

Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Untersuchung der initialen Bakterienadhäsion an selbstanordnenden Monoschichten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Department Chemie

Universität Hamburg

vorgelegt von

Nino Papukashvili

aus Tbilisi

Hamburg 2009

Für Tobi und meine Familie

ვუძღვნი ტობის და ჩემს ოჯახს

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum
von Oktober 2004 bis Oktober 2009
am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie
der Universität Hamburg
im Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Terfort.

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Terfort
Prof. Dr. Peter Heisig

Tag der Disputation: 04.12.2009

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Nino Papukashvili

Danksagung

Ich möchte mich bei allen aufrichtig bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt haben.

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Terfort für eine sehr interessante Aufgabenstellung, angenehme Atmosphäre und für die vielen Freiheiten, die er mir zur Gestaltung der Arbeit gewährt hat. Seine Anregungen und sein Interesse an meinen Ergebnissen waren mir sehr wichtig. Ich danke ihm auch für das Lesen des Manuskripts und die Vorschläge, die dieser Arbeit den letzten Feinschliff gaben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Heck möchte ich für seine Unterstützung danken und dafür, dass er mir ermöglicht hat diese Arbeit in Hamburg in Ruhe zu Ende zu führen.

Durch die Interdisziplinarität meines Forschungsprojekts, das anspruchsvoll aber gleichzeitig auch sehr bereichernd war, habe ich institutsübergreifende Kontakte sehr zu schätzen gelernt.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Peter Heisig aus dem Institut für Pharmazie dafür, dass er uns großzügig ermöglicht hat die technische Ausstattung seiner Laboratorien zu nutzen. Seine Unterstützung bei den mikrobiologischen Fragestellungen war sehr hilfreich und wertvoll. Weiterhin danke ich ihm für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Dietmar Keyser, dem Leiter der Elektronenmikroskopie im Biozentrum Grindel, möchte ich für die Möglichkeit der Nutzung des Rasterelektronenmikroskops und Fluoreszenzmikroskops, Unterstützung bei den technischen Problemen und seine stete Hilfsbereitschaft danken.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, Frau Renate Walter für die REM-Aufnahmen und eine angenehme Zusammenarbeit zu danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Heidi Thomas für AFM Messungen bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung als Stipendiatin des Graduiertenkollegs 611 „Design and Charakterisierung funktionalisierter Materialien“. Als ehemaligem und aktuellem Sprecher des Graduiertenkollegs möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Rehder und Herrn Prof. Dr. Michael Fröba für ihr Interesse und Wohlwollen danken, mit denen sie die Arbeit der Kollegiaten verfolgt haben.

Herrn Prof. Dr. Peter Burger möchte ich für die Einladungen zu Gruppen-Events danken, die das „Alleinsein“ in Hamburg erträglicher machten.

Herzlich möchte ich mich bei den ehemaligen und aktuellen Arbeitskreismitgliedern Dr. Björn Zeysing, Dr. Kevin Raiber, Dr. Jan Müller, Dr. Tobias Winkler, Dr. Birte Jürgens, Dr. Heidi Thomas, Björn Schüpbach, Simone Krakert und Kathrin Barbe bedanken. Die gemeinsame Zeit auch außerhalb des Laboratoriums war sehr bereichernd. Dr. Björn Zeysing danke ich zusätzlich für das Korrekturlesen.

Für eine ausgesprochen nette Atmosphäre danke ich sehr den aktuellen Mitgliedern der Forschungsgruppe von Prof. Heisig: Dr. Anke Heisig, Antje Schnasse, Tatjana Claußen, Sabine Badziong, Jörn Lenz, Birte Arntjen, Franziska Pott, Kristina Bahr, Jing Yuan, Jens Weinberg. Antje möchte ich zusätzlich für ihre große Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken. Ebenso bedanke ich mich bei allen ehemaligen Mitgliedern. Auch die kreativ gestalteten Weihnachtsfeste im Arbeitskreis Heisig werde ich in Erinnerung behalten.

Allen Mitgliedern des Instituts für Anorganische und Angewandte Chemie gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und sehr freundliche Atmosphäre. Die „Feuerzangenbowle- oder „internationalen Abende“ waren immer ein Erlebnis und sorgten für nicht nur wissenschaftlichen Austausch.

Des Weiteren möchte ich mich bei Katrin Brüggemann für ihre stete Hilfsbereitschaft und für das sagenhafte „Pressfest“ an der Nordsee danken.

Technischen und kaufmännischen Mitarbeitern in der Werkstatt, im Lager oder in der Verwaltung möchte ich ganz besonders für ihr kleines oder großes Entgegenkommen danken.

Meinen „EDV-Beratern“ Dr. Christian Fowelin und Michael Schmidt danke ich für ihre Geduld und Hilfe bei den PC-Fragen und das Lachen zwischendurch. Im gemeinsamen AK Heck/AK Terfort Schreibraum AC 506 herrschte doch ein „harmonisches Matriarchat“. An die Gespräche mit Christan über den Uni-Alltag, Gott und die Welt werde ich oft zurückdenken.

Für einen Ausgleich zum Labor sorgten die gemütlichen „Mittagssitzungen“ mit Marina, Sabrina und Katharina.

Unseren lieben Praktikantinnen und Praktikanten, Ariane Munk, Inga Rühl, Franziska Huß, Michael Sartor möchte ich für ihre Motivation und interessierte Mitarbeit bedanken. Franziska möchte ich zusätzlich für ihre Fleißarbeit als studentische Hilfskraft beim Fluoreszenzmikroskop sowie bei der Auswertung der Aufnahmen danken.

Vielen lieben Dank an Tobi für seine unendliche Geduld, sein Verständnis, für sorgfältiges Korrekturlesen meiner Arbeit und dafür, dass er meine „Schreibphase“ unterstützend mitgetragen hat. Es war hilfreich, dass wir über Jahre den Doktorandenalltag miteinander geteilt haben. Ohne ihn hätte ich die Zeit nicht überstanden.

Tiefen Dank schulde ich der Familie von Dr. Hayo Faerber dafür, dass sie seit meiner Ankunft in Hamburg auf allen erdenklichen Ebenen mir zur Seite gestanden hat und möglich gemacht hat diesen Weg zu gehen.

Durch die Worte kann nur bedingt ausgedrückt werden, was meine liebe Familie, die mich durch den mühsamen, langen Weg mit großem Beistand begleitet hat und es schaffte, auch aus der Ferne Georgiens mich mit Wärme und Liebe zu verwöhnen, an Dank verdient. Sie sind für mich etwas Besonderes.

Ich danke auch meinen lieben Freunden in Georgien oder verteilt durch die ganze Welt für viele Skype-Gespräche, die über die Krisen des Laboralltags hinweghalfen.

God made solids, but surfaces were the work of the devil.

Wolfgang Pauli

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Konzepte zur Bekämpfung von Biofilmen	2
1.2 Selbstanordnende Monoschichten	7
1.2.1 Thiolat-SAMs auf Gold	9
1.2.2 Siloxan-SAMs	13
1.2.3 Phosphonat-SAMs	14
1.3 Oberflächen in aquatischen und biologischen Medien	15
1.3.1 Biofilme: historische Perspektive, Vorkommen	19
1.3.1.1 Entstehung und Dynamik von Biofilmen	21
1.3.1.2 Biofilme aus ökologischer Sicht	25
1.3.1.3 Biofilme in Industrie und Technik	26
1.3.1.4 Biofilme in der Medizin	28
1.3.2 Bakterienadhäsion	33
1.3.2.1 Bakterienadhäsion beeinflussende Faktoren	41
1.3.2.1.1 Oberfläche	42
1.3.2.1.2 Umgebung/Medium	43
1.3.2.1.3 Eigenschaften der bakteriellen Oberfläche (Zellwand)	44
1.3.3 Biorepulsive Monoschichten	46
1.3.4 Ursachen für Biorepulsivität	49
1.3.5 Bakterien	53
1.3.5.1 Die bakterielle Zellwand	54
1.3.5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> (<i>S. epidermidis</i>)	58
1.3.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	59
1.3.5.4 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	60
1.3.5.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	61
2 Aufgabenstellung	63
3 Methoden	66
3.1 Elektronenstrahlverdampfung zur Herstellung von Goldsubstraten	66

3.2 Oberflächencharakterisierung	67
3.2.1 Kontaktwinkelmessung	67
3.3 Untersuchung der Bakterienadhäsion	69
3.3.1 Epifluoreszenzmikroskopie	71
3.3.2 Plattenzählmethode	73
3.3.3 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	74
4 Ergebnisse	78
4.1 Methodenentwicklung	78
4.1.1 Wachstum der Testorganismen	80
4.1.1.1 Wachstumskurve <i>E. coli</i> WT	81
4.1.1.2 Wachstumskurve <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	82
4.1.1.3 Wachstumskurve <i>S. aureus</i> ATCC 6538	82
4.1.1.4 Wachstumskurve <i>P. aeruginosa</i> PAO	83
4.1.2 Konzentration der Inkubationssuspension	84
4.1.3 Vorversuche mit <i>E. coli</i> WT	85
4.1.4 Vorversuche mit <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	94
4.2 Fazit Vorversuche - Konzeptfindung	99
4.3 Oligoethylenglycol-terminierte Monoschichten auf Gold	103
4.3.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen an den Heptaethylen-glycol-terminierten SAMs	103
4.3.1.1 Adhäsion von <i>E.coli</i> WT	104
4.3.1.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	107
4.3.1.3 Adhäsion von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	110
4.3.1.4 Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> PAO	112
4.3.2 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf EG ₇ OH-terminierte SAMs	116
4.4 Polyglycerol-terminierte Monoschichten auf Gold	120
4.4.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D1(SAc)	125
4.4.1.1 Adhäsion von <i>E. coli</i> WT	125
4.4.1.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	128
4.4.1.3 Adhäsion von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	134
4.4.1.4 Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> PAO	136
4.4.2 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D2(SAc)	139
4.4.2.1 Adhäsion von <i>E.coli</i> WT	139

4.4.2.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	141
4.4.2.3 Adhäsion von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	144
4.4.2.4 Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> PAO	145
4.4.3 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D3(SAc)	147
4.4.3.1 Adhäsion von <i>E.coli</i> WT	147
4.4.3.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	148
4.4.3.3 Adhäsion von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	152
4.4.3.4 Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> PAO	154
4.4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf den SAMs der Klassen D1(SAc), D2(SAc) und D3(SAc)	155
4.5 SPR-spektroskopische Untersuchung der Bakterienadhäsion	167
4.6 Oligoethylenglycol-terminierte Monoschichten auf Stahl und Aluminium	176
4.6.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der PEGmonomethylether-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium	181
4.6.1.1 Adhäsion von <i>E. coli</i> WT	181
4.6.1.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	185
4.6.2 Bakterienadhäsionsuntersuchungen an den PEGmonomethylether-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium	189
4.6.2.1 Adhäsion von <i>E. coli</i> WT	190
4.6.2.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	194
4.7 Polyglycerol-terminierte Monoschichten auf Stahl und Aluminium	196
4.7.1 Adhäsion von <i>E. coli</i> WT	197
4.7.2 Adhäsion von <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	199
4.8 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf den Phosphonat- und Thiophosphonat- SAMs auf Stahl und Aluminium	201
4.9 Ermittlung des wachstumshemmenden Potenzials der schichtbildenden Substanzen	207
4.9.1 Ermittlung der MHK-Werte für <i>E. coli</i> WT	208
4.9.2 Ermittlung der MHK-Werte für <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	210
4.9.3 Ermittlung der MHK-Werte für <i>S.aureus</i> ATCC 6538	211
4.9.4 Ermittlung der MHK-Werte für <i>P. aeruginosa</i> PAO	212
5 Zusammenfassender Vergleich der Methoden	215
6 Experimenteller Teil	218

6.1	Verwendete Lösemittel	218
6.2	Verwendete Messgeräte und Verbrauchsmaterialien	218
6.3	Puffer und Nährmedien	220
6.4	Verwendete Substrate	221
6.5	Verwendete schichtbildende Moleküle	222
6.6	Herstellung der Goldsubstrate	224
6.7	Reinigung der Goldsubstrate	224
6.8	Protokoll für die Präparation von SAMs auf Gold	225
6.9	Reinigung der Stahl und Aluminiumsubstrate	226
6.10	Protokoll für die Erzeugung von SAMs auf Stahl und Aluminium ³⁸²	226
6.11	Verwendete Testorganismen	227
6.12	Dauerhafte Lagerung der Testorganismen	228
6.13	Plattenkulturen der Testorganismen	229
6.14	Aufnahme der Wachstumskurven der Testorganismen	230
6.15	Übernachtskultur, Wachstums- und Kultivierungsbedingungen vor der Adhäsion	230
6.16	Bestimmung der Lebendkeimzahl der Testsuspension	231
6.17	Adhäsionsprotokoll <i>P. aeruginosa</i> ³⁴⁵	232
6.18	Adhäsionsprotokoll für <i>E. coli</i> ³⁴⁴	233
6.19	Adhäsionsprotokoll für <i>S. epidermidis</i> ³⁴⁴ (Statisches Adhäsionsassay)	234
6.20	Protokoll der SPR-Messung	235
6.21	Protokoll für die Anfärbung von Zellen mit DAPI	236
6.22	Mikroskopieprotokoll	237
6.23	Quantitative Bildanalyse mittels der Software <i>ImageJ</i>	237
6.24	Probenvorbereitung für die REM-Untersuchung	239
6.25	Protokoll zur Bestimmung minimaler Hemmkonzentration (MHK)	240
6.26	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)	241

7 Zusammenfassung	242
8 Summary	246
9 Sicherheit	250
9.1 Entsorgung des chemischen Abfalls	250
9.2 Entsorgung des mikrobiologischen Abfalls	251
10 Literatur	252

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
DNA	<i>Desoxy Ribonucleic Acid</i>
EG	Ethylenglycol-Einheit
EtOH	Ethanol
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
µL	Mikroliter
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MHK	Minimale Hemmkonzentration
nm	Nanometer
OD ₅₅₀	Optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 550 nm
OEG	Oligoethylenglycol
PG	Polyglycerol
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	<i>rotation per minute</i>
SAc	Thioacetylgruppe
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance (Spectroscopy)</i>
TSB	<i>Trypton Soja Boullion</i>

1 Einleitung

Bakterien stellen die erfolgreichste Lebensform der Erde bezüglich der totalen Biomasse und der Vielfalt kolonisierter Habitate dar. Der entscheidende Grund für diesen Erfolg ist die hohe phänotypische Plastizität.¹ Diese Eigenschaft befähigt Bakterien, ihren Lebensmodus als Antwort auf Umweltreize zu ändern. Diese Anpassungsfähigkeit beruht vor allem darauf, dass Bakterien zwei verschiedene Lebensweisen haben. Im planktonischen Zustand schweben die Zellen frei in einer Suspension. Bei der Kolonisierung einer festen Oberfläche hingegen spricht man von einem Biofilm.

Die Biofilme stellen die erste und älteste Lebensform auf diesem Planeten dar, in der Bakterien ein großes Überlebenspotenzial durch Selektion entwickelt haben. Biofilme sind in der Natur weit verbreitet. Sie sind an den globalen Kreisläufen essentieller Elemente wie Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor beteiligt und spielen eine zentrale Rolle in den Selbstreinigungsprozessen der Natur. Allerdings bereiten Biofilme auch große Schwierigkeiten. In fast jedem Bereich der menschlichen Existenz wachsen unerwünschte Biofilme. Biofilme können auf einer Oberfläche eines Feststoffs, in einer Flüssigkeit als Flocken oder als Pellikula (Häutchen) auf Gas-Flüssigkeit-Grenzflächen existieren.² Sie besiedeln Schiffshüllen und Meereseinrichtungen, Wärmetauscherflaschen in Kraftwerken, Werkstoffe, Frisch- oder Abwasserleitungen, Transport- und Lagerungssysteme, Membranen in der Wasseraufreinigung und andere technische Anlagen, sowie medizinische Implantate. Durch die Biofilme in industriellen und klinischen Umgebungen leiden und sterben Patienten und es entstehen jährliche Verluste durch längere Krankenhausaufenthalte, Materialzerstörung, Pipelineausfälle usw. in Milliardenhöhe.

Aufgrund der Vielzahl der Prozesse, die durch die Biofilme beeinträchtigt werden, ist das Verständnis der Biofilmbildung und deren Vermeidung von höchster Bedeutung. Da es kein allgemein gültiges Rezept zur Vermeidung der Biofilmbildung gibt, muss jede Spezies individuell bekämpft werden. Laut *Davies* steckt die Forschung jedoch noch im finsternen Mittelalter, wenn es darum geht, Bakterien zu verstehen und zu kontrollieren.³

1 Einleitung

Während die etablierten Techniken die ausgereiften Biofilme mit dem Einsatz von Bioziden bekämpfen, setzt sich zunehmend ein neuer Lösungsansatz durch, der auf der so genannten Biorepulsion basiert. Die Idee ist, die Oberflächen vor Biofilmen zu schützen bzw. die Biofilme erst gar nicht entstehen zu lassen, indem die Oberflächen durch chemische oder physikalische Modifizierung für Bakterien unbesiedelbar gemacht werden. Unterschiedliche Techniken, wie physikalische Adsorption sowie direkte chemische Bindung werden für die Oberflächenmodifizierung angewendet. Am häufigsten werden Oberflächeneigenschaften gezielt durch Erzeugung von selbstanordnenden Monoschichten (**Self-Assembled Monolayers**, SAMs) verändert.⁴ Dabei ordnen sich die gewählten Moleküle beim Eintauchen eines Substratmaterials in eine Lösung des jeweiligen Moleküls spontan als eine monomolekulare Schicht an der Oberfläche an. SAMs sind sehr gut für fundamentale Studien geeignet, da durch die Selbstorganisation die Oberflächeneigenschaften maßgeschneidert verändert werden können. Physikalisch-chemische Eigenschaften der resultierenden Oberfläche, wie Hydrophobizität oder Oberflächenspannung, werden durch die exponierten Molekülteile bestimmt.⁵ Diese Veränderung hat Konsequenzen bezüglich des Verhaltens der Oberfläche gegenüber Biomolekülen, wie Proteinen und Bakterien,⁵ die unter anderem auch Proteinstrukturen bei der Adhäsion an Oberflächen nutzen. Demzufolge bietet der Einsatz von SAMs die Möglichkeit, durch geeignete Wahl der schichtbildenden Moleküle das Adhäsionsverhalten gezielt zu verändern. Zudem lassen sich neue Erkenntnisse über die hochkomplexen Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Oberflächen gewinnen, um letztendlich die Oberflächen in den betroffenen Bereichen vor Biofilmbildung zu schützen. Diese Strategie ist umweltschonend, kostengünstig und somit eines der Zukunftskonzepte.

1.1 Konzepte zur Bekämpfung von Biofilmen

Biofilmforschung erfolgt in chemische, physikalische und mikrobiologische Richtungen. Das Forschungsobjekt ist so komplex und interdisziplinär, dass eine Zusammenarbeit unterschiedlicher Felder wie Mikrobiologie, Chemie, Biochemie und Materialkunde notwendig ist.⁶ Daher steht bei der Biofilmkontrolle die Erforschung von bakteriellen Eigenschaften, wie beispielsweise die Aufklärung der spezifischen Genexpression im Biofilm, physikalisch-chemischer Parameter, die die Zell-

1 Einleitung

Oberflächen-Wechselwirkung und damit letztlich den Biofilmbildungsprozeß beeinflussen, im Vordergrund.

Es gibt drei grundsätzliche Strategien zur Bekämpfung von Biofilmen:

1. Physikalische Reinigungsstrategien: thermische Behandlung, UV-Strahlung, mechanische Entfernung von Biofilmen,
2. Chemische Reinigungsstrategien: Abtöten der Biofilm-bildenden Mikroorganismen mit Antibiotika oder Bioziden;
3. Prävention durch *Surface Engineering*: Erzeugung von antimikrobiellen *non-fouling* oder biorepulsiven Oberflächen durch Oberflächenmodifizierung.

Bis vor kurzem war die Bekämpfung von Biofilmen auf die Tötung der Mikroorganismen mit toxischen Stoffen und/oder die mechanische Entfernung limitiert.⁷

Physikalische Reinigungsmethoden, wie Hochdruckreiniger oder flexible Bürsten wenden mechanische Kraft an. Die mechanische Reinigung bakteriell besiedelter Oberflächen gelingt aber oft aufgrund der schweren Zugänglichkeit vieler Biofilme nur unvollständig. Hinzu kommt, dass die Bakterien durch selbst produzierte Polysaccharide sehr stark an den Oberflächen haften. Untersuchungen an dem Gramnegativen, in Wasserquellen vorkommendem Bakterium *Caulobacter crescentus* haben gezeigt, dass jedes einzelnes Bakterium mit einer Kraft von über 68 N/mm^2 am Untergrund haftet. Das ist beachtlich, wenn man berücksichtigt, dass die Haftkraft eines kommerziellen Sekundenklebers zwischen 18 und 28 N/mm^2 liegt.⁸

In der medizinischen Praxis wird oft Ultraschall eingesetzt, um der Bildung von Biofilmen entgegen zu wirken. In Wärmetauschern kann durch den vorsorglichen Einbau von Ultraschall-Schwingern die Entstehung von Biofilmen verringert werden. In einigen Versuchen wurde allerdings gezeigt, dass die Zellen die Beschallung ungeschadet überstehen können. Die Angaben von Expositionszeit, Leistung und Frequenz reichen nicht aus, da das Schallfeld inhomogen ist. D. h., dass die Probe je nach Platzierung eine unterschiedliche Schallintensität erfährt. Bei einer Ultraschallbehandlung zur Entfernung von Biofilmen muss allerdings auch die Stabilität der betroffenen Materialien gegenüber Ultraschall sichergestellt werden.⁹ Zur Sterilisierung von Oberflächen wird auch UV-Licht eingesetzt. UV-Licht verändert bakterielle DNS. Wird die Zelle jedoch nicht letal geschädigt, erfolgen molekulare Reparaturmechanismen und das Bakterium erholt sich. Vermutlich ist UV-Strahlung aber unwirk-

1 Einleitung

sam gegen bereits etablierte Biofilme. Im Rahmen eines Forschungsprojekts zur Desinfektion von Abwassern mittels UV-Licht wurde festgestellt, dass sich lebensfähige Biofilme auf der Oberfläche des Quarz-Schutzglases der UV-Lampe bilden können.⁹ Anscheinend ermöglicht die Biofilmstruktur bzw. Biofilmmatrix den Schutz gegen UV-Strahlung. Es gibt Ansätze, durch die Anwendung vom elektrischen Strom die Biofilme auf chirurgischen Edelstahl zum Ablösen zu stimulieren.¹⁰

Im Rahmen der chemischen Bekämpfung von Biofilmen werden Biozide angewendet. Biozide sind Stoffe oder Zubereitungen, die Lebewesen, beispielsweise Mikroorganismen, abtöten oder zumindest stark in ihrer Lebensfunktion einschränken. Allgemein unterscheidet man zwischen oxidierenden (Chlor, Ozon, Chlordioxid) und nicht-oxidierenden (quartäre Ammoniumsalze) Bioziden.⁹ Dabei ist das Ziel die Unterdrückung des *Biofouling*, also der unerwünschten unspezifischen Ansammlung vom biologischen Material. Allerdings zeigt die Erfahrung, dass die Anwendung von Bioziden viele Nachteile hat und nicht als dauerhafte Lösung des Biofilmproblems geeignet ist. Bevor überhaupt die Biozide zum Einsatz kommen, müssen die Biofilme im technischen System zunächst nachgewiesen werden. Diese werden meistens nur indirekt, an Betriebsparametern, wie Druckverlust, Wirkungsgrad etc., erkannt. Proben aus dem *bulk*-Material geben keine Information darüber, wo sich ein Biofilm befindet und welche Organismen darin wachsen.⁹ Ist die Stelle identifiziert, müssen für die Wahl und Dosierung der Biozide Oberflächenproben genommen werden. Dafür müssen die Proben bzw. Biofilme analysiert werden. Für die Wahl der Biozide ist es notwendig zu wissen, welche Organismen man überhaupt töten möchte. Erst nach diesen nicht unproblematischen und aufwendigen Schritten können geeignete Biozide eingesetzt werden.

Der Erfolg dieser Strategie ist durch die deutlich erhöhte Resistenz der Biofilmbakterien gegenüber Antibiotika und Bioziden limitiert. Aus mehreren Untersuchungen ist bekannt, dass um ein bis zwei Größenordnungen höhere Biozid-Konzentrationen und längere Expositionszeiten benötigt werden, um eine Abtötung der Biofilmbakterien im Vergleich zu planktonischen Bakterien zu erreichen.¹¹ Verantwortlich hierfür sind möglicherweise unterschiedliche Mechanismen, welche die Organismen im Basisfilm vor toxischen Stoffen schützen. Wenn einige Organismen die Behandlung überleben, regeneriert sich der Biofilm innerhalb von wenigen Tagen. Aber auch wenn alle Organismen absterben, dient die tote Biomasse oft als Nährsubstrat für „Nachsiedler“.

1 Einleitung

Da technische Anlagen nicht steril gehalten werden können, müssen immer Maßnahmen gegen ein weiteres Biofilmwachstum getroffen werden. Dies erfordert eine exzessive Verwendung von Bioziden, die vermehrt in die Umwelt gelangen und dort die Resistenzbildung der Mikroorganismen stetig fördern.

Eine Strategie, den Biozideintrag in die Umwelt zu reduzieren, besteht im Einsatz so genannter antimikrobieller Oberflächen. Bei antimikrobiellen Oberflächen unterscheidet man zwischen so genannten Freisetzungssystemen und kontaktaktiven antimikrobiellen Oberflächen. Bei kommerziell verfügbaren Freisetzungssystemen handelt es sich um Materialien, die mit Bioziden, wie Silberionen,¹² quartären Ammoniumverbindungen,¹³ Chlor¹⁴ und diversen anderen antimikrobiell wirksamen Stoffen imprägniert sind. Jedoch werden auch beim Einsatz dieser Oberflächenmodifikationen toxische Stoffe in die Umwelt entlassen, wenn auch in deutlich geringerem Umfang als bei den herkömmlichen Systemen. Beispielsweise gibt es Katheterbeschichtungen, die permanent Silberionen abgeben.¹⁵ Wesentlich effizienter sind die kontaktaktiven antimikrobiellen Oberflächen, die ihre Wirkung selektiv entfalten und keine Wirkstoffe in die Umgebung abgeben. Diese Beschichtungen halten Materialien steril, indem sie die Mikroben beim Kontakt abtöten, ohne Biozide in die Umgebung freizusetzen. Auf unterschiedlichen Materialien, wie Glas, Cellulose und Kunststoffen kann man kontaktaktive Oberflächen durch chemisches Aufpfropfen von antimikrobiellen Polymeren erzeugen.¹⁶ Der Nachteil ist allerdings, dass für die Präparation kontaktaktiver Oberflächen sehr aufwendige Methoden und organische Lösemittel erforderlich sind. Außerdem tritt in diesem Fall auch die Problematik der Resistenzentwicklungen auf. Zusätzlich ist es notwendig, dass tote Biomasse gründlich mechanisch entfernt wird, da sonst, ähnlich wie bei der konventionellen Anwendung der Biozide, Nachsiedler auf der Biomasse wachsen. Auch die Langzeitaktivität dieser Systeme ist nicht vollständig geklärt.

Zusammenfassend lässt sich für die Biozide sagen, dass es aufgrund der strukturellen Komplexität und der mikrobiologischen Diversität schwierig bleibt, ausgereifte Biofilme zu bekämpfen. Daher sind die Desinfektionsmaßnahmen nur von örtlich und zeitlich begrenzter Wirksamkeit und Dauer. Zusätzlich ist die Biozidanwendung sowohl aus ökologischer als auch ökonomischer Sicht nachteilig.

Während die ersten zwei Ansätze auf der Abtötung von Bakterien bzw. Biofilmen basieren, baut die dritte Strategie auf die Prävention, d. h. der Vermeidung der Biofilmbildung. Diese wäre vermeidbar, wenn Materialoberflächen so verändert

1 Einleitung

werden, dass Bakterien nicht mehr daran haften könnten. Während die antimikrobiellen Oberflächen Zellen abtöten, wirken die so genannten *non-fouling* oder biorepulsiven Oberflächen bakterienabweisend und erschweren oder unterbinden im Idealfall die Bakterienadhäsion, die den ersten Schritt der Biofilmbildung darstellt. Die Vorteile dieser Methode sind: Umweltfreundlichkeit (keine Freisetzung giftiger Stoffe), hohe Effizienz (nur geringe Mengen der Substanzen werden benötigt), sowie kein zusätzlicher Selektionsdruck auf Bakterien (Resistenzentwicklung wird nicht beschleunigt). Der Hauptvorteil dieser Methode bleibt jedoch die Tatsache, dass sie darauf basiert, die Biofilmbildung zu verhindern und somit einen nachhaltigen Schutz vor dem Bewuchs auf den Oberflächen zu bieten. Unter den SAM-basierten Systemen dieser Klasse sind ethylenglycolterminierte Thiolate auf Gold¹⁷, sowie ethylenglycolterminierte Alkylsiloxan-SAMs auf Silicium¹⁸ und Glas¹⁹ für ihre biorepulsive Aktivität bekannt. Biorepulsive SAMs eignen sich sehr gut für die Biofilmkontrolle sowie grundlegende Untersuchungen, da sie mit guter Reproduzierbarkeit und sehr einfach aus kostengünstigen Reagenzien präpariert werden können. Ein entscheidender Pluspunkt der SAMs ist jedoch die Tatsache, dass durch diese Technik Grenzflächen generiert werden können, die erlauben, die dynamischen Lebensprozesse in kleiner Dimension zu studieren.

Abb. 1 fasst die unterschiedlichen Interaktionsmöglichkeiten zwischen Bakterien und Oberflächen zusammen. Im Vergleich zu einer unmodifizierten Oberfläche bietet eine mit bioziden Substanzen ausgestattete Oberfläche zwar einen Schutz der Oberfläche, allerdings ist der Schutz nicht nachhaltig. Im Gegensatz dazu ermöglicht eine Funktionalisierung der Oberfläche mit biorepulsiven Substanzen eine steuerbare Verminderung der Interaktion zwischen Bakterien und Oberflächen.

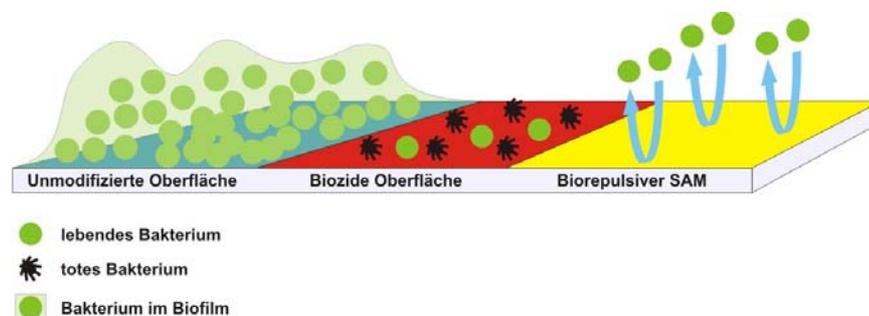


Abb. 1: Gegenüberstellung der vorgestellten Konzepte gegen Biofilmbildung.

Neben den aufgezählten Systemen gibt es noch multifunktionelle sterile Oberflächen, welche die Wirkungsweisen mehrere Methoden vereinen:

1. Freisetzungssysteme auf Basis von Silbernanopartikeln in einem Netzwerk aus biorepulsivem Polyethylenglykol (PEG). Diese Oberflächen stoßen *S. aureus* ab und töten sie dabei.²⁰
2. Die Kombination aus Freisetzungssystemen basierend auf Chlor und *N*-Halogenaminen mit kontaktaktiven Beschichtungen aus quartären Ammoniumgruppen. Diese Oberflächen töten Bakterien sowohl durch die Freisetzung, als auch bei Kontakt mit der Oberfläche.²¹

1.2 Selbstanordnende Monoschichten

Selbstorganisation stellt ein fundamentales Prinzip für die Funktion komplexer biologischer Systeme dar. Zahlreiche Phänomene in der Natur basieren auf Selbstorganisation. Die biologische Membran, die die Grenzen von individuellen Zellen definiert, ist ein Beispiel dafür. Dabei organisieren sich Lipide, die das Gerüst aller biologischen Membranen bilden, in lamellaren Strukturen, sogenannten Doppelschichten. Dem Prinzip der Selbstorganisation auf der molekularen Ebene liegt die Kombination zweier DNS-Einzelstränge zur DNS-Doppelhelix zugrunde. Dieses aus der biologischen Welt bekannte Phänomen gewinnt zunehmend auch für die Materialwissenschaften an Bedeutung und ist ein integraler Bestandteil der Produktion funktionalisierter Materialien.²² Durch den Einsatz der Selbstorganisation und Strukturbildung bei der Oberflächenmodifizierung erhoffen sich die Materialforscher nützliche Erkenntnisse über den Ablauf von chemischen, physikalischen und biologischen Prozessen.

Der Bildung selbstanordnender Monoschichten liegt auch das Prinzip der Selbstorganisation zu Grunde. 1946 publizierten *Bigelow et al.* als erste die Präparation von monomolekularen Schichten, als sie beobachteten, dass Alkylamine spontan eine geordnete Schicht auf Platin bilden.²³

Die Entstehung einer selbstanordnenden Monoschicht stellt einen Adsorptionsprozess dar, in dem die zu adsorbierenden Teilchen (Adsorbat) unter Ausbildung einer kovalent gebundenen Monolage auf einer Oberfläche (Adsorbens oder Substrat) chemisorbiert werden. (Abb. 2.).

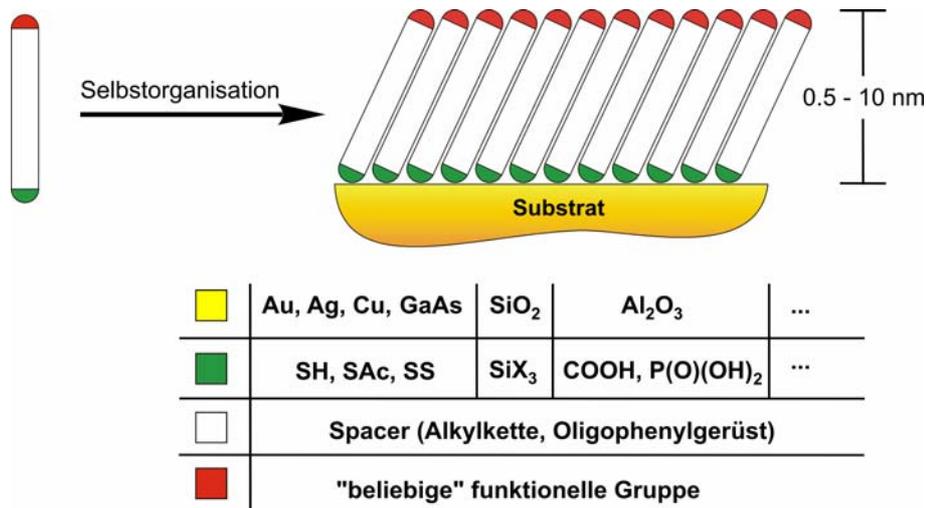


Abb. 2: SAM-Bildung auf verschiedenen Materialien.

Dabei bildet sich spontan eine dicht gepackte, hoch orientierte Schicht. Die Dicke der resultierenden Schicht entspricht in etwa der Länge eines einzigen Moleküls und variiert innerhalb eines Bereichs von mehreren Nanometern. Eine Besonderheit von Molekülen in einer Monoschicht ist, dass sie sich in ihren Eigenschaften zum Teil erheblich von denen, die sie im *bulk*-Material besitzen, unterscheiden.²⁴

Die für die SAM-Bildung eingesetzten Moleküle müssen über drei Funktionalitäten verfügen: Kopfgruppe, *Spacer* und Ankergruppe. Während die Ankergruppe mit dem Substrat interagiert und für die Anbindung an die Oberfläche sorgt, ist der *Spacer* für die Orientierung und mechanische Stabilität der Monoschicht verantwortlich. Chemische und physikalische Eigenschaften, wie Polarität und Reaktivität, des SAMs bzw. der modifizierten Grenzfläche werden durch die Kopfgruppen bestimmt. SAMs können auf unterschiedlichen Substrattypen mit geeignet funktionalisierten Adsorbatmolekülen präpariert werden.

Aus der Abb. 2 wird ersichtlich, dass durch Variation der Substrat/Adsorbat-Kombination eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme realisierbar ist. Alkanthiole eignen sich beispielsweise zur Schichtbildung auf Gold oder Silber,⁵ wogegen die Trichlorsilyl-Ankergruppe die Anbindung der Adsorbate auf oxidischen Oberflächen ermöglicht und daher auch SAMs auf technisch relevanten Materialien wie Stahl,²⁵ Glas²⁶ und Siliziumdioxid²⁷ erzeugt werden können. Zur Anbindung auf oxidischen Oberflächen eignen sich auch Alkylphosphonsäuren.^{28,29} Die Wahl der Kopfgruppe ist sehr mannigfaltig und nahezu jede Funktionalität, wie beispielsweise CH₃, OH,

NH₂, CF₃ oder COOH ist denkbar. Daher sind die Einsatzmöglichkeiten von SAMs sehr vielfältig und reichen von Korrosionsschutz über Nanotechnologie³⁰ und Mikroelektronik³¹ bis zur Biofilmprävention³² und Biosensorik³³. Zum Beispiel behindert eine hydrophobe Kopfgruppe den Wasserdurchtritt zu Metalloberflächen und hemmt somit die Sauerstoffreduktion, die nur in Gegenwart von Wasser stattfindet. Diese Oberflächeneigenschaft ist im Korrosionsschutz erwünscht.

1.2.1 Thiolat-SAMs auf Gold

Das bekannteste und am besten untersuchte System sind Alkanthiolat-SAMs auf Gold(111)-Oberflächen.³⁴⁻³⁶ Gold ist das Standard-Substrat, obwohl es für viele Anwendungen aufgrund des hohen Preises kaum in Frage kommt. Einer der wichtigsten Gründe für seine Verwendung ist, dass sich auf Gold hochgeordnete SAMs bilden. Die Inertheit des Materials, durch die die ungewollte Oxidation durch Luftsauerstoff oder Adsorption von Stoffen aus der Umgebungsluft verhindert werden, stellt einen weiteren Vorteil dar. Diese Eigenschaft ermöglicht die Handhabung der Proben unter atmosphärischen Bedingungen anstatt z. B. im Ultrahochvakuum. Gold zeigt zu Thiolen eine hohe Affinität³⁴ und geht mit ihnen keine ungewöhnlichen Reaktionen ein.⁵ Die Schichtbildungsprozesse auf Goldsubstraten können mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden, wie Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, (*Surface Plasmon Resonance*, SPR), Quarzkristall-Mikrowaagen (*Quartz Crystal Microbalance*, QCM) und Ellipsometrie charakterisiert werden.

Die inerten Eigenschaften des Goldes sind insbesondere nützlich für die Anwendung von Thiolat-SAMs auf Gold als Grenzflächen für zellbiologische Studien. Gold ist kompatibel mit Zellen, d. h. die Zellen können auf Goldsubstrate adhären und erleiden keine toxischen Einflüsse.⁵

Der Herstellungsprozess der SAMs auf Gold ist außerordentlich einfach. Der SAM kann durch Abscheidung der schichtbildenden Moleküle aus der Gasphase gebildet werden. Häufiger werden die Monoschichten allerdings erzeugt, indem das gereinigte Substrat für ~12-18 h bei Raumtemperatur in eine Lösung (~1-10 mM) des betreffenden Adsorbats in einem geeigneten Lösemittel belassen wird. Dieses Protokoll stammt aus den früheren Studien über die Optimierung der Reproduzierbarkeit der SAM-Bildung.³⁶

1 Einleitung

Die Reaktionsgleichung der Bildung eines Alkanthiolat-SAMs zeigt, dass sich unter Abspaltung von molekularem Wasserstoff eine stabile Gold-Thiolat-Monolage bildet.³⁷



Das Schicksal des Wasserstoffs der S-H Gruppe ist nicht eindeutig geklärt.³⁸⁻⁴⁰

Vieles deutet darauf hin, dass die Adsorption im Vakuum zum Verlust von Wasserstoff in Form von H_2 führt.⁴¹ In der Lösung gibt es auch andere Möglichkeiten, wie beispielsweise oxidative Konversion zu Wasser durch den in der Lösung möglicherweise vorhandenen Sauerstoff.⁵ Adsorptionskinetische Untersuchungen sprechen für einen in zwei Schritten ablaufenden Reaktionsmechanismus.⁴² Der erste Schritt stellt die Chemisorption der Thiol-Moleküle dar. In dessen Verlauf wird die Oberfläche innerhalb einiger Millisekunden bis Minuten weitgehend belegt. In diesem Stadium der Schichtbildung liegen die adsorbierten Moleküle noch sehr ungeordnet auf dem Substrat vor. Im zweiten Schritt erfolgt die Reorganisation der gebundenen Moleküle. Dieser Prozess dient der Maximierung der Packungsdichte und der Minimierung der Defekte in der Monoschicht.⁵ Der langsamere zweite Schritt wird daher auch als zweidimensionale Kristallisation bezeichnet. Eine Vielzahl experimenteller Faktoren, wie Lösemittel, Temperatur, Konzentration der Adsorbat-Lösung, Zeit, Kettenlänge usw. können die Struktur der resultierenden SAM beeinflussen. Elektrochemische Untersuchungen,⁴³ STM⁴⁴ und RAIRS⁴⁵ weisen darauf hin, dass die SAM-Struktur sich über einen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen verändern kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass mit der Zeit die Zahl der strukturellen Defekte in der Monoschicht abnimmt.

Nach der gegenwärtig allgemein akzeptierten Vorstellung sind die Adsorbatmoleküle in Alkanthiolat-SAM über ihre Schwefelatome kovalent an das Gold gebunden. Laut Röntgenbeugungs- und IR-spektroskopischen Untersuchungen weisen die Alkylketten im Thiolat-SAM eine *all-trans*-Konformation auf. Zur Maximierung der intermolekularen Wechselwirkungen nehmen die Alkylketten in Alkanthiolat-SAMs auf Au(111) eine 30° zur Goldoberfläche verkippte Lage ein,^{46,47} wodurch eine $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ -Struktur ausgebildet wird.⁴⁸⁻⁵¹ Diese Organisation lässt eine sekundäre Ordnung der Alkylketten in $c(4 \times 2)$ Überstruktur zu.^{52,53} (Abb. 3, Abb. 4)

Wie die Abb. 3 verdeutlicht, liegen zwei inäquivalente Alkylketten pro Einheitszelle vor.

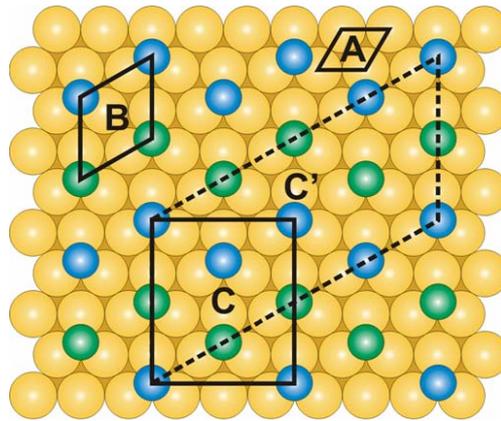


Abb. 3 : Struktur eines Alkanthiolat-SAMs auf Gold(111), A: Elementarzelle des Goldes, B: $(\sqrt{3} \times \sqrt{3}R30^\circ)$ -Struktur des Alkanthiolat-SAMs,⁵⁴ C: $p(2\sqrt{3} \times \sqrt{3})$ -Überstruktur, C': $c(4 \times 2)$ -Überstruktur des SAMs.

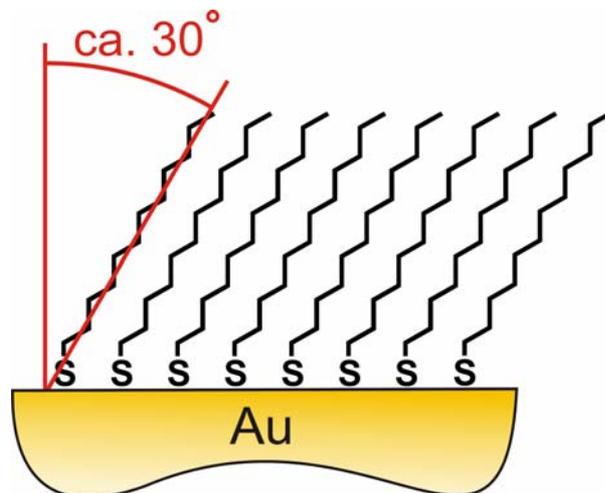


Abb. 4: Alkanthiolat-SAM auf Au(111).

Untersuchungen belegen, dass die Kettenlänge der eingesetzten organischen Komponenten einen großen Einfluss auf die Stabilität der gebildeten Schicht ausübt. Bei den Alkanthiolen mit einer Kettenlänge von weniger als sechs Kohlenstoffatomen kommt es nur zu einer unvollständigen Schichtbildung. Mit steigender Zahl von CH_2 -Gruppen im *Spacer* nimmt die Schichtordnung zu. Kettenlängen zwischen vier und sieben CH_2 -Gruppen werden als kritische Grenze für die Ausbildung geordneter Schichten betrachtet.^{35,55} Grund hierfür sind die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten im SAM, die bei kurzen Ketten nicht stark genug sind, um für eine hohe Packungsdichte und Ordnung innerhalb der Schicht zu sorgen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Anwesenheit einer Amidgruppe im *spacer* für eine

zusätzliche Stabilisierung der Schicht sorgt, was auf die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Gruppen zurückzuführen ist.⁵⁶

Bis heute wird die Struktur der Metall-Thiolat-Grenzfläche kontrovers diskutiert. Sowohl DFT-Rechnungen als auch GXRD-Messung weisen darauf hin, dass nicht, wie bisher angenommen, eine *on-top*-Bindung der Schwefelatome auf der Au-Oberfläche überwiegt, sondern vor allem verbrückende S-Au-Strukturen eine Rolle spielen (Abb. 5).^{57,58}

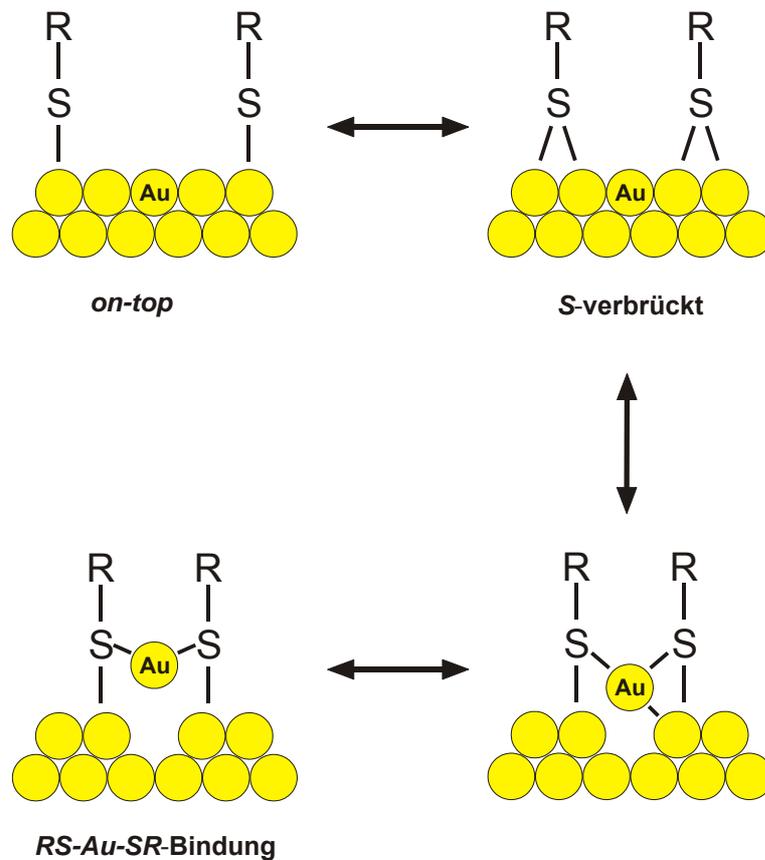


Abb. 5: Verschiedene S-Au-Bindungsmodi nach *Scoles et al.*^{57,58}

Die Schwefelgruppen binden hierbei zunächst *on-top* an das Substrat und bilden dann eine verbrückende Struktur aus. Bei Bildung der verbrückten Struktur werden Au-Atome aus der Oberfläche herausgelöst und anderswo auf der Oberfläche als einzelne Atome abgelegt (nicht gezeigt). Hieraus entstehen Fehlstellen und interfaciale Goldatome, die zu einer Erhöhung der Oberflächenrauhigkeit des Substrats führen, die experimentell nachgewiesen wurde. Durch die Fehlstellen nimmt die Bindungsstärke zwischen den verbrückenden Schwefelatomen und den Goldatomen zu. Da die hierdurch gewonnene Bindungsenergie, die zum Entfernen des Gold-

atoms notwendige Energie überkompensiert, findet dieser Vorgang freiwillig statt. Weiterhin ermöglichen die interfacialen Goldatome eine teilweise Umordnung der schwefelverbrückten Struktur zur noch energieärmeren, jedoch deutlich weniger geordneten RS-Au-SR-Struktur.

Je länger die Alkylkette des Thiols ist, desto weniger findet der Übergang von der schwefelverbrückten Struktur zum zweifach S-kordinierten Gold statt. Grund hierfür ist die Zunahme der Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylresten, die eine Erhöhung der Ordnung des Schichtsystems bewirken und der Umstrukturierung der schwefelverbrückten Struktur entgegenwirken. Dies zeigten vergleichende Studien zwischen Methanthiolat- und Hexadecanthiolat-SAMs. Ebenfalls sinkt die Tendenz zur Ausbildung der RS-Au-SR-Struktur mit dem Bedeckungsgrad des Substrats. So wurde bei Hexadecanthiolat-SAMs mit geringem Bedeckungsgrad eine $(2\sqrt{3} \times 3)$ -Struktur gefunden, in der die Alkylreste eine deutlich ungeordnete Struktur und einen signifikanten Anteil an RS-Au-SR-Bindungen aufwiesen. Bei höheren Bedeckungsgraden konnte hingegen eine Abnahme des RS-Au-SR-Bindungsmotifs zugunsten der schwefelverbrückten Struktur und eine deutliche Erhöhung des Ordnungszustandes der Alkylreste nachgewiesen werden. Zurückzuführen war dieser Effekt auf die Zunahme der intermolekularen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylresten. Mit steigendem Bedeckungsgrad wurde bei Hexadecanthiolat-SAMs daher ein Übergang der stärker ungeordneten $(2\sqrt{3} \times 3)$ -Struktur in die bekannte, hochgeordnete $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})$ -Überstruktur beobachtet.

1.2.2 Siloxan-SAMs

Die Struktur von Alkylsiloxan-SAMs unterscheidet sich grundlegend von dieser der Thiolat-SAMs (Abb. 6 A). In der Schicht sind einzelne Moleküle über Si-O-Bindungen miteinander verknüpft.⁵⁹⁻⁶² Da die Si-O-Bindung stärker ist als die S-Au-Bindung, kommt es hier nicht zum zweiten Schritt der Schichtbildung bzw. zur Umordnung der Schicht. Daher sind Alkylsiloxan-SAMs uneinheitlicher als die entsprechenden Thiolat-SAMs. NEXAFS-Untersuchungen haben ergeben, dass die Alkylketten gegenüber der Oberflächen nicht oder sehr wenig gekippt sind.⁶³

1.2.3 Phosphonat-SAMs

Neben den Alkanthiolat- und Siloxan-SAMs gibt es Alkylphosphonat-SAMs auf nativen Oxidschichten von Stahl, Titan oder Aluminium. Die Bildung eines Phosphonat-SAMs auf Metalloxiden verläuft ähnlich wie die Bildung eines Thiolat-SAMs auf der Goldoberfläche.⁵⁰ Die Schichtbildung wird als ein dreistufiger Prozess formuliert.⁶⁴ Der erste Schritt, in dessen Verlauf Alkylphosphonsäuremoleküle auf dem Substrat physisorbiert werden, dauert nur wenige Minuten. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Alkylketten der organischen Komponente noch ungeordnet vor. Im zweiten Schritt erfolgt die Immobilisierung der Moleküle durch Kondensationsreaktionen der Phosphonsäuregruppen mit den OH-Gruppen der oxidischen Oberfläche.⁶⁵ Nach der Reorganisation im dritten Schritt liegen die Alkylketten in der vollständig ausgebildeten Schicht, wie in Abb. 6 B gezeigt, in *all-trans*-Konformation vor.⁶⁶ Die ermittelten Kippwinkel liegen zwischen 0° und 45° .^{64,67-69} Die Alkylphosphonate können daher mono-, bi- und tridentat gebunden sein.^{70,71}

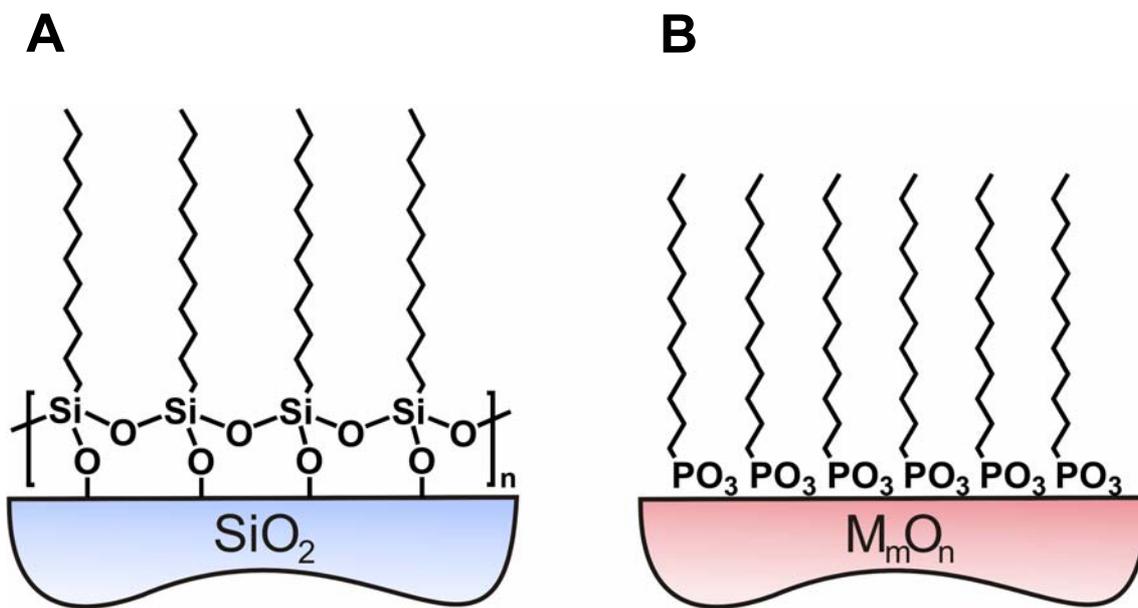


Abb. 6: Alkylsiloxan-SAMs auf SiO_2 (A) bzw. Alkylphosphonat-SAM auf Metalloxid (B).

1.3 Oberflächen in aquatischen und biologischen Medien

Die biologischen Systeme sind durch molekulare Erkennung charakterisiert, die auf spezifischen Wechselwirkungen mit Zielstrukturen beruht. Zusätzlich tendieren biologische Systeme dazu, ohne molekulare Erkennung, also unspezifisch, auf Oberflächen zu adsorbieren.

Grenzflächenreaktionen sind sehr wichtig in der Biologie.⁷² Die wichtigsten Prozesse in der Natur laufen an Oberflächen ab. Auch für Bakterien sind Materialoberflächen von bedeutender Wichtigkeit, da die Nährstoffkonzentration auf der Oberfläche deutlich höher sein kann als in der *bulk* Phase. Die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen einem Bakterium und einer Materialoberfläche ist besonders im Bereich der Medizin und Industrie von Interesse. Die fest-flüssig Grenzfläche zwischen einer Oberfläche und einem wässrigen Medium, z. B. Wasser oder Blut, bietet eine ideale Umgebung für die Adsorption von Proteinen bzw. das Anheften und das Wachstum von Mikroorganismen.⁷³ Daher wird zunehmend versucht, die Materialoberflächen durch geeignete Modifizierungen mit biorepulsiven Eigenschaften auszustatten. Allerdings ist bisher kein Werkstoff bekannt, der auf Dauer einer bakteriellen Besiedlung widersteht.⁷⁴ Eines der Probleme bei der Entwicklung biorepulsiver Oberflächen ist, dass fast jedes biologische Material aus hydrophilen, hydrophoben und geladenen Komponenten aufgebaut ist. Hinzu kommt, dass die Bakterien sich sehr schnell dem gegebenen Zustand der zu besiedelnden Oberfläche anpassen können. Infolge zahlreicher Wechselwirkungen und adsorbierter Stoffe, denen Rechnung getragen muss, ist es äußerst kompliziert, die Bakterienadhäsion vorherzusagen. Daher ist schwierig, die Materialien so zu funktionalisieren, dass die Wechselwirkung mit Biomolekülen vorhersehbar ist. Allgemein anerkannt ist die Tatsache, dass die Oberflächeneigenschaften zweifellos bestimmend für die Bioadhäsion bzw. das Ergebnis der Oberflächen-Bakterium-Wechselwirkung sind. Das systematische Studieren und Verständnis dieser Wechselwirkungen, sowie die Erkennung möglicher Korrelationen zwischen bestimmten Oberflächeneigenschaften und dem Adhäsionsverhalten der Mikroorganismen tragen dazu bei, neuartige Materialien zu entwickeln. Dabei sind Oberflächen-Eigenschaften, wie freie Energie, Hydrophobizität, Hydrophilie oder Kontaktwinkel einerseits und die Charakteristika der bakteriellen Zellwand andererseits für die Forscher von besonderer Bedeutung. Vor etwas mehr

1 Einleitung

als drei Jahrzehnten publizierte *Baier* eine Reihe von Studien, in denen er postuliert, dass eine kritische Oberflächenenergie zwischen 22-24 mN/m den Oberflächen die Resistenz gegenüber Bioadhäsion verleiht.⁷⁵ Die Adhäsion unterschiedlicher Bakterien zeigte eine Übereinstimmung zu der so genannten Baier Kurve.⁷⁶ (Abb. 7).

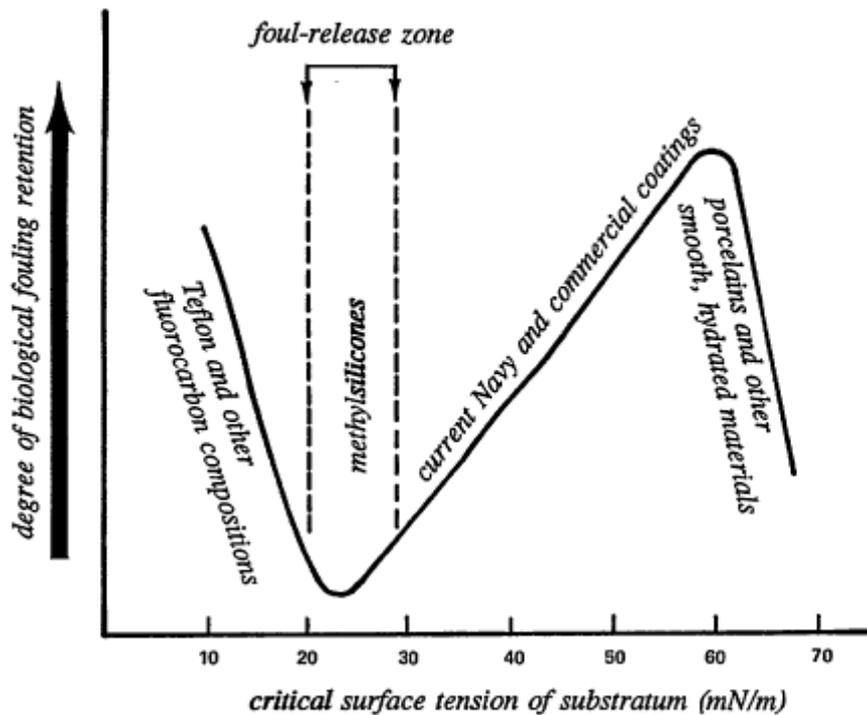


Abb. 7: Baier Kurve.⁷⁵

Auch die Untersuchungen von *Zhao et al.* hinsichtlich Abhängigkeit der Bakterienadhäsion von der Oberflächenenergie haben ergeben, dass die Adhäsion minimal ist, wenn die freie Oberflächenenergie dem Optimum zwischen 20-30 mN/m entspricht.⁷⁷

In der marinen Umwelt sind Poly(dimethyl siloxan) (PDMS) Elastomere aufgrund der niedrigen Oberflächenenergie als *Fouling release* Beschichtungen bekannt, da die Mikroorganismen nur sehr schwach an diese Oberflächen binden und unter geeigneten hydrodynamischen Bedingungen wieder von der Oberfläche gelöst werden.^{78,79}

Cao et al. berichten von der Resistenz von Fluoroalkylsilanen gegenüber *E. coli* und *S. epidermidis*.⁸⁰

Auf der anderen Seite haben *Andrade et al.* postuliert, dass die Oberflächen von Hydrogelen mit möglichst geringer Grenzflächenenergie hochresistent gegenüber Zelladhäsion sein sollten.⁸¹ Polyethylenglycol (PEG) beschichtete Oberflächen mit relativ hoher Oberflächenenergie vom ~ 43 mJ/m²,⁸² aber mit niedriger Grenzfläche-

nergie bei Wasserkontakt, sind wohlbekannt für ihre hohe Resistenz gegen Proteinadsorption und Zelladhäsion.⁸³⁻⁸⁵ Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die zeigen, dass die Oberflächen- bzw. die Grenzflächenenergie nicht die einzigen Faktoren sind, die den Vorgang der Bioadhäsion beeinflussen.

Bei den Wechselwirkungen zwischen Oberflächen und Bakterien bzw. Proteinen, über welche die Bakterien an die Oberfläche binden, spielt das Wasser eine sehr wichtige Rolle. *Vogler* und *Morra* haben vorgeschlagen, dass der Hydratisierungsgrad einer Materialoberfläche eine Größe darstellt, die bestimmend für die Proteinadsorption ist.⁸⁶ Daher ist das Verhalten der Materialoberfläche gegenüber Wasser, also ihre Benetzbarkeit, ein entscheidendes Kriterium in der Bakterienadhäsion. Benetzbarkeit stellt eine der fundamentalen Materialeigenschaften dar. Ob Wasser eine Oberfläche gleichmäßig benetzt oder davon abperlt, hängt von deren Substruktur und chemischen Beschaffenheit ab. Die physikalischen Grundlagen zur Benetzung von Oberflächen sind seit langem bekannt.⁸⁷ Vor vielen Jahren haben *Ikada et al.* theoretisch vorhergesagt, dass sich die Adhäsionsarbeit F im wässrigen Medium dem Wert Null nähert, wenn der Kontaktwinkel des Wassers näherungsweise 0° oder 90° ist.⁸⁸ *Blassey* beschreibt zwei scheinbar widersprüchliche Prinzipien, die sich hinter der Biorepulsivität verbergen. Diese sind Superhydrophilie und Superhydrophobie, zwei gegensätzliche Ansätze mit dem gleichen Resultat.⁸⁹

Die theoretische Aussage von *Ikada et al.* wurde experimentell bei der Adsorption von BSA an verschiedene Polymeroberflächen in Phosphatpuffer bestätigt. Dies war der Startschuss für die Entwicklung proteinresistenter Oberflächen.⁸⁸ Tatsächlich gibt es bei der Entwicklung von potentiell antiadhäsiven Materialien beide Strategien: Erzeugung hydrophiler oder superhydrophober Oberflächen. Es wird angenommen, dass sich bei den hydrophilen antiadhäsiven Oberflächen durch die starke Quellung im wässrigen Medium Hydrogele bilden, deren Eigenschaften denen von reinem Wasser ähneln. Der Versuch eines Bakteriums, an eine stark gequollene, beispielsweise PEGylierte Oberfläche anzubinden, ist erfolglos, da dieses durch die hohe Viskosität des Hydrogels eine Gegenkraft spürt bzw. abgewiesen wird. Die hydrophoben, selbstreinigenden, funktionalen Oberflächen sind vor allem aus der Pflanzen- und Tierwelt bekannt. Die Haut vieler Fische und Reptilien ist frei von jeglicher Kontamination. Bereits seit langem ist die extreme Unbenetzbarkeit mancher Blätter bekannt. Das prominenteste Beispiel und am besten untersucht ist die Lotus-Pflanze (*Nelumbo nucifera*). Warum ist die wasserabweisende Eigenschaft für das Lotus-

1 Einleitung

Blatt so wichtig? Der Hauptgrund ist der Schutz vor pathogenen Bakterien. Obwohl dieser Effekt aus der Pflanzenwelt stammt, ist er kein biologischer, sondern ein physiko-chemischer Effekt. Die auf den Blättern exponierten superhydrophoben Oberflächen besitzen eine sehr geringe Oberflächenenergie und sind für die Mikroorganismen wenig attraktiv, da sie eine geringe Angriffsfläche bieten. Durch die minimierte Kontaktfläche werden auch die Adhäsionskräfte verringert, so dass die Bakterien zusammen mit der wässrigen Phase (Regen) abtransportiert werden. Allerdings können auf glatten hydrophoben Oberflächen die Tropfen nicht rollen, sondern nur gleiten, wobei nur eine geringfügige Schmutzentfernung stattfinden kann. Daher wird versucht, nach dem Vorbild der Lotusblüte den hydrophoben Oberflächen durch regelmäßige Mikro- und Nanostrukturierung Bakterien- und Schmutzabweisende Eigenschaften zu verleihen.^{90,91} Die Nanostrukturen weisen allerdings geringe mechanische Stabilität auf. Die Schichten können relativ leicht abgerieben oder zerkratzt werden. Zur Verbesserung der Langzeitstabilität entsprechender Systeme wird eine hierarchische Rauheitsstruktur vorgeschlagen.⁹² Am Beispiel des Lotus-Effekts wird deutlich, dass das Verständnis physikalisch-chemischer und auch biologischer Zusammenhänge im Nanometerbereich extrem wichtig ist für die Entwicklung von Materialien mit biorepulsiven Eigenschaften. Auch der Ansatz einer Vereinigung dieser Eigenschaften in so genannten amphiphilen Oberflächen sieht viel versprechend aus. So wurden Oberflächen aus PEG- und Fluoralkyl-Segmenten effektiv gegen Biofilmmikroorganismen aus der marinen Umwelt getestet.⁹³

Ein weiterer Versuch der Systematisierung der Eigenschaften stellt das so genannte „*fouling triangle*“ dar. Dieses kombiniert die Rauigkeit, Hydrophobizität und mechanische Eigenschaften, wie die Elastizität der Materialoberfläche, als einen Satz erwünschter Oberflächeneigenschaften eines Materials, der über die Adhäsion auf der Oberfläche bestimmt.⁹⁴ *Bos et al.* zeigten allerdings, dass Bakterien keine strenge Präferenz für hydrophobe oder hydrophile Oberflächen zeigen.⁹⁵ Untersuchungen mit AFM zur Adhäsion von *E.coli* konnten keinen signifikanten Einfluss der Hydrophobizität in der Vorhersage der Adhäsion bestätigen, vielmehr sind die auf den Oberflächen vorhandenen funktionalen Gruppen wichtig.⁸⁰ *Boyd et al.* haben herausgefunden, dass die Oberflächenrauigkeit im Mikrometerbereich eine Art physikalische Barriere für die Mikroorganismen darstellen muss.⁹¹ Im Gegensatz dazu unterstützen in Nanometerbereich strukturierte Oberflächen die Bakterienadhä-

sion.⁹⁶ Der Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Bakterienadhäsion wurde auch in späteren Studien bestätigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Bakteriengröße und dem Oberflächenstrukturierungsbereich geben muss.⁹⁷

Auch wird versucht, einen Zusammenhang zwischen den Oberflächeneigenschaften der Bakterien und der Adhäsionswahrscheinlichkeit herzustellen. Es wurden beispielsweise Korrelationen zwischen dem isoelektrischen Punkt und der Adhäsion auf Teflon und Glas gefunden, was auf das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein negativ geladener Phosphat und Carboxylatgruppen hinweist, die eine Adhäsion verhindern bzw. ermöglichen.⁹⁸ Dieser Effekt ist auf die elektrostatische Attraktion bzw. Repulsion zurückzuführen.

1.3.1 Biofilme: historische Perspektive, Vorkommen

Biofilme können als Urform des Lebens betrachtet werden. Die ältesten Fossilien, wie die in *Pilbara Craton* gefundene Stromatolithen, stammen von Mikroorganismen in Biofilmen, die vor 3,2 Milliarden Jahren gelebt haben.^{99,100} Costerton et al. betrachten den Biofilm als den ältesten Bakterienphänotyp.¹⁰¹

1676 beobachtete *Antoni van Leeuwenhoek* erstmalig mit einem selbstgebauten Mikroskop Biofilmbakterien im Plaque seiner eigener Zähne, die er in Berichten an die *Royal Society of London* als „animalcules“ (lat. kleine Tiere) bezeichnete. „The number of these animalcules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom“.

Nach diesem ersten wissenschaftlichen Bericht über Biofilme schrieb *Henrici* 1933: „Es ist ziemlich offensichtlich, dass der Grossteil der Wasserbakterien nicht freischwimmend ist, sondern auf den Oberflächen unter Wasser wächst“.¹⁰²

Zobell und *Anderson* beschrieben den so genannten „effect of volume“¹⁰³ und etwas später, 1940, beobachteten *Heukelekian* and *Heller* den „bottle effect“¹⁰⁴ für marine Mikroorganismen. Diese zeigten eine wesentlich verbesserte metabolische Aktivität in der Flasche. Die Erklärung für dieses Ergebnis ist die Tatsache, dass die auf der Behälteroberfläche konzentrierten Nährstoffe für Bakterien besser verfügbar sind als im Seewasser. 1943 beschrieb *Zobell* die Affinität der marinen Bakterien zu Oberflächen, nachdem er beobachtet hatte, dass die Bakterienzahl auf der Behälteroberfläche deutlich höher war als im umgebenden Medium, in diesem Fall im Seewasser.¹⁰⁵

1 Einleitung

1973 untersuchte *Characklis* mikrobiellen Schleim in Industrie-Wassersystemen und stellte fest, dass dieser hartnäckig und hochresistent gegenüber Chlor als Desinfektionsmittel war.^{106,107} Auch wenn Biofilme in unterschiedlichen Systemen beschrieben wurden, wurde ihre Dominanz gegenüber dem planktonischen Zustand lange Zeit nicht anerkannt. 1978 veröffentlichte *Costerton* den Artikel: „How bacteria stick“, in dem er eine Theorie formulierte, welche besagte, dass die Mehrzahl der Bakterien an einer Oberfläche gebunden ist und dass diese sessile Form sich hochgradig von dem planktonischen Gegenstück unterscheidet.¹⁰⁸ Die Theorie basierte auf Daten aus dem natürlichen aquatischen Ökosystem. Direkte mikroskopische Beobachtungen haben eindeutig ergeben, dass mehr als 99,9% der Bakterien auf einer breiten Vielfalt von Oberflächen wachsen.¹⁰⁹

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Biofilmen haben gezeigt, dass sie aus unterschiedlichen Mikroorganismen zusammengesetzt sein können. Wahrscheinlich sind alle Bakterien in der Lage, neben dem planktonischen Lebensmodus auch eine Existenz als Biofilm zu zeigen.¹

Biofilm stellt die häufigste und somit die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen dar.¹¹⁰ *Donlan* und *Costerton*¹¹¹ definieren den Biofilm folgendermassen: „Biofilme sind Konsortien von Mikroorganismen, die in einer Matrix aus selbst produzierten, extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) eingelagert sind und miteinander und/oder an der Grenzfläche verhaftet sind und phänotypische Änderungen hinsichtlich Wachstumsrate und Gentranskription aufweisen.“ Die Bezeichnung „Biofilm“ ist eigentlich unzutreffend, da keine regelmäßige Schicht auf der Oberfläche gebildet wird. Vielmehr handelt es sich bei einem Biofilm chemisch und biologisch um ein sehr heterogenes Gebilde, das je nach der Umgebung oder Nahrungsangebot unterschiedliche Strukturen aufweist. Während in schnellen Gewässern wachsende Biofilme eine „Luftschlangenform“ (*flamentous „Streamers“*) annehmen, weisen die Biofilme in ruhigen Gewässern eine Pilz- oder Hügelähnliche (*mushroom or mound-like*) Struktur auf. Durch die Nährstoff- und Abfallproduktgradienten im Biofilm entstehen unterschiedliche Umgebungen für die Zellen des gleichen Biofilms, was unterschiedliche Wachstumsraten und Metabolismen zur Folge hat.

Im Allgemeinen versteht man unter Biofilmen synergetische Mikrokonsortien aus verschiedenen Spezies, wie Bakterien, Hefen und Pilzen, die in eine Matrix, der **E**xtrazellulären **P**olymeren **S**ubstanz (EPS), eingebettet sind. Biofilme als Organisation von einzelnen oder mehreren Spezies besitzen einige Selektionsvorteile:

In Biofilmen verfügen die Mikroorganismen über einen großen Gen-Pool, in dem der Austausch von Genen durch die räumliche Nähe erleichtert wird. Es wurde beobachtet, dass der horizontale Gentransfer in der sessilen Form 1000-fach öfter stattfindet als bei planktonischen Zellen.¹¹² Die Zelldichte in einem Biofilm kann 10^7 Zellen/cm² erreichen.¹¹³

Der Biofilm ist der Standardmodus der bakteriellen Existenz. Eine generelle Hypothese nimmt an, dass die Bakterien für ihr Wachstum die Grenzflächen bevorzugen, da hier eine Nährstoffakkumulation aus der *bulk* Phase stattfindet.¹¹⁴ Durch die Entwicklung und Kombination moderner Untersuchungstechniken, wie hochauflösende, dreidimensionale Bildgebungsverfahren, die Fluoreszenzmikroskopietechnik und Biofilmkultivierungsapparaturen, konnte gezeigt werden, dass ein Biofilm keine passive Schleimschicht an einer Oberfläche ist, sondern ein dynamisches und strukturell hochkomplexes System darstellt.^{115,116}

Im Rahmen der Evolution hat sich der Biofilm als optimale Lebensform etabliert, die es Mikroorganismen trotz harscher Bedingungen wie extremer Temperaturen, pH-Werte oder atmosphärischer UV-Strahlung ermöglichte zu überleben. Durch kontinuierlich Anpassungen an sich verändernde Umwelteinflüsse ist es den Biofilmbakterien gelungen, sowohl Resistenzen gegen Desinfektionsmittel zu entwickeln als auch das menschliche Immunsystem gekonnt zu kontern. Die Fähigkeit der Prokaryonten, sich rasch an die Umweltbedingungen anzupassen, ist auf die genetische Regulation¹¹⁷ und Selektion¹¹⁸ zurückzuführen. Eine Flexibilität in diesem Umfang ist für multizelluläre eukaryontische Organismen nicht möglich. Biofilmbakterien zeigen daher einen signifikanten phänotypischen, biochemischen und morphologischen Unterschied im Vergleich zu planktonischen Bakterien.

1.3.1.1 Entstehung und Dynamik von Biofilmen

Bei der Biofilmbildung handelt es sich um eine Folge von komplexen und gut regulierten Einzelschritten.^{111,119} Der molekulare Mechanismus ist zwar von Art zu Art unterschiedlich, jedoch verläuft der Prozess nach einer festgelegten Sequenz von Ereignissen. In der Abb. 8 ist der Verlauf der Biofilmbildung nach *O'Toole et al.* vorgestellt.¹²⁰

1 Einleitung

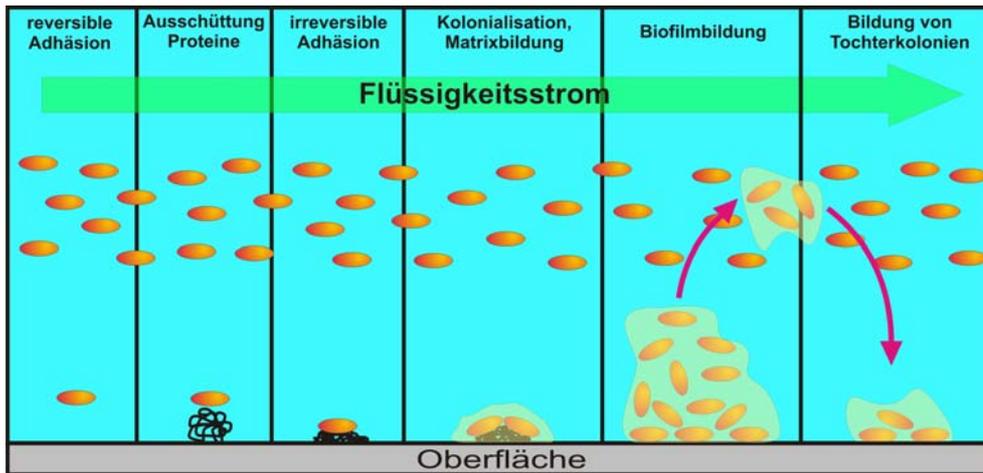


Abb. 8: Stufen der Biofilmentwicklung nach O'Toole.¹²¹

Jedes in Wasser getauchte Material ist nur so lange in seinem theoretischen (ursprünglichen) physiko-chemischen Zustand bis es von im Wasser befindlichen Stoffen, wie Proteinen, Polysacchariden und Huminstoffen, überzogen wird. Dieser Prozess stellt die Bildung des so genannten *Conditioning Films* dar und läuft sehr schnell ab.¹²² Im ersten Schritt der Biofilmbildung werden die Organismen an die Oberfläche transportiert. Die Adhäsionsrate wird durch die Zahl der zur Oberfläche transportierten Mikroorganismen bestimmt.¹²³ In ruhenden Gewässern können Mikroorganismen einfach durch Sedimentation an die Oberfläche gebracht werden. In fließenden Medien trägt die Konvektion zum Transport der Mikroorganismen bei. Die 10-100 µm dicken Diffusionsgrenzschichten in technischen Systemen können allerdings nur durch die Diffusion überwunden werden. Neben diesem passiven Transport gibt es einen aktiven Fortbewegungsmechanismus durch unterschiedliche Zellorganellen, beispielsweise Flagelen. Hat ein planktonisches Bakterium eine Oberfläche erreicht, erfolgt infolge eines ersten unspezifischen Kontaktes innerhalb von Sekunden eine reversible Adhäsion. Es wurde beobachtet, dass Bakterien ein spezies-spezifisches Verhalten zeigen, welches Prozesse wie „*Rolling*“, oder „*Ripping*“, einschließt, bevor sie irreversibel binden und EPS produzieren.¹²⁴ Die initiale Adhäsion stellt somit den ersten und entscheidenden Schritt der Biofilmbildung dar.¹²⁵ Diese wird als ein physiko-chemischer Prozess betrachtet, an dem Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt sind. Wenn Umweltreize und Signalmoleküle oberflächengebundenen Wachstum einleiten, schließt sich an die reversible Adhäsion die irreversible Adhäsion an, die einige Sekunden bis Minuten dauert. Bei der irreversib-

1 Einleitung

len Adhäsion übernehmen die Strukturen der bakteriellen Zelloberfläche, wie Fimbrien und ausgeschiedene spezifische Polysaccharide (EPS) die Vermittlerrolle. Es wurde berichtet, dass sich bei *Escherichia coli* die Transkription von 38% der Gene nach der Adhäsion ändert.¹²⁶

Woher wissen die Bakterien, dass sie sich auf der Oberfläche befinden? Das Erkennungssystem bleibt immer noch ein Mysterium.¹²⁷ Eine Hypothese geht davon aus, dass die Änderung in der Osmolarität bedingt durch die Oberflächenladung wahrgenommen wird, was als Hilfe in der Erkennung der Oberfläche dient.¹²⁸ Der Adhäsionsschritt wird durch die Oberflächeneigenschaften des Substrats und des Bakteriums sowie Umweltfaktoren beeinflusst. Durch die Zellteilung unter Beibehaltung von *cell-to-cell* Kontakten formieren sich zunächst Mikrokolonien und später Makrokolonien bzw. die komplexe dreidimensionale Struktur eines reifen Biofilms. Kennzeichnend für die Biofilm-Architektur ist das Netzwerk aus die Mikrokolonien umgebenden Wasserkanälen, welche den Nährstofffluss in das Innere des Biofilms ermöglichen. Biofilme sind hunderte von µm bis einige mm dick und haben komplexe Struktur. Von reifen Biofilmen spalten sich kontinuierlich Tochterkolonien ab. Dies erfolgt durch zwei Prozesse: die Erosion oder die Abschilferung. Die Freigabe der Zellen erfolgt entweder durch physikalisches Ablösen, verursacht von Scherkräften, oder durch eine programmierte Abfolge von Ereignissen, die von Signalmolekülen kontrolliert wird und zur lokalen Hydrolyse des EPS-Matrix führt. Beispielsweise kann *P. aeruginosa* eigenes EPS durch das Enzym Alginatlyase spalten. Traditionell betrachtete man den letzten Schritt, also Abspaltung der Tochterkolonien, als passives Verhalten von Biofilmen, größtenteils abhängig vom Flüssigkeitsstrom (Schubspannung) oder Nährstoffmangel.¹²⁹ Allerdings könnte die Ablösung auch eine Strategie sein, mit der Bakterien vorausschauend neue Nischen kolonisieren, bevor der bereits besiedelte Lebensraum und die Nahrung knapp werden. In diesem Zusammenhang spricht man von Verteilung der Zellen. In unterschiedlichen Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass der letzte Schritt, die Zellablösung, gefolgt von der Kolonisation neuer Oberflächen notwendig ist, um Nährstoff- und Sauerstoffmangel zu vermeiden und eine Art Rückantwort auf diesen Mangel ist. Somit handelt sich dabei eher um ein physiologisch reguliertes Ereignis.^{117,130,131}

EPS ist der Hauptbestandteil eines Biofilms. Es ist allgemein anerkannt, dass mikrobielle EPS ein komplexes Gemisch aus Makromolekülen, wie Polysacchariden,

1 Einleitung

Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren ist.¹³² Die Zusammensetzung und die Eigenschaften der EPS können nach Gegebenheiten, nach Spezies und physiologischem Zustand der Zellen sehr variieren. Im Wesentlichen setzt sich EPS aber aus Polysacchariden zusammen. Manche davon sind neutral, oder polyanionisch, wie beispielsweise bei den Gram-negativen Bakterien.¹³³ Diese Eigenschaft erlaubt die Assoziation divalenter Kationen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , die das Polysaccharid quervernetzen und es so stabilisieren. Im reifen Biofilm übernimmt die EPS folgende Funktionen: Bildung synergetischer Gemeinschaften, Zell-Zell-Kommunikation, erhöhter Gentransfer, mechanische Stabilität, Nährstoffreserve-Transport („*cross feeding*“), Schutz vor Austrocknung und Bioziden. Die EPS ist oft hoch hydratisiert und enthält bis zu 99% Wasser.¹³⁴ Sie sorgt für die Struktur, Stabilität und Verankerung des Biofilms an die Oberfläche. Zwischenräume und Wasserkanäle dienen zum Transport der Nährstoffe, Sauerstoff und Abfallprodukte. In der EPS-Matrix sind extrazelluläre Enzyme akkumuliert, die polymere Substanzen und Partikel abbauen können.

Unter dem Mikroskop lassen sich hochorganisierte Strukturen erkennen. Neben Wasser als Hauptbestandteil sind auch andere Stoffe, wie Proteine, DNS und RNS, Polysaccharide und unterschiedliche Ionen vorhanden. Das Wasser ist sowohl intrazellulär in den Mikroorganismen als auch in den Poren und Kanälen der EPS gebunden.^{132,133} Die Wasserkanäle dienen zur Nährstoffversorgung der Biofilmbakterien und zur Zellenkommunikation. Derartige Organisation der Mikroorganismen im Biofilm wird als eine symbiotische Gemeinschaft angesehen und wird oft mit den Eigenschaften von Vielzellern verglichen.¹

Ein bemerkenswertes Charakteristikum der Biofilme ist die Nutzung von Signalmolekülen, den sogenannten Autoinduktoren. Die Bakterien sind mit einem System ausgestattet, das ihnen erlaubt, mit Individuen ihrer Art zu kommunizieren. Am besten beschrieben sind zwei Autoinduktoren bzw. Pheromon-Systeme. AHL (*N-Acyl-L-Homoserinlacton*) wurde als derjenige Signalstoff identifiziert, der von den Gram-negativen Bakterien zur Kontrolle der Populationsdichte eingesetzt wird. Gram-positive Bakterien überwachen die eigene Zelldichte und Koordinierung der Genexpression durch peptidische Signalstoffe.¹³⁵ In Abhängigkeit von der Zelldichte steigt die Konzentration der Signalmoleküle im Umgebungsmedium an und induziert nach dem Überschreiten einer kritischen Schwellenkonzentration in den Bakterienzellen die Transkription spezifischer Gene, die zur gezielten Änderung der phänotypischen Funktionen des Bakteriums führen. Durch Repression und Induktion be-

stimmter Gene synthetisieren Biofilmbakterien diverse Enzyme, die ihnen besondere metabolische Fähigkeiten verleihen. Die kleinste Zelldichte-Einheit, die zu einer Expression solcher Moleküle führt, wird Quorum genannt. Das Phänomen der zell-dichteabhängigen Genregulation wird daher als *Quorum Sensing* bezeichnet. Es wird vermutet, dass mittels solcher unspezifischer Signalmoleküle die Zell-Zell-Kommunikation zwischen unterschiedlichen Bakterienarten erfolgt („bakterielles Esperanto“).¹³⁶

Allgemein ist das *Quorum Sensing* weit verbreitet und konnte bei zahlreichen Bakterienarten nachgewiesen werden. Unabhängig von der Bakterienart folgen die dem *Quorum Sensing* zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen einem identischen Grundschema. Dieser Mechanismus erlaubt den Bakterien ein kollektives Leben als Mehrzeller und eine Symbiose mit den höheren Organismen, Pflanzen und Tieren. *Quorum Sensing* ist ebenfalls wichtig in der Pathogenese. Im Zusammenhang mit *Quorum Sensing* sprechen die Wissenschaftler daher auch vom „sozialen Verhalten der Bakterien“. Durch aktuelle Ergebnisse wird das Konzept von Bakterien als „soziale Organismen“ verstärkt.

Costerton prognostiziert, dass in der Zukunft viele neue Signalstoffe entdeckt werden, die als Hormone oder Pheromone die Abläufe in den Biofilmen regeln.¹³⁷ Diese Hypothese erscheint nicht unrealistisch, wenn man berücksichtigt, dass bereits die Übertragung einer Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin über den Luftweg beschrieben wurde, die bei räumlich getrennten *E-coli*-Kulturen beobachtet wurde.¹³⁸

1.3.1.2 Biofilme aus ökologischer Sicht

Biofilme sind wichtig für unser Ökosystem. Die so genannten „*microbial mats*“ werden für die Umstellung von anaeroben zu aeroben Verhältnissen in der früheren Erdgeschichte verantwortlich gemacht.^{136,139} Diese spielen eine positive Rolle in der Aufrechterhaltung von natürlichen Kreisläufen, in denen sie als Katalysatoren fungieren. Biofilme sind beteiligt am Kreislauf zahlreicher Elemente, wie Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen, Mangan usw..¹⁴⁰

Die aeroben Bakterien oxidieren Verbindungen, wie H₂S, NH₃ oder CH₄ mit Hilfe von O₂ und beziehen aus diesem Vorgang ihre Lebensenergie. Die Oxidationsprodukte, wie Nitrat, Sulfat oder CO₂ können durch die anaeroben Bakterien in der Atmung verwendet werden. Dieser Stoffkreislauf wird durch Diffusion der reduzierten Produk-

1 Einleitung

te in die sauerstoffhaltige Zone geschlossen. Die Mikroorganismen sorgen für die Mineralisierung des Kohlenstoffs und damit für die Erhaltung eines sehr empfindlichen Gleichgewichts.¹⁴¹ Außerdem sind sie für die Selbstreinigung von Gewässern und Sedimenten verantwortlich und wirken somit der Bodenerosion vor.¹¹⁰

Eine große Zahl der Pflanzen und Tiere sind direkt von bestimmten Bakterien abhängig und leben mit ihnen in Symbiose.¹⁴¹ Manche Pflanzen können ohne diese Helfer im Erdboden nicht gedeihen. Die Stickstoff-fixierenden Knöllchenbakterien der Gattung *Rhizobium* gehen eine Symbiose mit den Leguminosen ein und arbeiten als lebende Düngemittelfabriken.

Untersuchungen industrieller Abwasseraufbereitungsanlagen zeigen, dass bestimmte Mikroorganismenpopulationen in der Lage sind, als persistent geltende Stoffe wie Dioxan, Tetrahydrofuran und andere effizient abzubauen.^{142,143} Der Abbau in der Umwelt akkumulierter Xenobiotika kann auch technisch eingeleitet werden, allerdings ist der mikrobielle Abbau meistens kostengünstiger. Außerdem werden die Schadstoffe im Verlauf des mikrobiologischen Abbaus fast vollständig zu Kohlendioxid und Wasser umgewandelt. Diese Fähigkeit der Bakterien, schnell und nahezu vollständig organische Stoffe zu CO₂ und H₂O zu oxidieren, wird in der Abwasserreinigung und Bodensanierung genutzt.

1.3.1.3 Biofilme in Industrie und Technik

Mikroorganismen stehen in vielen Bereichen im Dienste der Menschen, beispielsweise in der Biotechnologie, der Lebensmitteltechnologie und der Pharmazeutischen Industrie. Mikroorganismen werden zunehmend bei langen Synthesesequenzen zur Produktion von Vitaminen, essentiellen Aminosäuren und Enzymen eingeschaltet, wobei mikrobielle Umsetzungen gängige Labormethoden an Spezifität, Energieeffizienz und Ausbeute übertreffen. Biotechnologische Laugung von Erzen wird bei der Gewinnung von Metallen genutzt.¹⁴¹

Allerdings verursachen unerwünschte Biofilme eine Vielzahl ernsthafter Problemen in der Industrie. Die durch Mikroorganismen verursachten Kosten sind volkswirtschaftlich enorm und ihre Tragweite bilanzmäßig kaum erfasst.

