

# **Strategien zur Kontrolle von Biofilmen**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Dipl.-Ing. Tanja Kleintschek  
aus Leonberg

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Obst

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Hintergrund und Zielsetzung.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Mikrobielle Biofilme .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Flüssigkeitsdurchdrungene PFPE-Oberflächen.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Pilzliche Exoprodukte.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor .....</b>	<b>10</b>
<b>2.6 Zielsetzung .....</b>	<b>12</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 Bakterien, Nährmedien und Biofilmanzucht .....	15
3.1.2 Biofilm-Plug Flow Reaktor für Oberflächenuntersuchungen .....	16
3.1.3 Untersuchung der primären Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> .....	18
3.1.4 Kristallviolett und Resazurin Assay .....	18
3.1.5 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) mit dem Plattengussverfahren .....	20
3.1.6 Wachstumscharakteristik .....	20
3.1.7 Agardiffusionstest nach Kirby-Bauer .....	21
3.1.8 Antibiogramm.....	21
3.1.9 Toxizitätstest .....	22
<b>3.2 Screening pilzlicher Fermentationsüberstände .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Kultivierungsbedingungen für die Biofilmanzucht.....	23
3.2.2 Screening pilzlicher Fermentationsüberstände .....	23
3.2.3 Reinigung von realen RO-Membranen mit pilzlichem Fermentations- überstand.....	24
<b>3.3 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford.....	25

---

3.3.2	Enzymaktivitätstests .....	25
<b>3.4</b>	<b>Mikroskopische Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	28
3.4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	29
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.5.1	RAPD-PCR .....	31
3.5.2	Populationsanalyse mittels PCR-DGGE .....	32
3.5.3	Ähnlichkeitsindex .....	36
<b>3.6</b>	<b>Oberflächencharakterisierung .....</b>	<b>37</b>
3.6.1	Statische Kontaktwinkelmessung.....	37
3.6.2	Dynamische Kontaktwinkelmessung (Kontaktwinkelhysterese).....	38
<b>3.7</b>	<b>Elektrochemische Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.7.1	Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von PFPE-Oberflächen auf die Biofilmbildung.....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Stabilität der PFPE-Oberflächen .....	41
4.1.2	Toxizitätstest der PFPE-Flüssigkeit .....	43
4.1.3	Biofilmbildung auf PFPE-Oberflächen.....	44
4.1.4	Einfluss von Mediumskomponenten auf die primäre bakterielle Adhäsion .....	46
4.1.5	Einfluss von nährstoffreichem Medium auf die bakterielle Adhäsion von PFPE-Oberflächen .....	47
4.1.6	Vergleich des primären Adhäsionsverhaltens von <i>P. aeruginosa</i> .....	49
4.1.7	Genetische Vielfalt von <i>P. aeruginosa</i> .....	50
4.1.8	Inkubation der PFPE-Oberflächen für 21 Tage in Abwasser .....	53
4.1.9	Kurzzusammenfassung .....	54
<b>4.2</b>	<b>Einfluss pilzlicher Fermentationsüberstände auf Biofilme .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	Populationszusammensetzung bakterieller Biofilme auf realen RO-Membranen .....	56
4.2.2	Etablierung eines Standard-Assays für das Screening pilzlicher Fermentationsüberstände .....	63

---

4.2.3	Ergebnisse des Screenings der pilzlichen Fermentationsüberstände.....	66
4.2.4	Charakterisierung des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands.....	71
4.2.5	Vergleich verschiedener Chargen des Fermentationsüberstands (F+++)	78
4.2.6	Kurzzusammenfassung .....	80
<b>4.3</b>	<b>Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor .....</b>	<b>81</b>
4.3.1	Einfluss von Biozid auf die Signalverläufe .....	84
4.3.2	Wirkung des Fermentationsüberstands auf die Signalverläufe .....	86
4.3.3	Kurzzusammenfassung .....	88
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
5.1	Prävention der primären bakteriellen Adhäsion .....	89
5.2	Schonende Reinigung von RO-Membranen .....	96
5.3	Überwachung der Biofilmentwicklung.....	101
5.4	Zusammenspiel dreier Strategien zur Kontrolle von Biofilmen.....	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung/ Summary .....</b>	<b>103</b>
6.1	Zusammenfassung .....	103
6.2	Summary .....	107
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>129</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol L <sup>-1</sup> )
3D	Dreidimensional
BHI	Brain Heart Infusion
BM2	Basal Medium 2
BMA	Butylmethacrylat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Ch	Charge
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTC	5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Dideoxyribonukleosidtriphosphat
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDMA	Ethylen-Dimethacrylat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ESEM	Environmental scanning electron microscope
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
kD	Kilodalton
KIT	Karlsruher Institut für Technologie

---

L	Liter
LB	Luria-Bertani
MDF-Platte	Mitteldichte Faserplatte
MEP	Malzextrakt-Pepton
MH	Müller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/L)
n.n.	Nicht nachweisbar
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEM	Proton Exchange Membrane
PFPE	Perfluorpolyether
PFR	Plug Flow Reaktor
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
RO	Reverse Osmosis
rpm	Revolutions per minute
s	Sekunde
SLIPS	Slippery Liquid-Infused Porous Surfaces
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Units
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
ZOI	Zone of inhibition

# 1 Einleitung

In nahezu allen wasserführenden technischen Systemen treten Bakterien nicht nur frei schwimmend in der wässrigen Phase auf, sondern kommen in großer Zahl sessil auf den Grenzflächen als Beläge, in sogenannten Biofilmen, vor. Schon 1933 beobachtete Henrici, dass die meisten Wasserbakterien nicht frei flotieren, sondern auf sich im Wasser befindenden Oberflächen wachsen [1]. Der Begriff „Biofilm“ wurde von dem amerikanischen Bakteriologen J. William Costerton im Jahr 1978 geprägt [2]. Biofilme sind die älteste und erfolgreichste Lebensform auf der Erde. Die in Australien gefundenen Stromatolithen sind versteinerte Bakterien in mineralisierten fossilen Biofilmen, die seit ungefähr 3,5 Milliarden Jahren existieren [3].

Von relevanter Bedeutung sind Biofilme für die menschliche Gesundheit, Lebensmittelhygiene, Umweltbiologie und vor allem für wasserführende technische Systeme [4]. Aus hygienischer Sicht sind Biofilme als Infektionsherd von Bedeutung, da sie einen geschützten Lebensraum für pathogene Krankheitserreger darstellen, die sich im Biofilm ansiedeln und sogar vermehren können [5]. Biofilme erschweren die Behandlung von chronischen Lungenentzündungen bei Patienten mit zystischer Fibrose [4]. Ebenfalls sehr gefährlich sind Biofilme in medizinischen Geräten und auf Implantaten [2, 5], da sie die Ursache für biofilmassoziierte Infektionskrankheiten sein können. Biofilme besiedeln z. B. künstliche Herzklappen, Katheter, Gelenk- und Gefäßprothesen, Implantate der Kiefer- und Gesichtschirurgie, Herzschrittmacher und Kontaktlinsen [2, 6-9]. Biofilme auf den Zähnen können zu Karies und Parodontitis führen [10].

Die unerwünschte Ausbildung mikrobieller Beläge wird dabei als Biofouling bezeichnet [11, 12]. Biofouling tritt in allen wasserführenden technischen Systemen auf und kann so zu erheblichen Problemen führen. Ein Beispiel ist der Bewuchs von Schiffsrümpfen, welcher zu Geschwindigkeitseinbußen führt und damit zusätzliche Kosten für Treibstoff verursacht [13]. In Reinstwasseranlagen können Biofilme zur Beeinträchtigung von Gewinnung, Aufbereitung, Transport, Lagerung und Nutzung von Wasser beitragen und somit auch eine Verschlechterung der Wasserqualität hervorrufen. Aufgrund der großen Tendenz von Bakterien zur Adhäsion auf Oberflächen kommt es nach wenigen Wochen in wasserführenden Kompartimenten regelmäßig zu einer persistierenden Besiedelung

mit unterschiedlichen bakteriellen Spezies [14]. Biofilme sind zudem in Membrananlagen, bei der Papierherstellung, bei der Nahrungsmittel- und Getränkeproduktion [15], in Kühltürmen und in Heizsystemen weit verbreitet. Dabei können sie Materialschäden durch mikrobielle Korrosion, Verblockung von Membranen, Effektivitätsminderung bei Wärmetauschern und Kontamination von Produkten verursachen [16]. So entstehen jährlich Kosten in Milliardenhöhen durch Einbußen in der industriellen Produktivität. Besonders RO-Membranverfahren (RO = Reverse Osmosis) reagieren sehr empfindlich auf Biofouling (Abb. 1.1). Anwendungen finden solche Membranen z. B. in der Trinkwasseraufbereitung, in der Meerwasserentsalzung und in der Abwasseraufbereitung. Mikroorganismen aus dem Rohwasser lagern sich auf den Membranen an und sekretieren dort extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), in die sich die Mikroorganismen einbetten.



Abb. 1.1. Verschmutzte RO-Membran aus der Industrie

Der Energiebedarf ist bei RO-Membranverfahren stark vom Widerstand der Membran abhängig. Die Folgen von Biofouling sind ein mitunter enormer Rückgang der Permeatleistung und -qualität, steigende Energiekosten, erhöhter Reinigungsaufwand, und eine kürzere Betriebsdauer der Membranen [17]. Die direkten und indirekten Kosten für Maßnahmen gegen Biofouling liegen bei etwa 30 % der Betriebskosten für RO-Membranprozesse. In der Praxis gehört Biofouling noch zu den am wenigsten beherrschten Problemen, dessen Bekämpfung derzeit überwiegend durch den Einsatz von Chemikalien, insbesondere von Bioziden, erfolgt. Die Effektivität solcher Strategien

ist jedoch häufig unzureichend und verursacht darüber hinaus eine erhöhte Belastung des Abwassers [18]. Durch den Einsatz von Bioziden können die Bakterien zwar abgetötet werden, verantwortlich für die Beläge auf den RO-Membranen ist aber die Anwesenheit der Biomasse und nicht die physiologische Aktivität der Biofilmbakterien. Darüber hinaus bietet tote Biofilmbiomasse eine günstige Aufwuchsfläche und ermöglicht eine lokale Anreicherung von abbaubarem organischem Material. Die Dosierung von Chemikalien stellt also keine Lösung für die Zukunft dar. Zunehmende Anforderungen an die Abwasserqualität machen eine Behandlung des Konzentrats erforderlich. Für die zusätzliche Reinigung von RO-Membranen werden bisher überwiegend chemische Reinigungsprozesse verwendet. Diese wirken sich jedoch oft schädigend auf das Membranmaterial aus und erfordern einen vorzeitigen Austausch der Membran [17]. Zudem verursachen die Biofilme auf den Membranen die Verkürzung des Zeitintervalls zwischen zwei Reinigungen.

Schließlich ist bislang noch kein Material bekannt, welches auf Dauer eine mikrobielle Besiedelung verhindert [19]. Um Biofouling entgegen zu wirken, ist daher die Entwicklung innovativer Strategien zur Kontrolle unerwünschter Biofilme unerlässlich.

## 2 Hintergrund und Zielsetzung

### 2.1 Mikrobielle Biofilme

Biofilme stellen eine mikrobielle Lebensgemeinschaft an Grenzflächen dar, eingebettet in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) [20, 21]. 99 % der Mikroorganismen auf der Erde leben in Biofilmen [22]. In unserer Umwelt sind Biofilme ubiquitär verbreitet und stellen eine spezielle, symbiotische Lebensform von Bakterien dar [4]. Nahezu alle Bakterienspezies können zusätzlich zur planktonischen Lebensform auf den unterschiedlichsten natürlichen und künstlichen Oberflächen Biofilme bilden. Es gibt Mikroorganismen, die an extreme Umweltbedingungen adaptiert sind, daher besiedeln Biofilme sogar scheinbar lebensfeindliche Habitate, wie z. B. schwefelhaltige heiße Quellen [23], hypersaline und saure Seen [24], Gletscher der Antarktis [25] und Wüsten [26].

Die Grundbedingungen für die Biofilmbildung sind die zum Wachstum erforderlichen Nährstoffe, eine Grenzfläche zu einer wässrigen Phase und die Bakterien selbst [8, 21]. Allerdings können eine Vielzahl von Faktoren, wie z. B. Temperatur, pH-Wert oder Oberflächenladung Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen [8, 27].

Das Leben in dieser symbiotischen strukturierten Gemeinschaft bietet entscheidende Vorteile gegenüber planktonischen Bakterien, beispielsweise die Fähigkeit der Biofilm-Matrix (EPS), Nährstoffe aus verdünnten Lösungen anzureichern. Darüber hinaus bietet der Biofilm Schutz vor pH-Extremen, Salzbelastungen, hydraulischen Belastungen, toxischen Metallionen durch deren Bindung an die EPS, Bioziden und Antibiotika sowie Immunabwehrmechanismen des Wirtsorganismus bei Infektionen [28, 29]. Die Wasser-rückhaltung der EPS bewirkt einen gewissen Schutz vor einer Austrocknung des Biofilms. Die für Biofilme typische hohe Zelldichte erlaubt den Informationsaustausch in Form von Gentransfer [30] oder mittels niedermolekularer Signalmoleküle, was in Populationen planktonischer Bakterien nicht möglich ist. Im direkten Vergleich der beiden Lebensformen zeigen sich Bakterien einer identischen Spezies in Biofilmen gegenüber Konzentrationen eines Antibiotikums, entsprechend der 1000-fachen minimalen Inhibitionskonzentration für planktonische Bakteriensuspensionen, noch als resistent [31]. Um zu überleben, können Biofilmbakterien in schlecht versorgten

Bereichen ihren Stoffwechsel inaktivieren bis hin zum Stadium sogenannter Persister-Zellen (stoffwechsellinaktive Dauerstadien) [32].

Besonderes Charakteristikum aller Biofilme ist neben der festen Anheftung an einen Ort ihr weitgehend strukturierter Aufbau [33, 34]. Biofilme bestehen bis zu 98 % aus Wasser, welches zusammen mit der EPS eine schleimige Matrix bildet. Darüber hinaus können exogene partikuläre organische und anorganische Materialien und gelöste Stoffe eingelagert sein [35]. Biofilme sind durchzogen von Tunneln, über die Wasser und Nährstoffe alle Regionen im Biofilm erreichen können. Nährstoffe und Stoffwechselprodukte werden über Diffusion innerhalb des Biofilms transportiert [36, 37]. Im Biofilm wechseln sich aerobe und anaerobe Zonen sowie nährstoffreichere und nährstoffärmere Bereiche ab.

Für die Biofilmentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* sind anhand von Proteomuntersuchungen fünf regulierte, aufeinanderfolgende Entwicklungsstufen erkennbar [38, 39]. In Abb. 2.1 ist der charakteristische Verlauf einer Biofilmentwicklung auf Oberflächen dargestellt, der für die Mehrzahl der Prokaryoten gilt [40]. Die Entstehung von mikrobiellen Biofilmen beginnt durch den Kontakt von der zu besiedelnden Oberfläche und dem umgebenden Medium. Auf den Oberflächen bildet sich ein sogenannter „Conditioning Film“ aus organischen und/oder anorganischen Substanzen [41]. Bei der primären Adhäsion kommt es zur reversiblen Interaktion zwischen Bakterien und einer Oberfläche. Die Oberflächenbeschaffenheit der Bakterien und der Oberfläche nehmen Einfluss auf diesen Prozess. Diese reversible Adhäsion (Abb. 2.1A) planktonischer Bakterien an eine Oberfläche kann durch zufällige Kollision oder durch aktive Bewegung hervorgerufen werden. Bei diesem Prozess wirken verschiedene Kräfte auf die Bakterien. Generell spielen Van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle [8, 21]. Der Kontakt zwischen Bakterium und Oberfläche wird intensiviert, dies geschieht durch Veränderungen der Struktur der Zelloberfläche bzw. durch Ausbildung von spezifischen Adhäsionsproteinen, Flagellen oder Pili [42, 43]. Anschließend folgt die irreversible Adhäsion (Abb. 2.1B). Zeitgleich beginnen die Bakterienzellen extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), wie Polysaccharide, Proteine oder extrazelluläre DNA zu sekretieren und Mikrokolonien auszubilden (Abb. 2.1C). Der Biofilm reift und bildet 3D-Architekturen aus (Abb. 2.1D).

Abhängig von den Umgebungsbedingungen, kann die Dicke des Biofilms wenige Mikrometer bis mehrere Zentimeter betragen. Mit zunehmendem Wachstum und zunehmender Reifung kommt der Biofilm in die Plateau-Phase. In dieser Phase befinden sich die Dispersion von Subpopulationen (Abb. 2.1E) aus dem reifen Biofilm und der Zuwachs an neuen Bakterien im Gleichgewicht [44].

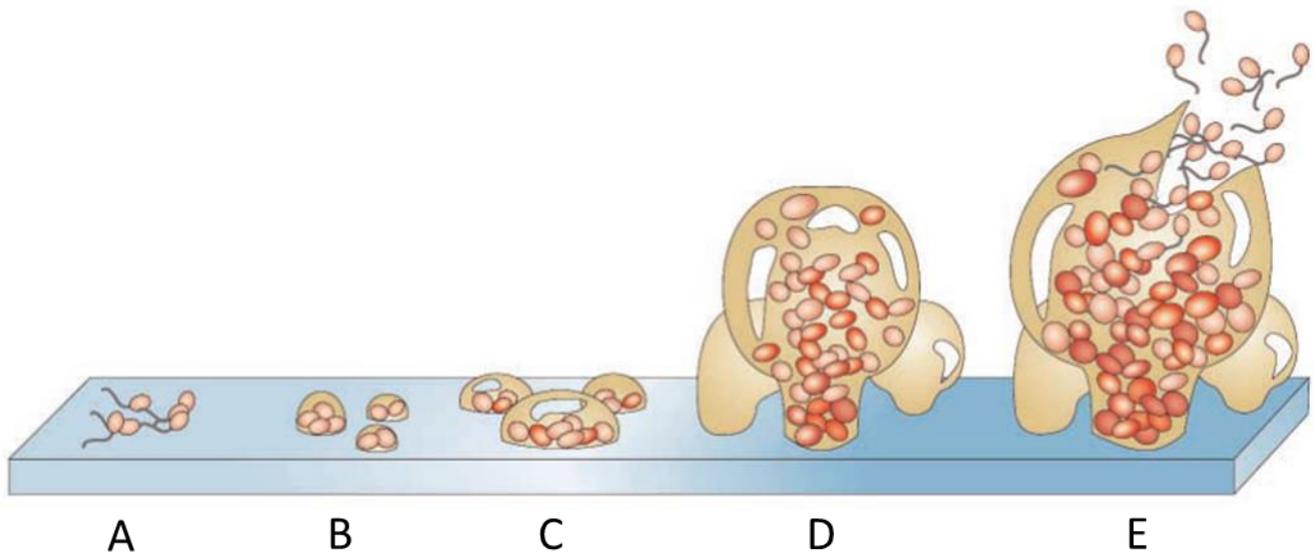


Abb. 2.1. Schematischer Verlauf einer Biofilmentwicklung. (A) Primäre reversible Adhäsion; (B) irreversible Adhäsion; (C) Sekretion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) und Bildung von Mikrokolonien (D) Biofilmwachstum und Ausbildung von 3D-Architekturen; (E) Freisetzung von Bakterienzellen aus dem reifen Biofilm [45]

## 2.2 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Die EPS bilden eine starke hydratisierte Gelmatrix, die am Zusammenhalt der Biofilmorganismen und bei der Entwicklung, der Differenzierung und der Ausbildung der 3D-Struktur von Biofilmen beteiligt ist [46]. Die EPS ermöglichen auch die Haftung der Biofilme an Oberflächen [21]. Darüber hinaus stellen die EPS eine Schutzbarriere für Mikroorganismen dar, wodurch sich deren Toleranz gegenüber Bioziden, Schwermetallen, organischen Schadstoffen, hydraulischen Belastungen, pH-Schwankungen und osmotischem Stress erhöht [47]. Durch die Rückhaltung von Wasser schützt die EPS den Biofilm vor einer möglichen Austrocknung. Weiterhin wird

auch die Fixierung und Stabilisierung extrazellulärer Enzyme in der Biofilm-Matrix ermöglicht. Etwa 50 bis 90 % des gesamten organischen Kohlenstoffs in Biofilmen sind auf die EPS zurückzuführen [21, 37, 48]. Die EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden [49] und Proteinen, aber auch aus anderen Makromolekülen wie Phospholipiden und Nukleinsäuren [50-52]. Es kommen Homopolysaccharide vor, die nur aus neutralen Bausteinen (Glucose, Fructose) z. B. Mutan, Curdlan, Dextran, Cellulose, oder nur aus anionischen Bausteinen (Uronsäuren), dazu gehören z. B. Alginate, bestehen. Ebenso können Heteropolysaccharide vorkommen, diese bestehen aus neutralen und anionischen Bausteinen, wie z. B. Xanthan, die in Form von Wiederholungseinheiten (von 4-8 Zuckern) zusammengesetzt sind [37]. Außerdem beeinflussen geladene Gruppen in bakteriellen Polymeren (Carboxylgruppen von Uronsäuren) sowie Substituenten (Acetylgruppen in Polysacchariden) die physikalisch-chemischen Eigenschaften (Festigkeit, Viskosität, Wasserbindungskapazität, Bindung von anorganischen Ionen) der EPS. Di- und trivalente Kationen (beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der EPS-Matrix, sie können Carboxylgruppen der Zuckersäuren in Polysacchariden verbrücken [21].

Polymere können durch verschiedene Mechanismen in die Biofilm-Matrix gelangen. Mögliche Mechanismen hierfür sind aktive Sekretion, Ablösen von Bestandteilen der äußeren Zellmembran oder Lysis. Darüber hinaus können in Biofilmen aus der Umwelt neben den Biopolymeren auch andere polymere Moleküle wie z. B. Huminstoffe in die EPS akkumuliert werden [53]. Die EPS-Matrix ist heterogen aufgebaut und ihre Bestandteile können stark variieren, abhängig von der Populationszusammensetzung des Biofilms, unter welchen Nährstoffbedingungen sie sich befinden und welche hydrodynamischen Bedingungen vorliegen [21, 54]. Außerdem besitzt die EPS-Matrix sorptive Eigenschaften und kann daher Nährstoffe akkumulieren [37]. Der Zusammenhalt der EPS-Matrix beruht auf schwachen physikalisch-chemischen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Dispersionswechselwirkungen und elektrostatischen Wechselwirkungen [37].

### 2.3 Flüssigkeitsdurchdrungene PFPE-Oberflächen

In den letzten Jahrzehnten wurde viel an der Entwicklung von Oberflächenbeschichtungen zur Prävention vor Biofilmentwicklung gearbeitet [55]. So wurden z. B. Beschichtungen entwickelt, die aktiv antibakterielle Substanzen, wie Antibiotika [56-58], Silbernanopartikel [59], oder bakterielle Antikörper [60] abgeben. Der Vorteil von solchen Oberflächen ist die Abgabe der antibakteriellen Substanz direkt von der Oberfläche. Nachteilig wiederum ist, dass die Abgabe eher unkontrolliert abläuft und mit der Zeit abnimmt. Eine weitere Strategie basiert auf den bakteriellen Resistenzeigenschaften von z. B. hydrophilen Polymeren wie Polyethylenglycol [61], oder von passiven antibakteriellen Oberflächen mit toxischen Materialien [62, 63] wie z. B. Chitosan [64] oder antimikrobielle Peptide [65].

Die Anpassung und Übertragung von Phänomenen aus der Natur auf technische Anwendungen wird als Biomimetik bezeichnet. Zu einem der bisher bekanntesten Beispiele für biomimetrische Forschung zählen selbstreinigende Oberflächen basierend auf dem Lotus-Effekt. Anwendungen sind z. B. selbstreinigende Fenster, Fassadenanstriche und die Beschichtung von Textilien. Die strukturelle Grundlage des Selbstreinigungseffektes, inspiriert durch die Lotusblume, basiert auf der Kombination aus hydrophoben Materialien und einer geeigneten Mikro- und/oder Nanostruktur [66]. Nachteilig ist, dass der Lotus-Effekt schlecht bei fettlöslichen Substanzen sowie unter erhöhtem Druck und nach Beschädigung funktioniert. Außerdem sind diese Oberflächen teuer in der Herstellung.

Epstein *et al.* [67] entwickelten sogenannte „Slippery Liquid-Infused Porous Surfaces“ (SLIPS), die nach den physikalisch-chemischen Prinzipien der fleischfressenden Kannenpflanzen funktionieren. Diese Pflanzen verfügen über extrem glatte Fangblätter. Insekten können sich weder mit ihren Hafthaaren noch mit ihren ölprägnierten Fußpolstern festhalten [68-70]. Im Gegensatz zum Lotus-Effekt ist nicht die Mikrostruktur der Oberfläche direkt am abweisenden Effekt beteiligt. Stattdessen dient diese nur dazu, die Gleitflüssigkeit festzuhalten.

In dieser Arbeit wurden neue flüssigkeitsdurchdrungene PFPE-Oberflächen auf ihre Eigenschaften zur Prävention von bakterieller Adhäsion untersucht. In Kooperation mit der Gruppe um Pavel A. Levkin (ITG, KIT) wurden diese innovativen flüssigkeitsdurchdrungenen PFPE-Oberflächen hergestellt [71], die ebenfalls auf den Prinzipien der

fleischfressenden Kannenpflanze beruhen. Als poröses Grundmaterial dienten Butylmethacrylat-Ethylen-Dimethacrylat (BMA-EDMA) Polymeroberflächen auf Glassubstraten [72, 73]. Diese makroporösen Polymeroberflächen wurden mit einer Perfluorpolyether-Gleitflüssigkeit (PFPE), Dupon Krytox<sup>®</sup> GPL 103 (H. Costenoble GmbH & Co. KG, Eschborn, Deutschland), überzogen. PFPEs sind synthetische makromolekulare Öle, die, wie in Abb. 2.2 gezeigt, ausschließlich aus C-, F- und O-Atomen aufgebaut sind. Aufgrund der hohen Stabilität der C-F-Bindung sind sie hochbeständig gegen chemische, thermische und biologische Zersetzung [74]. Weitere Eigenschaften umfassen eine hohe Dichte, eine geringe Oberflächenspannung (ungefähr  $20 \text{ mN m}^{-1}$  bei  $20 \text{ °C}$ ), ein gutes Benetzungsvermögen und einen geringen Dampfdruck [75-78]. PFPEs wurden bisher überwiegend beispielsweise als Schmierstoffe und als Hydrauliköle eingesetzt [76].

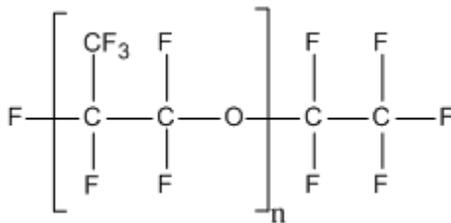


Abb. 2.2. Aufbau von Perfluorpolyethern (PFPE)

## 2.4 Pilzliche Exoprodukte

Pilzliche Exoprodukte haben in der Medizin und in anderen Bereichen eine große Bedeutung. Zu den bekanntesten pilzlichen Exoprodukten gehört das Penicillin. Die Entdeckung erfolgte 1928 durch Alexander Fleming. Er beobachtete Wachstumshemmungen von Staphylococccen auf Nähragarplatten, diese waren mit dem Schimmelpilz *Penicillium* kontaminiert. So wie dieses Antibiotikum entstammen ungefähr ein Viertel der bekannten Antibiotika dem Stoffwechsel von Pilzen [79].

Auf Grundlage dieses vielversprechenden Potentials von pilzlichen Exoprodukte wurden in dieser Arbeit Fermentationsüberstände von unterschiedlichen Pilzen bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung untersucht.

## 2.5 Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor

In technischen Systemen ist die Anwesenheit von Biofilmen in der Regel nur indirekt erkennbar, beispielsweise wenn sich die Betriebsparameter der Anlage verändern. Um Biofouling festzustellen, werden gewöhnlich nur Wasserproben entnommen. Anhand von Zellzahlen in der Wasserphase können jedoch keine Aussagen über Anwesenheit, Ort und Ausmaß von Biofilmen getroffen werden, denn vom Biofilm werden nur unregelmäßig und wenig voraussagbar Bakterien an die Wasserphase abgegeben.

Darüber hinaus erfolgt die Kontrolle und Überwachung der Biofilmentwicklung derzeit oft mit destruktiven Endpunkt-Analysen. Beispiele dafür sind folgende:

- Optische Analysen über Konfokalmikroskopie mittels fluoreszenzmarkierter DNA
- Gravimetrische Analysen, beispielsweise mithilfe von Quarzkristall-Mikrowaagen

Für RO-Membransysteme gilt: Sobald die Permeatleistung unter eine definierte Toleranzgrenze fällt, wird Biofouling dafür verantwortlich gemacht. Doch in der Regel existiert der Biofilm bereits deutlich vorher. Um zeitig entgegen wirken zu können, ist es daher wichtig, das Ausmaß der Biofilmentwicklung mit einem entsprechenden Frühwarnsystem zu erkennen und dann unter der Toleranzgrenze zu halten.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Gruppe um Bastian E. Rapp (IMT, KIT) ein neu entwickelter Biofilmsensor zur online-Messung der adhärennten Biofilmbiomasse und der Biofilmaktivität in Betrieb genommen. Er basiert auf zwei Messprinzipien:

1. Die Messung der Biofilmbiomasse erfolgt mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie. Die Impedanz als komplexe Größe kann nach Lvovich [80] als komplexer Widerstand aufgefasst werden, wenn Strom durch Stromkreise mit Widerständen, Kondensatoren und Spulen fließt. Sie ist der Quotient aus komplexer Wechselspannung und komplexem Wechselstrom entsprechend Gl. 1. Der Betrag der Impedanz wird als Wechselstromwiderstand bezeichnet [81].

$$\underline{Z} = \frac{\underline{U}(f)}{\underline{I}(f)} \quad \text{Gl. 1}$$

Bei der Impedanzspektroskopie wird die durch Bildung von Biofilmen auf den Elektroden zunehmende Hemmung des Ladungsträgeraustausches einer Elektrode mit dem

umgebenden Medium gemessen. Dadurch ändern sich der Durchtrittswiderstand und die Oberflächenkapazität, was zur Veränderung sowohl des realen als auch des imaginären Anteils der Impedanz führt. Weitere Details zur Impedanzspektroskopie und deren Anwendungen können beispielsweise Lvovich [80] entnommen werden.

2. Die Messung der Biofilmaktivität erfolgt mit der elektrochemischen Amperometrie. Bei dem auf dem elektrochemischen Messprinzip basierenden Sensor korreliert die Atmungsaktivität der Bakterien mit einem messtechnisch erfassbaren Strom [82].

## 2.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen drei innovative Strategien (Abb. 2.3) mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur Kontrolle von Biofilmen untersucht werden. Strategie 1 soll die Entstehung eines Biofilms verhindern. Strategie 2 soll zum Einsatz kommen, wenn bereits ein Biofilm vorhanden ist. Strategie 3 befasst sich mit der Überwachung der kompletten Biofilmentwicklung von der primären Adhäsion bis hin zum reifen Biofilm.

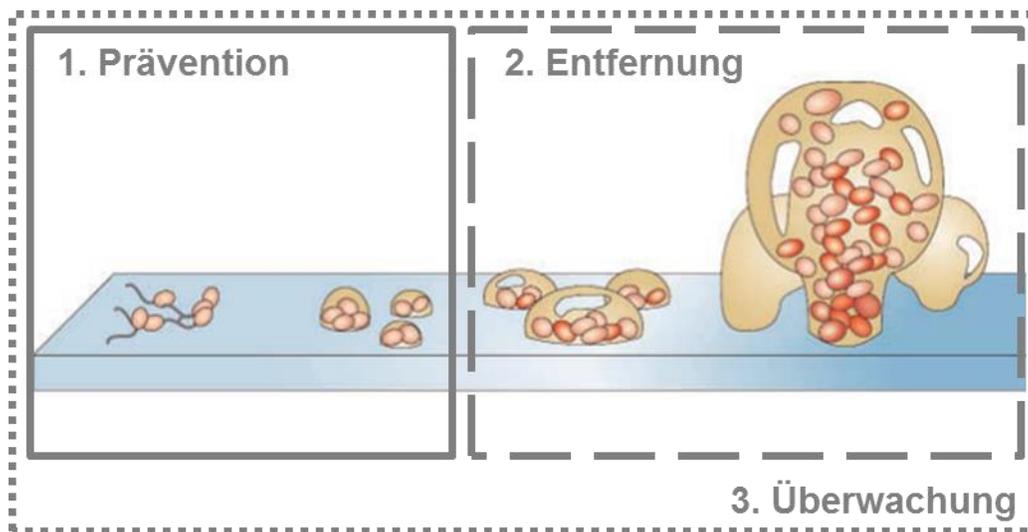


Abb. 2.3. Strategien zur Kontrolle von Biofilmen: 1. Prävention der primären bakteriellen Adhäsion; 2. Schonende Biofilmentfernung; 3. Überwachung der Biofilmentwicklung (bearbeitet nach [45])

### 1. Prävention der primären bakteriellen Adhäsion

Der Ansatz zur Prävention der bakteriellen Adhäsion basiert auf der Beschichtung von porösen Polymeroberflächen mit PFPE-Flüssigkeit (PFPE = Perfluorpolyether). Um die Eignung dieser flüssigkeitsdurchdrungenen PFPE-Oberflächen für die spätere Anwendung beurteilen zu können und um die Versuchsergebnisse interpretieren zu können, sind verschiedene Voruntersuchungen notwendig:

- Untersuchung der PFPE-Oberflächen hinsichtlich Stabilität in wässrigem Milieu
- Überprüfung der PFPE-Flüssigkeit auf Toxizität gegenüber Bakterien
- Einfluss von Mediumskomponenten auf die bakterielle Adhäsion bei den PFPE-Oberflächen

Nach diesen wichtigen Voruntersuchungen kann die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion mit verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Umweltisolaten auf den flüssigkeitsdurchdrungenen PFPE-Oberflächen erfolgen. Zur Beurteilung möglicher Unterschiede in der bakteriellen Adhäsion muss des Weiteren die genetische Vielfalt der untersuchten *P. aeruginosa* Umweltisolate aufgezeigt werden. Schließlich können die PFPE-Oberflächen im Abwasser getestet werden, um deren Wirkung bei Anwesenheit natürlicher Bakterienpopulationen zu testen.

## **2. Schonende Biofilmentfernung von RO-Membranen**

Der zweite Ansatz umfasst die Entwicklung einer innovativen und schonenden Reinigungsstrategie für RO-Membranen (RO = Reverse Osmosis). Dazu müssen zunächst die Biofilmpopulationen auf industriell genutzten und mit Belägen verschmutzten RO-Membranen ermittelt werden. In einem zweiten Schritt werden pilzliche Fermentationsüberstände bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung gescreent. Dafür wurden von der BASF SE 406 Fermentationsüberstände zur Verfügung gestellt. Für das Screening der pilzlichen Fermentationsüberstände muss ein Standard-Assay etabliert werden. Schließlich kann der pilzliche Fermentationsüberstand mit der stärksten biofilmentfernenden Wirkung in Bezug auf Wirkprinzip und zur Identifikation der für die Wirkung verantwortlichen Exoprodukte charakterisiert werden.

## **3. Überwachung der Biofilmentwicklung**

Um beim Auftreten von Biofouling rechtzeitig Gegenmaßnahmen einleiten zu können, ist schließlich ein Frühwarnsystem wichtig. Dies kann mit einem am KIT neuentwickelten mikrofluidischen Biofilmsensor erfolgen, der sowohl die Biofilmbiomasse über Impedanzspektroskopie als auch die Biofilmaktivität über Amperometrie erfasst. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Inbetriebnahme und Charakterisierung dieses Biofilmsensors. Um die Funktionalität des mikrofluidischen Biofilmsensors aufzuzeigen, müssen zunächst Biofilme angezüchtet und das Messsignal des Sensors auf Plausibilität geprüft werden. In einem zweiten Schritt werden die Biofilme mit Biozid behandelt, um die Bakterien im Biofilm abzutöten. Auch diese Daten sind zur Beurteilung des Sensors wichtig.

---

Schließlich kann bei erfolgreicher Inbetriebnahme des mikrofluidischen Biofilmsensors die biofilmentfernende Wirkung des unter „2. Schonende Biofilmentfernung“ identifizierten pilzlichen Fermentationsüberstands verifiziert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Bakterien, Nährmedien und Biofilmanzucht

##### Bakterien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienisolate sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Aufgrund der enormen physiologischen Vielseitigkeit des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* und der Fülle an verfügbaren Daten gilt dieses Bakterium derzeit als populärster Modellorganismus und wurde daher in dieser Arbeit zur Untersuchung von Biofilmen verwendet.

Tab. 3.1. Überblick über die verwendeten Bakterienisolate

Bakterienisolat	Eigenschaft	Referenz bzw. Herkunft
<i>P. aeruginosa</i> PA30	Gram-negativ	Krankenhausabwasser [83]
<i>P. aeruginosa</i> PA910	Gram-negativ	Krankenhausabwasser [83]
<i>P. aeruginosa</i> PA49	Gram-negativ	Kläranlagenzulauf [83]
<i>P. aeruginosa</i> PA14; DSM 19882	Gram-negativ	DSMZ
<i>P. aeruginosa</i> ; DSM 1117	Gram-negativ	DSMZ
Abwasser	Gemischte Populationen	Kläranlagenzulauf (Karlsruhe-Neureut)

Alle verwendeten Bakterienisolate lagen in Glycerinkulturen (25 % Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)) bei -80 °C vor. Die Abwasserproben wurden direkt vor der Verwendung aus der Kläranlage entnommen.

## Nährmedien und Bakterienanzucht

Für die Anzucht und den Nachweis der Bakterien bzw. Biofilme wurden folgende Nährmedien (Tab. 3.2) verwendet.

Tab. 3.2. Überblick über die verwendeten Nährmedien und -agars zur Bakterien- bzw. Biofilmanzucht

Nährmedium oder -agar	Zusammensetzung
BM2-Mineralmedium (Basal Medium 2)	62 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7), 7 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 µM FeSO <sub>4</sub> , 0,4 % (w/v) Glucose
BM2-Agar	Zugabe von 15 g L <sup>-1</sup> Agar-Agar <sup>1</sup>
TSB-Medium (Tryptic Soy Broth)	Fertignährmedium <sup>2</sup>
BHI-Medium (Brain Heart Infusion)	1:4 mit dH <sub>2</sub> O verdünnt; Fertignährmedium <sup>1</sup>
LB-Medium (Luria-Bertani)	Fertignährmedium <sup>2</sup>
MH-Medium (Müller-Hinton)	Fertignährmedium <sup>1</sup>
MH-Agar	Fertignähragar <sup>1</sup>
MEP-Medium (Malzextrakt-Peptone)	Fertignährmedium <sup>3</sup>
Cetrimid-Agar	Fertignähragar <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Merck, Darmstadt, Deutschland

<sup>2</sup> Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

<sup>3</sup> verwendet von der BASF SE zur Fermentation der Pilze

Für die Bakterien- bzw. Biofilmanzucht erfolgte zunächst die Herstellung von Übernachtskulturen bei 37 °C oder Raumtemperatur und bei 170 rpm. Damit sich die Bakterienkulturen für die Biofilmanzucht in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wurden die Kulturen einige Stunden vor Versuchsbeginn mit sterilem Medium verdünnt.

### 3.1.2 Biofilm-Plug Flow Reaktor für Oberflächenuntersuchungen

Die Charakterisierung der Biofilmbildung auf den generierten PFPE-Oberflächen erfolgte in Biofilm-Plug Flow Reaktoren (Biofilm-PFR). Verwendet wurde eine laborinterne Reaktoreigenkonstruktion bestehend aus einer Reaktorröhre (Kammerdimensionen: Reaktorlänge: 29,0 cm; Innendurchmesser: 4,6 cm) und einer Halterung für die zu untersuchenden Oberflächen (Abb. 3.1).

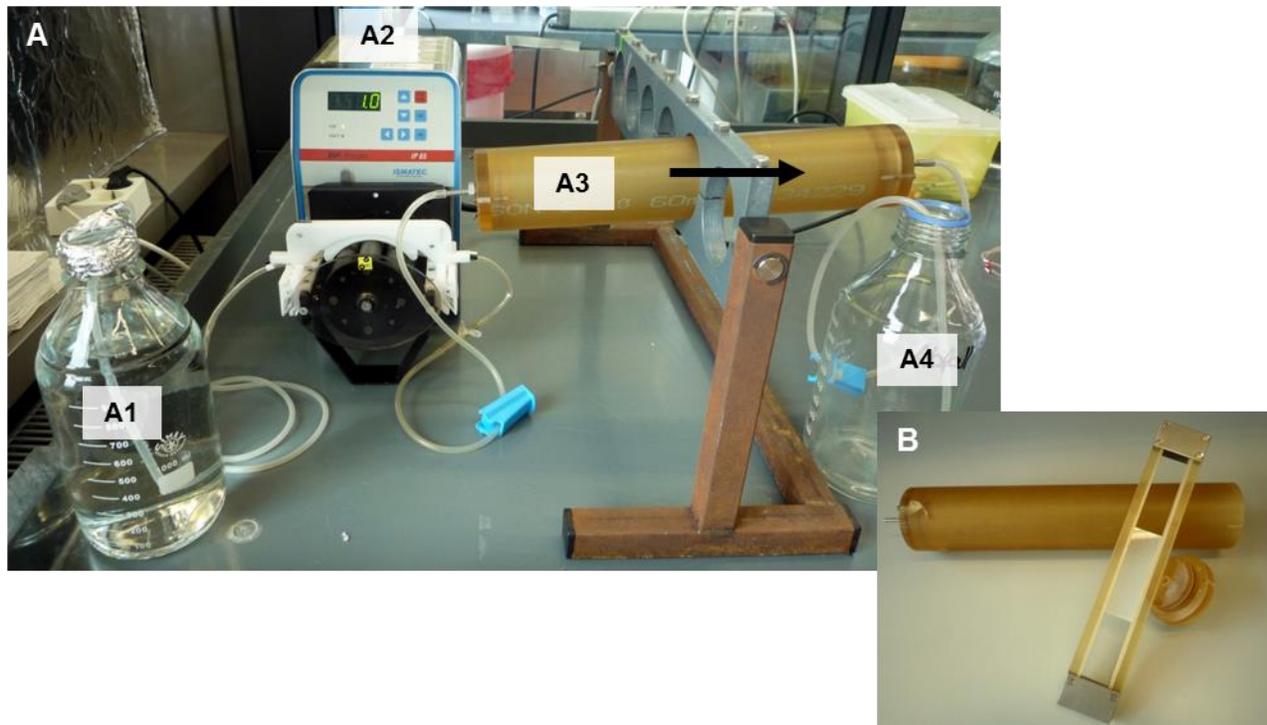


Abb. 3.1. Biofilm-PFR zur Oberflächenuntersuchung. (A) Versuchsaufbau mit (A1) Mediumreservoir, (A2) peristaltischer Pumpe, (A3) Röhrenreaktor und (A4) Abfallgefäß. (B) Reaktorgehäuse mit Reaktordeckel und Halterung für Oberflächen in Objektträgergröße

Für den Betrieb des Biofilmreaktors wurden Bakteriensuspensionen ( $\sim 10^8$  KBE mL<sup>-1</sup>) von Übernachtskulturen der *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910 oder PA49 hergestellt. Anschließend wurden die Testoberflächen mit Hilfe der Halterung (Abb. 3.1B) im Biofilm-PFR platziert. Unbeschichtete Glasoberflächen und/oder unbeschichtete poröse Polymeroberflächen wurden bei jedem Versuch als Kontrolle mitgeführt. Nach einer statischen Inkubation von 1 h wurde der Biofilm-PFR mit einer kontinuierlichen Flussrate von 0,94 mL min<sup>-1</sup> für 7 oder 14 Tage bei Raumtemperatur betrieben. Nach der Inkubation wurden die Testoberflächen aus dem Biofilm-PFR entnommen und in sterilem Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris; pH 8,0) gewaschen, um lose Bakterien zu entfernen. Anschließend erfolgte die mikroskopische Charakterisierung der Oberflächen (Kap. 3.4.1).

