Datensatz vorhanden sind. Dieser multidimensionale Raum, den man sich auch als multidimensionale Datenmatrix (mit m Merkmalsvariablen) vorstellen kann, wird nun derart rotiert, dass der Massenschwerpunkt der Daten den Ursprung eines neuen ebenfalls multidimensionalen Koordinatensystems (mit m Faktoren) bildet, in dem die orthogonalen Achsen (Faktoren) ihrem Informationsgehalt nach angeordnet sind, d. h. sie sind varianzgewichtet. Die Faktorisierung beinhaltet dann die Darstellung der Spektren als Linearkombinationen der so genannten Faktorspektren.

$$a = T_{1a} \cdot f_1 + T_{2a} \cdot f_2 + T_{3a} \cdot f_3 + \dots T_{sa} \cdot f_s, \quad (1.21)$$

wobei der Vektor a das Spektrum a repräsentiert und f_1, f_2, \dots, f_s die s Faktorspektren. Die Koeffizienten $T_{1a}, T_{2a}, \dots, T_{sa}$, hingegen werden in der Faktoranalyse als Ladungen (*loadings*) bezeichnet. Die Faktorspektren sind orthogonal zueinander. Als Maß für die Signifikanz, die ein Faktor für die Reproduktion eines Spektrums besitzt, dienen

die Eigenwerte (hier die Faktorladungen). Die Faktorspektren werden gemäß ihrer Eigenwerte angeordnet, d. h. nach ihrem Informationsgehalt, so dass die ersten Faktorspektren den größten Anteil der Varianz repräsentieren, während die Varianz der nachfolgenden Faktorspektren immer mehr abnimmt. Die Faktorspektren, die keine interspektrale Varianz, sondern nur noch Rauschen repräsentieren, kann man entweder visuell (diese Methode ist bei großen Datensätzen impraktikabel) oder mit statistischen Tests, z. B. mit Hilfe des so genannten KAISER-Kriteriums, ermitteln [51]. Weiterführende Berechnungen können dann ausschließlich mit den vergleichsweise wenigen, relevanten Faktorspektren mit nur geringem Informationsverlust durchgeführt werden. Daher werden diese Verfahren häufig zur Datenreduktion eingesetzt. Maßgeblich bei diesem Datenreduktionsverfahren ist der Versuch, näherungsweise gültige lineare Abhängigkeiten zwischen Variablen zu entdecken. Ziel der Faktoranalyse ist es, mit möglichst geringem Informationsverlust eine kleine Anzahl von Linearkombinationen (Faktorladungen) aus einer Menge von Variablen zu bilden. Oft liefert eine kleine Zahl von Faktorladungen nahezu dieselben Informationen für z. B. Plots oder Clusteranalysen wie die Originaldaten. Basierend auf den Faktorspektren können dann mittels einer Clusteranalyse die Distanzen im s -dimensionalen Faktorraum berechnet und dann in Form eines Dendrogramms visualisiert werden.

1.4.3 Künstliche Neuronale Netze (ANN's)

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten nicht-überwachten Klassifizierungsmethoden handelt es sich bei künstlichen neuronalen Netzen um überwachte, selbstlernende Systeme. Künstliche neuronale Netze sind informationsverarbeitende Systeme, die aus einer großen Anzahl einfacher Einheiten (Neuronen) bestehen, die sich Informationen in Form der Aktivierung der Neuronen über gerichtete Verbindungen zusenden [52]. Neuronale Netze weisen eine grobe Analogie zu biologischen Systemen (Nervenzelle) auf. Diese Analogie zeigt sich im Aufbau der Neuronen, die in Anlehnung an das biologische Vorbild aus folgenden vier Komponenten bestehen

- einem Zellkern, der den Prozess steuert
- den Dendriten, die die Eingabe des Netzes (Eingangssignale) in die Zelle aufsummieren
- einem Axon, welches die Ausgabe (Reiz) einer Zelle nach außen weiterleitet, sich verzweigt und mit den Dendriten nachfolgender Neuronen in Kontakt tritt
- Synapsen (die in der Nervenzelle chemische Botenstoffe für die Reizaufnahme besitzen), die das Bindeglied zwischen den Dendriten der einzelnen Neuronen darstellen. Die Stärke der Synapsen wird meist durch einen numerischen Wert, das so genannte Verbindungsgewicht dargestellt.

Die Bestandteile neuronaler Netze umfassen im einzelnen:

1. *Zellen (Neuronen)*. Für diese Zellen werden über verschiedene Eingänge benachbarter Zellverbindungen Eingangsgewichte berechnet, so dass es je nach Errei-

1 Einleitung

chen eines bestimmten Schwellenwertes zur Informationsweiterleitung kommt. Diese Zellen beinhalten folgende mathematische Funktionen:

- Der *Aktivierungszustand* $a_i(t)$, der den Grad der Aktivierung der Zelle wiedergibt.
- Die *Aktivierungsfunktion* f_{act} , die angibt, wie sich ein neuer Aktivierungszustand $a_j(t+1)$ aus dem vorherigen Zustand des Neurons j mit der alten Aktivierung $a_j(t)$ und der Netzeingabe $net_j(t)$ entwickelt.

$$a_j(t+1) = f_{act}(a_j(t), net_j(t), \theta_j), \quad (1.22)$$

wobei $\theta_j(t)$ der Schwellenwert des Neurons j ist.