Oberflächen in technischen Anlagen, die während des Betriebs sowohl mit Wasser als auch mit organischen Materialien in Kontakt kommen, beherbergen immer die Gefahr, mikrobiell kontaminiert zu werden. Kritisch sind schwer zugängliche Berei-

che. In den technischen Systemen erkennt man die Biofilme meistens indirekt, an der Veränderung von Betriebsparametern. In Rohrleitungen oder auf Schiffsrümpfen entwickelte Biofilme erhöhen den Reibungswiderstand. Die Folgen sind Druckabfall und höherer Energieverbrauch. Es wird geschätzt, dass ein Biofilm mit einer Dicke von 50 µm zu einem Geschwindigkeitsverlust von 5 bis 12% führen kann.¹⁴⁴ Dadurch entsteht ein erheblicher finanzieller Aufwand. Ein weiteres Problem stellt die Biokorrosion, die so genannte *microbially influenced corrosion*, (MIC) dar.¹⁴⁵ Die Schädigung des Materials erfolgt durch korrosive Stoffwechselprodukte. Dabei verändern die auf den Oberflächen wachsende Biofilme entscheidende Parameter wie pH-Wert, Redox-Potenzial und Sauerstoffkonzentration dahingehend, dass eine Korrosion stattfinden kann. Durch Korrosion entstehen jährlich wirtschaftliche Schäden in Milliardenhöhe. Die Bekämpfung der durch Biofilme verursachten Materialzerstörung erfolgt oft mit einer Erhöhung der Biozidkonzentration im mit der Oberfläche in Kontakt stehenden Medium. Diese Strategie hat, wie anfangs besprochen, wenig Aussicht auf Erfolg. Es gibt Hinweise darauf, dass manche Biofilme durch mikrobielle Ausscheidungen Metallkorrosion inhibieren können. Es gibt Ansätze, diesen interessanten Ansatz auch technologisch zu nutzen.¹⁴⁶

In Wärmetauschsystemen wirken Biofilme wie Isolierschichten und führen somit zu einem Verlust der Leistung.¹⁴⁵

Biofilme spielen in der Aufarbeitung und Verteilung von Trinkwasser eine ambivalente Rolle. In der Aufarbeitung sorgen sie für Entfernung von biologisch abbaubaren Substanzen, in Trinkwasserverteilungssystemen können jedoch unerwünschte Biofilme entstehen, was zur erhöhten Zahl pathogener Keime führt. Schon 1973 untersuchte *Characklis* mikrobiellen Schleim aus Industrierwassersystemen und konnte zeigen, dass die Biofilmbakterien hochresistent gegenüber Desinfektionsmitteln, wie beispielsweise Chlor, sind.^{106,107} Auch in Reinstwasseranlagen und sogar im bidestillierten Wasser werden Biofilme gefunden.¹⁴⁷

Kupfer gilt als bakterizid, aber detaillierte Untersuchungen haben gezeigt, dass sich doch Biofilme auf Kupfer bilden können.⁹ Im Schiffsbau wurde ausgenutzt, dass die Induktionszeit bis zur massiven Biofilm-Bildung durch Kupfer-Bepflanzung deutlich verlängert werden kann. Allerdings ließ sich der Bewuchs nicht langfristig vermeiden. *Tuschewitzki* berichtet außerdem von Biofilmbildung in einer Kupferleitung einer zentralen Desinfektions-Dosieranlage.¹⁴⁸

1.3.1.4 Biofilme in der Medizin

Bakterien nutzen den Menschen sowohl exogen als auch endogen als Besiedlungsfläche. Hautfläche, Schleimhäute, Mund und Rachenraum, sowie Verdauungstrakt enthalten in Biofilmen organisierte Bakterien, die für unsere Existenz essentiell sind. Im menschlichen Körper leben 10 Billionen Bakterien. Das übersteigt die Anzahl der Körperzellen um den Faktor 10. 2008 entdeckten Wissenschaftler, dass selbst im Fruchtwasser bakterielle Biofilme enthalten sein können. Etwa bei 15% der Schwangeren sieht man im Ultraschall eine schleimige Substanz, die als Biofilm identifiziert wurde.¹⁴⁹ Allerdings entstehen durch Biofilme in der Medizin auch sehr umfangreiche Probleme, insbesondere, wenn die Besiedlung von Biomaterialien^{150,151} und Geweben zu chronischen bakteriellen Infektionen führen.^{152,153} Es ist bewiesen, dass sich Bakterien im befallenen Gewebe in mehreren wichtigen Parametern signifikant von den entsprechenden Röhren-Kulturen derselben Organismen unterscheiden.^{154,155} Strukturelle und physiologische Eigenschaften des Biofilms verleihen den Mikroorganismen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln und Bioziden (Germizide). Diese zeigen eine bis zu 1000-fach verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika verglichen mit genetisch äquivalenten Zellen in Suspension.¹⁵⁶ Der ausgereifte Biofilm ist ebenfalls außergewöhnlich resistent gegenüber Makrophagen des Immunsystems.¹⁵⁷ Nach *Stewart et al.* ist der multizelluläre Aufbau des Biofilms für die hohe Resistenz entscheidend.¹⁵⁸ Es wird geschätzt, dass Biofilme an 65% der nosokomialen (im Krankenhaus erworben) Infektionen beteiligt sind. Von den Biofilmen können neben Implantaten auch ganze Organe betroffen sein. So sind biofilm-bildende Bakterien der Gattung *Pseudomonas aeruginosa* für chronische und mit Antibiotika kaum behandelbare Lungeninfektionen verantwortlich, die oft zum Tode der Patienten führt.

Katheter-assoziierte Bakteriämien (CR-BSI) sind eine weitere häufige und schwerwiegende Komplikation. Die Anbindung an die Implantate findet an der Grenzfläche zum umliegenden Gewebe oder der Körperflüssigkeit statt. Inhaltsstoffe von Körperflüssigkeiten wie Blut, Tränen, Urin oder Speichel können als so genannter *Conditioning film* dienen und so eine Kolonisation eines Biomaterials begünstigen.⁷³

Habash *et al.* nehmen an, dass die im Urin oft vorhandenen Ca^{2+} und Mg^{2+} Kationen als Brücken bei der Adhäsion dienen können und so dem Bakterium bei der Überwindung der repulsiven Wechselwirkung mit der Oberfläche helfen.¹⁵⁹

1 Einleitung

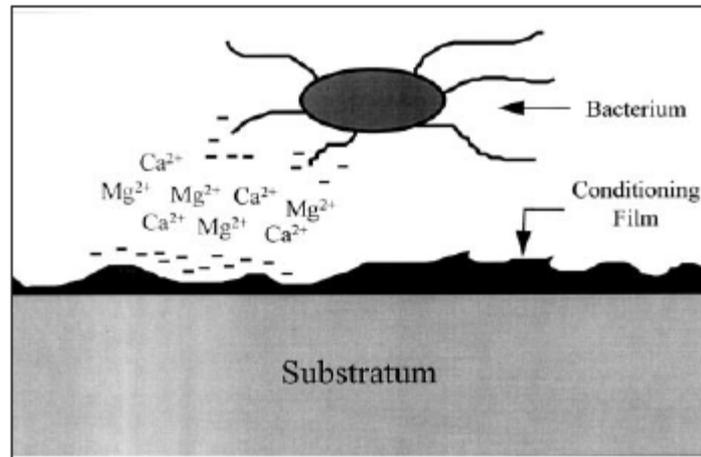


Abb. 9: Die Rolle der Kationen bei der Bakterienadhäsion.¹⁵⁹

Implantat	Organismus	Implantatassoziierte Krankheit
Künstliche Herzklappen	<i>S. epidermidis</i> <i>S. sanguis</i>	Endocarditis
Kontaktlinsen	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i>	Keratitis
Intravaskuläre Katheter	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Endocarditis, Sepsis
Kunsth Herzen	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Sepsis
Blasen Katheter	<i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Bacteriurie
Gelenkimplantat	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Sepsis

Tabelle 1: Häufige Implantatinfektionen.¹⁶⁰

Wie die Tabelle 1 verdeutlicht, gehören die meisten Bakterienarten, die Biomaterial-induzierte Infektionen verursachen, zur normalen Mikroflora des Menschen. Staphy-

1 Einleitung

lococcen beispielsweise besiedeln die menschliche Haut, bilden aber gleichzeitig häufig gefährliche Biofilme auf Implantaten, wie z. B. intravenösen Kathetern oder Hüft- und Knieprothesen. Nach dem Einsetzen der Implantate kommt es sehr häufig post-operativ zur Besiedlung durch diese Keime. Oft folgt ein chronischer Infektionsverlauf mit Aktivierung von Blutgerinnungskaskaden oder fibrösen Einkapselungen. Infektiöse Biofilme sind im Körper schlecht detektierbar und behandelbar. Teile der Biofilme können sich lösen und Embolien verursachen. Da das Gruppenverhalten der Bakterien erst seit einiger Zeit bekannt ist, sind gute therapeutische Strategien gegen Biofilminfektionen bis jetzt nicht verfügbar und eine erfolgreiche Antibiotikatherapie daher kaum möglich. In der Regel muss das Implantat entfernt werden, was enorme Kosten für das Gesundheitssystem verursacht und, abgesehen von dem Risiko für den Patienten, den regenerationsbiologischen Prozess der Wundheilung verzögert.¹⁶¹

Während in der Natur Biofilme gemischter Populationen weit verbreitet sind, sind klinisch die sogenannten *single-species*-Biofilme relevant, und für das Auftreten persistenter Infektionen in Krankenhäusern verantwortlich.¹⁶²

Entscheidend für den oben erwähnten Misserfolg einer Antibiotikatherapie bei den Biofilmen ist die Tatsache, dass diese auf Daten für planktonische Bakterien basiert. Für diese wird die so genannte Minimale Hemmkonzentration, MHK, ermittelt. Die MHK entspricht der niedrigsten Konzentration einer Substanz, bei der die Vermehrung der Bakterien mit bloßem Auge nicht wahrnehmbar ist. Liegt als Infektionsherd ein Biofilm vor, ist der Erfolg dieses Ansatzes sehr beschränkt.

Bakterien haben eine Reihe Resistenzmechanismen entwickelt, denen folgende grundsätzliche Strategien zugrunde liegen: 1. Veränderung des Angriffsortes oder Bildung eines strukturell veränderten Bindemoleküls (zusätzliches Penicillinbindeprotein bei Staphylokokken), 2. Verhinderung der Aufnahme der Antibiotika in der Zelle (durch fehlende Expression eines Porins der äußeren Membran bei gramnegativen Bakterien), 3. aktiver Transport der Antibiotika aus der Zelle durch spezifische Transporter, 4. enzymatische Detoxifizierung bzw. Veränderung der Antibiotika in der Hinsicht, dass sie nicht mehr an ihrem Wirkort binden können (β -Lactamase).

Es besteht eine eindeutige Beziehung zwischen der Häufigkeit des Auftretens antibiotika-resistenter Bakterien und dem Verbrauch an Antibiotika.

1 Einleitung

Bakterien im Biofilm sprechen schlechter auf eine antibiotische Therapie an als die planktonischen. Drei mögliche Mechanismen, die für die erhöhte Resistenz der Biofilmorganismen verantwortlich sein könnten, werden wie folgt formuliert:¹¹¹

1. Verzögerte Penetration der Antibiotika bzw. Biozide durch die Biofilmmatrix
2. Veränderte Wachstumsrate/Physiologischer Zustand der Biofilmorganismen (metabolische Inaktivität)
3. Existenz extrem resistenter kleiner Subpopulationen im Biofilm
4. Veränderung der Zellwandzusammensetzung

Der erste Mechanismus schreibt der EPS eine Barriere-Rolle zu und erklärt die Resistenz gegenüber UV-Strahlung oder Antibiotika, durch eine Bindung der Stoffe an die EPS bzw. durch Absorption der Strahlung durch die EPS. Hierdurch können weder Strahlung noch Antibiotika die individuellen Zellen innerhalb des Biofilms in ausreichender Intensität bzw. Konzentration erreichen, die für eine Abtötung notwendig wäre.^{1,157,163} Allerdings gibt es NMR-Untersuchungen, die belegen, dass der Diffusionskoeffizient von Wasser im Biofilm praktisch gleich groß ist wie im freien Wasser.¹⁶⁴ Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass kleine Moleküle praktisch ungehindert durch die EPS difundieren. Vermutlich wird die Penetration von elektrisch geladenen Antibiotikamolekülen in tiefere Schichten durch ein Überwiegen von entgegengesetzter Ladung in den oberen Schichten des Biofilms behindert. Viele Antibiotika, wie beispielsweise die Gruppe der β -Lactame, können frei die EPS penetrieren, sind jedoch unwirksam gegen Biofilmbakterien. Die β -Lactame wirken in der Regel gegen schnell teilende Gram-positive Bakterien, indem sie in die Zellwandsynthese der Bakterien eingreifen. Dieser Stoffwechselfvorgang kommt bei den in die Ruhephase übergegangenen Biofilmbakterien nicht vor. Zusätzlich wird im Fall von β -Lactamen vermutet, dass durch in der EPS-Matrix immobilisierte β -Lactamase das Antibiotikum effektiv abgebaut bzw. inaktiviert werden kann. Es wurde beobachtet, dass die Zellen in *P. aeruginosa* Biofilmen 32-fach mehr β -Lactamase produzieren als die planktonischen.¹⁶⁵

Praktisch alle Antibiotika sind wirksam gegen schnell wachsende Zellen. Die Bildung der inaktiven stationären Zonen mit geringem Metabolismus innerhalb des Biofilms scheint ein signifikanter Faktor in der Resistenz gegenüber Antibiotika der Biofilmpopulation zu sein.^{166,167} Der dritte mögliche Mechanismus, der zur Resistenz beiträgt,

1 Einleitung

basiert auf der Existenz der persistenter Zellen. Es ist fast unmöglich, einen Biofilm vollständig zu beseitigen, da ein kleiner Teil der Population immer überlebt. Weiterhin wurde beobachtet, dass in Biofilmbakterien 40% der Zellwandproteine eine veränderte Zusammensetzung aufweisen im Vergleich zu den planktonischen Zellen.¹⁶⁵ Ein wichtiger Faktor könnte auch der begünstigte und beschleunigte Gentransfer bzw. Austausch der Resistenzgene innerhalb eines Biofilms sein. Ein weiterer Faktor der erhöhten Resistenz könnte die funktionelle Kompartimentierung des Biofilms sein. Dadurch entstehen innerhalb eines Biofilms stark divergierende Lebensräume mit unterschiedlichem pH-Wert sowie elektrochemischem Potenzial, woraus die unterschiedliche Empfindlichkeit der Biofilmbakterien gegenüber Antibiotika resultieren könnte.¹⁶⁸

Während konventionelle Antibiotika den Stoffwechsel oder die Reproduktion der Bakterienzellen stören, richten sich neuartige Antibiotika gegen die am Aufbau des Biofilms beteiligten Prozesse, beispielsweise durch Störung der primären Adhäsion. Als neuartige Antibiotika machen so genannte Pilizide Hoffnung bei der Bekämpfung pathogener Bakterien, die Pilis für die Auslösung von Infektionskrankheiten benötigen. Durch Pilizide werden Bakterien nicht abgetötet, sondern nur gehemmt, Pilis zu produzieren. So „entwaffnete“ Bakterien können sich nicht mehr einnisten. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt nicht nur in der Vermeidung der Infektionskrankheit. Da die Bakterien die Behandlung mit Piliziden überleben, sollte der Selektionsdruck zugunsten der Resistenzgene nicht so stark sein wie bei den konventionellen Antibiotika. Aktivitätstests einer Gruppe von Piliziden, die auf bityklischen 2-Pyridon-Derivaten basieren, zeigen gegenüber *E. coli* als Modellorganismus viel versprechende Ergebnisse.¹⁶⁹ Über ausgeprägte anti-adhäsive Eigenschaften verfügen die von Kranbeere abgeleiteten Proanthocyanidine, PAC. Bei uropathogenem *E. coli* bewirken diese den Verlust der Adhäsionsfähigkeit, ohne die Lebensfähigkeit der Bakterien einzuschränken.¹⁷⁰

Postoperative bzw. Implantat-vermittelte Infektionen stellen ein ernsthaftes Problem dar. Daher ist es notwendig, bei der Entwicklung der Biomaterialien neben der Biokompatibilität und Beständigkeit auch anti-Biofilm Eigenschaften zu betrachten.¹⁷¹ Biorepulsive Materialien, die die Proteinadsorption, Zelladhäsion und Bakterienadhäsion unterbinden, haben deswegen in der Medizin eine sehr große Bedeutung. Bei Implantaten sind die Materialoberflächen entscheidend für die Akzeptanz oder Abstoßung des Materials durch den Körper. Die Vorgänge, die bei dem Kontakt einer

Implantatoberfläche mit dem Blut und Gewebe *in vivo* ablaufen, sind so komplex, dass *Vroman* 1971 diesbezüglich schrieb: „Nach unserer Berechnung würden die oben vorgestellten Studien bei der aktuellen Geschwindigkeit des Fortschritts etwa 10^7 Jahre beanspruchen.“¹⁷²

1.3.2 Bakterienadhäsion

Bakterienadhäsion ist nach *Busscher et al.* der initiale, essentielle Schritt der Biofilmbildung¹⁷³ und der Entstehung von Infektionen und somit ein sehr wichtiger Vorgang in der Biologie, Industrie und Medizin. Aus diesem Grund gibt es große Bestrebungen, die molekulare Ebene der Bakterienadhäsion zu verstehen. Der Großteil der Biofilmstudien fokussiert sich auf den Mechanismus der Bakterienadhäsion und die während des Übergangs vom planktonischen in den Biofilmzustand vorkommenden Veränderungen.¹⁷⁴ Die Bakterienadhäsion gilt in erster Linie als physikalisch-chemischer Prozess mit relativ geringem Anteil an physiologischer Aktivität der Mikroorganismen¹⁷⁵ Es gibt Bakterienstämme, deren Zellen auch im abgetöteten Zustand an Oberflächen haften können. In diesem Fall spricht man von einer „passiven Adhäsion“. Andere Spezies können nur im lebenden Zustand adhären („aktive Adhäsion“).¹⁷⁶

Viele Organismen haben multiple Adhäsionsmechanismen entwickelt, um potenzielle Hürden zu überwinden. Die Gesamtwechselwirkung ist eine komplizierte Balance zwischen Kräften, Gestalt, Abstand und Orientierung.

Nach *Marshall* ist der erste Link zwischen dem Bakterium und Material vermutlich eine Kombination aus schwachen chemischen Bindungen, Dipol-Dipol- und hydrophoben Wechselwirkungen.¹⁷⁷ Dieser Autor beschreibt die Bakterienadhäsion als zweistufigen Prozess, der durch eine schnelle und reversible physikalische Kontaktphase eingeleitet wird, gefolgt von einer zeitabhängigen und irreversiblen molekularzellulären Phase,^{178,179} in der strukturelle Erkennungsmechanismen involviert sind. Diese zwei Phasen werden korreliert mit einem energetischen sekundären Minimum (reversible Adhäsion) und einem energetischen primären Minimum (irreversible Adhäsion).

Bakterienadhäsion ist ein hochkomplexer Prozess, in dem drei Komponenten involviert sind. Diese sind: die bakterielle Zelloberfläche, das Substratum und die umgebende liquide Phase. Bakterientransport zur Oberfläche erfolgt durch nicht vernach-

1 Einleitung

lässigbare Brown'sche Bewegung mit ca. 40 $\mu\text{m}/\text{h}$,¹¹⁹ van der Waals Kräfte und Gravitation.

Die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Oberflächen werden vom physikochemischen Standpunkt aus in *long-range* und *short-range* Wechselwirkungen eingeteilt.¹⁸⁰ Die ersteren sind Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen. Diese agieren unspezifisch, um das Bakterium nah an die Substratoberfläche zu bringen, und wirken schon bei Entfernungen >50 nm. Kommt die Zelle näher an die Oberfläche (<5 nm), gewinnen die *short-range* Wechselwirkungen an Relevanz und tragen dazu bei, den Organismus fest an der Oberfläche zu halten. Diese werden ihrerseits in Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eingeteilt.¹⁸¹

Die erste Phase der Adhäsion macht die zweite, molekulare Phase möglich. Die Polymerstrukturen der Bakterien sind daran maßgeblich beteiligt. Die bakterielle Zelloberfläche von Gram-negativen Bakterien trägt Anbindungsstrukturen, wie Pili (Fimbrien), *outer membrane proteins* (OMPs), Lipopolysaccharide, und andere Polymere, die wie Adhäsine wirken. Die Fimbrien sind ebenfalls an der Adhäsion Gram-positiver Bakterien beteiligt. Die Fimbrien Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien unterscheiden sich strukturell voneinander. Während diese bei den Gram-negativen Bakterien hoch-geordnete Strukturen darstellen, kommen die Fimbrien bei den Gram-positiven Bakterien eher in Form aggregierter Proteine vor.¹⁸²

Die Eigenschaften der Adhäsine werden durch die Physiologie des Organismus, Wachstumsbedingungen¹⁸³ und Umweltbedingungen¹⁸⁴ bestimmt. Die Adhäsine haben in unterschiedlichen Spezies unterschiedliche Funktionen. Weiterhin hängt ihre Funktion auch von den jeweiligen Umweltbedingungen ab. Die Annäherung an eine abiotische Oberfläche wird durch die Bewegung von Zellorganellen, wie Flagellen, zur Überwindung abstoßender Kräfte unterstützt. Ist die Oberfläche zunächst „erobert“, sorgen andere Adhäsine für eine stabile Anbindung zwischen den Zellen und Oberfläche.¹⁸⁵

Fimbrien tragen zur Hydrophobie der Zelloberfläche bei, denn meisten Fimbrien enthalten einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäureresten.¹⁸⁶ Den Fimbrien wird eine Rolle bei der Überwindung der initialen elektrostatischen Repulsionsbarriere durch hydrophobe Wechselwirkungen zugeschrieben.¹⁸⁷

Es ist bekannt, dass die hydrophoben Wechselwirkungen die stärksten *long range* Wechselwirkungen in den biologischen Systemen darstellen.^{188,189} Hydrophobe

1 Einleitung

Strukturen leisten einen großen Beitrag bei der Beseitigung des Wasserfilms auf einer Oberfläche. Ist der Wasserfilm im ausreichenden Maß verdrängt, kommen Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenwechselwirkungen oder Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zur Geltung. In einer Serie empirischer Untersuchungen gelang es *Fletcher et al.*, Hydrophobizität neben den elektrostatischen Wechselwirkungen als wichtigen Faktor in Bakterienadhäsion zu erkennen.¹⁹⁰ Hydrophoben Wechselwirkungen wird auch von *Van Oss* eine wichtige Rolle bei der primären Adhäsion zugesprochen.¹⁹¹ Spätere Untersuchungen bestätigten diese Befunde.^{192,193} Wie XPS Untersuchungen ergaben, tragen die Oberflächenproteine maßgeblich zur Hydrophobizität bei.¹⁹⁴ *Oliveira et al.* fanden einen linearen Zusammenhang zwischen dem Hydrophobizitätsgrad und der Adhäsion für *S. epidermidis* und betrachten die Hydrophobizität als primäre treibende Kraft der Adhäsion.¹⁹⁵

Neben dem Zwei-Phasen-Modell gibt es ein Drei-Phasen-Modell,¹⁹⁶ (Abb. 10) welches die Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Bakterien und Oberfläche als die erste Phase der Adhäsion vorschlägt, die bereits in einem Abstand von einigen hundert Nanometern wirksam ist. Bei einer Distanz von 20 nm kommen die elektrostatischen Wechselwirkungen hinzu, was der zweiten Phase der Adhäsion entspricht. Die dritte Phase tritt bei einer Distanz von 5 nm auf. Hier können spezifische Rezeptoren die Adhäsion unterstützen.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, sind im Drei-Phasen-Modell bei einer Separationsdistanz von über 50 nm Substratoberfläche und Bakterium weit von einander entfernt und treten es nur anziehende Van-der-Waals-Wechselwirkungen auf. Bei der Entfernung von 10 bis 20 nm wirkt die elektrostatische Abstoßung. Zu diesem Zeitpunkt ist die Adhäsion reversibel, da noch keine feste Bindung stattgefunden hat. Ist die Zelle <1,5 nm von der Oberfläche entfernt, befähigen sie eine Vielfalt *short-range* Wechselwirkungsmöglichkeiten zur irreversiblen Adhäsion.

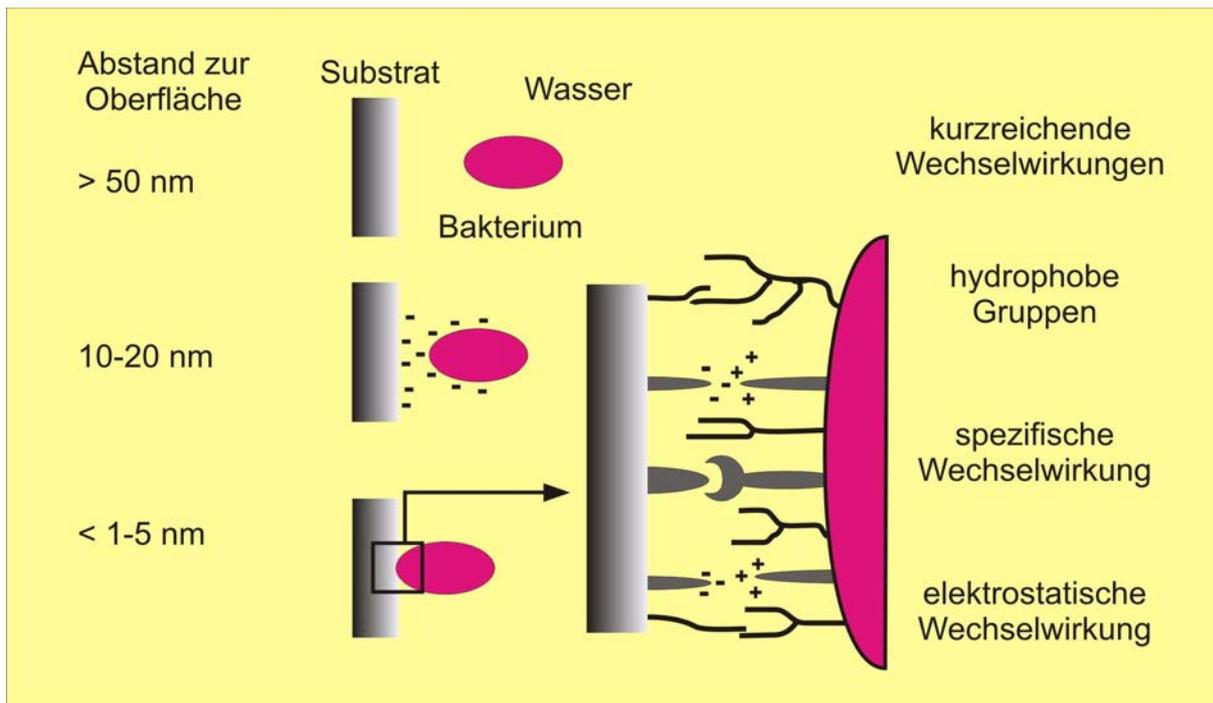


Abb. 10: Mögliche Wechselwirkungen in der Bakterienadhäsion nach *Busscher et al.*¹⁹⁶

Obwohl die Zeitabhängigkeit der Adhäsion bereits von *Zobell*¹⁰⁵ erkannt wurde, ist sie noch weitgehend unverstanden. *Meinders et al* berichten vom zeitabhängigen „aging of bonds“.¹⁹⁷ Diese beobachteten für unterschiedliche Stämme, Substrate und Bedingungen, dass die Bakterienadhäsion anfänglich reversibel verläuft mit einer hohen Desorptionsrate, die innerhalb von 2 bis 4 Minuten abnimmt.

Es gibt im Wesentlichen zwei Theorien, um die komplexen Wechselwirkungen bei der Adhäsion zu erklären. Diese sind: die DLVO Theorie und das so genannte Thermodynamische Modell. Nach der gegenwärtigen Vorstellung kann die Bakterienadhäsion ähnlich der Deposition kolloidaler Partikel betrachtet werden, da die auftretenden Kräfte ähnlich sind. Bakterien werden dabei als lebendige kolloidale Partikel angesehen, die eine etwas höhere Dichte als Wasser besitzen und stabile Suspensionen bilden.¹⁹⁸

Die nach Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek benannte DLVO-Theorie der kolloidalen Stabilität beschreibt die Wechselwirkungen eines sich einer Oberfläche nähernden Partikels.¹⁹⁹ Dabei wird die Änderung der Gibbs'schen Energie als Funktion des Abstandes zwischen den interagierenden Oberflächen betrachtet. Die DLVO-Theorie beschreibt die Netto-Wechselwirkung V_T zwischen der Zelle und Oberfläche als die Summe der Van-der-Waals-Wechselwirkung V_A , die als allgemein anziehend gilt, und der Wechselwirkung der elektrostatischen Doppelschicht V_R , die in der Regel absto-

1 Einleitung

ßend wirkt, da sowohl die bakterielle Zelloberfläche als auch die Substrate in den meisten natürlichen und technischen Systemen negativ geladen sind:

$$V_T = V_A + V_R$$

V_T = Netto-Wechselwirkung

V_A = Van-der-Waals-Wechselwirkung

V_R = elektrostatische Wechselwirkung

Wie aus Abb. 11 ersichtlich wird, beschreibt die DLVO-Theorie zwei Minima, das primäre und sekundäre Minimum, welche ein Organismus bei der Annäherung an eine Oberfläche erreichen muss. Das sekundäre Minimum tritt in einer größeren Entfernung zur Oberfläche auf. Hier sind nur Van-Der-Waals-Kräfte zwischen Bakterium und der Oberfläche wirksam. Starke elektrostatische Repulsion stellt eine hohe Energiebarriere dar, die eine weitere Annäherung von Bakterien verhindert. Die Brownsche Molekularbewegung stellt die notwendige kinetische Energie für die Überwindung der Energiebarriere zur Verfügung. Wenn das Bakterium die elektrostatische Barriere zwischen dem sekundären und primären Minimum überwindet, werden die anziehenden Kräfte wieder stärker und es kann sich der Oberfläche nähern bzw. eine irreversible Bindung ausbilden. Bei der Kompensierung der elektrostatischen Repulsion spielen die Fimbrien eine wichtige Rolle. Diese sind dünner als die Zellen und erfahren eine geringere Abstoßung und können so die Überwindung der Barriere zum primären Minimum vermitteln.²⁰⁰

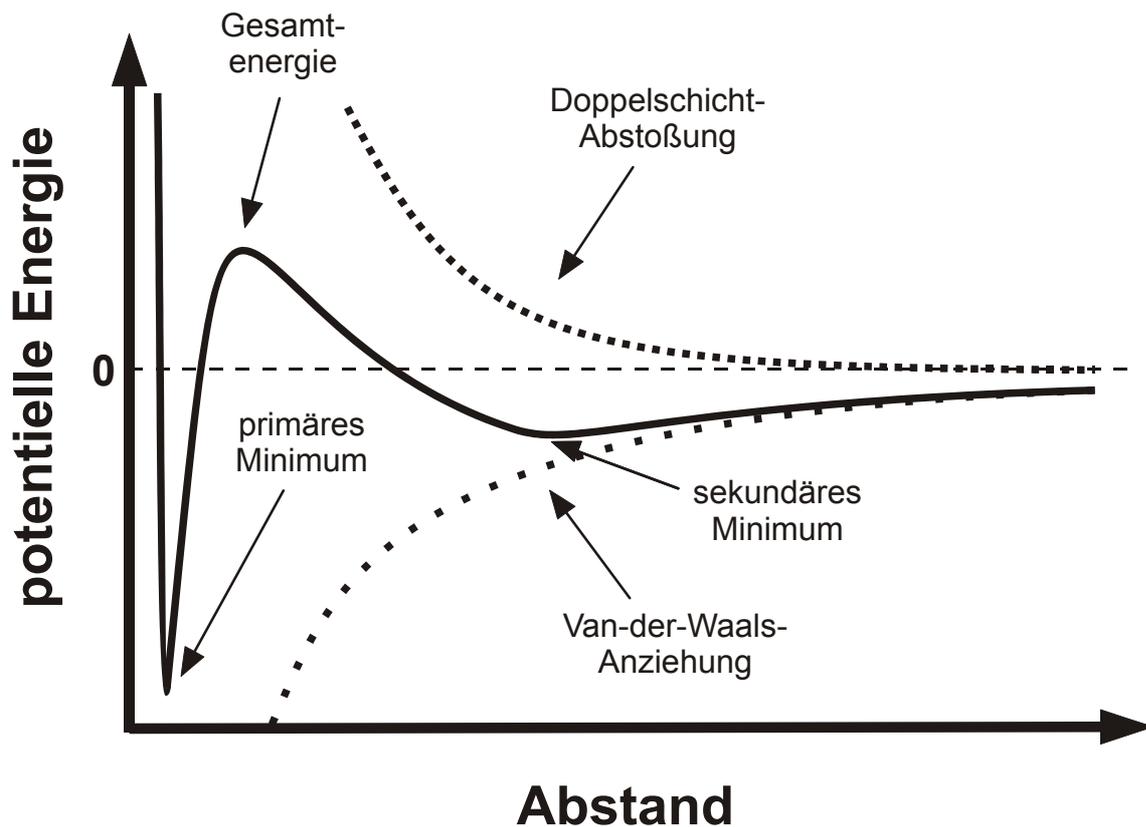


Abb. 11: Energie der Wechselwirkungen zwischen zwei interagierenden gleich geladenen Partikeln in Abhängigkeit von der Separationsdistanz. In unmittelbarer Nähe der Oberfläche existiert ein primäres Minimum, das durch eine Energiebarriere vom sekundären Minimum getrennt ist.

Ist die Doppelschicht sehr dünn, treten trotzdem attraktive Wechselwirkungen zwischen den gleich geladenen Oberflächen auf. Obwohl beide Oberflächen sich abstoßen sollten, erfolgt meistens die Adhäsion. Allerdings sagt die DLVO-Theorie für solche Fälle das Gegenteil voraus. Der Grund hierfür ist, dass die DLVO-Theorie eine homogene, ideal glatte Oberfläche annimmt, die in der Realität nicht existiert. Die bakterielle Oberfläche ist chemisch und strukturell viel komplexer als diejenige kolloidaler Partikel. Die DLVO-Theorie berücksichtigt nicht die unterschiedlichen molekularen Wechselwirkungen im *short-range* Bereich, die beim Kontakt der Polymere der bakteriellen Zelloberfläche mit den Molekülgruppen auf dem Substrat bzw. dem *conditioning film* stattfinden können. Auch Strukturen wie Pilis und Flagellen auf der Zelloberfläche, die entscheidend über die Distanz zwischen einer Zelle und der Oberfläche sowie die Art der Wechselwirkung bestimmen, werden in der DLVO-Theorie nicht berücksichtigt.

1 Einleitung

Daher kann man zusammenfassend sagen, dass die DLVO-Theorie eine der verschiedenen Komponenten des Adhäsionsprozesses beschreibt und als konzeptioneller Rahmen für das Verständnis der Beziehung zwischen *long-range* Wechselwirkungen und Adhäsion dienen kann.

Das Thermodynamische Konzept stellt die zweite Betrachtungsweise zur Beschreibung der Bakterienadhäsion dar.²⁰¹ Dieses Modell sieht die Adhäsion als eine Minimierung der freien Energie des Systems. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen den drei beteiligten Phasen Bakterium, Substrat und dem umgebenden Medium kollektiv in der Größe der freien Energie kombiniert:

$$\Delta F_{\text{adh}} = \gamma_{\text{sb}} - \gamma_{\text{sl}} - \gamma_{\text{bl}} < 0$$

ΔF_{adh} = Freie Energie der Adhäsion

γ_{sb} = Freie Energie der Grenzfläche zwischen dem Bakterium und Substrat

γ_{sl} = Freie Energie der Grenzfläche zwischen Substrat und liquider Phase

γ_{bl} = Freie Energie der Grenzfläche zwischen Bakterium und liquider Phase

Die Adhäsion ist energetisch ungünstig, wenn $\Delta F_{\text{adh}} > 0$.²⁰²

Für die Anwendung dieser Theorie zur Berechnung der Gibbs'schen Adhäsionsenergie ist es notwendig, die Zahlenwerte der Freien Oberflächenenergie für das Substratum, die Bakterien und das umgebenden Medium zu wissen. Allgemein werden diese Größen durch Kontaktwinkelmessungen bestimmt.²⁰³ Da der Kontaktwinkel der Bakterienoberfläche nicht direkt gemessen werden kann, wird alternativ der geschlossene Bakterienfilm charakterisiert. Es ist sehr schwierig die freie Energie der bakteriellen Zelloberfläche exakt zu betrachten,²⁰⁴ denn diese Oberflächen weisen eine komplexe Chemie auf. Die Adhäsion wird dann favorisiert, wenn infolge der Adhäsion die freie Energie pro Flächeneinheit ΔF_{adh} negativ ist, d. h., wenn die Bakterienadhäsion eine Abnahme der freien Energie des Systems bewirkt.

Es wird häufig beobachtet, dass eine wachsende Hydrophobizität des Substratums oder der Zelloberfläche zur Erhöhung der Adhäsion führt. Die Erklärung hierfür bietet wiederum die Thermodynamik: Für die Bakterienadhäsion müssen die auf der Oberfläche adsorbierten Wassermoleküle verdrängt werden. Ist das Wasser fest an der Oberfläche gebunden, ist die Verdrängung energetisch ungünstig. Auf hydrophoben Oberflächen ist das polare Wasser nur schwach gebunden und lässt sich daher

1 Einleitung

leichter verdrängen. Zudem wird der Prozess durch eine Zunahme der Entropie der Wassermoleküle begünstigt.

Der Nachteil der thermodynamischen Theorie ist, dass diese für geschlossene Systeme gilt. Bakterien sind allerdings lebende Organismen, die im ständigen Kontakt und Austausch mit ihrer Umgebung stehen, die Substrate in Energie umwandeln. Der thermodynamische Ansatz wird daher kritisiert als ein Gleichgewichtsmodell, dass allgemein keine kinetische Interpretation erlaubt und zusätzlich die Abstandabhängigkeit von ΔG^{adh} vernachlässigt.²⁰⁵ In vielen Fällen entsprechen die durch das thermodynamische Modell gewonnenen Aussagen daher nicht den experimentellen Ergebnissen,²⁰⁶ während in anderen Fällen diese Theorie in der Lage ist, manche experimentelle Daten der Bakterienadhäsion zu erklären.^{202,207}

Beide, die DLVO-Theorie und die thermodynamische Theorie, sind demnach nicht in der Lage, die Bakterienadhäsion in allen Aspekten zu erklären. Aus diesem Grund wurde die erweiterte DLVO-Theorie, allgemein bekannt als XDLVO-Theorie,²⁰⁸ vorgeschlagen, welche zusätzlich zu den Van-der-Waals und Doppelschicht-Wechselwirkung auch die Lewis Säure-Base-Wechselwirkungen, die auf die Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen polaren Gruppen basieren, berücksichtigt.^{209,205} Da die Bakterien Gruppen dieser Art enthalten ($-\text{NH}_2$, $-\text{COO}^-$, $-\text{SH}$, Wasserstoffbrückenbindungen), kann die Berücksichtigung der Säure-Base-Effekte die klassische DLVO-Theorie verbessern.

$$\Delta G^{\text{adh}} = \Delta G^{\text{vdW}} + \Delta G^{\text{dl}} + \Delta G^{\text{AB}}$$

ΔG^{vdW} und ΔG^{dl} „klassische“ van der Waals und Doppelschicht Wechselwirkungen

ΔG^{AB} Säure-Base-Wechselwirkungen.²¹⁰

All diese Wechselwirkungen sind abhängig von der Separationsdistanz zwischen den interagierenden Körpern sowie von deren Geometrie.

Die erweiterte DLVO-Theorie scheint ein viel versprechendes Modell zu sein, wurde aber noch nicht ausreichend getestet. In manchen Fällen kann diese Theorie eine qualitative Vorhersage über experimentelle Ergebnisse liefern. Allerdings bleibt die quantitative Bewertung des Adhäsionsverhaltens durch eine physikochemische Betrachtung ohne Berücksichtigung biologischer Faktoren aufgrund der oben angesprochenen Komplexität und Dynamik des Systems fast unmöglich.

Die Konsequenz dieser Komplexität ist die Tatsache, dass die Bakterien auf unterschiedliche Art und Weise mit einer Oberfläche in Wechselwirkung treten können. In

allen Studien wird oft von einer homogenen Oberfläche ausgegangen. Dazu kommt oft ein sehr vereinfachtes Modell, welches Bakterien als 1 µm große, weiche Partikel behandelt. Diese Annahmen entsprechen jedoch bei weitem nicht den realen Verhältnissen.

1.3.2.1 Bakterienadhäsion beeinflussende Faktoren

Bakterienadhäsion wird von folgenden Faktoren beeinflusst: Oberfläche, Medium und Art der Spezies. Diese Faktoren werden wiederum von zahlreichen Parametern beeinflusst, wie in Abb. 12 gezeigt.

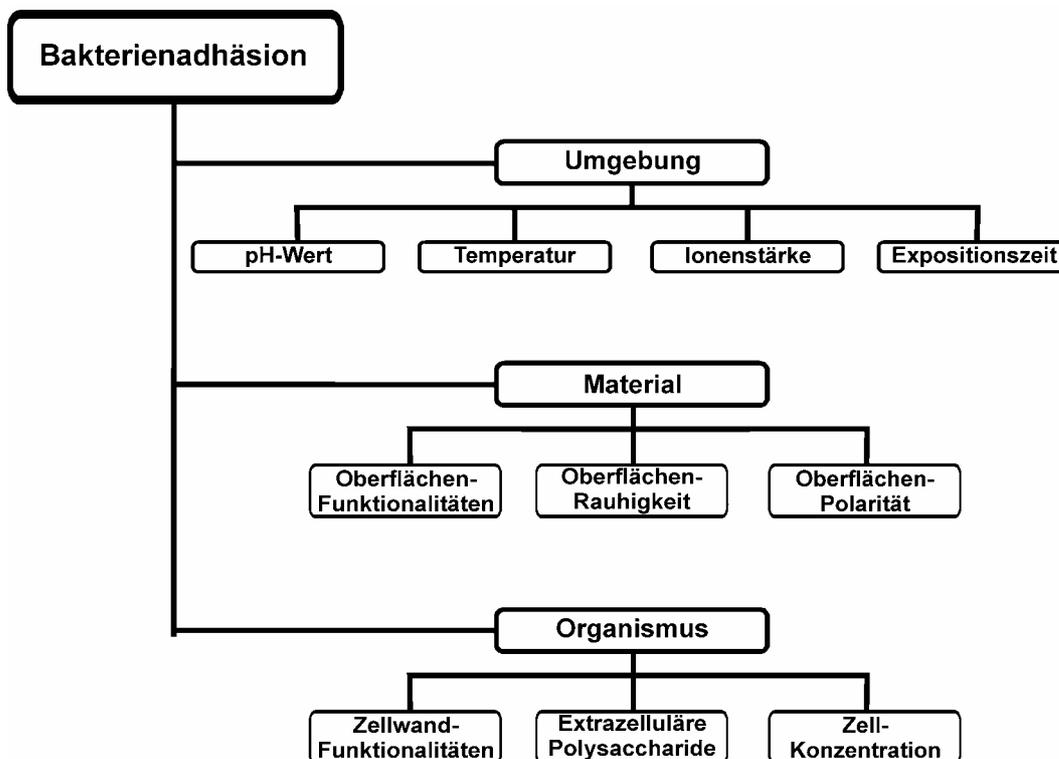


Abb. 12: Bakterienadhäsion beeinflussende Faktoren.

In den nachfolgenden drei Abschnitten wird der Einfluss der Oberfläche, der Umgebung und der Spezies auf die Bakterienadhäsion erläutert.

1.3.2.1.1 Oberfläche

Die Materialoberfläche spielt eine sehr wichtige Rolle in der Stimulierung der Genexpression der Bakterien. Die Bakterienadhäsion kann auf unterschiedlichen Oberflächen erfolgen. Die Eigenschaften der Materialoberflächen werden üblicherweise kategorisiert in Oberflächenchemie, Oberflächentopographie und Oberflächenenergie. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass Rauheit die mikrobielle Kolonisation begünstigt.²¹¹ Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass ein rauher Körper im Gegensatz zu einem glatten eine größere Oberfläche aufweist und im angeströmten Zustand eine geringere Scherspannung an der Grenzfläche zu Flüssigkeit auftritt, die eine Ablösung der Zelle begünstigen würde. Allerdings ist eine Quantifizierung dieses Effekts noch nicht gelungen. Daher ist es noch nicht möglich, eine Oberfläche maßgeschneiderter Textur mit anti-adhäsiven Eigenschaften zu erzeugen.

In mehreren Untersuchungen wurde außerdem herausgefunden, dass die meisten Bakterien sehr viel schneller und bereitwilliger auf hydrophobe und unpolare Oberflächen, wie Teflon, als auf hydrophilen Oberflächen, wie Glas oder Metallen, adhären. Adhäsionsexperimente auf SAMs haben ergeben, dass die hydrophoben Monoschichten eine erhöhte Adhäsion zeigen.²¹² Dabei wurden unterschiedliche Adhäsionsmechanismen für *Pseudomonas fluoreszens* für hydrophile und hydrophobe Monoschichten beobachtet. Während an den hydrophilen Oberflächen sich anfangs die Zellorganellen, Flagellen, anlagern, erfolgt die Adhäsion an den hydrophoben Oberflächen durch den Zellkörper.²¹²

Bei Adhäsionsexperimenten mit *E.coli* auf NH₂- und CH₃-terminierten SAMs wurde herausgefunden, dass die Oberflächenzusammensetzung auch die Verteilung der adhärenierten Bakterien und die Adhäsionskinetik beeinflusst. Auf NH₂-terminierten Monoschichten entstanden baumartige Biofilme, während auf CH₃-terminierten Monoschichten die Bakterien *cluster* bildeten.²¹³

Oberflächenladungen spielen eine große Rolle in der Bakterienadhäsion. Bakterien haften bereitwilliger an positiv geladene als an negativ geladene Oberflächen.^{214,215}

Es wurde beobachtet, dass *E. coli* und *P. aeruginosa* nach der Adhäsion auf positiv geladenen Poly(methacrylat)-Oberflächen kaum ein Wachstum zeigen, obwohl *S. aureus* und *S. epidermidis* in der Lage waren, auf diesen Oberflächen zu wachsen.²¹⁴

Auf negativ geladenen Poly(methacrylat)-Oberflächen konnten alle vier Organismen wachsen. Diese Beobachtungen kann man möglicherweise dadurch erklären, dass

die Bindung der unter physiologischen Bedingungen in der Regel negativ geladenen Bakterien^{216,217} an die positiv geladenen Oberflächen durch elektrostatische Wechselwirkung sehr stark ist und die für das Wachstum notwendige Verlängerung und die Teilung der Zellen gehemmt wird.²¹⁴

Metalloberflächen besitzen eine hohe Oberflächenenergie und sind negativ geladen, während hydrophobe Polymere wie Teflon oder Polyethylen eine niedrige Oberflächenenergie aufweisen. Allgemein gilt, dass die hydrophilen Materialien resistenter gegenüber Bakterienadhäsion sind als die hydrophoben.²¹⁸ Allerdings muss eine *sub*-Einteilung der hydrophilen Materialien vorgenommen werden, denn sauberes Glas ist sehr hydrophil, aber gleichzeitig ein bevorzugtes Material für Zell- und Bakterienadhäsion.

Der Einfluss der Oberflächenzusammensetzung lässt sich gut an unterschiedlich funktionalisierten SAMs als Modelloberflächen studieren. Die Adhäsion von *S. aureus* auf CH₃, COOH, OH, EG₃ terminierten SAMs nimmt in der Reihenfolge CH₃>COOH>OH>EG₃ ab. Demzufolge findet die geringste Kolonisation auf EG₃ terminierten SAMs statt.²¹⁹

1.3.2.1.2 Umgebung/Medium

Auch Parameter wie pH-Wert, Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit, hydrodynamische Bedingungen, Expositionszeit oder Einwirkung anderer Umweltfaktoren beeinflussen die Bakterienadhäsion und Biofilmbildung. Es gibt unterschiedliche Studien zum Einfluss jedes einzelnen Parameters auf die Bakterienadhäsion. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass beim Überschreiten der optimalen Schergeschwindigkeit die Bakterien ihre Wachstumsrate, Morphologie, Zellgröße und Zelldichte anpassen.²²⁰ Die Konzentrationen von Elektrolyten, wie KCl, NaCl und der pH-Wert haben einen großen Einfluss auf die Bakterienadhäsion.²²¹⁻²²³ Variationen der Ionenstärke und des pH-Werts führen zur Änderung der Oberflächeneigenschaften sowohl bei den Bakterien als auch beim Substrat. Es wurde gefunden, dass die Zellen bei pH= 7,4 und Ionenstärke 0,5 M die geringste Oberflächenhydrophobizität aufweisen. Eine größere Hydrophobizität und die stärkste Adhäsion war im Bereich pH=2,2 bis 4 und Ionenstärke von 1 M zu beobachten.²²¹ Viele Untersuchungen bestätigen den Zu-

sammenhang zwischen der Ionenstärke und Bakterienadhäsion, was auch konsistent mit der DLVO-Theorie ist.

Das Zusammenspiel dieser Faktoren entscheidet darüber, ob aus einer reversiblen Anheftung eine irreversible Bakterienadhäsion resultieren kann.

1.3.2.1.3 Eigenschaften der bakteriellen Oberfläche (Zellwand)

Eine erfolgreiche Überlebensstrategie der Bakterien erfordert die ständige Wahrnehmung der Umgebung und eine schnelle Antwort auf die bestehenden Reize. Dabei kommt der bakteriellen Zelloberfläche eine große Bedeutung zu. Daher ist nicht überraschend, dass die Bakterien die Hauptmenge ihrer metabolischen Energie in die Synthese und Erhaltung der makromolekularen Komponenten der Zelloberfläche investieren.

Allgemein benutzen Bakterien drei wichtige Stoffklassen für die Adhäsion: Polysaccharide, Lipopolysaccharide und Proteine.

Es wird vermutet, dass die EPS, die an der Adhäsion beteiligt ist,¹⁷⁸ eine Präkonditionierung²²⁴ der Oberfläche unterstützt, und somit die Adhäsion stärker favorisiert wird. Auch der Umfang und die Geschwindigkeit des Adhäsionsprozesses werden maßgeblich von den Eigenschaften der bakteriellen Zelloberfläche beeinflusst. Die bakterielle Zellwand weist eine äußerst variable Natur auf. Die bakterielle Zelle ist ein sehr komplexes Milieu, weil diese in der Regel zahlreiche, sehr unterschiedliche Substanzen enthält, von denen jedoch die meisten nur in geringer Konzentration vorhanden sind. Daher sind die einzelnen Wechselwirkungen zwar schwach, kumulativ jedoch ziemlich stark.

Die meisten Bakterien sind unter physiologischen Bedingungen negativ geladen.²¹⁷ Allerdings ändert sich ihre Ladung in Abhängigkeit vom Medium, dem pH-Wert, der Ionenstärke des Puffers und der Wachstumsphase des Organismus.

Tabelle 2 enthält einige Zellwandkomponenten, die typischerweise in den Bakterien vorkommen. Zusätzlich sind Funktionalitäten aufgeführt, die für die Oberflächenladung der bakteriellen Zelle verantwortlich sind. Es ist offensichtlich, dass die elektrostatischen Eigenschaften meistens von Carboxyl- oder Phosphatgruppen bestimmt werden.

1 Einleitung

Verbindung	Funktionelle Gruppen
Proteine	Carboxyl-, Amino-
Murein	Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl-
Teichonsäure	Phosphat-, Hydroxyl-, Carboxyl-
Polysaccharide	Hydroxyl-
Lipopolysaccharide	Amino-, Hydroxyl-, Phosphat-

Tabelle 2: Komponente der bakteriellen Zellwand.

Außerdem besitzen sie hydrophobe Oberflächenkomponenten, wie beispielsweise Fimbrien. Diese entstehen aus Proteinen der äußeren Membran und werden 0,2 bis 20 μm lang und 4 bis 7 nm dick. Auf der Bakterienoberfläche existieren in der Regel 100-1000 Fimbrien.^{225,226} Es wird angenommen, dass die Fimbrien bei den Gram-negativen Bakterien die wichtigsten adhäsiven Strukturen sind. Die Fimbrien stehen auch im direkten Zusammenhang mit der Virulenz. So sind die Gram-negativen Bakterien mit Fimbrien infektiöser als die ohne Fimbrien.²²⁷

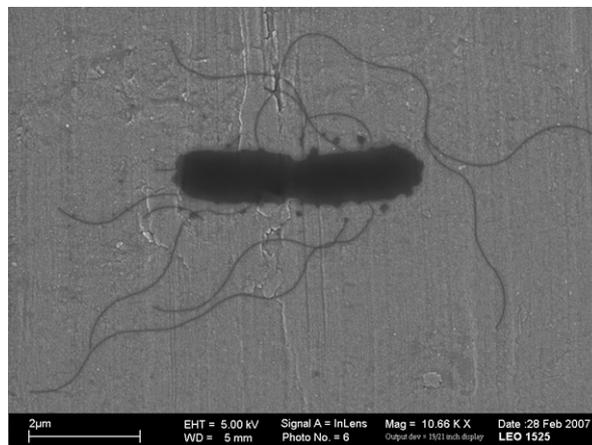


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer sich teilenden Zelle von *E. coli* WT.

Abb. 13 macht deutlich, dass die Zellorganellen aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung dem eigentlichen Zellkörper bessere Fortbewegungs- und Wechselwirkungsmöglichkeiten eröffnen.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Behandlung adhärerter Zellen mit proteolytischen Enzymen eine merkliche Ablösung der gebundenen Zellen verursachten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Proteinstrukturen in der Zelladhäsion eine

Rolle spielen.^{228,229} *Herald* und *Zottola* fanden, dass die Zugabe von Stoffen wie Concanavalin A oder Natriummetaperiodat, die Kohlenhydrate binden oder zersetzen, eine Abnahme der Adhäsion von *Pseudomonas fragi* auf Stahl bewirkt.²³⁰ Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutungen über die Beteiligung von EPS an der Adhäsion.^{178,224}

Allgemein wird angenommen, dass die Bakterien mit einer hydrophoben Oberfläche gut an hydrophoben Materialien adhären, wohingegen Bakterien mit einer hydrophilen Oberfläche hydrophile Substrate bevorzugen.²¹⁸ Außerdem ist bekannt, dass hydrophobe Bakterien generell eine stärker ausgeprägte Tendenz zur Adhäsion aufweisen als hydrophile.²²⁷

Die bakterielle Zellwand ist eine hochdynamische Oberfläche, welche im ständigen Austausch mit der Umgebung steht und auf Änderungen im umgebenden Medium rasch reagiert. Die Vielfalt der Oberflächenpolymere und die daraus resultierende große Variationsmöglichkeit der Oberflächeneigenschaften führen dazu, dass letztlich praktisch alle Oberflächen besiedelt werden können.

Da die an der Adhäsion beteiligten Zelloberflächenstrukturen lokal agieren, bleibt es schwierig, diese in physiko-chemische Modelle einzubeziehen. Daher ist fraglich, ob die Bakterienadhäsion jemals durch einen allgemein gültigen Mechanismus beschrieben werden kann.²³¹

1.3.3 Biorepulsive Monoschichten

Es gibt derzeit kein Material, das unter entsprechenden Voraussetzungen nicht von Mikroorganismen besiedelt werden kann.⁷⁴ Materialwissenschaftler versuchen seit langem, eine Beziehung zwischen der chemisch-physikalischen Struktur von Oberflächen und ihrer Affinität zur Bindung biologischer Materie herzustellen und zu kontrollieren.

SAMs eignen sich gut zur Erforschung der Bakterienadhäsion, da man mit ihrer Hilfe leicht chemisch unterschiedlich funktionalisierte und sogar strukturierte Grenzflächen generieren kann, die gegebenenfalls die Größenordnung der physikalischen Dimension von Mikroorganismen aufweisen können. Obwohl Goldoberflächen in biologischen Systemen eigentlich keine Rolle spielen, eignen sich Thiolat-SAMs auf Gold sehr gut zur Untersuchung von Proteinadsorptions- sowie Bakterienadhäsionsvor-

gängen. So ist es möglich, SAMs so zu funktionalisieren, dass sie z.B. -OH, -COOH, -NH₂ und andere Gruppen exponieren, die ubiquitär auf Zelloberflächen vorkommen. Neben oberflächengebundenen Gruppen, die eine Anbindung von Biomolekülen bzw. Zellen vermitteln, wurde auch eine Vielzahl von Kopfgruppen untersucht, die eine solche Wechselwirkung unterbinden. Solch biorepulsives Verhalten wurde zuerst von *Prime* und *Whitesides* bei oligoethylenglycolterminierten Thiolat-SAMs beschrieben.²³² Da die Proteinadsorption oft das primäre, induzierende Ereignis in der Bakterienadhäsion darstellt, ist die Proteinresistenz allgemein als wichtige Grundvoraussetzung für die Bakterienresistenz einer Oberfläche akzeptiert.²³³

1996 berichteten *Ista et al.* von der Adhäsion von *Delya marina* und *Staphylococcus epidermides* auf SAMs mit CH₃, CF₃, COOH und EG₆ Kopfgruppen.²³⁴ Es wurde beobachtet, dass die Adhäsion von *D. marina* auf methylterminierte SAMs am stärksten ausgeprägt war, wohingegen *S. epidermides* carboxyterminierte SAMs bevorzugte. Auf den EG₆-terminierten SAMs war hingegen keine Adhäsion zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bakterienadhäsion durch die Änderung der Materialeigenschaften kontrolliert werden kann. *Wiencek* und *Fletcher* führten eine systematische Untersuchung der Oberflächenchemieeffekte auf die Bakterienadhäsion durch. Als Substrate wählten sie SAMs mit polaren OH- und unpolaren CH₃-Kopfgruppen. Sie berichteten, dass die Zahl der adhärenierten Zellen mit der Hydrophobizität des Testsubstrats stieg.²³⁵

Der Effekt der chemischen Modifizierung auf der Bakterienadhäsion wurde auch in einer Adhäsionsstudie mit *Staphylococcus aureus* auf unterschiedlich funktionalisierten SAMs untersucht. Auf EG₃-terminierten Systemen wurde die geringste Adhäsion gefunden, gefolgt von -OH-terminierten SAMs. Die Adhäsion auf -COOH und -CH₃-terminierten SAMs war hingegen deutlich stärker ausgeprägt.²¹⁹

OEG- und PEG-terminierte SAMs stellen bis heute die am stärksten wirksamsten Systeme zur Unterdrückung der Proteinadsorption bzw. der Bakterienadhäsion dar.²³⁶⁻²³⁹ Neben dem direktem Immobilisieren entsprechend funktionalisierter Moleküle auf Materialien wie Gold oder SiO₂ können EG-haltige, biorepulsive Oberflächen auch durch Polymerisation EG-haltiger Monomere auf Siliziumoxid,²⁴⁰ Gold,²⁴¹ sowie Thiolat-SAMs auf Gold²⁴² erzeugt werden.

Neben OEG ist eine Vielfalt anderer Kopfgruppen bekannt, die resistent hinsichtlich unspezifischer Proteinadsorption bzw. Bakterienadhäsion sind. Zu nennen wären hier vor allem Oligophosphorylcholine,^{243,244} Polycarboxybetaine,²⁴⁵ Sulfobetaine,²⁴⁶

1 Einleitung

Oligopropylensulfoxide²⁴⁷ und Polyglycerol.²⁴⁸ Mit der Ausnahme von Polyglycerol-terminierten SAMs, die eine den OEG-SAMs vergleichbare Biorepulsivität aufweisen, reduzieren die oben aufgezählten Kopfgruppen die Bioadsorption zwar, unterdrücken sie jedoch in vielen Fällen nur unvollständig. Diese geringere Wirksamkeit ist insbesondere bei der Adhäsion von Bakterien zu beobachten.²⁴³

Weiterhin berichteten *Chi et al.* kürzlich über SAMs aus thiolmodifiziertem Tween 20, einem PEG-basierten Tensid, das ebenfalls Schichten auf Gold bildet, die resistent gegenüber unspezifischer Proteinadsorption sind.²⁴⁹

Neben ihrer hohen Wirksamkeit bietet der Einsatz von PEG bzw. OEG als biorepulsive Beschichtungssubstanzen einige weitere Vorteile: Die entsprechenden Materialien sind im Regelfall nicht toxisch und sogar von *US Food and Drug Administration* sowohl für orale als auch lokale Applikation zugelassen.²⁵⁰ Ein gravierendes Manko EG-basierter Kopfgruppen ist ihre Empfindlichkeit gegen oxidativen Abbau, insbesondere beim Einsatz *in vivo*. Während PEG-Lösungen in nichtbiologischen Medien^{251,252} langzeitstabil sind, zeigen sie in Körperflüssigkeiten wie Speichel und Urin eine deutlich reduzierte Lebenszeit. So wurde von *Busscher et al.* gefunden, dass PEG-Schichten nur 48 h der Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* HBH 276 standhielten.²⁵³ Als Ursache für die geringere Stabilität der Verbindungen *in vivo* wurde der enzymatisch katalysierte, oxidative Abbau der PEGs unter Bildung von Aldehyden und Carbonsäuren identifiziert.²³⁹

Langzeitstabilitätsuntersuchung von EG₃C₁₁SH/Au SAMs in PBS und Kalbsserum durch Kontaktwinkelmessungen und XPS haben weiterhin gezeigt, dass die Anwesenheit von Sauerstoff im Umgebungsmedium die Lebensdauer der Schichten zusätzlich reduziert.²⁵⁴ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sauerstoff die Oxidation des Thiolat-Schwefels bewirkt, was dann zu einer Desorption der Schicht vom Gold führt. Ein weiterer Nachteil OEG-basierter Systeme liegt in ihrer relativ geringen thermischen Stabilität begründet.²⁵⁵ Diese limitiert insbesondere den Einsatz im medizinischen und mikrobiologischen Bereich, wo thermische Sterilisation eine bedeutende Rolle spielt.

Da Polyglycerole (PG) sowohl thermisch stabiler sowie auch weniger empfindlich gegen biologischen Abbau sind, stellen PG-terminierte SAMs im medizinischen und mikrobiologischen Bereich eine echte Alternative zu PEG-SAMs dar.

1.3.4 Ursachen für Biorepulsivität

Trotz intensiver Forschung ist die molekulare Basis der Biorepulsivität ethylenglycol-terminierter SAMs weitgehend unverstanden. Nach der Analyse empirischer Befunde bei der systematischen Untersuchung an resistenten funktionalen Gruppen haben *Ostuni et al.*²³⁹ folgende strukturellen und physikalisch-chemischen Kenndaten formuliert, die für die Biorepulsivität notwendig sind:

1. Die Kopfgruppe muss elektrisch neutral sein, ein zwitterionischer Charakter ist jedoch unproblematisch.
2. Das terminale Ende der Kopfgruppe muss polar sein.
3. Das Rückgrat der Kopfgruppe muss hydrophil sein, zudem Wasserstoffbrückenakzeptor-, aber keine Wasserstoffbrücken-Donor-Eigenschaften besitzen.
4. Bei der Verwendung von Oligomeren als Kopfgruppen steigt der repulsive Charakter mit der Anzahl der Monomereinheiten im Rückgrat.

Es gibt unterschiedliche Modelle zur Erklärung der Biorepulsivität. Eine allgemein anerkannte Theorie geht von der sterischen Repulsion^{256,257} aus, die bei der Wechselwirkung mit dem Protein eintritt. PEG-Moleküle können als mobile, hochhydratisierte, elastische Kugeln angesehen werden. Die hohe Kettenmobilität ermöglicht nur einen kurzen Kontakt mit den Proteinmolekülen, der für eine bindende Wechselwirkung nicht ausreichend ist. Das PEG-Rückgrat ist über Wasserstoffbrückenbindungen sehr komplex mit den Wassermolekülen verbunden. Daraus resultieren Wasser *cluster*, die sich in die wässrige Phase hinein erstrecken.

Chromatographiestudien zeigen, dass PEG im Wasser viel größer ist als andere Moleküle vergleichbarer Masse.²⁵⁸ Die Beweglichkeit der PEG-Ketten wurde durch Relaxation-Zeit Studien belegt.²⁵⁹ Ein sich einer PEG-Schicht näherndes Protein kann zwar diese temporär deformieren, aber nicht darauf adsorbieren. Eine Proteinadsorption auf der PEG-Oberfläche hätte zwei Konsequenzen: PEG-Ketten würden gegen die Oberfläche, ohne Wassermoleküle zu verlieren, gestaucht werden, was entropisch ungünstig wäre, resultierend aus der eingeschränkten Bewegung der sonst hochmobilen, hydratisierten Ketten. Diese unvorteilhafte Entropieänderung könnte überkompensiert werden, wenn die Wassermoleküle von den PEG-Ketten abgerissen würden, was wiederum aus enthalpischen Gründen nicht passiert.^{256,257}

1 Einleitung

Der Effekt der osmotischen Repulsion ist sowohl abhängig von der Kettenlänge als auch von der Dichte der Moleküle auf der Oberfläche. Im Gegensatz zu PEG-Schichten und PEG-terminierten SAMs lässt sich mit dieser Theorie die Biorepulsivität der OEG-SAMs nicht erklären, da die EG-Ketten zu kurz sind, um sterische Repulsion zu zeigen.

Mit Hilfe der *single-chain-mean-field theory* (SCMFT) stellte Szleifer eine Theorie auf, die auch auf OEG-terminierte Systeme anwendbar ist. Die Theorie sagt aus, dass die PEG- oder OEG-Ketten der oberflächengebundenen Schicht mit freien Adsorptionsplätzen des Substrats in attraktive Wechselwirkung treten und dadurch potentielle Bindungsstellen für das Protein blockieren. Die Interaktion der PEG-Ketten mit dem Protein wird analog zur sterischen Repulsion beschrieben, allerdings als wenig von der Kettenlänge abhängig.^{260,261}

Durch die Anwendung der Theorie der Kosmotropen entstand ein weiteres Modell, das die OEG- bzw. PEG-Ketten in der Proteinlösung als Kosmotrope beschreiben.²⁶²⁻²⁶⁴ Kosmotrope (Ordnungsbildner) sind polare Verbindungen, die sich durch Hydratisierung mit Wasser mischen. Dabei bilden sie stärkere Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser aus als die Wassermoleküle im *bulk*-Wasser untereinander. Dadurch kommt es zur *cluster*-Bildung im Wasser und der Ordnungsgrad des Systems erhöht sich. Folgende Effekte resultieren daraus: Im *bulk*-Wasser kommt es einerseits zur Absenkung der Enthalpie, andererseits verursacht die *cluster*-Bildung eine Abnahme der Entropie. Diese ungünstige Entropieänderung wird jedoch durch die positive Mischungsentropie, entstanden aus der Vermischung von Wasser und Kosmotrop, überkompensiert.

Wassermoleküle in der Hydrathülle eines Proteins weisen eine im Vergleich zum *bulk*-Wasser stark geordnete Struktur auf. Eine weitere Erhöhung des Ordnungsgrades dieses Hydratwassers durch ein Kosmotrop wäre entropisch äußerst ungünstig. Hieraus resultiert, dass sich das hydratisierte Protein bevorzugt an Kosmotrop-freien Stellen im System aufhält, also dort, wo keine OEG-Gruppen zugegen sind. Man bezeichnet das Protein in diesem Zusammenhang auch als Ausschlussvolumen.

Laut einiger Simulationsstudien soll durch die starke Wechselwirkung zwischen Ethylenglycolgruppen und Wassermolekülen auf der SAM-Oberfläche ein festgebundener Wasserfilm entstehen, der den Kontakt zwischen der Monoschicht und dem Protein unterbindet.^{265,266} Die vorgeschlagene Korrelation zwischen Proteinresistenz

und der fest gebundenen Wassermenge konnte jedoch weder durch andere theoretische Arbeiten noch durch Neutronenreflektivitätsmessungen an biorepulsiven Monoschichten bestätigt werden, die eher auf eine signifikant verminderte Wasserdichte an der Grenzfläche hindeuten.^{267,268}

Aktuelle molekulardynamische Simulationen dagegen sagen für das Wasser der Grenzfläche eine dem *bulk*-Wasser ähnliche Struktur vorher.²⁶⁹

Die osmotische Repulsion, das Fehlen von proteinbindenden Stellen, hohe Hydrophilie und hohe molekulare Mobilität werden als Ursachen für die Biorepulsivität von PEG in mehreren Theorien diskutiert.^{238,270,271} Oft werden PEGylierte Schichten als beinahe flüssige Aggregate mit hoch-mobilen oligomeren Segmenten dargestellt.²⁷²

Zum besseren Verständnis der Biorepulsivität haben die systematischen Untersuchungen der OEG-Grenzflächenstruktur-bestimmenden Parameter, wie die Kettenlänge, Packungsdichte und Konformation, beigetragen. *NEXAFS*-Messungen und *molecular modelling* an dehydratisierten EG-terminierten SAMs haben gezeigt, dass die Struktur des EG-Teils maßgeblich von der Kettenlänge abhängig ist.²⁷³ Während die OEG-terminierten Alkanthiolat-SAMs auf Gold mit drei bis sechs EG-Einheiten eine kristalline Struktur mit helicaler Konformation der Kopfgruppe aufweisen, bewirkt eine größere Kettenlänge eine Veränderung der Kopfgruppenstruktur von kristallin zu amorph.²⁷³ Auch das Substrat hat einen Einfluß: Während auf Gold für EG₃-terminierte Alkanthiolat-SAMs eine kristallin-helicale Struktur beobachtet wurde, sind die SAMs auf Silber in dichter gepackter, kristalliner *all-trans*-Konformation angeordnet.²⁷⁴⁻²⁷⁶ Daraus lässt sich schließen, dass die Packungsdichte der Monoschicht bestimmend für die Konformation der Kopfgruppe ist. Außerdem scheint die Proteinresistenz der OEG-terminierten Alkanthiolat-SAMs mit der Konformation der Kopfgruppen zu korrelieren. In der Tat sind OEG-terminierte Alkanthiolat-SAMs auf Gold gegenüber Fibrinogen-Adsorption resistent, während die dicht gepackten OEG-terminierten SAMs auf Silber in *all-trans*-Konformation der Kopfgruppe die Adsorption dieses Proteins nicht unterbinden konnten.²⁷⁵

Es ist offensichtlich, dass der Hydrogel-Zustand der PEG-Schicht wichtig für den biorepulsiven Effekt ist. Hydrogele bestehen aus losen und flexiblen Polymerketten, die große Mengen relativ fest eingebundene Wassermoleküle enthalten. Dem Wasser kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu. Theoretische Rechnungen und Monte Carlo Simulationen für EG-terminierte Alkanthiolat-SAMs auf Gold haben ergeben, dass Wasser im EG-Teil eingelagert und durch zwei- oder

1 Einleitung

dreifache Wasserstoffbrückenbindung pro Wassermolekül an O-Atome der EG-Gruppe vorliegt.^{274,266} Dieses Ergebnis kann als intramolekulare Vernetzung durch Wasserstoffbrückenbindungen angesehen werden.²⁷⁷ Die EG₃-OMe SAMs auf Gold wurden durch *IR-VIS sum frequency generation* (SFG) im Bereich der C-H Schwingung untersucht. Es wurde eine Reduktion der Intensität der Methyl-Schwingung und eine Zunahme der Intensität der Methylen-Schwingung beobachtet. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Wasser in die EG-Schicht penetriert und den Ordnungsgrad vermindert.²⁷⁸ Dies ist in der dichten SAM-Phase auf dem Silber nicht möglich.

Ergebnisse moleküldynamischer Rechnungen deuten darauf hin, dass die Bindung der Wassermoleküle in der OEG-Schicht stärker ist als die Bindung zwischen den Wassermolekülen in der *bulk*-Phase. Dieses und die oben beschriebenen praktischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Aufrechterhaltung der starken Wechselwirkung der eingelagerten Wassermoleküle mit den OEG-Einheiten der Schicht gestörte helicale oder stärker amorphe Konformationen der EG-Ketten erforderlich sind. Der Grund hierfür ist, dass nur bei Vorhandensein solcher Konformationen die Ausbildung der größtmöglichen Anzahl stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und der Schicht möglich ist.

Da auch die Bakterien keine abgesonderten Proteine auf der Oberfläche deponieren können, wird die Bakterienadhäsion durch oberflächengebundene PEG-Moleküle wirksam verhindert. Neben der Unterdrückung der Proteinadsorption wird die Reduktion der Bakterienadhäsion auch auf die sterische Repulsion zwischen Teichonsäure (bei den Gram-positiven Bakterien) oder Lipopolysaccharide (bei den Gram-negativen Bakterien) Hydrogelen auf der Bakterienoberfläche und dem Hydrogel auf den modifizierten Oberflächen zurückgeführt.²⁷⁹

Es kann als gesichert angesehen werden, dass die Ethylenglycolsegmente im Wasser unterschiedliche Kettenstruktur annehmen und dass unterschiedliche Konformationen unterschiedlich mit dem Protein in Wechselwirkung treten.²⁷⁵

Es gibt noch Kontroversen darüber, was ganz genau eine ideale PEG Schicht ausmacht, d. h. welche Wirkungsweise für die Biorepulsivität vorhanden sein sollte.²⁸⁰ Es fehlt eine einheitliche, beständige Theorie. Allgemein kann man davon ausgehen, dass unterschiedlich Proteinabweisungsmechanismen wirken, da es sehr wahr-

scheinlich ist, dass die reale Situation viel komplexer ist als durch die vereinfachten Modelle dargestellt wird.

1.3.5 Bakterien

Bakterien gehören zu den einfachsten Lebewesen und sind die kleinsten zellulären Organismen mit einer einfachen Zellstruktur. Die bakterielle Diversität wird auf 10^7 - 10^9 geschätzt,²⁸¹ wobei bis jetzt nur ein geringer Teil isoliert und kultiviert wurde.²⁸² Meistens besitzen sie eine typische Gestalt bzw. Morphologie. Nach der Morphologie lassen sich Bakterien in Kokken, Stäbchen und Spiralen einteilen. Die meisten Bakterien in der Natur sind hydrophil mit $\Theta_w < 60^\circ$ (vgl. Kapitel 3.2.1).²⁸³

In der Regel sind Bakterien 0,5-5 μm lang und 1 μm dick. Als typische Prokaryonten besitzen Bakterien eine Zelle ohne Kern und sind wie folgt aufgebaut (Abb. 14):

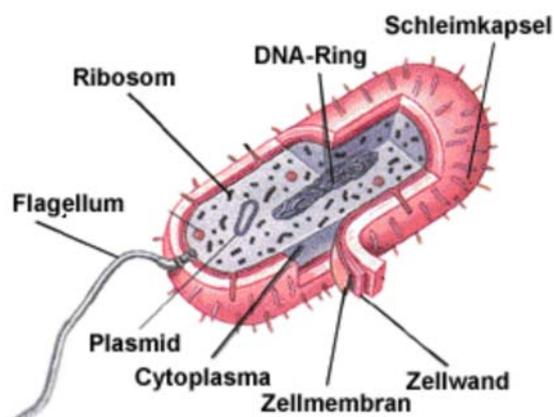


Abb. 14: Typischer Aufbau einer bakteriellen Zelle.²⁸⁴

Sie besitzen eine starre Zellwand, deren Aufbau von Art zu Art variiert. Als Träger der Erbinformation fungieren eine zirkuläre und stark verdrillte DNA und kleine DNA-Ringe, die so genannten Plasmide. In den Ribosomen findet die Proteinsynthese statt.

Prokaryontische Zellen, beispielsweise *E.coli*, bestehen zu 70-85% aus Wasser. Die Trockenmasse enthält 96% polymere Substanzen, hauptsächlich Proteine. Eine *E.coli*-Zelle ist beispielsweise in der Lage, 4288 verschiedene Proteine zu syntheti-

1 Einleitung

sieren, von denen nur 2700 bekannt sind.¹⁴¹ Bis zu 4% der Trockenmasse sind monomere Bausteine, wie Aminosäuren und Zucker.

Für das Wachstum benötigen Bakterien ein aquatisches Medium und darin gelöste Nährstoffe. Bemerkenswert ist ihre metabolische Aktivität, die es ermöglicht, schnell auf chemische und physikalische Veränderungen des unmittelbaren Mediums zu reagieren. Durch eine Reihe von Orientierungsreaktionen, die als Taxien bezeichnet werden, gelingt es den Bakterien, gezielt auf ihre Umwelt zu reagieren und nach Orten mit den günstigsten Lebensbedingungen zu suchen, an denen sie überleben und sich möglichst gut vermehren können.

Bakterien sind in der Lage, ihre Morphologie zu ändern, um sich an die Nanotopographie einer Materialoberfläche anzupassen.⁹⁷ Diese Flexibilität ermöglicht ihnen, in natürlichen Habitaten auf nahezu allen Grenzflächen zu wachsen. Hierzu gehören neben mineralischen Oberflächen auch Wurzeln und andere Pflanzenoberflächen, sowie die Oberflächen höherer Organismen, wie Haut, Mundhöhle oder Magen-Darm-Trakt.¹⁹⁸

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakterien *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *E. coli* sind klinisch relevant und sind häufig die Ursache für Infektionen.^{285,286}

1.3.5.1 Die bakterielle Zellwand

Obwohl die Natur beim Aufbau lebender Materie nur eine kleine Zahl von Elementen benutzt, sind biologische Materialien hochkomplex. Allein eine Bakterienzelle enthält rund 6000 verschiedene Molekülspezies. Zu diesem komplexen Aufbau kommt die Interaktivität der Bakterienzellen. Durch biochemische Signalketten wie z. B. Botenstoffe und durch Genexpression wird ihre Struktur und Funktion reguliert.

Die bakterielle Zellwand trennt das Cytoplasma von der Umgebung. Sie ist rigider als die eukaryotischer Zellen.²⁸⁷ Die Funktionen der Zellwand sind vielfältig und umfassen die Aufrechterhaltung der Zellgeometrie, mechanischen Schutz, Schutz vor ungünstigen Umweltbedingungen sowie Kompensierung des osmotischen Druckes. Außerdem dient die Zellwand als rigide Plattform für Zellorganellen, wie Fimbrien und Flagellen. Die molekulare Zusammensetzung einer bakteriellen Zellwand ist im Wesentlichen plastisch d. h. sie variiert als Antwort auf die Änderungen in der unmittelbaren Umwelt.^{288,289}

1 Einleitung

Außerdem können Bakterien ihre Wachstumsrate und enzymatische Aktivität ändern. Ähnliche Änderungen werden auch beim Übergang vom planktonischen in den oberflächengebundenen Zustand beobachtet. Die Zellwand aller Bakterienarten besitzt eine individuelle Struktur und die Zellwandzusammensetzung ist einer der wichtigsten Faktoren in der Differenzierung der Bakterien. Eine dieser Differenzierungsmethoden ist die so genannte Gram-Färbung, nach der in Gram-positive und in Gram-negative Gruppen eingeteilt wird. Die Gram-Färbung basiert auf Unterschieden in der Zellwandstruktur (Abb. 15). Die Gram-positiven Bakterien behalten bei der Anfärbung mit einer Mischung aus Kristallviolett und Jod eine blaue Färbung, während die Gram-negativen durch die Behandlung mit Ethanol entfärbt werden.

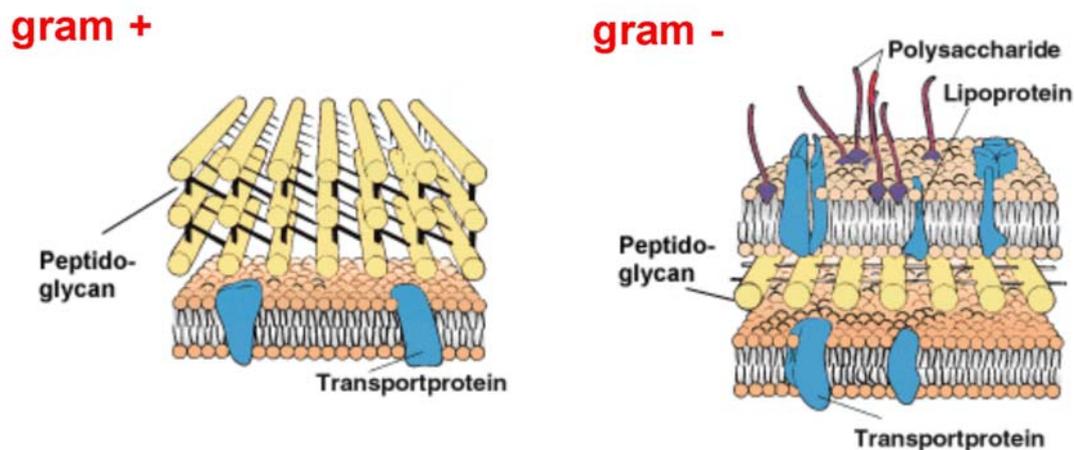


Abb. 15: Zellwände Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien.²⁸⁴

Die Zellwand der Gram-positiven Bakterien besitzt eine massive, dicke Peptidoglykan- oder Murein-Schicht, in der große Mengen kovalent verankerte Teichonsäuren eingelagert sind. Teichonsäuren sind eine Art molekulares „Markenzeichen“ der Gram-positiven Bakterien. Peptidoglykane sind aus Zucker und Aminosäuren zusammengesetzte Makromoleküle, die der Zellwand die Festigkeit verleihen. Die verbrückenden Aminosäuren bzw. ihre Derivate variieren von Spezies zu Spezies. Das Rückgrat der Peptidoglykan ist aus alternierenden Sequenzen von *N*-Acetylglycosamin und *N*-Acetylmuraminsäure aufgebaut. Zwischen Plasmamembran und Mureinhülle liegt ein enger, mit Periplasma gefüllter Raum, der so genannte periplasmatische Spalt. Während bei den Gram-positiven Bakterien Peptidoglykan bis zu 90% der Trockenmasse ausmacht, beträgt sein Anteil nur 20% des Trockengewichtes bei den Gram-negativen, da diese oft nur eine dünne, einschichtige Mur-

1 Einleitung

ein Hülle haben, die keine Teichonsäure enthält und in ein großräumiges, so genanntes periplasmatisches Gel eingebettet ist. Das Periplasma wird durch eine Membran, die so genannte äußere Membran begrenzt. Die äußere Membran wirkt als komplexes Barriersystem gegen Biozide und Antibiotika und stellt eine Besonderheit der Gram-negativen Bakterien dar. Die äußere Membran ähnelt der Cytoplasmamembran, ist jedoch asymmetrischer und komplexer aufgebaut und enthält große Mengen Lipopolysaccharid, das LPS.¹⁴¹ LPS ist eine charakteristische Komponente der Gram-negativen Bakterien und weist drei strukturelle Komponenten auf. Diese sind: Lipid A, Kernregion und O-Antigen (Abb. 16).

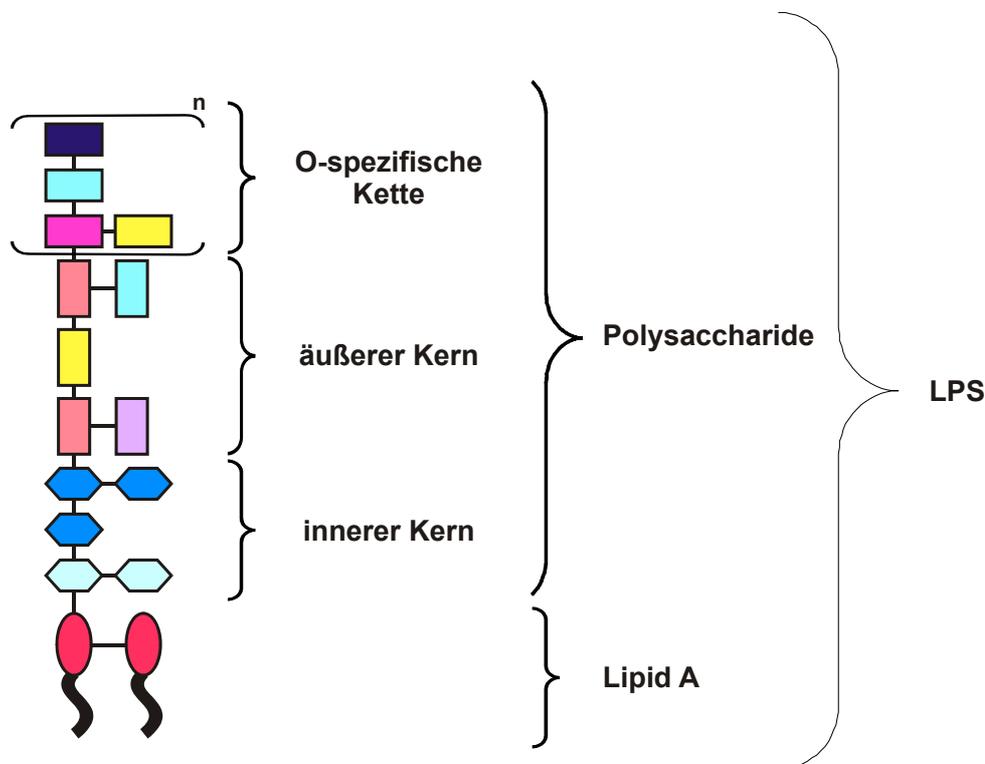


Abb. 16: Struktureller Aufbau von LPS.

Lipid A Region: Sie bildet den inneren Bereich des LPS. Beim Lipid A handelt es sich um ein Phosphoglycolipid (biphosphoryliertes *N*-Acetylglucosamin-Disaccharid), das in der Regel mit mehreren Fettsäuren verestert ist. Das Lipid A erweist sich in isolierter Form als äußerst toxisch und ist damit ein wichtiger Virulenzfaktor der Gram-negativen Bakterien.

Innere und äußere Kernregionen: Die innere Kernregion steht mit dem Lipid A in Verbindung und enthält eine spezielle Zuckersäure, 2-Keto-3-desoxyoctonsäure

(KDO), sowie drei teils phosphorylierte Heptosen. Die daran anschließende äußere Kernregion besteht aus fünf Hexosen, Galactose und N-Acetylglycosamin.

O-spezifische Kette (äußere Polysaccharidkette): Sie besteht aus bis zu 25 sich wiederholenden Einheiten von 3 bis 5 Zuckerbausteinen, die oft auch verzweigt mit einander verknüpft sind. Auf diese Art entstandene, nach außen ragende Polysaccharidstrukturen sind von Keim zu Keim unterschiedlich und stellen die für die serologische Typisierung wichtigen, so genannten *O-Antigene* dar.

Dem LPS wird eine wichtige Rolle sowohl in der Adhäsion als auch in der Antibiotikaresistenz zugesprochen.

Sowohl bei den Gram-negativen als auch bei den Gram-positiven Bakterien kommen Oberflächenanhängsel namens Flagellen vor, die die Fortbewegung ermöglichen. Manche Bakterien besitzen neben den Flagellen auch Fimbrien oder Pilis. Fimbrien stellen rigide, gerade und faserartige Anhängsel dar. Sie sind aus identischen stammspezifischen Protein-Einheiten zusammengesetzte Polymere. Strukturell sind Fimbrien winzige Härchen, die aus ineinander greifenden Proteinsegmenten bestehen und eine Helix mit dem Durchmesser von 7 nm bilden. Fimbrien sind Adhäsionsvermittler bei den Gram-negativen Bakterien. Die Oberfläche einer *E.coli*-Zelle weist beispielsweise mehr als 300-400 Typ-I-Fimbrien auf.²¹⁷ Allerdings wurden ähnliche Strukturen auch bei den Gram-positiven Bakterien beobachtet.²⁹⁰ Während Fimbrien bei den Gram-negativen Bakterien durch nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen *Sub*-Einheiten entstehen, wurde bei den Gram-positiven Bakterien eine kovalente Polymerisation zwischen den Einheiten gefunden. Allerdings scheint die Funktion der Fimbrien bei den Gram-positiven identisch mit der bei den Gram-negativen zu sein, und der Adhäsion zu dienen.²⁹¹ Wichtige Komponenten der Zellwand Gram-negativer Bakterien sind die Proteine in der äußeren Membran (*outer membran proteins*, OMP), die für die Stabilität der Zellwand und den Transport hydrophiler Substanzen sorgen. Reichlich vorhanden sind Porine, die Kanäle bilden, entweder für den unspezifischen Transport kleiner hydrophiler Substanzen oder für den spezifischen Transport von beispielsweise Eisen in Form von Chelatkomplexen. Die Porine sind wassergefüllte Kanäle, die je nach physiologischen Bedingungen offen oder geschlossen sind und so den Stoffaustausch regulieren. Die äußere Membran enthält etwa 10^5 Porine, durch die unspezifisch gelöste Stoffe, wie Zucker oder Aminosäuren, in die Zelle gelangen können.

Wie bereits erwähnt, spielen die Eigenschaften der bakteriellen Zelloberfläche eine entscheidende Rolle in der Bakterienadhäsion.²⁹² Während die Gram-negativen Bakterien über proteinbasierte Strukturen, wie Fimbrien, adhäreren, verwenden die Gram-positiven dafür die Kohlenhydratstrukturen.²⁹³

1.3.5.2 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

S. epidermidis ist ein Gram-positives, koagulasenegatives, nicht bewegliches Bakterium, das zur Normalflora der menschlichen Haut gehört. Als pathogener Keim spielt es in der Medizin, ganz besonders in der Chirurgie, eine große Rolle und wird als „*pathogen of medical progress*“ bezeichnet.²⁹⁴ Dieser Erreger ist in der Lage, an einer Vielzahl von Kunststoffoberflächen, wie Kathetern, künstlichen Herzklappen oder Gelenkprothesen Biofilme auszubilden und somit Implantat-assoziierte Infektionen auszulösen.²⁹⁵ *S. epidermidis* ist in der Lage, direkt an Oberflächen, ohne *conditioning film*, zu adhäreren.²⁹⁶ Die Zunahme an *S. epidermidis*-Infektionen korreliert mit der wachsenden Verwendung von Implantaten. *S. epidermidis* produziert im Gegensatz zu *S. aureus* kaum Toxine und gewebeschädliche Exoenzyme. Die Häufigkeit von *S. epidermidis* bei den Implantat-assoziierten Infektionen beruht hauptsächlich auf seiner Fähigkeit, nach Anhaften auf die Implantatoberfläche einen schützenden Biofilm zu bilden.²⁹⁷ *S. epidermidis* bildet während der Kolonisierung große Mengen einer extrazellulären Schleimsubstanz jenseits der Zellwand. Man spricht in diesem Zusammenhang von Kapseln oder Schleimhülle. Für solche exopolysaccharidhaltige Strukturen wurde aufgrund der Identifizierung von Polysacchariden als häufige Hauptbestandteile der Begriff *Glycocalyx* eingeführt.¹³⁶

S. epidermidis besitzt verschiedene kohlenhydratbasierte Adhäsine, die als funktionelle Faktoren die primäre Anhaftung an unterschiedliche Materialien sowie Zell-Zell Adhäsion im Biofilm vermitteln. Die wichtigsten Vertreter sind das kapsuläre Polysaccharid-Adhäsine, PS-A, die eine komplexe Zusammensetzung mit hohem Glucose- und Galaktoseanteil aufweist sowie das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsine (*polysaccharide intercellular adhesin*, PIA), das für die interbakterielle Adhäsion im Biofilm sorgt.²⁹⁸

Neben der Funktion als intrazelluläres Adhäsine dient PIA auch als aktive Substanz bei der Agglutination von Erythrozyten.

