

Tyll Utesch

Es schneit. Herr Meier schaute aus dem Fenster und erkennt im diffusen Abendlicht nur eine Wand aus tausenden Schneeflocken, die vor dem Eingangsportal des Krankenhauses herabfallen. Er erinnerte sich an seine Kindheit, als er noch im Schnee gespielt und den herabfallenden Schneeflocken zugeschaut hatte. Jede Schneeflocke sah im hellen Licht der Laterne vor dem Haus seiner Eltern so einzigartig aus. Das lag wohl an der Intensität des Lichtes und an der besseren Wahrnehmung der Reflexion an den Schneeflocken, und wohl auch an den besseren Augen damals, analysiert der pensionierte Physiker. Herr Meier freute sich gerade über seine selbsterlangte Erkenntnis, als die Tür aufsprang und eine Schwester aufgebracht auf der Schwelle stand. „Herr Meier, es tut mir leid aber wir müssen Sie verlegen. Wir haben eine gefährliche Infektion festgestellt...“

Das Krankenhaus ist mit einem Antibiotika-resistenten Keim befallen, der zu der Familie *Enterococcus faecium* gehört. Solch ein Befall von resistenten Keimen muss in Krankenhäusern schnell erkannt werden, da immungeschwächte Patienten sonst schnell in Gefahr geraten, wenn auch kein Antibiotikum mehr Wirkung zeigt. Gängige Methoden wie die PCR-Analyse zur Identifizierung solcher Bakterien können daher in einigen Fällen zu lange dauern. Eine neuere Methode der Anwendung einer Raman-spektroskopischen Analyse der kontaminierten Probe erlangt nun aufgrund ihrer zügigen Auswertbarkeit große Bedeutung.

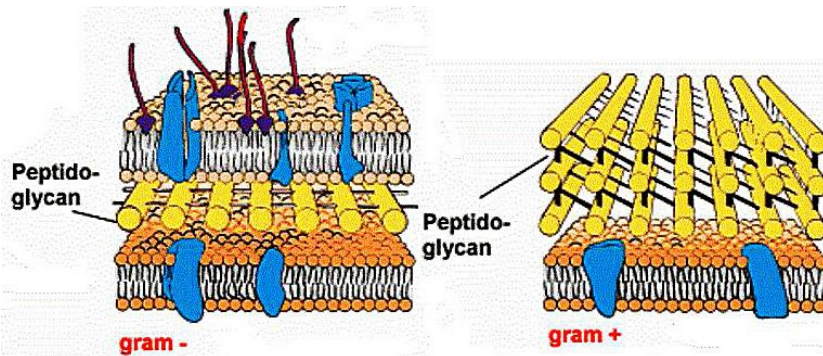


Abbildung 1: Zellwandstruktur von Gram-positiven bzw. -negativen Bakterien [3]

Im Allgemeinen beruht die Spektroskopie auf der Wechselwirkung von untersuchter Materie und eingesetzter Strahlung. Die einfachste spektroskopische Methode, die klassische Linsenmikroskopie, stößt aufgrund der geringen Auflösung schnell an ihre Grenzen und kann bestenfalls nur die Bakterien in ihrer Gestalt identifizieren. Komplexere Methoden, bei denen die

Auswertung mit Computern und nicht mit dem menschlichen Auge erfolgt, sind hierfür besser geeignet, scheitern jedoch oftmals am Lösungsmittel Wasser und erlauben es meistens nicht, an der vitalen Zelle zu messen. So scheidet die Infrarot Spektroskopie aus, da hierbei die Wassermoleküle die eingesetzte Strahlung so stark absorbieren, dass keine Messung an den Bakterien möglich ist.

