

Einzelzellanalyse

Dynamisches Einzelzellverhalten von *L. innocua* nach Bacteriocin-Exposition

NIKLAS FANTE¹, CHRISTIAN U. RIEDEL², ALEXANDER GRÜNBERGER^{1,3,4}

¹ MULTISCALE BIOENGINEERING, TECHNISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT BIELEFELD

² MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT ULM

³ CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (CEBITEC), UNIVERSITÄT BIELEFELD

⁴ INSTITUTE OF PROCESS ENGINEERING IN LIFE SCIENCES: MICROSYSTEMS IN BIOPROCESS ENGINEERING, KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE

The use of bacteriocins is a promising alternative to antibiotics in therapeutic treatment and food preservation. Traditional assays for the identification of novel bacteriocins rely on bulk measurements neglecting the heterogeneity in responses of cells. Microfluidic tools in combination with live-cell imaging are promising for time-resolved single-cell analysis under precisely controllable environmental conditions. Our results show differences in survival of individual cells of *Listeria innocua* after nisin exposure.

DOI: 10.1007/s12268-025-2499-4

© The Author(s) 2025

■ Antibiotika haben eine zentrale Bedeutung für den Medizin- und Lebensmittelsektor. Die zunehmenden Resistenzbildungen von Bakterien gegen gebräuchliche Antibiotika aufgrund von übermäßigem Einsatz oder Fehlgebrauch sind ein bedeutendes Gesundheitsproblem von globalem Ausmaß [1]. Daher sind Alternativen zu klassischen Antibiotika von großem Interesse. Eine häufig diskutierte Stoffklasse hierfür sind Bacterio-

cine, also natürlich vorkommende Peptide mit antibiotischen Eigenschaften [2, 3].

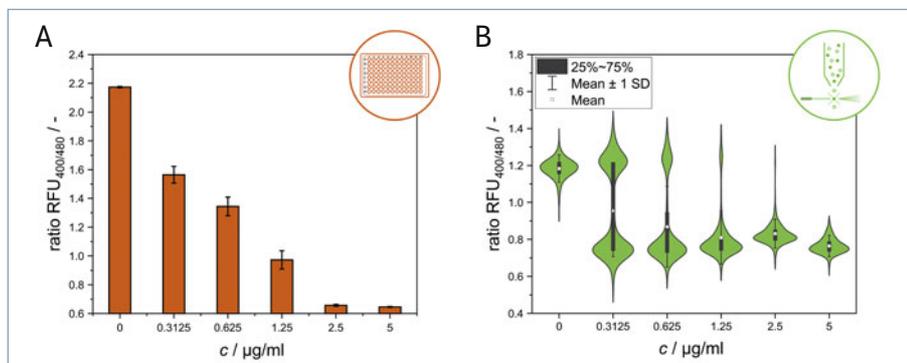
Von der Population zur einzelnen Zelle

Die Identifizierung neuer Bacteriocine ist jedoch eine Herausforderung. Gegenwärtige Screening-Methoden setzen auf die Unterstützung von Ganzzell-Biosensoren, welche die Identifizierung neuer Stoffe aus der Natur