1.3.5.3 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus (*aureus*, lateinisch „der Goldene“) gehört zu den Gram-positiven, kugelförmigen, nichtbeweglichen Bakterien, die keine Sporen bilden. Ein charakteristisches morphologisches Merkmal ist die goldgelbe Pigmentierung der Kolonie. *S. aureus* ist ein medizinisch sehr relevantes Bakterium, das als Hauptverursacher von Wundinfektionen gilt. *S. aureus* ist in der Lage Virulenzfaktoren, wie extrazelluläre Enzyme und Toxine, zu produzieren. Besondere Probleme bereiten Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme (MRSA) Diese sind unempfindlich gegen fast alle zur Verfügung stehenden Antibiotika geworden. Bis dahin waren die Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin die Mittel der Wahl. *S. aureus* ist eigentlich ein harmloses Bakterium, welches die Schleimhaut des vorderen Nasenvorhofes bei etwa 20% der Bevölkerung bewohnt. Allerdings kann dieser Erreger bei schweren Erkrankungen oder nach den Operationen, wenn das Immunsystem des Patienten geschwächt ist, lebensbedrohliche Infektionen (Sepsis, Wundinfektionen, Pneumonie) auslösen. Darüber hinaus ist *S. aureus* der Haupterreger bei Infektionen auf Metallimplantaten²⁹⁹ und wird als „Krankenhauskeim“ bezeichnet.

Hat *Staphylococcus aureus* einen Biofilm auf einem Biomaterial gebildet, ist eine Antibiotika-Therapie meistens erfolglos, was eine Entfernung des Implantats notwendig macht.³⁰⁰

Als Adhäsine dienen meistens Proteine oder Polysaccharide. Bei der Biofilmbildung von *S. aureus* ist das *biofilm-associated protein, bip*, involviert.³⁰¹ Außerdem wurde gefunden, dass Teichonsäure-Moleküle auf der Oberfläche der Bakterien bei der Oberflächenbesiedlung eine Rolle spielen.³⁰² Nach der Identifizierung des Gens, das für die Synthese von Teichonsäure erforderlich ist, gelang es, dieses Gen bei einem *Staphylococcus*-Stamm auszuschalten, wodurch die Bakterien in der Laborkultur ihre Adhäsionsfähigkeit verloren.³⁰³ Bei der Adhäsion von *Staphylococcus aureus* trägt PiA außerdem bei.³⁰⁴ Darüber hinaus gibt es eine Reihe spezifischer bakterieller Oberflächenproteine, die die Adhäsion an Wirtstrukturen, wie Kollagen, Fibrinogen und Fibronectin vermitteln. Diagnostisch bedeutsam ist eine Subpopulation von *S. aureus*, die aufgrund des reduzierten Wachstums als *small colony variants* bezeichnet wird und häufig erst nach 48-72 h Bebrütung sichtbare Kolonien bildet.

1.3.5.4 Escherichia coli (E. coli)

E. coli wurde 1885 von T. Escherich beschrieben und zu seiner Ehre *Escherichia coli* (*E. coli*) genannt. *E. coli* stellt den am intensivsten untersuchten Mikroorganismus in der mikrobiologischen und molekularbiologischen Forschung dar. Es handelt sich dabei um Gram-negative, kurze, stumpfe Stäbchen mit einem Durchmesser von ca. 0,6-1 µm, einer Länge von 1-2 µm, die zur aeroben Atmung und anaeroben Fermentation (fakultativ anaerob) befähigt sind und eine peritriche Begeißelung aufweisen. Taxonomisch wird *E. coli* in die Familie der Enterobacteriaceae eingeordnet. Die Kolonien von *E. coli* sind in der Regel rund.

E. coli ist ein typisches Beispiel für Modellorganismen in der molekularen Biologie. Der Grund hierfür ist gute Handhabbarkeit, gute Kultivierbarkeit und geringe Virulenz. Dieser Keim kommt im normalen gastrointestinalen Trakt des Menschen, anderer Säuger und Vögeln vor und ist sehr wichtig für die gesunde Darmflora dieser Organismen. Allerdings haben sich auch pathogene Varianten entwickelt, die komplizierte Erkrankungen, wie Harnwegsinfektionen, Meningitis und Septikämien verursachen. *E. coli* wird oft im Fall von Harnweg-Katheter-Infektionen gefunden.³⁰⁵ Eine besondere Rolle bei der Adhäsion spielt die Zellwand des Bakteriums. Zwei Phospholipidschichten, eine Cytoplasmamembran und eine äußere Membran sind die Bestandteile der Zellwand. Zwischen den beiden Membranen, die jeweils ca. 8 nm dick sind, befindet sich ein periplasmatischer Raum mit einem Zellgerüst aus Peptidoglykan und Lipoproteinen. Der Hauptbestandteil der äußeren Membran sind Lipopolysaccharide. Bei *E. coli* ist drei Viertel der gesamten Zelloberfläche mit LPS besetzt. Außerdem verfügt *E. coli* über organisierte Fortbewegungsorganellen, die so genannten Flagellen, die das Erreichen verschiedener Habitats sowie die Flucht ermöglichen.

Von *E. coli* sowie von den meisten Enterobakterien werden Typ-I-Fimbrien exprimiert. Neben der Adhäsion vermitteln Typ-I-Fimbrien auch eine Invasion an das Blasenepithel.³⁰⁶ Nach der Invasion bzw. erfolgter Infektion werden die Typ-I-Fimbrien wieder abgestoßen, um die Erkennung der Bakterien durch das Immunsystem (Granulozyten) und Phagozytose zu vermeiden.

Die Untereinheit von Typ-I-Fimbrien ist ein Protein namens FimA. Bei der spezifischen Adhäsion von *E. coli* agiert das Mannose-spezifische Lektin FimH als Andockprotein. Es ist an den Enden und am Schaft der Fimbrien lokalisiert. Die Bindung zwischen FimH und Mannose wird als so genannte „catch bond“ bezeichnet, also

eine Bindung, deren Bindungskraft mit Zunahme von außen wirkender Scherkräfte auf das System zunimmt.³⁰⁷ Statt durch die Körperflüssigkeit weggeschwemmt zu werden, haften sich die *E.coli* Bakterien deshalb noch stärker an den Schleimhäuten und können dort Infektionen verursachen.

1.3.5.5 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

P. aeruginosa ist ein 0,5-0,8 µm dickes und 1,5-3,0 µm langes Gram-negatives, stäbchenförmiges, und polar begeißeltes Bakterium. Taxonomisch zählt die Gattung *Pseudomonas* zur Familie der *Pseudomonadaceae*. *P. aeruginosa* bildet relativ große, grünlich metallisch glänzende Kolonien mit einem charakteristischen, süßlichen, an Lindenblüten erinnernden Geruch.

P. aeruginosa ist in der Umwelt ubiquitär und wird wegen seiner Anspruchslosigkeit gegenüber Nährstoffvorkommen auch als „Pfützkeim“ bezeichnet. Dieser Keim kolonisiert sehr schnell und hartnäckig unterschiedliche Oberflächen. *P. aeruginosa* ist als ein fakultativ pathogenes Bakterium ein wichtiger Krankheitserreger und häufig die Ursache für die bakterielle Keratitis, eine Infektion des Auges, die durch die Besiedlung von Kontaktlinsen mit dem Keim entsteht.²⁹⁵ Im Körper verursacht *P. aeruginosa* beim Menschen eitrige und septikämische Infektionen.

P. aeruginosa ist ein sehr vielseitiger Organismus, der unter diversen Bedingungen floriert. Entsprechend kompliziert ist die Bekämpfung der *P. aeruginosa* Biofilme. 1993-1994 ist in den USA eine mysteriöse Krankheit unter Asthmatikern ausgebrochen, bei der 100 Patienten verstarben. Wie sich herausstellte, hatten alle *Albuterol-Inhalationsmittel* für ihre Therapie verwendet. Im Fermenterinhalt der Herstellerfirma wurde *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt. Das von der Firma eingesetzte Desinfektionsmittel war nicht wirksam, da *Pseudomonas aeruginosa* einen massiven Biofilm gebildet haben. Mit dem Inhalationsmittel zusammen gelangten auch die mit dem Schleim umhüllten Zellverbände in die Sprayflaschen. Nach Inhalation dieser Biofilme konnten sowohl das Immunsystem der Patienten als auch die angewandte Chemotherapie der Infektion nicht mehr Herr werden.³⁰⁸

Bei oberflächengebundenen *P. aeruginosa* erfolgt eine Herab-Regulierung der für die Flagellensynthese verantwortlichen Gene, wohingegen die für die EPS- und OMP-Bildung verantwortlichen Gene hoch-reguliert werden.³⁰⁹ Daher wird vermutet, dass die Bakterien sich an das immobile Leben im Biofilm anpassen, indem sie die Flagel-

1 Einleitung

len verlieren und die EPS-Produktion erhöhen. Bei *P. aeruginosa*, der aus Patienten mit zystischer Fibrose isoliert wurde, wurde eine exzessive Alginatproduktion beobachtet. Alginat ist ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure und das Haupt-Exopolysaccharid im Biofilm von *P. aeruginosa*.

Die ausgeprägte Anspruchslosigkeit, die Fähigkeit, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen, und die diversen Adhäsionsmechanismen spiegeln sich in der Genomgröße von *P. aeruginosa* wieder. Das vollständig sequenzierte Genom des Referenzstammes PA01 gehört mit einer Größe von 6,264 Mbp zu den größten bisher sequenzierten Genomen.³¹⁰

P. aeruginosa verfügt über ein großes Repertoire an extrazellulären Virulenzfaktoren und ist oft ein Pionier, der die Oberfläche für andere Bakterien besiedelbar macht. Vor der Adhäsion führt *P. aeruginosa* eine flagellenabhängige Schwimmbewegung entlang der Oberfläche aus. Die einzelnen Bakterien binden zunächst in Form einer Monoschicht an die freie Oberfläche und gruppieren sich dann innerhalb von ca. drei Stunden zu Mikrokolonien. Voraussetzung für die Gruppierung ist eine an die Typ-IV-Fimbrien gebundene Mobilität. Die über Typ-IV-Fimbrien vermittelte Fähigkeit, sich entlang der Oberfläche zu bewegen und Zellhaufen bzw. Mikrokolonien zu formen, wird als „*twitching motility*“ bezeichnet.³¹¹ Diese Beobachtung weist darauf hin, dass sensorische Systeme aktiviert werden, wenn individuelle Zellen die Oberfläche erreichen. Nach *Stoodley et al.* ist der Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Adhäsion bei *P. aeruginosa* auf die Typ-IV-Fimbrien zurückzuführen.¹⁰¹

2 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe selbstanordnender Monoschichten Oberflächen dahingehend zu modifizieren, dass eine Bakterienadhäsion unterdrückt wird. Zur Realisierung dieses Projekts sollten SAMs mit biorepulsiven Kopfgruppen auf Gold und den oxidischen Oberflächen von Stahl und Aluminium erzeugt werden. Neben den als proteinresistent bekannten Hexaethylenglycol- bzw. Hexaethylenglycolmonomethylether-Termini sollte die Polyglycerolkopfgruppe als biorepulsivitätgebende Einheit untersucht werden.

Die Monoschichten sollten hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber unspezifischer Bakterienadhäsion untersucht werden. Hierzu sollte ein *in vitro* Untersuchungsmodell etabliert werden, das eine Korrelation der biorepulsiven Eigenschaften unterschiedlicher SAM-Typen mit der auf ihnen stattfindenden primären Adhäsion der Testkeime ermöglicht.

Die meisten Adhäsionsstudien untersuchen entweder die Adhäsionsfähigkeit eines bestimmten Organismus, den Effekt eines bestimmten Faktors auf die Adhäsion oder aber den Adhäsionsgrad, mit dem ein Bakterium auf einer bestimmten Oberfläche haftet.³¹² Im Rahmen dieser Arbeit war der dritte Punkt, die Adhäsionsfähigkeit unter konstanten Versuchsbedingungen, von Interesse. Das Ziel war, ein zuverlässiges Protokoll für die Adhäsionstests zu entwickeln.

Als Testkeime wurden zwei Gram-negative, *E. coli* WT und *P. aeruginosa* PAO und zwei Gram-positive Bakterien, *S. epidermidis* ATCC 14990 und *S. aureus* ATCC 6538, ausgewählt. Der wesentliche Grund für die Wahl dieser Organismen war ihre medizinische Relevanz. Es war aber auch wichtig, unterschiedliches Adhäsionsverhalten, bedingt durch die Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung und Zellwandstruktur, mit in die Untersuchung einzubeziehen.

Nach der Erarbeitung und Charakterisierung dieses Untersuchungssystems war es von Interesse, mögliche Zusammenhänge zwischen der Struktur der schichtbildenden Moleküle und den biorepulsiven Eigenschaften der Monoschichten aufzudecken. Weiterhin war von Bedeutung zu klären, ob die Biorepulsivität der Monoschichten bei den PG-terminierten Dendrimer-SAMs durch den Polymerisationsgrad der verwend-

2 Aufgabenstellung

einem empirischen Prozess sollten Parameter variiert werden, um ein reproduzierbares System zu entwickeln.

Nach der Etablierung der Plattenzählmethode als Grundtechnik zum Studieren von Bakterienadhäsion sollte die Epifluoreszenzmikroskopie als eine alternative Untersuchungsmethode erprobt werden, die die geforderten Aspekte der Einfachheit, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit vereinte. Ein Vergleich zwischen diesen beiden Methoden sollten die Vorteile und Nachteile aufdecken. Mit diesem Ziel sollte die in der Literatur viel diskutierte Problematik der direkten und indirekten Detektion adhärerter Bakterien in unserem Testsystem adressiert werden.

Weiterhin war vorgesehen, den Einsatz der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie zur Untersuchung der Bakterienadhäsion auf Metalloberflächen zu testen.

Nach der Etablierung des Untersuchungssystems für Gold- und SAMs auf Gold sollte in der dritten Phase der Arbeit die Erweiterungsfähigkeit der Methoden auf Stahl und Aluminium erprobt werden. Hierfür sollten auf den oxidischen Oberflächen SAMs generiert werden und die primäre Adhäsion der Testkeime auf diesen untersucht werden. Weiterhin musste eine geeignete Methode zur Funktionalisierung dieser Oberflächen gefunden werden.

Als Schichtbildende Moleküle sollten Polyethylenglycolmonomethylether-terminierte Undecylphosphon- und -thiophosphonsäure sowie Polyglycerol-terminierte Undecylphosphonsäure zum Einsatz kommen (Abb. 18).

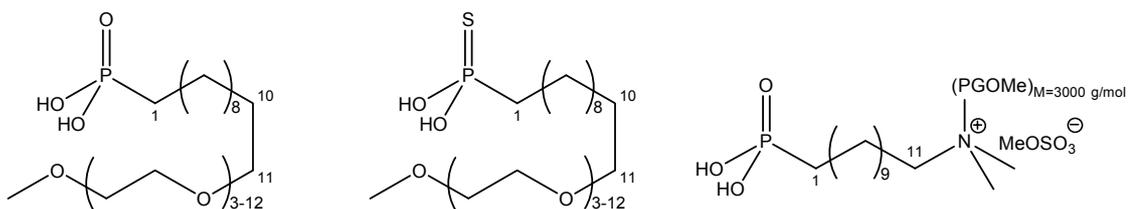


Abb. 18: PEG-terminierte Undecylphosphonsäure (links), PEG-terminierte Undecylthiophosphonsäure (Mitte) und PG-terminierte Undecylphosphonsäure (rechts).

3 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Methoden zum Einsatz, deren wesentliche Prinzipien nachfolgend vorgestellt werden.

3.1 Elektronenstrahlverdampfung zur Herstellung von Goldsubstraten

Elektronenstrahlverdampfung ist die Methode der Wahl bei der Abscheidung von Metallen auf Substrate. Darunter versteht man das thermische Verdampfen des jeweiligen Metalls im Ultrahochvakuum mit anschließender Kondensation einer Schicht gewünschter Dicke dieses Metalls auf den Substraten. Der durch eine Hochspannungsquelle erzeugte Elektronenstrahl wird durch ein Magnetfeld auf den Tiegel, in dem das Metallgranulat platziert ist, gelenkt. Dabei entsteht eine Temperatur von 1000 bis 2000 °C, die das Metall zum Schmelzen und zum Verdampfen bringen. Für die Ermittlung der Dicke des auf dem Substrat kondensierten Metalls misst ein in der Nähe der Substrate befindlicher Schwingquarz die Massendifferenz auf dem Quarzplättchen über die Änderung der Resonanzfrequenz (Abb. 19).

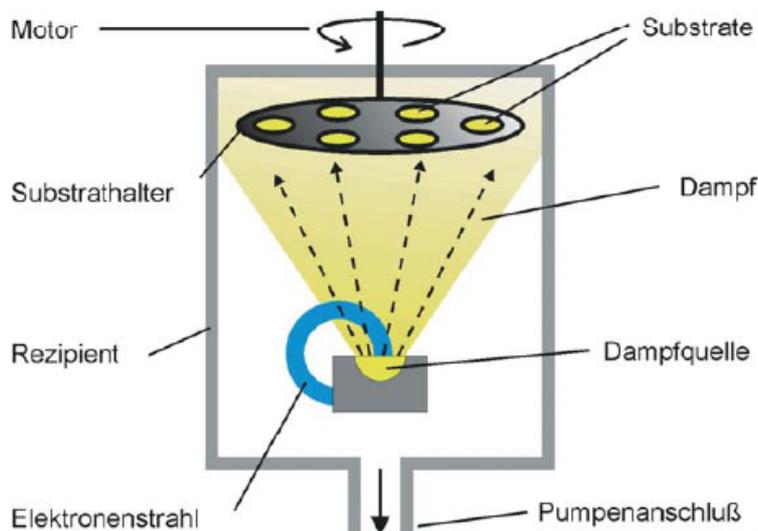


Abb. 19: Schematische Darstellung einer Elektronenstrahlverdampfungsanlage.³¹³

3.2 Oberflächencharakterisierung

3.2.1 Kontaktwinkelmessung

Unter den zahlreichen modernen Methoden, die zur Oberflächenanalyse eingesetzt werden, wird die Bestimmung des Kontaktwinkels als Standard angesehen. Die Kontaktwinkelmessung ist eine zerstörungsfreie Methode, die ermöglicht, Oberflächen bezüglich ihrer Polarität und Rauigkeit zu charakterisieren. Außerdem kann über Kontaktwinkelmessungen die Oberflächenenergie der Oberfläche bestimmt werden. Durch die Kontaktwinkelmessung an SAMs kann zum Einen festgestellt werden, ob eine Schichtbildung stattgefunden hat, zum Anderen korreliert die so genannte Kontaktwinkel-Hysterese (s. u.) mit der Rauigkeit des Films und gibt somit Informationen über den Ordnungsgrad der gebildeten Schicht.

Als Kontaktwinkel Θ wird der Winkel bezeichnet, der durch Flüssigkeitstropfen auf einer festen Oberfläche gebildet wird (Abb. 20). Die Benetzung einer Oberfläche, beispielsweise mit Wasser in Luft als umgebendem Medium, also die Größe des Kontaktwinkels, ist abhängig von den Grenzflächenspannungen zwischen Wasser und Luft (γ_{lv}), Festkörper und Wasser (γ_{sl}) und Oberfläche und Luft (γ_{sv}).

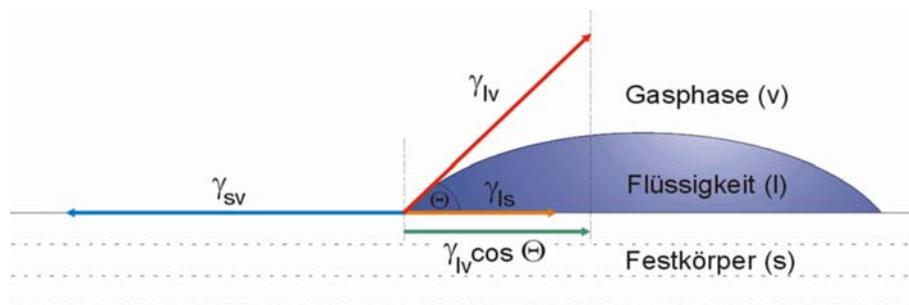


Abb. 20: Grenzflächenspannungen γ und Kontaktwinkel Θ an einer teilweise benetzten Oberfläche.

Den Zusammenhang zwischen Kontaktwinkel und den Grenzflächenspannungen beschreibt die Young'sche Gleichung.³¹⁴

$$\gamma_{sv} = \gamma_{ls} + \gamma_{lv} \cdot \cos \Theta$$

Gl. 1

Das Verhältnis der Grenzflächenspannungen bestimmt den Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf einer Oberfläche. Je stärker die bindende Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und der Flüssigkeit ist, desto geringer ist der Kontaktwinkel. Das ist der Fall bei hydrophilen Oberflächen, die sich von Wasser gut benetzen lassen. Hydrophobe Oberflächen weisen dagegen gegenüber Wasser größere Kontaktwinkel auf. Per Definition ist eine Oberfläche mit einem Wasser-Kontaktwinkel kleiner 90 ° hydrophil und größer als 90 ° hydrophob. Ab einem Winkel von 140 ° werden Oberflächen als superhydrophob bezeichnet.

Die Young'sche Gleichung geht von ideal glatten Oberflächen aus. Die Rauigkeit der realen Oberflächen führt zur so genannten Kontaktwinkelhysterese. Diese Größe stellt die Differenz zwischen dem Fortschreitwinkel Θ_A (*advancing contact angle*) und dem Rückzugswinkel Θ_R (*receding contact angle*) dar. Die Größen Θ_A und Θ_R können gemessen und anschließend die Kontaktwinkelhysterese bestimmt werden.³¹⁵⁻³¹⁷

Abb. 21 zeigt die Messanordnung der Kontaktwinkelmessung nach der *sessile drop*-Methode.⁴² Hierbei wird mit einer Mikroliterspritze ein Wassertropfen auf die Probe aufgebracht und von der Rückseite her beleuchtet.

Zur Messung des Fortschreitwinkels Θ_A wurde das Volumen des Wassertropfens auf der Oberfläche kontinuierlich erhöht, bis der Tropfen sich auszudehnen begann. Dann wurde die Kanüle aus dem Tropfen entfernt und der Kontaktwinkel bestimmt. Zur Bestimmung des Rückzugswinkels Θ_R wurde nach der Messung von Θ_A die Kanüle wieder in den Tropfen eingeführt und das Volumen solange vermindert, bis der Tropfen sich auf der Oberfläche zusammenzuziehen begann. Die Kanüle wurde dann wieder aus dem Tropfen entfernt und Θ_R bestimmt.

Durch die Kamera wird das Bild des gebildeten Tropfens an einen angeschlossenen Rechner übermittelt. Mit einem speziellen Programm wird zunächst die Kontur des Tropfens ermittelt und daraus der Kontaktwinkel über einen Young-Laplace-Algorithmus berechnet.

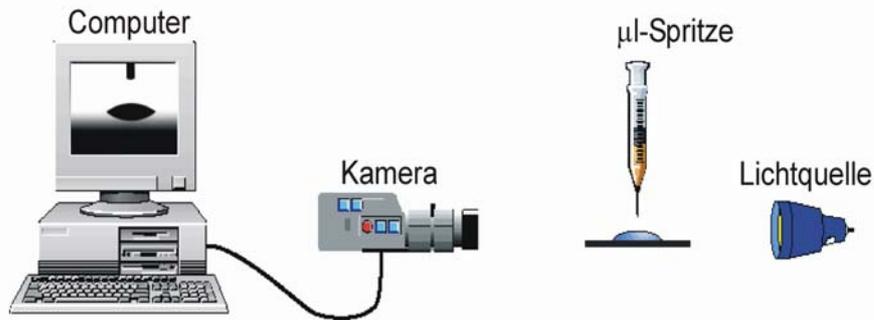


Abb. 21: Messanordnung zur Bestimmung von Kontaktwinkeln nach der *sessile drop*-Methode.

3.3 Untersuchung der Bakterienadhäsion

Zum Evaluieren der Wechselwirkung zwischen Bakterien und Materialoberflächen wurden einige *in vitro* Techniken entwickelt.^{318,319} Je nach verwendeter Methode verläuft das Experiment, vor allem die Quantifizierung der adhärirten Zellen, unterschiedlich, jedoch kann man einen Grundablauf formulieren:

1. Präparation der Substrate
2. Anzucht und Präparation der Zellen
3. Adhäsionsassay (Inkubation der Proben in der Bakteriensuspension)
4. Waschen der Proben zur Entfernung ungebundener Bakterien
5. Detektion/Quantifizierung adhärirter Bakterien

Zur Quantifizierung der Bakterien werden folgende Techniken eingesetzt: die Lichtmikroskopie,³¹⁹ Epifluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie,³²⁰ Konfokalmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*). Durch AFM-Messung kann einerseits die Zelloberfläche mit hoher Auflösung visualisiert werden, gleichzeitig ist diese Methode in der Lage, die an der Wechselwirkung beteiligten Kräfte sowohl zwischen einzelnen Zellen als auch zwischen Zellen und der Oberfläche zu detektieren und zu quantifizieren.^{321,322}

Neben den mikroskopischen Methoden, die eine direkte Zählung adhärirter Bakterien ermöglichen, gibt es beispielsweise die radioaktive Markierung³²³ sowie die Plattenzählmethode (*plate count method*),³²⁴ bei der das Ablösen adhärirter Zellen für die Quantifizierung notwendig ist, sowie viele andere Methoden.³¹⁹ Alle Methoden

3 Methoden

haben Vorteile und Nachteile, jedoch ist die Wahl der Untersuchungsmethode ein wichtiger Punkt und muss bei der Planung der Versuchsdurchführung berücksichtigt werden. Es gibt derzeit keine standardisierte, allgemein akzeptierte Methodologie,³²⁵ was dazu führt, dass nicht nur die Assays variieren, sondern auch entscheidende Parameter, wie Expositionszeit, physiologische Phase der Mikroorganismen, Präparation der Zellen, Konzentration der Bakteriensuspension, der Spülvorgang und hydrodynamische Bedingungen. Dieser Umstand macht den Vergleich der Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Techniken erhalten wurden, schwierig. Auch sind Faktoren, wie Positionierung der zu untersuchenden Substrate, die Spülprozedur und gegebenenfalls die Ablösung der adhärenierten Bakterien von Methode zu Methode verschieden.^{319,325}

Bei der Positionierung der Substrate gibt es unterschiedliche Wege, wie beispielsweise bei den *random-flow* oder *static* Systemen, wo die Proben horizontal, in einer Petrischale plaziert,²¹⁸ oder vertikal auf einem Stahldraht aufgehängt werden.³¹⁹ Die Proben werden dabei mit der Bakteriensuspension statisch inkubiert oder willkürlich, beispielsweise durch Inkubationsschüttler aufgewirbelt. Bei den *oriented-flow* Systemen sind die wichtigsten Vertreter die *radial flow chamber*,³¹⁹ die *rotating disc*,³¹⁹ und der *laminar flow*.³¹⁹

Auch das Spülen ist ein sehr wichtiger Teil eines Bakterienadhäsionsassays.³¹² In Abhängigkeit vom experimentellen Design und der Form der Proben werden unterschiedliche Spülvorgänge beschrieben.

Unterschiede in der Zusammensetzung der Spülflüssigkeit, der ausgeübten Kraft und der Richtung des Flüssigkeitsstrahls sollten vermieden werden. Zum Spülen werden Flüssigkeiten, wie NaCl-Lösung, PBS-Puffer oder steriles Wasser, verwendet. In Experimenten mit *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* und *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die beim Spülen auftretenden starken Scherkräfte die adhärenierten Bakterien verschieben können.³²⁶ Dies führt zu einer uneinheitlichen Verteilung der Bakterien auf der Oberfläche, verändert das tatsächliche Adhäsionsmuster und macht in letzter Konsequenz oft die akkurate Quantifizierung der Bakterien schwierig. Auch die Arbeiten von *Comez-Suarez et al.* sprechen dafür, dass es nicht bekannt ist, wie viele Bakterien beim leichten Spülvorgang bzw. beim Passieren der Luft-Flüssigkeit Grenzfläche abgelöst werden.^{327,328}

Die Ablösung adhärenierter Zellen zwecks Quantifizierung wird bei der Plattenzählmethode durch die Anwendung von Ultraschall, eines Vortexers oder von grenzflächen-

aktiven Stoffen, wie beispielsweise Tween[®] 80 oder Triton X-100, erreicht. Dabei ist das Ziel, die Zellen quantitativ abzulösen. Eine Alternative, die neben dem Ultraschall verwendet wird, ist die Übertragung der Zellen durch das Auflegen der Probe auf die Agaroberfläche, gefolgt von einer visuellen Analyse bzw. Zählen der Kolonienbildende Einheiten (CFU). Das manuelle Zählen ist sehr weit verbreitet in der mikrobiologischen Methodologie, jedoch ist zum Einen diese Methode sehr zeitintensiv, zum Anderen nicht fehlerfrei.

Allgemein stellt die Ablösung der Bakterien einen unumgänglichen Schritt bei den indirekten Methoden dar. Dies ist problematisch, da die Zahl der Bakterien, die auf dem Substrat verbleiben oder beim Ablösen geschädigt werden und somit in der Quantifizierung der Adhäsion nicht berücksichtigt werden, nicht bekannt ist, woraus ein unbekannter Fehler für das Ergebnis resultiert. Vergleichstudien haben gezeigt, dass die Ultraschallmethode der effektivste und sicherste Weg ist.³¹⁹

Die Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Quantifizierung adhärierter Zellen angewendet wurden, werden unter 3.3.1 und 3.3.2 ausführlich besprochen.

Im Abschnitt 4. werden neben den erzielten Ergebnissen die Schritte erläutert, die vorgenommen wurden, um die entsprechenden Methoden bezüglich der untersuchten Systeme zu optimieren.

3.3.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzmikroskopie ist eine weit verbreitete Methode in der Biologie. Es handelt sich dabei um eine Form der Lichtmikroskopie, die seit der ersten Anwendung³²⁹ eine viel genutzte Technik für die direkte Quantifizierung der Zellen geworden ist. Die zu untersuchende Probe wird vor der Untersuchung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) behandelt. Der Farbstoff absorbiert das Licht bei einer (kurzwelligen) Wellenlänge und emittiert dann Licht bei einer anderen (langwelligen) Wellenlänge. Zur Anregung wird eine Quecksilberdampfampe, die UV-Strahlung aussendet, verwendet. Mit Hilfe von Filtern wird die zur Anregung benötigte Wellenlänge isoliert und über die Optik des Mikroskops auf die Probe gelenkt. Die Probe beginnt zu fluoreszieren. Der Strahlenfilter ermöglicht es, das emittierte Licht, also die Fluoreszenz, gegen einen dunklen Hintergrund wahrzunehmen. In der Beobachtungsoptik ist ebenfalls ein Filter, der die Anregungswellenlänge ausblendet.

3 Methoden

Die Abb. 22 zeigt den Messplatz für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Proben zwecks Quantifizierung adhärierter Bakterien.



Abb. 22: Messplatz, Axioskop 2 von Zeiss.

Je nach verwendetem Fluorochrom kann die totale Zellzahl, das heißt, die Anzahl vitaler und avitaler Zellen, bestimmt werden. Durch den Einsatz selektiver Fluorochrome, wie *Live/Dead*[®]-Baclight[™], besteht zusätzlich die Möglichkeit, zwischen stoffwechselaktiven, also lebensfähigen und stoffwechsellinaktiven Zellen zu differenzieren. Die Wahl des Fluorochroms ist abhängig vom Anwendungsgebiet. Zu den meist verwendeten Fluorochromen zur Anfärbung von adhärieren Bakterien gehören Acridine Orange und 4',6-Diamidino-2-phenylindol, auch DAPI genannt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich um DAPI.

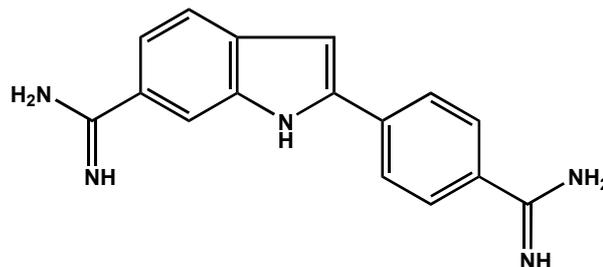


Abb. 23: Struktur von DAPI.

DAPI bindet selektiv an doppelsträngige DNS und bildet blau fluoreszierende Komplexe mit Adenin-Thymin-reichen Nukleinsäure-Regionen. DAPI besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 463 nm. Bei der Anregung mit UV-Licht sind fluoreszierende Zellkerne (nach Bindung DNS-DAPI) als hellblau leuchtende Punkte sichtbar. DAPI bindet auch an RNA (AU-selektive Interkalation) allerdings mit einer geringeren Fluoreszenzintensität.³³⁰

Die Aufnahme von DAPI durch Zellen erfolgt schnell. Obwohl DAPI spezifisch an DNA bindet, werden auch einige andere (nichtlebende) organische und anorganische Materialien angefärbt. Die Differenzierung zwischen Bakterien und Ablagerungen ist nicht immer einfach. Es wird berichtet, dass die Bakterien blau erscheinen und der Rest gelblich.

3.3.2 Plattenzählmethode

Die Plattenzählmethode gehört zu den konventionellsten und fundamentalsten Methoden der Mikrobiologie für die Ermittlung der Zellzahl. Dafür werden bestimmte Volumina, beispielsweise 50 µl Bakteriensuspension, aus einer (dezimalen) Verdünnungsreihe auf Agarplatten gebracht, verteilt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Durch die Zählung der gewachsenen, Kolonien-bildenden Einheiten, (*colony forming units*) CFU, wird die Zelldichte in der Ausgangssuspension bestimmt. Idealerweise sollte die Zahl auf einer Agarplatte zwischen 200 bis 300 CFU liegen.

Auch in Bakterienadhäsionsexperimenten findet die Methode zur Ermittlung der Zahl der adhärennten Bakterien eine weite Anwendung. Allerdings hat die Plattenzählmethode auch gewisse Nachteile: Sie ist sehr mühsam und zeitintensiv. Die oben angesprochenen, für die Quantifizierung der haftenden Bakterien notwendigen indirekten und komplizierten Prozeduren, wie das Ablösen von Zellen von den Proben gefolgt von anschließender Kultivierung, führen zu einer erhöhten Variabilität.³¹⁹

Ein gravierender Nachteil dieser Methode bei den Bakterienadhäsionsexperimenten ist, dass die haftenden Zellen zunächst abgelöst bzw. quantitativ übertragen werden müssen, um quantifiziert zu werden. Der Transfer vom Substrat ist oft nicht vollständig und lässt sich schlecht reproduzieren. Zudem neigen Bakterien zu Aggregatbildung, was bei der Plattenzählmethode zur Ermittlung einer geringen Zellzahl führen kann, die nicht den tatsächlichen Verhältnissen entspricht.

Der große Nachteil von Bakterienadhäsionsexperimenten ist, dass sie sehr viel Zeit in Anspruch nehmen und eine große Anzahl von Messungen durchgeführt werden muss, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Die Verwendung von Mikrotiterplatten in den Experimenten konnte die Zeit, die für die Durchführung benötigt wurde, jedoch verringern. *Whitesides et al.* nutzten Alkanthiolat-SAMs auf Gold, welche auf 96-Näpfchen (in den Kavitäten) Mikrotiterplatte erzeugt wurden, zum einfachen und bequemen Screening des InhibitionsPotenzials bestimmter Kopfgruppen gegenüber Bakterienadhäsion. Die vorteilhaften Eigenschaften von SAMs und die Standardisierung der Methode durch die Verwendung von Mikrotiterplatten macht die SAM-basierten Arrays zu Hilfsmitteln, die einen hohen Durchsatz von Bakterienadhäsionstests erlauben.³³¹

3.3.3 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (**Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, SPR**) stellt eine optische Untersuchungsmethode dar, die Echtzeitmessungen von Adsorptionsprozessen auf Metalloberflächen ermöglicht. Die Methode hat eine breite Anwendung in der Oberflächenanalytik zur Verfolgung von Affinitätsreaktionen zwischen interagierenden Biomolekülen gefunden. Als Metalle kommen meistens Gold und Silber zum Einsatz.

Die Voraussetzung für Oberflächenplasmonspektroskopie ist die Erzeugung eines evaneszenten Feldes auf der Substratoberfläche. Dieses Feld entsteht unter der Bedingung der totalen Reflexion des eingestrahlten Lichtes an der Grenzfläche eines Materials mit einem hohen Brechungsindex zu einem Medium mit einem niedrigen Brechungsindex. Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche exponentiell ab.

Bei der Messung wird polarisiertes, monochromatisches Licht unter einem Winkel auf die dünne Metallschicht eingestrahlt, bei dem Totalreflexion an der Schicht auftritt. (Die Goldschicht befindet sich im Kontakt mit einem Glasprisma). Durch die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit den Elektronen des Goldfilms kann sich ein sogenanntes Oberflächenplasmon ausbilden. Im Falle einer Resonanz bei einem ganz bestimmten, so genannten Resonanzwinkel Θ , tritt im reflektierten Licht Intensitätsminimum auf, der mit einem Detektor erfasst wird.

3 Methoden

Eine Interaktion des Analyten, wie z. B. Proteinen oder Bakterien, mit dem Goldfilm oder Monoschichten führt zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels. Diese Verschiebung korreliert mit der Schichtdicke, der auf der Goldoberfläche gebundenen Substanz und kann für die Quantifizierung der Adsorption herangezogen werden (Abb. 24).

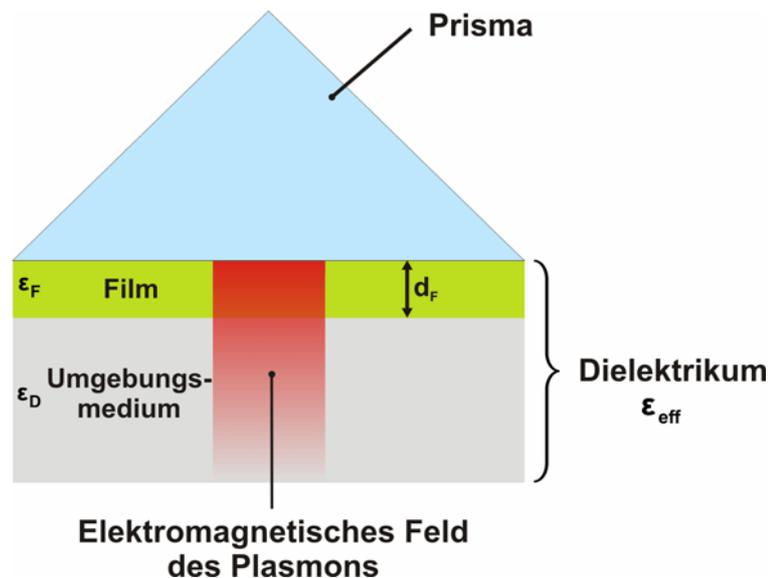


Abb. 24: Effektive Dielektrizitätskonstante bei Abscheidung eines dünnen Films auf der Au-Oberfläche.

Dabei wird die Sensitivität des Resonanzwinkels gegenüber ϵ_{eff} ausgenutzt, um die Veränderungen des Dielektrikums an und in der Nähe der Grenzfläche zum Metallfilm zu detektieren. Die Bindung des Analyten an der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche führt zu einer Änderung der dielektrischen Eigenschaften und daher auch zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels. Im Bereich kleiner $\Delta\epsilon_{eff}$ besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Veränderung der effektiven Dielektrizitätskonstante und der Verschiebung des Resonanzwinkels. Die zugrunde liegenden Formeln sind in Gl. 2 und Gl. 3 wiedergegeben.

3 Methoden

$$\Delta\Theta_R = m \cdot (\Delta\varepsilon_{\text{eff}})$$

$\Delta\Theta_R$ = Resonanzwinkelverschiebung

m = Proportionalitätsfaktor

$\Delta\varepsilon_{\text{eff}}$ = Änderung der effektiven Dielektrizitätskonstante durch Adsorption

$$\Delta\varepsilon_{\text{eff}} = (\varepsilon_{\text{eff}}^{\text{nach}} - \varepsilon_{\text{eff}}^{\text{vor}})$$

$\varepsilon_{\text{eff}}^{\text{vor}}$ = effektive Dielektrizitätskonstante vor

Schichtbildung

$\varepsilon_{\text{eff}}^{\text{nach}}$ = effektive Dielektrizitätskonstante nach

Schichtbildung

Die Bestimmung der Schichtdicken des gebundenen Films kann auf zwei Weisen erfolgen. Wenn die Dielektrizitätskonstanten der vier Medien bei der verwendeten Wellenlänge bekannt sind, kann die Schichtdicke direkt aus der Größe der Resonanzwinkelverschiebung berechnet werden. Neben der direkten Berechnung besteht die Möglichkeit mit der frei erhältlichen Software *Winspill* anhand simulierter Kurven praktisch bestimmte Werte für $\Delta\Theta_R$, direkt einer Schichtdicke zu zuordnen.³³² Der Einsatz dieser Methode zur Messung der Bakterienadhäsion ist wegen der Möglichkeit, die Adhäsionsprozesse im Echtzeitmodus zu verfolgen, sehr reizvoll.

Besonders in biologischen Systemen ist die Abbildung der Dynamik bzw. unterschiedlicher Stadien der Wechselwirkungen sehr interessant.

SPR-Biosensoren werden bereits zur Überprüfung der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit, im Umweltschutz, in der Diagnostik, der pharmazeutischen Forschung und in anderen *Life Science* Bereichen eingesetzt. Neben dem Nachweis von kleinen Analyten besitzt das SPR System als markierungsfreie Detektionsmethode ein großes Potenzial in der Detektion von bakteriellen Analyten. *Escherichia coli* O157:H7,³³³ *Salmonella enteritidis*³³⁴ sowie *Staphylococcus aureus*³³⁵ konnten durch SPR nachgewiesen werden. Dabei ist die Möglichkeit der direkten und schnellen Detektion im Vergleich zu mikrobiologischen Labormethoden, die mit der Kultivierung verbunden sind und daher bis 48 h in Anspruch nehmen können, ein großer Vorteil.

Die meisten SPR-Sensoren zur Detektion von Bakterien in Suspension basieren auf Immunoassays und besitzen ein gemeinsames Grundprinzip, nämlich die Nutzung der Spezifität einer Antigen-Antikörper Bindung. Diese Immunoassays sind so konfiguriert, dass das Bakterium an den auf der Metalloberfläche immobilisierten Antikörpern bindet und so durch die bindungsbedingte Veränderung des Resonanzwinkels nachgewiesen werden kann.

Es wird auch von der direkten Detektion von Bakterien durch SPR berichtet.³³⁶ Dabei wurde die primäre Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* auf Gold detektiert. Allerdings wird die SPR-Sensitivität für Mikroorganismen als weniger zufriedenstellend angesehen als für die Proteine.³³⁷ Als möglicher Grund hierfür wird unter anderem die Größe der Bakterien von ca. 1 μm vermutet. Aus diesem Grund ist die Hauptmasse der gebundenen Bakterien vermutlich außerhalb des evaneszenten Feldes und kann nicht detektiert werden.

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Bakterienadhäsionsuntersuchungen auf Gold-, Stahl- und Aluminium-Substraten und auf SAMs auf diesen Metallen vorgestellt.

4.1 Methodenentwicklung

Die Untersuchung der Bakterienadhäsion auf SAMs umfasste chemisches und mikrobiologisches praktisches Arbeiten. Im chemischen Labor erfolgte die Präparation von SAMs. Die Präparation der Zellen und die Bakterienadhäsionsassays wurden im mikrobiologischen Labor durchgeführt.

Eine wichtige Voraussetzung für die gewählte Methode war, dass diese in unserem Forschungslabor durchführbar war. Für die Etablierung der Methoden zur Bakterienadhäsionsuntersuchung auf SAMs war es unerlässlich, jeden Arbeitsschritt, soweit möglich, zu standardisieren. Die Präparation von Thiolat-SAMs auf Gold ist in unserem Laboratorium gut etabliert und kann daher als reproduzierbar angesehen werden. Vor der SAM-Präparation wurden die Goldsubstrate unter anderem mit Wasserstoffplasma gereinigt. Plasmabehandlung stellt eine sehr effektive Oberflächenreinigungstechnik dar, um die sehr dünne Kontaminationsschicht zu entfernen. Die Methode wird oft genutzt, um die Grenzflächenaktivität bzw. die Fähigkeit zur Ausbildung einer Bindung zu fördern.³³⁸

Um zu gewährleisten, dass die untersuchten SAMs immer gleich alt waren, wurden sie vor jedem Adhäsionsexperiment frisch hergestellt.

Wegen der geringen Größe der Mikroorganismen lassen sich ihre Eigenschaften d. h. auch ihr Adhäsionsverhalten, im Allgemeinen nicht an einzelnen Zellen studieren, sondern nur an Populationen (*bulk assays*). Es werden Bakterienkulturen, Kollektive aus individuellen Zellen, untersucht. Innerhalb einer Population können sich die einzelnen Zellen von einander genetisch und damit auch im Verhalten unterscheiden. Die Signifikanz dieser Unterschiede ist nicht gut verstanden.³³⁹

4 Ergebnisse

Das Ergebnis eines Adhäsionsexperiments wird maßgeblich von der physiologischen Entwicklungsphase der untersuchten Population und der Bakterienkonzentration der Testsuspension beeinflusst. Bakterien sind äußerst dynamisch bezüglich ihrer Zellwandzusammensetzung. Die Art der dort anzutreffenden Proteine, der LPS und die Expressierung bestimmter Adhäsine sind davon abhängig, ob die Bakterien sich in der exponentiellen oder der stationären Wachstumsphase befinden (s. 4.1.1).

Die Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von *E. coli* WT, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, zeigten deutlich bei den Zellen mit einer $OD_{550} = 0,5$ Oberflächenanhängsel (Abb. 25). Die Abwesenheit dieser Oberflächenstrukturen bedeutet allerdings nicht unbedingt den Verlust der Adhäsionsfähigkeit. Eine weitere Beobachtung hinsichtlich der Oberflächeneigenschaften wurde mit einem *E. coli* Stamm MIII aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Heisig gemacht. Dieses Bakterium exprimiert keine Fimbrien. Die einzelnen Experimente im Rahmen dieser Arbeit deuteten jedoch darauf hin, dass diese Bakterien trotzdem über eine ausgeprägte Adhäsionsfähigkeit verfügen. (vgl. 4.5)

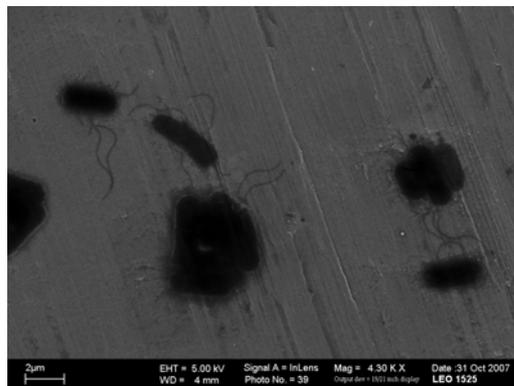


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* WT mit $OD_{550} = 0,5$.

Die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase gelten in ihrem individuellen Verhalten als weitgehend einheitlich.³⁴⁰ Daher wurde, um die Heterogenität in der Testpopulation und die dadurch bedingten Fehler so gering wie möglich zu halten, die exponentielle Wachstumsphase für die Adhäsionsexperimente gewählt.

Als nächstes wurden Versuche unternommen, in denen das Wachstumsverhalten der Testorganismen untersucht wurde.

4.1.1 Wachstum der Testorganismen

Bei der Kultivierung der Mikroorganismen liegt in der Regel kein synchronisiertes Wachstum vor. Das bedeutet, dass die verschiedenen Zellen der Population sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten teilen. Die bakterielle Zelloberfläche, die maßgeblich an der Adhäsion beteiligt ist, ändert sich in der physiologischen Phase des Wachstums kontinuierlich. Daher war es von erheblicher Bedeutung, für die Testorganismen sowohl die Wachstumsbedingungen als auch die Kultivierungszeit optimal zu wählen.

Es werden allgemein vier Phasen des Wachstums unterschieden. In der Anlaufphase erfolgt die Anpassung der Zellen an die herrschenden Bedingungen. Beispielsweise erfolgt die Induktion von Enzymen zur Verwertung von Nährstoffen. In der exponentiellen Wachstumsphase teilen sich die Zellen in regelmäßigen Abständen. Außerdem wird der Zellzuwachs pro Zeiteinheit ausschließlich von der Wachstumsrate und der vorherigen Zelldichte und nicht von anderen Faktoren, wie Sauerstoff- bzw. Nährstoffeintrag bestimmt. In der stationären Phase bleibt die Zellzahl konstant, da aufgrund des Nährstoffmangels kaum noch Wachstum möglich ist. Mit der Induktion lytischer Enzyme und der Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte fangen die Zellen an abzusterben. Dies entspricht dem Übergang in die letzte Phase, der Absterbephase.

Wegen der relativen Konstanz der Teilungsrate wird die exponentielle Phase als einheitlich und am besten geeignet für unterschiedliche Untersuchungen angesehen. Vor der Durchführung von Bakterienadhäsionstests wurden die Wachstumskurven der Testorganismen durch Trübungsmessungen bestimmt. Dabei wurden die optischen Dichten (OD) ermittelt, die jeweils einer bestimmten Anzahl von Testorganismen im Medium entsprachen. Die Linearität zwischen Trübungswert und dem Zellgehalt gilt allerdings nur im Bereich $OD \leq 0,3$. Bei größeren Trübungswerten werden die Proben in der Regel vor der Messung zehnfach verdünnt.³⁴¹

In einem endlichen System kann allerdings das exponentielle Wachstum nicht unbeschränkt andauern. Beim bakteriellen Wachstum wird auch die Grenze durch die Limitierung des Nahrungsangebots bestimmt. Zur Beschreibung des bakteriellen Wachstums wird die logistische Funktion als Wachstumsmodell verwendet. Dieses Modell behandelt Dynamiken mit beschränkten Ressourcen d. h. der Rückgang der

4 Ergebnisse

Wachstumsrate ab einer bestimmten Populationsdichte wird in Betracht gezogen. Damit berücksichtigt die logistische Funktion, dass mit steigender Bakterienzahl die Wachstumsrate (Zuwachs pro Zeiteinheit) so lange fällt, bis schließlich ein stabiles Gleichgewicht zwischen Sterberate und Zuwachsrate erreicht ist.

4.1.1.1 Wachstumskurve *E. coli* WT

In Anlehnung an die Bakterienadhäsionsuntersuchungen von Whitesides³⁴² wurde für die Testsuspension eine Kultivierungszeit bis zur frühen exponentiellen Phase gewählt. Die entsprechende optische Dichte ($OD_{550} = 0,5$) wurde aus der Wachstumskurve von *E. coli* WT ermittelt (Abb. 26). Als Wachstumsmedium diente Trypton Soja Bullion (*Tryptone Soya Broth* pH = 7,3, TSB). Dabei handelte es sich um ein nährstoffreiches Flüssigmedium, das das Wachstum einer Vielzahl von Mikroorganismen unterstützt.

Bei der Durchführung jedes Adhäsionsexperiments wurden die Zellen dann geerntet, wenn die optische Dichte der Suspension den gewünschten Wert von 0,5 erreicht hatte. Danach wurden die Zellen entsprechend der Vorschrift präpariert.

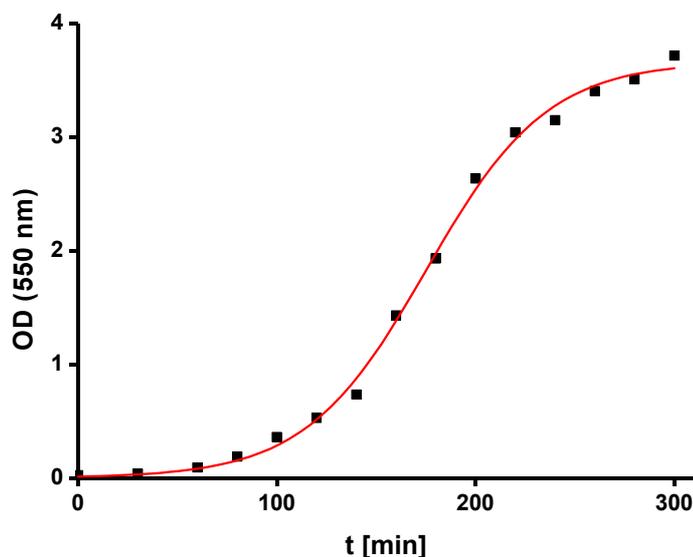


Abb. 26: Wachstumskurve von *E. coli* WT.

4.1.1.2 Wachstumskurve *S. epidermidis* ATCC 14990

In Abb. 27 ist die Wachstumskurve von *S. epidermidis* ATCC 14990 gezeigt. Für die Wachstumsmessung wurden die Zellen aerob in einer Schüttlerkultur gezüchtet und in regelmäßigen Abständen Proben zur Wachstumsverfolgung entnommen und gemessen. TSB wurde auch für *S. epidermidis* ATCC 14990 als Flüssigmedium verwendet.

Für die Adhäsionsexperimente wurde eine optische Dichte von $OD_{550}=0,25$ aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase die Testsuspension festgelegt.

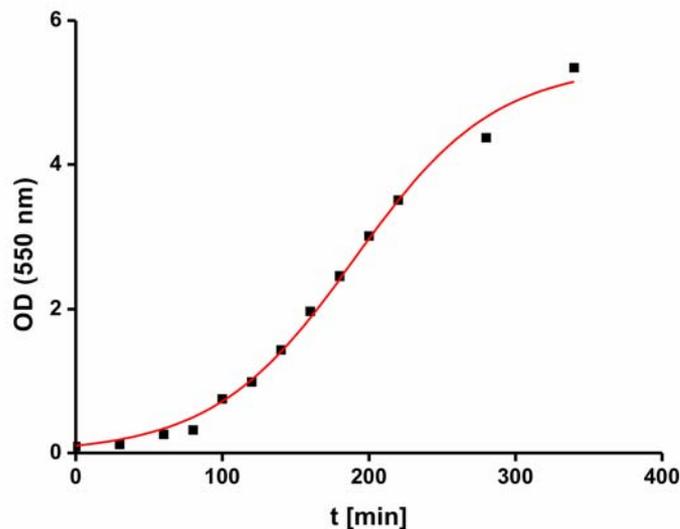


Abb. 27: Wachstumskurve von *S. epidermidis* ATCC 14990.

4.1.1.3 Wachstumskurve *S. aureus* ATCC 6538

Die Wachstumskurve von *S. aureus* ATCC 6538 ist in der Abb. 28 dargestellt. Für die Aufnahme der Wachstumskurve wurden die Zellen aerob in TSB als Flüssigmedium inkubiert und Proben in regelmäßigen Abständen gemessen. Die gewählte optische Dichte $OD_{550}=0,25$ entsprach auch für diesen Organismus der gewünschten konstanten maximalen Teilungsrate.

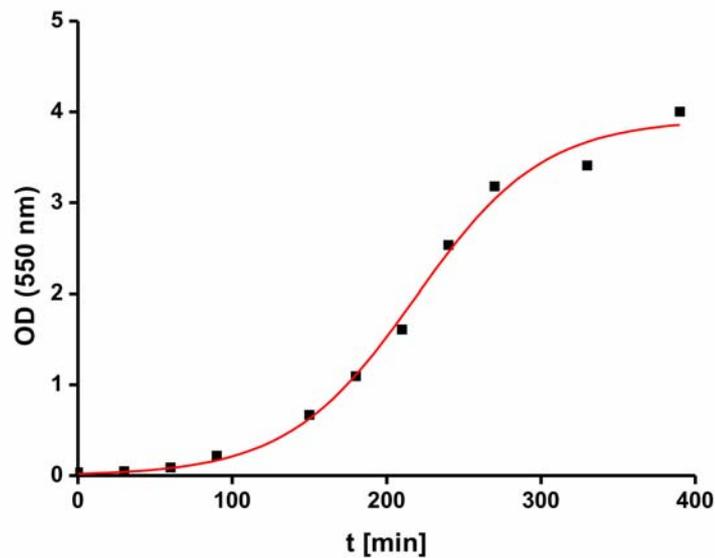


Abb. 28: Wachstumskurve von *S. aureus* ATCC 6538.

4.1.1.4 Wachstumskurve *P. aeruginosa* PAO

In Anlehnung an die Literatur³⁴³ wurde für *P. aeruginosa* die mittlere exponentielle Phase mit OD = 1 gewählt. Anhand McFarland Standards (vgl. 4.1.2) und der Ergebnisse des Ausplattierens verschiedener Verdünnungsstufen wurde ermittelt, dass die zu erreichende Zelldichte für die Arbeitskultur von 10^9 Bakt./mL bei dieser physiologischen Phase bzw. optischen Dichte erreicht war.

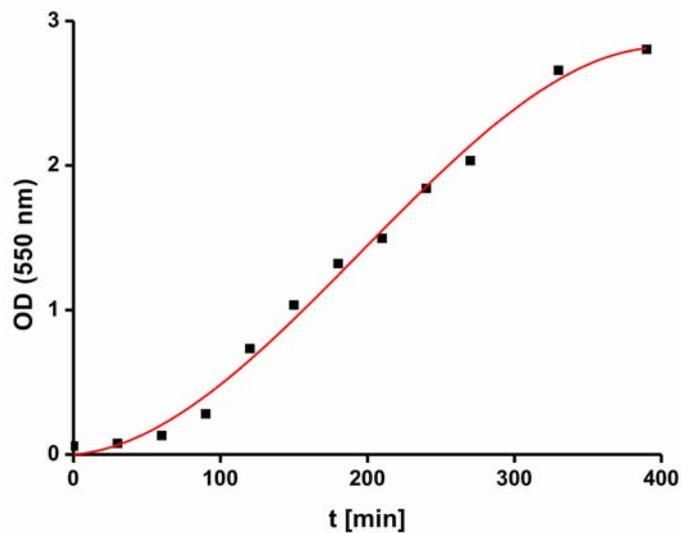


Abb. 29: Wachstumskurve von *P. aeruginosa*.

4.1.2 Konzentration der Inkubationssuspension

Wie oben erwähnt, ist die Konzentration (Kolonien-bildenden Einheiten pro mL, CFU/mL) und nicht die Gesamtzahl der Organismen in der Inkubationssuspension für die Bakterienadhäsion wichtig. Daher wurde stets nicht nur darauf geachtet, die Testorganismen in der exponentiellen Wachstumsphase zu ernten, sondern die Experimente bei gleicher Konzentration durchzuführen.

Die Herstellung der Bakteriensuspensionen mit definierter Keimdichte erfolgte über die Messung der optischen Dichte und Vergleich mit McFarland Standards. Dabei handelt es sich um eine Standardreihe mit verschiedenen optischen Dichten zur Einstellung von Bakteriensuspensionen. Diese Standards werden durch die Zugabe von BaCl₂ zu H₂SO₄ hergestellt. Das führt zu einem Niederschlag von BaSO₄, von dem die Absorptionswerte gemessen werden.³⁴⁴ Es gibt auch Standard-Sets aus Suspensionen uniformer Latexpartikel.

Tabelle 3 und Abb. 30 fassen das Prinzip der Anwendung der McFarland Standards zusammen.

Standard	Bakteriendichte x 10⁶/mL	Optische Dichte theoretisch bei 550 nm
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

Tabelle 3: Äquivalenzen nach McFarland.

Das Referenz-Set besteht aus speziell normierten sechs Standard-Ampullen, die mit den Nummern der Skala 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 beschriftet sind. Zusätzlich werden optische Dichten und die korrespondierenden Bakterienkonzentrationen tabellarisch angegeben. D. h. von der OD der Bakteriensuspensionen konnte durch die McFarland Referenz direkt auf die Zellzahl geschlossen werden. Zur Überprüfung erfolgte

4 Ergebnisse

zusätzlich die Ausplattierung der auszählbaren Verdünnungsstufen auf Agarplatten. Das Ergebnis wurde am nächsten Tag mit der angenommenen Zellzahl verglichen.

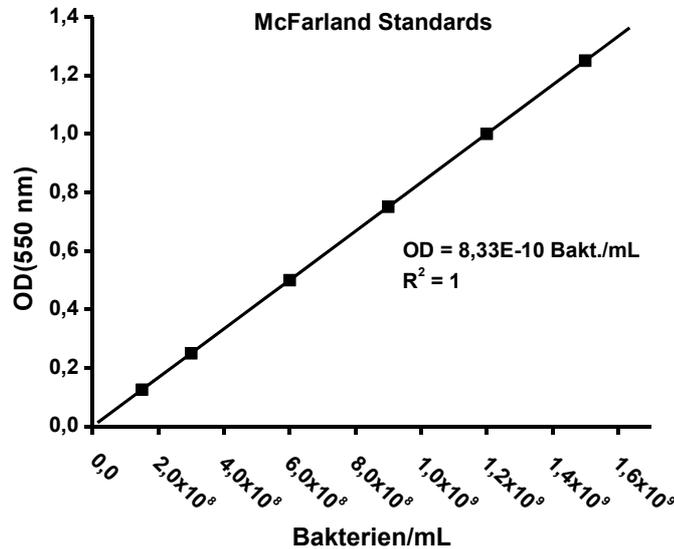


Abb. 30: Korrelation der OD mit der Keimdichte.

Die Einstellung der gewünschten Konzentration kann auch visuell ohne eine photometrische Messung erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings keine visuelle Einstellung der Konzentration durchgeführt, da dieser Vergleich zu Bakterien suspension mit abweichender Konzentration bzw. Dichte führen konnte.

4.1.3 Vorversuche mit *E. coli* WT

Zur Untersuchung der Anhaftung von *E. coli* WT an Gold-, Stahl- und Aluminiumoberflächen sowie an selbstanordnenden Monoschichten auf diesen Metallsubstraten wurde eine in der Literatur für die Adhäsionsuntersuchungen auf Thiolat-SAMs auf Gold beschriebene Methode³⁴² eingesetzt. Diese Methode wurde im späteren Verlauf an einigen Arbeitsschritten modifiziert. Diese Veränderungen waren notwendig, da die praktische Durchführung, wie sie in der obigen Literatur beschrieben wird, zum Teil nicht möglich war oder erkannt wurde, dass der jeweilige Arbeitsschritt zu einem Fehler im Ergebnis beiträgt. In der Phase der Methodenoptimierung wurden Adhäsionsexperimente hauptsächlich auf Goldsubstraten aber auch auf ethylenglycoltermi-

4 Ergebnisse

nierten SAMs, sowie SAMs der Klassen **D2(SAc)** und **D3(SAc)** durchgeführt. Nachfolgend werden im Rahmen der Experimentbeschreibung auch diese Veränderungen aufgezeigt und erläutert.

Um Inkubationssuspensionen gewünschter Konzentration herzustellen, wurde die entsprechende Menge der Ausgangssuspension mit PBS verdünnt. Zur Überprüfung der Keimdichten wurden aus der Ausgangssuspension und der Inkubationssuspension standardisierte Verdünnungsreihen in Schritten von zehnfachen Verdünnungen hergestellt. Dann wurden je 50 µL der Suspensionen auszählbarer Verdünnungsstufen auf die Agarplatten verteilt. Die Kontrolle der Ausgangssuspension erfolgte direkt nach der Herstellung sowie nach dem Zentrifugieren, um einen Zellverlust als Folge der Zentrifugation zu erfassen. Die Inkubationssuspension wurde sowohl vor als auch nach der Applikation ausplattiert.

Für die Durchführung des Experiments wurden *E. coli* WT Bakterien bis zur mittleren exponentiellen Phase gezüchtet ($OD_{550} = 0,5$). Zur Zellernte wurden die Bakterien zentrifugiert und mit kaltem PBS (pH = 7,4) gewaschen. Zentrifugieren ist das Standardprotokoll zum Ernten von Zellen. Es wurde gefunden, dass das Zentrifugieren mit einer hohen Drehzahl zerstörend auf die strukturelle Integrität der *E. coli* Zelle wirken kann.³⁴⁵ Daher wurde, wie in der Literatur angegeben, immer mit einer Geschwindigkeit von 3000 upm zentrifugiert.

Mit einer Testsuspension von 1×10^5 Bakt./mL in PBS (pH = 7,4) wurden die Testsubstrate über eine Expositionszeit von 1 h im Inkubationsschüttler bei 37° C inkubiert. In den anfänglichen Experimenten wurden die Proben einzeln in den Zentrifugenröhrchen inkubiert. Die Konzentrationsunterschiede in den Zentrifugenröhrchen, die möglicherweise beim Aliquotieren der Suspension entstanden sind, und die zufällige Platzierung der Metallsubstrate im Röhrchen drückten sich in schwankenden Ergebnissen aus. Um diese Fehlerquellen auszuschließen, wurden Adhäsionsboxen aus Polyvinylchlorid (PVC) gebaut, in denen alle Substrate einer Versuchsreihe vertikal in die „Führungsrillen“ platziert bzw. fixiert und mit der Testsuspension überschichtet werden konnten. Die Boxen besaßen den Vorteil, dass alle Substrate in der gleichen Testsuspension inkubiert wurden und somit die gleiche Behandlung aller Testsubstrate gegeben war. Die Menge der Testsuspension (50 mL) wurde so eingestellt, dass die Proben auch unter der kreisenden Bewegung des Inkubationsschüttlers permanent von der Testsuspension bedeckt waren. Der Abstand zwischen den Proben war so gewählt (zwischen zwei Proben wurde eine Rille frei gelassen), dass

4 Ergebnisse

sie frei in der Testsuspension schwingen konnten, ohne sich gegenseitig zu berühren oder gar zu überlagern. Somit bestand keine Gefahr einer mechanischen Schädigung der Proben. Für die Wahl des Materials sprach die Beständigkeit von PVC gegenüber Alkohol, da die Boxen nach jedem Adhäsionsexperiment mit Alkohol gespült wurden, um Keimfreiheit in den nächsten Versuchen zu garantieren. Des Weiteren war vorteilhaft, dass die glatte Oberfläche von PVC kaum von Bakterien besiedelt wird. Daher bestand keine Gefahr, dass die zu untersuchenden Metalloberflächen bzw. Selbstanordnenden Monoschichten mit den Keimen aus den Adhäsionsboxen kontaminiert wurden.

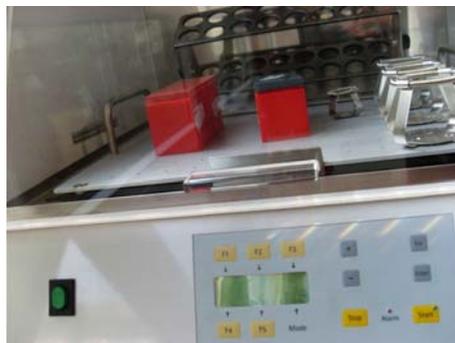


Abb. 31: Für das Testsystem gebaute Adhäsionsboxen.

Bei der Konstruktion der Boxen zeigte sich, dass die Verwendung von Klebstoffen zu vermeiden war, da beobachtet wurde, dass die Testkeime durch die Kleber abgetötet wurden. Nach dieser Beobachtung wurden die Adhäsionsexperimente ausschließlich in gefrästen, klebstofffreien Boxen durchgeführt.

Da in der Literatur exakte Angaben zur hydrodynamischen Bedingungen der Adhäsionsexperimente fehlten, wurden Schüttelgeschwindigkeiten von 40 rpm, 180 rpm und 250 rpm verglichen. *E. coli* WT Bakterien zeigten unter allen Schüttelgeschwindigkeiten eine Adhäsionsfähigkeit. Als optimal zeigte sich jedoch eine Geschwindigkeit von 40 rpm, die dann in den anschließenden Untersuchungen durchgängig benutzt wurde.

Die ungebundenen Bakterien wurden nach dem Adhäsionsschritt durch Waschen mit PBS entfernt. In der Literatur war angegeben, dass dreimal 200 mL PBS zum Waschen verwendet wurde. Allerdings fehlten detaillierte Angaben dazu, wie der Waschschrift genau durchgeführt wurde. Da es bis dato noch kein standardisiertes Spülprotokoll gibt, hat sich in der Literatur der Ausdruck „leichtes, vorsichtiges Spü-

4 Ergebnisse

len“ zur Beschreibung dieses Schrittes etabliert, was irreführend ist.³²⁵ Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, diesen Arbeitsschritt, soweit wie möglich, zu standardisieren.

Die anfängliche starke Streuung der Ergebnisse war vermutlich auf die Verwendung einer Spritzflasche zum Spülen der Proben nach der Adhäsion zurückzuführen. Hier schien ein unvollständiges Entfernen ungebundener Zellen aufgetreten zu sein, was zur Verzerrung der Messergebnisse führte. Um dieses Problem zu umgehen, wurde überlegt, die losen Bakterien direkt in den Boxen durch dreimaliges Schwenken mit jeweils frischem Puffer von den Proben zu entfernen. Weiterhin wurde eine Spülvorrichtung, bestehend aus einem an einem Stativ befestigten Scheidetrichter (s. Abb. 32) zum Spülen der Substrate verwendet. Der Scheidetrichter hat gegenüber der Spritzflasche den Vorteil, dass der gleich gerichtete Flüssigkeitsstrom kontinuierlich die gleiche Kraft auf die Proben ausübt und der Flüssigkeitsstrom gleichmäßiger und schneller ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein schneller Flüssigkeitsstrom kaum Drei-Phasen-Kontakt erlaubt und letztlich bewirkt, dass nur ein geringer Teil der fest adhärenierten Bakterien wieder abgelöst werden.³²⁸



Abb. 32: Spülvorrichtung zum Spülen der Proben nach der Adhäsion.

Daher wurde entschieden, in den folgenden Experimenten einheitlich den Scheidetrichter zum Spülen der Proben einzusetzen.

Die Quantifizierung adhärenierter Bakterien erfolgte durch die Plattenzählmethode. Für die Übertragung der Bakterien vom Substrat auf die Agaroberfläche sollte ein kurzer

4 Ergebnisse

Kontakt der Proben mit der Agaroberfläche sorgen (Abb. 33). Analog zu einem Stempel sollte dabei ein Abdruck erzeugt werden, der der Verteilung der Bakterien auf der Probe entsprach. Nach der Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37° C sollten die vom Substrat übertragenen Bakterien dann als Kolonien sichtbar werden und würden dann auszählbar sein.

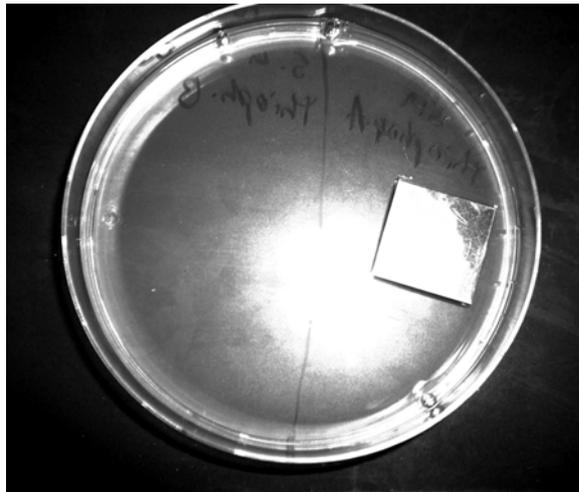


Abb. 33: Übertragung adhärerter Bakterien auf eine Agarplatte.

Die erste praktische Schwierigkeit bei diesem Schritt war das Entfernen der Probe nach dem Kontakt mit der Agarplatte. Zunächst wurde versucht, wie in der Literatur beschrieben, diesen Schritt mit einer sterilen Plastikpinzette durchzuführen.³⁴² Allerdings gelang dies nicht, ohne dabei die Agaroberfläche zu zerstören. Außerdem waren die *E. coli* Bakterien nicht detektierbar. Vermutlich führte der mehrmalige Versuch, die Probe abzunehmen dazu, dass die Bakterien zum größten Teil auf dem mit dem Substrat abgezogenen Agarfilm verblieben, sowie teilweise in die Risse der Agaroberfläche eindrangen und nicht auswertbar waren. Es wurde auch versucht, durch die Quantifizierung der Keimzahl nach dem Adhäsionsexperiment im Waschpuffer Rückschlüsse auf den Verbleib der Testkeime zu ziehen. Dieses Verfahren verlängerte die Experimentdauer sehr, ohne einen brauchbaren Hinweis auf die mögliche Ursache des Problems zu geben.

Um zu überprüfen, ob die Bakterien nach dem Adhäsionsexperiment noch kultivierbar waren, wurden manche Proben auf der Agaroberfläche gelassen und über Nacht inkubiert. Da es sich bei *E. coli* um fakultativ anaerobe Bakterien handelt, sollten auch unter Sauerstoffunterschuss sichtbare Kolonien entstehen. Die Abb. 34 zeigt eine der Agarplatten mit sichtbarem Bakterienwachstum.

4 Ergebnisse

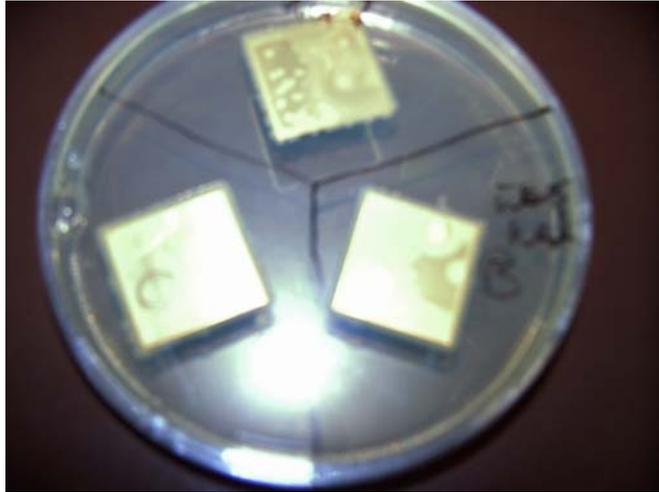


Abb. 34: Bakterienwachstum auf den Goldsubstraten.

Nach einigen Überlegungen erwies es sich als sinnvoll, die Pinzette durch einen handelsüblichen Saugnapf für Kontaktlinsen zu ersetzen. Bei der Anwendung eines Saugnapfes zum Anheben der Proben flacht sich dieser etwas ab und bildet einen elastischen Kontaktrand. Durch den entstandenen Unterdruck saugt sich der Napf an der Oberfläche der Probe an. Dies ermöglichte das Abnehmen der Proben von der Agaroberfläche, ohne diese zu beschädigen (Abb. 35).



Abb. 35: Saugnäpfe zum Anheben der Proben von der Agaroberfläche.

Der nächste Schritt bestand darin, die Lebendkeimzahl auf den bebrüteten Platten zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass die Übertragung der Keime durch das Andrücken der Probe auf den Agar große Nachteile hatte, wie z. B. zusammengewachsene Kolonien, was Quantifizierungsschwierigkeiten verursachte. Die Zahl der Kolonienbildenden Einheiten war in vielen Fällen zu hoch und die Bakterien waren zu dicht gewachsen. Daher war eine akkurate Auszählung nicht möglich. Anders als in einem Flüssigmedium war hier der für eine zuverlässige Quantifizierung notwendige

4 Ergebnisse

Verdünnungsschritt nicht durchführbar. Um die Kolonien von einander zu entfernen, wurde überlegt, nach dem Abnehmen der Proben einige μL NaCl-Lösung auf die Agarplatte zu geben und die Zellen zu verteilen. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt bewirkte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Agarplatte, was wiederum eine exaktere Auszählung ermöglichte.

Außerdem wurde beobachtet, dass es beim einmaligen Auflegen (Abklatschen) der Proben keine vollständige Übertragung erfolgte. Die Frage an dieser Stelle war, ob 20-30 Sekunden Transferzeit und wie in der Literatur angegeben,³⁴² ausreichend für eine möglichst quantitative Übertragung der Zellen waren. Um diesen Parameter zu optimieren, wurden Transferzeiten von 30, 60 und 120 Sekunden verglichen. Das Ergebnis war, wie die Abb. 36 zeigt, uneinheitlich.

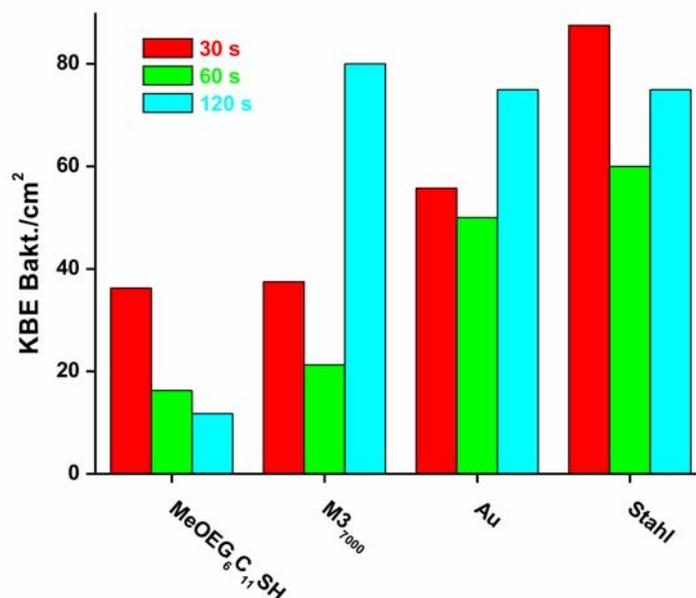


Abb. 36: Vergleich der Transferzeiten.

Für hexaethylenglycolterminierte SAMs und Stahl schienen 30 Sekunden Transferzeit optimal zu sein, während beim Gold und **D2(SAc)₇₀₀₀**-SAMs erst nach 120 Sekunden maximale Zellenübertragung zu beobachten war. Da es allgemein ein wenige Sekunden andauernder Kontakt als ausreichend angesehen wird, um die Erreger von einer kontaminierten Fläche, wie beispielweise Türklinke, aufzunehmen, wurde an dieser Stelle sinnvoll gefunden, 30 Sekunden als Transferzeit festzulegen

4 Ergebnisse

und den auf den Proben verbliebenen Bakterien neue Agaroberfläche zum Übergang anzubieten.

Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, wurde eine Goldprobe nach der Keimübertragung auf eine erste Agarplatte auf einen zweiten Nährboden gelegt und diese nach den 30 Sekunden Transferzeit über Nacht bei 37° C inkubiert. Das Ergebnis bestätigte unsere Vermutung, dass auf den Proben nach dem ersten Kontakt mit einer Agarplatte noch anhaftende, nicht transferierte Bakterien verblieben (Abb. 37).

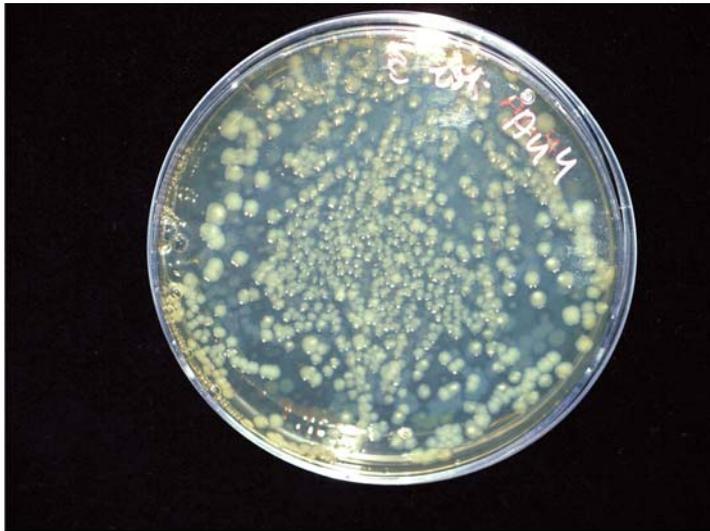


Abb. 37: *E. coli* Bakterien, die von einer Au-Oberfläche transferiert wurden.

Wie im Methodenteil besprochen, stellt die Variabilität bei der quantitativen Analyse mikrobiologischen Materials ein großes Problem dar. Diese setzt sich aus der naturbedingten, daher unvermeidbaren, biologischen und die durch die Bestimmungsmethode bedingte Variabilität. Auf der Grundlage der Beobachtungen der Vorversuche wurde ein Arbeitsablauf für das Adhäsionsexperiment festgelegt, um die zweite Komponente der Variabilität möglichst klein zu halten (Tabelle 4).

4 Ergebnisse

Arbeitsschritt	Ablauf und Hilfsmittel
Adhäsion	Die Proben in die Adhäsionsboxen platzieren, mit 50 mL Testsuspension der Konzentration von 10^5 Bakt./mL überschichten, im Inkubationsschüttler 1 h bei 37 °C und 40 rpm inkubieren.
Waschen der Proben zum Entfernen der nicht-adhäsiv gebundenen Bakterien	Nach der erfolgten Adhäsion die Bakterien-suspension in den Boxen durch 50 mL sterilem PBS ersetzen und die Proben einzeln mittels eines Scheidetrichters jeweils mit 80 mL PBS abspülen. Den Vorgang dreimal wiederholen. Die Proben dabei mit einer sterilen Pinzette so halten, dass der Spülpuffer in Richtung Pinzette ablaufen kann. Die Pinzetten beim Umgreifen wechseln. Die gebrauchten Pinzetten zunächst in ein Becherglas mit EtOH tauchen, anschließend mit PBS spülen.
Bakterientransfer auf die Agarplatten	Die gespülten Proben in die Mitte einer Agarplatte legen, nach 30 s mit einem Saugnapf abnehmen. Den Vorgang mit zwei weiteren Agarplatten wiederholen. 80 µL sterile NaCl-Lsg. auf die Agarplatten geben und mit einem sterilen Drigalskispatel durch kreisende Bewegungen gleichmäßig so lange verteilen, bis der Spatel nicht mehr leicht über die Agaroberfläche gleitet. Die Agarplatten über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank legen.
Vitalitätstest der Testkeime nach dem Experiment	Aus der Testsuspension eine Verdünnungsreihe herstellen und drei Verdünnungsstufen ausplattieren.

Tabelle 4: Modifizierung einiger Arbeitsschritte für die *E. coli*-Adhäsion gegenüber in der Literatur beschriebenenem Protokoll.³⁴²

4.1.4 Vorversuche mit *S. epidermidis* ATCC 14990

Das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* wurde im statischen System nach der in der Literatur beschriebenen Methode³⁴² untersucht. Adhäsionsexperimente unter statischen Konditionen werden einerseits gewählt, um die Studien zu vereinfachen, andererseits betrifft das Problem der Biofilmbildung sowohl fließende als auch stehende Systeme. Bei diesem Verfahren handelte es sich um eine nicht automatisierte Untersuchung, die manuell von der Experimentatorin durchgeführt wurde.

Auch bei der Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Staphylokokken wurden die Bedingungen für die Präparation von Selbstanordnenden Monoschichten und Testkulturen gleich gehalten. Es wurde versucht, Stressfaktoren, wie die Änderung der Temperatur, des pH-Werts, aber auch raue Behandlung der Zellen beim Pipettieren, zu vermeiden.

Für das eigentliche Experiment wurden die mit Ethanol gespülten Proben horizontal in die Petrischalen gelegt. Nachdem die Testsuspension in TSB eine $OD_{550} = 0,25$ (McFarland 1) aufwies, wurde diese aus dem Inkubationsschüttler genommen. Durch die Wahl von McFarland 1 konnte eine ausreichende Keimkonzentration von 1×10^7 Bakt./mL sichergestellt werden. Das gewählte Volumen sollte ausreichend für einen permanenten Kontakt der verwendeten Substrate ($A = 400 \text{ mm}^2$) mit der Bakterien-suspension sein. Da für die Adhäsion die Konzentration der Bakterien-suspension ausschlaggebend ist und nicht die Gesamtkeimzahl in der Testsuspension, wurden in den folgenden Untersuchungen 300 μL Testsuspension auf die Proben pipettiert (Abb. 38).

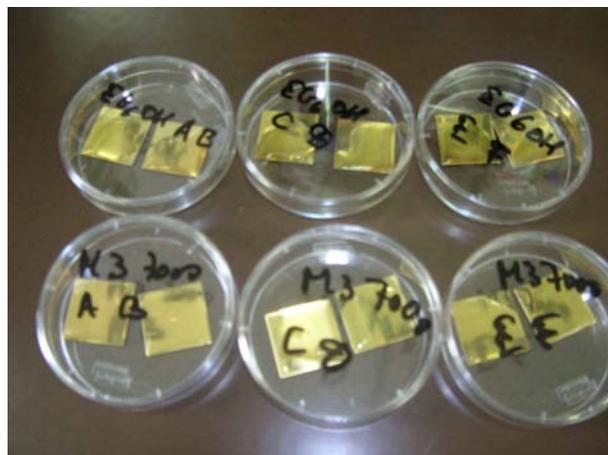


Abb. 38: Inkubation der Proben mit *Staphylokokken*.

4 Ergebnisse

Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37 ° C wurden die Proben mit sterilem PBS (pH = 7,4) gewaschen, um lose Bakterien zu entfernen. Dabei kam das für *E. coli* optimierte Spülprotokoll zum Einsatz. Auch an dieser Stelle war die Methodenbeschreibung in der Literatur nicht exakt, da nur fünfmal Spülen angegeben war und Angaben zum verwendeten Volumen des Spülpuffers sowie zur genauen Spülprozedur fehlten.

Nun wurden die Zellen zwecks Quantifizierung vom Substrat wieder abgelöst. Hierzu wurden 10 mL TSB, welches mit 0,05% Tween[®]80 supplementiert war, in Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Substrate wurden vertikal hineingelegt und 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Für die Wahl der Dauer der Ultraschallbehandlung war entscheidend, dass bei einem längeren Ablösevorgang durch Ultraschall viele Keime abgetötet werden konnten. Allgemein Bakterien, aber insbesondere *Staphylokokken* neigen zur Aggregatbildung, wie Abb. 39 zeigt. Aus dieser rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme wird außerdem ersichtlich, dass die Zellen unterschiedlich groß sind bzw. sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden. Als Folge dieser Beobachtung wäre anzunehmen, dass ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten in der Bakteriensuspension existent und kaum zu kontrollieren ist.

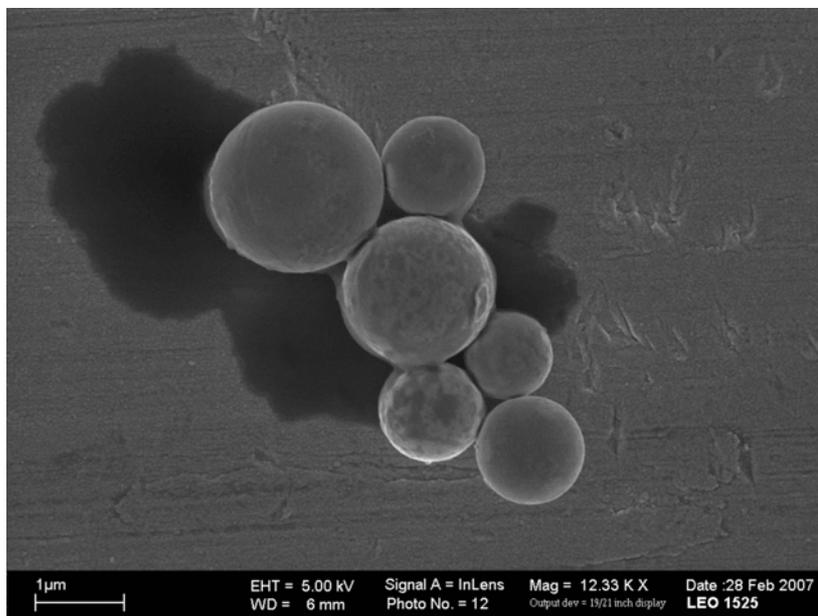


Abb. 39: *Staphylokokken* in haufenförmiger Ansammlung auf einer Goldoberfläche.

Nach dem Ablösen der Zellen durch Ultraschall wurden die Proben mit einer sterilen Pinzette aus der TSB-Tween[®]80-Lösung genommen. Die in den Zentrifugenröhrchen verbliebene Suspension enthielt nun die Bakterien (Testsuspension I). Tween[®]80, ein

4 Ergebnisse

oberflächenaktiver und chemisch weitgehend inerte Stoff, sorgte für die Verminderung der Aggregation der Zellen und hielt sie in der Suspension. Für die Quantifizierung wurden diese Suspensionen (Testsuspension I) zehnfach verdünnt. Danach wurden jeweils 50 μL der unverdünnten und verdünnten Lösung auf Agarplatten verteilt. Diese Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann die kolonienbildenden Einheiten ausgezählt.

Auch bei den *Staphylokokken* zeigte sich am Anfang eine Variabilität der Messergebnisse. Als mögliche Fehlerquelle wurde die Inhomogenität der Ultraschallfelder vermutet. Um die Signifikanz des daherrührenden Fehlers zu verringern, wurde eine Halterung für das Ultraschallbad gebaut, die es ermöglichte, während der Ultraschallbehandlung der Proben, die Zentrifugenröhrchen immer an der gleichen Stelle zu positionieren.