### **Einfluss von Mediumskomponenten auf die primäre bakterielle Adhäsion**

Um zu überprüfen, ob es zur Adhäsion von Mediumskomponenten aus dem nährstoffreichen Medium und damit zur Ausbildung eines „Conditioning Films“ auf den

PFPE-Oberflächen kommt, wurden diese für 48 h in 1:4 verdünntem BHI-Medium vorinkubiert. Anschließend wurden diese Oberflächen, wie zuvor beschrieben, mit BM2-Mineralmedium für 7 Tage im Biofilm-PFR getestet.

### **Oberflächenuntersuchung in Abwasser**

Darüber hinaus wurden die PFPE-Oberflächen in natürlichem Abwasser getestet. Hierfür wurden die Testoberflächen für 21 Tage im Biofilm-PFR mit einer kontinuierlichen Flussrate von  $0,94 \text{ mL min}^{-1}$  mit Abwasser überströmt. Anschließend wurden die Oberflächen, wie zuvor beschrieben, aus dem Biofilm-PFR entnommen und mikroskopisch charakterisiert (Kap. 3.4.1).

### **3.1.3 Untersuchung der primären Adhäsion von *P. aeruginosa***

Zur Untersuchung der primären Adhäsion von *P. aeruginosa* PA14, PA30, PA910 und PA49 wurden Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte (OD600) von 1,0 in BM2-Mineralmedium oder in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium hergestellt. 15 mL der Bakteriensuspensionen wurden in Petrischalen gegeben und für 1 h, 2 h oder 3 h bei 37 °C und leichtem Schütteln (50 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die adhärennten Bakterien mit Kristallviolett (Kap. 3.1.4) angefärbt.

### **3.1.4 Kristallviolett und Resazurin Assay**

#### **Kristallviolett Assay**

Zur Quantifizierung der Biofilmbiomasse wurde ein Kristallviolett Assay etabliert. Hierfür wurde die Biomasse mit einer Kristallviolettlösung angefärbt und anschließend wurde der Farbstoff herausgelöst und quantifiziert. Kristallviolett färbt die Biofilmbiomasse durch Bindung an negativ geladene Oberflächenmoleküle und an Polysaccharide in der extrazellulären Matrix reifer Biofilme [84].

Der im Folgenden beschriebene Kristallviolett Assay gilt für Biofilme in 96-well Mikrotiterplatten (Polystyrol; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Für die Färbung der Biofilmbiomasse wurde in jede Kavität 100  $\mu\text{L}$  einer 0,05%-igen

Kristallviolettlösung (Gram's Crystal Violet Solution; Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurden die Biofilme anschließend vorsichtig dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Der im Biofilm gebundene Kristallviolettfarbstoff wurde herausgelöst, indem in jede Kavität 200 µL 33%-ige Essigsäure gegeben wurde. Nach einer Inkubation von weiteren 10 min bei Raumtemperatur wurde von dem herausgelösten Farbstoff in einer neuen 96-well Mikrotiterplatte eine 1:2 Verdünnung (mit 33%-iger Essigsäure) hergestellt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Mikrotiterplatten-Reader (Tecan Infinite 200 PRO, Crailsheim, Deutschland).

Vor der Durchführung des Kristallviolett Assays wurde die Kristallviolettkonzentration bestimmt. Hierfür wurden *P. aeruginosa* PA49-Biofilme für 15 h bei 37 °C und leichtem Schütteln (50 rpm) angezüchtet. Der Überstand wurde vorsichtig nach der Inkubation entnommen und die Biofilme auf dem Boden der Kavitäten einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Färbelösung hergestellt. Hierfür wurde aus einer Kristallviolett-Stocklösung mit einer Konzentration von 2 % eine zweifache Verdünnungsreihe mit dH<sub>2</sub>O hergestellt. Danach wurden 100 µL pro Verdünnung auf die einzelnen Biofilme gegeben. Die nachfolgenden Schritte wurden, wie zuvor beschrieben, durchgeführt.

### **Resazurin Assay**

Resazurin ist ein blauer Redoxindikator, der von metabolisch aktiven Bakterien in Biofilmen irreversibel zum rosafarbenen fluoreszierenden Resorufin reduziert wird [85]. Die hierbei entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen.

Der Resazurin Assay erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten (Polystyrol; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Nach Behandlung der Biofilme wurden diese zweimal mit 0,89 % NaCl gewaschen. In jede Kavität wurden 100 µL 0,89 % NaCl und 20 µL Resazurin (CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay; Promega, Mannheim, Deutschland) gegeben und für 60 min bei 37 °C und leichtem Schütteln (50 rpm) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz (Ex: 544 nm, Em: 612 nm) am Fluorometer

(Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

### **3.1.5 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) mit dem Platten-gussverfahren**

Zur Bestimmung der Anzahl an kultivierbaren Bakterien wurden die KBE ermittelt. Ausgehend von der zu untersuchenden Bakteriensuspension wurde in sterilem Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris; pH 8,0) eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt. Von ausgewählten Verdünnungsstufen wurden im Dreifachansatz je 150  $\mu\text{L}$  in eine sterile Petrischale pipettiert. Cetrimid-Agar wurde hierbei als selektives Wachstumsmedium für Pseudomonaden verwendet. Der Agar wurde im Dampftopf bei 99 °C geschmolzen und anschließend im Wasserbad auf ca. 50 °C abgekühlt. Der Agar wurde in die Petrischale gegossen und durch Kreisen mit der Bakteriensuspension vermischt. Nach Aushärten der Platten bei Raumtemperatur wurden diese für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Aus den Dreifachansätzen wurde durch Bildung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Bakterienzahl der Ausgangssuspension in KBE  $\text{mL}^{-1}$  bestimmt.

### **3.1.6 Wachstumscharakteristik**

Die Wirkung des pilzlichen Fermentationsüberstands wurde untersucht, indem das Wachstum von *P. aeruginosa* PA49 in Fermentationsüberstand mit dem Wachstum in MEP-Medium verglichen wurde. Übernachtkulturen in BM2-Mineralmedium wurden abzentrifugiert und in die entsprechenden Medien aufgenommen und anschließend auf eine optische Dichte (OD<sub>595</sub>) von 0,1 mit sterilem Medium verdünnt.

Jeweils 200  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspensionen wurden in Triplikaten in 96-well Mikrotiterplatten (Polystyrol; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) gegeben und dienten als Start zur Erstellung der Wachstumskurven. Alle 30 min wurde die optische

Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm bei 37 °C und leichtem Schütteln (50 rpm) im Mikrotiterplatten-Reader (Tecan Infinite 200 PRO, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

### 3.1.7 Agardiffusionstest nach Kirby-Bauer

Der Agardiffusionstest nach Kirby-Bauer wird standardmäßig in der Routinediagnostik verwendet, um die Empfindlichkeit von Bakterienstämmen gegenüber Antibiotika zu bestimmen. Eine Inhibitionszone (ZOI), in der mikrobielles Wachstum verhindert wird, zeigt die Effizienz gegenüber antimikrobiellen Substanzen an.

Anhand des Agardiffusionstests soll überprüft werden, ob sich antimikrobielle Wirkstoffe in den Fermentationsüberständen befinden. Als Referenzstamm wurde *P. aeruginosa* PA49 verwendet. Eine Übernachtskultur wurde 1:1000 mit MH-Medium verdünnt und homogen auf MH-Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurden 100 µL des pilzlichen Fermentationsüberstands in vorgestanzte Löcher gegeben und die Agarplatten für 18 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine visuelle Auswertung von Dreifachansätzen durch Bestimmung der Inhibitionszone.

### 3.1.8 Antibiogramm

Um Unterschiede zwischen den *P. aeruginosa* Stämmen PA14, PA30, PA910 und PA49 aufzuzeigen, wurde ein Antibiogramm nach der Plattendiffusionsmethode in Anlehnung an die Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) erstellt. Hierfür wurden die Teststämme mit einem Wattetupfer auf MH-Agar ausplattiert. Auf diese Agarplatten wurden in Triplikaten jeweils mit verschiedenen Antibiotika versetzte Filterplättchen (BD Sensi-disc; BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) gelegt. Die getesteten Antibiotika sind in Tab. 3.3 aufgelistet. Die Agarplatten wurden bei 37 °C inkubiert. Nach 18 h Stunden ließen sich um einige der Antibiotikaplättchen Hemmhöfe erkennen, deren Durchmesser (in mm) gemessen wurde. Anhand der Hemmhofgröße wurden die Stämme in sensitiv ( $\geq 15$  mm), intermediär (13-14 mm) und resistent ( $\leq 12$  mm) eingeteilt.

Tab. 3.3. Überblick über die getesteten Antibiotika

Antibiotika	Abkürzung	µg/Plättchen
Gentamicin	GM	10
Ciprofloxacin	CIP	5
Imipenem	IPM	10
Ceftazidime	CAZ	30
Amikacin	AN	30
Azlocillin	AZ	75
Piperacillin/Tazobactam	PT	100/10

### 3.1.9 Toxizitätstest

Um zu zeigen, dass die Verhinderung der Biofilmbildung durch die PFPE-Oberflächen nicht auf Toxizitätseffekte der PFPE-Flüssigkeit zurückzuführen ist, wurde der Einfluss der PFPE-Flüssigkeit auf das Bakterienwachstum getestet. In einer Mikrotiterplatte (Polystyrol; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) wurde eine zweifache Verdünnungsreihe der PFPE-Flüssigkeit (höchste Konzentration der PFPE-Flüssigkeit 12,5 %) mit sterilem Milli-Q H<sub>2</sub>O (Endvolumen 50 µL) hergestellt. 50 µL Bakteriensuspension von *P. aeruginosa* PA14 und PA49 (~10<sup>6</sup> KBE mL<sup>-1</sup>) wurden in jede Kavität hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Nach 1, 4, 8 und 22 h wurden Proben von jeder Bakteriensuspension entnommen und auf MH-Agar mit dem Plattengussverfahren (Kap. 3.1.5) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit der Agarplatten von 48 h wurden die Bakterienkolonien (KBE mL<sup>-1</sup>) ausgezählt. Aus Dreifachansätzen wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungen der Mittelwert der Bakterienzahl der Ausgangssuspension berechnet.

Zusätzlich wurde der Einfluss der PFPE-Flüssigkeit auf Bakterien durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillon Mikrodilution in Anlehnung an die Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) untersucht.

## 3.2 Screening pilzlicher Fermentationsüberstände

### 3.2.1 Kultivierungsbedingungen für die Biofilmanzucht

Bevor das Screening der pilzlichen Fermentationsüberstände erfolgte, wurden vorab die Kultivierungsbedingungen für die Biofilmanzucht in 96-well Mikrotiterplatten festgelegt.

Der Biofilm sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- Aus einer einzelnen Bakterienspezies bestehen
- Eine hohe Stabilität besitzen
- Eine hohe Biofilmbiomasse besitzen

Hierfür wurden drei verschiedene *P. aeruginosa* Stämme (*P. aeruginosa* DSM 1117, *P. aeruginosa* PA30, *P. aeruginosa* PA49) und fünf verschiedene Medien (1:4 BHI-, TSB-, 5 % TSB-, LB-Medium, BM2-Mineralmedium) bei zwei verschiedenen Zeitpunkten (12 h, 24 h) untersucht.

Nach der Biofilmbildung wurden alle Biofilme einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Überprüfung der Stabilität wurde ein Teil der Biofilme erneut dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Biofilme wurden getrocknet und nachfolgend mit Kristallviolett (Kap. 3.1.4) angefärbt. Es wurden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt.

### 3.2.2 Screening pilzlicher Fermentationsüberstände

Das Screening der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände hinsichtlich ihrer biofilmentfernenden Wirkung wurde unter definierten Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden *P. aeruginosa* PA49-Biofilme statisch in 96-well Mikrotiterplatten angezüchtet. Anschließend erfolgte die Behandlung der Biofilme mit den unterschiedlichen Fermentationsüberständen. Die Fermentation der 406 Pilze erfolgte durch die BASF SE, diese wurden anschließend bis zu den Versuchen bei -20 °C eingefroren.

### **3.2.3 Reinigung von realen RO-Membranen mit pilzlichem Fermentationsüberstand**

Die biofilmentfernende Wirkung des pilzlichen Fermentationsüberstands wurde an kleintechnischen RO-Membrananlagen der BASF SE überprüft. Hierfür wurde der pilzliche Fermentationsüberstand zur Reinigung von industriell genutzten und mit Belägen verschmutzten RO-Membranen nach gewöhnlichen Reinigungsprotokollen getestet. Verglichen wurden die Flussraten vor und nach der Reinigung. Zusätzlich wurde ein kommerzielles Reinigungsmittel (Tergazyme; Alconox, New York, USA) und eine Mischung aus pilzlichem Fermentationsüberstand mit dem Komplexbildner Trilon M getestet.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford

Die quantitative Bestimmung an Gesamtprotein in den Fermentationsüberständen erfolgte nach Bradford. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert.

Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts wurde eine Standardkurve mit BSA (bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in MEP-Medium ( $0\text{--}0,5\text{ mg mL}^{-1}$ ) verwendet.  $20\text{ }\mu\text{L}$  des BSA-Standards oder des Fermentationsüberstands wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je  $200\text{ }\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz ( $0,01\text{ }\%$  (w/v) Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland),  $5\text{ }\%$  (v/v) Ethanol,  $8,5\text{ }\%$  (v/v) Phosphorsäure ( $85\text{ }\%$ )) aufgefüllt. Nach  $10\text{ min}$  Inkubation im Dunkeln und leichtem Schütteln ( $50\text{ rpm}$ ) wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $560\text{ nm}$  bestimmt. Von jedem Fermentationsüberstand wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Durch Erstellen einer Kalibriergeraden anhand des BSA-Standards wurde anschließend der Gesamtproteingehalt der Fermentationsüberstände bestimmt.

#### 3.3.2 Enzymaktivitätstests

##### API ZYM Methode

Die Charakterisierung der identifizierten pilzlichen Fermentationsüberstände basierte auf dem Nachweis enzymatischer Reaktionen der Exo-Enzyme in den Fermentationsüberständen.

Der Nachweis der Aktivität von  $19$  verschiedenen Enzymen erfolgte semiquantitativ mit dem API ZYM System (API ZYM<sup>®</sup>; bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. In jede Enzymsubstratkammer wurden  $100\text{ }\mu\text{L}$  des Fermentationsüberstands gegeben. In kombinatorischen Ansätzen wurde eine Reihe von Enzymsubstraten getestet und nach anschließender Inkubation von  $5\text{ h}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  die Aktivitäten der entsprechenden Enzyme durch Farbreaktionen sichtbar gemacht und visuell ausgewertet.

### **Protease-Aktivitätstest**

Die Anwesenheit von Proteasen in den Fermentationsüberständen wurde mit dem *Fluoro*<sup>TM</sup> Protease Assay Kit (G-Biosciences, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Im Test dient Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Casein als Proteasesubstrat. In Anwesenheit von Proteasen wird das FITC-Caseinsubstrat in kleinere Peptide gespalten, dabei kommt es zur Zunahme der Fluoreszenz.

### **DNase-Aktivitätstest**

Die Anwesenheit von DNasen in den Fermentationsüberständen erfolgte mit DNA-Toluidinblau-Agar. Nach dem Abkühlen von BM2-Agar mit  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Toluidinblau (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf ca.  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden dem Medium  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  DNA aus Lachssperma (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugegeben. Anschließend wurden  $100 \text{ }\mu\text{L}$  der Fermentationsüberstände in vorgestanzte Löcher gegeben und die Agarplatten (Duplikate) für 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die DNA-Agarplatten visuell ausgewertet.

### **Lipase-Aktivitätstest**

Die Anwesenheit von Lipasen in den Fermentationsüberständen wurde mit Olivenöl-Rhodamin-B-Agar untersucht. Nach dem Abkühlen von BM2-Agar mit  $250 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  auf ca.  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden dem Medium 2,5 % (w/v) steriles Olivenöl und 1 % (w/v) Rhodamin B (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugegeben. Anschließend wurden  $100 \text{ }\mu\text{L}$  der Fermentationsüberstände in vorgestanzte Löcher gegeben und die Agarplatten (Duplikate) für 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Agarplatten visuell ausgewertet.

### **Esterase-Aktivitätstest**

Die quantitative Bestimmung der Esterasen-Aktivität erfolgte durch die enzymatische Umsetzung von Fluoresceindiacetat zum fluoreszierenden Fluorescein.

Zunächst erfolgte die Herstellung einer Standardkurve ( $0\text{-}8 \text{ }\mu\text{M}$ ) mit Fluorescein-Natrium (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in  $\text{dH}_2\text{O}$ . Jeweils  $200 \text{ }\mu\text{L}$  des 1:4 verdünnten Fermentationsüberstands wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je  $10 \text{ }\mu\text{L}$  Standardlösung ( $4,8 \text{ mM}$  in Ethylenglykolmonoethylether) aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation

im Dunkeln und leichtem Schütteln (50 rpm) wurden zu jeder Probe 30  $\mu$ L HEPES-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz (Ex: 485 nm; Em: 538 nm) am Fluorometer (Fluoroskan Ascent; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Von jedem Fermentationsüberstand wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Durch Erstellen einer Kalibriergeraden anhand des Fluorescein-Standards konnte anschließend die Esterase-Aktivität der Fermentationsüberstände bestimmt werden.

### **Proteindenaturierung**

Um die im Fermentationsüberstand enthaltenen Proteine zu denaturieren, wurde der Fermentationsüberstand bei 99 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde der inaktivierte Fermentationsüberstand auf 15 h-alten Biofilmen getestet (Kap. 4.2.2).

### **Fraktionierung**

Die Komponenten des Fermentationsüberstands wurden hinsichtlich ihres Molekulargewichts fraktioniert. Hierfür wurde der Fermentationsüberstand mit VivaSpin Konzentratoren (Polyethersulfon; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit Ausschlussvolumen 5, 10, 30, 50 und 100 kD zentrifugiert (4000 g). Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen auf ihre biofilmentfernende Wirkung (Kap. 4.2.2) untersucht.

## 3.4 Mikroskopische Methoden

### 3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

#### Lebend/Tot-Färbung

Die Charakterisierung der biofilmentfernenden Wirkung des stärksten Fermentationsüberstands erfolgte anhand fluoreszenzmikroskopischer 3D-Aufnahmen.

Hierfür wurden die Bakterien in den Biofilmen mit DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, wobei behandelte Biofilme mit Fermentationsüberstand mit unbehandelten Ansätzen verglichen wurden.

Die Biofilmanzucht erfolgte statisch in Chamber Slides (Chamber Slide™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) in BM2-Mineralmedium für 15 h und bei 37 °C und 100 rpm. Nach der Biofilmbildung wurde der Überstand verworfen und die Biofilme wurden einmal mit Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris; pH 8,0) gewaschen, um lose Bakterien zu entfernen. Die Behandlung mit Fermentationsüberstand erfolgte für 2 h (37 °C und 100 rpm) mit anschließendem Waschschrift mit Zellwaschpuffer. Bakterien mit intakter und beschädigter Zellmembran wurden mit SYTO9 und Bakterien mit beschädigter Zellmembran mit Propidiumiodid aus dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden SYTO9 (5 µM Endkonzentration) und Propidiumiodid (15 µM Endkonzentration) in Zellwaschpuffer verdünnt. Die Biofilme wurden mit Färbelösung benetzt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Um die Färbelösung vollständig zu entfernen, wurden die Biofilme nochmals mit Zellwaschpuffer gewaschen.

Die anschließende Analyse der Biofilme erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging Mikroskop mit ApoTome-Funktion (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit 200-facher Vergrößerung unter Verwendung der Filter Sets für SYTO9 (BP450-490, FT510, BP515-565) und Propidiumiodid (BP546/12, FT580, LP590). Digitale 3D-Aufnahmen der Biofilme wurden mit einer Zeiss AxioCam MRm und der AxioVision 4.6 Software generiert. Die Bestimmung der Biofilmbiomasse und -dicke erfolgte durch Auswertung der 3D-Aufnahmen mit der ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA) und der Comstat2 (Technical University of Denmark) Software.

### **CTC/DAPI-Färbung**

Die Charakterisierung der bakteriellen Adhäsion auf den PFPE-Oberflächen erfolgte durch das Anfärben metabolisch aktiver Bakterien mit einer CTC-Lösung. Das Tetrazoliumsalz CTC (5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) wird durch Dehydrogenasen der Bakterien zu einem wasserunlöslichen und nach Anregung rotfluoreszierenden Formazankristall reduziert [86]. Das Anfärben aller Bakterien erfolgte mit dem DNA-spezifischen DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) [87].

Um eine maximale Detektion der respiratorisch aktiven Bakterien zu erhalten, wurde die CTC-Lösung mit einer Endkonzentration von 3,5 mM in BM2-Mineralmedium vor jedem Versuch frisch angesetzt. Nach der Entnahme der Testoberfläche aus dem Biofilm-PFR wurden diese vorsichtig mit sterilem Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris; pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurden die Oberflächen für 3 h und nach leichtem Schütteln (50 rpm) im Dunkeln bei Raumtemperatur mit CTC-Lösung inkubiert. Danach wurde eine DAPI-Färbelösung mit einer Endkonzentration von 11,4  $\mu$ M hinzugefügt und für weitere 10 min inkubiert. Die Testoberflächen wurden anschließend erneut mit Zellwaschpuffer gewaschen, um lose Bakterien zu entfernen.

Die bakterielle Adhäsion wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging System (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit 200-facher Vergrößerung und den Filtersets für CTC (BP 546/12, FT 580, LP 590) und DAPI (G 365, FT 395, BP 445/50) analysiert. Digitale Aufnahmen der Testoberflächen erfolgten mit einer Zeiss AxioCAM MRm Kamera und der AxioVision 4.6 Software. Die Quantifizierung der Oberflächenbedeckung mit respiratorisch aktiven Bakterien erfolgte anhand 5 unabhängiger Aufnahmen und der BioFlux 200 Software (Version 2.3.0.2; Fluxion Biosciences/IUL Instruments GmbH, Königswinter, Deutschland).

### **3.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Das ESEM stellt eine spezielle Variante des Rasterelektronenmikroskops dar. Der wesentliche Unterschied zu einem konventionellen Rasterelektronenmikroskop ist das geringere Vakuum (höherer Druck) in der Probenkammer und der speziell angepasste Detektor.

Es wurden ESEM-Aufnahmen von industriell genutzten und mit Belägen verschmutzten RO-Membranen aufgenommen. Die RO-Membranen wurden vom Kooperationspartner, der BASF SE, zur Verfügung gestellt.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 RAPD-PCR

Die RAPD-PCR wurde verwendet, um die *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910 und PA49 auf klonale Unterschiede zu untersuchen.

Die RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*-Polymerase Chain Reaction) stellt eine Sonderform der PCR-Methode dar. Verwendet werden unspezifisch bindende Primer, meist ein Dekanukleotid, die zufällig an verschiedene Abschnitte eines Genoms binden und als Amplifikationsstart für die darauffolgende PCR dienen. Anhand der entstandenen Bandenprofile können die verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme verglichen werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass keinerlei Kenntnis über die zu untersuchenden Genome erforderlich ist, da sich der Primer zufällig anlagert [88].

Die DNA der *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910 und PA49 wurde aus Übernachtskulturen mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die PCR erfolgte in einem 50 µL-Ansatz mit 40 ng Template-DNA, 10x PCR Puffer (PeqLab, Erlangen, Deutschland), 20 pmol einsträngigen 10-basen Primern (Tab. 3.4), 1,25 Units Taq-Polymerase (peqGold Hot Taq DNA-Polymerase, PeqLab, Erlangen, Deutschland), 200 µM dNTPs und H<sub>2</sub>O.

Tab. 3.4. Primersequenzen für die RAPD-PCR

Primer	Sequenz	Referenz
P15	5'-AATGGCGCAG-3'	[89]
1290	5'-GTGGATGCGA-3'	[90]
1254	5'-CCGCAGCCAA-3'	[90]
1247	5'-AAGAGCCCGT-3'	[90]

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit dem in Tab. 3.5 aufgeführten Temperaturprofil.

Tab. 3.5. Temperaturprofil für die PCR

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	60 s	Denaturierung
45 Zyklen	33-72 °C	3 min	Annealing
	72 °C	2 min	Elongation
	72 °C	10 min	Abschließende Extension

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 4%-igen Polyacrylamidgel mit einem D-Code-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die Durchführung erfolgte bei 120 V mit 1xTBE Puffer und gefärbt mit SYBR Gold (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Analysiert wurden die Gele bei einer Wellenlänge von 520 nm mit einer Lumilmager Working Station (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die Ähnlichkeit zweier Bakterienstämme wurde anhand des Bandenprofils im Polyacrylamidgel und der Gl. 2 bestimmt.

### 3.5.2 Populationsanalyse mittels PCR-DGGE

Die Untersuchung der Bakteriendiversitäten sowie die Erstellung von Ähnlichkeitsprofilen von Biofilmen auf verschmutzten RO-Membranen erfolgte durch die Auftrennung PCR-vervielfältigter 16S rDNA-Fragmente mittels DGGE (Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese). Mit Hilfe der DGGE lassen sich DNA-Fragmente mit gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenzabfolge, in einem Polyacrylamidgel mit einem linearen Harnstoff/Formamid-Gradienten auftrennen [91, 92]. Ein 16S rDNA-Fragment wird zuerst in einer PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend mittels DGGE aufgetrennt. Durch das Vorhandensein von Harnstoff und Formamid wird die DNA zusätzlich denaturiert, d.h. es wird ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA verursacht. Der gebildete Harnstoff/Formamid Gradient im Gel führt beim Gellauf mit zunehmend denaturierenden Bedingungen zu einem partiellen Schmelzen der doppelsträngigen DNA. Durch die Formänderung, d.h. Bildung von einzelsträngigen Bereichen und Loops, kommt es zu einer Reduktion der Mobilität des DNA-Fragmentes im Gel. Das Aufschmelzen der DNA ist sequenzabhängig und vollzieht sich nicht linear, sondern es ist sowohl vom Anteil an Cytosin und Guanin, die eine Dreifachwasserstoff-



Tab. 3.7. Parameter für die Amplifikation (PCR)

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
35 Zyklen	55 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

### DGGE Populationsanalyse

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in denaturierenden Polyacrylamidgelen (Polyacrylamid-Konzentration 7,5 %, Harnstoffgradient 40-70 %) mit TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1mM EDTA; pH 8,5) aufgetrennt (70 V, 60 °C, 16 h; BioRad DCode™ System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Zur Visualisierung der Bandenprofile, die sich durch die sequenzspezifische Auftrennung der PCR-Produkte ergaben, wurden die Gele mit dem DNA-Farbstoff SYBR® Gold (0,001 %; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Die gefärbten Gele wurden bei einer Wellenlänge von 520 nm mit einer Lumilmager Working Station (LumilmagerT1™, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ausgewertet. Die Ähnlichkeit zweier Bakterienpopulationen wurde anhand der DGGE-Bandenprofile im Polyacrylamidgel und der Gl. 2 bestimmt.

### Sequenzanalyse

Darüber hinaus wurden einzelne Banden im Anschluss an die DGGE nach dem Prinzip von Sanger [96] sequenziert und anhand eines Datenbank-Abgleichs (NCBI-BlastN) identifiziert. Die zu sequenzierenden Banden wurden bei diesem Verfahren in einem PCR-ähnlichen Ansatz vervielfältigt. Dieser Ansatz enthält eine Pufferlösung, einen geeigneten Primer, eine Polymerase die vier dNTPs (Deoxyribonukleosidtriphosphate) und ddNTPs (Dideoxyribonukleosidtriphosphate), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Werden die ddNTPs bei der Extension eingebaut, kommt es zu einer Kettenabbruch-Reaktion, da sie keine OH-Gruppe am C<sub>3</sub>-Atom besitzen und somit keine Phosphodiesterbindung ausbilden können. Die ddNTPs werden zufällig eingebaut, so dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die ein durch den Primer definiertes 5'-Ende besitzen.

Vor der Sequenzierung wurden die überschüssigen Primer in den PCR-Produkten mit den Enzymen Exonuklease I und Shrimps Alkaline Phosphatase verdaut (illustra™ ExoStar™, GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland). Dazu wurden 5 µL der PCR-Produkte mit 2 µL ExoStar-Lösung vermischt, bei 37 °C für 15 min inkubiert und anschließend wurden die Enzyme 15 min bei 80 °C inaktiviert. Nach der enzymatischen Verdauung wurden die aufgereinigten Produkte 1:5 mit sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt und in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Ein 10 µL-Ansatz enthielt 1 µL des verdauten und verdünnten PCR-Produktes, 2 µL BigDye Terminator (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 5 pmol Primer 517R. Tab. 3.8 zeigt das Temperaturprofil, das für die Sequenzierreaktion eingesetzt wurde.

Tab. 3.8. Temperaturprofil für die Sequenzierreaktion

	96 °C	5 min	
	96 °C	10 s	Denaturierung
25 Zyklen	55 °C	5 s	Annealing
	60 °C	1 min	Elongation

Anschließend erfolgten die DNA-Fällung und das Entfernen überschüssiger ddNTPs. Hierfür wurde ein 72 µL-Ansatz bestehend aus 10 µL Sequenzierprobe, 2 µL 3M Natriumacetat, 10 µL H<sub>2</sub>O und 50 µL Ethanol (99 %) hergestellt. Nachdem der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde, folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet mit 250 µL Ethanol (70 %) gewaschen, bevor die Probe erneut für 10 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet über Nacht bei geöffnetem Deckel getrocknet, danach in 10 µL sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Von dieser aufgereinigten DNA wurden 5 µL mit 12 µL HiDi-Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemischt und für die Kapillarelektrophorese eingesetzt. Die unterschiedlich großen Produkte wurden mit dem Sequenziergerät ABI310 (ABI Prism® Genetic Analyser 310; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) über eine Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt. Die Glaskapillare wird durch Anlegen einer Spannung über wenige Sekunden mit den Produkten beladen, wobei die DNA entlang des Spannungsfeldes durch die Kapillare wandert. Die Trennung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente erfolgt über

Wechselwirkungen mit dem Polymer und der Wand der Kapillare. Da die ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, können sie mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Die Abfolge dieser spezifischen Farbsignale wird in die entsprechende Basensequenz der untersuchten DNA-Probe umgewandelt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Chromas Lite Software (Version 2.01; Technelysium Pty Ltd) bearbeitet und ausgewertet. Überprüft wurden die Sequenzen anhand der in der NCBI Blast-Datenbank hinterlegten DNA-Sequenzen.

### 3.5.3 Ähnlichkeitsindex

Als Maß für die Ähnlichkeit zweier RAPD- oder DGGE-Profile wurde der Ähnlichkeitsindex ( $F_{xy}$ ) anhand der Gl. 2 von Nei und Li [97] bestimmt. Der Index ist ein Quotient aus der doppelten Anzahl gemeinsamer Banden und der Summe der Banden der jeweiligen Proben (Diversität).

$$F_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \quad \text{Gl. 2}$$

Die RAPD- und die DGGE-Profile wurden manuell bezüglich der An- und Abwesenheit von Banden ausgezählt, unabhängig von deren Intensität. Dabei ist  $n_{xy}$  die Anzahl der gemeinsamen DNA-Banden in Probe  $X$  und  $Y$ ,  $n_x$  ist die Anzahl der DNA-Banden in Probe  $X$  und  $n_y$  ist die Anzahl der DNA-Banden in Probe  $Y$ . Beträgt der  $F_{xy}$ -Wert 0, haben die beiden Proben keine Ähnlichkeit miteinander, beträgt der  $F_{xy}$ -Wert 1, weisen die beiden Proben eine 100 %-ige Ähnlichkeit auf.

## 3.6 Oberflächencharakterisierung

### 3.6.1 Statische Kontaktwinkelmessung

Zur Überprüfung der Stabilität der generierten PFPE-Oberflächen wurde die Kontaktwinkelmessung verwendet. Der Kontaktwinkel gibt Auskunft über die Benetzbarkeit einer Oberfläche und wurde mit der Tropfenanalyse Drop Shape Analysis (DSA) bestimmt. Dazu werden folgende Annahmen verwendet:

- Der Tropfen ist perfekt symmetrisch und nicht in Bewegung, es handelt sich um eine feste, glatte, chemisch homogene, unlösliche und nicht reaktive Oberfläche.
- Die Tropfenform ergibt sich allein durch die Grenzflächenspannung und durch die Gewichtskraft.
- An der Dreiphasengrenze bildet sich ein thermodynamisches Gleichgewicht aus, welches durch die *Young'sche*-Gleichung (Gl. 3) beschrieben werden kann [98].

$$\cos \theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{SL}}{\gamma_L} \quad \text{Gl. 3}$$

Die Benetzbarkeit von Festkörperoberflächen durch flüssige Tropfen hängt von der freien Oberflächenenergie des Festkörpers  $\gamma_S$  sowie der Oberflächenspannung der Flüssigkeit  $\gamma_L$  und der Grenzflächenspannung  $\gamma_{SL}$  zwischen der Flüssigkeit und dem Festkörper ab (Abb. 3.2). Der Kontaktwinkel  $\theta$  (Benetzungswinkel) stellt sich nach der *Young'sche*-Gleichung gemäß dem Kräftegleichgewicht ein [99].

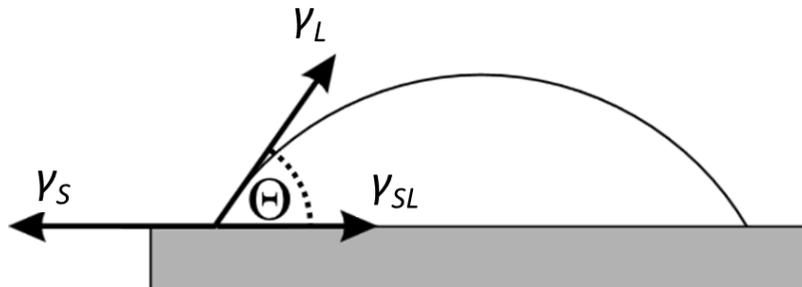


Abb. 3.2. Liegender Tropfen auf einer festen Oberfläche mit dem Kontaktwinkel  $\theta$  und den Vektoren für die freie Oberflächenenergie des Festkörpers  $\gamma_S$ , der Oberflächenspannung der Flüssigkeit  $\gamma_L$  und der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Festkörper  $\gamma_{SL}$  [99].

### 3.6.2 Dynamische Kontaktwinkelmessung (Kontaktwinkelhysterese)

Neben der oben beschriebenen statischen Kontaktwinkelmessung gibt es zusätzlich die dynamische Kontaktwinkelmessung. Hier wird das Volumen des Tropfens während der Messung langsam vergrößert bzw. verkleinert. Der Kontaktwinkel wird dabei in bestimmten Abständen gemessen. Der Vorteil liegt bei dieser Messung vor allem darin, dass die Dreiphasengrenze beim fortschreitenden Winkel immer frisch gebildet wird und dadurch weniger anfällig gegenüber lokalen Inhomogenitäten ist. Bei der Messung des rückschreitenden Winkels wird der Kontaktwinkel während der Entnetzung der Oberfläche gemessen. Der Unterschied zwischen dem fortschreitenden und dem rückschreitenden Winkel wird Kontaktwinkelhysterese genannt und kann Aufschluss über die Rauigkeit oder Inhomogenität einer Oberfläche geben [98, 100]. Während der Kontaktwinkel den Gleichgewichtszustand beschreibt, wird die Hysterese durch metastabile Zustände hervorgerufen [98].

Um die Stabilität der generierten PFPE-Oberflächen in wässrigem Milieu zu zeigen, wurden diese Oberflächen und die porösen Polymeroberflächen (nicht beschichtet) für 7 Tage mit BM2-Mineralmedium oder mit nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium in Petrischalen unter leichtem schütteln (50 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils vor und nach der Inkubation wurden der statische, der fortschreitende und der rückschreitende Kontaktwinkel dieser Oberflächen gemessen. Zur Bestimmung des statischen Kontaktwinkels wurden 3  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  und für den dynamischen Kontaktwinkel 2  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  auf die Oberflächen aufgebracht. Die entstehenden Wassertropfenformen wurden von der Seite mit einer UK 1115 Digitalkamera (EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland) aufgenommen. Der Kontaktwinkel ergab sich aus der Steigung der Tangente an den Tropfen durch die Dreiphasengrenze (Abb. 3.2). Die Kontaktwinkelmessung erfolgte in vier unabhängigen Versuchen.

## 3.7 Elektrochemische Methoden

### 3.7.1 Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor

Die Charakterisierung von Biofilmen erfolgte mit einem elektrochemischen mikrofluidischen Biofilmsensor (Abb. 3.3), der die online-Überwachung des Biofilmwachstums und der Biofilmaktivität erlaubt.

Während des kompletten Versuchszeitraums werden kontinuierlich Messpunkte vom impedanzspektrometrischen und amperometrischen Sensor aufgenommen.

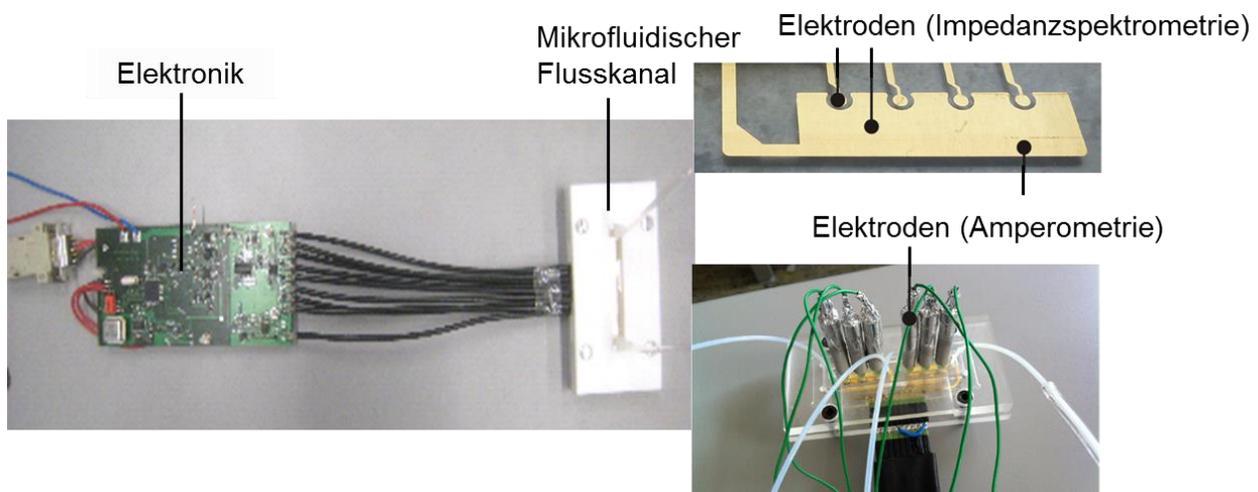


Abb. 3.3. Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor. Das Messsystem besteht aus einem Referenz- und einem Messkanal. Jeder Kanal besteht aus vier impedanzspektrometrischen und drei amperometrischen Elektroden.

Am Ende jedes Versuchs wurde der mikrofluidische Flusskanal auseinander gebaut und anschließend wurden die adhärenierten Bakterien in den Biofilmen auf den Elektroden des Messkanals und des sterilen Referenzkanals mit der Lebend/Tot-Färbung (Kap. 3.4.1) untersucht.

### Funktionalitätstest des mikrofluidischen Biofilmsensors

Um die Funktionalität des elektrochemischen mikrofluidischen Biofilmsensors zu zeigen, wurde Natriumazid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) exemplarisch als Biozid verwendet. Natriumazid bindet irreversibel an die Cytochrome-c-Oxidase in der Atmungskette der Bakterien [101, 102]. Dadurch kommt die ATP-Synthese zum Erliegen

und die Bakterienzelle stirbt. Der Betrieb des mikrofluidischen Biofilmsensors erfolgte nach Tab. 3.9. Die Animpf-Phase erfolgte mit *P. aeruginosa* PA14 ( $\sim 10^8$  KBE mL<sup>-1</sup>) für einen Zeitraum von 3 h. Das darauffolgende Biofilmwachstum erfolgte bei einer kontinuierlichen Flussrate von 210  $\mu\text{L min}^{-1}$  mit 1:4 verdünntem BHI-Medium. Nach 72 h Biofilmwachstum wurde der Biofilm dreimal mit einer 1 % (w/v) Natriumazid-Lösung behandelt.