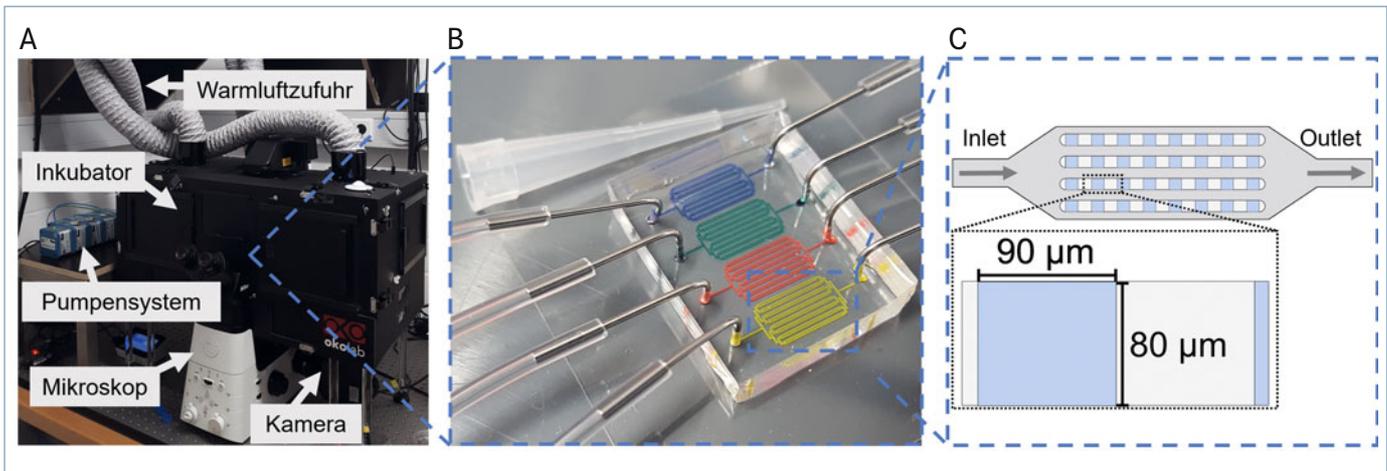
ermöglichen und gleichzeitig Auskunft über die Wirksamkeit geben können [4, 5]. Diese Ganzzell-Biosensoren basieren auf dem fluoreszierenden Reporterprotein pHluorin2 und ermöglichen einen Readout des Signals durch eine ratiometrische Fluoreszenzmessung. Fluoreszenzbasierte Reporterproteine ermöglichen eine einfache, optische Analyse und Messung zellulärer Prozesse oder Zustände und haben maßgeblich zu deren Verständnis beigetragen [6]. Oft erfolgen die Messungen in Küvetten oder Mikrotiterplatten in Kombination mit geeigneten Messgeräten und liefern ein Durchschnittssignal über das Verhalten einer gesamten Population (Abb. 1A).

Im hier dargestellten Fall setzten wir Zellen des Modellorganismus *Listeria innocua* steigenden Konzentrationen des Bacteriocins Nisin aus [7]. Mit steigender Konzentration nimmt das ratiometrische Fluoreszenzsignal der Population ab. Aus dem Fluoreszenzsignal können Rückschlüsse über den Zustand der Zellen gezogen werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Bindung von Nisin an Lipid II mit anschließender Porenbildung, was in Konsequenz zur Störung der Integrität der Zytoplasmamembran führt [8]. Hierdurch wird die pH-Homöostase der Zellen gestört und sorgt für einen Anstieg des intrazellulären pH-Werts an das saure Milieu des Puffers, was wiederum eine Verringerung der ratiometrischen Fluoreszenz zur Folge hat. Aus den erhobenen Daten kann jedoch nicht abgeleitet werden, ob es sich hierbei um ein kollektives Zellverhalten oder um das Verhalten einzelner Zellen handelt. Seit einigen Jahren steigt daher das Interesse und die Relevanz der Einzelzellanalyse. Diese wird durch die Kombination von fluoreszenten Biosensoren mit entsprechenden Einzelzell-Analyseverfahren, z. B. Mikroskopie oder Durchflusszytometrie, ermöglicht.

Mithilfe der Durchflusszytometrie führten wir Experimente durch, um Einblicke in das heterogene Verhalten einzelner Zellen innerhalb von Zellpopulationen zu gewinnen. Hierfür wurden Zellen von *L. innocua* steigenden Nisinkonzentrationen ausgesetzt



▲ **Abb. 1:** Messung des ratiometrischen Fluoreszenzsignals als Maß für den physiologischen Zustand von *Listeria innocua*-Zellen nach 30-minütiger Exposition mit Nisin in verschiedenen Konzentrationen (0–5 µg/ml). **A**, Durchschnittssignal einer Population gemessen mittels Mikrotiterplatte (n=3). **B**, mittels Durchflusszytometrie gemessene Verteilung der Einzelzellwerte sowie Mittelwerte und Standardabweichung der Fluoreszenzsignale. RFU: Relative Fluorescence Unit. Adaptiert aus [7].