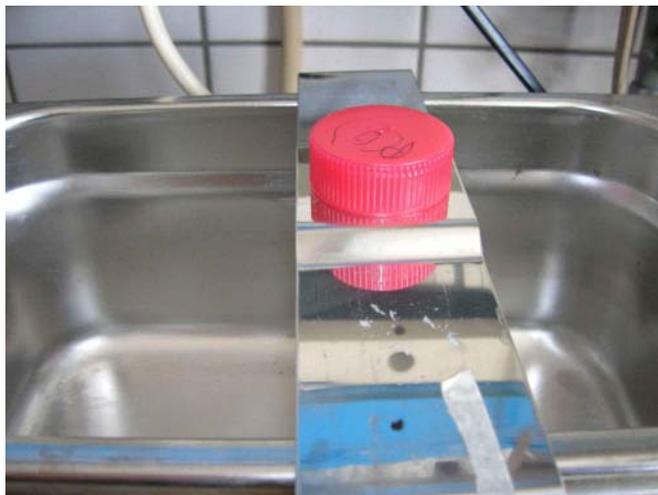


Abb. 40: Haltevorrichtung für Zentrifugenröhrchen.

Außerdem zeigte sich insbesondere bei den unmodifizierten Goldsubstraten, dass die Auftragung von 50 μL Suspension zu einer hohen Zellzahl auf der Agarplatte führte, die nur eine ungefähre Schätzung der Zellzahl durch das Auszählen eines Viertels der Agarplatte und anschließendem Multiplizieren mit vier, ermöglichte (Tabelle 5). Es war anzunehmen, dass die Zellzahl deutlich höher lag, aber einerseits wegen der Konkurrenz um Nährstoffe zwischen den Bakterien nur ein Teil überlebt hat und andererseits wegen des zu dichten Wachstums das Zählen extrem fehlerbehaftet war.

4 Ergebnisse

Goldsubstrate	Zahl der CFU, 50 μL 10x verdünnte Susp.	Zahl der CFU, 50 μL unverdünnte Susp.
Au 1	> 100	ca. 1600
Au 2	> 100	ca. 1600
Au 3	> 100	ca. 1600

Tabelle 5: Hohe Zellzahl, die keine exakte Quantifizierung der auf Au adhärerten Zellen ermöglichte.

Daher wurde für die nächsten Untersuchungen festgelegt, im Falle der unmodifizierten Substrate 25 μ L Suspension (Testsuspension I) auf die Agarplatte zu verteilen und diese Volumendifferenz in der Berechnung zu berücksichtigen.

Tabelle 6 fasst die wesentlichen Schritte der Adhäsionsversuche von *Staphylokokken* an SAMs zusammen.

4 Ergebnisse

Arbeitsschritt	Ablauf und Hilfsmittel
Adhäsion	Die Proben in die Petrischalen horizontal platzieren, mit 300 µL Testsuspension der Konzentration von 10 ⁷ Bakt./mL überschichten, 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubieren.
Bakterientransfer auf die Agarplatten	In 50 mL Zentrifugenröhrchen werden 10 mL TSB supplementiert mit 0,05% Tween [®] 80 vorgelegt. Anschließend werden die Proben vertikal in dieser Lösung platziert und der Deckel wieder zugeschraubt. Die Zentrifugenröhrchen werden in die Halterung des Ultraschallbades hineingehängt und das Bad für 5 Sekunden eingeschaltet. Nach dem erfolgten Übergang der Zellen von der Substratoberfläche in die TSB-Tween [®] 80-Lösung (Testsuspension I) wird die Probe mit einer sterilen Pinzette herausgenommen. Die Testsuspension I wird zehnfach verdünnt und jeweils 50 µL bzw. 25 µL der unverdünnten und zehnfach verdünnten Suspensionen auf die Agarplatten verteilt. Die Agarplatten wird bei 37 °C über Nacht bebrütet.
Vitalitätstest der Testkeime nach dem Experiment	Aus der Adhäsionssuspension eine Verdünnungsreihe herstellen und drei Verdünnungsstufen ausplattieren.

Tabelle 6: Modifizierung einiger Arbeitsschritte für die *Staphylokokken*-Adhäsion gegenüber dem in der Literatur beschriebenen Protokoll.³⁴²

Die Überprüfung der Vitalität der Zellen erschien aufgrund der Erfahrung sinnvoll, um im Falle eines missglückten Versuches einen Zusammenhang mit dem Zustand der Zellen bzw. deren Kultivierbarkeit herstellen zu können. Dabei handelte es sich um eine visuelle Überprüfung der Kultivierbarkeit der Bakterien.

In den einzelnen Experimenten im Rahmen der Vorversuche wurde parallel zu Ultraschall auch Vortexen zum Ablösen der Bakterien nach der Adhäsion eingesetzt. Allerdings fiel die Entscheidung aufgrund der deutlich höheren Effizienz zugunsten des Ultraschallbads aus.

Weitere Optimierungsversuche wurden hinsichtlich der Temperatur des Waschpuffers unternommen. Hierzu wurde zum Spülen der Substrate der Puffer bei RT und temperiert auf 37° C, verwendet. Es konnte kein signifikanter Einfluß der Puffertemperatur auf das Testsystem festgestellt werden. Daher wurde entschieden, im Folgenden Spülvorgang mit PBS von RT durchzuführen.

4.2 Fazit Vorversuche - Konzeptfindung

Auch wenn die Vorversuche keine endgültigen Ergebnisse liefern konnten, waren diese von großer Bedeutung. Durch die Vorversuche war möglich, den Ablauf des Experiments kennenzulernen, den Zeitbedarf besser einzuschätzen und zu erkennen, welche vorbereitenden Arbeiten durchgeführt werden müssen. Die Erkenntnisse aus den Vorversuchen mit *E. coli* waren nützlich für das Adhäsionsexperiment mit *P. aeruginosa*, da dieses nach einer ähnlichen Vorschrift durchgeführt wurde. Die Erkenntnisse der Vorversuche mit *S. epidermidis* wurden bei den nachfolgenden Testreihen mit *S. aureus* berücksichtigt. Außerdem, wie unter 4.1.3 und 4.1.4 angedeutet, ließen sich bereits bei den Vorarbeiten für die Methodenentwicklung die Nachteile der Plattenzählmethode eindeutig erkennen. Das Ablösen der Bakterien vom Substrat war ein sehr problematischer Arbeitsschritt bei der Optimierung, da dieser nicht kontrolliert werden konnte und nicht bekannt war, wie viele Zellen nicht übertragen oder geschädigt worden waren. Auch ein Übergang in den so genannten VBNC-Zustand (*Viable but Not Culturable*), der bereits als Folge der natürlichen Stressfaktoren auftritt, ließ sich nicht ausschließen.^{346,347}

Daher wurde festgelegt, parallel zu der Plattenzählmethode den Vorteil der direkten Zelldetektion der Epifluoreszenzmikroskopie zu nutzen. Es wurde entschieden, die Adhäsion von *S. epidermidis* und *E. coli* sowohl mit Plattenzählmethode als auch mittels Epifluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, um die Vor- und Nachteile beider Methoden miteinander vergleichen zu können. Für die Adhäsionsstudien mit *S.*

4 Ergebnisse

aureus und *P. aeruginosa* wurde die Epifluoreszenzmikroskopie als Detektionsmethode festgelegt.

Die Wahl des Farbstoffs fiel, wie unter 3.3.1 bereits vorgestellt, auf DAPI, da dieses als das universal anwendbare Fluorochrom gilt. Mit DAPI können die Zellen direkt in der Suspension, also vor der Adhäsion angefärbt werden. Allerdings beeinflusst der Fluoreszenzfarbstoff die Eigenschaften der bakteriellen Zelloberfläche und möglicherweise auch das Adhäsionsverhalten. So wurde beispielsweise beobachtet, dass bei *E. coli* durch den Fluoreszenzfarbstoff die Zelloberfläche hydrophiler wurde.¹²³ Daher wurde entschieden, die Zellen erst nach dem Adhäsionsexperiment anzufärben, um DAPI-induzierte Veränderungen der Zelloberfläche zu vermeiden. Ein zusätzlicher Fixierungsschritt war nicht notwendig, da DAPI die Zellmembran vitaler und avitaler Zellen ohne vorherige Fixierung passiert.³⁴⁸ Die durch Fluoreszenzmikroskopie visualisierten Bakterien wurden mit der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera fotografiert. Da aufgrund der Datenmenge eine *in situ* Auswertung undenkbar war, wurden die Bilder gespeichert und später mit dem Bildanalyseprogramm *ImageJ* ausgewertet. Diese Software wird von *Rasband* am *US National Institute of Health (NIH)* entwickelt und ist öffentlich zugänglich. Auf der *ImageJ* Homepage stehen die aktuelle Version der Programms, sowie *Updates* und *Plugins* zur Verfügung.³⁴⁹

Da das Sichtfeld im Mikroskop nur 0,144 mm² betrug, sollten 16 Blickfelder pro Probe aufgenommen und ausgezählt werden (für detaillierte Bildanalyse vgl. Abschnitt 6.23). Diese Zahl sollte eine hinreichend genaue Statistik über die ausgezählten Bildausschnitte erlauben. Nach Berechnung des Mittelwertes sollte die Zahl der Bakterien auf 1 cm² normiert werden. (dabei handelte es sich um die geometrische Oberfläche und nicht um wahre oder wirksame Oberfläche).

Die Verwendung von *ImageJ* zur Bildanalyse war ein Schritt Richtung Standardisierung, allerdings stellte sich heraus, dass dieses Verfahren sehr zeitintensiv ist. Dies betrifft insbesondere die Auftrennung der bakteriellen Aggregate vor dem Zählschritt. An dieser Stelle konnten auch Fehler entstehen, da manchmal bei den verschiedenen Bildausschnitten unterschiedliche Helligkeit und ungleichmäßiger Kontrast zu beobachten war. Der Grund hierfür war eine ungleichmäßige Ausleuchtung des Sichtfeldes.

Aufgrund der bereits diskutierten Schwankungen bei den Bakterienadhäsionsexperimenten wurden in den nachfolgenden Experimenten pro Testorganismus und Ver-

4 Ergebnisse

such 10 Substrate parallel untersucht. Zusätzlich wurde jeder Versuch dreimal an drei verschiedenen Tagen bzw. mit drei verschiedenen Ausgangssuspensionen durchgeführt, so dass pro Substrat insgesamt 30 Einzelwerte erhalten wurden. So konnte die Reproduzierbarkeit im Rahmen des Messfehlers durch Wiederholung der Versuche erreicht werden.

Statistisch wurden die Datensätze mit dem nichtparametrischen *Mann-Whitney-U-Test* ausgewertet.³⁵⁰ Für die Anwendung dieses Tests wird keine Gaußverteilung, aber eine stetige Verteilung vorausgesetzt. Es werden zentrale Tendenzen zwei Stichproben A und B mit den Werten n_1 und n_2 durch Testen von Hypothesen verglichen. Die Signifikanzüberprüfung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte unter der Annahme der Nullhypothese, die keinen bedeutsamen Unterschied der beiden Gruppen proklamierte.

H₀: Die beiden Stichproben unterscheiden sich nicht in ihrer zentralen Tendenz.

Im Rahmen eines Signifikanztests war das Ziel, folgende Alternativhypothese zu bestätigen:

H₁: Die Stichproben unterscheiden sich signifikant in ihrer zentralen Tendenz.

Bei der Berechnung der Ergebnisse für *S. epidermidis* mit der Plattenzählmethode erschien es sinnvoll, die Keimzahlen der 10fachen Verdünnungen zu berücksichtigen.

Bei den Adhäsionsexperimenten sollten auch Kontrollen mitgeführt werden. Als negative Kontrollen sollten Proben dienen, die gleich behandelt und inkubiert wurden wie die realen Proben, allerdings im sterilen PBS ohne Testkeime. Diese Blindproben wurden in den Experimenten mit *S. epidermidis* und *S. aureus* statt mit Zellsuspension mit 300 μ L sterilem PBS überschichtet. Bei *E. coli* oder *P. aeruginosa* wurden die Blindproben in mit 50 mL sterilem PBS gefüllten Adhäsionsboxen vertikal platziert. Bei der kultivierungsabhängigen Plattenzählmethode wurde kein Wachstum auf den Blindproben-Agarplatten beobachtet. Bei der Detektion mit Epifluoreszenzmikroskopie wurde einzelne Fluoreszenz beobachtet, welche allerdings eher auf das organische Material (Reste der Fingerabdrücke aus der Werkstatt) oder Pufferreste zurückzuführen war. Da die Zahl fluoreszierender Partikel auf den Blindproben verschwindend gering war, wurde darauf verzichtet, den Blindwert als Hintergrund von den Mittelwerten der übrigen Parallelansätze abzuziehen. Die Blindproben zeigten jedoch, dass der Versuch kontaminationsfrei lief.

4 Ergebnisse

Die Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Messreihen bestimmt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich der bakterienabweisenden Eigenschaften von Selbstanordnenden Monoschichten werden nachfolgend vorgestellt. In den Abschnitten 4.3 und 4.4 wird das biorepulsive Verhalten der Heptaethylenglycol-terminierten SAMs und der Dendrimer-SAMs anhand der Testergebnisse diskutiert.

Im Abschnitt 4.5 stehen einige SPR-spektroskopische Untersuchungen an den Goldbasierten Systemen im Vordergrund.

In den Abschnitten 4.6 bis 4.8 wird auf die Wechselwirkung der Testorganismen mit den PEG- bzw. PG-terminierten SAMs auf Stahl- und Aluminium eingegangen.

Der Abschnitt 4.9 beschäftigt sich mit der Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen (MHK) der schichtbildenden Moleküle. Weiterhin werden die Testergebnisse der Ermittlung minimaler bakterizider Konzentration (MBK) vorgestellt. Durch diese Untersuchungen wurde qualitativ überprüft, ob der Resistenz der Monoschichten gegenüber den Testorganismen eine bakterizide Wirkung zugrunde liegt. Die Vorteile und Nachteile der angewandten Detektionsmethoden werden abschliessend in Abschnitt 5 diskutiert.

4.3 Oligoethylenglycol-terminierte Monoschichten auf Gold

Sowohl aus der Literatur,²³² als auch aus den Arbeiten unserer Gruppe ist der biorepulsive Charakter von Oligoethylenglycol-terminierten SAMs bekannt (Abb. 41).

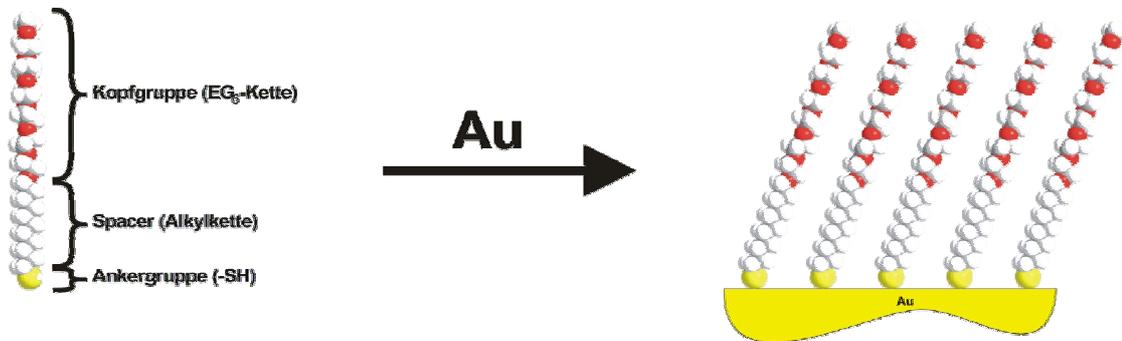


Abb. 41: Allgemeine Struktur einer Ethylenglycol-terminierten Monoschicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Heptaethylenglycol-terminierte SAMs als Bezugssystem eingesetzt. Während in der Literatur von der Proteinresistenz dieser Schichten berichtet wird, wurde das Adhäsionsverhalten von Bakterien auf diesen SAMs bisher nicht untersucht. Die Untersuchungen unserer Gruppe haben ergeben, dass diese Monoschichten resistent gegenüber der Adsorption von Fibrinogen und Globulin waren.¹²¹ Interessant war, zu klären, ob die Proteinresistenz dieser Schichten mit deren bakterienabweisenden Eigenschaften korreliert.

4.3.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen an den Heptaethylenglycol-terminierten SAMs

Zur Bestimmung der repulsiven Eigenschaften der Heptaethylenglycol-terminierten SAMs auf Gold wurden diese einer Bakteriensuspension ausgesetzt und nach Beendigung des Experiments mit sterilem PBS (pH = 7,4) gewaschen. Anschliessend wurden für alle Testkeime die CFU pro cm² Substrat als Ergebnis bestimmt. Zur Detektion der CFU wurden je nach dem Testkeim, wie unter 4.2 beschrieben, die Plattenmethode oder Epifluoreszenzmikroskopie verwendet.

4.3.1.1 Adhäsion von *E.coli* WT

In der Abb. 42 sind CFU dargestellt, die nach der Inkubation mit *E. coli* WT-Suspension und nachfolgenden Waschschrift auf den Substratoberflächen durch die Plattenzählmethode detektiert wurden. Der Graphik kann entnommen werden, dass die Heptaethylenglycol-terminierten Monoschichten einen sehr stark ausgeprägten repulsiven Effekt gegenüber der Adhäsion von *E. coli* WT aufweisen. Dabei konnte im Vergleich zu unbeschichtetem Gold eine Verminderung der Keimzahl um bis zu 98% beobachtet werden.

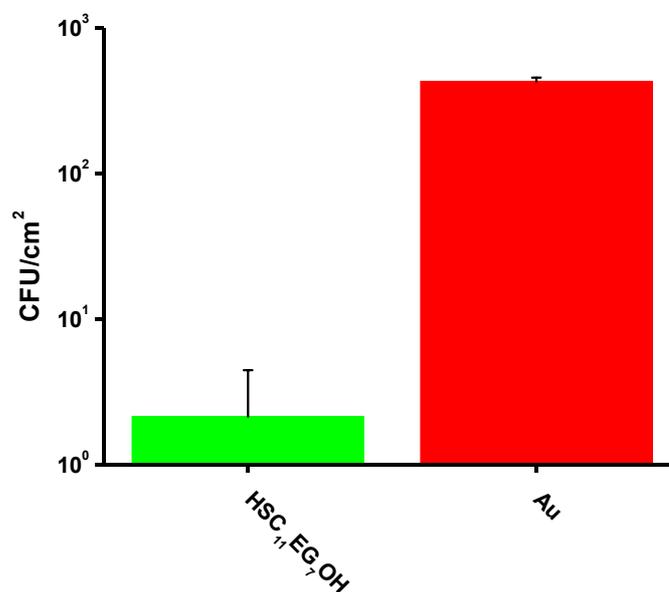


Abb. 42: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften der EG₇OH-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenzählmethode.

Wie unter 4.2 bereits erwähnt, war vorgesehen, die Adhäsion von *E. coli* WT neben der Plattenmethode mittels Epifluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Dafür wurden die Heptaethylenglycol-terminierten Monoschichten und die Gold-Kontrollsubstrate nach dem Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI behandelt (vgl. Abschnitt 6.21). Allerdings stellte sich heraus, dass die *E. coli* WT Zellen nicht gut detektierbar waren. Auch die späteren Versuche mit verlängerten Färbezeiten mit DAPI (bis zur 1 h) waren erfolglos. Zunächst war diese Tatsache sehr überraschend, da in der Literatur und auch vom Hersteller DAPI als universeller Fluoreszenzmarker empfohlen wird.



Abb. 43: Mit DAPI angefärbte *E. coli* auf einem Goldsubstrat nach dem Adhäsionsexperiment.

Eine Hypothese zur Erklärung dieses Problems war, dass möglicherweise DAPI in der Nähe der Goldoberfläche das Fluoreszenzverhalten z. B. durch Energietransfer veränderte. Allgemein ist dieses Phänomen bekannt, aber konkrete Hinweise, warum dieser Effekt im Fall der *E. coli*-Adhäsion an Relevanz gewinnen sollte, konnten nicht gefunden werden. Jedoch ergab eine Literaturrecherche, dass eine ähnliche Beobachtung bereits von *Davies* gemacht worden ist, als er unterschiedliche Fluorochrome, wie Acridine Orange, Ethidium Bromid und DAPI miteinander verglich.³⁵¹ Auch in dieser Untersuchung war *E. coli* nicht detektierbar.

Bei der weiteren Literaturrecherche stießen wir auf eine Untersuchung, in der einige Fluoreszenzfarbstoffe, unter anderem auch DAPI, auf ihre Eignung als Indikatoren zur Vitalitätsbestimmung von *P. fluorescens* getestet wurden.³⁵² Diese Untersuchung ergab, dass aktive und inaktive Zellen durch die Fluoreszenzintensität unterschieden werden konnten und für die Erfassung der Gesamtzahl eine Konzentration von 20 $\mu\text{g/mL}$ von DAPI benötigt werde. Auch wenn das Ergebnis die Reaktion von *P. fluorescens* auf DAPI beschrieb, die nicht unbedingt vergleichbar mit der von *E. coli* sein muss, ließ diese Untersuchung für unser Problem eine Schlussfolgerung zu, die überprüft werden konnte: Sind die Zellen während des Adhäsionsexperiments in PBS als Adhäsionsmedium möglicherweise inaktiv geworden, wodurch die Fluoreszenzintensität sehr niedrig war? Um dieser Frage nachzukommen, wurden einige Goldsubstrate in *E.coli* Suspension mit TSB bzw. PBS als Suspensionsmedium inkubiert, mit DAPI angefärbt und unter dem Epifluoreszenzmikroskop beobachtet.

4 Ergebnisse

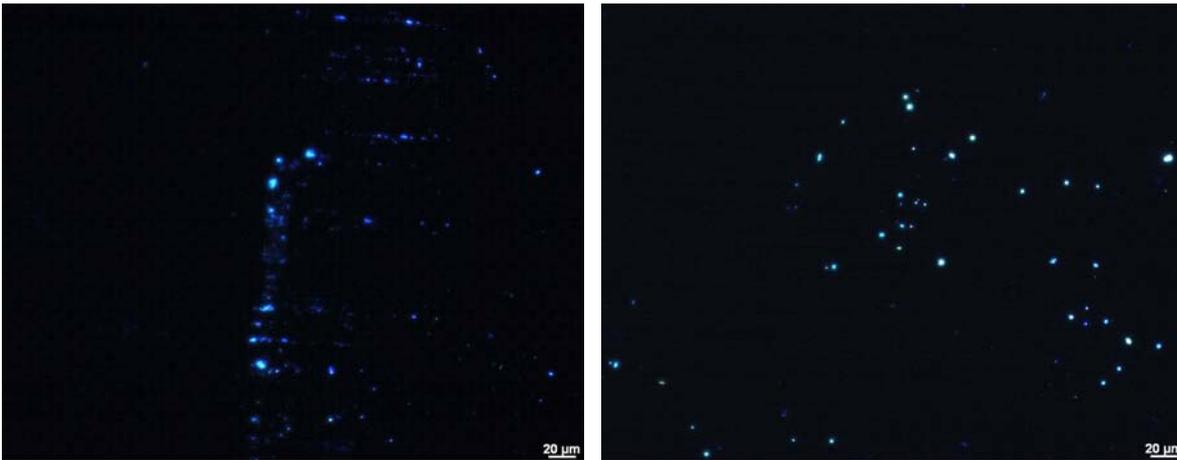


Abb. 44: Mit DAPI angefärbte *E. coli* auf einem Goldsubstrat in PBS (links) und in TSB (rechts) als Adhäsionsmedium.

Dabei ließ sich zwar eine klarere Fluoreszenz, aber kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität bzw. der Zellzahl zwischen den Aufnahmen aus dem Adhäsionsexperiment in TSB und PBS feststellen (Abb. 44), obwohl TSB als nährstoffreiches Flüssigmedium eine andere Zusammensetzung (Casein, Sojabohnenmehl, Glucose, NaCl, K₂HPO₄) als PBS (NaCl, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄) aufweist. Die Zellen im PBS waren eher im „gehungerten“ Zustand, wobei keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob dieser Unterschied für die Fluoreszenzintensität wichtig sein könnte. Es wird berichtet, dass die für die Detektion adhärierter Bakterien eingesetzten Konzentrationen von DAPI stark variieren.³⁵³ Daher wurde als Nächstes empirisch überprüft, ob eine höhere Konzentration der DAPI-Lösung das Problem lösen konnte. Allerdings konnte selbst bei der Verwendung von DAPI-Lösungen mit einer Konzentration von 50 µg/mL kein Einfluß der Konzentration beobachtet werden. Nach zahlreichen Versuchen, das Detektionsproblem von DAPI-angefärbten *E. coli* zu klären, wurde auf weitere Untersuchungen bzw. einen Wechsel des Fluorochroms verzichtet.

Allerdings stellte sich bei den späteren Adäsionsuntersuchungen von *E. coli* WT auf Stahl- und Aluminium-Oberflächen heraus, dass mit DAPI angefärbte *E. coli*-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich stärker fluoreszierten (vgl. Abschnitt 4.6.1.1). Dieser Fakt weist darauf hin, dass möglicherweise das Gold zur Fluoreszenzquenchung geführt haben könnte.

4.3.1.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Der Abb. 45 kann entnommen werden, dass die Wechselwirkung von Heptaethylglycol-terminierten Monoschichten mit *S. epidermidis* stark repulsiv ist. Betrachtet man die mit der Plattenzählmethode ermittelten Keimdichten, stellt man dabei eine um den Faktor 100 verminderte Adhäsion im Vergleich zu unbehandeltem Gold fest.

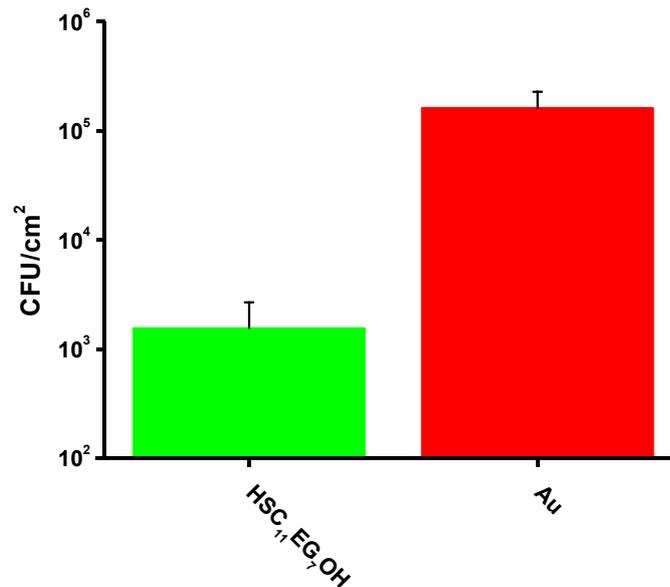


Abb. 45: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenzählmethode.

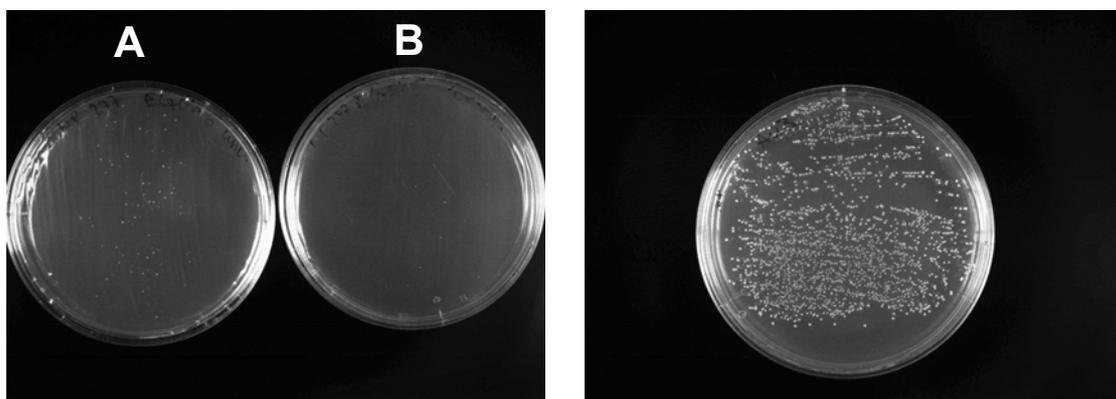


Abb. 46: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *S. epidermidis*-Zellen von einer EG₇OH-terminierten SAM (links A: unverdünnt, B: 10fach verdünnt) und einer Au-Probe (rechts 10fach verdünnt).

4 Ergebnisse

In Abb. 46 rechts ist eine Petrischale mit relativ dicht zusammengewachsenen Kolonienbildenden Einheiten zu sehen, während die zwei Petrischalen in Abb. 46 links ein sehr geringes Wachstum der Testkeime zeigen. Diese sind nach dem Transfer der *S. epidermidis* Zellen von einer Goldprobe und einer EG₇OH-terminierten SAM auf die CASO-Agarplatten entstanden. Dabei ist im Falle der EG₇OH-SAMs das Ergebnis der Auftragung sowohl unverdünnter als auch zehnfach verdünnter Testsuspension I (Testsuspension mit bereits abgelösten Zellen nach der Ultraschallbehandlung der Proben) und im Falle der Goldprobe nur die Petrischale mit der Auftragung der zehnfach verdünnten Testsuspension I zu sehen. Es ist auf den ersten Blick auffallend, dass selbst die zehnfach verdünnte Testsuspension I der nativen Goldprobe zur Entwicklung deutlich höherer CFU-Zahlen führt als die unverdünnte Testsuspension I der EG₇OH-Probe. Außerdem wird bei der Betrachtung dieser Agarplatten deutlich, dass das bereits angesprochene Problem mit der kultivierungsabhängigen Detektionsmethode bei den unmodifizierten Proben viel mehr ins Gewicht fällt und zur Unterschätzung der tatsächlichen Zellzahl führt als bei den EG₇OH-terminierten SAMs.

Die durch Epifluoreszenzmikroskopie ermittelten CFU pro cm² Substrat für *S. epidermidis* auf unmodifiziertem Gold und EG₇OH-terminierter Monoschicht (Abb. 47) bestätigen das Ergebnis der Plattenzählmethode: EG₇OH-SAM zeigt weniger Adhäsion als Au.

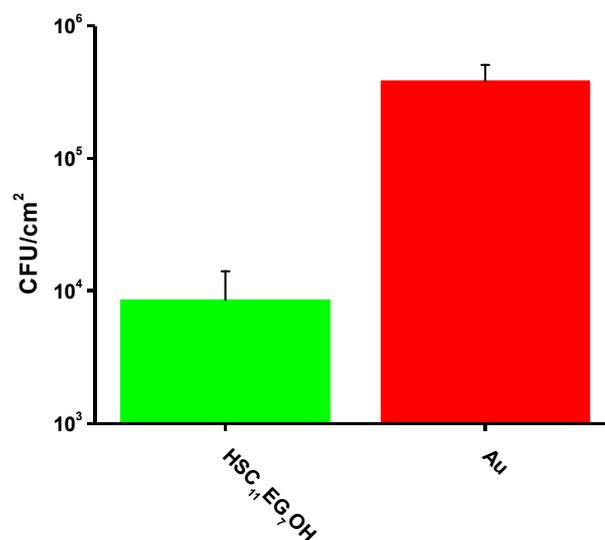


Abb. 47: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Epifluoreszenzmikroskopie

4 Ergebnisse

Der Vergleich der Ergebnisse (Abb. 48), die durch die beiden unterschiedlichen Techniken erhalten wurden, zeigt jedoch gewisse Differenzen. Während die Plattenzählmethode $1,61 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 adhärierter Bakterien an den Goldsubstraten ermitteln ließ, konnten mit Epifluoreszenzmikroskopie $3,82 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 Zellen detektiert werden. Noch größer fiel der Unterschied zwischen den Möglichkeiten beider Methoden beim Nachweis adhärierter Zellen an den EG₇OH-terminierter Monoschichten. Dabei wurde mit $8,57 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 5,5 Mal stärkere Adhäsion fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen als durch die Rekultivierung adhärierter Zellen im Rahmen der Plattenzähltechnik

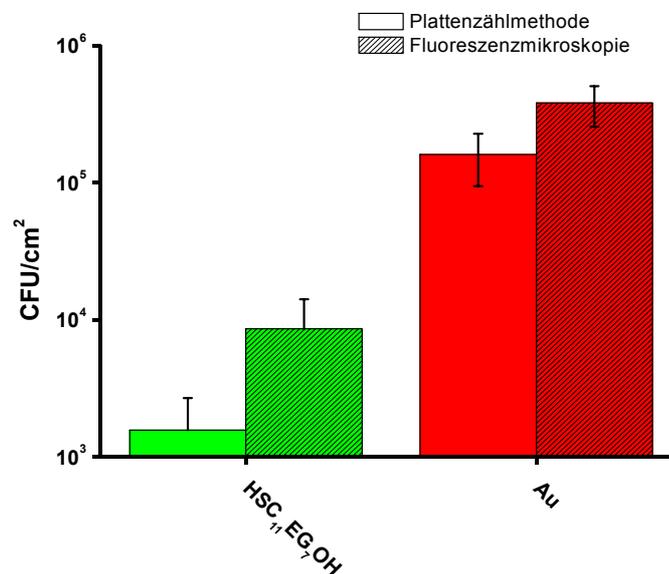


Abb. 48: Vergleich der Quantifizierungsmethoden bei der Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *S. epidermidis*.

Dieser Unterschied in der absoluten Zahl der detektierten CFU ist auf die oben angesprochene Limitation der Plattenzählmethode zurückzuführen.

Abb. 49 zeigt jeweils eine der 16 Mikroskopieaufnahmen von adhärten *S. epidermidis*-Zellen auf Au (rechts) und mit EG₇OH funktionalisiertem Goldsubstrat (links) nach Anfärbung mit DAPI.

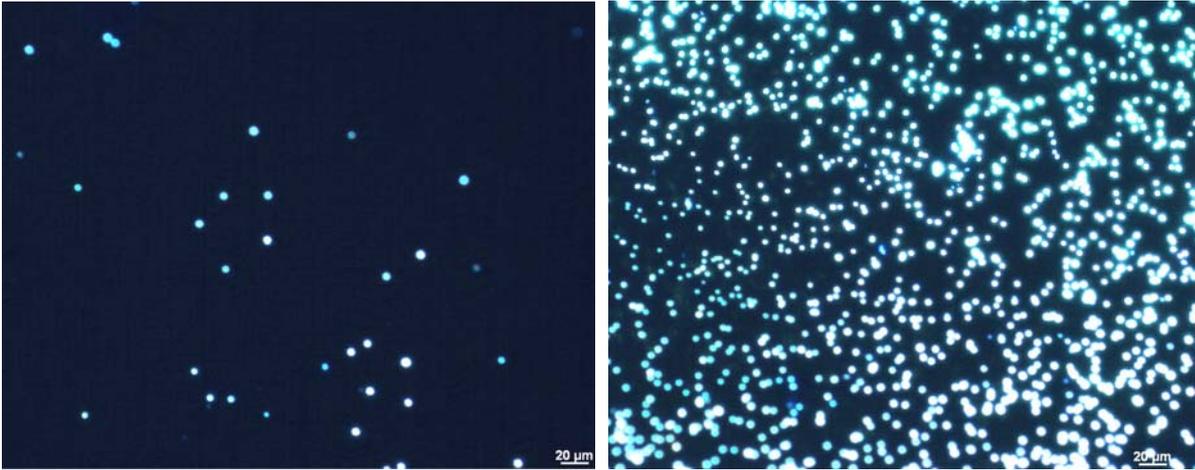


Abb. 49: Mit DAPI angefärbte *S. epidermidis*-Zellen auf einem EG₇OH-SAM (links) und Au (rechts).

Auf dem Gold wurden 1074 CFU und auf dem SAM 33 CFU gezählt. Auf den restlichen fünfzehn Aufnahmen sind ähnliche Verhältnisse beobachtet worden. Mit der willkürlichen Annahme einer 100%igen Adhäsion auf dem Goldsubstrat ergibt sich für die EG₇OH-SAMs eine Verminderung der Adhäsion um ca. 98%.

Die bei den *Staphylokokken* besonders stark ausgeprägte Aggregatbildung machte vor der Auswertung eine manuell durchgeführte Trennung der mikrobiellen Aggregate in der Abbildung (durch Einfügen schwarzer Trennlinien) notwendig. Da dieser Schritt nicht immer absolut exakt durchgeführt werden konnte, stellt er gerade im Falle hoher CFU-Zahl eine Fehlerquelle dar. Sehr hohe Zellzahlen fallen daher etwas geringer aus als es den tatsächlichen Verhältnissen entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben, die bereits durch die Plattenmethode quantifiziert wurden, auch mit DAPI angefärbt, um zu überprüfen, ob eine quantitative Übertragung der Zellen möglich war. Allerdings ist eine permanente Durchführung der Kombination von beiden Methoden aufgrund des Zeitaufwands nicht möglich und zur Analyse der Bakterienadhäsion auch nicht praktisch. Der Zeitaspekt war nicht unwichtig, da die Bakterienadhäsionsuntersuchungen bedingt unter anderem durch die Kultivierungs-, Zellenpräparations- und Inkubationszeiten sehr zeitintensiv sind.

4.3.1.3 Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538

EG₇OH-funktionalisierte Monoschichten bewirken auch bei den *S. aureus* ATCC 6538 eine hohe Reduktion der Keimzahl auf den Proben (Abb. 50). Mit $6,12 \cdot 10^3$ CFU

4 Ergebnisse

pro cm^2 Probe zeigt die modifizierte Oberfläche gegenüber dem Goldsubstrat mit $6,57 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 Probe eine um zwei Zehnerpotenzen verminderte Adhäsion. Das entspricht einer Verminderung der Adhäsion um 99%.

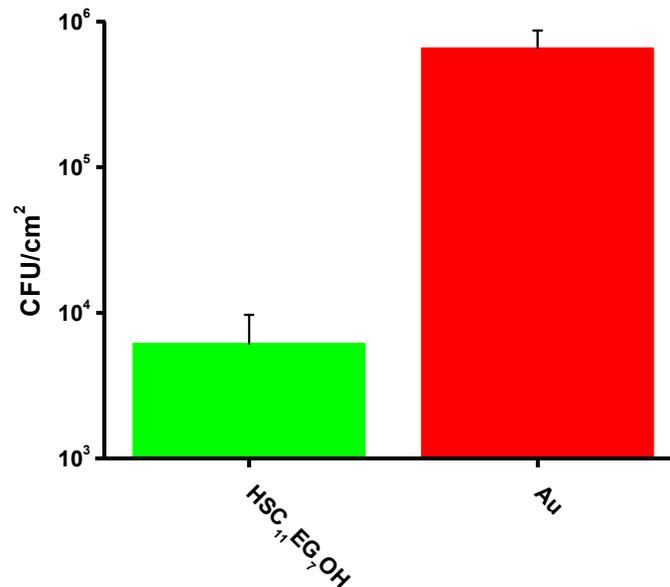


Abb. 50: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften EG₇OH-SAMs gegenüber *S. aureus* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Mikroskopieaufnahmen verdeutlichen, dass die EG₇OH-terminierten SAMs einen stark ausgeprägten biorepulsiven Effekt gegenüber *S. aureus* zeigen (Abb. 51). Diese Aufnahmen illustrieren gleichzeitig, dass eine exakte Auszählung der Zellen besonders auf den Goldproben fast unmöglich ist.

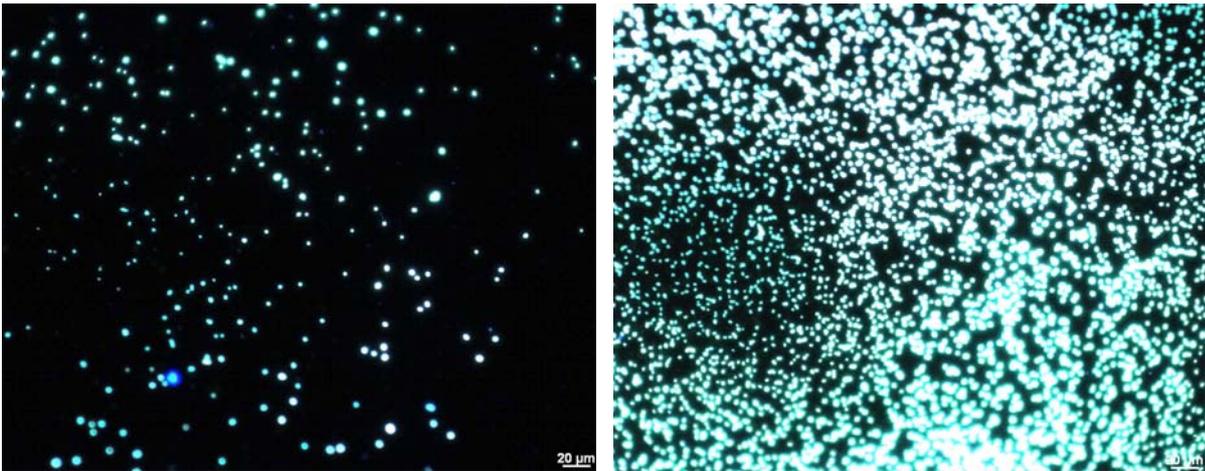


Abb. 51: Mit DAPI angefärbte *S. aureus* auf EG₇OH-SAM (links) und Au (rechts).

4.3.1.4 Adhäsion von *P. aeruginosa* PAO

Abb. 52 zeigt die Verhältnisse nach der Adhäsion von *P. aeruginosa* auf EG₇OH-terminierten SAMs und unmodifizierten Goldsubstraten. Es ist deutlich zu erkennen, dass die repulsiven Eigenschaften der ethylenglycolterminierten Monoschichten gegenüber diesem Testkeim nicht so stark ausgeprägt sind, wie bei den oben vorgestellten *Staphylokokken* und *E. coli*.

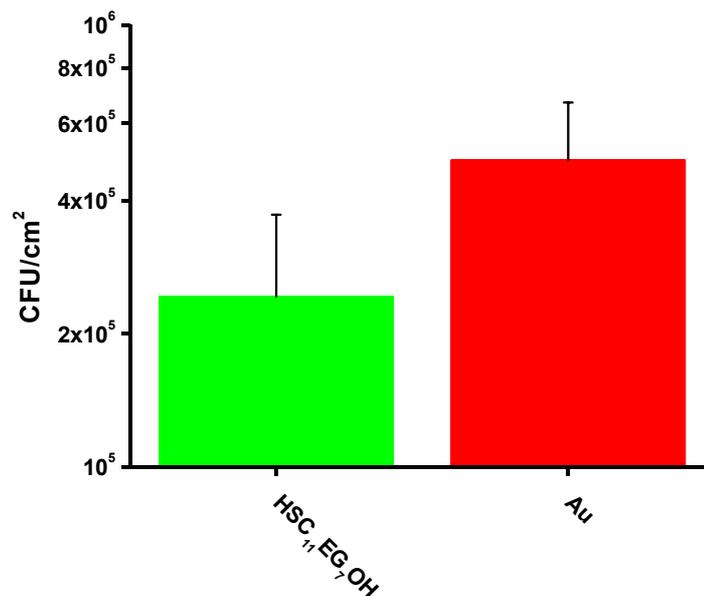


Abb. 52: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften EG₇OH-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Einerseits ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich, da *P. aeruginosa* als ein sehr schnell anpassungsfähiges Bakterium gilt, welches über eine Vielfalt an Virulenzgenen verfügt und entsprechend der Gegebenheiten Adhäsine selektiv exprimiert.³⁵⁴

Andererseits könnte eine mögliche Erklärung im Unterschied in den Wachstumsphasen der Testorganismen liegen. Es wurde schon beobachtet, dass sich mit der Wachstumsphase die Zusammensetzung der extrazellulären Polymere ändert, was ein anderes Adhäsionsverhalten zur Folge hat.³⁵⁵ Während die anderen drei Testkeime, *E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* ATCC 6538, für die Adhäsionsuntersuchungen in frühen exponentiellen Phase geerntet wurden, entsprach der physiologischer Zustand der *P. aeruginosa*-Zellen der späten exponentiellen Wachstumsphase mit der $OD_{550} = 1$. Die Wahl wurde in Anlehnung an die Literatur getroffen³⁴³ (vgl. Abschnitt 4.1.1.4).

Abb. 53 kann entnommen werden, dass die EG₇OH-SAMs unter den gewählten Versuchsbedingungen eine deutlich verminderte Biorepulsivität gegenüber *P. aeruginosa* zeigen. In diesem Fall konnte lediglich eine Verminderung der Adhäsion um ca. 51% festgestellt werden.

4 Ergebnisse

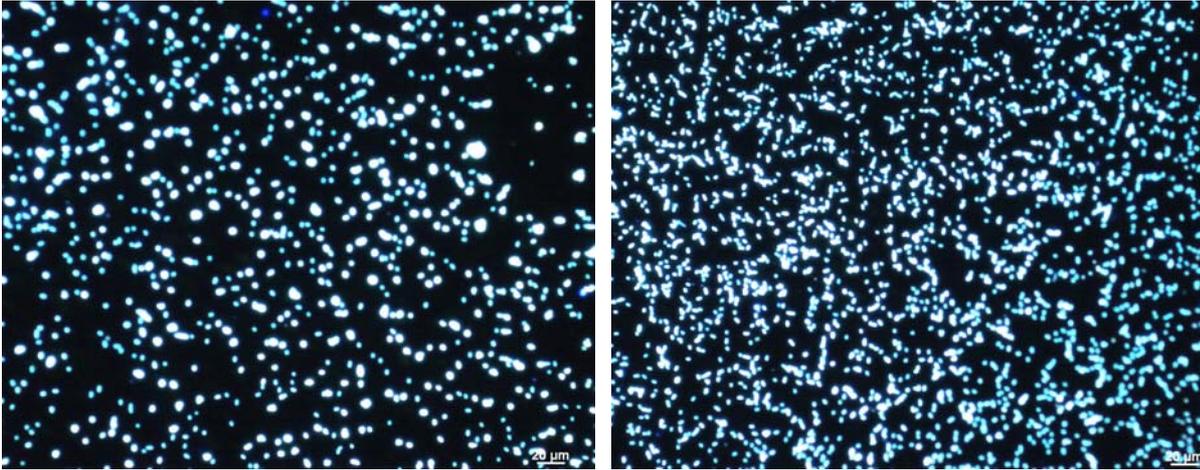


Abb. 53: Mit DAPI angefärbte *P. aeruginosa* auf EG₇OH-SAM (links) und Au (rechts).

Das Adhäsionsexperiment mit *P. aeruginosa* wurde in reinem PBS als Adhäsionsmedium durchgeführt, da der Puffer ein Wachstum der Bakterien während des Experiments unwahrscheinlich macht und somit Bedingungen schafft, unter denen sich die Zellen nicht teilen. Daher stand die Wechselwirkung der Bakterien mit der Oberfläche im Vordergrund und die adhärenierten Zellen sind demnach der primären Adhäsion zuzuordnen. Allerdings wäre die Expositionszeit theoretisch auch für die akkumulative Phase der Biofilmbildung ausreichend, was bedeuten würde, dass die detektierte Zellzahl nicht ausschließlich der Zellzahl der Primärbesiedler entspricht. Die unter Fluoreszenzmikroskop beobachteten Aggregate unterstützen diese Vermutung. Wegen der Anspruchslosigkeit von *P. aeruginosa* wäre aber auch denkbar, dass sich trotzdem im Versuchszeitraum irreversibel haftende Zellen vermehrt und Mikrokolonien gebildet haben (Abb. 54).

Die SPR-spektroskopische Untersuchung der Adhäsion von *P. aeruginosa* ergab Hinweise, dass möglicherweise 1 h ausreichend für die Adhäsion dieses Keims war (vgl. Abschnitt 4.5).

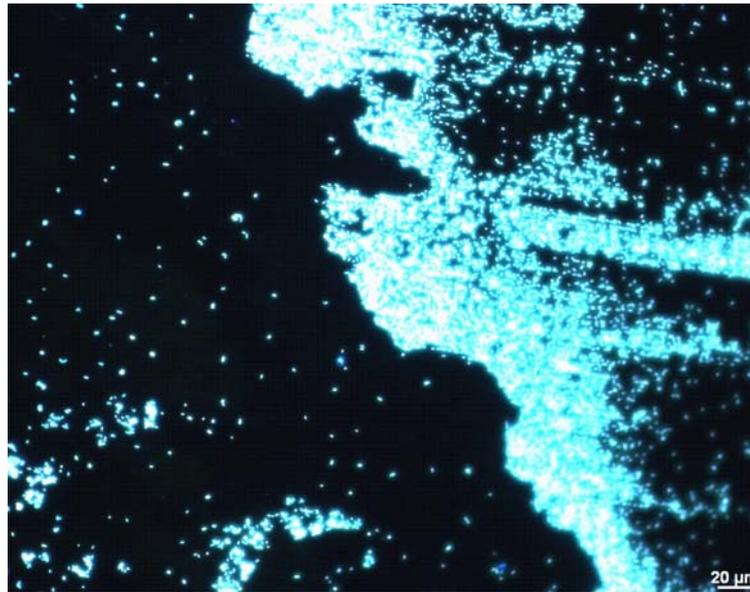


Abb. 54: Die beobachtete Aggregatbildung bei der Adhäsion von *P. aeruginosa*.

Weiterhin kommt wahrscheinlich die unter 1.3.3 diskutierte Instabilität der PEG-Schichten ins Spiel. Aus der Literatur ist bekannt, dass die *Pseudomonas*-Spezies biologische, grenzflächenaktive Stoffe produzieren, um kohlenwasserstoffhaltiges Material aufzulösen und die Biodegradationsrate zu erhöhen.³⁵⁶ Diese Biotenside heißen Rhamnolipide und werden von *P. aeruginosa* bevorzugt beim Wachstum auf hydrophoben Substraten, wie n-Alkanen produziert und extrazellulär ausgeschieden. Die Zusammensetzung der Rhamnolipide ist von den Umweltbedingungen und vom Substrat abhängig. Es ist bekannt, dass Rhamnolipide sehr wichtig für die Biofilmarchitektur von *P. aeruginosa* sind.³⁵⁷ Bei *Pseudomonas* sp. DES1 wurde die Fähigkeit der Biodegradation von Alkyl Ethoxylaten beobachtet.³⁵⁸ Möglicherweise sind die *Pseudomonaden* durch diesen Mechanismus in der Lage, PEG-SAMs abzubauen und auf diese Weise die chemischen und physikalischen Gegebenheiten der Grenzfläche zu verändern. Das würde das Ergebnis unserer Untersuchung erklären. Andererseits berichten manche Autoren von der Resistenz der ethylenglycolterminierten Monoschichten bzw. Ethylenglykolhaltiger Polymere gegenüber *P. aeruginosa*. *Portolés et al.* beobachteten 92-99% Inhibition von *P. aeruginosa*-Adhäsion auf Pluronic F127, einem kommerziell erhältlichen Triblockcopolymer mit 70% Ethylenglykolanteil.³⁵⁹ Allerdings wurde eine Bakterienkonzentrationsabhängige Adhäsionsinhibition beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst eine Konzentration von 10^9 CFU pro mL für die Adhäsionsexperimente von *P. aeruginosa* gewählt, da von konzentrationsabhängigen, SPR-spektroskopischen Adhäsionsstudien berichtet

4 Ergebnisse

wird, bei denen erst bei der Konzentration von 10^9 CFU pro mL ein Adsorptionspeak zu beobachten war.³³⁶

4.3.2 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf EG₇OH-terminierte SAMs

In *in vitro*-Bioadhäsionsuntersuchungen wurde das Potenzial von Heptaethylglycolterminierten SAMs getestet, die initiale Bakterienadhäsion zu reduzieren und somit die darauffolgende Biofilmbildung zu unterdrücken. Dafür wurden vier ausgewählte Testkeime mit den Monoschichten inkubiert und die adhärenierten Zellen auf den Substraten nach einem Spülschritt mittels Plattenzählmethode bzw. Epifluoreszenzmikroskopie quantifiziert.

Die vier nachfolgenden Tabellen (Tabelle 7 bis Tabelle 9) geben einen Überblick über die Ergebnisse aus drei Versuchsreihen der Adhäsion der Testkeime auf die Testsubstrate.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	1×10^5 CFU/mL	(2,13±2,3)	0,5±0,5	99,5±0,5
Au	1×10^5 CFU/mL	(4,28±0,26) 10^2	100	0

Tabelle 7: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*).

Tabelle 7 kann entnommen werden, dass heptaethylglycolterminierte Monoschichten unter den Versuchsbedingungen weitgehend resistent gegenüber *E. coli* WT sind. Es konnte mit der Plattenmethode eine 99,5%-ige Repulsivität festgestellt werden.

Der abweisende Charakter der EG₇OH-terminierten Monoschichten gegenüber *S. aureus* ATCC 6538 (Tabelle 8) unterschied sich nur unwesentlich von dem Resistenzpotenzial dieser Schichten gegenüber *E. coli*.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	1x10 ⁷ CFU/mL	(6,12±3,58) 10 ³	0,93±0,62	99,1±0,6
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(6,57±2,13)·10 ⁵	100	0

Tabelle 8: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *S. aureus* ATCC 6538 mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Die beobachtete 99%-ige Verminderung der Adhäsion ist ein viel versprechendes Ergebnis. Da sowohl Gold als auch die SAMs in der gleichen Testsuspension inkubiert wurden, kann das repulsive Verhalten der modifizierten Oberflächen nur durch die SAM-bildenden Moleküle bedingt gewesen sein. Verglichen mit Gold, scheinen die modifizierten Oberflächen kaum Ankerpunkte für eine erfolgreiche *S. aureus*-Adhäsion anzubieten.

Ebenfalls einen starken repulsiven Effekt zeigten die EG₇OH Monoschichten unter den getesteten Versuchsbedingungen gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990. (Tabelle 9). Die Quantifizierung der adhärenierten Bakterien mittels Plattenzählmethode ergab eine Verminderung der Adhäsion um 99%. Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurde eine Verminderung um 98% festgestellt.

4 Ergebnisse

A: Plattenmethode

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,56±1,12) 10 ³	0,97±0,70	99±0,7
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,61±0,67) 10 ⁵	100	0

B: Epifluoreszenzmikroskopie

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	1x10 ⁷ CFU/mL	(8,57±5,51) 10 ³	2,24±1,62	97,8±1,6
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,82±1,26) 10 ⁵	100	0

Tabelle 9: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (A) und Epifluoreszenzmikroskopie ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (B).

Ein klarer Vorteil der Fluoreszenzmethode bei den Experimenten mit *S. epidermidis* ATCC 14990 war die Möglichkeit, die Bakterien direkt im adhärerten Zustand zu detektieren. Im Gegensatz dazu war für die Plattenmethode das Ablösen der Zellen durch Ultraschall und eine anschließende Kultivierung der Bakterien notwendig. Der erhoffte Effekt war, zeigen zu können, dass bei der Kultivierungs-basierten Detektion mit der Plattenzählmethode die Zahl der adhärerten Bakterien unterschätzt wird. Das Ergebnis entspricht tendenziell dieser Erwartung, der Unterschied ist jedoch nicht so gravierend wie erwartet. Bei der Annahme einer 100%igen Empfindlichkeit der Epifluoreszenzmikroskopie bei der Detektion adhärterter Zellen betrug die Effizienz der Plattenzählmethode für natives Gold 42,2% und für die EG₇OH-SAMs nur 18,2%. Das würde bedeuten, dass das Problem unzureichender Quantifizierung adhärterter Bakterien durch die Plattenzählmethode bei den Monoschichten deutlich ausgeprägter war als bei dem unbeschichteten Gold.

Bei der Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erwiesen sich die typischen bakteriellen Agglomerate oder Ketten nachteilhaft, da diese erst sorgfältig getrennt werden mussten, damit sie vom Auswerteprogramm nicht als eine Einheit gezählt wurden.

4 Ergebnisse

Daraus ergaben sich dabei auch Fehler, zudem handelte es sich um einen sehr zeitaufwendigen Prozess.

Allerdings führte die ausgeprägte Neigung von *Staphylokokken*, Klumpen oder Mikrokolonien zu bilden, auch bei der Plattenmethode zu praktischen Schwierigkeiten beim Auszählen. Dieses Problem konnte jedoch durch die Wahl der aufgetragenen Suspensionsvolumina und sorgfältiges Verteilen der Keimsuspension auf der Agarplatte in den meisten Versuchen eliminiert oder zumindest reduziert werden.

Während bei drei der vier Testorganismen eine stark verminderte Adhäsion auf den modifizierten Substraten zu beobachten war, fiel der Unterschied im Adhäsionsverhalten von *P. aeruginosa* auf modifizierten und unmodifizierten Oberflächen nicht so signifikant aus. Im Falle der *P. aeruginosa*-Adhäsion auf ethylenglycolterminierten Oberflächen konnte eine um nur 50,9% (Tabelle 10) verminderte Adhäsion beobachtet werden. Die nur teilweise vorhandene Resistenz kann vermutlich auf den Abbau der Monoschicht durch bakterielle Biotenside zurückgeführt werden.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	1x10 ⁹ CFU/mL	(2,43±1,29) 10 ⁵	49,1±31,2	50,9±31,2
Au	1x10 ⁹ CFU/mL	(4,95±1,73) 10 ⁵	100	0

Tabelle 10: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von EG₇OH-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* PAO mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Bei der Betrachtung der Keimzahlen auf dem Gold fällt auf, dass *S. aureus* bei den gleichen Adhäsionsbedingungen und gleicher Konzentration deutlich stärker auf Gold adhärierte als *S. epidermidis*. Bezieht man in diese Betrachtung auch die Ergebnisse für das Adhäsionsverhalten von *P. aeruginosa* auf Gold ein, fällt auf, dass *S. aureus* mit ca. 1x10⁶ CFU/cm² von den Testkeimen am stärksten auf Gold adhärierte, obwohl die Adhäsionszeit bei *P. aeruginosa* mit 3 h sechsfach länger war als bei der Adhäsion von *Staphylokokken*. Dieser Befund bestätigt die aus der Literatur bekannte Tatsache, dass *S. aureus* bevorzugt auf Metallimplantaten adhäriert, während *S. epidermidis* die Adhäsion auf Kunststoffimplantaten vorzieht.^{295,299}

4 Ergebnisse

Während EG-terminierte SAMs die Adsorption vieler Proteine, wie BSA, Fibrinogen und Globulin, wirkungsvoll unterdrücken,¹²¹ zeigen unsere Untersuchungen, dass im besten Fall eine um zwei Größenordnungen verminderte Bakterienadhäsion erreicht werden kann. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Annahme, dass die Proteinresistenz eines Materials mit der Bakterienrepulsivität dieses Materials korreliert.³⁴² Auch in der Literatur werden ähnliche Beobachtungen beschrieben.⁸³ Allerdings sagen theoretische Studien, dass PEG in der Lage sein sollte, die Bakterienadhäsion vollständig zu unterdrücken.^{256,257,261} Möglicherweise vermögen viele Bakterienspezies einen Abbau der Monoschicht zu bewirken und so die in der Literatur vielfach beschriebene Instabilität der PEG-Schichten hervorrufen.

Dennoch lässt sich das bakterienabweisende Potenzial der ethylenglycolterminierten Monoschichten in einer positiven Bilanz zusammenfassen. Der Unterschied zwischen der Zahl adhärierter Bakterien auf den EG₇OH-SAMs und auf den Goldreferenzen war bei allen Testkeimen statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$, *Mann-Whitney* - Test).

4.4 Polyglycerol-terminierte Monoschichten auf Gold

Wie in der Einleitung erwähnt, werden neben Oligo- und Polyethylenglycolderivaten Polyglycerol-terminierte Oberflächen hinsichtlich ihrer Biorepulsivität untersucht. Polyglycerolhaltige Verbindungen weisen zwar eine Polyethylenglycol-Leitstruktur auf, unterscheiden sich aber in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften stark von den Glycolderivaten. Dieser Unterschied wirkt sich positiv auf die thermische Stabilität und die Beständigkeit gegen biologischen Abbau dieser Gruppe aus. Diese vorteilhaften Eigenschaften prädestinierten die PG-Gruppe für den Einsatz als biorepulsive Kopfgruppe in Monoschichten. Zur Verstärkung des biorepulsiven Effekts trägt die stark verzweigte Struktur des Polyglycerols bei, die zur Erhöhung der sterischen Repulsion führt.

Es wurden drei Klassen von PG-terminierten Dendrimeren mit Thioacetat-Ankergruppen auf Gold immobilisiert, um die modifizierten Oberflächen auf ihre bakterienrepulsiven Eigenschaften zu untersuchen.

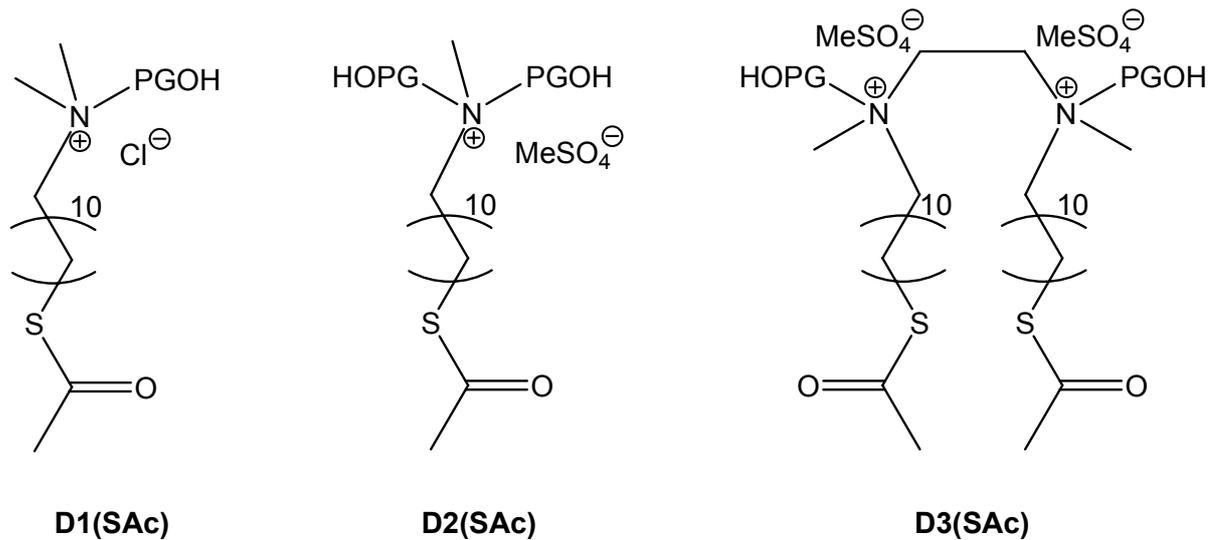


Abb. 55: Untersuchte Dendrimer-Klassen.

Die in Abb. 55 dargestellten Moleküle **D1(SAc)** und **D2(SAc)** besitzen jeweils eine Thioacetatgruppe, über die eine monovalente Bindung an das Gold erfolgt. Der wesentliche Unterschied zwischen den Vertretern beider Substanzklassen bestand in der Anzahl der PG-Substituenten im Molekül. Die Dendrimere der Klasse **D3(SAc)** enthielten zwei Thioacetat-Anker, die eine bivalente Bindung an das Gold ermöglichen. Wie Abb. 56 verdeutlicht, handelt es sich bei der PG-Kopfgruppe um eine sehr voluminöse Gruppe. Daher weisen die Dendrimer-SAMs vermutlich geringere Packungsdichten und Schichtordnungen auf als die OEG-terminierten Alkanthiolat-SAMs.

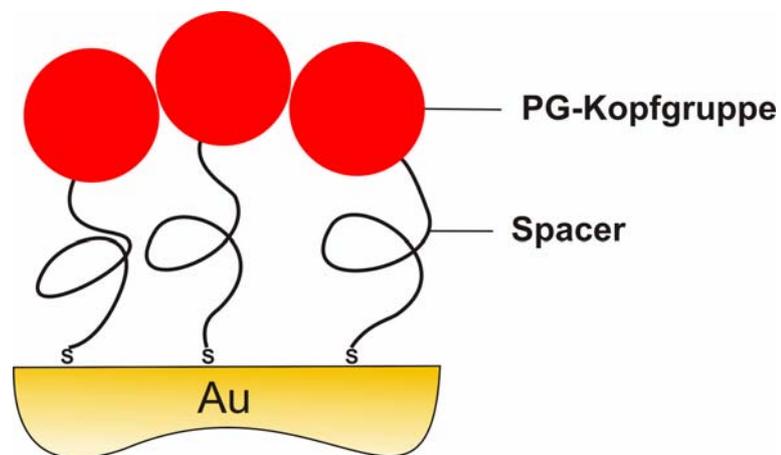


Abb. 56: Angenommene Struktur eines PG-terminierten Thiolat-SAMs auf Gold.¹²¹

4 Ergebnisse

Trotz verminderter Packungsdichte der Schicht ist davon auszugehen, dass durch die großen PG-Reste das Substrat vollständig mit repulsiven Kopfgruppen bedeckt war. Bedingt durch die lockere Packung sollten eine höhere Konformationsfreiheit der Spacer und damit ein zusätzlicher Beitrag zur sterischen Repulsion gegeben sein. Daher wurde ein stärker ausgeprägter Effekt der Biorepulsivität erwartet.

Der Aufbau des Polyglycerolbausteins erfolgte durch anionische Polymerisation von (\pm)-2,3-Epoxypropan-1-ol (Glycidol).¹²¹ In Abb. 57 ist der Reaktionsverlauf für die Dendrimerbildung durch Polymerisation von Glycidol an der Aminogruppe skizziert. Die Reaktion wird gestartet, indem ein Nukleophil, hier ein Amin, das Oxiran unter Ringöffnung angreift. Nach der Initiierung erfolgt das Kettenwachstum von innen nach außen und mit steigendem Polymerisationsgrad entsteht das immer stärker verzweigte PG-Dendrimer. Die Schalen um Kern werden als Generationen bezeichnet, die anstelle des Polymerisationsgrads angegeben werden. Allerdings sind die durch anionische Polymerisation dargestellten Polyglycerole streng genommen keine Dendrimere, da das Wachstum des Polymers nicht an allen Punkten mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt und daher nicht von einer einheitlichen Generation der Moleküle gesprochen werden kann. Zusätzlich sind die Produkte aus der anionischen Polymerisation nicht monodispers, sondern weisen eine Molmassenverteilung auf. Aus Gründen der Einfachheit werden die durch anionische Polymerisation dargestellten Polymere in dieser Arbeit als Dendrimere bezeichnet.

4 Ergebnisse

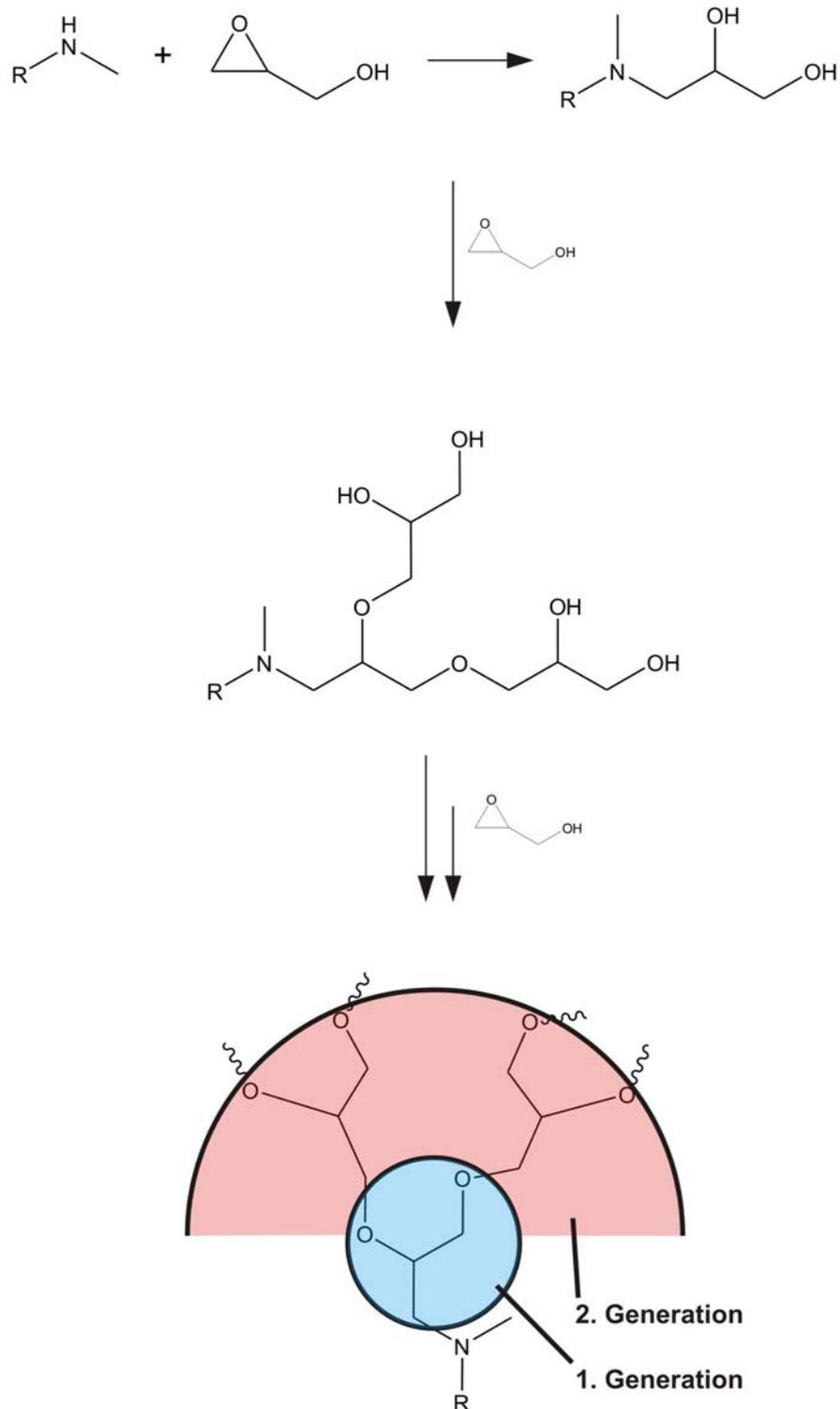


Abb. 57: Das Prinzip anionischer Polymerisation von Glycidol.

Aus der Doktorarbeit von Tobias Winkler war bekannt, dass diese SAMs proteinrepulsive Eigenschaften besitzen. Um herauszufinden, ob die PG-terminierten SAMs auch eine Resistenz gegenüber Bakterienadhäsion aufweisen, wurden diese in Bakterienadhäsionsexperimenten als Testsubstrate eingesetzt.

4 Ergebnisse

Zunächst wurden die SAMs der drei vorgestellten Klassen **D1(SAc)**, **D2(SAc)** und **D3(SAc)** hinsichtlich ihrer Benetzbarkeit und ihrer Oberflächenrauigkeit charakterisiert.

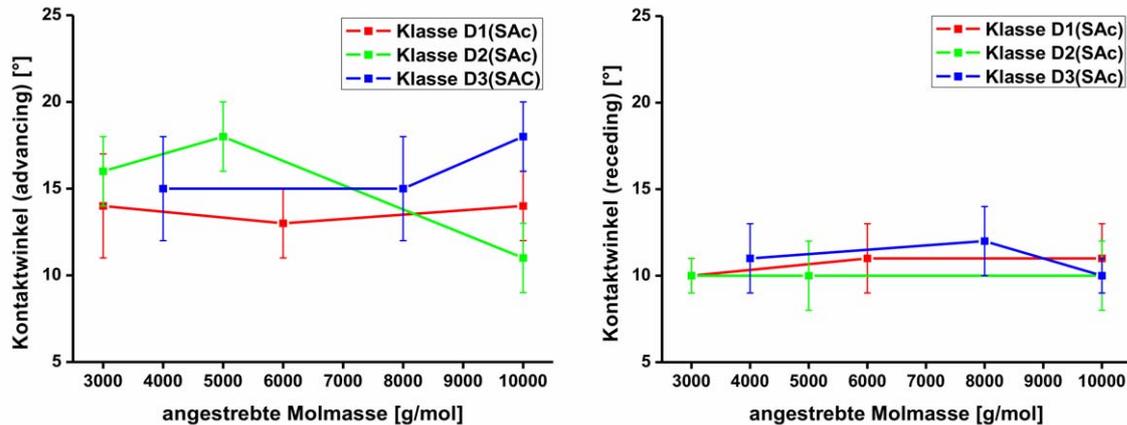


Abb. 58: *Advancing*- und *receding*-Kontaktwinkel der Dendrimer-SAMs auf Gold.¹²¹

Abb. 58 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Kontaktwinkelmessungen. Die Werte für die *advancing*-Kontaktwinkel der verschiedenen SAMs unterschieden sich sowohl innerhalb einer Klasse als auch unter den drei Dendrimerklassen nicht signifikant voneinander. Es wurden Werte zwischen 18° und 11° ermittelt, die charakteristisch für Hydroxyl-terminierte, polare Oberflächen sind.^{360,361} Ein ähnliches Bild ergab sich für die *receding*-Kontaktwinkel. Die gemessenen Werte für die Dendrimer-SAMs wiesen kaum Unterschiede auf. Die Kontaktwinkel-Hysteresen für alle gemessenen SAMs, deren Größe ein Maß für die Rauigkeit und chemischer Inhomogenität der Oberfläche darstellt, weisen darauf hin, dass die Oberflächen in allen Fällen recht einheitlich sind. Der Wert der Kontaktwinkel-Hysterese für die **D1(SAc)**-Dendrimere betrug 3°, für die **D2(SAc)**-Dendrimere 6° und für die **D3(SAc)**-Dendrimere 5°. Die vorgestellten Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen bestätigen, dass die untersuchten Dendrimere einheitliche, PG-terminierte SAMs auf dem Goldsubstrat bilden. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Schichtqualität eignen sich diese Systeme sehr gut zur Untersuchung der Bakterienadhäsion.

Aus jeder Klasse wurden zwei Dendrimere mit unterschiedlichen Molmassen zwischen 3000 g/mol und 8000 g/mol getestet. Allerdings zeigte sich im MALDI-TOF-Spektrum, dass die mittleren Molmassen der PG-Verbindungen geringer ausfielen

als geplant.¹²¹ Daher bezieht sich die Zahl im Index der Substanzbezeichnung beispielsweise **D1(SAc)₈₀₀₀** auf die angestrebte Molmasse der jeweiligen Verbindung und nicht das reale Molekulargewicht.

4.4.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D1(SAc)

Es wurden zwei Vertreter dieser Klasse, **D1(SAc)₈₀₀₀** und **D1(SAc)₄₀₀₀**, hinsichtlich der Biorepulsivität gegen *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 untersucht. Die Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538 und *P. aeruginosa* PAO wurde lediglich auf **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs getestet. Dafür wurden die frisch präparierten SAMs mit der jeweiligen Testkeimsuspension inkubiert. Durch Auszählen der CFU auf den Agarplatten bzw. das Auswerten der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen mit der Bildanalyse-Software *ImageJ* konnten die CFU pro cm² Probe ermittelt werden und somit Aussagen über die Bakterien-abweisenden Eigenschaften der Schichten gemacht werden.

4.4.1.1 Adhäsion von *E. coli* WT

Das Adhäsionsverhalten von *E. coli* WT auf **D1(SAc)₈₀₀₀**- und **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs ist in Abb. 59 graphisch dargestellt. Beide Substanzen verminderten die Adhäsion im Vergleich zu unmodifiziertem Gold deutlich, wobei der Bakterien-abweisende Effekt bei **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs mit etwa 85% etwas weniger stark ausgeprägt zu sein schien.

4 Ergebnisse

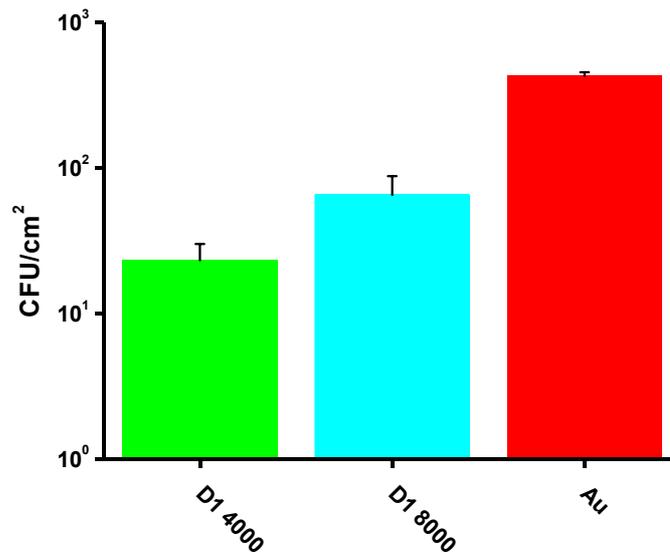


Abb. 59: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode.

Betrachtet man die Ergebnisse der *E. coli*-Adhäsion differenziert nach beiden Vertretern der Klasse **D1(SAc)**, so zeigt sich ein kleiner Unterschied. Die Schichten aus dem Dendrimer **D1(SAc)₄₀₀₀** wiesen ein stärker ausgeprägtes Inhibierungspotenzial auf als die **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs (Tabelle 11). Es ist unwahrscheinlich, dass es sich dabei um einen Zusammenhang zwischen der Molmasse der schichtbildenden Moleküle und der Repulsivität handelte, da, wie bereits in Abschnitt 4.4 erwähnt, die beiden Dendrimere eine sehr ähnliche mittlere Molmasse aufwiesen.

Abb. 60 und Abb. 61 zeigen typische Fotografien bebrüteter Agarplatten nach der Rekultivierung von Bakterien, die von Testsubstraten abgelöst wurden.

4 Ergebnisse

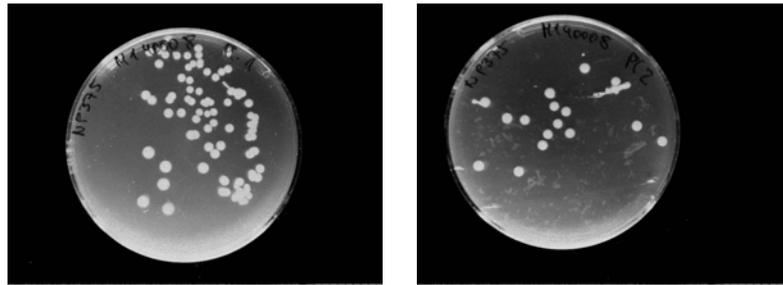


Abb. 60: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *E. coli*-Zellen von einem D1(SAc)₄₀₀₀-terminierten SAM auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 links, Platte 2 rechts).

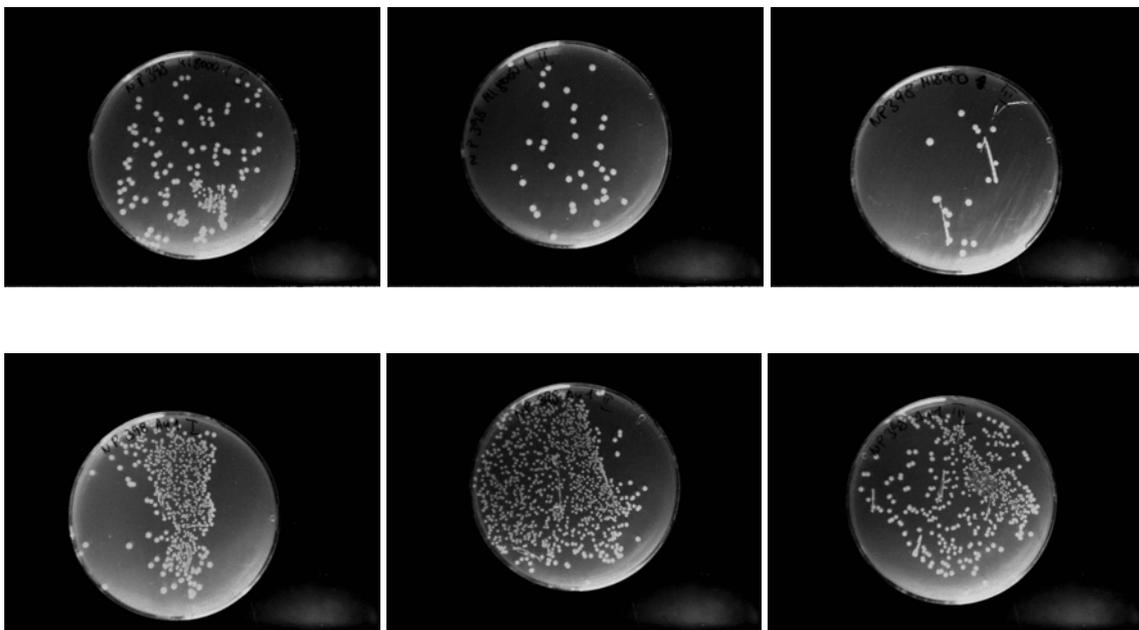


Abb. 61: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *E. coli* WT Zellen von einer Au-Probe (unten) und einem D1(SAc)₈₀₀₀-terminierten SAM (oben) auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Für den optimalen Zelltransfer wurden die Proben, wie unter 4.1.3 beschrieben, nacheinander mit drei unterschiedlichen Agarplatten in Kontakt gebracht. Nach der Übertragung wurden auf den Abdruck jeweils 80 µL NaCl-Lsg. gegeben, um die übertragenen Zellen mit einem sterilen Glasstab zu verteilen. Wie man der Abb. 61 entnehmen kann, war die Verteilung, die möglichst vorsichtig ausgeführt werden musste, um die durch die Prozedur vermutlich ohnehin gestressten Zellen nicht zu schädigen, bei den Goldproben oft nicht optimal. Wie Abb. 60 und Abb. 61 demonstrieren führte die Kultivierung nicht vollständig getrennter Zellen manchmal auch zur Bildung „bakterieller Streifen“, die ebenfalls nicht exakt quantifizierbar waren.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁵	(2,31±0,69)·10 ¹	5,41±1,6	94,6±1,6
D1(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁵	(6,51±2,24) 10 ¹	15,2±0,9	84,7±0,9
Au	1x10 ⁵	(4,28±0,26) 10 ²	100	0

Tabelle 11: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von D1(SAc)-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*).

4.4.1.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Aus Abb. 62 geht hervor, dass die SAMs die Adhäsion von *S. epidermidis* stark reduzierten. In der Biorepulsivität gegenüber *S. epidermidis* ergeben sich kaum Unterschiede für die **D1(SAc)₈₀₀₀**- und die **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs. Zwangsläufig auftretende Zufallsfehler während des Experiments drückten sich auch hier in Schwankungen der Messwerte aus. Sowohl bei den **D1(SAc)₈₀₀₀**- als auch bei **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs, insbesondere jedoch beim unmodifizierten Gold war eine beträchtliche Spannweite zwischen dem größten und niedrigsten Wert im Datenbestand zu beobachten.

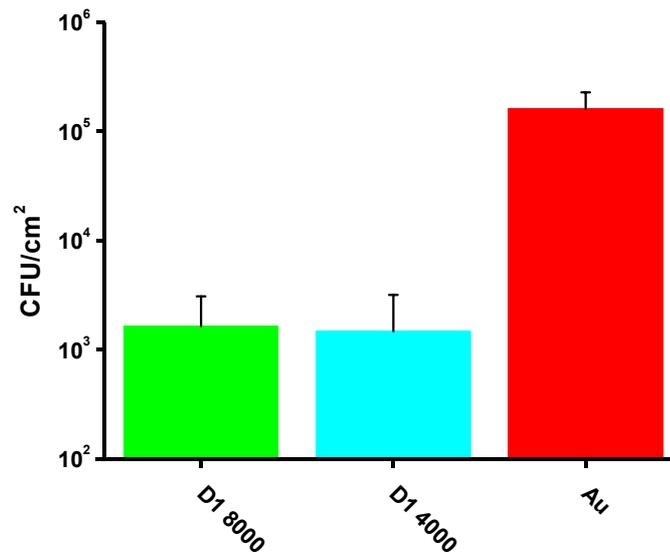


Abb. 62: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode.

So wurde innerhalb einer Messreihe aus jeweils 10 mL Testsuspension, die von zwei unterschiedlichen Goldproben abgelöste Bakterien enthielten, als niedrigster Wert 1500 CFU und als höchster Wert 4550 CFU gefunden. Neben den methodenbedingten Artefakten wären auch durch die Uneinheitlichkeit der Goldoberfläche erzeugte Schwankungen denkbar. Die für unser Auge nicht wahrnehmbaren Unterschiede auf der Oberfläche stellen für Bakterien eine sehr heterogene Landschaft dar, die eine unterschiedliche Anzahl von Adhäsionsplätzen anbietet. Trotz dieser großen Spannweite war die Varianz innerhalb einer Testreihe statistisch nicht signifikant.

4 Ergebnisse

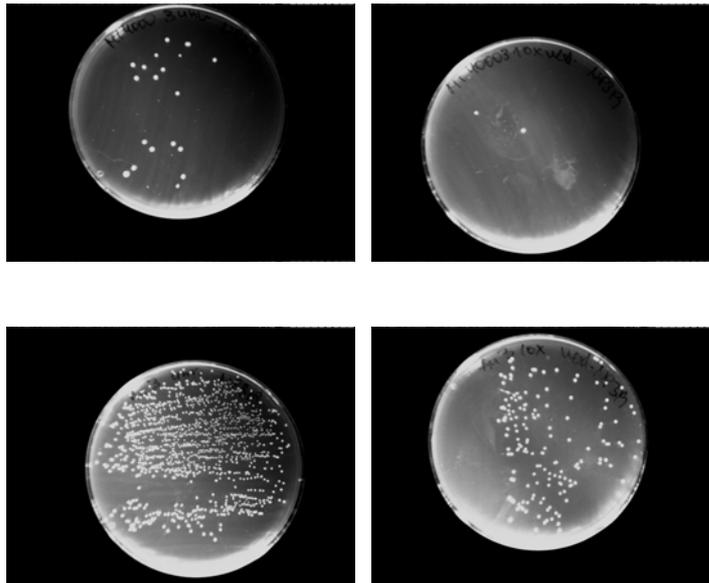


Abb. 63: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S. epidermidis* Zellen von einer Au-Probe (unten) und einem D1(SAc)₄₀₀₀-terminierten SAM (oben) auf CASO Agar-Festkulturmedium, unverdünnt (links) 10fach verdünnt (rechts).

In Abb. 63 und Abb. 64 sind die Agarplatten mit den rekultivierten *S. epidermidis*-Zellen dargestellt. Links sind die Agarplatten gezeigt, die mit der unverdünnten Testsuspension behandelt wurden und rechts die, bei denen die Suspension vor dem Auftragen zehnfach verdünnt wurde. Durch Auszählen dieser Platten konnte die CFU pro mL in der Testsuspension und daraus die CFU pro cm² Substrat ermittelt werden. Während die von den **D1(SAc)₄₀₀₀**- und **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs stammenden Agarplatten (Abb. 63 oben und Abb. 64 oben) mit gut erkennbaren Einzelkolonien bewachsen sind, zeigen die vom unmodifizierten Goldsubstrat stammenden Agarplatten ein dichtes Wachstum. Daraus ergab sich auch hier ein Problem mit der exakten Auszählung der Kolonien.

4 Ergebnisse

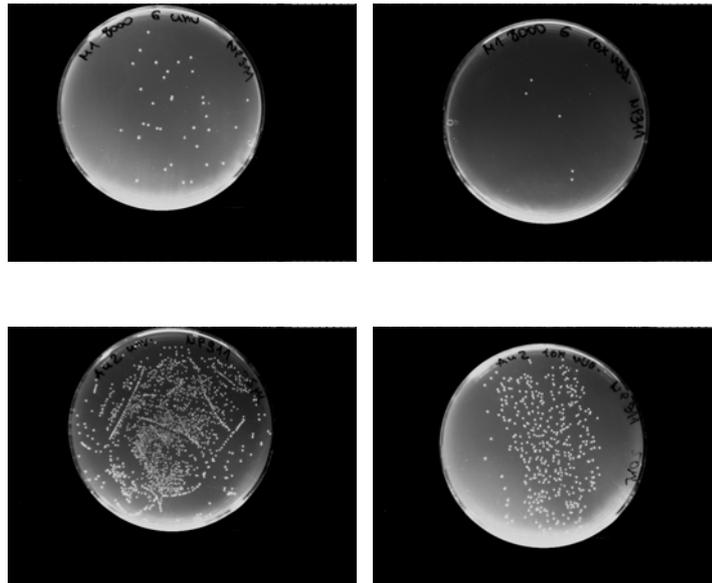


Abb. 64: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *S. epidermidis* Zellen von einer Au-Probe (unten) und einem D1(SAc)₈₀₀₀-terminierten SAM (oben) auf CASO Agar-Festkulturmedium.

Die Ergebnisse der *S. epidermidis*-Adhäsionsexperimente auf den D1(SAc)₈₀₀₀- und D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs, ermittelt durch die Epifluoreszenzmikroskopie, sind in der Abb. 65 dargestellt.

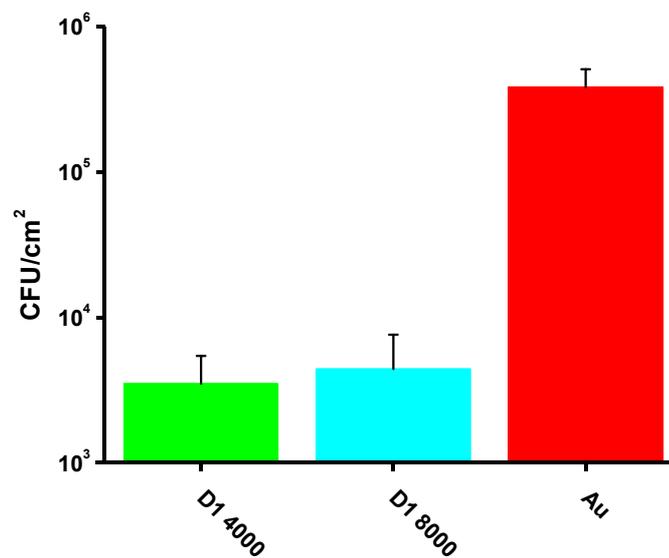


Abb. 65: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

4 Ergebnisse

Durch dieses Detektionsverfahren konnten für die **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs $3,49 \cdot 10^3$ CFU pro cm^2 Substrat und für **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs $4,42 \cdot 10^3$ CFU pro cm^2 Substrat ermittelt werden.