Tab. 3.9. Überblick über den Versuchsablauf: Biofilmbehandlung mit Natriumazid

Nummer	Zeit	Vorgang
1.	3 h	Animpfen
2.	72 h	Biofilmwachstum
3.	4 h	1 % Natriumazid (1.)
4.	40 h	Biofilmwachstum
5.	6 h	1 % Natriumazid (2.)
6.	24 h	Biofilmwachstum
7.	20 h	1 % Natriumazid (3.)

### Behandlung des Biofilms mit pilzlichem Fermentationsüberstand

Die biofilmentfernende Reinigungskraft des pilzlichen Fermentationsüberstands wurde mit dem elektrochemischen mikrofluidischen Biofilmsensor verifiziert.

Der Betrieb des mikrofluidischen Biofilmsensors erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Animpf-Phase sowohl des Messkanals als auch des Referenzkanals erfolgte mit *P. aeruginosa* PA49 ( $\sim 10^8$  KBE mL<sup>-1</sup>) für 3 h. Das darauffolgende Biofilmwachstum erfolgte bei einer kontinuierlichen Flussrate von 210  $\mu\text{L min}^{-1}$  mit 1:4 verdünntem BHI-Medium. Nach 24 h Biofilmwachstum wurde der Biofilm für 6 h mit pilzlichem Fermentationsüberstand behandelt. Zum Vergleich wurde der Biofilm im Referenzkanal mit inaktiviertem Fermentationsüberstand (Kap. 3.3.2) behandelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von PFPE-Oberflächen auf die Biofilmbildung

Durch die Beschichtung von porösen Polymeroberflächen mit einer Perfluorpolyether-Gleitflüssigkeit (PFPE) entstehen extrem glatte Oberflächen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Eigenschaft zur Prävention bakterieller Adhäsion genutzt werden. Aufgrund des geringen Dampfdrucks und der Unlöslichkeit in allen gängigen Lösungsmitteln stellen PFPE-Flüssigkeiten zudem eine äußerst stabile Beschichtung dar. In Kooperation mit der Gruppe um Pavel A. Levkin (ITG, KIT) wurden diese innovativen PFPE-Oberflächen hergestellt und untersucht. Ein Teil der Ergebnisse ist in Kleintschek und Li *et al.* [71] publiziert. Ein schematischer Aufbau der generierten PFPE-Oberflächen ist in Abb. 4.1 dargestellt.

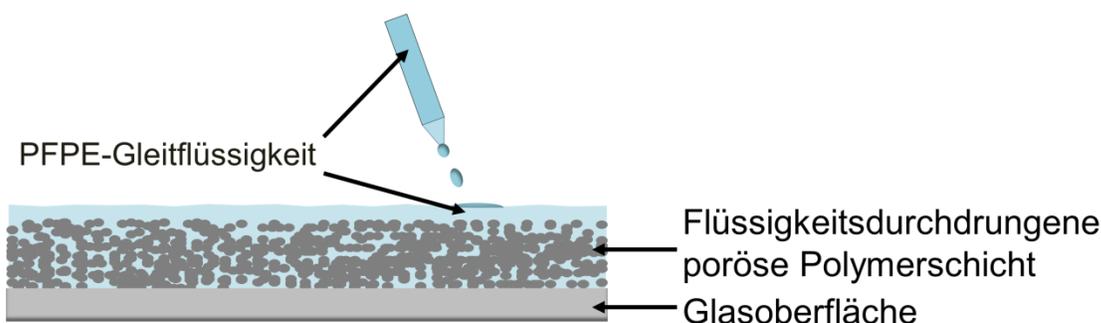


Abb. 4.1. Schematischer Aufbau der PFPE-Oberflächen. Als poröses Grundmaterial wurden Butylmethacrylat-Ethylen-Dimethacrylat (BMA-EDMA) Polymeroberflächen auf Glassubstraten verwendet [72, 73]. Diese makroporösen Polymeroberflächen wurden mit Perfluorpolyether-Gleitflüssigkeit (PFPE) überzogen.

#### 4.1.1 Stabilität der PFPE-Oberflächen

Zur Überprüfung der Stabilität der generierten PFPE-Oberflächen in wässrigem Milieu wurden die Oberflächen für 7 Tage statisch in BM2-Mineralmedium sowie in nährstoffreichem Medium inkubiert. Überprüft wurde die Stabilität durch Vergleich des Kontaktwinkels auf Veränderungen vor und nach 7-tägiger Inkubation (Kap. 3.6).

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Zu erkennen ist ein signifikant höherer statischer Kontaktwinkel vor der Inkubation der porösen Polymeroberflächen (132,9°) im Vergleich zu den PFPE-Oberflächen (111,1°). Der Kontaktwinkel der PFPE-Oberflächen ist  $> 90^\circ$ , daher sind diese Oberflächen hydrophob. Die Kontaktwinkelhysterese nimmt durch die PFPE-Beschichtung von ungefähr  $60^\circ$  bei den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen auf  $9^\circ$  bei den PFPE-Oberflächen ab. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Beschichtung geglückt war.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse die Stabilität der PFPE-Oberflächen, da sich der Kontaktwinkel vor und nach der 7-tägigen Inkubation in BM2-Mineralmedium und in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium nicht signifikant änderte. Wie Tab. 4.1 zeigt, nimmt der statische Kontaktwinkel der nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen von ungefähr  $133^\circ$  auf  $120^\circ$  nach 7-tägiger Inkubation in BM2-Mineralmedium ab, die Kontaktwinkelhysterese nimmt von ungefähr  $58^\circ$  auf  $120^\circ$  zu. Die Versuche in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium zeigen ähnliche Ergebnisse. Dies deutet auf eine Veränderung der Oberfläche hin.

Tab. 4.1. Kontaktwinkelmessungen der PFPE-Oberflächen und der nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen vor und nach 7-tägiger Inkubation in BM2-Mineralmedium sowie in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen.

	Statischer Kontaktwinkel		Kontaktwinkelhysterese	
	Tag 0	Tag 7	Tag 0	Tag 7
<b>BM2-Mineralmedium</b>				
PFPE-Oberflächen	111,1±2,4° #	113,2±1,3°	9,5±1,4° #	12,6±1,9°
Poröse Polymeroberflächen (nicht beschichtet)	132,9±2,8°	119,6±5,3° *	58,4±1,5°	120,4±6,9° *
<b>1:4 verdünntes BHI-Medium</b>				
PFPE-Oberflächen	110,9±1,5° #	110,8±2,3°	8,2±2,1° #	13,1±2,1°
Poröse Polymeroberflächen (nicht beschichtet)	132,3±6,1°	119,7±6,2° *	61,8±7,2°	138,7±3,4° *

# =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen Tag 0)

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der porösen Polymeroberflächen Tag 0 mit Tag 7)

Keine Signifikanz beim Vergleich der PFPE-Oberflächen Tag 0 mit Tag 7

### 4.1.2 Toxizitätstest der PFPE-Flüssigkeit

Um zu zeigen, dass die mögliche Verhinderung vor Biofilmbildung der PFPE-Oberflächen nicht auf Toxizitätseffekte der PFPE-Flüssigkeit zurückzuführen ist, wurde der Einfluss der PFPE-Flüssigkeit auf das Bakterienwachstum getestet. Hierfür wurde nach 1, 4, 8 und 22 h von mit bis zu 12,5 % der PFPE-Flüssigkeit versetzten Bakteriensuspensionen Proben entnommen und die KBE mL<sup>-1</sup> bestimmt (Kap. 3.1.9).

Sowohl der Toxizitätstest als auch ein MHK-Test zeigten, dass die PFPE-Flüssigkeit keine antimikrobielle Wirkung besitzt. Nach 4 h war noch keine Zunahme der KBE mL<sup>-1</sup> zu erkennen. Ab 8 h (Tab. 4.2) zeigten die Bakterien (*P. aeruginosa* PA14 und PA49) in BM2-Mineralmedium mit bis zu 12,5 % PFPE-Flüssigkeit einen deutlichen Wachstumsanstieg. In allen Bakteriensuspensionen mit und ohne PFPE-Flüssigkeit wurde ein ähnliches Bakterienwachstum beobachtet. Nach 22 h betragen die Konzentrationen in allen Bakteriensuspensionen zwischen 2,7\*10<sup>7</sup> und 4,5\*10<sup>8</sup> KBE mL<sup>-1</sup>. Somit lässt sich kein Einfluss der PFPE-Flüssigkeit auf das Bakterienwachstum beobachten.

Tab. 4.2. Wachstum der *P. aeruginosa* Stämme PA14 und PA49 in bis zu 12,5 % PFPE-Flüssigkeit. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Anteil PFPE-Flüssigkeit in %	PA14; KBE mL <sup>-1</sup>		PA49; KBE mL <sup>-1</sup>	
	8 h	22 h	8 h	22 h
0,0	7,2*10 <sup>5</sup> ±2,1*10 <sup>2</sup>	4,2*10 <sup>8</sup> ±2,8*10 <sup>2</sup>	8,6*10 <sup>4</sup> ±4,5*10 <sup>2</sup>	3,2*10 <sup>7</sup> ±5,1*10 <sup>2</sup>
0,4	6,9*10 <sup>5</sup> ±1,8*10 <sup>1</sup>	3,7*10 <sup>8</sup> ±9,2*10 <sup>2</sup>	9,2*10 <sup>4</sup> ±6,2*10 <sup>2</sup>	2,7*10 <sup>7</sup> ±5,7*10 <sup>2</sup>
0,8	7,3*10 <sup>5</sup> ±4,7*10 <sup>2</sup>	3,9*10 <sup>8</sup> ±7,7*10 <sup>2</sup>	8,9*10 <sup>4</sup> ±2,9*10 <sup>2</sup>	5,2*10 <sup>7</sup> ±2,2*10 <sup>2</sup>
1,6	7,0*10 <sup>5</sup> ±3,1*10 <sup>2</sup>	4,5*10 <sup>8</sup> ±2,4*10 <sup>3</sup>	8,2*10 <sup>4</sup> ±1,3*10 <sup>2</sup>	4,6*10 <sup>7</sup> ±3,8*10 <sup>3</sup>
3,1	7,3*10 <sup>5</sup> ±1,2*10 <sup>2</sup>	3,8*10 <sup>8</sup> ±2,5*10 <sup>2</sup>	8,6*10 <sup>4</sup> ±9,6*10 <sup>1</sup>	3,8*10 <sup>7</sup> ±4,6*10 <sup>2</sup>
6,3	7,2*10 <sup>5</sup> ±9,8*10 <sup>1</sup>	3,0*10 <sup>8</sup> ±1,8*10 <sup>2</sup>	9,1*10 <sup>4</sup> ±2,2*10 <sup>2</sup>	3,0*10 <sup>7</sup> ±3,2*10 <sup>2</sup>
12,5	6,8*10 <sup>5</sup> ±1,5*10 <sup>2</sup>	3,9*10 <sup>8</sup> ±6,4*10 <sup>2</sup>	8,9*10 <sup>4</sup> ±7,9*10 <sup>2</sup>	3,5*10 <sup>7</sup> ±1,4*10 <sup>3</sup>

### 4.1.3 Biofilmbildung auf PFPE-Oberflächen

Die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion auf den generierten PFPE-Oberflächen erfolgte im Biofilm-Plug Flow Reaktor (Biofilm-PFR). Um den Biofilmreaktor mit den Testoberflächen zu starten, wurden Bakteriensuspensionen ( $\sim 10^8$  KBE mL<sup>-1</sup>) von den *P. aeruginosa* Stämmen PA14, PA30, PA910 oder PA49 verwendet. Bei einer kontinuierlichen Flussrate von 0,94 mL min<sup>-1</sup> wurden die Testoberflächen für 7 oder 14 Tage mit BM2-Mineralmedium oder mit nährstoffreichem Medium inkubiert (Kap. 3.1.2). Die darauffolgende Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion auf den Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit anschließender Software-unterstützter Analyse. Das Anfärben metabolisch aktiver Bakterien erfolgte mit CTC und das Anfärben aller Bakterien mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Kap. 3.4.1). Die Untersuchungen erfolgten an drei Oberflächen: (i) PFPE-Oberflächen, (ii) nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen oder (iii) Glasoberflächen durch Inkubation mit den *P. aeruginosa* Stämmen PA14, PA30, PA910 oder PA49.

Nur wenige metabolisch aktive Bakterien waren auf den PFPE-Oberflächen adhärirt, wohingegen auf den Glasoberflächen eine massive Oberflächenbedeckung von adhärirten Bakterien zu erkennen war. Beispielhaft ist in Abb. 4.2 ein Fluoreszenz-Mikrograph einer PFPE-Oberfläche und einer Glasoberfläche dargestellt.

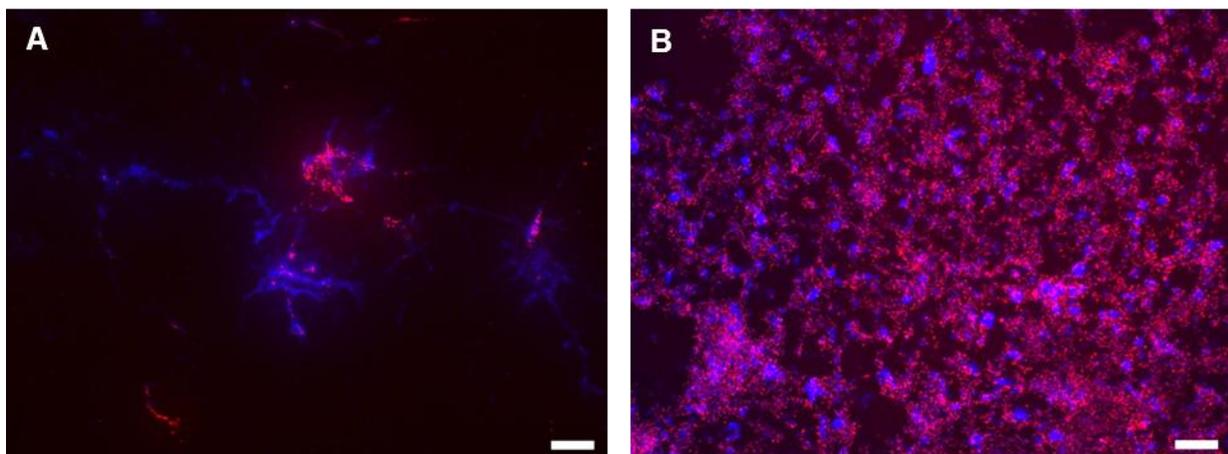


Abb. 4.2. Fluoreszenz-Mikrographen nach 7-tägiger Inkubation von *P. aeruginosa* PA49 in BM2-Mineralmedium (Flussrate: 0,94 mL min<sup>-1</sup>). Metabolisch aktive Bakterien wurden mit CTC (rot) bzw. alle Bakterien mit DAPI (blau) gefärbt. (A) PFPE-Oberfläche, (B) Glasoberfläche. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m

Die Beschichtung der Polymeroberflächen mit PFPE-Flüssigkeit verminderte bis zu 97,6 % der *P. aeruginosa* PA49 Biofilmbildung bei 7 Tagen in BM2-Mineralmedium im Vergleich zu den Glasoberflächen. Die bakterielle Oberflächenbedeckung auf den PFPE-Oberflächen betrug 1,9 % im Durchschnitt von drei unabhängigen Versuchen. Im Gegensatz dazu betrug die bakterielle Oberflächenbedeckung auf den Glasoberflächen 32,8 % (Abb. 4.3A-B) mit einem Maximalwert von 98,6 % (Abb. 4.3C).

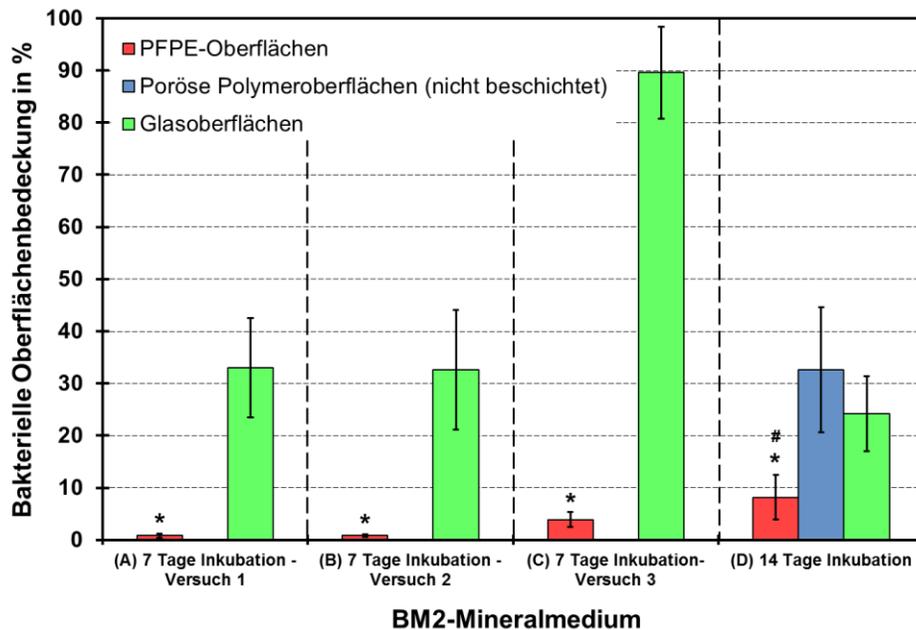


Abb. 4.3. Vergleich der bakteriellen Oberflächenbedeckung auf den PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen und Glasoberflächen. Die Oberflächen wurden in vier unabhängigen Versuchen mit dem Umweltisolat *P. aeruginosa* PA49 in BM2-Mineralmedium für 7 Tage (A-C) oder 14 Tage (D) inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von fünf unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenbedeckung mit respiratorisch aktiven Bakterien.

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit Glasoberflächen)

# =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen)

Diese Ergebnisse wurden auch durch eine Inkubation von 14 Tagen bei gleichen Versuchsbedingungen bestätigt. Auf den PFPE-Oberflächen betrug die bakterielle Oberflächenbedeckung 8,2 %, auf den Glasoberflächen 24,2 % und auf den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen 32,6 % (Abb. 4.3D). Bei den

Glasoberflächen nach 14-tägiger Inkubation ist jedoch zu beachten, dass es zum vorzeitigen Ablösen von Bakterien gekommen sein kann. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es sich in Abb. 4.3 um vier unabhängige Versuche handelt.

#### **4.1.4 Einfluss von Mediumskomponenten auf die primäre bakterielle Adhäsion**

Ein mögliches Problem für die mit PFPE-Flüssigkeit beschichteten Oberflächen kann ein adhärerter „Conditioning Film“ aus organischen und/oder anorganischen Substanzen darstellen. Um zu prüfen, ob Mediumskomponenten aus dem nährstoffreichen Medium einen solchen „Conditioning Film“ verursachen und damit eine bakterielle Adhäsion begünstigen, wurden die PFPE-Oberflächen vor dem eigentlichen Versuch im Biofilm-PFR für 48 h in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium inkubiert. Anschließend wurden diese vorinkubierten Oberflächen für 7 Tage in BM2-Mineralmedium im Biofilm-PFR getestet.

Auf den vorinkubierten PFPE-Oberflächen befanden sich nur wenige respiratorisch aktive Bakterien. Zwischen den PFPE-Oberflächen und den vorinkubierten PFPE-Oberflächen wurden nur geringe Unterschiede beobachtet (Abb. 4.4). Die PFPE-Oberflächen besaßen eine bakterielle Oberflächenbedeckung von ca. 1,3 %, die vorinkubierten PFPE-Oberflächen waren zu ca. 0,8 % mit Bakterien besiedelt und die Glasoberflächen besaßen eine bakterielle Oberflächenbedeckung von 6,6 %. Ähnlich geringe Unterschiede zeigte der Versuch mit vorinkubierten Glasoberflächen. Die Glasoberflächen besaßen eine bakterielle Oberflächenbedeckung von ca. 98,1 %, die vorinkubierten Glasoberflächen waren zu etwa 93,6 % mit Bakterien besiedelt, die PFPE-Oberflächen wiesen hingegen lediglich eine bakterielle Oberflächenbedeckung von 36,1 % auf. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es sich in Abb. 4.4 um zwei unabhängige Versuche handelt.

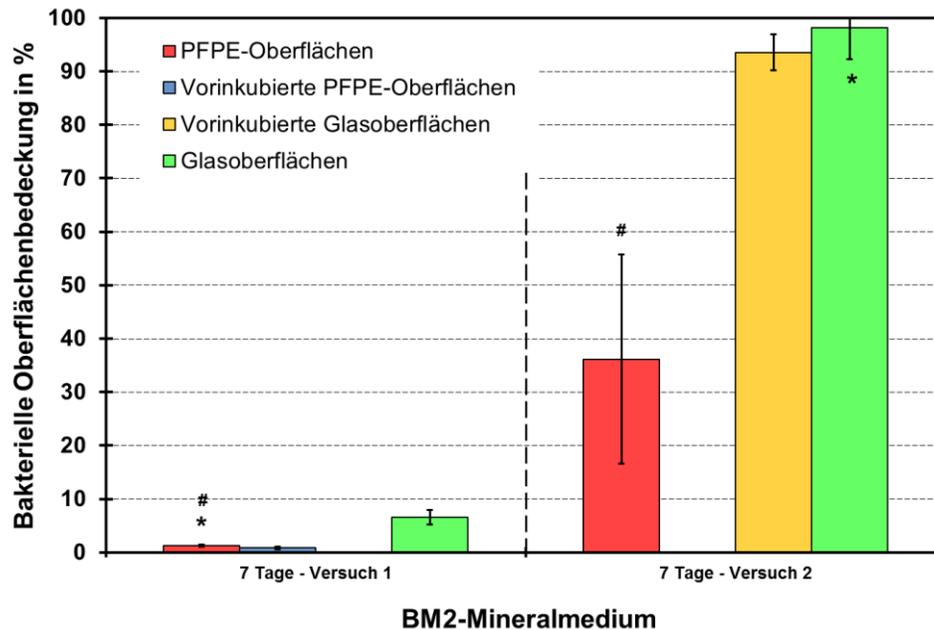


Abb. 4.4. Vergleich der bakteriellen Oberflächenbedeckung auf den PFPE-Oberflächen mit vorinkubierten PFPE-Oberflächen und Glasoberflächen sowie vorinkubierten Glasoberflächen. Die Oberflächen wurden in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium für 48 h vorinkubiert und anschließend mit *P. aeruginosa* PA49 in BM2-Mineralmedium für 7 Tage inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von fünf unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenbedeckung mit respiratorisch aktiven Bakterien.

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen oder Glasoberflächen mit vorinkubierten PFPE-Oberflächen oder vorinkubierten Glasoberflächen)

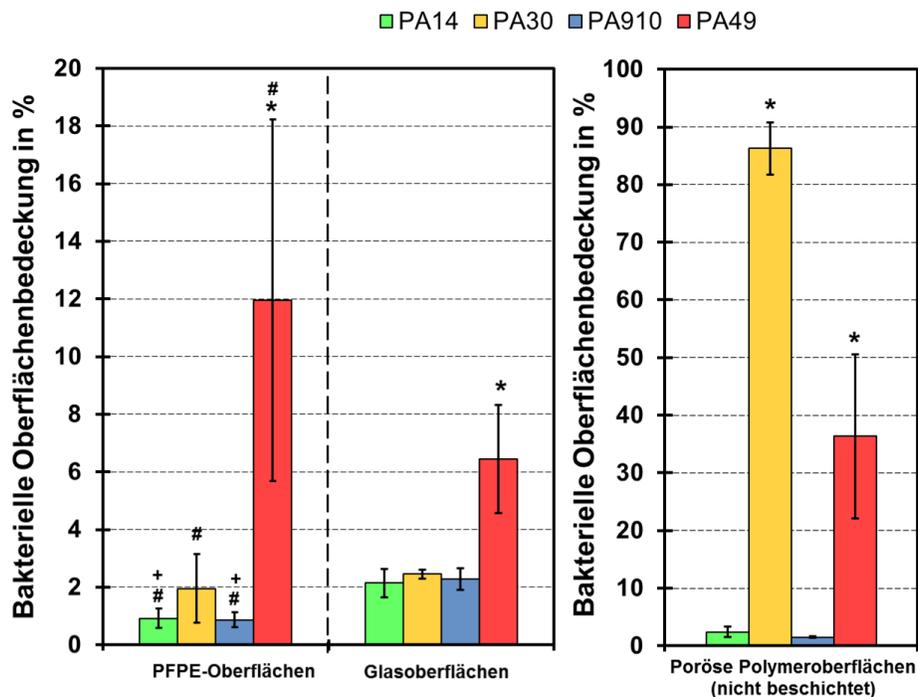
# =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit Glasoberflächen)

#### 4.1.5 Einfluss von nährstoffreichem Medium auf die bakterielle Adhäsion von PFPE-Oberflächen

Um die Effektivität der PFPE-Oberflächen zu demonstrieren, wurde die bakterielle Adhäsion von verschiedenen *P. aeruginosa* Umweltisolaten in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium bei gleicher Flussrate ( $0,94 \text{ mL min}^{-1}$ ) untersucht. Die bakterielle Adhäsion des Referenzstamms *P. aeruginosa* PA14 wurde mit den Umweltisolaten *P. aeruginosa* PA30, PA910 und PA49 verglichen (Abb. 4.5).

Vom Referenzstamm *P. aeruginosa* PA14 besiedelten in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium nach 7-tägiger Inkubation nur einzelne Bakterien und

Mikrokolonien die PFPE-Oberflächen. Die *P. aeruginosa* Umweltstämme PA30 und PA910 zeigten ein ähnliches Verhalten in Kontakt mit den PFPE-Oberflächen wie der *P. aeruginosa* PA14. Im Gegensatz dazu zeigte der multiresistente *P. aeruginosa* PA49 eine vermehrte Kolonisation mit Bakterien auf den PFPE-Oberflächen. *P. aeruginosa* PA49 besaß im Vergleich zu den Stämmen PA14, PA30 und PA910 die höchste Anzahl an Antibiotikaresistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika (Tab. 4.3). Mit etwa 12 % ergab sich für den *P. aeruginosa* Stamm PA49 eine dreizehnmal höhere bakterielle Oberflächenbedeckung als mit *P. aeruginosa* PA14 (ca. 0,9 %) auf den PFPE-Oberflächen und doppelt so viel als auf den Glasoberflächen (PA49: ca. 6,5 %).



#### 7 Tage Inkubation in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium

Abb. 4.5. Vergleich der bakteriellen Oberflächenbedeckung auf den PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen und Glasoberflächen. Die Oberflächen wurden mit *P. aeruginosa* PA14, PA30, PA910 und PA49 in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium für 7 Tage inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von fünf unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenbedeckung mit respiratorisch aktiven Bakterien.

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich *P. aeruginosa* PA30, PA910 oder PA49 mit PA14)

# =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen)

+ =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit Glasoberflächen)

Wird die bakterielle Adhäsion von *P. aeruginosa* PA49 auf den PFPE-Oberflächen in den unterschiedlichen Medien verglichen (Abb. 4.3 und Abb. 4.5), so betrug die bakterielle Adhäsion nach 7-tägiger Inkubation in BM2-Mineralmedium lediglich 0,8-4 %, wohingegen in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium eine bakterielle Oberflächenbedeckung von knapp 12 % bestimmt wurde.

#### 4.1.6 Vergleich des primären Adhäsionsverhaltens von *P. aeruginosa*

Zur Untersuchung des primären Adhäsionsverhaltens von *P. aeruginosa* PA14, PA30, PA910 und PA49 wurden Bakteriensuspensionen in BM2-Mineralmedium oder in nährstoffreichem Medium für 1 h, 2 h oder 3 h in Petrischalen inkubiert (Kap. 3.1.3). Die anschließende Quantifizierung erfolgte durch Anfärben der adhärenierten Bakterien mit Kristallviolett (Kap. 3.1.4).

In Abb. 4.6 sind die Ergebnisse der bakteriellen Adhäsion für die verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme in BM2-Mineralmedium (links) und in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium (rechts) dargestellt. Die Ergebnisse sind dabei jeweils auf den Wert von *P. aeruginosa* PA14 bei gleicher Inkubationszeit normiert.

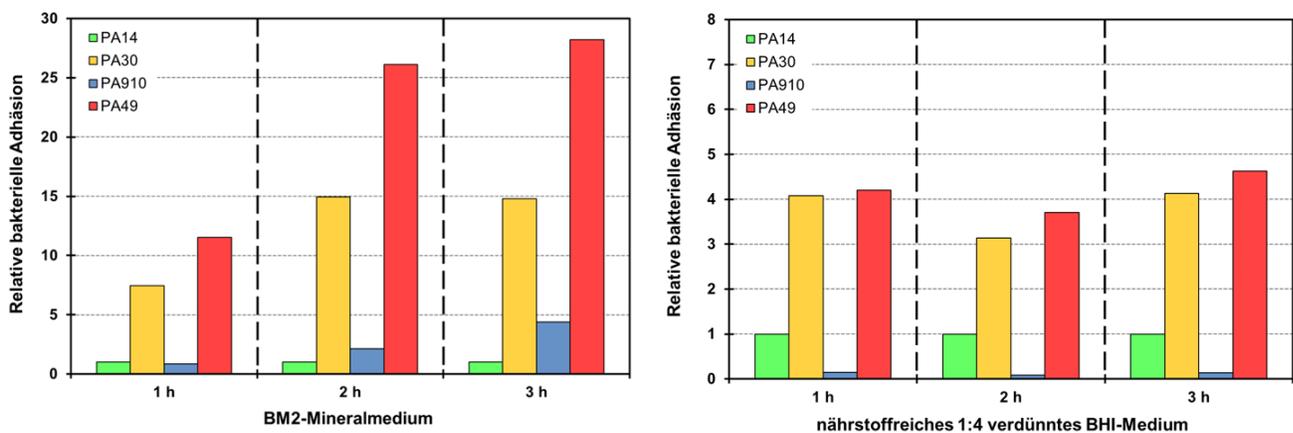


Abb. 4.6. Bakterielle Adhäsion der *P. aeruginosa* Stämme PA30, PA910 und PA49 normiert auf PA14; links: BM2-Mineralmedium, rechts: nährstoffreiches 1:4 verdünntes BHI-Medium nach einer Inkubation von 1 h, 2 h und 3 h

In Abb. 4.6 mit BM2-Mineralmedium wird deutlich, dass die *P. aeruginosa* Stämme PA30 und PA49 eine deutlich größere primäre Adhäsion zeigten als die Stämme PA14

und PA910. Nach nur 1-stündiger Inkubation wurde für *P. aeruginosa* PA30 eine siebenmal größere und für *P. aeruginosa* PA49 sogar eine zwölfmal größere Adhäsion beobachtet. In nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium wies *P. aeruginosa* PA49 ebenso schon nach 1 h die höchste bakterielle Adhäsion auf (viermal größere Adhäsion als von PA14).

#### 4.1.7 Genetische Vielfalt von *P. aeruginosa*

Anhand eines Antibiogramms wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen dem unterschiedlichen Adhäsionsverhalten der *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910, PA49 und Antibiotikaresistenzen bestehen (Kap. 3.1.8).

Das in Tab. 4.3 dargestellte Antibiogramm zeigt die genetische Vielfalt der *P. aeruginosa* Umweltisolate. *P. aeruginosa* PA14 und PA30 besitzen keine Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika. Diese beiden Stämme wurden daher als sensitiv eingestuft, wohingegen die *P. aeruginosa* Stämme PA910 und PA49 mehrere Resistenzen aufweisen. *P. aeruginosa* PA49 zeigte die höchste Anzahl an Antibiotikaresistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika.

Tab. 4.3. Antibiogramm von *P. aeruginosa* PA14, PA30, PA910 und PA49<sup>1</sup>

Bakterienstamm	GM	CIP	IPM	CAZ	AN	AZ	PT
<i>P. aeruginosa</i> PA14	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> PA30	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> PA910	R	R	R	R	S	R	I
<i>P. aeruginosa</i> PA49	R	R	R	R	R	R	R

<sup>1</sup> Plattendiffusionsmethode von folgenden Antibiotika: Gentamicin (GM; 10 µg/Plättchen), Ciprofloxacin (CIP; 5 µg/Plättchen), Imipenem (IPM; 10 µg/Plättchen), Ceftazidime (CAZ; 30 µg/Plättchen), Amikacin (AN; 30 µg/Plättchen), Azlocillin (AZ; 75 µg/Plättchen), Piperacillin/Tazobactam (PT; 100/10 µg/Plättchen); Sensitiv (S), Intermediär (I), Resistent (R)

Darüber hinaus wurden klonale Unterschiede zwischen den *P. aeruginosa* Stämmen PA14, PA30, PA910 und PA49 mittels RAPD-PCR untersucht. Hierfür wurden vier verschiedene Oligonukleotidprimer (10mer) verwendet, die willkürlich an das Genom der

*P. aeruginosa* Stämme binden (Kap. 3.5.1). Die DNA-Bandenprofile, generiert von den Genomen der *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910 und PA49, sind in Abb. 4.7 dargestellt.

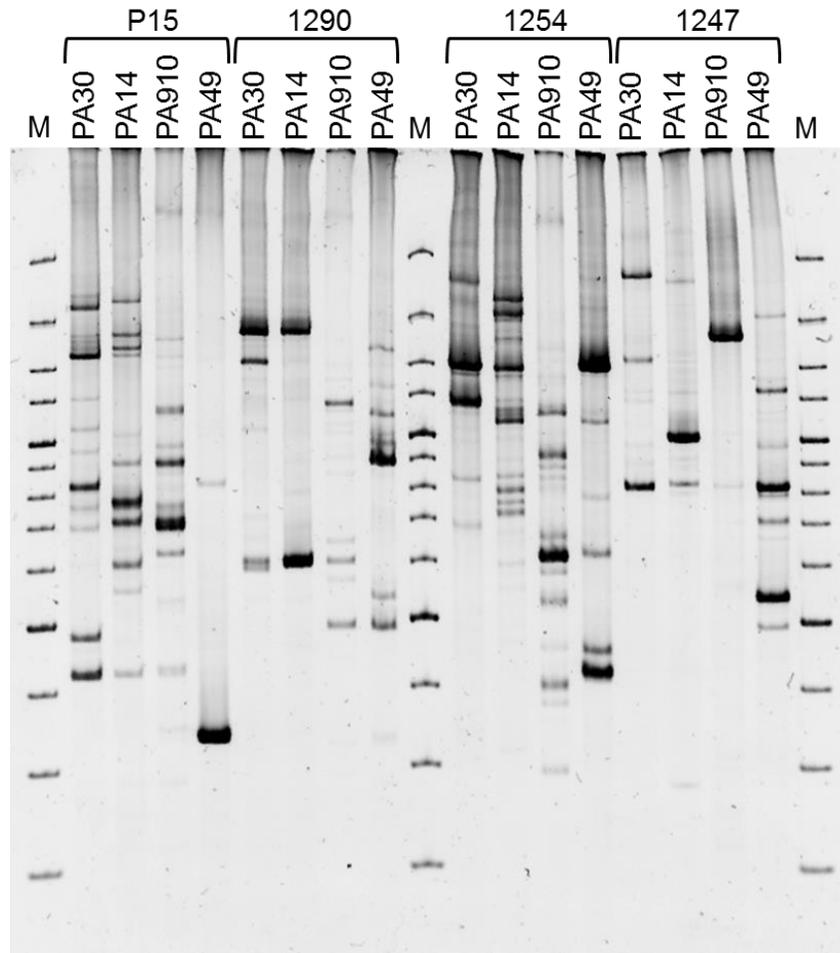


Abb. 4.7. RAPD-PCR DNA-Bandenprofile der *P. aeruginosa* Stämme PA30, PA14, PA910 und PA49 für die Primer P15, 1290, 1254 und 1247; M: DNA Marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

Unterschiede in den Bandenprofilen sind für jeden Primer in Anzahl und Größe der nicht-gerichteten amplifizierten DNA-Fragmente zwischen den vier verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen zu erkennen. Die Ähnlichkeit zwischen den generierten DNA-Bandenprofilen wurde mit dem Ähnlichkeitsindex (Gl. 2) berechnet, wobei 1 eine 100%ige und 0 keine Ähnlichkeit zwischen zwei Genomen bedeutet. Eine große klonale Diversität der verschiedenen *P. aeruginosa* Umweltisolate demonstrierten die Ähnlichkeitsindizes von ungefähr 0,5 und kleiner. Das multiresistente Abwasserisolat

*P. aeruginosa* PA49 besaß besonders in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium auf den PFPE-Oberflächen eine vermehrte Biofilmbildung gegenüber den anderen Stämmen. Das DNA-Bandenprofil von *P. aeruginosa* PA49, generiert mit dem Primer P15, zeigte keine Ähnlichkeit zum Referenzstamm PA14. Geringe Ähnlichkeiten zeigten sich bei der Verwendung der anderen Primer (Tab. 4.4).

Tab. 4.4. Vergleich der RAPD-PCR DNA-Bandenprofile anhand von Ähnlichkeitsindizes (Gl. 2), wobei ein Ähnlichkeitsindex von 1 eine 100 %-ige und 0 keine Ähnlichkeit zwischen den *P. aeruginosa* Stämme PA14, PA30, PA910 und PA49 bedeutet.

Primer	PA14	PA30	PA910	PA49
P15				
<b>PA14</b>	1,00			
<b>PA30</b>	0,48	1,00		
<b>PA910</b>	0,52	0,46	1,00	
<b>PA49</b>	0,00	0,12	0,13	1,00

Primer	PA14	PA30	PA910	PA49
1290				
<b>PA14</b>	1,00			
<b>PA30</b>	0,33	1,00		
<b>PA910</b>	0,14	0,13	1,00	
<b>PA49</b>	0,15	0,27	0,35	1,00

Primer	PA14	PA30	PA910	PA49
1254				
<b>PA14</b>	1,00			
<b>PA30</b>	0,4	1,00		
<b>PA910</b>	0,22	0,11	1,00	
<b>PA49</b>	0,20	0,17	0,15	1,00

Primer	PA14	PA30	PA910	PA49
1247				
<b>PA14</b>	1,00			
<b>PA30</b>	0,46	1,00		
<b>PA910</b>	0,25	0,22	1,00	
<b>PA49</b>	0,25	0,24	0,17	1,00

#### 4.1.8 Inkubation der PFPE-Oberflächen für 21 Tage in Abwasser

Um die Effektivität der generierten PFPE-Oberflächen gegenüber natürlichen Bakterienpopulationen zu untersuchen, wurden die PFPE-Oberflächen in Abwasser inkubiert. Bei einer kontinuierlichen Flussrate von  $0,94 \text{ mL min}^{-1}$  wurden die Testoberflächen für 21 Tage im Biofilm-PFR untersucht (Kap. 3.1.2). Hierfür wurden der Kontaktwinkel (Kap. 3.6) und die bakterielle Oberflächenbedeckung (Kap. 3.4.1) vor und nach 21-tägiger Inkubation bestimmt. Verglichen wurden die PFPE-Oberflächen mit nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen und Glasoberflächen.

Tab. 4.5. Kontaktwinkelmessungen der PFPE-Oberflächen, der nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen und Glasoberflächen vor und nach 21-tägiger Inkubation in Abwasser. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen.

	Statischer Kontaktwinkel		Kontaktwinkelhysterese	
	Tag 0	Tag 21	Tag 0	Tag 21
PFPE-Oberflächen	113,5±2,3°	105,1±3,1° *	0,9°	11,0° *
Poröse Polymeroberflächen (nicht beschichtet)	140,7±5,8°	60,3±8,0° *	38,6°	72,1° *
Glasoberflächen	20,8±3,2°	47,6±5,5° *	31,5°	49,8° *

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der Oberflächen Tag 0 mit Tag 7)

Wie in Tab. 4.5 erkennbar, veränderte sich der Kontaktwinkel der PFPE-Oberflächen nur geringfügig. Der statische Kontaktwinkel fiel von  $113,5^\circ$  auf  $105,1^\circ$  und die Kontaktwinkelhysterese stieg von  $0,9^\circ$  auf  $11,0^\circ$  nach 21-tägiger Inkubation in Abwasser. Der Kontaktwinkel der nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen veränderte sich nach 21 Tagen in Abwasser hingegen merklich. Der statische Kontaktwinkel fiel von  $140,7^\circ$  auf  $60,3^\circ$  und die Kontaktwinkelhysterese stieg von  $38,6^\circ$  auf  $72,1^\circ$ . Eine steigende Kontaktwinkelhysterese durch die Inkubation lässt vermuten, dass die Oberflächenrauigkeit und/oder die Heterogenität der Oberfläche zugenommen haben, was wiederum kinetische Barrieren für die Tropfenbewegung verursacht [98].

Bei den PFPE-Oberflächen veränderte sich der Kontaktwinkel nur gering, dies wird durch eine geringe Besiedelung mit Bakterien von ca. 1,22 % bestätigt (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu zeigten die nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen die höchste bakterielle Adhäsion mit etwa 6,5 %, die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung

demonstrierten ebenso die größte Veränderung bei Vergleich der Oberflächen vor und nach 21 Tagen Inkubation. Die Glasoberflächen lagen mit einer bakteriellen Oberflächenbedeckung von 4,9 % dazwischen. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die bakterielle Oberflächenbedeckung nach Inkubation in Abwasser bei allen untersuchten Oberflächen gering war. Die maximale bakterielle Oberflächenbedeckung demonstrierten die nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen mit 6,5 %.

