

V. Diskussion

1. Molekularbiologische Studien zur Pathogenität und Ökologie von *Legionella pneumophila*

Die *lly*-Determinante ist an die Degradation aromatischer Aminosäuren beteiligt.

Der Kenntnisstand über Genprodukte von *L. pneumophila*, die einen Einfluß auf das Überleben des Keimes in der Umwelt haben, ist sehr begrenzt. Das *Lly*-Protein kann jedoch als solch ein Fitnessfaktor bezeichnet werden. Es ist für die dunkelbraune Pigmentierung der Legionellen verantwortlich und vermittelt hierdurch eine hochgradige Resistenz gegenüber gewöhnlichem Licht (Steinert et al., 1995). Die *Lly*-Proteinsequenz weist hohe Homologien zum MelA-Protein von *S. colwelliana* (Fuqua et al., 1991), zur *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) von *Pseudomonas* sp. (Rueschi et al., 1992) und zum *Vibrio vulnificus* Hämolysin VIIY (Chang et al., 1997) auf. Auch MelA und VIIY sind hochgradig homolog zu HPPD-like Proteinen. Diese Homologien, wie auch die Beobachtung einer verstärkten Pigmentproduktion bei zusätzlicher Tyrosingabe in *lly*-positiven Stämmen (Vickers und Yu, 1984; Wintermeyer et al., 1991), legen die Vermutung nahe, daß das *Lly*-Protein in den Degradationsprozeß aromatischer Aminosäuren involviert ist. In Analogie zu den beschriebenen Stoffwechselwegen des Tyrosin-Metabolismus' von *P. aeruginosa* (Yabuuchi et al., 1972), *S. colwelliana* (Coon et al., 1994) und *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994) ist auch für *Legionella* die Generierung von Pyomelanin ausgehend von Tyrosin über *p*-Hydroxyphenylpyruvat und Homogentisat (HGA) zu postulieren. Der daraus abgeleitete Syntheseweg ist in Abb. 46 dargestellt.

Die Nukleotidsequenz des *lly*-Locus mehrerer *L. pneumophila*-Stämme besitzt hochkonservierte Strukturen, die für die Relevanz dieser genetischen Determinante sprechen.

Im Vergleich zu *lly*-negativen *L. pneumophila*- und rekombinanten *E. coli*-Stämmen konnte in den Kulturüberständen von *lly*-positiven Stämmen auf Basis einer Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) HGA nachgewiesen werden. Das Legiolysin-Gen kodiert somit für ein Protein mit *p*-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase - Aktivität. Die für diesen Stoffwechselweg erforderlichen Tyrosin-Transaminasen finden bei Bakterien ubiquitäre Verbreitung, wodurch die Pigment-Generierung in *lly*-positiven rekombinanten *E. coli* erklärt werden kann.

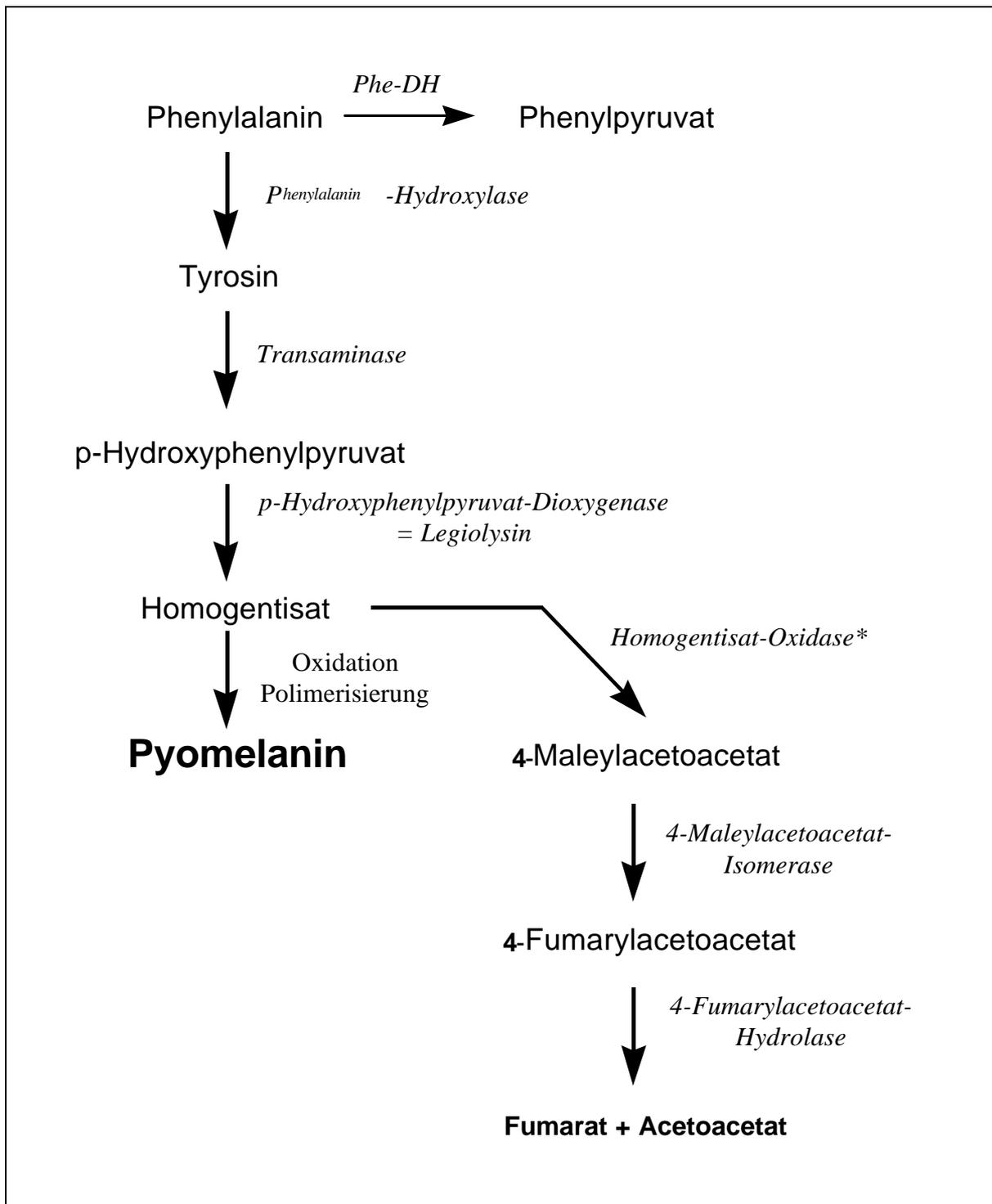


Abb. 46) Stoffwechselweg zur Synthese des *Legionella*-Pyomelanins über die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Des weiteren ist in der Abbildung die Transformation von Homogentisat zu Fumarat und Acetoacetat dargestellt. Das Sternchen markiert den enzymatischen Block der Homogentisat-Oxidase bei der Alkaptonurie.