Abb. 66 macht deutlich, dass die direkte Zählung der adhärenierten Zellen das Ergebnis von $1,48 \cdot 10^3$ CFU pro cm^2 für **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs und $1,63 \cdot 10^3$ CFU pro cm^2 für **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs der Plattenzählmethode innerhalb der gleichen Größenordnung nur geringfügig verbesserte. Auch die Ergebnisse der Goldproben beider Verfahren wiesen kaum Diskrepanzen auf. Selbst die bei der Plattenzählmethode beobachtete Streuung der Werte innerhalb einer Messreihe trat auch bei der Fluoreszenzmikroskopie auf (höchster Wert: 11213 CFU, niedrigster Wert: 4056 CFU). Dies unterstützte die oben diskutierte Vermutung, dass die Oberflächenuneinheitlichkeit die Adhäsion beeinflusst. Außerdem wirkte sich möglicherweise auch die Tatsache nachteilig aus, dass die Substratgröße nicht exakt gleich war und damit zusätzliche Variablen im System vorhanden waren. Die Substratgröße variierte dabei von 18x18 mm bis 22x22 mm.

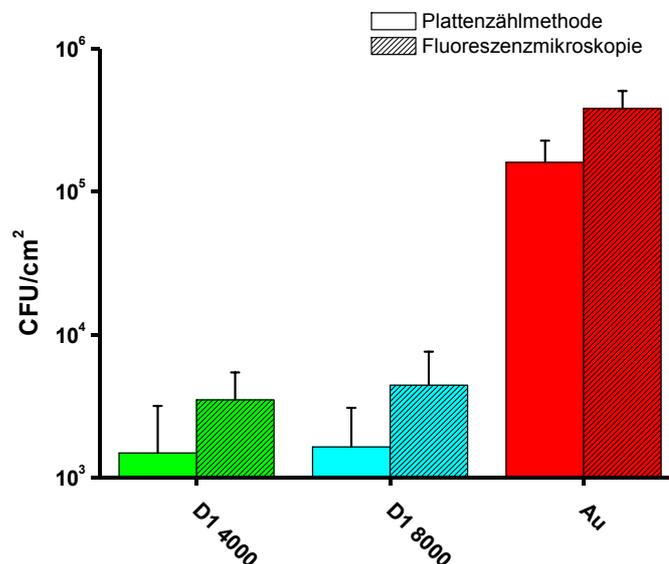


Abb. 66: Vergleich der Quantifizierungsmethoden bei der Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *S. epidermidis*.

Abb. 67 vermittelt einen optischen Eindruck der deutlich unterscheidlichen Bakteriendichte auf **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAM und unmodifiziertem Gold.

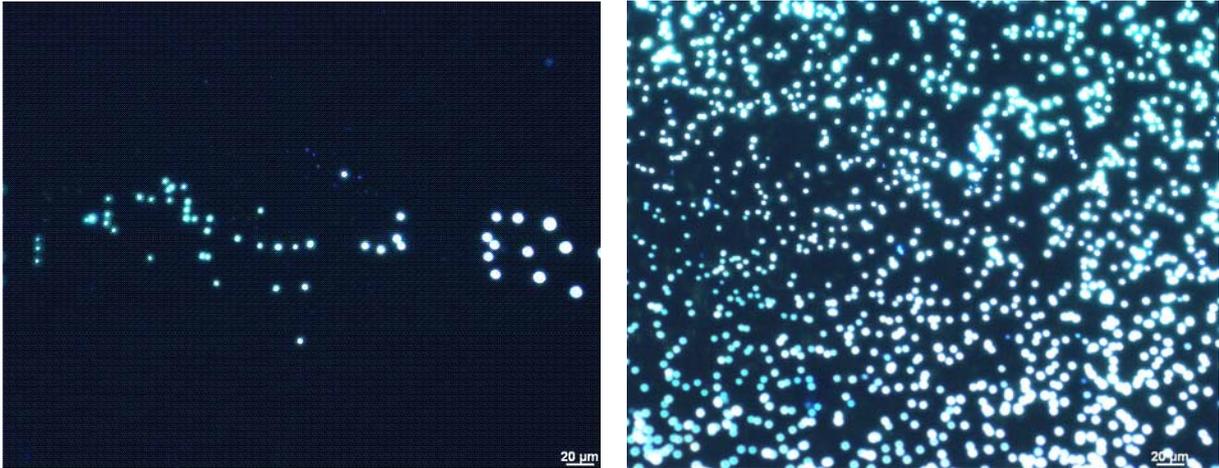


Abb. 67: Mit DAPI angefärbte *S. epidermidis* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs (links) und Au (rechts).

Unerwartet war die Beobachtung, dass die Fluoreszenz-mikroskopisch ermittelte Bakterienrepulsivität dieser SAMs im Rahmen der Messgenauigkeit mit den Ergebnissen aus der Plattenmethode übereinstimmte. Es ist daher anzunehmen, dass durch die Verwendung der Halterung für das Ultraschallbad (vgl. Abschnitt 4.1.4) der Ablöseschritt adhärenzierter Bakterien quantitativ und zuverlässig verlaufen ist. Außerdem scheint die Entscheidung, zur Ermittlung der CFU pro cm² Substrat bei der Plattenmethode die zehnfach verdünnte Testsuspension zu verwenden, die methodenbedingten Unterschiede in den Ergebnissen minimiert zu haben.

Im Gegensatz zur *E. coli*-Adhäsion zeigten die **D1(SAc)₄₀₀₀**- und **D1(SAc)₈₀₀₀**-SAMs kaum eine Variation bezüglich ihrer Repulsivität gegenüber *S. epidermidis*.

Aus der Tabelle 12 geht hervor, dass die beiden Vertreter dieser Klasse die Adhäsion von *S. epidermidis* ähnlich stark, nämlich um ca. 99% reduzierten.

4 Ergebnisse

A: Plattenmethode

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,48±1,69)·10 ³	0,92±1,05	99,1±1,0
D1(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,63±1,44)·10 ³	1,01±0,89	99,0±0,9
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,61±0,67)·10 ⁵	100	0

B: Epifluoreszenzmikroskopie

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,49±1,93)·10 ³	0,91±0,59	99,1±0,6
D1(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(4,42±3,17)·10 ³	1,16±0,91	98,8±0,9
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,82±1,26)·10 ⁵	100	0

Tabelle 12: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (A) und Epifluoreszenzmikroskopie ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (B).

4.4.1.3 Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538

In Abb. 68 sind die Ergebnisse der Adhäsion von *S. aureus* auf **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs und Gold aus jeweils drei unterschiedlichen Messreihen zusammengefasst.

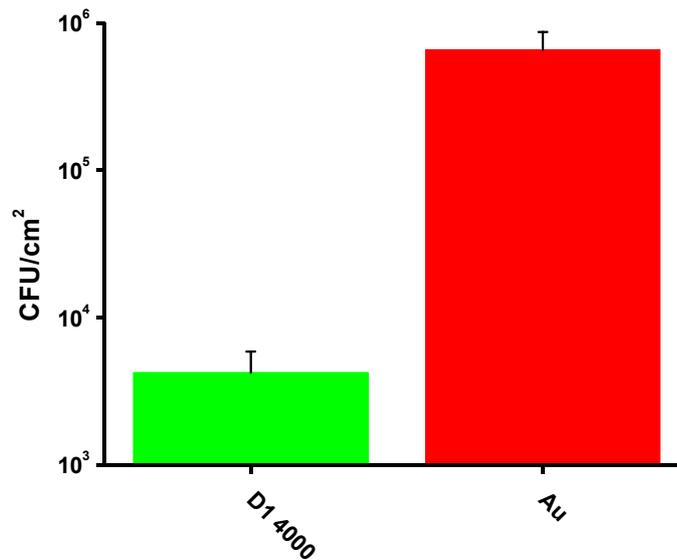


Abb. 68: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *S. aureus* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Resistenz der **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs gegenüber der Adhäsion von *S. aureus* ist mit $4,23 \cdot 10^3$ CFU pro cm² Substrat (Tabelle 13) nur unwesentlich stärker ausgeprägt als die der EG₇OH-SAMs ($6,12 \cdot 10^3$ CFU pro cm² Substrat). Bei unmodifiziertem Gold konnten $6,57 \cdot 10^5$ CFU pro cm² Probe als Ergebnis ermittelt werden. Somit bewirkten die **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs eine um zwei Größenordnungen reduzierte Bakterienadhäsion.

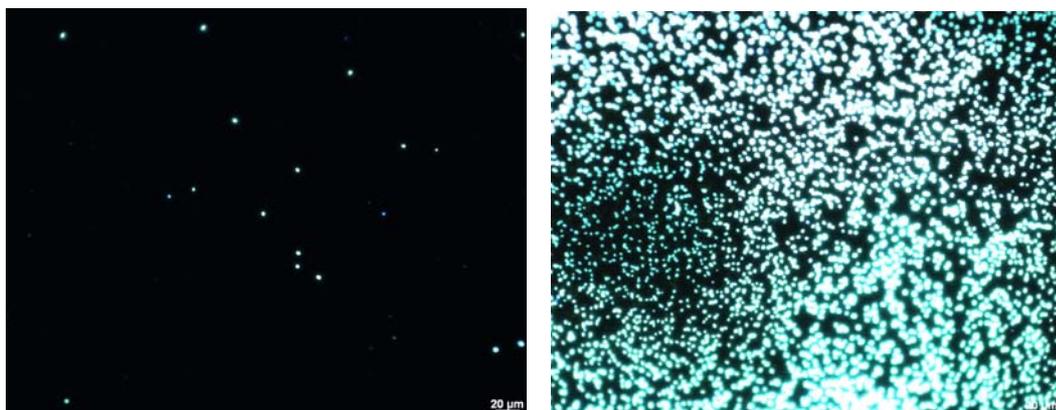


Abb. 69: Mit DAPI angefärbte *S. aureus* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs (links) und Au (rechts).

Abb. 69 zeigt auf den Testsubstraten adhärenzte *S. aureus* Zellen, die durch die Anfärbung mit DAPI unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurden. Mit

4 Ergebnisse

bloßem Auge ist ein drastischer Unterschied in der Zelldichte auf dem **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAM verglichen mit der Goldprobe zu erkennen. Besonders auf der Goldprobe kommt die Neigung der Bakterien, Zellhaufen zu bilden, zum Ausdruck. Die Haufenbildung von adhärenierten Bakterien erlaubt die Annahme, dass bereits in der Phase der Anheftung oder vorher die einzelnen Zellen miteinander interagieren.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(4,23±1,66)·10 ³	0,64±0,32	99,4±0,3
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(6,57±2,13)·10 ⁵	100	0

Tabelle 13: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-SAMs gegenüber *S. aureus* ATCC 6538 mittels Epifluoreszenzmikroskopie(p<0,001, *Mann-Whitney-Test*).

4.4.1.4 Adhäsion von *P. aeruginosa* PAO

Abb. 70 illustriert, dass die bereits bei EG₇OH-SAMs diskutierte, deutlich schwächer ausgeprägte Bioresistenz gegenüber *P. aeruginosa* auch bei den **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs zu beobachten war. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass dieser Testkeim tatsächlich in der Lage ist, jede Oberfläche zu besiedeln.

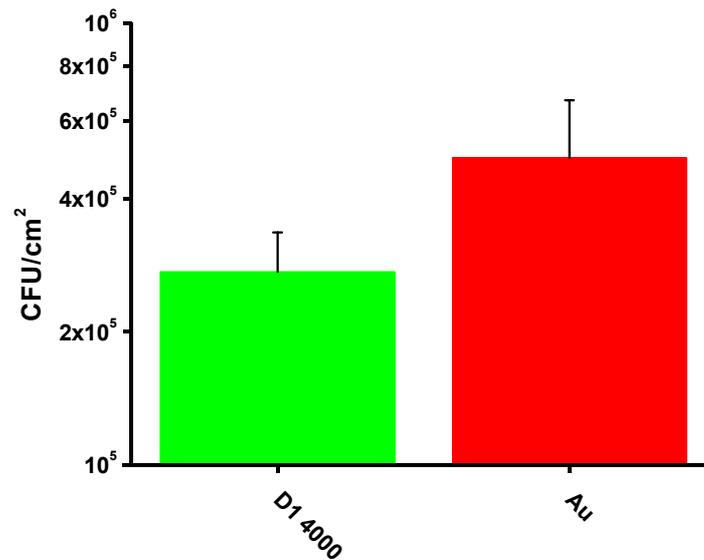


Abb. 70: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Abb. 71 macht deutlich, dass auch auf den **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs eine hohe Bakterien-dichte detektiert wurde. Der Unterschied zu der Besiedlung auf dem unmodifizierten Gold fiel in diesem Fall deutlich geringer aus als bei den drei restlichen Testkeimen.

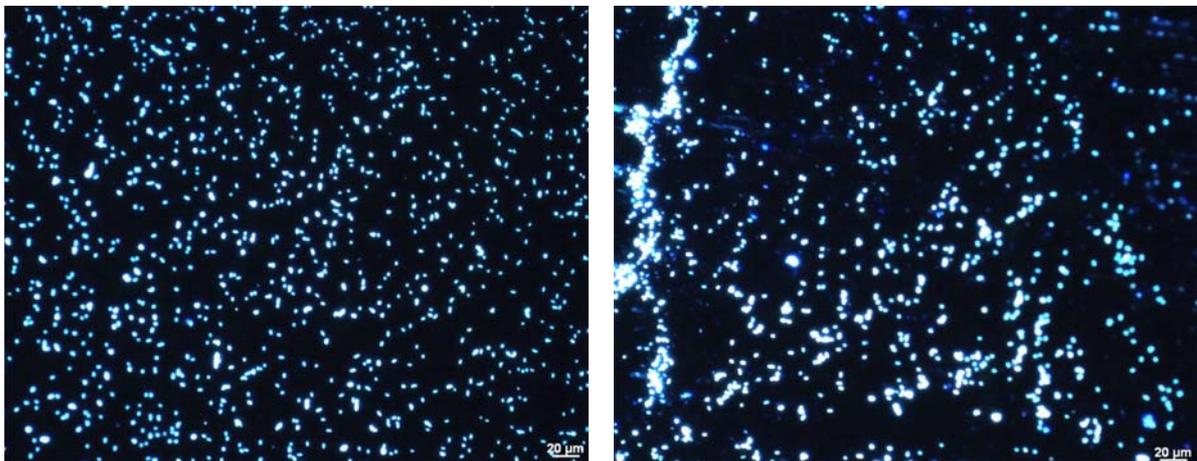


Abb. 71: Mit DAPI angefärbte *P. aeruginosa*-Zellen auf D1-SAM (links) und Au (rechts).

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁹ CFU/mL	(2,73±0,63)·10 ⁵	55,2±23	44,8±23
Au	1x10 ⁹ CFU/mL	(4,95±1,73) 10 ⁵	100	0

Tabelle 14: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* PAO mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Diese Tatsache unterstreicht die Unterschiede im Adhäsionsverhalten einzelner Organismen, was eine Formulierung eines allgemein gültigen Adhäsionsmechanismus unmöglich macht.

Der Vergleich der Adhäsionsergebnisse von *P. aeruginosa* auf EG₇OH- und **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs hat ergeben, dass dieser Keim mit 55,2% relativer Adhäsion (Tabelle 14) eine geringfügig höhere Tendenz zur Bindung an die dendrimermodifizierten Oberflächen zeigt. Für die geringe Wirksamkeit der ethylenglycolterminierten SAMs gegenüber der Adhäsion von *P. aeruginosa* wurde im Abschnitt 4.3.2 ein möglicher Abbau der Monoschicht unter Einwirkung von bakteriellen Biotensiden vermutet. Da die Polyglycerol-Kopfgruppe als weniger empfindlich gegenüber biologischem Abbau gilt, wäre im Falle der Richtigkeit unserer Annahme ein besseres Ergebnis für Dendrimer-SAMs zu erwarten gewesen. Das eingetretene Ergebnis lässt sich so interpretieren, dass die funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* mit der PG-Kopfgruppe eine günstigere Wechselwirkung eingehen konnten als mit der EG-Gruppe. Andererseits konnte auch der Abbau der PG-Gruppe durch bakterielle Biotenside nicht ausgeschlossen werden. Mit dem Ergebnis konnte die im Abschnitt 4.3.2 diskutierte Annahme der möglichen Schichtdegradation weder bestätigt noch widerlegt werden.

Während EG- und PG-terminierte SAMs in den Experimenten eine geringe Repulsivität gegenüber *P. aeruginosa* zeigen, wird in der Literatur eine drastische Reduzierung der Adhäsion von *P. aeruginosa* durch CH₃-terminierte SAMs beschrieben.³⁴³ Allerdings bewirkte eine Verlängerung der Expositionszeit von 3 h bis zu 24 h auch auf diesen SAMs eine starke Keimakkumulation.

Zwischen der Anzahl adhärierter Bakterien auf den **D1(SAc)**-SAMs und den Goldreferenzen bestand ein hochsignifikanter Unterschied (*Mann-Whitney-Test*, p<0,001).

4.4.2 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D2(SAc)

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen auf den **D2(SAc)**-SAMs vorgestellt. Es wurden zwei Vertreter dieser Klasse, **D2(SAc)₃₀₀₀** und **D2(SAc)₅₀₀₀**, hinsichtlich ihrer Biorepulsivität gegenüber *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 untersucht. Die Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538 und *P. aeruginosa* PAO wurde nur auf **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs getestet.

Im Experiment wurden frisch präparierte SAMs mit der jeweiligen Testkeimsuspension inkubiert. Durch Auszählen der CFU auf den Agarplatten bzw. Auswerten der Mikroskopieaufnahmen mithilfe von *ImageJ* konnte das Endergebnis als CFU pro cm² Substrat ermittelt werden und somit Aussagen über die Bakterien-abweisenden Eigenschaften dieser Schichten gemacht werden.

4.4.2.1 Adhäsion von *E.coli* WT

Die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen von *E. coli* WT auf **D2(SAc)₃₀₀₀**- und **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs sind in Abb. 72 wiedergegeben.

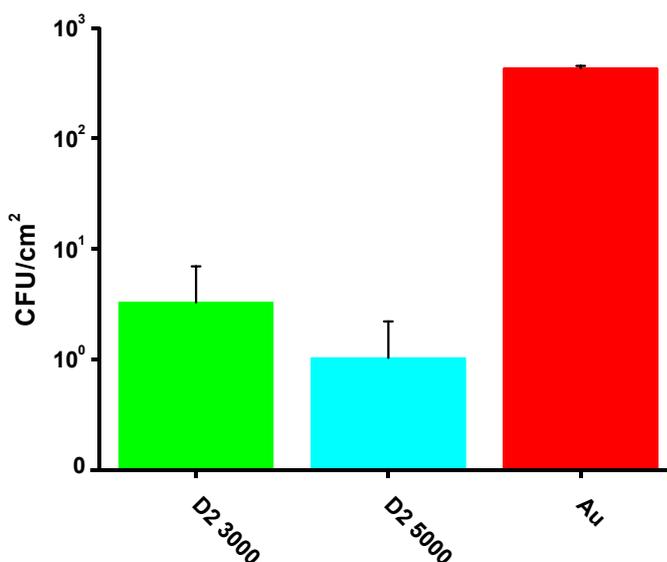


Abb. 72: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode.

4 Ergebnisse

Verglichen mit unmodifiziertem Gold wiesen beide Dendrimer-SAMs eine deutliche Repulsivität gegenüber *E. coli* auf. Auffällig war, dass die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs die Adhäsion von *E. coli* etwas stärker reduzierten als **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs.

Abb. 73 zeigt bebrütete Agarplatten nach der Rekultivierung der von den Testsubstraten abgelösten Bakterien. Bei dieser Probe wurden auf die erste Agarplatte (links) 10 Bakterien, auf die zweite (in der Mitte) 5 und auf die dritte (rechts) keine Bakterien übertragen worden. Auf den Goldproben waren die Verhältnisse ähnlich wie bei den bisherigen Ergebnissen.



Abb. 73: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *E. coli* Zellen von einem D2(SAc)₃₀₀₀-terminierten SAM auf CASO Agar-Festkulturmedium

Wie die Tabelle 15 verdeutlicht, zeigten die SAMs der **D2(SAc)**-Klasse eine geringere Variation in der Repulsivität gegenüber *E. coli* als die **D1(SAc)**-Schichten.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D2(SAc)₃₀₀₀	1x10 ⁵ CFU/mL	(3,27±3,68)	0,76±0,86	99,2±0,9
D2(SAc)₅₀₀₀	1x10 ⁵ CFU/mL	(1,03±1,17)	0,24±0,27	99,8±0,3
Au	1x10 ⁵ CFU/mL	(4,28±0,26)·10 ²	100	0

Tabelle 15: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2(SAc)-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Sowohl auf **D2(SAc)₅₀₀₀**- als auch **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs fand nur eine geringfügige Adhäsion statt. In beiden Fällen betrug die Verminderung der Bakterienadhäsion über 99%.

4.4.2.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Mit den in Abb. 74 dargestellten Ergebnissen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die **D2(SAc)₃₀₀₀**- und **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs die Adhäsion von *S. epidermidis* deutlich reduzieren. In beiden Fällen konnte eine Adhäsionsverminderung über 99% beobachtet werden. Mit $1,61 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 Goldsubstrat war die Besiedlung auf unmodifiziertem Gold um zwei Größenordnungen höher als auf den Monoschichten.

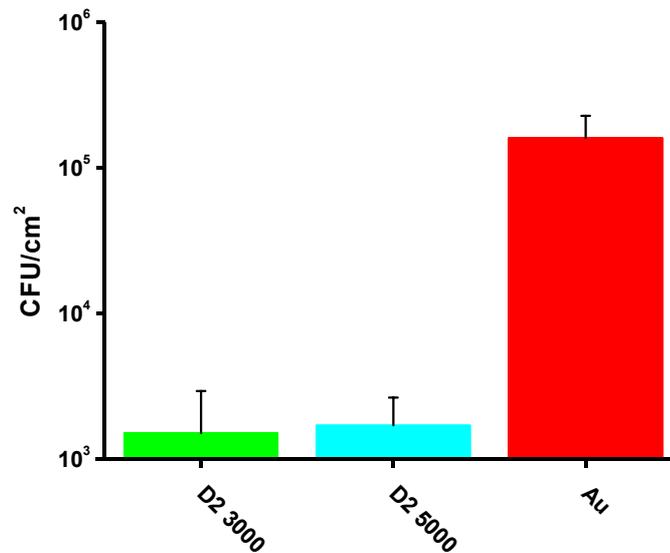


Abb. 74: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode.

Die durch Epifluoreszenzmikroskopie gewonnenen Ergebnisse für **D2(SAc)₃₀₀₀**- und **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs sind in Abb. 75 dargestellt.

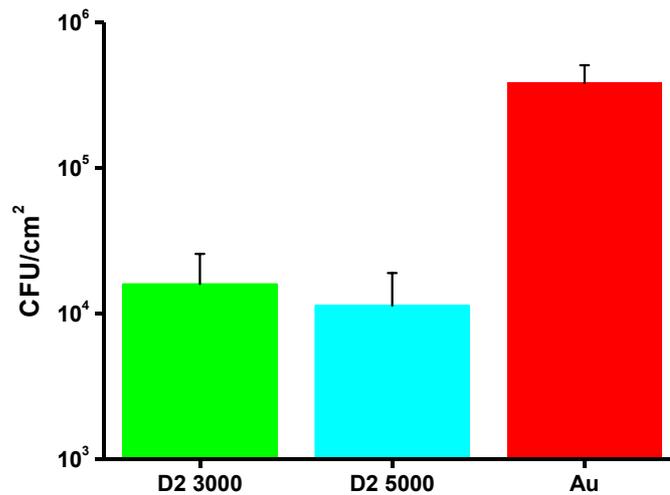


Abb. 75: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Ähnlich wie bei *E. coli* sprachen die Ergebnisse dafür, dass die beiden Vertreter der **D2(SAc)**-Klasse auch die Anheftung von *S. epidermidis* stark reduzieren. Anders als bei der **D1(SAc)**-Klasse (vgl. Abschnitt 4.4.1.2) wurden bei näherer Betrachtung der Ergebnisse der **D2(SAc)**-Schichten auswertungsmethodenabhängige Unterschiede festgestellt (Abb. 76, Tabelle 16). Während bei den SAMs der **D1(SAc)**-Klasse das durch die Plattenzählmethode und Epifluoreszenzmikroskopie ermittelte Ergebnis in der gleichen Größenordnung lag, wurde durch die Epifluoreszenzmikroskopie eine um eine Größenordnung höhere Bakterienzahl auf den Monoschichten der **D2(SAc)**-Klasse detektiert.

4 Ergebnisse

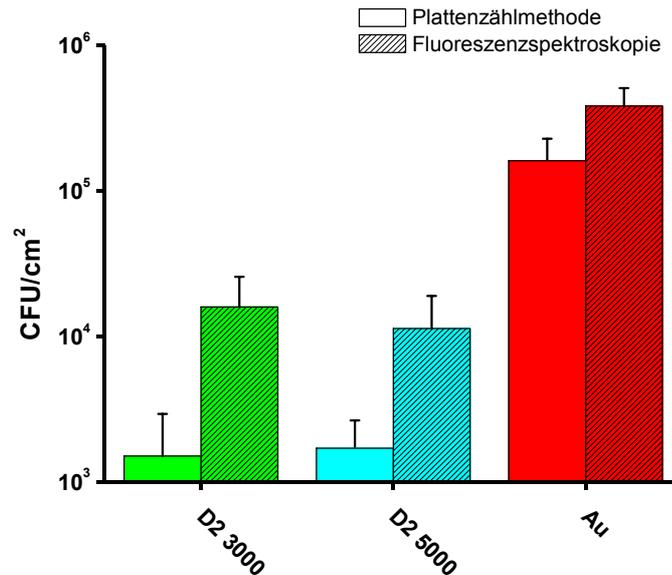


Abb. 76: Vergleich der Quantifizierungsmethoden bei der Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *S. epidermidis*.

Die beobachtete Diskrepanz verwundert nicht, da das notwendige Ablösen und die Rekultivierung der Bakterien bei der Plattenmethode allgemein zur Unterschätzung der Zellzahl führt. In diesem Fall hat sich die Annahme bestätigt, dass die Fluoreszenzmethode zuverlässiger ist bzw. richtigere Ergebnisse liefert.

A: Plattenmethode

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D2(SAc)₃₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,50±1,43)·10 ³	0,93±0,89	99,1±0,9
D2(SAc)₅₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(0,85±1,08)·10 ³	0,53±0,67	99,5±0,7
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,61±0,67)·10 ⁵	100	0

4 Ergebnisse

B: Epifluoreszenzmikroskopie

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D2(SAc)₃₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,59±0,98)·10 ⁴	4,16±2,91	95,8±2,9
D2(SAc)₅₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,13±0,77)·10 ⁴	2,96±2,23	97,0±2,2
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,82±1,26)·10 ⁵	100	0

Tabelle 16: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2(SAc)-SAMs gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (A) und Epifluoreszenzmikroskopie ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (B).

4.4.2.3 Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538

Gegenüber *S. aureus* zeigten die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs einen deutlichen biorepulsiven Effekt (Abb. 77). Sie verminderten die Adhäsion des Testkeimes um 99,4% und waren daher als resistent einzustufen (Tabelle 17).

Durch den Vergleich mit den Ergebnissen für SAMs der **D1(SAc)**-Klasse (vgl. Abschnitt 4.4.1.3) und EG₇OH-SAMs (vgl. Abschnitt 4.3.1.3) kann dies als bestes Zwischenergebnis in der Inhibierung der Adhäsion von *S. aureus* festgehalten werden.

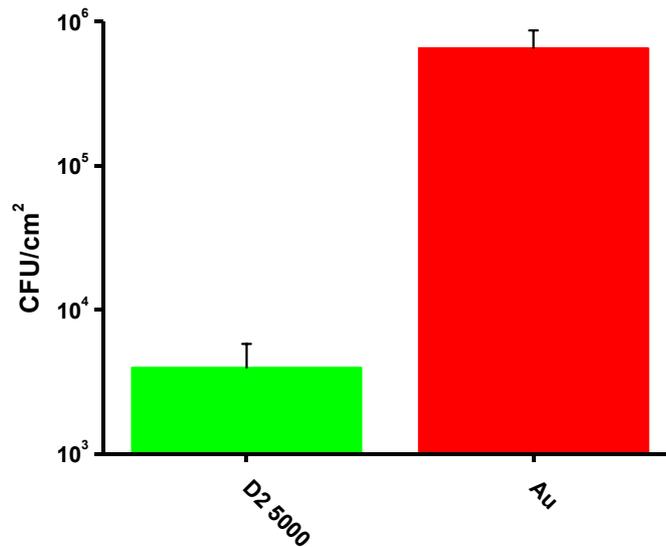


Abb. 77: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *S. aureus* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D2(SAc)₅₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	$(3,88 \pm 1,85) \cdot 10^3$	0,59±0,34	99,4±0,3
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	$(6,57 \pm 2,13) \cdot 10^5$	100	0

Tabelle 17: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2(SAc)-SAMs gegenüber *S. aureus* ATCC 6538 mittels Epifluoreszenzmikroskopie ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*).

4.4.2.4 Adhäsion von *P. aeruginosa* PAO

Abb. 78 und Tabelle 18 fassen die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen von *P. aeruginosa* auf **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs zusammen. Ähnlich wie bei EG₇OH- und **D1(SAc)**-SAMs (vgl. Abschnitte 4.3.1.4 und 4.4.1.4) konnte auch im **D2(SAc)**-System eine stark ausgeprägte Bindungsfähigkeit des Testkeims auf PG-terminierte Oberflächen festgestellt werden. Mit einer nur 36%igen Verminderung der Adhäsion können die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs als gering wirksam eingestuft werden. Die pro cm²

4 Ergebnisse

Substrat ermittelten Keimzahlen unterscheiden sich für unmodifiziertes Gold und **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs unwesentlich innerhalb der gleichen Größenordnung.

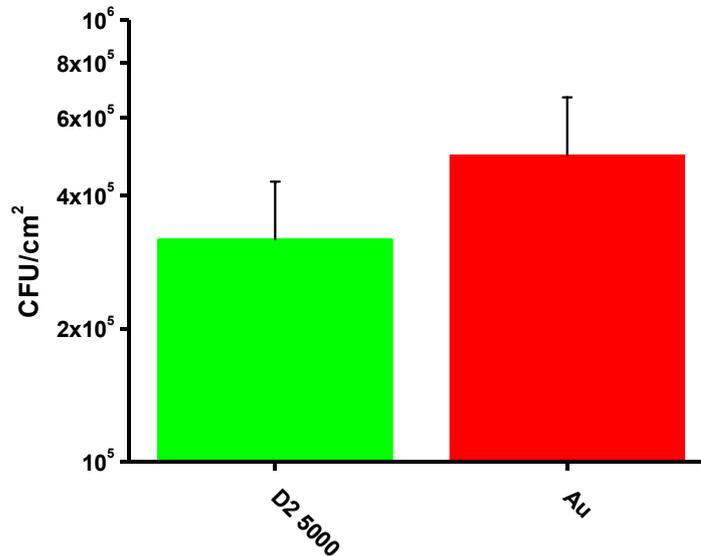


Abb. 78: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D2(SAc)₅₀₀₀	1x10 ⁹ CFU/mL	(3,19±1,12)·10 ⁵	64,4±31,9	35,6±31,9
Au	1x10 ⁹ CFU/mL	(4,95±1,73)·10 ⁵	100	0

Tabelle 18: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2(SAc)-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* PAO mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,001, *Mann-Whitney-Test*).

Zwischen der Anzahl adhärierter Bakterien auf den **D2(SAc)**-SAMs und den Goldreferenzen bestand ein hochsignifikanter Unterschied (*Mann-Whitney-Test*, p<0,001).

4.4.3 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der Dendrimere der Klasse D3(SAc)

Zwei Vertreter der **D3(SAc)**-Klasse, **D3(SAc)₄₀₀₀** und **D3(SAc)₈₀₀₀**, wurden hinsichtlich ihrer Biorepulsivität gegen *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 untersucht. Die Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538 und *P. aeruginosa* PAO wurde auf **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs untersucht. Dafür wurden die frisch präparierten SAMs mit der jeweiligen Testkeimsuspension inkubiert. Zwei Auswertungsmethoden, die Plattenzählmethode und die Epifluoreszenzmikroskopie kamen zur Bestimmung der Anzahl der adhärenierten Keime zum Einsatz. Dabei konnte durch Auszählen der CFU auf den Agarplatten bzw. Auswerten der Mikroskopieaufnahmen mit Hilfe von *ImageJ* das Endergebnis als CFU pro cm² Substrat ermittelt werden und somit Aussagen über die bakterienabweisenden Eigenschaften dieser Schichten gemacht werden.

4.4.3.1 Adhäsion von *E.coli* WT

Die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen von *E. coli* auf **D3(SAc)₄₀₀₀**- und **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs sind in Abb. 79 wiedergegeben.

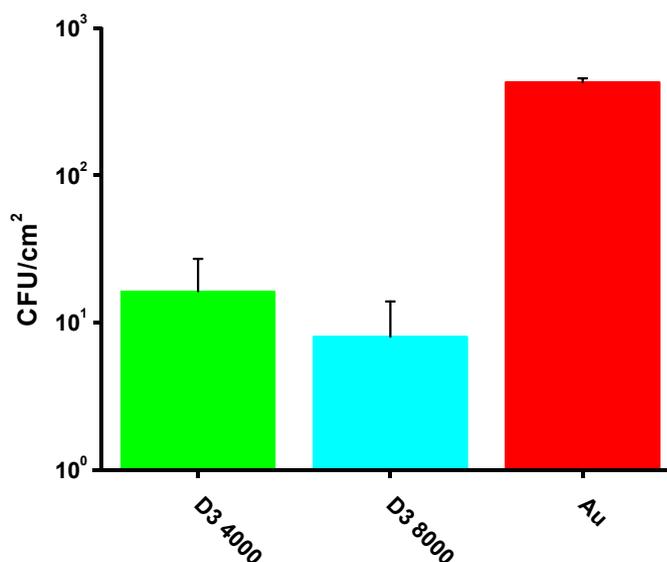


Abb. 79: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3-SAMs gegenüber *E. coli* mittels Plattenmethode.

4 Ergebnisse

Verglichen mit dem unmodifizierten Gold wiesen beide Dendrimer-SAMs ein deutlich ausgeprägtes repulsives Potenzial (96,2% bzw. 98,1%, Tabelle 19) gegenüber *E. coli* auf. Im Experiment reduzierten **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs die Adhäsion von *E. coli* unwesentlich stärker als **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs. Ein ähnliches scheinbar molmassenabhängiges repulsives Verhalten wurde auch im **D2(SAc)-E. coli**-System beobachtet. Zwar war der Effekt sehr schwach ausgeprägt, jedoch zeigten **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs eine stärkere Inhibierung der Adhäsion von *E. coli* als **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs. Dieses Ergebnis war unerwartet, da aufgrund der sehr ähnlichen mittleren molaren Masse der Thioacetate von einem weitgehend identischen Schichtbildungs- und Repulsionsverhalten ausgegangen wurde. Die **D1(SAc)**-SAMs hingegen wiesen einen unwesentlichen Unterschied im Repulsionspotenzial in der umgekehrten Richtung auf (vgl. Abschnitte 4.4.1.1 und 4.4.2.1). Allerdings kann bei diesen Beobachtungen nicht von einem systematischen Zusammenhang zwischen dem repulsiven Charakter der SAMs und der angestrebten Molmasse ausgegangen werden.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D3(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁵ CFU/mL	(1,63±1,07)·10 ¹	3,81±2,51	96,2±2,51
D3(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁵ CFU/mL	(7,99±5,88)	1,87±1,38	98,1±1,38
Au	1x10 ⁵ CFU/mL	(4,28±0,26)·10 ²	100	0

Tabelle 19: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3(SAc)-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode (p<0,001, *Mann-Whitney-Test*).

4.4.3.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Die nachfolgend gezeigten Abb. 80 und Abb. 81 geben die Ergebnisse der Plattenzählmethode der *S. epidermidis* Adhäsion auf **D3(SAc)₄₀₀₀** und **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs wieder.

4 Ergebnisse

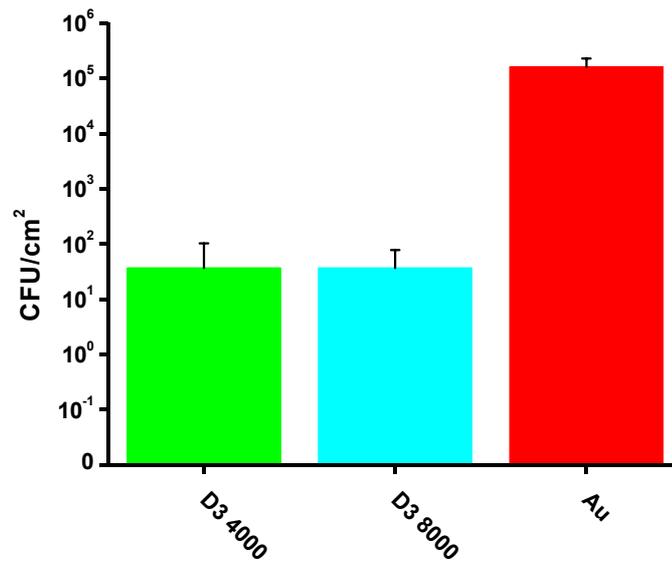


Abb. 80: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften D3-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode.

Die durch die Rekultivierung der von den Testsubstraten abgelösten Keime ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Vertreter der **D3(SAc)**-Klasse die Adhäsion von *S. epidermidis* sehr stark reduzieren.

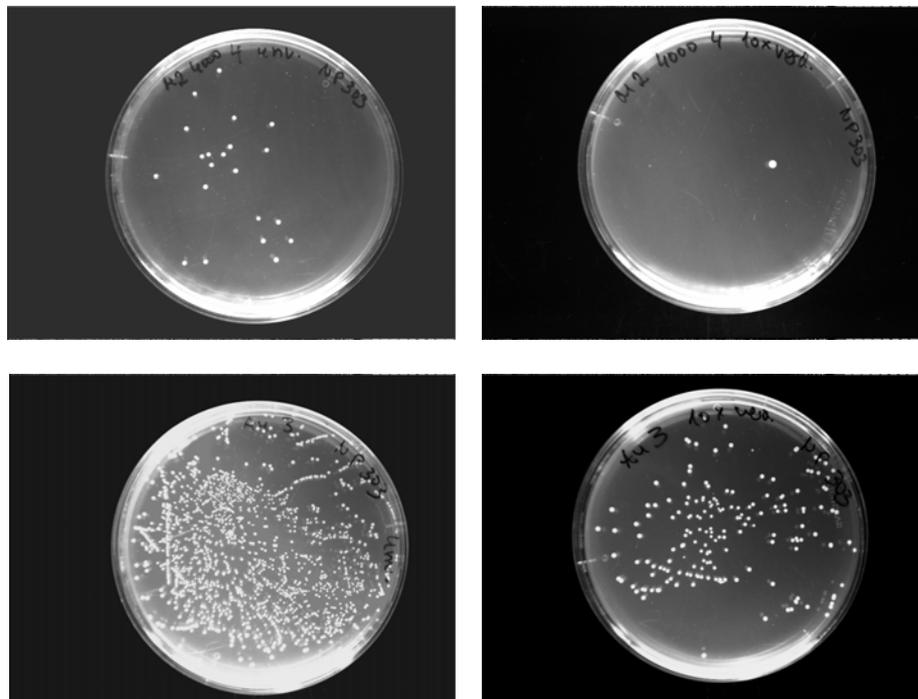


Abb. 81: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S. epidermidis* Zellen von einer Au-Probe (unten) und einem D3(SAc)₄₀₀₀-terminierten SAM (oben) auf CASO Agar-Festkulturmedium, unverdünnt (links) und 10fach verdünnt (rechts).

4 Ergebnisse

In Abb. 81 sind links die Agarplatten mit unverdünnter und rechts zehnfach verdünnter Testsuspension gezeigt. Die der **D3(SAc)₄₀₀₀** zugehörigen Agarplatten weisen ein geringes Wachstum der Testkeime auf. Wie das Bild unten zeigt, führte der Zellen-transfer von den Goldproben auf die Agarplatten zu einem sehr dichten Wachstum. Zu berücksichtigen ist, dass das aufgetragene Volumen bei den SAM-Proben 50 μL und bei den Goldproben 25 μL betrug. Trotzdem eignete sich das Ergebnis der Agarplatte mit der unverdünnten Testsuspension nicht für die Quantifizierung, da das Auszählen der Kolonien nicht fehlerfrei durchgeführt werden konnte.

Während durch Plattenzählmethode für beide Vertreter dieser Klasse $3,67 \cdot 10^1$ CFU pro cm^2 Substrat als Endergebnis ermittelt wurde, ergab die Auswertung durch die Epifluoreszenzmikroskopie mit $5,55 \cdot 10^3$ bzw $4,29 \cdot 10^3$ CFU pro cm^2 Substrat (Abb. 82, Tabelle 20) eine um zwei Größenordnungen höhere Adhäsion.

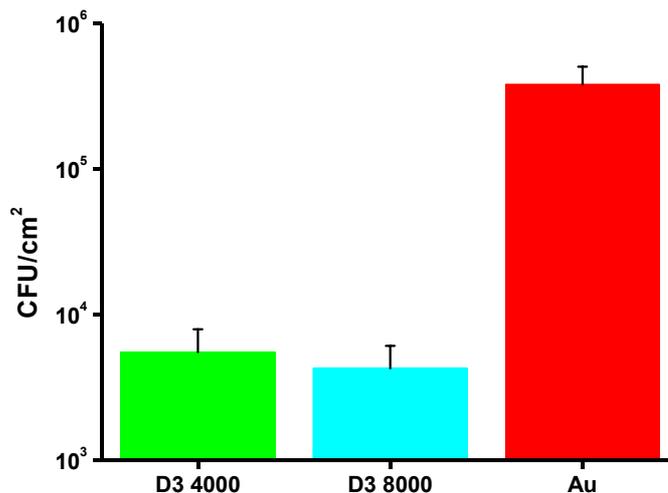


Abb. 82: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften D3-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Wie die grafische Darstellung in Abb. 83 verdeutlicht, führten die beiden Detektionsmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. Diese Diskrepanz war auch bei den Au-Substraten zu erwarten, da es in der Regel bei der Bestimmung von CFU durch Kultivierung die Zahl der Bakterien unterschätzt wird (vgl. Abschnitt 3.3.4.2).

4 Ergebnisse

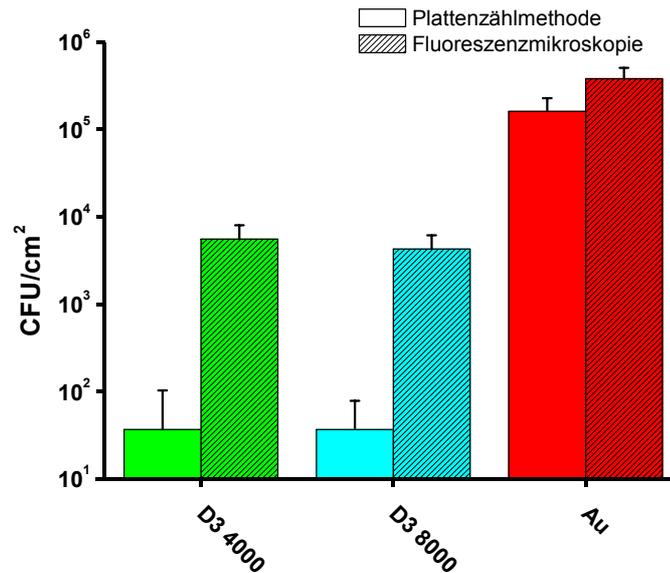


Abb. 83: Vergleich der Quantifizierungsmethoden bei der Bestimmung der repulsiven Eigenschaften D3-SAMs gegenüber *S. epidermidis*.

Bei den Adhäsionsuntersuchungen kommt die Notwendigkeit der Ablösung der Zellen hinzu. Die Zahl der Zellen, die nicht abgelöst werden können oder die eventuell geschädigt werden und nicht mehr aktiv, also nicht detektierbar sind, ist nicht bekannt. Auch bei der Goldreferenz wurden durch das mikroskopische Verfahren 2,4 mal mehr adhärenzte Zellen pro Fläche ermittelt.

Übereinstimmend zeigten beide Auswertungsmethoden ein hohes repulsives Potenzial für die **D3(SAc)₄₀₀₀** und **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs. Mit einer 99%-igen Repulsivität im Vergleich zur Referenz können die Schichten als stark repulsiv eingestuft werden.

4 Ergebnisse

A. Plattenmethode

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D3(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,67±6,56)·10 ¹	0,02±0,04	99,98±0,04
D3(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,67±4,14)·10 ¹	0,02±0,03	99,98±0,03
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,61±0,67) 10 ⁵	100	0

B: Epifluoreszenzmikroskopie

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D3(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(5,55±2,43)·10 ³	1,4±0,8	98,5±0,8
D3(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(4,29±1,82)·10 ³	1,1±0,6	98,8±0,6
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(3,82±1,26)·10 ⁵	100	0

Tabelle 20: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3(SAc)-SAMs gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (A) und Epifluoreszenzmikroskopie ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*) (B).

4.4.3.3 Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538

Abb. 84 kann entnommen werden, dass die repulsiven Eigenschaften der **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs gegenüber der Adhäsion von *S. aureus* nicht so stark ausgeprägt waren.

4 Ergebnisse

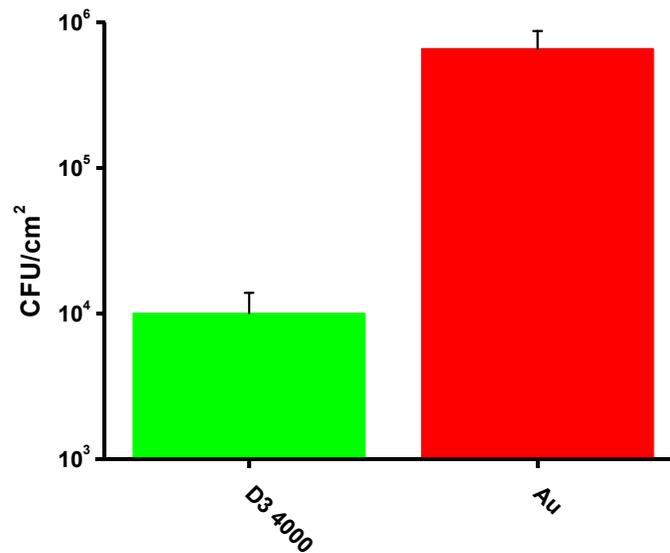


Abb. 84: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3-SAMs gegenüber *S. aureus* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Verminderung der Adhäsion im Vergleich zur unbeschichteten Probe betrug 84,8%. Bei der Berechnung wurde ein Datensatz von insgesamt 30 Einzelwerten für die Monoschichten und ebenfalls 30 Werte für die Goldreferenz verwendet. Sowohl für **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs als auch für die Goldreferenz wurden jeweils sechs Werte als Ausreißer identifiziert und nicht im Gesamtergebnis berücksichtigt (s. Anhang).

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D3(SAc)₈₀₀₀	1x10 ⁷ CFU/mL	(1,00±0,38)·10 ⁴	1,52±0,76	98,5±0,8
Au	1x10 ⁷ CFU/mL	(6,57±2,13)·10 ⁵	100	0

Tabelle 21: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3(SAc)-SAMs gegenüber *S. aureus* ATCC 6538 mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Der Unterschied in der Anzahl adhärierter Bakterien (*E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990 und *S. aureus* ATCC 6538) auf den **D3(SAc)**-SAMs und den Goldreferenzen war statistisch hochsignifikant (p<0,001, Mann-Whitney-Test).

4.4.3.4 Adhäsion von *P. aeruginosa* PAO

Bei den untersuchten **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs konnte in den Adhäsionsexperimenten mit *P. aeruginosa* eine Resistenz von ca. 28% beobachtet werden (Abb. 85). Gegenüber unbeschichtetem Gold zeigten die Monoschichten eine geringere Verminderung der Adhäsion als die Vertreter der **D1(SAc)-** und **D2 (SAc)-**Klassen. (Tabelle 22, bei der Berechnung wurden 5 Werte als Ausreisser identifiziert und aus dem Datensatz von **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs entfernt).

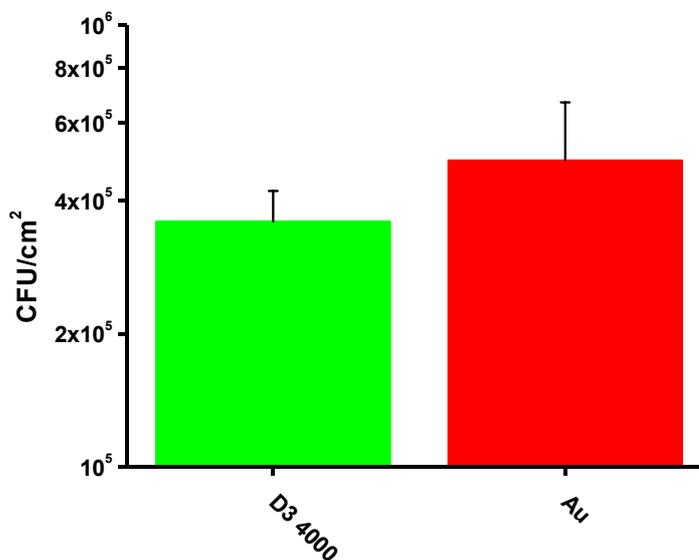


Abb. 85: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D3(SAc)₄₀₀₀	1x10 ⁹ CFU/mL	(3,59±0,62) 10 ⁵	72,5±28,3	27,5±28,3
Au	1x10 ⁹ CFU/mL	(4,95±1,73)·10 ⁵	100	0

Tabelle 22: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D3(SAc)-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* PAO mittels Epifluoreszenzmikroskopie (p<0,05, Mann-Whitney-Test).

Diesem Ergebnis zufolge wiesen die **D3(SAc)₄₀₀₀**-SAMs von allen getesteten Dendrimer-SAMs die geringste Wirksamkeit gegen die Anhaftung von *P. aeruginosa* auf. Auch Statistisch war der Unterschied zwischen der Anzahl adhärerter Bakterien auf den **D3(SAc)**-SAMs und den Goldreferenzen weniger ausgeprägt (*Mann-Whitney*-Test, $p < 0,05$) als für **D1(SAc)**- und **D2(SAc)**- SAMs.

4.4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf den SAMs der Klassen D1(SAc), D2(SAc) und D3(SAc)

Im *in vitro* Testsystem wurden die Monoschichten der Klasse **D1(SAc)**, **D2(SAc)** und **D3(SAc)** auf ihr Potenzial, die Adhäsion der Bakterien *E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* ATCC 6538 und *P. aeruginosa* PAO zu unterdrücken, getestet. Tabelle 23 bis Tabelle 26 geben eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse aus jeweils drei Versuchsreihen an und verdeutlichen, soweit vorhanden, das stammspezifische Adhäsionsverhalten der Testkeime auf diesen Monoschichten.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	(2,31±0,69)·10 ¹	5,4±1,6	94,6±1,6
D1(SAc)₈₀₀₀	(6,51±2,24) 10 ¹	15,2±0,9	84,7±0,9
D2(SAc)₃₀₀₀	(3,27±3,68)	0,76±0,86	99,2±0,86
D2(SAc)₅₀₀₀	(1,03±1,17)	0,24±0,27	99,8±0,27
D3(SAc)₄₀₀₀	(1,63±1,07) 10 ¹	3,81±2,51	96,2±2,51
D3(SAc)₈₀₀₀	(7,99±5,88)	1,87±1,38	98,1±1,38
EG₇OH	(2,13±2,3)	0,5±0,5	99,5±0,5
Au	(4,28±0,26) 10 ²	100	0

Tabelle 23: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode.

Der Vergleich der Bakterienzahl pro Fläche und der daraus berechneten Repulsivitäten aller getesteten Monoschichten gegen *E. coli* WT (Tabelle 23) machen deutlich, dass die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs mit 99,8%-iger Repulsivität das beste Ergebnis zeigten. Die Adhäsion an den als Standard geltenden EG₇OH-SAMs mit einem Inhibierungspotenzial von 99,5% war doppelt so hoch.

Ebenfalls eine Verminderung der Adhäsion um mehr als 99% zeigten die **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs. Somit können auch die SAMs dieser Klasse gegenüber der Adhäsion von *E. coli* WT als hochrepulsiv eingestuft werden. Verglichen mit den SAMs der Klasse **D2(SAc)** zeigten die **D3(SAc)**-Monoschichten eine etwas geringere ausfallende Repulsivität. Auffallend war, dass auch in dieser Klasse, ähnlich wie im **D2(SAc)**-System, trotz unwesentlicher Unterschiede in der mittleren molaren Masse, die repulsiven Eigenschaften der SAMs von den zur Schichtbildung eingesetzten Dendrimeren abzuhängen schien. In den Adhäsionsexperimenten mit *E. coli* WT zeigten die **D1(SAc)**-SAMs von allen untersuchten PG-terminierten Monoschichten die am schwächsten ausgeprägte Bakterienrepulsivität.

4 Ergebnisse

Generell lässt sich feststellen, dass *E. coli* WT sich unter den gewählten Bedingungen als schwach adhärenter Keim zeigte. Selbst nativen Goldoberflächen wurden nur ca. 400 CFU pro cm² gefunden. Die Ergebnisse deuten weiterhin auf einen stark repulsiven Charakter der PG-Kopfgruppe hin, der in seiner Stärke mit dem der EG-Kopfgruppe vergleichbar ist und im Falle der **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs die Wirksamkeit der EG₇OH-Monoschichten sogar leicht übertrifft.

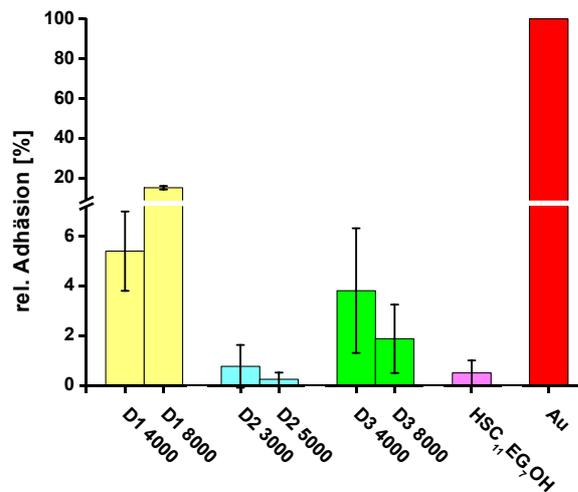


Abb. 86: Vergleich der relativen Adhäsion von *E. coli* WT auf D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs (ermittelt durch Plattenmethode).

Wie Tabelle 24 verdeutlicht, ist das Bild für die Adhäsion von *S. epidermidis* auf den **D1(SAc)**-, **D2(SAc)**- und **D3(SAc)**-SAMs anders. Gegenüber diesem Testkeim wiesen die beiden Vertreter der **D3(SAc)**-Klasse sowohl bei der Plattenmethode als auch bei der Epifluoreszenzmikroskopie mit einer circa 99%-iger Repulsivität eine starke Resistenz auf. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Testmethoden für die **D3(SAc)**-Klasse, stellt man fest, dass diese die EG₇OH-SAMs in ihrer repulsiven Wirksamkeit übertreffen. Während bei den EG₇OH-SAMs bei beiden Methoden die ermittelte Keimzahl pro Fläche innerhalb derselben Größenordnung lag, zeigten sich bei den **D3(SAc)₄₀₀₀**- und **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs allerdings methodenabhängige Unterschiede.

Da nicht auszuschließen ist, dass bei der Plattenzählmethode 5 s Ultraschallbehandlung für die vollständige Ablösung der Bakterien nicht ausreicht, scheint die

4 Ergebnisse

direkte Auszählung der adhärenierten Keime durch Epifluoreszenzmikroskopie die zuverlässigere Methode zu sein.

Testsub- strat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]		Rel. Adhäsion [%]		Reduzierung der Bioadhäsion [%]	
	Platten- methode	Epifluoreszenz- mikroskopie	Platten- methode	Epifluo- reszenz- mikrosko- pie	Platten- methode	Epifluo- reszenz- mikro- skopie
D1(SAc)₄₀₀₀	(1,48±1,69)·10 ³	(3,49±1,93) 10 ³	0,92±1,05	0,91±0,59	99,1±1,05	99,1±0,59
D1(SAc)₈₀₀₀	(1,63±1,44)·10 ³	(4,42±3,17)·10 ³	1,01±0,89	1,16±0,91	98,99±0,89	98,8±0,91
D2(SAc)₃₀₀₀	(1,50±1,43) 10 ³	(1,59±0,98) 10 ³	0,93±0,89	4,16±2,91	99,1±0,89	95,8±2,91
D2(SAc)₅₀₀₀	(0,85±1,08) 10 ³	(1,13±0,77) 10 ³	0,53±0,67	2,96±2,23	99,5±0,67	97,0±2,23
D3(SAc)₄₀₀₀	(3,67±6,56) 10 ¹	(5,55±2,43) 10 ³	0,02±0,04	1,4±0,80	99,98±0,04	98,5±0,80
D3(SAc)₈₀₀₀	(3,67±4,14) 10 ¹	(4,29±1,82) 10 ³	0,02±0,03	1,1±0,60	99,98±0,03	98,8±0,60
EG₇OH	(1,56±1,12) 10 ³	(8,57±5,51) 10 ³	0,97±0,70	2,24±1,62	99,0±0,70	97,8±1,62
Au	(1,61±0,67) 10 ⁵	(3,82±1,26) 10 ⁵	100	100	0	0

Tabelle 24: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode und Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Dendrimere der Klasse **D1(SAc)** zeigten mit *S. epidermidis* eine ähnliche Repulsivität wie EG₇OH und eigneten sich sehr gut zum Schutz der Metalloberflächen vor der Besiedlung mit den Testkeimen. Der unwesentliche Unterschied in der Repulsivität zugunsten der **D1(SAc)₄₀₀₀** liegt im Rahmen des Fehlers und kann nicht als Indiz für einen Zusammenhang zwischen der Molmasse der schichtbildenden Dendrimere und den bakterienabweisenden Eigenschaften der Monoschichten verstanden werden. Die Tabelle 24 zeigt auch, dass die methodenbedingten Unterschiede bei der **D1(SAc)**-Klasse weniger ins Gewicht fielen als bei der **D2(SAc)**-Klasse.

Die grundsätzliche Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren bei der **D1(SAc)**-Klasse war einerseits positiv zu bewerten, gleichzeitig jedoch etwas ver-

4 Ergebnisse

wunderlich, da allgemein davon ausgegangen wird, dass die kultivierungsabhängige Plattenmethode die realen Verhältnisse unterschätzt. Allerdings muss in dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit realisierte Optimierung der Plattenmethode beispielsweise durch Verwendung der Haltervorrichtung bei der Ultraschallbehandlung der adhärenzten *S. epidermidis*-Zellen oder die „Abklatsch-Zyklen“ zur möglichst quantitativen Ablösung der *E. coli*-Zellen, maßgeblich dazu beigetragen hat, dass so erhaltene Werte meistens nur noch unwesentliche Unterschiede von den Ergebnissen der Epifluoreszenzmikroskopie aufwiesen.

Die hier untersuchten **D2(SAc)**-SAMs vermindern deutlich die Besiedlung des Substrats, wie die Werte in der Tabelle erkennen lassen. Der Vergleich der durch die Plattenmethode bzw. Epifluoreszenzmikroskopie ermittelten Ergebnisse bestätigt einerseits eine geringfügige Variation in der Bakterienrepulsivität innerhalb der **D2(SAc)**-Klasse. Dabei zeigten sich die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs, ähnlich wie in den Experimenten mit *E. coli* WT etwas resistenter als die **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs. Andererseits machte dieser Vergleich die bereits diskutierten methodenspezifischen Unterschiede eindrucksvoll klar. Durch die Epifluoreszenzmikroskopie konnten bei den **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs die 5,6-fache und bei den **D2(SAc)₃₀₀₀**-SAMs die 4,5-fache Anzahl Bakterien detektiert werden im Vergleich zur ablösebasierten und kultivierungsabhängigen Plattenmethode. Die beobachtete Differenz in der Nachweissensibilität beider Methoden (vgl. Abb. 87 und Tabelle 24) lässt sich dadurch erklären, dass bei der Plattenmethode nur aktive Bakterien gezählt werden, während bei der Epifluoreszenzmikroskopie unabhängig von der metabolischen Aktivität alle Bakterien detektiert werden.

Die berechneten Fehler visualisieren allerdings, dass die Standardabweichungen bei beiden Methoden ähnlich hoch sind. Während der Keimverlust beim Transfer adhärenzter Zellen vom Testsubstrat auf die Agaroberfläche und die Rekultivierung als nichtkontrollierbare Variable nur für die Plattenmethode von Bedeutung sind, kommen bei der Epifluoreszenzmikroskopie andere Faktoren ins Spiel. Zu nennen wären hier z. B. Oberflächenfehler, wie Kratzer, die beim Schneiden der Stahlfolie in der Werkstatt auf fast jedem Substrat entstanden sind. Trotz Aussortieren stark zerkratzter Proben kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Testsubstrate Oberflächenfehler aufwiesen. Der Einfluss der Heterogenität der Materialoberfläche auf das Adhäsionsverhalten der Bakterien wird auch in der Literatur diskutiert. Es wird angenommen, dass die Heterogenität auf der Materialoberfläche für die Bakterien lokal

4 Ergebnisse

hoch favorisierte *sticky sites* erzeugt.³⁶² Die Detektion von auf Kratzern oder Stufen verankerten Bakterien hätte nicht nur eine lokal erhöhte Zellzahl, sondern auch eine erhöhte Spannweite zwischen den Einzelwerten zur Folge. Zusätzlich könnte der Farbstoff auf einer mechanisch geschädigte Oberfläche akkumulieren und so zur Verfälschung der Ergebnisse führen.

Eine negative Beeinflussung der Messergebnisse bei der Fluoreszenzmikroskopie könnte auch durch die leichte Wölbung der Proben, die ebenfalls bei der Handhabung in der Werkstatt entstanden ist, nicht ausgeschlossen werden. Die durch die Wölbung bedingte Unebenheit macht die notwendige homogene Ausleuchtung der zu untersuchende Probe schwierig. Der Strahl muss neu fokussiert werden, wodurch der quantitative Vergleich zwischen zwei Proben erschwert wird.

Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass die Beschichtung der Goldoberfläche mit PG-Gruppen zur deutlich verminderten Adhäsion von *S. epidermidis* führte. Unter den gewählten Experimentbedingungen kann *S. epidermidis* als moderat adhärenter Keim bezeichnet werden.

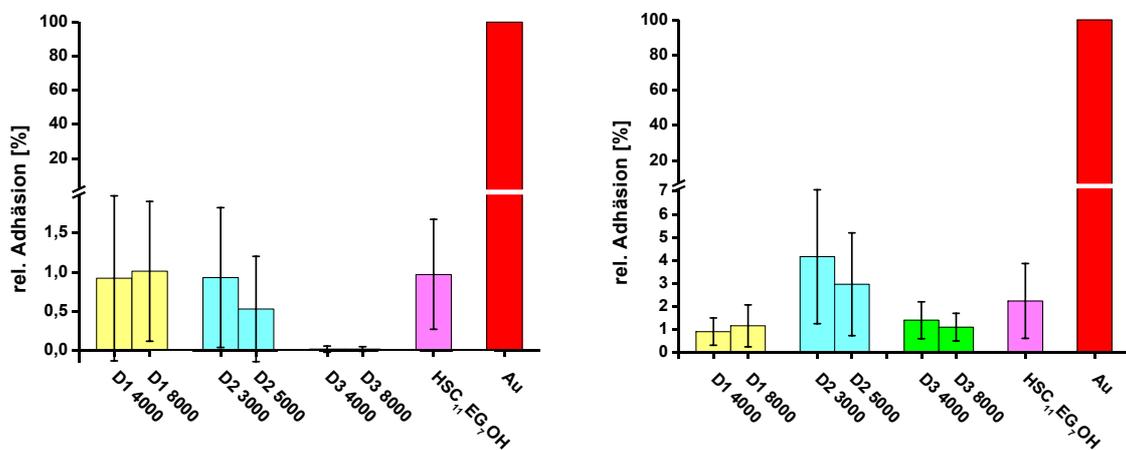


Abb. 87: Vergleich der relativen Adhäsion von *S. epidermidis* zwischen D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs, jeweils durch Epifluoreszenzmikroskopie (links) und Plattenmethode (rechts) ermittelt.

Möglicherweise ist jedoch die Zahl der adhärennten Zellen etwas höher als durch die Epifluoreszenzmikroskopie quantifiziert werden konnte, da bei der Zählung im Pro-

4 Ergebnisse

gramm *imageJ* die Trennung der mikrobiellen Ansammlungen nicht exakt durchgeführt werden konnte.

Wie in den Experimenten mit *E. coli* WT zeigten auch in den Adhäsionsuntersuchungen mit *S. aureus* die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs von allen getesteten Schichten die höchste Wirksamkeit (Tabelle 25, Abb. 88).

Testsubstrat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc)₄₀₀₀	$(4,23 \pm 1,66) \cdot 10^3$	0,64 ± 0,32	99,4 ± 0,3
D2(SAc)₅₀₀₀	$(3,88 \pm 1,85) 10^3$	0,59 ± 0,34	99,4 ± 0,3
D3(SAc)₈₀₀₀	$(1,00 \pm 0,38) 10^4$	1,52 ± 0,76	98,5 ± 0,7
EG₇OH	$(6,12 \pm 3,58) 10^3$	0,93 ± 0,62	99,1 ± 0,6
Au	$(6,57 \pm 2,13) 10^5$	100	0

Tabelle 25: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs gegenüber *S. aureus* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

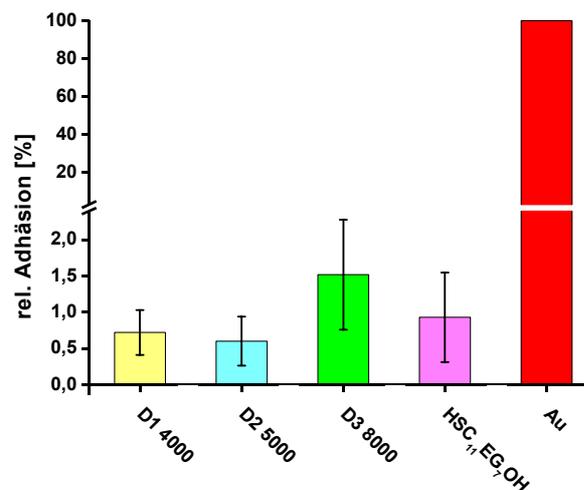


Abb. 88: Vergleich der relativen Adhäsion von *S. aureus* auf D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs (ermittelt durch Epifluoreszenzmikroskopie).

4 Ergebnisse

Mit nur 0,59% relativer Adhäsion übertrifft die Bakterienrepulsion der **D2(SAc)**-SAMs Schichten das abweisende Potenzial der etablierten EG₇OH-SAMs deutlich. Die Werte in Tabelle 25 lassen erkennen, dass die hier untersuchten **D1(SAc)**-SAMs ebenfalls eine deutliche Reduktion der Bakterienadhäsion bewirken. Der repulsive Effekt war in etwa mit dem der **D2(SAc)**-SAMs vergleichbar. Die **D1(SAc)₄₀₀₀**-SAMs verminderten die Adhäsion von *S. aureus* um 99,3%. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die PG-Kopfgruppen im Vergleich zur EG-Kopfgruppe eine stärkere Repulsivität aufwiesen.

Der abweisende Effekt gegenüber *S. aureus* war mit 98,5% verminderter Adhäsion gegenüber der unbehandelten Probe auch bei den **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs sehr stark ausgeprägt.

Anhand des Haftvermögens auf Gold kann festgestellt werden, dass es sich auch bei *S. aureus* um einen moderat adhärenenten Keim handelt.

Stellt man die Ergebnisse der drei Testkeime *E. coli*, *S. epidermidis*, und *S. aureus* gegenüber, wird klar, dass die PG-Kopfgruppe eine starke Verminderung der Adhäsionsfähigkeit dieser Keime bewirkte und dass, gemessen an den Unterschieden zwischen den verschiedenen Stämmen, die Variation in der Repulsion eher untergeordnet war. Diese Aussage erlaubt allerdings nicht die Annahme, dass es für alle Mikroorganismen einen allgemein gültigen Adhäsionsmechanismus geben kann. Bezieht man in diese Betrachtung die Ergebnisse der Adhäsion von *P. aeruginosa* mit ein (Abb. 89, Tabelle 26), kann man allgemein feststellen, dass die Resistenz einer Monoschicht gegenüber einem Testkeim keine Aussagen über die Repulsivität derselben Schicht gegenüber anderen Bakterienarten zulässt.

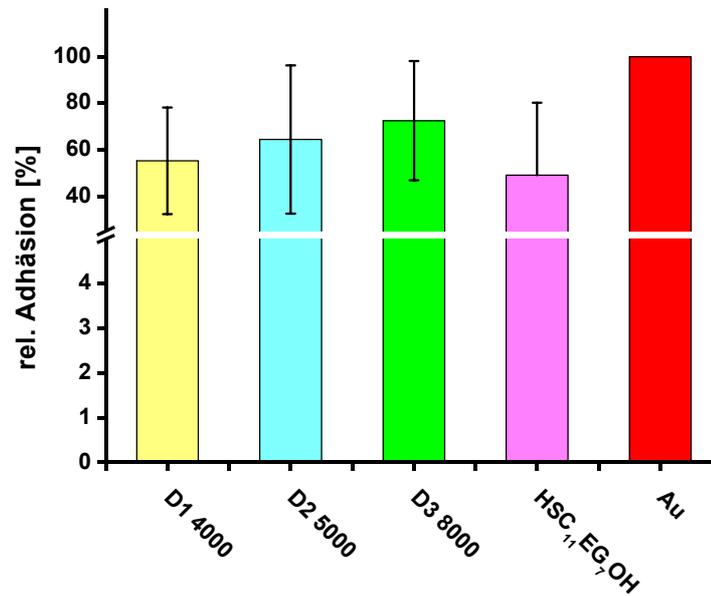


Abb. 89: Vergleich der relativen Adhäsion von *P. aeruginosa* auf D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs (ermittelt durch Epifluoreszenzmikroskopie).

Gegenüber *P. aeruginosa* wurde eine deutlich geringe Wirksamkeit der untersuchten **D(SAc)**-SAMs festgestellt. Tabelle 26 verdeutlicht, dass die **D1(SAc)₄₀₀₀**- und **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs ein ähnliches Inhibierungspotenzial aufwiesen, während die **D3(SAc)₈₀₀₀**-SAMs einen deutlich schwächer ausgeprägten Repulsionseffekt zeigten.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
D1(SAc) ₄₀₀₀	(2,73±0,63)·10 ⁵	55,2±23	44,8±23
D2(SAc) ₅₀₀₀	(2,74±0,89) 10 ⁵	64,4±31,9	35,6±31,9
D3(SAc) ₈₀₀₀	(3,41±0,50) 10 ⁵	72,5±28,3	27,5±28,3
EG ₇ OH	(2,17±1,09) 10 ⁵	49,1±31,2	50,9±31,2
Au	(4,95±1,73) 10 ⁵	100	0

Tabelle 26: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D1(SAc)-, D2(SAc)- und D3(SAc)-SAMs gegenüber *P. aeruginosa* mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Selbst die EG₇OH-SAMs, die in diesem Fall etwas bessere Ergebnisse als die D(SAc)-SAMs brachten, konnten die Adhäsion dieses Keims nicht effizient vermindern. Wie bereits in Abschnitt 4.4.1.4 diskutiert, ist dieses Problem bekannt und symptomatisch für die Wechselwirkung von PEG-Schichten mit *P. aeruginosa*.³⁴³

Es wird von einer Abhängigkeit der Adhäsion von *P. aeruginosa* von der Oberflächenrauigkeit berichtet.³⁶³ Um die Bedeutung dieses Parameters für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse herauszufinden, wurden die Goldoberflächen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie auf ihre Rauigkeit untersucht (Abb. 90).

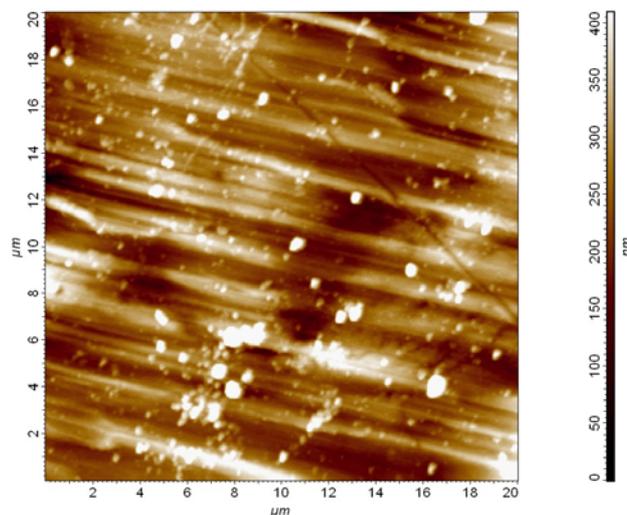


Abb. 90: 20x20 µm rasterkraftmikroskopische Abbildung einer Goldoberfläche auf Stahl.

4 Ergebnisse

Die mittlere quadratische Standardabweichung der Rauigkeit, die so genannte RMS-Rauigkeit auf dem Stahl erzeugten Goldoberfläche betrug lokal auf 20x20 µm Abtastfläche 26,12 nm. Der hohe Rauigkeitswert kann bereits ausreichend sein, um die Bakterienadhäsionsprozesse zu beeinflussen. Allerdings erlaubt der RMS-Rauigkeitswert keinerlei Quantifizierung dieser Aussage.

Roosjen et al. beobachteten auf PEO *brushes* eine deutlich stärkere Adhäsion von *P. aeruginosa* als von *S. epidermidis*.³⁶⁴ In einer weiteren Adhäsionsuntersuchung von sechs *P. aeruginosa* Stämmen auf PEG Polymerschicht wurde gefunden, dass die Hydrophobizität der Zelloberfläche und die Freisetzung von oberflächenaktiven Stoffen hauptsächlich für die Adhäsion dieser Keime auf PEG-Schichten verantwortlich sein scheinen.³⁶⁵

Im Bezug auf die stark ausgeprägte Adhäsionsfähigkeit von *P. aeruginosa* gegenüber den Testsubstraten ist die Rolle von PBS als Adhäsionsmedium auch von Interesse. Die Anwesenheit anorganischer Phosphate wird als entscheidender Umweltfaktor bei der initialen Adhäsion und der Biofilmbildung von Pseudomonaden betrachtet. Ein hochkonzentriertes phosphathaltiges Medium scheint erforderlich für ihre Biofilmbildung zu sein.³⁶⁶ Allerdings wäre nicht richtig, die Anwesenheit anorganischer Phosphate als alleinige Ursache für die gezeigte Adhäsionsfähigkeit dieses Keims anzusehen.

Bei der Organisation von *Pseudomonaden*-Biofilmen wird außerdem den multivalenten Wechselwirkungen der Lektine mit Polysacchariden eine besondere Rolle zugesprochen. Lektine sind spezifisch an Kohlenhydrate bindende Proteine, die weit verbreitet in der Pflanzen-, Mikroorganismen- und Tierwelt sind. Sie sind in vielen Erkennungsprozessen beteiligt. Beispielsweise erfolgt die Zellerkennung bei uropathogenen *E. coli*-Infektionen über das Mannose-spezifische Lektin FimH, welches bei der spezifischen Adhäsion von *E. coli* als Andockprotein agiert (vgl. Abschnitt 1.3.5.4). Es wird berichtet, dass *P. aeruginosa* zwei Lektine produziert, die eng mit den Virulenzfaktoren PA-IL und PA-IIL verbunden sind und an galaktose- und fukose/mannose-haltige Glykokonjugate binden. Diesen wird eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und der Biofilmbildung auf biotischen und abiotischen Oberflächen zugeschrieben.^{367,368}

Sollte *P. aeruginosa* tatsächlich in der Lage sein, die Monoschicht abzubauen, würde dies zur Entstehung von Unregelmässigkeiten auf der sonst glatten SAM-Oberfläche führen. Diese Tatsache würde ihrerseits die Besiedlung des Materials durch *P.*

4 Ergebnisse

aeruginosa fördern. Diese Hypothesen müssten allerdings in Experimenten verifiziert werden.

Wie im Abschnitt 1.3.5.5 bereits erwähnt, werden bei der Adhäsion von *P. aeruginosa* multiple Pfade vermutet, die eingeschlagen werden können. Unter diesen Voraussetzungen ist anzunehmen, dass dieser Keim in der Lage wäre, im Verlauf einer Langzeitexposition, beispielsweise 24 h, jede Oberfläche zu besiedeln.

Damit zeigt *P. aeruginosa* PAO unter den getesteten Mikroorganismen das effizienteste Adhäsionsverhalten auf allen Testoberflächen und kann als stark adhärent eingestuft werden.

4.5 SPR-spektroskopische Untersuchung der Bakterienadhäsion

Auch wenn das Hauptanwendungsgebiet der SPR-Spektroskopie die Untersuchung von Proteinadsorption an funktionalisierten Materialien ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Einsatzmöglichkeit der Methode zur Untersuchung von Bakterienadhäsion überprüft. Zusätzlich war von Interesse, ob sich die Ergebnisse der Plattenzählmethode und Epifluoreszenzmikroskopie durch SPR-Untersuchungen reproduzieren lassen.

Zur Durchführung oberflächenplasmonresonanzspektroskopischer Messungen wurde das im Arbeitskreis vorhandene SPR-System verwendet.

Abb. 91 zeigt eine schematische Darstellung des Messaufbaus, der für die Messungen verwendet wurde.

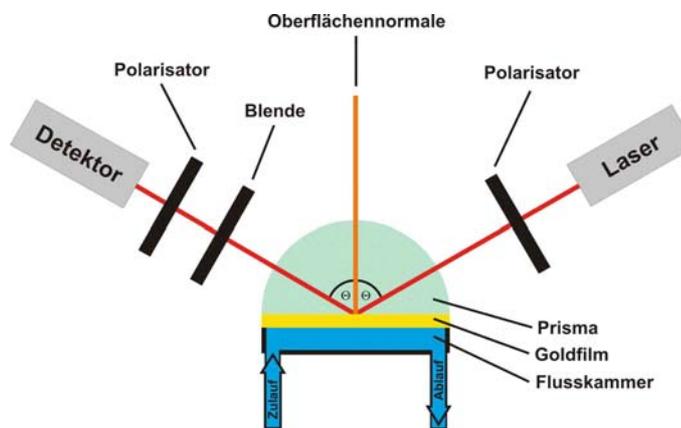


Abb. 91: SPR-Messaufbau.

Die Flusszelle, durch die der Puffer und die Bakteriensuspension geleitet wurden, wurde auf dem Goldsubstrat befestigt. Durch ein Goniometer konnten Laser und Detektor bewegt und der Einfallswinkel variiert werden. Nach der Aufnahme der Reflektivitätskurven wurden die Adsorptionskurven bei konstantem Einfallswinkel in der Nähe des Reflexionsminimums aufgenommen.

Für die Ermittlung der Resonanzwinkel wurde die Flusszelle mit PBS befüllt und der Resonanzwinkel gemessen (Abb. 92). Anschließend wurde bei einem Einfallswinkel, der um $0,5^\circ$ niedriger lag als Reflexivitätsminimum, der Adsorptionsprozess der

4 Ergebnisse

Bakterien auf dem Substrat verfolgt, indem die Intensität des reflektierenden Lichts gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abb. 93).

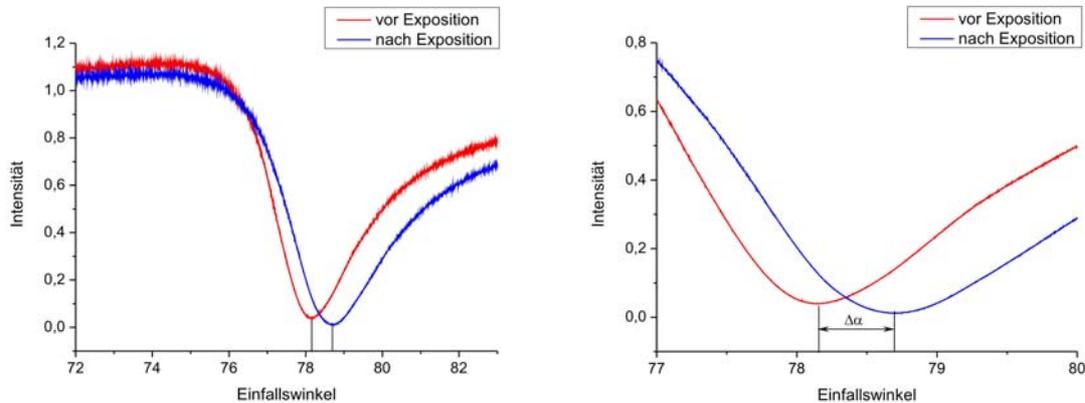


Abb. 92: Verschiebung des Resonanzwinkels.

Das Adsorptionsgleichgewicht war erreicht, wenn die Intensität einen konstanten zeitlichen Verlauf zeigte. Dann wurde wieder PBS durch die Flusszelle geleitet, um locker gebundene Mikroorganismen zu entfernen und der Resonanzwinkel erneut gemessen (Abb. 92).

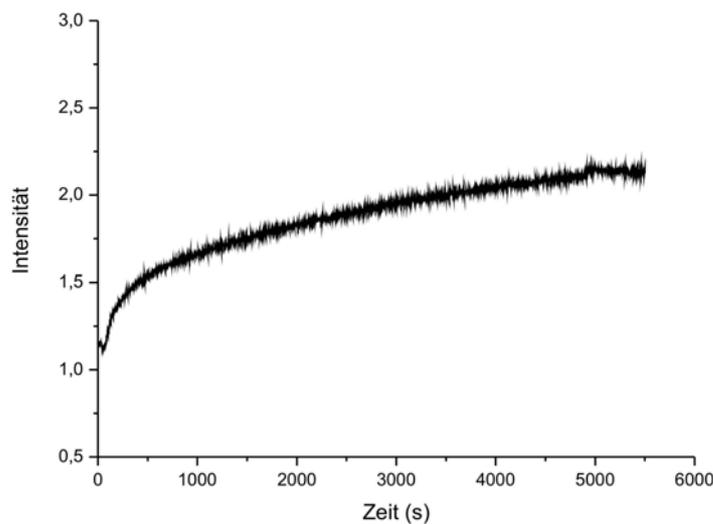


Abb. 93: SPR-Sensogram der *E. coli* WT-Adhäsionsexperiments auf einer Goldoberfläche.

Da es kein etabliertes Messprotokoll gab, wurde versucht, die Messung zu optimieren. Hierzu wurden im Verlauf der ersten Messungen mit dem Stamm *E. coli* WT

4 Ergebnisse

Parameter, wie die physiologische Phase der Bakterien, die Flussgeschwindigkeit der Suspension beim Adhäsionsschritt und die Expositionszeit variiert. Die in Tabelle 27 aufgeführten Werte für $\Delta\Theta$ entsprechen der adhäsionsbedingten Verschiebung des resonanten Einfallswinkels. Die höchsten Verschiebungen wurden bei Messungen über Nacht (Messungen 6, 10 und 13) beobachtet.

Durchgeführte Messung	$\Delta\Theta$ [°]	OD ₅₅₀	Konzentration [CFU/mL]	Messdauer [Min]	Flussgeschwindigkeit [mL/h]
1	(298±9) 10 ⁻³	0,3	0,04·10 ⁹	80	5
2	(309±5) 10 ⁻³	0,4	0,12·10 ⁹	80	5
3	(211±30) 10 ⁻³	1,0	0,52·10 ⁹	80	0,3
4	(460±4) 10 ⁻³	1,0	0,9·10 ⁹	100	5
5	(286±8) 10 ⁻³	1,0	1,1·10 ⁹	120	5
6	(1281±4) 10 ⁻³	1,0	0,8·10 ⁹	1080	1
7	(308±60) 10 ⁻³	1,1	1,2·10 ⁹	80	5
8	(292±20) 10 ⁻³	1,5	1,1·10 ⁹	80	5
9	(259±8) 10 ⁻³	1,7	1,2·10 ⁹	75	10
10	(803±7) 10 ⁻³	1,7	1,2·10 ⁹	900	3
11	(402±30) 10 ⁻³	2,3	4,8·10 ⁹	80	5
12	(470±3) 10 ⁻³	4	1,8·10 ⁹	60	5
13	(816±3) 10 ⁻³	4	1,8·10 ⁹	1080	1

Tabelle 27: Experimente zur Optimierung der SPR-Messung von *E. coli* WT-Adhäsion auf Gold.

Während alle über Nacht durchgeführte Messungen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Werte für $\Delta\Theta$ führten (Messungen 6, 10 und 13, Tabelle 27), zeigten die Messungen mit einer Expositionszeit von 100 bzw. 120 Minuten (Messungen 3 und 4, Tabelle 27) keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Messdauer und der Änderung des Resonanzwinkels. Es wurde festgestellt, dass nach dem Ablauf von 80 min im SPR-Sensogramm eine konstante Intensität erreicht wurde (Abb. 93).

4 Ergebnisse

Diese Zeit wurde als ausreichend für die Beobachtung von primärer Adhäsion betrachtet und als Messdauer für die späteren Untersuchungen gewählt.

Der Vergleich der Flussgeschwindigkeiten hat ergeben, dass 5 mL/h zu den höchsten Resonanzwinkelverschiebungen führten und daher in den Experimenten verwendet wurde.

Die Messungen 11 und 12 legen nahe, dass auch die Bakterien aus der späten stationären Wachstumsphase in der Lage sind zu adhären. Diese Ergebnisse weisen zusätzlich darauf hin, dass bei einer Messdauer von 60 Minuten die Adhäsion der Bakterien mit $OD_{550} = 4$ zu größeren Werten für $\Delta\theta$ führte als die Adhäsion der Zellen mit einer $OD_{550} = 2,3$ und bei einer Messdauer von 80 Minuten. Allerdings handelte es sich hier um einzelne Messungen, die keine allgemein gültigen Aussagen erlauben. Auch in der Literatur wurde die SPR-Messung mit Übernachtskulturen beschrieben.³³⁶

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde allerdings eine Wachstumsphase, die mit der $OD_{550} = 1$ korrelierte, verwendet, da in dieser Phase eine höhere Homogenität der Kultur im Adhäsionsverhalten angenommen werden konnte, als in der Übernachtskultur.³⁴⁰

Tabelle 28 gibt einen Überblick über die Parameter, die für die SPR-Messung der Adhäsion von *E. coli* WT festgelegt wurden.

Physiologische Phase	Messdauer	Flussgeschwindigkeit
$OD_{550} = 1$	80 min	5 mL/h

Tabelle 28: Gewählte Messparameter für die SPR-Untersuchung der Adhäsion von *E. coli* WT.

Als Nächstes wurden die modifizierten Goldoberflächen mittels SPR-Messung hinsichtlich ihrer Biorepulsivität untersucht. Neben den Ethylenglykol- und Polyglycerolterminierten Monoschichten wurden in einzelnen Experimenten auch Dodecanthiolat- und Heneicosafuordodecanthiolat-SAM eingesetzt.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	$\Delta\theta$ [°]	Konzentration [CFU/mL]	Relative Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	$(-4 \pm 10) \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	-1 ± 3	100
C ₁₂ H ₂₅ S-SAM	$(172 \pm 80) \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	56 ± 27	44 ± 27
C ₁₂ F ₂₁ H ₄ S-SAM	$(423 \pm 120) \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	137 ± 46	-37 ± 46
D1(SAc) ₇₀₀₀	$(-19 \pm 20) \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	-6 ± 6	100
D1(SAc) ₃₀₀₀	$(4 \pm 6) \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	1 ± 2	99 ± 2

Tabelle 29: SPR-spektroskopische Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-, D1(SAc)-, Dodecanthiolat- und Heneicosafuordodecanthiolat-SAMs gegenüber *E. coli* WT.

Wie erwartet, zeigten sich die EG₇OH-terminierten SAMs resistent gegenüber der Adhäsion von *E. coli* WT (Tabelle 29). Diese Beobachtung stimmte mit dem Ergebnis von 99,5% Biorepulsivität, ermittelt durch Plattenzählmethode überein. Die Resonanzwinkelverschiebung betrug durchschnittlich $-0,004^\circ$. Der negative Wert weist darauf hin, dass während der Adhäsion bei den Schichten eine geringfügige Desorption von vermutlich physisorbierten Material aufgetreten ist. Auch bei den beiden Vertretern der D1(SAc)-Klasse wurde vollständige Biorepulsivität beobachtet.

Mit dem Einsatz von Dodecanthiol und Heneicosafuordodecanthiol als schichtbildende Moleküle konnte durch SPR-Untersuchungen ein Einfluß der Hydrophobizität auf die Bakterienadhäsion nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Bakterienadhäsion gilt das wissenschaftliche Interesse perfluorierten Beschichtungen für ihr Potenzial, bakterielle Besiedlung zu verhindern. In AFM- und SEM-Untersuchungen zeigten sich die Fluoralkylsilan-Beschichtungen auf SiO₂ resistent gegenüber der Adhäsion von *E. coli*.⁸⁰ Während Dodecanthiolat-SAMs mit 44%iger Biorepulsivität eine im Vergleich zur Goldreferenz verminderte Adhäsion bewirkten, schienen die Heneicosafuordodecanthiolat-SAMs die Adhäsion von *E. coli* WT zu begünstigen. Es wurde eine Resonanzwinkelverschiebung von $0,423^\circ$ gemessen, was einer Förderung der Adhäsion verglichen mit der Goldreferenz um 37% entsprach. Dieses Ergebnis stimmte also nicht mit der Erwartung überein, dass die Heneicosafuordodecanthiolat-SAMs aufgrund der Hydrophobisierung wirksamer die Adhäsion von *E. coli* WT verhindern würden als Dodecanthiolat-SAMs.

4 Ergebnisse

Als Nächstes wurde der Adhäsionsvorgang von *E. coli* MIII auf unmodifiziertem Gold sowie EG₇OH- und PG-terminierten-SAMS der Klasse **D1(SAc)** mit Hilfe der SPR-Spektroskopie beobachtet. Bei *E. coli* MIII handelte sich um einen Stamm, der keine Pilis produziert, aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Heisig. Da Pilis eine wichtige Rolle beim Adhäsionsvorgang und der Biofilmbildung zugeschrieben wird (vgl. Abschnitt 1.3.5.4), war es von Interesse zu klären, ob beim Fehlen von Pilis tatsächlich eine verminderte Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp beobachtet werden konnte.