- Die *Ausgabefunktion* d_{out} , die die Ausgabe der Zelle aus ihrer Aktivierung bestimmt

$$o_j = f_{out}[a_j] \quad (1.23)$$

2. Das *Verbindungsnetzwerk* der Zellen bestimmt die Art und Weise wie die Architektur des Netzes aufgebaut ist. Dabei wird das Gewicht der Verbindung von Zelle i nach Zelle j durch w_{ij} bezeichnet. Die Matrix der Verbindungen aller Zellen wird mit W beschrieben.
3. Die *Propagierungsfunktion* fasst alle Eingänge gewichtet zusammen, d. h. sie gibt an, wie sich die Netzeingabe eines Neurons aus den Angaben der anderen Neuronen und den Verbindungsgewichten berechnet

$$net_j(t) = \sum_{i=1} o_i(t)w_{ij}. \quad (1.24)$$

4. Das *Lernverfahren* bezeichnet einen Algorithmus, nach dem das neuronale Netz lernt, für eine vorgegebene Eingabe eine gewünschte Ausgabe zu produzieren. Beim Lernen wird die Stärke der Verbindungen als Resultat der wiederholten Präsentation von Trainingsmustern modifiziert. Ziel des Lernprozesses ist es, den Fehler zwischen der erwarteten Ausgabe und der tatsächlichen Ausgabe für alle Trainingsmuster zu minimieren.

Eine wesentliche Eigenschaft von neuronalen Netze, die sie ebenfalls in Analogie zum biologischen Vorbild besitzen, ist ihre Lernfähigkeit, also die Fähigkeit eine Aufgabe, wie z. B. ein Klassifizierungsproblem, selbstständig anhand von Trainingsbeispielen, zu lernen. Aufgrund ihrer Lernfähigkeit haben neuronale Netze in der vorliegenden Arbeit mehrfach Anwendung gefunden, z. B. zur Differenzierung von Antibiotika-sensitiven und -resistenten Stämmen oder zur Klassifizierung von Mikroorganismen. Weitere Stärken der neuronalen Netze liegen in ihren assoziativen Fähigkeiten (Analogien bilden, Ähnlichkeiten finden), Generalisierungsfähigkeiten, Unempfindlichkeit gegenüber Störungen und Defekten, Vertrautheit mit häufigen Ereignissen, und der Geschwindigkeit. Bei allen Vorteilen, die mit neuronalen Netzen

1.4 Auswerteverfahren zur Charakterisierung und Identifizierung

assoziiert sind, existieren auch Nachteile dieses Verfahrens. Ein häufig auftretender Fehler bei der Verwendung von neuronalen Netzen liegt in dem so genannten Übertrainieren (*overtraining*) eines Netzes, d. h. dass ein solches Netz zwar ein perfektes Ergebnis für den Trainingsdatensatz liefert, hingegen die Klassifizierung von unbekanntem Daten zu einem schlechten Ergebnis führt. Darüber hinaus werden neuronale Netze oft auch als *black boxes* bezeichnet, da es sehr schwierig ist, die Informationen, die für die Klassifizierung bzw. Identifizierung wichtig sind, zu extrahieren.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich so genannte voll verknüpfte *feedforward*-Netze bestehend aus drei Schichten verwendet. Bei dieser Netzwerktopologie erfolgt für jede Eingabe an das Netz die Berechnung der zugehörigen Ausgabe in Vorwärtsrichtung von der Eingabeschicht (*input layer*) über die verdeckte Schicht (*hidden layer*) zur Ausgabeschicht (*output layer*). Es existieren nur Verbindungen von einer Schicht zur nächsten, innerhalb einer Schicht gibt es keine Verbindung, wobei die ankommenden Informationen an den Synapsen gewichtet werden. Die Synapsenstärken, die die Verbindungen zwischen den Neuronen bewerten, werden durch das Training des *multilayer perceptrons*, einer der wichtigsten Funktionen zum Training von *feedforward*-Netzwerken, so eingestellt, dass es eine Menge von Eingaben auf die gewünschten Sollausgaben (Ausgabeschicht) abbildet. Das dabei am häufigsten verwendete Lernverfahren erfordert Berechnungen von der Ausgabeschicht zurück; daher rührt der Name dieses Trainingsalgorithmus: *backpropagation*. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Form dieses Lernverfahrens, nämlich der *resilient propagation* (*Rprop*) verwendet, bei dem es sich um eine Weiterentwicklung des *backpropagation*-Algorithmus handelt [53]. Die Änderung des Gewichtes Δw_{ij} erfolgt nach

$$\Delta w_{ij} = \eta o_i \delta_j \quad (1.25)$$

wobei η eine Konstante (Lernrate) bezeichnet und δ_j der Differenz zwischen der aktuellen Aktivierung a_j und der erwarteten Aktivierung t_j (*teaching input*) entspricht.

Obwohl das *multilayer-perceptron* bereits in verschiedenen Bereichen erfolgreich eingesetzt wird, kann für eine gegebene Anwendung noch nicht vorhergesagt werden, ob eine neuronale Lösung existiert und falls ja, welche Architektur, d. h. Anzahl und Größe der Schichten optimal ist. Dies muss empirisch ermittelt werden, wobei vor allem die endgültige Validierung eines neuronalen Netzes mittels eines Testdatensatzes, der ausschließlich 100 % unabhängige Daten enthalten sollte, darüber entscheidet, ob ein solches Modell verlässlich zu Klassifizierungszwecken eingesetzt werden kann.

1 Einleitung