In dem Melanogenese-Prozeß kommt dabei dem Homogentisat besondere Bedeutung zu, das vermutlich durch Autooxidation und spontane Polymerisierung das melaninartige Pigment aufbaut. Eine ähnliche biochemische Reaktion ist bei Patienten zu beobachten, die unter der Stoffwechselkrankheit Alkaptonurie leiden (Ruzafa et al., 1994). Durch den Block der HGA-Oxidase kann die oxidative Spaltung des aromatischen Ringes nicht mehr erfolgen. Dies hat zur Folge, daß sich akkumuliertes HGA in vielen Geweben intra- und extrazellulär einlagert und u. a. als sog. „Schwarzharn“ ausgeschieden wird. Als Spätfolge ist die Ausbildung von ochronotisch bedingter Arthritis mit exzessiven Bindegewebsschädigungen durch Sauerstoffradikale anzusehen (Hegedus und Nayak, 1994). Als weiterer angeborener Fehler im gleichen Katabolismus aromatischer Aminosäuren beim Menschen ist die Unfähigkeit zur Umsetzung von Phenylalanin zu Tyrosin zu nennen. Diese Defizienz führt zum Krankheitsbild der Phenylketonurie (Scazzoccio et al., 1997).

Die Analyse der DNA-Sequenz zeigte für das benachbarte, upstream liegende Offene Leseraster (ORF 1) von *lly* auf Proteinebene hochgradige Homologien zu 3-O-Methyltransferasen von *Synechocystis sp.* (Nakamura et al., 1998), *Petroselinum crispum* (Schmitt et al., 1991) und *Streptomyces mycarofaciens* (Hara und Hutchinson, 1992). Methyltransferasen diesen Typs sind häufig am Sekundärstoffwechsel beteiligt. Die Funktion des von ORF 1 kodierenden Enzyms bleibt jedoch spekulativ. Denkbar wäre die Methylierung eines Catecholintermediates während der Pyomelaninsynthese. Die Methylierung könnte dabei über den Verbleib des Pigments im Zytoplasma oder deren Ausschleusung ins Periplasma entscheiden (Borovansky, 1996), und damit einen Einfluß auf die funktionalen Eigenschaften des Pigments ausüben. Das ORF 1 (654 bp) und das *lly*-Gen (1044 bp) werden offensichtlich gemeinsam transkribiert, da die Sequenzanalyse lediglich eine putative Promotorstruktur vor dem ORF 1 aufzeigte. Zudem konnte die Länge des zugehörigen RNA-Transkripts im Northern-Blot mit ungefähr 1,8 kb bestimmt werden. Die Methyltransferase scheint jedoch für die Expression von Legiolysin nicht essentiell zu sein, wie Klonierungsstudien von rekombinanten *E. coli*-Klonen aufzeigen konnten (Wintermeyer et al., 1991).

Das zweite, upstream liegende Leseraster (ORF 2) kodiert für ein Enzym mit Homologien zu NAD(P)⁺-abhängigen Dehydrogenasen von *Thermoactinomyces intermedius* (Takada et al., 1991), *Chlamydia trachomatis* (Stephens et al., 1998), *Bacillus stearothermophilus* (Nagata et

al., 1988) und *B. sphericus* (Okazaki et al., 1988). Das von ORF 2 transkribierte Protein scheint jedoch nicht in die Regulation der Expression von Legiolysin einzugreifen, da diesem Gen ein eigener Promotor vorgelagert ist. Zudem hat das Fehlen dieses ORFs in verschiedenen rekombinanten *E. coli*-Klonen keinen Einfluß auf die Expression von Legiolysin (Wintermeyer et al., 1991). Die Homologien zu mehreren Phenylalanin-Dehydrogenasen unterstreicht die Annahme, daß die gesamte *lly*-Region in die Degradation aromatischer Aminosäuren involviert ist.

Downstream von *lly* konnte ein weiteres Leseraster mit Bezug zur Legiolysin-Determinante identifiziert werden. Das ORF 6 kodiert für ein Protein mit signifikanter Homologie zur Fumarylacetoacetat-Hydrolase aus *Emericella nidulans*. Dieses Enzym katalysiert mit der hydrolytischen Spaltung von 4-Fumarylacetoacetat zu Fumarat und Acetoacetat den letzten Schritt im Degradationsprozeß aromatischer Aminosäuren. Größe und Leserichtung des ORF 6 lassen im Vergleich zum Gen aus *E. nidulans* auf eine Erweiterung im C-terminalen Bereich schließen, der jedoch außerhalb des klonierten *PstI*-Fragments von pEWL 1 liegt. Möglicherweise befinden sich downstream dieses Leserasters noch weitere Gene, die im Tyrosin-Katabolismus von Bedeutung sind. Die Homologie zur Fumarylacetoacetat-Hydrolase impliziert neben der Pigmentgenerierung die Möglichkeit einer weiteren Degradation von Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat.

Die letzten 3 Enzyme des Stoffwechselweges, Homogentisat Oxygenase, Maleylacetoacetat Isomerase und Fumarylacetoacetat Hydrolase, können zum geschwindigkeitslimitierenden Schritt im Tyrosin-Katabolismus werden (Sanchez-Amat et al., 1998), was die Homogentisat-Akkumulation und Pyomelanogenese erklärt. Somit vermag *L. pneumophila* auch als prokaryotisches Modell zu dienen, um zu zeigen, daß der Phänotyp für das Krankheitsbild Alkaptonurie oder anderer in den L-Tyrosin-Metabolismus involvierter Krankheiten selbst dann vorhanden sein kann, wenn keines der relevanten Enzyme in seiner Funktionalität gestört ist.

Der Vergleich verschiedener HPPD-like Proteine mit *Lly* weist im N-terminalen Bereich nur einen relativ geringen Homologiegrad auf, während der C-Terminus hochkonservierte Regionen beinhaltet. Daher könnte der C-Terminus für die spezifische Dehydrogenaseaktivität des Enzyms essentiellen Charakter haben. Resonanzspektroskopische Untersuchungen des gereinigten Enzyms von *Pseudomonas* weisen mit dem koordinierten Auftreten eines Eisenions

mit Tyrosin im aktiven Zentrum HPPD-like Proteine als Angehörige der Familie der Eisen-Tyrosinat-Proteine aus (Bradley et al., 1986). Die Konservierung von Tyrosin- und Histidinresten als potentielle Metall-Liganden ist bei allen bisher bekannten Mitgliedern der HPPD-like Proteine zu beobachten (Chang et al., 1997).

Legiolysin - Umwelt- und Pathogenitätsfaktor?