▲ Abb. 2: Übersicht über den Aufbau der Messtechnik. **A**, inverses Fluoreszenzmikroskop für Live Cell Imaging. Ein Mikrofluidikchip befindet sich innerhalb eines Inkubators, der das Mikroskop umgibt und mithilfe einer Heizung konstante Temperaturen ermöglicht. **B**, Abbildung eines Mikrofluidikchips mit gefärbten Kammerstrukturen. Der Chip verfügt über eine Inlet- und eine Outlet-Struktur für kontinuierlichen Perfusionbetrieb. **C**, schematische Darstellung des Aufbaus eines Mikrofluidikchips mit mehreren Kammern zum Fixieren der Zellen. Adaptiert aus [7].

und die Verteilung der Einzelzellensignale untersucht (**Abb. 1B**). Die Verteilung der Einzelzellensignale ist besonders interessant bei Nisinkonzentrationen von $0,3125\text{--}1,25\ \mu\text{g/ml}$ und zeigt hier eine deutliche Heterogenität des Zellverhaltens als Reaktion auf den Kontakt mit dem Bacteriocin. Dabei ist die Bildung zweier Subpopulationen zu erkennen, was auf unterschiedliche Anfälligkeit einzelner Zellen auf Nisin schließen lässt. Somit konnten wir zeigen, dass der Signalverlauf, wie er auf Populationsebene in Mikrotiterplatten bestimmt wurde, nicht den Verlauf einzelner Zellen widerspiegelt, sondern auf einem heterogenen Verhalten der Population beruht.

Es lässt sich weiterhin erkennen, dass einzelne Zellen selbst bei höheren Konzentrationen ($1,25$ und $2,5\ \mu\text{g/ml}$ Nisin) weiterhin intakt bleiben und die Exposition mit Nisin scheinbar keine Auswirkungen hat, bzw. dass die Auswirkungen von den Zellen ausgeglichen werden können. Da es sich hierbei allerdings nur um eine Momentaufnahme, also eine Messung zu einem bestimmten Zeitpunkt handelt, können hierdurch relevante Fragen, wie der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals einzelner Zellen, nicht untersucht und nachvollzogen werden.

Einblicke in das dynamische Verhalten einzelner Zellen sind mittels Durchflusszytometrie nur eingeschränkt möglich. Um einzelne Zellen unter präzisen Umweltbedingungen und mit zeitlicher Auflösung zu untersuchen, werden daher andere Methoden benötigt. Eine wichtige Voraussetzung hierbei ist, dass die zu untersuchende Zellen

in einem System eingefangen und fixiert werden können, das sowohl definierte und physiologische Umweltbedingungen als auch die Möglichkeit für zeitlich und räumlich hochaufgelöste Messungen über einen längeren Zeitraum bietet. Die Kultivierung bzw. Analyse in Mikrofluidik-Kammern in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie und Live Cell Imaging zeichnet sich hier als ein wertvolles Werkzeug ab, um Zellen bei definierter Umweltveränderung und mit Einzellauflösung untersuchen zu können.