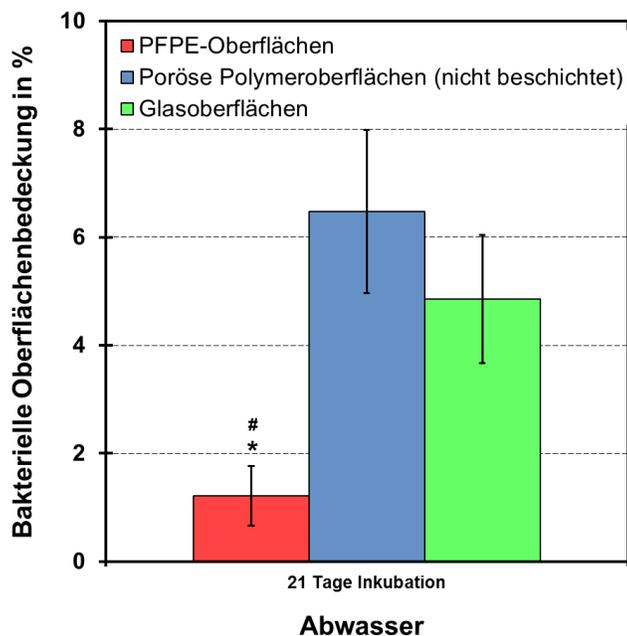


Abb. 4.8. Vergleich der bakteriellen Oberflächenbedeckung auf den PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen und Glasoberflächen. Diese Oberflächen wurden für 21 Tage in Abwasser inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von fünf unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenbedeckung mit respiratorisch aktiven Bakterien.

\* =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit porösen Polymeroberflächen)

# =  $p < 0,05$  im Student's t-Test (Vergleich der PFPE-Oberflächen mit Glasoberflächen)

#### 4.1.9 Kurzzusammenfassung

Die Beschichtung der porösen Polymeroberflächen mit PFPE-Flüssigkeit verminderte bis zu 97,6 % der Biofilmbildung im Vergleich zu Glasoberflächen. Ein Grund dafür ist die durch Kontaktwinkelmessungen gezeigte hohe Stabilität der PFPE-Oberflächen in

wässrigen Medien. Die Minderung der bakteriellen Adhäsion auf den PFPE-Oberflächen ist dabei auf die Oberflächeneigenschaften und nicht auf toxische Effekte zurückzuführen. Die Ergebnisse belegten allerdings auch, dass die bakterielle Adhäsion auf den PFPE-Oberflächen vom verwendeten *P. aeruginosa* Stamm abhängig war, wobei die untersuchten *P. aeruginosa* Stämme eine große klonale Diversität zeigten. Wird das multiresistente Umweltisolat PA49 in nährstoffreichem Medium eingesetzt, wurde auch auf den PFPE-Oberflächen eine geringe bakterielle Adhäsion beobachtet.

Die Ergebnisse sind auch in folgender Publikation zusammengefasst:

T. KLEINTSCHEK, J. LI, A. RIEDER, Y. CHENG, T. BAUMBACH, U. OBST, T. SCHWARTZ, P.A. LEVKIN: Hydrophobic Liquid-Infused Porous Polymer Surfaces for Antibacterial Applications. In: *ACS Applied Materials & Interfaces* 5 (2013), S. 6704-6711.

## 4.2 Einfluss pilzlicher Fermentationsüberstände auf Biofilme

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung neuartiger pilzlicher Exoprodukte hinsichtlich der Eignung zur schonenden Reinigung von verschmutzten RO-Membranen (RO = Reverse Osmosis).

In dieser Arbeit wurden 406 Fermentationsüberstände von unterschiedlichen Pilzen bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung untersucht. Durch eine Kooperation mit der BASF SE wurden die Fermentationsüberstände zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung wurden die verschiedenen Pilzkulturen in Batch-Fermentationen für 7 oder 10 Tage kultiviert. Die 406 Pilzkulturen stammen aus Stammsammlungen der BASF SE. Nach der Fermentation erfolgte eine grobe Filtration, um die Pilzkulturen vom Fermentationsüberstand abzutrennen.

### 4.2.1 Populationszusammensetzung bakterieller Biofilme auf realen RO-Membranen

Die Biofilmpopulationen wurden qualitativ mit der PCR-DGGE untersucht, um Unterschiede in der Biofilmmzusammensetzung auf realen RO-Membranen zu detektieren (Kap. 3.5.2). Exemplarisch wurden sechs RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft (Tab. 4.6) untersucht. Die RO-Membranen wurden vom Kooperationspartner BASF SE zur Verfügung gestellt.

Tab. 4.6. Überblick über die untersuchten RO-Membranen

Süßwassermembran		Brackwassermembran		Salzwassermembran	
A	Trinkwasseraufbereitung	C	Barcelona, 3 Jahre alt	E	Las Palmas, 3 Jahre
B	MDF-Plattenproduktion	D	Dubai	F	Australien

Die PCR-DGGE mit dem Primerpaar 27F und 517R ermöglicht dabei die Schmelzeigenschaften von 16S rDNA-Fragmenten mit einer Größe von 526 bp von Eubakterien zu vergleichen. Anhand der in Abb. 4.9 dargestellten 16S rDNA-DGGE-Profile konnte die Biodiversität und die Ähnlichkeit von Biofilmpopulationen auf RO-Membranen verglichen werden.

Bei den sechs untersuchten RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft wurden zwischen 12 und 18 verschiedene DNA-Banden detektiert. Diese Biodiversität gibt Informationen über die Anzahl der Bakterienspezies in einer Population, aber nicht über die Menge der Bakterien in der Probe [94]. Die höchste bakterielle Diversität zeigte die RO-Membran aus der Trinkwasseraufbereitung (A) mit 18 Banden. Geringere bakterielle Diversitäten zeigten die Brackwasser- und Salzwassermembranen, die zwischen 12 und 15 DNA-Banden besaßen.

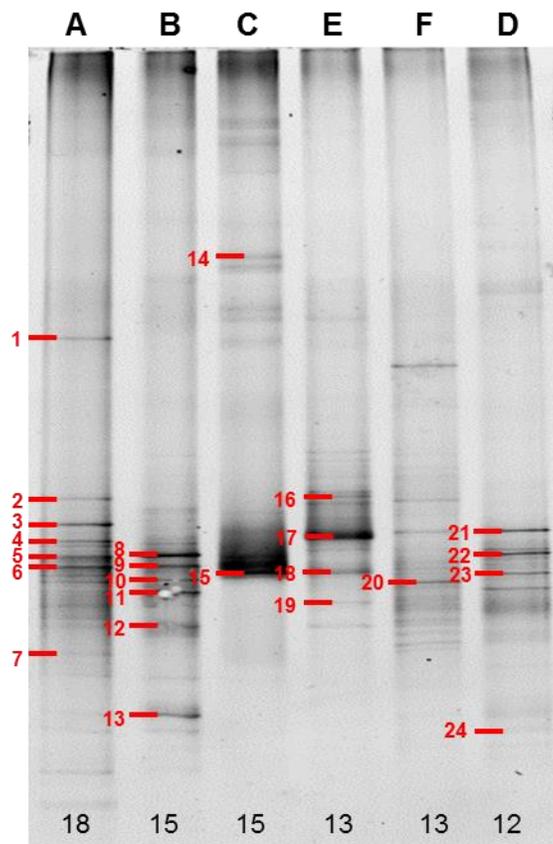


Abb. 4.9. 16S rDNA-DGGE-Profile bakterieller Biofilmpopulationen auf RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft: (A) Trinkwasseraufbereitung, (B) MDF-Plattenproduktion, Brackwassermembranen aus (C) Barcelona und (D) Dubai, Salzwassermembranen aus (E) Las Palmas und (F) Australien. Die durchnummerierten Zahlen (rot) stellen die sequenzierten Banden dar. Die Zahlen am unteren Ende jeder Bahn stellen die Gesamtbandenzahl jeder Probe dar.

Die Ähnlichkeitsindizes (Gl. 2) für den Vergleich der Bakterienpopulationen zweier RO-Membranen sind in Tab. 4.7 gegeben, wobei ein Ähnlichkeitsindex von 1 eine 100 %-ige und 0 keine Ähnlichkeiten zwischen zwei Bakterienpopulationen bedeutet. Die

Biofilmpopulationen der sechs untersuchten RO-Membranen zeigten nur geringe Ähnlichkeiten zueinander, das demonstrierten die Ähnlichkeitsindizes von ungefähr 0,3 und kleiner (Tab. 4.7). Geringe Ähnlichkeiten zueinander besaßen die zwei Salzwassermembranen aus Las Palmas und Australien ( $F_{xy} = 0,17$ ). Eine sehr geringe Ähnlichkeit zueinander demonstrierten schließlich die zwei Biofilmpopulationen der Brackwassermembranen aus Barcelona und Dubai mit  $F_{xy} = 0,08$ .

Tab. 4.7. Vergleich der 16S rDNA-DGGE-Profile anhand von Ähnlichkeitsindizes, wobei ein Ähnlichkeitsindex von 1 eine 100 %-ige und 0 keine Ähnlichkeit zwischen zwei Biofilmpopulationen bedeutet. Untersucht wurden sechs RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft: (A) Trinkwasseraufbereitung, (B) MDF-Plattenproduktion, Brackwassermembranen aus (C) Barcelona und (D) Dubai, Salzwassermembranen aus (E) Las Palmas und (F) Australien.

RO-Membran	A	B	C	D	E	F
A	1,00					
B	0,31	1,00				
C	0,00	0,00	1,00			
D	0,08	0,08	0,08	1,00		
E	0,10	0,00	0,00	0,15	1,00	
F	0,26	0,24	0,00	0,27	0,17	1,00

Die dominierenden Bakterienpopulationen auf den RO-Membranen wurden durch Sequenzierung der 16S rDNA-Fragmente aus der DGGE-Analyse mittels Datenbankabgleichs (NCBI-BlastN) identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.8 dargestellt.

Tab. 4.8. Überblick über sequenzierte DNA-Fragmente der Biofilmpopulationen auf den RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft: (A) Trinkwasseraufbereitung, (B) MDF-Plattenproduktion, Brackwassermembranen aus (C) Barcelona und (D) Dubai, Salzwassermembranen aus (E) Las Palmas und (F) Australien.

Probennummer	Sequenzgröße in bp	Accession Nummer	Engste phylogenetische Verwandtschaft (NCBI-BlastN)	Sequenzidentität in %	Phylum/Klasse
A1	385	JF707453	<i>Acidobacteria bacterium</i>	97	Acidobacteria
A2	327	AF361187	<i>Flexibacter</i> sp.	97	Bacteroidetes
		JN674641	<i>Sediminibacterium</i> sp.	88	
		FJ177533	<i>Flavosolibacter</i> sp.	87	
A3	415	NR_041585	<i>Rhizobacter dauci</i>	98	$\gamma$ -Proteobacteria
A4	411	NR_041768	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	98	$\beta$ -Proteobacteria
A5	440	AB289613	<i>Mesorhizobium loti</i>	95	$\alpha$ -Proteobacteria
		FJ025123	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	95	
A6	368	AB680816	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
A7	369	FJ190062	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	82	$\delta$ -Proteobacteria
B8	455	GQ891725	<i>Acidovorax delafieldii</i>	99	$\beta$ -Proteobacteria
B9/10	368/385	AB680816	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
		JQ039739	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	98	
		AB681833	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	98	
B11	397	HE801231	<i>Caulobacter vibrioides</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
		AB680820	<i>Caulobacter segnis</i>	99	
B12	439	JF734327	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	98	Actinobacteria
		HQ845985	<i>Mycobacterium phocaicum</i>	98	
		AM884316	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	98	
		JQ897420	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	97	
B13	359	GQ889459	<i>Isosphaera</i> sp.	96	Planctomycetes
C14/15	371/372	AF417546	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
D16	455	EU440977	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99	$\gamma$ -Proteobacteria
D17	389	GQ891706	<i>Caulobacter leidyia</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
		FJ599671	<i>Sphingopyxis soli</i>	98	
D18	342	JF738027	<i>Rhodobacter azotoformans</i>	97	
D19	380	AF461159	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	95	
E20	415	HM133909	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	93	$\gamma$ -Proteobacteria
E21	379	AB681839	<i>Iodobacter fluviatilis</i>	93	$\beta$ -Proteobacteria
		GU397630	<i>Neisseria bacilliformis</i>	93	
E22	373	AF417546	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	$\alpha$ -Proteobacteria
E23	372	GU370084	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	92	
F24	414	AB681847	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	99	$\beta$ -Proteobacteria
		AB681846	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	99	
		NR_029024	<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	99	

Abb. 4.10 zeigt die Biofilmdiversität der sechs untersuchten RO-Membranen. Bei der bakteriellen Biofilmpopulation der RO-Membran aus der Trinkwasseraufbereitung (A)

dominierten Bakterienarten aus 6 verschiedenen Phyla bzw. Klassen. Hier wurden  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien, Acidobakterien und Bacteroidetes identifiziert, wohingegen auf der RO-Membran aus der MDF-Plattenproduktion  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobakterien, Actinobakterien und Planctomycetes identifiziert wurden. MDF-Platten sind dabei mitteldichte Faserplatten. Für die Herstellung wird Holz zerfasert, beleimt und anschließend zu Platten gepresst.

In den Biofilmpopulationen der Brackwassermembran aus Barcelona (C) und der Salzwassermembran aus Australien (F) dominierte nur eine Bakterienart. Auf der Brackwassermembran aus Barcelona (C) dominierten  $\alpha$ -Proteobakterien, wohingegen auf der Salzwassermembran aus Australien (F)  $\beta$ -Proteobakterien dominierten. Auf der Brackwassermembran aus Dubai (D) wurden  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien identifiziert. Auf der Salzwassermembran aus Las Palmas (E) wurden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien identifiziert. Der überwiegende Teil der identifizierten Spezies auf den sechs untersuchten RO-Membranen waren somit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobakterien zuzuordnen, zu denen die meisten aquatischen Bakterien gehören.

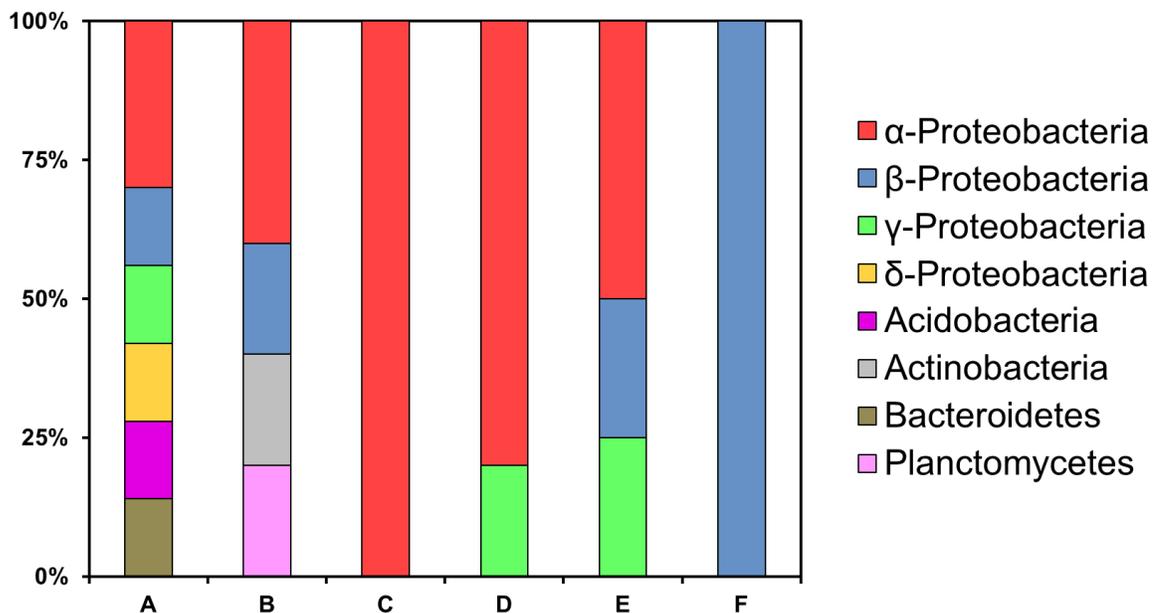


Abb. 4.10. Vergleich der Biofilmdiversität realer RO-Membranen unterschiedlicher Herkunft: (A) Trinkwasseraufbereitung, (B) MDF-Plattenproduktion, Brackwassermembranen aus (C) Barcelona und (D) Dubai, Salzwassermembranen aus (E) Las Palmas und (F) Australien.

Gleichzeitig wurden ESEM-Aufnahmen von den RO-Membranen aus der Trinkwasseraufbereitung, aus der MDF-Plattenproduktion und von den Salzwassermembranen aus Australien und Las Palmas aufgenommen. Anhand der ESEM-Aufnahmen war auf keiner der untersuchten RO-Membranen bakterielle Adhäsion bzw. ein dichter Biofilm zu erkennen. Auf den ESEM-Aufnahmen der Salzwassermembran aus Australien waren Kristallstrukturen zu erkennen. Vereinzelt waren zudem Kieselalgen zu beobachten (Abb. 4.11F). Abb. 4.11 und Abb. 8.1 (Anhang) zeigen jedoch, dass auf den untersuchten RO-Membranen eine hohe Belastung an nicht biogenem Material vorlag.

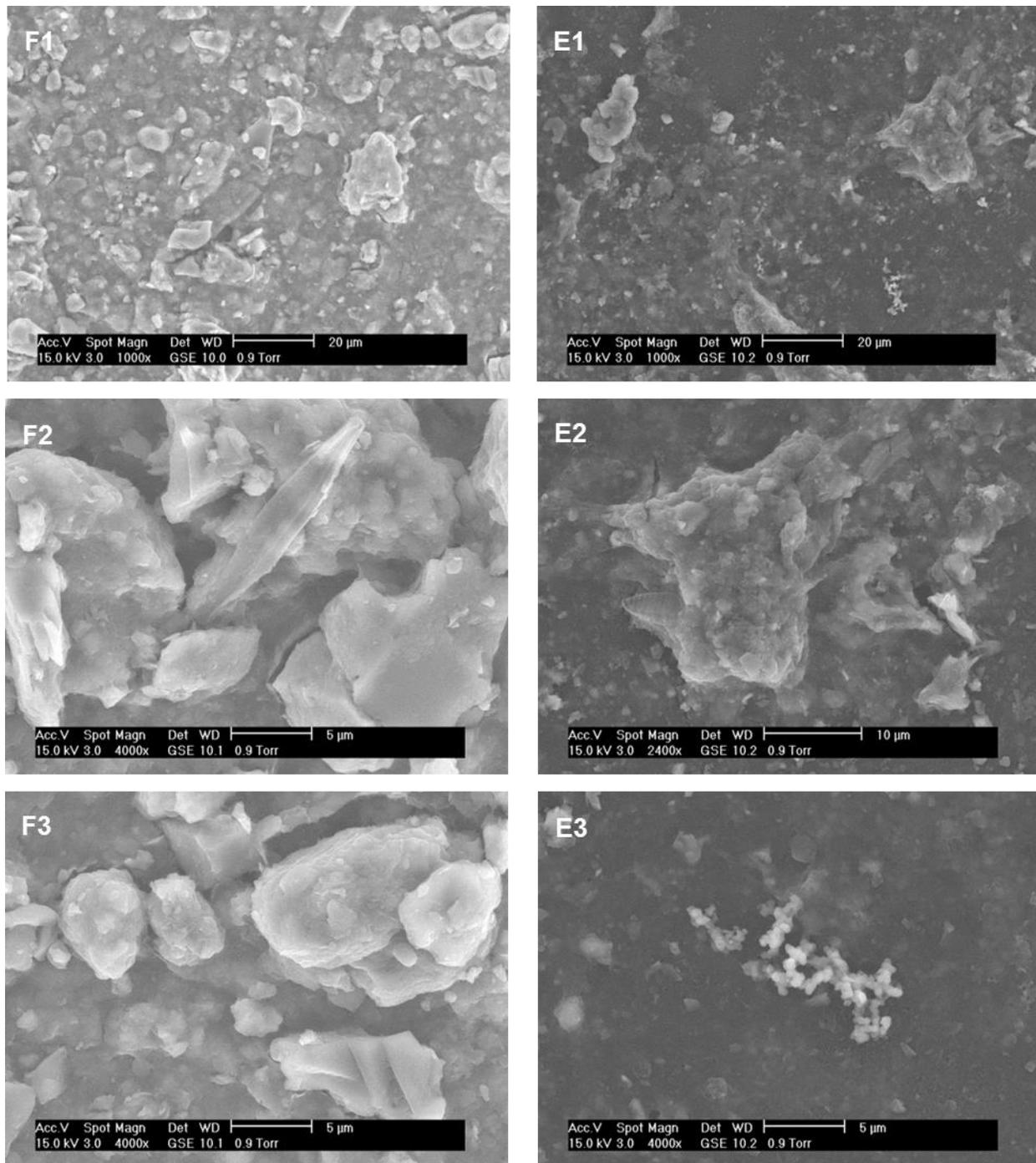


Abb. 4.11. ESEM-Aufnahmen von Salzwassermembranen aus (F1-F3) Australien und aus (E1-E3) Las Palmas

#### 4.2.2 Etablierung eines Standard-Assays für das Screening pilzlicher Fermentationsüberstände

Um die Kultivierungsbedingungen für das Screening der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände in 96-well Mikrotiterplatten zu definieren, sollte der Biofilm folgende Bedingungen erfüllen:

- Aus einer einzelnen Bakterienspezies bestehen
- Eine hohe Stabilität besitzen
- Eine hohe Biofilmbiomasse besitzen

Hierfür wurden drei verschiedene *P. aeruginosa* Stämme und fünf verschiedene Medien bei zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Stabilität der Biofilme wurde durch dreimaliges Waschen überprüft (Kap. 3.2.1).

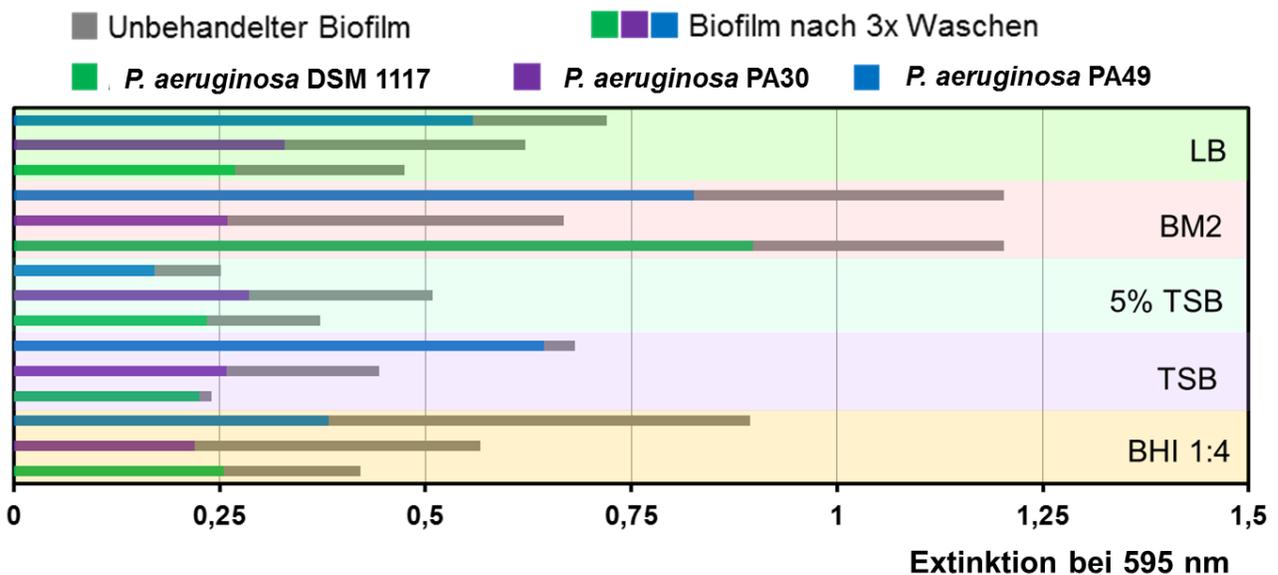


Abb. 4.12. Einfluss verschiedener Kulturmedien und Inkubationszeit auf die Stabilität und die Biomasse definierter Biofilme. Biofilmanzucht von drei verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen mit fünf verschiedenen Medien für 12 h.

In Abb. 4.12 ist die Biofilmanzucht beispielhaft für 12 h (24 h siehe Anhang, Abb. 8.2) dargestellt. Die gemessene Extinktion von *P. aeruginosa* PA49 in BM2-Mineralmedium fiel durch dreimaliges Waschen von ca. 1,2 auf 0,8, in TSB-Medium fiel die Extinktion durch das dreimalige Waschen lediglich von ca. 0,68 auf 0,64. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Stabilität aller Biofilme durch das dreimalige Waschen angegriffen

wurde und sich die Biofilmbiomasse oft deutlich reduzierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *P. aeruginosa* PA49, kultiviert in TSB-Medium oder in BM2-Mineralmedium, für das Screening gewählt, da unter diesen Kultivierungsbedingungen ein stabiler Biofilm mit hoher Biomasse in 96-well Mikrotiterplatten angezüchtet werden konnte. Um die Biofilmanzucht über Nacht durchzuführen, wurde eine Biofilmanzucht von 15 h gewählt (Tab. 4.9).

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Biofilmbiomassen durch das Anfärben mit Kristallviolett. Hierfür wurde die optimale Kristallviolett-Konzentration für das Anfärben von 15 h-alten *P. aeruginosa* PA49-Biofilmen in TSB-Medium oder in BM2-Mineralmedium untersucht. Ausgehend von einer 2%-igen Kristallviolett-Stammlösung wurde mit dH<sub>2</sub>O eine zweifache Verdünnungsreihe hergestellt. Zur anschließenden Quantifizierung des herausgelösten Farbstoffs wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt (Kap. 3.1.4).

Die Kurven in Abb. 4.13 zeigen einen ähnlichen Verlauf, wobei die Kurve der in BM2-Mineralmedium angezüchteten Biofilme (blaue Kurve) leicht über der Kurve mit TSB-Medium (grüne Kurve) liegt. Aufgrund der Abb. 4.13 wurde eine Kristallviolett-Konzentration von 0,05 % aus dem linearen Bereich für das Anfärben der Biofilmbiomasse gewählt.

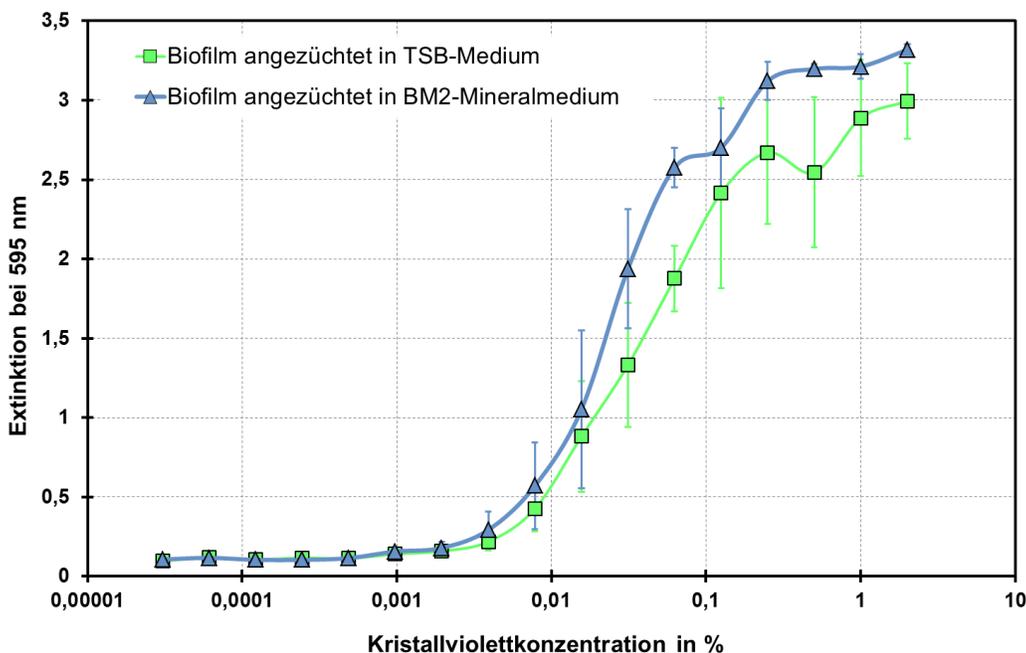


Abb. 4.13. Die Biomassen von 15 h-alten *P. aeruginosa* PA49-Biofilmen wurden mit unterschiedlichen Kristallviolett-konzentrationen gefärbt und anschließend die Extinktion bei 595 nm der zur Entfärbung verwendeten Essigsäurelösung gemessen. Die Anzucht erfolgte mit TSB-Medium (grüne Kurve) oder BM2-Mineralmedium (blaue Kurve) in 96-well Mikrotiterplatten. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen.

Anhand dieser Vorversuche wurde für das Screening der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände das folgende Protokoll etabliert. Das Screening erfolgte statisch in 96-well Mikrotiterplatten. Ausgehend von Übernachtskulturen wurden Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,2 (ca.  $2,28 \cdot 10^8$  KBE mL<sup>-1</sup>) in BM2-Mineralmedium oder TSB-Medium hergestellt. Nachfolgend wurde in jede Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte 200 µL Bakteriensuspension gegeben. Die anschließende Biofilmanzucht erfolgte für 15 h bei 37 °C und 100 rpm. Nach der Biofilmbildung wurden diese einmal mit Zellwaschpuffer (5 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris; pH 8,0) gewaschen. Zur anschließenden Behandlung der Biofilme wurde in jede Kavität 200 µL pilzlicher Fermentationsüberstand gegeben. Als Kontrolle wurde anstelle des Fermentationsüberstands 200 µL PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 5,9) verwendet. Die Behandlung pro Fermentationsüberstand und Bedingung wurde in Duplikaten durchgeführt. Nach Behandlung der Biofilme mit den pilzlichen

Fermentationsüberständen wurde der Überstand vorsichtig entnommen, die Biofilme zweimal mit 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5 gewaschen und getrocknet. Die anschließende Quantifizierung der Biofilmbiomasse erfolgte mit dem Kristallviolett Assay (Kap. 3.1.4).

### 4.2.3 Ergebnisse des Screenings der pilzlichen Fermentationsüberstände

Alle 406 Fermentationsüberstände wurden, wie zuvor erwähnt, mit einem in dieser Arbeit entwickelten Screeningverfahren bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung geprüft. Der Ablauf des Screenings erfolgte entsprechend dem Fließschema in Abb. 4.14.

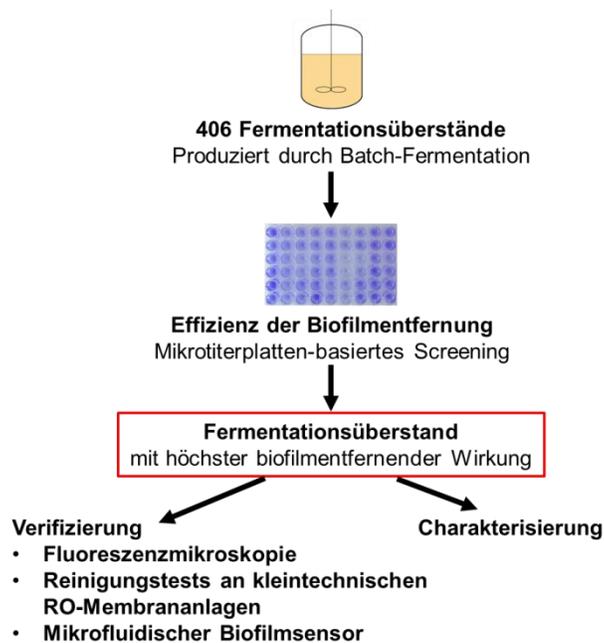


Abb. 4.14. Fließschema zum Ablauf des Screenings der 406 Fermentationsüberstände

Die 406 Fermentationsüberstände wurden bei fünf verschiedenen Bedingungen, zusammengefasst in Tab. 4.9, getestet. *P. aeruginosa* PA49-Biofilme wurde in TSB-Medium oder in BM2-Mineralmedium für 15 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (100 rpm) in 96-well Mikrotiterplatten angezüchtet. Die Behandlung der 15 h-alten Biofilme erfolgte jeweils für 2 h oder 6 h bei 37 °C oder Raumtemperatur und bei leichtem Schütteln (100 rpm).

Tab. 4.9. Überblick über die verwendeten Bedingungen für das Screening der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände

<i>P. aeruginosa</i> PA49	TSB-Medium		BM2-Mineralmedium		
	<b>Kultivierungstemperatur</b>	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
<b>Kultivierungszeit</b>	15 h	15 h	15 h	15 h	15 h
<b>Behandlungstemperatur</b>	37 °C	23±2 °C	37 °C	23±2 °C	37 °C
<b>Behandlungszeit</b>	2 h	2 h	2 h	2 h	6 h

Anschließend wurden die Biofilmbiomassen kolorimetrisch mit einer 0,05%-igen Kristallviolettlösung gefärbt und die Extinktion bei 595 nm der zur Entfärbung verwendeten Essigsäurelösung gemessen (Kap. 3.1.4).

Anhand der gemessenen Extinktionswerte wurde die prozentuale Biofilmreduktion, verursacht durch die Wirkung der Fermentationsüberstände, mit Hilfe von Gl. 4 berechnet. Hierbei wurde der Extinktionsmesswert der Kontrolle (unbehandelter Biofilm) ins Verhältnis zum Extinktionsmesswert des behandelten Biofilms gesetzt.

$$r = 100 - \left( \frac{100}{\left( \frac{K}{M} \right)} \right) \quad \text{Gl. 4}$$

Dabei ist  $r$  die Biofilmreduktion in Prozent,  $K$  ist der Mittelwert der Extinktionsmesswerte der Kontrolle (unbehandelte Biofilme) und  $M$  der Mittelwert der Extinktionsmesswerte der behandelten Biofilme.

Eine Einteilung der 406 Fermentationsüberstände für die fünf getesteten Bedingungen erfolgte bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung in drei Gruppen: 75-100 % Biofilmreduktion (rot), 65-74 % Biofilmreduktion (orange) und 50-64 % Biofilmreduktion (gelb). Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang (Tab. 8.1) zusammengefasst. Ein Überblick über die Verteilung der effektiven Fermentationsüberstände bei den verschiedenen Bedingungen gibt Abb. 4.15. Beim Vergleich aller Bedingungen wurden zwischen 0 und 6 pilzliche Fermentationsüberstände identifiziert, die die Biofilmbiomasse zwischen 75 und 100 % entfernten. Eine Biofilmreduktion zwischen 65 und 74 % bewirkten zwischen 1 und 10 Fermentationsüberstände. Eine Biofilmreduktion

zwischen 50 und 64 % wiesen sogar 12 bis 48 Fermentationsüberstände auf. Bei der Biofilmanzucht in BM2-Mineralmedium mit einer Biofilmbehandlung von 6 h wurde mit 6 Überständen die höchste Anzahl an effektiven Fermentationsüberständen identifiziert.

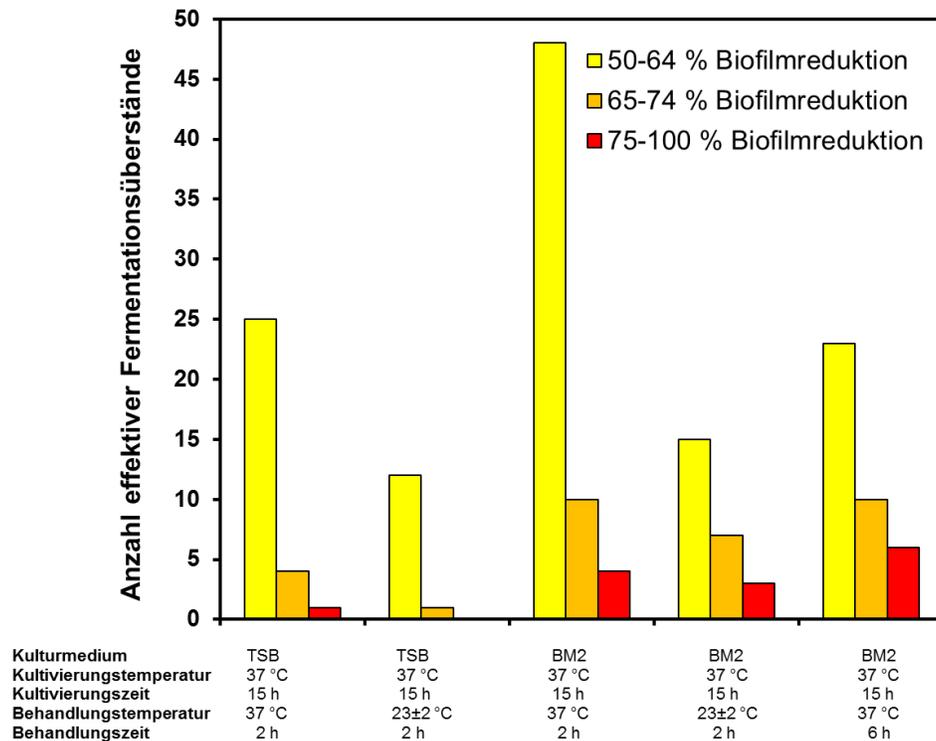


Abb. 4.15. Verteilung der effektiven Fermentationsüberstände, dargestellt bei fünf verschiedenen Bedingungen

Zusätzlich zum Kristallviolett Assay wurden die wirkungsstarken Fermentationsüberstände mit dem Resazurin Assay (Kap. 3.1.4) verifiziert. Resazurin wird von metabolisch aktiven Bakterien zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16 dargestellt.

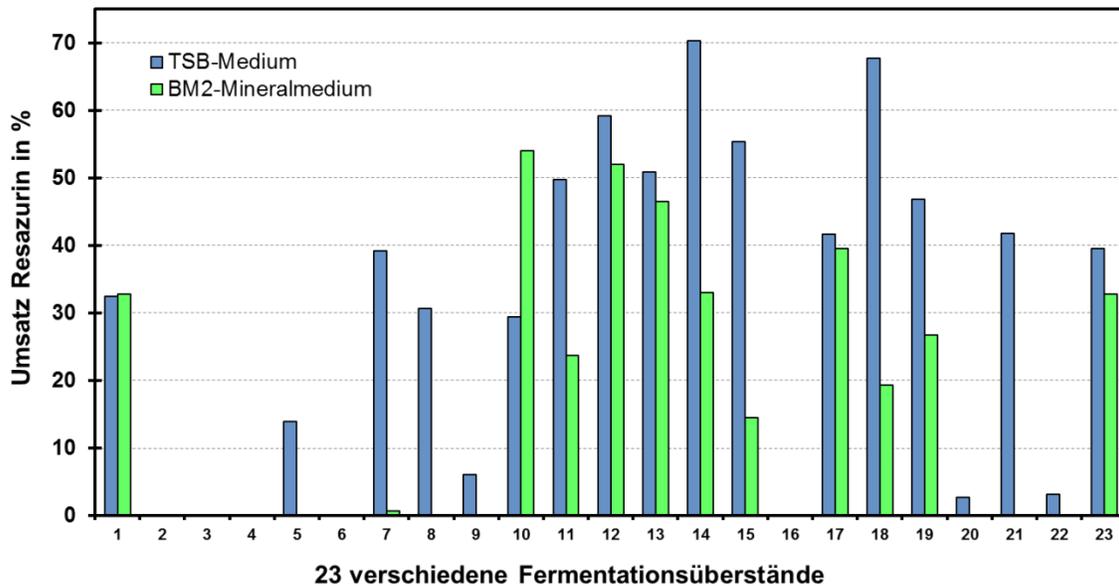


Abb. 4.16. Ergebnisse des Resazurin Assays. Dargestellt ist der Umsatz nach 60 min von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin durch metabolisch aktive Bakterien. 2-stündige Behandlung von 15 h-alten *P. aeruginosa* PA49-Biofilmen, in TSB-Medium (blau) oder BM2-Mineralmedium (grün), mit 23 vielversprechenden Fermentationsüberständen.

Anhand der Ergebnisse des Kristallviolett und des Resazurin Assays wurde, ausgehend von 406 pilzlichen Fermentationsüberständen, ein Überstand identifiziert, der eine sehr starke Wirkung aufwies. Hierbei handelt es sich um den Fermentationsüberstand von *Polyporus squamosus*, der zu den Ständerpilzen (Basidiomycota) gehört.

Darüber hinaus wurden 8 Fermentationsüberstände mit einer starken biofilmentfernenden Wirkung und 14 Fermentationsüberstände mit einer mäßigen biofilmentfernenden Wirkung identifiziert (Tab. 4.10).

Tab. 4.10. Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenings der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung

Einteilung der pilzlichen Fermentationsüberstände	Abkürzung	Anzahl
Ineffektive Fermentationsüberstände	F-	383
Fermentationsüberstände mit mäßiger biofilmentfernender Wirkung	F+	14
Fermentationsüberstände mit starker biofilmentfernender Wirkung	F++	8
Fermentationsüberstand mit höchster biofilmentfernender Wirkung	F+++	1

Einen Vergleich zwischen unbehandelten und behandelten Biofilmen gibt Abb. 4.17. Der Fermentationsüberstand (F+++)  
zeigte bei allen fünf Bedingungen entsprechend Tab. 4.9 eine Biofilmreduktion von über 53 % mit einer maximalen Reduktion von sogar 80 % (Abb. 4.17). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die geringe Aktivität metabolisch aktiver Biofilmbakterien im Resazurin Assay, wobei das Resazurin innerhalb von 60 min nur geringfügig (ca. 6 % Resazurin Umsatz) bis gar nicht umgesetzt wurde.