Obwohl Aminosäuren als Hauptenergiequelle dienen, ist über die degradativen Aminosäure-Stoffwechselwege von *L. pneumophila* noch wenig bekannt (Hoffman, 1984). Die ermittelten Daten lassen jedoch vermuten, daß HGA direkt in den Katabolismus von Tyrosin und die Generierung eines vor Licht schützenden Pigments involviert ist. Der hämolytische Effekt, den man bei *L. pneumophila* und *lly*-tragenden rekombinanten *E. coli*-Klonen findet, könnte dabei durch die Oxidation und Polymerisation von HGA hervorgerufen worden sein (Hegedus und Nayak, 1994). Neben dem protektiven Charakter gegenüber Licht und hämolytischer Aktivität wurden für andere Pyomelanine und deren Vorprodukte eine ganze Reihe von Funktionen beschrieben, u. a. Metallresistenz, Adhäsionsvermögen in Biofilmen und Inhibition von Polysaccharasen (Kotob et al., 1995). Die Generierung von Pyomelanin führt über hochreaktive Semiquinone als Zwischenprodukte. Während der Autooxidation werden zudem toxische Sauerstoffradikale, wie O_2^- , H_2O_2 und HO^{\cdot} gebildet (Hegedus und Nayak, 1994). Daher erscheint die Sekretion von HGA als ein lebenswichtiger Schritt für *Legionella*, um keinen Schädigungen durch diese Radikale ausgesetzt zu sein. HGA und seine toxischen Pyomelanin-Zwischenprodukte können auch durch Reaktion mit anderen Makromolekülen oder essentiellen Proteinen während des intrazellulären Infektionsprozesses zu entsprechenden Zell- und Gewebeschädigungen führen, um damit dem Keim die Etablierung im Wirt zu sichern. Aufgrund seiner DNA-schädigenden Wirkung ist HGA darüber hinaus als mutagen einzustufen (Hiraku et al., 1998).

Für die Relevanz von Legiolysin als Pathogenitätsfaktor bleibt festzustellen, daß für *L. pneumophila* bislang kein singulärer für die Pathogenität verantwortlicher Faktor entdeckt werden konnte. Nur das koordinierte Zusammenspiel mehrerer Gendeterminanten verleiht dem Keim das virulente Potential zur Etablierung seines intrazellulären Überlebens (Abu Kwaik et al., 1993).

Analyse der upstream-Region: benachbarte Genprodukte der *lly*-Determinante sind in Transportprozesse involviert.

Upstream der *lly*-Determinante konnten drei weitere ORFs identifiziert werden. Diese stehen offenbar nicht im Zusammenhang mit der Pyomelanin-Synthese. ORF 4 kodiert für ein periplasmatisches Bindeprotein aus dem Glycerin-3-phosphat (G-3-P) Transportsystem mit Homologien zu UgpU aus *E.coli* und *M. tuberculosis* (Argast und Boos, 1979). Das ORF 3 weist auf Proteinebene Homologien zur Glycerophosphoryldiester-Phosphodiesterase UgpU aus *E. coli* (Brzoska und Boos, 1988) bzw. GlpQ aus *B. subtilis* und *M. tuberculosis* auf. G-3-P ist ein essentieller Metabolit in der Phospholipid-Biosynthese, dient aber auch als Kohlenstoff- und Energiequelle. Der Transportprozeß ist als Cotransport charakterisiert, da an die Aufnahme von G-3-P die Ausschleusung von zellulärem Phosphat gekoppelt ist (Elvin et al., 1985). Das Transportsystem arbeitet substratspezifisch und erkennt daher keine Glycerophosphoryldiester. Diese werden durch UgpU bzw. GlpQ zu G-3-P hydrolysiert und vermutlich dann dem Transportsystem zur Verfügung gestellt.

Die Funktionalität von ORF 5 bleibt spekulativ. Das Genprodukt ist einerseits homolog zur Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit CytN aus *Azospirillum brasilense* (Marchal et al., 1998) bzw. dem Cytochrom *c* Oxidase Polypeptid 1 aus *Azorhizobium caulinodans* (Kaminski et al., 1996). Diese Enzyme sind Teil der Atmungskette und katalysieren während der oxidativen Phosphorylierung den terminalen Elektronentransfer von Cytochrom *c* auf O₂. Die dabei auftretende protonenmotorische Kraft führt zu einem Transmembranpotential, daß zur ATP-Synthese genutzt wird. ORF 5 weist andererseits auf Proteinebene Homologien zur Permease AroP aus *Corynebacterium glutamicum* auf (Wehrmann et al., 1995). Dieses Genprodukt kodiert für das allgemeine Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren, d. h. den aktiven Transport von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und könnte als solches auch am Tyrosinstoffwechsel von *Legionella pneumophila* beteiligt sein. Schließlich ist ORF 5 noch homolog zum Bacitracin Transport Permease Protein BcrB aus *Bacillus licheniformis* (Podlesek et al., 1995). Diese Daten lassen das Genprodukt von ORF 5 als ein weiteres in Transportprozesse involviertes Protein erscheinen.

Häufig können physiologische Charakteristika nicht nur auf einen Survival-Faktor, sondern mehrere Determinanten zurückgehen. Die erfolgreiche Besiedlung ökologischer Nischen kann dabei von ganzen Stoffwechselwegen abhängig sein. Die weitergehende Erforschung der Physiologie von *L. pneumophila* erscheint daher im Rahmen ökophysiologischer Studien

notwendig, um ein besseres Verständnis für die ökologischen Zusammenhänge und die Virulenz dieses Pathogens zu entwickeln.

2. Ökologische Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* in der Umwelt

Assoziation zu *Fischerella* sp.

Das Verbreitungsspektrum der oxygenen phototrophen Cyanobakterien ist weit gefächert und schließt neben dem Süßwasserhabitat auch marine Standorte und humide Böden mit ein. Cyanobakterien sind die größte und am weitesten verbreitete Gruppe photosynthetisch aktiver Prokaryonten. Durch die Befähigung, an extremen Standorten wachsen und molekularen Stickstoff fixieren zu können, sind sie im Naturhaushalt von großer Bedeutung (Brock, 1997).

Neben *Fischerella* sp. konnte die Assoziation von *Legionella pneumophila* auch zu den Blaualgen *Phormidium* sp. und *Oscillatoria* sp. nachgewiesen werden (Tison et al., 1980). Gegenüber einzelligen Blaualgen unterscheiden sich diese fadenförmigen Zellverbände durch interkalares Wachstum innerhalb von Trichomen (Ketten von Zellen). Sie werden aufgrund ihres Teilungsmodus auch als hormogonale Blaualgen bezeichnet. Die Heterocysten-bildende Blaualge *Fischerella* sp. unterscheidet sich von den oben genannten Gattungen durch Zellteilungen in mehr als einer Ebene. Die Algenmatte ist somit als ein verzweigtes Netzwerk charakterisiert (Schlegel, 1985).

