

V. Becker*, H. Nerenz**, A. Schrader**, B. Becker*

Einsatz der Durchflusszytometrie zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von Phytoalexinen und Pflanzenextrakten

■ Einleitung

Die Durchflusszytometrie findet bereits seit langer Zeit ein weites Einsatzspektrum z.B. in der Onkologie, der Blutanalytik und der toxikologischen Forschung (1). Auch in der Lebensmittelbranche findet die Durchflusszytometrie zunehmend Anwendung. In Getränken und Molkereiprodukten (2) aber auch im Wasser (3) ermöglicht die Methode einen schnellen Hinweis auf mikrobiologische Belastung. Unterschiedliche Farbstoffe,

Gensonden und Antikörper werden im Rahmen der spezifischen durchflusszytometrischen Nachweisverfahren eingesetzt (4, 5).

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Konservierungsstoffen in Kosmetika werden bislang mittels Konservierungsbelastungstest nach Ph. Eu. 7, 2011 durchgeführt. Der Konservierungsbelastungstest ist eine kulturelle Methode zur Untersuchung von kosmetischen Produkten auf ausreichende Konservierung, die langwierig, arbeitsaufwändig

und fehlerbehaftet ist. Zudem sind beträchtliche Mengen Wirkstoff für die Untersuchungsansätze erforderlich. Phytoalexine und Pflanzenextrakte sind teilweise nur in kleinen Mengen verfügbar und sehr kostspielig. Vor dem Hintergrund wurde die Durchflusszytometrie als schnelles Screeningverfahren zur Wirkstoffprüfung eingesetzt.

■ Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine laser-gestützte Methode zur Untersuchung einzelner Zellen einer Population anhand von Lichtstreuungs- und Fluoreszenzsignalen. Dabei werden suspendierte Einzelzellen in einem Hüllstrom an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt und die dabei erzeugten Signale detektiert. Durch eine elektronische Verarbeitung der Daten ist es möglich tausende Zellen pro Sekunde zu untersuchen und so innerhalb kürzester Zeit ein Gesamtbild der Zellpopulation zu ermitteln. Das benötigte Probenvolumen ist sehr klein, da weniger als 1 ml Probe in die Messung eingesetzt wird. Im Rahmen der Untersuchung von Phytoalexinen und Pflanzenwirkstoffen bedeutet das nur den Einsatz kleinster Mengen der oftmals kostspieligen Substanzen. Bei der Untersuchung der Zellen werden sowohl das Streulicht, welches eine Aussage über die Größe und Granularität der Zellen zulässt, als auch verschiedene Fluoreszenzen, je nach Vorbehandlung der Zellen, im Durchflusszytometer detektiert. Zur Färbung oder Markierung der Zellen sind eine Vielzahl von Farbstoffen, Gensonden und Antikörper auf

Abstract

Die steigende Nachfrage nach natürlichen Konservierungshelfern für kosmetische Formulierungen erhöht auch die Nachfrage nach Methoden zur Wirksamkeitsprüfung antimikrobieller Stoffe. Vorwiegend werden Konservierungsbelastungstests (nach Ph. Eu. 7, 2011) zur Wirkstoffprüfung eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass ausgewählte Phytoalexine und Pflanzenextrakte nur in kleinen Mengen erhältlich und sehr kostspielig sind, wurde im AiF-Forschungsprojekt IGF 17182N »Phytoalexine als multifunktionelle pflanzliche Wirkstoffe für die Kosmetik« die Durchflusszytometrie als Screeningmethode zur Ermittlung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Phytoalexinen und Pflanzenextrakten eingesetzt. Durch eine Lebend/Tot-Färbung der Mikroorganismen kann der Einfluss von Wirkstoffen nach definierten Einwirkzeiten auf eine Zellpopulation ermittelt werden. Dabei ist das eingesetzte Probenvolumen gering. Anhand der ermittelten Screeningergebnisse konnte die Anzahl der Wirkstoffprüfungen im Produkt (Konservierungsbelastungstests) minimiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Durchflusszytometrie als schnelle Screeningmethode zur Wirkstoffprüfung geeignet ist.

Untersuchungsparameter	Farbstoff/Gensonde/Antikörper	Bindung an	Quelle
Gesamtkeimzahl	Thiazole Orange, SYBR Green	DNA	<i>Prest et al., 2013 (6)</i>
Lebend/Tot-Färbung	Propidium Iodide + Thiazole Orange	DNA	<i>Schmidt et al., 2005 (4)</i>
DNA-Gehalt	Propidium Iodide, DAPI	DNA	<i>Müller, 2007 (7)</i>
Identifizierung von Mikroorganismen	sequenzspezifische DNA-Sonden	DNA	<i>Rothe, 2007 (8)</i>
Identifizierung, biochemische/ biophysikalische Eigenschaften	fluoreszenzmarkierte Antikörper	Oberflächenproteine, DNA	<i>Füchslin et al., 2010 (9)</i>
paralleler Nachweis versch. Bakterien in einer Probe	fluoreszente Nano-partikel gekoppelt mit Aptameren	Oberflächenproteine, DNA, RNA	<i>Duan et al., 2013 (10)</i>
Analyse des intrazelluläre pH-Wert	SNARF-4F, 9-Aminoacridin	Gene der Proteinexpression	<i>Valkonen et al., 2013 (11)</i>

Tabelle 1 Ausgewählte Farbstoffe/Gensonden/Antikörper, die im Rahmen durchflusszytometrischer Untersuchungen eingesetzt werden.

dem Markt (Tabelle 1). Die Fluoreszenzfarbstoffe Propidium Iodide (PI) und Thiazole Orange (TO) werden z. B. eingesetzt um nachzuweisen, ob eine Zelle lebt oder tot ist. Sie dringen je nach Schädigung der Zellwand unterschiedlich stark in die Zellen ein und geben nach Anregung mit Laserlicht ein spezifisches Signal ab. Die Ergebnisse können in unterschiedlichen Darstellungsformen angezeigt werden. Weit verbreitet ist der DotPlot (Abb. 1). Hier werden beispielsweise die detektierten Fluoreszenzsignale der unterschiedlich gefärbten Zellen gegeneinander aufgetragen, wodurch sich der Anteil lebender, geschädigter und toter Zellen in einer Population darstellt.

■ Wirkstoffprüfung mittels Durchflusszytometrie

Im Rahmen des Forschungsvorhabens »Phytoalexine als multifunktionelle pflanzliche Wirkstoffe für die Kosmetik« wurde die Durchflusszytometrie zur Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Phytoalexinen und Pflanzenwirkstoffen eingesetzt. Vorteil der Screeningmethode ist neben dem Einsatz geringer Wirkstoffmengen ihre schnelle, einfache, objektive und standardisierbare Durchführung (4). Die zellschädigende Wirkung der ausgewählten Substanzen wird auf Einzelzellebene geprüft. Untersucht wurde die antimikrobielle

Wirkung der Phytoalexine Chlorogensäure, Hinokitiol und Genistein sowie der Pflanzenextrakte von Echinacea, der Artischocke, der Bartflechte und des Ingwers. Die genannten Reinsubstanzen wurden in einer Endkonzentration von 0,1 % und 1 % in die Untersuchungsansätze (Bakteriensuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit Reinsubstanzen der Wirkstoffe) eingearbeitet. Getestet wurde die Wirkung im Zeitraum von 48 Stunden auf *Staphylococcus aureus* (grampositiv), *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativ) sowie auf die Hefe *Candida albicans*. *Prest et al. (6)* stellten bei ihren durchflusszytometrischen Untersuchungen von Trinkwasser fest, dass ein definiertes Färbeprotokoll für reproduzierbare Ergebnisse entscheidend ist. Aus diesem Grund wurden alle Mikroorganismen unter standardisierten Bedingungen kultiviert und nach einem definierten Protokoll vorbereitet. Aus den Untersuchungsansätzen wurden nach 15 Minuten bzw. nach 1, 6, 24 und 48 Stunden Aliquots entnommen, die Zellen mit den Farbstoffen TO und PI angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Begleitend wurden Versuchsansätze der Bakteriensuspensionen ohne Zugabe von Phytoalexinen und Pflanzenextrakten zum Nachweis der generellen Zellvitalität während des Untersuchungszeitraumes mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein Phenoxyethanol-Parabengemisch eingesetzt. Seine antimikrobielle Wirkung ist in der Kosmetik bereits bekannt und wurde in der Literatur hinlänglich beschrieben (12).

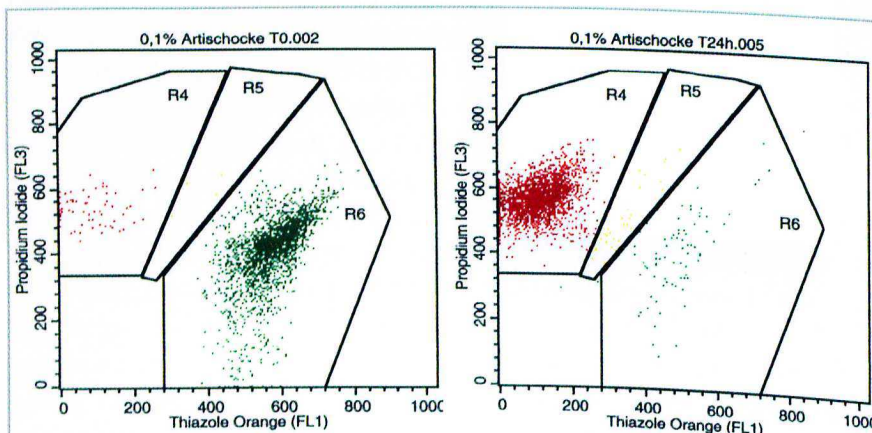


Abb. 1 DotPlot einer durchflusszytometrischen Messung (Lebend/Tot-Färbung) einer *S. epidermidis* Population nach Einfluss eines 0,1 %igen Artischockenextraktes. Die Punktwolken zeigen die Anteile der lebenden (R6), geschädigten (R5) und toten (R4) Zellen der Population links ohne Einwirkzeit des 0,1 %igen Artischockenextraktes, rechts nach einer 24stündigen Einwirkzeit des 0,1 %igen Artischockenextraktes.

PFLANZLICHE KONSERVIERUNGSHELFER

	Chlorogensäure		Hinokitiol		Genistein		Phenoxyethanol-Parabengemisch
	0,1 %	1 %	0,1 %	1 %	0,1 %	1 %	1 %
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+

Tabelle 2 Durchflusszytometrische Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Phytoalexinen (Endkonzentration im Versuchsansatz: 0,1 % und 1 %) auf Mikroorganismen im Untersuchungszeitraum von 48 Stunden. (+: Reduktion der Zellzahl lebender Zellen um > 50 %, -: keine bis geringe Reduktion der Zellzahl lebender Zellen)

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass die antibakterielle Wirkung der Phytoalexine und Pflanzenextrakte auf ausgewählte Bakterien und Hefen durch spezifische Färbung sehr gut zu beobachten ist. Die Wirkstoffe verursachten in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Konzentration eine unterschiedliche keimspezifische Schädigung. Das Phytoalexin Genistein (Tabelle 2) zeigte keine antimikrobielle

Wirkung auf die ausgewählten Mikroorganismen im Untersuchungszeitraum von 48 Stunden. Chlorogensäure bedingte in hohen Konzentrationen (1 %) eine Reduktion der Lebendzellzahl sowohl auf gramnegative als auch auf grampositive Bakterien. Hinokitiol schädigt bereits in 0,1%iger Konzentration ausgewählte gramnegative Bakterien. Durch alle eingesetzten Phytoalexine wurde die Hefe *C. albicans* nicht geschädigt. Das Phenoxye-

thanol-Parabengemisch (Positivkontrolle) führte in 1%iger Konzentration zu einer Schädigung aller Bakterien und der Hefe. Die Pflanzenextrakte (Tabelle 3) der Artischocke (enthält Chlorogensäure), der Bartflechte, des Ingwers und Echinacea zeigten keine Wirkung auf *C. albicans*. Mit Ausnahme des Echinaceaextraktes zeigten alle Pflanzenextrakte bereits in 0,1%iger Konzentration eine deutliche Wirkung auf *S. epidermidis*.

	Artischocken-extrakt		Bartflechten-extrakt		Ingwerextrakt		Echinacea-extrakt		Phenoxyethanol-Parabengemisch
	0,1 %	1 %	0,1 %	1 %	0,1 %	1 %	0,1 %	1 %	1 %
<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabelle 3 Durchflusszytometrische Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten (Endkonzentration im Versuchsansatz: 0,1 % und 1 %) auf Mikroorganismen im Untersuchungszeitraum von 48 Stunden. (+: Reduktion der Zellzahl lebender Zellen um > 50 %, -: keine bis geringe Reduktion der Zellzahl lebender Zellen)

■ Fazit

Die vorliegende Untersuchung macht deutlich, dass die durchflusszytometrische Wirkstoffprüfung auf zellulärer Ebene einen schnellen Hinweis über die antibakteriellen Eigenschaften von Phytoalexinen und Pflanzenextrakten ermöglicht. Das durchflusszytometrische Screening erlaubt nach definierter Färbung die direkte Beobachtung der Zellschädigung. Vor allem die Untersuchung kostspieliger oder nur in geringen Mengen zur Verfügung stehender Wirkstoffe wird so ermöglicht. Die Anzahl der zeit- und arbeitsaufwendigen Konservierungsbelastungstests kann durch die Screeningergebnisse erheblich reduziert und die Kosten beim Einsatz teurer Wirkstoffe deutlich verringert werden. Nur die im Screening identifizierten, antimikrobiell wirksamen Substanzen können anschließend im Konservierungsbelastungstest auf ihre Wirksamkeit im Produkt überprüft werden. Während der antimikrobielle Einfluss der unterschiedlichen Wirkstoffe auf verschiedene Bakterien und die Hefe *C. albicans* durchflusszytometrisch detektierbar war, konnte der Stoffeinfluss auf den Schimmelpilz *A. niger* auf Grund der Zellvariabilität durchflusszytometrisch nicht zuverlässig ermittelt werden. Das IGF-Vorhaben 17182N der Forschungsgemeinschaft für die kosmetische Industrie e. V. wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Referenzen

- (1) Shapiro, H. M.: Practical Flow Cytometry 1988, 2nd ed., Alan R. Liss, Inc., NY.
- (2) Narendja, F.: Anwendungsbereich Molekularbiologischer Analytik, Vorstudie zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Analytik im Zusammenhang mit der Qualitätssicherung von Produkten. Report REP-0228, 2009, Wien.
- (3) Egli, T.; Berney, M.; Hammes, F.; Fuchslin, H. P.: Neue Methoden der Trinkwasserhygiene. Eawag News 65d 2008, 20-23.
- (4) Schmidt, M., Hourfar, M. K., Nicol, S.-B., Spengler, H.-P., Montag, T., Seifried, E.: FACS technology used in a new rapid bacterial detection method. Transfusion Medicine 2006, 16, 355-361.
- (5) Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J.: Novel flow cytometric screening method for bacterial contamination of red blood cells: a proof-of-principle evaluation. Transfusion 2013, 54, 900-909.
- (6) Prest, E. I., Hammes, F., Köttsch, S., van Loosdrecht, M. C. M., Vrouwenvelder, J. S.: Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reducible flow cytometric method. Water Research 2013, 47, 7131-7142.
- (7) Müller S.: Review – Modes of cytometric bacterial DNA pattern: a tool for pursuing growth. Cell Proliferation 2007, 40, 621-639.
- (8) Rothe, S.: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. –Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. 2007, 27-70, Karger Verlag, Basel.
- (9) Fuchslin, H. P., Köttsch, S., Keserue, H.-A., Egli, T.: Rapid and quantitative detection of

Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry. Cytometry Part A 2010, 77A, 3, 264-274.

- (10) Duan, N., Wu, S., Yu, Y., Ma, X., Xia, Y., Chen, X., Huang, Y., Wang, Z.: A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella Typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels. Analytica Chimica Acta 2013, 804, 151-158.
- (11) Valkonen, M., Majzita, D., Penttilä, M., Benčina, M.: Noninvasive High-Throughput Single-Cell Analysis of the Intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* by Ratiometric Flow Cytometry. Applied and Environmental Microbiology 2013, 79, 7179-7187.
- (12) Scholtyssek, R.: Deutsche Gesellschaft für wissenschaftliche und angewandte Kosmetik e. V., Handbuch der Konservierungsmittel. Verlag für chemische Industrie, 1995, Ziolkowsky GmbH, Augsburg.

Anschriften der Verfasser:

*Verena Becker
Barbara Becker
Hochschule Ostwestfalen-Lippe
ILT.NRW
Institut für Lebensmitteltechnologie,
Fachbereich Life Science Technologies
Liebigstr. 87, 32657 Lemgo
E-Mail: verena.becker@hs-owl.de
E-Mail: barbara.becker@hs-owl.de

**Heiko Nerenz
Andreas Schrader
Wissenschaftliches Institut der FKI e. V.
Max-Planck-Str. 6 , 37603 Holzminden
E-Mail: webmaster@fki-ev.de