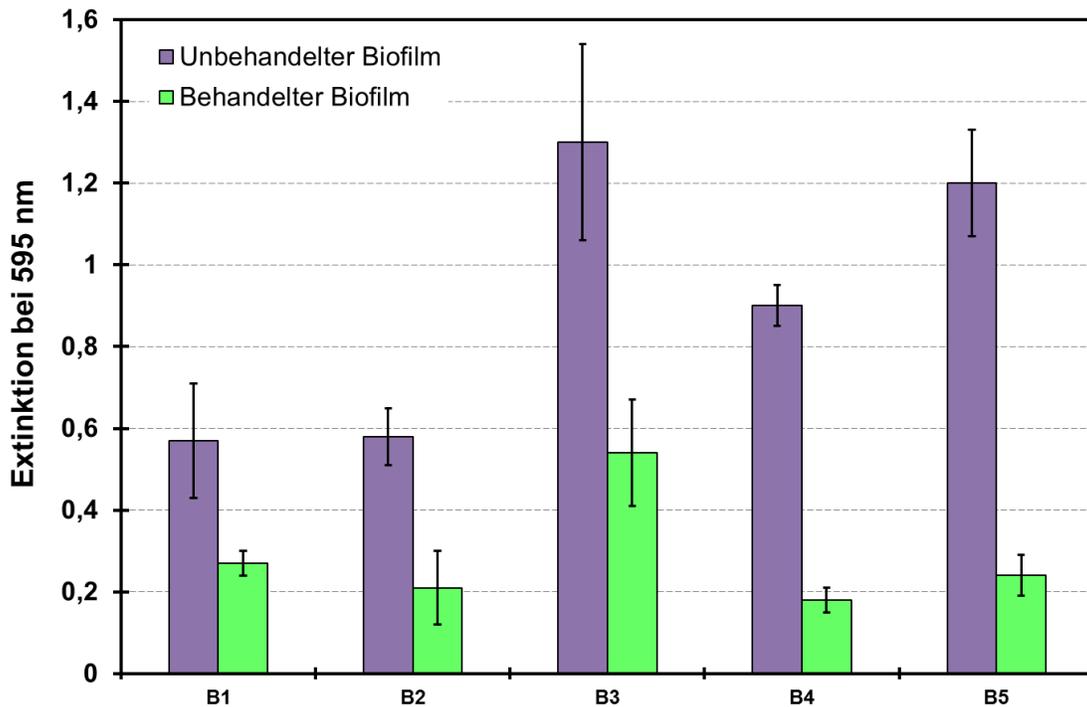


Abb. 4.17. Dargestellt sind die Ergebnisse des Kristallviolett Assays vom Fermentationsüberstand (F+++). Die Behandlung eines 15 h-alten Biofilms erfolgte (B1) mit TSB-Medium für 2 h bei 37 °C; (B2) mit TSB-Medium für 2 h bei 23±2 °C; (B3) mit BM2-Mineralmedium für 2 h bei 37 °C; (B4) mit BM2-Mineralmedium für 2 h bei 23±2 °C; und (B5) mit BM2-Mineralmedium für 6 h bei 37 °C. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.2.4 Charakterisierung des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands

Die genauere Untersuchung des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++) erfolgte anhand fluoreszenzmikroskopischer 3D-Aufnahmen. Hierfür wurden die Bakterien in den Biofilmen mit den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9 und Propidiumiodid gefärbt (Kap. 3.4.1).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines unbehandelten Biofilms im Vergleich zu einem für 2 h mit Fermentationsüberstand behandelten Biofilm sind beispielhaft in Abb. 4.18 dargestellt. Der unbehandelte Biofilm (Abb. 4.18A) wies eine homogene Struktur auf, im Vergleich dazu war die 3D-Architektur des behandelten Biofilms (Abb. 4.18B) deutlich verändert.

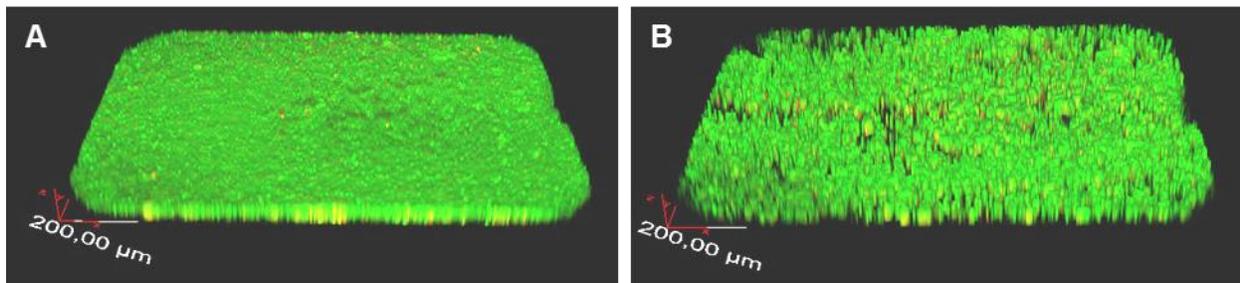


Abb. 4.18. Fluoreszenzmikroskopische 3D-Aufnahmen (A) unbehandelten Biofilm und (B) Biofilm nach 2-stündiger Behandlung mit Fermentationsüberstand. Bakterien mit intakter und beschädigter Zellmembran wurden mit SYTO9 (grün), Bakterien mit beschädigter Zellmembran wurden mit Propidiumiodid (rot) angefärbt.

In Abb. 4.18 ist zu erkennen, dass die Anteile an lebenden und toten Bakterien bei Behandlung vergleichbar blieben. Zudem zeigte die Quantifizierung der Biofilmbiomasse und -dicke anhand der 3D-Aufnahmen aus Abb. 4.18, dass die spezifische Biofilmbiomasse von  $8,12$  auf  $5,03 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  und die Biofilmdicke von  $8,43$  auf  $6,80 \mu\text{m}$  abnahm (Tab. 4.11). Dies bedeutet, dass die Biofilmbiomasse um 38 % und die Biofilmdicke um 19 % durch Behandlung mit dem Fermentationsüberstand (F+++) verringert wurde.

Tab. 4.11. Vergleich der Biofilmbiomasse und -dicke zwischen unbehandelten Biofilmen und Biofilmen nach 2-stündiger Behandlung mit dem Fermentationsüberstand (F+++). Die Quantifizierung der Biofilmbiomasse und -dicke erfolgte durch Auswertung fluoreszenzmikroskopischer 3D-Aufnahmen (Abb. 4.18) mit der ImageJ und der Comstat2 Software. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

	<b>Biofilmbiomasse in <math>\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}</math></b>	<b>Biofilmdicke in <math>\mu\text{m}</math></b>
Unbehandelter Biofilm	8,12±0,22	8,43±0,37
Biofilm nach 2-stündiger Behandlung mit Fermentationsüberstand F+++	5,03±0,66	6,80±0,59

Bestätigt wurden diese Ergebnisse auch durch Untersuchungen an kleintechnischen RO-Membrananlagen der BASF SE, die die Wirksamkeit des identifizierten Fermentationsüberstands an realen RO-Membranen zeigten (Kap. 3.2.3). Eine Zunahme der Flussrate um 49 % wurde durch die Reinigung mit Fermentationsüberstand im Vergleich zur unbehandelten RO-Membran erzielt (Tab. 4.12). Eine Kombination des Fermentationsüberstands mit dem Komplexbildner Trilon M verbesserte nochmals die Reinigungswirkung und erhöhte die Flussrate um sogar 94 %. Zum Vergleich wurde das kommerzielle Reinigungsmittel Tergazyme (Alconox) getestet, womit eine Zunahme der Flussrate um 102 % erreicht wurde.

Tab. 4.12. Reinigungswirkung des Fermentationsüberstands (F+++), alleine, in Kombination mit dem Komplexbildner Trilon M sowie von Tergazyme an realen RO-Membranen, durchgeführt an kleintechnischen Membrananlagen der BASF SE

	<b>Flussrate in <math>\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}</math></b>	
	<b>Unbehandelte RO-Membran</b>	<b>Behandelte RO-Membran</b>
Biofilm nach Behandlung mit Fermentationsüberstand (F+++)	26,5	39,5
Fermentationsüberstand+Trilon M	26,5	51,3
Tergazyme	30,1	60,9

### Wachstumscharakteristik

Die Untersuchung der Wachstumskinetiken von *P. aeruginosa* PA49 in Fermentationsüberstand (F+++)<sup>1</sup> und MEP-Medium sind in Abb. 4.19 dargestellt. Der Kurvenverlauf von *P. aeruginosa* PA49 im Fermentationsüberstand ist nahezu stationär (rote Kurve). Die Kultivierung von *P. aeruginosa* PA49 in MEP-Medium, worin die pilzlichen Exoprodukte im Fermentationsüberstand vorlagen, zeigte einen deutlichen Anstieg der optischen Dichte auf über 1,2 nach 23 h (grüne Kurve). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Fermentationsüberstand eine bakteriostatische Wirkung besitzt.

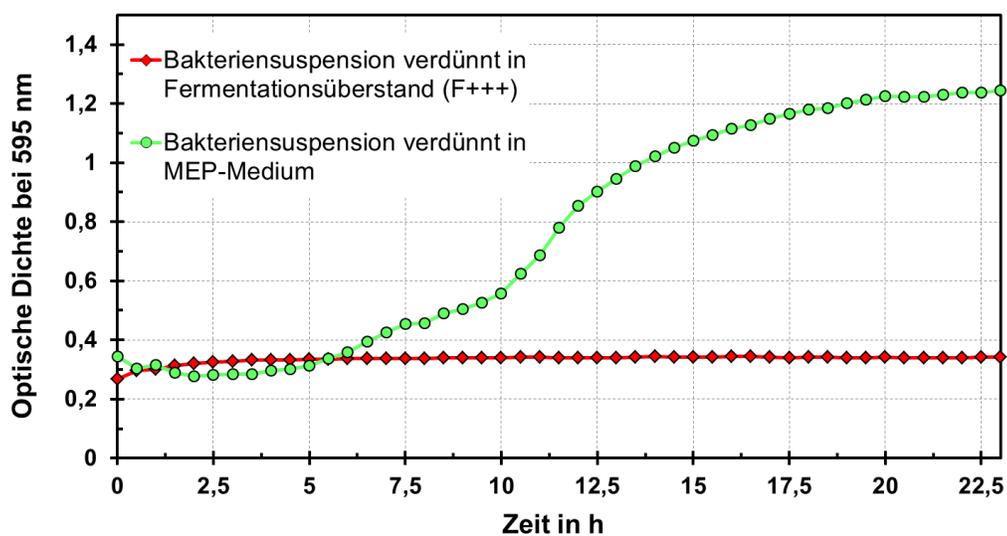


Abb. 4.19. Wachstumskurven über einen Zeitraum von 23 h von *P. aeruginosa* PA49 verdünnt in Fermentationsüberstand (F+++)<sup>1</sup> (rote Kurve) und in MEP-Medium (grüne Kurve). Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm alle 30 min bei 37 °C (50 rpm) gemessen.

### Wirkung der Proteine im Fermentationsüberstand auf Biofilme

Um zu untersuchen, ob Proteine für die biofilmentfernende Wirkung des Fermentationsüberstands verantwortlich sind, wurden diese durch Hitze denaturiert und anschließend wurde ihre biofilmentfernende Wirkung überprüft (Kap. 3.3.2). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.20 dargestellt. Während der Fermentationsüberstand (nicht denaturiert) eine hohe biofilmentfernende Wirkung mit 65 % Biofilmreduktion aufwies, wurde bei dem durch Hitze denaturierten Fermentationsüberstand nur noch eine merklich geringere Biofilmreduktion von 19 % nachgewiesen. Des Weiteren wurde zum Vergleich auch das kommerzielle Reinigungsmittel Tergazyme (Alconox) angegeben,

welches mit 80 % erwartungsgemäß die höchste Biofilmreduktion bewirkte. Bei dem kommerziellen Reinigungsmittel hatte eine Proteindenaturierung keinen wesentlichen Effekt auf die biofilmentfernende Wirkung.

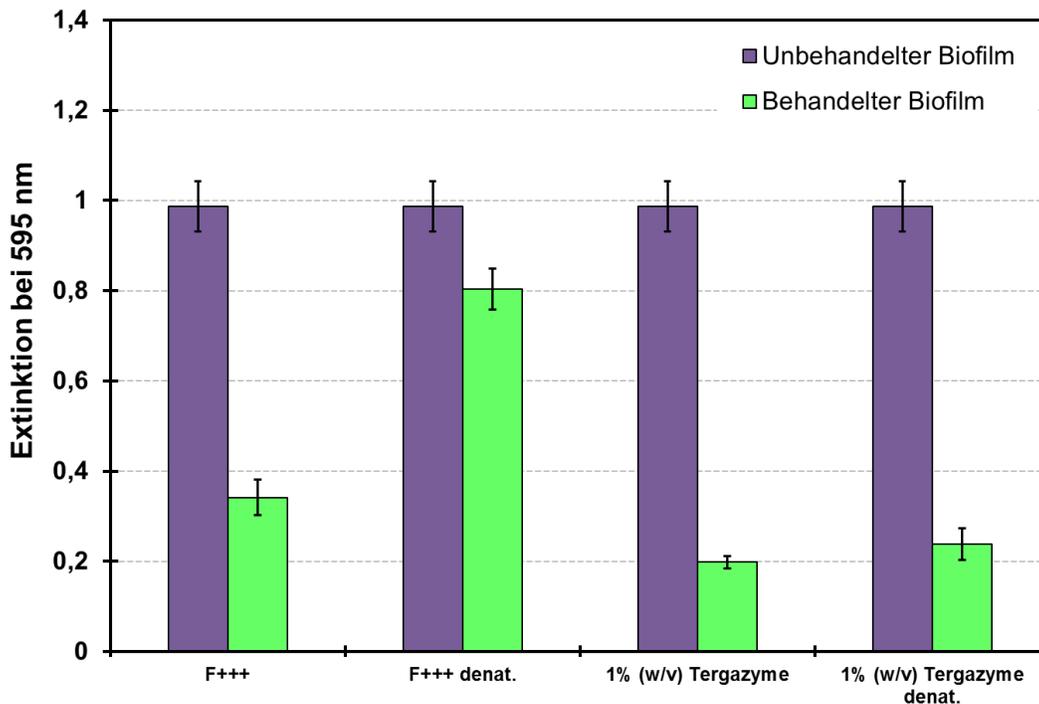


Abb. 4.20. Vergleich der biofilmentfernenden Wirkung des Fermentationsüberstands (F+++), mit proteindenaturiertem Fermentationsüberstand, mit dem kommerziellen Reinigungsmittel Tergazyme (Alconox) und mit proteindenaturiertem Tergazyme. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

### Fraktionierung des Fermentationsüberstands

Der wirkungsstärkste Fermentationsüberstand wurde mittels VivaSpin Konzentratoren (Sartorius AG) hinsichtlich seines Molekulargewichts fraktioniert (Kap. 3.3.2). Die anschließende Untersuchung der biofilmentfernenden Wirkung erfolgte mit dem Kristallviolett Assay. Der native Fermentationsüberstand entfernte den Biofilm um 58 % (Abb. 4.21). Abb. 4.21 ist zudem zu entnehmen, dass in allen Fraktionen eine Aktivität des Fermentationsüberstands nachweisbar war. Der Großteil der Fraktionen bewirkte eine Biofilmreduktion zwischen 42 und 54 %, wobei die Fraktion kleiner 5 kDa nur 24 % vom Biofilm entfernte. Die Wirkung des Fermentationsüberstands (F+++), basiert damit nicht nur auf einem einzelnen Exoprodukt.

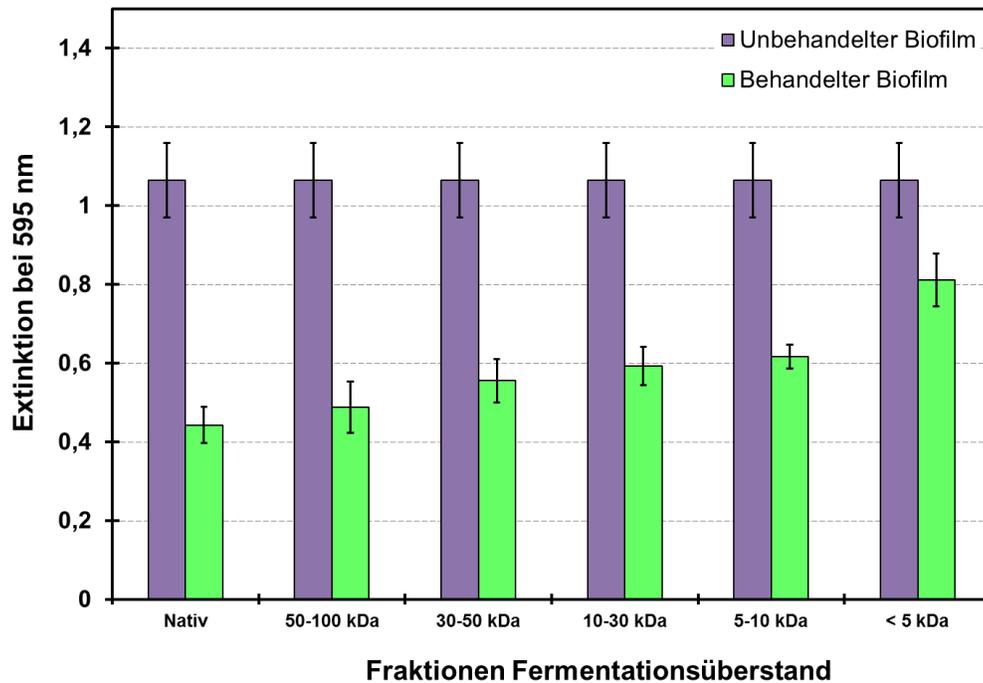


Abb. 4.21. Vergleich der biofilmentfernenden Wirkung des nativen mit verschiedenen Fraktionen des Fermentationsüberstands (F+++). Fraktionierung hinsichtlich des Molekulargewichts. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

### Gesamtproteingehalt

Die Gesamtproteinbestimmung einiger Fermentationsüberstände erfolgte nach Bradford (Kap. 3.3.1). Den Ergebnissen aus Tab. 4.13 ist zu entnehmen, dass der Gesamtproteingehalt aller untersuchten Fermentationsüberstände im Durchschnitt ca.  $28 \mu\text{g mL}^{-1}$  betrug, wobei ein Fermentationsüberstand mit starker biofilmentfernender Wirkung den Höchstwert mit  $366,87 \mu\text{g mL}^{-1}$  Gesamtprotein besaß. Ebenfalls ist in Tab. 4.13 zu erkennen, dass bei einigen Fermentationsüberständen mit der verwendeten Methode kein Proteingehalt nachweisbar war. Der wirkungsstärkste Fermentationsüberstand besaß einen Gesamtproteingehalt von  $52,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Somit wurde keine direkte Korrelation zwischen dem Gesamtproteingehalt und der biofilmentfernenden Wirkung der Fermentationsüberstände festgestellt.

Tab. 4.13. Überblick über den Gesamtproteingehalt verschiedener Fermentationsüberstände (nach Bradford)

Fermentationsüberstand	Gesamtproteingehalt in $\mu\text{g mL}^{-1}$
F+++	52,03
	1,01
	0
	0,55
	5,75
	8,61
	51,89
F++	1,61
	10,53
	38,94
	0
	0
	0
	0
	48,56
	0
	366,87
F+	18,07
	0
	0
	8,61
	0

### Enzymaktivitäts-Profile

Der Aktivitätsnachweis von Exo-Enzymen in den Fermentationsüberständen erfolgte anhand des Nachweises enzymatischer Reaktionen mit der API ZYM Methode (Kap. 3.3.2). Tab. 4.14 zeigt die Enzymaktivitäts-Profile verschiedener Fermentationsüberstände. Dabei zeigte der wirkungsstärkste Fermentationsüberstand (F+++ ) bei 11 von 19 getesteten Enzymen Aktivitäten. Im Vergleich dazu wurden bei den Fermentationsüberständen mit starker biofilmentfernender Wirkung nur noch zwischen 2 und 8 verschiedene Enzymaktivitäten detektiert. Auch die getesteten ineffektiven Fermentationsüberstände wiesen zwischen 5 und 6 Enzymaktivitäten auf. Sowohl

effektive als auch ineffektive Fermentationsüberstände zeigten ein weites Spektrum an unterschiedlichen Enzymaktivitäten.

Tab. 4.14. Überblick über Exo-Enzymaktivitäten verschiedener Fermentationsüberstände.  
+ Enzymaktivität vorhanden; - keine Enzymaktivität vorhanden

19 Enzymaktivitäten	F+++	F++									F-		
Alkalische Phosphatase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esterase (C4)	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystin Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saure Phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Galactosidase	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
$\beta$ -Galactosidase	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Glucuronidase	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Glukosidase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
$\beta$ -Glukosidase	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
N-acetyl- $\beta$ -Glukosaminidase	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Fucosidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Anzahl an Enzymaktivitäten</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	

Zudem wurde vom wirkungsstärksten Fermentationsüberstand (F+++), eine Esterase-Aktivität von  $36,3 \mu\text{mol h}^{-1}$  gemessen. Es wurde keine Lipase oder DNase-Aktivitäten des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++), mit den verwendeten Methoden nachgewiesen.

In Abb. 4.22 ist die Protease-Aktivität von 11 verschiedenen Fermentationsüberständen dargestellt. Der Fermentationsüberstand (F+++) besaß mit  $1528,28 \mu\text{g h}^{-1}$  die mit Abstand stärkste Protease-Aktivität. Die Protease-Aktivität der anderen Fermentationsüberstände lag häufig im Bereich von  $200\text{-}400 \mu\text{g h}^{-1}$ . Dabei hatten die Überstände F++ (starke biofilmentfernende Wirkung) im Mittel nur mäßig höhere Protease-Aktivitäten als die mäßig effektiven (F+) und die ineffektiven Fermentationsüberstände (F-).

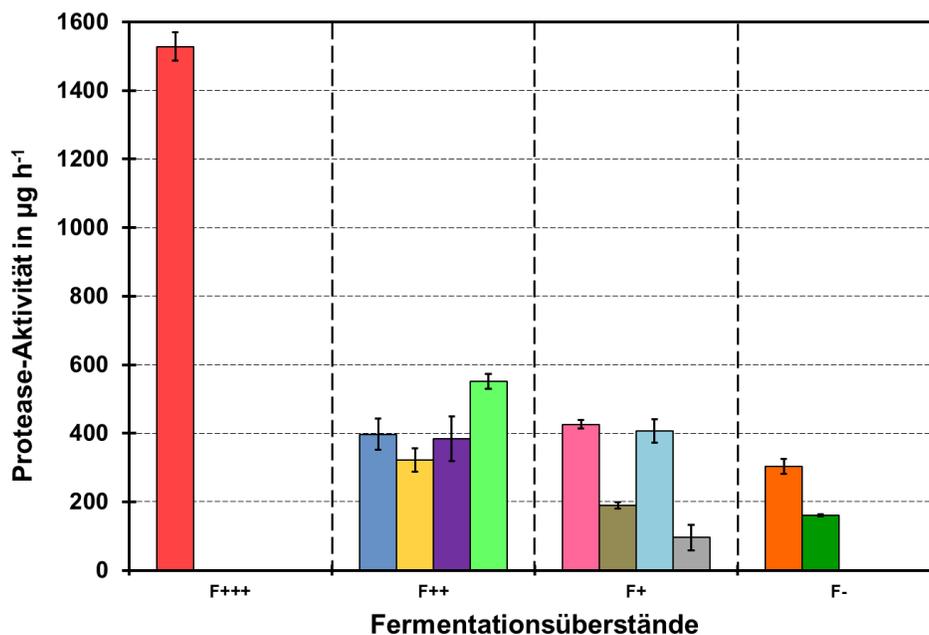


Abb. 4.22. Vergleich der Protease-Aktivität verschiedener Fermentationsüberstände. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Untersuchungen.

#### 4.2.5 Vergleich verschiedener Chargen des Fermentationsüberstands (F+++)

Vor jeder Verwendung einer neuen von der BASF SE bereitgestellten Charge des Fermentationsüberstands (F+++) wurde dieser auf seine biofilmentfernende Wirkung getestet. Anhand der Ergebnisse in Abb. 4.23 ist zu erkennen, dass die biofilmentfernende Wirkung je nach Fermentationscharge deutlich variiert. Während zwei von vier Chargen mit über 60 % eine hohe biofilmentfernende Wirkung aufwiesen, war die Wirkung bei den Chargen 3 und 4 mit einer Biofilmentfernung zwischen 20 und 30 % eher gering.

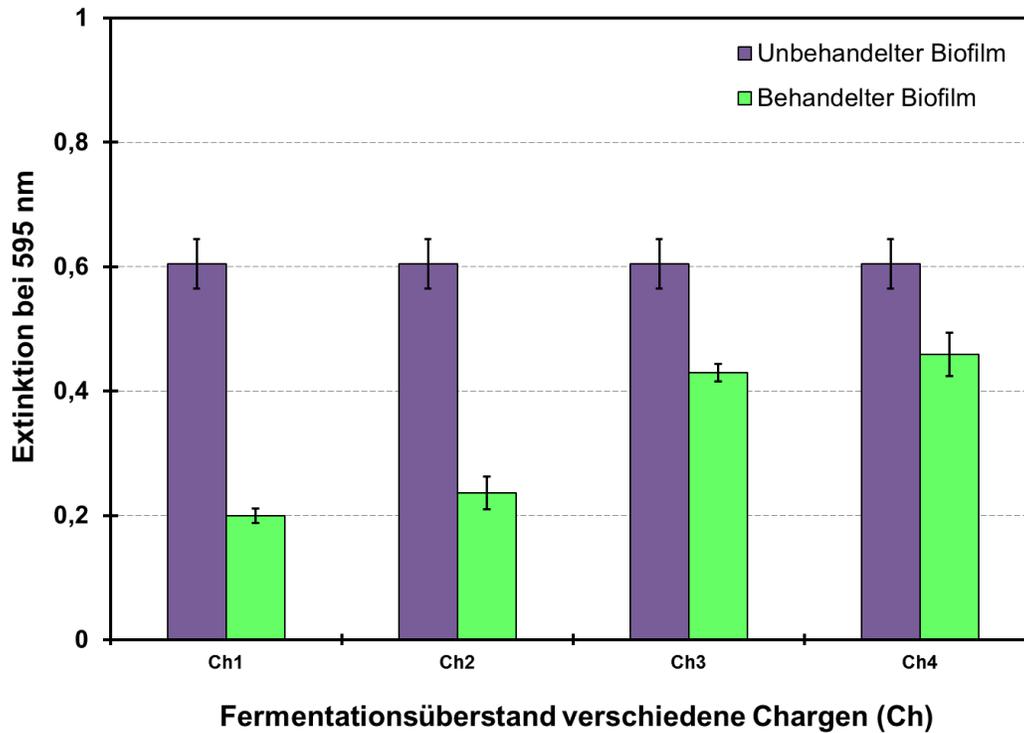


Abb. 4.23. Vergleich der biofilmentfernenden Wirkung verschiedener Chargen (Ch) des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Ebenso bestätigten die Untersuchungen zum Nachweis verschiedener Enzymaktivitäten mit der API ZYM Methode im Fermentationsüberstand die großen Unterschiede je nach Charge (Tab. 4.15). Die Chargen 1 und 2, die wie zuvor beschrieben eine hohe biofilmentfernende Wirkung besitzen, wiesen auch eine hohe Anzahl an Enzymaktivitäten auf. Dementsprechend hatten die Chargen mit geringer biofilmentfernender Wirkung auch eine geringe Anzahl an Enzymaktivitäten. Details zu den Enzymaktivitäten der einzelnen Chargen sind im Anhang zu finden (Tab. 8.2).

Tab. 4.15. Anzahl an Enzymaktivitäten verschiedener Chargen (Ch) des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++)

	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
Anzahl an Enzymaktivitäten	11	9	4	4

Diese Beobachtungen wurden schließlich auch bei Vergleich des pH-Wertes, der Protease- und der Esterase-Aktivität entsprechend Tab. 4.16 bestätigt. Mit

abnehmendem pH-Wert war auch eine geringere biofilmentfernender Wirkung zu erkennen. Zudem wiesen die Chargen 1 und 2, die entsprechend Abb. 4.23 eine hohe Biofilmreduktion zeigten, eine um wenigstens eine Größenordnung größere Protease- und Esterase-Aktivität auf als die Chargen 3 und 4.

Tab. 4.16. pH-Wert, Protease- und Esterase-Aktivität verschiedener Chargen (Ch) des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++) (n.n.: nicht nachweisbar)

<b>F+++ Chargen</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Protease in <math>\mu\text{g h}^{-1}</math></b>	<b>Esterase in <math>\mu\text{mol h}^{-1}</math></b>
Ch1	4,0	1528,28	36,3
Ch2	3,82	1507,80	38,82
Ch3	3,09	81,19	n. n.
Ch4	2,95	n. n.	0,31

#### 4.2.6 Kurzzusammenfassung

Durch ein Screening von 406 pilzlichen Fermentationsüberständen wurde bei dem Überstand von *Polyporus squamosus* (Basidiomycota) eine besonders starke biofilmentfernende Wirkung identifiziert. Fluoreszenzmikroskopische 3D-Aufnahmen zeigten, dass die Behandlung mit diesem Fermentationsüberstand eine Veränderung der 3D-Architektur des Biofilms bewirkt. Der identifizierte Fermentationsüberstand wies zudem eine bakteriostatische Wirkung auf. Schließlich wurden Enzymaktivitäten nachgewiesen, wie Proteasen und Polysaccharid-spaltende Enzyme, die gegen Bestandteile der EPS wirken. Der Fermentationsüberstand besitzt somit eine destabilisierende Wirkung auf Biofilme.

### 4.3 Elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Inbetriebnahme und Charakterisierung eines elektrochemischen mikrofluidischen Biofilmsensors, der um die Gruppe von Bastian E. Rapp (IMT, KIT) entwickelt wurde. Dieser mikrofluidische Biofilmsensor kombiniert einen impedanzspektrometrischen mit einem amperometrischen Sensor und ermöglicht dadurch die online-Überwachung des Biofilmwachstums und der Biofilmaktivität.

Das Messsystem besteht entsprechend Abb. 4.24 aus zwei mikrofluidischen Kanälen, einem Referenzkanal (links) und einem Messkanal (rechts). Jeder Kanal zur elektrochemischen Impedanzspektroskopie besteht aus vier Elektroden. Als Elektrodenmaterial wurde aufgrund der hohen Korrosionsbeständigkeit Gold gewählt. Somit ändern sich während des Aufwachsens des Biofilms die Oberflächenkapazität bzw. der Oberflächenwiderstand nicht durch Korrosionseffekte. Darüber hinaus ist Gold biokompatibel, die Elektroden sollten daher das Aufwachsen des Biofilms nicht inhibieren.

Jeder mikrofluidische Kanal besitzt zusätzlich drei amperometrische Elektroden (Abb. 4.24 oben). Diese bestehen aus einer mit Elektrolytlösung gefüllten Kammer, die durch Protonen-Austausch-Membranen (PEM = Proton Exchange Membrane) vom mikrofluidischen Kanal getrennt sind [103].

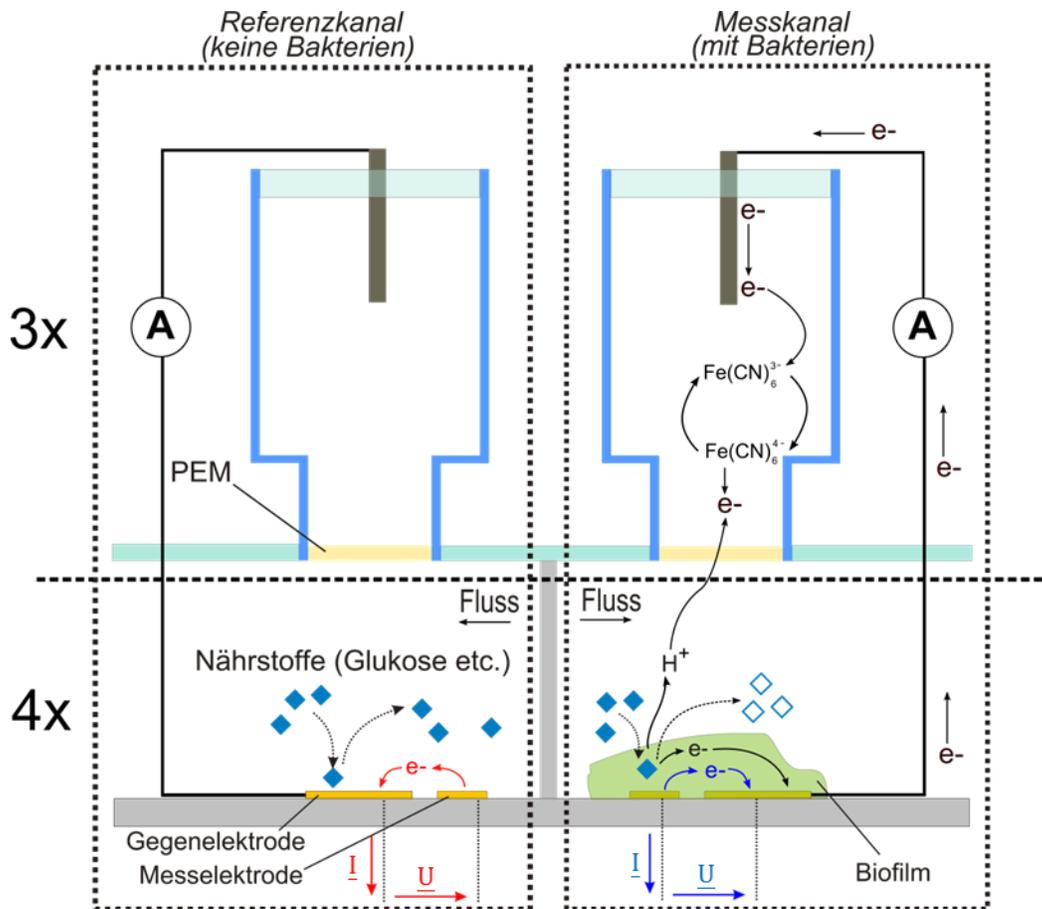


Abb. 4.24. Schematische Darstellung der Messeinheit mit zwei mikrofluidischen Kanälen (Referenzkanal links und Messkanal rechts). Für die elektrochemische Impedanzspektroskopie (unten) besteht jeder der zwei Kanäle aus insgesamt vier Elektroden. Jeder mikrofluidische Kanal besitzt zusätzlich drei amperometrische Elektroden (oben) (bearbeitet nach [103]).

Die Messung mit dem mikrofluidischen Biofilmsensor besteht aus zwei Schritten, der Animpf-Phase und dem Biofilmwachstum (Abb. 4.25). Bei der Animpf-Phase wird der Messkanal mittels einer externen Pumpe mit Bakteriensuspension beprobt, während durch den Referenzkanal Medium gepumpt wird. Für das anschließende Biofilmwachstum werden die 3-Wege Hähne umgeschaltet, so dass steriles Medium mit einer kontinuierlichen Flussrate von  $210 \mu\text{L min}^{-1}$  durch beide Kanäle fließt. Damit es während der Biofilmwachstums-Phase nicht zur Kontamination des Referenzkanals mit Bakterien kommt, liegt dieser vor dem Messkanal.

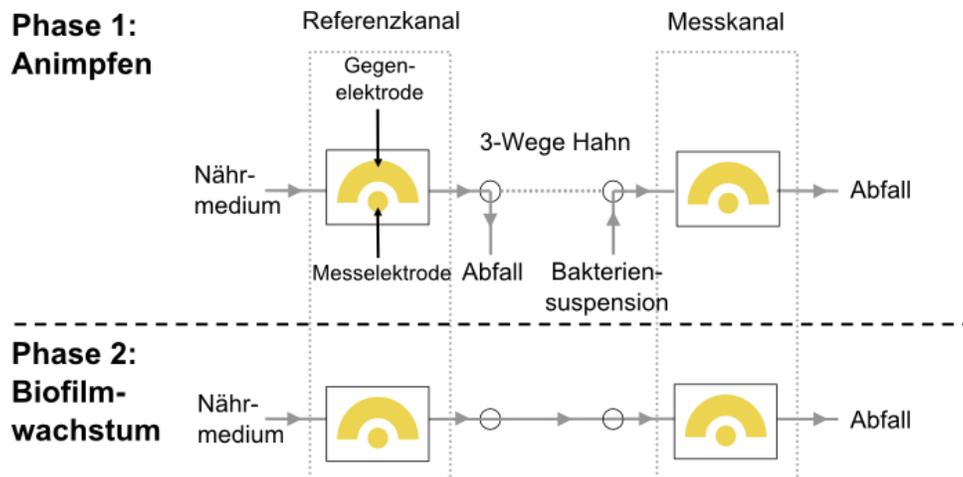


Abb. 4.25. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit zwei mikrofluidischen Kanälen (Referenzkanal links und Messkanal rechts). Phase 1: Zum Animpfen wird der Messkanal mit Bakterien suspension beprobt, während durch den Referenzkanal Medium gepumpt wird (oben). Phase 2: Biofilmwachstum; Nährmedium wird mit einer kontinuierlichen Flussrate von  $210 \mu\text{L min}^{-1}$  durch beide Kanäle gepumpt (unten) (bearbeitet nach [103]).

Während des kompletten Versuchs wurden kontinuierlich Messpunkte vom impedanzspektrometrischen und amperometrischen Sensor aufgenommen. Nach jedem Versuch wurde der mikrofluidische Flusskanal auseinander gebaut und der gewachsene Biofilm auf den Elektroden des Messkanals und der sterile Referenzkanal mit der Lebend/Tot-Färbung (Kap. 3.4.1) untersucht.

Beispielhaft sind in Abb. 4.26 die impedanzspektrometrischen Signalverläufe von vier Elektroden und die amperometrischen Signalverläufe von drei Elektroden dargestellt. Über den kompletten Untersuchungszeitraum von 120 h zeigten die vier Elektroden des impedanzspektrometrischen und die drei Elektroden des amperometrischen Sensors einen untereinander nahezu identischen Signalverlauf. Aus Abb. 4.26 wird zudem deutlich, dass das impedanzspektrometrische Signal für alle vier Elektroden nach Versuchsstart zwischen Stunde 5 und 9 merklich anstieg, sodass nach kürzester Zeit eine Biofilmentwicklung detektiert wurde.

### 4.3.1 Einfluss von Biozid auf die Signalverläufe

Um die Funktionalität des mikrofluidischen Biofilmsensors aufzuzeigen, wurde überprüft, ob das amperometrische Signal abfällt, wenn durch die Zugabe von 1% (w/v) Natriumazid die Bakterien im Biofilm abgetötet werden.

Hierfür wurde zunächst ein Biofilm im Flusskanal unter definierten Bedingungen angezüchtet, dieser wurde anschließend mit Biozid behandelt. Dabei wurden online kontinuierlich die impedanzspektrometrischen und amperometrischen Signalverläufe aufgenommen (Kap. 3.7.1).

Zum Animpfen des mikrofluidischen Biofilmsensors wurden der Messkanal mit Bakteriensuspension und der Referenzkanal mit Nährmedium für 3 h durchströmt. Das amperometrische Signal war in der Animpf-Phase merklich höher als zu Beginn der nachfolgenden Bakterienwachstums-Phase (Abb. 4.26 unten), während das impedanzspektrometrische Signal in beiden Phasen zunächst in der gleichen Größenordnung lag (Abb. 4.26 oben). In den nächsten 48 h, dem Biofilmwachstum, wurden beide Kanäle ausschließlich mit Nährmedium durchströmt. Während dieser Phase ließ sich ein linearer Anstieg vom impedanzspektrometrischen Signal aller 4 Elektroden auf ca. 200-400 Ohm erkennen. Parallel dazu blieb das amperometrische Signal die ersten 24 h etwa konstant bei  $< 25 \text{ nA}$  (Abb. 4.26 unten). Nach ca. 24 h begann das amperometrische Signal bis auf 65-90 nA anzusteigen.

Nach ungefähr 51 h wurde zum Nährmedium 1 % (w/v) Natriumazid hinzugegeben, und für 69 h wurden beide Kanäle behandelt. Das amperometrische Signal nahm, wie erwartet, im Laufe der 69 h auf nahe null ab, während das impedanzspektrometrische Signal lediglich um 15-20 % abnahm. Diese leichte Abnahme könnte durch einen Biomasse-Austrag verursacht worden sein. Die Biofilmbiomasse wird durch das Biozid nicht verringert, da die Bakterien dadurch nur abgetötet werden.

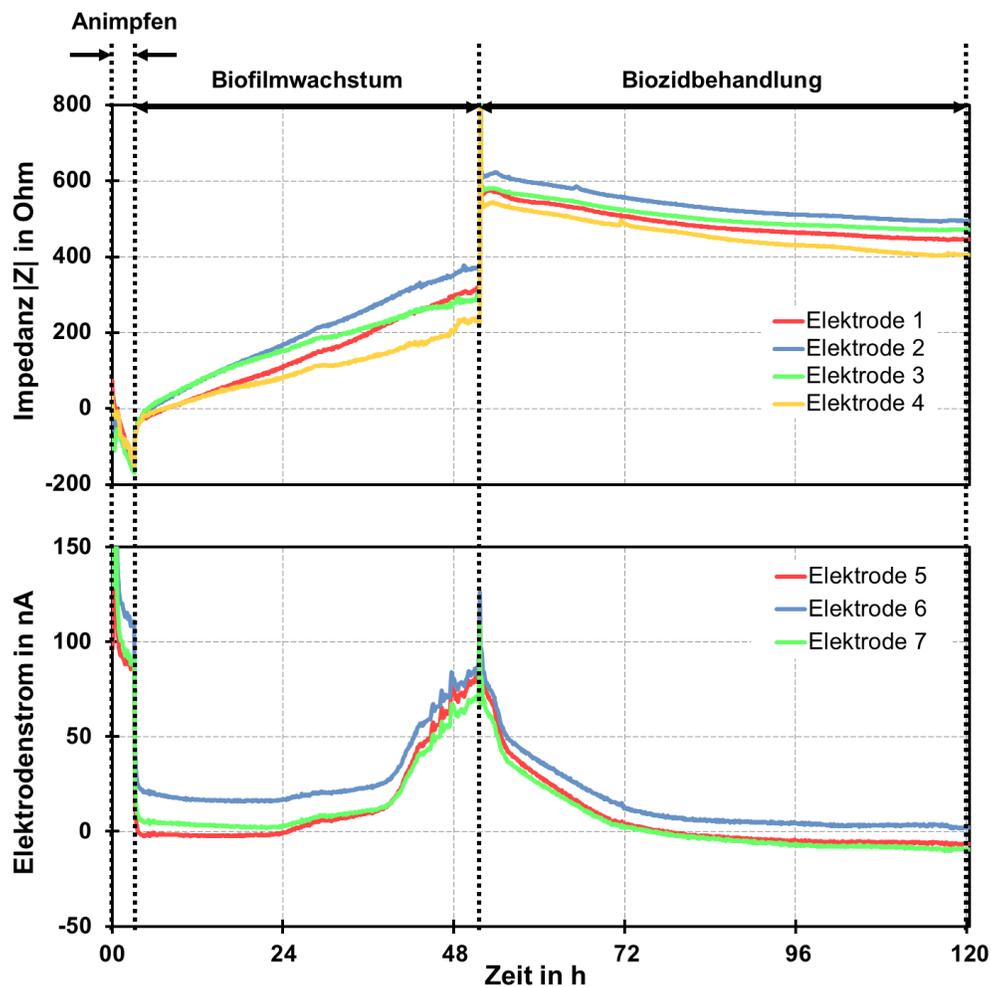


Abb. 4.26. Dargestellt sind die impedanzspektrometrischen (4 Elektroden oben) und amperometrischen (3 Elektroden unten) Signalverläufe. Die impedanzspektrometrischen Signalverläufe sind als Gesamtwiderstand der Impedanz (vektorielle Länge des realen und des imaginären Widerstandes) bei einer Frequenz von 1300 Hz über 120 h aufgetragen. Gezeigt sind drei Phasen: 3 h Animpfen, 48 h Biofilmwachstum und 69 h Biofilmbehandlung mit 1 % (w/v) Natriumazid. Dargestellt ist die Differenz der Signale der Mess- und der Referenzelektroden.