Um zu verstehen, wie mit Hilfe der Raman-Spektroskopie Bakterien identifiziert werden können, muss man sich Bakterien als ein Gebilde aus vielen Molekülen vorstellen. Diese Moleküle bilden die Organellen des Bakteriums, die wiederum das gesamte Bakterium charakterisieren. Somit kann die Raman-Spektroskopie durch das Auslesen der

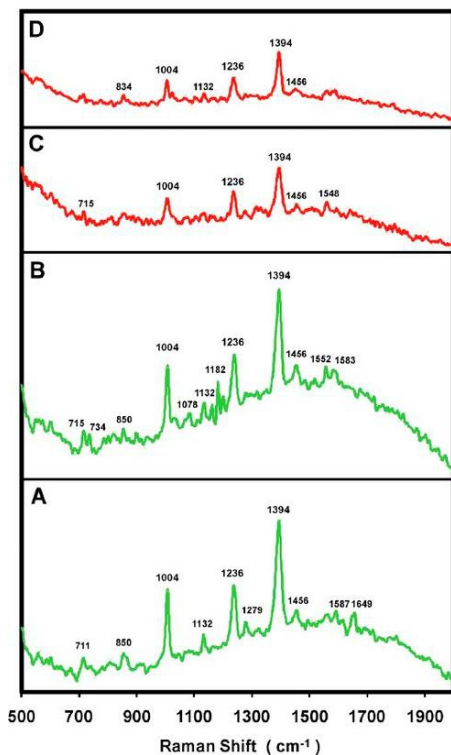


Abbildung 2: Raman-Spektren von Gram-positiven (A,B) und Gram-negativen (C,D) Bakterien [4]

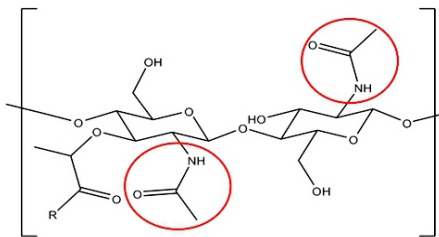


Abbildung 3: Baueinheit des Peptidoglykans, N-Acetylglucosamin glykosidisch verknüpft mit N-Acetylmuraminsäure

Kombination und der Mengenverhältnisse bestimmter detektierbarer Moleküle den jeweiligen Bakterienstamm bestimmen. Jeder Bakterienstamm besitzt somit einen eigenen Fingerabdruck. Wichtige detektierbare Moleküle innerhalb eines Bakteriums sind z.B. die aromatischen Aminosäuren der Proteine, Nukleinsäurebestandteile sowie Membranlipide oder Kohlenhydrate. Da jedoch das eingestrahlte Licht zuerst auf die Oberfläche des Bakteriums trifft und dort streut, dient die Zellwand als wichtigste Sonde zur Bakteriencharakterisierung.

Somit ist eine Unterscheidung von Gram-positiven zu Gram-negativen Bakterien mit der Raman-Spektroskopie sehr gut möglich. Hierbei dient die Peptidoglykanschicht (PGL), die bei Gram-positiven deutlich ausgeprägter in der Zellwand vorliegt [3] (Abb. 1) als Raman-aktiver Bereich. Anhand der Intensitäten der Raman-Streuung kann nun auf die relative Menge der Moleküle geschlossen und so zwischen den Bakterienspezies differenziert werden. In Abbildung 2 kann man gut erkennen, wie die Peptidoglykanschicht der Gram-positiven Bakterien im Spektrum (A, B) sichtbar wird. Die Spektren C und D zeigen Gram-negative Bakterien. Im Bereich $>1000 \text{ cm}^{-1}$ der Spektren sieht man die Intensitäten der Molekülbewegungen (Schwingungen, Rotationen) der N-Acetyl-Gruppen innerhalb der PGL.

In Abbildung 3 sind die wichtigsten Bausteine im PGL (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure) in ihrer glykosidischen Verknüpfung dargestellt.

Die anderen Peaks zeigen weitere Bestandteile der Bakterien an. Somit werden bei 1394 cm^{-1} z.B. Deformations- und Valenzschwingungen der Carboxylgruppen von Aminosäuren sichtbar, oder bei 1004 cm^{-1} die C-C Ringschwingung innerhalb von Polysacchariden [4].