Testsubstrat	$\Delta\theta$ [°]	Konzentration [CFU/mL]	Relative Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
EG ₇ OH	$(-9\pm 1) \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^9$	-2 ± 1	100
D1(SAc)₃₀₀₀	$(-6\pm 20) \cdot 10^{-3}$	$1,28 \cdot 10^9$	-1 ± 4	100
Au	$(552\pm 5) \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^9$	100	0

Tabelle 30: SPR-spektroskopische Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-terminierten und D1(SAc)-SAMS gegenüber der Adhäsion von *E. coli* MIII.

Tabelle 30 macht deutlich, dass dieser Stamm auch ohne Pilis in der Lage ist, auf unmodifiziertem Gold zu adhären. Die Resonanzwinkerverschiebung von $0,552^\circ$ liegt im Bereich der Winkerverschiebung, die auch für den *E. coli* Wildtyp gemessen wurde. Das hier beobachtete gleiche Adhäsionsverhalten von diesen beiden *E. coli*-Stämmen lässt vermuten, dass Pilis bei der primären Adhäsion nicht zwingend notwendig sind. Allerdings bedarf diese Vermutung einer systematischen Untersuchung. Bei der Adhäsionsuntersuchung von *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe von SPR wurden allerdings umgekehrte Hinweise gefunden.³³⁶ In dieser Untersuchung adhärierte *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp stärker als hyperpilisierte Mutanten, die während der Adhäsion Piliproduktion nicht herunterregulieren und die, die keine Pilis produzieren konnten. Zusätzlich wurde im Adhäsionsverhalten beider Mutanten ein Unterschied beobachtet, was die Interpretation zulässt, dass die Fähigkeit nach der erfolgten Adhäsion die Piliproduktion herunterzuregulieren entscheidender für die Adhäsion ist, als permanente Pilipräsenz.

Bei den EG₇OH- und **D1(SAc)₃₀₀₀** kam es während der Messung zur Desorption von vermutlich noch physisorbiertem Material, was die negativen Messwerte in beiden

4 Ergebnisse

Fällen erklärt. Ähnlich wie bei *E. coli* Wildtyp wurde auch bei *E. coli* MIII eine 100%ige Biorepulsivität dieser Monoschichten beobachtet.

Neben diesen beiden Testkeimen wurden SPR-Messungen zur Beobachtung der Adhäsionsvorgänge von *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Dieser Organismus zeigte sich in den vorherigen Adhäsionstests als stark adhärent nicht nur auf unmodifiziertem Gold, sondern auch auf den EG₇OH- und PG-terminierten-SAMs. Daher war von Interesse, ob sich das mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie ermittelte Adhäsionsverhalten auch in oberflächenplasmonresonanzspektroskopischen Messungen bestätigen ließ. Dafür wurde *P. aeruginosa* bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 1 gezüchtet und präpariert, wie bei den Untersuchungen der Adhäsion mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie (vgl. Abschnitt 6.17). Die Konzentration der Bakteriensuspension betrug 1·10⁹ CFU/mL. Als Adhäsionsmedium diente PBS (pH = 7,4).

Tabelle 31 fasst die Ergebnisse der SPR-Messungen der Adhäsion von *P. aeruginosa* zusammen.

Testsubstrat	$\Delta\theta$ [°]	Konzentration [CFU/mL]	Relative Adhäsion	Reduzierung der Bioadhäsion
EG ₇ OH	(132±5) 10 ⁻³	1·10 ⁹	24±1	76±1
D1(SAc) ₃₀₀₀	(149±190) 10 ⁻³	1·10 ⁹	33±42	67±42
Au	(553±5) 10 ⁻³	1·10 ⁹	100	0

Tabelle 31: SPR-spektroskopische Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-terminierten und D1(SAc)-SAMs gegenüber *P. aeruginosa*.

Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass die EG₇OH-terminierten und die D1(SAc)₃₀₀₀-SAMs, anders als bei der Adhäsion von *E. coli* WT, keine vollständige Biorepulsivität aufwiesen. Die Resonanzwinkerverschiebungen zeigten hier positive und deutlich höhere Werte. Verglichen mit unmodifiziertem Gold wurde bei den EG₇OH-SAMs aber trotzdem eine 76%ige und bei D1(SAc)₃₀₀₀-SAMs eine 67%ige Reduzierung der Adhäsion beobachtet. Die Quantifizierung der Adhäsion von *P. aeruginosa* mit Hilfe von Epifluoreszenzmikroskopie und *ImageJ* hat allerdings für die ethylenglycolterminierte SAMs eine 42%ige und die SAMs der D1(SAc)-Klasse eine

4 Ergebnisse

27%ige Biorepulsivität ergeben (vgl. Abschnitt 4.4.1.4). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass beim Einsatz der Epifluoreszenzmikroskopie die Messdauer der Adhäsionsuntersuchungen 3 h betrug, während 1 h als optimale Messdauer für die SPR-Untersuchung ermittelt wurde.

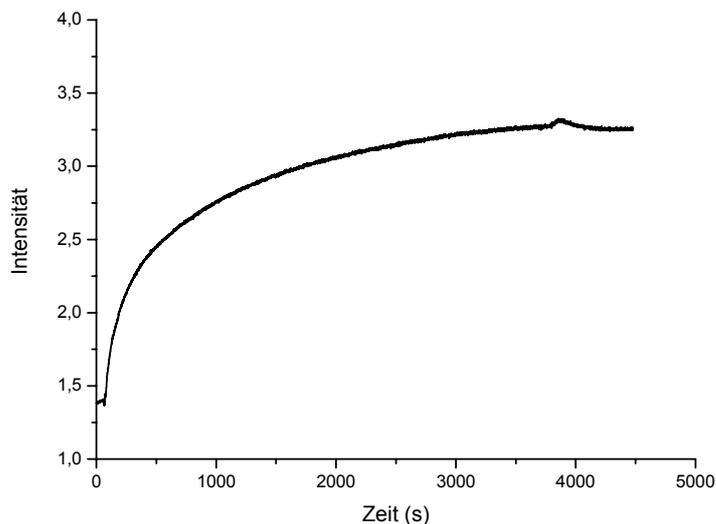


Abb. 94: Ermittlung der Messdauer für die Adhäsion von *P. aeruginosa*.

Abb. 94 ist zu entnehmen, dass bereits nach 60 Minuten der Messung eine konstante Intensität zu beobachten war. Daher wurde angenommen, dass diese Zeit ausreichend für die Messung war. Das Ergebnis der SPR-Messung der Adhäsion von *P. aeruginosa* weist darauf hin, dass bei der Untersuchung mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie möglicherweise nicht ausschließlich die primäre Adhäsion gemessen wurde. Trotz dieser Differenz kann festgestellt werden, dass die SPR-Messung eine gleiche Tendenz des Biorepulsivitätspotenzials für beide Monoschichten wiedergibt wie Epifluoreszenzmikroskopie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die diskutierten Ergebnisse aus den SPR-Messungen nur qualitative Aussagen über die Adhäsionsvorgänge darstellen. Im Gegensatz zu Plattenzählmethode oder Epifluoreszenzmikroskopie ist die Ermittlung der CFU/cm² durch die Resonanzwinkelverschiebung nicht möglich. Der Hauptgrund hierfür ist, dass der Brechungsindex für Bakterien nicht zuverlässig bestimmt werden kann. Es ist nur Vergleich der relativen Adhäsion möglich.

4 Ergebnisse

Um die in den Experimenten ermittelten $\Delta\Theta$ einer Anzahl adhärierter Bakterien zuordnen zu können, wurde eine experimentelle Kalibrierung mit Fluoreszenzmarkierung versucht. Hierfür wurden die Testsubstrate nach dem SPR-Experiment mit *E. coli* WT mit DAPI-Lösung behandelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die ermittelten CFU/cm²-Werte wurden dann gegen die Resonanzwinkelverschiebung aufgetragen. Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Resonanzwinkelverschiebung $\Delta\Theta$ und der Bakterienzahl pro Fläche angenommen. Durch die Erstellung einer Kalibrierkurve wären praktisch bestimmte Werte für $\Delta\Theta$ direkt einer Bakterienzahl pro Fläche zuzuordnen. Abb. 95 zeigt den gefundenen Zusammenhang zwischen der Resonanzwinkelverschiebung und CFU/cm² exemplarisch für unmodifiziertes Gold.

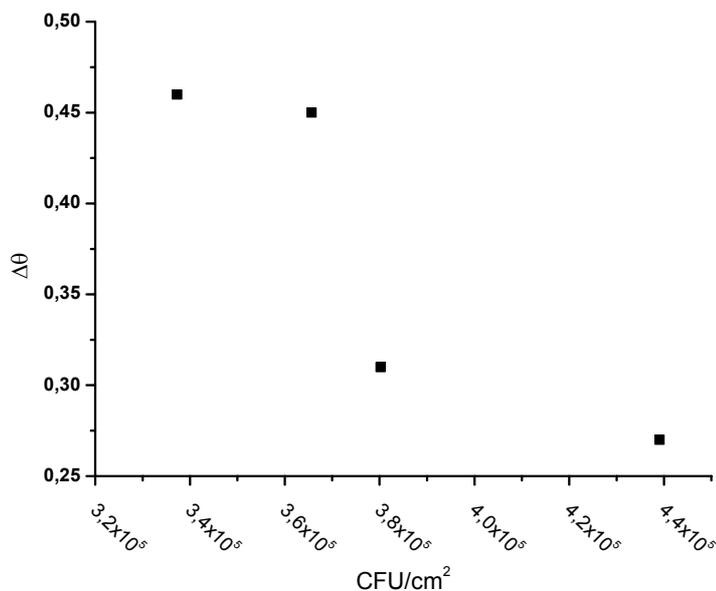


Abb. 95: Gefundener Zusammenhang zwischen Bakterienzahl und $\Delta\Theta$.

Anders als erwartet, wird hier eine Abnahme der Zellzahl pro Fläche mit der wachsenden Resonanzwinkelverschiebung beobachtet. Daher scheint $\Delta\Theta$ maßgeblich von mindestens einer anderen Größe bestimmt zu werden. Ebenso ließe sich vermuten, dass statt der Bakterien primär extrazelluläre Proteine detektiert wurden, die sich mit dieser flächen-integrierenden Methode nicht unterscheiden lassen. Als mögliche Ursache wäre eine verzögerte Untersuchung die Proben aufgrund eines Funktionsfehlers am Epifluoreszenzmikroskop zu nennen. Daher muss dieses Ergebnis kritisch

betrachtet werden. Der genaue Grund für diese Beobachtung konnte allerdings nicht geklärt werden. Auf eine weitere Untersuchung des Sachverhaltes wurde verzichtet.

Zusammenfassend für SPR als Methode zur Untersuchung von Bakterienadhäsion lassen sich die Vorteile und Nachteile wie folgt zusammenfassen: der große Vorteil der Oberflächenplasmonspektroskopie ist, dass die Beobachtung der Bindungsvorgänge unter Flusssdynamik in Echtzeit möglich ist. Besonders bei der Bakterienadhäsion gewinnt der dynamisch Aspekt, mit der Möglichkeit der Abbildung unterschiedlicher Interaktions-Stadien an Bedeutung. Zusätzlich kann der Einfluß der Flusssgeschwindigkeit auf der Bakterienadhäsion durch die einfache Variierung dieses Parameters studiert werden.

Zu den limitierenden Faktoren dieser Methode zählt, dass die Messung der Bakterienadhäsion zu einer qualitativen Aussage führt. Diese Einschränkung könnte möglicherweise durch die Kombination SPR und *in situ* Fluoreszenzmikroskopie behoben werden. Denkbar wäre eine in das System integrierte Bildverarbeitung, die erlauben würde, ohne Zeitverzögerung Bilder aufzunehmen bzw. auszuwerten.

4.6 Oligoethylenglycol-terminierte Monoschichten auf Stahl und Aluminium

Unedle Metalle, wie Eisen und Aluminium haben eine breite Anwendung in zahlreichen Bereichen der modernen Technologie und der alltäglichen menschlichen Existenz. Stahl gehört zu meisteingesetzten Materialien in der Industrie. Er findet Anwendung als Konstruktionsmaterial in der Industrie, zum Bau von Wasserversorgungssystemen und im Haushalt. Daneben findet Stahl, vor allem rostfreier Edelstahl, eine immer größere Verbreitung in biomedizinischen Anwendungen und Lebensmittelverarbeitungssystemen.

Aluminium ist wegen seines geringen Gewichts ein beliebter Konstruktionswerkstoff. Neben dem Bauwesen besitzt Aluminium eine große Bedeutung in der Produktion von Haushaltsgeräten, Verpackungen und Behältern.

In manchen Anwendungen ist eine unspezifische Wechselwirkung dieser Oberflächen mit Proteinen und Mikroorganismen problematisch. Eine Untersuchung ergab,

4 Ergebnisse

dass die Verbreitung hospitalrelevanter Keime, unter anderem auch der MRSA-Stämme (Methicillin-resistente *Staphylokokkus aureus*), durch den Ersatz von Aluminiumkontaktflächen (z. B. Türklinken und Lichtschalter) durch Kupfer um mehr als ein Drittel reduzieren lässt.³⁶⁹

Die Kontrolle der Wechselwirkung von Mikroorganismen mit Stahloberflächen ist beispielsweise im Wasserverteilungssystem von großer Bedeutung. Üblicherweise wird in diesen Systemen die Phosphatbehandlung zur Unterdrückung der Korrosion angewendet. Allerdings ist diese Praxis hoch kontrovers, da angenommen wird, dass die Phosphate als Nährstoffe dienen und somit das bakterielle Wachstum aufrechterhalten können. Überraschenderweise wird bei dieser Prozedur das Gegenteil beobachtet, nämlich der Rückgang der bakteriellen Kontamination. Das bedeutet, dass die Phosphate für eine bakterielle Entwicklung eine wenig passende Umgebung schaffen³⁷⁰ und so einen schonenden Weg zur Modifizierung der Oberflächen anbieten.

Durch Selbstorganisation können auf oxidischen, technisch relevanten Oberflächen ähnlich wie auf Gold Monoschichten erzeugt werden. Allerdings ist die Zahl der Publikationen über SAMs auf Stahl bis zum heutigen Tag noch sehr niedrig.

Es ist bekannt, dass Alkylphosphonsäuren bei Raumtemperatur auf oxidischen Oberflächen einiger reaktiver Metalle relativ stabile Alkylphosphonat-Monoschichten bilden (vgl. 1.2.3).^{29,70,71} Dabei findet eine Adsorption der Phosphonsäuregruppe auf der oxidischen Oberfläche statt, gefolgt von einer Kondensation der Hydroxylgruppen der Säure mit den Hydroxylgruppen der nativen Oxidschicht des Metalls (Ausbildung von P-O-M-Bindung). In der Literatur werden unterschiedliche Hypothesen hinsichtlich des Mechanismus der chemischen Bindung von Phosphonsäuren an oxidischen Oberflächen diskutiert. Unklarheit herrscht über die Wechselwirkung der schichtbildenden Phosphonsäuren mit der Substratoberfläche. Es wird beispielsweise bei Aluminium von der Anbindung über mindestens ein Sauerstoffatom ausgegangen.³⁷¹ Gleichzeitig beschreiben *Ramsier et al.* drei gleichwertige Bindungen des Phosphitanions mit Aluminium.³⁷² Die Abwesenheit der P=O und P(OH) Banden im IR-Spektrum der Schicht im Gegensatz zu dem des gelösten Moleküls sprechen für die Richtigkeit dieses Modells.

Durch die Wahl der Kopfgruppe bietet sich die Möglichkeit, die Oberfläche beispielsweise mit hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften auszustatten. Es wird von CH₃-, COOH-, OH- und NH₂- Funktionalitäten als terminale Gruppen in Monoschicht-

4 Ergebnisse

ten auf Stahl berichtet.³⁷³ In diesen Systemen wurde jedoch die Carboxylatgruppe als Ankergruppe verwendet.

Für die Erzeugung bakterienabweisender Oberflächen bieten sich PEG oder OEG als terminale Gruppen an. In der Literatur wird berichtet, dass Moleküle mit Phosphonat-Ankergruppe^{374,375} wohldefinierte Phosphonat-SAMs auf Stahl bilden. Der Abstand zwischen den auf divalenten Metallionen adsorbiertem Phosphonat-Ankergruppen beträgt 0,48 nm. Dieser Wert ähnelt dem von 0,499 nm, der für Alkanthiolat-SAMs auf Gold bestimmt wurde.³⁷⁶ Es wird von einer großen Stabilität von Phosphonat-SAMs berichtet. Beispielsweise weist der Reibungskoeffizient von Decylphosphonat-SAMs auf Al nach 700 h keine Änderung auf, während der Reibungskoeffizient von Decanthiolat-SAMs auf Gold sich bereits nach 24 h ändert, was auf einen oxidativen Abbau hinweist.³⁷⁶ Alkylphosphonat-Monoschichten werden üblicherweise aus organischen Lösemitteln abgeschieden. *Tosatti et al.* berichten jedoch von der Bildung von Alkylphosphonat-SAMs auf Titanoxid aus aquatischer Phase. Diese Technik bietet insbesondere bezüglich der Umwelt- und Biokompatibilität große Vorteile.³⁷⁷

Im Rahmen dieser Arbeit wurden OEG-terminierte Moleküle mit Phosphonat- und Thiophosphonat-Ankergruppen bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, bakterienabweisende SAMs auf Stahl und Aluminium zu bilden. Die Kopfgruppen wiesen 6-12 EG-Einheiten auf und besaßen eine mittlere Molmasse von 350 g/mol (Abb. 96).

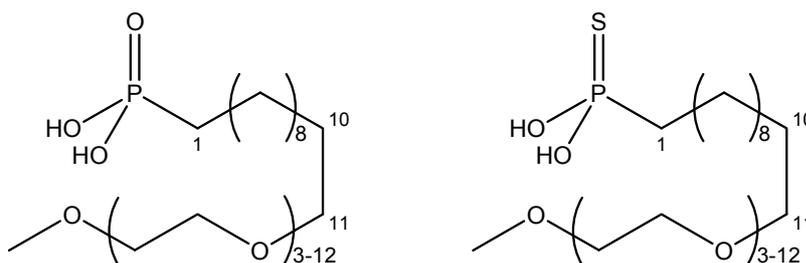


Abb. 96: Polyethylenglycolmonomethylether-terminierte Undecylphosphon- und -thiophosphonsäure.

Außerdem wurde zur Modifikation der oxidischen Testsubstrate eine Polyglycol-terminierte Undecylphosphonsäure (**MeD1(Phospon)**₃₀₀₀) eingesetzt und auf ihr Repulsivitätspotenzial getestet (Abb. 97).

4 Ergebnisse

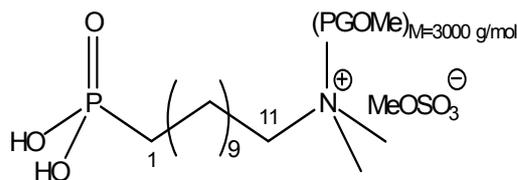


Abb. 97: Polyglycerol-terminierte Undecylphosphonsäure (MeD1(Phosphon)₃₀₀₀).

Zu Beginn erfolgte die Schichtbildung der Phosphonate und Thiophosphonate auf Stahl und Aluminium bei RT und mindestens 14 h Belegungszeit aus 10 mM Lösung der jeweiligen Verbindung in absolutem Ethanol.³⁷⁸ Um eine einheitlichere Schichtbildung zu bewirken, wurde die Belegung später ausschliesslich in THF bei 120 ° C und 18 h Belegungszeit durchgeführt (vgl. Abschnitt 6.10). Obwohl Stahl und Al native Oxidschichten bilden, wurde vor der Beschichtung die Dichte von Hydroxylgruppen zur Anbindung der Phosphonsäuremoleküle durch Behandlung der Testsubstrate mit heißem MeOH erhöht.

Es wurden Polyethylenglycolmonomethylether-terminierte Undecylphosphonat- und Undecylthiophosphonat-Schichten sowie Polyglycerol-terminierte Undecylphosphonat-Schichten auf Stahl- und Aluminiumoberflächen erzeugt.³⁷⁹

Nach der Belegung bei RT waren sowohl auf den modifizierte Stahl- als auch Aluminiumoberflächen Beläge erkennbar, die durch Spülen nicht entfernt werden konnten. Daher war es unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Schichten um Monoschichten handelte. Vielmehr wurden vermutet, dass die Beläge schwerlösliche Alkylphosphonat bzw. -thiophosphonat-Komplexe seien. Eine ähnliche Beobachtung wird in der Literatur für Aluminium beschrieben. Allerdings wird hier bei RT von der Bildung der Alkylphosphonat-Multilagen berichtet, wohingegen eine Belegungstemperatur von ca. 100 °C zur Ausbildung hochgeordneter Monoschichten führt.⁷⁰ Dieser positive Einfluss der Temperatur auf die Schichtbildung konnte im Rahmen dieser Arbeit bei Aluminium ebenfalls beobachtet werden. Äußerlich waren die bei 120 °C erzeugten Phosphonat-Schichten von den unmodifizierten Aluminiumproben ununterscheidbar. Auf den Stahlsubstraten waren unabhängig von der Belegungstemperatur immer Flecken erkennbar. Dies deutet aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Bildung unspezifisch abgeschiedener Multilagen anstatt geordneter Monolagen. Verwunderlich ist, dass die Kontaktwinkel³⁷⁸ der Phosphonat- und Thiophosphonat-schichten auf Stahl im Rahmen des Messfehlers dem Kontaktwinkel methoxyterminierter Oberflächen entsprachen.⁸³ Der Kontaktwinkel der entsprechenden Schichten

4 Ergebnisse

auf Al war hingegen kleiner. Diese Tatsache konnte durch die Entstehung von methoxyterminierten Multilagen und der damit verbundenen Erhöhung der Oberflächenrauigkeit erklärt werden. Daher musste bei den EG-terminierten Phosphonat- und Thiophosphonat-SAMs von einer uneinheitlichen Schichtbildung ausgegangen werden.

Um die Struktur der Schicht näher zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einiger Proben gemacht. Abb. 98 zeigt die REM-Aufnahmen der modifizierten und unmodifizierten Stahloberflächen. Trotz sichtbarer Kratzer weist die Stahloberfläche ein glattes und homogeneres Bild auf, während nach der Schichtbildung eine ungleichmäßig strukturierte Oberfläche entstanden ist. Die Bildung einer Monoschicht konnte somit ausgeschlossen werden, da diese nicht sichtbar gewesen wäre. Es konnte anhand dieser Aufnahmen nicht geklärt werden, ob es zur Bildung einer uneinheitlichen Schicht kommt oder die jeweilige Säure sich in Form einer Multilage als Metallsalz auf den Oberflächen niederschlägt.

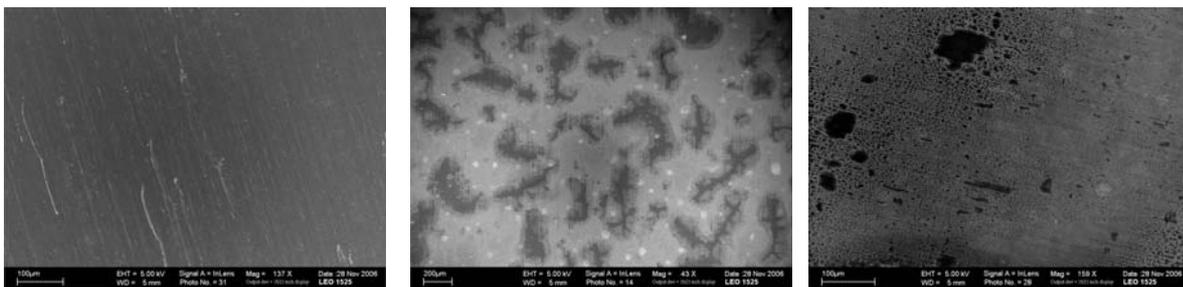


Abb. 98: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Polyethylenglycolmonomethylether-terminierte Stahl (links), sowie Phosphonat- (Mitte) und Thiophosphonatschichten (rechts) auf Stahl.

Die modifizierten Oberflächen sehen auf den REM-Aufnahmen aufgerauter aus. Die Änderung des Erscheinungsbildes der Metalloberflächen nach dem Modifizierungsschritt bedarf weiterer Untersuchungen. Dies war jedoch nicht primärer Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Daher wurden die Schichten trotz der unerwünschten Uneinheitlichkeit auf ihre Fähigkeit, die Adhäsion der Testkeime zu unterdrücken, getestet.

Die Ergebnisse der Bakterienadhäsionsuntersuchungen auf modifizierten Stahl- und Aluminiumoberflächen werden in den folgenden zwei Abschnitten näher erläutert.

4.6.1 Bakterienadhäsionsuntersuchungen der PEGmonomethyl-ether-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium

Die Bestimmung der Biorepulsivität dieser Oberflächen erfolgte wie bei den EG₇-OH- und Dendrimer-SAMs auf Gold durch Bakterienadhäsionstests auf diesen Oberflächen. Hierzu wurden die beschichteten Metalle einer Bakteriensuspension ausgesetzt und anschliessend mit PBS (pH = 7,4) gespült, um die ungebundenen Bakterien zu entfernen. Als Testkeime dienten *E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* PAO. Zur Bestimmung der Anzahl adhärierter Keime (CFU pro cm² Substrat) kamen zwei Auswertungsmethoden, die Plattenzählmethode und Epifluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Allerdings, wie später noch diskutiert wird, konnte die Epifluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung der adhärten Keime nicht angewendet werden.

Als Referenzgröße dienten die Keimzahlen, die nach dem Adhäsionsexperiment auf den unmodifizierten Metallsubstraten detektiert wurden.

4.6.1.1 Adhäsion von *E. coli* WT

In Abb. 99 sind die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen von *E. coli* an den PEG-terminierten phosphonatbeschichteten Metallen zusammengefasst. Diese Schichten scheinen sowohl auf Al- als auch Stahloberflächen die Adhäsion von *E. coli* WT zu reduzieren. Wie Tabelle 32 zusätzlich verdeutlicht, zeigen die PEG-terminierten Schichten auf Stahl etwas mehr Inhibierungspotenzial als die gleichen Schichten auf Al.

4 Ergebnisse

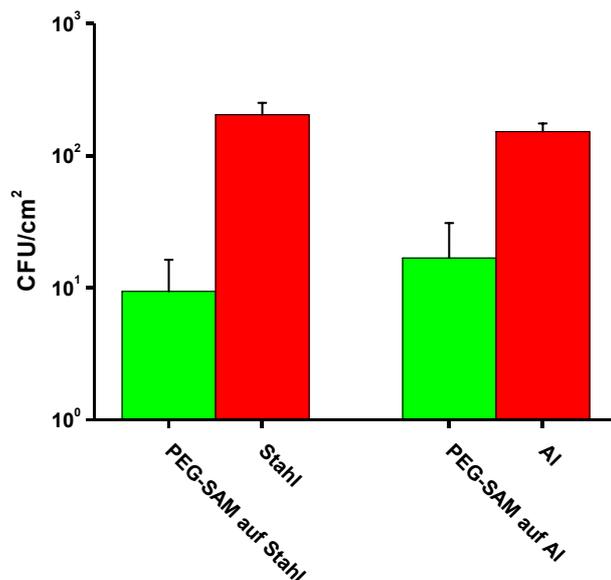


Abb. 99: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PEG-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *E. coli* mittels Plattenmethode.

Mit 9,40 CFU pro cm² weist die Monoschicht auf Stahl eine 95%ige Repulsivität gegenüber *E. coli* WT auf. Für die Monoschichten auf Aluminium wurden 16,8 CFU pro cm² gefunden, was einer ca. 89%igen Reduzierung der relativen Adhäsion entspricht.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG-SAMs auf Stahl	1x10 ⁵	9,40±6,90	4,6±3,6	95,4±3,6
Stahl	1x10 ⁵	(2,04±0,47) 10 ²	100	0
PEG-SAMs auf Al	1x10 ⁵	(1,68±1,41) 10 ¹	11,1±9,4	89,0±9,4
Al	1x10 ⁵	(1,52±0,24) 10 ²	100	0

Tabelle 32: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von PEG-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*).

4 Ergebnisse

Den PEG-terminierten phosphonatbeschichteten Proben zugehörigen Photographien in Abb. 100 und der unbeschichteten Stahlreferenz zugehörigen Photographien in Abb. 101 zeigen die Kolonienbildende Einheiten, die nach der Reaktivierung der adhärirten Keime gefunden wurden. Die inkubierten Träger wurden mit drei - Agarplatten durch Auflegen in Kontakt gebracht. Auf diesen Bildern ist die sehr gute Adhäsionsverminderung bei den PEG-terminierten Phosphonat-SAMs deutlich zu erkennen.

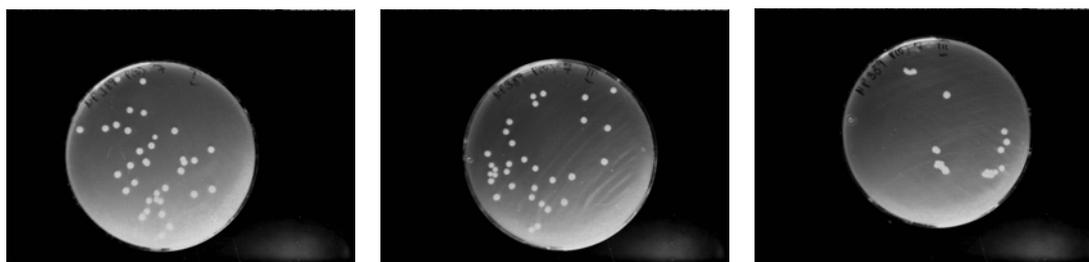


Abb. 100: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärirter *E. coli*-Zellen von einem PEG-terminierten Phosphonat-SAM auf Stahl auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

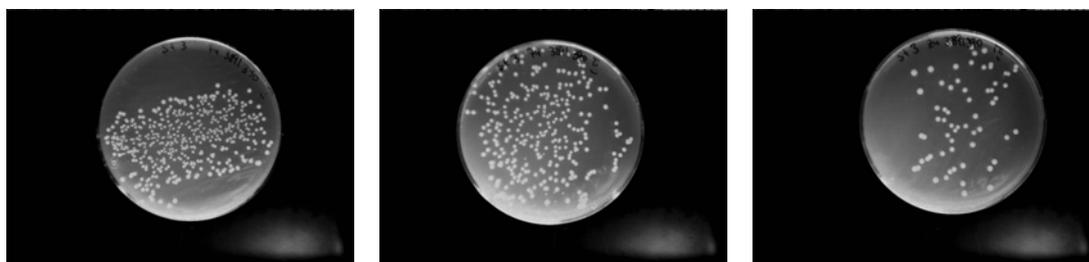


Abb. 101: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärirter *E. coli*-Zellen von einem Stahlträger auf CASO Agar Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Die Keimzahlen, die nach der gleichen Behandlung auf den unbeschichteten Stahl- oder Aluminiumoberflächen gefunden wurden, sind als Referenzgrößen ebenfalls in Tabelle 32 dargestellt. Dabei zeigte sich die Stahloberfläche stärker mit dem Testkeim besiedelt als die Aluminiumoberfläche. Der gefundene Wert von $2,04 \cdot 10^2$ CFU pro cm^2 liegt in der Größenordnung der Keimbesiedlung von Gold ($4,28 \cdot 10^2$ CFU pro cm^2).

Ob die in dieser Untersuchung beobachtete stärkere Besiedlung von Stahloberflächen im Vergleich zu Aluminiumoberflächen auf spezifische Interaktionseffekte bzw.

4 Ergebnisse

eine hohe Affinität von *E. coli* zu Stahl zurückzuführen war, konnte nicht endgültig geklärt werden. Allerdings konnten auch die Schwierigkeiten, die bei dem Entfernen der Al-Proben von der Agaroberfläche auftraten, zur Unterschätzung der Keimzahl auf Al Proben geführt haben. Dieser Arbeitsschritt gestaltete sich sowohl bei den unmodifizierten als auch modifizierten Aluminiumsubstraten schwierig. Die Ablösung der Proben mit dem Saugnapf war offensichtlich wegen der Rauigkeit des Aluminiums nicht optimal und problematischer als bei den Gold- oder Stahlproben. Auch der Ersatz einer Pinzette statt des Saugnapfs verlief nicht reibungslos. Die Mikrostruktur der Al-Oberfläche könnte das Bindungsgefüge der Bakterienadhäsion beeinflusst und daher zur Ablöseschwierigkeiten geführt haben.

Vermutlich verblieb der Großteil der adhärenierten Bakterien auf dem mit dem Substrat abgezogenen Agarfilm ohne detektiert zu werden. Bei den PEG-terminierten Phosphonatschichten auf Al konnten bei einer Testreihe überhaupt keine Keime transferiert werden.

Um mehr über diese Vorgänge zu erfahren und die Ergebnisse zu verifizieren, wurde versucht, die Proben durch Epifluoreszenzmikroskopie zu analysieren. Dabei stellte sich heraus, dass mit DAPI angefärbte *E. coli*- Zellen auf Stahl oder Aluminium deutlich intensiver unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen waren als auf Gold (vgl. Abschnitt 4.3.1.1). Allerdings ergab sich in diesem Fall ein anderes Problem, was eine Quantifizierung der fluoreszierenden Zellen nicht möglich machte. Neben den markierten Zellen fluoreszierte auch der Hintergrund, was darauf hindeutete, dass das Schichtmaterial ebenfalls angefärbt wurde.

Abb. 102 vermittelt einen optischen Eindruck der Fluoreszenzaufnahmen, die wegen des fehlenden Kontrastes zu einer Quantifizierung der adhärenierten Zellen nicht geeignet waren.

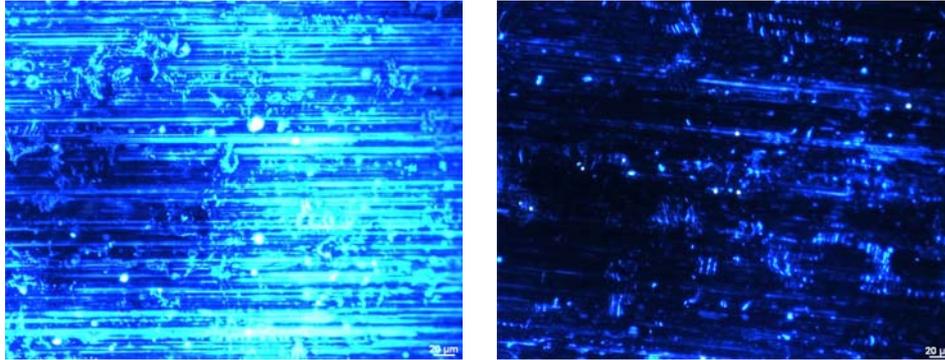


Abb. 102: Mit DAPI angefärbte Blindprobe eines PEG-P(O)(OH)₂-SAMs (links) und *E. coli* WT auf PEG-P(O)(OH)₂-SAM auf Al (rechts).

Die Analyse der Blindproben zeigte, dass diese ebenfalls eine stark diffuse Fluoreszenz aufwiesen. Dieses Ergebnis verstärkte die Vermutung, dass nicht nur die Bakterien, sondern auch die organische Schicht mit DAPI angefärbt wurde. Dies unterstützt die Vermutung, dass sich auf den Substratoberflächen im Modifizierungsschritt Multilagen statt Monoschichten gebildet haben.

Aus dem Bereich der mikrobiellen Ökologie ist bekannt, dass einige organische Partikel oder Polyanionen und sehr stark lichtstreuende Nano- und Mikrostrukturen die mikroskopische Erfassung von Mikroorganismen auf Oberflächen behindern.³⁸⁰ *Allan et al.* haben weiterhin gefunden, dass auch Phosphonate angefärbt werden und fluoreszieren.³⁸¹ Ähnlich wie beim unmodifizierten Gold stellte sich *E. coli* WT auch gegenüber unmodifiziertem Stahl und Aluminium unter den gewählten Versuchsbedingungen als schwach adhärenter Keim dar.

Interessant bezüglich der Wechselwirkung von *E. coli* mit der Stahl- oder Aluminiumoberfläche ist die Beobachtung, dass mehr Keime auf der Oberfläche verbleiben, wenn bei der Zellpräparation bzw. beim Waschschrift Wasser statt NaCl-Lsg. als Waschmedium verwendet wird.³⁴⁵

4.6.1.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Abb. 103 zeigt die Ergebnisse der Adhäsion von *S. epidermidis* auf den PEG-terminierten phosphonat-beschichteten Stahl- und Aluminiumproben. Betrachtet man zusätzlich die in Tabelle 33 zusammengefassten ermittelten Keimzahlen pro Substratfläche, wird deutlich, dass durch die chemische Modifizierung der Oberflächen eine Verminderung der Adhäsion erzielt werden konnte.

4 Ergebnisse

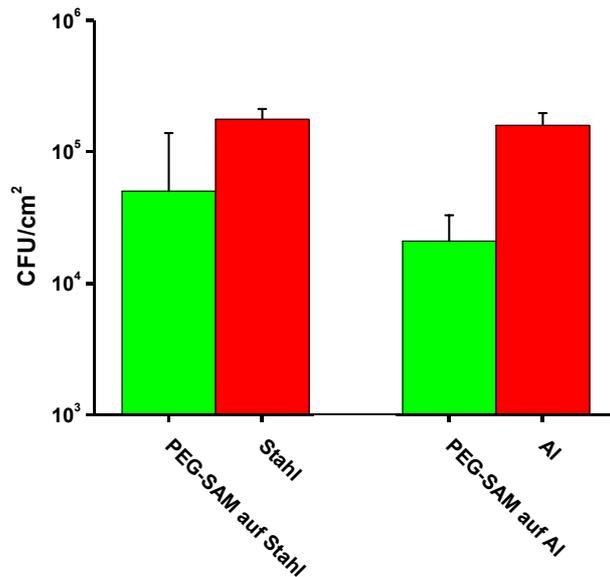


Abb. 103: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PEG-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode.

Mit $1,59 \cdot 10^5$ bzw. $1,76 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 zeigten unmodifizierte Aluminium- und Stahloberflächen eine ähnlich starke Besiedlung. Auf den PEG-terminierten Phosphonatschichten auf Stahl konnten $5,02 \cdot 10^4$ CFU pro cm^2 als Endergebnis ermittelt werden, was einer Adhäsionsreduzierung von ca. 72% entspricht.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG-SAMs auf Stahl	1×10^7	$(5,02 \pm 8,83) \cdot 10^4$	$28,5 \pm 50,5$	$71,5 \pm 50,5$
Stahl	1×10^7	$(1,76 \pm 0,36) \cdot 10^5$	100	0
PEG-SAMs auf Al	1×10^7	$(2,09 \pm 1,20) \cdot 10^4$	$13,1 \pm 8,2$	$86,9 \pm 8,2$
Al	1×10^7	$(1,59 \pm 0,38) \cdot 10^5$	100	0

Tabelle 33: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von PEG-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

4 Ergebnisse

Abb. 104 zeigt zwei CASO Agarplatten aus dem Adhäsionstest zur Prüfung adhäsionsvermindernder Eigenschaften von Phosphonat-beschichteten Oberflächen nach 24 h Inkubation bei 37 ° C. Auf den beiden wurde die gleiche Testsuspension, links unverdünnt und rechts zehnfach verdünnt aufgetragen.

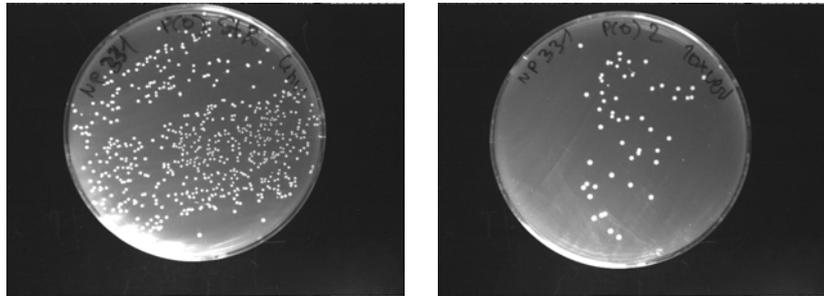


Abb. 104: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *S. epidermidis*-Zellen von einem PEG-terminierten Phosphonat-SAM auf Stahl auf CASO Agar-Festkulturmedium.

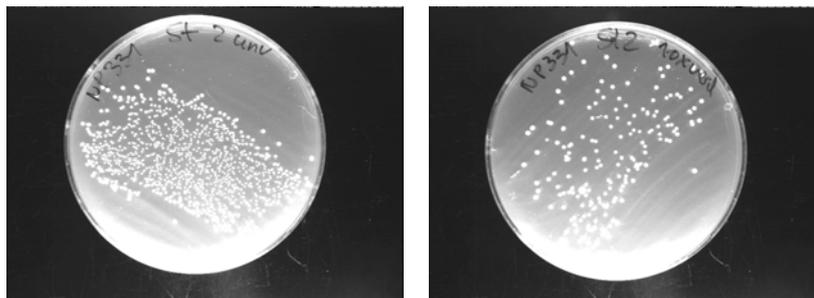


Abb. 105: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *S. epidermidis*-Zellen von einem Stahlträger auf CASO Agar Festkulturmedium.

Auf eine stärkere Besiedlung der Stahlreferenzen deuteten die dazugehörigen - Agarplatten hin (Abb. 105).

Die Modifizierung der Aluminiumoberfläche bewirkte mit circa 87% Verminderung eine stärkere Inhibierung der Adhäsion von *S. epidermidis* als die Funktionalisierung der Stahloberflächen. Die dieser Berechnung zu Grunde liegende Reaktivierung von den inkubierten Trägern abgelöster *Staphylokokken* ergab für das Aluminiumsystem die in Abb. 106 und Abb. 107 dargestellten Bilder.

4 Ergebnisse

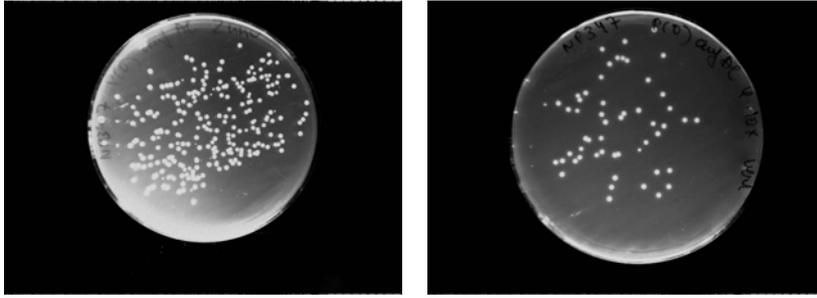


Abb. 106: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S. epidermidis*-Zellen von einem PEG-terminierten Phosphonat-SAM auf Stahl auf CASO Agar-Festkulturmedium.

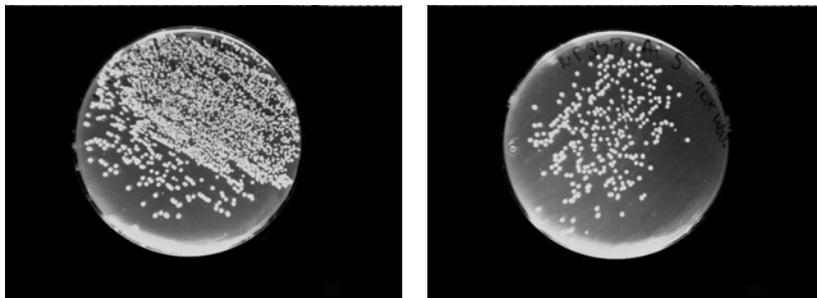


Abb. 107: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S. epidermidis*-Zellen von einem Aluminiumträger auf CASO Agar Festkulturmedium.

Es ist leicht zu erkennen, dass in dem durchgeführten Versuch *S. epidermidis* stärker an den unbehandelten Aluminiumproben adhärierte.

Wie kann der beobachtete Unterschied der gleichen Schichten auf unterschiedlichen Materialien interpretiert werden? Sollten auf den beiden Materialoberflächen qualitativ gleichwertige Schichten entstanden sein, wäre unter den gleichen Versuchsbedingungen kein Unterschied in den bakterienabweisenden Eigenschaften zwischen den beiden zu erwarten.

Die aufgetretene Differenz könnte zum Einen als ein Hinweis auf die schlechtere Schichtbildung auf Stahl gedeutet werden, zum Anderen wäre eine unvollständige Ablösung der *S. epidermidis*-Zellen von der Probenoberfläche durch Ultraschallbehandlung und eine damit verbundene Unterschätzung der Zellzahl denkbar. Möglicherweise sind Bakterien in den Kavitäten der Aluminiumoberfläche verblieben.

Abb. 108 zeigt mit DAPI angefärbte *Staphylokokken* auf Stahl unter dem Epifluoreszenzmikroskop.

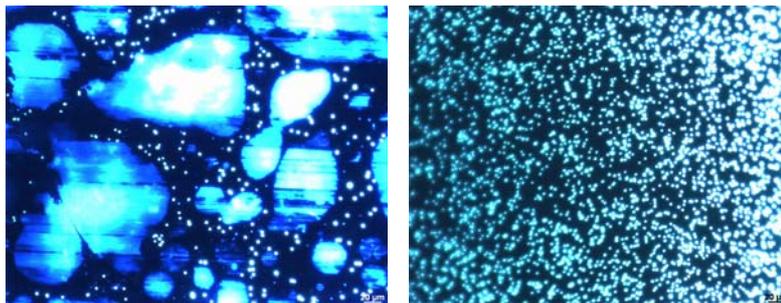


Abb. 108: Mit DAPI angefärbte *S. epidermidis* auf einem PEG-P(O)(OH)₂-SAM auf Stahl (links) und auf einer Stahlprobe (rechts).

Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass ähnlich wie bei *E. coli* die Fluoreszenzmikroskopie als Auswertungsmethode ausscheidet. Allerdings sind auf den Aufnahmen einige fluoreszierende Inseln zu erkennen, die nicht besiedelt sind und den nach der Beschichtung entstandenen Flecken auf den Substraten entsprechen. Diese Beobachtung kann als qualitativer Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Phosphonatschichten eine Biorepulsivität aufwiesen. Dieser Effekt bezogen auf die Gesamtfläche des Substrats war nicht so ausgeprägt, da die Schicht nicht intakt war. Die Fluoreszenzaufnahmen auf Stahl lassen jedoch eine deutlich stärkere Besiedlung als durch die Plattenmethode ermittelt vermuten.

S. epidermidis zeigte gegenüber Stahl und Aluminium eine ähnlich starke Affinität wie gegenüber Gold, auf dem Keimzahlen von $1,61 \cdot 10^5$ CFU pro cm^2 ermittelt wurden.

Die geplante Adhäsionsuntersuchung von *S. aureus* und *P. aeruginosa* auf MeO-PEG-terminierten Phosphonatschichten auf Stahl und Aluminium mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurden wegen der oben diskutierten Probleme nicht mehr durchgeführt.

4.6.2 Bakterienadhäsionsuntersuchungen an den PEGmonomethylether-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium

Für die Bestimmung der Biorepulsivität wurden frisch präparierte, MeOPEG-terminierte Thiophosphonatschichten auf Stahl- und Aluminiumoberflächen einer Bakteriensuspension ausgesetzt und anschliessend mit PBS (pH = 7,4) gespült, um

4 Ergebnisse

ungebundene Bakterien zu entfernen. Das Versuchskonzept für dieses System war ähnlich wie das für das Goldsystem beschriebene. Für die Testkeime *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 sollte die Anzahl adhärierter Keime (CFU pro cm²) durch die klassische Plattenzählmethode bzw. die kultivierungsunabhängige Epifluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Außerdem war vorgesehen, die Adhäsion von *S. aureus* ATCC 6538 und *P. aeruginosa* PAO mittels Epifluoreszenzmikroskopie zu quantifizieren. Wie in den Abschnitten 4.6.1 und 4.6.1.2 bereits diskutiert wurde, war die Fluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung der Adhäsion auf diesen Materialien und Schichten jedoch nicht anwendbar.

Für die Schichtbildung wurden die gereinigten Substrate mit einer Lösung der schichtbildenden Substanz in THF besprüht und 18 h bei 120 ° C im Trockenschrank gelagert. Wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben, waren hier ebenfalls nach der Belegung fleckenartige Ablagerungen entstanden.

4.6.2.1 Adhäsion von *E. coli* WT

Abb. 109 gibt die Verhältnisse der Adhäsion von *E. coli* WT auf PEG-terminierten Thiophosphonatschichten auf Stahl- und Aluminiumoberflächen wieder.

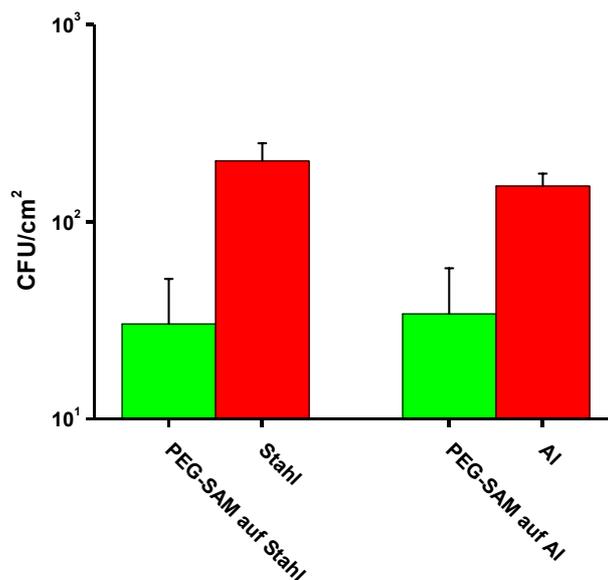


Abb. 109: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PEG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *E. coli* mittels Plattenmethode.

4 Ergebnisse

Auf den ersten Blick erscheint das Adhäsionsverhalten von *E. coli* auf den thiophosphonatbeschichteten Materialien ähnlich dem, das bei den phosphonatbeschichteten Metallen gefunden wurde (vgl. Abschnitt 4.6.1.1). Die nähere Betrachtung der pro Fläche ermittelten Keimzahlen (Tabelle 34) zeigte jedoch in beiden Fällen eine leicht erhöhte Adhäsionstendenz. Trotzdem bewirkten die Thiophosphonatschichten eine Reduzierung der Adhäsion im Vergleich zu unbehandelten Metalloberflächen. Auf Thiophosphonatschichten auf Stahl wurden 30 CFU pro cm² ermittelt, was einer relativen Reduzierung der Adhäsion von 85% entspricht. Mit einer circa 76%igen Reduzierung der Adhäsion wiesen die Thiophosphonatschichten auf Aluminium 34 CFU pro cm² auf.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG-SAMs auf Stahl	1x10 ⁵	(3,04±2,10) 10 ¹	15,0±10,5	85,1±10,5
Stahl	1x10 ⁵	(2,04±0,47) 10 ²	100	0
PEG-SAMs auf Al	1x10 ⁵	(3,42±2,40) 10 ¹	23,0±16,2	78,0±16,2
Al	1x10 ⁵	(1,52±0,24) 10 ²	100	0

Tabelle 34: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PEG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

Die den behandelten und unbehandelten Proben zugehörigen Agarplatten sind für das Stahlsystem in Abb. 110 und Abb. 111 und für das Aluminiumsystem in Abb. 112 und Abb. 113 dargestellt.

4 Ergebnisse

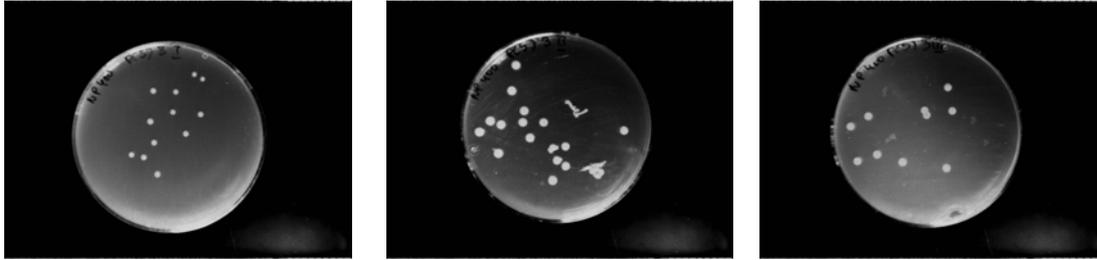


Abb. 110: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *E. coli*-Zellen von einem PEG-terminierten Thiophosphonat-SAM auf Stahl auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Auf den ersten Blick ist die Adhäsionsverminderung durch die Funktionalisierung der Oberflächen sichtbar. In den hier durchgeführten Versuchen zeigten sich die thiophosphonatbeschichteten Stahlträger wirksamer bei der Adhäsionsverminderung von *E. coli* als die analogen Schichten auf Aluminium.

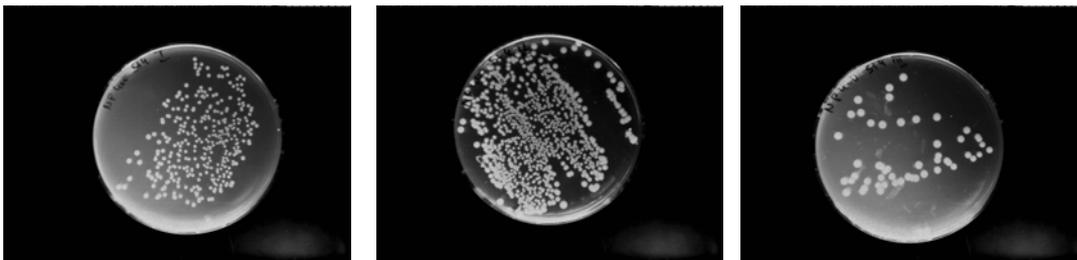


Abb. 111: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *E. coli*-Zellen von einem Stahlträger auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Bei der Betrachtung der Agarplatten in Abb. 111 fällt auf, dass die zweite Agarplatte (in der Mitte) deutlich stärker bewachsen ist als die erste. Diese Beobachtung, die kein Einzelfall war, deutet darauf hin, dass beim Kontakt der Probe mit der ersten Agarplatte weniger Zellen transferiert wurden als beim zweiten Kontakt. Daher kann festgestellt werden, dass die Entscheidung, zur Maximierung des Zelltransfers die Proben mit drei Agarplatten in Kontakt zu bringen, trotz des großen Zeitaufwandes richtig war.

4 Ergebnisse

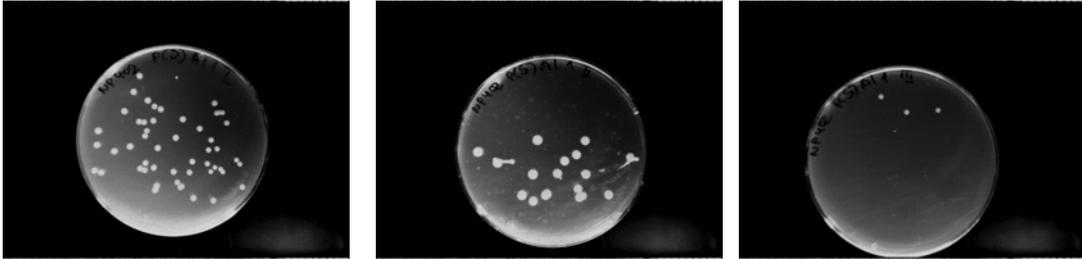


Abb. 112: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *E. coli*-Zellen von einem PEG-terminierten Thiophosphonat-SAM auf Al auf CASO Agar-Festkulturmedium (Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Weiterhin macht die Analyse der Digitalfotos der Agarplatten in Abb. 113 deutlich, dass eine zuverlässige Quantifizierung nur gelingt, wenn die abgelösten Zellen keine Keimrasen bilden und einzeln gezählt werden können.

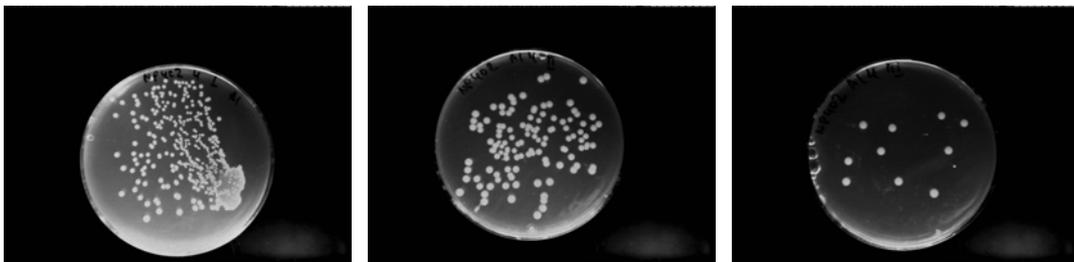


Abb. 113: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärierter *E. coli*-Zellen von einem Aluminiumträger auf CASO Agar-Festkulturmedium(Platte 1 bis 3 von links nach rechts).

Zu bemerken ist ebenfalls, dass der Kontakt mit den behandelten Schichten die Kultivierungsfähigkeit der Zellen anscheinend nicht beeinträchtigt hat.

Ob durch die Plattenzählmethode erzielten Ergebnisse tatsächlich die Realität wiedergeben, konnte durch die Fluoreszenzmikroskopie nicht überprüft werden. Abb. 114 macht deutlich, dass der ebenfalls fluoreszierende Hintergrund keine akkurate Auswertung der Zahl der fluoreszierenden bakteriellen Ketten und Aggregate ermöglichte.

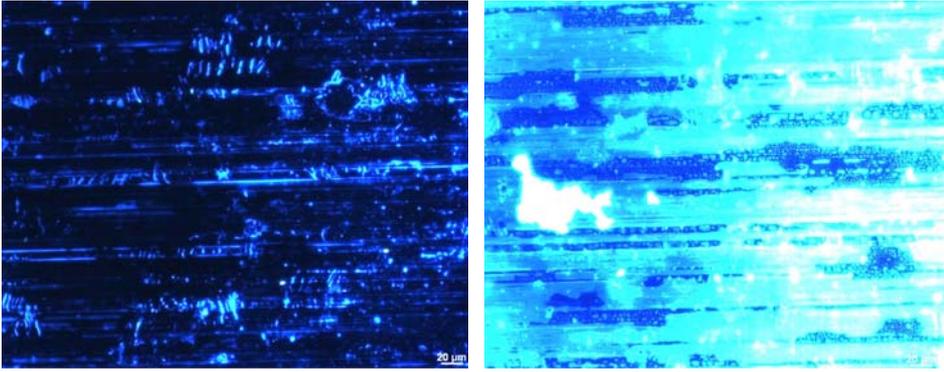


Abb. 114: Mit DAPI angefärbte *E. coli* WT auf PEG-terminiertem SAM auf Al (links) und einer Blindprobe (rechts).

4.6.2.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Abb. 115 verdeutlicht zusammenfassend das Adhäsionsverhalten von *S. epidermidis* auf den Thiophosphonat-SAMs auf Stahl- und Aluminium-Oberflächen, sowie auf den unbeschichteten Metalloberflächen.

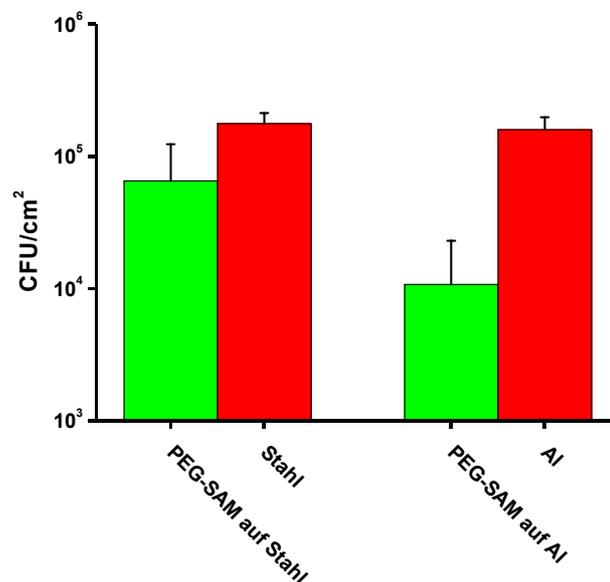


Abb. 115: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PEG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode.

Ähnlich wie bei den Versuchen mit den Phosphonatschichten wurde auch hier ein ausgeprägtes Adhäsionspotenzial dieses Testkeims beobachtet. Die Digitalfotos

4 Ergebnisse

der Agarplatten (Abb. 116, Abb. 117) und die Keimzahlen pro cm² in Tabelle 35 veranschaulichen, dass die PEG-terminierten Thiophosphonate auf beiden getesteten oxidischen Oberflächen eine Verminderung der Adhäsion von *S. epidermidis* um ca. eine Größenordnung bewirkten.

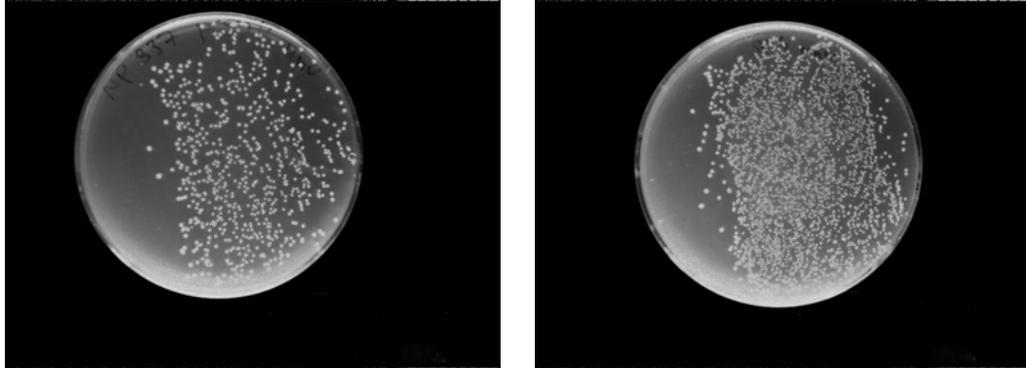


Abb. 116: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S.epidermidis*-Zellen von einem PEG-terminierten Thiophosphonat-SAM auf Stahl (links) und einer Stahlreferenz (rechts) auf CASO Agar-Festkulturmedium.

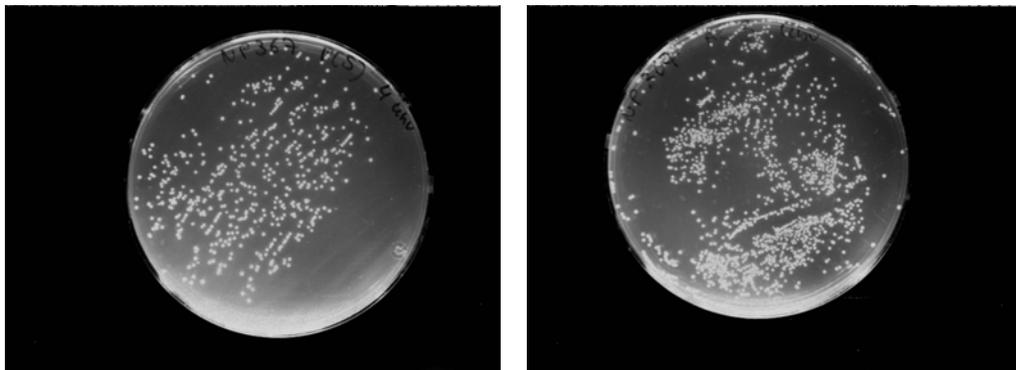


Abb. 117: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Rekultivierung adhärierter *S.epidermidis*-Zellen von einem PEG-terminierten Thiophosphonat-SAM auf Aluminium (links, aufgetragenes Volumen 50 µL) und einer Aluminiumreferenz (rechts, aufgetragenes Volumen 25 µL) auf CASO Agar-Festkulturmedium.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG-SAMs auf Stahl	1x10 ⁷	(6,49±5,81)·10 ⁴	36,9±33,9	63,1±33,9
Stahl	1x10 ⁷	(1,76±0,36) 10 ⁵	100	0
PEG-SAMs auf Al	1x10 ⁷	(1,04±1,22) 10 ⁴	6,5±7,8	93,5±7,8
Al	1x10 ⁷	(1,59±0,38) 10 ⁵	100	0

Tabelle 35: Bestimmung repulsiver Eigenschaften von PEG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

Mit $1,04 \cdot 10^4$ CFU pro cm^2 und einem Biorepulsivitätspotenzial von ca. 93% zeigte sich die Beschichtung auf den Aluminiumoberflächen wirksamer als die Beschichtung auf Stahl, die mit einer Besiedlung von $6,49 \cdot 10^4$ CFU pro cm^2 lediglich eine ca. 63%ige Verminderung der Adhäsion aufwies. Die logische Schlussfolgerung dieses Ergebnisses wäre, anzunehmen, dass sich auf der Aluminiumoberfläche einheitlichere Schichten gebildet haben als auf der Stahloberfläche. Dieser scheinbar materialabhängige Unterschied wurde auch bei den PEG-terminierten Phosphonatschichten beobachtet (vgl. Abschnitt 4.6.1.2) und konnte in ähnlicher Weise erklärt werden. Da eine exakte Quantifizierung durch die angewandte Plattenmethode nicht sicher war und dieses Ergebnis auch durch die Epifluoreszenzmikroskopie wegen der diskutierten Hintergrundfluoreszenz nicht verifiziert werden konnte, muss dieser Faktor in erster Linie als möglicher Grund für das geringer ausgeprägte Inhibierungspotenzial der (thio)phosphonatbeschichteten Stahlproben in Betracht gezogen werden.

4.7 Polyglycerol-terminierte Monoschichten auf Stahl und Aluminium

Es wurde ein PG-terminiertes Dendrimer mit Phosphonat-Ankergruppen auf Stahl und Aluminium immobilisiert, um die modifizierten Oberflächen auf ihre bakterienre-

pulsiven Eigenschaften zu untersuchen. Da Polyglycerol-terminierte Dendrimere mit SAc-Ankergruppe auf Gold stark biorepulsive SAMs gebildet haben, war zu erwarten, dass auch im Falle der Ausbildung einer analogen Phosphonatschicht auf oxidischen Stahl- und Aluminiumoberfläche bakterienabweisende Eigenschaften zu beobachten wären. Die Bestimmung der Biorepulsivität erfolgte durch die Ermittlung der primären Bakterienadhäsion der Testkeime unter *in vitro* Bedingungen auf den Oberflächen der Proben. Zur Detektion der adhärirten Zellen konnte wegen der bereits in Abschnitt 4.6.1 diskutierten inhomogenen Hintergrundfluoreszenz nur die Plattenmethode eingesetzt werden. Daher war es nicht möglich, die Ergebnisse der Plattenzählmethode durch die Epifluoreszenzmikroskopie zu verifizieren.

4.7.1 Adhäsion von *E. coli* WT

In Abb. 118 sind die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen von *E. coli* WT auf den PG-terminierten phosphonatbeschichteten Metallen zusammengefasst. Sowohl die phosphonatbeschichteten Stahl- als auch die entsprechend behandelten Aluminiumproben zeigen gegenüber den Referenzen eine Verminderung der Bakterienadhäsion um etwa eine Größenordnung.

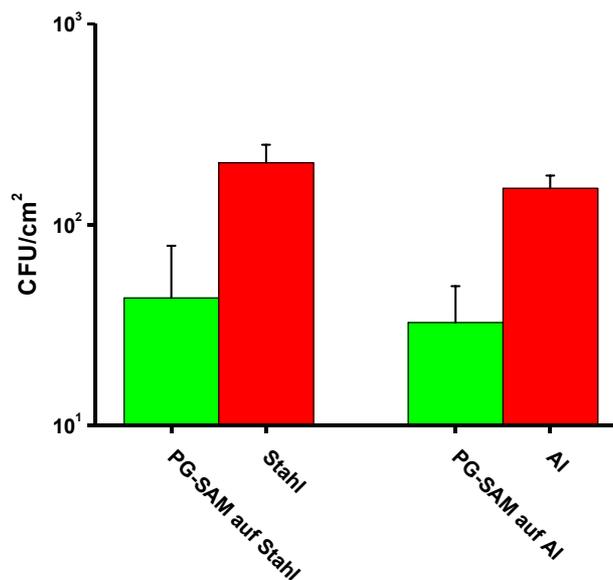


Abb. 118: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *E. coli* mittels Plattenmethode.

4 Ergebnisse

Die Betrachtung der in Tabelle 36 aufgeführten Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Keimzahlen, die für die PG-terminierten Phosphonatschichten auf Stahl- und Aluminiumsubstrate ermittelt wurden.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PG-SAMs auf Stahl	1x10 ⁵	(4,32±3,54)·10 ¹	21,2±17,6	78,8±17,6
Stahl	1x10 ⁵	(2,04±0,47) 10 ²	100	0
PG-SAMs auf Al	1x10 ⁵	(3,26±1,69) 10 ¹	21,5±11,6	78,6±11,6
Al	1x10 ⁵	(1,52±0,24) 10 ²	100	0

Tabelle 36: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PG-terminierten SAMs auf Stahl und Al gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, *Mann-Whitney-Test*).

Mit $4,32 \cdot 10^1$ CFU pro cm² für PG-SAMs auf Stahl und $3,26 \cdot 10^1$ CFU pro cm² auf Aluminium wiesen die beiden modifizierten Oberflächen eine Reduzierung der Bakterienadhäsion von ca. 79% auf.

Abb. 119 liefert einen optischen Eindruck für das Verteilungsmuster der Zellen auf den Phosphonatschichten auf Stahl. Links ist ein stark besiedelter Oberflächenausschnitt zu sehen. Diese Aufnahme lässt vermuten, dass die tatsächliche Besiedlung deutlich höher war, als durch die Plattenmethode ermittelt wurde. Allerdings wiesen die meisten Aufnahmen sehr starke Hintergrundfluoreszenz auf, weshalb diese Annahme letztendlich nicht bewiesen werden konnte.

Das rechte Bild, das eine mit DAPI angefärbte Blindprobe zeigt, macht deutlich, dass die Schicht selbst ebenfalls mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurde und daher der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie als Auswertungsmethode ausgeschlossen war.

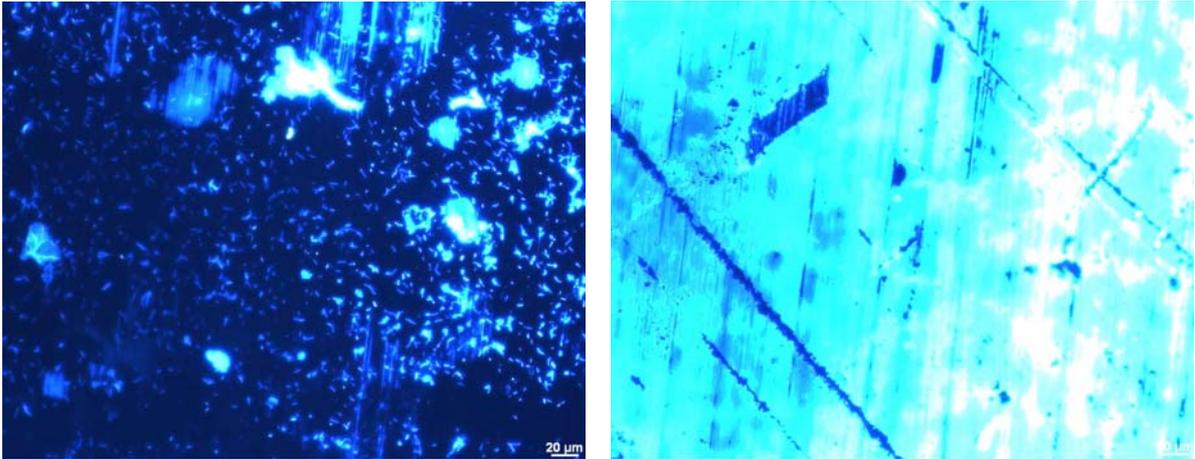


Abb. 119: Mit DAPI angefärbte *E. coli* WT auf PG-terminierten Phosphonatschicht auf Stahl (links) und eine Blindprobe (rechts).

4.7.2 Adhäsion von *S. epidermidis* ATCC 14990

Abb. 120 gibt die Ergebnisse der der Adhäsionsuntersuchungen mit *S. epidermidis* an den PG-terminierten Phosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium wieder. Verglichen mit unmodifizierten Substraten bewirkten die SAMs auf beiden Materialien eine Verminderung der Adhäsion.

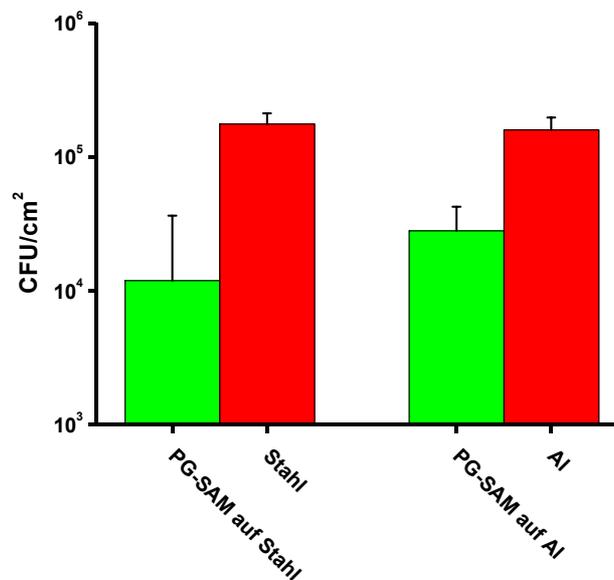


Abb. 120: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PG-terminierten Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode.

4 Ergebnisse

Mit $1,19 \cdot 10^4$ CFU pro cm^2 wurde bei den PG-SAMs auf Stahl eine 93%ige Biorepulsivität festgestellt (Tabelle 37). Eine etwas stärkere Adhäsion fand auf den PG-SAMs auf Aluminium statt. Die Verminderung der Bakterienadhäsion betrug aber auch für diese Schichten 82%.

Testsubstrat	Konzentration der Testsuspension [CFU/mL]	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PG-P(O)(OH) ₂ -SAMs auf Stahl	$1 \cdot 10^7$	$(1,19 \pm 2,45) \cdot 10^4$	$6,8 \pm 14,0$	$93,2 \pm 14,0$
Stahl	$1 \cdot 10^7$	$(1,76 \pm 0,36) 10^5$	100	0
PG-P(O)(OH) ₂ -SAMs auf Al	$1 \cdot 10^7$	$(2,80 \pm 1,44) 10^4$	$17,6 \pm 10,0$	$82,4 \pm 10,0$
Al	$1 \cdot 10^7$	$(1,59 \pm 0,38) 10^5$	100	0

Tabelle 37: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von PG-terminierten SAMs auf Stahl und Al gegenüber *S. epidermidis* mittels Plattenmethode ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

Abb. 121 und Abb. 122 vermitteln einen optischen Eindruck von der Wirkung der Beschichtung.

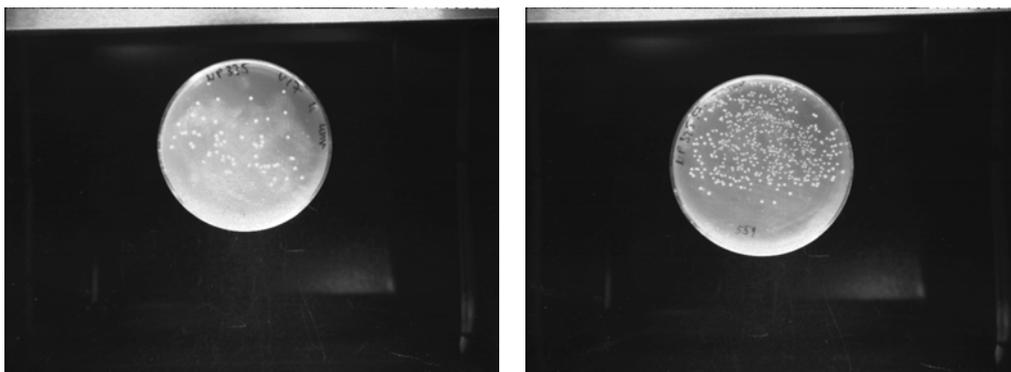


Abb. 121: Kolonienbildende Einheiten nach der Ablösung und Reaktivierung adhärerter *S. epidermidis*-Zellen von einem PG-terminierten Phosphonat-SAM auf Stahl (links, aufgetragenes Volumen 50 μL) und einer Stahlreferenz (rechts, aufgetragenes Volumen 25 μL) auf CASO Agar-Festkulturmedium.

Auch hier verhinderten die eingefärbten Oberflächenareale auf den Proben die computergestützte quantitative Auswertung der adhärerten Zellen. Allerdings ermög-

4 Ergebnisse

lichten diese Fluoreszenzaufnahmen eine scharfe Unterscheidung zwischen den bakteriell besiedelten und unbesiedelten Arealen. Die besiedelten Areale entsprechen den unmodifizierten Abschnitten der Probenoberfläche. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verhinderten die schichtbildenden Moleküle die Bakterienadhäsion, da die beschichteten Abschnitte bis auf einzelne, stark fluoreszierende und daher gut erkennbare Zellen, kein Bakterienwachstum aufwiesen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass bei einer intakten Monoschicht höhere Biorepulsivität zu erwarten wäre.

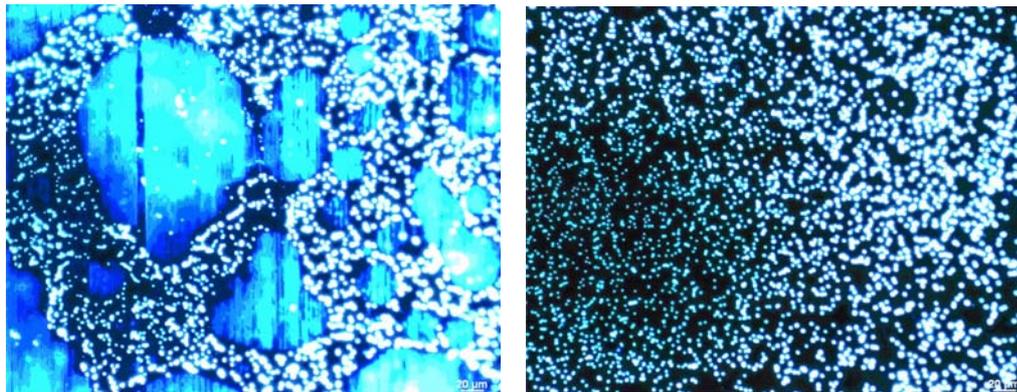


Abb. 122: Mit DAPI angefärbte *S. epidermidis* auf PG-terminierten Phosphonatschicht auf Stahl (links) und auf einer Stahlreferenz (rechts).

4.8 Zusammenfassende Betrachtung der Bioadhäsionsuntersuchungen auf den Phosphonat- und Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Aluminium

Testsystem Die Repulsivitätseigenschaften der PEG- und PG-terminierten Schichten auf nativen Oxidschichten der industriell relevanten Materialien, Stahl und Aluminium gegenüber der Adhäsion von *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 wurden im *in vitro* getestet.

Abb. 123 und Tabelle 38 geben einen zusammenfassenden Überblick über das Verhalten von *E. coli* WT auf diesen Schichten.

4 Ergebnisse

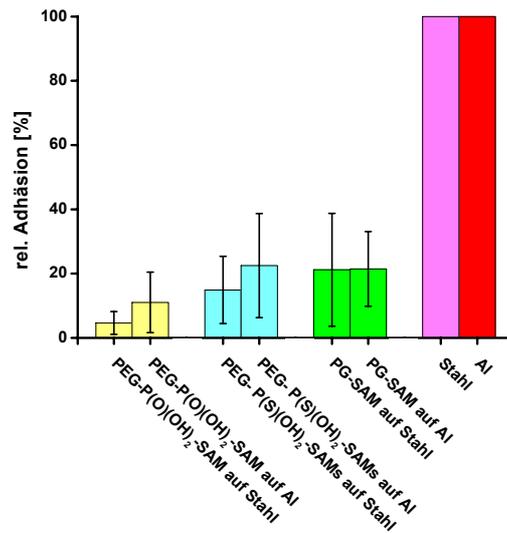


Abb. 123: Vergleich der relativen Adhäsion von *E. coli* WT auf Phosphonat- und Thio-phosphonat-SAMs auf Stahl und Al (ermittelt durch die Plattenmethode).

Im Vergleich zu den Adhäsionszahlen auf unmodifiziertem Stahl und Al zeigen alle Schichten einen abweisenden Effekt. Mit ca. 96% Verminderung der Adhäsion zeigten die PEG-Phosphonat-SAMs auf Stahl das beste Ergebnis. Der gleiche SAM auf Al wies mit ca. 89% Verminderung der Adhäsion ebenfalls eine hohe Biorepulsivität auf. Dieser Unterschied des Biorepulsivitätspotenzials gleicher SAMs auf unterschiedlichen Materialien wurde auch bei den PEG-terminierten Thiophosphonat-SAMs beobachtet. Dass die beobachtete Differenz durch Messfehler entstanden ist, ist unwahrscheinlich. Vielmehr muss der systematische Zusammenhang zwischen den verschiedenen Metalloxiden und Ankergruppen in Betracht gezogen werden, der die Schichtbildung positiv bzw. negativ beeinflusste.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG-P(O)(OH) ₂ -SAM auf Stahl	9,40±6,90	4,6±3,6	95,4±3,6
PEG-P(O)(OH) ₂ -SAM auf Al	(1,68±1,41) 10 ¹	11,1±9,4	89,0±9,4
PEG- P(S)(OH) ₂ -SAMs auf Stahl	(3,04±2,10) 10 ¹	15, 0±10,5	85,1±10,5
PEG- P(S)(OH) ₂ -SAMs auf Al	(3,42±2,40) 10 ¹	22,5±16,2	77,5±16,2
PG- P(O)(OH) ₂ -SAMs auf Stahl	(4,32±3,54)·10 ¹	21,2±17,6	78,9±17,6
PG- P(O)(OH) ₂ -SAMs auf Al	(3,26±1,69) 10 ¹	21,5±11,6	78,6±11,6
Stahl	(2,04±0,47) 10 ²	100	0
Al	(1,52±0,24) 10 ²	100	0

Tabelle 38: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von Phosphonat- und Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *E. coli* WT mittels Plattenmethode.

Lediglich bei den PG-terminierten SAMs wurde eine Übereinstimmung der bakterienabweisenden Eigenschaften auf beiden Metalloberflächen beobachtet.

Abb. 124 und Tabelle 39 fassen die Untersuchungsergebnisse der Adhäsion von *S. epidermidis* auf Phosphonat- und Thiophosphonat-SAMs zusammen.

4 Ergebnisse

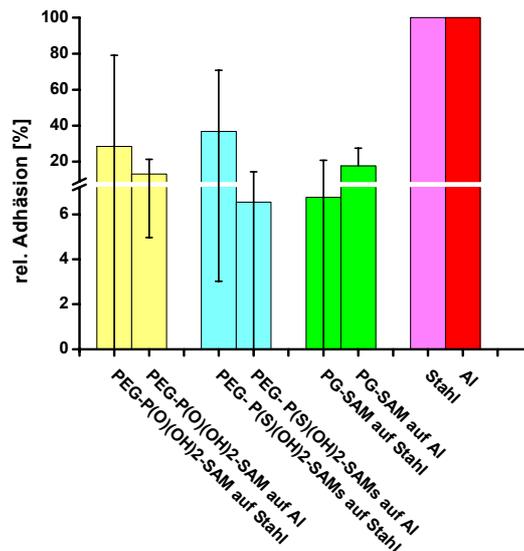


Abb. 124: Vergleich der relativen Adhäsion von *S. epidermidis* auf Posphonat- und Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Al (ermittelt durch die Plattenmethode).

Ähnlich wie bei der Adhäsion von *E. coli* konnte auch hier eine Variation in der Biorepulsivität bei gleichen SAMs auf unterschiedlichen Substraten beobachtet werden. PEG- P(O)(OH)₂-SAMs auf Aluminium zeigten eine circa 87%ige Repulsivität, während die gleiche Verbindung auf Stahl eine nur 71%ige Verminderung der Adhäsion bewirkte.

Besonders stark ausgeprägt war dieser Unterschied bei den PEG- P(S)(OH)₂-SAMs, die im Aluminiumsystem eine um 94% verminderte Bakterienadhäsion aufwiesen, während im Stahlsystem mit 63% Inhibierung ein deutlich geringerer Effekt auftrat.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der PG-terminierten SAMs fällt auf, dass diese SAMs auf dem Stahl stärker bakterienabweisend waren (93% Repulsivität), als die auf Aluminium. Aber auch für diese Schichten betrug die Verminderung der Bakterienbindung über 82%.

Diese Ergebnisse erlauben eine Aussage über spezifisches Adhäsionsverhalten auf unterschiedlichen Materialien der beiden Testkeime. Während bei *E. coli* WT die PEG-Phosphonat-SAMs auf Stahl am schwächsten besiedelt wurden, reduzierten die PEG-Thiophosphonat-SAMs auf Aluminium am wirksamsten die Adhäsion von *S. epidermidis*.

4 Ergebnisse

Testsubstrat	Ermittelte Adhäsion [CFU/cm ²]	Rel. Adhäsion [%]	Reduzierung der Bioadhäsion [%]
PEG- P(O)(OH) ₂ -SAM auf Stahl	(5,02±8,83) 10 ⁴	28,52±50,51	71,48±50,51
PEG- P(O)(OH) ₂ -SAM auf Al	(2,09±1,20) 10 ⁴	13,14±8,17	86,86±8,17
PEG- P(S)(OH) ₂ -SAMs auf Stahl	(6,49±5,81)·10 ⁴	36,88±33,86	63,13±33,86
PEG- P(S)(OH) ₂ -SAMs auf Al	(1,04±1,22) 10 ⁴	6,54±7,83	93,46±7,83
PG-SAMs auf Stahl	(1,19±2,45)·10 ⁴	6,76±13,99	93,24±13,99
PG-SAMs auf Al	(2,80±1,44) 10 ⁴	17,61±9,99	82,39±9,99
Stahl	(1,76±0,36) 10 ⁵	100	0
Al	(1,59±0,38) 10 ⁵	100	0

Tabelle 39: Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von Phosphonat- und Thiophosphonat-SAMs auf Stahl und Al gegenüber *S. epidermidis* ATCC 14990 mittels Plattenmethode.

Zusammenfassend lässt sich für die Stahl- und Aluminium-SAMs sagen, dass die Phosphonat- und Thiophosphonatschichten einen deutlichen Einfluß auf das Adhäsionsverhalten der Testkeime hatten. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit PEG modifizierter Stahl resistent gegen Proteinadsorption, aber unwirksam gegenüber bakterieller Adhäsion ist.³⁸² Insgesamt zeigten jedoch die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Schichten gegenüber der jeweiligen Referenz eine signifikante Verminderung der Keimadhäsion. Auch statistisch hat sich eine hohe Signifikanz für den beobachteten Effekt ergeben ($p < 0,001$), wobei hier keine Aussage über die Größe des Unterschieds gemacht wird.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die PEG- und PG-terminierten Stahl- und Aluminiumoberflächen als biorepulsive Oberflächen in technischen Systemen durchaus interessant sein könnten. Allerdings müsste der Schichtbildungsprozeß weiter untersucht und optimiert werden. Die Abscheidung aus der Lösung erfordert eine

4 Ergebnisse

sehr hohe Sauberkeit. Es wäre denkbar, dass verbliebene Verunreinigungen die Strukturbildung der SAMs negativ beeinflusst haben.

Es ist bekannt, dass die Glätte der Substratoberfläche teilweise die Struktur des SAMs und insbesondere die Defektdichte bestimmt.³⁸³ Denkbar wäre, dass auch die Rauigkeit der Stahl- und Aluminiumsubstrate die Schichtbildung negativ beeinflusst haben könnten. Die Rauigkeit der Oberfläche ist auch für die Bakterienadhäsion von Bedeutung. Daher wurden die Substrate, die sichtbare Kratzer oder andere Oberflächendefekte aufwiesen, vor der SAM-Präparation aussortiert. Allerdings stellen auch die Oberflächen, die dem menschlichen Auge glatt und defektfrei erscheinen, für die Bakterien eine sehr heterogene Landschaft dar. Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch, wenn die in den Experimenten eingesetzten Substrate sorgfältig gereinigt wurden und ideal glatt ausgesehen haben, im Nanometerbereich Heterogenitäten vorhanden waren. Diese Vermutung wurde durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen der Testoberflächen bestätigt.

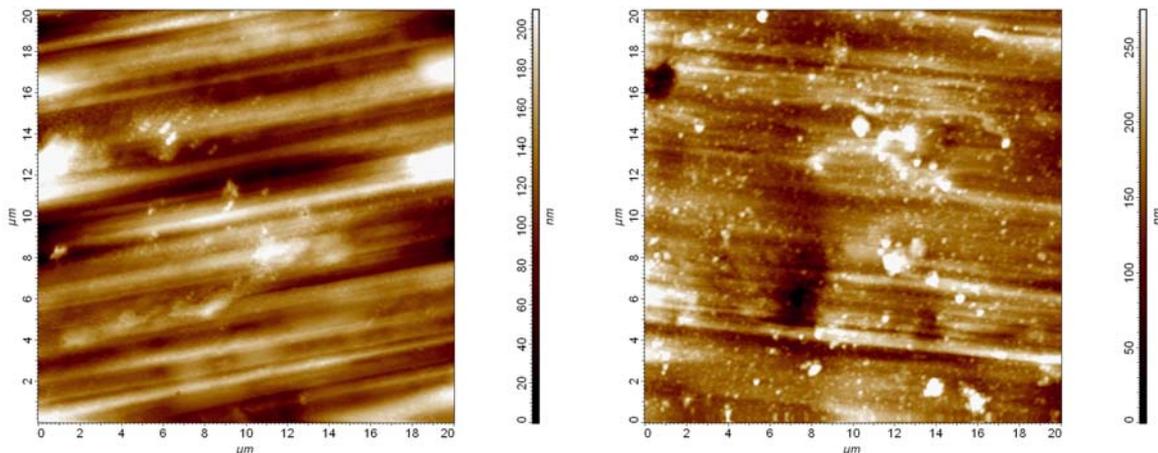


Abb. 125: 20x20 μm rasterkraftmikroskopische Abbildung einer Al- (links) und Stahloberfläche.

AFM-Aufnahmen in Abb. 125 deckten die Risse und Spalten auf, die darauf hinweisen, dass es sich bei den Testsubstraten nicht um eine auf molekularem Maßstab ideal glatte Oberflächen handelte, die gleichwertige Bindungsstellen für eine defektfreie SAM-Bildung anbieten und zusätzlich Bakterienadhäsion fördern konnten. Um einen Zahlenwert für die beobachtete Mikrorauigkeit zu erhalten wurden der so genannte, *Root Mean Square*, RMS, der Rauigkeit errechnet. Dabei handelt es sich um die mittlere quadratische Abweichung der Prüffläche zur Idealfäche. Die Abtast-

fläche für die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit betrug 20x20 µm. Es wurde ein Wert von 15,68 für das Stahlsubstrat und von 23,28 nm für Aluminium erhalten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weitere Untersuchungen notwendig wären, um die Oberflächenbedeckung, die einen kritischer und entscheidender Parameter für die Biorepulsivität darstellt, zu verbessern.

4.9 Ermittlung des wachstumshemmenden Potenzials der schichtbildenden Substanzen

Eine Grundvoraussetzung für die Biorepulsivität von Monoschichten ist, dass sie die Bakterien beim Kontakt nicht abtöten, sondern nur abweisen. Die nach jedem Experiment durchgeführte Vitalitätsprüfung bestätigte qualitativ, dass die Zellen in der Testsuspension nach dem Kontakt mit den Monoschichten weiterhin auf Festnährboden kultivierbar waren. Um jedoch auszuschließen, dass eventuell abgelöste Moleküle die Bakterien nicht während des Adhäsionsexperiments hemmten, wurden die schichtbildenden Moleküle einer systematischen Empfindlichkeitsprüfung unterworfen, die üblicherweise für Antibiotika durchgeführt wird. Dabei wird experimentell das Verhalten einer Bakterienpopulation gegenüber dem zu testenden Stoff gemessen und die minimale Hemmkonzentration, (MHK), dieses Stoffes ermittelt. Unter MHK versteht man die niedrigste Konzentration einer antibiotischen Substanz in µg/mL, die das Keimwachstum unter den Versuchsbedingungen hemmt. International existieren verschiedene Standards zur Bestimmung des MHK-Werts. In Deutschland erfolgt die MHK-Bestimmung auf der Basis der DIN 58940 („Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“), in der drei Methoden, die Mikrodilutionsmethode, die Agardiffusions- und die Agardilutionsmethode beschrieben werden.

Bei der Ermittlung der MHK durch die Mikro-Bouillon-Verdünnungsmethode (DIN 58940-8 und Beiblätter), die in dieser Arbeit verwendet wurde, wird aus einer Antibiotikastammlösung eine Verdünnungsreihe mit abfallender Konzentration in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte hergestellt (vgl. Abschnitt 6.25). Im Anschluss werden diese Vertiefungen mit einer definierten Menge des zu testenden Keims beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 h werden die Mikrotiterplatten dann visuell

4 Ergebnisse

ausgelesen und gegenüber mitgeführten Wachstums-(Positiv)-Kontrollen bewertet. Die visuelle Beurteilung der Trübung und die Entscheidung zwischen Wachstum oder Hemmung ist ein entscheidender und schwieriger Schritt bei der Ermittlung von MHK. Die Stoffkonzentration in der letzten Vertiefung, die kein Wachstum bzw. keine Trübung aufweist, entspricht der MHK. Allerdings ist die Unterdrückung des sichtbaren Wachstums nur ein Hinweis auf eine wachstumshemmende Wirkung. Daher erlaubt der MHK-Wert keine Aussage darüber, ob ein Stoff bakterizid wirkt. Um dies beurteilen zu können, wurde nach der Ablesung der MHK noch ein weiterer Test zur Ermittlung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) durchgeführt (vgl. Abschnitt 6.26). Hierzu wurden definierte Inokulummengen aus den nicht getriebenen Kavitäten der Mikrotiterplatte und den Wachstumskontrollen auf Festkulturmedium subkultiviert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Da auf allen Agarplatten starkes Wachstum zu beobachten war, konnte davon ausgegangen werden, dass die schichtbildenden Substanzen in den getesteten Konzentrationen (0,5-64 mmol/L) keine bakterizide Wirkung aufwiesen.

Die Voraussetzung für zuverlässige Ergebnisse bei beiden Bestimmungen war die genaue Einhaltung von Parametern, wie die Bebrütungszeit und -temperatur nach den standardisierten Vorgaben.

4.9.1 Ermittlung der MHK-Werte für *E. coli* WT

In Tabelle 40 sind die unter standardisierten *in vitro*-Bedingungen ermittelten Werte der minimalen Hemmkonzentrationen der schichtbildenden Substanzen gegenüber *E. coli* aufgeführt. Getestet wurde ein Konzentrationsbereich von 0,5 mmol/L bis 64 mmol/L. Allen Werten liegt eine Doppelbestimmung zugrunde. Aus jeder Klasse wurden zwei Dendrimere mit unterschiedlichen Molmassen zwischen 3000 g/mol und 8000 g/mol getestet. Wie bereits diskutiert (vgl. Abschnitt 4.4), wiesen alle PG-Verbindungen geringere mittlere Molmassen auf. Die Zahl im Index der Substanzbezeichnung gibt die angestrebte Molmasse der jeweiligen Verbindung wieder, jedoch wurden für alle Verbindungen ca. 3000 g/mol als reales Molekulargewicht bestimmt., was dementsprechend als Grundlage für die Konzentrationsberechnung herangezogen wurde. Bei den Dendrimeren **D2(SAc)₅₀₀₀** und **D3(SAc)₈₀₀₀** wurde einschließlich bis zur Ausgangskonzentration von 64 mmol/L eine deutliche Trübung beobachtet, was für ein ungehemmtes Wachstum in Gegenwart dieser Teststoffe spricht. Keine

4 Ergebnisse

der getesteten Substanzen zeigte daher im für die Schichtbildung relevanten Konzentrationsbereich (1 mmol/L) eine wachstumshemmende Wirkung.

SAM-bildendes Molekül	Molmasse [g]	Beobachtete Wachstumshemmung [mmol/L]	Beobachtete Wachstumshemmung [$\mu\text{g/mL}$]	Bakterizide Wirkung
D1(SAc)₈₀₀₀	3000	32	96000	keine
D1(SAc)₄₀₀₀	3000	64	192000	keine
D2(SAc)₅₀₀₀	3000	Nicht beobachtet	Nicht beobachtet	keine
D2(SAc)₃₀₀₀	3000	32	96000	keine
D3(SAc)₈₀₀₀	3000	Nicht beobachtet	Nicht beobachtet	keine
D3(SAc)₄₀₀₀	3000	2	6000	keine
EG₇OH	512,74	8	4100	keine
PEGC₁₁P(O)(OH)₂	600	64	37400	keine
PEGC₁₁P(S)(OH)₂	600	64	38200	keine
PGC₁₁P(S)(OH)₂	3000	32	96000	keine

Tabelle 40: Ermittlung der MHK und MBK der Schichtbildenden Moleküle gegenüber *E. coli* mittels Mikro-Bouillon-Reihenverdünnungsmethode.

Die makroskopisch sichtbare Trübung bzw. Sedimentation wurde mittels einer extra angefertigten Spiegelvorrichtung betrachtet. Dabei wurde die Mikrotiterplatte von unten durch einen beweglichen Spiegel genau angesehen. Oftmals war die Trübung schwer zu beurteilen, da in jeder Kavität eine gewisse Trübung vorhanden war.

Die im Anschluss durchgeführte MBK-Bestimmung war für alle Substanzen negativ. Tabelle 40 kann entnommen werden, dass keine der getesteten Substanzen eine bakterizide Wirkung auf die Testkeime aufwies.

Betrachtet man die MHK-Werte der Dendrimere innerhalb der Klassen, stellt man fest, dass diese sich unterscheiden. Während **D2(SAc)₅₀₀₀** nicht wachstumshemmend im getesteten Konzentrationsbereich war, hemmte der Zusatz der 32 mmolaren Lösung des **D2(SAc)₃₀₀₀**-Dendrimers das Wachstum von *E. coli*. Ein deutlich größerer Unterschied in der Empfindlichkeit war in der **D3(SAc)**-Klasse festzustellen.

4 Ergebnisse

Möglicherweise hat die Anwesenheit von Nebenprodukten dieses Verhalten verursacht, denn die Dendrimere enthielten teilweise größere Mengen an Methanol aus dem Syntheseprozess. Der Methanolgehalt war nicht bei allen Vertretern gleich.

4.9.2 Ermittlung der MHK-Werte für *S. epidermidis* ATCC 14990

Der unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführten Mikro-Bouillon-Verdünnungstest für *S. epidermidis* ergab für alle schichtbildende Substanzen oberhalb der für die Schichtbildung eingesetzte Konzentration (1 mmol/L) liegende MHK-Werte. Wie Tabelle 41 verdeutlicht, war im Fall der **D2(SAc)₃₀₀₀** keine Wachstumshemmung des Testkeims bis zu einer Konzentration von 64 mmol/L zu beobachten.

SAM-bildendes Molekül	Molmasse [g]	Beobachtete Wachstumshemmung [mmol/L]	Beobachtete Wachstumshemmung [µg/mL]	Bakterizide Wirkung
D1(SAc)₈₀₀₀	3000	16	48000	Keine
D1(SAc)₄₀₀₀	3000	16	48000	Keine
D2(SAc)₅₀₀₀	3000	2	6000	Keine
D2(SAc)₃₀₀₀	3000	Nicht beobachtet	Nicht beobachtet	Keine
D3(SAc)₈₀₀₀	3000	4	12000	Keine
D3(SAc)₄₀₀₀	3000	2	6000	Keine
EG₇OH	512,74	8	4100	Keine
PEGC₁₁P(O)(OH)₂	600	64	37400	Keine
PEGC₁₁P(S)(OH)₂	600	32	19210	Keine
PGC₁₁P(S)(OH)₂	3000	32	96000	Keine

Tabelle 41: Ermittlung der MHK und MBK der Schichtbildenden Moleküle gegenüber *S. epidermidis* mittels Mikro-Bouillon-Reihenverdünnungsmethode.

Bei dieser Testreihe wurde eine Übereinstimmung zwischen den MHK-Werten der **D1(SAc)**-Klasse beobachtet. Ähnliche MHK-Werte wurden auch für die beiden Vertreter der **D3(SAc)**-Klasse ermittelt. Deutlich größer fiel der Unterschied in der

Empfindlichkeit der Testkeime gegenüber allen Verbindungen der **D2(SAc)**-Klasse aus.

Tabelle 41 kann außerdem entnommen werden, dass bei keiner der Testsubstanzen eine bakterizide Wirkung nachgewiesen werden konnte.

4.9.3 Ermittlung der MHK-Werte für *S.aureus* ATCC 6538

Tabelle 42 enthält die Daten, die für *S. aureus* im Mikro-Bouillon-Verdünnungstest erhalten wurden. Auf den ersten Blick lässt sich erkennen, dass der Testkeim gegenüber den Dendrimeren keine besondere Empfindlichkeit im für die SAM-Bildung relevanten Konzentrationsbereich von 1 mmol/L zeigte.

Innerhalb der Dendrimer-Klassen sind auch bei diesem Keim gewisse Unterschiede in der anscheinend Wachstums-hemmenden Wirkung aufgetreten. Mit achtfacher Differenz war der Unterschied zwischen den beiden Vertretern der **D3(SAc)**-Klasse am größten. Wie oben bereits erwähnt (vgl. 4.9.1), wäre der Einfluß des aus dem Syntheseprozess stammenden Methanols als Nebenprodukt denkbar. Ein Wert für die minimale bakterizide Konzentration konnte nicht ermittelt werden, da unter *in vitro*-Bedingungen keine der getesteten Substanzen eine bakterizide Wirkung aufwies.

4 Ergebnisse

SAM-bildendes Molekül	Molmasse [g]	Beobachtete Wachstumshemmung [mmol/L]	Beobachtete Wachstumshemmung [µg/mL]	Bakterizide Wirkung
D1(SAc) ₈₀₀₀	3000	16	48000	keine
D1(SAc) ₄₀₀₀	3000	8	24000	keine
D2(SAc) ₅₀₀₀	3000	2	6000	keine
D2(SAc) ₃₀₀₀	3000	8	24000	keine
D3(SAc) ₈₀₀₀	3000	16	48000	keine
D3(SAc) ₄₀₀₀	3000	2	6000	keine
EG ₇ OH	512,74	4	2050	keine
PEGC ₁₁ P(O)(OH) ₂	600	64	37400	keine
PEGC ₁₁ P(S)(OH) ₂	600	32	19210	keine
PGC ₁₁ P(S)(OH) ₂	3000	2	6000	keine

Tabelle 42: Ermittlung der MHK und MBK der Schichtbildenden Moleküle gegenüber *S. aureus* mittels Mikro-Bouillon-Reihenverdünnungsmethode.

4.9.4 Ermittlung der MHK-Werte für *P. aeruginosa* PAO

Wie Tabelle 43 erkennen lässt, lagen die MHK-Werte der Testsubstanzen auch bei *P. aeruginosa* deutlich oberhalb des für die Schichtbildung verwendeten Konzentrationsbereichs.

4 Ergebnisse

SAM-bildendes Molekül	Molmasse [g]	Beobachtete Wachstumshemmung [mmol/L]	Beobachtete Wachstumshemmung [$\mu\text{g/mL}$]	Bakterizide Wirkung
D1(SAc)₈₀₀₀	3000	32	96000	Keine
D1(SAc)₄₀₀₀	3000	32	96000	Keine
D2(SAc)₅₀₀₀	3000	16	48000	Keine
D2(SAc)₃₀₀₀	3000	16	48000	Keine
D3(SAc)₈₀₀₀	3000	32	96000	Keine
D3(SAc)₄₀₀₀	3000	2	6000	Keine
EG₇OH	512,74	32	16400	Keine
PEGC₁₁P(O)(OH)₂	600	32	18700	Keine
PEGC₁₁P(S)(OH)₂	600	32	19210	Keine
PGC₁₁P(S)(OH)₂	3000	2	6000	Keine

Tabelle 43: Ermittlung der MHK und MBK der schichtbildenden Moleküle gegenüber *P. aeruginosa* mittels Mikro-Bouillon-Reihenverdünnungsmethode.

Bei diesem Keim wurden keine Empfindlichkeitsunterschiede in der **D1(SAc)**- und **D2(SAc)**-Klasse festgestellt. Sehr groß war die Differenz zwischen den MHK-Werten innerhalb der **D3(SAc)**-Klasse. Eine bakterizide Wirkung wurde jedoch bei keiner der getesteten Substanzen nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich für die ermittelten MHK-Werte der schichtbildenden Substanzen gegenüber den Testkeimen feststellen, dass keine Wachstumshemmung im für die Schichtbildung relevanten Konzentrationsbereich beobachtet wurde. Zum Vergleich soll erwähnt werden, dass die Wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika üblicherweise im Bereich von Mikrogramm pro Milliliter liegt. Auch die nach der MHK-Bestimmung durchgeführten MBK-Tests fielen negativ aus. Daher kann festgehalten werden, dass die beobachteten bakterienabweisenden Eigenschaften der untersuchten SAMs allein auf die Biorepulsion zurückzuführen war. Verwunderlich waren die Unterschiede der MHK-Werte innerhalb der Klassen. So wurde beispielsweise bei *P. aeruginosa* eine Empfindlichkeit gegenüber **D3(SAc)₄₀₀₀** bereits bei 2 mmol und gegenüber **D3(SAc)₈₀₀₀** erst bei 32 mmol nachgewiesen.

4 Ergebnisse

Da die visuelle Unterscheidung des Trübungsgrades nicht einfach ist, kann es jedoch auch hier zu Fehleinschätzungen gekommen sein.

5 Zusammenfassender Vergleich der Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Methoden, die Plattenzählmethode, die Epifluoreszenzmikroskopie und die SPR-Spektroskopie zur Untersuchung der Bakterienadhäsion eingesetzt. Die ersten beiden Methoden, die eingehender untersucht wurden, eigneten sich gut für die Quantifizierung der adhärirten Bakterien. Durch die SPR-Spektroskopie gelang es zwar, die Oberfläche-Bakterium Interaktion zu detektieren, jedoch gab es wesentliche Probleme bei der Quantifizierung der Adhäsion durch die Kombinationsversuche der SPR mit der Epifluoreszenzmikroskopie. Daher lieferte die SPR-Spektroskopie nur qualitative Aussagen über das Adhäsionsverhalten der Testkeime.

Während die Plattenzählmethode durch das Auszählen abgelöster und rekultivierter Bakterien bzw. Kolonien-bildenden Einheiten Rückschlüsse auf die Bakterienadhäsion erlaubte, stellte die Epifluoreszenzmikroskopie eine Methode dar, die adhärirte Bakterien direkt auf den Testsubstraten nachwies und quantifizierte. Im Folgenden sind die beobachteten Vor- und Nachteile der Methoden und ihre möglichen Fehlerquellen kurz zusammengefasst.

Im Verlauf der Arbeit hat sich gezeigt, dass die zusätzlichen Arbeitsschritte bei der Plattenzählmethode nicht nur zeitaufwendig sind, sondern auch potenzielle Fehlerquellen darstellen können. So ließ sich das notwendige Ablösen der Bakterien von den Testsubstraten nach der Optimierung im Rahmen der Vorversuche zwar sicherer durchführen, trotzdem konnten in einigen Versuchen die adhärirten Bakterien nur unzureichend oder gar nicht abgelöst werden.

Zwei unterschiedliche Ablösevorgänge wurden dabei getestet. Zur Ablösung von *S. epidermidis* ATCC 14990 kam Ultraschall zum Einsatz, während der Transfer von *E. coli* WT-Zellen durch Auflegen der Proben auf die Agarplatten erreicht wurde. Zusammenfassend lässt sagen, dass der Ablösevorgang durch Ultraschall effektiver war als das Abklatschen auf eine Agarplatte. Aber auch bei der Abklatschmethode ließ sich durch Kombination von drei Transfervorgang-Zyklen der gleichen Probe einerseits das möglichst quantitative und andererseits ein „fraktioniertes“ Ablösen der Bakterien erzielen. Das Ergebnis war, dass auf den Nährböden meistens scharf voneinander isolierte CFU entstanden sind, die gut auszählbar waren. Der Aspekt

5 Zusammenfassender Vergleich der Methoden

der Auszählbarkeit abgelöster und rekultivierter Zellen war auch beim Einsatz von Ultraschall als Ablösevorgang nicht unwichtig. Die Keimzahl in der Testsuspension nach der Ultraschallbehandlung, insbesondere bei den unmodifizierten Metallsubstraten, war sehr hoch, was einen zusätzlichen Verdünnungsschritt notwendig machte. Trotz 10facher Verdünnung konnte in manchen Versuchen eine „Verschmelzung“ der CFU nicht vermieden werden. Weitere Nachteile der Plattenzählmethode sind die lange Inkubationsdauer von mindestens 12 h sowie die nicht zu unterschätzende Vorbereitungsarbeit wie beispielsweise Autoklavieren und Gießen der Nährböden.

Hinsichtlich der Quantifizierung der Bakterienadhäsion kann festgestellt werden, dass die Plattenzählmethode keine absoluten Zahlen der adhärenierten Bakterien lieferte. Es muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass die tatsächlichen Zahlen deutlich höher lagen als ermittelt. Trotzdem konnte diese Methode als zuverlässig zur Auswertung der Bakterienadhäsion eingestuft werden, da diese richtige Aussagen über die Adhäsionsvorgänge lieferte. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Plattenzählmethode mit denen der Epifluoreszenzmikroskopie war im Laufe der Arbeit erkennbar und wurde bereits diskutiert (vgl. Abschnitt 4.4.4).

Grundlegend unterschiedlich waren die Arbeitsschritte bei der Epifluoreszenzmikroskopie. Das Anfärben der Proben, das meistens direkt nach der Adhäsion und dem Waschvorgang mit DAPI erfolgte, war der notwendige Arbeitsschritt bei dieser Methode. Da die Adhäsionsexperimente sehr viel Zeit in Anspruch nahmen, war die Markierung der Proben oft erst ca. 12 h nach der Adhäsion möglich. Auch wenn die Proben für diese Zeit im Kühlschrank gelagert wurden, stellte dieser verzögerte Arbeitsschritt eine mögliche Fehlerquelle dar. Weiterhin war bei der Epifluoreszenzmikroskopie die Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs nicht unproblematisch. Auch wenn es kein schnelles Bleichen während einer mikroskopischen Untersuchung beobachtet wurde, wurden die Arbeiten im Dunkeln durchgeführt, um einen exponentiellen Zerfall des DAPI-DNS-Komplexes im Anregungslicht zu verhindern. Allerdings konnte einerseits wegen der Nutzung der für die Adhäsionsexperimente notwendigen technischen Ausstattung in drei unterschiedlichen Häusern und andererseits wegen der häufig auftretenden Funktionsfehler am Mikroskop nicht immer sofort nach dem Anfärben eine Auswertung bzw. mikroskopische Untersuchung durchgeführt werden.

Der wichtigste Arbeitsschritt bei der Epifluoreszenzmikroskopie war die quantitative Auswertung mit Hilfe des Bildanalyseprogramms *ImageJ*. Bedingt durch das un-

5 Zusammenfassender Vergleich der Methoden

gleichmäßige Wachstum der Bakterien auf der Probenoberfläche mussten vor dem eigentlichen Zählschritt die zusammengewachsenen Bakterienkolonien mit dem *Pen-Tool* graphisch voneinander getrennt werden. Daher war dieser Arbeitsablauf, anders als angestrebt, weder voll automatisiert noch benutzerunabhängig. Somit waren potenzielle Fehlerquellen dabei nicht auszuschließen.

In Summe kann jedoch festgestellt werden, dass die Fluoreszenzmethode eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur kultivierungsabhängigen Auswertung ermöglichte und häufig eine um zwei Größenordnungen größere Zellzahl detektierte als die Plattenzählmethode. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Epifluoreszenzmikroskopie den tatsächlichen Verhältnissen im Adhäsionsgeschehen näher kommen, jedoch auch keine absoluten Zahlen darstellen. Als Hauptgrund hierfür müssen die bereits diskutierten möglichen Fehlerquellen bei der Bildanalyse in Betracht gezogen werden.

Als gemeinsamer Nachteil der beiden Methoden ist jedoch, dass sie wenig Einblickmöglichkeit in den eigentlichen Adhäsionsprozeß bieten. D. h. nicht der Fortschritt der Bindungsprozesse konnte beurteilt werden, sondern nur das Ergebnis der Adhäsion dokumentiert werden. Die Detektion der Wechselwirkungen zwischen Bakterien und der Oberfläche in der Echtzeit war durch SPR-Spektroskopie möglich. Dabei bestand zwar das Problem der Quantifizierung, jedoch bestätigten qualitative Aussagen dieser Untersuchungen tendenziell die Ergebnisse aus den beiden quantitativen Methoden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Lösemittel

Die verwendeten absoluten Lösemittel wurden durch mehrtägiges Sieden in einer Umlaufdestillationsapparatur über den angegebenen Trockenmitteln (Tabelle 44) und anschließender Destillation unter Stickstoff-Atmosphäre erhalten.

Lösungsmittel	Trockenmittel
Tetrahydrofuran	Na/K-Legierung
Methanol	Mg
Ethanol	Mg

Tabelle 44: Verwendete Lösemittel.

6.2 Verwendete Messgeräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 45 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien sowie über die Hersteller und Bezugsquellen.

Material/Gerät	Hersteller
Elektronenstrahl-Verdampfungsanlage	Leybold
Tiegeleinsatz 25 Elektrographit, Außendurchmesser 22 mm, Höhe 9 mm	Leybold
Plasma-Cleaner/Sterilizer PDC-32G	Harrick
Brutschrank, Function Line Typ B12	Heraeus,
Autoklav, Typ 3870 ELV, S/N 2012020	Systec
Sicherheitswerkbank, Hera safe	Heraeus

6 Experimenteller Teil

Material/Gerät	Hersteller
Sterilwerkbank, Hera gard	Heraeus
Dokumentationsanlage BioDoc	Biometra
Reinstwasseranlage, Milli-Q Synthesis, S/N F1EN01253H	Millipore
Zentrifuge Biofuge, Stratos (Rotor: 3046)	Heraeus
Spektralphotometer (Bio Cary 50)	Varian
Schüttelinkubator, Haube Certomat H, S/N 8863453 Certomat R, S/N 8863024	Braun Biotech International
Ultraschallbad USR3	Julabo Labortechnik GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
pH-Meter, inoLab pH Level 1, S/N 02000020	WTW
Kolbenhubpipette, variabel 100-1000 µL; Multipipette Kolbenhubpipette, variabel 10-100 µL	Eppendorf Roth
Einmalküvetten halbmikro 1,5 mL	Brand
Petrischalen mit Nocken 92x16 mm Zentrifugenröhrchen 15mL, 50 mL	Sarstedt
Multistep-Pipette (8-Kanal)	Hirschmann,
Mikrotiterplatten	Merck (VWR)
Drigalskispatel	Roth
Epifluoreszenzmikroskop: Axioskop 2 Kamera: MC 200 CHIP Objektiv: Ph2 Plan-Neofluar	Zeiss
UV- Lampe: HBO 100W	Osram

Tabelle 45: Verwendete Messgeräte und Verbrauchsmaterialien.

6.3 Puffer und Nährmedien

CASO-Agar und Trypton Soja Bouillon wurden nach dem Herstellerhinweis zubereitet. Puffer, physiologische Kochsalzlösung und Nährmedien wurden 15 Minuten bei 120 ° C autoklaviert.

Puffer, NaCl-Lösung und Trypton Soja Bouillon wurden nach der Abkühlung im Kühlschrank bei 4 ° C aufbewahrt. Je 20 mL CASO-Agar wurden unter keimfreien Bedingungen der *Laminar-Flow-Box* mittels einer Peristaltikpumpe in die Petrischalen mit Nocken (sorgt für ausreichende Sauerstoffzufuhr) gegeben und bei 4 ° C im Kühlschrank maximal für vier Wochen aufbewahrt.

Die Tabelle 46 gibt den Überblick über die Zusammensetzung und Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Nährmedien.

Medien	Zusammensetzung	Bezugsquelle
N1 Nährbouillon, pH=7,3	0,5 mg/mL Insulin aus Rinderpankreas 0,5 mg/mL humanes Transferrin 0,5 mg/mL Natriumselenit 1,6 mg/mL Putrescin 0,7 µg/mL Progesteron	Merck(VWR) Hamburg
Trypton Soja Bouillon (TSB), pH = 7,3	17 g/L Caseinpepton 2,5 g/L Kaliumhydrogenphosphat 2,5 g D(+)Glycose 5 g/L Natriumchlorid 3 g/L Sojapepton	VWR
Trypton Soja Bouillon-supplementiert mit Tween	0,05%-ige Tween-Lösung in TSB	Selbst hergestellt
Müller-Hinton-Bouillon, pH=7,4	Rindfleisch 2,0 g Caseinhydrolysat 17,5 g Stärke 1,5 g	Becton Dickinson, Sparks MD, USA
CASO-Agar, pH = 7,3	15 g/L Agar	VWR

6 Experimenteller Teil

Medien	Zusammensetzung	Bezugsquelle
	15 g/L Caseinpepton 5 g/L Natriumchlorid 5 g/L Sojapepton	
Physiologische Kochsalzlösung	0,9%-ige NaCl Lösung	Selbst hergestellt
Blutagar	Fleischextrakt 10 g/L Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Agar-Agar 15 g/L Zusatz: Defibriertes steriles Schafsblut 70 mL/L	CM Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Phosphat-gepufferte Salzlösung, (PBS), pH = 7,4	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Phosphate	Selbst hergestellt

Tabelle 46: Puffer und Nährmedien.

6.4 Verwendete Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gold-, Stahl- und Aluminiumsubstrate untersucht und modifiziert. Diese wurden aus handelsüblichem Stahl und Aluminium in der Forschungswerkstatt des Departments Chemie in 20 mm x 20 mm große Substrate geschnitten.



Abb. 126: Stahlfolie vor dem Schneiden.

Die Erzeugung der Goldsubstrate erfolgte durch das Aufdampfen von Gold auf die Stahlsubstrate. Nachfolgende Tabelle 47 gibt einen Überblick über die verwendeten Substrate, deren Zusammensetzungen und Bezugsquellen.

Substrat	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Stahlfolie, nicht rostend	18 Cr, 9 Ni	Hoffmann GmbH, Achim
Aluminiumblech	Al	Hoffmann GmbH, Achim
Gold	Feingold-Granulat 99,99%	Allgemeine Gold und Silberscheideanstalt AG

Tabelle 47: Verwendete Substrate.

6.5 Verwendete schichtbildende Moleküle

In Tabelle 48 sind die in dieser Arbeit für die SAM-Bildung verwendeten Moleküle aufgelistet. Bei den Dendrimeren ist die angestrebte Molmasse angegeben (vgl. Abschnitt 4.4).

Außerdem enthält die Tabelle Angaben über das auf die schichtbildende Substanz abgestimmte Substrat. Dabei kamen Gold, Stahl und Aluminium bzw. deren native Oxide als Metallsubstrate zum Einsatz.

Weiterhin gibt Tabelle 48 einen Überblick über die Lösemittel, die für die Abscheidung der Monoschichten eingesetzt wurden. Da die Qualität selbstanordnender

6 Experimenteller Teil

Monoschichten bei Abscheidung aus der Lösung stark von den gewählten Bedingungen, unter anderem vom Wassergehalt des Lösemittels, abhängen kann, wurden absolute Lösemittel verwendet.

In den Abschnitten 6.8 und 6.10 wird der Herstellungsprozess der selbstanordnenden Monolagen auf Gold und oxidischem Stahl- und Aluminium ausführlich beschrieben.

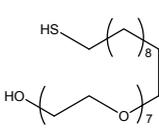
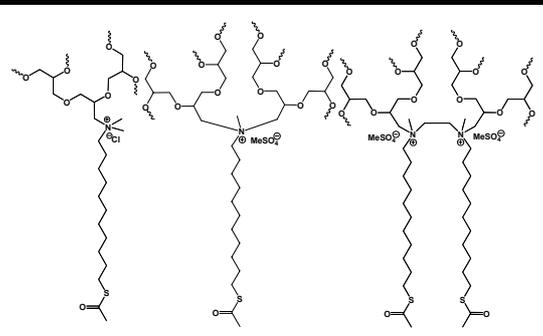
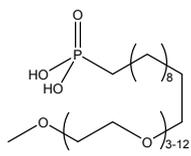
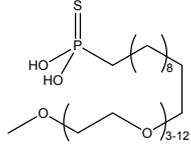
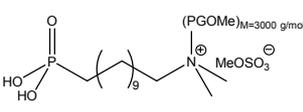
Schichtbildende Substanz	Struktur	Substrat	Lösemittel
HOEG ₇ C ₁₁ SH		Au(111)	EtOH
D1(SAc) ₄₀₀₀		Au(111)	MeOH
D1(SAc) ₈₀₀₀		Au(111)	MeOH
D2(SAc) ₃₀₀₀		Au(111)	MeOH
D2(SAc) ₅₀₀₀		Au(111)	MeOH
D3SAc) ₄₀₀₀		Au(111)	MeOH
D3(SAc) ₈₀₀₀		D1, D2, D3-Klassen der Dendrimere	Au(111)
MeOEG ₍₃₋₁₂₎ C ₁₁ P(O)(OH) ₂		Stahl, Aluminium	THF
MeOEG ₍₃₋₁₂₎ C ₁₁ P(S)(OH) ₂		Stahl, Aluminium	THF
MeD1(Phosphon) ₃₀₀₀		Stahl, Aluminium	MeOH

Tabelle 48: SAM-bildende Substanzen.

6.6 Herstellung der Goldsubstrate

Die Herstellung der Au(111)-beschichteten Substrate erfolgte durch Elektronenstrahlverdampfung. Dafür wurden die 20 mm x 20 mm Stahlsubstrate mit Hilfe eines Substrathalters und handelsüblichen Tesafilms (Arbeitsschritt 1, Abb. 128) im Rezipienten der Elektronenstrahlverdampfungsanlage plziert. Danach wurden Chrom- und Gold-Granulat in Graphit-Tiegeln in die dafür vorgesehene Tiegelhalter als Dampfquelle eingesetzt. Anschließend wurde die Verdampfungsanlage bis zu einem Druck von $<10^{-5}$ mbar evakuiert (ca. 1,5-2 h). Zunächst wurde für die Haftvermittlung eine 2 nm dicke Cr-Schicht auf das Substrat aufgebracht. Anschließend wurde eine Goldschicht von 50 nm Dicke aufgedampft. Bei den beiden Aufdampfprozessen betrug die Aufdampftrate 0,1 nm/s.



Abb. 127: Goldsubstrate in der angefertigten Aufbewahrungs- und Transportbox.

Nach dem Belüften der Anlage wurden die Goldsubstrate in speziell angefertigte Boxen (Abb. 127) verpackt. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt.

6.7 Reinigung der Goldsubstrate

Au(111)-Substrate wurden durch eine dreiminütige Behandlung mit Dichlormethan, Aceton und Methanol im Ultraschallbad von Verunreinigungen befreit. Anschließend

wurden die Goldsubstrate mit Wasserstoffplasma behandelt. (Arbeitsschritte 2 und 3, Abb. 128) Der Unterdruck wurde durch eine Drehschieberpumpe erzeugt und durch das Feinventil am Rezipienten des Plasma Cleaners reguliert.

6.8 Protokoll für die Präparation von SAMs auf Gold

Die Bildung von SAMs erfolgte unter Stickstoff als Schutzgas und unter Verwendung absoluter Lösemittel. Für die Erzeugung von Thiolat-SAMs wurden die gereinigten Substrate über Nacht in einer Kristallisierschale, die in einem Exsiccator platziert war, mit einer ethanolischen Lösung des jeweiligen Thiols ($c = 1 \text{ mmol/L}$) bzw. Thioacetats ($c = 5 \text{ mmol/L}$) überschichtet. Bei der Bildung von PG-terminierten SAMs wurde für die bessere Löslichkeit Methanol als Lösemittel verwendet. Nach der Bildung der Monoschicht wurden die modifizierten Substrate in das für die Beschichtung verwendete Lösemittel gelegt, mit diesem gründlich abgespült, im Stickstoffstrom getrocknet und staubfrei in eine Petrischale gepackt.

Die Arbeitsschritte 4 und 5 in Abb. 128 geben den Ablauf der SAM-Präparation wieder.

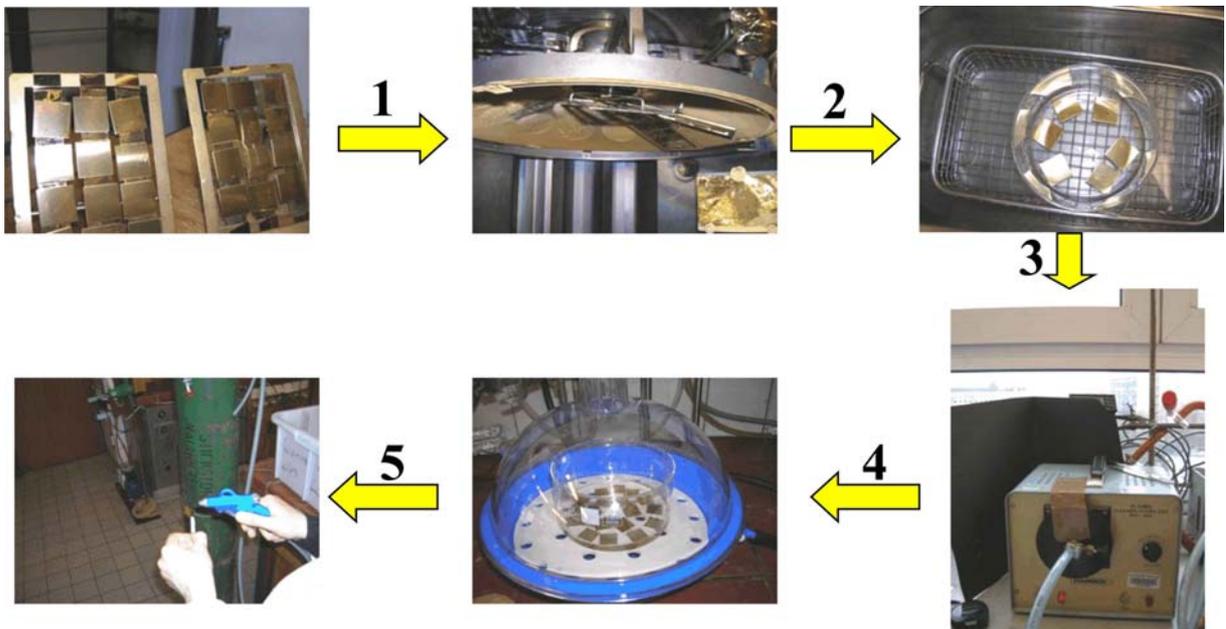


Abb. 128: Herstellung, Reinigung und Modifizierung der Goldsubstrate.

6.9 Reinigung der Stahl und Aluminiumsubstrate

Die Stahl- und Aluminiumsubstrate wurden durch jeweils fünfminütige Behandlung mit 1%iger wässriger SDS-Lsg. (*Sodium dodecyl sulfate*), Wasser, Dichlormethan, Aceton und Methanol³⁸² im Ultraschallbad gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.10 Protokoll für die Erzeugung von SAMs auf Stahl und Aluminium³⁷⁹

Zur Schichtbildung wurden die vorher gereinigten Metallsubstrate 10 Minuten mit heißem Methanol behandelt und im Trockenschrank 1 h bei 160 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben in eine Kristallisierschale gelegt und mit 0,75 mM Lösungen der jeweiligen Verbindung in absolutem THF mit Hilfe eines Zerstäubers besprüht (Abb. 129).



Abb. 129: Zerstäuber zum Besprühen von Stahl- und Aluminiumsubstraten.

Danach wurden die Substrate 18 h bei einer Temperatur von 120 °C getempert, dann für 5 Minuten in THF eingelegt, anschließend gründlich mit THF gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.11 Verwendete Testorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 49 aufgeführt. Die Tabelle enthält zusätzlich Hinweise auf die Gram-Antwort und die Herkunft der Stämme.

Organismus	Gramverhalten	Bezeichnung/Herkunft
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram-positiv	ATCC 14990/GK 2278
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positiv	ATCC 6538/GK 774
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativ	WT/GK 571
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativ	MIII/GK 574
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negativ	PAO/GK 1220

Tabelle 49: Testorganismen.

Alle Testorganismen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig aus der Gruppenkulturen-Sammlung (GK) zur Verfügung gestellt. Bei den Testorganismen handelt es sich um Reinkulturen. Die Staphylokokken stammten aus der Stammsammlung **American Type Culture Collection, ATCC**. Bei *E. coli* WT handelt es sich um ein Stuhlisolat aus einem gesunden Probanden, der noch nie mit Antibiotika behandelt worden ist.³⁸⁴ Ein wichtiges genetisches Merkmal von *Pseudomonas aeruginosa* PAO war die nachgewiesene Rifampicin-Resistenz, deren molekulare Basis die Mutation des *rpoB* Gens darstellte.³⁴⁰

Tabelle 50 gibt einen Überblick über die Konzentrationen der Testorganismen und Medien in den Bakterienadhäsionsuntersuchungen.

Testorganismus	Testkonzentration [CFU/mL]	Adhäsionsmedium
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$1 \cdot 10^7$	TSB
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1 \cdot 10^7$	TSB
<i>Escherichia coli</i>	$1 \cdot 10^5$	PBS
<i>Escherichia coli</i> MIII	$1 \cdot 10^9$	PBS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1 \cdot 10^9$	PBS

Tabelle 50: Adhäsionskonzentrationen und –medien.

6.12 Dauerhafte Lagerung der Testorganismen

Ein Kryoröhrchen mit Schraubverschluss und einem Fassungsvermögen von 2 mL wurde mit 0,5 mL N1-Bouillon als Suspensionsmedium, Glycerin als Schutzstoff (Endkonzentration 43,5%) und 10 Glasperlen gefüllt und vorsterilisiert. Von der Agarkultur, die nicht älter als 24 Stunden war, wurden einzelne Kolonien in die Suspension gegeben und das Kryoröhrchen zur Inkubation 30 Minuten bei RT gelassen. Anschließend wurde das Suspensionsmedium mit einer Pipette oberhalb der Glasperlen abgenommen, das Röhrchen beschriftet und im Tiefkühlschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Allgemein wurden alle Arbeitsschritte mit den Dauerkulturen in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt (Abb. 130).



Abb. 130: Mikrobiologische Sicherheitswerkbank.

6.13 Plattenkulturen der Testorganismen

Zum Anlegen der Arbeitskulturen für den täglichen Bedarf erfolgte periodisches Überimpfen der Testorganismen von konservierten Kulturen. Diese Arbeit erfolgte in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (vgl. Abb. 130, 6.12). Mit diesem Verfahren wurden die Testorganismen reaktiviert.

Mittels einer Impföse aus Platin-Iridium-Draht (90% Pt, 10% Ir), mit einem Ring am vorderen Ende wurde eine bakterienbeladene Glasteile aus dem Kryoröhrchen der Dauerkultur entnommen und auf einer beschrifteten CASO-Agarplatte aufgebracht. Nach der 24-stündigen Bebrütung des rekultivierten Stammes bei 37 °C wurde eine zweite Subkultur im Verdünnungsausstrich angelegt, um die Vitalität der Bakterien zu verbessern und die Reinheit zu überprüfen. Dabei wurden die Bakterien zur Gewinnung gut isolierter Einzelkolonien durch die Drei-Ösen-Ausstrich-Methode auf der Platte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Praktisch wurde so vorgegangen, dass im ersten Schritt mit Impfmaterial beladene Öse oder ein steriler Glasstab in Zickzacklinien über die Hälfte der Agaroberfläche geführt wurde. Im zweiten Schritt wurde die ausgeglühte Öse oder ein neuer Glasstab zweimal durch den ersten Ausstrich geführt und ein weiteres Viertel der Nährbodenoberfläche beimpft. Im dritten Schritt wurde mit erneut ausgeglühter Öse analog zum zweiten Schritt das letzte Viertel der Agaroberfläche beimpft.

Vor und nach dem Gebrauch wurde die Impföse durch Ausglühen in der Bunsenbrennerflamme sterilisiert. Das Kryoröhrchen wurde sofort in den Tiefkühlschrank zurückgestellt. Die Arbeitskulturen wurden im Kühlschrank bei 4-6 °C aufbewahrt, um

die Stoffwechselaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit der Testorganismen herabzusetzen. Abb. 131 gibt die Arbeitsschritte der Reaktivierung der Dauerkulturen wieder.



Abb. 131: Die Arbeitsschritte zur Reaktivierung der Dauerkulturen.

6.14 Aufnahme der Wachstumskurven der Testorganismen

Vor der Aufnahme einer Wachstumskurve wurde eine frische Übernachtskultur angeimpft. Dafür wurden von der Plattenkultur des zu testenden Organismus einige einzeln liegende Kolonien in einem Erlenmeyerkolben mit 25 mL TSB suspendiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 130 rpm wurden dieser Vorkultur 1000 µL entnommen und in 100 mL TSB überimpft. Von diesem Zeitpunkt ($t = 0$ Minuten) an wurden in regelmäßigen Zeitintervallen jeweils 1 mL Probe entnommen und im Photometer bei 550 nm gemessen. Ab einem Trübungswert von $OD > 0,3$ wurden die Proben vor der Messung um den Faktor 10 verdünnt. Die Trübungsmessung wurde in regelmäßigen zeitlichen Abständen bis zum Erreichen der stationären Phase nach 400 Minuten wiederholt.

6.15 Übernachtskultur, Wachstums- und Kultivierungsbedingungen vor der Adhäsion

Vor jedem Adhäsionsexperiment wurden Übernachtskulturen der Organismen angesetzt. Hierfür wurden von der maximal 4 Wochen alten Arbeitsplatte einzeln liegende Kolonien mit einem sterilen Glasstab in 100-150 mL Erlenmeyerkolben mit 25 mL TSB suspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Kulturvolumen höchstens 20% des Kolbenvolumens betrug. Das Inokulum wurde bei 37 °C und 130 rpm im

Inkubationsschüttler geschüttelt. Diese Inkubationsmethode schafft einheitliche Bedingungen zum Bebrüten.

Am nächsten Tag wurden 500 µL der Vorkultur in 100 mL TSB überimpft und bei 37°C und 130 rpm bis zur gewünschten optischen Dichte hoch gezüchtet. Anschließend wurde die Bakteriensuspension, wie im Falle der Staphylokokken direkt über die Testsubstrate gegeben (vgl. 6.19).

Bei *E. coli* und *P. aeruginosa* wurde die Bakteriensuspension bei 3000 rpm (entsprechend einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 1062) 10 Minuten zentrifugiert. Der geerntete Zellpellet wurde in 10 mL PBS (pH=7,4) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde der Zellpellet in PBS (pH=7,4) resuspendiert und die Testsuspension gewünschter Konzentration wurde hergestellt (vgl. 6.17-6.18).

6.16 Bestimmung der Lebendkeimzahl der Testsuspension

Die Ausgangszellen für die Lebendkeimzahl werden als *Colony Forming Unit* (CFU) bezeichnet. Die Lebendkeimzahl wird als CFU/mL angegeben. Für die Ermittlung der Lebendkeimzahl wurde eine serielle Verdünnung (1:10) in steriler physiologischer Kochsalzlösung der Testsuspension hergestellt. Dabei wurde von einer Bakteriensuspension (10^0) ausgegangen. Diese wurde auf dem Vortexer homogenisiert. Danach erfolgte mittels einer Präzisionspipette eine Übertragung von 500 µL Suspension in 4,5 mL sterile NaCl-Lösung. Auf dieser Weise wurde bis zur Verdünnung 10^{-7} gearbeitet, wobei auf Homogenisieren der Bakteriensuspension vor der Probenentnahme und Wechsel der Pipettenspitzen geachtet wurde. Von den Verdünnungsstufen 10^{-7} - 10^{-4} wurden definierte Volumen, in der Regel 50 µL, auf die Oberfläche von Nährböden aufgebracht und mit einem sterilen Glasstab oder Drigalskispatel möglichst gleichmäßig verteilt und zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Über Nacht entstandene Einzelkolonien wurden am nächsten Tag gezählt und die CFU nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{CFU} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Verdünnungsstufe} \cdot \text{aufgetragenes Volumen [mL]}}$$

6 Experimenteller Teil

Die Herstellung der Testsuspension mit definierter Keimdichte erfolgte wie unter 4.1.2 beschrieben über die Messung der optischen Dichte und Vergleich mit McFarland Standards (Tabelle 51).

Standard	Bakteriendichte x 10 ⁶ /mL	Optische Dichte theoretisch bei 550 nm
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

Tabelle 51: McFarland Standards.

6.17 Adhäsionsprotokoll *P. aeruginosa*³⁴³

Vor dem Adhäsionsexperiment wurde eine Übernachtskultur von *P. aeruginosa* angesetzt. Dafür wurden 25 mL TSB mit einigen Kolonien von der Plattenkultur angeimpft und bei 37 ° C und 130 rpm 18 h im Inkubationsschüttler inkubiert. Dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 500 µL entnommen und in 100 mL frischem TSB suspendiert. Nachdem der Zellzuwachs eine OD₅₅₀ = 1 erreicht hatte, wurden die Zellen bei 4 ° C und 3000 rpm (entsprach einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 1062) 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Zellpellet wurde in 10 mL PBS (pH = 7,4) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem dritten Waschgang wurde der geerntete Zellpellet in sterile PBS bis zur Endkonzentration von 10⁸ Zellen/mL aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde seriell verdünnt und auf Cetrimid-Agar verteilt, um die Zellkonzentration zu bestimmen.

Die zu untersuchenden Substrate wurden mit Ethanol gespült, vertikal in die Adhäsionsboxen gestellt, mit 50 mL Testsuspension bedeckt und 3 h bei 40 rpm und 37 ° C im Inkubationsschüttler inkubiert. Nach dem Waschen der Proben wurden diese mit

DAPI-Lösung angefärbt (vgl. Abschnitt 6.21) und vor der mikroskopischen Untersuchung im Dunkeln gelagert.

Die Ermittlung der CFU pro cm² Substrat basierte auf dem Mittelwert der Anzahl der Bakterien von mehreren Mikroskopieaufnahmen. Insgesamt wurden 16 Fluoreszenzaufnahmen pro Probe gemacht, wobei jeweils ein Feld von $1,444 \cdot 10^{-3}$ cm² Fläche betrachtet wurde. Daher ergab die Division der durchschnittlichen Keimzahl durch die Zahl 0,023104, die durch die Multiplikation der Fläche mit der Anzahl der Aufnahmen zustande kommt, die CFU pro cm² Probe.

Um die Vitalität der Zellen nach dem Adhäsionsexperiment zu überprüfen, wurden aus der Bakteriensuspension drei Verdünnungsstufen auf die Agarplatten verteilt und rekultiviert.

6.18 Adhäsionsprotokoll für *E. coli*³⁴²

Vor dem Adhäsionsexperiment wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* angesetzt. Dafür wurden 25 mL TSB mit einigen Kolonien von der Plattenkultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm 18 h im Inkubationsschüttler inkubiert. Dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 500 µL entnommen und in 100 mL frischem TSB suspendiert. Nachdem der Zellzuwachs eine OD₅₅₀ = 0,5 erreicht hatte, wurden die Zellen bei 4 °C und 3000 rpm (entspricht einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 1062) 10 Minuten zentrifugiert. Die Bakterien wurden dreimal mit PBS (pH = 7,4) gewaschen. In jedem Waschgang wurden die Zellen in 10 mL PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem dritten Waschgang wurde der geerntete Zellpellet in sterile PBS bis zur Endkonzentration von 10⁵ Zellen/mL aufgenommen.

Diese Zellsuspension wurde seriell verdünnt, um die exakte Zellkonzentration zu bestimmen.

Die Testsubstrate wurden direkt vor Gebrauch mit EtOH gespült. Anschließend wurden sie vertikal in die Adhäsionsboxen gestellt, 50 mL *E. coli* Suspension (1·10⁵ Zellen/mL) zugefügt und bei 40 rpm und 37 °C 1 h in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension in den Adhäsionsboxen mit frischem, sterilem PBS ersetzt. Im Waschgang wurden die Substrate durch 100 mL PBS mit Hilfe der Spülvorrichtung (vgl. 4.1.3) einzeln gespült, um die ungebundenen Bakterien zu entfernen. Nach dem Abtropfen des PBS wurde die besiedelte Seite

jedes Substrates auf die CASO Agar-Oberfläche aufgedrückt und nach 30 s wieder abgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal mit den neuen Agarplatten wiederholt, sodass insgesamt drei Agarplatten zum Zelltransfer zur Verfügung standen.

Nach der Bebrütung über Nacht bei 37 ° C wurden die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt und die CFU pro cm² Substrat ermittelt. Dazu wurde der Mittelwert berechnet und durch anschließende Division durch die Zahl vier (Bezug auf die Probenfläche) der CFU pro cm² berechnet.

Um die Vitalität der Zellen nach dem Adhäsionsexperiment zu überprüfen, wurden aus der Bakteriensuspension drei Verdünnungsstufen auf die Agarplatten verteilt und rekultiviert.

6.19 Adhäsionsprotokoll für *S. epidermidis*³⁴² (Statisches Adhäsionsassay)

Vor dem Adhäsionsexperiment wurde eine Übernachtskultur von *S. epidermidis* angesetzt. Dafür wurden 25 mL TSB mit einigen Kolonien der Plattenkultur des Testkeims angeimpft und bei 37 ° C und 130 rpm 18 h im Inkubationsschüttler inkubiert. Dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 500 µL entnommen und in 100 mL frisches TSB suspendiert. Nachdem die Testsuspension in TSB eine OD₅₅₀ = 0,25 (McFarland 1, 4.1.4) aufwies, wurde diese aus dem Inkubationsschüttler genommen. Durch die Wahl von McFarland 1 konnte eine ausreichende Keimkonzentration von 1·10⁷ Bakt./mL sichergestellt werden.

Die frisch mit EtOH gespülten Substrate wurden mit der Bakteriensuspension überschichtet und bei 37 °C inkubiert. Die Detektion adhärerter Bakterien erfolgte bei *S. epidermidis* sowohl über konventionelle Kultivierung im Rahmen der *Plate count* Methode als auch mit EpiFluoreszenzmikroskopie.

Die Vorgehensweise bei der ersten Methode war wie folgt: nach der Expositionszeit von 30 Minuten wurden die Substrate mit 100 mL sterilem PBS (pH= 7,4) mit Hilfe der Spülvorrichtung gewaschen und in Zentrifugenröhrchen mit 10 mL TSB, supplementiert mit 0,05 % Tween 80, platziert (Abb. 132).



Abb. 132: Die Testsubstrate nach der Adhäsion in TSB-Tween-Lsg.

Die Zentrifugenröhrchen mit jeweils einer Probe wurden nacheinander in die speziell angefertigte Halterung eingehängt (vgl. Abb. 40) und 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Nach diesem Schritt wurden die Proben sofort aus dem Zentrifugenröhrchen entfernt. Die Bakterienzellen, die während der Ultraschallbehandlung vom Substrat in die TSB-Tween 80-Lsg. übertragen worden sind, konnten nun durch deren Rekultivierung auf CASO-Agar sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden 50 μL der Bakteriensuspension der unverdünnten und 10fach verdünnten Lösung auf die Agarplatte gebracht und verteilt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 ° C im Brutschrank wurden am nächsten Tag die kolonienbildenden Einheiten gezählt und die CFU pro cm^2 Substrat ermittelt.

Für die Bestimmung der Zahl adhärierter Bakterien durch EpiFluoreszenzmikroskopie wurden die Proben nach dem Waschschrift mit DAPI versetzt (vgl. Abschnitt 6.21) und mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Nach der Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen mit dem Programm *ImageJ* wurde auch bei dieser Methode die CFU pro cm^2 Substrat als Endergebnis berechnet.

Um die Vitalität der Zellen nach dem Adhäsionsexperiment zu überprüfen, wurden aus der Bakteriensuspension drei Verdünnungsstufen auf die Agarplatten verteilt und rekultiviert.

6.20 Protokoll der SPR-Messung

Die SPR-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem umgebauten „Multiskop“ der Firma Optrel durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein NIR-Laser ($\lambda = 785$ nm). Flüssigkeitstransport erfolgte mittels Spritzenpumpen (*Perfusor Secura*) der Firma Braun durch Teflonschläuche ($\varnothing = 1$ mm). Bei der Flusszelle handelte es sich um selbst hergestellte PDMS-Kammern mit einem Volumen von 36 μL .¹²¹

Mindestens 15 Minuten vor jeder Messung wurde der Laser eingeschaltet, um eine konstante Intensität zu gewährleisten. Für die Messungen wurde ausschließlich entgaster und filtrierter Puffer (PBS, pH = 7,4) verwendet, um Luftbläschen und Kontaminationen im Schlauchsystem und in der Flusszelle zu vermeiden.

Für die SPR-Messungen wurden die Bakterien in gleicher Weise kultiviert wie für die Adhäsionsassays (vgl. Abschnitt 6.15). Die modifizierte Goldprobe bzw. die Goldreferenz wurde mit der Flusszelle in den Probenhalter eingebaut, der Laserstrahl justiert und der Hintergrund bei der leeren Flusszelle im Winkelbereich von 72-83 ° aufgenommen. Anschließend wurde die Flusszelle vorsichtig mit Puffer befüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftbläschen in die Flusszelle gelangen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 mL/h und einem Winkelbereich von 72-83° erfolgte dreimal die Messung der Intensität des reflektierenden Lichtes. Für die Messung wurde der Einfallswinkel 0,5° unter dem Reflektionsminimum gewählt. Die Bakterien-suspension wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/h in die Flusszelle geleitet und bei dem eingestellten Einfallswinkel ein Intensität-Zeit-Diagramm aufgenommen. Dabei wurde die Messzeit variiert. Nach beendeter Messung wurde erneut mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 mL/h 10 Minuten Puffer in das System geleitet. Die Intensitätsmessung des reflektierenden Lichtes erfolgte wieder zwischen 72 ° und 83 °. Als Messergebnis wurde die Resonanzwinkelverschiebung berechnet, die der Differenz zwischen den Resonanzwinkeln vor und nach der Messung entsprach. Nach jeder Messung wurde die Flusskammer mit 0,1%iger Natriumazidlösung gereinigt. Aus den Werten der Einzelmessungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

6.21 Protokoll für die Anfärbung von Zellen mit DAPI

Für die Detektion adhärierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie wurden die Bakterien mit DAPI angefärbt. Zunächst wurde eine Stammlösung von DAPI mit einer Konzentration von 1 mg/mL in demineralisiertem, sterilem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde im Gefrierfach bei -20 ° C aufbewahrt. Aus dieser Lösung wurde vor jedem Anfärbeschritt die Arbeitslösung mit der Konzentration 1 µg/mL hergestellt.³⁸⁵ Die Substrate mit den adhärten Bakterien und die Blindproben wurden mit 300 µL

DAPI-Lösung überschichtet. Nach 20 Minuten Expositionszeit bei RT im Dunkeln wurden die Proben mit sterilem Wasser gewaschen.

6.22 Mikroskopieprotokoll

Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss Axioskop II aufgenommen. Nach dem Start des Programms wurde der Objektträger in den Objekthalter eingespannt und die zu untersuchende Probe eingelegt. Anschliessend wurde zur Beobachtung des Bildes in dem Auflichtfluoreszenzmodus der DAPI-Filter ausgewählt, die Schärfe, die Tisch- und Objektivposition eingestellt. Die Fläche, die mit dem Mikroskop betrachtet wurde, entsprach $0,144 \text{ mm}^2$. Die Beobachtung erfolgte mit dem Plan-Neofluar 20x/0,50Ph Objektiv von Zeiss. Zur Bilddarstellung diente die gerätinterne Software AxioVision von Zeiss. Die angefärbten Zellen auf den Substraten erschienen unter dem Mikroskop als leuchtende Punkte, Ketten oder Agglomerate. Pro Probe wurden jeweils 16 Bilder aufgenommen und gespeichert.

Keine Bakterien wurden beobachtet auf den Blindproben, die nur mit PBS ohne Bakterien inkubiert wurden. Gelegentlich waren hell leuchtende Partikel zu erkennen, die vermutlich Phosphatreste darstellten, die scheinbar ebenfalls mit DAPI angefärbt wurden. Die Kontaminationsfreiheit wurde durch die visuelle Beurteilung der Blindproben sichergestellt.

6.23 Quantitative Bildanalyse mittels der Software *ImageJ*

Die Bilder wurden mit dem Java-basierten Programm *ImageJ* (*National Institutes of Health*) ausgewertet.³⁴⁹ Hier wurden die einzelnen Zellen, die in den Fluoreszenzbildern als leuchtende Punkte erschienen, als sogenannte *Direct Microscopy Counts* (DMC) gezählt. Für die Ermittlung der CFU wurde angenommen, dass jeder DMC einer CFU entspricht. Mit Hilfe der Probenfläche, die durch die Fluoreszenzaufnahme abgebildet wurde, konnte dann die CFU pro cm^2 Probe berechnet werden.

Zur Auswertung eines Bildes wurde dieses in dem Programm *ImageJ* geöffnet und in ein 8 bit Tif Format konvertiert. Danach wurde mit der *Threshold*-Funktion des Programms aus den Graustufenwerten des Bildes ein Grenzwert für den Hintergrund

6 Experimenteller Teil

definiert. Nach der Einstellung des Kontrastes und der Schärfe wurden die mehrstufigen Grauwerte in binäre schwarz/weiß Werte umgewandelt. Dann wurde das Bild invertiert, wodurch ein dunkler Vordergrund auf einem weißen Hintergrund erhalten wurde. Die leuchtenden Zellen des Fluoreszenzbildes erschienen als schwarze Punkte vor einem weißen Hintergrund.

Durch das Setzen eines Schwellenwerts konnten blasse Objekte (Artefakte) aus dem Bild entfernt werden. Diese Operation musste mit viel Vorsicht ausgeführt werden, da bei einer falschen Einstellung des Schwellenwerts ein Teil der Zellen nicht mitberücksichtigt wird. Das so erhaltene neue Bild wurde mit dem ursprünglichen Bild verrechnet und als Ergebnis wurde ein Bild erhalten, in dem die Zellen als getrennte Objekte erschienen. Durch die Anwendung der Optionen „*erode*“, „*dilate*“ und „*close*“ wurden dann Lücken in den hellen Strukturen geschlossen. Vorher mussten zusammenhängende Strukturen (Zellverbände), die zu einem einzelnen Objekt verschmolzen dargestellt wurden, durch die Anwendung des Zeichenstifts („*Pen*“) in ihre einzelnen Objekte zerlegt werden. Danach wurde die Auszählung der Zellen durchgeführt. Hierfür wurde ein Größenwert gesetzt, der darüber entschied, ab welcher Größe das Programm die Objekte automatisch erkannte. Mit dem Befehl „*exclude on edges*“ wurden Bakterien bzw. Objekte, die nur teilweise im Bild lagen, nicht berücksichtigt. Durch Anklicken der Schaltflächen „*display results*“, „*show outlines*“, und „*summary*“ wurden die Ergebnisse erhalten. Neben der Zahl der gezählten Objekte enthielt das Ergebnis auch Informationen über die individuelle und die durchschnittliche Größe der einzelnen Zellen.

Abb. 133 zeigt das Hauptmenü des Programms und in Tabelle 52 ist die Lage der verwendeten Funktionen im Programmsubmenü angegeben.

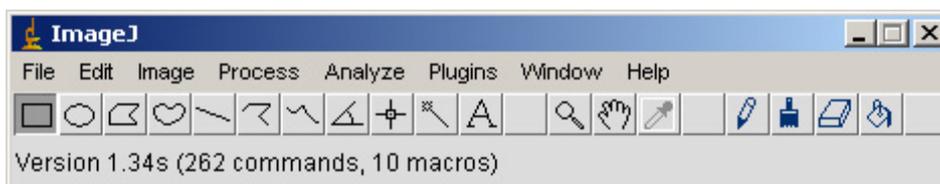


Abb. 133: Hauptfenster von *ImageJ* mit *Toolbar*.

6 Experimenteller Teil

Menü/Submenü/Werkzeug	Durchgeführte Operation
<i>File-open</i>	Öffnen und Speichern der Tif-Bitmaps
<i>Image-Type</i>	Konvertieren des Bildes in 8 bit
<i>Image- adjust- threshold</i>	Einstellung von <i>Threshold</i> und Kontrast
<i>Process-binary-make binary</i>	Schwellenwerteinstellung
<i>Process-erode-dilate-close</i>	Schließen der Lücken
<i>Process-image calculator</i>	Auswählen und Verrechnen des ursprünglichen (Image 1) und des konvertierten (Image 2) Bildes durch den Befehl „and“
<i>Pen</i>	Trennung zusammenhängender Objekte
<i>Analyse particles (circularity 0,001; size pixel 30-2000)</i>	Zählen einzelner Objekte
<i>Show outlines-display results-clear results-Save results</i>	Anzeigen und Speichern der Ergebnisse

Tabelle 52: Basisfunktionen von *ImageJ*.

6.24 Probenvorbereitung für die REM-Untersuchung

Nach dem Adhäsionsexperiment wurden die Proben mit PBS gewaschen und 2 h in 2,5%iger Glutaraldehydlösung in PBS eingelegt. Im Anschluss wurden die Proben dreimal mit PBS gespült und in aufsteigender Ethanolreihe entwässert. Hierzu sind die Proben jeweils 10 Minuten in 40, 50, 60, 70, 90 und 100% Ethanol eingelegt worden.³⁸⁶

Anschließend wurden die Proben mit Hilfe doppelseitiger Klebefolie auf die Träger für das rasterelektronenmikroskopische Untersuchung befestigt.

6.25 Protokoll zur Bestimmung minimaler Hemmkonzentration (MHK)

Für die Ermittlung der Empfindlichkeit der Testorganismen gegenüber den Substanzen, die für die SAM-Bildung verwendet wurden, wurde die MHK als Mikro-Bouillonverdünnung bestimmt. Hierfür wurde eine Stammlösung ($c = 128 \text{ mmol}$) der betreffenden Substanz in Wasser hergestellt.

Für die Herstellung des Inokulums wurden von den Arbeitsplatten mit einem sterilem Glasstab so viele einzelne Kolonien in 4,5 mL steriler NaCl-Lösung suspendiert, bis ein McFarland-Standard von 0,5 ($OD_{550} = 1,25 \pm 0,02$) erreicht war (eine gerade sichtbare Trübung der Suspension). Nach der Homogenisierung wurden der Ausgangssuspension mit einer Präzisionspipette 50 μL entnommen und in ein Röhrchen mit 4950 μL steriler Müller-Hinton-Bouillon gegeben.

Vor der Beschickung wurden die Mikrotiterplatten beschriftet. Danach wurden in jeder Vertiefung mit einer Pipette 50 μL Müller-Hinton-Bouillon vorgelegt. Ausgehend von der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in Verdünnungsschritten 1:2 in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte hergestellt. Dafür wurden 50 μL der Stammlösung in die Reihen A1 bis H1 gegeben (Abb. 134).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	MHK
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

Abb. 134: Verdeutlichung des Prinzips des Mikro-Bouillon-Verdünnungstests an einer Mikrotiterplatte.

6 Experimenteller Teil

Anschließend wurde mit einer Transferpipette (8 Kanäle) die Verdünnungsreihe des zu testenden Stoffes fortgesetzt. Nun wurden 50 µL des Inokulums in alle Vertiefungen gegeben. Im Rahmen einer Doppelbestimmung wurden jeweils zwei Reihen mit der Bakteriensuspension des gleichen Bakterienstamms befüllt. Die Reihe 11 diente zur Wachstumskontrolle und enthielt nur die Bakteriensuspension. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie verschlossen und im Brutschrank bei 37 °C für 18 bis maximal 24 h inkubiert.

Bei der Auswertung der Platten wurde zunächst die Wachstumskontrolle beurteilt. Zeigte diese eine Trübung oder gar ein Sediment, wurde die Auswertung fortgesetzt.

Die Ergebnisse wurden als:

- 0 kein Wachstum
- + leichtes Wachstum
- ++ mittleres Wachstum
- +++ starkes Wachstum

in die Tabelle eingetragen.

6.26 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Für die Ermittlung der MBK wurden 50 µL der ersten und zweiten nicht bewachsenen Vertiefungen nach der MHK auf eine Agarplatte verteilt. Nachdem die Flüssigkeit eingezogen war, wurden die Agarplatten zur Bebrütung 18 h in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Beim Erscheinen von mehr als fünf Kolonien auf der Agarplatte wurde die entsprechende Konzentration des zu testenden Stoffes als nicht bakterizid bewertet.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit biorepulsive selbstanordnende Monoschichten (SAMs) in der Lage sind, die Adhäsion verschiedener Bakterien zu unterbinden. Diese Art der Oberflächenfunktionalisierung ist interessant, da sie im Gegensatz zu bioziden Oberflächen eine Prävention vor bakterieller Kontamination ermöglicht, ohne Bakterien abzutöten (Abb. I).

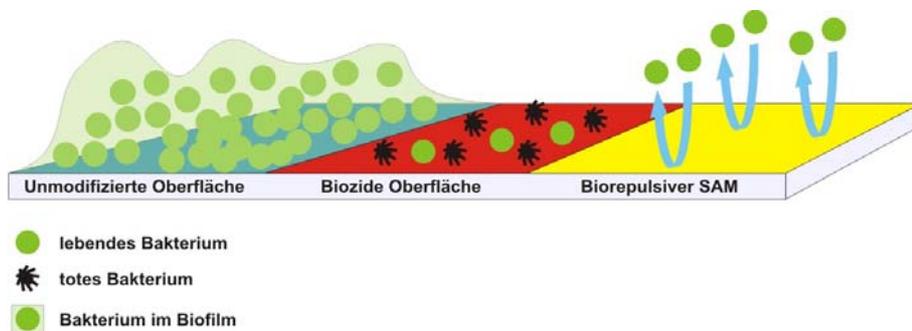


Abb. I: Interaktionen zwischen Bakterien und je einer nativen, bioziden bzw. biorepulsiven Oberfläche.

In diesem Zusammenhang wurde ein *in vitro* System zur Untersuchung von Bakterienadhäsion an biorepulsiven selbstanordnenden Monoschichten entwickelt. Im Vordergrund stand der Einfluß der biorepulsiven Ethylenglykol (EG)- und Polyglycerol (PG)- Kopfgruppen auf die Bakterienadhäsion. Als Testsubstrate dienten EG- und PG-terminierte SAMs auf Gold, Stahl und Aluminium. Die PG-SAMs auf Gold wurden durch die Bindung von Thioacetaten der Typen **D1**, **D2** und **D3** erhalten (Abb. II).

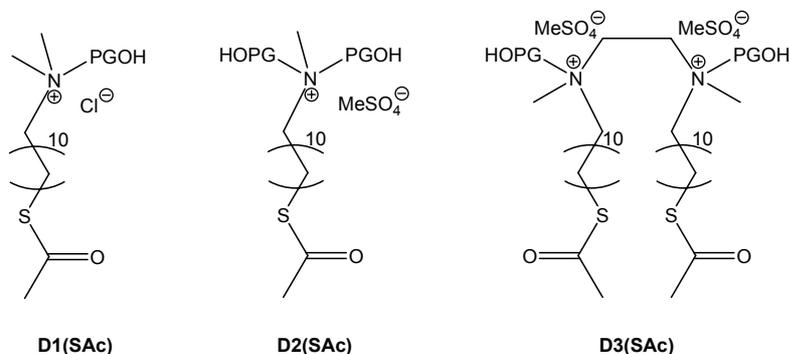


Abb. II: Untersuchte PG-terminierte Thioacetate zur Bildung von biorepulsiven SAMs auf Au.

Das abweisende Potenzial der verschiedenen SAMs gegenüber den Testkeimen *E. coli* WT, *E. coli* MIII, *P. aeruginosa* PAO, *S. epidermidis* ATCC 14990 und *S. aureus* ATCC 6538 sollte mittels verschiedenen *in vitro* Adhäsionsassay untersucht werden. Ausgehend vom aktuellen Stand des Wissens, war der Schwerpunkt der Arbeit, eine verlässliche Methode zur Untersuchung und Quantifizierung der unspezifischen Bakterienadhäsion zu etablieren. Zur Detektion bzw. Quantifizierung der adhärenierten Bakterien (als CFU pro cm²), kamen die klassisch-mikrobiologische Plattenmethode, die Epifluoreszenzmikroskopie und die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) zum Einsatz. Die Ergebnisse der letzten Methode korrelierten aber bereits im Vorfeld nicht mit der tatsächlichen Zelldichte, so dass sie frühzeitig als ungeeignet eingestuft wurde. Von den beiden anderen Methoden erwies sich die Epifluoreszenzmikroskopie als praktikabler, wobei jedoch bei speziellen Problemen statt ihrer die aufwendige Plattenzählmethode verwendet werden mußte.

Mit den beiden so etablierten Methoden erwiesen sich die repulsiven Eigenschaften von EG₇OH-terminierten SAMs gegenüber *E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990 und *S. aureus* ATCC 6538 als deutlich ausgeprägt. Es wurde eine Reduzierung der Adhäsion dieser Testkeime um etwa 99% beobachtet.

Ein ähnlicher repulsiver Charakter wurde bei den PG-terminierten Monoschichten der **D1(SAc)**-, **D2(SAc)**- und **D3(SAc)**-Dendrimere Klassen beobachtet. Das Antifoulingpotenzial dieser Schichten war mit dem des EG-Systems vergleichbar.

Für *E. coli* WT und *S. aureus* erwiesen sich die **D2(SAc)₅₀₀₀**-SAMs als am effizientesten. (99,8% bzw. 99,4%). Dabei konnte kein systematischer Zusammenhang zwischen repulsivem Wirkprofil und der Molmasse der Dendrimere gefunden werden.

Auch die Ergebnisse mit *S. epidermidis* deuten auf einen ausgeprägten repulsiven Charakter der PG-Kopfgruppe der Dendrimerschichten hin, der in seiner Stärke mit dem der EG-Kopfgruppe vergleichbar war. Mithilfe dieses Testkeims wurden auch die beiden Detektionsmethoden quantitativ verglichen. Zu erwarten war, dass die Kultivierungs-abhängige Plattenmethode im Vergleich der Epifluoreszenzmikroskopie, die die adhärenierten Zellen ohne Ablösung direkt detektiert, zur Unterschätzung der Zellzahl führt. Dieser Unterschied ist beispielsweise bei den Ergebnissen von **D2(SAc)**-SAMs eindrucksvoll klar geworden (Abb. III). Das die Differenz geringer ausfiel als erwartet, deutet darauf hin, dass durch die Wasch- und Ultraschallvorrichtungen eine gewisse Standardisierung sowie eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Plattenmethode gelungen ist.

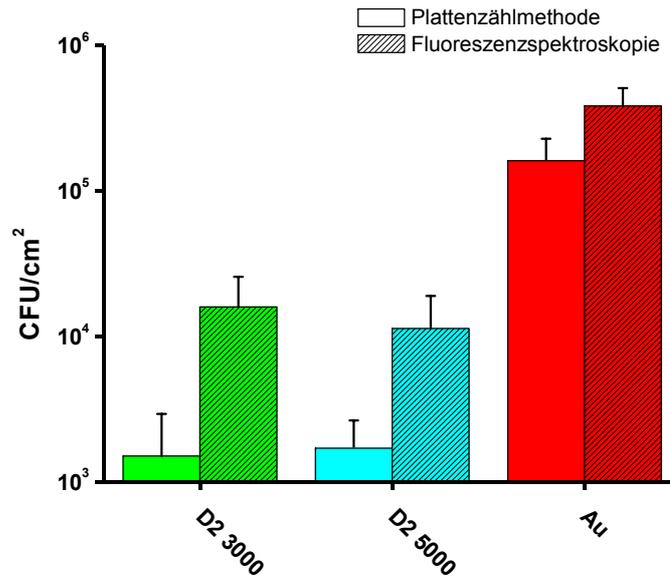


Abb. III: Vergleich der Quantifizierungsmethoden bei der Bestimmung der repulsiven Eigenschaften von D2-SAMs gegenüber *S. epidermidis*.

Beim vierten Testkeim, *P. aeruginosa*, war ein spezies-spezifisches Adhäsionsverhalten festzustellen. Mit nur ca. 49% zeigten die EG₇OH-Schichten eine deutlich geringe biorepulsive Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa*. Auch die Beschichtung mit den Dendrimeren führte nicht zu einem effektiven Schutz der Metalloberfläche vor der Besiedlung mit diesem Testkeim. Es wurde eine Abnahme des repulsiven Charakters von **D1 (SAc)** mit 45% über **D2 (SAc)** mit 36% bis hin zu **D3 (SAc)** mit 28% Reduzierung der Adhäsion festgestellt.

Ebenfalls wurden die Repulsivitätseigenschaften der PEG- und PG-terminierten Schichten auf den nativen Oxidschichten industriell relevanter Materialien, wie Stahl und Aluminium, gegenüber *E. coli* WT und *S. epidermidis* ATCC 14990 getestet. Als Ankergruppen dienen jedoch nicht Thiole sondern Phosphonate. Die Anwendung der Epifluoreszenzmikroskopie und der computergestützten quantitativen Auswertung der adhärenierten Zellen wurde hier jedoch durch die Hintergrundfluoreszenz der Phosphonatschichten verhindert. Zur Quantifizierung war daher die Plattenmethode besser geeignet. Allerdings ermöglichten diese Fluoreszenzaufnahmen eine scharfe Unterscheidung zwischen den bakteriell besiedelten und unbesiedelten Arealen, die unmodifizierten und modifizierten Abschnitten der Probenoberfläche zugeordnet wurden (Abb. IV).

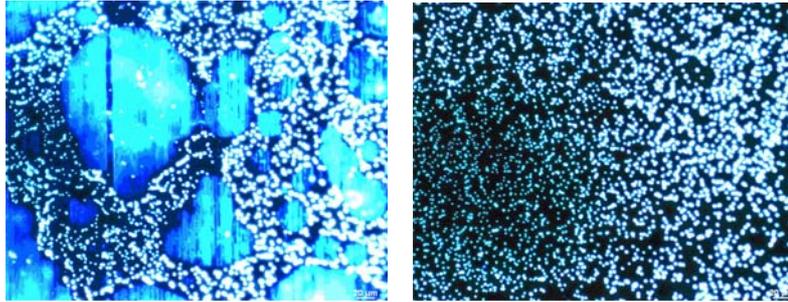


Abb. IV: Mit DAPI angefärbte *S. epidermidis* auf PG-terminierten Phosphonatschicht auf Stahl (links) und auf einer Stahlreferenz (rechts).

Zusammenfassend lässt sich für die Stahl- und Aluminium-SAMs sagen, dass die Phosphonat- und Thiophosphonatschichten einen deutlichen reduzierenden Einfluß auf das Adhäsionsverhalten der Testkeime hatten. Allerdings müsste der Schichtbildungsprozeß weiter untersucht und optimiert werden.

Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse auf der Wachstumshemmung oder gar Abtötung der Bakterien beruht, wurden Tests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) durchgeführt. Diese haben bestätigt, dass die Wechselwirkung zwischen den generierten Monoschichten und den Testkeimen einen biorepulsiven und nicht einen bioziden Charakter hatten.

Es wurden in dieser Arbeit also nicht nur geeignete Schichtsysteme für die Unterdrückung der Adhäsion mehrerer Keime auf verschiedenen Substraten gefunden sondern auch optimale Evaluationsverfahren für diese Adhäsion etabliert.

8 Summary

The main objective of this work was to investigate the potential of biorepulsive self-assembled monolayers (SAMs) to suppress bacterial adhesion to metal surfaces. In contrast to biocidal surface functionalizations the use of biorepulsive SAMs allows for the prevention of bacterial adhesion without killing the microorganisms and is therefore of particular interest (Fig. I).

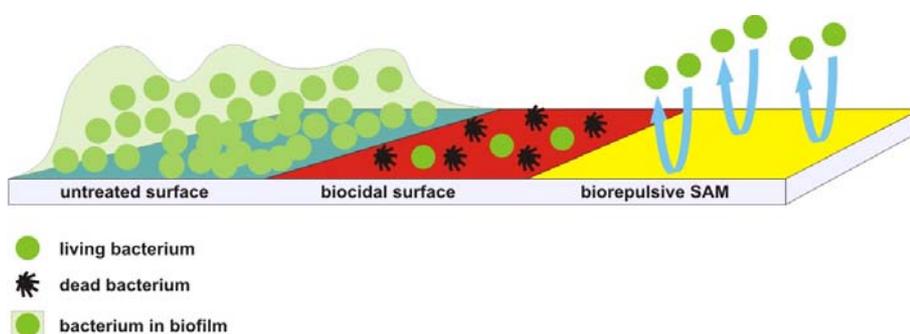


Fig. I: Interactions of bacteria with untreated, biocidal and biorepulsive functionalized surfaces.

In this context an *in vitro* assay for the quantification of the bacterial adhesion to biorepulsive SAMs was developed. Using this assay, the impact of oligoethylene glycol (EG)- and polyglycerol (PG)-terminated SAMs on gold, aluminum and stainless steel on the adhesion of different bacteria was investigated.

PG-terminated SAMs on gold were obtained by treating the metal surface with solutions of the thioacetates **D1**, **D2** and **D3** (Fig. II).

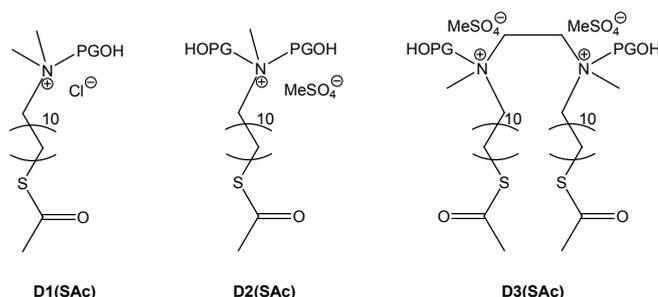


Fig. II: Used PG-functionalized thioacetates for the formation of PG-terminated SAMs on Au.

8 Summary

To test the ability of the PG-terminated SAMs to suppress the adhesion of the germs *E. coli* WT, *E. coli* MIII, *P. aeruginosa* PAO, *S. epidermidis* ATCC 14990, and *S. aureus* ATCC 6538 different *in vitro* assays for the detection of the adhered bacteria were used and compared. Here the main focus was to establish a suitable method for the quantification of the non-specific adhesion to the substrates. For this purpose epifluorescence microscopy, surface plasmon spectroscopy (SPR) as well as the traditional plate count method were employed to determine the number of adhered cells per substrate area (CFU/cm²).

The results obtained from SPR measurements did not correlate well with the actual number of adhered germs on the surface. This method was therefore regarded as inappropriate. The plate count method and the epifluorescence spectroscopy on the other hand provided reliable data that correlated well with the real number of surface-bound bacteria. Compared to the plate count method, the fluorescence microscopy proved to be much faster. Therefore the plate count method was only used, when the cell detection *via* fluorescence microscopy failed.

Both methods indicated a pronounced repulsive behavior of the EG₇OH-terminated monolayers against the binding of *E. coli* WT, *S. epidermidis* ATCC 14990, and *S. aureus* ATCC 6538. In all cases the monolayers reduced the number of adhered cells by approximately 99 %.

A repulsive effect of similar magnitude was found for the PG-terminated **D1(SAc)**, **D2(SAc)** and **D3(SAc)** SAMs. In case of *E. coli* WT and *S. aureus* the **D2(SAc)₅₀₀₀** SAMs showed the highest activity (99,8% respectively 99,4%). The origin of this repulsion maximum is not clear, because no systematic relation was found between molecular weight of the dendritic compounds on the biorepulsive behavior of the monolayers. Also the results of the adhesion test with *S. epidermidis* indicated a strong repulsive effect of the PG head group, which was comparable to that of the EG₇OH-terminated system.

Furthermore the results of the *S. epidermidis* adhesion to the **D2(SAc)** SAMs were used to compare the plate count method and the fluorescence microscopy quantitatively. As expected, the results of the plate count method did underestimate the real number of adhered cells. The reason for this was an incomplete cell transfer from the substrate to the agar. The fluorescence spectroscopy on the other hand detects the cells directly on the substrate and led consistently to higher numbers of adhered

8 Summary

bacteria. Fig. III shows this method-dependent difference in the number of detected *S. epidermidis* cells on **D2(SAc)** SAMs.

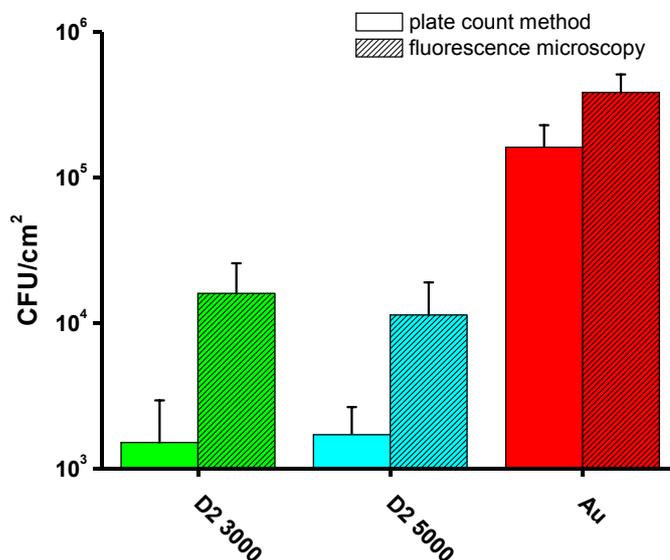


Fig. III: Comparison between CFU/cm² values determined by the plate count method and by fluorescence spectroscopy for the adhesion of *S. epidermidis* to D2(SAc) SAMs and gold.

For the fourth test germ, *P. aeruginosa*, a specific adhesion behavior was found. Here the usually highly repulsive EG₇OH-terminated SAMs reduced the adhesion by only 49 %. Also the PG-terminated dendrimer SAMs did not result in an effective protection of the substrate against adhesion. With 45 % reduction, the **D1(SAc)** SAMs showed the highest effect, followed by the **D2(SAc)** SAMs with 36 % reduction and the **D3(SAc)** that reduced the adhesion by only 28 %.

Besides biorepulsive monolayers on gold, analogue PEG- and PG-terminated coatings on the native oxide layers of aluminum and stainless steel were investigated regarding their bacteria-repulsive properties. To allow for a binding to the oxidic surfaces SAM-forming, compounds with phosphonic and thiophosphonic acid anchor groups were used. As test germs *E. coli* WT and *S. epidermidis* ATCC 14990 were employed.

As the coated substrates showed pronounced background fluorescence, it was impossible to detect the adhered cells *via* epifluorescence spectroscopy. Therefore the quantification of the surface-bound bacteria was carried out using the plate count method. Although the determination of the accurate number of cells from the fluores-

8 Summary

cent images failed, it was possible to distinguish between colonized and bacteria-free areas on the substrate (Fig. IV). From the images it is obvious that the substrates were not completely covered with the phosphonate films. The surface was only partly covered with phosphonate islands and the adhesion of bacteria took place at the coating-free areas between the islands. In contrast, the coated areas seem to be bacteria-free.

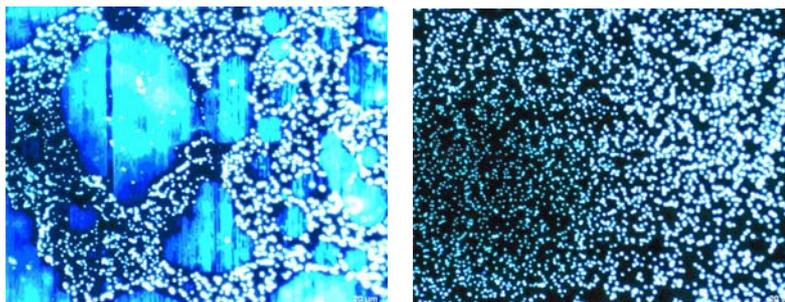


Fig. IV: DAPI-stained *S. epidermidis* on (left) steel with PG-terminated phosphonate coating and (right) untreated steel.

Summing up, the phosphonate and thiophosphonate coatings on aluminum and steel showed a distinct reduction of the bacterial adhesion. However, the process of film deposition needs to be optimized to avoid island formation and incomplete surface coverage.

To rule out any toxic effect of the SAM-forming compounds on the test organisms, the minimum inhibitory concentration (MIC) as well as the minimal bactericidal concentration (MBC) was determined for all used substances. These tests confirmed the non-biocidal character of the EG and PG compounds. Therefore the reduced adhesion to the functionalized surfaces could clearly be attributed to purely biorepulsive interactions between monolayer and microorganisms.

9 Sicherheit

9.1 Entsorgung des chemischen Abfalls

Aceton	R: 11-36-66-67 S: 9-16-26	F, Xi
Chloroform	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	X _n
Dichlormethan	R: 40 S: 23-24/25-36/37	X _n
Kalium	R: 14/15-34 S: 8-43-45	F, C
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	F, T
Ethanol	R: 11 S: 7-16	F
Natrium	R: 14/15-34 S: 8-43-45	F, C
Natriumazid	R: 28-32-50/53 S: 28-45-60-61	T ⁺ , N
DAPI	R: 36-37-38 S: 26-36	Xi
H ₂ O ₂		
Schwefelsäure (96 %)	R: 35 S: 26-30-45	C
THF	R: 11-19-36/37 S: 2-16-29-33	F, Xi

9.2 Entsorgung des mikrobiologischen Abfalls

Der Waschpuffer wurde gesammelt und mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lsg. chemisch über eine Einwirkzeit von 24 h desinfiziert.

Bakteriensuspensionen, verwendete Glasgeräte und Materialien sowie alle anderen Abfälle wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

10 Literatur

- ¹ J. W. Costerton, Z. Lewandowsky, D. E. Caldwell, D. R. Korber, L. H. M. Scott, „Microbial Biofilms“, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1995**, 49, 711–745.
- ² L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, „Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens“, *Trends in Microbiology*, **2005**, 13, 7–10.
- ³ Don Monroe, „Looking for Chinks in the Armor in Bacterial Biofilms“, *PLoS Biology*, **2007**, 5, 2458–2461.
- ⁴ A. Ulman, „Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers“, *Chem. Rev.*, 96, **1996**, 1533–1554.
- ⁵ J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides „ Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology“, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103–1169.
- ⁶ C. Compere, M. N. Bellon-Fontaine, P. Bertrand, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, C. M. Pradier, B. Rondot, M. G. Walls, „Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in sea water“, *Biofouling*, **2001**, 17, 129–145.
- ⁷ A. S. Clare, D. Rittschoff, D. J. Gerhart, J. S. Maki, „Molecular approaches to non-toxic antifouling“, *Invert. Reprod. Dev.*, **1992**, 22, 67–76.
- ⁸ P. H. Tsang, G. Li, Y. V. Brun., L. B. Freund, J. X. Tang, „ Adhesion of single cells in the micronewton range“, *PNAS*, **2006**, 103, 5764–5768.
- ⁹ H. C. Flemming, G. Schaule, „Bekämpfung von Biofouling in wässrigen Systemen“, *Werkstoffe und Korrosion*, **1994**, 45, 40–53.
- ¹⁰ A. J. van der Borden, H. van der Werf, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, „Electric Current-Induced Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms from Surgical Stainless Steel“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 6871–6874.
- ¹¹ B. H. Pyle, G. A. McFeters, “Iodine susceptibility of pseudomonads grown attached to stainless steel surfaces”, *Biofouling*, **1990**, 2 113–120.
- ¹² J. Chainer, “Home steel home – AK Steel partners with AGION™ to build world’s first antimicrobial steel house”, *AISE Steel Technol.*, **2001**, 78, 59.

- ¹³ J. C. Tiller, C. Sprich, L. Hartmann, "Amphiphilic conetworks as regenerative controlled releasing antimicrobial coatings", *J. Controlled Release*, **2005**, 103, 355–367.
- ¹⁴ M. W. Eknoian, S. D. Worley, J. Bickert, J. F. Williams, "Novel antimicrobial *N*-halamine polymer coatings generated by emulsion polymerization", *Polymer*, **1999**, 40, 1367–1371.
- ¹⁵ S. Bassetti, J. Hu, R. B. D'Agostino Jr., R. J. Sheretz, "Prolonged Antimicrobial Activity of a Catheter Containing Chlorhexidine-Silver Sulfadiazine extends Protection against Catheter Infections in Vivo", *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, 45, 1535–1538.
- ¹⁶ A. D. Fuchs, J. C. Tiller, "Kontaktaktive antimikrobielle Beschichtungen aus wässrigen Suspensionen", *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 1–5.
- ¹⁷ K. Feldman, G. Hähner, N. D. Spencer, P. Harder, M. Grunze, „Probing Resistance to Protein Adsorption of Oligo(ethyleneglycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers by Scanning Force Microscopy", *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 10134–10141.
- ¹⁸ S.-W. Lee, P. E. Laibinis, "Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo(ethyleneglycol)-terminated alkyltrichlorsilanes", *Biomaterials*, **1998**, 19, 1669–1675.
- ¹⁹ Y. Takebe, Y. Shirota, T. Ohtake, *Mat. Res. Jpn.*, **1994**, 15A, 611–614.
- ²⁰ C. H. Ho, J. Tobis, C. Sprich, R. Thomann, J. C. Tiller, "Nanoseparated Polymeric Networks with Multiple Antimicrobial Properties", *Adv. Mater.*, **2004**, 16, 957–961.
- ²¹ J. Liang, Y. Chen, K. Barnes, R. Wu, S. D. Worley, T. S. Huang, „*N*-halamine/quat siloxane copolymers for use in biocidal coatings“, *Biomaterials*, **2006**, 27, 2495–2501.
- ²² G. M. Whitesides, B. Grzybowski, "Self-Assembly at All Scales", *Science*, **2002**, 295, 2418–2421.
- ²³ W. C. Bigelow, D. L. Pickett, W. A. Zisman, "Oleophobic Monolayers, 1. Films Adsorbed from Solution in Non-Polar Liquids", *J. Colloid. Interface Sci.*, **1946**, 1, 513–538.
- ²⁴ E. Arzt, „Size Effects in materials due to microstructural and dimensional constraints: a comparative review“, *Acta Mater.*, **1998**, 46, 5611–5626.

- ²⁵ A. Adenier, E. Cabet-Deliry, T. Labot, J. Pinson, F. Podvorica, "Attachment of Polymers to Organic Moieties Covalently Bonded to Iron Surfaces" *Chem. Mater.* **2002**, 14, 4576–4585.
- ²⁶ Z. Yang, J. A. Galloway, H. Yu, "Protein Interactions with Poly(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers on Glass Substrates: Diffusion and Adsorption", *Langmuir*, **1999**, 15, 8405-8411.
- ²⁷ Y.-Z. Du S. Scott Saavedra, "Molecular Orientation Distributions in Protein Films. V. Cytochrome c Adsorbed to a Sulfonate-Terminated, Self-Assembled-Monolayer", *Langmuir*, **2003**, 19, 6443–6448.
- ²⁸ U. Harm, R. Bügler, W. Fürbeth, K.-M. Mangold, K. Jüttner, "Novel protective coatings for steel based on a combination of self-assembled-monolayers and conducting polymers", *Macromol. Symp.*, **2002**, 187, 65–76.
- ²⁹ J. G. Van Alsten, „Self-Assembled Monolayers on Engineering Metals: Structure, Derivatization and Utility“, *Langmuir*, **1999**, 15, 7605–7614.
- ³⁰ J. L. Willbur, A. Kumar, H. A. Biebuyck, E. Kim, G. Whitesides, "Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication", *Nanotechnology*, **1996**, 7, 452–457.
- ³¹ S. R. Oliver, T. D. Clark, N. Bowden, G. M. Whitesides, " Three-Dimensional Self-Assembly of Complex, Millimeter-Scale Structures Through Capillary Bonding Structures" *J. Am. Chem.Soc.*, **2001**, 123, 8119–8120.
- ³² S. Hou, E. A. Burton, K. A. Simon, D. Blodgett, Y-Y. Luk, D. Ren, "Inhibition of *Escherichia coli* Biofilm Formation by Self-Assembled Monolayers of Funktional Alkanethiols on Gold", *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, 73, 4300–4307.
- ³³ M. Mrksich, "A Surface chemistry approach to Studying cell adhesion", *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, 29, 267–273.
- ³⁴ R. G. Nuzzo, D. L. Allara, "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4481–4483.
- ³⁵ M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, "Spontaneously organized molecular assemblies. 4. structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared Spectroscopy, and electrochemistry", *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 3559–3568.

- ³⁶ C. D. Bain, J. Evall, G. M. Whitesides, "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent", *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 7155–7164.
- ³⁷ T. Shibue, T. Nakanishi, T. Matsuda, T. Asahi, T. Osaka, "Thermal Desorption-HighResolution Mass Spectrometry of Mixed Self-Assembled Monolayers on Gold", *Langmuir*, **2002**, 18, 1528–1534.
- ³⁸ M. Hasan, D. Bethell, M. Brust, "The Fate of Sulfur-Bound Hydrogen on Formation of Self-Assembled Thiol Monolayers on Gold: ¹H-NMR Spectroscopic Evidence from Solutions of Gold Clusters", *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1132–1133.
- ³⁹ J.-G. Lee, J. T. Jr. Yates, "Nondissociative Chemisorption of Methanethiol on Ag(110): A Critical Result for Self-Assembled Monolayers", *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 440–441.
- ⁴⁰ W. Andreoni, A. Curioni, H. Gronbeck, "Density functional theory approach to thiols and disulfides on gold: Au(111) surface and clusters", *Int. J. Quantum. Chem.*, **2000**, 80, 598–608.
- ⁴¹ C. Kodama, T. Hayashi, H. Nozoye, "Decomposition of alkanethiols adsorbed on Au(111) at low temperature", *Appl. Surf. Sci.*, **2001**, 169, 264–267.
- ⁴² A. Ulman, *Characterization of Organic Thin Films*, Butterworth-Heinemann, Boston, **1995**.
- ⁴³ C. E. D. Chidsey, "Free Energy and Temperature Dependence of Electron Transfer at the Metal-Electrolyte Interface", *Science*, **1991**, 251, 919–922.
- ⁴⁴ L. Sun, R. M. Crooks, "Direct visualization of defect structures contained within self-assembled organomercaptan monolayers: combined use of electrochemistry and scanning tunneling microscopy", *J. Electrochem. Soc.*, **1991**, 138, L23.
- ⁴⁵ R. H. Terrill, T. A. Tanzer, P. W. Bohn, "Structural Evolution of Hexadecanethiol Monolayers on Gold during Assembly: Substrate and Concentration Dependence of Monolayer Structure and Crystallinity", *Langmuir*, **1998**, 14, 845–854.
- ⁴⁶ P. E. Laibnis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y.-T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, "Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver and gold", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7152–7167.

- ⁴⁷ K. D. Truong, P. A. Rowntree, "Formation of Self-Assembled Butanethiol Monolayers on Au Substrates: Spectroscopic Evidence for Highly Ordered Island Formation in Sub-Monolayer Films", *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 19917–19926.
- ⁴⁸ L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, "Synthesis, Structure and Properties of Model Organic Surfaces", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1992**, 43, 437–463.
- ⁴⁹ L. H. Dubois, B. R. Zegarsky, R. G. Nuzzo, "Molecular ordering of organosulfur compounds on Au(111) and Au(100): Adsorption from solution and ultrahigh vacuum", *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 678–688.
- ⁵⁰ F. Schreiber, "Structure and growth of self-assembling monolayers", *Prog. Surf. Sci.*, **2000**, 65, 151–257.
- ⁵¹ G. E. Poirier, "Characterization of Organosulfur Molecular Monolayers on Au(111) using Scanning Tunneling Microscopy", *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1117–1128.
- ⁵² G. E. Poirier, "Mechanism of Formation of Au Vacancy Islands in Alkanthiol Monolayers on Au(111)", *Langmuir*, **1997**, 13, 2019–2026.
- ⁵³ N. Camillone III, C. E. D. Chidsey, G. Y. Liu, G. J. Scoles, "Superlattice structure at the surface of a monolayer of octadecanethiol self-assembled on Au(111)", *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 3503–3511.
- ⁵⁴ A. Terfort, *Habilitationsschrift*, Universität Hamburg, **2003**.
- ⁵⁵ C. A. Alves, E. A. Smith, M. D. Porter, "Atomic scale imaging of alkanthiolate monolayers at gold surfaces with atomic force microscopy", *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1222–1227.
- ⁵⁶ S.-W. Tam Chang, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, N. Jeon, R. G. Nuzzo, "Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Alkanethiols with the Structure RNHCOCH₂SH", *Langmuir*, **1995**, 11, 4371–4382.
- ⁵⁷ R. Mazzarello, A. Cossaro, A. Verdini, R. Rousseau, L. Casalis, M. F. Danisman, L. Floreano, S. Scandolo, A. Morgante, G. Scoles, "Structure of a CH₃S Monolayer on Au(111) Solved by the Interplay between Molecular Dynamics Calculations and Diffraction Measurements", *Phys. Rev. Lett.*, **2007**, 98, 16102–16104.
- ⁵⁸ A. Cossaro, R. Mazzarello, R. Rousseau, L. Casalis, A. Verdini, A. Kohlmeyer, L. Floreano, S. Scandolo, A. Morgante, M. L. Klein, G. Scoles, "X-ray Diffraction and Computation Yield the Structure of Alkanethiols on Gold(111)", *Science*, **2008**, 321, 943–946.

- ⁵⁹ J. Sagiv, "Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 92–98.
- ⁶⁰ M. M. Sung, C. Carraro, O. W. Yauw, Y. Kim, R. Maboudian, "Reversible Liquid-Liquid Transitions in the Early Stages of Monolayer Self-Assembly", *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 1556–1559.
- ⁶¹ R. Baustia, N. Hartmann, E. Hasselbrink, „Two-Dimensional Aggregation of Species with Weak and Strong Bonding Interactions: Modeling the Growth of Self-Assembled Alkylsiloxane Monolayers“, *Langmuir*, **2003**, 19, 6590–6593.
- ⁶² M. E. McGovern, K. M. Kallury, M. Thompson, "Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane", *Langmuir*, **1994**, 10, 3607–3614.
- ⁶³ K. Bierbaum, M. Kinzler, Ch. Wöll, M. Grunze, G. Hähner, S. Heid, F. Effenberger, "A Near Edge X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy and X-ray Photoelectron Spectroscopy Study of the Film Properties of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes on Oxidized Si(100)", *Langmuir*, **1995**, 11, 512–518.
- ⁶⁴ M. J. Pellerite, T. D. Dunbar, L. D. Boardman, „Effects of Fluorination on Self-Assembled Monolayer Formation from Alkanephosphonic Acids on Aluminium: Kinetics and Structure“, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 11726–11736.
- ⁶⁵ S. Pawsey, K. Yach, L. Reven, "Self-Assembly of Carboxylalicylphosphonic Acids on Metal Oxide Powders", *Langmuir*, **2002**, 18, 5205–5212.
- ⁶⁶ R. G. Snyder, H. L. Strauss, H. L. Elliger, „Carbon-Hydrogen stretching modes and the structure on n-alkyl chains 1. long, disordered chains“, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 5145–5150.
- ⁶⁷ Ch. Bram, Ch. Jung, M. Stratmann, „Self assembled molecular monolayers on oxidized inhomogeneous aluminium surfaces“, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 358, 108–111.
- ⁶⁸ M. Textor, L. Ruiz, R. Hofer, A. Rossi, K. Feldman, G. Hähner, N. D. Spencer, „Structural Chemistry of Self-Assembled Monolayers of Octadecylphosphoric Acid on Titanium Oxide Surfaces“, *Langmuir*, **2000**, 16, 3257–3271.
- ⁶⁹ G. Guerrero, P. H. Mutin, A. Vioux, „Anchoring of Phosphonate and Phosphinate Coupling Molecules on Titania Particles“, *Chem. Mater.*, **2001**, 13, 4367–4373.

- ⁷⁰ W. Gao, L. Dickinson, C. Grozinger, F. G. Morin, L. Reven, „Self-Assembled Monolayers of Alkylphosphonic Acids on Metal oxides“, *Langmuir*, **1996**, 12, 6429–6435.
- ⁷¹ R. D. Ramsier, P. N. Henriksen, A. N. Gent, „Adsorption of phosphorus Acids on alumina“, *Surf. Sci* **1988**, 203, 72–88.
- ⁷² D. G. Castner, B. D. Ratner, “Biomedical surface science: Foundations to frontiers”, *Surface Science*, **2002**; 500, 28–60.
- ⁷³ M. W. Mittelman, “Adhesion to Biomaterials”, In M. Fletcher (Hrsg.), *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity* Wiley-Liss Inc., New York, **1996**, 89–127.
- ⁷⁴ W. G. Characklis, G.A. Mc Feters, K. C. Marshall, „Physiological ecology in Biofilm Systems“ in K.C. Marshall, W.G. Characklis (Hrsg.), *Biofilms*, John Wiley, New York, **1990**, 341–394.
- ⁷⁵ R. E. Baier, „Surface behaviour of biomaterials: The *theta* surface for biocompatibility“, *J. Mater. Scie: Mater. Med.*, **2006**, 17, 1057–1062.
- ⁷⁶ S. C. Dexter, „Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion in situ studies“, *J. Colloid. Interface Sci.*, **1979**, 70, 346–354.
- ⁷⁷ Q. Zhao, S. Wang, H. Maller-Steinhagen, „Tailored surface free energy of membrane diffusers to minimize microbial adhesion“, *Appl. Surf. Sci.*, **2004**, 230, 371–378.
- ⁷⁸ N. Clarkson, „The antifouling Potential of silicone elastomer polymers“, *Recent Adv. Biotechnol.*, **1999**, 3, 87–108.
- ⁷⁹ C. J. Kavanagh, R. D. Quinn, G. W. Swain, „Observations of barnacle detachment from silicone using high-speed video“, *J. Adhes.*, **2005**, 81, 843–868.
- ⁸⁰ T. Cao, X. Liang, A. Wang, G. W. Auner, S. O. Salley, K. Y. S. Ng, „Nanoscale Investigation on Adhesion of *E. coli* to Surface Modified Silicone Using atomic Force Microscopy“, *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**, 94, 167–176.
- ⁸¹ J. D. Jr. Andrade, H. B. Lee, M. S. Jhon, S. W. Kim, J. B. Jr. Hibbs, „Water as a biomaterial“, *ASAIO*, **1973**, 19, 1–7.
- ⁸² S. Wu, „Surface and interfacial tensions of polymers, oligomers, plasticizers and organic pigments“, In J. Brandrup, E. H. Immergut, (Hrsg.), *Polymer Handbook*, 3rd ed., Willey, New York, **1989**, VI–411-VI–449.

- ⁸³ E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, F. P. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, „Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells, *Langmuir*, **2001**, 17, 6336–6343.
- ⁸⁴ L. Andruzzi, W. Senaratne, A. Hexamer, E. D. Sheets, B. Ilic, E. A. Kramer, B. Baird, C. K. Ober „Oligo(ethylene glycol) containing polymer brushes as bioselective surfaces, *Langmuir*, **2005**, 21, 2495–2504.
- ⁸⁵ W. Senaratne, L. Andruzzi, C. K. Ober, „Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives“, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2427–2448.
- ⁸⁶ E. A. Vogler, M. Morra, *Water in Biomaterials Surface Science*, Wiley, New York, **2001**.
- ⁸⁷ R. N. Wenzel, „Resistance of solid surfaces to wetting by water“, *Industr. Engin. Chem.*, **1936**, 28, 988–994.
- ⁸⁸ Y. Ikada, M. Suzuki, Y. Tamada, „Polymer Surfaces Possessing Minimal Interaction with Blood Components“, in: *Polymers as Biomaterials*, S. W. Shalaby (Hrsg.) Plenum Press, New York, 135-147, **1984**.
- ⁸⁹ R. Blassey, “Self-cleaning surfaces – virtual realities”, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 301–306.
- ⁹⁰ K. Shellenberger, B. E. Logan, “Effect of Molecular Scale Roughness of Glass Beads on Colloidal and Bacterial Deposition”, *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 184–189.
- ⁹¹ R. D. Boyd, J. Verran, M. V. Jones, M. Bhakoo, „Use of the atomic force microscopy to determine the effect of substratum topography on bacterial adhesion“, *Langmuir*, **2002**, 18, 2343–2346.
- ⁹² M. Nosonovsky, “Multiscale Roghness and Stability of Superhydrophobic Biomimetic Interfaces”, *Langmuir*, **2007**, 23, 3157–3161.
- ⁹³ S. Krishnan, A. Ramakrishnan, A. Hexemer, J. A. Finlay, K. E. Sohn, R. Perry, C. K. Ober, E. J. Kamer, M. E. Callow, J. A. Callow, D. A. Fischer, „Anti-biofouling properties of comb-like block copolymers with amphiphilic side-chains“, *Langmuir*, **2006**, 22, 5075–5086.
- ⁹⁴ M. Krupers, “Cleanability of surfaces”, *Eur. Coat. J.*, **2000**, 10, 36–40.

- ⁹⁵ R. Bos, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, „Retention of bacteria on a Substratum Surface with micro-patterned hydrophobicity“, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2000**, 189, 311–315.
- ⁹⁶ V. Vadillo-Rodriguez, B. E. Logan, “Localized Attraction Correlates with Bacterial Adhesion to Glass and Metal Oxide Substrata”, *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 2983–2988.
- ⁹⁷ C. Diaz, M. C. Cortizo, P. L. Schilardi, S. G. Gómez de Saravia, “Influence of the Nano-micro Structure of the Surface on Bacterial Adhesion”, *Mater. Res.*, **2007**, 10, 11–14.
- ⁹⁸ H. H. M. Rijnaarts, W. Norde, J. Lyklema, A. J. B. Zehnder, „The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion“, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **1995**, 4, 191–197.
- ⁹⁹ S. Kjelleberg, “Starvation in Bacteria”, **1993**, Plenum Press, New York.
- ¹⁰⁰ J. W. Schopf, J. M. Hayes and M. R. Walter, “Evolution on earth’s earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems”, in: J. W. Schopf (Hrsg.) “*Earth’s earliest biosphere*”, **1993**, Princeton Univ. Press, New Jersey, 361–384.
- ¹⁰¹ P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton „Biofilm as Complex Differentiated Communities“ *Annu. Rev. Microbiol.*, **2002**, 56, 187–209.
- ¹⁰² A. T. Henrici, “Studies of freshwater bacteria. I. A. direct microscopic technique” *J. Bacteriol.*, **1933**, 25, 277–286.
- ¹⁰³ C. E. Zobell, D. Q. Anderson, „Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces“, *Biol. Bull.*, **1936**, 71, 324–342.
- ¹⁰⁴ H. Heukelekian, A. Heller, “Relation Between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth”, *J. Bacteriol.*, **1940**, 40, 547–558.
- ¹⁰⁵ C. E. Zobell, „The effect of solid surfaces upon bacterial activity“, *J. Bacteriol.*, **1943**, 43, 39–56.
- ¹⁰⁶ W. G. Characklis, „Attached microbial Growths-I. Attachment und growth“, *Water Res.*, **1973**, 7, 1113–1127.
- ¹⁰⁷ W. G. Characklis, „Attached microbial Growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes“, *Water Res.*, **1973**, 7, 1249–1258.

- ¹⁰⁸ J. W. Costerton, G. G. Geesey, G. K. Cheng, "How bacteria stick", *Scie. Amer.*, **1978**, 238, 86–95.
- ¹⁰⁹ J. W. Costerton, K.-J. Cheng, Gill G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie, "Bacterial Biofilms in Nature and Disease", *Annu. Rev. Microbiol.*, **1987**, 41, 435–464.
- ¹¹⁰ S. Schulte, H.- C. Flemming, „Ursachen der erhöhten Resistenz von Mikroorganismen in Biofilmen“, *Chem. Ingen. Technik*, **2006**, 78 1683–1689.
- ¹¹¹ R. M. Donlan, J. W. Costerton, "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms", *Clin. Microbiol. Rev.*, **2002**, 15, 167–193.
- ¹¹² J.-M. Ghigo, "Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development", *Nature*, **2001**, 412, 442–445.
- ¹¹³ L. Hall-Stoodley, H. M. Lappin-Scott, „ Biofilm Formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacteria fortuitum*“ *FEMS Microbiol Lett* **1998**, 168, 77–84.
- ¹¹⁴ S. Kjellenberg, B. A. Humphrey, K. C. Marshall, „ Effect of Interfaces on small, starved Marine Bacteria“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1982**, 43, 1166–1172.
- ¹¹⁵ R. Doyle, (Hrsg.), *Microbial growth in biofilms*, part A: developmental and molecular biological aspects. *Methods Enzymol.*, **2001**, 336.
- ¹¹⁶ R. Doyle, (Hrsg.) *Microbial growth in biofilms*, part B: special environments and physiochemical aspects. *Methods Enzymol.*, **2001**, 337.
- ¹¹⁷ K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, D. G. Davies, "*Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm", *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 1140–1154.
- ¹¹⁸ M. Klausen, A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, T. Tolker-Nielsen, „Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants“, *Mol. Microbiol.*, **2003**, 48 1511–1524.
- ¹¹⁹ M. C. M. Van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, A. J. B. Zehnder „Influence of interfaces on microbial activity“, *Microbiol. Rev.*, **1990**, 54, 75–87.
- ¹²⁰ G. A. O’Toole, H. Kaolan, R. Kolter, „Biofilm formation as microbial development“, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2000**, 54, 49–79.
- ¹²¹ T. Winkler, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2008**.

- ¹²² G. I. Loeb, R. A. Neihof, „Marine conditioning films“, *Adv. Chem.*, **1975**, 145, 319–335.
- ¹²³ H. J. Busscher, H. C. van der Mei, „Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems“, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2006**, 19, 127–141.
- ¹²⁴ D. R. Korber, J. R. Lawrence, H. M. Lappin-Scott, J. W. Costerton, “Growth of Microorganisms on Surfaces”, in H. M. Lappin-Scott, J. W. Costerton, (Hrsg.), *Microbial Biofilms*, Cambridge, UK, Cambridge Univ. Press **1995**, 15–45.
- ¹²⁵ H. Barberousse, R. Brayner, A. M. Botelho Do Rego, J.-C. Castaing, P. Beurdeley-Saudou, J.-F. Colombet, “Adhesion of façade coating colonisers, as mediated by physico-chemical properties”, *Biofouling*, **2007**, 23, 15–24.
- ¹²⁶ C. Prigent-Combaret, O. Vidal, C. Dorel, P. Lejeune, „Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*“ *J. Bacteriol.*, **1999**, 181, 5993–6002.
- ¹²⁷ H. F. Jenkinson, H. M. Lappin-Scott, „Biofilms adhere to stay“, *Trends Microbiol.*, **2001**, 9, 9–10.
- ¹²⁸ P. Lejeune, „Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blut it“, *Trends Microbiol.*, **2003**, 11, 179–184.
- ¹²⁹ K. Sauer, M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. H. Zeef, D. G. Davies, P. Gilbert „Characterisation of nutrient-induced dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm“, *J. Bacteriol.*, **2004**, 186, 7312–7326.
- ¹³⁰ D. G. Allison, D. J. Evans, M. R. W. Brown, P. Gilbert “Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms”, *J. Bacteriol.*, **1990**, 172, 1667–1669.
- ¹³¹ S. M. Hunt, E. M. Werner, B. Huang, M. A. Hamilton, P. S. Stewart, „Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 7418–7425.
- ¹³² J. Wingender, T. R. Neu, H.-C. Flemming, „What are bacterial extracellular polymeric substances?“ In Wingender, T. R. Neu, H.-C. Flemming, (Hrsg.) “Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function” Springer-Verlag, New York, 1999, 1–15.
- ¹³³ I. W. Sutherland „Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework“, *Microbiology*, **2001**, 147, 3–9.

- ¹³⁴ I. W. Sutherland „Bacterial exopolysaccharides“, *Adv. Microb. Physiol.*, **1972**, 8, 143–213.
- ¹³⁵ B. L. Bassler, „Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria“, *Cell*, **2002**, 109, 421–424.
- ¹³⁶ H.-C. Flemming, J. Wingender, „Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien“, *Biol. Unser. Zeit*, **2001**, 31, 169–180.
- ¹³⁷ J. W. Costerton, *SocigenMicrobiol*, „Biofilms in the new millenium: musings from a peak in Xanadu. In: Community structure and co-operation in Biofilms“, University Press, Cambridge, **2000**, 329–345.
- ¹³⁸ A. Coghlan, „Bugs broadcasting corporation“, *New Scientist*, **2002**, 2338, 13. April.
- ¹³⁹ M. Ward, R. Weller, J. Shiea, R. W. Castenholz, Y. Cohen, „Hot spring microbial mats: anoxygenic and oxygenic mats of possible evolutionary significance“. In: Y. Cohen, E. Rosenberg (Hrsg): „Microbial mats“, *Acad Soc Microbiol* **1989**, Washington, 3–15.
- ¹⁴⁰ H. L. Ehrlich, *Geomicrobiology*, **1990**, Marcel Dekker, New York, Basel 557–602.
- ¹⁴¹ G. Fuchs, T. Eitinger, H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag, **2006**.
- ¹⁴² D. Bernhardt, und H. Diekmann „Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental Rhodococcus strain“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 36, 120–123.
- ¹⁴³ A. Swain, K. V. Waterhouse, W. A. Venables, A. G. Callely, S. E. Lowe, „Biochemical studies of morpholine catabolism by an environmental mycobacterium“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 35, 110–114.
- ¹⁴⁴ B. E. Christensen, W. G. Characklis, „Physical and chemical properties of biofilms“, in W. G. Characklis, K. C. Marshall (Hrsg.) *Biofilms*, New York, John Wiley, **1990**, 93–130.
- ¹⁴⁵ H.-C. Flemming, „Biofouling and microbially influenced corrosion (MIC) – an economical and technical overview“, in E. Heitz, W. Sand, H.-C. Flemming (Hrsg.) *Microbially influenced corrosion of materials- scientific and technological aspects*, Heidelberg, Springer Verlag, **1996**, 5–14.

- ¹⁴⁶ B. Little, R. Ray „A perspective on corrosion inhibition by biofilms“, *Corrosion*, **2002**, 58, 424–428.
- ¹⁴⁷ M. C. Mittelman „Bacterial growth and biofouling control in purified water systems“, In: H.-C. Flemming, G. G. Geesey (Hrsg.) “Biofouling and biocorrosion in industrial waste water systems”. 1991, Springer, Heidelberg, 113–134.
- ¹⁴⁸ M. Exner, G. J. Tuschewitzki, E. Thofern, “Untersuchungen zur Wandbesiedlung der Kupferrohrleitung einer zentralen Desinfektionsmitteldosieranlage“, *Zbl Bakt Hyg Abt Orig B/177* **1983**, 170–181.
- ¹⁴⁹ R. Romero, C. Schaudinn, J. P. Kusanovic, A. Gorur, F. Gotsch, P. Webster, C.-L. Nhan-Chang, O. Erez, C. J. Kim, J. Espinoza, L. F. Goncalves, E. Vaisbuch, S. Mazaki-Tovi, S. S. Hassan, J. W. Costerton, „Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection“, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **2008**, 198, 135–137.
- ¹⁵⁰ J. W. Costerton, J. C. Nickel, T. J. Marrie, „The role of the bacterial glycocalyx and of the biofilm mode of growth in bacterial pathogenesis“, *Roche Semin. Bacteriol.*, **1985**, 2, 1–25.
- ¹⁵¹ A. G. Gristina, J. W. Costerton, “Bacterial adherence to biomaterials and tissue: The significance of its role in clinical sepsis”, *J. Bone Joint Surg.*, **1985**, 67 264–273.
- ¹⁵² J. S. Lam, R. Chan, K. Lam, J. W. Costerton, “Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis”, *Infect. Immun.*, **1980**, 28, 546–556.
- ¹⁵³ K. J. Mayberry-Carson, B. Tober-Meyer, J. K. Smith, D. W. Lambe, J. W. Costerton, *Infect. Immun.*, **1984**, 43, 825–833.
- ¹⁵⁴ H. Anwar, M. R. W. Brown, A. Day, P. H. Weller, “Outer membrane antigens of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolated directly from the sputum of a cystic fibrosis patient”, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1984**, 24, 235–239.
- ¹⁵⁵ H. Anwer, G. H. Shand, K. H. Ward, M. R. W. Brown, K. R. Alpar, J. Gower, “Antibody response to acute *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn wound“, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1985**, 29, 225–230.
- ¹⁵⁶ T.F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart, G. A. O’Toole, “A genetic basis to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance”, *Nature*, **2003**, 426, 306–310.

- ¹⁵⁷ K. Lewis, „Riddle of biofilm resistance“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45, 999–1007.
- ¹⁵⁸ P. S. Stewart, J. W. Costerton, „Antibiotic resistance of bacteria in biofilms“, *Lancet*, **2001**, 358, 135–138.
- ¹⁵⁹ M. Habash, G. Reid, „ Microbial Biofilms: their development and significance for medical device-related infections“ *J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 39, 887–898.
- ¹⁶⁰ M. E. Davey, G. O’Toole, „Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2000**, 64, 847–867.
- ¹⁶¹ A. G. Gristina, “Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration”. *Science*, **1987**, 237, 1588–1595.
- ¹⁶² J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, „Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, **1999**, 284, 318–322.
- ¹⁶³ M. F. C. Thien, G. A. O’Tool, „Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents“, *Trends Microbiol.*, **2001**, 9, 34–39.
- ¹⁶⁴ M. Vogt, H. C. Flemming, W. S. Veeman, „Diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: a pulsed field gradient NMR study“, *J. Biotechnol.*, **2000**, 77, 137–146.
- ¹⁶⁵ C. Potera, „Forging a Link Between Biofilms and Disease“, *Science*, **1999**, 283, 1837–1839.
- ¹⁶⁶ J. N. Anderl, J. Zahller, F. Roe, P. S. Stewart, „Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin“, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 1251–1256
- ¹⁶⁷ M. C. Walters, F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin, P. S. Stewart, „Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin“, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 317–323.
- ¹⁶⁸ K. D. Xu, G. A. McFeters, P. S. Stewart, „Biofilm resistance to antimicrobial agents“, *Microbiology*, **2000**, 146, 547–549.
- ¹⁶⁹ V. Åberg, F. Almqvist, “Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence”, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1827–1834.
- ¹⁷⁰ I. A. Eydelnant, N. Tufenkji, “Cranberry Derived Proanthocyanidins Reduce Bacterial Adhesion to Selected Biomaterials”, *Langmuir*, **2008**, 24, 10273–10281.

- ¹⁷¹ K. Adachi, T. Tsurumoto, A. Yonekura, S. Nishimura, S. Kajiyama, Y. Hirakata, H. Shindo „New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials“, *J. Orthop. Sci.*, **2007**, 12, 178–184.
- ¹⁷² L. Vroman, A. L. Adams, M. Klings, „Interactions among human blood proteins at interfaces“, *Federation Proceedings*, **1971**, 30, 1494–1502.
- ¹⁷³ H. J. Busscher, R. Bos, H. C. van der Mei, „Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion“ *FEMS Microbiol. Lett.*, **1995**, 128, 229–234.
- ¹⁷⁴ G. O’Tool, H. B. Kaplan, R. Kolter, „Biofilmformation as microbial development“, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2000**, 54, 49–79.
- ¹⁷⁵ K. C. Marshall, B. Blainey, *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*, **1991**, Spinger Verlag, Heidelberg, 28–45.
- ¹⁷⁶ M. Fletcher, *Microbial adhesion to surfaces*, Ellis Horwood, Chichester, **1980**, 197–210.
- ¹⁷⁷ K. C. Marshall „Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces“, *ASM News*, **1992**, 58, 202–207.
- ¹⁷⁸ K. C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell, „Mechanisms of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces.“, *J. Gen. Microbiol.*, **1971**, 68, 337–348.
- ¹⁷⁹ K. C. Marshall, „Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces“, in *Bacterial Adhesion. Mechanisms and Physiological Significance.*, Hrsg. D. C. Savage, M. Fletcher, New York, Plenum Press, **1985**, 133–161.
- ¹⁸⁰ B. Gottenbos, H. J. Busscher, H. C. Van Der Mei, P. Nieuwenhuis, „Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections“, *J. Mater. Sci.: Mat. In Med.*, **2002**, 13, 717–722.
- ¹⁸¹ C. Mayer, R. Moritz, C. Kirschner, W. Borchard, R. Maibaum, J. Wingender, H-C Flemming, „The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms.“, *J. Biol. Macromol.*, **1999**, 26, 3–16.
- ¹⁸² R. J. Doyle, E.M. Sonnenfeld, “Properties of the cell surfaces of pathogenic bacteria”, *Int. Rev. Cytol.*, **1989**, 118, 33–92.
- ¹⁸³ C. M. Brown, D. C. Ellwood and J. R. Hunter, „Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation“, *FEMS Microbiol Lett*, **1977**, 1, 163–166.

- ¹⁸⁴ W. E. de Boer, C. Golten and W. A. Scheffers, „Effects of some physical factors on flagellation and swarming of *Vibrio alginolyticus*“, *Neth. J. Sea Res.*, **1975**, 9, 197–213.
- ¹⁸⁵ L. A. Pratt, R. Kolter, „Genetic analysis of *Escherichia coli* Biofilm formation: roles of flagell, motility, chemotaxis and type I pilli.“, *Mol Microbiol* **1998**, 30, 285–293.
- ¹⁸⁶ M. Rosenberg, S. Kjelleberg, “Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion”, *Adv. Microbiol Ecol.*, **1986**, 9, 353–393.
- ¹⁸⁷ W. A. Corpe, “Microbial surface components involved in Adsorption of Microorganisms onto surfaces”, in *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, Hrsg. G. Bitton, K. C. Marshall John Wiley, New York, **1980**, 105–144.
- ¹⁸⁸ C. J. Van Oss, “Hydrophobicity and hydrophilicity of biointerfaces”, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **1997**, 2, 503–512.
- ¹⁸⁹ T. A. Kadam, L. Pupa, D. K. Balhal, N. D. Totewad, G. Gynanath, “Determination of the Degree of Hydrophobicity – A Technique to Assess Bacterial Colonisation on Leaf Surface and Root Region of Lotus Plant”, *Asian J. Exp. Sci.*, **2009**, 23, 135–139.
- ¹⁹⁰ M. Fletcher, G. I. Loeb, “Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to solid Surfaces”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1979**, 37, 67–72.
- ¹⁹¹ C. J. Van Oss, “Hydrophobicity of biosurfaces- origin, quantitative determination and interaction energies”, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **1995**, 5, 91–110.
- ¹⁹² Y. L Ong, A. Razatos, G. Georgiou, M. M. Sharma, “Adhesion Forces between *E. coli* Bacteria and Biomaterial Surfaces”, *Langmuir*, **1999**, 15, 2719–2725.
- ¹⁹³ G. A. Burks, S. B. Velegol, E. Paramonova, B. E. Lindenmuth, J. D. Feick, B. E. Logan, “Macroscopic and Nanoscale Measurements of the Adhesion of Bacteria with Varying Outer Layer Surface Composition”, *Langmuir*, **2003**, 19, 2366–2371.
- ¹⁹⁴ H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher, „The Use of X-Ray Spectroscopy for the Study of Oral Streptococcal Cell Surface“, *Adv. Dent. Res.*, **1997**, 11, 388–394.
- ¹⁹⁵ R. Oliveira, J. Azeredo, P. Teixeira, A. P. Fonseca, “The Role of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion”, *BioLine*, **2001**, 11–22.
- ¹⁹⁶ H. J. Busscher, A. H. Weerkamp, „Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata“, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1987**, 46, 165–173.

- ¹⁹⁷ J. M. Meinders, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, „Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow“, *J. Coll. Interface Sci.*, **1995**, 176, 329–341.
- ¹⁹⁸ K. C. Marshall, “Adsorption and Adhesion Processes in Microbial Growth at Interfaces”, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, **1986**, 25, 59–86.
- ¹⁹⁹ B. V. Derjaguin, L. Landau, „Theory of the stability of strongly charged lyophobic soils on the adhesion of the strongly charged particles in solutions of electrolytes“, *Acta Physicochim* **1941**, 14, 633–662.
- ²⁰⁰ Y. H. An, R. B. Dickinson, R. J. Doyle, “Mechanisms of Bacterial Adhesion and Pathogenesis of Implant and Tissue Infections”, in Y. H. An, R. J. Friedman (Hrsg.), *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, Humana Press, Totowa, NJ, **2000**.
- ²⁰¹ M. Morra, C. Cassinelli, „Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surface thermodynamic approaches“, *J. Biomater. Scie. Polymer. Edn.*, **1997**, 9, 55–74.
- ²⁰² D. R. Absolom, F. V. Lamberti, Z. Policova, W. Zingg, C. J. van Oss., A. W. Neumann, “Surface Thermodynamics of Bacterial Adhesion”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1983**, 46, 90–97.
- ²⁰³ M. Fletcher, K. C. Marshall, “Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1982**, 44, 184–192.
- ²⁰⁴ Van der Mei, M Rosenberg, H. J. Busscher, „Assessment of microbial cells surface hydrophobicity“, in N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher, P. G. Rouxhet, (Hrsg.) *Microbial Cell Surface Analysis* New York, VCH, **1991**, 263–288.
- ²⁰⁵ M. Hermansson, “The DLVO theory in microbial adhesion”, *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **1999**, 14, 105–119.
- ²⁰⁶ M.-N. Bellon-Fontaine, N. Mozes, H. C. van der Mei, J. Sjollemma, O. Cerf, P. G. Rouxhet, H. J. Busscher, “A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata”, *Cell Biophys.*, **1990**, 17, 93–106.
- ²⁰⁷ M. Fletcher, J. N. Pringle, “The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial adhesion”, *J. Coll. Interf. Sci.*, **1985**, 104, 5–14.

- ²⁰⁸ C. J. Van Oss, "Interfacial Forces in Aqueous Media", Marcel Dekker, New York, **1994**.
- ²⁰⁹ B. A. Jucker, A. J. B. Zehnder, H. Harms, „Quatification of polymer interactions in bacterial adhesion“, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 2909–2915.
- ²¹⁰ J. Sjollem, H. C. Van der Mei, H. M. W. Uyen, H. J. Busscher, „The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral streptococci in a parallel plate flow cell“, *J. Adhesion Sci. Technol.*, **1990**, 4, 765–777.
- ²¹¹ W. G. Characklis, G. A. McFeters, K. C. Marshall, In Biofilms (W. G. Characklis, K. C. Marshall,) John Wiley, New York, **1990**, 341–394.
- ²¹² K. Wiencek, M. Fletcher, „Effects of substratum wettability and molecular topography on the initial adhesion of bacteria to chemically defined substrata“, *Biofouling*, **1997**, 11, 293–311.
- ²¹³ L. Ploux, S. Beckendorff, M. Nardin, S. Neunlist, „Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers“, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **2007**, 57, 174–181.
- ²¹⁴ B. Gottenbos, D. W. Grijpma, H. C. Van der Mei, J. Feijen, H. J. Busscher, „Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria“, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, 48, 7–13.
- ²¹⁵ G. Harkes, J. Feijen, J. Dankert, „Adhesion of *Escherichia coli* on to a series of Poly(metacrylates) differing in charge and hydrophobicity“, *Biomaterials*, **1991**, 12, 853–860.
- ²¹⁶ T. R. Neu, K. C. Marshall, „Bacterial Polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces“, *J. Biomater. Appl.*, **1990**, 5, 107–133.
- ²¹⁷ I. C. Hancock, „Microbial cell surface architecture“ in: N. Mozes, P.S. Handely, H. J. Busscher, P. G. Rouxter (Hrsg): *Microbial cell surface analysis, structural and physicochemical methods*, **1991**, 21–59, VCH Weinheim, Deutschland.
- ²¹⁸ A. H. Hogt, J. Dankert, J. A. Vries, J. Feijen, „Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials“, *J. Gen. Microbiol.*, **1983**, 129, 1959–1968.
- ²¹⁹ V. A. Tagoulia, S. L. Cooper, „*Staphylococcus aureus*, adhesion to self-assembled monolayers: effects of surface chemistry and fibrinogen presence“, *Col. Surf. B: Biointerf.*, **2002**, 24, 217–228.

- ²²⁰ Y. Liu, J-H. Tay, "The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge", *Water Res.*, **2002**, 36, 1653–1665.
- ²²¹ C. R. Bunt, D. S. Jones, I. G. Tucker, "The Effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test", *Intern. J. Pharm.*, **1993**, 99, 93–98.
- ²²² C. R. Bunt, D. S. Jones, I. G. Tucker, „The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods", *Intern. J. Pharm.*, **1995**, 113, 257–261.
- ²²³ M. J. McWhirter, A. J. McQuillan, P. J. Bremer, „Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attached to ZeSe and to TiO₂ monitored by ATR-IR spectroscopy", *Col. Surf. B: Biointerf.*, **2002**, 84, 17–25.
- ²²⁴ R. Oliveira, L. Melo, A. Oliveira, R. Salgueiro, "Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material", *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **1994**, 2, 41–46.
- ²²⁵ J. O. Duguid, I. W. Smith, G. Dempster, P. N. Edmunds, "Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in bacterium coli", *J. Pathol. Bacteriol.*, **1955**, 70, 335–348.
- ²²⁶ C. C. Brinton, "The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and molecular model for DNA and RNA transport in Gram-negative bacteria", *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **1965**, 27, 1003–1054.
- ²²⁷ Y. H. An, R. J. Friedman, "Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces", *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **1998**, 43, 338–348.
- ²²⁸ Y. Bashan, H. Levanony, „Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol*, **1988**, 134, 2269–2279.
- ²²⁹ A. Danielsson, B. Bjommsson, "On bacterial adhesion-the effect of certain enzymes on adhered cells in a marine *Pseudomonas sp*", *Bot Marina* **1977**, 20, 13–17.
- ²³⁰ P. J. Herald, E. A. Zottola, „Effect of various agents upon the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel", *J. Food Sci.*, **1989**, 54, 461–464.

- ²³¹ R. Bos, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, „Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study“, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1999**, 23, 179–230.
- ²³² K. L. Prime, G. M. Whitesides, “Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10714–10721.
- ²³³ W. A. Corpe, “Attachment of marine bacteria to solid surfaces”, in *Adhesion in Biological Systems*, S. Manly (Hrsg.), Academic Press, New York, 1970, 73–87.
- ²³⁴ L. K. Ista, H. Fan, O. Baca, G. P. López, “Attachment of bacteria to model solid surfaces: oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment”, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1996**, 142, 59–63.
- ²³⁵ K. M. Wiencek, M. Fletcher, “Bacterial Adhesion to Hydroxyl- and Methyl-Terminated Alkanthiol Self-Assembled Monolayers”, *J. Bacteriol.*, **1995**, 177, 1959–1966.
- ²³⁶ M. Mrksich, G. S. Sigal, G. M. Whitesides, „Surface Plasmon Resonance permits in situ Measurement of Protein Adsorption on Self-Assembled Monolayers of Alkanthiolates on Gold“, *Langmuir*, **1995**, 11, 4383–4385.
- ²³⁷ G. S. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, “Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3464–3473.
- ²³⁸ J. M. Harris, S. Zalipsky, *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum Press, New York, **1992**.
- ²³⁹ E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, „A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that resist the Adsorption of Protein“, *Langmuir*, **2001**, 17, 5605–5620.
- ²⁴⁰ S. Jon, J. Seong, A. Khademhosseini, T.-N. T. Tran, P. E. Laibinis, R. Langer, “Construction of Nonbiofouling Surfaces by Polymeric Self-Assembled Monolayers”, *Langmuir*, **2003**, 19, 9989–9993.
- ²⁴¹ N. Xia, Y. Hu, D. W. Grainger, D. G. Castner, „Functionalized Poly(ethylene glycol)-Grafted Polysiloxane Monolayers for Control of Protein Bining“, *Langmuir*, **2002**, 18, 3255–3262.

- ²⁴² Y. Zhou, B. Liedberg, N. Gorochovceva, R. Makuska, A. Dedinaite, P. M. Claesson, "Chitosan-*N*-poly(ethylene oxide) brush polymers for reduced nonspecific protein adsorption", *J. Colloid Interface Sci.*, **2007**, 305, 62–71.
- ²⁴³ V. A. Tegoulia, W. Rao, A. T. Kalambur, J. F. Rabolt, S. L. Cooper, „Surface Properties, Fibrinogen Adsorption, and Cellular Interactions of a Novel Phosphorylcholine-Containing Self-Assembled Monolayers on Gold“, *Langmuir*, **2001**, 17, 4396–4404.
- ²⁴⁴ S. Chen, L. Liu, S. Jiang, „Strong Resistance of Oligo(phosphorylcholine) Self-Assembled Monolayers to Protein Adsorption“, *Langmuir*, **2006**, 22, 2418–2421.
- ²⁴⁵ Z. Zhang, S. Chen, S. Jiang, "Dual-Functional Biomimetic Materials: Nonfouling Poly(carboxybetaine) with Active Functional Groups for Protein Immobilization", *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 3311–3315.
- ²⁴⁶ Y. Chang, S. Chen, Z. Zhang, M. Bernards, S. Jiang, „Development of Biocompatible Interpenetrating Polymer Networks Containing a Sulfobetaine-Based Polymer and a Segmented Polyurethane for Protein Resistance“ *Biomacromolecules* , **2007**, 8, 122–127.
- ²⁴⁷ L. Deng, M. Mrksich, G.M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates Presenting Tri(propylene sulfoxide) Groups Resist the Adsorption of Protein", *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5136–5137.
- ²⁴⁸ G. Siegers, M. Biesalsky, R. Haag, „Self-Assembled Monolayers of Dendritic Polyglycerol Derivatives on Gold That Resist the Adsorption of Proteins“, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 2831–2838.
- ²⁴⁹ Y. S. Chi, B. S. Lee, M. Kil, H.-j. Jung, E. Oh, I. S. Choi, „Asymmetrically Functionalized, Four-Armed, Poly(ethylen glycol) Compounds for Construction of Chemically Functionalizable Non-Biofouling Surfaces“, *Chem. Asian. J.*, **2009**, 4, 135–142.
- ²⁵⁰ P. Krsko, M. Libera, "Biointeractive Hydrogels", *Materials Today*, **2005**, 8, 36–44.
- ²⁵¹ S. W. Lee, P. E. Laibinis, "Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo(ethylene glycol)-terminated alkyltrichrosilanes", *Biomaterials*, **1998**, 19, 1669–1675.
- ²⁵² D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, D. E. Leckband, "Longterm stability of grafted polyethylene glycol surfaces for use with microstamped substrates in neuronal cell culture", *Biomaterials*, **2001**, 22, 1035–1047.

- ²⁵³ A. Roosjen, J. de Vries, H. C. van der Mei, W. Norde, H. J. Busscher, „Stability and Effectiveness against Bacterial Adhesion of Poly(ethylene oxide) Coatings in Biological Fluids“, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2005**, 73B, 347–354.
- ²⁵⁴ N. T. Flynn, T. Nga, T. Tran, M. J. Cima, R. Langer „Long-Term Stability of Self-Assembled Monolayers in Biological Media“, *Langmuir*, **2003**, 19, 10909–10915.
- ²⁵⁵ N. I. Gordienok, B. G. Freidin, L. S. Proskurina, „Autooxidation of diethylen glycol“, *Zhurnal Prikladnoi Khimii*, **1986**, 59, 1549-1554.
- ²⁵⁶ S. I. Jeon, L. H. Lee, J. D. Anrade, P. G. de Gennes, „Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I Simplified theory“, *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, 142, 149–158.
- ²⁵⁷ S. I. Jeon, J. D. Anrade, „Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: II Effect of protein size“, *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, 142, 159–166.
- ²⁵⁸ K. Helsing, „Gel Chromatography in eluents containing Polymers“, *J. Cromatogr.*, **1968**, 36, 170–180.
- ²⁵⁹ S. Nagaoka, Y. Mori, H. Takiuchi, K. Yokota, H. Tanzava, S. Nishiumi, in: *Polymers as Biomaterials*, S. W. Shalaby, A. S. Hofmfman, B. D. Ratner, T. A. Horbett (Hrsg.), Plenum Press New York, **1985**, 361.
- ²⁶⁰ T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, „Prevetion of Protein Adsorption by Tethered Poly(ethylene oxide) Layers: Experimental Single-Chain Mean-Field Analysis“, *Langmuir*, **1998**, 14, 176–186.
- ²⁶¹ I. Szleifer, „Polymers and proteins: interactions at interfaces“, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **1997**, 2, 337–344.
- ²⁶² R. S. Kane, P. Deschatelets, G.M. Whitesides, „Kosmotropes Form the Basis of Protein-Resistent Surfaces“, *Langmuir*, **2003**, 19, 2388–2391.
- ²⁶³ S. Moelbert, B. Normand, P. De Los Rios, „Kosmotropes chaotropes: Modelling preferential exclusion, binding and agregate stability“, *Biophys. Chem.*, **2004**, 112, 45–57.
- ²⁶⁴ Y. Miyazaki, H. Matsuura, „Hydratation of Cyclic Oligo(oxyethylene) Compaunds. Ultrasonic Velocities and Compressibilities of Biniry Systems of Water with 12-Crown-4, 15-Crown-5, and 18-Crown-6“, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, 64, 288–290.

- ²⁶⁵ J. Zheng, L. Li, S. Chen, S. Jiang, „Molecular simulation study of water interaction with oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers“, *Langmuir*, **2004**, 20, 8931–8938.
- ²⁶⁶ J. Zheng, L. Li, H.-K. Tsao, Y.-J. Sheng, S. Chen, S. Jiang, „Strong Repulsive Forces between Protein and Oligo(Ethylene Glycol) Self-Assembled Monolayers: A Molecular Simulation Study“, *Biophys. J.*, **2005**, 89, 158–166.
- ²⁶⁷ D. Schwendel, T. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, F. Schrieber, „Interaction of Water with Self-Assembled Monolayers: Neutron Reflectivity Measurements of the Water Density in the Interface Region“, *Langmuir*, **2003**, 19, 2284–2293.
- ²⁶⁸ A. J. Pertsin, T. Hayashi, M. Grunze, „Grand Canonical Monte Carlo Simulations of the Hydration Interaction between Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanthiol Self-Assembled Monolayers“, *J. Phys. Chem: B*, **2002**, 106, 12274–12281.
- ²⁶⁹ A. E. Ismail, G. S. Grest, M. J. Stevens, „Structure and Dynamics of Water near the Interface with oligo(ethylene oxide) Self-Assembled Monolayers“, *Langmuir*, **2007**, 23, 8508–8514.
- ²⁷⁰ W. R. Gombotz, W. Ganghui, T. A. Horbett, A. S. Hoffman, „Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces“, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1991**, 25, 1547–1562.
- ²⁷¹ E. W. Merrill, „Distinctions and correspondence among surfaces contacting blood“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1987**, 516, 196–203.
- ²⁷² L. G. Griffith, „Polymeric biomaterials“, *Acta Mater.*, **2000**, 48, 263–277.
- ²⁷³ M. Zuhlen, S. Herrwerth, W. Eck, M. Grunze, G. Hähner, „Conformational Order in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold Determined by Soft X-ray Adsorption“, *Langmuir*, **2003**, 19, 9305–9310.
- ²⁷⁴ R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze, „Molecular Conformation and Solvation of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Protein Adsorption“, *J. Phys. Chem. B.*, **1997**, 101, 9767–9773.
- ²⁷⁵ P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibnis, „Molecular Conformation in Oligo(Ethylene glycol)-Terminated Self-assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability to Resist Protein Adsorption“, *J. Phys. Chem. B.*, **1998**, 102, 426–436.

- ²⁷⁶ A. J. Pertsin, M. Grunze, I. A. Garbuzova, „Low-Energy Configurations of Methoxy Triethylene Glycol Terminated Alkanthiol Self-Assembled Monolayers and Their Relevance to Protein Adsorption“, *J. Phys. Chem. B.*, **1998**, 102, 4918–4926.
- ²⁷⁷ P. Vermette, L. Meagher, „Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms“, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2003**, 28, 153–198.
- ²⁷⁸ M. Zolk, F. Eisert, J. Pipper, S. Herrwerth, W. Eck, M. Buck, M. Grunze, „Solvation of Oligo(ethylene glycole)-Terminated Self-Assembled Monolayers Studied by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy“, *Langmuir*, **2000**, 16, 5849–5852.
- ²⁷⁹ R. Kunz, C. Anders, L. Heinrich, K. Gersonde, „Investigation into the mechanism of bacterial adhesion to hydrogel-coated surfaces“, *J. Mater. Sci.: Mater. in Med*, **1999**, 10, 649–652.
- ²⁸⁰ P. Kingshott, H. J. Griesser, „Surfaces that resist Bioadhesion“, *Current Opinion in solid state and materials science*, **1999**, 4, 403–412
- ²⁸¹ T. P. Curtis, W. T. Sloan, J. W. Scannell, „Estimating procaryotic diversity and its limits“, *PNAS*, **2002**, 99, 10494–10499.
- ²⁸² M. S. Rappe, S. J. Giovannoni, „The uncultured microbial majority“, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2003**, 57, 369–394.
- ²⁸³ H. C. Van der Mei, R. Bos, H. J. Busscher, „A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on kontakt angles“, *Coll. Surf. B* **1998**, 11, 213–221.
- ²⁸⁴ <http://www.egbeck.de/skripten/bilder/bakt3.gif>
- ²⁸⁵ D. J. Diekema, M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, „Survey of infections due staphylococcus spezies: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Pacific region for the Sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999.“, *Clin. Infect. Dis.*, **2001**, 32, 114–132.
- ²⁸⁶ G. Livni, Y. Yuhas, S. Ashkenazi, S. Michowiz, „In vitro Bacterial Adherence to Ventriculoperitoneal Shunts“, *Pediatr. Neurosurg.*, **2004**, 40, 64–69.
- ²⁸⁷ Z. Shen, M. Huang, C. Xiao, Y. Zhang, X. Zeng, P. G. Wang, „Nonlabeled Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Bacterial Detection using Carbohydrate and Lectine Recognations“, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 2312–2319.

- ²⁸⁸ M. R. W. Brown, P. Williams, "The Influence Of Environment On Envelope Properties Affecting Survival Of Bacteria In Infections", *Ann. Rev. Microbiol.*, **1985**, 39, 527–556
- ²⁸⁹ H. Smith, „Microbiol Surfaces in Relation to Pathogenicity“, *Bacteriol. Rev* , **1977**, 41, 475–500
- ²⁹⁰ R. Yanagawa, K. Otsuki, T. Tokul, „Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili“, *Jpn. Vet. Res.*, **1968**, 16, 31–37.
- ²⁹¹ J. Scott, D. Zähler, "Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently", *Mol. Microbiol.*, **2006**, 62, 320–330.
- ²⁹² M. H. Ly, N. H. Vo, T. M. Le, J. M. Belin & Y. Waché „Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components“, *Colloid Surface B*, **2006**, 52, 149–153.
- ²⁹³ K. Meritt, Y. H. An, „Factors Influencing Bacterial Adhesion“, in Y. H. An, R. J. Friedman (Hrsg) *Handbook of Bacterial Adhesion*, Humana Press, Totowa, NY, **2000**, S. 56.
- ²⁹⁴ M. S. Smeltzer, „Characterization of Staphylococcal Adhesins for Adhesion to Host Tissues“, in Y. H. An, R. J. Friedman, (Hrsg.) *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, S. 411, Humana Press, Totowa, NJ, **2000**.
- ²⁹⁵ A. G. Gristina, „Biomaterials-centred infection: microbial adhesion versus tissue integration“, *Science*, **1987**, 237, 1588–1595.
- ²⁹⁶ G. J. C. Veenstra, F. F. M. Gemers, H. van Dijk, A. Fleer, „Ultrastructural organisation and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*“, *J. Bacteriol.*, **1996**, 178, 537–541.
- ²⁹⁷ C. Vuong, M. Otto, „*Staphylococcus epidermidis* infections“, *Microbes Infect.*, **2002**, 4, 481–489.
- ²⁹⁸ M. E. Rupp, J. S. Ulphani, P. D. Fey, D. Mack, "Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysacchside intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter associated infection in a rat model", *Infect. immun.*, **1999**, 67, 2656–2659.
- ²⁹⁹ E. Barth, Q. M. Myrvik, W. Wagner, A. G. Gristina, „*In vitro* and *in vivo* comparative colonization of *staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis* on orthopedic implantat materials“, *Biomaterials*, **1989**, 10, 325–328.

- ³⁰⁰ T. J. Marrie, J. W. Costerton, „Morphology of bacterial attachment to cardiac pace-maker leads and power packs“. *J. Clin. Microbiol.*, **1984**, 19, 911–914.
- ³⁰¹ C. Cucarella, C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, J. R. Penacles, „Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation“, *J. Bacteriol.*, **2001**, 183, 2888–2896.
- ³⁰² M. Gross, S. E. Cramton, F. Gotz, A. Peschel, “Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonisation of artificial surfaces”, *Infect. Immun.*, **2001**, 69, 3423–3426.
- ³⁰³ C. Weidenmaier, J. F. Kokai-Kun, S. A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kilbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J. J. Mond, A. Peschel „Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonisation, a major risk factor in nosocomial infections“ *Nature Medicine*, **2004**, 10, 243–245.
- ³⁰⁴ S. E. Cramton, C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, F. Götz, „The intercellular adhesin (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation” *Infect. Immun.*, **1999**, 67, 5427–5433.
- ³⁰⁵ J. Danert, A. H. Hogt, J. Feijen, „Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization, and infection“, *Crit. Rev. Biocompat.*, **1986**, 2, 219–301.
- ³⁰⁶ J. J. Martinez, M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, “Type I pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells”, *EMBO J.*, **2000**, 19, 2803–2812.
- ³⁰⁷ M. Dembo, D. C. Torney, K. Saxman, D. Hammer, “The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment”, *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **1988**, 234, 55–83.
- ³⁰⁸ Research News, *Science*, **1996**, 27, 273.
- ³⁰⁹ D. G. Davies, A. M. Chakrabarty, G. G. Geesey, „Exopolysaccharide production in Biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59, 1181–1186.
- ³¹⁰ C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, E. S. Binkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbog, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen,

“Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen”, *Nature*, **2000**, 406, 956–964.

³¹¹ G. A. O’Toole, R. Kolter, „Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development“, *Mol. Microbiol.*, **1998**, 30, 295–304.

³¹² M. Fletcher, „Methods for studying adhesion and attachment to surfaces“ in ,R. Grigorova, J. R. Norris, (Hrsg.) *Methods in Microbiology*, **1990**, 22, 251–280.

³¹³ K. Raiber, *Doktorarbeit*, Universität Hamburg, **2005**.

³¹⁴ H. Motschmann, *Handbuch zum Multiskop*, Optrel GBR, Berlin, **2001**.

³¹⁵ C. W. Extrand, “Contact Angles and Hysteresis on Surfaces with Chemically Heterogeneous Islands”, *Langmuir*, **2003**, 19, 3793–3796.

³¹⁶ K. Abe, H. Takigudie, K. Tamada, „Dynamic Contact Angle Measurements of Au(111)-Thiol Self-Assembled Monolayers by the Wilhelmy Plate Method“, *Langmuir*, **2000**, 16, 2394–2397.

³¹⁷ J. Lahann, S. Mitagori, T. N. Tran, H. Kaido, J. Sundaram, I. S. Choi, S. Hoffer, G. A. Somorjai, R. Langer, “A Reversibly Switching Surface”, *Science*, **2003**, 299, 371–374.

³¹⁸ J. Dankert, A. H. Hogt, J. Feijen, „Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonisation, and infection“, *CRC, Crit. Rev. Biocompat.*, **1986**, 2, 219–301.

³¹⁹ Y. H. An, R. J. Friedman, „Laboratory methods for studies of bacterial adhesion“, *J. Microbiol. Meth.*, **1997**, 30, 141–152.

³²⁰ T. W. Fraser, A. Gilmour, „Scanning electron microscopy preparation methods: their influence of the morphology and fibril formation in *Pseudomonas fragi*“, *J. Appl. Bacteriol.*, **1986**, 60, 527–533.

³²¹ T. A. Camesano, Y. Liu, M. Datta, “Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques”, *Advanc. Water. Res.*, **2007**, 30, 1470–1491.

³²² Y. F. Dufrêne, “Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology”, *J. Bacteriol.*, **2002**, 184, 5205–5213.

³²³ J. H. Pringle, M. Fletcher, “Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1983**, 45, 811–817.

³²⁴ R. A. Herbert, „Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments“, *Methods Microbiol.*, **1990**, 22, 287–307.

- ³²⁵ D. P. Bakker, B. R. Postmus, H. J. Busscher, H. C. van der Mei, „Bacterial Strains Isolated from Different Niches Can Exhibit Different Patterns of Adhesion to Substrata“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, 70, 3758–3760.
- ³²⁶ W. G. Pitt, M. O. McBride, A. J. Barton, R. D. Saers, “Air-water interface displaces adsorbed bacteria”, *Biomaterials*, **1993**, 14, 605–608.
- ³²⁷ H. J. Busscher, H. C. van Der Mei, „Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial Adhesion“, *Meth. Enzymol.*, **1995**, 253, 455–477.
- ³²⁸ C. Cómez-Suárez, H. J. Busscher, H. C. Van Der Mei, “Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67, 2531–2537.
- ³²⁹ J. E. Hobbie, R. J. Daley, S. Jasper, “Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1977**, 33, 1225–1228.
- ³³⁰ F. A. Taniou, J. M. Veal, H. Buczuk, L. S. Ratmeyer, W. D. Wilson, “DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites”, *Biochemistry*, **1992**, 31, 3103–3112.
- ³³¹ X. Qian, S. J. Metallo, I. S. Choi, H. Wu, M. N. Liang, G. M. Whitesides, „Arrays of Self-Assembled Monolayers for Studying Inhibition of Bacterial Adhesion“, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1805–1810.
- ³³² <http://www.mpip-mainz.mpg.de/knoll/soft/index.html>
http://www.mpip-mainz.mpg.de/knoll/soft/winspall301_free.zip.
- ³³³ P. M. Fratamico, T. P. Strobaugh, M. B. Medina, A. G. Gehring, “Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor”, *Biotechnol. Techniq.*, **1998**, 12, 571–576.
- ³³⁴ J. R. Son, G. Kim, A. Kothapalli, M. T. Morgan, D. Ess, “Detection of *Salmonella enteritidis* Using a Miniature Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor”, *J. Physic., Conference Series*, **2007**, 61, 1086–1090.
- ³³⁵ S. Balasubramanian, I. B. Sorokulova, V. J. Vodyanoy, A. L. Simonian, “Lytic phage as a apezific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* – A surface plasmon resonance spectroscopic study”, *Biosens. Bioelectronocs*, **2007**, 22, 948–955.

- ³³⁶ A. Toby, A. Jenkins, F.-C. Richard, A. Buckling, D. J. Clarke, K. Jarvis, "Study of the Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* on Gold and Modified Gold Surfaces Using Surface Plasmon Resonance", *Biotechnol. Prog.*, **2004**, 20, 1233–1236.
- ³³⁷ E. A. Perkins, D. J. Squirrell, "Development of instrumentation to allow the detection of microorganisms using light scattering in combination with surface plasmon resonance", *Biosens. Bioelectronics*, **2000**, 14, 853–859.
- ³³⁸ B.-I. Noh, C.-S. Seok, W.-C. Moon, S.-B. Jung, „Effect of plasma treatment on adhesion characteristics at interfaces between underfill and substrate”, *Intern. J. Adhes. Adhesiv.*, **2007**, 27, 200–206.
- ³³⁹ M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, P. S. Swain, "Stochastic gene expression in a single cell", *Science*, **2002**, 297, 1183–1186.
- ³⁴⁰ Prof. Dr. P. Heisig, Persönliche Mitteilung.
- ³⁴¹ A. Steinbüchel, F. B. Opeermann-Sanio, "*Mikrobiologisches Praktikum. Versuche und Theorie*", 1. Auflage, Springer, Berlin, **2003**.
- ³⁴² R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. S. Warren, G. M. Whitesides, „Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria“, *Langmuir*, **2001**, 17, 1225–1233.
- ³⁴³ G. Cheng, Z. Zhang, S. Chen, J. D. Bryers, S. Jiang, „Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces”, *Biomaterials*, **2007**, 28, 4192–4199.
- ³⁴⁴ J. McFarland, "Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines", *J. Amer. Medic. Assoc.*, **1907**, 14, 1176–1178.
- ³⁴⁵ R. S. Pembrey, K. C. Marshall, R. P. Schneider, „Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 65, 2877–2894.
- ³⁴⁶ R. R. Colwell „Viable but non-culturable bacteria in the aquatic environment“, *Culture*, **1991**, 72, 2–4.
- ³⁴⁷ D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, D. H. Weichert, C. R. Harwood, M. B. Barer, „Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues“, *Antonie van Leeuwenhoek*, **1998**, 73, 169–187.

- ³⁴⁸ K. Morikawa, M. Yanagida, „Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy. DAPI staining method”, *J. Biochem.*, (Tokyo), **1981**, 89, 693–696.
- ³⁴⁹ <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- ³⁵⁰ <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>
- ³⁵¹ C. M. Davies, „A comparison of fluorochromes for direct viable counts by image analysis“, *Appl. Lett. Microbiol.* **1991**, 13, 58–61.
- ³⁵² R. Oltmanns, *Diplomarbeit*, „Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung von Mikroorganismen“, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, **1996**.
- ³⁵³ J. C. Fry, „Direct Methods and Biomass Estimation“ in *Methods in Microbiology*, Hrsg. R. Grigorova, J. R. Norris **1990**, 22, 41–85.
- ³⁵⁴ A. Prince, „*Pseudomonas aeruginosa*: Versatile Attachment Mechanisms“, in M. Fletcher (Hrsg.) „*Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*“, Wiley-Liss, New York, **1996**, 183–199.
- ³⁵⁵ B. E. Christensen, J. Kjosbakken, O. Smidsrod, „Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine periphytic *Pseudomonas* sp. Strain NCMB2021“, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1985**, 50, 837–845.
- ³⁵⁶ R. A. Al-Tahhan, T. R. Sandrin, A. A. Bodour, R. M. Maier, “Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 3262–3268.
- ³⁵⁷ M. E. Devey, N. C. Caiazza, G. A. O’Toole, “Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA01”, *J. Bacteriol.*, **2003**, 185, 1027–1036.
- ³⁵⁸ E. T. Griffiths, S. G. Hales, N. J. Russel, G. F. White, „Identification of Hydrophobic Metabolites Formed During Biodegradation of Alkyl Ethoxylate and Alkyl Ethoxy Sulfate surfactants by a *Pseudomonas* sp. DES 1”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1987**, 9, 217–229.
- ³⁵⁹ M. Portolés, M. F. Refojo, F.-L. Leong, “Poloxamer 407 as a bacterial adhesive to hydrogel contact lenses”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1994**, 28, 303–309.
- ³⁶⁰ R. C. Sabapathy, R. M. Crooks, “Interfacial Reactivity of Hydroxyl-Terminated Monolayers in the Absence of Solvents”, *Langmuir*, **2000**, 16, 1777–1782.

- ³⁶¹ M. Lestelius, B. Liedberg, P. Tengvall, "In Vitro Plasma Protein Adsorption on ω -Funktionalized Alkanthiolate Self-Assembled Monolayers", *Langmuir*, **1997**, 13, 5900–5908.
- ³⁶² J. P. Wit, H. J. Busscher, „Site selectivity in the deposition and redeposition of polystyrene particles to glass“, *J. Colloid. Interface Sci.*, **1998**, 208, 351–352.
- ³⁶³ G. M. Bruinsma, M. Rustems-Abbing, J. De Vries, H. J. Busscher, M. L. Van der Linden, J. M. M. Hooymans, H. C. Van der Mei, „Multiple surface properties of worn RGP lenses and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*“, *Biomaterials*, **2003**, 24, 1663–1670.
- ³⁶⁴ A. Roosjen, H. C. van der Mei, H. Busscher, W. Norde, „Microbial Adhesion to Poly (ethylene oxide) Brushes: Influence of Polymeric Chain Length and Temperature“, *Langmuir*, **2004**, 20, 10949–10955.
- ³⁶⁵ A. Roosjen, H. Busscher, W. Norde, H. C. van der Mei, „Bacterial factors influencing adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to a poly(ethylene oxide) brush“, *Microbiology*, **2006**, 152, 1673–2682.
- ³⁶⁶ R. D. Monds, M. W. Silby, H. K. Mahanty, "Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *pseudomonas aureofaciens* PA147-2", *Mol. Microbiol.*, **2001**, 42, 415–426.
- ³⁶⁷ A. Imberty, M. Wimmerova, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, "Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition", *Microb. Infect.*, **2004**, 6, 221–228.
- ³⁶⁸ D. Tielker, S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, K.-E. Jager, „*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation“, *Microbiology*, **2005**, 151, 1313–1323.
- ³⁶⁹ <http://idw-online.de/pages/en/news320667>
- ³⁷⁰ B. M. R. Appenzeller, Y. B. Duval, F. Thomas, J.-C. Block, „Influence of Phosphate on Bacterial Adhesion onto Iron Oxyhydroxide in Drinking Water“, *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 646–652.
- ³⁷¹ L. B. Goetting, T. Deng, G. M. Whitesides, "Microcontact Printing of Alkanephosphonic Acids on Aluminium: Pattern Transfer by Wet Chemical Etching", *Langmuir*, **1999**, 15, 1182–1191.

- ³⁷² R. D. Ramsier, P. N. Henriksen, A. N. Gent, „Adsorption of phosphorus acids on alumina”, *Surf. Sci.*, **1988**, 203, 72–88.
- ³⁷³ A. Raman, E. S. Gawalt, “Self-Assembled Monolayers of Alkanoic Acids on the Native Oxide Surface of SS316L by Solution Deposition”, *Langmuir*, **2007**, 23, 2284–2288.
- ³⁷⁴ A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman, E. S. Gawalt, „Formation of Self-Assembled Monolayers of Alkylphosphonic Acid on the Native Oxide Surface of SS316L”, *Langmuir*, **2006**, 22, 6469–6472.
- ³⁷⁵ J. Amalric, P. H. Mutin, G. Guerrero, A. Ponche, A. Sotto, J.-P. Lavigne, “Phosphonate monolayers functionalized by species as antibacterial nanocoatings on titanium and stainless steel”, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 141–149.
- ³⁷⁶ S. Sun, G. J. Leggett, “Micrometer and Nanometer Scale Photopatterning of Self-Assembled Monolayers of Phosphonic Acids on Aluminium Oxide”, *Nano Letters*, **2007**, 7, 3753–3758.
- ³⁷⁷ S. Tosatti, R. Michel, M. Textor, N. D. Spenser, “Self-Assembled Monolayers of Dodecyl and Hydroxy-dodecyl Phosphonates on Both Smooth and Rough Titanium and Titanium Oxide Surfaces”, *Langmuir*, **2002**, 18, 3537–3548.
- ³⁷⁸ Tobias Winkler, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2003**.
- ³⁷⁹ E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, N. Koch, J. Schwartz, “Self-Assembly and Bonding of Alkanephosphonic Acids on the Native Oxide Surface of Titanium”, *Langmuir*, **2001**, 17, 5736–5738.
- ³⁸⁰ H. M. Freese, U. Karsten, R. Schumann, „Bacterial Biomass, activity and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany”, *Microb Ecol* **2006**, 51, 117–127.
- ³⁸¹ R. A. Allan, J. J. Miller, “Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole”, *Can. J. Microbiol.*, **1980**, 26, 912–920.
- ³⁸² J. Wei, D. B. Ravn, L. Gram, P. Kingshott, „Stainless steel modified with poly(ethylene glycol) can prevent protein adsorption but not bacterial adhesion”, *Colloids Surf. B*, **2003**, 32, 275–291.
- ³⁸³ J. G. Vos, R. J. Foster, T. E. Keyes, „Substrate Choice and Preparation”, in “*Interfacial supramolecular assemblies*”, John Wiley & Sons, 1. Auflage, **2003**.

- ³⁸⁴ P. Heisig, R. Tschorny, „Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro”, *Agents. Chemoter.* **1994**, 1284–1291.
- ³⁸⁵ K. G. Porter, Y. S. Féig, „The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora“ *Linnol. Oceanogr.*, **1980**, 28, 1062–1074.
- ³⁸⁶ R. Walter, Persönliche Mitteilung.

Anhang

In folgenden Tabellen sind die der Berechnung von CFU pro cm² zugrunde liegende Zahlen aufgeführt. Die Zahlen in den grau hinterlegten Feldern wurden als Ausreißer identifiziert und bei der Berechnung des Endergebnisses nicht berücksichtigt.

CFU *E. coli* auf Au (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP I	NP II	NP III
1	1727	1796	1765
2	1779	1657	1861
3	1662	1772	1583
4	1739	1687	1704
5	1673	1659	1609
6	1734	1624	1777
7	1801	1557	1751
8	1755	1798	1661
9	1639	1747	1379
10	1777	1763	1927

CFU *E. coli* auf EG₇OH-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 227	NP 242	NP 245
1	7	1	1
2	2	9	2
3	8	24	1
4	9	1	0
5	3	15	3
6	2	35	10
7	6	16	1
8	3	13	4
9	21	31	6
10	10	147	3

CFU *E. coli* auf D1 (SAC)₄₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 375	NP 379	NP 383
1	79	8	96
2	46	129	90
3	85	161	77
4	62	164	86
5	66	138	59
6	117	96	101
7	91	91	88
8	109	94	91
9	79	94	72
10	72	74	76

CFU *E. coli* auf D1 (SAC)₈₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 396	NP 397	NP 398
1	582	262	231
2	393	369	235
3	311	379	222
4	318	290	179
5	294	379	154
6	235	209	184
7	176	272	239
8	203	172	209
9	216	248	241
10	194	203	207

CFU *E. coli* auf D2 (SAC)₃₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 254	NP 255	NP 257
1	5	11	1
2	4	15	7
3	10	17	3
4	5	22	4
5	5	12	0
6	3	40	0
7	12	49	0
8	36	54	4
9	7	17	3
10	13	31	2

CFU *E. coli* auf D2 (SAC)₅₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 248	NP 251	NP 253
1	8	1	0
2	13	2	6
3	17	3	0
4	7	0	9
5	6	1	2
6	14	2	2
7	4	2	2
8	2	0	0
9	8	2	0
10	10	1	0

CFU *E. coli* auf D3(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 373	NP 377	NP 381
1	10	54	43
2	15	48	43
3	151	67	60
4	44	36	49
5	140	102	17
6	108	98	45
7	148	118	26
8	83	109	18
9	35	9	17
10	47	118	20

CFU *E. coli* auf D3 (SAc)₈₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 260	NP 262	NP 262
1	30	23	22
2	31	11	1
3	45	25	32
4	20	4	27
5	62	55	58
6	39	15	3
7	100	25	6
8	82	34	18
9	53	20	43
10	175	37	6

CFU *E. coli* auf Stahl (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP I	NP II	NP III
1	679	752	984
2	924	847	777
3	876	787	692
4	1189	587	1168
5	972	545	474
6	953	582	909
7	881	358	757
8	965	623	855
9	913	915	857
10	891	849	967

CFU *E. coli* auf PEG-P(O)(OH)₂-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 387	NP 389	NP 391
1	17	76	91
2	24	3	65
3	7	19	41
4	11	55	39
5	17	8	33
6	15	4	81
7	88	90	73
8	13	32	51
9	35	19	35
10	27	37	22

CFU *E. coli* auf PEG-P(S)(OH)₂-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 399	NP 400	NP 401
1	154	217	47
2	36	101	129
3	37	48	97
4	78	350	269
5	316	8	173
6	201	69	113
7	165	181	43
8	43	127	37
9	88	119	82
10	121	86	109

CFU *E. coli* auf MeD1 (Phosphon)₃₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 388	NP 390	NP 392
1	100	62	255
2	245	39	177
3	111	324	98
4	88	128	73
5	118	276	157
6	74	53	215
7	161	641	149
8	54	98	540
9	138	85	390
10	135	97	98

CFU *E. coli* auf Al (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP I	NP II	NP III
1	586	461	776
2	696	519	473
3	594	629	521
4	529	493	681
5	678	697	499
6	641	747	487
7	712	564	567
8	651	653	423
9	693	676	654
10	739	586	579

CFU *E. coli* auf PEG-P(O)(OH)₂-SAMs auf Al (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 384	NP 385	NP 386
1	0	29	79
2	0	81	83
3	0	73	141
4	0	116	127
5	0	36	95
6	0	68	156
7	0	97	121
8	0	92	175
9	0	113	106
10	0	126	98

CFU *E. coli* auf PEG-P(S)(OH)₂-SAMs auf AI (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 402	NP 403	NP 404
1	71	107	83
2	208	85	21
3	297	206	23
4	365	223	21
5	224	166	18
6	200	181	18
7	228	212	14
8	211	193	30
9	203	109	34
10	172	157	24

CFU *E. coli* auf MeD1(Phosphon)₃₀₀₀SAMs auf AI (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 392	NP 393	NP 395
1	167	193	83
2	199	27	117
3	134	81	136
4	228	28	79
5	22	21	126
6	145	45	206
7	208	59	221
8	228	122	156
9	199	114	213
10	87	86	176

CFU *S. epidermidis* auf Au (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 266	NP 269	NP 271
1	3650	2600	1830
2	2990	1990	2290
3	3090	1990	1500
4	3940	1140	2280
5	4030	6730	1920
6	4520	1780	2250
7	4540	5440	1640
8	4580	2780	4680
9	2720	3520	3850
10	3970	4090	4550

CFU *S. epidermidis* auf EG₇OH-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 274	NP 276	NP 277
1	10	70	70
2	50	20	50
3	10	10	50
4	10	10	10
5	30	10	10
6	50	100	60
7	10	60	0
8	10	100	30
9	10	20	50
10	30	60	340

CFU *S. epidermidis* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 315	NP 317	NP 319
1	140	30	30
2	130	20	20
3	10	50	20
4	10	60	0
5	0	30	0
6	10	30	0
7	0	50	20
8	0	60	20
9	10	30	10
10	30	50	20

CFU *S. epidermidis* auf D1(SAc)₈₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 309	NP 311	NP 313
1	20	50	20
2	0	50	40
3	0	70	120
4	10	30	40
5	0	30	70
6	20	50	10
7	0	80	0
8	50	10	30
9	60	20	40
10	0	10	50

CFU *S. epidermidis* auf D2(SAc)₃₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 285	NP 287	NP 289
1	10	60	70
2	10	0	80
3	90	20	110
4	10	10	0
5	20	0	20
6	0	40	10
7	10	50	10
8	0	90	30
9	0	10	10
10	0	10	20

CFU *S. epidermidis* auf D2(SAc)₅₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 278	NP 281	NP 282
1	0	20	40
2	0	40	50
3	0	0	50
4	0	0	150
5	0	40	50
6	0	30	100
7	0	40	70
8	0	10	20
9	0	0	10
10	0	0	50

CFU *S. epidermidis* auf D3(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 303	NP 305	NP
1	10	0	0
2	0	0	10
3	60	20	0
4	10	0	0
5	10	10	20
6	0	0	0
7	20	0	0
8	0	0	20
9	30	0	0
10	0	0	0

CFU *S. epidermidis* auf D3(SAc)₈₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 291	NP 293	NP 295
1	0	10	0
2	0	10	10
3	20	0	10
4	20	10	0
5	10	10	0
6	0	0	10
7	0	20	10
8	0	0	20
9	30	10	0
10	0	0	10

CFU *S. epidermidis* auf Stahl (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP I	NP II	NP III
1	4180	5060	3580
2	3670	3960	3040
3	4260	3660	2780
4	2070	2900	3560
5	4380	3700	3420
6	4890	3780	3820
7	3570	3740	2980
8	4390	3020	3260
9	2890	2980	3160
10	1950	3060	3640

CFU *S. epidermidis* auf PEG-P(O)(OH)₂-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 329	NP 331	NP 333
1	0	6110	570
2	4210	550	430
3	7200	450	250
4	20	0	180
5	1190	1980	0
6	0	820	1500
7	0	150	0
8	140	1310	1200
9	0	430	670
10	0	20	740

CFU *S. epidermidis* auf PEG-P(S)(OH)₂-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 335	NP 337	NP 339
1	90	2500	400
2	1090	4570	260
3	1280	1130	1170
4	1170	700	1350
5	410	30	970
6	950	1070	1450
7	560	4690	1750
8	170	2730	2250
9	30	2110	1110
10	30	1410	1480

CFU *S. epidermidis* auf MeD1(Phosphon)₃₀₀₀-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 321	NP 323	NP 325
1	0	0	60
2	20	0	0
3	1950	0	0
4	790	490	50
5	10	570	0
6	10	340	0
7	1120	10	0
8	120	0	0
9	0	0	60
10	1510	0	50

CFU *S. epidermidis* auf AI (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP I	NP II	NP III
1	3280	2800	3160
2	5050	2570	4530
3	4640	2760	3750
4	3310	2610	2960
5	2610	2800	4730
6	2840	2630	3240
7	2190	2420	3540
8	2430	2510	3540
9	3150	3150	4290
10	2610	2760	2730

CFU *S. epidermidis* auf PEG-P(O)(OH)₂-SAMs auf AI (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 347	NP 349	NP 350
1	690	350	370
2	280	410	350
3	140	370	870
4	540	230	510
5	160	440	630
6	200	1100	470
7	840	290	350
8	40	340	570
9	150	390	600
10	90	420	360

CFU *S. epidermidis* auf PEG-P(S)(OH)₂-SAMs (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 367	NP 369	NP 371
1	0	20	350
2	80	390	100
3	390	190	150
4	410	620	40
5	70	30	80
6	160	90	300
7	50	570	120
8	0	1110	500
9	160	100	60
10	10	50	200

CFU *S. epidermidis* auf MeD1(Phosphon)₃₀₀₀-SAMs auf Al (pro Agarplatte, Plate Count)

Probe	NP 405	NP 406	NP 407
1	490	590	440
2	360	610	1030
3	710	380	330
4	130	1160	260
5	1010	220	1160
6	570	360	510
7	390	540	470
8	290	630	390
9	1090	760	790
10	210	470	420

CFU *S. epidermidis* auf Au (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 266	NP 268	NP 270
1	12085	9814	5274
2	8864	11327	6516
3	10497	17534	4056
4	11453	7846	5727
5	7415	12535	7031
6	7562	9834	4209
7	10998	11545	3964
8	8086	8999	11213
9	9693	7823	7233
10	7599	8393	9414

CFU *S. epidermidis* auf EG₇OH-SAMS (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 272	NP 273	NP 275
1	218	144	177
2	146	303	399
3	293	159	266
4	89	185	312
5	88	170	285
6	596	111	117
7	308	125	1225
8	112	95	781
9	132	64	239
10	345	323	141

CFU *S. epidermidis* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMS (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 314	NP 316	NP 318
1	32	163	100
2	63	114	77
3	135	118	500
4	51	67	147
5	1040	24	83
6	207	68	94
7	37	90	411
8	63	30	1269
9	48	64	80
10	49	44	49

CFU *S. epidermidis* auf D1(SAc)₈₀₀₀-SAMS (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 308	NP 310	NP 312
1	121	157	383
2	76	317	40
3	32	216	60
4	68	51	261
5	105	132	107
6	72	75	199
7	98	31	40
8	63	147	44
9	136	87	48
10	44	135	319

CFU *S. epidermidis* auf D2(SAc)₃₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 284	NP 286	NP 288
1	406	272	148
2	1323	705	241
3	573	149	1215
4	390	1865	485
5	963	358	334
6	270	284	184
7	276	491	182
8	1257	313	261
9	576	884	541
10	298	172	109

CFU *S. epidermidis* auf D2(SAc)₅₀₀₀-SAMS (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 278	NP 279	NP 283
1	367	234	106
2	318	673	263
3	155	1089	105
4	209	148	111
5	315	416	444
6	110	97	479
7	116	110	180
8	257	175	117
9	341	181	331
10	198	839	187

CFU *S. epidermidis* auf D3(SAc)₄₀₀₀-SAMS (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 302	NP 304	NP 306
1	134	113	310
2	211	56	170
3	149	66	127
4	648	122	116
5	58	110	145
6	121	160	494
7	109	95	194
8	55	107	164
9	115	74	433
10	97	86	200

CFU *S. epidermidis* auf D3(SAc)₈₀₀₀-SAMS (pro 0,02304 cm²,

Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 290	NP 292	NP 294
1	78	141	109
2	95	58	101
3	119	60	104
4	101	67	207
5	174	64	99
6	52	271	40
7	339	48	107
8	67	172	64
9	92	69	71
10	74	343	113

CFU *S. aureus* auf Au (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 354	NP 355	NP 361
1	22138	14651	14569
2	19709	13118	9485
3	12929	18674	3612
4	19749	17802	8868
5	19641	20719	14016
6	10784	12882	11111
7	13941	21949	
8	2883	14830	
9	8942	18842	
10	2364	21541	

CFU *S. aureus* auf EG₇OH-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 351	NP 352	NP 353
1	944	103	118
2	127	152	124
3	190	1056	65
4	161	899	0
5	79	114	0
6	136	422	0
7	634	77	0
8	129	46	0
9	54	91	0
10	958	175	0

CFU *S. aureus* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 360	NP 361	NP 362
1	111	103	96
2	139	114	198
3	124	129	64
4	45	112	40
5	115	112	188
6	69	78	131
7	100	32	71
8	42	52	126
9	70	103	122
10	103	70	173

CFU *S. aureus* auf D2(SAc)₅₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 354	NP 355	NP 356
1	132	124	58
2	39	129	54
3	78	147	77
4	201	135	66
5	43	135	42
6	153	66	59
7	46	118	78
8	110	85	40
9	77	311	35
10	69	129	73

CFU *S. aureus* auf D3(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 357	NP 358	NP 359
1	361	139	582
2	142	394	272
3	105	453	264
4	365	356	153
5	176	426	125
6	161	171	174
7	235	154	1205
8	91	662	302
9	198	228	654
10	237	286	336

CFU *P. aeruginosa* auf Au (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 408	NP 409	NP 410
1	5712	10430	17245
2	7364	11465	17672
3	9235	7407	16132
4	7788	7118	14840
5	8350	9207	16865
6	8252	14674	18539
7	6934	13907	14259
8	8117	6565	16075
9	7430	10882	16157
10	8580	8581	12369

CFU *P. aeruginosa* auf EG₇OH-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 419	NP 420	NP 421
1	3009	2365	1577
2	3111	5525	9783
3	6155	4507	10914
4	5862	1512	2246
5	7004	12442	3516
6	5447	7643	7976
7	1450	8508	4189
8	5767	7691	10726
9	4229	8256	14266
10	1459	10589	6362

CFU *P. aeruginosa* auf D1(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 414	NP 415	NP 416
1	7525	7601	6103
2	8469	3397	8811
3	4848	6282	6168
4	7450	5638	4321
5	5656	5271	5539
6	5358	10835	7009
7	6036	10904	4033
8	6215	7023	5630
9	5165	8654	5331
10	7440	6413	8957

CFU *P. aeruginosa* auf D2(SAc)₅₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 422	NP 423	NP 424
1	6229	7570	4503
2	4634	10281	5410
3	6754	3362	6892
4	6635	10775	12819
5	5214	6237	10676
6	4616	6581	7221
7	4400	7490	10318
8	6812	11245	11718
9	8196	8511	15078
10	3645	7443	

CFU *P. aeruginosa* auf D3(SAc)₄₀₀₀-SAMs (pro 0,02304 cm², Epifluoreszenzmikroskopie)

Probe	NP 411	NP 412	NP 413
1	6009	7689	14648
2	13477	6771	7456
3	8787	8692	6403
4	12320	9427	8886
5	6453	9052	10578
6	7736	8948	8892
7	10186	8391	9700
8	7049	5401	11239
9	9490	8623	10476
10	9712	6411	8520

Stipendien

04.2004 – 09.2004	Examensbeihilfe, Abteilung Internationales Universität Hamburg
04.2005 – 07.2006	Leistungsstipendium, Abteilung Internationales
02.2007 – heute	Graduiertenkolleg 611 (Design und Charakterisierung funktionalisierter Materialien)

Arbeitserfahrung

09.1995– 09.1996	Au-pair-Tätigkeit in Hamburg
08.1997– 03.2001	Diverse studentische Jobs, z. B.: Kassier- bzw. Aufsichtstätigkeit im Panoptikum-Wachsfigurenkabinett, Ferienjobs in der Hamburgische Münze und Ludwig-Schokolade
05.2001– 09.2003	Studentische Beschäftigte bei „TÜV NORD Umweltschutz GmbH & Co. KG“ mit Tätigkeitsschwerpunkten <ul style="list-style-type: none">● Probenvorbereitung und –aufarbeitung im Bereich Umweltanalytik● Pflege der Substanzdatenbank
10.2003 – 09.2004	Studentische Hilfskraft an der Universität Hamburg <ul style="list-style-type: none">● Unterstützung bei der organisatorischen Vorbereitung des Praktikumsbetriebs
10.2004– heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiterin am Department Chemie der Universität Hamburg <ul style="list-style-type: none">● Präsentation aktueller Ergebnisse in den Arbeitskreis-, Instituts- und Graduiertenkollegseminaren● theoretische und praktische Ausbildung von Studenten, Einarbeitung studentischer Hilfskräfte
04.2005-07.2006	Leitung eines Georgischkurses an der Universität Hamburg (in Zusammenarbeit mit der Abteilung Internationales), Organisation georgischer Kulturveranstaltungen

Sonstiges Engagment

- 10.2001 – 03.2002** Fachschaftsrat Chemie (Mitgestaltung der Fachschaftsarbeit)
- 10.2000 – 03.2001** Beteiligung an Berufungsverfahren
- 04.2001 - 03.2002** Mitglied im Institutsrat der Anorganischen Chemie
- 04.2005-07.2006** Kooperation mit der Arbeitsgruppe Entwicklung und Fachkräfte,
AGEF, Organisation einer Informationsveranstaltung für
rückkehrende Fachkräfte aus Georgien

Fremdsprachen & EDV-Kenntnisse

Georgisch (Muttersprache)
Russisch
Deutsch
Englisch
MS Office, Origin, Corel Draw, ImageJ

Mitgliedschaften

Gesellschaft Deutscher Chemiker e. V. (GDCh)
Pro Linguis Sprachenclub e. V.

Vorträge

Biorepulsive selbsanordnende Monoschichten, Seminar des Graduiertenkollegs 611, 27.06.2007, Hamburg.

Interactions between bacteria and Self-Assembled Monolayers, Workshop des Graduiertenkollegs 611, 17.10.-18.10.2008, Weißenhäuser Strand.

Poster

T. Winkler, N. Papukashvili, A. Terfort, *Biorepulsive Self-Assembled Monolayers on Gold, Stainless Steel and Aluminium*, International Bunsen-Discussion Meeting, 29.06-30.06.2008, Heidelberg.