Am Ende jedes Versuchs wurden die Bakterien in den Biofilmen direkt auf den Elektroden mit den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9 und Propidiumiodid angefärbt (Kap. 3.4.1). Die beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.27 bestätigen, dass auf den Elektroden im Referenzkanal keine Kontamination stattfand. Im Gegensatz dazu war auf den Elektroden im Messkanal ein deutlicher Biofilm erkennbar. Die Abtötung der Bakterien durch Natriumazidbehandlung und damit die Abnahme des amperometrischen Signals wurden durch den in Abb. 4.27

gezeigten Versuch bestätigt, denn der Großteil der Bakterien im Biofilm lag abgetötet vor (erkennbar an der Rotfärbung).

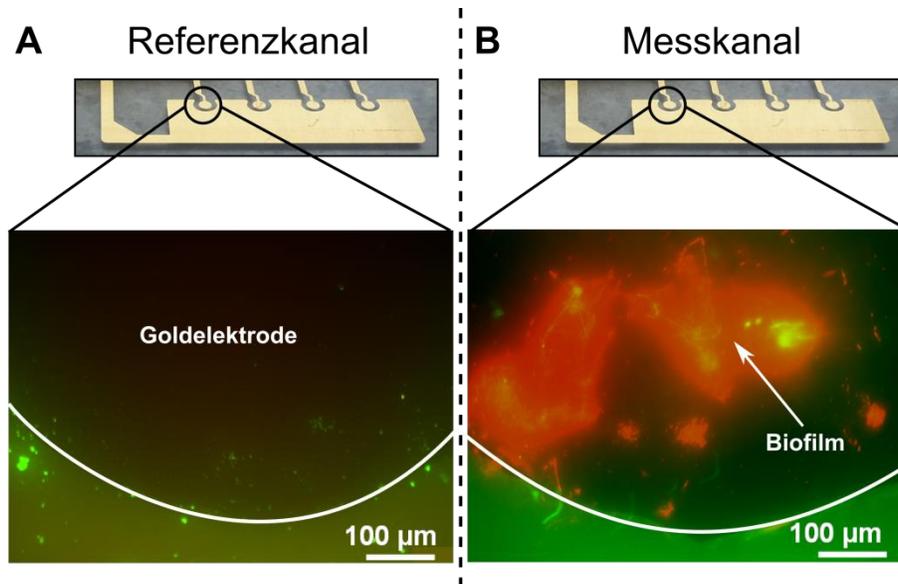


Abb. 4.27. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Natriumazidbehandlung von einer (A) Elektrode im Referenzkanal und von einer (B) Elektrode im Messkanal. Bakterien mit intakter und beschädigter Zellmembran wurden mit SYTO9 (grün), Bakterien mit beschädigter Zellmembran wurden mit Propidiumiodid (rot) angefärbt.

#### 4.3.2 Wirkung des Fermentationsüberstands auf die Signalverläufe

Um die Wirkung des Fermentationsüberstands mit der höchsten biofilmentfernenden Wirkung (F+++ entsprechend Kap. 4.2.4) zu bestätigen, wurde überprüft, ob die Zugabe des Fermentationsüberstands eine Abnahme des impedanzspektrometrischen Signals bewirkt.

Hierfür wurden zunächst Biofilme für 24 h sowohl im Referenz- als auch im Messkanal angezchtet. Der Biofilm im Referenzkanal wurde mit inaktivem Fermentationsüberstand (Proteindenaturierung (Kap. 3.3.2)) behandelt, wohingegen der Biofilm im Messkanal mit aktivem Fermentationsüberstand behandelt wurde (jeweils für 6 h). Anschließend wurden beide Kanäle erneut mit Nährmedium durchströmt. Die Signalverläufe sind beispielhaft in Abb. 4.28 zusammengefasst. Während der Behandlung mit Fermentationsüberstand (F+++) war das impedanzspektrometrische Signal nicht aussagekräftig, sodass die Verläufe in diesem Zeitraum extrapoliert wurden (gepunktete

Linien). Am Signalverlauf des inaktiven Fermentationsüberstands ist erkennbar, dass dieser Fermentationsüberstand das Biofilmwachstum nicht beeinträchtigte (blaue Kurve). So wurde nach 6 h Behandlungsdauer eine Zunahme des impedanzspektrometrischen Signals von 8 % gemessen. Der aktive Fermentationsüberstand hingegen führte im Behandlungszeitraum zu einer Verringerung des impedanzspektrometrischen Signals um 13 % (rote Kurve). Nach der Behandlung mit aktivem Fermentationsüberstand steigt das impedanzspektrometrische Signal wieder an. Dies zeigt, dass der Fermentationsüberstand keinen Langzeiteffekt besitzt. In Abb. 4.28 ist zu beachten, dass die impedanzspektrometrischen Absolutwerte nicht relevant sind, sondern lediglich der Verlauf.

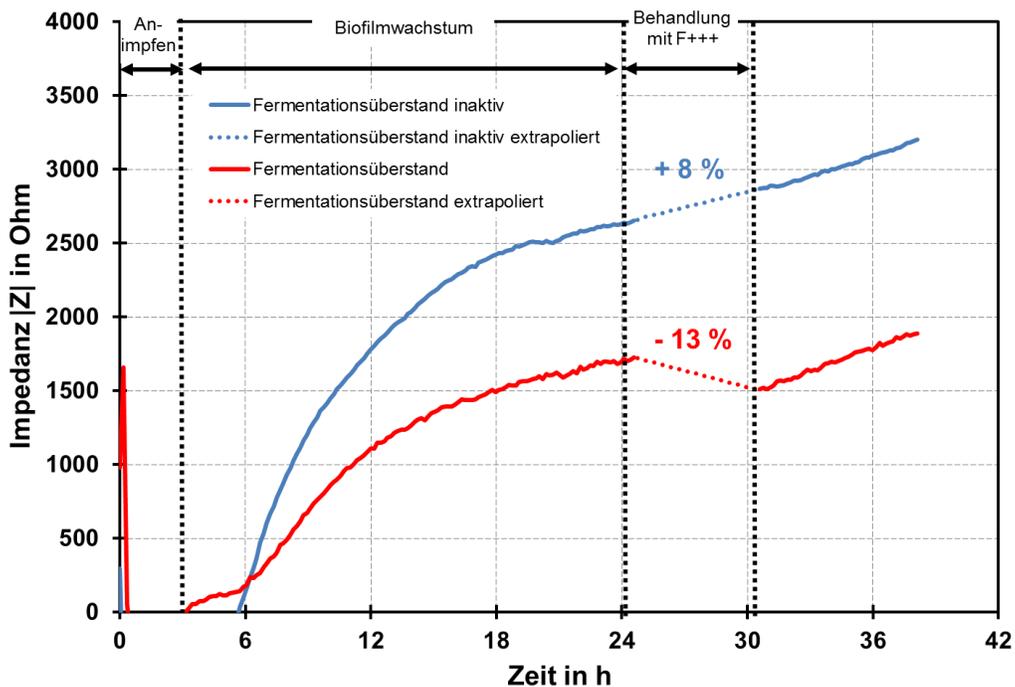


Abb. 4.28. Impedanzspektrometrischer Signalverlauf nach 3 h Animpfen, 24 h Bakterienwachstum und 6 h Behandlung mit aktivem und inaktivem Fermentationsüberstand. Die impedanzspektrometrischen Signalverläufe sind als Gesamtwiderstand der Impedanz (vektorielle Länge des realen und des imaginären Widerstandes) bei einer Frequenz von 1300 Hz über 38 h aufgetragen. Dargestellt ist die Differenz der Signale der Mess- und der Referenzelektroden.

### 4.3.3 Kurzzusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Funktionstüchtigkeit des elektrochemischen mikrofluidischen Biofilmsensors nachgewiesen. Bereits nach wenigen Stunden konnte eine Zunahme der Biofilmbiomasse detektiert werden, was die Eignung des Sensors als Frühwarnsystem belegt. Des Weiteren wurde mit Hilfe dieses Sensors die biofilmdestabilisierende Wirkung des zuvor identifizierten Fermentationsüberstands von *Polyporus squamosus* nachgewiesen. Mit Hilfe des Sensors konnte auch gezeigt werden, dass die Wirkung des Fermentationsüberstands auf Proteine zurückzuführen ist. Im Gegensatz zur biofilmdestabilisierenden Wirkung des Fermentationsüberstands bewirkt die Zugabe von Biozid die Abtötung der Bakterien im Biofilm.

Die Ergebnisse sind auch in folgender Publikation zusammengefasst:

L. PIRES, K. SACHSENHEIMER, T. KLEINTSCHEK, A. WALDBAUR, T. SCHWARTZ, B.E. RAPP: Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 47 (2013), S. 157-163.

## 5 Diskussion

In wasserführenden technischen Systemen besitzt das Biofouling eine kostenintensive relevante Bedeutung. Bislang ist kein Material bekannt, welches auf Dauer eine mikrobielle Besiedelung verhindert [19]. In dieser Arbeit wurden drei innovative Strategien mit unterschiedlichen Kontrollansätzen entwickelt.

Zunächst wurde eine Möglichkeit untersucht, um direkt die primäre bakterielle Adhäsion und damit die Biofilmentwicklung zu verhindern.

Darüber hinaus wurde eine Strategie zur Destabilisierung der Biofilmstruktur eines bereits vorhandenen Biofilms entwickelt, um die Widerstandsfähigkeit von Biofilmen für weitere Antibiofilm-Strategien zu reduzieren.

Schließlich wurde ein elektrochemischer mikrofluidischer Biofilmsensor zur online-Überwachung des Biofilmwachstums und der Biofilmaktivität getestet.

### 5.1 Prävention der primären bakteriellen Adhäsion

Zur Prävention der primären bakteriellen Adhäsion wurde die Effektivität von PFPE-Oberflächen untersucht. Dabei wurden poröse Polymeroberflächen mit Perfluorpolyethern (PFPE-Flüssigkeit) beschichtet. Der Einsatz von PFPE-Flüssigkeiten baut auf Arbeiten von Wong *et al.* [104] auf. Die Autoren stellten kürzlich eine SLIPS-Oberfläche (Slippery Liquid-Infused Porous Surface) mit wasser- und eisabweisenden Eigenschaften vor. Weitere Eigenschaften umfassen eine hohe Druckstabilität und eine geringe Oberflächenenergie bzw. Oberflächenspannung. Die Oberflächenspannung von PFPE-Flüssigkeiten beträgt bei 20 °C etwa  $20 \text{ mN m}^{-1}$  [78, 105] (Vergleich Wasser:  $73 \text{ mN m}^{-1}$  [106]). Zudem weisen diese SLIPS-Oberflächen die Möglichkeit zur Selbstheilung auf. Bei äußerer Beschädigung fließt innerhalb von einer Sekunde Flüssigkeit an die defekte Stelle nach und repariert so die Oberfläche [104].

Solche neuartigen Oberflächenstrukturen könnten in Zukunft für zahlreiche Anwendungen eingesetzt werden. Beispielsweise sind selbstreinigende Beschichtungen für die Innenseiten von Benzin- oder Wasserleitungen, in medizinischen Kathetern oder Transfusionssystemen denkbar. Der Ansatz zur Prävention der primären Adhäsion

basiert darauf, dass die Bakterien keinen Halt auf den SLIPS-Oberflächen finden und herunter rutschen. Epstein *et al.* [67] zeigten, dass sogar lebende Ameisen, Flüssigkeitstropfen oder Feststoffe von den SLIPS-Oberflächen gleiten, wenn die Oberflächen um fünf Grad geneigt sind. Epstein *et al.* [67] demonstrierten außerdem, dass eine Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* auf den SLIPS-Oberflächen für mindestens 7 Tage verhindert werden kann.

### **Beständigkeit der Beschichtung und Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften**

Um die Eignung zur Prävention bakterieller Adhäsion zu untersuchen, ist die Verweildauer der Beschichtung auf der Oberfläche wichtig. Ein bei beschichteten Oberflächen auftretendes Problem ist, dass die Besonderheiten der Oberflächen mit der Zeit nachlassen, wenn z. B. die eingelagerte Flüssigkeit verdunstet. Daher empfiehlt sich der Einsatz von Flüssigkeiten, die einen geringen Dampfdruck bzw. eine geringe Flüchtigkeit aufweisen. PFPE-Flüssigkeiten haben mitunter sehr geringe Dampfdrücke [107]. So wies die hier eingesetzte PFPE-Flüssigkeit, Krytox GPL 103, bei 121 °C nach 22 h einen Verlust von maximal 7 % auf (gemessen nach der Methode ASTM D2595), während beispielsweise Wasser bei dieser Temperatur bereits gasförmig ist [77]. Andere PFPE-Flüssigkeiten, z. B. Krytox XHT-1000, weisen noch wesentlich geringere Flüchtigkeiten auf. So hat XHT-1000 mit  $5 \cdot 10^{-15}$  mbar bei 20 °C [105] einen extrem geringen Dampfdruck (Vergleich Wasser: 23 mbar [106]).

Bei vielen Anwendungen muss neben der Verdunstung auch die Beständigkeit in wässrigem Milieu betrachtet werden. PFPEs sind in Wasser und den meisten anderen gängigen Lösungsmitteln unlöslich und sie sind außerordentlich hydrolysebeständig. Zudem sind sie chemisch weitestgehend inert sowie oxidationsbeständig [107].

Diese Eigenschaften machen die PFPE-Flüssigkeiten zu aussichtsreichen Kandidaten für die Beschichtung von Oberflächen. Um die Stabilität der Beschichtung zu prüfen, wurden zunächst Kontaktwinkelmessungen durchgeführt (Kap. 4.1.1). Dabei wurde keine Abhängigkeit des Kontaktwinkels von den beiden untersuchten Medien festgestellt. Zudem wurden sowohl für die unbeschichteten als auch für die beschichteten Oberflächen hohe Kontaktwinkel von  $> 110^\circ$  gemessen, d. h. die Benetzbarkeit dieser Oberflächen ist gering [108].

Die statischen Kontaktwinkelmessungen zeigten innerhalb von 7 Tagen eine signifikante Abnahme des Kontaktwinkels von ca.  $133^\circ$  auf  $120^\circ$ , wenn die porösen Polymeroberflächen nicht mit PFPE-Flüssigkeit beschichtet wurden. Zudem verdoppelte sich die Kontaktwinkelhysterese in 7 Tagen (Tab. 4.1). Die Änderungen des Kontaktwinkels und der Kontaktwinkelhysterese könnten auf eine partielle Hydrolyse der Esterbindungen auf den porösen Polymeroberflächen zurückzuführen sein. Ebenso denkbar wäre die Ablagerung von Mediumskomponenten auf den porösen Polymeroberflächen [71].

Die mit PFPE-Flüssigkeit durchdrungenen Polymeroberflächen zeigten hingegen eine hohe Stabilität für 7 Tage in wässrigem Milieu. Der Vergleich des Kontaktwinkels der PFPE-Oberflächen vor und nach 7-tägiger Inkubation in Nährmedium zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tab. 4.1). Die Verwendung der PFPE-Flüssigkeit verbessert somit die Stabilität der porösen Polymeroberflächen merklich. Diese verbesserte Stabilität ist u. a. auf die oben beschriebene Wasserunlöslichkeit und Hydrolysebeständigkeit der PFPE-Flüssigkeit zurückzuführen. Die PFPE-Flüssigkeit schirmt die Oberfläche gegenüber dem Medium ab. Das poröse Grundmaterial dient dabei lediglich zur Immobilisierung der Flüssigkeit. Die Kontaktwinkelmessungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren, die mit derselben PFPE-Flüssigkeit hergestellt wurden, überein [67, 104].

Nach Chen *et al.* [109] ist zur Beurteilung einer Oberfläche die Kontaktwinkelhysterese wichtiger als der statische Kontaktwinkel. SLIPS-Oberflächen sollten eine geringe Kontaktwinkelhysterese mit verschiedenen Flüssigkeiten aufweisen, da dies auch eine defektfreie Beschichtung des porösen Grundmaterials mit der PFPE-Flüssigkeit bedeutet [104, 110]. Beim Vergleich der unbeschichteten mit den PFPE-Oberflächen fällt auf, dass die Kontaktwinkelhysterese von ungefähr  $60^\circ$  bei den porösen Polymeroberflächen auf  $9^\circ$  bei den PFPE-Oberflächen abnahm (jeweils Tag 0) (Tab. 4.1). Diese signifikante Abnahme wird durch die PFPE-Flüssigkeit auf den porösen Polymeroberflächen verursacht und deutet darauf hin, dass die Generierung der PFPE-Oberflächen geglückt war.

Werden die Kontaktwinkel in Abwasser betrachtet, so ergaben sich vor der Inkubation für die nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen ca. 6 % höhere Kontaktwinkel als in den Nährmedien (Tab. 4.5). Diese Unterschiede könnten durch im Abwasser

enthaltene oberflächenaktive Substanzen verursacht worden sein. Nach Myers [111] beeinflussen solche Substanzen die Benetzung merklich.

Zudem wurde bei den Versuchen mit Abwasser auch die Kontaktwinkelhysterese der mit Biofilm bewachsenen Oberflächen gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PFPE-Oberflächen eine wesentlich höhere Stabilität und deutlich geringere Kontaktwinkelhysteresen (sowohl vor als auch nach der Inkubation) aufweisen als die anderen untersuchten Oberflächen.

Im Abwasser wurden auch die Kontaktwinkel auf Glasoberflächen gemessen. Frisches Glas ist hydrophil, sodass die gemessenen geringen statischen Kontaktwinkel von ca.  $21^\circ$  nicht überraschend sind. Durch die 21-tägige Inkubation in Abwasser wurde der Kontaktwinkel mehr als verdoppelt. Dieses Verhalten ist nach Grüne [108] typisch für Glasoberflächen, da hydrophobe Partikel (aus dem Abwasser) gut auf der Glasoberfläche anhaften können und so die Glasoberfläche mitunter irreversibel vergiften.

### **Einfluss der PFPE-Flüssigkeit auf Bakterien**

Die hier untersuchten SLIPS-Oberflächen sind anders als andere Antifouling-Strategien, beispielsweise alkoholhaltige Desinfektionsmittel, nicht giftig [78]. Sowohl der Toxizitätstest als auch der MHK-Test zeigten, dass die PFPE-Flüssigkeit keine antimikrobielle Wirkung besitzt (Kap. 4.1.2). Selbst bei Verwendung von BM2-Mineralmedium mit 12,5 % PFPE-Flüssigkeit zeigten die Bakterien ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in reinem BM2-Mineralmedium (Tab. 4.2). Dadurch lässt sich zeigen, dass die nachfolgend beschriebene Prävention der bakteriellen Adhäsion allein auf die Oberflächeneigenschaften der PFPE-Flüssigkeit zurückzuführen war. Zudem erhöht sich der Anwendungsbereich auch auf Bereiche, die bisher kaum vor Besiedelung mit Bakterien geschützt werden konnten, da der Einsatz von toxischen Flüssigkeiten nicht möglich ist. Dies umfasst beispielsweise die Kontamination von medizinischen Geräten, Herzschrittmachern und Implantaten [6, 7]. Gerade weil sie in den menschlichen Körper eingeführt werden, ist eine Verhinderung von Biofilmentwicklung umso wichtiger.

### **Einfluss von PFPE-Oberflächen auf die primäre bakterielle Adhäsion**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die primäre bakterielle Adhäsion von vier *P. aeruginosa* Stämmen in nährstoffreichem Medium und das *P. aeruginosa* PA49 Umweltisolat zusätzlich in BM2-Mineralmedium untersucht (Kap. 3.1.2). Epstein *et al.* [67] zeigten bereits, dass PFPE-Flüssigkeiten die bakterielle Adhäsion des Referenzstamms *P. aeruginosa* PA14 merklich reduzieren. Die deutliche Reduktion der bakteriellen Adhäsion durch die Beschichtung mit PFPE-Flüssigkeit konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl für den Referenzstamm *P. aeruginosa* PA14 als auch für die Umweltisolate *P. aeruginosa* PA30 und PA910 wurden bei den PFPE-Oberflächen deutlich geringere bakterielle Oberflächenbedeckungen bestimmt als bei den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen und den Glasoberflächen (z. B. Abb. 4.5). Bei dem Umweltisolat *P. aeruginosa* PA49 zeigten die PFPE-Oberflächen ebenfalls eine deutlich verringerte bakterielle Adhäsion im Vergleich zu den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen sowie zu Glasoberflächen, wenn die Kultivierung in BM2-Mineralmedium (Abb. 4.3) stattfand. Allerdings ist die primäre bakterielle Adhäsion stark vom verwendeten *P. aeruginosa* Umweltisolat abhängig (z. B. Abb. 4.6). Vor allem der *P. aeruginosa* Stamm PA49 wies eine vielfach höhere bakterielle Adhäsion auf als der von Epstein *et al.* untersuchte *P. aeruginosa* Stamm PA14. In nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium wies das *P. aeruginosa* PA49 Umweltisolat eine merkliche Kolonisation der PFPE-Oberflächen mit Bakterien auf. Während die bakterielle Oberflächenbedeckung der anderen drei betrachteten Stämme nach 7-tägiger Inkubation < 2 % betrug, lag sie für das Umweltisolat PA49 bei ca. 12 % (Abb. 4.5). Eine Biofilmentwicklung wurde also nicht verhindert. In nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium zeigte *P. aeruginosa* PA49 auf den PFPE-Oberflächen ein anderes Biofilmverhalten.

Die oben beschriebene gute Stabilität der PFPE-Oberflächen in nährstoffreichem Medium belegt, dass der Einfluss des Kulturmediums auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PA49 nicht auf die Instabilität der mit PFPE-Flüssigkeit beschichteten Oberflächen zurückzuführen ist. Ein mögliches Problem dieser Beschichtungen kann ein adhärierter „Conditioning Film“ aus organischen und/oder anorganischen Substanzen darstellen [41]. Ein solcher Film könnte den Verlust der abweisenden Eigenschaften der PFPE-Flüssigkeit verursachen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die

Mediumskomponenten keinen Einfluss auf das Biofilmverhalten von *P. aeruginosa* PA49 hatten. Hierfür wurde die bakterielle Adhäsion von PFPE-Oberflächen mit diesen Oberflächen, die für 48 h in nährstoffreichem 1:4 verdünntem BHI-Medium vorinkubiert wurden, verglichen, wobei die Ergebnisse keinen Unterschied zeigten (Abb. 4.4). Somit ist ein durch Ablagerungen aus dem Medium verursachter „Conditioning Film“ als Grund für die Unterschiede in der bakteriellen Adhäsion unwahrscheinlich.

Die gezeigten Ergebnisse belegen auch, dass die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* auf den PFPE-Oberflächen vom betrachteten Stamm und von deren Biofilmverhalten abhängig ist. In den meisten Fällen haben die mit PFPE-Flüssigkeit beschichteten Polymeroberflächen die bakterielle Adhäsion im betrachteten Zeitraum von 7 Tagen jedoch merklich reduziert.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Kontrolle und Verminderung der Biofilmbildung in RO-Membranlagern z. B. zur Trinkwasseraufbereitung, zur Meerwasserentsalzung oder auch zur Abwasseraufbereitung. Daher wurde auch die Effektivität der generierten PFPE-Oberflächen gegenüber natürlichen Bakterienpopulationen, die im Abwasser vorhanden sind, untersucht. Hierfür wurden die PFPE-Oberflächen für 21 Tage in Abwasser inkubiert (Kap. 4.1.8). Die bakterielle Oberflächenbedeckung korrelierte erwartungsgemäß mit der Kontaktwinkeländerung bzw. der Änderung der Kontaktwinkelhysterese. Bei den PFPE-Oberflächen veränderte sich der Kontaktwinkel nur geringfügig und die bakterielle Oberflächenbedeckung betrug nach 21 Tagen gerade einmal ca. 1,2 %. Im Gegensatz dazu zeigten die porösen Polymeroberflächen mit etwa 6,5 % und die Glasoberflächen mit einer bakteriellen Oberflächenbedeckung von 4,9 % deutlich höhere Werte.

### **Genetische Vielfalt von *P. aeruginosa***

Um den zuvor beschriebenen Einfluss der unterschiedlichen *P. aeruginosa* Stämme auf die bakterielle Adhäsion auf den PFPE-Oberflächen erklären zu können, wurde die genetische Vielfalt der Stämme untersucht. Anhand von RAPD-PCR Bandenprofilen wurden genotypische Unterschiede zwischen den untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen aufgezeigt. Für die Erzeugung der RAPD-PCR Bandenprofile wurden unspezifisch bindende Primer verwendet, die zufällig an verschiedene Abschnitte im Genom binden. Eine große klonale Diversität zwischen den verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen demonstrierten Ähnlichkeitsindizes von ungefähr 0,5 und kleiner (Tab. 4.4). Besonders bei der Betrachtung des DNA-Bandenprofils von *P. aeruginosa* PA49, generiert mit dem Primer P15, wird deutlich, dass auf DNA-Ebene zwischen *P. aeruginosa* PA49 und dem Referenzstamm PA14 deutliche Unterschiede vorliegen (Abb. 4.7).

Das erstellte Antibiogramm (Tab. 4.3) bestätigte die genetische Diversität der untersuchten *P. aeruginosa* Stämme. So besitzt das *P. aeruginosa* PA49 Umweltisolat die höchste Anzahl an Antibiotikaresistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika und wurde daher als multiresistent eingestuft. Im Gegensatz dazu wurden die *P. aeruginosa* Stämme PA14 und PA30 als sensitiv eingestuft.

Für *P. aeruginosa* ist zudem bekannt, dass er eine hohe Flexibilität bei Wachstum und Adaptation an ungünstige Bedingungen besitzt. Des Weiteren ist bekannt, dass die Genome von *P. aeruginosa* aus einem relativ invariablen „core genome“ und einem hochvariablen „accessory genome“ bestehen. Das „accessory genome“ umfasst Gene, die nur in einigen *P. aeruginosa* Stämmen nachgewiesen werden konnten. Genetische Elemente des „accessory genome“ codieren für Eigenschaften, die zur Adaptation von *P. aeruginosa* beitragen [112]. Aufgrund der gezeigten klonalen Diversität lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das unterschiedliche Biofilmverhalten der *P. aeruginosa* Stämme auf die Variabilität des „accessory genome“ zurückzuführen ist. Unterschiedliche Umweltbedingungen können für eine hohe Variabilität von bakteriellen Adhäsionsvorgängen verantwortlich sein. Zelloberflächenproteine, Polysaccharide, Co-Adhäsion oder biologische Veränderungen beeinflussen ebenso die Voraussetzungen für den Adhäsionsprozess [113]. Zudem ist die Biofilmentwicklung sehr komplex, sodass kaum ein einheitlich gültiger Adhäsionsmechanismus für alle Mikroorganismen an allen Oberflächen erwartet werden kann. Schließlich ist bekannt, dass ein und derselbe

Organismus für hydrophile und hydrophobe Oberflächen verschiedene Mechanismen benutzen kann [10].

### **Zwischenfazit**

Die Beschichtung von porösen Polymeroberflächen mit Perfluorpolyethern (PFPE) ist eine wirkungsvolle Methode, um die primäre bakterielle Adhäsion an Oberflächen u. a. in wasserführenden technischen Systemen deutlich zu verzögern. Allerdings kann damit die Problematik von Biofilmen in solchen Systemen nicht vollständig gelöst werden, sodass in einem zweiten Schritt die schonende Biofilmentfernung diskutiert wird.

## **5.2 Schonende Reinigung von RO-Membranen**

Besonders für RO-Membranverfahren stellt Biofouling ein kostenintensives Problem dar. Es verkürzt das Zeitintervall zwischen zwei Reinigungen. Die Reinigung erfolgt bisher meist mit chemischen Reinigungsmitteln. Diese wirken sich oft stark schädigend auf das Membranmaterial aus, sodass es zu hohen Kosten für Membranerneuerungen kommt. Daher wurden in der Literatur verschiedene Ansätze zur Biofilmentfernung vorgeschlagen. Einige dieser Ansätze basieren beispielsweise auf der Verwendung von D-Aminosäuren [114] oder Enzymen [115, 116]. Ein bekanntes Beispiel ist das Dispersin B von *Actinobacillus actinomycescomitans*. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von N-Acetyl-D-Glucosamin in der Biofilm-Matrix in einer Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien [117]. Xu und Liu [118] untersuchten die Reinigung von Nylonmembranen mit  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  D-Tyrosin. Laut Xu und Liu bewirkt dies eine Reduktion der Biofilmbiomasse von 60 %.

Trotz der genannten Ansätze konnte allerdings noch kein Durchbruch bei der schonenden Biofilmentfernung erzielt werden. In dieser Arbeit wurde daher eine innovative Strategie untersucht, um RO-Membranen schonend zu reinigen. Diese Strategie basiert auf der biofilmentfernenden Wirkung von pilzlichen Exoprodukten.

### **Bakterielle Zusammensetzung der Biofilmpopulationen von realen RO-Membranen**

Um einen Einblick über die Biofilmpopulationen auf industriell genutzten und mit Belägen verschmutzten RO-Membranen zu erhalten, wurden die Bakterienzusammensetzungen mittels PCR-DGGE, basierend auf der 16S ribosomalen DNA, untersucht (Kap. 3.5.2). Die Biodiversität der Biofilmpopulationen auf den untersuchten RO-Membranen aus der Trinkwasseraufbereitung und MDF-Plattenproduktion sowie von Brackwasser- und Salzwassermembranen bestand aus 12-18 unterschiedlichen Bakterienspezies. Es wurde gezeigt, dass die Biofilmpopulationen der untersuchten RO-Membranen nur geringe Ähnlichkeiten zueinander besaßen, demonstriert durch Ähnlichkeitsindizes von ungefähr 0,3 und kleiner (Tab. 4.7). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der überwiegende Teil der identifizierten Spezies auf den untersuchten RO-Membranen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobakterien zuzuordnen war. Hierzu zählen die meisten aquatischen Bakterien (Tab. 4.8).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine allgemein gültige Reinigungsstrategie notwendig ist. Gegen einzelne Bakterienspezies gerichtete Strategien erscheinen weniger erfolgsversprechend. Zudem ist anzumerken, dass ein Großteil des Foulings auf den realen RO-Membranen aus nicht biogenem Material bestand, wie ESEM-Aufnahmen der Membranen zeigten (Abb. 4.11 und Abb. 8.1).

### **Screening pilzlicher Fermentationsüberstände bezüglich biofilmentfernender Wirkung**

Die hier in Kooperation mit der BASF SE entwickelte schonende Reinigungsstrategie basiert auf der biofilmentfernenden Wirkung von pilzlichen Exoprodukten. Zur Identifikation neuer pilzlicher Exoprodukte wurden 406 Fermentationsüberstände bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung gescreent (Kap. 3.2.2). Für das Screening wurde ein Assay etabliert. In Vorversuchen wurden die Kultivierungsbedingungen festgelegt. Auf Basis dieses Assays wurde *P. aeruginosa* PA49 für 15 h in Mikrotiterplatten bei 37 °C angezüchtet. Die Behandlung mit den pilzlichen Fermentationsüberständen erfolgte für 2 oder 6 h bei Raumtemperatur oder 37 °C (Tab. 4.9). Zur Quantifizierung der Biofilmbiomasse wurde ein Kristallviolett Assay etabliert (Kap. 4.2.2). Kristallviolett färbt die Biofilmbiomasse durch Bindung an negativ geladene Oberflächenmoleküle und an Polysaccharide in der extrazellulären Matrix

reifer Biofilme [84]. Aufgrund von Vorversuchen wurde eine Kristallviolett-Konzentration für das Screening der pilzlichen Fermentationsüberstände von 0,05 % gewählt. Der Kristallviolett Assay erwies sich dabei als eine einfache und schnelle Methode für ein grobes Screening. Verifiziert wurden diese Ergebnisse in einem zweiten Screening-Schritt basierend auf einem Resazurin Assay.

Durch das Screening der 406 pilzlichen Fermentationsüberstände konnte im Rahmen dieser Arbeit ein pilzlicher Fermentationsüberstand (als F+++ bezeichnet) mit vielversprechender biofilmentfernender Wirkung identifiziert werden (Tab. 4.10). Hierbei handelt es sich um den Fermentationsüberstand des Pilzes *Polyporus squamosus*, der zu den Ständerpilzen (Basidiomycota) gehört.

### **Wirkung des Fermentationsüberstands auf Biofilme**

Zunächst wurde anhand von Wachstumskurven gezeigt, dass der Fermentationsüberstand F+++ *P. aeruginosa* PA49 nicht abtötet, sondern dessen Wachstum hemmt (Abb. 4.19). Dies deutet auf eine bakteriostatische Wirkung des Fermentationsüberstands hin. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Mit diesen wurde gezeigt, dass der Anteil an lebenden und toten Bakterien vor und nach der Behandlung mit dem Fermentationsüberstand (F+++) vergleichbar blieb. Bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen 3D-Aufnahmen wurde im Vergleich zu einem unbehandelten *P. aeruginosa* PA49 Biofilm allerdings auch eine veränderte löchrigere Biofilmstruktur nachgewiesen (Abb. 4.18). Der Fermentationsüberstand (F+++) bewirkte dabei eine Reduktion der Biomasse von *P. aeruginosa*-Biofilmen um 38 % sowie eine Abnahme der Biofilmdicke um 19 % (Tab. 4.11). Dies führt zu der Hypothese, dass sich die pilzlichen Exoprodukte im Fermentationsüberstand (F+++) destabilisierend auf die Biofilmstruktur auswirken.

Anschließend wurde die Wirkung der pilzlichen Exoprodukte unter realer Anwendung zur schonenden Reinigung von RO-Membranen getestet. Dies erfolgte an kleintechnischen RO-Membrananlagen der BASF SE. Mit den dabei durchgeführten Versuchen wurde die reinigende Wirkung der pilzlichen Exoprodukte auch für natürliche Biofilmpopulationen bestätigt. Die Reinigung mit den pilzlichen Exoprodukten bewirkte eine Zunahme der Flussrate um 49 % im Vergleich zur unbehandelten RO-Membran (Tab. 4.12). Eine Kombination der pilzlichen Exoprodukte mit dem Komplexbildner

Trilon M verbesserte nochmals die Reinigungswirkung, wobei die Flussrate sogar um 94 % erhöht wurde. Komplexbildner wie Trilon M unterstützen die destabilisierende Wirkung durch Komplexieren zweiwertiger Kationen in der EPS [119, 120]. Zum Vergleich wurde das kommerzielle Reinigungsmittel Tergazyme (Alconox) getestet, womit eine Zunahme der Flussrate um 102 % erreicht wurde. Durch Aufkonzentrieren des Fermentationsüberstands könnte dessen Wirkung nochmal deutlich verbessert werden, so dass Reinigungsergebnisse wie von Tergazyme eventuell auch mit dem Fermentationsüberstand erzielbar sind.

Bei der Charakterisierung des Fermentationsüberstands (F+++ ) wurde beim Vergleich mit den anderen untersuchten Überständen die mit Abstand stärkste Protease-Aktivität nachgewiesen. Des Weiteren wurden Polysaccharid-spaltende Enzyme wie z. B. Galactosidasen, Glukosidasen und Fructosidasen identifiziert (Tab. 4.14). Der Fermentationsüberstand besaß zudem eine Esterase-Aktivität. Im Gegensatz dazu wurden keine Lipase- oder DNase-Aktivitäten nachgewiesen. Bezogen auf die Biofilmdynamiken bestätigen auch diese Ergebnisse die Hypothese, dass die pilzlichen Exoprodukte (F+++ ) weniger auf die Bakterien, sondern vielmehr destabilisierend auf die Biofilm-Matrix (EPS) wirken. Aufgrund des hohen Anteils der EPS in Biofilmen [21, 37, 48] eignet sich diese besonders als Angriffspunkt für die Biofilm-Destabilisierung. Zudem ist die EPS hauptsächlich aus Polysacchariden [49] und Proteinen [50, 52] aufgebaut. Aufgrund dessen, dass bei Denaturierung der Proteine im Fermentationsüberstand die biofilmentfernende Wirkung erlischt, kann die biofilmentfernende Wirkung auf die Aktivität von Proteinen zurückgeführt werden (Abb. 4.20).

Zudem wurde bei der Fraktionierung des Fermentationsüberstands hinsichtlich seines Molekulargewichts mit VivaSpin Konzentratoren keine signifikante Aktivitätsfraktion identifiziert (Abb. 4.21). Dies zeigt, dass die biofilmdestabilisierende Wirkung des Fermentationsüberstands (F+++ ) nicht auf einem einzelnen Exoprodukt beruht, sondern vielmehr ein Cocktail an Exoprodukten zusammen biofilmdestabilisierend wirkt.

Der Vorteil der Biofilm-Destabilisierung ist, dass die Widerstandsfähigkeit von Biofilmen für weiterführende Reinigungsschritte reduziert werden kann. So ist es z. B. nach dem Toleranzschwellen-Konzept [17] nicht notwendig, alle Biofilme zu beseitigen, sondern

nur die Dicke unter einer bestimmten Schwelle zu halten. Dazu eignet sich beispielsweise eine Zwei-Schritt Strategie: Zunächst muss die Stabilität der Biofilm-Matrix (EPS) durch Destabilisierung überwunden werden, dann kann die geschwächte Biofilm-Matrix durch erhöhte Scherkräfte ausgetragen werden.

Ein Vergleich unterschiedlicher Chargen des Fermentationsüberstands ergab, dass die Aktivitäten der Chargen stark variieren (Abb. 4.23). Eine Möglichkeit wäre, dass schon kleine Unterschiede bei der Durchführung der Fermentation für die Verringerung der Aktivität verantwortlich sind. Eine weitere Möglichkeit sind Unterschiede bei der Anzucht der Pilzkulturen für die Fermentation. Laut BASF SE wurden die Pilzkulturen von Glycerinstocks auf Nähragarplatten ausgestrichen. Für die Herstellung von Vorkulturen für die Fermentation wurden kleine Stückchen aus den Agarplatten geschnitten und in das Medium gegeben.

### **Zwischenfazit**

Die Prävention der Biofilmentwicklung durch mit PFPE-Flüssigkeit beschichtete Polymeroberflächen in Kombination mit der schonenden Biofilmentfernung ermöglicht die Minimierung der durch Biofilme verursachten Probleme beispielsweise in wasserführenden technischen Systemen. Der Einsatz der pilzlichen Exoprodukte als Gegenmaßnahme kann aber nur dann sinnvoll erfolgen, wenn frühzeitig Informationen über das Ausmaß an Kontamination im System vorliegen. Daher muss, ergänzend zu den bisher entwickelten Methoden, eine Überwachung der Biofilmentwicklung ermöglicht werden.

### 5.3 Überwachung der Biofilmentwicklung

Als Frühwarnsystem bei niedrigen Kontaminationen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein mikrofluidischer Biofilmsensor, der um die Gruppe von Bastian E. Rapp (IMT, KIT) entwickelt wurde [103], getestet (Kap. 3.7.1). Der Biofilmsensor misst die Biofilmbiomasse über Impedanzspektroskopie sowie die Biofilmaktivität über Amperometrie. In der Animpf-Phase (Abb. 4.26) stieg das amperometrische Signal sprunghaft an und fiel dann ab. Dieses Verhalten ist auf die anfängliche hohe Konzentration an planktonischen Bakterien nahe den Elektroden zurückzuführen. Die geringfügigen Änderungen des impedanzspektrometrischen Signals in der Animpf-Phase sind auf die temporäre Adsorption und Desorption von Bakterien an den Elektroden zurückzuführen [103].

In der Biofilmwachstums-Phase kann anhand des impedanzspektrometrischen Signals sofort eine Zunahme der Biofilmbiomasse erkannt werden. Dabei zeigten alle vier Elektroden diesen Verlauf. Somit ist auszuschließen, dass durch inhomogene Biofilmverteilungen Messfehler entstehen. Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie wurde bereits nach wenigen Stunden zuverlässig eine Biofilmbildung nachgewiesen, so dass der Sensor als Frühwarnsystem eingesetzt werden kann.

Das amperometrische Signal begann erst nach ca. 24 h zu steigen. Vermutlich ist die Atmungsaktivität der Bakterien bei kleinen Konzentrationen noch zu gering, um einen mit dem untersuchten System messtechnisch erfassbaren Strom zu erzeugen. Nach ca. 24 h stellte sich der zu erwartende rasche Anstieg ein.

Wird das System mit Biozid durchspült, fällt die Biofilmaktivität nach einigen Stunden auf null ab. Dies spricht dafür, dass die Bakterien weitestgehend abgetötet wurden. Das impedanzspektrometrische Signal bleibt hingegen relativ konstant, da durch das Abtöten der Bakterien die Biofilmbiomasse nicht abnahm. Die leichte Abnahme des impedanzspektrometrischen Signals könnte durch einen Austrag von Biomasse aus dem System verursacht worden sein.