Dynamische Einzelzellanalyse

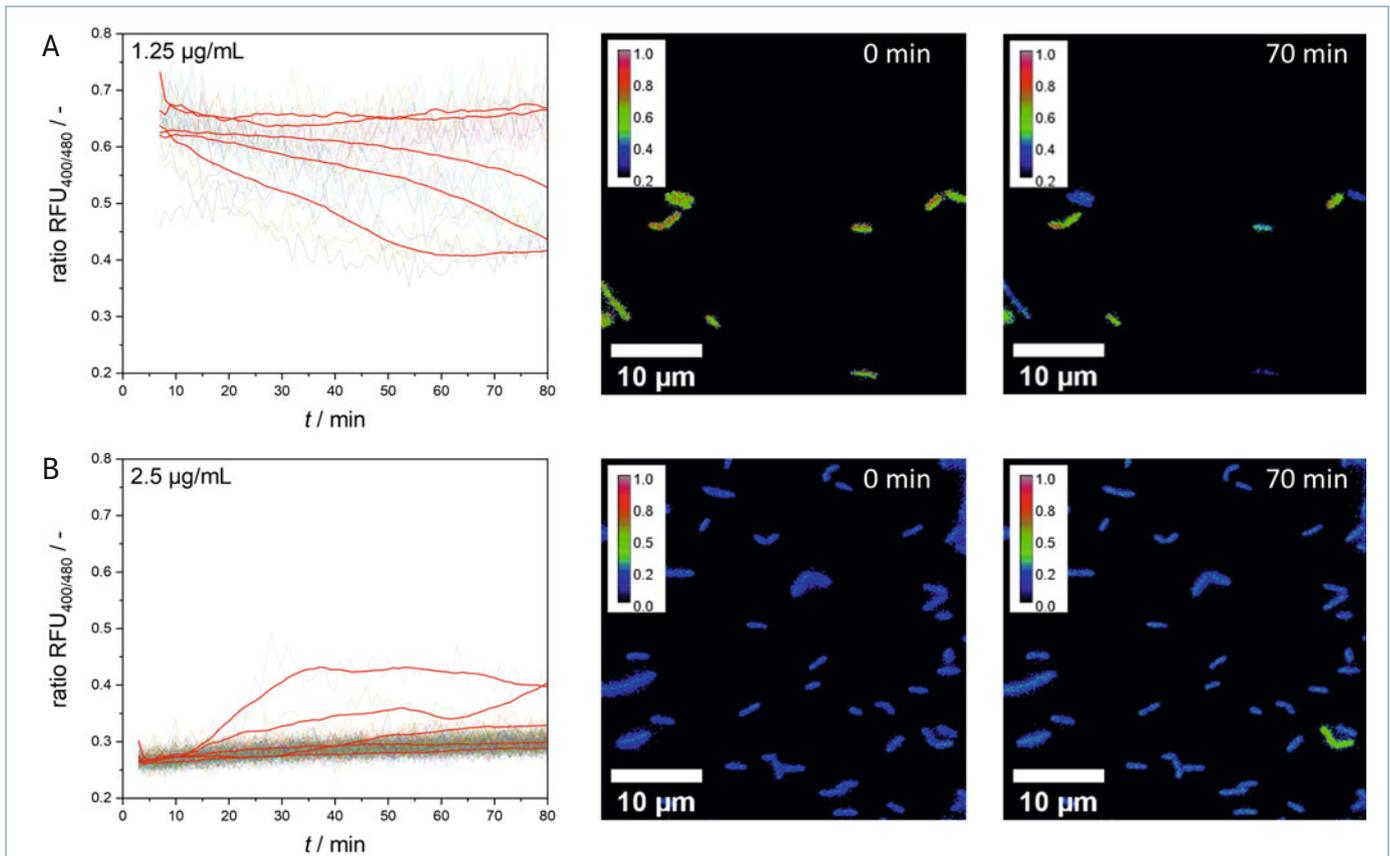
Aufgrund ihrer inhärenten Charakteristika ermöglichen Mikrofluidik-Systeme eine präzise Kontrolle von Umweltparametern, wie z. B. der Temperatur oder der Konzentration von Medienkomponenten. In Kombination mit Live Cell Imaging ermöglichen sie die Untersuchung des Verhaltens einzelner Zellen im zeitlichen Verlauf. So können Erkenntnisse über die Entwicklung von Populationsheterogenität gewonnen werden. Für diesen Zweck verwendeten wir PDMS-basierte Mikrofluidikchips für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzsignale einzelner Zellen nach Exposition oder bei Behandlung mit Nisin [7]. Diese werden in einem inversen Fluoreszenzmikroskop für Time Lapse Imaging positioniert (**Abb. 2**).

Der Chip verfügt über Inlet- und Outlet-Strukturen zum Inokulieren der Zellen und zur Injektion von Medium mit Nisin mithilfe eines druckbeaufschlagten Pumpensystems, um stabile Nisinkonzentrationen und definierte Bedingungen während der Messung

aufrechtzuerhalten. Das Fixieren der Zellen in einem Monolayer wurde durch mehrere Kammern ($80 \times 90\ \mu\text{m}$) mit einer Höhe von etwa $650\ \text{nm}$ erreicht, die in mehreren Arrays angeordnet sind. Hierdurch ist eine ideale Voraussetzung für Messungen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung unter konstanten Bedingungen gegeben.

Um einen näheren Einblick in den zeitlichen Verlauf der ratiometrischen Fluoreszenzsignale einzelner Zellen zu bekommen, setzten wir *L. innocua*-Zellen unterschiedlichen Nisinkonzentrationen aus und untersucht diese anschließend in Mikrofluidikchips unter konstanten Bedingungen. Bei Konzentrationen von 0 und $5\ \mu\text{g/ml}$ verhalten sich alle Zellen einheitlich, und die jeweiligen Einzelzellwerte sind kaum voneinander zu unterscheiden [7]. Die Einzelzellwerte liegen hierbei jeweils im Bereich von intakten Zellen bei einer Nisinkonzentration von $0\ \mu\text{g/ml}$ und im Bereich von gestörten Zellen bei $5\ \mu\text{g/ml}$ Nisin. Entsprechend werden die Zellen als lebend bzw. tot deklariert. Basierend auf den Bulk-Ergebnissen (**Abb. 1**) wurden daher Nisinkonzentrationen gewählt, bei denen die Ausbildung von Subpopulationen zu erwarten sind. Bei mittleren Nisinkonzentrationen (z. B. $1,25$ und $2,5\ \mu\text{g/ml}$) beobachteten wir deutliche Abweichungen im ratiometrischen Fluoreszenzsignal einzelner Zellen im zeitlichen Verlauf (**Abb. 3**).

Bei einer Nisinkonzentration von $1,25\ \mu\text{g/ml}$ zeigt die Population im Laufe der Zeit eine zunehmende Heterogenität. Dieser Anstieg kann auf die Störung der Membranintegrität einzelner Zellen und der damit verbundenen



▲ **Abb. 3:** Dynamische Einzelzellmessung des ratiometrischen Fluoreszenzsignals mittels Mikrofluidik. **A,** Verläufe des ratiometrischen Fluoreszenzsignals einzelner Zellen bei einer Nisinkonzentration von 1,25 bzw. 2,5 µg/ml. Für jede Konzentration wurden beispielhaft 5 unterschiedliche Signalverläufe geglättet (rot dargestellt). **B,** Die zu den Verläufen gehörenden Abbildungen stellen die ratiometrischen Fluoreszenzwerte mit Fehlern dar und zeigen die Werte der Zellen im Ausschnitt einer Kammer jeweils zu Beginn und 70 Minuten nach Nisin-Exposition. Adaptiert aus [7].

Zunahme der Anzahl toter Zellen zurückgeführt werden. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs einzelner Zellen lassen sich unterschiedliche Übergangszeiten und Dynamiken der Zellen von intaktem zu gestörtem Zustand beobachten. In den abgebildeten ratiometrischen Aufnahmen äußert sich dies durch eine Farbänderung entsprechender Zellen von grün zu blau.

Eine besonders interessante Beobachtung machten wir bei einer Nisinkonzentration von 2,5 µg/ml: Alle Zellen zeigten, wie erwartet, eine direkte Wirkung des Nisins, was bereits zu Beginn der Messung zu einem niedrigen ratiometrischen Fluoreszenzsignal führt. Insgesamt kann das Verhalten der Zellen während der gesamten Messzeit als homogen angesehen werden. Die zeitlich aufgelösten Einzelzelldaten ermöglichen jedoch die Beobachtung zweier Zellen deren Signalverläufe nach Erreichen des Minimalwerts erneut ansteigen. Dies deutet auf eine teilweise Wiederherstellung der pH-Homöostase hin. In den abgebildeten ratiometrischen Aufnahmen äußert sich dies durch eine Farb-

änderung der entsprechenden Zellen (im Bild rechts unten) von blau zu grün. Eine scheinbare Wiederherstellung der pH-Homöostase, wie durch den Signalverlauf indiziert, könnte auf mögliche Anpassungs-

prozesse und -strategien der Zellen hindeuten. Für den verwandten humanpathogenen Stamm *L. monocytogenes* wurden bereits mehrere Strategien zur Bewältigung einer Behandlung mit Nisin identifiziert, darunter

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Resistenz und Toleranz [9] sowie die Bildung von Persisterzellen [10]. Daher sind weitere Experimente erforderlich, um die zugrunde liegenden Prinzipien und Mechanismen im Detail aufzudecken und zu verstehen.

Die Ergebnisse des Einzelzelltrackings ermöglichten detaillierte Einblicke in die Entwicklung von Subpopulationen und in die Dynamik der Heterogenität einer *L. innocua*-Population. Hieraus können zwei wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: Zum einen ergibt sich der mittlere Signalwert des Assays aus der Summe bzw. dem Integral der Signale einzelner Zellen bzw. Subpopulationen. Zum anderen beobachten wir einzelne Zellen, die sich möglicherweise an Nisin-haltige Umgebungen anpassen und die Exposition überleben können. Mögliche Anpassungsprozesse müssen in weiteren Experimenten untersucht werden, um die Effektivität und Wirksamkeit von Nisin weiter zu charakterisieren. Die vorgestellten Methoden sind für die Charakterisierung und Untersuchung anderer Bacteriocine und antimikrobieller Verbindungen mit gleichen oder ähnlichen Wirkmechanismen anwendbar.

Einblicke in das Verhalten von Zellen unter Stresssituation

Die Heterogenität einer Population ist ein wichtiges Merkmal bei der Untersuchung der Wirksamkeit neuer Bacteriocine. Hierbei sollte das Verhalten einzelner Zellen über die Zeit berücksichtigt werden. Folglich müssen in diesem Zusammenhang geeignete Technologien für die Untersuchung von Einzeldynamiken etabliert und genutzt werden. Mikrofluidik-Systeme in Verbindung mit Live Cell Imaging ermöglichen die zeitlich und räumlich hochaufgelöste Beobachtungen und Analyse einzelner Zellen und gewähren wichtige Einblicke in das Verhalten von Zellen unter Stresssituation, wie beispielsweise nach der Exposition mit Bacteriocinen. Die vorgestellten Techniken könnten zukünftig ein wichtiges Werkzeug für die systematische Untersuchung der Effizienz und Wirksamkeit neuer Bacteriocine sein und mögliche Adaptionsprozesse sowie Persistenz einzelner Zellen bezüglich toxischer Umweltbedingungen aufzeigen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Multiscale Bioengineering sowie beim BMBF für die finanzielle Förderung (AMPLIFY, Fördernummer: 031B0826D).

Literatur

- [1] Gupta V, Datta P (2019) Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *Indian J Med Res* 149: 97–106
- [2] Pircalabioru GG, Popa LI, Marutescu L et al. (2021) Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics* 13: 196
- [3] Bangar SP, Chaudhary V, Singh TP, Özogul F (2022) Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience* 46: 101607
- [4] Reich SJ, Stohr J, Goldbeck O et al. (2022) Improved fluorescent *Listeria* spp. biosensors for analysis of antimicrobials by flow cytometry. *Microbiologyopen* 11: e1304
- [5] Otto SJ, Teichmann L, Fante N et al. (2024) High-throughput detection of potential bacteriocin producers in a large strain library using live fluorescent biosensors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 12: 1405202
- [6] Boy RL, Hong A, Aoki JI et al. (2022) Reporter gene systems: A powerful tool for *Leishmania* studies. *Curr Res Microb Sci* 3: 100165
- [7] Fante N, Desiderato CK, Riedel CU, Grünberger A (2024) Time-resolved cell-to-cell heterogeneity of *Listeria innocua* after nisin exposure. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 12: 1408652
- [8] Crauwels P, Schäfer L, Weixler D et al. (2018) Intracellular pHluorin as Sensor for Easy Assessment of

Bacteriocin-Induced Membrane-Damage in *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol* 9: 3038

- [9] Zhou J, Velliou E, Hong SH (2020) Investigating the effects of nisin and free fatty acid combined treatment on *Listeria monocytogenes* inactivation. *LWT* 133: 110115
- [10] Wu S, Yu P-L, Flint S (2017) Persister cell formation of *Listeria monocytogenes* in response to natural antimicrobial agent nisin. *Food Control* 77: 243–250

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

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger
 Mikrosysteme in der Bioverfahrenstechnik (µBVT)
 Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik (BLT) III
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Fritz-Haber-Weg 2
 D-76131 Karlsruhe
alexander.gruenberger@kit.edu

AUTOREN



Niklas Fante

2018–2020 Masterstudium (Molekulare Biotechnologie), Universität Bielefeld. Seit 2021 PhD Studium in der AG „Multiscale Bioengineering“ an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld.



Christian Riedel

2002–2005 Promotion. 2005–2007 Postdoc am Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Irland. Seit 2007 zunächst PostDoc und seit 2009 Arbeitsgruppenleiter am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm. 2015 Habilitation für das Fach Mikrobiologie, seit 2019 apl. Professur und Leiter der Arbeitsgruppe Mikrobielle Biotechnologie im Fachbereich Biologie der Universität Ulm.



Alexander Grünberger

2004–2010 Studium Bioingenieurswesen. 2010–2017 Promotion und PostDoc am FZ Jülich GmbH. 2010–2015 Promotion. 2015–2017 Postdoc am IBG1. 2017–2022 W1-Professor und W2-Professor der AG „Multiscale Bioengineering“ an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld. Seit 2022 W3-Professor für „Mikrosysteme in der Bioverfahrenstechnik“ am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).