Die Assoziation von *L. pneumophila* JR 32 und JR 32-1 (*lly*-negativ) mit *Fischerella* sp. wurde jeweils über einen Verlauf von sieben Tagen beobachtet. In Abhängigkeit von der Photosynthesetätigkeit scheint die Blaualge *Fischerella* sp. die Persistenz von *L. pneumophila* durch die Bereitstellung von essentiellen Faktoren positiv zu beeinflussen (Pope et al., 1982; Tison et al., 1980). Diese Faktoren sind vermutlich nur von geringem Molekulargewicht, da die Dialyse von *Fischerella*-Überstand zum Verlust des stabilisierenden Effekts führt (Berendt, 1981). Die Expression von *lly* spielt dabei für die Persistenz der Legionellen (JR 32-1) keine Rolle.

Im Gegensatz zu den von Bohach und Snyder (1983) ermittelten Daten vermag *L. pneumophila* in frischem *Fischerella*-Medium nicht zu persistieren. Vielmehr ist eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl von *L. pneumophila* JR 32 und JR 32-1 um 1,5 log-Stufen zu beobachten. Zudem war eine über den gesamten Zeitraum des Versuchs anhaltende Persistenz von *Legionella* in Assoziation mit *Fischerella* sp. bzw. in dessen Überstand

möglich. Die von Bohach und Snyder gemachte Beobachtung einer Verringerung der CFU-Werte von *L. pneumophila* in Cokultur mit *Fischerella* sp. konnte nicht bestätigt werden. Lichtmikroskopische Studien zeigten die Einbindung der Bakterien in den von *Fischerella* sp. segregierten Schleim (Bohach und Snyder, 1983). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen konnten diese Daten erweitern und zeigen die direkte Adhäsion von *L. pneumophila* an *Fischerella* sp. Dieses Adhäsionsvermögen ist jedoch unspezifisch, wie die optische Quantifizierung der Cokultur von *Fischerella* sp. mit *E. coli* DH5 α zeigte, und auch unabhängig von den getesteten Umwelt- und Pathogenitätsfaktoren Fla (*L. pneumophila* Corby KH 1) und Mip (*L. pneumophila* JR 32-2). Die Adhäsion der *lly*-defizienten Mutante *L. pneumophila* JR 32-1 ist jedoch gegenüber dem Wildtyp leicht rückgängig, kann aber immer noch als gut bezeichnet werden. Dieses Verhalten *lly*-defizienter *L. pneumophila* korreliert mit dem verminderten Vermögen, sich in Biofilmen über einen längeren Zeitraum (1 Jahr) zu etablieren. Im Gegensatz zur persistierenden Kontrolle konnte die *lly*-Mutante nach 160 Tagen nicht mehr detektiert werden (pers. Mitteilung, U. Szewzyk, Berlin). Dem Umweltfaktor *Lly* könnte somit bei der Etablierung von Biofilmen auf lange Sicht Bedeutung zukommen, wie die sog. Batch-Versuche zur Biofilm-Generierung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Cokultivierung von *L. pneumophila* mit *Fischerella* sp. aufzeigen konnten.

Persistenz von *L. pneumophila* und rekombinanten *E. coli* in Boden-Mikrokosmen

Die Verbreitung von Amöben, wie z. B. *A. castellanii* als einer der wichtigsten Wirte von *Legionella*, ist nicht nur auf wässriges Milieu beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf humide Böden. Diesem Umstand wurde bei der Versuchsdurchführung zur Persistenz von *L. pneumophila* in Boden-Mikrokosmen Rechnung getragen. Im Vordergrund der Betrachtung stand dabei jedoch die Überlebensfähigkeit der Bakterien in suboptimaler Umgebung und nicht die Interaktion zur etablierten Begleitbiozönose.

Zudem stellte sich die Frage, ob die gentechnische Veränderung des Organismus einen Einfluß auf das Persistenzvermögen ausübt. Diese Fragestellung ist im Zusammenhang mit der biologischen Sicherheitsforschung zu sehen. Diese beschäftigt sich mit der Identifizierung, Charakterisierung und Bewertung möglicher Risiken, die durch die Herstellung und Verbreitung gentechnisch veränderter Lebewesen für den Menschen und die Umwelt auftreten könnten (Lewin und Strauss, 1991). Ziel der Sicherheitsforschung ist es, möglichst frühzeitig

biologische und ökologische Risikopotentiale gentechnisch veränderter Mikroorganismen zu erkennen und ein hohes Maß an Sicherheit zu gewährleisten.

Zu diesem Zweck wurden in dem Experiment die *lly*-, *mip*- und *fla*-negativen Mutanten *L. pneumophila* JR 32-1, JR 32-2 und Corby KH 1, sowie die zuvor generierten rekombinanten *E. coli*-Klone AAEC 160-1 und WM 2269-1 mit genomischer *mip*- bzw. *lly*-Integration eingesetzt. Letztere zeichnen sich gegenüber plasmidkodierte Stämmen durch die wesentlich stabilere Expression der klonierten Eigenschaften im Verlauf von Langzeitstudien aus.

Grundsätzlich stellte sich dabei zunächst die Frage nach der Fähigkeit des Wildtyps und der gentechnisch veränderten Untersuchungsorganismen (gvO), die Bodenprobe besiedeln zu können. Der ungestörte Boden besteht aus einer großen Vielfalt anorganischer und organischer Komponenten und bietet Lebensraum für eine in der Regel komplex miteinander vernetzte Lebensgemeinschaft von Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Einzellern und Kleintieren. Durch die Sterilisation des Bodens wurde die natürliche Mikroflora und -fauna (Protozoen), die beispielsweise als Nährstoffkonkurrenz oder durch Fraß die Überlebensraten der zugesetzten Mikroorganismen erniedrigen könnten, ausgeschaltet (Recorbert et al., 1992). Eine Persistenz der gvO würde bedeuten, daß die Organismen prinzipiell im Bodenhabitat überlebensfähig sind, ein Absterben hingegen, daß selbst unter optimalen Bedingungen wahrscheinlich kein Potential zur Besiedlung des Umweltmediums Boden vorhanden ist.

Die gleichbleibende qualitative und quantitative Zusammensetzung der Bodenprobe war von essentieller Bedeutung, um die Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde auf kommerziell verfügbare Blumenerde als Kultursubstrat mit definierter Zusammensetzung und gleichförmigem Zersetzungsgrad zurückgegriffen.

Die Auswahl von Blumenerde als Versuchsmaterial ist zudem unter dem Aspekt der ständigen potentiellen Akkumulation von Legionellen infolge einer Präsenz in Wasserbesprengungsanlagen in Gärtnereien und Gewächshäusern zu sehen. Es stellte sich daher die Frage, ob sich *L. pneumophila* nicht nur in aquatischem Milieu, sondern auch in feuchter Blumenerde etablieren kann.

Die rapide Abnahme der kultivierbaren Legionellen führte schon nach sechs Tagen zur Unterschreitung der Nachweisgrenze. Dies bedeutet, daß *L. pneumophila* im Boden nicht überlebensfähig ist. Die Zellzahlen von *E. coli* DH5 α und den Integrationsmutanten AAEC 160-1 (*mip*-positiv) und WM 2269-1 (*lly*-positiv) nahmen über einen Zeitraum von vier Wochen kontinuierlich ab. Lediglich die als Kontrollen eingesetzten EHEC-Stämme

O 157 : H7 st 933 und O 157 : H7 st 86-24 vermochten über diesen Zeitraum zu persistieren. Diese enterohämorrhagischen *E. coli* zählen zu den wichtigsten darmpathogenen Bakterien. Als Hauptreservoir dient der Rinderdarm. Durch die Ausscheidung der Keime mit dem Kot weidender Rinder gelangen die Mikroorganismen in den Boden oder naheliegende Gewässer und stellen dort wichtige EHEC-Infektionsquellen dar.

Die Untersuchungen zur Besiedlungskapazität wurden nicht nur mit den gentechnisch veränderten Stämmen, sondern auch mit den nicht veränderten Ausgangsstämmen durchgeführt. Der Vergleich innerhalb der jeweiligen Arten ließ keine Unterschiede und damit keinen Einfluß der Pathogenitäts- und Umweltfaktoren Mip, Fla und Lly auf die Besiedlungskapazität erkennen. Keiner der Organismen erwies sich als erfolgreicher Besiedler des Versuchsmaterials Blumenerde. Lediglich die auch im Boden vorkommenden EHEC-Stämme vermochten sich über den gegebenen Zeitraum zu behaupten. Es besteht somit eine gute Übereinstimmung zwischen den ermittelten Daten und den aus der Literatur bekannten ökologischen Ansprüchen der untersuchten Stämme. Es ist jedoch festzuhalten, daß der Laborstamm *E. coli* DH5 α im Boden besser zu persistieren vermag, als das Umweltbakterium *L. pneumophila*.

Persistenzstudien von *L. pneumophila* und *E. coli* in Wasser-Mikrokosmen:

der Übergang zum VBNC (viable but nonculturable) - Stadium

Assoziationsmöglichkeiten mit Begleitorganismen (Symbiose, Parasitismus), Temperaturschwankungen und das häufig wechselnde Nährstoffangebot, sowie Salzgehalt, pH und osmotischer Druck charakterisieren die Lebensbedingungen von Umweltbakterien in der freien Natur. Durch die Ausnutzung eines großen Spektrums genotypischer und phänotypischer Mechanismen reagieren Bakterien dynamisch auf den Wechsel dieser Umweltparameter. Ein das Wachstum limitierendes Nährstoffangebot mit der Gefahr von Störungen in Stoffkreisläufen und daraus drohendem Zelltod kann zur Umleitung oder Abwandlung von Stoffwechselwegen durch konstitutive oder induzierbare Enzymsynthese führen (Colwell und Huq, 1994).

Alternativ werden für das Wachstum und die Verbreitung ungünstige Bedingungen von manchen Mikroorganismen durch die Ausbildung von Dauerformen umgangen. Diese sind durch die Reduktion metabolischer Aktivität gekennzeichnet. Als Beispiele für solche Dauerformen sind thermoresistente, gegen Austrocknung, Strahlung und chemische Einflüsse widerstandsfähige Endosporen stäbchenförmiger, gram-positiver Bakterien (*Bacillus*, *Thermoactinomyces*,

Clostridium, *Desulfotomaculum*), Exosporen (*Streptomyces*), Cysten (*Azotobacter*, *Methylocystis*) und Myxosporen (*Myxococcus*, *Sporocytophaga*) zu nennen (Marahiel und Zuber, 1999).

Als eine weitere Strategie zur Überwindung ungünstiger Phasen ist der Übergang in ein lebensfähiges, aber nicht mehr kultivierbares Ruhestadium (viable but nonculturable, VBNC) zu nennen. Neben *L. pneumophila* ist eine ganze Reihe gram-negativer, nicht sporulierender Bakterien, wie *E. coli*, *Xanthomonas campestris*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae* und *Helicobacter pylori* zum Übergang in das VBNC-Stadium befähigt (Steinert et al., 1997; Ghezzi et al., 1999; Colwell et al., 1985; Rollins und Colwell, 1986; Cho et al., 1999; Rahman et al., 1994). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch *Enterococcus faecalis* als erster und bisher einziger Vertreter gram-positiver Bakterien ins VBNC-Stadium übergehen kann (Lleo et al., 1998). Dieser Wechsel in das nicht kultivierbare Ruhestadium geht mit einer Reihe speziesspezifischer, physiologischer und morphologischer Veränderungen der Bakterienzelle einher. Neben der Veränderung von Größe und Gestalt der Zelle (Roszak und Colwell, 1987) betrifft dies u. a. auch die Anzahl an Ribosomen und dem Gehalt an kurzkettigen Membran-Fettsäuren (Linder und Oliver, 1989). Bei *E. coli* O 157 : H7 ist die Zusammensetzung der äußeren Membran variiert (Wang und Doyle, 1998). Bei *V. cholerae* konnte elektronenmikroskopisch eine Undulierung der äußeren, von einer zusätzlichen Faserschicht umhüllten Membran beobachtet werden. Zudem findet sich eine weitere, elektronendichte Schicht im Periplasma der Zellen (Kondo et al., 1994). Die stäbchenförmigen Zellen von *V. parahaemolyticus* erscheinen im Verlauf des Überganges zum Ruhestadium zunächst irregulär, und werden später zusehens coccoid. Das Flagellum bildet sich zurück, statt dessen werden polymerartige Filamente ausgebildet. Zudem ist die Zelloberfläche von membranösen Bläschen bedeckt, die vermutlich durch die Reduktion der Zellgröße bedingt sind (Jiang und Chai, 1996). Im Gegensatz zu einer häufig zu beobachtenden Verkleinerung von VBNC-Zellen konnte für *Campylobacter jejuni* eine Vergrößerung der Zellen, resultierend aus einem bis zu 5-fachen Anstieg des Wassergehalts, verzeichnet werden. Der interne Zell-pH nähert sich zusehens dem des Mikrokosmos' an, das Membranpotential und der Kalium-Gehalt der Zellen verringern sich (Tholozan et al., 1999). Für *Vibrio vulnificus* ist eine erhöhte Resistenz gegen Ultraschall, Ethanol und mechanischen Streß beobachtet worden (Weichart und Kjelleberg, 1996). Des weiteren findet man in verschiedenen pathogenen *Vibrio*-Arten eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber hydrostatischem Druck (Berlin et al., 1999). Die verlängerte Überlebensfähigkeit von *E. coli*

bei erniedrigter Temperatur (Smith et al., 1994) kann Folge einer Adaptation der Zellen an die Umwelt durch Veränderungen von Membranlipiden und der Expression von "cold shock proteins" sein (Gounot, 1991; Jones et al., 1992). Die bei verschiedenen Enterobakterien beobachtete reduzierte respiratorische Aktivität wird bei *V. vulnificus* vermutlich von der Temperatur, bei *E. coli*, *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* hingegen von der Verfügbarkeit von Nährstoffen determiniert (Oliver und Wanucha, 1989; Nilsson et al., 1991; Smith et al., 1994).

Trotz der recht umfangreichen morphologischen und physiologischen Veränderungen beim Übergang kultivierbarer Zellen zum VBNC-Stadium bleiben diese auf niedrigem Niveau metabolisch aktiv, wie die aktive Aufnahme und der Einsatz von ³⁵S-Methionin in der Proteinsynthese von *Shigella dysenteriae* zeigen konnte (Rahman et al., 1994). Die metabolische Aktivität konnte durch 16 S rRNA-Oligonukleotidhybridisierungen verschiedener *L. pneumophila*-Stämme vor und nach Verlust der Kultivierbarkeit in sterilisiertem Leitungswasser dargestellt werden. Aufgrund der engen Korrelation von rRNA-Menge und metabolischer Aktivität einer Zelle kann die Stärke der Fluoreszenz als Maß für die Stoffwechselaktivität dienen. Nach Erreichen des VBNC-Stadiums nimmt die Fluoreszenz der gegen die 16 S rRNA gerichtete Oligonukleotidsonde (LEG705) durch Reduktion des rRNA-Gehalts in den VBNC-Zellen ab.

Die Aufrechterhaltung der Virulenz nach Verlust der Kultivierbarkeit von pathogenen Mikroorganismen erscheint ebenfalls artspezifisch. Während *E. coli* seine Enteropathogenität nachweislich durch Produktion von Enterotoxin beibehält (Pommepuy et al., 1996), konnte dieser Nachweis für *Salmonella typhimurium* nach intraperitonealer Maus-Injektion nicht erbracht werden (Caro et al., 1999). Das Pathogenitätspotential von *Campylobacter jejuni* und *Aeromonas salmonicida* wird hingegen kontrovers diskutiert (Rollins und Colwell, 1986; Medema et al., 1992; Morgan et al., 1993; Rahman et al., 1996). Infektionsstudien mit reaktivierten *L. pneumophila*-Zellen in humanen Monozyten und im Meerschweinchen-Modell konnten deutlich machen, daß das Virulenzpotential des Keimes erhalten bleibt (Steinert et al., 1997).

Der Verlust der Kultivierbarkeit von *L. pneumophila* und *E. coli* wurde in Mikrokosmosstudien dokumentiert. Der Einsatz der *E. coli* K-12-Stämme mit genomischer Integration von *lly* und

mip ist dabei unter den ökologischen Aspekten der *E. coli* K-12 Sicherheitsforschung zu sehen, die bereits weiter oben diskutiert wurden.

Die Persistenzstudien erfolgten in autoklaviertem Leitungswasser und zwei unterschiedlich behandelten Varianten von Mainwasser. Neben sterilfiltriertem Mainwasser - unter Beibehaltung der nativen Struktur gelöster Stoffe - fand die Inokulierung der Organismen in einem autoklavierten Ansatz statt. Dieser zeichnete sich durch fortdauernde Präsenz kristalliner Substanzen und organischer, wie auch anorganischer Schwebeteilchen aus. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Frage nach einem geeigneten Medium zur Induktion des Übergangs kultivierbarer Zellen in das VBNC-Stadium. Die Induktionsmöglichkeiten scheinen ebenso wie das Reaktivierungsvermögen von VBNC-Zellen artspezifisch zu sein. Häufig führt dabei eine Absenkung der Temperaturen zum Übergang ins Ruhestadium. Dies macht bei Umweltkeimen im jahreszeitlichen Wechsel von Sommer und Winter einen Sinn. Bei *L. pneumophila* findet der Übergang zum VBNC-Stadium bei 4 °C gegenüber 37 °C verzögert statt (Hussong et al., 1987), könnte aber auch alternativ zur Verringerung der Nährstoffkonzentration durch niedrige Temperaturen induziert werden. In Tabelle 10 sind die Induktions- und Reaktivierungsvarianten einiger Bakterienarten aufgelistet.

Tabelle 10: Induktion und Reaktivierung von VBNC-Stadien verschiedener Bakterienspezies

Organismus	Induktion von VBNC	Reaktivierung der Kulturfähigkeit	Referenz
<i>Legionella pneumophila</i>	steriles Leitungswasser	Dottersack infizierter Hühnerembryonen Coinkubation mit <i>Acanthamoeba castellanii</i>	Hussong et al., 1987 Steinert et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	5 °C, Stickstoff-Mangel	k. A.	Nelson et al., 1996
<i>Escherichia coli</i> H10407	Meerwasser, Sonnenlicht	nicht möglich	Pommepeuy et al., 1996
<i>Escherichia coli</i> O157	steriles Flußwasser	k. A.	Kogure u. Ikemoto, 1997
<i>Escherichia coli</i> Tx432	polare, marine Umgebung, -1,8 °C, Salzgehalt 34,5 ppt	k. A.	Smith et al., 1994
<i>Enterococcus faecalis</i>	"	k. A.	Smith et al., 1994
	steriles gefiltertes Seewasser	k. A.	Lleo et al., 1998
<i>Yersinia enterocolitica</i>	polare, marine Umgebung	k. A.	Smith et al., 1994
<i>Salmonella typhimurium</i>	"	k. A.	Smith et al., 1994
<i>Salmonella enteritidis</i>	7 °C, 7,35 mMol / l Kaliumphosphat-Puffer	k. A.	Chmielewski und Frank, 1995
<i>Vibrio cholerae</i>	15 °C, M9-Salzlsg.	Hitzeschock, 1 min	Wai et al., 1996
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3,5 °C, MMS-Medium	Temp.-shift auf RT	Jiang und Chai, 1996
<i>Vibrio vulnificus</i>	5 °C Feldvers. Wintertemp < 15 °C	Tierpassage (Maus) Temp.-shift 15°C → 21°C	Oliver und Bockian, 1995 Oliver et al., 1995
<i>Campylobacter jejuni</i>	Seewasser ¹⁾	Tierpassage (Rattendarm) ²⁾	Saha et al., 1991 ²⁾ Korhonen und Morikainen, 1991 ¹⁾
<i>Helicobacter pylori</i>	4 °C, Brucella broth, 2 % FKS ³⁾	Hitzeschock, Ammoniumsulfat → Kultur in Brucella broth, Na-pyruvat, humane Erythrozyten und Serum ⁴⁾	Kurokawa et al., 1999 ⁴⁾ Cellini et al., 1998 ³⁾
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Kupfer	k. A.	Alexander et al., 1999
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Kupfer	k. A.	Alexander et al., 1999

k. A. = keine Angabe

In sterilem Leitungswasser verlieren logarithmisch gewachsene *L. pneumophila*-Zellen in einem Zeitraum von bis zu 180 Tagen ihre Kultivierbarkeit. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Expression der Gene *lly* und *fla*, wie die Langzeitstudien mit *L. pneumophila* JR 32-1 (*lly*-negativ) und *L. pneumophila* Corby KH 1 (*fla*-negativ) im Vergleich zu den Referenzstämmen zeigen konnten. Die bereits nach 60 Tagen Inokulierung zu verzeichnende Nichtkultivierbarkeit der *mip*-Mutante *L. pneumophila* JR 32-2 ist mit der um ca. 1 log-Stufe geringeren Beimpfung des Mikrokosmos zu erklären. Die Abnahmerate der noch kultivierbaren Zellen entspricht daher denen der anderen *Legionella*-Stämme.

Ein kontroverses Bild ergibt sich bei der Betrachtung des Persistenzvermögens von *Legionella* in sterilfiltriertem, bzw. autoklaviertem Mainwasser. Während die eingesetzten Stämme in sterilfiltriertem Mainwasser außerordentlich lange persistieren konnten, war dies mit Ausnahme von *L. pneumophila* JR 32-1 in autoklaviertem Mainwasser nicht zu beobachten. Innerhalb von ca. 30 Tagen war eine drastische Reduktion der CFU-Werte der Stämme *L. pneumophila* RIGP, JR 32-2 und Corby KH1 zu beobachten. Die Möglichkeit der Induktion von VBNC-Stadien dieser Stämme durch einen nur in sterilfiltriertem Mainwasser befindlichen gelösten Stoff läßt sich vermutlich ausschließen (Alexander et al., 1999), da der Versuch einer Reaktivierung zum Zeitpunkt $t = 50$ Tage durch Cokultivierung mit *A. castellanii* (Steinert et al., 1997) nicht möglich war. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß diese Stämme nicht in das VBNC-Stadium übergegangen sind, sondern schlichtweg abstarben. Möglicherweise führte die Autoklavierung des Mediums zur Degradation essentieller Nährstoffe, deren Fehlen nicht kompensiert werden konnte (Korhonen und Martikainen, 1991). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch das ungewöhnlich lange Persistenzvermögen von *L. pneumophila* JR 32-1. Die Abnahme der Kultivierbarkeit der *lly*-Mutante in autoklaviertem Mainwasser betrug nach 120 Tagen nur eine halbe log-Stufe. Das Verhalten der Legionellen innerhalb dieses Datensatzes erscheint daher ungewöhnlich und schwer interpretierbar. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß das Umweltmedium Mainwasser den Übergang von Legionellen zum VBNC-Stadium nicht fördert. Dies macht aus ökologischer Sicht einen Sinn, da das Flußwasser einem natürlichen Habitat von *Legionella* entspricht.

Die Persistenzstudien mit *E. coli* wurden neben dem Umweltmedium Mainwasser zusätzlich in PBS durchgeführt, da die Keime in Leitungswasser zu schnell absterben würden. Das

Persistenzvermögen enterohämorrhagischer *E. coli* in Umweltmedien ist dabei vor dem Hintergrund stets wieder auftretender Infektionsausbrüche zu sehen (Kogure und Ikemoto, 1997). Zudem gibt die Existenz von Coliformen in Oberflächengewässern Aufschluß über das Auftreten von Fäkalkontaminationen. Insbesondere in autoklaviertem Mainwasser war über den gesamten beobachteten Zeitraum von 110 Tagen für alle getesteten Stämme ein außergewöhnliches Persistenzvermögen nachweisbar. Die Kulturfähigkeit der Organismen verblieb dabei auf unverändert hohem Niveau. Diese Ergebnisse ließen sich für die EHEC-Stämme auch in PBS reproduzieren und stehen im Einklang mit der Literatur. So konnte abhängig von der eingesetzten Wasserprobe die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O 157 : H7 in Mikrokosmosstudien von über 300 Tagen ermittelt werden (Warburton et al., 1998).

In sterilfiltriertem Mainwasser erfolgte dagegen in einem Zeitraum von 140 Tagen nach einer kurzen Persistenz-Phase (10 bis 20 Tage) eine kontinuierliche Reduktion der CFU-Werte. Dieses Medium scheint den Starvation-Prozeß, vermutlich aufgrund reduzierter Nährstoffe, schneller einzuleiten, als autoklaviertes Mainwasser.

Ein lang anhaltender Verlust der Kulturfähigkeit kann neben dem Eintritt ins VBNC-Stadium auch zum Zelltod führen. Um diese Möglichkeiten voneinander zu diskriminieren, wurde die Lebensfähigkeit der Zellen in den Mikrokosmen durch Ermittlung der Lebendzellzahl dokumentiert. Dazu fand der LIVE/DEAD *BacLight*TM Bacterial Viability Kit (Molecular Probes Inc., Leiden, NL.) Verwendung. Dieser Kit enthält zwei Fluoreszenzfarbstoffe, die in ihrer Fähigkeit zur Penetration von Zellmembranen differieren. Der "SYTO 9" genannte grün fluoreszierende Farbstoff färbt dabei bei Alleinfärbung alle Zellen an, während rot fluoreszierendes Propidiumjodid lediglich Bakterien mit geschädigter Zellmembran anfärbt. Bei Doppelfärbung verhält sich Propidiumjodid kompetitiv, so daß alle lebenden Zellen grün, die toten rot fluoreszieren. Dieses Verfahren wurde der Färbemethode mittels Acridinorange (AODC) den Vorzug gegeben, da letztere nicht die Lebendzellzahl, sondern die Totalzellzahl ermittelt, und damit auch die bereits toten Zellen mit erfaßt. Der LIVE/DEAD-Kit ist in der Literatur als sichere Diskriminierungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen anerkannt und dient der Detektion von VBNC-Stadien (Cole et al., 1997; Rigsbee et al., 1997; Alexander et al., 1999). In sämtlichen Versuchsreihen ließ sich eine weitaus höhere Anzahl noch lebensfähiger Zellen nachweisen, selbst nachdem deren Kulturfähigkeit nicht mehr zu dokumentieren war. Somit läßt sich feststellen, daß neben den getesteten *Legionella*-Stämmen auch *E. coli* DH5 α und die EHEC-Stämme O 157 : H7 st 933 und st 86-24 in das VBNC-

Stadium übergehen können. Der Übergang von *E. coli* O 157 : H7 in das Ruhestadium konnte kürzlich bestätigt werden (Wang und Doyle, 1998; Warburton et al., 1998).

In autoklaviertem Mainwasser konnte die Lebendzellzahl aufgrund der Präsenz einer Vielzahl kristalliner Substanzen nicht festgestellt werden, da die Hintergrundfluoreszenz zu stark war.

Reaktivierung von VBNC-Stadien: echte Wiederbelebung mittels speziesspezifischer Trigger oder Neubewuchs einiger weniger noch kultivierbarer Zellen?

Die Reaktivierung von VBNC-Stadien ist speziesspezifisch als Reaktion auf einen Umwelttrigger zu sehen (vgl. Tabelle 10). Die Induktion der Reaktivierung von *L. pneumophila* kann durch Dottersack-Infektion von Hühnerembryonen und durch Coinkubation mit *Acanthamoeba castellanii* erfolgen (Hussong et al., 1987; Steinert et al., 1997). Andere Stimuli, wie Hitzeschock oder intraperitoneale Infektion von Meerschweinchen mit VBNC-Zellen brachten keine positiven Ergebnisse (West et al., 1993; Steinert et al., 1997). Die Reaktivierung der Ruhestadien von *L. pneumophila* erfolgte mittels Cokultivierung mit *A. castellanii*. Es konnte gezeigt werden, daß alle getesteten *Legionella*-Stämme aus dem Stadium der Nichtkultivierbarkeit wieder reaktiviert werden konnten. Das intrazelluläre Vermehrungspotential konnte dabei von den beiden Philadelphia I - Stämmen JR 32 und RIGP am besten ausgenutzt werden. Auch die Flagellin-Mutante *L. pneumophila* Corby KH 1 ließ sich im vergleichbaren Zeitrahmen reaktivieren. Die Zellzahlen stagnierten jedoch nach zwei Tagen Coinkubation. Eine signifikante Zeitverzögerung konnte jedoch bei *L. pneumophila* JR 32-1 und JR 32-2 beobachtet werden. Die *lly*- und die *mip*-Mutante erreichten die zum Zeitpunkt der Anlage der Mikrokosmen inokulierten Zellzahlen auch nach drei Tagen noch nicht. Erst nach 5-tägiger Coinkubation mit *A. castellanii* konnten vergleichbare Zellzahlen gegenüber dem Wildtyp ermittelt werden. In Bezug auf die *mip*-Mutante korreliert dieses Ergebnis mit der um 50 bis 100-fachen Reduktion der Infektiosität dieses Stammes in *A. castellanii* (Wintermeyer et al., 1995). Es wird vermutet, daß durch die Integration des *sacB*-Gens in das Chromosom zur Generierung der Mutante die Virulenz beeinträchtigt wird (M. Steinert, Würzburg; Dissertation). Das intrazelluläre Überleben von logarithmisch gewachsenen *L. pneumophila* in *A. castellanii* und der makrophagenähnlichen Zelllinie U937 zeigt jedoch keinen Effekt bezüglich der Mutagenisierung des *lly*-Locus (Wintermeyer et al., 1994). Die Infektionskinetik von *L. pneumophila* JR 32-1 zur Reaktivierung von VBNC-Stadien zeigt auf, daß *Lly* somit in irgendeiner Form den

Reaktivierungsprozeß modulierend beeinflußt. Die Reaktivierung von *L. pneumophila* wird durch die Mutagenisierung von *lly* nicht verhindert, wohl aber signifikant verzögert.

Es wurde auch versucht, lebensfähige, aber nicht mehr kulturfähige *E. coli*-Stämme zu reaktivieren. In der Annahme, daß ein Umwelttrigger diesen Prozeß auslösen könnte, wurden VBNC-Stadien mittels Temperaturshifts und dem Transfer in verschiedenen konzentrierte Nährmedien auf ihre Fähigkeit zur Rückkehr in ein kultivierbares Stadium getestet. Die Gabe verschieden konzentrierter Nährmedien sollte dabei der Verhinderung eines "Nährstoff-Schocks" Vorschub leisten, der aufgrund des lang andauernden Hunger-Zustandes der VBNC-Zellen eintreten könnte (Whitesides und Oliver, 1997). In Tabelle 11 sind die ausgeführten Aktivierungsversuche aufgelistet. Eine Reaktivierung konnte jedoch nicht erzielt werden. Dies bedeutet, daß der jeweils artspezifische Trigger zur Reaktivierung von *E. coli* DH5 α und O 157 : H7 noch nicht gefunden wurde. Möglicherweise könnte eine Passage der EHEC-Stämme durch Rinderdarm zur Reaktivierung der VBNC-Stadien führen, da auch für andere Organismen, wie *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter jejuni* und *L. pneumophila* die Wirtspassage zur Reaktivierung von VBNC-Stadien geführt hat (Oliver und Bockian, 1995; Saha et al., 1991; Steinert et al., 1997). Das Unvermögen einer Reaktivierung verschiedener Enterobakterien (Bogosian et al., 1998) kann somit auch durch falsche oder unzureichende Induktion erklärt werden.

Tab. 11: Reaktivierungsversuche von VBNC-Stadien in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

*	Temp.-shift:	37 °C → RT 37 °C → 4 °C	für 24 h und 72 h
*	Transfer in YT-Medium:	4 %; 20 %; 100 %; 2 x YT	
*	Transfer in BHI-Medium		

Die kontroverse Diskussion bezüglich eines grundsätzlich stattfindenden Überganges zu einem nicht mehr kultivierbaren Stadium ist abschließend zu nennen: Erfolgt dieser Wechsel zum VBNC-Stadium oder sterben die Zellen ab (Bogosian et al., 1996; 1998)? Diese Frage wurde mittels zweier Ansätze zu beantworten versucht. So wurden diverse Techniken zur Detektion noch lebensfähiger Zellen entwickelt, wie "Acridine orange direct count" (AODC) (Hobbie et

al., 1977), "Direct visible count" (DVC) (Kogure et al., 1979), INT-Reduktion (Quinn, 1984), CTC-Reduktion (Rodriguez et al., 1992) und der LIVE/DEAD-Kit von Molecular Probes Inc. (Leiden, NL). Des weiteren ist die Reaktivierung nicht mehr kultivierbarer Zellen ein Beweis für die VBNC-These. Dabei ist es wichtig, eine mögliche Reaktivierung von VBNC-Stadien vom Wiederbewuchs durch einige wenige, noch kultivierbarer Organismen zu diskriminieren (Dukan et al., 1997). In Bezug auf *L. pneumophila* erfolgte dies durch Verlängerung der Verweildauer von VBNC-Stadien in den Mikrokosmen um bis zu 60 Tagen vor einer Reaktivierung.

Zukünftige Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* in der Umwelt, wie beispielsweise der Zusammenhang von VBNC und Biofilmen, erscheinen für das Verständnis ökologischer Zusammenhänge notwendig.