Nur die Kombination beider Sensoren ermöglicht folglich ein umfassendes Bild, da je nach Anwendung die gesamte Biofilmbiomasse, die Biofilmaktivität oder beides von Interesse ist. Zudem wird das impedanzspektrometrische Signal benötigt, um bereits frühzeitig eine Biofilmentwicklung zu erkennen. Aufgrund des konstruktiv einfachen

Aufbaus ist der Sensor schließlich geeignet, beispielsweise das Screening antibakterieller Substanzen zu parallelisieren und damit die Charakterisierung von Biofilmdynamiken zu beschleunigen.

#### **5.4 Zusammenspiel dreier Strategien zur Kontrolle von Biofilmen**

Um die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Strategien zur Kontrolle von Biofilmen zu untersuchen, wurde die Wirksamkeit des biofilmdestabilisierenden Fermentationsüberstands (F+++)<sup>1</sup> in dem mikrofluidischen Biofilmsensor getestet. Wie bereits beschrieben, wurde mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie bereits wenige Stunden nach dem Animpfen Biofilmwachstum nachgewiesen (Abb. 4.28). Wird der inaktive Fermentationsüberstand verwendet, wurde auch nach dessen Zugabe keine Abnahme des impedanzspektrometrischen Signals beobachtet. Damit wird die oben beschriebene Hypothese bestätigt, dass Proteine für die biofilmdestabilisierende Wirkung verantwortlich sind. Wird nach ca. 21 h Biofilmwachstum der als wirksam identifizierte Fermentationsüberstand (F+++)<sup>1</sup> zugegeben, nimmt das impedanzspektrometrische Signal innerhalb von 6 h merklich ab. Der Fermentationsüberstand destabilisiert die Biofilme und führt zu deren Austrag, wobei der Austrag an Biomasse die neu gebildete Biomasse übersteigt. Die Behandlung von Biofilmen mit dem Fermentationsüberstand unterscheidet sich dabei merklich von dem Einsatz eines Biozids wie Natriumazid. Das Biozid führte zwar zur Abtötung von Bakterien, allerdings wird dadurch die Biofilmbiomasse im System nicht zwangsläufig vermindert. In vielen Anwendungen ist dies jedoch notwendig. Zum einen bietet tote Biofilmbiomasse eine günstige Aufwuchsfläche und stellt eine lokale Anreicherung von abbaubarem organischem Material dar [17]. Zum anderen wird durch das Abtöten der Bakterien alleine eine Verstopfung von Membranen etc. nicht beseitigt. Stattdessen müssen die Biofilme abgelöst werden, um die Permeatleistung der durch Biofilme verstopften Membranen wieder zu erhöhen. Die schonende Biofilmentfernung hingegen, vor allem in Kombination mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PFPE-Oberflächen, könnte zukünftig dazu beitragen, die Problematik durch Biofilme in wasserführenden technischen Systemen zu vermindern.

## 6 Zusammenfassung/ Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Bakterien können auf den unterschiedlichsten natürlichen und künstlichen Oberflächen Biofilme bilden. In den meisten wasserführenden technischen Systemen stellen Biofilme ein kostenintensives bzw. hygienisches Problem dar. Daher wurde ein auf unterschiedlichen Strategien basierender Ansatz zur Kontrolle von Biofilmen entwickelt (Abb. 6.1).

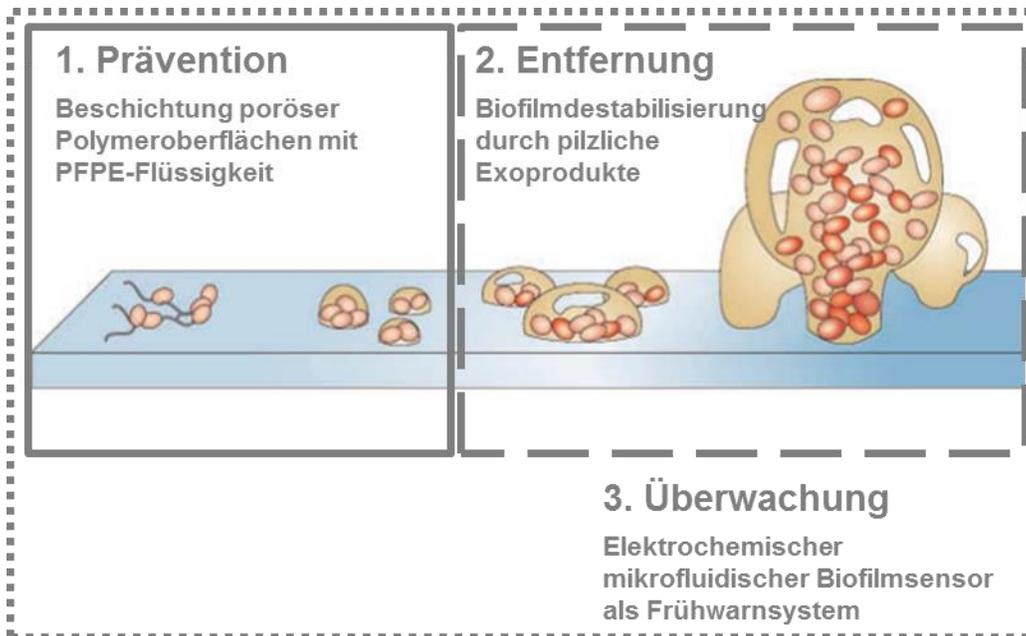


Abb. 6.1. Strategien zur Kontrolle von Biofilmen (PFPE = Perfluorpolyether; bearbeitet nach [45])

Ein essentieller Bestandteil der Biofilmkontrolle ist die **Prävention der primären bakteriellen Adhäsion**. Der Ansatz basiert auf der Beschichtung von porösen Polymeroberflächen mit Perfluorpolyethern (PFPE-Flüssigkeit). Diese Flüssigkeiten eignen sich aufgrund geringer Oberflächenenergien besonders für Beschichtungen von Oberflächen zur Prävention von bakterieller Adhäsion. Weitere Vorteile sind die sehr geringen Dampfdrücke, die Unlöslichkeit in allen gängigen Lösungsmitteln sowie die hohe chemische Beständigkeit. Die Flüssigkeiten wurden mit Hilfe von porösen Polymeren immobilisiert.

Dabei wurde in Biofilm-Plug Flow Reaktoren nachgewiesen, dass diese PFPE-Oberflächen die bakterielle Adhäsion gegenüber den nicht beschichteten porösen Polymeroberflächen und gegenüber Glasoberflächen deutlich vermindern. Getestet wurden die *P. aeruginosa* Umweltisolate PA30, PA910 und PA49 in zwei verschiedenen Medien. Auch in Abwasser wurde eine merkliche Senkung der bakteriellen Adhäsion nach 21-tägiger Inkubation nachgewiesen.

Die PFPE-Oberflächen wiesen zudem, wie Kontaktwinkelmessungen zeigten, eine hohe Stabilität in den untersuchten wässrigen Medien auf. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Minderung der bakteriellen Adhäsion nicht auf die Toxizität der Flüssigkeit zurückzuführen ist.

Die Versuche zeigten allerdings auch, dass die bakterielle Adhäsion auf den PFPE-Oberflächen vom verwendeten *P. aeruginosa* Isolat abhängt. Wurde das multiresistente Umweltisolat PA49 in nährstoffreichem Medium eingesetzt, so wurde auch auf den PFPE-Oberflächen eine geringe bakterielle Adhäsion beobachtet.

Die Beschichtung von porösen Polymeroberflächen kann die bakterielle Adhäsion deutlich verzögern. Darüber hinaus wird jedoch eine schonende Methode zur Biofilmentfernung benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein Ansatz zur **schonenden Reinigung von RO-Membranen (RO = Reverse Osmosis) auf Basis pilzlicher Exoprodukte entwickelt**. Dazu wurden zunächst die Biofilmpopulationen auf industriell genutzten und mit Belägen verschmutzten RO-Membranen ermittelt. Es wurde gezeigt, dass die Biofilmpopulationen nur geringe Ähnlichkeiten zueinander besaßen. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Reinigungsstrategie, die nicht nur gegen einzelne Bakterienspezies, sondern allgemein wirksam ist.

In einem zweiten Schritt wurde durch ein Screening aus 406 von der BASF SE bereitgestellten pilzlichen Fermentationsüberständen eine Reihe von Überständen mit biofilmentfernender Wirkung identifiziert, wobei ein Fermentationsüberstand eine besonders starke Wirkung zeigte. Hierbei handelt es sich um den Fermentationsüberstand von *Polyporus squamosus*, der zu den Ständerpilzen (Basidiomycota) gehört. Durch fluoreszenzmikroskopische 3D-Aufnahmen wurde gezeigt, dass bei Behandlung von Biofilmen mit diesem Fermentationsüberstand die 3D-Architektur verändert und damit die Stabilität der Biofilme verringert wird, sich aber das Verhältnis von lebenden zu

toten Bakterien nicht signifikant verändert. Durch die Auswertung der 3D-Aufnahmen konnte zudem die Abnahme der Biofilmbiomasse um 38 % nachgewiesen werden. Ebenso bestätigten Untersuchungen an kleintechnischen RO-Membrananlagen der BASF SE die Wirksamkeit des identifizierten Fermentationsüberstands.

Der besonders effektive pilzliche Fermentationsüberstand wurde in Bezug auf Wirkprinzip und zur Identifikation der für die Wirkung verantwortlichen Exoprodukte charakterisiert. Zur weiteren Charakterisierung wurde der Fermentationsüberstand auf Enzymaktivitäten untersucht. Es wurden Protease-Aktivitäten und Polysaccharid-spaltende Enzyme nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten Wachstumskurven eine bakteriostatische Wirkung des Fermentationsüberstands auf *P. aeruginosa* PA49. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Exoprodukte des Fermentationsüberstands auf die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) in Biofilmen wirken und somit zu einer Destabilisierung der Biofilm-Struktur führen. Die destabilisierende Wirkung des Fermentationsüberstands beruht dabei nicht auf einem einzelnen sondern auf der Interaktion verschiedener Exoprodukte.

Aufgrund dieser Biofilm-Destabilisierung kann die Widerstandsfähigkeit von Biofilmen für weiterführende Reinigungsschritte reduziert werden.

Um beim Auftreten von Biofouling rechtzeitig Gegenmaßnahmen einleiten zu können, ist schließlich ein **Frühwarnsystem zur Erkennung der Biofilmentwicklung** notwendig. Dazu kann ein am KIT neuentwickelter mikrofluidischer Biofilmsensor eingesetzt werden, der sowohl die Biofilmbiomasse über Impedanzspektroskopie als auch die Biofilmaktivität über Amperometrie erfasst. Ein Vorteil dieses Biofilmsensors ist der konstruktiv einfache Aufbau. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Inbetriebnahme und Charakterisierung dieses Biofilmsensors. Dazu wurden zunächst Biofilme angezüchtet und das Messsignal des Sensors wurde auf Plausibilität geprüft. Nachfolgend wurden die Biofilme mit Biozid behandelt, um die Bakterien im Biofilm abzutöten. Nach der Biozidbehandlung geht das Messsignal des amperometrischen Sensors auf null zurück, da die Bakterien abgetötet wurden. Das impedanzspektrometrische Signal hingegen blieb nach der Biozidbehandlung in etwa konstant, da das Biozid die Biofilmbiomasse nicht vermindert, sondern nur die Bakterien abtötet. Mit den Versuchen konnte die Funktionstüchtigkeit des Sensors gezeigt werden. Hervorzuheben ist, dass mit Hilfe der Impedanzspektroskopie bereits nach wenigen Stunden eine zuverlässige Aussage über

die Entwicklung von Biofilmbiomasse möglich ist. Damit ist der Sensor als Frühwarnsystem geeignet.

Schließlich half der erfolgreich getestete mikrofluidische Biofilmsensor, die biofilmentfernende Wirkung des zuvor identifizierten pilzlichen Fermentationsüberstands zu verifizieren. Dabei wurde zum einen die Wirksamkeit des Überstands bezüglich der destabilisierenden Wirkung auf Biofilme nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass die Wirkung des Fermentationsüberstands auf Proteine zurückzuführen ist, da der Überstand nach Proteininaktivierung keine biofilmentfernende Wirkung mehr zeigte.

## 6.2 Summary

Biofouling represents a complex and general problem. In particular in technical water-based systems, biofilms cause hygienic and cost-intensive problems. Therefore, three strategies (Fig. 6.2) were developed to control biofilm associated problems.

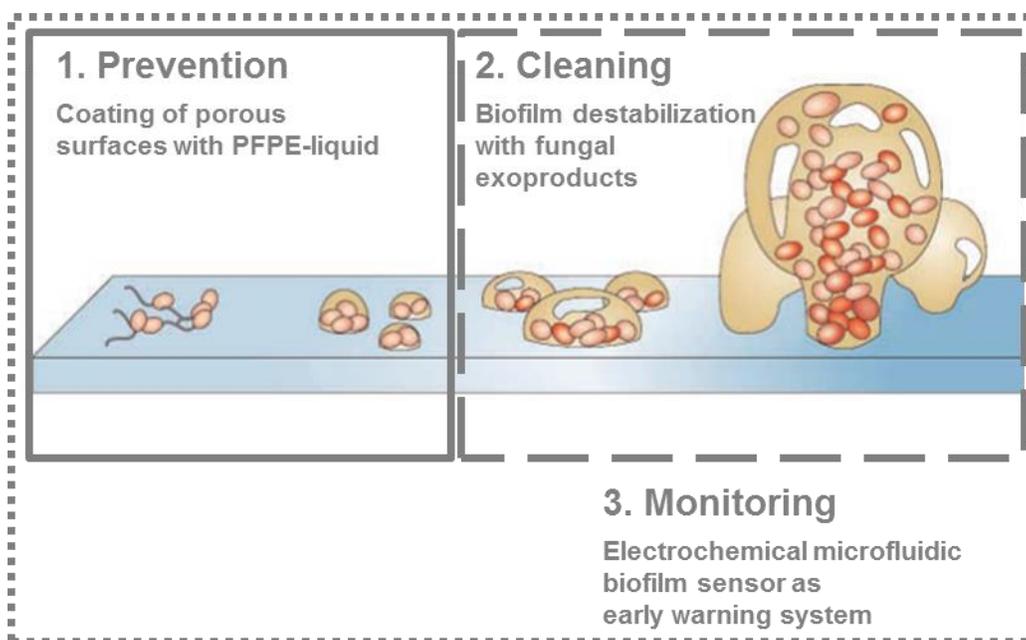


Fig. 6.2. Strategies to control biofilm associated problems (PFPE = perfluoropolyether; modified from [45])

One strategy is based on the **prevention of biofilm formation** by using slippery liquid-infused porous surfaces (SLIPS). Thereby, a porous poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) surface was infused with perfluoropolyether (PFPE) liquids. Surfaces infused with these liquid are well-suited for preventing biofilm formation because of the resulting low surface energies. Further advantages include a very low vapour pressure, the insolubility in almost all solvents, as well as a high chemical resistance.

The surfaces were tested with different environmental isolates of opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* using a biofilm plug flow reactor. It was shown that the use of the PFPE-infused surfaces reduced the biofilm formation significantly compared with uncoated porous polymer surfaces and glass controls. Further experiments demonstrated the reduction of bacterial adhesion on the PFPE-infused surfaces in wastewater after 21 days of incubation.

Besides the reduction of the bacterial adhesion, the stability of the liquid-infused surfaces in aqueous solutions was proven with contact angle measurements. Moreover, the toxicity of the

PFPE liquid on the bacterial growth was tested. The tests showed that the PFPE liquid itself did not have an antimicrobial effect.

However, the biofilm formation on the PFPE-infused surfaces turned out to be highly dependent on the bacterial strain. For example, the antibiotic-multiresistant *P. aeruginosa* isolate PA49 was able to slightly cover the PFPE-infused surfaces in high nutrient medium. The difference in biofilm formation between the laboratory reference strain *P. aeruginosa* PA14 and the environmental *P. aeruginosa* strains was attributed to their specific genotypic background.

The coating of porous polymer surfaces with PFPE liquid can reduce bacterial adhesion. However, a method to remove biofilms is also necessary for an effective biofilm control. Therefore, a strategy for the **soft cleaning of RO membranes** (RO = Reverse Osmosis) **based on fungal exoproducts** was developed.

First of all, biofilm populations on industrially used RO membranes were investigated. The biofilm diversity between the investigated membranes differed strongly indicating the necessity to develop a general cleaning approach.

After that, a developed microtiter plate-based screening was applied to test 406 culture supernatants from fungi provided by BASF SE. Thereby, several supernatants were identified showing strong biofilm removal tendencies. The supernatant from the fungi *Polyporus squamosus* (Basidiomycota) was the most effective culture supernatant and consequently it was used for further investigations.

Moreover, 3D fluorescence microscopy analysis of treated biofilms demonstrated more porous biofilm architecture with equal ratio of living and dead bacteria compared to untreated biofilms. The most effective culture supernatant resulted in a biofilm biomass reduction of 38 %. The culture supernatant destabilized the biofilm structure. The treatment of biofilm coated RO membranes under generally used cleaning conditions at BASF SE facilities with crude supernatant caused a flux increase of 49 % confirming the effectiveness of the identified fungal culture supernatant even against natural mixed-species biofilms.

After proving the efficiency of the culture supernatant, the fungal exoproducts were characterized. The following results were obtained:

- Bacteriostatic effect on *P. aeruginosa* PA49
- Protease activity (e. g. trypsin)
- Enzymes with polysaccharide cleavage activity (e. g. galactosidase)

Due to these results it can be concluded that the biofilm removal effects of the fungal culture supernatant are based on the destabilization of the extracellular polymeric substances (EPS) in

biofilms. Moreover, the destabilization of the EPS is caused by a mixture of exoproducts and not by a single exoproduct.

Exoenzymes of the fungal culture supernatant are responsible for biofilm destabilization and therefore contribute to the reduction of biofilm resistance against further cleaning processes.

To quickly initiate countermeasures against biofouling, **a real-time biofilm monitoring system** is necessary. Therefore, a biofilm sensor system, which was developed at the KIT, was tested. The sensor combines impedance spectroscopy to measure the biofilm biomass and amperometry to measure the biofilm activity. An advantage of this sensor is the simple measurement setup.

In this work, the sensor was tested and characterized. To operate the system, the measurement channel was inoculated with bacterial suspension while the reference channel was perfused with feeding medium. For biofilm formation, both channels were continuously perfused with feeding medium. The biofilm formation and the respiratory activity of *P. aeruginosa* were monitored using combined measurements of impedance spectroscopy and amperometry (for respiratory activity) during the seeding and biofilm growth phase as well as during treatment with a biocide. After biocide treatment, the amperometric signal dropped because the biocide killed the bacteria. Since the biocide treatment does not change the biofilm biomass, the impedance spectroscopy signal remained largely unchanged. The experiments demonstrated the suitability of the biofilm sensor system for monitoring biofilm growth. Moreover, the biofilm growth can be measured with the impedance spectroscopy after just a few hours. Consequently, the biofilm sensor system can be used as early warning system.

Finally, the biofilm sensor system was applied to test the efficiency of the fungal culture supernatant which was described above. The sensor helped to prove the destabilizing effect of the culture supernatant on the biofilm structure. Furthermore, experiments with inactivated proteins in the biofilm sensor system showed that proteins are responsible for this destabilizing effect.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] A.T. HENRICI: Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. In: *J Bacteriol* 25 (1933), S. 277-287.
- [2] J.W. COSTERTON, P.S. STEWART, E.P. GREENBERG: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. In: *Science* 284 (1999), S. 1318-1322.
- [3] A.C. ALLWOOD, M.R. WALTER, I.W. BURCH, B.S. KAMBER: 3.43 billion-year-old stromatolite reef from the Pilbara Craton of Western Australia: Ecosystem-scale insights to early life on Earth. In: *Precambrian Research* 158 (2007), S. 198-227.
- [4] J.W. COSTERTON, K.J. CHENG, G.G. GEESEY, T.I. LADD, J.C. NICKEL, M. DASGUPTA, T.J. MARRIE: Bacterial biofilms in nature and disease. In: *Annu Rev Microbiol* 41 (1987), S. 435-464.
- [5] C.A. FUX, J.W. COSTERTON, P.S. STEWART, P. STOODLEY: Survival strategies of infectious biofilms. In: *Trends Microbiol* 13 (2005), S. 34-40.
- [6] E.J. ANAISSIE, S.R. PENZAK, M.C. DIGNANI: The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. In: *Arch Intern Med* 162 (2002), S. 1483-1492.
- [7] S. CHOONG, H. WHITFIELD: Biofilms and their role in infections in urology. In: *BJU international* 86 (2000), S. 935-941.
- [8] R.M. DONLAN: Biofilms: microbial life on surfaces. In: *Emerging infectious diseases* 8 (2002), S. 881-890.
- [9] Y. IMAMURA, J. CHANDRA, P.K. MUKHERJEE, A.A. LATTIF, L.B. SZCZOTKA-FLYNN, E. PEARLMAN, J.H. LASS, K. O'DONNELL, M.A. GHANNOUM: Fusarium and Candida albicans biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. In: *Antimicrob Agents Chemother* 52 (2008), S. 171-182.
- [10] K. HÖLL: *Wasser : Nutzung im Kreislauf; Hygiene, Analyse und Bewertung*. XXVIII, 1019 S. de Gruyter: Berlin [u.a.], 2010. - ISBN 978-3-11-022677-5
- [11] G.D. BIXLER, B. BHUSHAN: Biofouling: lessons from nature. In: *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 370 (2012), S. 2381-2417.
- [12] H.C. FLEMMING: Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002), S. 629-640.
- [13] H.C. FLEMMING, P.S. MURTHY, R. VENKATESAN, K.E. COOKSEY: *Marine and Industrial Biofouling*. Springer, 2008. - ISBN 9783540697961
- [14] R. BOE-HANSEN, A.C. MARTINY, E. ARVIN, H.J. ALBRECHTSEN: Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. In: *Water Sci Technol* 47 (2003), S. 91-97.
- [15] R.A.N. CHMIELEWSKI, J.F. FRANK: Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 (2003), S. 22-32.
- [16] H.C. FLEMMING, G. SCHAULE: Microbial Deterioration of Materials - Biofilm and Biofouling - Biofouling. In: *Werkst Korros* 45 (1994), S. 29-39.
- [17] H.-C. FLEMMING: *Biofouling bei Membranprozessen*. XII, 181 S. Springer: Berlin, 1995. - ISBN 3-540-58596-6

- [18] D. SPETTMANN, S. EPPMANN, H.C. FLEMMING, J. WINGENDER: Visualization of membrane cleaning using confocal laser scanning microscopy. In: *Desalination* 224 (2008), S. 195-200.
- [19] W.G. CHARACKLIS, D.B.I.B. JAMES: Bioengineering Report. Fouling biofilm development: a process analysis. In: *Biotechnol Bioeng* 102 (2009), S. 309, 310-347.
- [20] J.W. COSTERTON, Z. LEWANDOWSKI, D.E. CALDWELL, D.R. KORBER, H.M. LAPPIN-SCOTT: Microbial biofilms. In: *Annu Rev Microbiol* 49 (1995), S. 711-745.
- [21] H.-C. FLEMMING, J. WINGENDER: Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. In: *Biologie in unserer Zeit* 31 (2001), S. 169-180.
- [22] G.G. GEESEY, W.T. RICHARDSON, H.G. YEOMANS, R.T. IRVIN, J.W. COSTERTON: Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. In: *Can J Microbiol* 23 (1977), S. 1733-1736.
- [23] D.M. WARD, M.J. FERRIS, S.C. NOLD, M.M. BATESON: A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (1998), S. 1353-1370.
- [24] K.J. EDWARDS, P.L. BOND, T.M. GIHRING, J.F. BANFIELD: An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. In: *Science* 287 (2000), S. 1796-1799.
- [25] H.W. PAERL, J.C. PRISCU: Microbial Phototrophic, Heterotrophic, and Diazotrophic Activities Associated with Aggregates in the Permanent Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. In: *Microb Ecol* 36 (1998), S. 221-230.
- [26] K. HAUSMANN: *Extremophile : Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*. XVII, 422. VCH: Weinheim [u.a.], 1995. - ISBN 3-527-30068-6
- [27] P. STOODLEY, I. DODDS, J.D. BOYLE, H.M. LAPPIN-SCOTT: Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. In: *Journal of Applied Microbiology* 85 (1998), S. 19S-28S.
- [28] H.-C. FLEMMING: *Biofilm highlights*. XII, 243 S. Springer: Berlin, 2011. - ISBN 978-3-642-19939-4
- [29] L.H.G. MORTON, D.L.A. GREENWAY, C.C. GAYLARDE, S.B. SURMAN: Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. In: *Int Biodeter Biodegr* 41 (1998), S. 247-259.
- [30] S. MOLIN, T. TOLKER-NIELSEN: Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. In: *Curr Opin Biotechnol* 14 (2003), S. 255-261.
- [31] H. CERI, M.E. OLSON, C. STREMICK, R.R. READ, D. MORCK, A. BURET: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. In: *J Clin Microbiol* 37 (1999), S. 1771-1776.
- [32] J.D. CHAMBLESS, S.M. HUNT, P.S. STEWART: A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. In: *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), S. 2005-2013.
- [33] J.W. COSTERTON: Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. In: *Science* 284 (1999), S. 1318-1322.
- [34] J.W. COSTERTON, H.N. DAMGAARD, K.J. CHENG: Cell envelope morphology of rumen bacteria. In: *Journal of Bacteriology* 118 (1974), S. 1132-1143.
- [35] R.M. DONLAN, J.W. COSTERTON: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clinical microbiology reviews* 15 (2002), S. 167-193.

- [36] J.W. COSTERTON: Overview of microbial biofilms. In: *Journal of industrial microbiology* 15 (1995), S. 137-140.
- [37] H.-C. FLEMMING, J. WINGENDER: Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide. In: *Chemie in unserer Zeit* 36 (2002), S. 30-42.
- [38] P. STOODLEY, K. SAUER, D.G. DAVIES, J.W. COSTERTON: Biofilms as complex differentiated communities. In: *Annu Rev Microbiol* 56 (2002), S. 187-209.
- [39] D. DAVIES, in: J. Wingender, T. Neu, H.-C. Flemming (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer Berlin Heidelberg, 1999, S. 93-117.
- [40] L. HALL-STOODLEY, J.W. COSTERTON, P. STOODLEY: Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. In: *Nature Reviews Microbiology* 2 (2004), S. 95-108.
- [41] N. SIBONI, M. LIDOR, E. KRAMARSKY-WINTER, A. KUSHMARO: Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. In: *FEMS Microbiol Lett* 274 (2007), S. 24-29.
- [42] C.J.P. BOONAERT, V. TONIAZZO, C. MUSTIN, Y.F. DUFRENE, P.G. ROUXHET: Deformation of *Lactococcus lactis* surface in atomic force microscopy study. In: *Colloid Surface B* 23 (2002), S. 201-211.
- [43] C.M. PANG, P. HONG, H. GUO, W.T. LIU: Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. In: *Environ Sci Technol* 39 (2005), S. 7541-7550.
- [44] G. O'TOOLE, H.B. KAPLAN, R. KOLTER: Biofilm formation as microbial development. In: *Annu Rev Microbiol* 54 (2000), S. 49-79.
- [45] D. DAVIES: Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (2003), S. 114-122.
- [46] J. WINGENDER, H.-C. FLEMMING, *Biotechnology Set*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, S. 65-83.
- [47] J. WINGENDER: *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure and function*. XIV, 258. Springer: Berlin; Heidelberg [u.a.], 1999. - ISBN 3-540-65720-7
- [48] S.K. CHOONG, H.N. WHITFIELD: Urinary encrustation of alloplastic materials. In: *Journal of endourology / Endourological Society* 14 (2000), S. 19-23.
- [49] I.W. SUTHERLAND: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. In: *Microbiology* 147 (2001), S. 3-9.
- [50] T. GEHRKE, J. TELEGDI, D. THIERRY, W. SAND: Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. In: *Appl Environ Microbiol* 64 (1998), S. 2743-2747.
- [51] R.E. STEINBERGER, P.A. HOLDEN: Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. In: *Appl Environ Microbiol* 71 (2005), S. 5404-5410.
- [52] C.B. WHITCHURCH, T. TOLKER-NIELSEN, P.C. RAGAS, J.S. MATTICK: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. In: *Science* 295 (2002), S. 1487.
- [53] P.H. NIELSEN, A. JAHN, R. PALMGREN: Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. In: *Water Science and Technology* 36 (1997), S. 11-19.
- [54] E.A. OMBAKA, R.M. COZENS, M.R. BROWN: Influence of nutrient limitation of growth on stability and production of virulence factors of mucoid and nonmucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Reviews of infectious diseases* 5 Suppl 5 (1983), S. 880-888.

- [55] L. TIMOFEEVA, N. KLESHCHEVA: Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (2011), S. 475-492.
- [56] H.F. CHUANG, R.C. SMITH, P.T. HAMMOND: Polyelectrolyte multilayers for tunable release of antibiotics. In: *Biomacromolecules* 9 (2008), S. 1660-1668.
- [57] J.S. PRICE, A.F. TENCER, D.M. ARM, G.A. BOHACH: Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. In: *J Biomed Mater Res* 30 (1996), S. 281-286.
- [58] P. WU, D.W. GRAINGER: Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. In: *Biomaterials* 27 (2006), S. 2450-2467.
- [59] R. KUMAR, H. MUNSTEDT: Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. In: *Biomaterials* 26 (2005), S. 2081-2088.
- [60] E.M. HETRICK, M.H. SCHOENFISCH: Reducing implant-related infections: active release strategies. In: *Chem Soc Rev* 35 (2006), S. 780-789.
- [61] P. KINGSHOTT, J. WEI, D. BAGGE-RAVN, N. GADEGAARD, L. GRAM: Covalent attachment of poly(ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. In: *Langmuir* 19 (2003), S. 6912-6921.
- [62] S.B. LEE, R.R. KOEPEL, S.W. MORLEY, K. MATYJASZEWSKI, Y. SUN, A.J. RUSSELL: Permanent, nonleaching antibacterial surfaces. 1. Synthesis by atom transfer radical polymerization. In: *Biomacromolecules* 5 (2004), S. 877-882.
- [63] S.E. STIRIBA, H. FREY, R. HAAG: Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 41 (2002), S. 1329-1334.
- [64] R.P. CARLSON, R. TAFFS, W.M. DAVISON, P.S. STEWART: Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. In: *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 19 (2008), S. 1035-1046.
- [65] F. COSTA, I.F. CARVALHO, R.C. MONTELARO, P. GOMES, M.C. MARTINS: Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. In: *Acta Biomater* 7 (2011), S. 1431-1440.
- [66] B. BHUSHAN: Bioinspired Structured Surfaces. In: *Langmuir* 28 (2012), S. 1698-1714.
- [67] A.K. EPSTEIN, T.S. WONG, R.A. BELISLE, E.M. BOGGS, J. AIZENBERG: Liquid-infused structured surfaces with exceptional anti-biofouling performance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012), S. 13182-13187.
- [68] U. BAUER, W. FEDERLE: The insect-trapping rim of *Nepenthes* pitchers: surface structure and function. In: *Plant signaling & behavior* 4 (2009), S. 1019-1023.
- [69] U. BAUER, M. SCHARMANN, J. SKEPPER, W. FEDERLE: 'Insect aquaplaning' on a superhydrophilic hairy surface: how *Heliamphora nutans* Benth. pitcher plants capture prey. In: *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 280 (2013).
- [70] H.F. BOHN, W. FEDERLE: Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), S. 14138-14143.
- [71] T. KLEINTSCHEK, J. LI, A. RIEDER, Y. CHENG, T. BAUMBACH, U. OBST, T. SCHWARTZ, P.A. LEVKIN: Hydrophobic liquid-infused porous polymer surfaces for antibacterial applications. In: *ACS applied materials & interfaces* 5 (2013), S. 6704-6711.
- [72] P.A. LEVKIN, F. SVEC, J.M. FRECHET: Porous polymer coatings: a versatile approach to superhydrophobic surfaces. In: *Adv Funct Mater* 19 (2009), S. 1993-1998.

- [73] J.S. LI, E. UEDA, A. NALLAPANENI, L.X. LI, P.A. LEVKIN: Printable superhydrophilic-superhydrophobic micropatterns based on supported lipid layers. In: *Langmuir* 28 (2012), S. 8286-8291.
- [74] I.B. JOHNS, E.A. MCELHILL, J.O. SMITH: Thermal Stability of Organic Compounds. In: *I&EC Product Research and Development* 1 (1962), S. 2-6.
- [75] B.A. BAMGBADE, Y. WU, W.A. BURGESS, M.A. MCHUGH: Experimental density and PC-SAFT modeling of Krytox® (perfluoropolyether) at pressures to 275 MPa and temperatures to 533 K. In: *Fluid Phase Equilibria* 332 (2012), S. 159-164.
- [76] SOLVAY SOLEXIS, PERFLUORPOLYETHER, Bollate, Italien, 2004.
- [77] DUPONT, DuPont™ Krytox® Performance Lubricants - PRODUCT INFORMATION, 2012.
- [78] DUPONT, DuPont™ Krytox® Performance Lubricants - PRODUCT OVERVIEW, USA, 2013.
- [79] H.-P. MOLITORIS: Pilze in der Biotechnologie. In: *Acta Albertina Ratisbonensia* 47 (1991), S. 103-117.
- [80] V.F. LVOVICH: *Impedance spectroscopy : applications to electrochemical and dielectric phenomena*. Online-Ressource (1 online resource (xiii, 353 p.)). Wiley: Hoboken, N.J, 2012. - ISBN 978-1-280-88135-0
- [81] R. BUSCH: *Elektrotechnik und Elektronik : für Maschinenbauer und Verfahrenstechniker; mit 132 Aufgaben mit Lösungen*. XIV, 390 S. Teubner: Wiesbaden, 2006. - ISBN 3-8351-0022-X
- [82] N.J. RICHARDSON, S. GARDNER, D.M. RAWSON: A Chemically Mediated Amperometric Biosensor for Monitoring Eubacterial Respiration. In: *J Appl Bacteriol* 70 (1991), S. 422-426.
- [83] T. SCHWARTZ, H. VOLKMANN, S. KIRCHEN, W. KOHNEN, K. SCHON-HOLZ, B. JANSEN, U. OBST: Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. In: *FEMS Microbiol Ecol* 57 (2006), S. 158-167.
- [84] X. LI: Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. In: *Microbiology* 149 (2003), S. 353-362.
- [85] J. O'BRIEN, I. WILSON, T. ORTON, F. POGNAN: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), S. 5421-5426.
- [86] *Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente : Methodensammlung*. XXI, 260 S. Oldenbourg: München [u.a.], 1998. - ISBN 3-486-26435-4
- [87] T. SCHWARTZ, S. HOFFMANN, U. OBST: Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. In: *Journal of Applied Microbiology* 95 (2003), S. 591-601.
- [88] J.G. WILLIAMS, A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucleic Acids Res* 18 (1990), S. 6531-6535.
- [89] P. MAROYE, H.P. DOERMANN, A.M. ROGUES, J.P. GACHIE, F. MEGRAUD: Investigation of an outbreak of *Ralstonia pickettii* in a paediatric hospital by RAPD. In: *J Hosp Infect* 44 (2000), S. 267-272.

- [90] D. VENIERI, A. VANTARAKIS, G. KOMNINO, M. PAPAPETROPOULOU: Differentiation of faecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). In: *Water Sci Technol* 50 (2004), S. 193-198.
- [91] S.G. FISCHER, L.S. LERMAN: Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. In: *Cell* 16 (1979), S. 191-200.
- [92] S.G. FISCHER, L.S. LERMAN: DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), S. 1579-1583.
- [93] J. BROSIUS, M.L. PALMER, P.J. KENNEDY, H.F. NOLLER: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978), S. 4801-4805.
- [94] G. MUYZER, E.C. DE WAAL, A.G. UITTERLINDEN: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. In: *Appl Environ Microbiol* 59 (1993), S. 695-700.
- [95] B. KILB, B. ESCHWEILER, G. PREUß, E. ZIEMANN, U. SCHÖTTLER: Darstellung der mikrobiellen Besiedlungsstruktur verschiedener Grundwasserhabitats durch Anwendung molekularbiologischer Methoden. In: *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 26 (1998), S. 349-354.
- [96] F. SANGER, S. NICKLEN, A.R. COULSON: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), S. 5463-5467.
- [97] M. NEI, W.H. LI: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), S. 5269-5273.
- [98] Y. YUAN, T.R. LEE, in: G. Bracco, B. Holst (Eds.), *Surface Science Techniques*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, S. 3-34.
- [99] E. BONACCURSO, in: G. Auernhammer, H.-J. Butt, D. Vollmer (Eds.), *Surface and Interfacial Forces – From Fundamentals to Applications*, Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 57-65.
- [100] G. MEICHSNER, T. MEZGER, J. SCHRÖDER: *Lackeigenschaften messen und steuern: Rheologie, Grenzflächen, Kolloide*. 236 S. Vincentz: Hannover, 2003. - ISBN 3-87870-739-8
- [101] K. MUNK, P. DERSCH: *Mikrobiologie : 43 Tabellen*. XVIII, 618 S. Thieme: Stuttgart [u.a.], 2008. - ISBN 3-13-144861-X
- [102] T. HILDEBRANDT: *Einblicke in den Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei Tieren*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Dissertation. 2007
- [103] L. PIRES, K. SACHSENHEIMER, T. KLEINTSCHEK, A. WALDBAUER, T. SCHWARTZ, B.E. RAPP: Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. In: *Biosens Bioelectron* 47 (2013), S. 157-163.
- [104] T.S. WONG, S.H. KANG, S.K. TANG, E.J. SMYTHE, B.D. HATTON, A. GRINTHAL, J. AIZENBERG: Bioinspired self-repairing slippery surfaces with pressure-stable omniphobicity. In: *Nature* 477 (2011), S. 443-447.
- [105] M. GÖTZ: *Methanisierung im Dreiphasen-Reaktor*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik Dissertation. 2014

- [106] *VDI-Wärmeatlas*. Online-Ressource (XXIII, 1760 S. eReference, online resource). Springer Vieweg: Berlin, Heidelberg, 2013. - ISBN 978-364-21998-1-3
- [107] A.B. GREGORY, H. JON, W.D.P. THOMAS, *Synthetic Lubricants And High-Performance Functional Fluids, Revised And Expanded*, CRC Press, 1999, S. 215-237.
- [108] M. GRÜNE: *Nanotechnologie : Grundlagen und Anwendungen*. 182 S. Vincentz Network: Hannover, 2008. - ISBN 978-3-87870-333-4
- [109] W. CHEN, A.Y. FADEEV, M.C. HSIEH, D. ÖNER, J. YOUNGBLOOD, T.J. MCCARTHY: Ultrahydrophobic and Ultralyophobic Surfaces: Some Comments and Examples. In: *Langmuir* 15 (1999), S. 3395-3399.
- [110] M. DELMAS, M. MONTHIOUX, T. ONDARÇUHU: Contact Angle Hysteresis at the Nanometer Scale. In: *Phys Rev Lett* 106 (2011).
- [111] D. MYERS: *Surfaces, interfaces, and colloids : principles and applications*. XX, 501 S. Wiley-VCH: New York, 1999. - ISBN 0-471-33060-4
- [112] V.L. KUNG, E.A. OZER, A.R. HAUSER: The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (2010), S. 621-641.
- [113] M. KATSIKOIANNI, Y.F. MISSIRLIS: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. In: *European cells & materials* 8 (2004), S. 37-57.
- [114] I. KOLODKIN-GAL, S. CAO, L. CHAI, T. BOTTCHER, R. KOLTER, J. CLARDY, R. LOSICK: A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. In: *Cell* 149 (2012), S. 684-692.
- [115] Y. LEQUETTE, G. BOELS, M. CLARISSE, C. FAILLE: Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. In: *Biofouling* 26 (2010), S. 421-431.
- [116] U. BÖCKELMANN, U. SZEWCZYK, E. GROHMANN: A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. In: *J Microbiol Methods* 55 (2003), S. 201-211.
- [117] J.B. KAPLAN, C. RAGUNATH, N. RAMASUBBU, D.H. FINE: Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. In: *J Bacteriol* 185 (2003), S. 4693-4698.
- [118] H.J. XU, Y. LIU: D-Amino acid mitigated membrane biofouling and promoted biofilm detachment. In: *J Membrane Sci* 376 (2011), S. 266-274.
- [119] R.M. PLATT, G.G. GEESEY, J.D. DAVIS, D.C. WHITE: Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. In: *Can J Microbiol* 31 (1985), S. 675-680.
- [120] S. WUERTZ, R. SPAETH, A. HINDERBERGER, T. GRIEBE, H.C. FLEMMING, P.A. WILDERER: A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. In: *Water Sci Technol* 43 (2001), S. 25-31.