Leider weisen nicht alle Bakterienspezies so eindeutige Unterschiede auf, da ihre molekulare Zusammensetzung im Normalfall eher ähnlich ist. Zusätzlich liegen in einer Probe auch

viele verschiedene Bakterien gleichzeitig vor, sodass sich die Spektren überlagern und computergestützte Auswertungen erfordern [5].“

Wenn aber mehrere Bakterienspezies in der Probe vorliegen, wie kann man dann sicher sein, dass man nicht ein Mischspektrum aus einer Vielzahl von Spezies erhält und somit gar nicht differenzieren kann?

Mittels der Micro-Raman-Spektroskopie können manuell oder automatisch einzelne Bakterien mit einem präzisen Laser erfasst und vermessen werden, sodass spezifische Spektren von einzelnen Bakterien erstellt werden können [6]. Desweiteren werden die oftmals sehr geringen Intensitäten der Raman-Streuung durch den Einsatz einer oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie erhöht. Mit Hilfe von metallischen Oberflächen (Gold/Silberpartikel) innerhalb der Probe können hierbei die Ergebnisse deutlich verbessert werden [4].

Die einfachere Methode der Infrarot-Spektroskopie, die zusätzlich auch noch deutlich höhere Intensitäten liefert, scheitert bei einer „vitalen Messung“ am vorhandenen Wasser.

Wasser absorbiert Infrarotlicht so stark, dass eine Messung nur schwer zu realisieren ist und so die Bakterien aufwendig getrocknet werden müssen. [7] Die Raman-Spektroskopie unterliegt nicht dieser Einschränkung und bleibt damit am günstigsten für schnelle Anwendungen vor Ort ist.

Herr Meier saß nun schon im Krankenwagen auf dem Weg ins nächstliegende Krankenhaus und schaute aus dem kleinen Krankenwagenfenster am Heck. „Diese neuartige Anwendung der Raman-Spektroskopie ist ja wirklich faszinierend. Obwohl die Bakterien oftmals schädlich für uns Menschen sind, werden sie nun so milde behandelt und fast wie bei einer Volkszählung erfasst. Jedes Bakterium hat sozusagen einen Ausweis in Form eines Raman-Spektrums“ scherzte Herr Meier. Er sah draußen die Schneeflocken, die durch das Bremslicht des Rettungswagens angeleuchtet wurden, und dachte an die bestrahlten Bakterien.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Biochemie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald verfasst (s. Woche 23).</p> <p>Der Autor, Tyll Utesch, ist Studierender im 2. Semester des Studiengangs Master Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Sabine Müller (E-Mail: smueller@uni-greifswald.de).</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Warum bedient man sich nicht der Infrarot-Spektroskopie, um gefährliche Bakterien im Krankenhaus zu identifizieren?</p>
Literatur:	
<p>[1] Atkins, P.W.; de Paula, J. (2006): <i>Physikalische Chemie</i>. 4. Auflage. Wiley-VCH.</p>	
<p>[2] Schwedt, G. (2001): <i>Taschenatlas der Analytik</i>. 2. Auflage. Thieme Verlag.</p>	
<p>[3] http://www.biokurs.de/skripten/bilder/bakt3.gif, 30.05.2013</p>	
<p>[4] Pucek, R.; Ranc, V.; Kvittek, L.; Panacek, A.; Zboril, R.; Kolar, M. (2012): <i>Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation</i>. <i>Analyst</i> 137, S. 2866-2870.</p>	
<p>[5] Schmid, U. (2009): <i>Entwicklung chemometrischer Methoden für die Klassifikation von Bakterien mittels Mikro-Raman-Spektroskopie</i>. Dissertation an der C.-W. Universität zu Braunschweig.</p>	
<p>[6] Krause, M.; Rösch, P.; Radt, B. Popp, J. (2008): <i>Localizing and Identifying Living Bacteria in an Abiotic Environment by a Combination of Raman and Fluorescence Microscopy</i>. <i>Anal. Chem.</i> 80, S. 8568-8575.</p>	
<p>[7] Bolwien, C. (2011): <i>Rasterfahndung mittels Raman-Spektroskopie. Just-in-time Sterilitätskontrolle von Transplantaten</i> BioRaman. IPM-Fraunhofer Institut.</p>	