## 8 Anhang

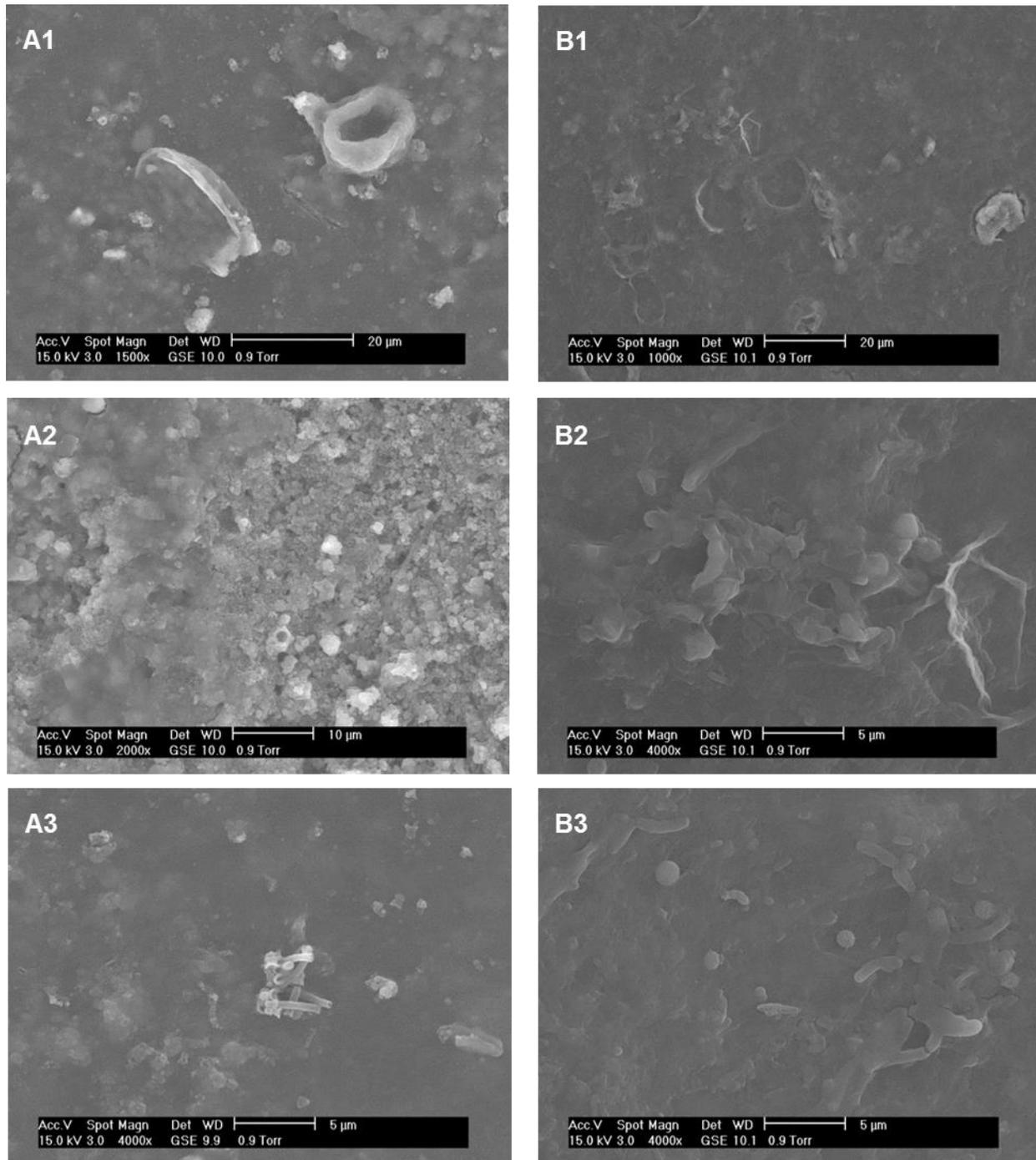


Abb. 8.1. ESEM-Aufnahmen der RO-Membranen aus der (A1-A3) Trinkwasseraufbereitung und aus der (B1-B3) MDF-Plattenproduktion

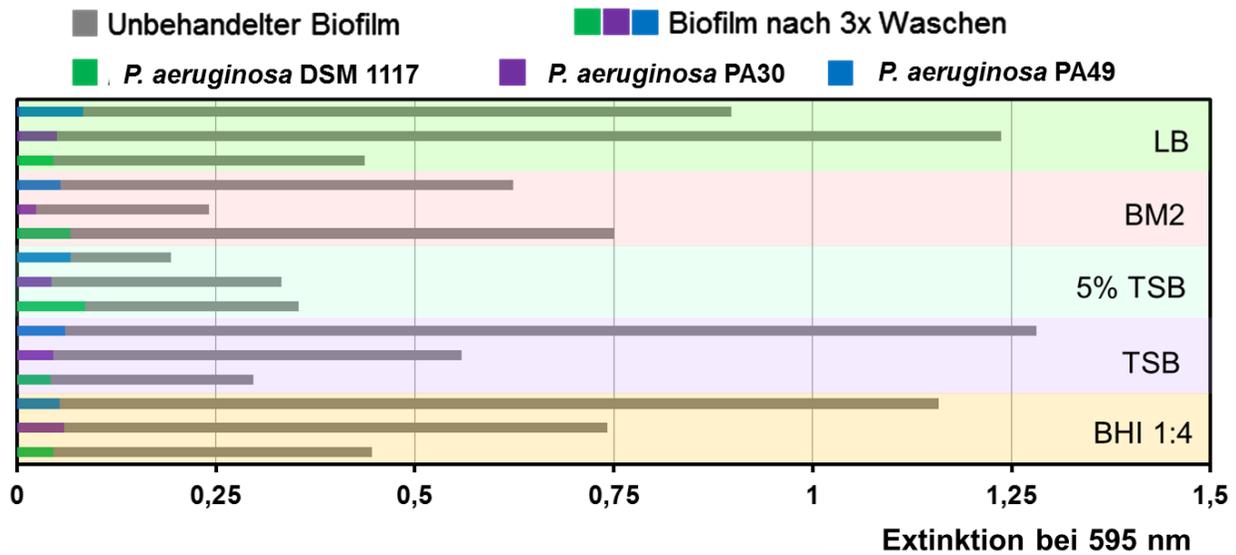


Abb. 8.2. Einfluss verschiedener Kulturmedien und auf die Stabilität und die Biomasse definierter Biofilme. Biofilmanzucht von drei verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen mit fünf verschiedenen Medien für 24 h.

Tab. 8.1. Einteilung der 406 Fermentationsüberstände für fünf getesteten Bedingungen bezüglich ihrer biofilmentfernenden Wirkung: 75-100 % Biofilmreduktion (rot), 65-74 % Biofilmreduktion (orange) und 50-64 % Biofilmreduktion (gelb)

Bakterienstamm	<i>P. aeruginosa</i> PA49									
	TSB					BM2				
Kulturmedium										
Kultivierungs-temperatur/-zeit	37 °C/ 15 h									
Behandlungs-temperatur/-zeit	37 °C 2 h		22–23 °C 2 h		37 °C 2 h		22–23 °C 2 h		37 °C 6 h	
Extinktion (595 nm)/ Biofilmreduktion in %	Ex <sub>595</sub>	r in %	Ex <sub>595</sub>	r in %	Ex <sub>595</sub>	r in %	Ex <sub>595</sub>	r in %	Ex <sub>595</sub>	r in %
Kontrolle	0,68		0,45		0,25		1,21		1,09	
1	0,69	-2	0,61	-35	0,40	-60	0,85	30	1,28	-17
2	0,63	8	0,84	-84	0,60	-138	1,13	6	1,47	-34
3	0,58	15	0,67	-48	0,50	-98	1,31	-8	1,62	-48
4	1,07	-57	0,70	-55	0,23	6	1,32	-9	0,61	44
5	0,67	2	1,05	-131	0,71	-186	1,41	-16	1,46	-33
6	0,85	-25	1,10	-142	0,70	-181	1,45	-20	1,43	-31
7	0,81	-19	0,83	-83	0,36	-43	1,20	0	1,15	-5
8	0,63	7	1,03	-128	0,48	-90	1,14	6	1,35	-24
9	0,79	-17	0,85	-87	0,38	-51	1,37	-14	1,33	-21
10	0,71	-4	0,89	-96	0,55	-118	1,29	-7	0,97	11
11	0,53	22	0,69	-53	0,73	-192	0,99	18	0,96	12
12	0,24	65	0,45	0	0,21	16	0,41	66	0,37	66
13	0,76	-12	0,73	-62	0,59	-137	1,15	4	1,62	-49

14	1,24	-82	0,79	-74	0,43	-73	1,29	-7	1,31	-20
15	0,74	-9	0,96	-112	0,69	-177	1,18	2	1,21	-11
16	0,65	5	0,69	-51	0,44	-78	1,01	16	0,81	26
17	0,55	19	0,70	-55	0,50	-102	1,18	2	1,73	-58
18	0,69	-1	0,82	-80	0,51	-102	1,10	9	1,44	-32
19	0,51	25	0,62	-36	0,26	-2	1,13	7	1,13	-3
20	0,61	11	0,74	-62	0,54	-117	1,27	-5	1,52	-39
21	0,38	44	0,93	-106	0,25	2	0,98	19	0,42	62
22	0,43	36	0,62	-36	0,42	-70	0,87	28	1,26	-15
23	0,62	9	0,71	-56	0,49	-96	1,22	-1	1,19	-9
24	0,39	42	0,49	-9	0,41	-65	1,04	14	0,76	30
25	0,63	7	0,82	-81	0,47	-86	1,34	-11	1,54	-41
26	0,75	-10	0,82	-82	0,42	-68	1,20	1	1,40	-28
27	0,45	33	0,72	-58	0,38	-51	1,06	13	1,10	-1
Kontrolle	0,67		0,77		0,69		1,28		0,77	
28	0,93	-38	0,58	25	0,73	-7	1,19	7	1,15	-50
29	0,56	16	0,71	8	0,82	-19	0,79	38	1,12	-46
30	0,96	-42	0,56	27	0,31	54	0,82	36	0,37	51
31	0,63	6	0,88	-14	0,96	-40	1,08	16	1,35	-77
32	0,76	-13	0,83	-7	1,08	-58	1,15	10	1,54	-101
33	0,68	-1	0,58	25	0,63	9	0,88	32	1,47	-92
34	0,78	-17	0,70	9	0,93	-36	1,32	-2	1,56	-103
35	1,11	-65	0,85	-11	1,14	-67	1,40	-9	1,33	-73
36	0,49	28	0,69	10	0,49	28	0,67	48	0,80	-4
37	0,83	-23	0,69	11	0,62	9	1,12	13	1,20	-56
38	1,26	-87	0,82	-7	1,00	-46	1,36	-6	1,13	-47
39	0,81	-21	0,79	-2	0,86	-25	1,42	-10	1,37	-79
40	0,76	-14	0,79	-3	0,72	-5	1,22	5	0,95	-25
41	1,08	-60	0,88	-15	0,49	28	0,84	35	0,43	44
42	1,26	-87	0,55	28	0,41	40	1,02	20	0,55	28
43	0,48	28	0,62	20	0,56	19	1,10	14	1,13	-48
44	0,98	-45	0,82	-6	1,01	-47	1,26	2	1,78	-132
45	0,36	47	0,65	16	0,88	-28	1,19	8	1,01	-32
46	0,52	23	0,54	30	0,29	58	0,89	31	0,57	26
47	0,67	0	0,94	-22	0,94	-37	1,28	0	1,36	-78
48	0,91	-36	0,71	8	1,01	-47	1,39	-8	1,72	-125
49	1,22	-82	0,59	23	0,75	-9	1,59	-24	1,62	-112
50	1,01	-51	0,71	7	0,70	-2	1,27	1	1,48	-94
51	0,84	-25	0,73	5	0,96	-40	1,20	7	1,68	-119
52	0,95	-41	0,78	-1	0,86	-25	1,51	-18	1,76	-129
53	1,18	-75	0,64	17	0,53	23	1,35	-5	1,15	-50
54	0,39	42	0,89	-15	0,91	-33	1,46	-14	1,25	-63
Kontrolle	0,81		0,75		1,06		1,15		1,06	
55	0,53	34	0,65	13	0,38	64	0,46	60	0,42	61
56	0,85	-6	0,81	-8	1,31	-24	1,34	-16	1,30	-23
57	0,65	20	0,87	-16	1,30	-23	0,98	15	1,37	-30
58	0,77	5	0,68	9	0,64	39	0,94	18	0,38	64

59	0,95	-18	0,57	23	0,63	40	0,78	32	0,56	47
60	0,70	13	0,59	21	1,01	4	0,68	41	1,23	-16
61	1,07	-33	0,73	3	1,22	-16	1,14	1	1,54	-46
62	0,72	10	0,72	4	1,09	-3	0,97	15	1,45	-38
63	1,00	-24	0,76	-1	0,46	56	1,24	-8	0,63	40
64	0,82	-1	0,52	31	0,97	9	0,97	15	1,40	-32
65	0,74	8	0,95	-26	0,81	23	1,08	6	0,83	21
66	1,25	-55	0,63	16	1,21	-15	1,26	-10	1,31	-24
67	0,86	-7	0,65	14	0,98	7	0,92	20	1,32	-25
68	0,64	21	0,85	-13	0,96	9	0,82	28	0,85	19
69	0,79	2	0,73	2	1,40	-32	0,93	19	1,18	-11
70	1,03	-27	0,58	23	0,76	28	0,65	44	0,91	14
71	0,68	16	0,59	21	1,05	1	1,02	11	1,11	-5
72	0,66	18	0,69	8	1,30	-23	1,28	-11	1,81	-71
73	0,59	26	0,94	-26	1,24	-18	0,92	20	1,56	-48
74	0,63	21	0,57	24	0,85	20	0,74	36	0,89	16
75	1,21	-50	0,68	10	1,27	-21	1,23	-7	1,67	-58
76	1,24	-54	0,62	18	0,95	10	1,20	-5	1,66	-57
77	0,86	-6	1,00	-34	1,34	-27	1,12	3	1,82	-72
78	0,78	4	0,82	-9	1,11	-5	0,89	23	1,05	0
79	0,30	63	0,22	71	0,35	67	0,32	72	0,64	40
80	0,82	-2	0,62	17	1,00	5	0,98	15	1,22	-15
Kontrolle	0,76		0,84		1,10		1,11		1,03	
81	0,64	16	0,87	-4	1,28	-16	1,08	3	1,50	-46
82	0,56	26	0,72	15	1,35	-22	1,08	3	1,88	-82
83	0,57	25	0,68	19	0,91	17	0,86	22	1,11	-8
84	0,57	25	0,71	16	1,20	-8	0,89	20	1,44	-40
85	0,61	20	0,76	10	1,26	-14	1,06	4	1,60	-55
86	0,43	43	0,64	24	1,16	-5	0,75	33	1,29	-25
87	0,39	49	0,62	26	1,22	-11	0,89	20	1,42	-37
88	0,46	39	0,62	26	0,69	38	0,62	44	0,73	29
89	0,66	13	0,78	8	1,43	-30	1,04	6	1,52	-48
90	0,60	21	0,75	11	1,03	7	0,93	16	1,05	-2
91	0,55	27	0,74	12	1,23	-11	0,88	21	1,26	-23
92	0,32	58	0,62	27	0,95	14	0,80	28	0,85	18
93	0,42	45	0,66	22	0,96	13	0,93	16	0,98	5
94	0,61	20	0,85	-1	1,37	-24	0,94	15	1,36	-32
95	0,48	37	0,56	33	1,06	4	0,93	16	1,29	-25
96	0,45	41	0,52	38	0,98	12	0,73	34	1,03	0
97	0,52	32	0,42	50	0,96	13	0,82	26	1,53	-49
98	0,56	27	0,69	18	1,29	-17	1,28	-15	1,88	-82
99	0,67	12	0,46	45	0,89	20	0,99	11	1,41	-37
100	0,23	70	0,35	58	0,45	60	0,48	57	0,78	25
101	0,61	19	0,81	4	1,24	-12	1,20	-8	1,07	-4
102	0,64	16	0,55	35	1,07	3	1,01	8	1,33	-29
103	0,37	52	0,54	36	1,10	1	0,89	20	1,04	-1
104	0,57	25	0,74	12	1,23	-11	1,19	-8	1,85	-80

Kontrolle	0,70		0,81		0,98		0,84		1,15	
105	0,73	-4	0,52	36	0,97	0	0,86	-2	1,02	11
106	0,35	49	0,73	11	0,84	14	0,87	-4	0,98	15
107	0,50	28	0,84	-4	1,52	-56	0,83	1	1,54	-34
108	0,52	25	0,80	1	1,24	-27	0,99	-18	1,51	-32
109	0,32	54	0,50	39	0,75	23	0,69	18	0,89	22
110	0,50	29	0,86	-5	1,14	-17	1,09	-30	1,28	-11
111	0,59	16	0,94	-16	1,38	-41	1,08	-29	1,66	-45
112	0,54	23	0,62	24	1,37	-41	0,93	-11	1,64	-43
113	0,46	35	0,44	46	0,64	34	0,63	25	0,56	51
114	0,43	39	0,67	18	1,07	-10	0,79	5	1,13	1
115	0,46	35	0,57	30	1,29	-32	0,82	2	0,82	28
116	0,53	24	0,88	-8	1,34	-37	1,15	-37	1,01	12
117	0,22	68	0,59	27	0,45	54	0,58	30	0,33	71
118	0,30	57	0,48	41	1,04	-7	0,85	-2	0,78	32
119	0,35	50	0,65	20	1,24	-27	0,84	0	0,92	20
120	0,42	40	0,42	49	0,53	46	0,66	21	0,88	23
121	0,43	39	0,51	37	0,70	28	0,65	23	0,92	20
122	0,45	36	0,70	14	1,22	-25	0,98	-17	1,17	2
123	0,48	31	0,51	37	1,01	-3	1,14	-36	1,20	-4
124	0,36	49	0,56	32	0,62	37	0,65	23	0,87	24
125	0,35	50	0,84	-3	1,07	-9	0,98	-16	1,38	-20
126	0,13	81	0,49	40	0,34	65	0,59	29	0,26	78
Kontrolle	0,57		0,58		1,30		0,90		1,20	
127	0,50	12	0,46	21	0,42	68	0,60	33	0,75	38
128	0,59	-3	0,45	24	0,69	47	0,76	15	0,56	53
129	0,62	-7	0,54	7	1,14	12	0,81	10	1,22	-2
130	0,27	53	0,21	63	0,54	58	0,18	80	0,24	80
131	0,73	-27	0,68	-16	1,18	9	0,76	16	1,23	-3
132	0,61	-6	0,62	-6	0,92	29	0,58	35	0,81	32
133	0,65	-13	0,60	-2	1,12	14	0,84	7	1,47	-23
134	0,67	-16	0,73	-25	1,14	12	1,22	-35	1,54	-29
135	0,62	-8	0,46	21	0,82	37	0,88	2	0,69	43
136	0,53	7	0,73	-25	0,66	49	0,74	18	0,66	45
137	0,48	17	0,37	36	0,93	28	0,62	31	0,97	19
138	0,65	-13	0,56	5	0,96	26	1,08	-20	1,11	8
139	0,73	-27	0,63	-8	0,87	33	0,84	7	1,11	8
140	0,67	-17	0,50	15	1,07	17	1,04	-15	1,07	11
141	0,51	12	0,42	29	0,40	69	0,55	38	0,27	77
142	0,47	18	0,54	7	0,97	25	0,85	6	1,33	-11
143	0,57	1	0,51	12	0,81	38	1,14	-27	1,28	-6
144	0,53	8	0,57	2	0,94	27	1,27	-41	1,50	-25
145	0,61	-7	0,49	16	0,79	39	0,67	25	0,92	23
146	0,56	2	0,44	25	0,94	28	0,88	2	1,01	15
147	0,71	-23	0,72	-24	1,12	14	1,10	-22	1,58	-32
148	0,81	-41	0,68	-16	1,12	14	1,35	-50	1,51	-26
149	0,68	-18	0,72	-23	1,00	23	1,20	-33	1,68	-40

150	0,63	-10	0,63	-7	0,62	52	0,91	-1	1,86	-55
Kontrolle	0,66		0,64		1,22		0,54		1,13	
151	0,74	-11	0,36	44	0,83	32	0,56	-3	1,42	-26
152	0,83	-24	0,37	42	1,27	-4	0,71	-31	1,56	-38
153	0,47	29	0,36	44	0,75	38	0,45	16	1,12	1
154	0,70	-5	0,42	34	0,73	40	0,61	-12	1,06	6
155	0,66	1	0,44	32	0,61	50	0,40	26	0,74	35
156	0,37	45	0,26	59	0,23	81	0,21	62	0,24	79
157	0,52	22	0,36	44	0,58	53	0,45	18	0,93	17
158	0,72	-9	0,45	30	0,92	25	0,81	-48	1,99	-76
159	0,70	-6	0,36	43	0,76	38	0,41	25	1,76	-56
160	0,56	16	0,36	45	0,57	53	0,49	9	1,04	8
161	0,72	-8	0,37	42	0,88	28	0,62	-14	1,19	-6
162	0,67	-1	0,44	31	0,96	21	0,68	-25	1,13	0
163	0,76	-14	0,38	42	0,82	33	0,62	-15	1,17	-4
164	0,69	-3	0,48	25	0,58	52	0,49	11	1,41	-88
165	0,65	2	0,45	29	0,70	42	0,47	13	1,32	-16
166	0,58	12	0,67	-4	0,64	47	0,44	18	0,78	31
167	0,52	22	0,45	29	0,66	46	0,50	8	1,43	-27
168	0,55	17	0,42	35	0,79	35	0,46	16	1,50	-32
169	0,75	-13	0,40	37	0,72	41	0,59	-8	1,40	-24
170	0,56	16	0,36	44	0,60	51	0,34	37	1,09	4
171	0,68	-3	0,34	47	0,75	39	0,54	1	1,37	-21
172	0,74	-11	0,41	36	0,76	37	0,39	28	1,50	-33
173	0,54	19	0,40	38	0,75	39	0,60	-10	1,27	-13
174	0,55	17	0,37	43	0,52	57	0,50	9	0,97	14
175	0,52	22	0,49	24	0,83	32	0,56	-3	1,39	-23
176	0,68	-2	0,41	37	0,93	24	0,69	-27	1,75	-55
177	0,55	17	0,30	53	0,45	63	0,55	-2	1,02	10
Kontrolle	0,69		0,56		1,43		0,98		1,00	
178	0,77	-12	0,52	7	1,02	29	1,10	-12	1,63	-63
179	0,64	7	0,74	-32	0,95	34	1,17	-18	1,19	-19
180	0,58	17	0,55	1	0,86	40	0,93	6	0,94	6
181	0,47	32	0,71	-28	0,58	60	0,76	23	0,42	58
182	0,47	32	0,56	0	0,92	36	1,15	-16	1,32	-33
183	0,64	8	0,64	-15	0,83	42	1,16	-18	1,49	-49
184	0,71	-2	0,93	-66	1,02	29	1,36	-39	1,44	-44
185	0,54	22	0,56	0	0,49	66	0,61	38	0,76	24
186	0,87	-26	0,51	8	1,22	15	1,33	-35	1,95	-96
187	0,77	-11	0,60	-7	0,82	42	0,95	3	0,98	2
188	0,46	34	0,46	17	0,36	75	0,57	42	0,30	70
189	0,57	18	0,66	-18	0,57	60	1,00	-2	0,52	48
190	0,61	12	0,78	-39	0,59	59	1,10	-11	0,60	40
191	0,67	4	0,69	-25	1,05	27	1,35	-37	0,98	2
192	0,61	11	0,58	-4	0,77	46	1,28	-30	1,06	-6
193	0,69	1	0,64	-14	0,66	54	1,09	-11	0,59	41
194	0,56	19	0,57	-2	0,89	37	1,06	-8	1,26	-26

195	0,58	16	0,44	21	0,87	39	0,99	0	1,36	-36
196	0,62	10	0,52	7	0,83	42	0,96	3	1,52	-52
197	0,44	36	0,45	19	0,99	30	1,05	-7	1,67	-67
198	0,41	41	0,63	-13	0,85	40	0,60	39	0,93	7
199	0,74	-6	0,56	-1	0,63	56	0,90	9	1,14	-15
200	0,70	-1	0,70	-25	1,15	20	1,46	-48	1,49	-49
201	0,67	3	0,69	-24	1,13	21	1,43	-45	1,38	-39
202	0,66	4	0,57	-2	0,82	43	1,15	-17	1,07	-7
203	0,60	13	0,55	1	0,83	42	0,72	27	1,26	-26
Kontrolle	0,61		0,55		1,27		0,94		1,02	
204	0,49	20	0,50	9	0,73	42	1,19	-28	1,31	-28
205	0,41	32	0,54	1	0,60	52	1,16	-24	1,15	-12
206	0,50	19	0,56	-2	0,62	51	1,17	-26	1,41	-38
207	0,40	34	0,58	-5	0,69	46	1,15	-23	1,14	-11
208	0,38	38	0,48	12	0,52	59	1,03	-10	0,79	23
209	0,42	31	0,53	4	0,68	46	1,04	-11	1,03	-1
210	0,91	-50	0,77	-41	0,77	39	1,31	-40	1,35	-32
211	0,71	-17	0,74	-35	0,92	27	1,32	-41	1,74	-70
212	0,50	18	0,61	-11	0,64	49	1,14	-21	1,40	-37
213	0,56	8	0,69	-26	0,50	60	0,78	17	0,68	34
214	0,38	37	0,62	-13	0,60	53	1,16	-24	0,52	49
215	0,53	12	0,77	-41	0,73	42	1,54	-64	1,32	-29
216	0,28	54	0,55	0	0,22	83	0,22	76	0,25	76
217	0,40	34	0,57	-4	0,26	80	0,55	41	0,27	74
218	0,59	3	0,89	-63	1,13	11	1,32	-41	1,57	-54
219	0,40	34	0,73	-33	0,57	55	1,31	-41	1,36	-33
220	0,55	10	0,56	-3	0,69	45	1,19	-27	1,55	-552
221	0,55	9	0,62	-14	0,67	47	1,18	-26	1,47	-44
222	0,66	-8	0,63	-16	1,07	15	1,45	-56	1,75	-72
223	0,62	-1	0,67	-22	0,65	48	1,22	-30	1,44	-41
224	0,49	20	0,58	-5	0,54	57	0,90	4	0,95	7
225	0,60	2	0,93	-69	1,10	13	1,37	-46	1,76	-72
226	0,67	-11	0,86	-57	1,17	8	1,49	-60	1,73	-69
227	0,59	3	0,72	-32	0,78	39	1,45	-56	1,55	-51
Kontrolle	0,50		0,83		0,81		0,87		0,94	
228	0,25	50	0,58	30	0,29	64	0,89	-3	0,68	28
229	0,40	19	0,57	31	0,40	50	1,20	-38	1,07	-14
230	0,53	-6	0,73	12	0,38	53	0,88	-1	0,54	42
231	0,27	47	0,75	10	0,50	38	1,06	-23	1,05	-11
232	0,42	16	0,84	-2	0,91	-13	1,45	-68	1,60	-71
233	0,41	17	0,82	1	0,77	5	1,37	-58	1,65	-76
234	0,18	63	0,40	51	0,23	71	0,36	59	0,41	57
235	0,20	61	0,46	44	0,24	70	0,95	-10	0,58	38
236	0,34	32	0,70	16	0,35	57	1,19	-38	1,03	-9
237	0,26	47	0,77	7	0,32	61	1,20	-38	0,89	5
238	0,46	8	0,83	0	0,33	59	1,45	-67	1,12	-20
239	0,36	27	0,77	7	0,53	35	1,39	-60	0,75	20

240	0,30	40	0,89	-7	0,67	17	1,37	-59	1,29	-37
241	0,51	-2	0,74	11	0,32	60	1,47	-70	1,19	-27
242	0,33	33	0,72	14	0,71	11	1,50	-73	1,27	-36
243	0,34	32	0,68	19	0,59	27	1,21	-40	1,28	-36
244	0,41	18	0,93	-12	0,84	-5	1,35	-57	1,82	-93
245	0,37	25	0,85	-2	0,42	48	1,35	-56	1,49	-59
246	0,41	18	0,52	38	0,39	52	1,12	-29	1,15	-23
247	0,26	49	0,70	16	0,47	42	1,33	-54	1,13	-20
248	0,26	48	0,78	7	0,27	67	1,16	-34	0,36	62
249	0,38	23	0,87	-5	0,80	1	1,55	-79	1,81	-92
250	0,23	54	0,64	23	0,42	48	0,97	-12	0,71	24
251	0,31	37	0,74	11	0,95	-18	1,45	-68	1,54	-64
Kontrolle	0,53		0,64		0,90		1,03		0,92	
252	0,43	18	0,51	21	0,40	55	0,47	54	0,55	40
253	0,60	-13	0,79	-24	1,40	-56	1,22	-19	1,57	-70
254	0,38	27	0,74	-15	0,69	23	0,63	39	0,55	40
255	0,48	10	0,78	-22	0,58	35	0,73	29	0,57	38
256	0,65	-23	0,66	-3	0,80	10	1,22	-18	0,97	-5
257	0,64	-20	0,75	-17	1,14	-28	1,36	-33	1,52	-65
258	0,73	-39	0,72	-12	0,81	9	1,13	-10	1,02	-10
259	0,65	-23	0,67	-4	1,06	-18	1,30	-27	1,17	-27
260	0,72	-37	0,50	23	0,64	28	0,93	9	1,11	-20
261	0,56	-6	0,69	-8	0,54	40	1,00	2	0,86	6
262	0,53	0	0,77	-20	1,11	-24	1,35	-31	1,17	-27
263	0,26	51	0,33	49	0,56	37	0,48	53	0,27	71
264	0,76	-44	0,87	-36	1,05	-17	1,36	-33	0,99	-8
265	0,61	-15	0,68	-6	0,66	27	0,82	20	0,39	57
266	0,84	-60	0,49	23	0,74	18	1,32	-29	0,44	53
267	0,60	-14	0,74	-15	0,95	-6	1,47	-44	1,04	-13
268	0,74	-39	0,61	5	0,69	23	1,46	-42	0,77	17
269	0,67	-27	0,59	9	0,79	12	0,91	11	0,85	8
270	0,53	0	0,59	9	0,95	-6	1,22	-19	1,24	-35
271	0,50	5	0,59	9	1,25	-40	1,33	-29	1,29	-40
272	0,63	-20	0,59	9	0,68	24	0,87	15	0,77	17
273	0,42	20	0,83	-30	0,70	22	1,16	-13	0,72	22
274	0,26	51	0,45	29	0,49	45	0,61	41	0,29	68
275	1,09	-107	0,80	-25	0,79	12	0,92	10	0,71	24
276	0,65	-22	0,58	10	0,97	-8	1,34	-30	1,32	-43
277	0,55	-4	0,54	15	0,94	-5	1,22	-19	1,50	-62
278	0,46	12	0,55	14	0,60	33	0,86	16	0,79	15
Kontrolle	1,07		0,41		0,95		0,65		1,17	
279	1,12	-5	0,38	8	0,54	43	0,52	21	0,41	65
280	1,16	-8	0,50	-21	1,21	-27	1,10	-68	1,42	-22
281	0,99	8	0,39	5	0,76	20	0,56	15	0,89	24
282	0,69	36	0,46	-12	0,57	40	0,77	-17	0,80	31
283	0,92	14	0,58	-42	1,01	-6	1,16	-77	1,40	-20
284	0,70	35	0,81	-97	1,10	-16	1,38	-110	1,65	-41

285	0,92	14	0,85	-107	0,76	20	1,12	-71	1,04	11
286	0,63	41	0,58	-41	0,90	6	0,68	-4	1,37	-17
287	0,56	47	0,55	-34	0,32	67	0,30	55	0,49	58
288	0,73	32	0,35	16	0,82	13	0,91	-38	0,75	36
289	0,85	21	0,57	-39	1,35	-42	1,33	-103	1,20	-3
290	1,05	2	0,61	-48	0,85	11	0,79	-20	0,65	44
291	0,88	18	0,55	-33	0,78	18	0,88	-35	0,55	53
292	1,32	-24	0,90	-118	0,96	-1	0,94	-44	0,81	31
293	1,28	-20	0,91	-121	0,91	4	1,08	-64	0,93	20
294	0,75	30	0,57	-39	0,93	2	1,34	-105	1,14	3
295	1,17	-9	0,63	-53	0,99	-4	1,15	-76	0,93	20
296	0,70	35	0,64	-55	0,67	29	0,97	-48	1,38	-18
297	1,03	4	0,74	-79	1,47	-55	1,57	-140	2,03	-74
298	0,88	18	0,42	-1	0,46	51	0,89	-36	0,91	22
299	1,40	-31	0,54	-31	0,67	30	0,63	4	0,74	37
300	1,11	-4	0,76	-84	0,99	-4	1,14	-74	1,21	-4
301	0,89	17	0,53	-28	0,99	-4	1,13	-72	1,55	-33
302	1,00	6	0,57	-39	0,90	6	1,03	-57	0,94	20
303	1,18	-10	0,60	-44	0,81	15	1,15	-76	1,05	10
304	0,45	58	0,40	2	0,58	39	0,56	15	0,70	40
305	1,17	-9	0,60	-46	0,60	37	0,69	-6	0,78	33
Kontrolle	1,17		0,46		0,77		0,84		1,00	
306	1,02	13	0,48	-3	1,34	-74	1,05	-26	1,45	-45
307	0,70	41	0,42	9	1,19	-54	0,84	-1	0,99	1
308	1,13	4	0,39	17	0,49	36	0,37	56	0,44	56
309	1,10	6	0,54	-17	1,01	-31	0,84	-1	1,15	-16
310	0,89	24	0,43	8	1,08	-40	0,52	37	1,34	-34
311	1,22	-4	0,62	-34	0,89	-16	0,69	18	0,85	15
312	1,15	2	0,48	-4	0,89	-16	0,78	7	1,21	-21
313	0,97	18	0,52	-11	0,70	9	0,64	23	1,09	-9
314	0,48	59	0,42	10	0,53	31	0,52	38	0,71	29
315	0,88	25	0,48	-3	0,82	-6	0,51	39	0,47	53
316	0,94	20	0,42	10	0,61	21	0,57	32	0,35	65
317	1,17	0	0,39	15	0,45	41	0,46	45	0,28	72
318	1,18	0	0,39	16	0,88	-14	0,61	27	0,56	44
319	1,05	10	0,36	22	0,71	7	0,38	54	0,39	61
320	1,20	-2	0,68	-46	0,83	-8	0,67	20	0,75	25
321	1,01	14	0,41	12	0,49	36	0,38	54	0,49	51
322	0,88	25	0,35	25	0,33	57	0,29	65	0,45	55
323	1,06	9	0,54	-17	0,67	13	0,66	20	1,28	-28
324	1,16	1	0,57	-24	1,08	-41	1,06	-26	1,57	-57
325	0,57	51	0,32	30	0,73	6	0,88	-6	0,81	19
326	0,86	27	0,42	9	1,22	-58	1,23	-47	1,63	-63
327	0,95	19	0,53	-14	1,39	-80	1,03	-23	1,36	-36
328	0,84	28	0,38	17	1,09	-42	0,84	-1	1,22	-22
329	0,98	17	0,51	-9	0,99	-29	0,94	-13	1,19	-19
330	0,79	33	0,39	16	0,49	37	0,80	4	0,52	48

331	0,94	20	0,49	-7	0,33	57	0,28	66	0,36	64
332	1,03	12	0,58	-25	1,04	-35	0,82	2	1,38	-38
Kontrolle	1,05		0,40		0,66		0,53		2,38	
333	0,46	56	0,27	31	0,89	-36	0,32	39	1,23	48
334	1,06	-1	0,41	-3	1,10	-68	0,68	-29	2,88	-21
335	1,06	-1	0,43	-8	0,93	-41	0,52	2	1,56	35
336	1,17	-12	0,26	33	1,20	-83	0,54	-2	2,13	11
337	0,84	20	0,27	33	0,71	-8	0,58	-10	1,50	37
338	1,11	-6	0,39	3	1,43	-119	0,62	-16	3,02	-27
339	1,13	-8	0,36	9	0,78	-19	0,54	-2	2,61	-10
340	0,87	17	0,27	31	0,76	-16	0,49	7	2,75	-15
341	0,93	11	0,39	1	0,94	-44	0,78	-46	3,20	-34
342	0,58	44	0,17	56	0,26	60	0,22	58	0,42	82
343	1,07	-2	0,36	10	0,60	8	0,51	4	1,41	41
344	0,88	16	0,30	23	1,17	-79	0,49	8	1,58	34
345	1,06	-1	0,37	7	0,77	-17	0,41	24	0,82	66
346	0,93	11	0,35	12	1,01	-53	0,54	-1	1,99	17
347	1,06	-1	0,37	6	1,48	-126	0,49	8	2,48	-4
348	1,18	-13	0,39	2	1,03	-57	0,59	-11	2,52	-6
349	1,38	-32	0,35	12	0,57	14	0,52	2	1,47	38
350	0,94	10	0,37	6	0,66	-1	0,35	34	2,45	-3
351	1,43	-36	0,50	-27	0,85	-30	0,49	8	2,55	-7
352	0,92	12	0,37	7	1,04	-58	0,64	-20	2,74	-15
353	1,02	2	0,38	4	0,69	-4	0,44	18	1,69	29
354	1,03	1	0,38	3	0,73	-11	0,43	20	2,01	16
355	1,14	-9	0,36	10	0,81	-24	0,44	17	2,20	8
356	0,95	9	0,50	-25	1,39	-113	0,63	-19	3,01	-26
357	1,25	-20	0,41	-4	1,38	-110	0,60	-13	2,96	-24
358	1,26	-20	0,35	11	1,27	-94	0,66	-24	3,19	-34
359	1,04	1	0,24	39	0,67	-2	0,62	-16	1,63	32
Kontrolle	0,93		0,30		0,48		1,29		1,02	
360	0,57	38	0,26	14	0,68	-43	1,15	10	1,02	1
361	1,00	-8	0,42	-39	0,55	-16	1,16	10	0,89	14
362	0,61	34	0,35	-15	0,49	-4	1,23	5	1,23	-20
363	0,60	35	0,25	17	0,21	55	0,83	35	0,37	63
364	0,89	4	0,39	-27	0,69	-45	1,39	-8	1,41	-38
365	0,82	11	0,36	-18	0,40	17	0,99	23	1,23	-20
366	0,56	39	0,22	28	0,56	-17	1,19	8	1,31	-28
367	1,01	-9	0,27	11	0,53	-11	1,11	14	1,16	-13
368	0,42	54	0,26	14	0,46	4	1,16	10	0,90	12
369	0,56	39	0,37	-21	0,41	13	1,13	12	0,71	30
370	0,26	72	0,15	50	0,27	43	0,41	68	0,66	36
371	0,70	24	0,28	10	0,37	23	1,07	17	0,96	6
372	0,82	12	0,29	5	0,21	55	0,79	39	0,54	47
373	0,79	15	0,40	-30	0,47	2	1,29	0	1,10	-8
374	0,37	60	0,14	55	0,25	47	0,34	73	0,62	40
375	0,80	14	0,48	-57	0,36	24	0,92	28	0,90	12

376	0,52	44	0,17	44	0,40	15	0,83	35	0,79	23
377	0,87	6	0,34	-13	0,81	-69	1,40	-9	1,64	-60
378	1,16	-25	0,56	-85	0,82	-73	1,48	-15	1,12	-10
379	0,95	-3	0,21	31	0,24	50	0,95	26	0,40	61
380	1,30	-40	0,75	-146	0,71	-49	1,29	0	0,93	9
381	0,85	9	0,46	-49	0,85	-78	1,41	-9	1,38	-35
382	1,04	-12	0,32	-6	0,28	42	0,80	38	0,56	45
383	1,03	-11	0,30	3	0,26	46	1,06	18	0,51	50
384	0,46	51	0,16	49	0,35	27	0,60	54	0,75	27
385	0,66	29	0,35	-16	0,71	-49	1,46	-13	1,04	-1
386	0,40	56	0,18	41	0,48	-1	0,47	63	0,74	28
Kontrolle	0,37		0,44		0,45		1,34		0,92	
387	0,29	21	0,34	22	0,24	46	0,98	27	0,96	-5
388	0,35	6	0,50	-14	0,28	37	1,13	15	0,84	8
389	0,40	-8	0,60	-36	0,43	4	1,33	1	1,56	-70
390	0,23	38	0,34	22	0,21	53	1,06	21	0,64	30
391	0,42	-13	0,35	20	0,67	-50	1,53	-15	1,68	-84
392	0,33	12	0,44	0	0,23	50	0,94	30	0,66	28
393	0,43	-14	0,40	8	0,75	-67	1,45	-9	1,79	-96
394	0,13	64	0,18	59	0,17	63	0,26	81	0,37	59
395	0,29	23	0,43	1	0,26	43	1,16	13	0,94	-3
396	0,54	-43	0,38	13	0,20	55	0,95	29	0,98	-7
397	0,18	52	0,20	53	0,14	68	0,49	63	0,34	63
398	0,21	45	0,18	59	0,28	37	0,47	65	0,71	22
399	0,46	-24	0,38	13	0,93	-107	1,48	-10	1,58	-73
400	0,46	-24	0,40	8	0,49	-8	1,48	-11	1,61	-76
401	0,40	-8	0,54	-22	0,85	-88	1,49	-11	1,77	-94
402	0,27	28	0,49	-11	0,35	22	0,86	36	1,09	-19
403	0,28	26	0,41	7	0,23	48	0,83	38	0,33	64
404	0,62	-66	0,50	-15	0,27	39	0,85	37	0,69	25
405	0,34	8	0,35	20	0,51	-13	1,24	8	1,40	-52
406	0,24	35	0,27	37	0,17	63	0,47	64	0,45	50

Tab. 8.2. Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Chargen (Ch) des wirkungsstärksten Fermentationsüberstands (F+++)

	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
Alkalische Phosphatase	+	-	+	+
Esterase (C4)	+	+	-	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	-	-
Trypsin	+	+	+	-
Saure Phosphatase	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	-
$\alpha$ -Galactosidase	+	+	-	-
$\beta$ -Galactosidase	+	+	-	-
$\beta$ -Glukosidase	+	-	-	-
N-acetyl- $\beta$ -Glukosaminidase	+	+	-	+
$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-	-
$\alpha$ -Fucosidase	+	+	-	-
<b>Anzahl an Enzymaktivitäten</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

## Danksagung

Prof. Dr. Ursula Obst danke ich für die Übernahme des Gutachtens, die fachlichen Diskussionen und zahlreichen Ratschläge sowie für die Möglichkeit, wissenschaftliche Erfahrungen, auch über das Thema der Dissertation hinaus, zu sammeln.

Prof. Dr. Christoph Syldatk danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates und das Interesse an dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Schwartz danke ich für die herzliche Aufnahme in seine Gruppe und für die fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Mein Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern bei der BASF SE für die Bereitstellung der Fermentationsüberstände.

Besonderer Dank gilt auch Bastian Rapp, Kai Sachsenheimer und Leonardo Pires vom IMT für die Bereitstellung des mikrofluidischen Biofilmreaktors und für die gute Zusammenarbeit.

Ein Dank geht des Weiteren an Pavel Levkin und Junsheng Li vom ITG für die gute Zusammenarbeit bezüglich den PFPE-Oberflächen.

Danke der BioInterfaces International Graduate School für den interdisziplinären Austausch mit anderen Doktoranden.

Ein herzliches Dankeschön richtet sich schließlich an alle Mitarbeiter der Abteilung Mikrobiologie natürlicher und technischer Grenzflächen für die ständige Hilfsbereitschaft und für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor.