

Effekte elektrischer Polarisierung leitender Oberflächen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung

Im Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen (Standort Duisburg)

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

von
Anna Katharina Rumpf
aus
Gleiwitz

Referent: Prof. H.-C. Flemming

Korreferent: Prof. B. Siebers

Tag der Einreichung: 17.02.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2009

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am IWW Zentrum Wasser, Abteilung Angewandte Mikrobiologie, Mülheim an der Ruhr, im Zeitraum von November 2005 bis Februar 2009. Ein Teil der Versuche wurde im Rahmen des AiF-Projektes 174 ZN/2 und in Kooperation mit dem Karl-Winnacker Institut (KWI), DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, durchgeführt. Die fachliche Betreuung am IWW übernahm Frau Dr. Gabriela Schaule. Prof. Hans-Curt Flemming des Biofilm-Centre, Abteilung aquatische Mikrobiologie, der Universität Duisburg-Essen übernahm die wissenschaftliche Betreuung.

Für den wichtigsten Menschen
an meiner Seite
C.H.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gabriela Schaule (IWW), die mir die Möglichkeit gab, an dem sehr interessanten und interdisziplinären AiF-Projekt 174 ZN/2 mitzuarbeiten und darüber hinaus das Forschungsthema meiner Dissertation zu erarbeiten. Herrn Prof. Dr. Hans-Curt Flemming danke ich besonders für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung und seine Unterstützung während des Projektes. Frau Prof. Dr. Bettina Siebers danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Besonders möchte ich unsere Kooperationspartner, Herrn Dr. Klaus-Michael Mangold und Frau Dr. Claudia Weidlich (KWI, Dechema e. V.), nennen, die mich in die Elektrochemie eingeführt haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Herrn Peter Schrems danke ich für die Hilfestellung im Umgang mit den Potentiostaten.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung durch mein Promotionsstipendium sowie weiterer Sachmittel. Darüber hinaus bedanke ich mich für die ideelle Förderung, die ich durch zahlreiche Seminare und Teilnahmen an Veranstaltungen wie „Woche der Umwelt“ oder „Sommerakademie“ erfahren durfte.

Bei allen Kollegen des IWW Zentrum Wasser bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima. Kathrin Petrowski danke ich besonders für ihre hervorragende Mitarbeit und das Engagement, das sie im Rahmen ihrer Tätigkeit als technische Mitarbeiterin meiner Arbeit entgegen brachte. Frau Dr. Ute Ruhrberg danke ich für die stets geduldige Beantwortung meiner kurzfristigen Fragen zur Elektrochemie. Frau Dr. Simone Schulte und Frau Dr. Susanne Grobe danke ich besonders für die regelmäßig aufmunternde und lustige Atmosphäre im Büro.

Herrn Prof. Dr. Mathias Ulbricht und Frau Eva Berndt (Technische Chemie II, Universität Duisburg-Essen) danke ich für die sehr gute Betreuung während meiner 3-monatigen Projektarbeit und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Daniel Bressler, Heike Petry-Hansen und Jost Wingender (Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen) danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Anregungen.

Den Mitarbeitern des Forschungszentrums Karlsruhe, Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Abteilung Mikrobiologie natürlicher und technischer

Grenzflächen, insbesondere Herrn Dr. Thomas Schwartz und Frau Annika Rieder, danke ich für die Einweisung in die Methoden RT-PCR und PCR-DGGE sowie für die ausgesprochen willkommene Aufnahme während meines Aufenthaltes.

Meinen Freunden, besonders Julia und Martin Florin, danke ich fürs Zuhören und Aufmuntern in besonders schweren Zeiten. Für Ablenkungen in der Freizeit und das Lachmuskeltraining, die mich die Arbeit haben vergessen lassen, danke ich den Teilnehmern am „Dienstagstreffen“ Tanja und Sonja Stermann, Birgit Engeln, Sonja Heuschkel und Markus Jaworski.

Meiner Familie danke ich für den Rückhalt und das Interesse an meiner Arbeit. Besonders danke ich meinen Eltern, Gabriele und Markus Rumpf, deren Mut vor 22 Jahren ein neues Leben in Deutschland aufzubauen, die Voraussetzung für meine Ausbildung und die Chance, diesen Grad zu erhalten, geschaffen hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Was sind Biofilme?	3
1.2 Wie entstehen Biofilme?	4
1.2.1 Theorie der primären Adhäsion	5
1.2.1.1 Bakterielle Adhäsion nach thermodynamischen Gesetzen	5
1.2.1.2 Bakterielle Adhäsion nach der klassische DLVO-Theorie	8
1.2.1.3 Anwendung der Theorien in mikrobiologischen Systemen	12
1.2.2 Biofilmbilmentwicklung	13
1.2.2.1 EPS – Was hält die Biofilme zusammen	13
1.2.2.2 Wechselwirkungen in der EPS-Matrix	15
1.2.2.3 Einfluss der Physiologie auf Wechselwirkungen zwischen Bakterienoberfläche und Aufwuchsfläche	16
1.3 Beeinflussung der Oberflächeneigenschaften der Aufwuchsfläche durch elektrische Polarisierung	17
1.3.1 Elektrisch leitfähige Aufwuchsflächen	17
1.3.2 Elektrische Polarisierung der Aufwuchsfläche	19
1.4 Einfluss elektrischer Polarisierung auf die bakterielle Aktivität	22
1.4.1 Wachstumsfähigkeit von Bakterien	22
1.4.1.1 Nachweis der Wachstumsfähigkeit durch den Gyrasehemmer Pipemidinsäure	23
1.4.2 Energiegehalt der Bakterien	25
1.4.3 Membranpotential und Membranintegrität	26
1.4.3.1 Nachweis der Membranintegrität	27
1.4.4 Ribosomale Aktivität	28
1.4.4.1 Nachweis ribosomaler RNA mittels FISH	28
1.4.5 Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen	29
1.4.5.1 Untersuchungen der Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen mittels PCR-DGGE	29
1.5 Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Teststämme	32
2.1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	32
2.1.2 Trinkwasserbakterien	32

2.2	Nährmedien und Lösungen	32
2.2.1	Standard-I-Nähragar	32
2.2.2	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Nährbouillon (CASO-Bouillon)	32
2.2.3	Physiologische Kochsalzlösung	33
2.2.4	Partikelfreies deionisiertes Wasser	33
2.2.5	Synthetisches Trinkwasser (Elektrolyt)	33
2.3	Chemikalien	34
2.3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	34
2.3.1.1	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	34
2.3.1.2	SYTO 9	34
2.3.2	Pipemidinsäure PA	34
2.3.3	Natriumazid NaN_3	35
2.3.4	Propidiummonoazid PMA	35
2.3.5	Chemikalien für DGGE	35
2.3.6	Chemikalien für FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)	35
2.3.7	Allgemeine Chemikalien	36
2.4	Aufwuchsflächen (Arbeitselektroden)	36
2.4.1	Indiumzinnoxid (ITO) beschichtete Glascoupons	36
2.4.2	Mit Polypyrrol beschichtete Membranen (Polypyrrol)	36
2.5	Reinigung der Aufwuchsflächen	37
2.6	Geräte	37
2.6.1	Potentiostaten-System	37
2.6.2	Elektroden (Drei-Elektroden-Anordnung)	38
2.6.2.1	Arbeitselektrode	39
2.6.2.2	Gegenelektrode (Platinnetz)	39
2.6.2.3	Referenzelektrode (Ag/AgCl)	39
2.6.2.4	Haber-Luggin-Kapillare	39
2.6.3	Flanschzellen (Elektrochemische Zellen)	40
2.6.3.1	Batch-Flanschzellen	40
2.6.3.2	Durchflussflanschzelle	41
2.6.4	Mikroskope	41
2.6.4.1	Epifluoreszenzmikroskop LEICA	41
2.6.4.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	42
2.7	Mikrobiologische Methoden	43
2.7.1	Kultivierung von Bakterien	43
2.7.2	Herstellung von Bakteriensuspensionen von Reinkulturen	43
2.7.3	Gesamtzellzahlbestimmung (GZZ)	44

2.7.3.1	Gesamtzellzahlbestimmung flüssiger Proben auf Polycarbonatfiltern	44
2.7.3.2	Gesamtzellzahlbestimmung direkt auf Aufwuchsflächen	44
2.7.4	Anzucht von Biofilmen auf Aufwuchsflächen	45
2.7.4.1	Primäradhäsion von Reinkulturen im Batchsystem	45
2.7.4.2	Primäradhäsion von Trinkwasserbakterien im Durchfluss	45
2.7.4.3	Biofilmwachstum von Trinkwasserbakterien im Durchfluss	46
2.7.4.4	Regeneration von Trinkwasserbiofilmen	46
2.7.5	Nachweis bakterieller Zellteilungsfähigkeit mittels Pipemidinsäure (PA)	47
2.7.5.1	Durchführung der Pipemidinsäurebehandlung	47
2.7.5.2	Auswertung der Pipemidinsäurebehandlung	48
2.7.6	Blockierung der DNA membrangeschädigter Bakterien mittels PMA (nach Nocker et al. 2006, 2007)	48
2.7.6.1	Positivkontrolle der PMA-Behandlung	48
2.8	Präparative Methoden	49
2.8.1	Isolierung bakterieller Biofilme von Oberflächen	49
2.8.2	Isolierung von DNA aus Bakterien	49
2.9	Biochemische Methoden	49
2.9.1	ATP-Bestimmung mittels Hy-Lite® Pens	49
2.10	Molekularbiologische Methoden	50
2.10.1	PCR zur Amplifikation von 16S rDNA-Fragmente für DGGE	50
2.10.1.1	Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte	51
2.10.2	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese DGGE	52
2.10.2.1	Lösungen für DGGE	53
2.10.2.2	Herstellung des DGGE-Gels	53
2.10.2.3	Auftragen der Proben auf das DGGE-Gel	54
2.10.2.4	Detektion der Banden im DGGE-Gel	54
2.10.3	Quantitative PCR (RT-PCR)	54
2.10.3.1	Durchführung der RT-PCR	55
2.10.3.2	Auswertung der RT-PCR	56
2.10.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	57
2.10.4.1	Lösungen für FISH	57
2.10.4.2	Fixierung der Proben für FISH	58
2.10.4.3	Hybridisierung der Proben für FISH	58
2.10.4.4	Mikroskopische Auswertung der FISH-Proben	59
2.11	Physikalisch elektrochemische Methoden	59
2.11.1	Zetapotentialmessung von Bakterien	59

2.11.2	Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von Lösungen	60
2.11.3	Beschichtung von Membranen mit Polypyrrol	60
2.11.4	Elektrische Polarisierung der Aufwuchsfläche	61
3	Ergebnisse	63
3.1	Entwicklung eines elektrochemisch-mikrobiologischen Testsystems	63
3.1.1	Elektrisch leitende Aufwuchsflächen	63
3.1.2	Aufbau der elektrochemischen Zelle	65
3.1.3	Synthetische Trinkwasser (TW) als Elektrolyt	66
3.1.4	Die Teststämme	67
3.1.5	Ausgewählte Ladungsverschiebungen auf der Aufwuchsfläche	69
3.1.5.1	Auswertung elektrochemischer Daten der untersuchten Polarisierungen	70
3.2	Einfluss elektrischer Polarisierung auf physiko-chemische Wechselwirkungen während der bakteriellen Primäradhäsion	73
3.2.1	Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Primäradhäsion von <i>S. maltophilia</i> auf ITO	73
3.2.2	Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Primäradhäsion von <i>S. maltophilia</i> auf Polypyrrol	75
3.2.3	Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Primäradhäsion von Trinkwasserbakterien auf ITO	76
3.2.4	Einfluss elektrischer Polarisierung auf das Adhäsionsmuster von Bakterien	78
3.3	Einfluss eines gepulsten Potentials auf das Biofilmwachstum von Trinkwasserbakterien auf ITO	79
3.4	Einfluss elektrischer Polarisierung auf physiko-chemische Wechselwirkungen in bereits etablierten Trinkwasserbiofilmen	84
3.4.1	Einfluss eines gepulsten Potentials auf einen 4 Tage alten Trinkwasserbiofilmen auf ITO	85
3.4.2	Einfluss eines gepulsten Potentials auf einen 2 Wochen alten Trinkwasserbiofilmen auf ITO	86
3.5	Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Physiologie der Bakterien	88
3.5.1	Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Zellteilungsfähigkeit von <i>S. maltophilia</i>	88
3.5.2	Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Zellteilungsfähigkeit von Trinkwasserbakterien	92
3.5.3	Einfluss eines gepulsten Potentials auf den ATP-Gehalt der Trinkwasserbakterien	93

3.5.4	Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Membranintegrität von Trinkwasserbakterien	94
3.5.5	Einfluss eines gepulsten Potentials auf den RNA-Gehalt eines Trinkwasserbiofilms	97
3.5.6	Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen	99
4	Diskussion	103
4.1	Entwicklung eines mikrobiologisch-elektrochemischen Testsystems	103
4.2	Effekte elektrischer Polarisation auf die bakterielle Primäradhäsion auf ITO und Polypyrrol	107
4.2.1	Bakterielle Adhäsion auf ITO	109
4.2.2	Adhäsion auf Polypyrrol	116
4.3	Hemmung der Biofilmentwicklung von Trinkwasserbakterien durch elektrische Polarisation	118
4.4	Einfluss elektrischer Polarisation auf die Physiologie von Bakterien	124
4.5	Einfluss elektrischer Polarisation auf bereits etablierte Biofilme	134
5	Ausblick	137
6	Literaturverzeichnis	138

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFM	Atomic force microscopy
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokale Laser-Raster-Mikroskopie)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Cy3	Carbocyanin-3
bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese
DMSO	N,N-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. acid)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
<i>et al.</i>	et alli (lat.: und andere)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GZZ	Gesamtzellzahl
Hz	Hertz
ITO	Indium tin oxide (Indiumzinnoxid)
KBE	Koloniebildene Einheit
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
M	Molarität [mol/L]
mM	Millimol
mV	Millivolt
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
PA	Pipemidic acid (Pipemidinsäure)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PMA	Propidium Monoazid (Propidiummonoazid)
Ppy	Polypyrrol
RNA	Ribo nucleid acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Revelations per minute (Umdrehung pro Minute)
RT-PCR	Real-Time PCR (quantitative PCR)
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
SHE	Standard Hydrogen Elektrode (Standardwasserstoffelektrode)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TW	Trinkwasser
VBNC	Viable But Not Culturable (lebensfähig aber nicht kultivierbar)

Zusammenfassung

Die Biofilmbildung durch Bakterien auf Oberflächen führt in Wasser führenden Systemen zu technischen und hygienischen Problemen. Die dabei herrschenden physico-chemischen Wechselwirkungen zwischen Bakterienoberfläche und Aufwuchsfläche werden z.B. in der Derjaguin-Landau-Vervej-Overbeck DLVO-Theorie beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch elektrische Polarisierung die physico-chemischen Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Aufwuchsfläche zu manipulieren. Unter Einsatz der elektrisch leitenden Aufwuchsflächen Indiumzinnoxid (ITO) und Polypyrrol (Ppy) wurden negativ ($- 600$ mV), positiv ($+ 600$ mV) sowie ständig gepulste (chaotische) Aufwuchsflächen erzeugt. Die Effekte auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung wurden quantitativ und qualitativ untersucht.

Quantitative Untersuchungen zeigten, dass jede untersuchte Polarisierung auf ITO zu einer erhöhten und auf Polypyrrol zu einer geringeren Primäradhäsion der Bakterien führte. Dies deutet während einer Polarisierung auf schwächere Anziehungskräfte zwischen der Bakterienoberfläche und Polypyrrol im Vergleich zum ITO.

Eine gepulste Polarisierung während der Wachstumsphase führte zu einer geringeren Biofilmbildung durch Trinkwasserbakterien auf ITO. Auf der Kontroll-Aufwuchsfläche entstand ein mehrschichtiger Trinkwasserbiofilm und auf dem polarisierten ITO verblieb der Trinkwasserbiofilm als Monolayer. Die Kontroll-Aufwuchsfläche war zu 22 % von einem Trinkwasserbiofilm belegt, während auf dem polarisierten ITO nur 0,15 % von einem Trinkwasserbiofilm überdeckt waren. Das Volumen des Trinkwasserbiofilms auf dem polarisierten ITO war im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 300 geringer. Eine gepulst polarisierte ITO-Aufwuchsfläche hemmte die Biofilmbildung über eine Woche hin.

Für eine qualitative Bewertung des physiologischen Zustandes der anhaftenden Bakterien nach Polarisierung wurden die Zellteilungsfähigkeit, ribosomale Aktivität, ATP-Gehalt und die Membranintegrität untersucht. Zusätzlich wurde ein potentieller Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Populationsdiversität der Trinkwasserbiofilme untersucht. Die Zellteilungsfähigkeit, nachgewiesen mittels Pipemidinsäure, nahm mit zunehmender Polarisationsdauer ab und war nach 20 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die mittels FISH untersuchte ribosomale Aktivität sowie die ATP-Messungen zeigten eine geringere Aktivität der Trinkwasserbakterien nach Polarisierung. Eine Überprüfung der

Membranintegrität mittels Propidiummonoazid (PMA), das nur in membrangeschädigte Bakterien eindringt und dessen DNA blockiert, zeigte in der quantitativen RT-PCR keinen Einfluss. Eine Auftrennung derselben Proben mittels PCR-DGGE wies bei einigen Stämmen eine geschädigte Membranintegrität nach. Die PCR-DGGE zeigte ebenfalls Unterschiede in der Population des Trinkwasserbiofilms auf der Kontrolle und dem polarisierten ITO. Einige Stämme etablierten sich nur auf dem polarisierten ITO und andere nur auf der nicht polarisierten Kontrolle. Wurde die Polarisation abgestellt, änderte sich die Population erneut, was eine Beeinflussung der anhaftenden Trinkwasserbakterien durch elektrische Polarisation zeigt.

Zusammenfassend weisen die Daten auf eine Beeinträchtigung bakterieller Aktivität durch elektrische Polarisation der Aufwuchsfläche hin. Dies bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Verminderung der Biofilmbildung auf elektrisch leitenden Oberflächen in der Praxis.

1 Einleitung

1.1 Was sind Biofilme?

Der Begriff Biofilm wird für eine Ansammlung von Mikroorganismen, die von einer Matrix umgeben sind (Donlan 2002, Flemming und Wingender 2001c). Diese mikrobiellen Aggregate kommen in Form von lockeren Mikrokolonien bis zu flächendeckenden, mehrschichtigen Belägen vor und entstehen stets an Grenzflächen zwischen zwei Phasen wie z.B. Wasser/feste Oberfläche. Grenzflächen dieser Art kommen in der Natur an Gesteinen in Gewässern, aber auch in technischen Systemen vor. In der Natur existieren Biofilme schon seit Milliarden von Jahren (Schopf et al. 1983) und ca. 99 % aller Mikroorganismen (Costerton et al. 1987) bevorzugen diese erfolgreiche Überlebensgemeinschaft. Diese Überlebensgemeinschaft wird von einer Matrix geschützt, die von den Mikroorganismen gebildet wird. Eine solche Matrix besteht aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) (Flemming und Wingender 2003a, b). Zu den Bestandteilen der EPS gehören Biomoleküle wie Kohlenhydrate (Polysaccharide), Proteine, DNA und/oder Huminstoffe (Flemming und Wingender 2003b, Flemming et al. 2007). Durch vielfältige molekulare Modifikationen der genannten Komponenten kann die Zusammensetzung der EPS-Matrix abhängig von der Populationsdiversität variieren. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Wasser beeinflussen die Entstehung eines Biofilms an verschiedensten Grenzflächen. Biofilme wurden an Orten mit extremsten Bedingungen wie bei sehr hohen Temperaturen (Walker et al. 2005; Weidler et al. 2007), hohe Drücke (1000 bar), starke Salzkonzentrationen sowie extreme pH-Werte in natürlicher Umgebung gefunden.

Im medizinischen Bereich wurden Biofilme auf der Haut, den Zähnen, Implantaten und in Wunden entdeckt. In der Industrie wurden Biofilme in wasserführenden Systemen (Flemming 1998, Flemming 2008, Hall-Stoodley et al. 2004, Davey und O`Toole 2000) wie z.B. Trinkwassernetzen, Kühltürmen, Wärmeaustauschern, Filtrationsmembranen und Pumpen gefunden. Aber auch in Desinfektionsmitteltanks, in nuklearen Einrichtungen mit starker Strahlung sind Biofilme nachweisbar (Chicote et al. 2005; Sarró et al. 2007). Nahezu jede Oberfläche ist von Biofilmen besiedelt. In dieser Form erfüllen diese wichtige Funktionen wie z.B. Schutz der Menschen vor Krankheitserregern durch die Hautflora oder Unterstützung der Verdauung durch die Darmflora. Allerdings

können Biofilme auch Ursache akuter und chronischer Erkrankungen sein (Wodtke und Löhr 2008, Bryers 2008).

1.2 Wie entstehen Biofilme?

Ein Biofilm auf einer Oberfläche entsteht durch einen Prozess, der als Biofilmbildung bezeichnet wird. Die Biofilmbildung ist eine komplexe Entwicklung planktonischer Bakterien zu sessilen Bakterien (Donlan et al. 2002). Die Voraussetzungen für die Biofilmbildung sind folgende:

- Eine Grenzfläche (Aufwuchsfläche/Medium)
- Ausreichend Wasser
- Mikroorganismen
- Nährstoffverfügbarkeit

Die genannten Voraussetzungen sind stets variabel, dennoch kann die Biofilmbildung in fünf Entwicklungsstufen unterteilt werden (Sauer et al 2002, Stoodley et al 2002, Flemming und Wingender 2001a, Characklis et al. 1990, van Loosdrecht et al. 1990a):

1. Bildung eines „conditioning films“
2. reversible und irreversible Adhäsion der Bakterien (Mikrokolonien)
3. Wachstumsphase und EPS-Produktion
4. Ausprägung einer dreidimensionalen Struktur
5. Plateau-Phase und Ablösung von Mikroorganismen

In der ersten Phase entsteht durch Adsorption der im Wassersystem vorkommenden Substanzen (organisch/anorganisch) ein „conditioning film“ auf der Aufwuchsfläche. Dieser beeinflusst die Oberflächenladung der Aufwuchsfläche (Schneider und Leis, 2002). Die Mikroorganismen kommen durch Diffusion aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung, konvektiven Transport des Durchflusses (Scherkraft) oder durch aktive Bewegung in die Nähe der Aufwuchsfläche (van Loosdrecht et al. 1990a,b). Auf dieser Aufwuchsfläche bzw. „conditioning film“ erfolgt zunächst eine reversible und anschließend irreversible Adhäsion der planktonischen Mikroorganismen, die durch physico-chemische Wechselwirkungen vermittelt wird (Phase 2). Während dieser Phase der Primäradhäsion entstehen Mikrokolonien (van Loosdrecht et al. 1990a,b).

1.2.1 Theorie der primären Adhäsion

Physico-chemische Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Oberflächen Bakterien/Aufwuchsfläche bestimmen die erste Phase der Biofilmbildung (van Loosdrecht et al. 1990a-b, van Oss 2003, van der Boorden et al. 2004, Boks et al. 2008). In Abhängigkeit der Oberflächeneigenschaften wirken verschiedene anziehende und abstoßende Kräfte, die eine Adhäsion einer Bakterienzelle an eine Aufwuchsfläche resultieren. Für die Beschreibung der bakteriellen Adhäsion an eine Aufwuchsfläche in wässrigen Systemen gibt es zwei unterschiedliche Erklärungsansätze. Der thermodynamische Ansatz beschreibt die Adhäsion als ein Gleichgewicht der Gibb'schen Energie an den Grenzflächen. Dabei werden nur die Gibb'schen Energien der interagierenden Oberflächen (Bakterien/Aufwuchsfläche) betrachtet. Der zweite Erklärungsansatz basiert auf den für Kolloide/Partikel formulierten DLVO-Theorie. Gemäß dieser Theorie wird die Adhäsion in eine schwache und reversible Adhäsion im sekundären Minimum und in eine irreversible Adhäsion im primären Minimum unterteilt (Abbildung 2). Im sekundären Minimum interagiert die Bakterienzelle mit der Aufwuchsfläche, wobei es aber nicht zu einer festen Bindung kommt. Diese erfolgt erst im primären Minimum bei geringerer Distanz zwischen Bakterienoberfläche und Aufwuchsfläche. Die Adhäsion von Bakterien nach der DLVO-Theorie ist von Van der Waals Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen bestimmt (van Loosdrecht et al. 1990a-b, Busscher et al. 2007).

In beiden Theorien wird die Adhäsion als ein rein physico-chemischer Prozess betrachtet, wobei die Physiologie der Bakterien nicht einbezogen ist. Bakterien haben aber keine starre Form und stabile Oberflächenbeschaffenheit wie Partikel. Physiologische Prozesse in Bakterien können die Komposition der bakteriellen Zelloberfläche verändern. Daher können diese Theorien nur eine Hilfestellung sein, um die bakterielle Wechselwirkung mit anderen Oberflächen zu betrachten. Aber sie sind nicht geeignet um Vorhersagen über das Verhalten einer Bakterienzelle an einer Aufwuchsfläche zu treffen (Van Loosdrecht et al. 1990a-b, Bos et al. 1999).

1.2.1.1 Bakterielle Adhäsion nach thermodynamischen Gesetzen

Der nullte Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass, wenn zwei Systeme jeweils mit einem dritten System im thermodynamischen Gleichgewicht stehen, alle drei Systeme untereinander im Gleichgewicht sind. Ein thermodynamisches

Gleichgewicht liegt vor, wenn die Zustandsgrößen in einem System sich nicht ändern (reversible bzw. irreversible Adhäsion). Als Zustandsgrößen werden z.B. Temperatur, Druck, und Gibb'sche Energie bezeichnet. In einem geschlossenen System stellt sich immer ein thermodynamisches Gleichgewicht dieser Größen ein.

Daher wird auf Grundlage dieser Theorie die bakterielle Adhäsion als Gleichgewicht der Gibb'schen Energie an den Grenzflächen Fest/Lösung (FL), Bakterien/Lösung (BL) und Bakterien/Fest (BF) betrachtet. Für jede Grenzfläche kann eine Gibb'sche Energie berechnet werden (Absolom et al. 1983, Busscher et al. 1984), die sich durch Adhäsion der Bakterien (B) aus der Lösung (L) an eine feste Aufwuchsfläche (F) ändert. Das Gleichgewicht dieser Gibb'schen Energien wird als Adhäsionsenergie ($\Delta G_{\text{Adh}}^{\circ}$) bezeichnet und ergibt sich aus:

$$(1) \quad \Delta G_{\text{Adh}}^{\circ} = G_{\text{BF}}^{\circ} - G_{\text{FL}}^{\circ} - G_{\text{BL}}^{\circ}$$

Ergibt die Gleichung für ΔG_{Adh} einen Wert < 0 so ist die Adhäsion thermodynamisch aufgrund eines Energiegewinns favorisiert. Bei einem Wert $\Delta G_{\text{Adh}} > 0$ jedoch findet keine Adhäsion statt, da Energie zugeführt werden müsste. Bei $\Delta G_{\text{Adh}} = 0$ liegt ein Gleichgewicht vor.

Unter der Annahme, dass weder Temperatur noch Druck sich an der Grenzfläche ändern, kann die Adhäsion auch als Gleichgewicht der Oberflächenspannung (γ) betrachtet werden.

$$(2) \quad \Delta G_{\text{Adh}} = \gamma_{\text{BF}} - \gamma_{\text{FL}} - \gamma_{\text{BL}}$$

Sowohl Gleichung 1 als auch 2 gelten nur, wenn die interagierenden Oberflächen in direktem Kontakt stehen. Für die Anwendung der zweiten Gleichung muss mittels Kontaktwinkelmessung (θ) und der Young-Gleichung die Oberflächenspannung (γ) ermittelt werden (van Loosdrecht et al. 1990a, 1987, Absolom 1988). Abbildung 1 zeigt eine Kontaktwinkelmessung eines Wassertropfens auf einer Glasoberfläche.

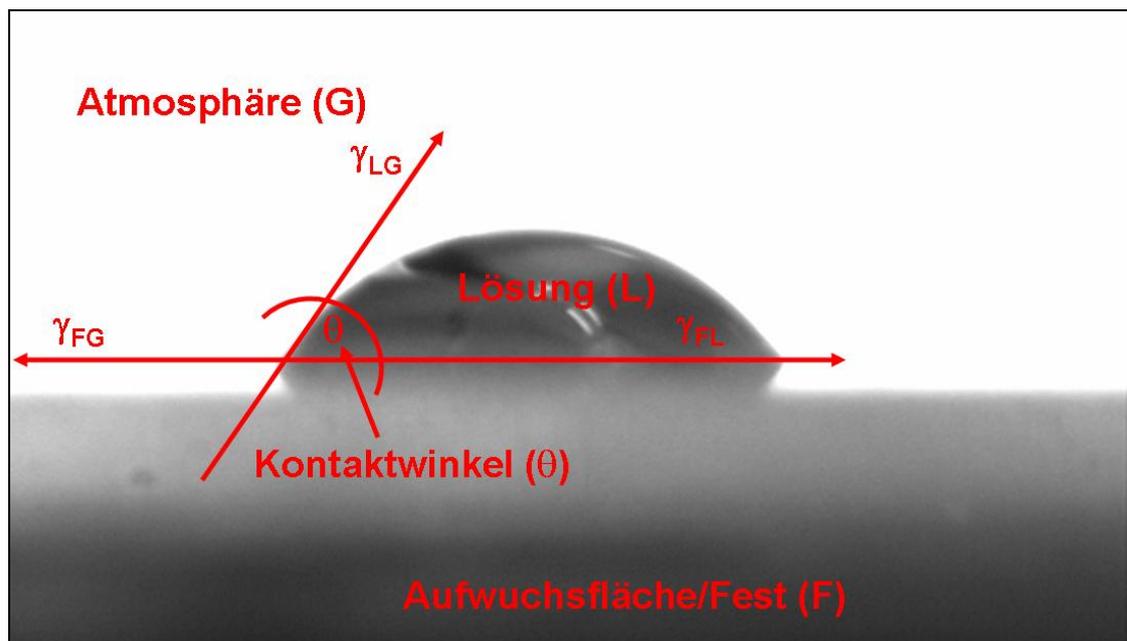


Abbildung 1: Kontaktwinkelmessung: Flüssigkeitstropfen (Lösung L) auf einer Aufwuchsfläche (Fest F) in der Atmosphäre (Gasphase G).

Bei Flüssigkeiten ist die Oberflächenenergie gleich der Oberflächenspannung. Der Kontaktwinkel kann sowohl auf einer Aufwuchsfläche (F) als auch auf einem Bakterienzellrasen (In Gleichung (3) F durch B ersetzen) gemessen werden.

$$(3) \quad \gamma_{FG} = \gamma_{FL} + \gamma_{LG} \cos \theta$$

Die Größe des Kontaktwinkels hängt von den Wechselwirkungen an den Grenzflächen zwischen den Phasen Fest/Lösung (γ_{FL}), Lösung/Gas (γ_{LG}) sowie Fest/Gas (γ_{FG}) ab. Gemäß Formel (3) gilt, je ähnlicher die Eigenschaft der Lösung (L) und der Aufwuchsfläche (F), umso geringer der Wechselwirkungsgrad an der Grenzfläche (γ_{FL}). Je kleiner γ_{FL} , umso größer wird $\cos \theta$. Folglich wird bei einem Wassertropfen der Kontaktwinkel umso größer, je unpolarer bzw. hydrophober die Oberfläche ist. Bei spontaner Benetzung der Aufwuchsfläche der Lösung z.B. Wasser wird eine besonders hydrophile Aufwuchsfläche angenommen.

Mit diesem Ansatz werden zwar die Hydrophobizität und damit hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in die Erklärung der bakteriellen Adhäsion einbezogen, aber elektrostatische Wechselwirkungen

werden nicht beachtet. Diese sind in der klassischen DLVO-Theorie enthalten (Bos et al. 1999).

1.2.1.2 Bakterielle Adhäsion nach der klassischen DLVO-Theorie

Die Grundlage dieses Erklärungsansatzes bildet die Derjaguin-Landau-Vervey-Overbeck (DLVO) Theorie, die für die Interaktion zwischen Partikeln und einer anderen Oberfläche erstellt wurde (Derjaguin, B. W., and L. Landau. 1941, Verwey und Overbeek 1948). Später wurde die DLVO-Theorie auf die bakterielle Interaktion mit einer anderen Oberfläche übertragen, wobei die Bakterienzelle als ein „lebendes Kolloid“ betrachtet wurde (Marshall et al. 1971). Im Gegensatz zum thermodynamischen Ansatz beschreibt die DLVO-Theorie die Interaktion von Partikeln/Bakterien mit anderen Oberflächen in Abhängigkeit des Abstandes zueinander. Dabei haben DLVO die Van der Waals und die Coulomb Kräfte zu weit reichenden (Long range) Wechselwirkungen ($> 1 \text{ nm}$) aufsummiert (Rutter und Vincent 1984). Im Gegensatz zum thermodynamischen Erklärungsansatz sind die Wechselwirkungen nach DLVO abhängig von dem Abstand zwischen den Oberflächen.

Van der Waals Kräfte zwischen zwei Atomen können anziehend wirken, wenn der Abstand gering ist. Durch die anziehenden Van der Waals Wechselwirkungen entsteht in den interagierenden Atomen ein Dipolmoment. Die Energie dieser Dispersionskraft wird in der Hamakerkonstante (A) ausgedrückt (Hamaker 1937). Für jeden Stoff bzw. interagierende Oberfläche bekannter Zusammensetzung kann eine spezifische Hamakerkonstante berechnet werden (Visser et al. 1972a, 1972b). Aufgrund der verschiedenen Berechnungs- und Messmethoden weichen die Hamakerkonstanten bis zu Faktor 100 voneinander ab (Visser et al. 1972). In einem wässrigen System wird nach Lagaly et al. 1997 für Polymere $(0,3-1,4) \times 10^{-20} \text{ J}$, Salze $(0,3-5) \times 10^{-20} \text{ J}$ und für Oxide bzw. Silikate $(1-5) \times 10^{-20} \text{ J}$ als Hamakerkonstante verwendet. Die Wechselwirkungen zwischen zwei Oberflächen werden von elektrostatischen Kräften beeinflusst. Weisen beide Oberflächen die gleiche Ladung auf (z.B. beide negativ), so stoßen sich diese gemäß des Coulombschen Gesetzes ab. Dieses Gesetz besagt z.B., dass die Energie proportional zum Kehrwert des Abstandes zwischen den geladenen Teilchen ist. In Lösungen mit gelösten Ionen können Ladungen an den Oberflächen durch Adsorption von Gegenionen neutralisiert werden. Dadurch entsteht eine diffuse elektrische Doppelschicht. Mit Zunahme der Ionenstärke (I) der Lösung

wird die elektrische Doppelschicht komprimiert und reicht nicht soweit in die Lösung hinein, wird also dünner. Folglich kommt es in Abhängigkeit des Abstandes (Distanz D) zur Abnahme elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Oberflächen (Abbildung 2). Während elektrostatische Wechselwirkungen stark von der Ionenstärke der Lösung abhängen, hat dies keinen Einfluss auf die Van der Waals Kräfte. Für die Berechnung der elektrostatischen Gibb'schen Energie $G_E(D)$ ist die Bestimmung der Oberflächenladung (Zetapotential) erforderlich. Diese wird über die elektrophoretische Mobilität des Partikels/Bakterienzelle in einer Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt. Daraus wird das ζ Zetapotential berechnet (siehe 2.11.1). Da die meisten Oberflächen in der Natur ein negatives Zetapotential aufweisen (van Loosdrecht et al. 1987, Loder und Liss 1985), wäre zwischen Bakterien und anderen Oberflächen eine Abstoßung zu erwarten.

Gemäß DLVO-Theorie ist die totale Wechselwirkungsenergie (G_{tot}) in einer Lösung bestimmter Ionenstärke (I) abhängig von Van der Waals Anziehung (V) und elektrostatischer Abstoßung (E).

$$(4) \quad G_{tot}(D) = G_E(D) + G_V(D)$$

Wobei die Wirkung jeder Kraft von dem Abstand (D) zwischen den interagierenden Oberflächen und von der Ionenstärke (I) der Lösung abhängig ist (Abbildung 2). Elektrostatische Wechselwirkungen sind weitreichende Kräfte, die bei großen Abständen dominieren. Im Vergleich dazu wirken Van der Waals Kräfte auf kurzen Abständen und bestimmen bei geringem Abstand die Adhäsion (Bos et al. 1999). Bei geringer Ionenstärke (I_{gering}) der Lösung hat $G_{tot}(D)$ eine positive Energie, was für die Adhäsion eine Barriere im primären Minimum ergibt. Mit zunehmender Ionenstärke (I_{mittel}) nimmt $G_{tot}(D)$ aufgrund der geringeren elektrostatischen Kräfte (G_E) ab. Wenn Bakterien durch ausreichend thermische Energie angetrieben werden, können sie diese Barriere überwinden und eine langsame Adhäsion erfolgen. Bei sehr hoher Ionenstärke (I_{hoch}) wird die elektrische Doppelschicht stark komprimiert, sodass $G_{tot}(D)$ negativ wird, wodurch die Bakterien ohne Barriere im primären Minimum adhären (Abbildung 2).

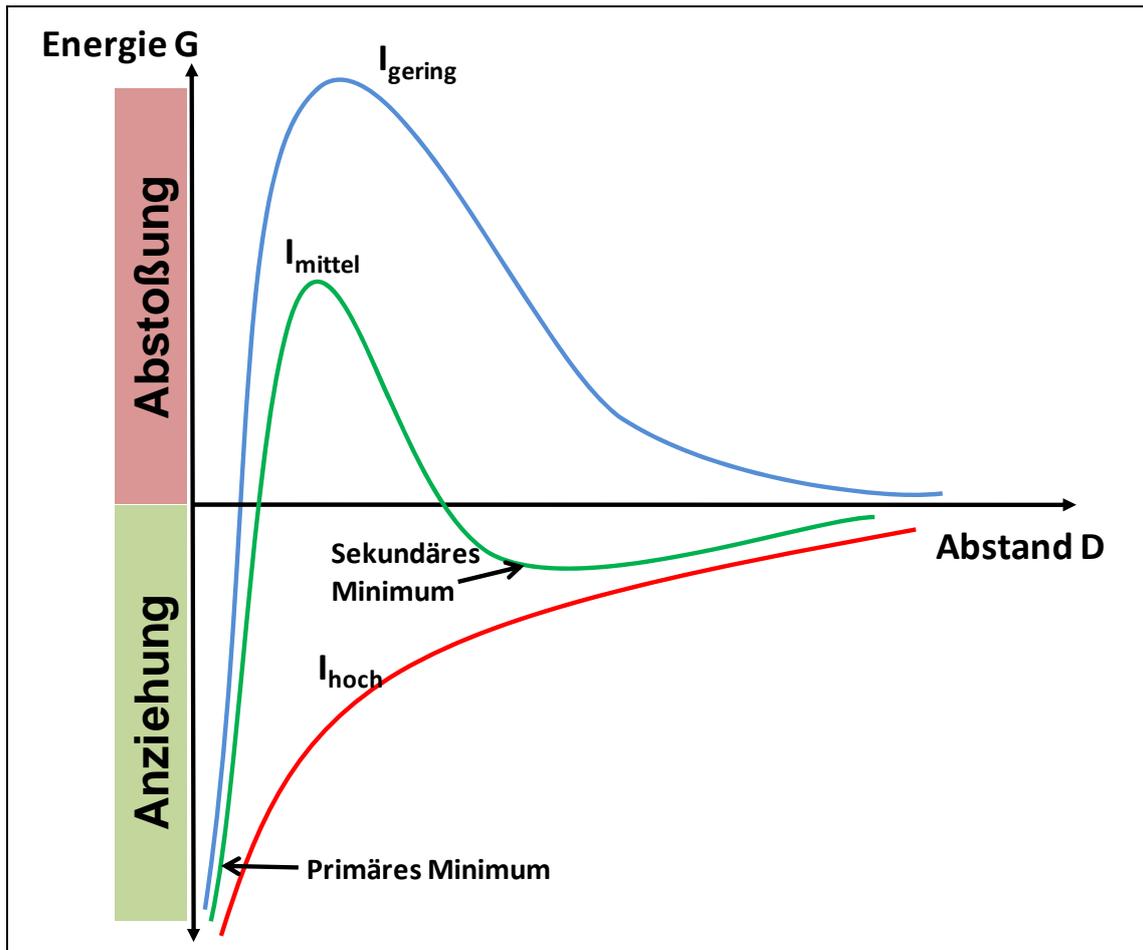


Abbildung 2: Schema zur totalen Gibb'sche Wechselwirkungsenergie (G_{tot}) in Abhängigkeit des Abstandes (D) der interagierenden Oberflächen (z.B. Bakterien und Aufwuchsfläche) bei geringer Ionenstärke (I , blau), mittlerer I (grün) und hoher I (rot) nach der DLVO-Theorie.

Bei geringeren Abständen ($D < 1 \text{ nm}$) können Kräfte wie die Van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Bindungen wirken. Diese bestimmen die Stärke der Adhäsion im primären Minimum. In größerer Entfernung der Bakterien von der Aufwuchsfläche gibt es noch ein kleineres sog. sekundäres Minimum. Dieses Minimum erreicht nie einen negativen Wert, sodass die Bakterien reversibel in diesem Minimum adhären. Sind die interagierenden Oberflächen gegensätzlich geladen, z.B. Bakterien negatives Zetapotential und Aufwuchsfläche positives Zetapotential, so ist G_E und damit auch G_{tot} stets negativ, unabhängig vom Abstand und führt direkt zur Adhäsion im primären Minimum.

Das Zetapotential einer Oberfläche wird durch die Ionen der umgebenden Lösung beeinflusst. Aufgrund der Oberflächenladung erfolgt in der direkt

umgebenden Lösung der Oberfläche ein Ionentransport, der eine Anlagerung von Gegenionen und Verdrängung gleichartiger Ionen bewirkt, um eine Ladungsneutralisation anzustreben. Dadurch bauen sich Konzentrationsgradienten auf, die einen entgegen gesetzten Diffusionstransport resultieren. Letztendlich stellt sich ein Gleichgewicht ein. Folgende Mechanismen sind für die Ausbildung einer Oberflächenladung verantwortlichen (Gregory 1975):

- Chemische Reaktion funktioneller Oberflächengruppen mit Wasser und der Inhaltsstoffe → Hydratisierung von Oxidgruppen
- Adsorption ionogener Wasserinhaltsstoffe
- Selektive Lösung von Ionen aus der Oberfläche
- Selektive Substitution von Ionen aus der Wasserphase

Die gegenseitige Beeinflussung zwischen einer Oberfläche und der unmittelbar umgebenden Ionen (Gegenionen sowie Coionen) der Lösung wurden erstmals von Stern 1942 durch das Modell der diffusen Schicht beschrieben, die aus gelösten frei beweglichen Gegenionen und Coionen besteht (Abbildung 3).

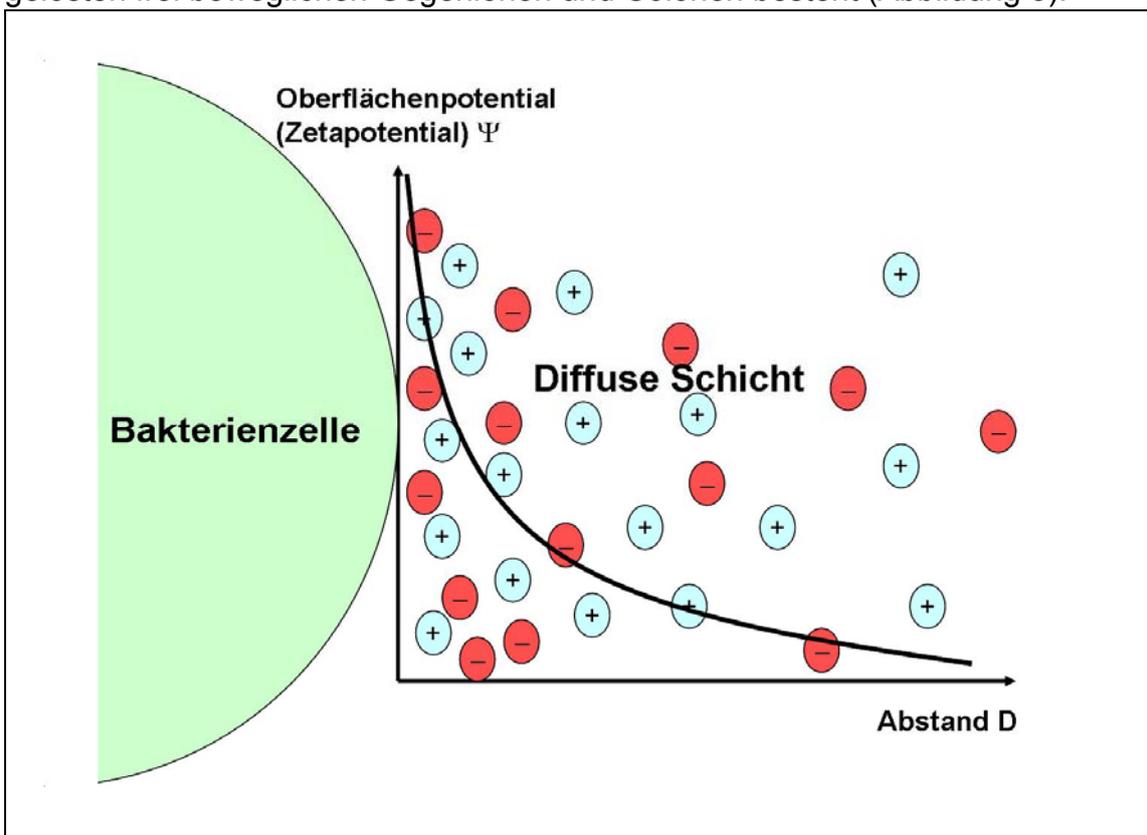


Abbildung 3: Schema zum Aufbau der diffusen elektrischen Doppelschicht an der Bakterienoberfläche in einer Lösung und Entstehung des Oberflächenpotentials (Zetapotential)

Über diese Schichten entsteht durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen ein Potential, das mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche absinkt (Lykelma 1999 und 2000). Dieses Potential kann in einem elektrischen Feld als elektrophoretische Bewegung der Partikel bzw. Bakterien gemessen werden. Daraus ergibt sich das bereits erwähnte Zetapotential (ζ) eines Partikels/Bakterienzelle, das in Abhängigkeit des pH-Wertes angegeben wird. Aus der elektrophoretischen Messung können Rückschlüsse auf die Oberflächenladung und elektrostatische Eigenschaften von Bakterien gezogen werden, wobei Bakterien während dieser Messung unter einem osmotischen Stress stehen. Daher ist das Zetapotential als Näherung zu betrachten, da unter realen Bedingungen die Nettooberflächenladung eher geringer sein kann. Das Zetapotential gibt zwar ein Maß für die Nettoladung an, aber keine Informationen über die Art der Ladungsträger. Hinzu kommt, dass die mittels Zetapotentialmessung erfasste Netto-Oberflächenladung lediglich eine Einschätzung der elektrostatischen Wechselwirkungen im long range Bereich gestattet. Bei der irreversiblen Bindung von Mikroorganismen an eine Oberfläche können jedoch auch direkte Ionenbindungen eine Rolle spielen.

1.2.1.3 Anwendung der Theorien in mikrobiologischen Systemen

Die beschriebenen Modelle werden stets zur Beschreibung der bakteriellen Wechselwirkungen mit Oberflächen und der dabei wirkenden Kräfte angewendet (Bos, et al. 1999, Duval, et al. 2006, Eichenlaub, et al. 2006, Gottenbos, et al. 1999, Ubbink, et al. 2005, de Kerchove, et al. 2005, van Loosdrecht, et al. 2002). Allerdings ist die thermodynamische Theorie zur Erklärung der bakteriellen Adhäsion nicht ausreichend, da die weit reichenden elektrostatischen Wechselwirkungen nicht einbezogen sind. Die DLVO-Theorie kann nur aussagen, ob eine Adhäsion im primären Minimum stattfindet, aber die Stärke der Wechselwirkungsenergie (Primäres Minimum) kann nicht vorhergesagt werden, da die kurz reichenden Kräfte, sterische Einflüsse sowie spezifische Wechselwirkungen nicht in der Theorie berücksichtigt werden. Van Oss et al. (1986) hatten auf Grundlage der klassischen DLVO-Theorie und der thermodynamischen Theorie eine erweiterte DLVO-Theorie formuliert, die eine Kombination der beiden erstgenannten ist (van Oss et al. 1995, 2003). Damit bezieht diese Theorie Van der Waals Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, Lewis Säure-Base Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen ein. Des Weiteren trifft Bos et al. die Aussage, dass nicht jede Kraft

für sich, sondern in der Summe, sowohl weit reichende als auch auf kurze Distanz wirkende Kräfte, im Zusammenhang mit Primäradhäsion betrachtet werden müssen. In einem Vergleich von Bos et al. 1999 wird die erweiterte DLVO-Theorie als eine gute Annäherung an die möglichen Wechselwirkungen betrachtet. Diese Theorien werden bis heute von Wissenschaftlern zur Erklärung der bakteriellen Primäradhäsion angewendet (Marshall, 1992; Zita et al., 1994; Bos et al., 1999; de Kerchove and Elimenech, 2005; Flemming, 2007, Liu et al. 2007). Allerdings zeigen diese Arbeiten, dass eine Vorhersage der Primäradhäsion mit diesen Modellen nicht möglich ist. Schon im Jahre 1989 hat van Loosdrecht die Unterschätzung der Vielseitigkeit der mikrobiellen Adhäsion erwähnt. Denn spezifische Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden, Fibrillen oder Polymeren können starke Bindungen zwischen Bakterien und Aufwuchsfläche vermitteln (van Oss et al. 2003). Die Präsenz solcher Wechselwirkungen ist von dem physiologischen Zustand der Bakterien abhängig.

1.2.2 Biofilmentwicklung

Nach der primären Adhäsion und Bildung von Mikrokolonien in der ersten und zweiten Phase der Biofilmbildung beginnen in der dritten Phase das Wachstum und die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen der anhaftenden Bakterien. In dieser Phase entsteht ein dreidimensional strukturierter Biofilm (van Loosdrecht et al. 1990, Flemming et al. 2001).

1.2.2.1 EPS – Was hält die Biofilme zusammen

Die bisher beschriebenen nicht kovalenten Bindungen sind nicht nur für die primäre Adhäsion der Bakterien an eine Oberfläche, sondern darüber hinaus für die Stabilität des Biofilms erforderlich. Durch das Wachstum und die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) entsteht eine komplexe Struktur aus dreidimensionalen Aggregaten, in denen die Zellen von einer EPS-Matrix umgeben und in dieser immobilisiert sind (Wingender et al. 1999). Die Vielfalt der EPS ermöglicht eine Vielzahl an Wechselwirkungen. Die Hauptbestandteile der EPS-Matrix sind Kohlenhydrate (Polysaccharide), Proteine, DNA und/oder Huminstoffe (Tabelle 1) sowie eingelagerte Partikel und Bestandteile des umgebenden Mediums.

Tabelle 1: Hauptkomponenten der EPS-Matrix (nach Wingender et al. 1999)

Komponente	Untereinheiten	Bindungstypen	Struktur des Grundgerüsts	Substituten (Beispiele)
Polysaccharide	Monosaccharide Uronsäuren, Aminozucker	Glykosidische Bindung	Linear, verzweigt	Organisch: O-acetyl, N-acetyl, Succinyl, Pyruvyl
Proteine (Polypeptide)	Aminosäuren	Peptidbindung	Linear	Oligosaccharide (Glukoproteine), Fettsäuren (Lipoproteine)
Nukleinsäuren	Nukleotide	Phosphatdiesterbindung	Linear	
(Phospho)-lipide	Fettsäuren, Glycerin, Phosphat, Ethanolamin, Serin, Cholin, Zucker	Esterbindung	Seitenketten	
Huminstoffe	Phenole, einfache Zucker, Aminosäuren	Etherbindungen, C-C-Bindungen, Peptidbindungen	vernetzt	

Abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit variiert die Zusammensetzung der EPS-Matrix und damit auch die Architektur (Quelas et al. 2006). Dabei erfüllen die EPS-Moleküle während der Biofilmbildung und im Biofilm wichtige physikalische und physiologische Funktionen (Grobe et al. 2001, Flemming 1995, Flemming und Wingender 2002, 2003b, 2004, Allison 2003, Costerton 1981). Neutrale Polysaccharide z. B. sind strukturgebend und bilden das Stützgerüst, dessen Stabilität auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert. Geladene Polysaccharide besitzen sorptive Eigenschaften und sind für ionische Wechselwirkungen wichtig (Späth et al. 1998, Flemming und Leis 2002, Sutherland 1990, 2001, Christensen 1985). Die EPS-Matrix bietet auch einen Reaktionsraum für physiologische Prozesse und kann daher aktive Komponenten wie z. B. Enzyme für den Abbau von Molekülen aufweisen (Wingender und Jäger 2002). In der Matrix können limitierende Faktoren und Nährstoffquellen für C, N und P gespeichert werden (Wingender und Jäger

2002, Wingender et al. 1999a, b). In Tabelle 2 (nach Flemming et al. 2007) sind die Funktionen der EPS-Komponenten in einem Biofilm zusammen gefasst.

Tabelle 2: Funktion der EPS-Komponenten in einem Biofilm nach Flemming et al. 2007

Effekt der EPS Komponenten	Eigenschaft der EPS Komponente	Funktion im Biofilm
Konstruktiv/stabilisierend	Neutrale Polysaccharide Amyloide	Strukturelle Komponente
Sorptiv	Geladene/hydrophobe Polysaccharide	Sorption, ionische Wechselwirkungen, Ionenaustausch
Aktiv	Extrazelluläre Enzyme	Polymerabbau
Oberflächen-aktiv	Amphiphilische Membranvesikel	Grenzflächeninteraktionen, Export von Zellen, Sorption
Informativ	Lektine, Nukleinsäuren	Spezifität, Erkennung, genetische Information, Struktur
Redox-aktiv	Bakterielle beständige Polymere	Elektronendonator/akzeptor
Nutritiv	Verschiedene Polymere	C-, N- und P-Quelle

1.2.2.2 Wechselwirkungen in der EPS-Matrix

Zwischen den EPS-Molekülen herrschen verschiedene Wechselwirkungen. Abhängig von der Struktur und den Ladungen der EPS wirken unterschiedliche anziehende sowie abstoßende Kräfte (Mayer et al. 1999; Wloka et al. 2004). Beide sind für die Struktur der EPS und die Stabilität des Biofilms verantwortlich. Zu den in der Matrix herrschenden Wechselwirkungen gehören:

- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Ionische Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrückenbindungen
- Hydrophobe Wechselwirkungen

Die nachfolgende Abbildung 4 veranschaulicht schematisch die für das stabile Netzwerk verantwortlichen Wechselwirkungen zwischen den EPS.

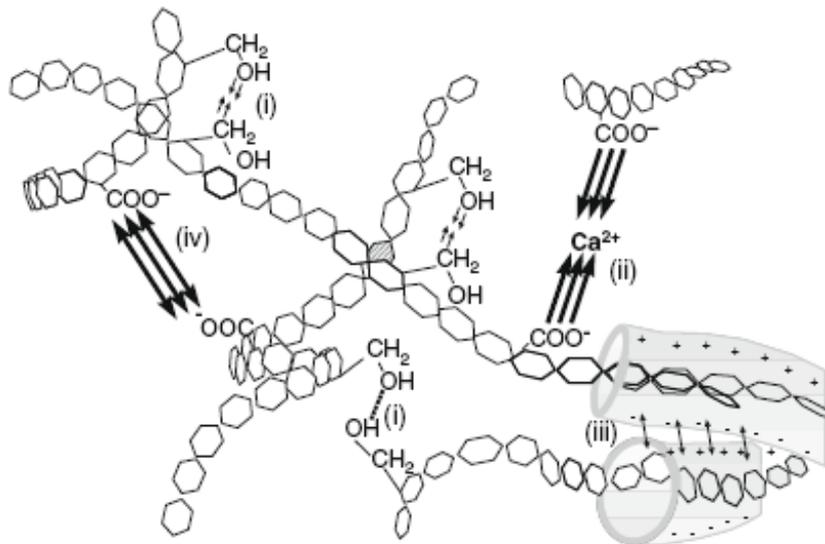


Abbildung 4: Wechselwirkungen zwischen den Molekülen innerhalb der EPS-Matrix (nach Mayer et al. 1999). (i) Wasserstoffbrückenbindung, (ii) ionische Bindung, (iii) van der Waals Kräfte, (iv) elektrostatische Abstoßung.

Elektrostatische Abstoßung (iv) findet z.B. zwischen Carbonyl-Gruppen zweier Polymere statt. Der gleiche Effekt findet zwischen Phosphatgruppen statt. Durch Kationen aus der umgebenden Lösung (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+}) kann es zu ionischen Brücken (ii) zwischen zwei negativ geladenen Molekülen (z.B. Carbonyl) kommen. Wasserstoffbrückenbindungen (i) sowie van der Waals Kräfte (iii) wirken zusätzlich in der EPS-Matrix. Die Summe dieser Kräfte ermöglicht ein stabiles Netzwerk, das abhängig von seiner Zusammensetzung dynamisch und flexibel sein kann.

Bereits während der Primäradhäsion auf der Bakterienoberfläche vorhandene EPS beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Aufwuchsfläche (Tsuneda et al. 2003). Welche EPS vorhanden sind und die Adhäsion beeinflussen, ist dabei vom physiologischen Zustand der Bakterien abhängig.

1.2.2.3 Einfluss der Physiologie auf Wechselwirkungen zwischen Bakterienoberfläche und Aufwuchsfläche

Wie zuvor erwähnt beziehen die genannten Theorien physico-chemische Wechselwirkungen zur Erklärung der bakteriellen Adhäsion ein. Dabei wird die Betrachtung der Bakterien als lebende Kolloide unterschätzt, da sich die Oberflächeneigenschaften der Bakterien in Abhängigkeit ihres physiologischen Zustandes ändern können (Haznedaroglu et al. 2008, Soni et al. 2008). Schon

van Loosdrecht et al. 1987 hat gezeigt, dass die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Hydrophobizität und damit den Charakter der Zelloberfläche hatte. Die Physiologie der Bakterien wird durch Faktoren wie Druck, pH-Wert, Scherkräfte, Nährstoffgehalt und gelöste Salze beeinflusst. Die gelösten Stoffe beeinflussen nicht nur das Zetapotential der interagierenden Oberflächen (siehe 1.2.1.2), sondern rufen bei Bakterien physiologische Reaktionen hervor. Durch die physico-chemischen Eigenschaften der Aufwuchsfläche kann es, durch veränderte Produktion extrazellulärer Substanzen, zu einer Adaption der Bakterienoberfläche an die Eigenschaften der Aufwuchsfläche kommen (Gehrke et al. 2001). Durch veränderte extrazelluläre Strukturen der Zelloberfläche (Marshall, 1992; Gehrke et al., 1998; Langille und Weiner, 1998; Quintero et al., 1995) wie extrazelluläre Polysaccharide, Flagellen und Fimbrien kann eine Adhäsion erhöht werden. Bei der Betrachtung der Adhäsion als komplexen Prozess kommt der Wechselbeziehung der unterschiedlichen Einflussfaktoren eine besondere Bedeutung zu.

1.3 Beeinflussung der Oberflächeneigenschaften der Aufwuchsfläche durch elektrische Polarisation

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einflussfaktor Oberflächenladung der Aufwuchsfläche variiert, um dessen Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten und die Biofilmentwicklung zu untersuchen. Dazu wurden elektrisch leitende Aufwuchsflächen eingesetzt und deren Oberflächeneigenschaften durch elektrische Polarisation während der Primäradhäsion bzw. Biofilmentwicklung variiert.

1.3.1 Elektrisch leitfähige Aufwuchsflächen

Bei Verwendung elektrisch leitfähiger Oberflächen kann durch elektrische Polarisation die Oberflächenladung beeinflusst werden. Dazu wurden Indiumzinnoxid beschichtete Glascoupons und Polypyrrol beschichtete Membranen verwendet.

- Indiumzinnoxid (ITO)

Indiumzinnoxid (engl. indium tin oxide, ITO) ist ein transparenter halbleitender Werkstoff. Es ist ein Mischoxid bestehend zu 90 % aus Indium(III)-oxid (In_2O_3) und zu 10 % aus Zinn(IV)-oxid (SnO_2). Durch das Zinn(IV)-oxid wird eine gute elektrische Leitfähigkeit von ca. 6,6 S erreicht. Durch thermische Verdampfung

werden dünne Schichten auf Glas aufgetragen und dadurch einseitig leitfähige transparente Glasflächen erzielt (Chopra et al. 1983). Indiumzinnoxid wird in der Industrie u.a. als antistatische Beschichtung auf Kunststoffen und Lacken aufgetragen bzw. in diese Materialien als Nanopartikel eingearbeitet. ITO wird z. B. als Material für Sensoren (Popovich et al. 2002) oder als Elektrodenmaterial in Brennstoffzellen verwendet (Nakaruma et al. 2009). Das Verhalten von ITO als Elektrodenmaterial während elektrischer Polarisation wurde von Matyeva 2005 in einer 1 M NaOH-Lösung untersucht. Das Ruhepotential, ohne Polarisation durch eine äußere Stromquelle, liegt bei + 150 mV bis + 200 mV vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode. Sowohl durch eine andauernd kathodische (negative) sowie anodische (positive) Polarisation wird die Indiumzinnoxidschicht elektrochemisch verändert. Abhängig vom pH-Wert des Elektrolyten, Dauer und Stärke der Polarisation (Polarisationsdauer + Spannungs-/ Stromstärke) kann ITO zu einem Metallspiegel irreversibel reduziert werden. Durch eine wechselnde Polarisation (positiv/negativ) sind diese Reaktionen reversibel (Matyeva 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden ITO-Coupons mit geringen Potentialen polarisiert, die keine Schädigung des ITO verursachen.

- Elektrisch leitfähige Polymere

Die Wissenschaftler Prof. Dr. Alan Heeger, Alan Prof. MacDiarmid und Prof. Dr. Hideki Shirakawa wurden im Jahre 2000 für die Entdeckung elektrisch leitfähiger Polymere mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Elektrische leitfähige Polymere besitzen ein konjugiertes π -Elektronensystem entlang der Polymerkette (Wegner 1981, Roth 1994). Durch Bildung delokalierter Defekte während der Oxidation oder Reduktion des Polymers findet eine Elektronenleitung längs des π -Elektronensystems statt (Evans 1990, Curran 1997). Abhängig von der Herstellung des Polymers, kann es mit Halbleitern vergleichbare Leitfähigkeiten erzielen. Die in Abbildung 5 gezeigten Polymere haben zahlreiche technische Anwendungen (Evans 1990, Curran 1997) wie z.B. in Batterien und Akkumulatoren von mobilen Telefonen, MP3-Playern und Notebooks (Evans 1990, Curran 1997).

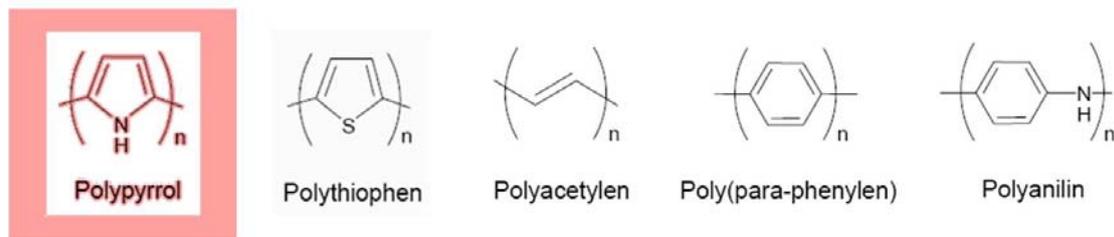


Abbildung 5: Chemische Struktur einiger elektrisch leitfähiger Polymere. Rot hinterlegt, das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Polymer

In der vorliegenden Arbeit wurde das Polypyrrol als Beschichtung auf nicht leitfähigen Filtrationsmembranen eingesetzt. Durch chemische Polymerisation der Monomere wird die elektrische Leitfähigkeit des Polymers erzeugt, wobei zur Kompensation der positiven Überschussladung Anionen (z. B. SO_4^{2-}) als Gegenionen in das Polymer eingebaut werden. Dadurch sind Elektronenleitfähigkeit und Ionenleitfähigkeit von leitfähigen Polymeren eng miteinander verknüpft und Redox-Reaktionen an leitfähigen Polymeren grundsätzlich mit Ionenaustausch-Vorgängen verbunden. Dabei kann die bei der Reduktion in das Polymer eingebrachte negative Ladung nicht nur durch die Abgabe der negativ geladenen Gegenionen, sondern auch durch die Aufnahme von Kationen kompensiert werden (Evans 1990, Curran 1997). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete synthetische TW enthält als zweiwertige Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} , die z.B. mit dem im Polymer eingebauten Gegenionen ionische Bindungen eingehen können.

Elektrisch leitfähige Polymere, wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete Polypyrrol, werden als chaotische Oberflächen diskutiert, da sie in der Lage sind, ihre Eigenschaften wie Potential, Struktur/Volumen, Rauigkeit und sogar den pH-Wert an der Oberfläche reversibel zu ändern (Shinohara et al. 1989a,b). Diese Eigenschaften werden durch elektrische Polarisierung beeinflusst und sind abhängig von der Potentialänderung des Polymers und Änderungen der Ionenkonzentration im Polymer.

1.3.2 Elektrische Polarisierung der Aufwuchsfläche

Eine elektrische Polarisierung ist die Verschiebung des elektrochemischen Oberflächenpotentials einer Elektrode (z.B. Aufwuchsfläche). Dazu muss ein geschlossener Kreislauf zwischen Arbeitselektrode (AE) und Gegenelektrode (GE) bestehen, die an eine äußere Stromquelle (Multi-Potentiostaten-System) angeschlossen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung verwendet, in der zwischen der AE und GE ein elektrisches Feld

angelegt wurde. Um das reale Oberflächenpotential der AE zu messen, wird eine Referenzelektrode (RE) eingesetzt, die das Potential direkt an der Oberfläche der AE stromlos messen kann. Da die RE ein eigenes Potential aufweist, wird das Potential der AE stets als Differenz zum Potential der RE angegeben. Die Daten aus dieser Messung ergeben eine Stromdichte-Potential-Kurve (Abbildung 6).

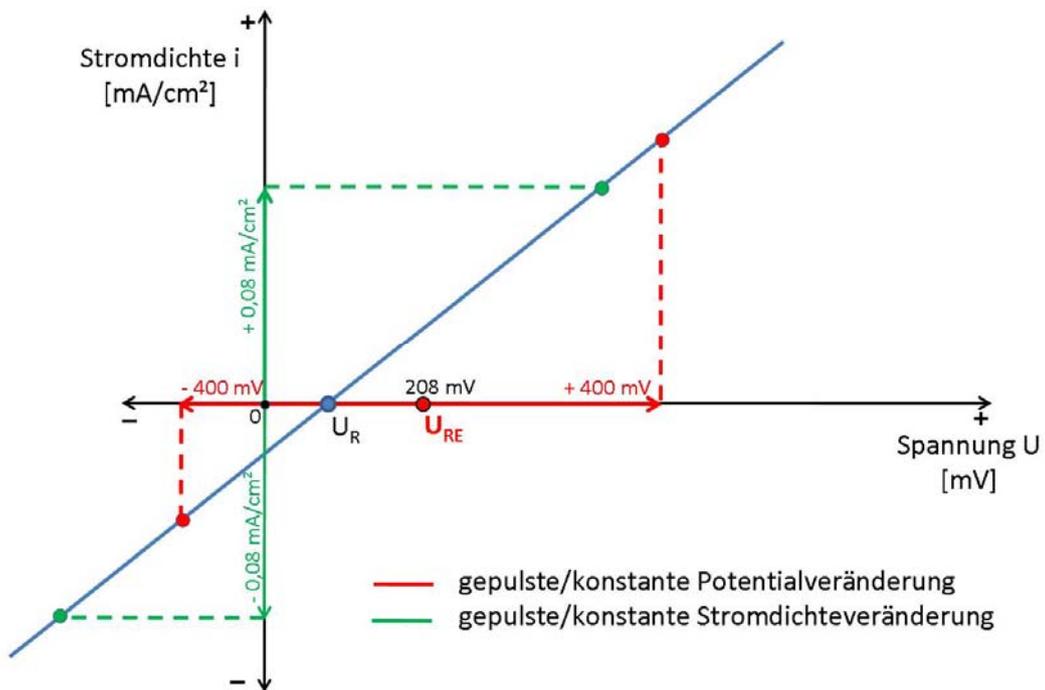


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer elektrischen Polarisation durch eine Potential bzw. Stromdichteveränderung. U_R = Ruhepotential (außen stromlos), U_{RE} = Potential der Ag/AgCl-Referenzelektrode

Aus jeder gepulsten bzw. konstanten Potentialveränderung (rote Linie) im Bezug zum U_{RE} (Potential der Referenzelektrode) an der Aufwuchsfläche resultierte eine Stromdichte. Bei jeder gepulsten bzw. konstanten Polarisation mit einer Stromdichte (grüne Linie) resultierte ein Potential. In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode (Elektrode zweiter Art) mit einem Elektrodenpotential von $+ 208 \text{ mV}$ gegen SHE (Standardwasserstoffelektrode) verwendet. Mittels verschiedener Polarisationsroutinen wurde die Oberflächenladung der Aufwuchsflächen (ITO und Polypyrrol) manipuliert und deren Einfluss auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung untersucht. Wird nun auf der Aufwuchsfläche (AE) ein Potential von $- 400 \text{ mV}$ ($- 600 \text{ mV}$ bzw. $- 800 \text{ mV}$) angelegt, herrscht absolut ein Potential von $- 400 \text{ mV} + 208 \text{ mV}$ also $- 192 \text{ mV}$ ($- 392 \text{ mV}$ bzw. $- 592 \text{ mV}$). Wird das Potential an der AE um $+ 400 \text{ mV}$

(+ 600 mV bzw. + 800 mV) gegen die Ag/AgCl-Elektrode verschoben, liegt auf der AE absolut ein Potential von + 608 mV (+ 808 mV bzw. 1008 mV) an. Poortinga et al. 2001a und 2001b polarisierte ITO mit einem Potential – 200 mV bis + 500 mV vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode und untersuchte dessen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion. Ein ähnliches Potential polarisierte Busalman et al. 2001 auf dünnen Goldelektroden vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die Elektrodenoberfläche der Goldelektrode sowie von ITO sind über einen weiten Potentialbereich und einen langen Zeitraum stabil (Matyeva 2005, Pourbaix 1974). Auf ITO werden elektrostatische Wechselwirkungen variiert. Die elektrische Polarisation von Polypyrrol führte nicht nur zur Änderung der Oberflächenladung, sondern auch zur veränderten Oberflächenstruktur. Hier wurden neben verschiedenen elektrostatischen Wechselwirkungen zusätzlich ionische Wechselwirkungen und sterische Einflüsse durch variierte Oberflächengeometrie des Polymers beeinflusst. Durch eine ständig gepulste Polarisation wird die Oberflächenladung ständig variiert, wodurch eine chaotische Oberfläche mit ständig wechselnder elektrostatischer Wechselwirkung erzeugt wird.

Der Einfluss einer äußeren Stromquelle (z.B. Potentiostat) kann elektrochemische Reaktionen des Elektrodenmaterials resultieren. Diese Reaktion ist von der Stärke des angelegten Stroms, der Dauer und der Zusammensetzung des Elektrolyten abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Elektroden (ITO, Polypyrrol) kein Strom angelegt. Die Oberflächenladung wurde hauptsächlich mit einem Potential beeinflusst und der dabei entstandene Strom gemessen.

Die Polarisation einer Elektrode kann auch Reaktionen im Elektrolyten induzieren. Die Wichtigste ist dabei die Elektrolyse von Wasser. Auf Grundlage des Redoxpotentials kann für die anodische Sauerstoffbildung bei der Elektrolyse von Wasser in basischer Lösung eine Zersetzungsspannung von + 0,401 V berechnet werden. Unter sauren Bedingungen erfolgt die Zersetzung ab einer Spannung von 1,23 V. Liegt der pH-Wert bei pH 7, so erfolgt eine Wasserelektrolyse bei 0,815 V. An der Kathode hingegen bildet sich Wasserstoff leichter unter sauren Bedingungen als unter neutralen oder basischen Bedingungen. Sind in einer Elektrolytlösung mehrere reduzierbare Kationen vorhanden, so werden zunächst die Kationen reduziert, die in der elektrochemischen Spannungsreihe ein positiveres (schwächer negatives) Potential haben. Auch beim Vorliegen von mehreren Anion-Arten werden

zunächst die oxidiert, die ein negativeres (schwächer positiveres) Potential haben. In Bezug auf die vorliegende Arbeit wurden an den Aufwuchsflächen Potentialänderungen hauptsächlich im Bereich von – 600 mV bis + 600 mV vs. Ag/AgCl, bei einem pH-Wert von 7,5 – 8,5 polarisiert.

1.4 Einfluss elektrischer Polarisation auf die bakterielle Aktivität

Wie zu Beginn dargestellt, erfolgt nach der irreversiblen Primäradhäsion die Wachstumsphase der aktiven auf der Aufwuchsfläche anhaftenden Bakterien. Umweltbedingungen wie Nährstoffgehalt, Scherkräfte, pH-Wert und weitere Faktoren beeinflussen den Stoffwechsel und damit die Aktivität der Bakterien. Obwohl in den Theorien (1.2.1) die Primäradhäsion als ein rein passiver Prozess rückführend auf physico-chemische Wechselwirkungen betrachtet wird, haben viele Wissenschaftler die Bedeutung des physiologischen Zustandes der Bakterien während der Primäradhäsion erkannt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der quantitative Einfluss elektrischer Polarisation auf die Primäradhäsion und Biofilmentwicklung untersucht und zum anderen ein qualitativer Einfluss elektrischer Polarisation auf die Physiologie der Bakterien geprüft. Dazu wurde unter Einsatz verschiedener Methoden untersucht, ob elektrische Polarisation ein Stressfaktor sein kann, der physiologische Antworten bewirkt. Es wurden qualitative Vergleiche zwischen polarisierten und nicht polarisierten Bakterien bei der Wachstumsfähigkeit, Enzymaktivität, Energiegehalt, ribosomale Aktivität, Membranintegrität sowie Populationsdiversität herangezogen, um eine potentielle Schädigung durch elektrische Polarisation nachzuweisen.

1.4.1 Wachstumsfähigkeit von Bakterien

Die übliche Methode zum Nachweis der Wachstumsfähigkeit von Bakterien ist die Kultivierung auf festen Nährmedien. Dabei werden Bakterien unter günstigen Bedingungen inkubiert und anschließend die sichtbar vermehrungsfähigen Bakterien anhand der entstandenen Kolonien (Koloniebildende Einheit = KBE) ermittelt. Bei unbekanntem Mischkulturen besteht das Problem, dass nicht aus jeder vermehrungsfähigen Zelle eine makroskopisch sichtbare Kolonie entsteht. Die gewählten Bedingungen sind meistens nur für einen Bruchteil der Population für ein Wachstum optimal und damit selektiv. Befinden sich Bakterien in einem sogenannten vitalen aber nicht

kultivierbaren Zustand (VBNC = viable but not culturable) können diese mit dieser Methode ebenfalls nicht erfasst werden. Bakterien im VBNC-Zustand sind potentiell vermehrungsfähige Mikroorganismen, die über Kultivierungsmethoden nicht mehr nachweisbar sind (Owen et al. 1995, Kell et al. 1998, Waage et al. 1999). Bakterien fahren ihren Stoffwechsel herunter und gehen in einen Ruhezustand über (Oliver 2005a). Ein solcher VBNC-Zustand kann durch Stress z.B. Temperatur oder Nahrungsangebot hervorgerufen werden. Ein weiterer Stressfaktor kann z.B. der Einfluss von Kupfer (Grey und Steck 2001, Alexander und Steck 1999) oder einer Chlordesinfektion auf Bakterien sein, was als Ursache für den VBNC-Zustand für *E. coli* identifiziert wurde. Ein als bakterizid beschriebener Effekt, könnte auch der Übergang der Bakterien in einen VBNC-Zustand sein, wie z. B. bei Pasteurisierung von Milch (Gunasekera et al. 2002). Diese Strategie ermöglicht den Bakterien ein Überleben, bis für sie wieder geeignete/optimale Wachstumsbedingungen herrschen. Durch Änderungen der Bedingungen (z.B. Temperatur oder Nährstoffgehalt) zu ihrem Vorteil können Bakterien wiederbelebt werden (engl. resuscitation). Durch eine Erhöhung der Temperatur konnte z.B. *P. fluoreszenz*, der zuvor ein Jahr in der Erde im VBNC lag, wiederbelebt werden (Bunker et al. 2004).

1.4.1.1 Nachweis der Wachstumsfähigkeit durch den Gyrasehemmer Pipemidinsäure

Gyrasehemmer sind Chinolone, die eine Wirkstoffgruppe der Antibiotika sind. Die Entwicklung von Gyrasehemmern begann mit der Nalidixinsäure (Singh et al. 1989). Weitere Arbeiten (Kalmbach et al 1997, Juhna et al. 2007a, Weißer und Wiedmann 1986) haben verwandte Substanzen charakterisiert und effektivere Chinolone wie z. B. die Pipemidinsäure (PA) eine 8-Ethyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(1-piperazinyl)-pyrido-(2,3-d)-pyrimidin-6-Carbonsäure untersucht, die Gram-negative und einige Gram-positive Bakterien hemmt (Abbildung 7).

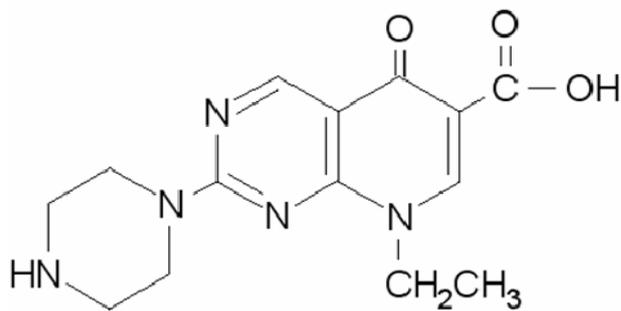


Abbildung 7: Strukturformel der Pipemidinsäure

Die Pipemidinsäure hemmt das Enzym DNA-Gyrase, eine Untergruppe der DNA-Topoisomerasen (Nöllmann et al. 2007). Diese Enzyme sind für den Replikationsablauf absolut notwendig und gehören zur Grundausstattung jeder Zelle. In Bakterien sind Topoisomerasen unter anderem für die negativ verdrillte Tertiärstruktur (supercoiled) der DNA verantwortlich. Durch zahlreiche Aktionen von Schneiden und Wiederverknüpfen erreichen sie diese DNA-Struktur (Bates et al. 2007, Kramlinger et al. 2006). Topoisomerasen werden in zwei Klassen unterteilt:

- Typ I: Topoisomerasen I überführen supercoiled DNA in entspannte DNA durch vorübergehende Spaltung einer der DNA-Stränge.
- Typ II: Topoisomerasen II spalten vorübergehend beide DNA Stränge. Für diese Reaktion benötigen sie ATP. Diese Topoisomerase wird auch als Gyrase bezeichnet. Sie besteht aus zwei Untereinheiten je zwei Gyr-A und Gyr-B, wobei nur die Gyr-B Untereinheit von ATP abhängig ist (Maxwell et al. 2005).

Während die Topoisomerase II die Funktion der Topoisomerase I übernehmen kann, ist die Topoisomerase II für das Überleben von Bakterien essentiell, da sie für entscheidende Prozesse am Ende einer Replikationsrunde verantwortlich ist. Wurde eine Replikationsrunde abgeschlossen, können die Ringe entweder getrennt werden, oder aber an den noch offenen bzw. einzelsträngigen DNA-Ringen kann direkt eine erneute Replikationsrunde initiiert werden. Letzteres führt zur Bildung von Catenanen. Catenane sind DNA-Ringe, die wie Glieder einer Kette aneinanderhängen. Die Auflösung der Ringe und Wiederverknüpfung der DNA-Ringe kann nur die Gyrase erzielen (Maxwell et al. 2005, Kramlinger et al. 2005).

Die Hemmung der DNA-Gyrase führt zum sofortigen Stopp der DNA-Replikation, wodurch ein Einbau von Nukleotiden nicht mehr stattfindet. Die Pipemidinsäure (PA) bindet wie andere Chinolone an den ATP-abhängigen Komplex der Gyrase und verhindert damit das Supercoiling der DNA bzw. das Aufbrechen der Catenane während der DNA-Replikation (Maxwell et al. 2003, Black et al. 2008). Diese Wirkung ist von dem ATP-Gehalt der Bakterien und der eingesetzten Konzentration von PA abhängig und kann von bakteriostatisch bis bakteriozid wirken.

Andere Prozesse, wie das Membran- und Zellwandwachstum, laufen noch weiterhin ab. Typisch für den Chinolon-Streß ist die Filamentbildung (Elongation) der Bakterien. An dieser können wachstumsfähige Bakterien unter den getesteten Bedingungen von nicht wachstumsfähigen Bakterien (nicht elongiert) unterschieden werden (Joux et al. 1997; Kalmbach et al. 1997, Guard et al. 1999, Juhna et al. 2007a, 2007).

1.4.2 Energiegehalt der Bakterien

Da die Aktivität vieler Enzyme wie z.B. der DNA-Gyrase und Prozesse in der Bakterienzelle wie z.B. Proteinsynthese von ATP abhängig ist (Bates et al. 2007), kann der intrazelluläre Gehalt an ATP als Maß der bakteriellen Aktivität herangezogen werden (Schneider et al. 2004). Durch Enzymreaktionen kann der ATP-Gehalt einer Bakterienzelle ermittelt und damit eine Aussage über den Aktivitätszustand getroffen werden (Karl et al. 1980, Stanley et al. 1989, Albers 1996). Die dabei verwendete Nachweismethode ist die ATP-Lumineszenz nach dem Luziferin-Luziferase Verfahren (Hara et al. 2006, Stanley et al. 1989, DeLuca und McElroy 1974). Aktive Bakterien besitzen näherungsweise 1 Femtogramm ft ATP pro Zelle. Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl und die Messung des ATP-Gehaltes, kann der ATP-Gehalt pro Zelle berechnet werden. Berney et al. 2008 zeigte, dass eine ATP-Messung zur Aussage über die Vitalität von Trinkwasserbakterien herangezogen werden kann. Velten et al. 2007 sowie Boe-Hansen et al. 2003 setzen die ATP-Messung in Kombination mit Färbetechniken und anderen Methoden ein, um Aussagen über den Zustand der Bakterien aus Trinkwasser bzw. Biofilmen zu treffen. In der vorliegenden Arbeit wurde die ATP-Messung in Kombination mit anderen Methoden eingesetzt, um einen qualitativen Vergleich der bakteriellen Aktivität polarisierter sowie nicht polarisierter Bakterien anzustellen.

1.4.3 Membranpotential und Membranintegrität

Viele Prozesse des Metabolismus der Bakterien finden in bzw. an der Cytoplasmamembran statt. Die Funktionalität dieser Reaktionen ist vor allem von einer intakten Cytoplasmamembran mit einem ausreichenden Membranpotential und der elektromotorischen Kraft abhängig. Das Membranpotential ist der elektrochemische Gradient über die Cytoplasmamembran, der ein negatives Potential auf der Innenseite der Cytoplasmamembran resultiert. Für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist der Elektronentransport, Protonenfluss (protonmotorische Kraft) und die ATP-Synthese (Atmungskettenphosphorylierung) erforderlich (Kocherginsky et al. 2008, Feniouk 2007, 2008). Diese Prozesse sind direkt von einander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig. Für einen solchen selektiven Ionentransport zur Aufrechterhaltung des Gradienten besitzt die Bakterienzelle spezifische Transportsysteme, die sogenannten Translokasen. Diese speziellen Translokasen (Uniporter, Symporter oder Antiporter) sind funktionelle Proteine (Enzyme, Ionenkanäle, Transportsysteme), die in der Phospholipid-Doppelschicht verankert sind. Zu solchen funktionellen Proteinen gehören die Komponenten der Atmungs-Elektronentransportkette Cytochrom-Komplexe und der ATP-Synthese-Apparat (Gennis 1987, Tony-Meyer 1997).

Beide Systeme sind an dem Aufbau und Erhalt eines Membranpotentials beteiligt. Die Elektronentransportkette (oxidative Phosphorylierung) wird durch die Aufnahme von Nährstoffen und deren Abbau durch wiederholte Dehydrogenierungsschritte angetrieben. Dabei werden die aus den Substraten stammenden Reduktionsäquivalente (H^+ und Elektronen) in die Atmungs-/Elektronentransportkette eingeschleust. Die Anordnung der Komponenten der Atmungs-/Elektronentransportkette bewirkt einen elektrochemischen Gradienten. Durch die Translokation von Protonen von innen nach außen und die gleichzeitige Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff, resultiert ein negatives Potential auf der Innenseite und ein positives Potential auf der Außenseite der Membran (Broojimanns et al. 2007). Dagegen ist aber der elektrochemische Gradient für den Antrieb der ATP-Synthase nicht in allen Bakterien erforderlich (Rao et al. 2008, Kocherginsky et al. 2008). Durch den rückläufigen Protonenfluss von Außen nach Innen (protonmotorische Kraft) wird ADP zu ATP phosphoryliert und damit Energie in Form von ATP gewonnen (Atmungskettenphosphorylierung) (Filingame 1997). Damit ist die ATP-

Synthese vom intrazellulären pH-Wert abhängig (Kashket 1981). Diese Energie ist wiederum für die Gewinnung neuer Energie und Synthese neuer Bausteine (DNA, Proteine, Zellwand) erforderlich (Anabolismus).

Die Cytoplasmamembran kann durch oxidative Chemikalien wie z.B. H_2O_2 bzw. Chlorverbindungen geschädigt werden (Lisle et al. 1998). Aber auch Stress durch UV-Bestrahlung oder Hitze kann zur Schädigung der Membranintegrität führen (Ukuku et al. 2008). Die Folge ist eine erhöhte Porosität, die bis zur vollständigen Zellyse führen kann. In einigen Veröffentlichungen wurde auch ein Einfluss elektrischer Polarisierung auf sessile Bakterien (Hong et al. 2008) oder elektrischer Felder auf planktonische Bakterien (Rieder et al. 2008, Wouters et al. 2001) auf die Membranintegrität gezeigt.

1.4.3.1 Nachweis der Membranintegrität

Der häufigste Nachweis der Membranintegrität erfolgt über den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur und Ladung nur in Bakterienzellen mit erhöhter Permeabilität bzw. geschädigter Cytoplasmamembran (herabgesetzte Membranintegrität) eindringen können. Im Inneren binden die Farbstoffe an Strukturen wie RNA, DNA oder Proteine, wodurch die für diese Moleküle durchgängigen Zellen fluoreszenzmarkiert werden.

- Propidiumiodid PI

Der bekannteste und am häufigsten verwendete Farbstoff ist Propidiumiodid (Hong et al. 2008, Wouters et al. 2001,). Dieser ist für intakte Cytoplasmamembranen nicht durchgängig. Weist diese eine erhöhte Permeabilität bzw. ist sie geschädigt, kann PI in die Zelle eindringen. Dort bindet es sowohl an RNA als auch an DNA (Waring 1965). In Kombination mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff, der alle Bakterien markiert, kann der Anteil an geschädigten Bakterien in der gesamten Population ermittelt werden. Daher wird diese Methode auch als Live-Dead-Färbung bezeichnet

- Propidiummonoazid PMA

PMA (Phenanthridium 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylm-ethylammonio)propyl]-6-phenyl dichloride) ist wie PI ein aromatisches Molekül, ist aber im Vergleich zu PI eine Di-Kation mit einem assoziierten Azid. Aufgrund dieser Struktur wird es stärker von intakten Cytoplasmamembranen abgestoßen.

Ist PMA eingedrungen, weist es eine hohe Affinität zur DNA auf, vergleichbar zum Mechanismus von Ethidiummonoazid (EMA) (DeTraglia et al. 1978, Hixon et al. 1975). Durch Bestrahlung mit Licht (λ 460 nm) zerfällt die Azid-Gruppe im PMA zu einem freien Nitren-Radikal (N●) und Stickstoff. Das hochreaktive Nitren-Radikal bindet sofort mit einem vorhandenen Kohlenstoff der DNA. Die dadurch entstehende stabile Bindung (N – R) resultiert in einer irreversiblen Modifikation der DNA (Nocker und Camper 2006). Diese Methode ist geeignet um DNA geschädigter Bakterien für nachfolgende molekularbiologische Methoden zu blockieren. PMA-modifizierte DNA wird in PCR-Reaktionen nicht amplifiziert (Nocker et al. 2006, 2007, Rieder et al. 2008, Vesper et al. 2008)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode mit PMA für polarisierte und nicht polarisierte Trinkwasserbiofilme eingesetzt, um einen Einfluss auf die Membranintegrität zu prüfen.

1.4.4 Ribosomale Aktivität

Bakterielle Aktivität kann auch anhand der ribosomalen Aktivität ermittelt werden. Weisen Bakterien einen aktiven Stoffwechsel auf, wird DNA in mRNA transkribiert, die an den Ribosomen in Aminosäuresequenzen bzw. Proteine translatiert wird. Die Übertragung der Aminosäuren auf die t-RNA ist ebenfalls vom ATP abhängig (Murray et al. 2003, Schneider et al. 2004, Barker et al. 2001). Die Ribosomen bestehen selbst aus RNA und sind aus zwei Untereinheiten (UE) 50S und 30S aufgebaut. Die 50S UE besteht aus 23S - und 5S - rRNA und die 30S-UE besteht aus 16S - rRNA. Anhand der 16S - rRNA können Bakterien phylogenetisch unterschieden werden. In Abhängigkeit der bakteriellen Aktivität bzw. ihres Zellwachstums besitzen Bakterien 5000 – 50.000 Ribosomen. Anhand der 16S-rRNA können Bakterien bei ausreichender Aktivität nachgewiesen werden.

1.4.4.1 Nachweis ribosomaler RNA mittels FISH

Diese Methode basiert auf Unterschieden bzw. Gemeinsamkeiten in der Sequenz der Zielstruktur, die meistens 16S - rRNA sind. Diese Sequenzen sind aufgrund der einheitlichen Funktionen der Ribosomen in der Proteinsynthese aller Organismen stark konserviert. Je geringer die phylogenetische Verwandtschaft zweier Organismen, umso größer ist der Sequenzunterschied.

Daher können spezifische RNA-Sonden zwischen Bakterienarten unterscheiden. Die dafür eingesetzten Speziespezifischen Oligonucleotidsequenzen sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Sonde). Dies ermöglicht unabhängig einer vorangehenden Kultivierung eine qualitative (Bakterienart) sowie quantitative (Anzahl in Gesamtpopulation) Bestimmung des Zielorganismus mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Zum Beispiel wurden mit Hilfe der FISH-Methode *E. coli* im Trinkwasser nachgewiesen, die mit Kultivierungsmethoden nicht erfasst wurden (Juhna et al. 2007). Auch *P. aeruginosa* wurde mittels FISH nachgewiesen (Kilb et al. 2003). Da die Voraussetzung für einen positiven Nachweis mittels FISH-Technik eine ribosomale Aktivität ist, kann diese Methode ebenfalls als ein Maß bakterieller Aktivität herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sonde für den Nachweis von Eubakterien (EUB338) in polarisierten und nicht polarisierten Trinkwasserbiofilmen eingesetzt (Amann und Schleifer 2005), um potentielle Unterschiede ribosomaler Aktivität zu erfassen.

1.4.5 Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen

Bereits zu Beginn (1.1) wurden Biofilme als ubiquitär vorkommende mikrobiologische Lebensorganisation wie u.a. in Trinkwassersystemen beschrieben (Berry et al. 2006, Långmark et al. 2005a/b, Flemming et al. 2002). In einer solchen Mischkultur sind Bakterien mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften vertreten. Im Trinkwasser sind auch Bakterien vorhanden, die im Labor nicht kultivierbar sind. Um solche Bakterien dennoch nachzuweisen, werden molekularbiologische Methoden (FISH, PCR-DGGE, RT-PCR) eingesetzt, die Bakterien anhand der 16S rDNA bzw. 16S rRNA identifizieren. Um einen Einfluss elektrischer Polarisation auf die Populationsdiversität während der Biofilmentwicklung zu untersuchen, wurde die PCR-DGGE Methode eingesetzt.

1.4.5.1 Untersuchungen der Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen mittels PCR-DGGE

Diese Methode basiert auf dem gleichen Prinzip wie die FISH-Technik. Zur Analyse der bakteriellen Diversität von Flussbiofilmen wurde z.B. die 16S rDNA PCR-DGGE Methode eingesetzt (Lyautey et al. 2005). Aber auch die Diversität von Trinkwasserbiofilmen konnte mittels PCR-DGGE untersucht werden (Schmeisser et al. 2003).

Mit diesen Methoden kann ein qualitativer Einblick in die Zusammensetzung isolierter Biofilme aus verschiedenen Systemen erzielt werden. Während die PCR-DGGE ein Spektrum verschiedener Bakterienarten darstellt, ermöglicht die FISH-Technik zusätzlich eine Quantifizierung einzelner Bakterien abhängig von der verwendeten Sonde (Amann et al. 1995).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrisch leitende Aufwuchsflächen eingesetzt, um den Einfluss verschieden geschalteter Oberflächenladungen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung zu untersuchen. Dazu wurden folgende Ziele definiert:

- Quantifizierung der Primäradhäsion auf konstant und gepulst polarisierten Aufwuchsflächen
- Beeinflussung des Biofilmwachstums durch gepulste Polarisation der Aufwuchsfläche
- Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Biofilmmablösung durch gepulste Polarisation der Aufwuchsfläche
- Prüfung eines physiologischen Einflusses elektrischer Polarisation auf die Bakterienzelle

2 Material und Methoden

2.1 Teststämme

2.1.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium mit einer Größe von ca. 0,5 µm x 2,5 µm (Anzai et al. 2000). Es wurde ein Isolat aus der Ruhr (Mülheim) verwendet, das mit einer 99,99 % Sicherheit als *S. maltophilia* mittels API 20 NE V 6. 0 identifiziert wurde. *S. maltophilia* wird der Risikogruppe 1 zugeordnet. Die optimale Bebrütungstemperatur beträgt 30°C und die Bebrütungsdauer 24 Stunden.

2.1.2 Trinkwasserbakterien

Um Trinkwasserbakterien als Mischkultur zu erhalten, wurde Trinkwasser der IWW internen Hausinstallation in den Versuchsaufbau eingeleitet.

2.2 Nährmedien und Lösungen

2.2.1 Standard-I-Nähragar

37 g Standard-I-Nähragar (Merck) wurden in 1000 mL deionisiertem Wasser gelöst und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Das sterile Agar-Medium wurde zu je 20 mL in Petrischalen gegossen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Der pH-Wert des Nähragars betrug 7,5±0,2 bei 25°C.

Zusammensetzung:

▪ Peptone	15,0 g/L
▪ Hefeextrakt	3,0 g/L
▪ Natriumchlorid	6,0 g/L
▪ D(+)-Glukose	1,0 g/L
▪ Agar-Agar	12,0 g/L

2.2.2 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Nährbouillon (CASO-Bouillon)

Es wurden 30 g/L CASO-Bouillon (Merck) in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Diese Lösung wurde in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Dazu wurde die sterile CASO-

Bouillon mit sterilem deionisiertem Wasser auf die erforderliche Konzentration (1:200, 1:400 oder 1:20 000) unter sterilen Bedingungen verdünnt.

Zusammensetzung:

▪ Pepton aus Casein	17,0 g/L
▪ Pepton aus Sojamehl	3,0 g/L
▪ D(+)-Glukose	2,5 g/L
▪ Natriumchlorid	5,0 g/L
▪ di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g/L

2.2.3 Physiologische Kochsalzlösung

9 g Natriumchlorid wurden in 1000 mL deionisiertem Wasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.4 Partikelfreies deionisiertes Wasser

Zur Herstellung von partikelfreiem deionisiertem Wasser wurde ein Filter mit einer Porenweite von Ø 0,2 µm (AcroPak™ 200 Capsule with Supor® Membrane) an die Deionat-führende Leitung angeschlossen. Zunächst wurde das deionisierte Wasser für 15 min langsam durch den Filter geleitet, um diesen zu reinigen. Durch die Filtration wird die Partikeldichte in deionisiertem Wasser auf < 50 Partikel/mL (Partikelgröße Ø 0,7 µm) reduziert. Das aufgefangene (1 L Schottfalschen) partikelfreie deionisierte Wasser wurde zur Sterilisation bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.5 Synthetische Trinkwasser (Elektrolyt)

Das synthetische Trinkwasser (Feser et al. 2001) wurde als eine 10 x konzentrierte Lösung angesetzt und bei 70 °C für 30 Minuten pasteurisiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Für den Gebrauch wurde eine 1:10 Verdünnung (1 x synthetische Trinkwasser) in sterilem deionisiertem partikelfreiem Wasser hergestellt. Vor dem Einsatz wurde das 1 x synthetische TW über einen Ø 0,2 µm Cellulose-Nitrat-Filter (Sartorius) sterilfiltriert. Das synthetische Trinkwasser (TW) diente als Elektrolyt während der elektrischen Polarisation.

Zusammensetzung:

Komponente	Einwaage [mg/L]	Anteil Kation [mol/L]
▪ CaSO ₄ x H ₂ O	358,50	(Ca ²⁺) 2,083 x 10 ⁻³
▪ MgCl ₂ x 6 H ₂ O	95,50	(Mg ²⁺) 0,473 x 10 ⁻³
▪ CaCl ₂ x 2 H ₂ O	34,60	(Ca ²⁺) 0,237 x 10 ⁻³
▪ NaHCO ₃	42,00	(Na ⁺) 0,500 x 10 ⁻³
▪ D(+)-Glukose	2,15	
▪ Pepton	2,00	

2.3 Chemikalien

2.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

2.3.1.1 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)

DAPI (Molecular Probes) ist ein wasserlöslicher Farbstoff. Es dringt in alle Bakterienzellen ein und lagert sich in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an. Der stabile DNA-Farbstoff-Komplex weist ein Absorptionsmaximum von 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 461 nm auf (Manzini et al. 1985, Taiou et al. 1992).

Für die DAPI-Arbeitslösung (10 µg/mL) wurden 500 µg DAPI (Sigma, Produkt-Nr. D-9542) mit einer 2 % (v/v) wässrigen Formaldehydlösung (47,3 mL deionisiertes Wasser und 2,7 mL 37 % Formaldehyd) auf 50 mL aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.3.1.2 SYTO 9

SYTO 9 (Molecular Probes) ist an DNA-bindender in DMSO löslicher Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 494 nm und einem Emissionsmaximum von 520 nm. Die käufliche SYTO 9-Stammlösung mit einer Konzentration von 3,34 mmol/L (DMSO) wurde bei – 20°C aufbewahrt.

Als SYTO 9-Arbeitslösung wurden nach Herstellerangaben 1,5 µl der Stammlösung in 1 mL steriles deionisiertes Wasser gegeben. Das Arbeitsreagenz wurde immer frisch angesetzt (Lebaron et al. 1998).

2.3.2 Pipemidinsäure PA

25 mg bzw. 30 mg Pipemidinsäure (Sigma) wurden in 100 mL 4 mM NaOH gelöst. Anschließend wurde diese Stammlösung (250 bzw. 300 mg/L) steril

filtriert und bei 4°C maximal zwei Wochen gelagert. Für den Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 in der entsprechend verdünnten CASO-Bouillon verdünnt.

2.3.3 Natriumazid NaN_3

Für eine 10 %-ige NaN_3 -Stammlösung wurden 10 g NaN_3 (Sigma) in 100 mL partikelfreiem deionisiertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (20 °C). Im Versuch wurde die Lösung mit einer Endkonzentration von 1 % eingesetzt.

2.3.4 Propidiummonoazid PMA

Propidiummonoazid (PMA, Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) wird als Pulver geliefert. Für eine Arbeitslösung wurde das PMA entsprechend der Herstellerangaben in 20 % DMSO gelöst (20 mM) und bei – 20 °C gelagert

2.3.5 Chemikalien für DGGE

Chemikalie	Firma
Acrylamid/ bis-Acrylamid 40%	Sigma
Formamid	AppliChem
Harnstoff ($\geq 98,0$ %)	Sigma
TEMED ultra pure grade	Amresco
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (99,8 %)	Sigma
Essigsäure (100 %)	Glacial
EDTA (99,0 %)	Riedel-de-Haen
Ammoniumpersulfat ACS grade, APS	Amresco
Bromphenolblau Xylene Cyanol (0,5%/0,5 %)	Sigma
Sybr Gold	Invitrogen

2.3.6 Chemikalien für FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

Chemikalie	Firma
NaCl (99,5 %)	Merck
KCl (99,5 %)	Merck
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (98,0 – 100,5 %)	Merck
KH_2PO_4 (99,5 – 100,5 %)	Merck
Paraformaldehyd (95,0 – 100,5 %)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($> 99,0$ %)	Roth
EDTA (99,0 %)	Sigma
Sodiumdodecylsulfat, SDS ($\geq 99,0$ %)	Sigma
Ethanol (99,9 %)	Merck

2.3.7 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Firma
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0 \%$)	Merck
$\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (99,0 – 102,0 %)	Merck
Ethanol (99,5 %)	Baker
Formaldehyd (37%)	Sigma
Folin-Ciocalteus	Merck
D(+)-Glukose	Merck
HCl rauchend (37 %)	Merck
H_2SO_4 (95,0 – 97,0 %.)	Merck
KOH (85,0 – 100,5 %)	Merck
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (99,0 – 101,0 %)	Merck
NaN_3 ($\leq 99,0 \%$)	Merck
NaHCO_3 (99,0 – 101,0 %)	Merck
NaOH, p.a. ($\geq 97 \%$)	Riedel-de Haen
Phenol (99,0 %)	Merck

2.4 Aufwuchsflächen (Arbeitselektroden)

2.4.1 Indiumzinnoxid (ITO) beschichtete Glascoupons

Floatglasstücke (SiO_2) mit einer Abmessung von $3,0 \times 3,0$ ($\pm 0,025$) cm wurden von der Firma Präzisions Glas & Optik GmbH mit Indiumzinnoxid (CEC020S) beschichtet (Abbildung 8). Die Schichtdicke des elektrisch leitenden Indiumzinnoxids, nachfolgend stets als ITO bezeichnet, beträgt $1,1$ ($\pm 0,1$) mm.

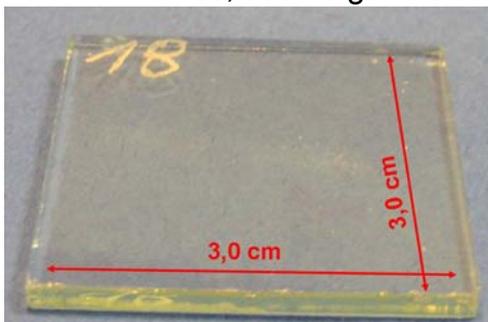


Abbildung 8: Indiumzinnoxid beschichteter Glas-Coupon (ITO).

2.4.2 Mit Polypyrrol beschichtete Membranen (Polypyrrol)

Das elektrisch leitfähige Polymer Polypyrrol wurde auf nicht leitfähige Membran polymerisiert (2.11.3). Aus den mit Polypyrrol beschichteten Membranen wurden mit einem Stanzeisen Stücke mit einem Durchmesser von $\varnothing 2,5$ cm

ausgestanzt. Diese wurden als Aufwuchsfläche eingesetzt (Abbildung 9). Nachfolgend wurden sie stets als Polypyrrol bezeichnet.



Abbildung 9: Polypyrrol-Aufwuchsfläche (Polypyrrol).

2.5 Reinigung der Aufwuchsflächen

Zur Reinigung der Aufwuchsflächen wurden alle Coupons bzw. Membranen in 70 %-igem Ethanol (Ethanol absl. zur Analyse) bei 120 rpm über Nacht (20 °C) auf einem Schwenktisch geschüttelt. Anschließend wurden die Aufwuchsflächen im Ultraschallbad (Branson 12000) beschallt (2 x 1 min). Daraufhin folgten drei Waschschriffe mit sterilem, partikelfreiem und deionisiertem Wasser. Zuletzt wurden die Coupons bzw. Membranen über Nacht im gleichen Wasser inkubiert. ITO-Coupons wurden bei 100 °C getrocknet. Die mit Polypyrrol beschichteten Membranen wurden im sterilen partikelfreien, deionisierten Wasser bis zum Einsatz im Versuch gelagert.

2.6 Geräte

2.6.1 Potentiostaten-System

Das Multi-Potentiostaten-System PGU10V-100mA-MOD ist eine Spezialanfertigung des Ingenieurbüros Peter Schrems IPS (Abbildung 10). Es besteht aus vier baugleichen Potentiostaten, die mit einer Analogtechnik ausgestattet sind (Bereiche: ± 10 V/ ± 100 mA mit 6 Strombereichen bis 1 μ A, eine Auflösung von 100 pA). Jeder Potentiostat ist für eine elektrochemische Flanschzelle mit einer Drei-Elektroden-Anordnung ausgelegt. Die Steuerung des Multi-Potentiostaten-Systems erfolgte mittels der dazugehörigen Software EcmWin (IPS).



Abbildung 10: Multi-Potentiostaten-System bestehend aus vier Potentiostaten jeweils angelegt für eine elektrochemische Flanschzellen.

2.6.2 Elektroden (Drei-Elektroden-Anordnung)

Bei elektrochemischen Untersuchungen wurde das Potential der Arbeitselektrode AE gegenüber einer Referenzelektrode RE stromlos gemessen und über verschiedene Polarisationsroutinen geregelt. Dazu wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode (AE, GE und RE) in einem Elektrolyten gewählt (Abbildung 11).

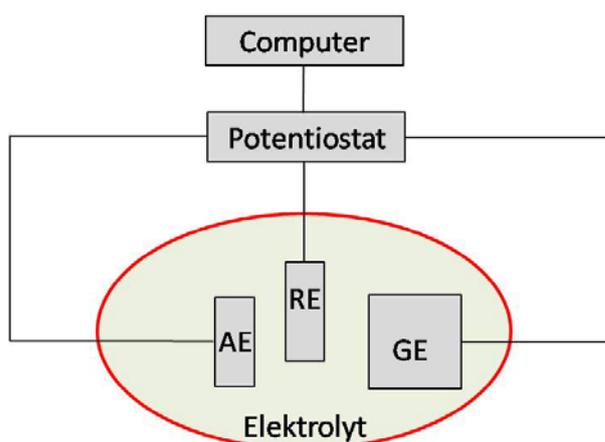


Abbildung 11: Drei-Elektroden-Anordnung mit Arbeitselektrode (AE), Referenzelektrode (RE) und Gegenelektrode (GE) in einem Elektrolyten.

2.6.2.1 Arbeitselektrode

Als Arbeitselektroden AE wurden die unter 2.4 beschriebenen Aufwuchsflächen eingesetzt. Die Kontaktierung der AE an das Multi-Potentiostaten-System erfolgte über eine Krokodilklemme.

2.6.2.2 Gegenelektrode (Platinnetz)

Die Gegenelektrode GE wurde so gewählt, dass deren Fläche stets größer ist als die der AE. Als Gegenelektrode wurde ein Platinnetz (Goodfellow/Bad Nauheim) mit einer Gesamtoberfläche von $75,63 \text{ cm}^2$ eingesetzt (Abbildung 12). Der Werkstoff besitzt eine 99,9 %-ige Reinheit. Der Drahtdurchmesser beträgt $\varnothing 0,06 \text{ mm}$ und die nominale Öffnung des Netzes $0,25 \text{ mm}$ (Abbildung 12 rechts). Die Kontaktierung an das Multi-Potentiostaten-System wurde durch ein Platindraht ($\varnothing 0,3 \text{ mm}$, Reinheit 99,99 %, Härtegrad: gegläht; Goodfellow/Bad Nauheim) gewährleistet.

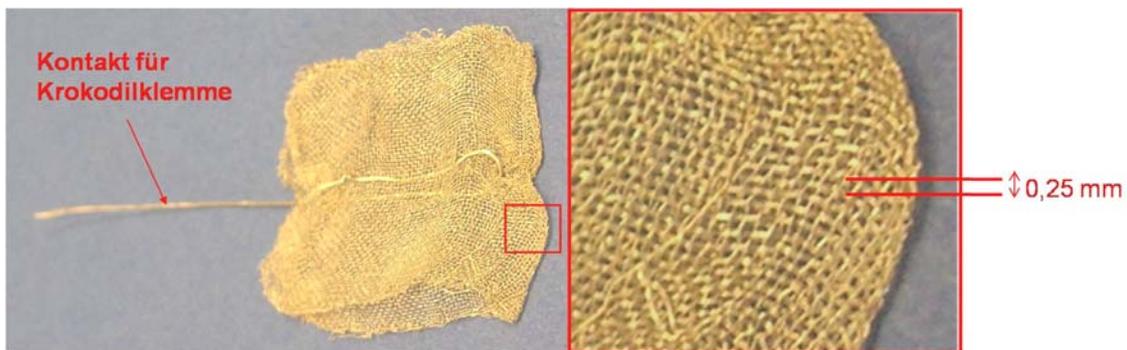


Abbildung 12: Gegenelektrode (Platinnetz) mit Detailausschnitt der nominalen Netzöffnung.

2.6.2.3 Referenzelektrode (Ag/AgCl)

Als Referenzelektrode wurden Ag/AgCl-Elektroden SE 21 L, Spezialanfertigung Sensortechnik Meinsberg GmbH, verwendet (Abbildung 13). Die Ag/AgCl-Elektroden besitzen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ein Potential von $+ 208 \text{ mV}$ gegen die Standardwasserstoffelektrode (SHE). Die Anwendung der Referenzelektrode erfolgte stets in Haber-Luggin-Kapillaren (2.6.2.4).

2.6.2.4 Haber-Luggin-Kapillare

Die Haber-Luggin-Kapillare ist mit dem gleichen Elektrolyten wie die Referenzelektrode, einer gesättigten KCl-Lösung, gefüllt. Durch das

eingeschmolzene Magnesiastäbchen wird ein Auslaufen des Elektrolyten verhindert (Abbildung 13). Gleichzeitig sind ein Ionentransport und damit eine Messung des Potentials an der AE gewährleistet. Durch eine optimale Positionierung der Öffnung der Kapillare an der AE kann der Messfehler, bedingt durch einen Ohm'schen Spannungsabfall zwischen AE und GE, minimiert werden. Der unerwünschte Spannungsabfall zwischen AE und GE kommt besonders in schwach leitfähigen Elektrolyten z.B. dem synthetischen Trinkwasser (2.2.5) zum Tragen. Die Kapillare schützt die RE ebenfalls vor Verschmutzung.

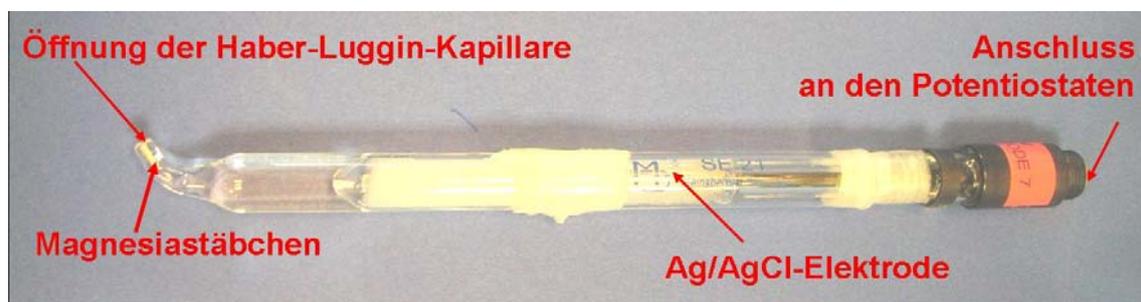


Abbildung 13: Haber-Luggin-Kapillare mit einer Ag/AgCl-Elektrode.

2.6.3 Flansczellen (Elektrochemische Zellen)

Die Drei-Elektroden-Anordnung (Abbildung 11) wurde in Flansczellen eingesetzt (Abbildung 15). Dazu wurde die AE in den Flanschen befestigt. Die RE wurde zur AE ausgerichtet und die GE parallel so nah wie möglich zur AE, aber hinter der RE platziert. Diese Drei-Elektroden-Anordnung wurde in zwei verschiedenen Typen von Flansczellen, das Batchsystem und Durchflusssystem, eingesetzt. Nach Befüllen der Flansczellen mit dem Elektrolyten (2.2.5) erhielt man eine elektrochemische Zelle.

2.6.3.1 Batch-Flansczellen

Eine Flansczelle ist ein Becherglas, an das Flansche (Fläche: 2,385 cm²) angeschmolzen wurden. Die Flanschflächen wurden stets mit Teflonband umwickelt, um bei Fixierung der Arbeitselektrode Leckagen zu verhindern. Die kleinen Flansczellen mit einem Fassungsvermögen von 50 mL (Füllvolumen: 40 mL) besitzen einen Flansch (Abbildung 14a). Die großen Doppelflansczellen (Fassungsvermögen 120 mL, Füllvolumen: 80 mL) besitzen zwei sich gegenüber angeordnete Flansche (Abbildung 14b).

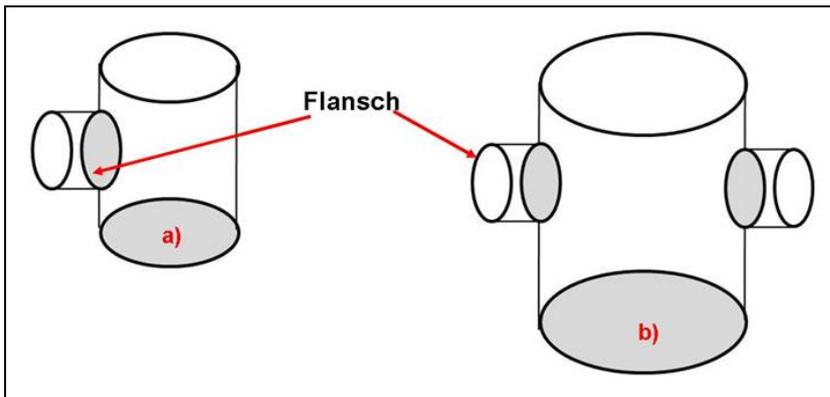


Abbildung 14: Batch-Flanschzellen a) kleine Flanschzelle mit einem Flansch mit 80 mL Volumen b) große Doppelflanschzelle mit 120 mL Volumen.

2.6.3.2 Durchflussflanschzelle

Für das Durchflusssystem wurden große Doppelflanschzellen mit einem Zulauf und Ablauf zu einer Durchflussflanschzelle modifiziert (Abbildung 15). Für die Befestigung der Arbeitselektrode, wurde ein Haushaltsgummi über die Arbeitselektrode an den vier Haken um den Flansch gebunden.

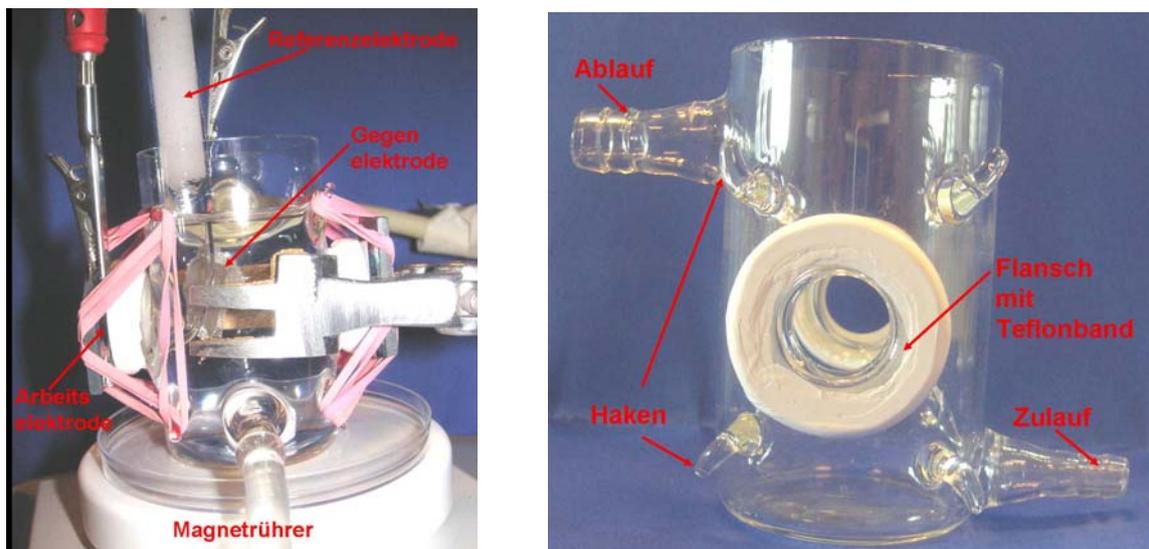


Abbildung 15: Drei-Elektroden-Anordnung in einer Durchflussflanschzelle (links), Durchflussflanschzelle mit Zulauf und Ablauf und Haken zur Befestigung der AE.

2.6.4 Mikroskope

2.6.4.1 Epifluoreszenzmikroskop LEICA

Das Epifluoreszenzmikroskop Modell DM LB der Firma Leica wurde zur Untersuchung fluoreszenzmarkierter Proben eingesetzt. Das Mikroskop ist mit

folgenden Objektiven ausgestattet: HC PL Fluotar 10x/0.30, Ph1; HC PL Fluotar 20x/0.50, Ph2; PL Fluotar 40x/0.70, Ph2; PL Fluotar 100x/1.30, Ölimmersion, Ph3 sowie PL Fluotar L 100x/0.75 (long distance). Das PL Fluotar L 100x/0.75 long distance Objektiv erlaubt eine hoch auflösende mikroskopische Untersuchung von Proben ohne Öl. Das Anwendungsspektrum ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Filterblöcke Modell DM LB LEICA

Filterblock	Farbstoff	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
A	DAPI	BP 340-380	RKP 400	LP 425
I3	Syto 9	BP 340-380	RKP 400	LP 515
I3 + Rotfilter	Propidium iodid	BP 340-380	RKP 400	LP 515
Y3	Cy3	BP 340-380	RKP 400	BP 610-675

Für Bildaufnahmen ist eine LEICA DC 200 Kamera mit einer Auflösung von 1,3 Megapixel angeschlossen. Über eine TWAIN Schnittstelle sind Mikroskop und Kamera mit einem PC verbunden. Die Kamera wird über das Bildbearbeitungsprogramm IrfanView gesteuert. Durch eine Teilablenkung des Lichtes am Mikroskop ist die Betrachtung eines Live-Bildes und Vorschau am Bildschirm möglich. Die optimale Bildqualität kann in der DC 200 Software durch eine Anpassung der Belichtungszeit (ms. oder sek.), Verstärkung des Lichtsignals (gain) sowie die Verschiebung der Helligkeitsverteilung (Live-Bild-Histogram) eingestellt werden.

2.6.4.2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Es wurde das Laser Scanning Modul LSM 510 von Carl Zeiss Jena gekoppelt an das inverse Mikroskop Axiovert 100 BP (Zeiss) verwendet. Das Mikroskop war mit folgenden Objektiven ausgestattet: Plan-Neofluar 10x/ 0.30, Plan-Neofluar 20x/ 0.50, LD Achroplan 40x/ 0.60 Korr. und LD Achroplan 63x / 0.75 Korr.. Das Modul verfügte über einen Argon-, zwei Helium- und eine Argon-Ion-UV-Laser (Tabelle 4).

Tabelle 4: Laser des Scanning Moduls LSM 510

Laser	Anregungswellenlängen [nm]	Intensität max.
Argon	458, 488, 514	25 mW
Helium 1	543	1 mw
Helium 2	633	5 mW
UV	351, 364	80 mW

Die Steuerung des Mikroskops sowie der Laser erfolgte über die LSM 510 Release 3.2 Software (Zeiss). Zur Bilddarstellung wurde das Programm AxioVision 3.1 (Zeiss) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die CSLM

Farbstoff	$\lambda_{\text{ex, max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em, max}}$ [nm]	Anregungswellenlänge Laser [nm]	Detektionsfilter
SYTO 9	494	520	488	BP 505-530 oder LP 505

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung von Bakterien

Die Stammhaltung von *S. maltophilia* erfolgte auf Standard-I-Nähragar. Die Überimpfung auf frische Agar-Nährmedien erfolgte alle 2 Wochen. Monatlich wurde eine frische Dauerkultur entnommen. Der Einzelkoloniausstrich wurde bei 30 °C für 24 Stunden bebrütet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.7.2 Herstellung von Bakteriensuspensionen von Reinkulturen

Von einem Einzelkoloniausstrich des Teststammes wurden 4 Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse entnommen und in 2 mL synthetischem TW suspendiert. Durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (\varnothing 0,4 mm) mit einer Spritze (5 mL) wurde die Bakteriensuspension homogenisiert. Die Bakteriensuspension wurde über einen befeuchteten (2 mL synthetische TW) Cellulose-Nitrat-Filter (Porenweite \varnothing 0,45 μm oder \varnothing 0,2 μm , Sartorius) filtriert. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit abfiltriert. Die Membranfilter mit den abfiltrierten Bakterien wurden auf einer Standard-I-Nähragarplatte überführt (ohne Luftblasen). Um die Sterilität des synthetischen TW zu prüfen, wurden stets 100 mL synthetisches TW auf dieselbe Weise filtriert. Alle Membranfilter auf eine Standard-I-Nähragarplatten wurden bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Bakterienzellrasen mit einem sterilen Drigalskispatel vom Filter entnommen und in 20 mL steriles synthetisches TW suspendiert. Mittels einer Kanüle (\varnothing 0,4 mm) mit einer Spritze (20 mL) wurde die Stamm-Bakteriensuspension homogenisiert und die Gesamtzellzahl (GZZ)

bestimmt (2.7.3.1). In Versuchen wurde eine 3×10^7 Bakterien/ml konzentrierte Bakteriensuspension im synthetischen TW eingesetzt.

2.7.3 Gesamtzellzahlbestimmung (GZZ)

2.7.3.1 Gesamtzellzahlbestimmung flüssiger Proben auf Polycarbonatfiltern

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl nach Porter und Feig 1980 von Bakteriensuspensionen wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der wässrigen Probe hergestellt. Eine geeignete Verdünnung wurde auf einen Polycarbonatfilter (Millipore; Isopore™ membrane filter; Typ 0,2 µm GTTP) mit einer Porenweite von \varnothing 0,2 µm filtriert. Anschließend wurde 1 mL der DAPI-[10 µg/mL] steril auf die Probe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 Minuten wurde mittels der Wasserstrahlpumpe die Färbelösung abgesaugt. Nach Entlüften der Filtrationseinheit wurden die Filter entnommen und getrocknet.

Der trockene Filter wurde mit der Bakterien belegten Seite nach oben auf einen Tropfen Fixiermedium (Citiflour AF2, Science Services oder BacLight™ mounting oil, molecular probes) auf einem Objektträger (VWR) gelegt. Dann wurde der Filter mit einem Tropfen desselben Mediums überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 24 mm, Borsilikatglas, VWR) überdeckt. Anschließend wurde ein Tropfen Immersionsöl (Brechungsindex n_D^{20} 1,515-1,517, Merck) auf das Deckglas getropft und die Probe im Epifluoreszenzmikroskop (2.6.4.1) bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt. Pro Probe wurden bei gleichmäßiger Verteilung der Bakterien 20 Zählfenster (100 x 100 µm) oder mindestens 300 Bakterien gezählt. Die Gesamtzellzahl (GZZ) in Bakterien/mL wurde entsprechend der nachstehenden Formel berechnet.

$$GZZ[\text{Bakterien} / \text{ml}] = \frac{\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Mikroskopsfaktor}}{\text{filtriertes Volumen}}$$

2.7.3.2 Gesamtzellzahlbestimmung direkt auf Aufwuchsflächen

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl von Bakterienbelägen auf Aufwuchsflächen wurden die Bakterien mit 1 mL einer SYTO 9-Färbelösung (1,5 µl / 1 mL) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Färbelösung vorsichtig mit einem handelsüblichen Papiertuch aufgesaugt. Um nicht gebundenes Färbereagenz

abzuspülen, wurde vorsichtig 1 mL einer physiologischen Lösung (NaCl, synthetische TW) seitlich an die Probe pipettiert und am anderen Ende erneut durch ein Papiertuch langsam aufgesaugt.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl einschichtiger Biofilme erfolgte mittels des long distance Objektivs des Epifluoreszenzmikroskops (2.6.4.1) nach Trocknung der Probe. Je Probe wurden bei gleichmäßiger Verteilung der Bakterien 20 Zählfenster (je 100 x 100 µm) oder mindestens 300 Bakterien gezählt. Um die Gesamtzellzahl in Bakterien pro Fläche cm² zu ermitteln, wurde der Mittelwert der Auszählungen mit dem Mikroskopfaktor 10.000 multipliziert.

Die mikroskopische Untersuchung mehrschichtiger Biofilme erfolgte mittels des CLSM (2.6.4.2). Dazu wurde der Biofilm ebenfalls mit SYTO 9 gefärbt. Bis zur Mikroskopie wurde die Probe in eine feuchte Kammer gelegt, um eine Kollabierung und Austrocknung des Biofilms zu verhindern.

2.7.4 Anzucht von Biofilmen auf Aufwuchsflächen

2.7.4.1 Primäradhäsion von Reinkulturen im Batchsystem

Die Anzucht von *S. maltophilia* Biofilmen auf den Aufwuchsflächen (2.4) wurde in Doppelflanschzellen im Batchsystem bei 20 °C durchgeführt. Die mit den Aufwuchsflächen bestückten Doppelflanschzellen wurden mit 80 mL einer 3×10^7 Bakterien/mL konzentrierten Bakteriensuspension (2.7.2) befüllt. Mittels eines Kreuzrührers (Ø 1 cm; VWR) und eines Magnetrührers (Hei-Mix-S, Heidolph) wurden kontinuierliche Scherkräfte mit 300 rpm erzeugt. Die Primäradhäsion erfolgte für 5 Stunden mit bzw. ohne elektrische Polarisierung der Aufwuchsflächen. Unter diesen Bedingungen wurden in derselben Doppelflanschzelle ein polarisierter Biofilm und ein nicht polarisierter Kontrollbiofilm angezüchtet.

2.7.4.2 Primäradhäsion von Trinkwasserbakterien im Durchfluss

Die Anzucht von Trinkwasserbiofilmen auf den Aufwuchsflächen (2.4) wurde in Durchflussflanschzellen bei 20 °C durchgeführt. Nachdem die Aufwuchsflächen an den Flanschen befestigt waren, wurden die Durchflussflanschzellen an eine Mehrkanalpumpe (ISMATEC Mehrkanal IPC-8) angeschlossen. Über diese wurde anschließend Trinkwasser aus der Hausinstallation des IWW mit einer Durchflussrate von 1,3 mL/min gepumpt. Mit einem Kreuzrührer wurden mittels eines Magnetrührer (300 rpm) kontinuierliche Scherkräfte erzeugt und eine

homogene Durchmischung des Trinkwassers gewährleistet. Die Primäradhäsion der Trinkwasserbakterien erfolgte für 5 Stunden mit bzw. ohne elektrische Polarisation der Aufwuchsflächen. Unter diesen Bedingungen wurden in derselben Durchflussflanschzelle ein polarisierter Trinkwasserbiofilm und ein nicht polarisierter Kontrollbiofilm angezchtet.

2.7.4.3 Biofilmwachstum von Trinkwasserbakterien im Durchfluss

Zur Anzucht mehrschichtiger Trinkwasserbiofilme wurden Durchflussflanschzellen mit Aufwuchsflächen bestückt und mit Trinkwasser befüllt. Zunächst erfolgte eine Primäradhäsion der Trinkwasserbakterien für 72 Stunden im Batchsystem (gemäß 2.7.4.2). Anschließend wurde das Trinkwasser gegen eine 1: 20 000 verdünnte CASO-Bouillon ausgetauscht und für vier Stunden gerührt (300 rpm). Nach dieser Aktivierungszeit wurde Trinkwasser aus der Hausinstallation des IWW und eine CASO-Bouillon (Endkonzentration 1: 20 000) mittels der Ismatec-Mehrkanalpumpe 1:1 gemischt und mit einer Durchflussrate von 1,3 mL/min in die Flanschzellen eingeleitet. Ein Kreuzrührer erzeugte mittels eines Magnetrührers (300 rpm) kontinuierliche Scherkräfte und gewährleistete eine homogene Verteilung des Trinkwassers und der Nährlösung. Das Biofilmwachstum der Trinkwasserbakterien erfolgte für 3 bis 7 Tage mit bzw. ohne elektrische Polarisation der Aufwuchsflächen. Unter diesen Bedingungen wurden in derselben Durchflussflanschzelle ein polarisierter Trinkwasserbiofilm und eine nicht polarisierte Kontrolle angezchtet.

2.7.4.4 Regeneration von Trinkwasserbiofilmen

Zur Regeneration der Trinkwasserbiofilme auf dem polarisierten und nicht polarisierten ITO, wurden diese nach erfolgter Anzucht (2.7.4.3) aus den Flanschzellen entnommen und in 50 ml einer 1:20 000 verdünnten CASO-Bouillon überführt. Anschließend wurden die Trinkwasserbiofilme ohne Einwirkung einer Polarisation oder Scherkräfte für 24 Stunden bei Raumtemperatur ruhend inkubiert.

2.7.5 Nachweis bakterieller Zellteilungsfähigkeit mittels Pipemidinsäure (PA)

Zum Nachweis der DNA-Replikation und Zellteilungsfähigkeit von Bakterien, wurden die Bakterien mit dem Gyrasehemmer Pipemidinsäure (PA). In Anwesenheit von Nährstoffen werden die Bakterien wiederbelebt und die gleichzeitige Hemmung des Gyrasesystems durch PA resultiert eine Verlängerung der Bakterien, da die Zellteilung nicht stattfindet (Kalmbach et al. 1997b). Die Zellelongation wurde als Maß bakteriellen Aktivität herangezogen. Eine ausbleibende Elongation deutet auf geringere oder fehlende Enzymaktivität in diesen Zellen hin.

2.7.5.1 Durchführung der Pipemidinsäurebehandlung

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode sowohl für Trinkwassermischkulturen als auch für *S. maltophilia* an das Testsystem angepasst und optimiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Optimale Bedingungen zur Pipemidinsäurebehandlung von Bakterien

	<i>S. maltophilia</i>	Trinkwassermischkultur
Pipemidinsäurekonz. [mg/L]	25	30
Medium	CASO 1:400	CASO 1:200
Temperatur	20°C	20°C
Inkubationszeit	20-24 Stunden	28-32 Stunden
Negativkontrolle + NaN ₃	1 %	1 %

Sowohl die polarisierten als auch nicht polarisierten ITO wurden aus den Flanschzellen entnommen. Um nicht adhärierte Bakterien abzuspülen, wurden die ITO einmal in synthetischen TW eingetaucht und in 50 mL einer CASO-Bouillon mit Pipemidinsäure überführt. Parallel wurde eine Negativkontrolle (polarisiert/ nicht polarisiert) in 50 mL CASO-Bouillon mit Pipemidinsäure und Natriumazid angesetzt. Dabei blockiert Natriumazid das Cytochromsystem, was zum Zelltod führt (Yoshikawa und Caughey 1992, Bowler et al. 2006) Nach erfolgter Inkubation wurden die ITO entnommen und einmal in synthetisches Trinkwasser eingetaucht, um Reste der Lösungen abzuspülen. Abschließend wurden die Bakterien mit Syto 9 gefärbt (2.7.3.2).

2.7.5.2 Auswertung der Pipemidinsäurebehandlung

Die Verlängerung der Zellen bzw. Filamentbildung ohne Zellteilung wurde als Maß herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Elongation um mindestens das 2-3-fache der Ursprungslänge der Bakterien als Elongation gewertet. Als Maß der Ursprungslänge der Bakterien wurde die Negativkontrolle herangezogen. Bakterien, deren Elongation nicht eindeutig gewertet werden konnte, wurden nicht gezählt. Daher handelt es sich stets um Mindestangaben.

2.7.6 Blockierung der DNA membrangeschädigter Bakterien mittels PMA (nach Nocker et al. 2006, 2007)

PMA (2.3.3) wurde eingesetzt um DNA membrangeschädigter Bakterien zu binden und für eine anschließende PCR zu selektieren. Dazu wurden die Biofilme isoliert (2.8.1) und 1 mL der Bakteriensuspension mit 2,5 µl PMA in Multi[®]-Sicherheitsreaktionsgefäßen (1,5 mL, Roth) gemischt. Parallel wurde eine Probe ohne Zugabe von PMA identisch behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde das Gemisch, auf Eis gekühlt, bestrahlt (10 Minuten, Halogenlampe 650 W 464 nm, Lampenabstand 15 – 20 cm). Die Reaktionsgefäße wurden alle 3 Minuten gemischt. Zuletzt wurde die DNA aus den bestrahlten Bakterien isoliert (2.8.2) und für molekularbiologische Analysen wie RT-PCR (2.10.3) und DGGE (2.10.1) eingesetzt.

2.7.6.1 Positivkontrolle der PMA-Behandlung

Eine Positivkontrolle dient zum Nachweis selektierter PMA-modifizierter DNA aus geschädigten Bakterien. Dazu wurden 500 mL Trinkwasser aus der Hausinstallation mit 500 mL 1:100 verdünnter CASO-Bouillon (Endkonz. 1:200) für 48 Stunden bei Raumtemperatur in einem 1,5 L Becherglas gerührt (300 rpm). Die kultivierten Trinkwasserbakterien wurden anschließend zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5403 6000 x g, 10 Minuten) und das Pellet anschließend im synthetischen TW resuspendiert. Anschließend wurden 1,5 mL der Bakteriensuspension (ca. 1×10^7 Bakterien/mL) für 10 Minuten bei 70 °C mit Hitze behandelt. Sowohl die hitzebehandelten als auch eine unbehandelte Bakteriensuspension wurden ebenfalls mit PMA behandelt (2.7.6). Zuletzt wurde die DNA aus den Bakteriensuspensionen isoliert (2.8.2) und für

molekularbiologische Analysen wie RT-PCR (2.10.3) und DGGE (2.10.1) eingesetzt.

2.8 Präparative Methoden

2.8.1 Isolierung bakterieller Biofilme von Oberflächen

Biofilme von den Aufwuchsf lächen wurden durch Abschaben mittels eines Teflonschabers entnommen und anschließend mit 1 mL des synthetischen TW abgespült. Dieser Vorgang wurde mehrfach Mal wiederholt (Endvolumen 5 mL). Für weitere Untersuchungen wurden die Bakterien durch eine \varnothing 0,2 mm Kanüle mittels einer Spritze disaggregiert.

2.8.2 Isolierung von DNA aus Bakterien

Die DNA-Extraktion aus Bakterien wurde mit dem QiampDNA-Mini-Kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden die Proben gemäß Protokoll D des Handbuches präpariert. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension (10 min, 5000 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 180 μ l Lysepuffer resuspendiert und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l Proteinase K und 200 μ l Buffer AL hinzugefügt und auf einem Vortex (Heidolph) gemischt. Die Inkubation erfolgt bei 56 °C für 30 Minuten. Die DNA wurde gewaschen und anschließend in 25 bzw. 50 μ l PCR-Wasser (Licrosolv, Merck) aufgenommen.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 TP-Bestimmung mittels Hy-Lite[®] Pens

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes von abgeschabten Biofilmproben, wurde das Hy-Lite[®] Pens Kit (Merck, 1.30102) verwendet. Der Nachweis von ATP basiert auf der spezifischen Reaktion eines Luciferin/Luciferase-Gemisches. Dabei wird das Luciferin durch die Luciferase unter ATP-Verbrauch in einen elektronisch angeregten Zustand z.B. das Oxyluciferin überführt. Die dabei frei werdende Energie in Form von Photonen (530 - 630 nm) wird als Lichtsignal im Hy-Lite[®]-Luminometer (Art. 1.30100.) gemessen und die Lichtintensität in RLU (= relative light units) angezeigt. Die Nachweisgrenze dieses Kits liegt bei $1,4 \times 10^{-14}$ Mol ATP. Als ATP-Standard bzw. Positivkontrolle der Funktionalität der Pens wurde für jede Messreihe ein HY-LITE[®] ATP-Standard (1 ng/mL)

gemessen. Der Messwert des ATP-Standards liegt zwischen 2500 und 5000 RLU. Auf der Grundlage des ATP-Standards wurde anschließend der ATP-Gehalt der Proben berechnet.

Für jede Probe wurde ein neuer Pen eingesetzt. Dieser wurde in die flüssige Probe eingetaucht und die anschließend Messung gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Biofilmprouben wurden vor der Messung im synthetischen TW suspendiert (2.8.1) und das synthetische TW ohne Bakterien als Blindwert gemessen.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 PCR zur Amplifikation von 16S rDNA-Fragmente für DGGE

Zur Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente isolierter DNA aus polarisierten bzw. nicht polarisierten Trinkwasserbiofilmen wurden die Primer 27F und 517R (Kilb et al. 1998, Muyzer et al. 1993) für die vorangehende PCR der PCR-DGGE verwendet, wobei der Forward-Primer mit einer GC-Clamp (Emtiazi et al. 2004) modifiziert war (Tabelle 7).

Tabelle 7: Oligonukleotide für PCR-DGGE

Bezeichnung	Organismen	Sequenz
GC 27 F	Eubakterien	(GC-Clamp) AGAGTTTGATCCTGGATCAG
517 R	Eubakterien	ATTACCGCGGCTGCTGG
GC-Clamp	Eubakterien	5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCG CCC CCG CCC C-3'

Der Reaktionsansatz pro Probe besteht aus den in Tabelle 8 aufgelisteten Komponenten. Für mehrere Proben wurde ein Mastermix aus allen Komponenten, DNA-Probe ausgenommen, angefertigt und ein entsprechender Aliquot von 48 µl auf die DNA-Proben pipettiert.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für PCR (DGGE)

Komponente	Endkonz.	Eingesetztes Volumen
5 U Stock HotStar Taq-DNA Polymerase (Qiagen)	0,025 U	0,25 µl
40 pmol Stock Primer I	20 pmol	0,5 µl
40 pmol Stock Primer I	20 pmol	0,5 µl
10 x PCR-Puffer (Quiagen)	1x	5,0 µl
200 µM Stock dNTP-Mix (Pharmacia)	4 µM	1,0 µl
Template DNA (Probe)	1-2 µl	2,0 µl
PCR-Wasser		40,75 µl
Gesamtvolumen		50,00 µl

Nach Ansatz der PCR wurde der Mix kurz gemischt und anschließend abzentrifugiert. Die PCR-Reaktion erfolgte im Cyclor (GENAMP PCR System 9700, applied Biosystems) mit dem in Tabelle 9 beschriebenen PCR-Programm. Die Schritte 2 bis 4 wurden in dieser Reihenfolge in 30 Zyklen wiederholt.

Tabelle 9: PCR-Programm für DGGE

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	15 min.
2	94°C	30 sek.
3	55°C	30 sek.
4	72°C	1 min.
5	72°C	7 min

2.10.1.1 Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Überprüfung von PCR-Produkten durchgeführt und auf dessen Basis wurde die einzusetzende Probenmenge für die DGGE bestimmt. Auf der Grundlage der negativ geladenen DNA-Moleküle wird die DNA in einem elektrischen Feld von der Anode (positiv geladener Pol) angezogen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist von der Größe (Basenpaare Bp) abhängig. Folglich wandern kleinere Moleküle mit wenigen hundert Bp schneller als größere DNA-Fragmente (kb).

- Präparation des Gels

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1 %-igen Agarosegel (0,4 g Agarose auf 40 mL 1x TAE-Puffer). Dazu wurden 0,4 g Agarose in 40 mL 1x TAE-Puffer (4 M Tris, 1M Na-Acetat, 0,1 M EDTA, pH 8,0) eingewogen und

für 3 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle aufgeköcht und gelöst. Um die DNA-Fragmente zu markieren wurden der auf 55 °C abgekühlte flüssige Agarose 4 µl einer 1 %-igen Ethidiumbromidstammlösung zugegeben. Die Agarose wurde in einen abgeklebten Schlitten gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Probenaschen eingehangen. Nach 20 Minuten wurde das ausgehärtete Agarosegel in eine mit 1x-TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Renner) gelegt. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Ladepuffer ("blauer Gelauftragspuffer": EDTA 50 mM pH 8,0, 20 % Ficoll, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen-Cyanol = 0,4 g Ficoll, 5 mg Bromphenolblau, 5mg Xylen-Cyanol+ 2 mL EDTA) in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Zugabe des Ladepuffers gewährleistet, dass die Probe nicht hinaus diffundiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Längenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe mit aufgetragen, um nach erfolgter Elektrophorese die Größe der DNA-Proben zu ermitteln. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 – 100 V für 30 Minuten bis 2 Stunden. Anschließend wurde das Gel mittels des Lumi-Imager (Roche) photographiert.

2.10.2 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese DGGE

Die Auftrennung vervielfältigter 16S rDNA-Fragmente in einer denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) wurde als eine qualitative molekularbiologische Methode zur Darstellung der Diversität einer bakteriellen Mischpopulation verwendet. Mit den gewählten Primern (Tabelle 7) und Reaktionsbedingungen der PCR (Tabelle 9) wurden 16S rDNA Fragmente von Eubakterien aus einer Trinkwasserpopulation selektiv erfasst und vervielfältigt. Daraus resultieren gleichlange 16s rDNA-Fragmente, dessen Basenzusammensetzung allerdings artspezifisch sich unterscheiden. Die Auftrennung der DGGE basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten der gleichlangen 16S rDNA-Fragmente bedingt durch die variable Basensequenz. Das Schmelzen der Fragmente in einer DGGE wird durch ein chemisches Denaturierungsmittel, bestehend aus Harnstoff und Formamid, verursacht. Das Denaturierungsmittel wurde als Gradient (von 40 % auf 70% Harnstoff) parallel zum elektrischen Feld (Richtung der Auftrennung) der Elektrophorese ausgerichtet. Nach erfolgter Auftrennung wurden die DNA-Fragmente mit Sybr[®] Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen) markiert. Im Lumi-Imager (Roche) wurde das resultierende Bandenmuster photographiert.

2.10.2.1 Lösungen für DGGE

- 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)

18,612 g EDTA einwiegen und auf 100 mL deionisiertem Wasser auffüllen

- 1x TAE-Laufpuffer

140 mL des 50x TAE-Puffer (242,0 g Tris-Base, 57,1 mL Essigsäure, 100 mL 0,5 M EDTA auf 1 L mit destilliertem Wasser auffüllen) mit 6,86 L destilliertem Wasser mischen.

- 10 % APS-Lösung

0,1 g Ammoniumpersulfat (APS) werden in 1 mL deionisiertem Wasser gelöst

- Färbelösung

0,05 g Bromphenol Blau und 0,05 g Xylene Cyanole werden in 10 mL 1x TAE-Puffer gelöst

- Denaturierungslösung

Tabelle 10: Zusammensetzung der Denaturierungslösungen

Komponente	0 %-ig	40 % LDL	70 % HDL
40 % Acrylamid/Bis 37,5:1	18,8 mL	18,8 mL	18,8 mL
50x TAE-Puffer	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Formamid		16,0 mL	28,0 mL
Urea (Harnstoff)		16,8 g	29,4 g
Deionisiertes Wasser	Auf 100 mL	Auf 100 mL	Auf 100 mL

- Sybr Gold-Färbelösung

300 mL des 1x TAE-Puffer mit 30 µl Sybr Gold (Invitrogen) mischen.

2.10.2.2 Herstellung des DGGE-Gels

Zuerst wurden die Glasplatten mit Isopropanol gereinigt. Anschließend wurden 0,2 mm Spacer zwischen die Glasplatten an den Kanten gelegt und mit Hilfe einer Schablone ausgerichtet. Dabei ist zu beachten, dass die Unterkanten plan aufliegen. Anschließend wurden die Glasplatten im Gießstand fixiert und die Kammhöhe mit einem Filzstift markiert.

Je 20 mL HDL und LDL (Tabelle 10) wurden in zwei Bechergläser blasenfrei pipettiert. Die HDL-Lösung wurde mit 300 µl Färbelösung versetzt. Je 180 µl einer 10 %-igen APS-Lösung (Ammonium persulfate ACS grade, Amresco) und 18 µl TEMED (ultra pure grade, Amresco) wurden zu den HDL- und LDL-Lösungen zugeben und blasenfrei gemischt.

Anschließend wurden schnell jeweils 15 mL der HDL- bzw. LDL-Lösung in eine Spritze aufgenommen (luftblasenfrei) und beide Spritzen an dem Gradient Former befestigt. Die Gießschläuche wurden an beiden Spritzen befestigt. Durch gleichmäßiges Drehen des Rades wurde das Gel bis zur markierten Füllhöhe gegossen. Eventuelle Luftblasen wurden durch Klopfen an die Glasplatten ausgetrieben. Das überschüssige Acrylamid wurde in ein Becherglas gegossen und die Spritzen mit Wasser gereinigt. Nach dem Gießen wurden 300 µl Isopropanol zur Verhinderung der Austrocknung auf das Gel pipettiert und mindestens 30 Minuten auspolymerisiert.

Anschließend wurde das Isopropanol dekantiert und die Gelkante mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend getrocknet. Zuletzt wurde das Sammelgel (5 mL der 0%-igen Denaturierungslösung mit 45 µl APS (10 %) und 4,5 µl TEMED) auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach 4 Stunden Wartezeit wurde der Kamm entnommen und das Gel beladen.

2.10.2.3 Auftragen der Proben auf das DGGE-Gel

Zunächst wurde der 1 x TAE-Puffer auf 56 °C im Elektrophorese-Tank vorgewärmt. Anschließend wurden die Gele in die DGGE-Kammer eingehangen. Die Probenaschen wurden mit TAE-Puffer gespült und anschließend mit einer Hamiltonspritze (maximal 25 µl) beladen. Das beladene Gel wurde in eine Isolierbox gestellt und die Elektrophorese für 16 Stunden bei 70 Volt und konstanten 56 °C gestartet.

2.10.2.4 Detektion der Banden im DGGE-Gel

Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten vorsichtig von dem Gel gelöst. Nach Abtrennung des Sammelgels wurde das Trenngel in eine Färbewanne auf einem Schwenktisch überführt. Dort wurde es für 10 Minuten in der Sybr-Gold-Färbelösung unter Lichtausschluss gefärbt. Anschließend wurde das Gel auf eine Klarsichtfolie überführt und damit auf eine Acrylplatte gelegt. Die Photodokumentation erfolgte bei 520 nm im Lumi-Imager (Roche).

2.10.3 Quantitative PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei sie die Quantifikation der amplifizierten DNA gestattet. Durch eine Fluoreszenzmarkierung der DNA während der Amplifikation, wird nach jedem

Zyklus ein Fluoreszenzsignal online (real-time) angezeigt. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Anzahl der DNA-Amplifikate zu. Die Kinetik einer PCR wird in drei Phasen unterteilt. Nach einer kurzen Initialphase, steigt die Vervielfältigung der DNA exponentiell an und endet nach Verbrauch der Nukleotide in einer Plateau-Phase. Die Quantifizierung wird anhand der exponentiellen Phase durchgeführt, da nur in dieser Phase die optimalen Bedingungen für die Amplifikation herrschen. Als Fluoreszenzmarker wird Sybr® Green I (Invitrogen) eingesetzt. Es bindet unspezifisch sowohl an RNA als auch an doppelsträngige DNA. Nach Bindung an die DNA emittiert Sybr Green I ein starkes Fluoreszenzsignal bei 520 nm. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der Verlauf der PCR-Kinetik am PC online verfolgt werden kann und ohne eine Agarosegelelektrophorese auskommt.

2.10.3.1 Durchführung der RT-PCR

Für die RT-PCR wurde isolierte DNA aus Trinkwasserbakterien eingesetzt. Zur Amplifikation der DNA wurden zwei Eubakterien Primer (Kilb et al. 1998, Muyzer et al. 1993), 27F (Forward) und 517 (Reverse) für die RT-PCR eingesetzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Oligonukleotide für RT-PCR

Bezeichnung	Organismen	Sequenz
Primer 27 F	Eubakterien	AGAGTTTGATCCTGGATCAG
Primer 517 R	Eubakterien	ATTACCGCGGCTGCTGG

Der PCR-Reaktionsansatz erfolgte in 96er Mikrotiter-Platten (optical reaction plate, applied Biosystems). Die Komponenten des Reaktionsansatzes sind in Tabelle 12 aufgelistet. Der Universal Master Mix Puffer (UUM: dNTPs, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG (uracil-*N*-glycosidase), MgCl₂, Pufferkomponenten, SYBR Green I, ROX als Referenz; Applied Biosystems) enthält alle erforderlichen Komponenten für eine RT-PCR. Für eine größere Probenanzahl wurde ein Mastermix aus allen Komponenten ohne DNA-Proben angesetzt und anschließend auf die DNA-Proben verteilt. Die DNA-Probe wurde in einer 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung jeweils als Doppelbestimmung eingesetzt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die RT-PCR

Komponente	Endkonz.	Eingesetztes Volumen
▪ 5 µmol Stock (5 µmol/L) 27F	300 nM	1,5 µl
▪ 5 µmol Stock (5 µmol/L) 517R	300 nM	1,5 µl
▪ 2 x UMM Puffer	1x	12,5 µl
▪ Template DNA (Probe)		5,0 µl
▪ PCR-Wasser		4,5 µl
Gesamtvolumen		25,00 µl

Der Ansatz wurde unter sterilen Bedingungen in PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf) angesetzt. Nach kurzem Mischen wurde der Reaktionsansatz kurz abzentrifugiert und in den Real-Time-PCR System ABI 7300 (applied Biosystems) gestellt. Im Programm „Sequence Detection Software“ V 1.4 wurde das in Tabelle 13 beschriebene PCR-Programm eingestellt. Die Schritte 3 bis 5 wurden in dieser Reihenfolge in 40 Zyklen wiederholt.

Tabelle 13: PCR-Programm der RT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1	50 °C	2 min.
2	95 °C	15 min.
3	95°C	15 sek.
4	54°C	30 sek.
5	72°C	1 min.

2.10.3.2 Auswertung der RT-PCR

Anhand der exponentiellen Phase der PCR-Kinetik berechnet die software ct-Werte (ct = threshold cycle = Schwellenwert). Der ct-Wert ist der Punkt an dem die Fluoreszenz den Schwellenwert (Übergang von Initial- zur exponentiellen Phase) erreicht. Aus den Mehrfachansätzen einer geeigneten Verdünnung wurden Mittelwerte und deren Standardabweichung als Kontrolle der Reproduzierbarkeit ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Auswertung angewandt. Hierbei wurden ct-Werte von behandelten mit den ct-Werten der nicht behandelten Proben verglichen. Unterschiede wurden anhand von Differenzen zweier ct-Werte (Δ ct-Werte) beschrieben. Lag der Δ ct-Wert innerhalb der Streuung, war kein Unterschied in der amplifizierbaren DNA vor. Lag der Δ ct-Wert außerhalb der Streuung, deutete dies auf einen Unterschied in der amplifizierbaren DNA in der RT-PCR hin. Ein Δ ct-Wert von 3,33 entspricht einer Log-Stufe.

2.10.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Technik (Amann et al. 1995, 1990) wurde zum 16S RNA-Gehalt abhängigen Nachweis von Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter 16S RNA Sonden eingesetzt.

2.10.4.1 Lösungen für FISH

Tabelle 14: Zusammensetzung PBS-Puffer pH 7,2 für FISH

Komponente	Einwaage pro 1 L
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
NaHPO ₄ x 2 H ₂ O	1,81 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Rotipuran-Wasser (Roth)	Auf 1000 mL auffüllen

Tabelle 15: Zusammensetzung Hybridisierungspuffer für FISH

Komponente	Volumen
Rotipuran-Wasser	600 µl
5 M NaCl	180 µl
1 M Tris, pH 8	20 µl
10 % SDS	1 µl
Formamid	200 µl

Tabelle 16: Sonden (eurofins MWG GmbH) für FISH (Amann 1990)

Bezeichnung	Organismen	Sequenz	Markierung
EUB338, 16s, 338-355	Eubakterien	GCTGCCTCCCGTAGG	CY3
NonEUB338	Negativkontrolle	ACTCCTACGGGAGGCAGC	CY3

- EUB338-Sondenstammlösung (eurofins MWG GmbH)
14 pmol/µl, T_m 56 °C
- NONEUB-Sondenstammlösung (eurofins MWG GmbH)
10 pmol/µl, T_m 60,5 °C
- Sondenlösung EUB338/NONEUB338 (5 ng/µl)

Die Sondenstammlösungen (1 µl) wurden mit 9 µl des Hybridisierungspuffers (Tabelle 15) verdünnt.

Tabelle 17: Zusammensetzung Waschpuffer für FISH

Komponente	Volumen
5 M NaCl	2250 µl
1 M Tris, pH 8	1000 µl
10 % SDS	50 µl
EDTA	1000 µl
Rotipuran-Wasser	auf 50 mL auffüllen

2.10.4.2 Fixierung der Proben für FISH

Zunächst wurden die Proben mittels Zentrifugation (6000 x g bei 4 °C für 10 Minuten) aufkonzentriert. Zur Fixierung wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (6000 x g, 4 °C für 10 Minuten) wurde das Pellet in 2 mL PBS-Puffer (Tabelle 14) resuspendiert und erneut zentrifugiert (6000 x g 4 °C für 10 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Ethanol/PBS 1:1 aufgenommen. In dieser Form kann die Probe für 6 Monaten bei – 20 °C gelagert werden.

2.10.4.3 Hybridisierung der Proben für FISH

Für die Hybridisierung wurden 10 µl der fixierten Bakteriensuspension in die Wells des 8-well-Objektträgers (Menzelgläser GmbH) pipettiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für jeweils 3 Minuten in einer Ethanol-Reihe (50 %, 80 % und 96 % EtOH) inkubiert und erneut getrocknet. Auf die trockene Probe wurden 10 µl der Sondenlösung (5 ng/µl) gegeben und anschließend in einer feuchten Kammer bei 46 °C für 90 Minuten inkubiert.

Danach wurden die Objektträger sofort in den Waschpuffer (Tabelle 17) überführt und für 15 Minuten bei 46°C inkubiert. Der Waschvorgang wurde durch einen Waschschrift im auf Eis gekühlten deionisiertem Wasser abgeschlossen.

Nach Trocknung der Objektträger wurden diese mit 10 µl DAPI (1 µg/mL) überschichtet und für 20 Minuten im Dunkeln gefärbt. Für die mikroskopische Auswertung wurden die Objektträger mit Citiflour AF2 (Science Services) überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt.

2.10.4.4 Mikroskopische Auswertung der FISH-Proben

Die mikroskopische Auswertung erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop (2.6.4.1) bei 1000 x facher Vergrößerung mit dem Öl-Objektiv. Dabei wurden mindestens 10 Zählfenster ausgezählt. Die mit der Gensonde ausreichend markierten Bakterien (Cy3 Anregung 490 – 500 nm, Emission 525 – 550 nm) wiesen eine rote Fluoreszenz auf. Die Gesamtzellzahlbestimmung erfolgte mit der DAPI-Färbung der Bakterien.

2.11 Physikalisch elektrochemische Methoden

2.11.1 Zetapotentialmessung von Bakterien

Das Zetapotential wird über die elektrophoretische Mobilität der Bakterien im elektrischen Feld unter Anwendung des Zetazisers 3000 HS (Fa. Malvern Instruments) bestimmt. Das Zetapotential wurde aus der ermittelten elektrophoretischen Mobilität mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnet, in der neben der elektrischen Mobilität die Dielektrizität und Viskosität des Mediums eingehen.

$$\mu_E = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

ζ = Zetapotential (mV)

μ_E = elektrophoretische Mobilität ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

ε = Dielektrizitätskonstante in der elektrischen Doppelschicht

η = Viskosität (mPa s)

Bakterien im synthetischen Trinkwasser werden in die Küvette des Messsystems gefüllt. Das Anlegen eines elektrischen Feldes an der Messzelle bewirkt eine Bewegung der zu untersuchenden Bakterien aufgrund ihrer Oberflächenladung. Dabei passieren die Bakterien einen Laserstrahl und streuen das Licht. Der Dopplereffekt führt zu einer Frequenzverschiebung des Lichtes, die abhängig von der Mobilität (Geschwindigkeit) ist.

Als Referenzelektrolyt diente das synthetische Trinkwasser. Der gewünschte pH-Bereich, in dem das Oberflächenpotential der Bakterien gemessen werden sollte, wurde in der Software (Malvern Software Zetasizer 3000) definiert. Die pH-Titration erfolgte mittels 0,1 M KOH- und 0,1 M HCl-Lösung. Anschließend wurde das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgenommen.

2.11.2 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von Lösungen

Zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit einer wässrigen Lösung wurde die Messzelle des Messgerätes (WTW LF539, TetraCon®96) in die zu messende Lösung eingetaucht. Die Messtechnik beruht auf einer elektrochemischen Widerstandsmessung durch Anlegen einer Wechselspannung. Über den Kehrwert des spezifischen Widerstandes wird die elektrische Leitfähigkeit der Lösung berechnet und am Gerät in Abhängigkeit der Messtemperatur (20 °C) angezeigt.

2.11.3 Beschichtung von Membranen mit Polypyrrol

Die leitfähige Schicht von Polypyrrol auf Membranen wurde durch chemische Oxidation des Monomers Pyrrol (Aldrich) erzielt. Dazu wurde eine Membran (Polyvinylidenfluorid PVDF/Durapor®, Polyethersulfon PES/Express PLUS®) verwendet. Die Beschichtung erfolgte in einer Zwei-Kammer-Polymerisationszelle, wobei die Membran die Kammern trennte (Abbildung 16). Eine Kammer wurde mit der 0,1 M Pyrrol-Monomer-Lösung blasenfrei gefüllt. In die zweite Kammer wurde eine 0,1 M Lösung des Oxidationsmittels Natriumperoxodisulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ebenfalls blasenfrei hinzugefügt. Sowohl der Monomer-Lösung als auch dem Oxidationsmittel wurden Na_2SO_4 (0,1 M) beigemischt. Alle Lösungen wurden in partikelfreiem Wasser (PURELAB Ultra ELGA) angesetzt.

Durch Diffusion des Monomers durch die Membran wurde Pyrrol auf der anderen Seite oxidiert und als Polymer (schwarz) auf der Membran abgeschieden. Dabei wurden durch Reduktion Elektrolytionen als Gegenionen (SO_4^{2-}) in das Polymer eingebaut. Die Polymerisation erfolgte bei 20 °C auf einem Laborschüttler (160 rpm) für 15 min. Die verwendeten Membranen haben einen Gesamtdurchmesser von 9 cm. Bedingt durch die Geometrie der Polymerisationszelle wurde eine Fläche von \varnothing 7 cm der Membran beschichtet (Abbildung 16). Aus dieser wurden Aufwuchsflächen von \varnothing 2,5 cm ausgestanzt (2.4.2).

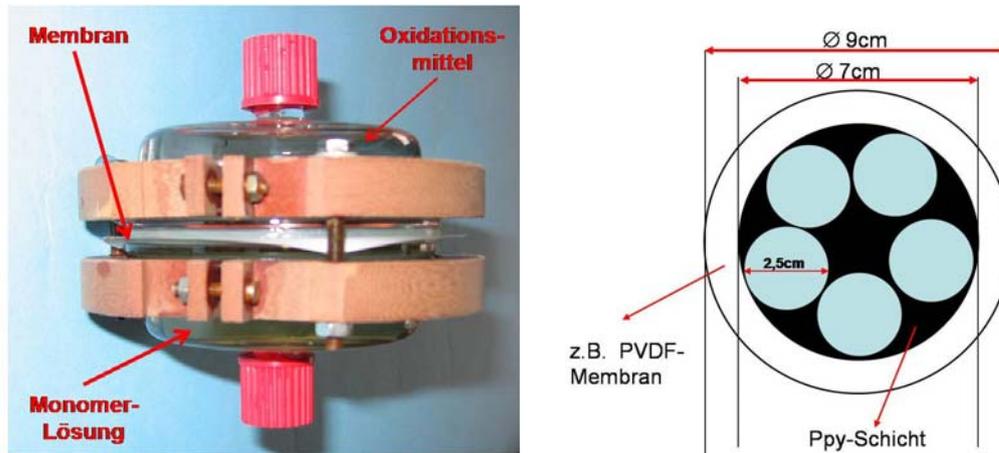


Abbildung 16: Links Polymerisationszelle zur chemischen Polymerisation von Pyrrol auf einer Membran. Rechts Schnittmuster einer Polypyrrol-beschichteten Membran.

2.11.4 Elektrische Polarisierung der Aufwuchsfläche

Eine elektrische Polarisierung der Aufwuchsflächen wurde mittels der Drei-Elektroden-Anordnung (2.6.2) durchgeführt. Diese wurde über verschiedene Programme (Polarisationsroutine) mit der Software EcmWin des Multi-Potentiostaten-Systems (2.6.1) gesteuert. Eine Polarisationsroutine definiert sich durch die Polarisationsdauer (Stunden) und durch eine Potential bzw. eine Stromdichte. In der Potentiostaten-spezifischen Software EcmWin wurde der Verlauf der Polarisierung entweder als Potentialverschiebung oder als Schaltung der Stromdichte vorgegeben. Zum Beispiel wurde eine konstante Polarisierung mit -600 mV (potentiostatisch) oder eine Stromdichte von $0,04$ mA/cm² (galvanostatisch) mit einer Dauer von 5 Stunden (Polarisationsdauer) vorprogrammiert. Im Vergleich dazu wurden auch gepulste Polarisationsroutinen definiert. Wurde z. B. ein gepulstes Potential von -600 mV / $+600$ mV mit einer Pulsdauer von 1 Minute für eine Polarisationsdauer von 5 Stunden vorprogrammiert, so wurde jeweils ein Puls von -600 mV für eine Minute und ein Puls von $+600$ mV für eine Minute polarisiert. Diese Pulsung des Potentials auf der Arbeitselektrode wurde über eine Dauer von 5 Stunden im ständigen Wechsel polarisiert. Alle Potentialverschiebungen erfolgten stets gegen die Ag/AgCl-Elektrode (Abbildung 17).

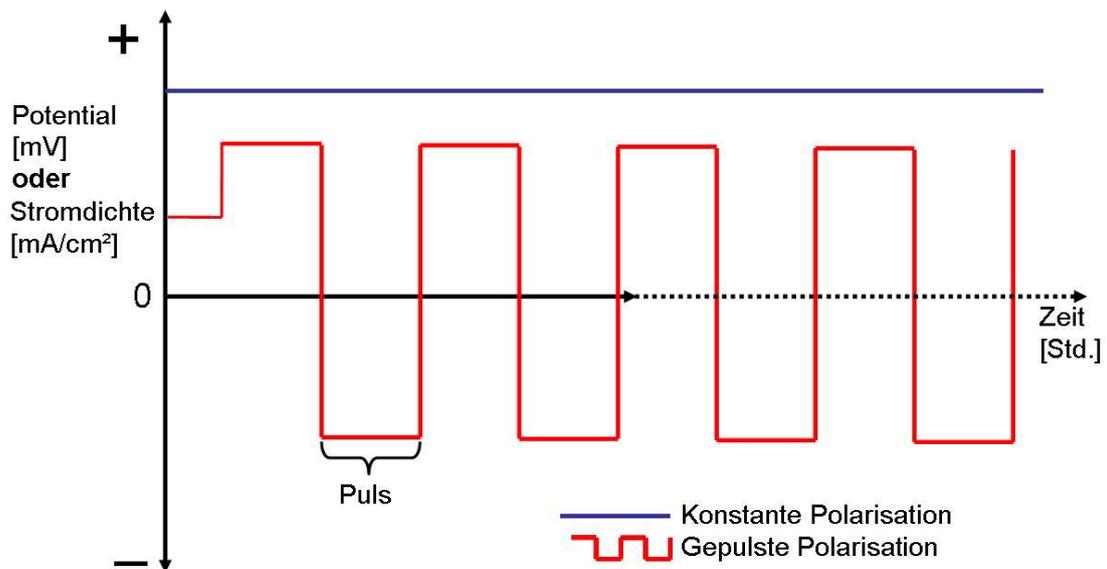


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer konstanten (blaue Linie) und gepulsten (rote Linie) Polarisation

Die Wirkung elektrischer Polarisation auf die Bakterien wurde anschließend mikrobiologisch ausgewertet. Als Kontrolle wurden Aufwuchsflächen mit ihrem Testsystem-spezifischen Oberflächenpotential U_R (Ruhepotential) ohne Polarisation ebenfalls mikrobiologisch ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschreibt Effekte verschiedener Oberflächenladungen einer Aufwuchsfläche auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung. Die Oberflächenladung wurde durch elektrische Polarisierung manipuliert. Anschließend wurde eine quantitative Auswertung der Adhäsion von *S. maltophilia* bzw. Trinkwasserbakterien und dessen Biofilmwachstums durchgeführt. Darüber hinaus wurde der physiologische Zustand der Bakterien nach elektrischer Polarisierung untersucht. Die Voraussetzung für diese Untersuchungen war ein elektrochemisch-mikrobiologisches Testsystem.

3.1 Entwicklung eines elektrochemisch-mikrobiologischen Testsystems

Um den Einfluss verschiedener Oberflächenladungen einer Aufwuchsfläche auf das Adhäsions- und Biofilmbildungsverhalten der Bakterien untersuchen zu können, war ein elektrochemisch-mikrobiologisches Testsystem zur Schaltung der Oberflächenladung erforderlich. Als Voraussetzungen waren a) elektrisch leitende Aufwuchsflächen b) elektrochemische Zellen c) ein Elektrolyt d) geeignete Polarisationsverfahren erforderlich. Dieses System wurde auf reproduzierbare Bedingungen hin entwickelt und optimiert. Die Entwicklung und Optimierung des Testsystems erfolgte in Kooperation mit der DECHEMA e.V..

3.1.1 Elektrisch leitende Aufwuchsflächen

Als elektrisch leitende Aufwuchsflächen wurden ITO und Polypyrrol ausgewählt. Im Vergleich zu Polypyrrol hat ITO eine höhere Leitfähigkeit. Die Belastbarkeit der Indiumzinnoxidschicht durch Polarisierung wurde von der DECHEMA e.V. untersucht. Da ITO ein Mischoxid ist, kann es durch andauernde reduktive Polarisierung irreversibel geschädigt werden. In eigenen Versuchen wurde z.B. nach einer konstanten Polarisierung von $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für 3 Stunden eine Schädigung der Indiumzinnoxidschicht beobachtet (Abbildung 18). Während der Polarisierung fiel auf, dass das Potential von ca. + 1000 mV auf über + 3000 mV anstieg.



Abbildung 18: ITO nach Polarisation mit $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für 1 Stunde im synth. TW, zentral eine metallische Abscheidung durch Reduktion des Indiumzinnoxids.

Geringere Stromdichten sowie Potentiale von + 800 mV konnten über einen längeren Zeitraum (mindestens 20 Stunden) ohne Beeinträchtigung der ITO-Schicht polarisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ITO mit geringen konstanten bzw. gepulsten Stromdichten von max. +/- $80 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und Potentialen von max. +/- 800 mV polarisiert. Daher waren ITO-Coupons mehrfach einsetzbar.

Im Rahmen des AiF-Projektes 174 Z/N2 wurde eine elektrisch leitende Polymerbeschichtung auf Membranen am KWI, DECHEMA e.V., entwickelt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Polypyrrol-Aufwuchsflächen wurden durch chemische Polymerisation erzielt (2.11.3). Die Oxidation des Monomers Pyrrol im Zwei-Kammersystem führte nicht nur zur Abscheidung des Polypyrrols auf der Membranoberfläche, sondern auch zur Polymerisation im Gewebe der Membran (Abbildung 19). Dadurch wurde eine stabile elektrisch leitende Polypyrrolschicht erreicht.

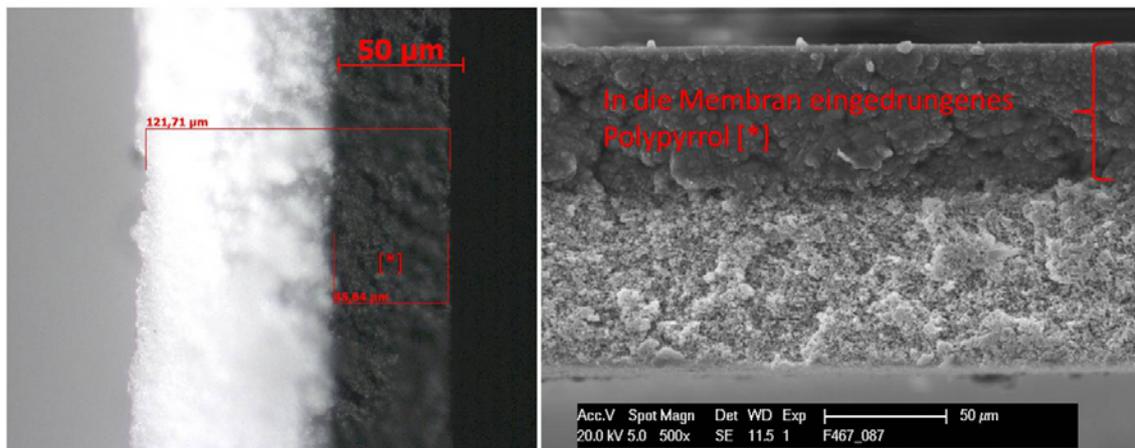


Abbildung 19: Querschnitt einer mit Polypyrrol beschichteten Membran. Lichtmikroskopisch und mittels des REM (Rasterelektronenmikroskop) ist das Polypyrrol als dunkle Verfärbung sichtbar.

Die elektrische Leitfähigkeit der Polypyrrolschicht auf den Membranen wurde mittels zyklischer Polarisation (Cyclovoltammetrie) von der Dechema e.V. durchgeführt (Abbildung 20). Dabei wurde das Potential schrittweise variiert und der korrespondierende Strom gemessen. Der rote Kurvenverlauf zeigt, dass in Abhängigkeit des auf der Membran polarisierten Potentials kein Strom gemessen werden konnte und die unbeschichtete Membran folglich nicht elektrisch leitfähig war. Nach Beschichtung mit Polypyrrol (blaue Linie) konnte in Abhängigkeit des polarisierten Potentials ein Strom gemessen werden. Dies weist eine deutliche elektrische Leitfähigkeit der mit Polypyrrol beschichteten Membran nach.

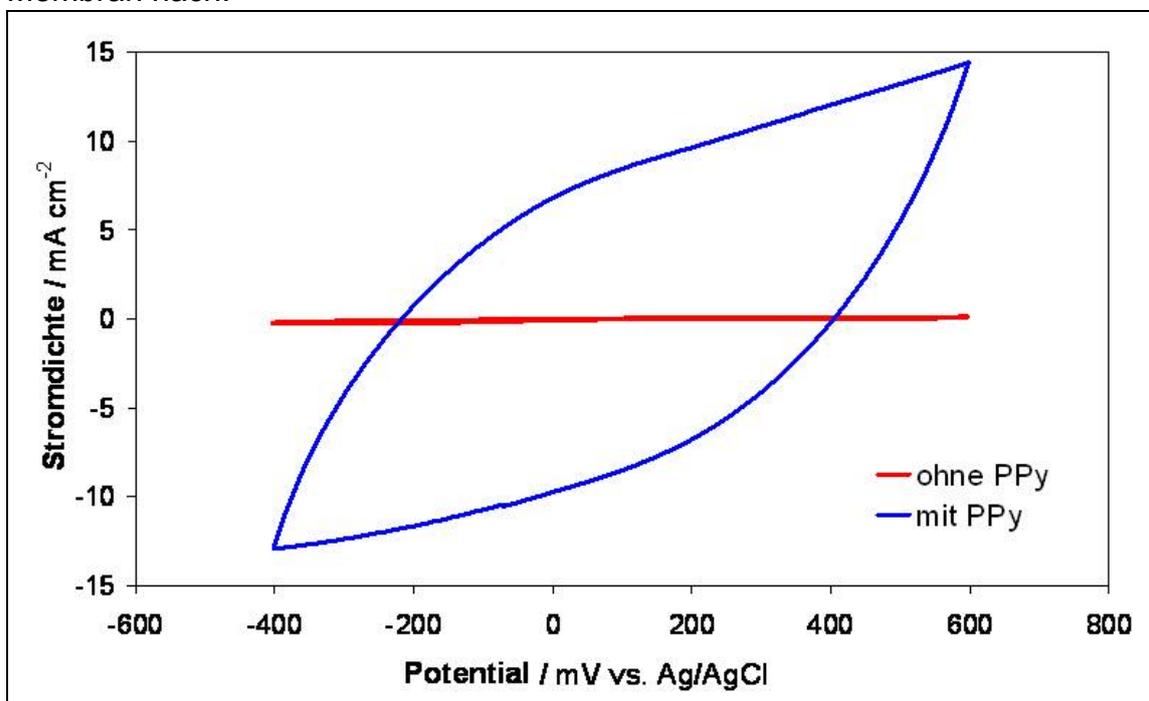


Abbildung 20: Cyclovoltammetrie einer nicht beschichteten Membran (rot) und einer mit Polypyrrol beschichteten Membran (blau). Datenquelle: DECHEMA e.V.

3.1.2 Aufbau der elektrochemischen Zelle

Für die Drei-Elektroden-Anordnung wurde zu Anfang ein Becherglas (80 mL) verwendet. In diesem wurden die Elektroden eingehängt. Polypyrrol beschichtete Membranen wurden mit einer Krokodilklemme kontaktiert. Um eine gleiche Probengröße und reproduzierbare Ergebnisse während der Polarisation der Aufwuchsflächen sicherzustellen, wurden für weitere Versuche Flansczellen eingesetzt. Die Kontaktierung der Membranen in den Flanschen

wurde durch einen Platinring mit abstehendem Platindraht gewährleistet, der durch eine Öse der Teflonkappe nach außen reichte (Abbildung 21).

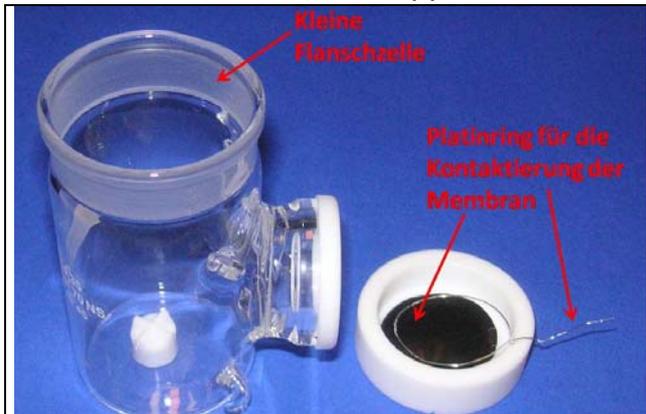


Abbildung 21: Kontaktierung der Membran in einem Flansch mittels eines Platindrahtes.

Durch den definierten Durchmesser der Flansche war die Probengröße bekannt und bei allen Aufwuchsflächen gleich. Mit den Flanschzellen konnten Parallelansätze als solche auch ausgewertet werden.

Für eine Identifizierung und korrekte Auswertung von Effekten elektrischer Polarisierung auf Bakterien war eine entsprechende Kontrolle erforderlich. Diese durfte sich nur in der fehlenden Polarisierung unterscheiden. Daher wurden die einfachen Flanschzellen zu Doppelflanschzellen mit zwei sich gegenüber befindlichen Flanschen umfunktioniert (Abbildung 15). In einem Flansch wurde die Aufwuchsfläche über die Elektroden an das Multi-Potentiostaten-System angeschlossen und polarisiert. Der gegenüberliegende Flansch enthielt die gleiche Aufwuchsfläche, war in derselben Lösung (Elektrolyt, Bakterien) exponiert, wurde aber nicht polarisiert. Dieser Aufbau wurde für ein Batchsystem und ein Durchflusssystem angefertigt. Das Durchflusssystem wurde für Versuche mit erforderlicher Trinkwasser- und Nährlösungszufuhr konzipiert.

3.1.3 Synthetisches Trinkwasser (TW) als Elektrolyt

Für das Testsystem war ein Elektrolyt erforderlich, der sowohl elektrochemischen als auch biologischen Anforderungen gerecht wurde. Elektrochemisch musste der Elektrolyt ausreichend elektrisch leitfähig sein, um in einem elektrischen Feld zwischen der AE und GE einen Ladungstransport zu gewährleisten. Biologisch musste der Elektrolyt den Mikroorganismen eine Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten garantieren, aber kein Wachstum zulassen.

Das synthetische Trinkwasser (2.2.5) ist ein gering elektrisch leitfähiger Elektrolyt (550 - 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass der Elektrolyt einen hohen elektrischen Widerstand hat. Da der Strom proportional zur Spannung ist ($U = R \times I$, Ohm'sches Gesetz), konnten die AE nur mit geringen Stromdichten polarisiert werden, um beim entstehenden Potential nicht in den Bereich der Wasserzersetzung (pH 7 ca. 800 mV) zu gelangen. Da bei vielen Polarisationsroutinen mit einer Stromdichte (z.B. 40 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) das Potential Werte von + 2000 bzw. - 2000 mV erreichte, wurden hauptsächlich Polarisationsroutinen mit Vorgabe des Potentials durchgeführt.

Für die biologischen Anforderungen war die Ionenzusammensetzung des synthetischen Trinkwassers (2.2.5) ausschlaggebend. Da in den Elektrolyten ausreichend Ionen wie Natrium, Calcium, Magnesium, Chlorid und Hydrogencarbonat enthalten waren, wurde der Salzgehalt für den osmotischen Gradienten der Mikroorganismen eingehalten. Für den Praxisbezug wurden durch einen geringen Gehalt an Kohlenstoff (Pepton, Glukose) nährstoffarme Bedingungen, wie sie im realen Trinkwasser herrschen, imitiert. Aus diesen Gründen wurde das synthetische Trinkwasser als Elektrolyt verwendet.

3.1.4 Die Teststämme

Für eine quantitative Analyse von Effekten elektrischer Polarisation wurden Bakterien mit einem schnellen und hohen Biofilmbildungspotential ausgewählt. Im Rahmen eines Verbundprojektes „Entwicklung von biomimetischen Antifoulingkonzepten für Mikrosensorsysteme in der Gewässerüberwachung und Abwasserbehandlung“ waren Isolate aus Trink- und Oberflächenwasser in Mülheim/Ruhr bezüglich ihres Biofilmbildungspotentials und ihrer Oberflächeneigenschaften charakterisiert worden. Aufgrund des in dieser Arbeit beschriebenen hohen Biofilmbildungspotentials des Isolats *S. maltophilia* wurde dieser Stamm als Reinkultur eingesetzt. Weitere Arbeiten haben für *S. maltophilia* ebenfalls eine starke Biofilmbildung publiziert, und diesen Stamm in Trinkwassersystemen nachgewiesen (Silbaq et al. 2009, Simoes et al. 2007, Critchley 2003, Stoodley 1999). Damit wurde in der vorliegenden Arbeit ein Trinkwasser relevanter Stamm verwendet. Um zu gewährleisten, dass es sich um diesen Stamm handelt, wurde *S. maltophilia* mittels eines API 20 NE zu 99,99 % identifiziert.

Neben dem Biofilmbildungspotential war die Nettooberflächenladung der Teststämme ein weiteres Auswahlkriterium. Die Nettooberflächenladung wurde

als das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes des Mediums bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Zetapotential über die elektrophoretische Mobilität von *S. maltophilia* im synthetischen Trinkwasser über einen pH-Gradienten von 1,5 bis 11 bei 20 °C gemessen (Abbildung 22).

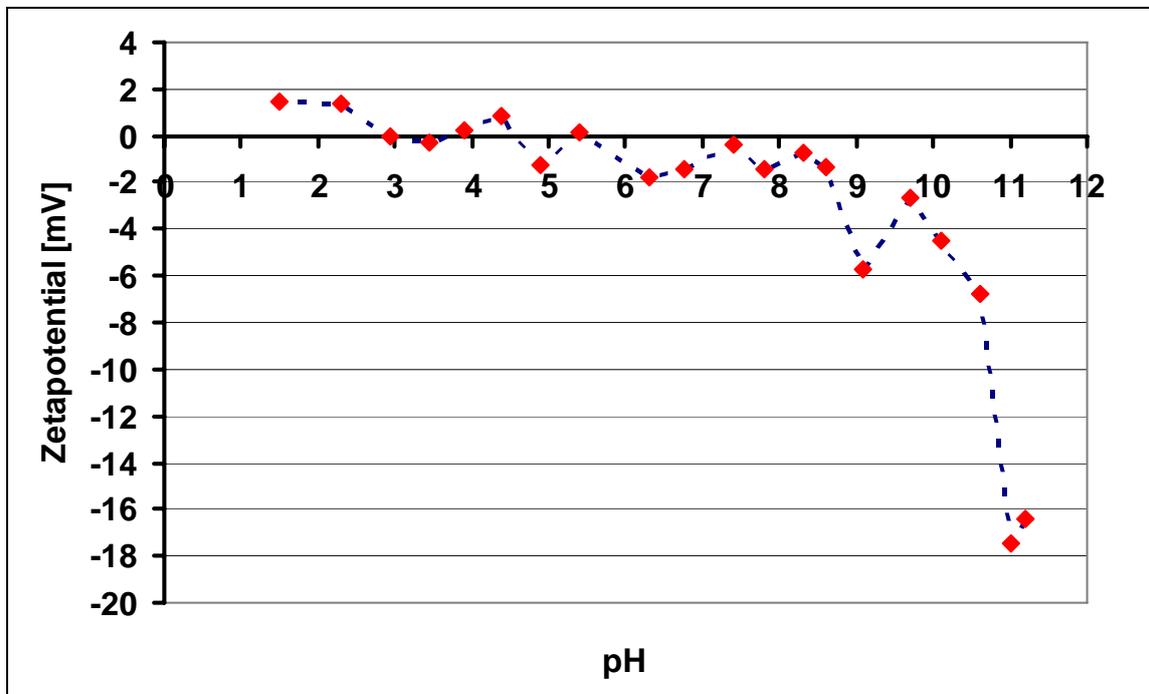


Abbildung 22: Zetapotential von *S. maltophilia* im synthetischen Trinkwasser bei 20°C

Die Messung der elektrophoretischen Mobilität von *S. maltophilia* in einem elektrischen Feld ergab ein Zetapotential von – 0,5 mV bei pH 7. Im pH-Bereich von 1,5 bis 9 variierte das Zetapotential zwischen + 1,5 mV und – 2,0 mV. Bei pH 10 fiel das Zetapotential stark ab und wurde bei pH 11 mit – 18,0 mV als negativster Wert gemessen.

Tabelle 18: Eigenschaften von *S. maltophilia*

Stamm	Belegung auf [Bakterien/cm ²]		Zetapotential	Risikogruppe
	Borsilikatglas	Edelstahl	bei pH 7 [mV]	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	55 x 10 ⁶	183 x 10 ⁶	0 bis -3	1

Für den Praxisbezug wurde neben der Reinkultur das Trinkwasser aus der Hausinstallation des IWW als eine unbekannte Mischkultur verwendet. In natürlicher Umgebung besitzen die meisten Bakterien eine negative

Nettooberflächenladung (Soni et al. 2008, Matz et al. 2001) und wurden für den Praxisbezug nicht näher charakterisiert.

3.1.5 Ausgewählte Ladungsverschiebungen auf der Aufwuchsfläche

Die Wahl der Polarisationsroutinen war bedingt durch die geringe Leitfähigkeit des Elektrolyten, der elektrischen Leitfähigkeit der Aufwuchsflächen und des Biofilmbildungspotentials der Bakterien. Es wurden konstante sowie gepulste Polarisationsroutinen mit Stromdichten und Potentialen getestet (Tabelle 19). Bei der Polarisation wurde berücksichtigt, dass ab einem Potential von – 800 mV bzw. + 800 mV eine Zersetzung von Wasser erfolgen kann. Um den Bereich festzustellen, in dem das Potential innerhalb des Bereiches von – 800 mV bis + 800 mV bleibt, wurden verschiedene Stromdichten von – 0,01 mA/cm² bis maximal + 0,1 mA/cm² angelegt. Dieses Problem wurde vollständig umgangen, indem mit einem Potential zwischen – 800 und + 800 mV über mehrere Stunden polarisiert wurde. Konstante Polarisationsroutinen wurden für 5 bzw. 20 Stunden durchgeführt. Zusätzlich wurden gepulste Stromdichten bzw. Potentiale mit einer Pulsdauer von 1, 10 und 60 Sekunden sowie 10 Minuten getestet.

Tabelle 19: Geschaltete Polarisationsroutinen (Ladungsverschiebungen) auf der Aufwuchsfläche

	konstant	gepulst
Potential [mV]	-200, -400, -600, -800 +200, +400, +600, +800	-400 / +400; -600 / +600 -800 / +800
Stromdichte [mA/cm ²]	-0,02, -0,04, -0,08 +0,02, +0,04, +0,08	-0,04 / +0,04
Polarisationsdauer [Std.]	5 bis 164 (7 Tage)	5 bis 164
Pulsdauer [Sek.]		1, 10 und 60

Eine Pulsdauer von einer Sekunde war nicht ausreichend, um die gewählte Pulstärke zu erreichen. Nach 10 Sekunden war gerade die gewählte Pulstärke erreicht. Um einen Puls über eine Zeitspanne zu halten, wurden die Pulse für 1 Minute polarisiert. Als gepulste Varianten wurden maximal – 800 mV/ + 800 mV bzw. – 600 mV/ + 600 mV getestet.

3.1.5.1 Auswertung elektrochemischer Daten der untersuchten Polarisierungen

Um die Möglichkeit elektrochemischer unerwünschter Nebenreaktionen im Elektrolyten und auf der Aufwuchsfläche einzuschätzen, wurden die Daten nach erfolgter Polarisation aufgearbeitet. Während der galvanostatischen bzw. potentiostatischen Polarisierungen wurden der Verlauf jeder Potentialkurve bzw. Stromkurve aufgenommen. In Tabelle 20 und Tabelle 21 sind die maximal erreichten Potentiale bzw. Stromdichten aufgelistet. Auf einem mit Potential polarisierten ITO wurden Potentiale von + 1400 mV bis zu + 2300 mV gemessen. Wurde ITO negativ mit - 0,02 oder - 0,04 mA/cm² polarisiert, wurde ein Potential von - 400 mV bis maximal - 1200 mV gemessen.

Die auf Polypyrrol entstandenen Potentiale, während der Polarisation mit + 0,02 mA/cm², lagen deutlich niedriger bei maximal 435 mV. Wurde die Stromdichte auf + 0,08 mA/cm² erhöht, stieg das auf Polypyrrol gemessene Potential auf maximal 1150 mV. Bei einer negativen Stromdichte von - 0,02 mA/cm² wurde ein Potential von maximal - 240 mV gemessen. Bei einem Anstieg der Stromdichte auf - 0,08 mA/cm², stieg das Potential auf Polypyrrol auf - 1370 mV.

Tabelle 20: Geschaltete galvanostatische Bedingungen und gemessenes Potential während der Polarisation für 5 Stunden.

Stromdichte [mA/cm ²]	Potential [mV]	Polarisationsdauer [Stunden]	Aufwuchsfläche
- 0,02	- 400 bis - 1030	5	ITO
+ 0,02	+ 1400 bis + 1580	5	ITO
- 0,02	- 125 bis - 240	5	Polypyrrol
+ 0,02	+ 400 bis + 435	5	Polypyrrol

Auf Polypyrrol sind geringere Potentiale gemessen worden als auf ITO. Zur Veranschaulichung eines Potentialverlaufs sind die elektrochemischen Daten graphisch dargestellt. Es wurden die Versuche mit den stärksten Effekten auf Polypyrrol gewählt. In Abbildung 23 ist der Verlauf des Potentials während einer galvanostatischen Polarisation mit + 0,02 bzw. + 0,08 mA/cm² auf Polypyrrol dargestellt (Grün hinterlegte Zeilen in Tabelle 20). Auf Polypyrrol konnte eine stabile konstante Stromdichte von + 0,02 (orange) + 0,08 (rot) mA/cm² polarisiert werden. Das Potential stieg während der Polarisation mit + 0,02 mA/cm² stetig auf + 435 mV an (Abbildung 23, blau). Während der

Polarisation mit + 0,08 mA/cm² stieg das Potential höher auf + 1150 mV (türkis) an (Abbildung 23).

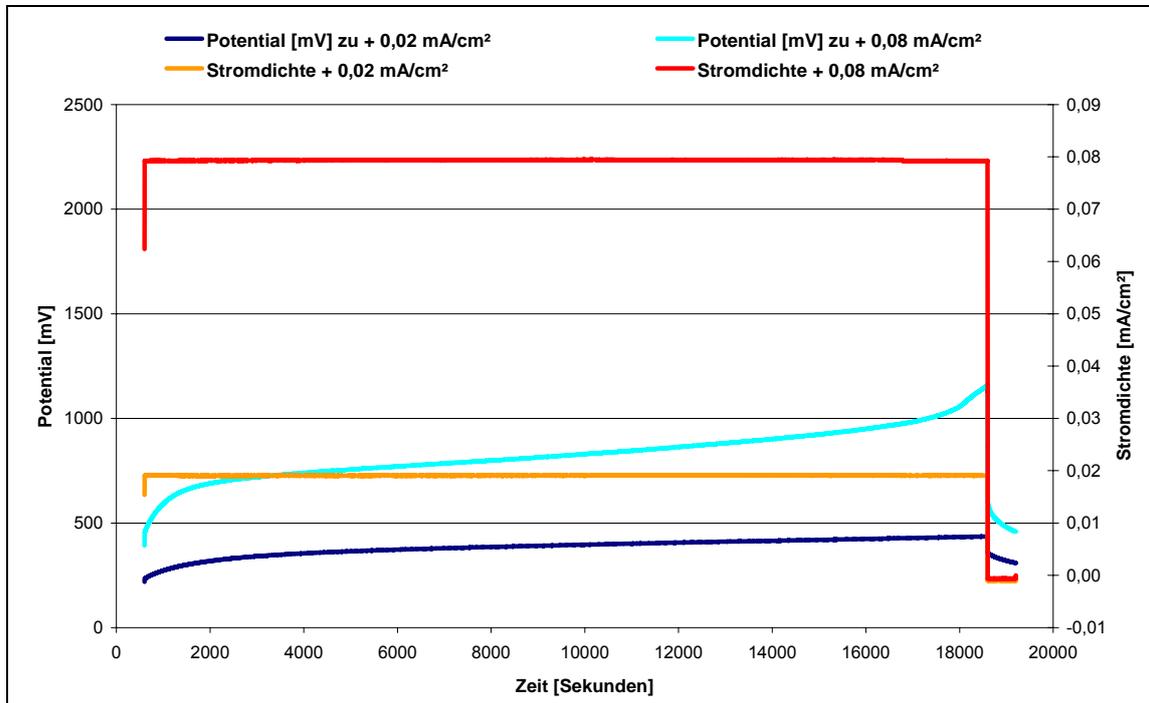


Abbildung 23: Verlauf des Potentials [mV] in Abhängigkeit der Stromdichte auf Polypyrrol. Polarisationsdauer 5 Stunden.

Wurde potentiostatisch polarisiert, wurde der Stromverlauf aufgenommen. In der nachfolgenden Tabelle 21 sind die gemessenen Stromstärken, angegeben als Stromdichten (Spalte 2), aller in der vorliegenden Arbeit beschriebenen potentiostatischen Versuche (Spalte 1) dargestellt. Der gemessene Strom war sehr gering, zwischen $- 0,0008$ und $- 0,02$ mA/cm², und fiel während der Polarisation stetig ab.

Tabelle 21: geschaltete Potentiale und die dazu gemessenen Stromdichten (min/max) während der Polarisation.

Potential [mV]	Stromdichte [mA/cm ²]	Pulsdauer [Sekunden]	Polarisationsdauer [Stunden]	Aufwuchsfläche
- 800	- 0,001 bis - 0,0008		5	ITO
+ 800	- 0,02 bis - 0,007		5	ITO
- 800 / + 800	- 0,06 / + 0,001	10	20	ITO
- 600 / + 600	- 0,06 / + 0,001	60	2,5 bis 7 Tage	ITO

Als Beispiel wurde der Stromverlauf in Abhängigkeit einer Polarisation mit $- 800 \text{ mV}$ bzw. $+ 800 \text{ mV}$ graphisch dargestellt (Abbildung 24). Zu Beginn der Polarisation mit $- 800 \text{ mV}$ bzw. $+ 800 \text{ mV}$ wurde ein geringer Strom gemessen ($- 0,001 \text{ mA/cm}^2$ bzw. $0,02 \text{ mA/cm}^2$), der über die Zeit auf $- 0,0008 \text{ mA/cm}^2$ bzw. $- 0,007 \text{ mA/cm}^2$ abfiel.

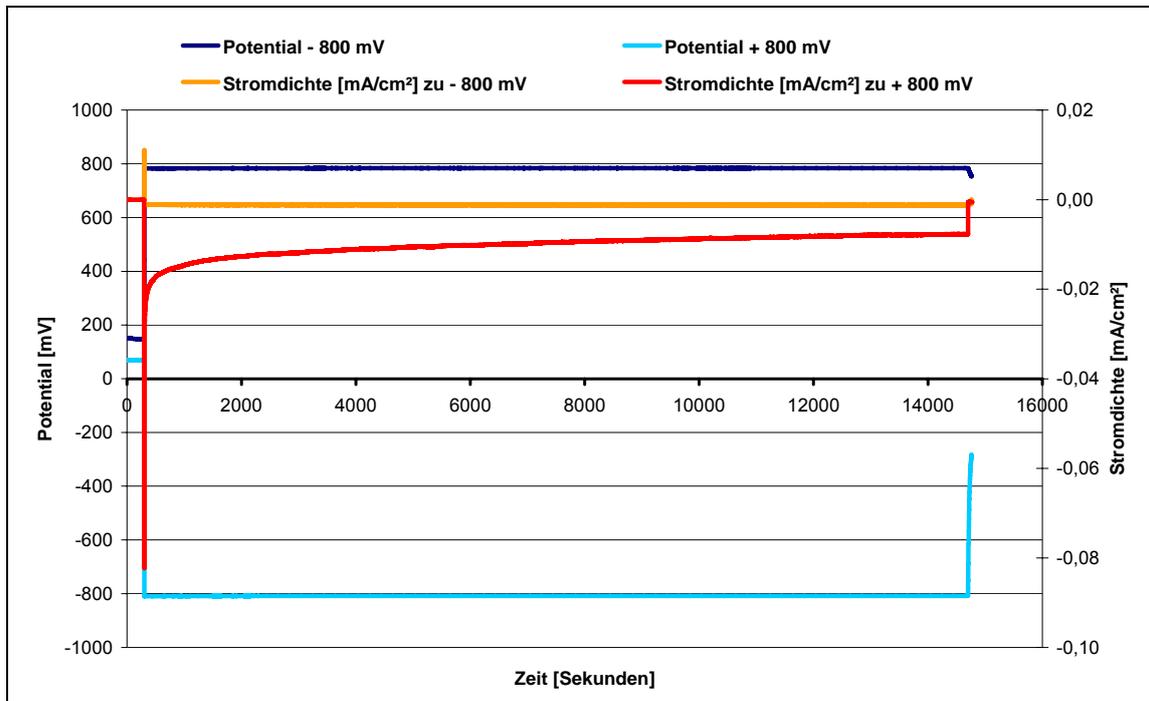


Abbildung 24: Stromverlauf in Abhängigkeit der Zeit und des vorgegebenen Potentials auf ITO. Polarisationsdauer 4 Stunden.

Eine Schaltung der Oberflächenladung mit Vorgabe eines Potentials im Vergleich zur Vorgabe einer Stromdichte hat den Vorteil, dass ersteres eine Kontrolle des Potentials im Bereich von $- 800 \text{ mV}$ bis $+ 800 \text{ mV}$ ermöglicht. Um eine mögliche Zersetzung von Wasser und unerwünschte elektrochemische Reaktionen auf der Aufwuchsfläche in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testsystem auszuschließen, wurden Ladungsverschiebungen der Aufwuchsfläche mit Vorgabe eines Potentials reguliert.

Bei gepulsten Polarisationen mit einem Potential wurde ebenfalls die Stromstärke geprüft. Abbildung 25 zeigt einen Ausschnitt aus einer 7 tägigen Polarisation ($- 600 \text{ mV} / + 600 \text{ mV}$) mit dem Verlauf der Pulse mit einer Pulsdauer von 1 Minute. Die Pulse wurden sauber und stabil über die gesamte Pulsdauer polarisiert. Währenddessen wurde eine geringe Stromstärke von $- 0,0006 / - 0,02 \text{ mA/cm}^2$ gemessen (Abbildung 25).

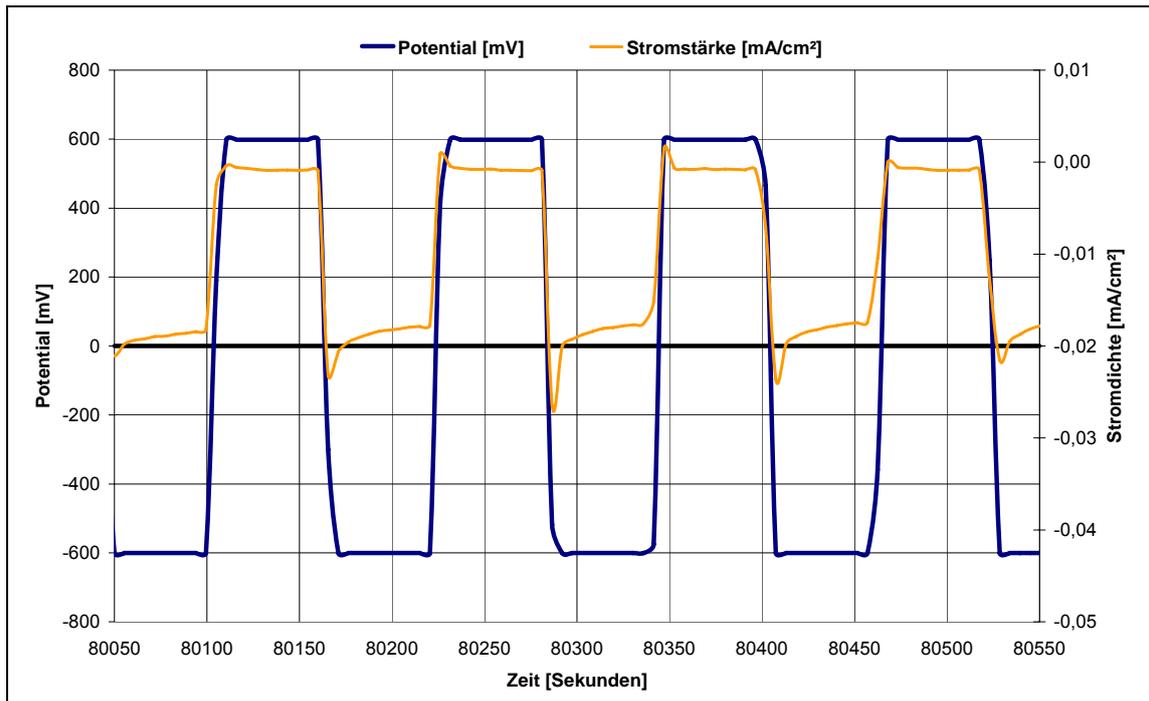


Abbildung 25: Ausschnitt aus einer gepulsten potentiostatischen Polarisationsroutine auf ITO. Die blaue Linie zeigt den Verlauf der Potentialpulse (Ein Puls = 1 Minute). In orange ist die dazu entsprechende Stromdichte dargestellt.

3.2 Einfluss elektrischer Polarisation auf physiko-chemische Wechselwirkungen während der bakteriellen Primäradhäsion

Ziel war es, den Einfluss verschiedener Oberflächenladungen bzw. Ladungsverschiebungen auf die Primäradhäsion von Bakterien zu untersuchen. Auf der Grundlage der DLVO-Theorie sollte ein negativ geladenes Bakterium von einer negativ geladenen Oberfläche abgestoßen werden und vice versa. Bei entgegengesetzter Oberflächenladung bzw. erhöhter Ladungsdifferenz zwischen Bakterien und Aufwuchsfläche sollte eine erhöhte Adhäsion erfolgen. Nachfolgend werden die Einflüsse unterschiedlicher Polarisationsroutinen auf die bakterielle Primäradhäsion von Reinkulturen und Mischkulturen auf verschiedenen Aufwuchsflächen beschrieben

3.2.1 Einfluss elektrischer Polarisation auf die Primäradhäsion von *S. maltophilia* auf ITO

S. maltophilia besitzt bei einem pH-Wert 7 im synthetischen Trinkwasser eine neutrale bis schwach negative Netto-Oberflächenladung (Zetapotential) von

– 3 mV bis 0 mV. Folglich sollten aufgrund ansteigender Polarisierung der Aufwuchsfläche und damit zunehmender Ladungsdifferenz eine erhöhte Adhäsion erfolgen.

Durch Anlegen eines Stroms ($-0,02 \text{ mA/cm}^2$ bzw. $+0,02 \text{ mA/cm}^2$) wurden auf ITO unterschiedliche Oberflächenladungen erzeugt. Nach 5 Stunden Adhäsion von *S. maltophilia* wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) auf den polarisierten Aufwuchsflächen und der Kontrolle bestimmt. Als Kontrolle wurde ein nicht polarisiertes ITO eingesetzt. Hier wurde für *S. maltophilia* nach 5 Stunden Inkubation eine GZZ von $1,7 \times 10^6$ Bakterien/cm² bestimmt. Auf dem polarisierten ITO ($-0,02 \text{ mA/cm}^2$ bzw. $+0,02 \text{ mA/cm}^2$) stieg die GZZ von *S. maltophilia* auf $2,9 \times 10^6$ Bakterien/cm² bzw. $1,6 \times 10^6$ Bakterien/cm² (Abbildung 26).

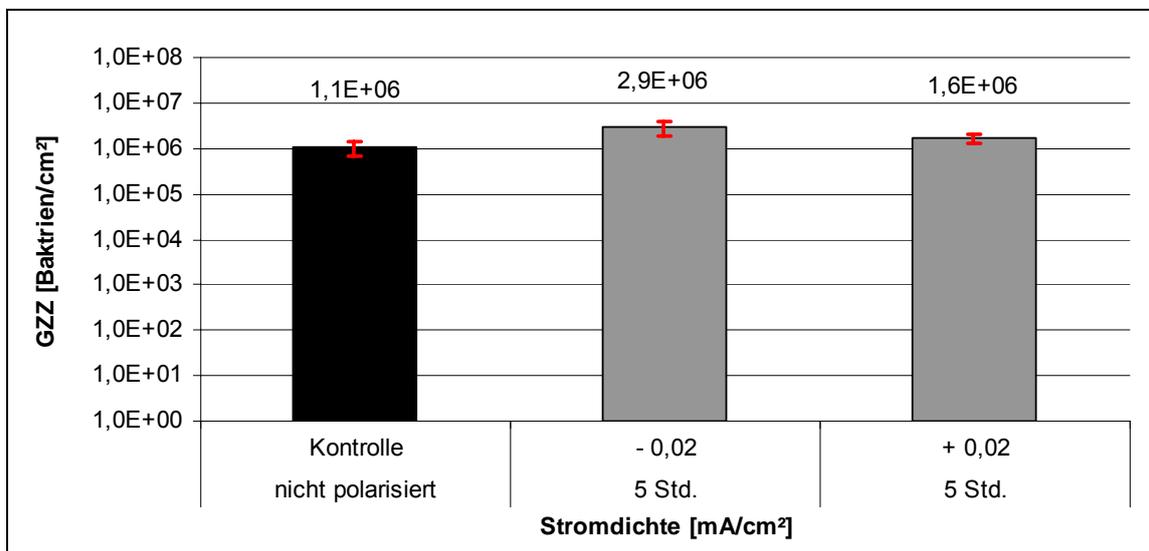


Abbildung 26: Gesamtzellzahl (GZZ = Mittelwert aus n=6) von *S. maltophilia* auf polarisierten ITO-Aufwuchsflächen ($-0,02 \text{ mA/cm}^2$ bzw. $+0,02 \text{ mA/cm}^2$) nach 5 Stunden, pH-Wert des Elektrolyten synthetische Trinkwasser vor/nach Polarisation 7,5 / 8,1

Die Daten zeigen, dass eine Ladungsverschiebung auf ITO im Vergleich zur nicht polarisierten Kontrolle eine geringfügig erhöhte Primäradhäsion von *S. maltophilia* resultiert. Dies deutet auf eine durch Polarisierung erhöhte Ladungsdifferenz zwischen Bakterienoberfläche und ITO-Aufwuchsfläche und damit erhöhte attraktive Wechselwirkungen hin.

3.2.2 Einfluss elektrischer Polarisation auf die Primäradhäsion von *S. maltophilia* auf Polypyrrol

Als weitere Aufwuchsfläche wurde das leitfähige Polymer Polypyrrol eingesetzt, das zusätzlich zur Oberflächenladung auch seine Struktur ändert (siehe 1.3.1). Ziel war es zu prüfen, welchen Einfluss eine Ladungsverschiebung **und** Strukturänderung der Aufwuchsfläche auf die Primäradhäsion von *S. maltophilia* hat. Dazu wurden Stromdichten von $- 0,02$ bzw. $+ 0,02$ mA/cm² für 5 Stunden auf Polypyrrol geschaltet und anschließend die Gesamtzellzahl (GZZ) von *S. maltophilia* bestimmt (Abbildung 27). Zwischen den verschiedenen Versuchen wurden bei der GZZ auf der Kontrolle starke Abweichungen festgestellt. Es wurden $2,5 \times 10^6$ bzw. $2,1 \times 10^7$ Bakterien/cm² auf der Kontrolle bestimmt. Auf dem polarisierten Polypyrrol ($- 0,02$ mA/cm² bzw. $+ 0,02$ mA/cm²) wurde eine um Faktor 2 ($1,4 \times 10^6$ Bakterien/cm² bzw. $1,1 \times 10^7$ Bakterien/cm²) geringere Adhäsion festgestellt (Abbildung 27).

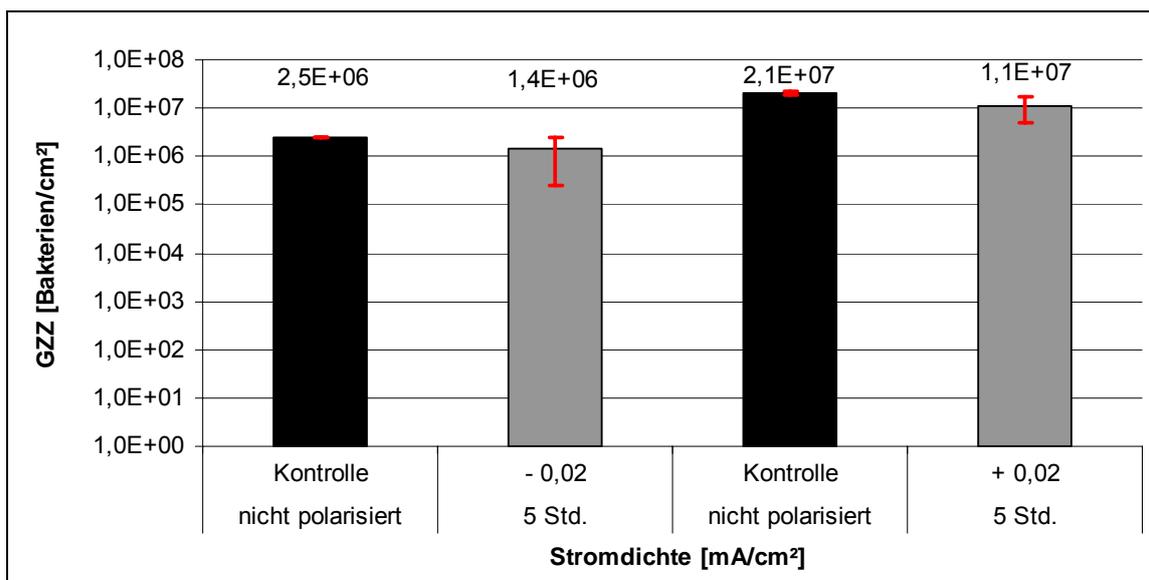


Abbildung 27: Gesamtzellzahl (GZZ = Mittelwert aus n=2) von *S. maltophilia* auf einer polarisierten Polypyrrol-Aufwuchsfläche ($- 0,02$ mA/cm² bzw. $+ 0,02$ mA/cm²) nach 5 Stunden.

Diese Daten zeigen im Vergleich zu ITO keine erhöhte, sondern tendenziell eine geringere Primäradhäsion von *S. maltophilia* auf Polypyrrol. Dies deutet darauf hin, dass die durch Polarisation von Polypyrrol resultierte Veränderung der Oberflächenladung und Oberflächenstruktur zu erhöhten repulsiven Wechselwirkungen zwischen der Bakterienoberfläche und Aufwuchsflächen führt.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss einer jede Minute gepulsten Ladungsverschiebung mit - 800 mV / + 800 mV (Pulsdauer 1 Minute) von Polypyrrol auf die Adhäsion von *S. maltophilia* untersucht. Nach 5 Stunden wurde auf der nicht polarisierten Kontrolle eine Gesamtzellzahl (GZZ) von *S. maltophilia* mit $1,0 \times 10^6$ Bakterien/cm² bestimmt. Im Vergleich dazu wurde auf der polarisierten Polypyrrol-Aufwuchsfläche eine um Faktor 2 geringere GZZ $5,5 \times 10^5$ Bakterien/cm² festgestellt (Abbildung 28).

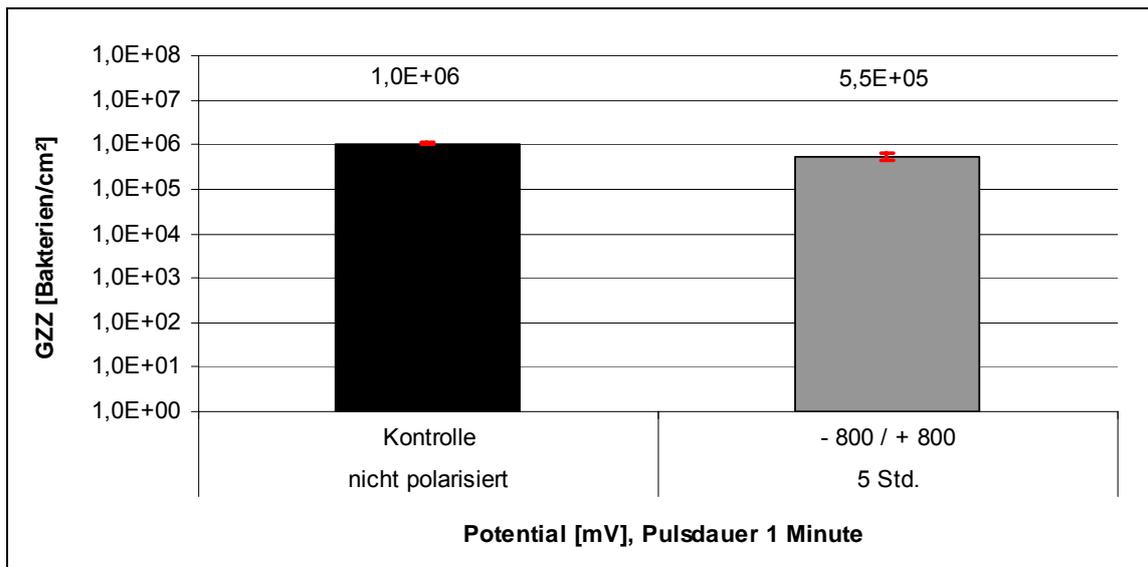


Abbildung 28: Gesamtzellzahl (GZZ = Mittelwert aus n=2) von *S. maltophilia* auf gepulst polarisiertem Polypyrrol (- 800 mV / + 800 mV, Pulsdauer 1 Minute) nach 5 Stunden.

Die Daten zeigen, dass sowohl eine konstante als auch eine gepulste Ladungsverschiebung auf Polypyrrol zu einer geringeren Adhäsion im Vergleich zur nicht polarisierten Kontrolle von *S. maltophilia* führt.

3.2.3 Einfluss elektrischer Polarisation auf die Primäradhäsion von Trinkwasserbakterien auf ITO

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, wie elektrische Polarisation einer Oberfläche die Primäradhäsion von Bakterien beeinflusst. Dazu wurden neben einer bekannten Reinkultur *S. maltophilia* auch eine unbekannte Mischkultur aus Trinkwasser eingesetzt. Im Vergleich zur neutralen Netto-Oberflächenladung (Zetapotential) von *S. maltophilia* besitzen Trinkwasserbakterien meistens ein negatives Zetapotential. Daher sollten auf einer negativ geladenen Aufwuchsfläche im Vergleich zur Kontrolle weniger

Bakterien anhaften. Gemäß DLVO-Theorie wäre auf einer positiv geladenen Oberfläche eine erhöhte Adhäsion zu erwarten.

Auf der nicht polarisierten Kontrolle wurde nach 5 Stunden eine Gesamtzellzahl (GZZ) von $2,2 \times 10^5$ Bakterien/cm² bestimmt. Zwischen der Adhäsion der Trinkwasserbakterien auf der Kontrolle und dem positiv polarisierten ITO ($3,9 \times 10^5$ Bakterien/cm²) war ein sehr geringer Unterschied. Im Vergleich dazu wurde auf der negativ geladenen ITO-Aufwuchsfläche (- 800 mV) eine zur Kontrolle um Faktor 8 erhöhte Adhäsion ($1,9 \times 10^6$ Bakterien/cm²) festgestellt (Abbildung 29).

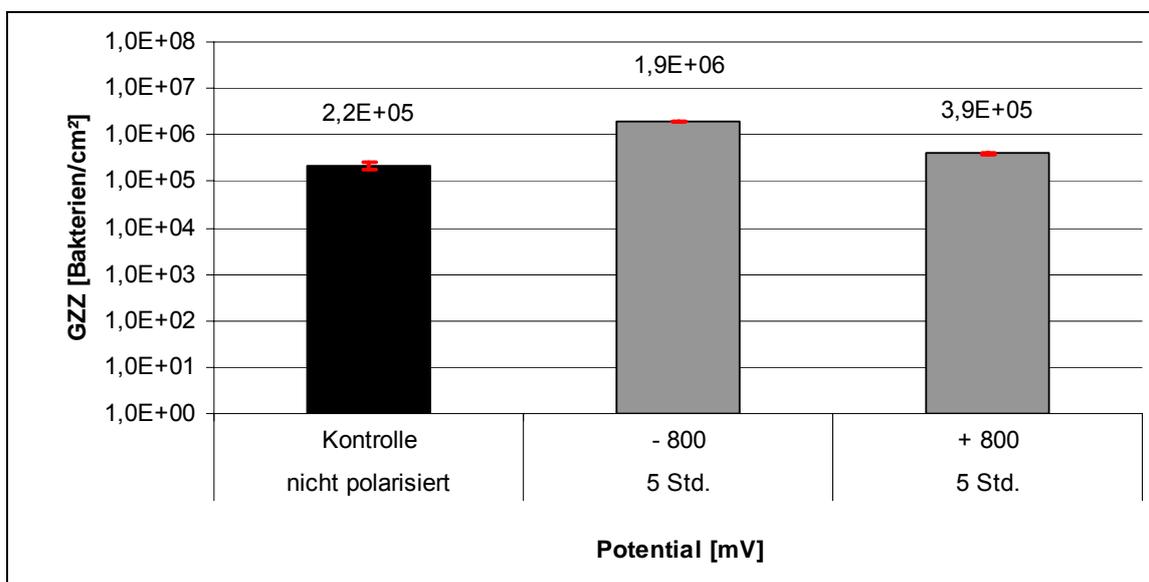


Abbildung 29: Gesamtzellzahl (GZZ = Mittelwert aus n=2) von Trinkwasserbakterien auf polarisierten ITO-Aufwuchsflächen (- 800 mV bzw. + 800 mV) nach 5 Stunden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss eine gepulste Ladungsverschiebung (- 800 mV / + 800 mV, Pulsdauer 10 Sek.) auf die Adhäsion von Trinkwasserbakterien auf ITO hat. Nach 5 Stunden wies die Kontrolle eine Gesamtzellzahl von $1,5 \times 10^6$ Bakterien/cm² auf. Im Vergleich dazu wurden auf dem polarisierten ITO $2,0 \times 10^6$ Bakterien/cm² gezählt (Abbildung 30).

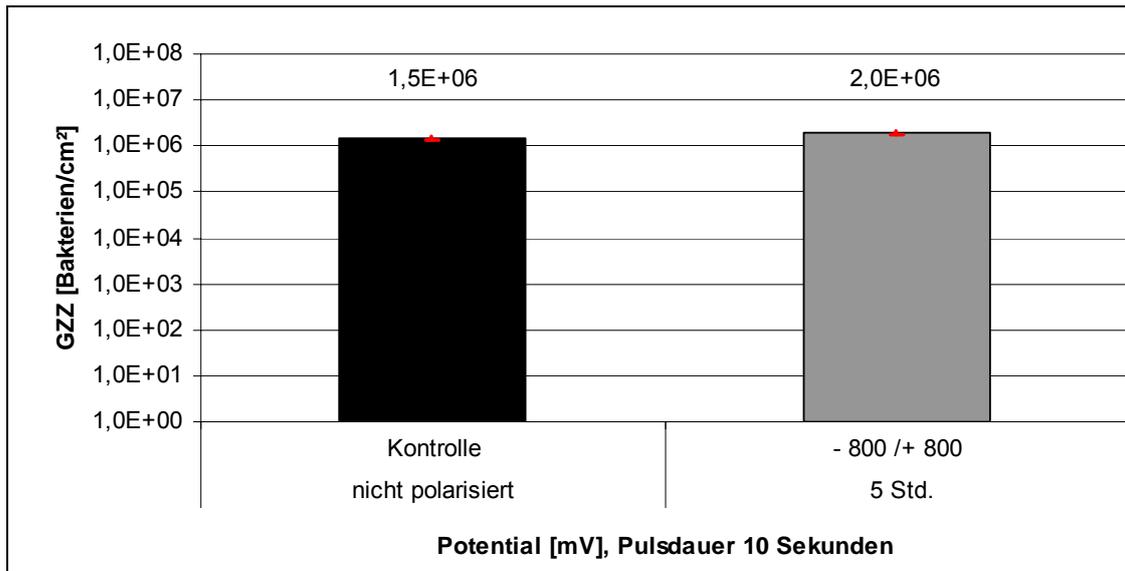


Abbildung 30: Gesamtzellzahl (GZZ = Mittelwert n=4) von Trinkwasserbakterien auf polarisierten ITO-Aufwuchsflächen (- 800 mV/ + 800 mV, Pulsdauer 10 Sek.) nach 5 Stunden.

In allen Versuchen mit unterschiedlichen Ladungsverschiebungen waren auf der polarisierten Aufwuchsfläche stets mehr Bakterien als auf der nicht polarisierten Kontrolle. Diese Daten weisen entgegen der Erwartung nach der DLVO-Theorie darauf hin, dass eine im Vergleich zur nicht polarisierten Kontrolle ins Negative verschobene Oberflächenladung zu verstärkt attraktiven Kräften und damit zur höheren Adhäsion von Bakterien aus dem Trinkwasser führt. Dagegen hatte eine positive Polarisation bzw. ständig wechselnd geladene Oberfläche eher keinen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Bakterien- und Aufwuchsfläche.

3.2.4 Einfluss elektrischer Polarisation auf das Adhäsionsmuster von Bakterien

Nach erfolgter Polarisation wurden die anhaftenden Bakterien direkt auf der ITO-Oberfläche mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt (DAPI bzw. Syto9) und mikroskopiert. Dabei fiel zwischen den polarisierten und nicht polarisierten Biofilmen ein Unterschied im mikroskopischen Bild im Adhäsionsmuster auf (Abbildung 31). Auf der nicht polarisierten Aufwuchsfläche (Kontrolle) bildeten Trinkwasserbakterien Mikrokolonien. In diesen Mikrokolonien waren die Bakterien von einer sichtbaren Matrix umgeben. Im Vergleich dazu hafteten die Bakterien auf dem polarisierten ITO vereinzelt und nicht umgeben von einer Matrix (Abbildung 31).

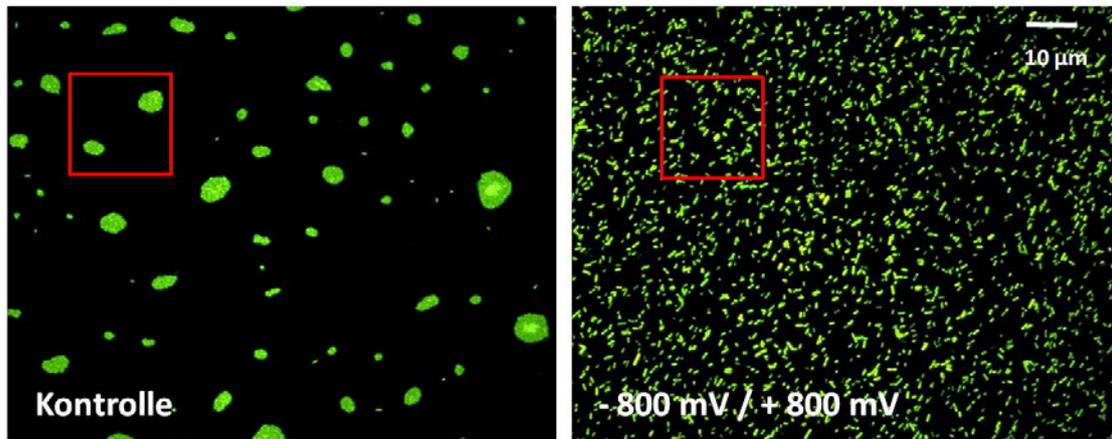


Abbildung 31: Adhäsion von Trinkwasserbakterien auf einem nicht polarisierten (Kontrolle) und polarisierten (- 800 mV / + 800 mV, Pulsdauer 10 Sekunden) ITO nach 5 Stunden. Bakterien gefärbt mit Syto 9.

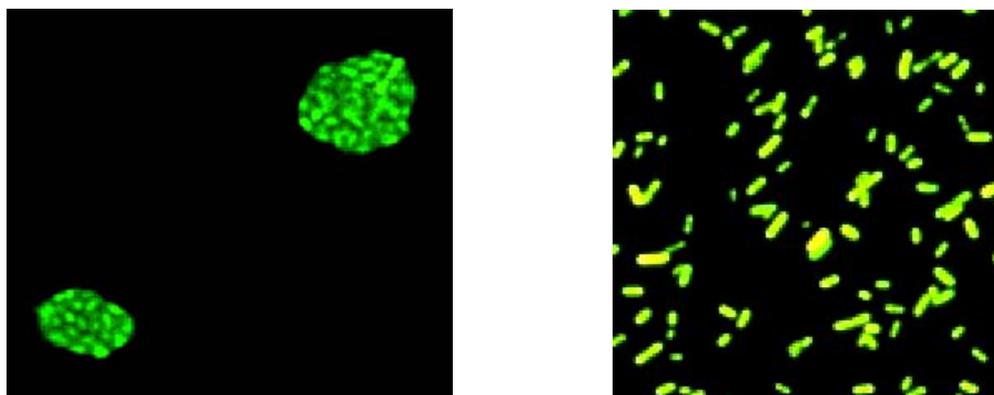


Abbildung 32: Ausschnitt (rote Rahmen) aus Abbildung 31 Links: Kontrolle, Rechts: Polarisiert

Dieser Unterschied im Adhäsionsmuster wurde sowohl bei Trinkwasserbakterien als auch bei *S. maltophilia* unabhängig von der Art der Polarisation beobachtet. Diese Beobachtung deutet auf einen Einfluss elektrischer Polarisation auf die zwischen den Bakterienzellen herrschenden Wechselwirkungen hin.

3.3 Einfluss eines gepulsten Potentials auf das Biofilmwachstum von Trinkwasserbakterien auf ITO

In vorherigen Abschnitten 3.2 wurde die Beeinflussung der Primäradhäsion durch elektrische Polarisation der Aufwuchsfläche beschrieben. In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob eine Ladungsverschiebung auf der Aufwuchsfläche einen Einfluss auf das Biofilmwachstum nach bereits erfolgter Primäradhäsion (Phase 3) hat. Im Gegensatz zu den Bakterien während der

Primäradhäsion besaßen die Bakterien während des Biofilmwachstums einen aktiven Stoffwechsel. Es stellte sich die Frage, ob aktive Bakterien sensitiver auf elektrische Polarisation reagieren. Daher wurde in einer Versuchreihe die Polarisation erst nach erfolgter Primäradhäsion und Nährstoffzugabe eingeschaltet.

Nach Adhäsion (72 Stunden) der Trinkwasserbakterien im Durchfluss wurde eine Gesamtzellzahl von maximalen 1×10^6 Bakterien/cm² gezählt (Abbildung 33 links). Diesem Biofilm wurde anschließend eine 1: 20 000 verdünnte CASO-Bouillon zugeführt und für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde eine Gesamtzellzahl von etwa $2,0 \times 10^6$ Bakterien/cm² gezählt (Abbildung 33 rechts). Die leichte Erhöhung der Gesamtzellzahl wies auf ein Wachstum der Bakterien durch den Zusatz der Kohlenstoffquelle hin. Der Stoffwechsel der Bakterien war aktiviert und das Zellwachstum angeregt.

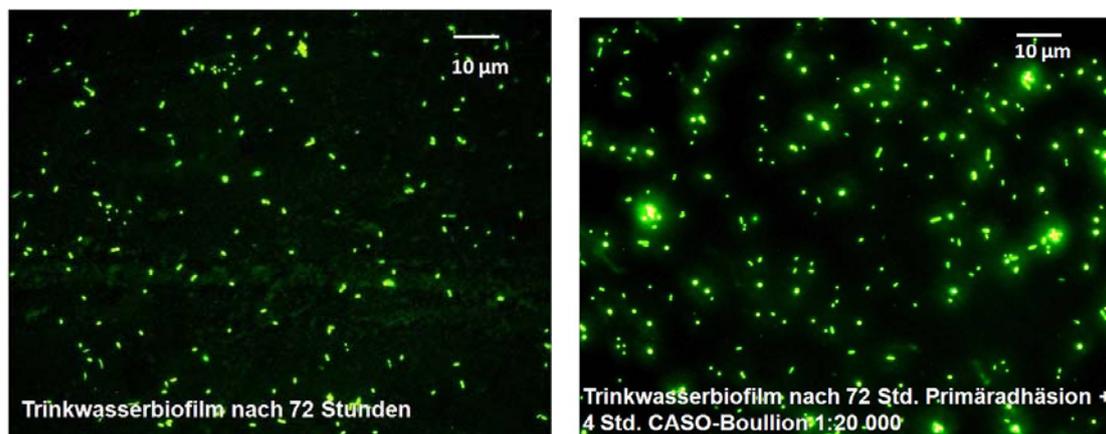
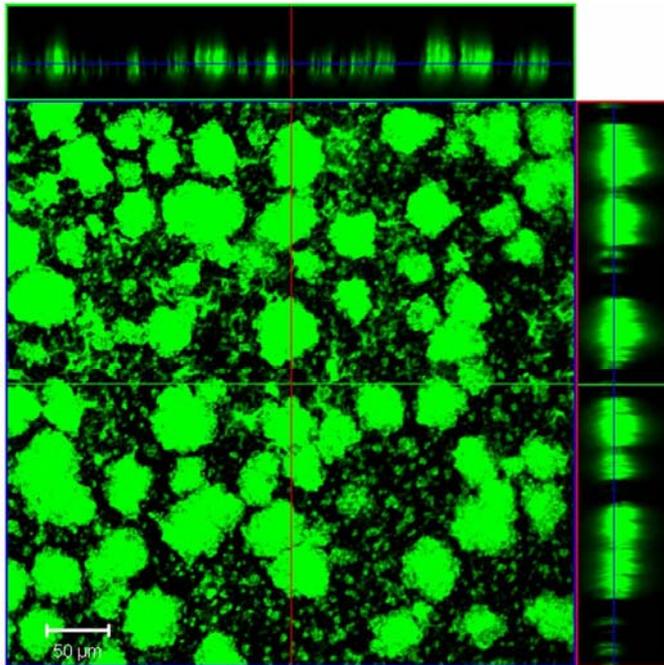


Abbildung 33: Links: Trinkwasserbiofilm nach 72 Stunden Adhäsion von Bakterien aus Trinkwasser der Hausinstallation des IWW Rechts: Nach 4 Stunden Inkubation in einer verdünnten CASO-Bouillon (1:20 000). Gefärbt mit Syto9

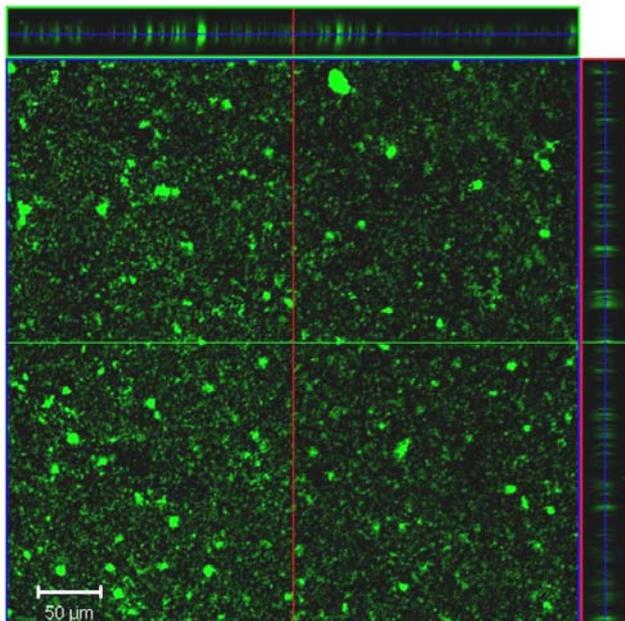
Nach der Adhäsion und Aktivierungszeit wurde der Durchfluss der CASO-Bouillon (Endkonzentration: 1: 20 000) verdünnt mit dem Trinkwasser gestartet. Gleichzeitig wurde ein gepulstes Potential von $- 600$ mV/ $+ 600$ mV (Pulsdauer 1 Minute) auf ITO für insgesamt 7 Tage polarisiert.

Nach 2,5 Tagen wurde ein ITO-Coupon entnommen und im CLSM mit dem 20 x Objektiv mikroskopiert. Auf dem nicht polarisierten ITO (Kontrolle) war ein mehrschichtiger dreidimensionaler Biofilm mit Aggregaten mit einer Dicke von 65 µm. Die Basis des Biofilms bestand aus einem dünnen Bakterienrasen. Zwischen den Aggregaten waren zellfreie Kanäle (Abbildung 34). Auf dem polarisierten ITO war ein im Vergleich zur Kontrolle dünner Trinkwasserbiofilm

(Schichtdicke 20 μm) mit einigen kleinen Aggregaten zu sehen. Der polarisierte Trinkwasserbiofilm war um Faktor 3 dünner als der Kontrollbiofilm (Abbildung 34).

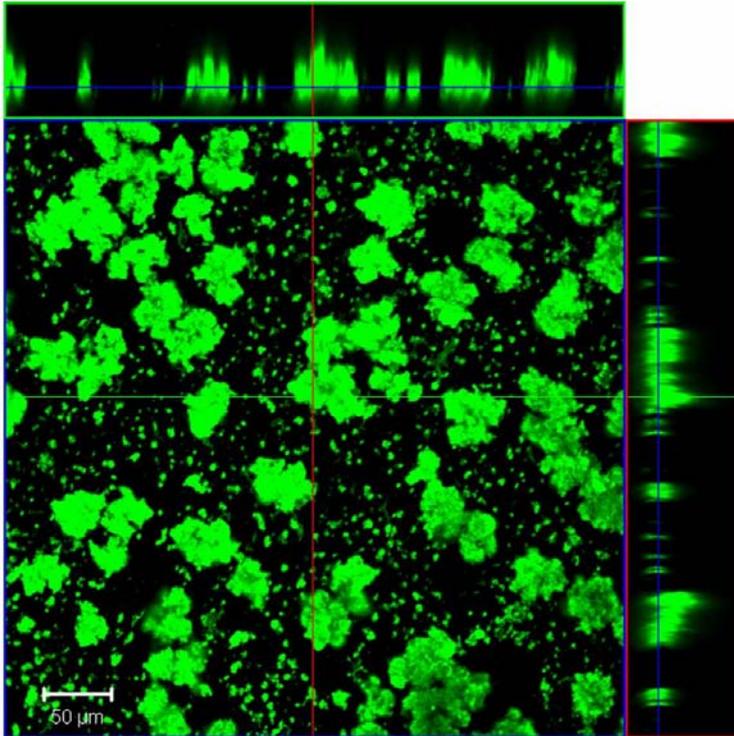


Trinkwasserbiofilm (Kontrolle nicht polarisiert 2,5 Tage)
+ CASO 1:20 000 im Durchfluss

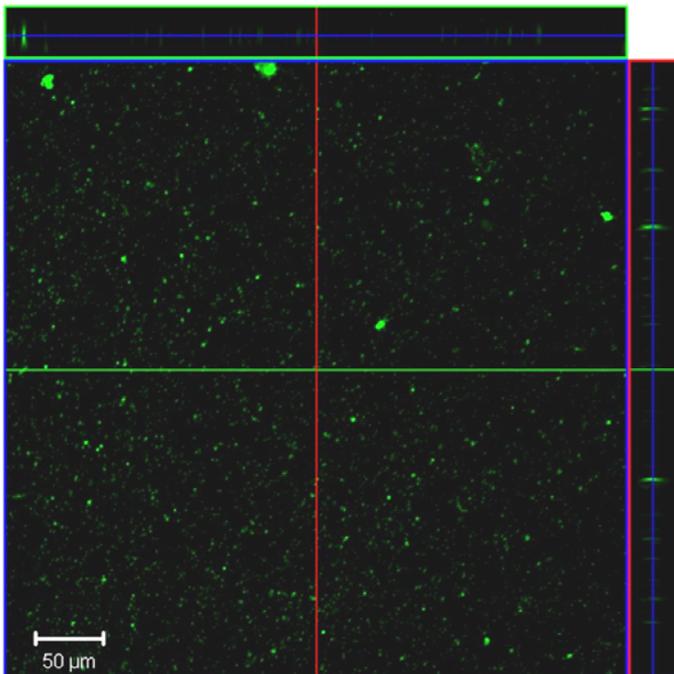


Trinkwasserbiofilm (- 600 mV/ + 600 mV; Pulsdauer
1Minute, 2,5 Tage) + CASO 1:20 000 im Durchfluss

Abbildung 34: CLSM-Aufnahme (20x) eines Trinkwasserbiofilms (gefärbt mit SYTO 9) auf ITO nach 2,5 Tagen. Oben: Kontrolle nicht polarisiert, Unten: Polarisiert mit - 600 mV/ + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute.



Trinkwasserbiofilm (Kontrolle nicht polarisiert 7 Tage)
+ CASO 1:20 000 im Durchfluss



Trinkwasserbiofilm (- 600 mV/ + 600 mV; Pulsdauer
1Minute, 7 Tage) + CASO 1:20 000 im Durchfluss

Abbildung 35: CLSM-Aufnahme (20x) eines Trinkwasserbiofilms (gefärbt mit SYTO 9) auf ITO nach 7 Tagen. Oben: Kontrolle nicht polarisiert, Unten: Polarisiert mit - 600 mV/ + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute.

Nach weiterer Polarisation für insgesamt sieben Tage war auf dem nicht polarisierten ITO ein vergleichbarer Trinkwasserbiofilm (Schichtdicke 67 µm) zu sehen wie schon nach 2,5 Tagen. Dagegen war der polarisierte Trinkwasserbiofilm (Schichtdicke 20 µm) sehr dünn mit nur wenigen Aggregaten (Abbildung 35).

Die CLSM-Aufnahmen der Trinkwasserbiofilme (Abbildung 34, Abbildung 35) zeigen, dass eine ständig gepulste Oberflächenladung von negativ (- 600 mV) zu positiv (+ 600 mV) einen Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum eines Trinkwasserbiofilms und damit auf dessen Struktur hatte. Der in Abbildung 35 gezeigte Ausschnitt wurde für eine weitere Analyse verwendet. Der Kontrollbiofilm weist ein Volumen von 6,05 cm³/cm² auf. Im Vergleich dazu beträgt das Volumen des polarisierten Trinkwasserbiofilm ein um Faktor 300 geringeres Volumen von 0,02 cm³/cm². Der Kontrollbiofilm belegt 22,4 % des in Abbildung 35 zu sehenden Ausschnitts. Auf dem polarisierten ITO sind im Vergleich dazu 0,15 % der Aufwuchsfläche durch den Trinkwasserbiofilm belegt.

Um zu prüfen, welcher Unterschied in der Gesamtzellzahl des Trinkwasserbiofilms auf dem polarisierten ITO im Vergleich zur Kontrolle war, wurde dieser Versuch mehrfach wiederholt. Der zuvor beschriebene und gezeigte Effekt konnte mit unterschiedlicher Ausprägung reproduziert werden (Tabelle 22). Die Gesamtzellzahlen (GZZ) 7 Tage alter Trinkwasserbiofilme (nicht polarisiert) auf ITO lag im Mittel bei 5,1 x 10⁶ Bakterien/cm². Im Vergleich dazu lag die GZZ gleich alter aber polarisierter Trinkwasserbiofilme etwa um Faktor 4 geringer bei 1,4 x 10⁶ Bakterien/cm² (Abbildung 36).

Tabelle 22: GZZ 7 Tage alter Trinkwasserbiofilme auf ITO nicht polarisiert (Kontrolle) und polarisiert (- 600 mV/ + 600 mV; Pulsdauer 1 Minute)

Versuch	Kontrolle	- 600 mV/ + 600 mV	Faktor
	nicht polarisiert [Bakterien/cm ²]	Pulsdauer 1 Minute Bakterien/cm ²	GZZ Kontrolle / GZZ Polarisiert
Nr. 1	3,0E+06	6,1E+05	5
Nr. 2	6,9E+06	1,4E+06	5
Nr. 3	4,9E+06	1,4E+06	3
Nr. 4	7,1E+06	2,8E+06	3
Nr. 5	3,5E+06	1,0E+06	3
Mittelwert	5,1E+06	1,4E+06	4
STABW	1,9E+06	8,1E+05	1

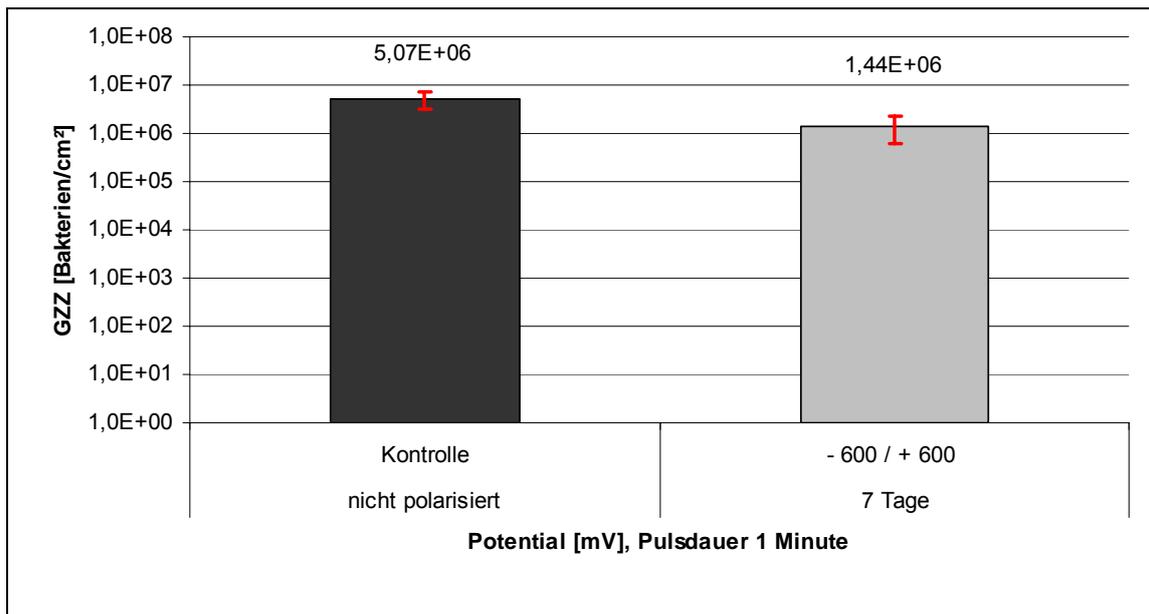


Abbildung 36: Mittelwerte (n=5) der GZZ 7 Tage alter Trinkwasserbiofilme auf ITO nicht polarisiert (Kontrolle) und polarisiert (- 600 mV/ + 600 mV; Pulsdauer 1 Min.)

Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Beobachtung (Abbildung 34, Abbildung 35) ergab eine um Faktor 4 reduzierte Gesamtzellzahl auf dem polarisierten ITO im Vergleich zur Kontrolle.

Dies deutet darauf hin, dass aktive Bakterien sensitiv auf Veränderungen der Oberflächenladungen der Aufwuchsfläche reagieren und dessen Physiologie in der Wachstumsphase durch elektrische Polarisation beeinflusst wurde.

3.4 Einfluss elektrischer Polarisation auf physiko-chemische Wechselwirkungen in bereits etablierten Trinkwasserbiofilmen

Die Veränderung der Oberflächenladungen auf der Aufwuchsfläche und damit die Beeinflussung elektrostatischer Wechselwirkungen führte auf ITO meistens zu einer erhöhten Primäradhäsion (3.2) aber zu einem geringeren Biofilmwachstum (3.3). Daher stellte sich die Frage, wie bereits entstandene Trinkwasserbiofilme (Phase 4) auf eine Polarisation reagieren, und ob eine Biofilmablösung durch elektrische Polarisation an der Basis des Trinkwasserbiofilms (Grenzfläche zwischen Biofilm und Aufwuchsfläche) erzielt werden kann. Es wurde geprüft, welche Auswirkungen eine elektrische Polarisation auf einen 4 Tage (während Entstehung) und 2 Wochen (nach Entstehung) alten Trinkwasserbiofilm haben kann.

3.4.1 Einfluss eines gepulsten Potentials auf einen 4 Tage alten Trinkwasserbiofilm auf ITO

Nach 4 Tagen Anzucht von Trinkwasserbiofilmen auf ITO in Durchflussflanschzellen mit Nährstoffzufuhr wurden diese mittels des Fluoreszenzscanners (SFM25 Bio-TEK; Kontron Instruments) qualitativ auf Belegung und Zelldichte ausgewertet. Dunkle Bereiche repräsentieren besonders viele Fluoreszenzsignale aufgrund erhöhter Anzahl Syto 9 markierter Zellen. Je dunkler eine Fläche, desto mehr Fluoreszenzsignal und damit mehr Zellen befinden sich in diesem Bereich.

Ein Trinkwasserbiofilm vor Polarisation wies eine ungleichmäßige Belegung mit dickeren Aggregaten auf (Abbildung 37 links). Wurden nach der Biofilmanzucht die Scherkräfte für 1 Stunde erhöht (300 rpm), wurden weniger Fluoreszenzsignale detektiert (Abbildung 37, Mitte). Hier lösten sich Bakterien bereits durch die Einwirkung der Scherkräfte ab. Eine Kombination der Scherkräfte mit einer gepulsten Polarisation (- 800 mV/ + 800 mV, Pulsdauer 10 Sekunden) führte zu einer ungleichmäßigen aber verstärkten Ablösung des Trinkwasserbiofilms von ITO (Abbildung 37, rechts). Ein Drittel der polarisierten ITO-Oberfläche war vollständig vom Biofilm befreit und zwei Drittel waren noch dünn von einem Trinkwasserbiofilm belegt.

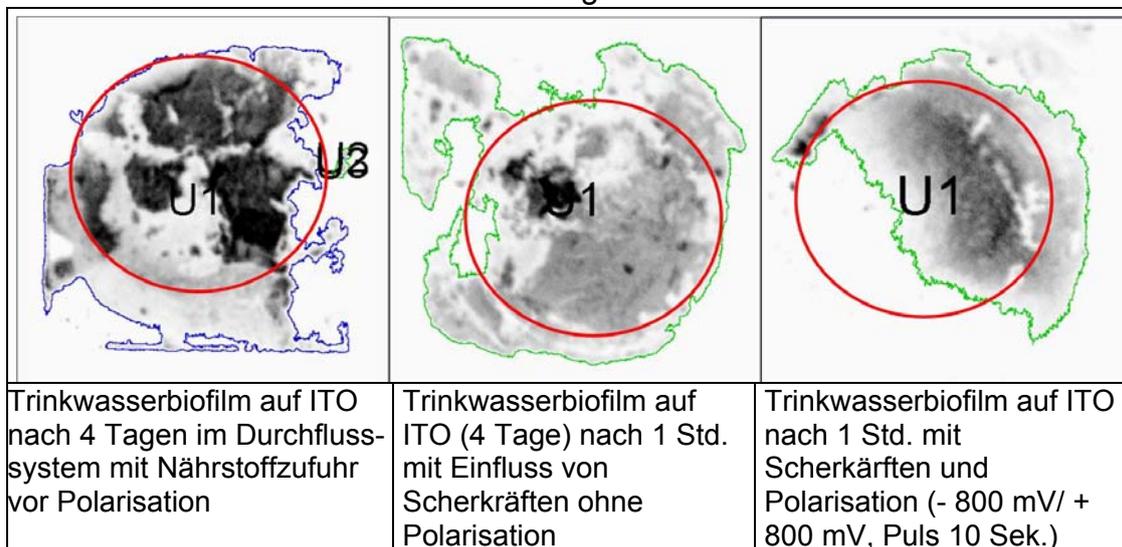


Abbildung 37: Fluoreszenzscanner-Aufnahmen von Syto 9 markierten Trinkwasserbiofilmen auf ITO.

Diese Daten deuten darauf hin, dass durch ständige Ladungsverschiebungen an der Grenzfläche zwischen Trinkwasserbiofilm und Aufwuchsfläche eine Ablösung von Trinkwasserbiofilmen in Kombination mit Scherkräften verstärkt wurde.

3.4.2 Einfluss eines gepulsten Potentials auf einen 2 Wochen alten Trinkwasserbiofilm auf ITO

Mit zunehmendem Wachstum der Bakterien und dessen Produktion extrazellulärer Polymerer Substanzen (EPS) entsteht ein Netzwerk, in dem die Wechselwirkungen zwischen Bakterienoberfläche sowie der EPS der Matrix zunehmen (siehe 1.2.2 und Abbildung 4). In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der EPS-Matrix kann die Stabilität des Biofilms zunehmen. Es sollte untersucht werden, ob elektrische Polarisation die Struktur eines zwei Wochen alten Trinkwasserbiofilms beeinflussen bzw. dessen Ablösung erreicht werden kann. Die Trinkwasserbiofilme wurden im Durchfluss mit Nährstoffzufuhr auf ITO für zwei Wochen angezchtet. Nach einmaligem Spülen mit Trinkwasser zur Entfernung des Mediums und planktonischer Bakterien wurde eine Polarisation mit einem gepulsten Potential ($- 800 \text{ mV} / + 800 \text{ mV}$; Pulsdauer 1 Minute) gestartet. Anschließend wurden die Biofilme mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie auf Biofilmstruktur und Biofilmdicke untersucht.

Im Vergleich des Kontrolltrinkwasserbiofilms mit dem polarisierten Trinkwasserbiofilm wurden keine Unterschiede in der Biofilmstruktur festgestellt. Beide Biofilme bestanden aus einem Zellrasen an der Basis (Grenzfläche Biofilm/ITO) mit dreidimensionalen Aggregaten (Zelltürme). Zwischen den Zelltürmen waren Kanäle mit einzelnen Bakterien. Die Schichtdicke der Trinkwasserbiofilme wurde an verschiedenen Punkten gemessen und schwankte zwischen $250 \mu\text{m}$ und $350 \mu\text{m}$ sowohl im Kontroll- als auch im polarisierten Trinkwasserbiofilm. Abbildung 37 (Kontrolle nicht polarisiert) und Abbildung 38 (polarisiert) zeigen repräsentative Stellen der untersuchten Trinkwasserbiofilme.

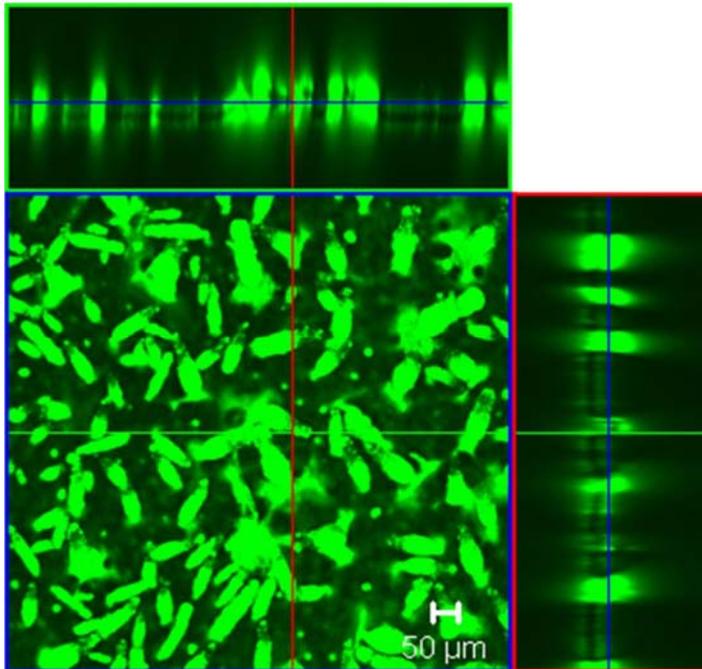


Abbildung 38: CLSM-xyz-Aufnahme (10x) eines nicht polarisierten Trinkwasserbiofilms (Kontrolle auf ITO. Gefärbt mit SYTO 9).

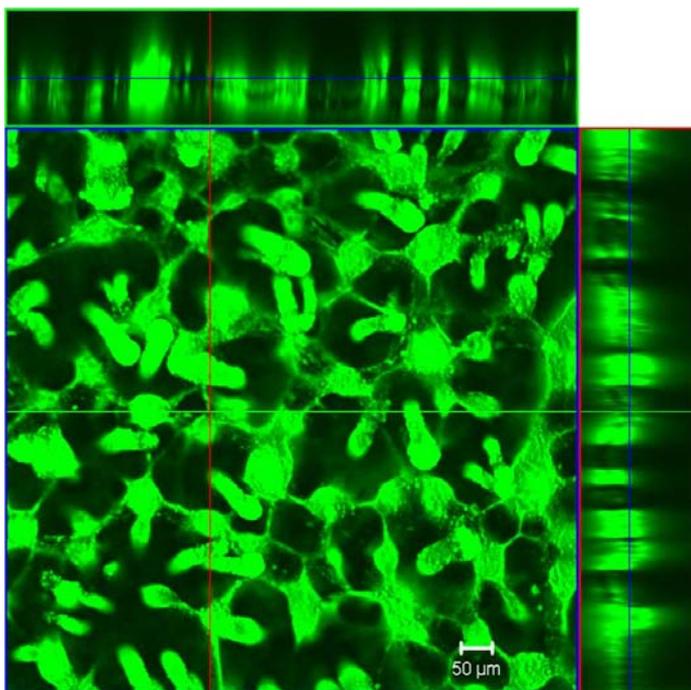


Abbildung 39: CLSM-xyz-Aufnahme (10x) eines polarisierten (- 800 mV/ + 800 mV, Pulsdauer 1 Minute) Trinkwasserbiofilms auf ITO. Gefärbt mit SYTO 9.

Die Schwankungen der Dicke der Trinkwasserbiofilme können die Folge einer Dehydration und damit Kollabierung der Biofilme während der Untersuchungen sein. Die Daten zeigen keine Unterschiede in der Schichtdicke und Struktur der Trinkwasserbiofilme nach einer gepulsten Polarisation. Daher deuten die

Ergebnisse darauf hin, dass eine Beeinflussung der elektrostatischen Kräfte durch gepulste Polarisation in einem bereits entstandenen mehrschichtigen Trinkwasserbiofilm keinen Einfluss hatte.

Die geringfügig verstärkte Ablösung eines bereits entstandenen Trinkwasserbiofilms (4 Tage) durch Veränderung der Oberflächenladung der Aufwuchsfläche könnte auf eine Schwächung anziehender Wechselwirkungen zwischen Bakterien und/oder deren EPS-Matrix und der Aufwuchsfläche zurück geführt werden. Da bei einem zwei Wochen alten Trinkwasserbiofilm keine Ablösung beobachtet wurde, scheint die in der vorliegenden Arbeit getestete Oberflächenbeeinflussung keinen Effekt auf die Wechselwirkungen der Bakterien und polarisierter ITO-Aufwuchsfläche zu haben.

3.5 Einfluss elektrischer Polarisation auf die Physiologie der Bakterien

In Abschnitt 3.2 wurde eine Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens der Bakterien auf polarisierten Aufwuchsflächen beschrieben. Bei mikroskopischer Betrachtung der anhaftenden Bakterien wurde ein Einfluss elektrischer Polarisation auf das Adhäsionsmuster (Abbildung 32) beobachtet. In Abschnitt 3.3 wurde ein Einfluss auf das Biofilmwachstum durch ständig variierende Oberflächenladung von negativ zu positiv beschrieben. Diese mikroskopisch sichtbaren Effekte elektrischer Polarisation deuten auf eine Beeinflussung der Physiologie der Bakterien hin. Eine mögliche Störung wäre die der Zellwandintegrität, des Replikationsapparates und des Zellwachstums (1.4). In folgenden Abschnitten werden mittels verschiedener Methoden nachgewiesene Einflüsse beschrieben.

3.5.1 Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Zellteilungsfähigkeit von *S. maltophilia*

Für den Nachweis einer Zellteilungsfähigkeit von Bakterien können Gyrasehemmer eingesetzt werden, welche aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf Enzyme des DNA-Replikations-Systems eine Zellteilungsfähigkeit anhand einer resultierenden Filamentbildung der gehemmenen Bakterien nachweisen (1.4.1.1). Als Gyrasehemmer wurde in der vorliegenden Arbeit die Pipemidinsäure eingesetzt.

Sowohl 20 Stunden gepulst polarisierte (- 600 mV / + 600 mV; Pulsdauer 1 Minute) als auch nicht polarisierte (Kontrolle) anhaftende *S. maltophilia* Bakterien auf ITO wurden unmittelbar in eine Pipemidinsäurebehandlung überführt. Als Negativkontrolle wurden parallel *S. maltophilia* Bakterien mit NaN_3 behandelt. Nicht polarisierte Bakterien (Kontrolle) wiesen eine Elongation um das 3 bis 5 fache ihrer Ausgangszelllänge. Polarisierte Bakterien dagegen wiesen keine Elongation auf. Bakterien der Negativkontrolle wurden mit 1 %-iger NaN_3 -Lösung getötet (2.3.3), wiesen ebenfalls keine Elongation auf (Abbildung 40).

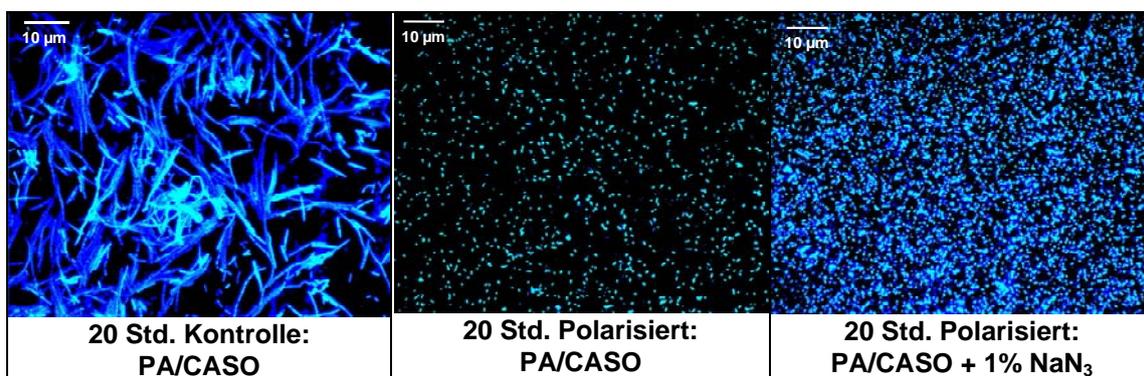


Abbildung 40: *S. maltophilia* auf ITO nicht polarisiert (Kontrolle) und polarisiert mit - 600 mV/+ 600 mV, Pulsdauer 1 min, Negativkontrolle (1 % NaN_3) Nach Behandlung mit Pipemidinsäure (25 mg/L) für 20 Stunden. Gefärbt mit DAPI.

Die Funktionalität der Methode wurde durch die Negativkontrolle bestätigt, da nicht polarisierte Bakterien durch Zugabe des Azids (Negativkontrolle) getötet wurden und unter Einsatz von PA, diese als inaktive Bakterien (nicht elongierte Zellen) nachgewiesen wurden. Da polarisierte Bakterien wie Bakterien der Negativkontrolle nicht elongierten, weist dies inaktive Bakterien nach erfolgter Polarisation nach. Es deutet auf einen Einfluss der Polarisation auf die Aktivität pipemidinsäuresensitiver Enzyme in *S. maltophilia* hin.

Um zu prüfen, ab welcher Einwirkzeit der Polarisation ein Einfluss durch die Pipemidinsäure nachweisbar ist, wurden kürzere Polarisationsdauern von 3 und 5 Stunden (- 600 mV/ + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) durchgeführt. Nach 3 bzw. 5 Stunden Primäradhäsion auf ITO wurden auf der Kontrolle $6,0 \times 10^5$ bzw. $3,4 \times 10^5$ elongierte Bakterien/cm² gezählt. Bezogen auf die Gesamtzellzahl (GZZ: $9,7 \times 10^5$ bzw. $1,0 \times 10^6$ Bakterien/cm²) sind noch mindestens 62 % bzw. 60 % Bakterien teilungsfähig (Tabelle 23).

Nach 5 Stunden Polarisation waren 12 % ($1,7 \times 10^5$ Bakterien/cm²) und nach 3 Stunden Polarisation waren 24 % ($3,2 \times 10^5$ Bakterien/cm²) der Gesamtzellzahl elongiert. In allen Negativkontrollen wurden keine elongierte Bakterien nachgewiesen (Abbildung 41, Abbildung 42).

Tabelle 23: Elongation von *S. maltophilia* in Abhängigkeit der Polarisation

Polarisationsdauer/ Probe	GZZ [Bakterien/cm²]	Anteil an GZZ [Elongierte Bakterien/cm²]	Anteil Elongierter Bakterien [%]
5 Std. Kontrolle PA / CASO	$1,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	60,0
5 Std. Polarisiert PA / CASO	$1,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	12,0
5 Std. Kontrolle PA / CASO / NaN ₃	$6,1 \times 10^5$		0
5 Std. Polarisiert PA / CASO / NaN ₃	$1,2 \times 10^6$		0
3 Std. Kontrolle PA / CASO	$9,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	62,0
3 Std. Polarisiert PA / CASO	$1,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	24,0
3 Std. Kontrolle PA / CASO / NaN ₃	$3,5 \times 10^5$		0
3 Std. Polarisiert PA / CASO / NaN ₃	$9,0 \times 10^5$		0

In Abbildung 41 (oben) ist die Zelllänge der nicht polarisierten (Kontrolle) und 5 Stunden polarisierten *S. maltophilia* Bakterien nach Inkubation in CASO (1:400) mit 25 mg/L PA + 1 % NaN₃ zu sehen. Die nicht elongierten Bakterien in Anwesenheit von Nährstoffen und der Pipemidinsäure weisen eine Abtötung der Bakterien durch das NaN₃ nach. Eine Inkubation der nicht polarisierten (Kontrolle) und polarisierten *S. maltophilia* Bakterien in CASO (1:400) mit 25 mg/L PA ohne NaN₃ resultiert deutlich elongierte Zellen (Abbildung 41 unten). In der Kontrolle sind 2 x, 3 x und 4 x fach elongierte Zellen markiert.

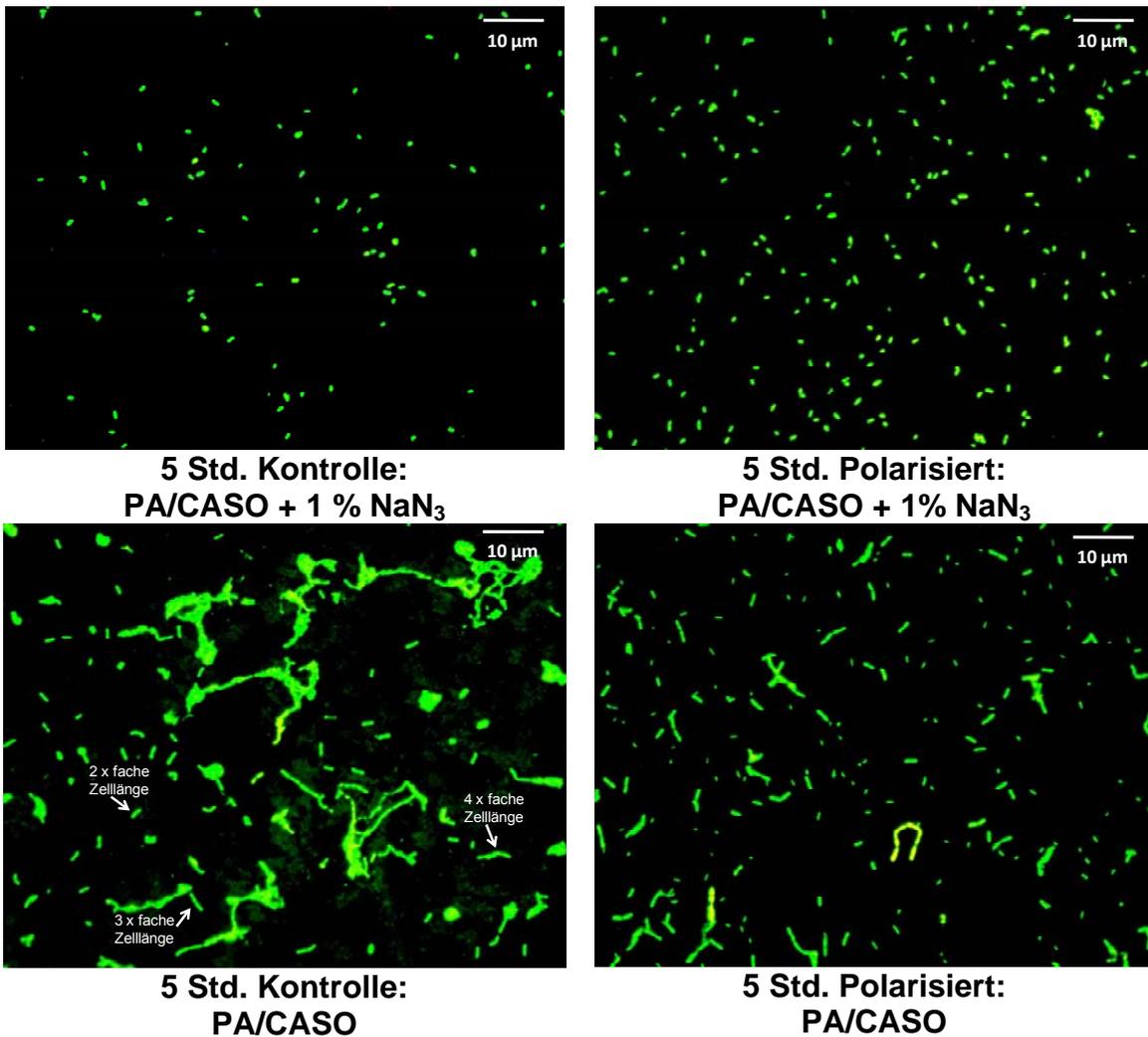


Abbildung 41: *S. maltophilia* Kontrolle und Polarisiert (5 Stunden: - 600 mV/ + 600 mV, Puls 1 Minute) auf ITO nach 24 Stunden mit PA/CASO (unten) und die Negativkontrollen mit PA/CASO/NaN₃ (oben).

Die Zelllänge der nicht polarisierten (Kontrolle) und für 3 Stunden polarisierten *S. maltophilia* Bakterien nach Inkubation in CASO (1:400) mit 25 mg/L PA + 1 % NaN₃ ist in Abbildung 42 zu sehen. Die nicht elongierten Bakterien in Anwesenheit von Nährstoffen und der Pipemidinsäure weisen eine Abtötung der Bakterien durch das NaN₃ nach. Die Inkubation der nicht polarisierten (Kontrolle) und polarisierten *S. maltophilia* Bakterien in CASO (1:400) mit 25 mg/L PA ohne NaN₃ führt zu deutlich elongierte Zellen (Abbildung 42 unten). In der Kontrolle ohne NaN₃ sind 2 x und 4 x fach elongierte Zellen markiert.

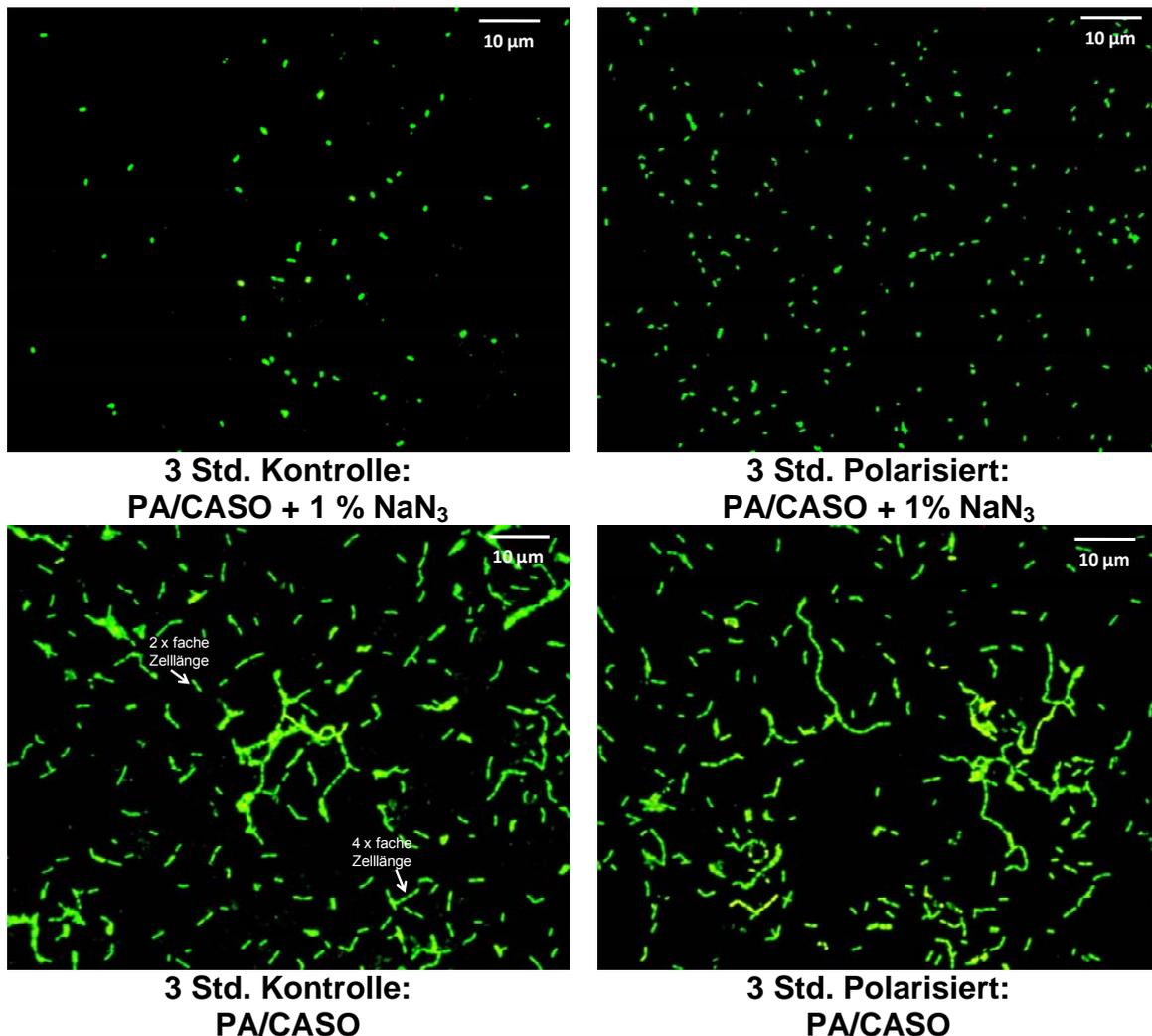


Abbildung 42: *S. maltophilia* Kontrolle und Polarisiert (3 Stunden: - 600 mV/ + 600 mV, Puls 1 Minute) auf ITO nach 24 Stunden mit PA/CASO (unten) und die Negativkontrollen mit PA/CASO/NaN₃ (oben).

Mit zunehmender Polarisationsdauer nahm die Anzahl elongierter Bakterien an der GZZ ab. Dies zeigt, dass eine Abnahme der Teilungsfähigkeit der Bakterien von der Einwirkzeit der Polarisation abhängig war. Die mit PA nachgewiesene Schädigung deutet auf eine zeitabhängige Inaktivierung der Bakterien durch elektrische Polarisation.

3.5.2 Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Zellteilungsfähigkeit von Trinkwasserbakterien

Analog zu Versuchen mit *S. maltophilia* wurden Trinkwasserbakterien (Kontrolle/Polarisiert) nach Anpassung der Bedingungen der Methode für 28 Stunden mit Pipemidinsäure behandelt. Bakterien auf der Kontrolle waren deutlich elongiert. Im Vergleich dazu sind nahezu keine Bakterien auf dem

polarisierten ITO elongiert. (Abbildung 43). Die Längenunterschiede in der Kontrolle können z.B. durch die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit oder Sensitivität gegenüber der Pipemidinsäure bedingt sein, da es eine undefinierte Trinkwassermischpopulation ist.

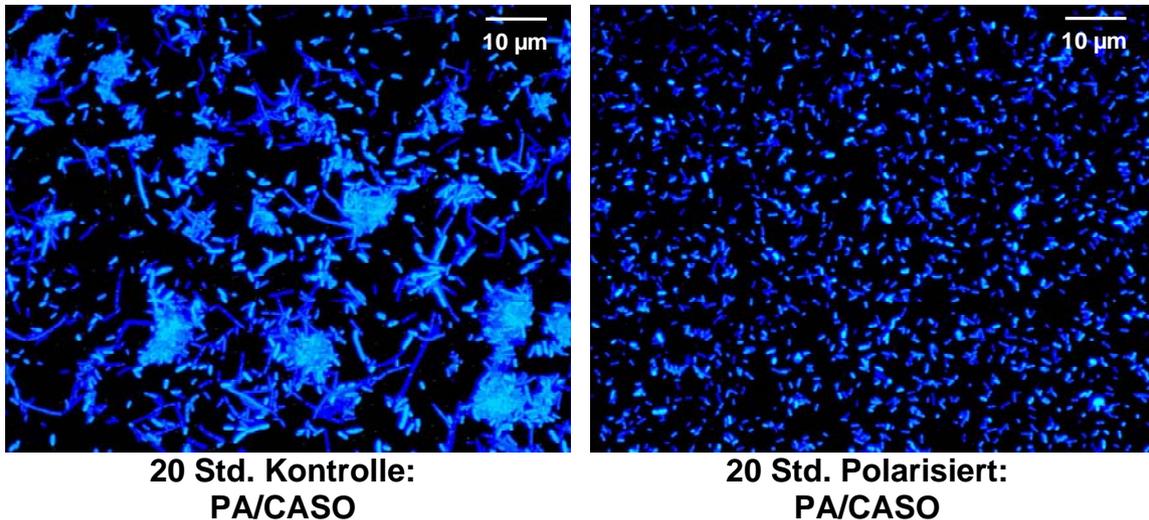


Abbildung 43: Trinkwasserbakterien Kontrolle und Polarisiert (20 Stunden: - 600 mV/+ 600 mV, Pulsdauer 1 min) auf ITO nach Behandlung mit Pipemidinsäure (30 mg/L) für 28 Stunden.

Die Elongation der Trinkwasserbakterien in der Kontrolle weist teilungsfähige und aktive Bakterien nach. Im Vergleich dazu zeigt die fehlende Elongation der polarisierten Trinkwasserbakterien einen Einfluss der Polarisation auf die Aktivität der pipemidinsäuresensitiven Enzyme und auf das Zellwachstum.

3.5.3 Einfluss eines gepulsten Potentials auf den ATP-Gehalt der Trinkwasserbakterien

Im vorherigen Abschnitt wurde eine schädigende Wirkung elektrischer Polarisation auf die Zellteilungsfähigkeit beschrieben, die mit der DNA-Replikation (1.4.1) einhergeht. An diesen Prozessen sind verschiedene ATP-abhängige Enzyme wie z. B. die zuvor erwähnte Gyrase beteiligt. Folglich wäre es möglich, dass die geschädigte Zellteilungsfähigkeit auf eine reduzierte/fehlende Enzymaktivität zurückgeführt werden kann. Ein Indiz für eine geringe Enzymaktivität wäre ein herabgesetzter ATP-Gehalt in polarisierten Bakterien.

Daher wurden nach gepulster Polarisation (- 600 / + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) für 7 Tage die Trinkwasserbiofilme isoliert und suspendiert. Um eine homogene Bakteriensuspension zu erhalten, wurde diese mehrfach mittels

einer Spritze durch eine Kanüle (\varnothing 0,2 μm) disaggregiert. Anschließend wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der polarisierten und nicht polarisierten Bakterien mittels des High-Lite Kits (2.9.1) gemessen und auf Femtogramm pro Zelle berechnet (Abbildung 44).

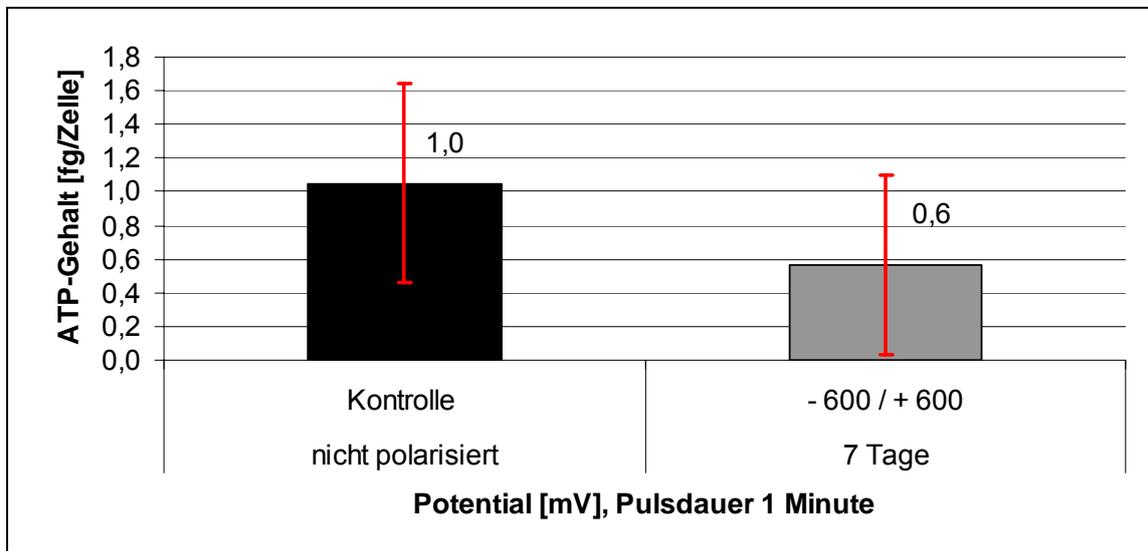


Abbildung 44: ATP-Gehalt (Mittelwert aus $n=3$) nicht polarisierter (Kontrolle) und 7 Tage gepulst polarisierter (- 600 mV / + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) Bakterien eines Trinkwasserbiofilms.

Bakterien aus einem nicht polarisierten Trinkwasserbiofilm enthielten 1,0 fg ATP pro Zelle. Im Vergleich dazu war der ATP-Gehalt polarisierter Bakterien des Trinkwasserbiofilm mit 0,6 fg/Zelle geringer. Obwohl die Proben homogenisiert wurden, fällt eine hohe Standardabweichung auf. Die mittels Pipemidinsäure nachgewiesene Inaktivierung der bakteriellen Zellteilungsfähigkeit scheint mit einer reduzierten Enzymaktivität aufgrund herabgesetzter ATP-Verfügbarkeit zusammen zu hängen. Dies stützt die Annahme einer Beeinträchtigung der bakteriellen Aktivität durch elektrische Polarisation.

3.5.4 Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Membranintegrität von Trinkwasserbakterien

Der herabgesetzte ATP-Gehalt in polarisierten Bakterien könnte auf eine geschädigte Membranintegrität bzw. herabgesetztes Membranpotential zurückgeführt werden, da die Aktivität der ATP-Synthase unter anderem von der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten sowie der Protonentranslokation abhängig ist (siehe 1.4.2). Es gibt verschiedene Methoden zur Detektion des Zustandes der Membranintegrität bzw. des Membranpotentials,

die auf dem Eindringen von Fluoreszenzfarbstoffen in die Bakterienzelle basieren (siehe 1.4.3). In der vorliegenden Arbeit wurde die PMA-Behandlung eingesetzt, da Propidiummonoazid (PMA) aufgrund seiner doppelt positiven Ladung stärker von intakten Bakterien abgestoßen wird und damit selektiver in geschädigte Bakterien eindringt. Ferner blockiert PMA die DNA in geschädigten Bakterien, wodurch mittels molekularbiologischer Methoden eine Schädigung der Membranintegrität nachgewiesen werden kann (Nocker et al. 2006, 2007). Sollte eine Schädigung nachgewiesen werden, sollte untersucht werden, ob diese letal ist oder ob die Bakterien nach einer Regenerationszeit sich wieder erholen.

Um also eine Membranschädigung durch elektrische Polarisation (7 Tage, - 600 mV/ +600 mV, Pulsdauer) zu prüfen, wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht. Zum einen wurden Trinkwasserbiofilme direkt nach Polarisation in die PMA-Behandlung überführt. Zum anderen wurden Trinkwasserbiofilme auf ITO nach Polarisation zunächst in eine CASO-Bouillon überführt, um ohne Einwirkung einer Polarisation und von Scherkräften für 24 Stunden im Batch ruhend zu regenerieren. Anschließend wurden diese Biofilme ebenfalls mit PMA behandelt. Als Positivkontrolle der PMA-Behandlung wurden hitzegeschädigte Bakterien eingesetzt (2.7.6.1).

Nach der PMA-Behandlung wurde die DNA isoliert (2.8.2) in eine quantitative PCR eingesetzt. Die DNA intakter Bakterien wird in der quantitativen PCR vervielfältigt, da PMA nicht in die Zellen eingedrungen ist. Dagegen wurde die DNA in membrangeschädigten Bakterien durch PMA blockiert und wird folglich in der quantitativen PCR nicht vervielfältigt. Anhand der ct-Werte der quantitativen PCR wurden verschiedene Δ -ct-Werte ermittelt, an denen Effekte elektrischer Polarisation auf die Membranintegrität beschrieben werden (Tabelle 24 und Tabelle 25).

Der Δ -ct-Wert +PMA/-PMA zeigt, ob und wie viel DNA durch PMA blockiert wurde. Bei den polarisierten Bakterien liegt der Δ -ct-Wert im Vergleich mit PMA und ohne PMA Behandlung bei 2,89. Bei der Kontrolle ergibt der gleiche Vergleich einen Δ -ct-Wert von 2,57. Nach Regeneration beträgt der Δ -ct-Wert der polarisierten Bakterien 3,39 und der Kontrollen 3,18. Im Vergleich +PMA/-PMA liegen die Werte der regenerierten und nicht regenerierten Proben unter Einbezug der Streuung sehr nahe bei einander. Unabhängig von der Polarisation und Regeneration wurde stets ungefähr eine Log-Stufe der Bakterien von PMA penetriert und deren DNA blockiert. Dies deutet darauf hin,

dass sowohl die Polarisierung als auch die anschließende Regeneration keinen Einfluss auf die Membranintegrität der Trinkwasserbakterien hatten.

Der +PMA/-PMA Vergleich der Positivkontrolle zeigte, dass nach Hitzebehandlung (Δ ct-Wert = 15,03) 4 Log-Stufen mehr Bakterien von PMA penetriert wurden als ohne Hitzebehandlung (Δ ct-Wert = 1,75). Dies weist eine Schädigung der Trinkwasserbakterien durch Hitze nach und damit die Eignung dieser Methode, Veränderungen der Membranintegrität nachzuweisen.

In einem weiteren Vergleich wurden die ct-Werte zwischen Polarisiert (23,18) und Kontrolle (22,68) nach PMA-Behandlung (+PMA_pol/+PMA_K) und die ct-Werte zwischen Polarisiert (20,29) und Kontrolle (20,11) ohne PMA-Behandlung (-PMA_pol/-PMA_K) herangezogen. Eine Regeneration zeigte in den analogen Vergleichen ebenfalls keine Unterschiede. Da die Unterschiede im Bereich der Streuung ($0,33 \pm 0,31$) liegen, kann ein Einfluss elektrischer Polarisierung auf die Membranintegrität ausgeschlossen werden.

Der analoge Vergleich in der Positivkontrolle nach und vor Hitzebehandlung mit PMA (Δ ct-Wert = 14,09) weist eine deutlich höhere Durchlässigkeit der Bakterien für PMA und damit eine Schädigung der Membranintegrität durch Hitze nach. Der Δ ct-Wert mit PMA von 14,09 zeigt im Vergleich zum ct-Wert ohne PMA von 0,81 die Effizienz des PMAs, DNA aus membrangeschädigten Bakterien zu binden und für eine PCR zu blockieren.

Tabelle 24: Zusammenfassung aller ct- und Δ ct-Werte der quantitativen (RT) -PCR PMA-behandelter Trinkwasserbakterien nach Polarisierung

Proben Polarisierung und PMA-Behandlung	Mittelwert^[*] ct-Werte (1:10)	Δct-Wert +PMA/ -PMA	Δct-Wert +PMA_pol/ +PMA_K	Δct-Wert -PMA_pol/ -PMA_K
polarisiert mit PMA	23,18	2,89	0,50	0,18
polarisiert ohne PMA	20,29			
Kontrolle mit PMA	22,68	2,57		
Kontrolle ohne PMA	20,11			
polarisiert/regeneriert mit PMA	18,48	3,39	-0,04	-0,26
polarisiert/regeneriert ohne PMA	15,09			
Kontrolle/regeneriert mit PMA	18,52	3,18		
Kontrolle/regeneriert ohne PMA	15,35			

[*]Die Standardabweichung der ct-Werte lag bei $0,33 \pm 0,31$.

Tabelle 25: Zusammenfassung aller ct- und Δ ct-Werte der quantitativen (RT) -PCR mit PMA- behandelter Trinkwasserbakterien nach Hitzebehandlung (Positivkontrolle)

Proben	Mittelwerte ^[**] ct-Werte (1:100)	Δ ct-Wert +PMA/ -PMA	Δ ct-Wert +PMA-70°C/ +PMA-20°C	Δ ct-Wert -PMA-70°C/ -PMA-20°C
TW Hitze mit PMA	30,1	15,03	14,09	0,81
TW Hitze ohne PMA	15,0			
TW mit PMA	16,0	1,75		
TW ohne PMA	14,2			

[**]Die Standardabweichung der ct-Werte lag bei $0,11 \pm 0,06$

Die Δ ct-Werte der quantitativen PCR der Positivkontrolle zeigen, dass PMA nur in geschädigte Bakterien eindringen kann und deren DNA selektiv blockiert. Durch die blockierte DNA konnte mittels der quantitativen PCR eine Schädigung der Membranintegrität der Trinkwasserbakterien durch Hitze nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigen die Δ ct-Werte der quantitativen PCR der Trinkwasserbakterien nach Polarisation bzw. Regeneration, dass ein über 7 Tage gepulstes Potential ($-600 / +600$ mV) keinen nachweisbaren Einfluss auf die Membranintegrität von Trinkwasserbakterien hatte. Dies deutet darauf hin, dass eine elektrische Polarisation keinen nachweisbaren Einfluss auf die Membranintegrität hatte und der reduzierte ATP-Gehalt polarisierter Bakterien nicht allein mit einer Schädigung der Membranintegrität zusammenhängt.

3.5.5 Einfluss eines gepulsten Potentials auf den RNA-Gehalt eines Trinkwasserbiofilms

Eine weitere Aussage über die bakterielle Aktivität kann der Anteil an ribosomal aktiven Bakterien erlauben (1.4.4). Die Proteinsynthese, also Translation der mRNA zu Proteinen an den Ribosomen, ist unter anderem von ATP abhängig, da durch Umsetzung von ATP zu Aminoacyl-AMP + PP_i zunächst die Aminosäuren aktiviert und mit der zugehörigen tRNA verknüpft werden. Daher wurde untersucht, welche ribosomale Aktivität polarisierte Bakterien im Vergleich zu nicht polarisierten Bakterien aufweisen.

Zum Nachweis ribosomaler Aktivität der Bakterien wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH-Technik) eingesetzt. Dazu wurden die Bakterien der Trinkwasserbiofilme direkt nach Polarisation abgeschabt und die Mikroorganismen entsprechend der Methode fixiert und mit der 16S RNA-Sonde EUB338 für Eubakterien (EUB) markiert. Der Anteil an EUB-positiven Bakterien wurde im Verhältnis zur Gesamtzellzahl betrachtet. Innerhalb einer Gesamtzellzahl (GZZ) eines 7 Tage nicht polarisierten Trinkwasserbiofilms ($9,1 \times 10^4$ Bakterien/cm²) wurden 60 % der Bakterien ($5,3 \times 10^4$ Bakterien/cm²) mit der EUB338-Sonde nachgewiesen. Im Vergleich dazu war der Anteil an EUB338 nachweisbaren Bakterien in einer Gesamtpopulation eines 7 Tage polarisierten Trinkwasserbiofilms ($6,4 \times 10^4$ Bakterien/cm²) geringer. In diesem wurden 11 % der Bakterien ($7,2 \times 10^3$ Bakterien/cm²) mit der RNA-abhängigen EUB338-Sonde nachgewiesen. (Abbildung 45).

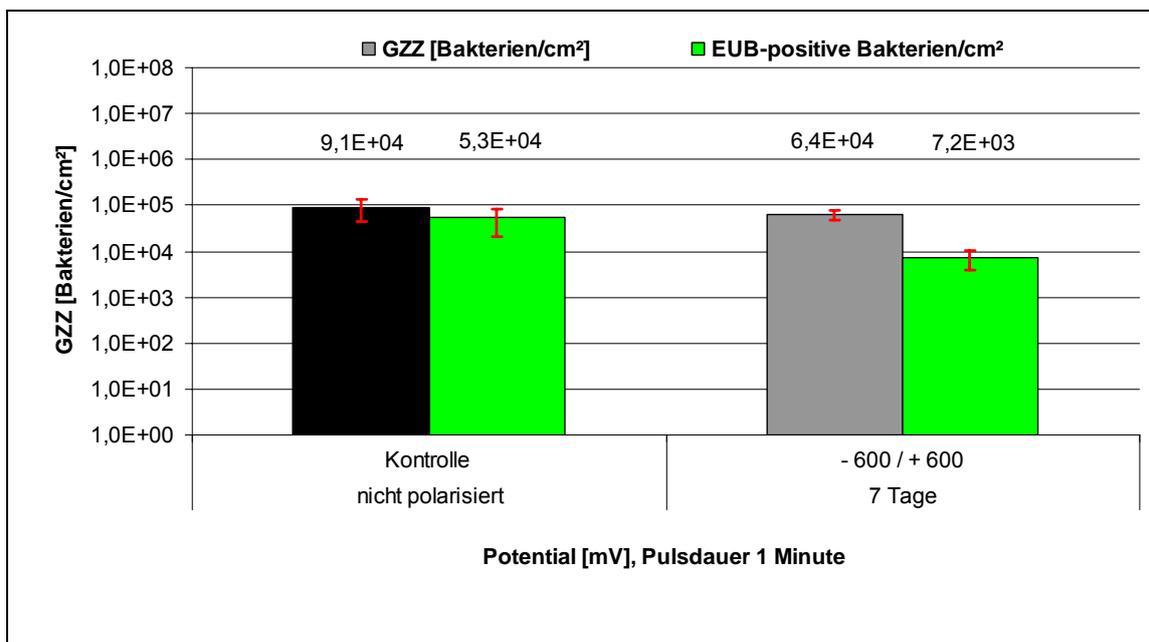


Abbildung 45: Nachweis (n=4) von Eubakterien mittels der EUB 338-Sonde in 7 Tage polarisierten (- 600 mV / + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) und nicht polarisierten Trinkwasserbiofilmen (Kontrolle). Schwarz/Grau Balken zeigen die Gesamtzellzahl (GZZ), Grün Balken stellen die EUB-markierten Bakterien dar.

Die Daten zeigen, dass nach Polarisation mit der EUB338-Sonde im Verhältnis zur Gesamtzellzahl 50 % weniger ribosomal aktive Trinkwasserbakterien nachgewiesen wurden.

Im Zusammenhang mit der geschädigten Zellteilungsfähigkeit (3.5.1 und 3.5.2) und dem herabgesetzten ATP-Gehalt (3.5.3) deuten diese Daten auf eine

Beeinflussung der Physiologie der Bakterien und Beeinträchtigung der bakteriellen Aktivität durch elektrische Polarisierung hin. Nicht auszuschließen ist, dass die veränderte bakterielle Aktivität auch mit einer Veränderung der Populationsdiversität der Trinkwasserbiofilme zusammenhängt.

3.5.6 Einfluss eines gepulsten Potentials auf die Populationsdiversität von Trinkwasserbiofilmen

Wie in vorherigen Abschnitten beschrieben, wurde eine reduzierte bakterielle Aktivität polarisierter Trinkwasserbiofilme festgestellt. Unter anderem wurde eine reduzierte ribosomale Aktivität mittels FISH nachgewiesen. Dies kann die Folge einer Schädigung der Bakterien und zu geringen ATP-Gehalten sein, aber auch eine veränderte Populationsdiversität mit unterschiedlichen ribosomalen Aktivitäten kann die Ursache sein. Daher wurde untersucht, ob eine gepulste Polarisierung (7 Tage, -600 mV/ $+600$ mV, Pulsdauer 1 Minute) einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Population der Trinkwasserbiofilme hat. Sollte die Population polarisierter Trinkwasserbiofilme verändert sein, sollte geprüft werden, ob diese sich nach Abschalten der Polarisierung erneut verändert.

Dazu wurde dieselbe, bereits für die quantitative PCR (3.5.5) isolierte, DNA für eine PCR und denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE) eingesetzt. Mit dieser Methode werden in einer vorangehenden PCR vervielfältigte 16S rDNA-Fragmente abhängig von ihrem GC-Gehalt im Harnstoff-Formamid-Gradienten aufgetrennt (2.10.2). Das entstandene Bandenmuster spiegelt die Diversität der verwendeten Population wieder. Dabei enthält jede Bande gleicher Retention im Gel DNA-Fragmente gleicher Sequenz mit gleichem Schmelzverhalten und entspricht damit einer Bakterienart. Die Populationsdiversität der nicht polarisierten (Kontrolle) und polarisierten Trinkwasserbiofilme ist in Abbildung 46 erkennbar. Die ersten vier Spuren spiegeln die Population des Trinkwasserbiofilms direkt nach Polarisierung wieder. Die Population der Trinkwasserbiofilme nach 24 Stunden Regeneration ist in der rechten Hälfte des DGGE-Gels zu sehen. Unterschiede im Bandenmuster wurden durch Nummern oberhalb der horizontalen Linien gekennzeichnet.

Der Vergleich der zusammengehörigen Banden mit (+PMA) und ohne (-PMA) PMA zeigt bei den Banden Nr. 2 und Nr. 5 Unterschiede. Bande Nr. 2 ist in den Proben ohne Regeneration sowohl ohne als auch mit PMA in der Kontrolle

deutlich erkennbar, aber nicht im polarisierten Biofilm. Dieselbe Bande wurde nach Regeneration ohne PMA aber nicht mit PMA im polarisierten Biofilm sichtbar. Bande Nr. 5 ist im polarisierten Biofilm nur ohne PMA sichtbar. Nach Regeneration ist diese Bande in keiner Spur erkennbar. Dies zeigt, dass die Membran der durch Bande Nr. 2 und Nr. 5 repräsentierten Bakterienarten nach Polarisation für PMA durchlässig war. Vor Regeneration war bei Bakterienart Nr. 2 anscheinend nicht ausreichend Biomasse für einen solchen Nachweis vorhanden. Bei den anderen Bakterienarten hatte die Polarisation keinen Einfluss auf deren Membranintegrität (siehe auch 3.5.4). Nach Regeneration (rechter Teil des Geles) sind keine Unterschiede in Abhängigkeit der PMA-Behandlung nachweisbar und Bande Nr. 5 ist in keiner Probe mehr nachweisbar. Obwohl die quantitative PCR der gesamten Trinkwasser-Mischpopulation keinen Unterschied in der Membranintegrität in Abhängigkeit einer Polarisation zeigte, weist die PCR-DGGE durch die Auftrennung der Mischpopulation derselben Proben in einer Bakterienart auf eine Beeinträchtigung der Membranintegrität hin.

Unterschiede in der Diversität der Population der Trinkwasserbiofilme mit Polarisation und ohne Polarisation (Kontrolle) werden an den 5 Banden sichtbar. Direkt nach Polarisation fehlten die Banden Nr. 1, Nr. 2, und Nr. 4 in der Spur der polarisierten Trinkwasserbiofilme, wogegen diese Banden in der Spur der Kontrolle nachweisbar waren. Die Bakterienart repräsentiert durch Bande Nr. 3 war im polarisierten Trinkwasserbiofilm, aber nicht in der Kontrolle nachweisbar. Die Bakterien der Bande Nr. 5 waren sowohl im polarisierten als auch nicht polarisierten Biofilm nachweisbar. Die Unterschiede im Bandenmuster deuten darauf hin, dass während der Polarisation einige Bakterienarten verstärkt abgestoßen und andere besonders angezogen wurden bzw. trotz Polarisation der Aufwuchsfläche im Gegensatz zu anderen Bakterien wachsen konnten.

Nach Regeneration der Trinkwasserbiofilme verändert sich das Bandenmuster. Bande Nr. 1, die in den Kontrollen, aber nicht im polarisierten Biofilm ohne Regeneration vorhanden war, fehlt nach der Regeneration überall. Bande Nr. 2 fehlte vor Regeneration bei den polarisierten Trinkwasserbiofilmen, aber nicht in der Kontrolle. Nach Regeneration wurde Bande Nr. 2 in beiden Spuren (Kontrolle + Polarisiert) ohne PMA sichtbar. Dieselbe Bande Nr. 2 fehlte in der Spur der polarisierten Bakterien mit PMA nach wie vor. In der regenerierten Kontrolle war die Bande Nr. 2 sowohl ohne auch als mit PMA nachweisbar. Der Bakterienstamm, repräsentiert von Bande Nr. 4, war direkt nach Polarisation

nicht nachweisbar. Nach Regeneration wurden diese Bakterien sowohl in der Kontrolle als auch im polarisierten Trinkwasserbiofilm nachgewiesen. Die durch Bande 5 vertretene Bakterienart, die vor Regeneration vorhanden (Kontrolle + Polarisiert) war, war nach Regeneration in keinem Biofilm mehr nachweisbar. Die Bande Nr. 3, die in der Kontrolle direkt nach Polarisation fehlte, war nach Regeneration sowohl in den Kontrollen als auch im polarisierten Biofilm deutlich zu erkennen.

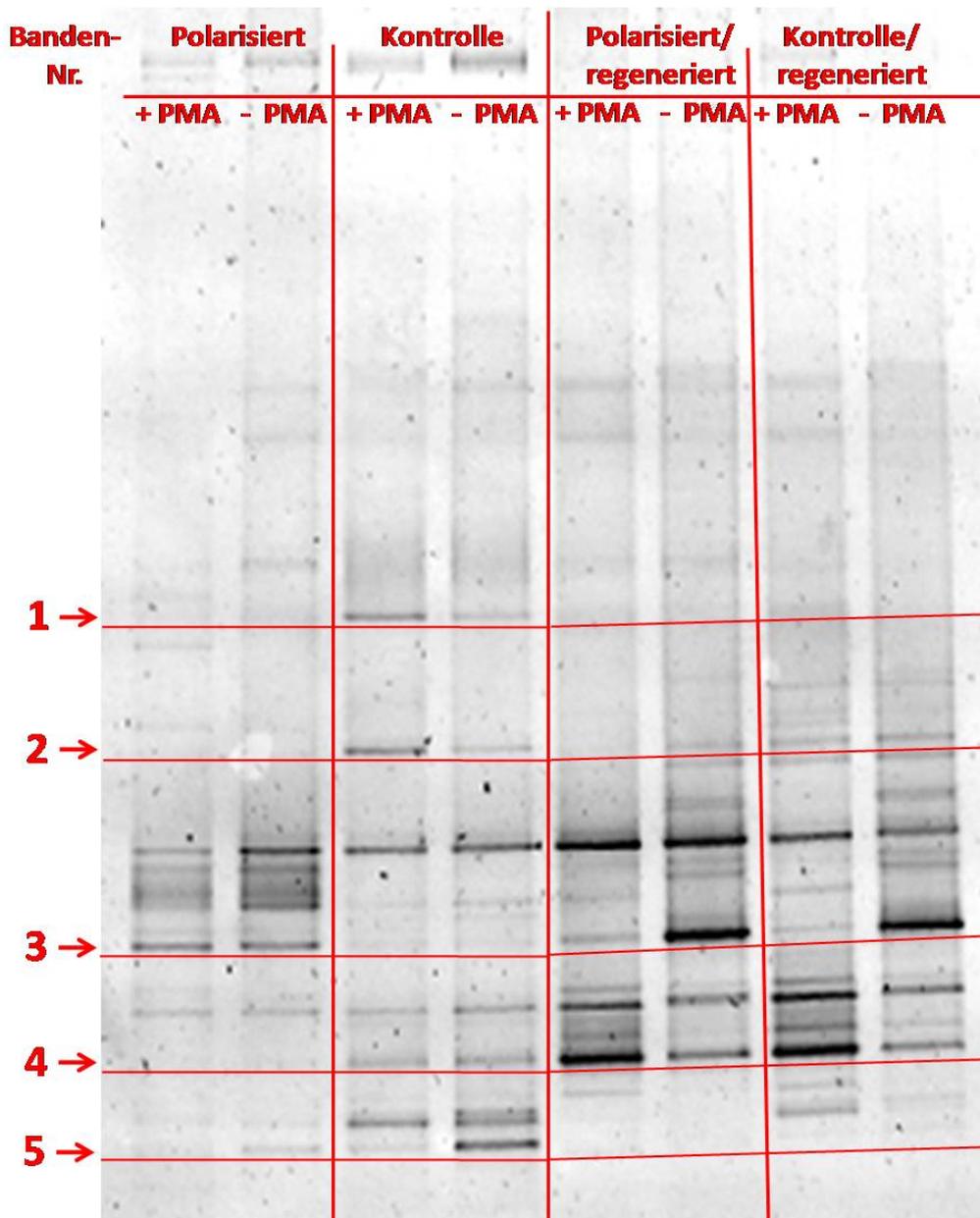


Abbildung 46: DGGE-Gel der aus 7 Tage polarisierten (- 600 mV/ + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) und nicht polarisierten Trinkwasserbiofilmen vor und nach Regeneration isolierten DNA mit und ohne PMA-Behandlung.

Diese Ergebnisse zeigen unterschiedliche Bandenmuster in Abhängigkeit einer Einwirkung durch elektrische Polarisation der Aufwuchsfläche. Dies weist darauf hin, dass während einer anhaltend gepulsten Polarisation (– 600 mV/ + 600 mV, Pulsdauer 1 Minute) über 7 Tage ein Einfluss auf die Populationdiversität eines Trinkwasserbiofilms herrscht. Wurde die Polarisation ausgeschaltet und die Trinkwasserbiofilme regeneriert, veränderte sich die Population desselben Biofilms erneut.

In Bezug auf einen Einfluss auf die Membranintegrität durch elektrische Polarisation, konnte im Gegensatz zur quantitativen PCR mittels PCR-DGGE ein Hinweis für eine herabgesetzte Integrität der Membranen einzelner Bakterienarten der Mischpopulation gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung eines mikrobiologisch-elektrochemischen Testsystems

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einflüsse elektrischer Polarisation einer Aufwuchsfläche auf die bakterielle Biofilmbildung auf dieser Aufwuchsfläche und die Physiologie der anhaftenden Bakterien zu untersuchen. Die Voraussetzung für die Beeinflussung der Oberflächenladung einer Aufwuchsfläche durch elektrische Polarisation war ein mikrobiologisch-elektrochemisches Testsystem. Für eine Manipulation der Oberflächenladung waren elektrisch leitfähige Aufwuchsflächen erforderlich. Diese wurden in Flanschzellen im Batch- bzw. Durchflusssystem eingesetzt, die mit einem Elektrolyten mit Bakterien exponiert waren. Mit der Drei-Elektroden-Anordnung, bestehend aus Arbeitselektrode (Aufwuchsfläche), Referenzelektrode und Gegenelektrode, wurde eine elektrochemische Zelle vervollständigt. In diesem Aufbau wurden Polarisationsroutinen eingesetzt, um an der Aufwuchsfläche verschiedene Oberflächenladungen zu testen.

Als elektrisch leitfähige Aufwuchsflächen wurden Indiumzinnoxid beschichtete Glascoupons (ITO) und Polypyrrol (PPy) verwendet. ITO-Coupons sind aufgrund ihrer durchsichtigen Eigenschaft sehr gut für mikrobiologische bzw. molekularbiologische Anwendungen und mikroskopische Auswertung geeignet. Raptis et al. 2008 und Tomai et al. 2003 verwendeten ITO-Coupons um auf ITO anhaftende und gewachsene Zellen einer Elektroporation zu unterziehen. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer yellow konnte Raptis et al. 2008 die Zellen nach Elektroporation ohne weitere Schritte direkt mikroskopisch untersuchen und auswerten (Raptis et al. 1995). Eine weitere elektrochemische Anwendung von ITO hat Yang et al. 2004 getestet. Er setzte ITO als Biosensor ein, um die Wirkung von Antikörpern gegen immobilisierte *E. coli* in Abhängigkeit eines Elektronentransfers auf die Bakterien zu untersuchen. Poortinga et al. 1999 und 2001b setzten ITO ein, um das Adhäsionsverhalten von Bakterien aus der Mundhöhle in Abhängigkeit eines angelegten Stroms zu untersuchen. In diesen Arbeiten konnte auf ITO ein Potential von + 1800 mV bis – 500 mV angelegt werden und erwies sich als stabile elektrisch leitende Oberfläche. Im Vergleich zu den Arbeiten von Poortinga wurden in der vorliegenden Arbeit geringere Potentiale von maximal – 800 mV/ – 600 mV bis + 800 mV/ + 600 mV polarisiert. Eine Beeinträchtigung der Zinnoxidschicht wurde erst bei einem

angelegten Strom von $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ festgestellt (3.1.1). Bei dieser Stromstärke wurde das Zinnoxid reduziert, was als Metallspiegel auf dem polarisierten ITO sichtbar wurde (Abbildung 18). Während der vergebene Strom auf dem ITO angelegt war, wurde mittels der Ag/AgCl-Referenzelektrode das entstandene Potential gemessen. Diese Messung zeigte nach 3 Stunden einen Anstieg des Potentials von $+ 1000 \text{ mV}$ auf über $+ 3000 \text{ mV}$. Ein Potentialanstieg ist stets der Hinweis, dass das Elektrodenmaterial durch die gewählten Bedingungen elektrochemisch zersetzt wird (Matyeva et al. 2005). Um diese irreversible Schädigung von ITO durch Einwirkung hoher Stromstärken zu vermeiden, wurden die Polarisationsroutinen angepasst. Dazu wurden die Versuche auf potentiostatische Bedingungen umgestellt. Die Veränderung des Oberflächenpotentials von ITO wurde im Bereich von $- 800 \text{ mV}$ bis $+ 800 \text{ mV}$ für maximal 5 Stunden konstant polarisiert. Eine gepulste Potentialverschiebung durch ständiges Umschalten von kathodischen zu anodischen Bedingungen ermöglicht eine reversible Veränderung und damit Regeneration des Indiumzinnoxids (Matyeva et al. 2005). Daher wurden Polarisationsroutinen mit Pulsen von $- 600 \text{ mV} / + 600 \text{ mV}$ mit einer jeweiligen Pulsdauer von 1 Minute durchgeführt. Diese Polarisation konnte stabil über mehrere Tage geschaltet werden (Tabelle 21). Die dabei über 7 Tage gemessenen Stromstärken (angegeben als Stromdichte mA/cm^2) waren mit maximal $- 0,02 \text{ mA}/\text{cm}^2$ und $+ 0,001 \text{ mA}/\text{cm}^2$ sehr gering. In Anlehnung an die elektrochemischen Analysen von Matyeva et al. 2005 ist eine irreversible Schädigung von ITO unter den gewählten Bedingungen in der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich. Somit konnte ITO als stabiles Elektrodenmaterial in dem verwendeten Testsystem eingesetzt werden.

Für eine reproduzierbare Durchführung wurden die gewählten Polarisationsroutinen in der EcmWin Software programmiert. In diesen Programmen wurden die Pulsdauer (10 Sekunden bzw. 1 Minute) sowie die Polarisationsdauer (5 Stunden bis 7 Tage) und die Stärke der Polarisationsart (Strom/Potential) definiert. Nach erfolgter Polarisation folgte stets die Datenauswertung. Dazu wurden die Daten der EcmWin software in Excel importiert und hinsichtlich der vorgegebenen Bedingungen (Stromdichte/Potential) und entstandenen Potential/Strom ausgewertet. Als weitere Kontrollparameter wurden der pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit des Elektrolyten in Abhängigkeit der Temperatur vor und nach Polarisation gemessen. Der pH-Wert des synthetischen TW in Batchsystemen lag vor Polarisation stets bei 7,5. Nach Polarisation wurde ein pH-Wert von maximal 8,5 gemessen. Die Leitfähigkeit

wurde vor Polarisation auf $550 \mu\text{S}/\text{cm}$ bestimmt und stieg nach Polarisation auf maximal $650 \mu\text{S}/\text{cm}$. Die Änderungen waren gering und bei allen Versuchen reproduzierbar. Im Bezug zum realen Trinkwasser liegen die Änderung des pH-Wertes sowie der elektrischen Leitfähigkeit des synthetischen TW im Bereich der Vorgaben nach der Trinkwasserverordnung TrinkwV2001. Diese schreibt einen pH-Bereich von 6,5 – 9,5 und einen Grenzwert für die elektrische Leitfähigkeit von $2500 \mu\text{S}/\text{cm}$ vor. Somit sind die Bedingungen gemäß der TrinkwV2001 eingehalten worden. Damit erfüllt der Versuchsaufbau die Bedingungen für ein Modellsystem mit Praxisbezug zum Trinkwassersystem. Im Rahmen der Einführung eines Qualitätsmanagements nach DIN ISO 9001 am IWW Zentrum Wasser wurde eine Wartung und Überprüfung der Ag/AgCl-Elektroden (Referenzelektroden) eingeführt und damit die Funktionsfähigkeit der Referenzelektroden gewährleistet. Das Multi-Potentiostatensystem wurde regelmäßig von der Firma IPS kalibriert und geprüft. Durch die Qualitätssicherung der Referenzelektroden, der Potentiostaten und Datenauswertung wurde ein stabiles und reproduzierbares Testsystem entwickelt.

Die Voraussetzung für eine elektrische Polarisation der Membranoberfläche wurde durch die Beschichtung mit Polypyrrol geschaffen (siehe Abbildung 20 auf Seite 65). Im Vergleich zu ITO wurden auf Polypyrrol geringere Potentiale gemessen. Während auf ITO bei einer Stromdichte von $+ 0,02 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ein Potential von bis $+ 1500 \text{ mV}$ gemessen wurde, lag das Potential auf Polypyrrol bei $+ 435 \text{ mV}$. Diese Daten zeigen, dass auf Polypyrrol höhere Stromstärken mit geringer entstehenden Potentialen angelegt werden können.

Um Einflüsse elektrischer Polarisation auf die bakterielle Primäradhäsion/Biofilmentwicklung zu untersuchen, wurden unter Beachtung der oben beschriebenen Bedingungen eine Reihe verschiedener Polarisationsroutinen getestet. Für die Auswahl wurden zahlreiche Publikationen herangezogen, die ähnliche Untersuchungen mit Mikroorganismen durchführten (Pareilleux 1970, Okochi et al. 1997, 1998, Shimada 1985, Nakayma 1998, Matsunga 1989, Busalman et al. 2001, Poortinga et al. 2001, Luo 2005, Hazan 2006, Wake et al. 2006).

Um die getesteten Polarisationsroutinen untereinander vergleichen zu können, ist die verwendete Referenzelektrode ausschlaggebend. In der beschriebenen Drei-Elektroden-Anordnung (siehe Abbildung 11 auf Seite 38) können verschiedene Werkstoffe als Arbeits- bzw. Gegenelektrode und verschiedene

Referenzelektroden verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit, wie auch z. B. bei Poortinga et al. 1999 und 2001 wurde eine Ag/AgCl-Elektrode eingesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Ag/AgCl-Elektroden besitzen ein eigenes Ruhepotential von + 208 mV gegen die SHE (Standardwasserstoffelektrode). Okochi et al. 1998 z.B. verwendete die SHE. Um das absolute Potential auf der Aufwuchsfläche zu ermitteln, muss dieses Potential mit einberechnet werden. Wurde z.B. auf Polypyrrol ein Potential von + 435 mV gemessen, so herrschte real ein Potential von + 643 mV.

Mit diesem System wurden in der vorliegenden Arbeit die Aufwuchsflächen während der Primäradhäsion der Bakterien, des Biofilmwachstums und in der Plateauphase der Biofilmentwicklung polarisiert.

4.2 Effekte elektrischer Polarisation auf die bakterielle Primäradhäsion auf ITO und Polypyrrol

Ziel war es, mit dem mikrobiologisch-elektrochemischen Testsystem den Einfluss elektrischer Polarisation auf die Primäradhäsion von *S. maltophilia* und Trinkwasserbakterien zu untersuchen. Dazu wurde die Aufwuchsfläche ITO bzw. Polypyrrol konstant bzw. gepulst während der ersten und zweiten Phase der Biofilmbildung polarisiert.

Zur Beschreibung der Adhäsion von Bakterien an Oberflächen werden in der Literatur verschiedene Ansätze diskutiert (Eichenlaub et al. 2006, Gottenbos et al. 1999, de Kerchove et al. 2005, van Loosdrecht et al. 1990, van Loosdrecht et al. 2002). Die Grundlage lieferte die zuerst für Interaktionen von Kolloiden mit anderen Oberflächen formulierte DLVO-Theorie (Derjajugin, B. W., and L. Landau. 1941, Verwey, E. J. W., and J. G. Overbeek. 1948). Diese Theorie sagt aus, dass eine Adhäsion von Kolloiden an eine Oberfläche von elektrostatischen Wechselwirkungen und Van der Waals Kräften bestimmt wird. Um 1970 wurde die DLVO-Theorie auf das Adhäsionsverhalten von Bakterien übertragen (Marshall et al. 1971) und diese als „lebende Kolloide“ betrachtet. Das Adhäsionsverhalten von Bakterien wurde in Abhängigkeit der Nettooberflächenladung (Zetapotential) der Bakterien und dem Zetapotential der interagierenden Oberfläche (Aufwuchsfläche) beschrieben. Diese Ansätze werden bis heute herangezogen, um die Primäradhäsion als Gleichgewicht der genannten Kräfte zu erklären (Bos et al. 1999, Marshall 1992, Zita et al. 1994, de Kerchove et al. 2005, van Loosdrecht et al. 1987a, van Loosdrecht et al. 1987b). Dennoch sind die Theorien nicht für Vorhersagen geeignet. Dies liegt daran, dass wenig darüber bekannt ist wie insbesondere die elektrostatischen Kräfte beeinflusst werden und welche Rolle sie bei der Wechselwirkung zwischen Bakterien und leitfähigen Oberflächen haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, wie auch in anderen Arbeitsgruppen, die DLVO-Theorie zur Erklärung der bakteriellen Primäradhäsion an andere Oberflächen herangezogen (Ahimou et al. 2001, Hayashi et al. 2001, Vigeant et al. 2002, van Oss 2003a). Auf der Grundlage dieser Theorie interagiert eine Bakterienzelle in Abhängigkeit ihrer Nettooberflächenladung (Zetapotential) mit einer anderen Oberfläche bzw. Aufwuchsfläche. Die Wechselwirkungen und Adhäsion der Bakterienzelle an diese Aufwuchsfläche werden durch elektrostatische Kräfte bestimmt. Besitzt

die Bakterienzelle das gleiche Zetapotential wie die interagierende Oberfläche, z.B. beide negativ, werden abstoßende Wechselwirkungen überwiegen (Abbildung 47 rechts). Im Vergleich dazu dominieren anziehende Wechselwirkungen zwischen einer Bakterienzelle mit einem negativen Zetapotential und der positiv geladenen Aufwuchsfläche, wodurch es zu einer Adhäsion kommt (Abbildung 47 links). Mit Zunahme der Ladungsdifferenz zwischen den interagierenden Oberflächen nehmen anziehende Wechselwirkungen zu.

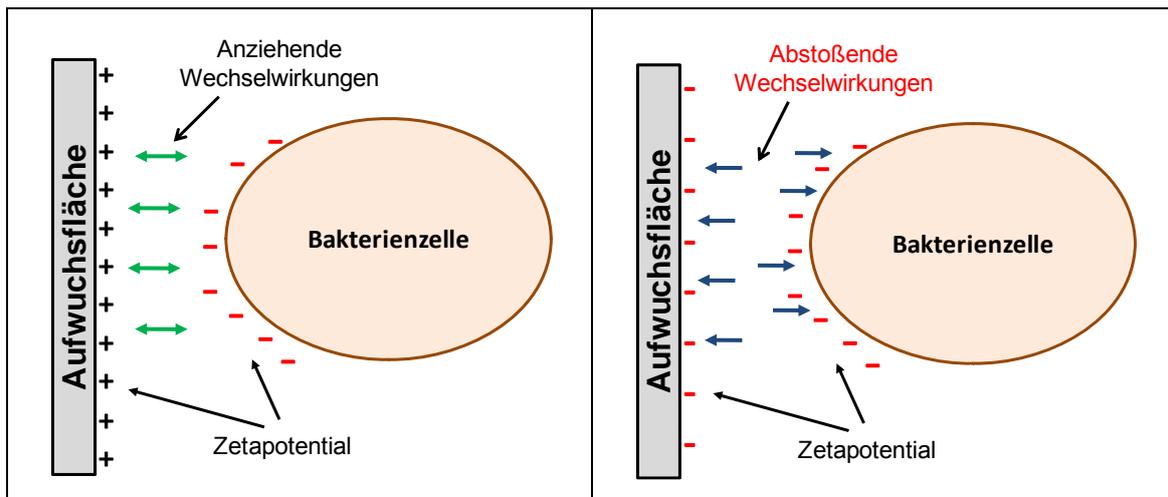


Abbildung 47: Schema zu Wechselwirkungen zwischen einer Bakterienzelle und einer positiv (links) und negativ (rechts) geladenen Aufwuchsfläche gemäß der DLVO-Theorie

In beiden Fällen müssen die Bakterien zunächst durch konvektive Diffusion (passiv) oder durch eigene Bewegung (aktiv) in unmittelbare Nähe der Aufwuchsfläche gelangen, um mit dieser zu interagieren. Dazu wurde die Bakteriensuspension in der vorliegenden Arbeit gerührt (300 rpm). In Bezug auf negativ geladenen Trinkwasserbakterien (Soni et al. 2008) wäre auf positiv polarisierten Aufwuchsflächen eine höhere und auf negativ polarisierten eine geringere Adhäsion der Bakterien zu erwarten. Bei dem eher neutralen *S. maltophilia* wäre eine erhöhte Adhäsion zu erwarten, wenn die Ladungsdifferenz zwischen *S. maltophilia* und Aufwuchsfläche zunimmt. Besäßen die Oberflächen ein ähnliches Potential würden abstoßende Wechselwirkungen überwiegen. Bei einer ständig wechselnden Ladung der Oberfläche von Positiv zu Negativ ist zu vermuten, dass es zu keiner konstant wirkenden Kraft käme.

4.2.1 Bakterielle Adhäsion auf ITO

In der vorliegenden Arbeit wurde bei jeder untersuchten Ladungsverschiebung auf ITO eine erhöhte Primäradhäsion von *S. maltophilia* und Trinkwasserbakterien beobachtet (Tabelle 19). Sowohl auf besonders positiv geladenen ITO-Oberflächen + 0,02 mA/cm² bzw. + 800 mV sowie besonders negativ geladenen ITO-Oberflächen – 0,02 mA/cm² bzw. – 800 mV vs Ag/AgCl wurde für *S. maltophilia* und für Trinkwasserbakterien eine im Vergleich zur Kontrolle (Ruhepotential + 150 mV bis + 250 mV) höhere Gesamtzellzahl festgestellt (siehe 3.2). Auf ständig gepulsten Oberflächen (- 800 mV/ + 800 mV) wurden ebenfalls in allen Versuchen auf ITO mehr *S. maltophilia* und Trinkwasserbakterien bestimmt. Dies deutet darauf, dass aus einer elektrischen Polarisierung von ITO im Vergleich zur Kontrolle verstärkt anziehende Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Aufwuchsfläche resultieren. Welche Kräfte stärker wirken, kann derzeit nicht bestimmt werden.

Da *S. maltophilia* ein schwach negativ bis neutrales Zetapotential von 0 mV bis – 3 mV bei einem pH-Wert 7 aufweist, und damit eine Ausnahme unter den Bakterien darstellt (Jucker et al. 1996), scheint eine Erhöhung der Ladungsdifferenz zwischen Bakterienoberfläche und polarisierter Aufwuchsfläche die anziehenden Wechselwirkungen zu fördern und damit die zuvor getroffene Annahme zu bestätigen. Bakterien in natürlicher Umgebung wie z. B. Trinkwasserbakterien besitzen ein negatives Zetapotential. Hier wäre im Vergleich zur Kontrolle eher eine geringere Adhäsion auf negativ geladenem ITO, aufgrund erhöhter abstoßender Kräfte, zu erwarten. Die dennoch höhere Adhäsion deutet darauf hin, dass hier eine Heterogenität der Bakterienoberfläche einen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit anderen Oberflächen hat, die zur höheren Anhaftung führt.

Bakterien besitzen keine glatte Oberfläche, sondern eine diffuse Schicht aus unterschiedlich geladenen Molekülen. Diese können in der Zellwand fest verankert sein oder durch die Bakterien produzierte und sekretierte extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) sein, die an der Bakterienoberfläche adsorbiert sind (Liu et al. 2007b, Wingender et al. 1999, Flemming et al. 2001a, 2001b, 2007). Als funktionelle Gruppen treten z.B. Carboxy- oder Amino-Gruppen von Proteinen auf. Zu den EPS gehören auch Polysaccharide mit unterschiedlich geladenen Gruppen. Zu Gruppen der Seitenketten der Polysaccharide zählen unter anderem negative geladene Gruppen wie Acetyl-, Carboxyl-, Phosphat- und Sulfat. Aber auch Ionen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ oder

Aminosäuren (z.B. L-Serine, L-Glutamat) liegen an der Zelloberfläche der Bakterien vor. Diese Moleküle und Ionen gehen mit ihrer Umgebung, in der vorliegenden Arbeit da synthetische TW, Wechselwirkungen ein. Die Ionenzusammensetzung und der pH-Werte der Lösung beeinflusst diese Wechselwirkungen (Cowan, et al. 1992), die letztendlich das Zetapotential ausmachen. Unter diesen Bedingungen besitzen Trinkwasserbakterien, wie im realen Trinkwasser, ein negatives Zetapotential von - 20 bis - 60 mV (Soni, et al. 2008) und *S. maltophilia* ein eher neutrales Zetapotential (Jucker et al. 1996).

Das synthetische Trinkwasser beinhaltet verschiedene Salze (CaSO_4 , MgCl , CaCl_2 und NaHCO_3), die als Ionen in dissoziierter hydratisierter Form vorliegen. Diese Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Cl^- und HCO_3^-) gehen mit den Ladungen der Bakterienoberfläche sowie der Aufwuchsfläche elektrostatische bzw. ionische Wechselwirkungen ein. Durch die Polarisierung der ITO-Oberfläche kann in der unmittelbaren Nähe eine erhöhte Anziehung von Gegenionen erfolgen, was zur Veränderung des Zetapotentials der Aufwuchsfläche führen kann. Derselbe Effekt kann auf das Zetapotential der Bakterien übertragen werden. Demnach wäre an negativ polarisierten Aufwuchsflächen eine erhöhte Anlagerung der zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) möglich und bei positiver Polarisierung eine Anlagerung der Chlorid-, Carbonat- und Sulfationen aus dem Elektrolyten. Die resultierende Abschirmung der ursprünglichen Oberflächenladung würde das Adhäsionsverhalten der Bakterien erklären. Dass zweiwertige Kationen einen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion an polarisierte Oberflächen haben, zeigte Yamashita et al. 1991. In dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterien aus der Mundhöhle (*B. gingivalis*, *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis* and *Actinomyces viscosus*) auf ihre Adhäsionsverhalten an eine Kathode (-) und Anode (+) in Abhängigkeit einer Calciumzugabe beobachtet. Yamashita et al. stellten fest, dass ohne Calcium signifikant mehr Bakterien an die Anode adhärten. Die Autoren folgerten ein negatives Zetapotential der untersuchten Bakterien. Wurden der Bakteriensuspension vorher Calciumionen zugesetzt, nahm die Anzahl der an die Anode adhärten Bakterien ab. Bei dem Stamm *B. gingivalis* wurde sogar nach Calciumbehandlung ein umgekehrtes Verhältnis der Bakterienanzahl zwischen Anode (mehr) und Kathode (weniger) festgestellt. Dies zeigt, dass Calcium als zweiwertiges Kation das Zetapotential von Bakterien und damit

dessen Adhäsionsverhalten an elektrisch leitfähigen und polarisierten Oberflächen beeinflussen kann.

Ein weiterer möglicher Effekt, der die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit erklären könnte, ist das von Busscher et al. 2008 als „zeta sizing“ bezeichnetes Phänomen. Es wurden innerhalb einer Reinkultur Subpopulationen mit unterschiedlichen Oberflächenladungen („zeta sizing“) nachgewiesen (van der Mei et al. 2001). Dies wurde als nicht vernachlässigbarer Einfluss während der Adhäsion einer Bakterienzelle an eine andere Oberfläche beschrieben. Die Heterogenität einer Population, als zusätzlichen Einflussfaktor der Adhäsion einer Bakterienart, stellte auch van Merode für *Enterococcus faecalis* fest (van Merode et al. 2006a, 2006b). Er bestimmte das Zetapotential verschiedener *Enterococcus faecalis* Isolate und stellte durch Isolierung der Subpopulationen fest, dass die Stämme heterogene Zetapotentiale mit Unterschieden von 10 mV aufwiesen. Die Unterschiede im Zetapotential waren unabhängig von den Kultivierungsbedingungen, Hydrophobizität oder Genotypen der Bakterien (van Merode et al. 2006b). In Versuchen stellte van Merode et al. 2006a fest, dass die heterogene Population ein höheres Biofilmbildungspotential besaß als die isolierten homogenen Populationen von *Enterococcus faecalis*. Während die heterogene Population mit Subpopulationen verschiedener Oberflächenladungen einen mehrschichtigen Biofilm bildete, formten die jeweils isolierten Subpopulationen mit einem homogenen Zetapotential einen Monolayer Biofilm (van Merode et al. 2006b). Dies deutet auf unterschiedliche Oberflächeneigenschaften der jeweiligen Subpopulationen hin, die unterschiedliche Einflüsse auf die Biofilmbildung und Biofilmstruktur von *Enterococcus faecalis* aufweisen. AFM-Messungen von Busscher et al. 2008 wiesen heterogene Charakteristika der Oberflächen von einzelnen Bakterien einer Population von *S. aureus* nach. Dies stützt die Annahme, dass Subpopulationen einer Bakterienart verschiedene Oberflächeneigenschaften aufweisen können, die einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten und die Biofilmbildung haben können.

In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre die Heterogenität des Isolates *S. maltophilia* und insbesondere der Trinkwasserbakterien eine schlüssige Erklärung für die stets erhöhte Adhäsion an polarisierten ITO-Aufwuchsflächen im Vergleich zur Kontrolle.

Um der Heterogenität der Populationen von *S. maltophilia* zu untersuchen, müsste z.B. nach van Merode et al. 2006b die Population mittels einer Anionenaustauscher Chromatographie in Subpopulationen aufgetrennt und deren

Zetapotentiale untersucht werden. Allerdings wird die Heterogenität einer Population nicht nur durch das Zetapotential (Cowan et al. 1992a, 1992b, Hong und Brown 2008), sondern auch durch Beweglichkeit (Streger et al. 2002) und natürliche bzw. genetisch vorgegebene Kompetenz (Dubnau 1991) beschrieben. Für verschiedene *S. maltophilia* Isolate wurden verschiedene Eigenschaften in Hydrophobizität, LPS und EPS-Gehalt publiziert (Berg et al. 1999, Denton et al. 1998, deOlivera et al. 2002, 2003, Lerich et al. 2003, Pompilio et al. 2008). Eine Trinkwasserpopulation ist allein aufgrund ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Bakterienarten heterogen, die zusätzlich variabel Subpopulationen aufweisen kann. Durch die Polarisierung von ITO könnten einzelne Bakterien und Subpopulationen unterschiedlich stark angezogen bzw. abgestoßen werden, wodurch eine stets erhöhte Adhäsion beobachtet wird.

Zu der erhöhten Adhäsion wurde auch ein Einfluss auf das Adhäsionsmuster der Bakterien beobachtet. Während auf der Kontrolle Bakterien in Mikrokolonien ansiedelten, hafteten Bakterien auf den polarisierten ITO-Oberflächen einzeln (siehe Abbildung 32 auf Seite 79). Ebenfalls auffällig war die homogene Verteilung der Bakterien auf polarisierten ITO. Im Vergleich dazu waren die Bakterien auf der Kontrolle in Mikrokolonien von einer Matrix umgeben, ungleichmäßig auf der Oberfläche verteilt (siehe Abbildung 32 auf Seite 79). Diese Beobachtung wurde sowohl bei *S. maltophilia* als auch bei Mischkulturbiofilmen von Trinkwasserbakterien gemacht. Wie bereits erwähnt, produzieren Bakterien extrazelluläre polymere Substanzen (Flemming et al. 2001a, 2001b, 2007) insbesondere verstärkt, wenn sie auf der Aufwuchsfläche irreversibel anhaften (van Loosdrecht et al. 1990a). Für *S. maltophilia* wies Lerich et al. 2000 mittels des Lektins ConvalinA (Glukose/Mannose) und Agglutinin WGA (N-Acetyl-D-Glukoseamin bzw. N-Acetylneuraminsäure) eine Veränderung von extrazellulären Polysacchariden in Abhängigkeit des Alters (1 bis 4 Tage) des Biofilms nach. Während 1 Tag alte Biofilme mit ConA nachweisbare Polysaccharide aufwiesen, waren im 4 Tage alten Biofilm ausschließlich mit WGA nachweisbare Polysaccharide vorhanden. Pompilio et al. 2008 wiesen in 24 Stunden alten *S. maltophilia* Biofilmen mittels Alcian Blau mikroskopisch einen mehrschichtigen Biofilm nach, in dem Bakterien in einer EPS-Matrix eingebettet waren. Pompilio et al. wiesen eine Zunahme der Hydrophobizität von *S. maltophilia* nach, wenn diese adhärten und einen Biofilm bildeten. Die Daten von Lerich et al. 2000 und von Pompilio et al. 2008 deuten auf eine verstärkte EPS-Produktion von anhaftenden *S. maltophilia* Bakterien

hin, die negativ geladen sind und die Hydrophobizität der Bakterien beeinflussen. Die Veränderungen der Oberflächeneigenschaften (EPS, Hydrophobizität) variierte zwischen den verschiedenen untersuchten Isolaten von *S. maltophilia* (Lerich et al. 2000, Pompilio et al. 2008). Dies stützt die These einer Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens aufgrund der Heterogenität durch verschiedene Subpopulationen.

Viele Publikationen beschreiben den Einfluss der EPS und der herrschenden Wechselwirkungen zwischen den EPS-Molekülen auf die Adhäsion von Bakterien an Oberflächen und die interzelluläre Adhäsion (Abu-Lail et al. 2006, Bos et al. 1996, Dunne 2002, Kreft et al. 2001, Liu et al. 2004, Ryu et al. 2004, Tsuneda et al. 2003, Walker 2005, de Kerchove et al. 2005). Den EPS wird u.a. die Funktion zugeschrieben, repulsive Kräfte zu überbrücken und Bakterien irreversibel an der Oberfläche zu binden. Während anziehende Van der Waals Wechselwirkungen zu den auf kurze Distanz wirkenden Kräften gehören, können elektrostatische Wechselwirkungen auf weitere Distanzen wirken und eine Anziehung über die diffuse Doppelschicht (Zetapotential) hinaus bewirken (Tsuneda et al. 2003, Rijnaart et al. 1993). Die erhöhte Anziehung wird durch die erhöhte Konzentration an EPS-Molekülen, und damit die erhöhte Anzahl an Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe WW, elektrostatische Kräfte und Wasserstoff-Brücken-Bindungen erklärt (Bos et al. 1999, Eichenlaub et al. 2006, Liu et al. 2007). In einer Publikation von Liu et al. 2002 wurden elektrostatische Bindungsstellen in isolierten EPS von wasserstoffproduzierenden Schlamm (HPS) und sulfatreduzierenden Biofilm (SRB) untersucht. Liu et al. 2002 stellte fest, dass die Gesamtkonzentration von elektrostatischen Bindungsstellen in den EPS 20 bis 30 fach höher war als für die EPS-freie Bakterienoberfläche publiziert. Als Bindungsstellen wurden Carboxyl-, Phosphat-, Hydroxyl-, Sulfhydryl (SH)-, Amino- und Phenol-Gruppen identifiziert.

Faktoren, welche u.a. die bakteriellen EPS und damit die Biofilmbildung beeinflussen, sind Nährstoffverfügbarkeit (C-Quelle, Konzentration), physikalische und chemische Bedingungen (Scherkraft, osmotischer Druck, pH-Wert) sowie Stressfaktoren wie Licht-, Temperaturänderungen (Flemming et al. 2001a, Flemming et al. 2001b, Flemming et al. 2007, Kreft et al. 2001, Looijesteijn et al. 2000, Ryu et al. 2004, Velasco et al. 2006, van Oss 2007). In dem hier verwendeten System sind die Bedingungen wie Nährstoffgehalt, Scherkräfte, Temperatur und Salzkonzentration konstant. Aber die physikalisch-chemischen Bedingungen an der Aufwuchsfläche wurden durch eine

Polarisation verändert. Dies könnte eine Stressreaktion der Bakterien hervorrufen. Der qualitative Unterschied im Adhäsionsmuster könnte darauf hindeuten, dass anhaftende Bakterien auf polarisierten Oberflächen weniger EPS produzieren bzw. die Physiologie der Bakterien derart beeinflusst wird, was am unterschiedlichen Adhäsionsmuster sichtbar wird.

Neben der Vielzahl an unspezifischen nicht-kovalenten Wechselwirkungen können auch spezifische Kräfte zwischen Bakterien und anderen Oberflächen wirken. Diese spezifischen Makromolekül-Interaktionen (Zucker-Protein = Ligand-Rezeptor) können zur Überwindung abstoßender Kräfte und zur Vermittlung interzellulärer Adhäsion dienen (Waar et al. 2005, Walker et al. 2004, Postollec et al. 2006). Den Effekt der Abschirmung abstoßender elektrostatischer Kräfte zeigte Walker et al. 2004 für *E. coli*. Eine Mutante ohne LPS zeigte ein der DLVO Theorie entsprechende Adhäsion. Dagegen wich die Adhäsion LPS produzierender *E. coli* Bakterien von Berechnungen gemäß der DLVO Theorie ab. Daraus wurde geschlossen, dass die langkettigen LPS-Moleküle über die elektrostatischen Kräfte hinaus wirken und diese dadurch abschirmen, folglich eine Adhäsion vermitteln. Postollec et al. 2006 wies mittels AFM Messungen stärkere Kräfte zwischen zwei Bakterienzellen als zwischen einer Aufwuchsfläche und einer Bakterienzelle nach. Die Bakterien adhärten durch spezifische Wechselwirkungen stärker aneinander als durch unspezifische Wechselwirkungen an andere Oberflächen. Waar et al. 2005 konnte durch Zugabe von Antikörpern zu *E. faecalis* nachweisen, dass durch die Blockierung eines Rezeptors auf der Bakterienoberfläche die Adhäsion reduziert war. Damit wurden spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen als mitverantwortliche Kräfte während einer bakteriellen Adhäsion an eine andere Oberfläche nachgewiesen. Die Biofilmbildung und damit Adhäsion von *S. maltophilia* ist oft eine Ursache von Infektion immunrepressiver Patienten (deOliveira et al. 2002, Palleroni und Bradberry 1993, Denton und Kerr 1998). In verschiedenen Isolaten von *S. maltophilia* aus Wunden von Patienten wurden Fimbrien nachgewiesen. Wurden diese mit einem Antikörper blockiert, resultierte dies in einer Inhibierung der Biofilmbildung von *S. maltophilia* an Epithelzellen und auf Polystyren. Vanhoof et al. 1995 und andere (Hong et al. 2006, Westermann 1997, Ruhmani et al. 1997, Zughair et al. 1999) wiesen negativ geladene LPS nach, die für die spezifische Bindung an humane Zellen verantwortlich sind und mit Di-Kationen ionische Wechselwirkungen eingehen.

Durch elektrische Polarisation könnte die Konformation solcher Moleküle beeinflusst werden, wodurch die sterisch vermittelten Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor zweier Oberflächen (Bakterien/Bakterien bzw. Bakterien/Aufwuchsfläche) gestört werden würde. So könnten durch hydrophobe Wechselwirkung der polymeren Substanzen, wie durch Walker et al. für *E. coli* gezeigt, stärkere Adhäsionskräfte wirken, oder adsorbierte EPS würden die ursprüngliche Oberflächenladung abschirmen und damit eine Adhäsion der Bakterien auf der Kontrolle vermitteln. Von letzterem ausgegangen, würden Bakterien eher durch spezifische Wechselwirkungen an bereits anhaftende Bakterien bzw. deren EPS anhaften, als an eine „nackte“ Oberfläche. Da bei *S. maltophilia* Fimbrien und EPS zwischen den Bakterien im Biofilm mit zunehmendem Alter des Biofilms nachgewiesen wurden (Lerich et al. 2008, Pompilio et al. 2000), würden zwischen einer planktonischen Zelle und einer bereits anhaftenden Bakterienzelle erhöhte Wechselwirkungen (ionische bzw. hydrophobe Kräfte) herrschen. Dies würde eine Anhaftung begünstigen und die Mikrokoloniebildung von *S. maltophilia* auf der Kontrolle erklären.

Das veränderte Adhäsionsmuster auf polarisierten ITO könnte das Resultat eines selektiven Einflusses der Polarisation auf die Heterogenität der Population sein, die in im Zetapotential, EPS-Zusammensetzung und Hydrophobizität variieren kann (Lerich et al. 2008, Pompilio et al. 2000). Da die LPS von *S. maltophilia* als Polyanionen fungieren, könnten sie auch in unmittelbarer Nähe der polarisierten ITO-Oberfläche mit Kationen aus dem synthetischen Trinkwasser (Mg^{2+} und Ca^{2+}) ionische Wechselwirkungen eingehen, wodurch die negative Ladung abgeschirmt werden würde. Durch negative Polarisation werden vermehrt Kationen an die Oberflächen angezogen, die dann als ionische Brücke zwischen ITO-Oberfläche und *S. maltophilia* LPS fungieren. Durch die Adsorption der Kationen an die LPS von *S. maltophilia* Bakterien würden zwischen den Bakterienzellen geringere interzelluläre Wechselwirkungen herrschen. Diese ionischen Bindungen unter polarisierten Bedingungen würden die erhöhte Adhäsion von *S. maltophilia* an negativ polarisierte Oberfläche und das veränderte Adhäsionsmuster erklären.

Zusammenfassend müssen sowohl die Heterogenität der Population, lokale Heterogenitäten der Oberfläche einer Bakterienzelle und Physiologie als Einflussfaktor des Adhäsionsverhaltens einbezogen werden, die eine hohe Variation an Anpassungsmöglichkeiten bieten. Diese Unterschiede sind in

keiner Theorie einbezogen, wodurch weder die thermodynamische noch die DLVO-Theorie eine Vorhersage der Adhäsion von Bakterien gestattetet.

4.2.2 Adhäsion auf Polypyrrol

Neben ITO wurde ein elektrisch leitfähiges Polymer Polypyrrol als Aufwuchsfläche eingesetzt. Polypyrrol verändert im Vergleich zu ITO nicht nur die Oberflächenladung, sondern auch die Oberflächenstruktur. Zusätzlich wurde auf Polypyrrol während Polarisation eine pH-Wertveränderung direkt an der Polymeroberfläche nachgewiesen (Shinohora et al. 1989a, b). In Kombination mit einer gepulsten Polarisation wurde Polypyrrol als chaotische Oberfläche (1.3.1) eingesetzt und die bakterielle Primäradhäsion auf dieser Polymeroberfläche untersucht.

Alle Versuche in der vorliegenden Arbeit zeigten auf polarisiertem Polypyrrol im Vergleich zur nicht polarisierten Kontrolle (Polypyrrol) eine um 50 % - 80 % reduzierte Adhäsion von *S. maltophilia*.

Wird Polypyrrol oxidiert (negative Polarisation), so gibt es Elektronen entlang des konjugierten π -Elektronenrückgrats an jedem 4. Pyrrolring ab, wodurch es zu einem Polykation mit delokalisierten positiven Ladungen wird, und damit die Volumenänderung die Oberflächenstruktur ändert (Ateh et al. 2006). Die Folge ist die Adsorption von Gegenionen/Anionen, um die Ladungen zu neutralisieren, wobei es zu ionischen Wechselwirkungen kommt (Shinohora et al. 1989a, b). Diese Oberflächenänderung könnte den Unterschied zwischen ITO und Polypyrrol ausmachen. Während auf ITO sich nur die Oberflächenladung änderte, reagierte das Polymer mit Struktur- und Volumenänderung auf die Polarisation. Eine konstant positive bzw. negative Polarisation von Polypyrrol (Abbildung 28) resultiert nach Wallace et al. 1993 in einer Adsorption von Anionen bzw. Kationen. Als Anionen kommen aus dem synthetischen TW OH^- , Cl^- , HCO_3^- und SO_4^- Ionen vor. Im Polymer ist Sulfat als Gegenion während der Polymerisation eingebaut worden (2.11.3). Als Kationen sind im synthetischen TW Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ und $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ vorhanden. Durch die Ionenaustauschereigenschaften von Polypyrrol (Gambhir et al. 2001, Ateh et al. 2006, Soares-Herrera et al. 2008) findet ein Ionenaustausch mit dem umgebenden Elektrolyten statt. Dabei können Zellen ebenfalls beeinflusst werden. Shinohora et al. 1989 zeigte, dass Erythrozyten in einem isotonischen Phosphatpuffer durch eine Polarisation von Polypyrrol mit + 400 mV vs. Ag/AgCl lysiert sind. Dies wurde mit einer lokalen pH-Wert-Änderung durch

Ladungsausgleich von OH^- -Ionen erklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Polypyrrol ein Strom von $-0,02$ bzw. $+0,02$ mA/cm^2 angelegt und ein Potential von -125 bis -240 mV bzw. $+400$ bis $+435$ mV gemessen. Im Vergleich zu Shinohora wäre folglich eine Zellyse der Bakterien, die an das Polypyrrol anhaften, möglich. Durch die negativ geladenen LPS und EPS würden *S. maltophilia* als Polyanionen besonders von dem positiv polarisierten Polypyrrol angezogen werden. Ob diese ionische Anziehung, in Zusammenhang mit den Ionenaustauscher-Eigenschaften des Polypyrrols, eine Zellyse von *S. maltophilia* induzieren kann, bleibt offen. Für den Wirkmechanismus kationischer Antibiotika (Aminoglykoside) bei *E. coli* oder *S. maltophilia* wird eine starke ionische Bindung der Antibiotika an die negative Phosphatgruppe des Lipid A in den LPS beschrieben, wodurch die Integrität der äußeren Zellmembran geschädigt wird (Rahmati-Bahram et al. 1997, Peterson et al. 1987). In Anlehnung an diesen Mechanismus kationischer Antibiotika wäre eine ähnliche Wechselwirkung des Polypyrrols zu prüfen.

Auf negativ polarisierten Polypyrrol mit einem Potential von -125 bis -240 mV und gepulst polarisierten mit -800 mV / $+800$ mV wurde ebenfalls eine geringere Adhäsion beobachtet. Hier ist ebenfalls eine Zellyse nicht ausgeschlossen. Aber rein physico-chemische Reaktionen auf die Polarisation des Polymers könnten verstärkt abstoßende Kräfte bedingt haben. Aufgrund der Ionenaustauschereigenschaften von Polypyrrol werden die jeweiligen Gegenionen aus dem Elektrolyten angezogen. Ionische Wechselwirkungen sind wie Van der Waals Wechselwirkung nicht kovalente unspezifische Kräfte, die aber eine größere Reichweite haben als Van der Waals Kräfte (De Kerchove et al. 2005, Eichenlaub et al. 2006, van Oss 2003). Folglich könnten Bakterien auf weitere Distanz durch die polarisierte Polypyrroloberfläche abgestoßen werden. Ob es sich um eine verstärkte Abstoßung oder besonders starke Anziehung und resultierende Zellyse handelt, kann aus dem derzeitigen Kenntnisstand nicht geschlossen werden.

4.3 Hemmung der Biofilmentwicklung von Trinkwasserbakterien durch elektrische Polarisation

Als weiteres Ziel wurde die Biofilmentwicklung in der dritten Phase durch elektrische Polarisation beeinflusst. Nachdem die Primäradhäsion der Trinkwasserbakterien auf der Aufwuchsfläche abgeschlossen war, wurde dessen Oberflächenladung durch gepulste Polarisation manipuliert.

Ein über 7 Tage gepulstes Potential von -600 mV / $+600\text{ mV}$ führte zu einer Hemmung der Biofilmentwicklung. Während auf der Kontrolle ein mehrschichtiger dreidimensionaler Biofilm entstand, war der polarisierte Trinkwasserbiofilm auf dem Entwicklungsstadium eines Monolayers verblieben. Dieser morphologische Unterschied der Trinkwasserbiofilme wurde mittels CLSM nach 2,5 Tagen (siehe Abbildung 38 auf Seite 87) und 7 Tagen (siehe Abbildung 39 auf Seite 87) Polarisation festgestellt. Die Gesamtzellzahl der Kontrolle im Vergleich zum polarisierten Trinkwasserbiofilm war um Faktor 4 höher. Der Trinkwasserbiofilm auf der Kontrolle wies ein Volumen von $6,05\text{ cm}^3/\text{cm}^2$ auf und belegte 22,4 % der Aufwuchsfläche. Im Vergleich dazu betrug der polarisierte Trinkwasserbiofilm ein um Faktor 300 geringeres Volumen von $0,02\text{ cm}^3/\text{cm}^2$ und belegte nur 0,15 % der Aufwuchsfläche. Diese Unterschiede weisen eine hemmende Wirkung elektrischer Polarisation auf die dreidimensionale Biofilmentwicklung nach.

Für das weitere Verständnis ist der Zeitpunkt der gestarteten Polarisation relevant. Zunächst erfolgte die Primäradhäsion der Bakterien aus dem Trinkwasser für 2 Tage ohne Zugabe von Nährstoffen. In dieser Phase sind die Bakterien aufgrund des geringen Nährstoffgehaltes des realen Trinkwassers in einem Hunger- bzw. Ruhezustand (Kolter et al. 1993). Anschließend wurde ein verdünntes Vollmedium zugegeben, um die auf ITO anhaftenden Bakterien zu aktivieren. Für 4 Stunden wurde der Stoffwechsel der Bakterien durch Nährstoffzufuhr angeregt. Danach wurde der Durchfluss mit weiterem Trinkwasser und zugegebenen Nährstoffen kontinuierlich in die Flanschzellen eingeleitet. Mit dem Start des Durchflusses wurde gleichzeitig die gepulste Polarisation auf einer der von Bakterien belegten ITO-Aufwuchsflächen gestartet. Die gegenüber liegende Kontrolle in derselben Flanschzelle wurde nicht polarisiert, sondern im selben Trinkwasser-Medium-Gemisch ohne Polarisation inkubiert. Der einzige Unterschied zwischen Kontrolle und polarisierten Trinkwasserbiofilm war die ständige Manipulation der

Oberflächenladung der Aufwuchsfläche an der Basis des Biofilms. Neben der gepulsten wurden auch eine konstant positive (+ 600 mV) und konstant negative (- 600 mV) Polarisierung der Aufwuchsfläche während der Biofilmentwicklung getestet. Nur durch die gepulste Oberflächenladung (- 600 mV/ + 600 mV) konnte die Biofilmentwicklung gehemmt werden.

Während die Art (konstant bzw. gepulst) der Polarisierung während der Primäradhäsion hungernder Bakterien keinen Einfluss hatte, ist diese für die Hemmung der Biofilmentwicklung/des Biofilmwachstums ausschlaggebend. Bezieht man an dieser Stelle die schon zuvor diskutierten Kräfte zwischen Bakterien sowie Bakterien und anderen Oberflächen mit ein, wird die Bedeutung der Wechselwirkungskraft deutlich. Die Daten deuten darauf hin, dass diese Kräfte für die dreidimensionale Biofilmentwicklung erforderlich sind und allein durch Manipulation der elektrostatischen Kräfte an der Aufwuchsfläche beeinflusst werden.

Da konstante Polarisierungen diesen Effekt nicht bewirkten, werden Bakterien dadurch nicht beeinflusst oder können sich an diese Bedingungen anpassen wobei letztendlich kein Einfluss mikroskopisch sichtbar wurde. Umso interessanter ist die Wirkung eines jede Minute ständig gepulsten Potentials von - 600 mV zu + 600 mV. Unter diesen Bedingungen sind die Bakterien nicht in der Lage zu wachsen und einen dreidimensionalen Biofilm zu bilden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine elektrische Polarisierung der Aufwuchsfläche einen Einfluss auf die Physiologie der Bakterien hat. Da in der Wachstumsphase der Biofilmbildung (Phase 3) die EPS-Produktion und eine erhöhte Zellteilungsaktivität statt findet, ist hier die wahrscheinlichste Ursache des morphologischen Unterschieds zu suchen. EPS sind für die Struktur eines dreidimensionalen Netzwerks (EPS-Matrix) und Zellteilung für das Wachstum und Biomasseproduktion erforderlich. Folglich würde die gepulste Polarisierung die bereits anhaftenden Bakterien schädigen/stressen, a) worauf die EPS-Produktion abnimmt bzw. fehlerhafte EPS produziert werden b) wobei eine EPS-Synthese statt findet, aber aufgrund der ständig wechselnden Oberflächenladung anziehende Wechselwirkungen zwischen den EPS gestört werden c) die Zellteilungsfähigkeit gestört und der Anabolismus beeinträchtigt wird oder d) das quorum sensing gestört und damit die Biofilmbildung gehemmt wird.

Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) werden von Bakterien während des Wachstums sekretiert und bestehen aus verschiedenen Substanzen wie

Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden. Aus einer physico-chemischen Sichtweise kann eine EPS belegte Oberfläche wie z.B. Aufwuchsfläche (conditioning film) als ein adsorbierter Polyelektrolyt betrachtet werden (Tsuneda et al. 2003). Diese Eigenschaft wird der Vielzahl an funktionellen Gruppen z.B. Carboxyl-, Amino- und Phosphatgruppen zugeschrieben (Wingender et al. 1999, Mayer et al. 1999), wobei die EPS nicht nur physico-chemische sondern auch Physiologische Funktionen erfüllen (Flemming et al. 2001a, 2001b, Sutherland 2001, Neu 1996, Neu und Marshall 1991, Donlan et al. 2002). Bezüglich der physico-chemischen Betrachtung kann die Komposition der EPS die Oberflächeneigenschaft der Bakterien z.B. in Oberflächenladung und Hydrophobizität beeinflussen (Rijnaarts et al. 1993, Neu und Marshall 1990). Dabei können negativ oder positiv geladene EPS elektrostatische Wechselwirkungen eingehen, die über weite Distanzen anziehende Kräfte ausüben und eine Adhäsion von Bakterien an einander oder an eine andere Oberfläche vermitteln können (Rijnaarts et al. 1999, Bos et al. 1999, Busscher et al. 2000, Neu und Marshall 1990). Tsuneda et al. 2003 untersuchte die Adhäsion verschiedener Isolate aus Abwasser auf Glas in Abhängigkeit der EPS, die hauptsächlich aus Proteinen und Zuckern (Hexosen, Pentose) bestanden. Durch Zugabe der Zucker nahm die Adhäsion der Bakterien auf Glas zu. Die Abhängigkeit der Adhäsion von EPS zeigten auch Azeredo et al. 2000 und van Loosdrecht et al. 1990. Sie stellten die elektrostatischen Kräfte, ermittelt durch die elektrische Doppelschicht (Zetapotential), van der Waals Kräfte und Polymere Interaktion als verantwortliche Kräfte für den Adhäsionsprozess fest (Azeredo et al. 2000). Tsuneda stellte die negativ geladene Glasoberfläche in Bezug zu dem negativen Zetapotential der Bakterien. Er folgerte, dass die elektrostatische Abstoßung zwischen Glasoberfläche und Bakterien ohne EPS ausschlaggebend sei. In Anwesenheit von EPS wird diese Abstoßung durch eine starke Wechselwirkung, resultierend aus der hohen Anzahl an Polymeren, überlagert und folglich eine höhere Adhäsion ermöglicht (Rutter und Vincent 1980).

In einem Review von Sutherland 2001 werden Exopolysaccharide bzw. extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) als wichtige Bestandteile und Bindeglieder zwischen Bakterien in Biofilmen beschrieben. Durch die geladenen Gruppen an den Polymerketten können EPS mit Ionen starke Wechselwirkungen eingehen. Für interzelluläre Adhäsion können EPS mit Lektinen an der Zelloberfläche anderer Bakterien interagieren. Jenkinson und

Lamont 1997 zeigten eine erhöhte Adhäsion von Bakterien (Streptokokken) an Oberflächen der Mundhöhle, wenn bereits sekretiertes α -D-Glukan an diese Oberflächen adsorbiert war. Dies wurde auf die Bildung intermolekularer Brücken des Glukans zurückgeführt. Jenkinson und Lamont 1997 referieren für Streptokokken aus der Mundhöhle die sogenannten Adhesine. Diese sind Zellwand gebundene Proteine bestehend aus linearen Aminosäuresequenzen. Ein solches Adhesin ist das DL1 von *Streptokokkus goondii*, das Wachstumsphasen abhängig expremiert wird. Rickard et al. 2000 untersuchte die Coaggregation zwischen aquatischen Bakterien und konnte 5 Bakterienpaare identifizieren, welche durch Adhesine aneinander haften. Dabei war die Fähigkeit der Bakterien aneinander zu haften von der Wachstumsphase der Population abhängig. Mit zunehmendem Alter der Population nahm die Bindungsfähigkeit zu. Abhängig von der Kombination der Bakterienarten aggregierten die Bakterien in der späten exponentiellen Phase oder erst in der späten stationären Phase.

Zusammenfassend sind bei verschiedenen Bakterienarten unterschiedliche EPS an der Adhäsion beteiligt, die abhängig von der Wachstumsphase der Population produziert werden. Folglich ist es wahrscheinlich, dass der physiologische Zustand der Bakterien auf der polarisierten Oberfläche beeinträchtigt war und damit auch die EPS-Produktion, die letztendlich die veränderte Biofilmstruktur verursachte. Die Beeinträchtigung der Zellteilungsfähigkeit durch elektrische Polarisation wurde mittels Pipemidinsäure nachgewiesen (3.5.1 und 3.5.2). Schon nach 20 Stunden gepulster Polarisation (- 600 mV/ + 600 mV) waren sowohl *S. maltophilia* als auch Trinkwasserbakterien nicht mehr teilungsfähig. Die Gesamtzellzahl des polarisierten Trinkwasserbiofilms nach 7 Tagen war im Vergleich zur Kontrolle um Faktor 4 geringer. Folglich wäre die Hemmung des Wachstums gering. Allerdings war das Volumen des polarisierten Trinkwasserbiofilms um Faktor 300 und die Belegung der Aufwuchsfläche um Faktor 150 im Vergleich zur Kontrolle geringer. Dies deutet darauf hin, dass, obwohl das Wachstum geringfügig beeinflusst war, die Bildung/Entwicklung der EPS/mehrschichtigen Biofilms deutlich beeinträchtigt wurde. Als ein Faktor, der die Biofilmentwicklung reguliert, wird das quorum sensing diskutiert (Kirisits und Parsek 2006, Jayaramann und Wood 2008, Nakaruma et al. 2008, Kievit 2009, Jain et al. 2007, Davies et al. 1998, Sauer et al. 2002, Sakugari et al. 2007). Es werden zwei System *las* und *rhl* beschrieben, die von Acyl-Homoserin-Lacton (AHL) basierenden Signalmolekülen gesteuert werden (Passador et al. 1993, Juhas et

al. 2005, Wagner et al. 2006). Davies et al. 1998 zeigte, dass *P. aeruginosa* ohne ein funktionierendes *las* quorum sensing System zwar einen Biofilm bilden konnte, aber dieser nicht die typische mehrschichtige Architektur aufwies. Während der Wildtyp einen typischen dreidimensionalen Biofilm bildete, erreicht die *las*-Mutante nur einen dünnen Monolayer (Kjelleberg 2002, Davies et al. 1998). Sauer et al. 2002 zeigte eine hohe Aktivität des *rhl* quorum sensing systems in der frühen Phase der Biofilmbildung. Der Einfluss des *rhl* Systems auf die Biofilmbildung wird auf die Regulation der Expression der Gene *rhlR* und *rhlI* durch einen Sigmafaktor RpoN der RNA-Polymerase zurückgeführt (Heurlier et al. 2003). Für beide Systeme wurde gezeigt, dass sie 616 bzw. 315 Gene in *P. aeruginosa* regulieren (Schuster et al. 2003, Wagner et al. 2003). Quorum sensing reguliert unter anderem Gene der DNA-Replikation, Zellteilung, RNA-Transkription, Aminosäuresynthese sowie Gene, die das Gruppenverhalten regulieren z. B. Biofilmbildung (Wagner et al. 2003). Die quorum sensing abhängige Regulation der Gene war von den Wachstumsbedingungen abhängig. In Abhängigkeit des Gehalts an Sauerstoff (aerob/anaerob), Phosphat und Stickstoff im Medium wurden verschiedene Expressionsmuster nachgewiesen (Wagner et al. 2003). Dabei war die Expression von *rhlR* in *P. aeruginosa* besonders sensitiv gegenüber Änderungen des Sauerstoffgehaltes und des Stickstoffs im Medium. Für *P. aeruginosa* wurde ebenfalls gezeigt, dass quorum sensing die Produktion zweier Zucker-bindener Lektine LecA und LecB reguliert, die im Biofilm sekretiert werden. *P. aeruginosa* mit Mutation in *lecA* und *lecB* bildeten veränderte Biofilme (Tielker et al. 2005, Diggle et al. 2006.). Kievit et al. 2001 zeigte mittels GFP markierter *las*-Gene, dass die Expression an der Grenzfläche zwischen Biofilm und Aufwuchsfläche besonders stark war und zur Oberfläche des Biofilms abnahm. Als wichtige Gene für die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wurde das *pel* Gencluster identifiziert, das durch quorum sensing reguliert wird (Sakuragi und Kolter 2007). Die *pel* Gene kodieren für Proteine, die für die Produktion glukosereicher Polysaccharide in Biofilmen verantwortlich sind. Diese glukosereichen Polysaccharide waren für Oberflächen-assoziierte Biofilme bzw. Bildung einer Pellikula essentiell (Friedmann und Kolter 2004). Mutationen im *las* und *rhl* quorum sensing System führten zur reduzierten Biofilmbildung auf festen Oberflächen bzw. reduzierten Pellikula an Biofilmen an Luft-Wasser-Grenzflächen (Sakuragi und Kolter 2007). In Bezug auf die vorliegende Arbeit könnte eine Beeinflussung des quorum sensing Systems von anhaftenden Trinkwasserbakterien durch elektrische Polarisation die Synthese

von EPS-Komponenten beeinflussen, wodurch das um Faktor 300 reduzierte Volumen eines polarisierten Trinkwasserbiofilms erklärt werden könnte. Da die Gesamtzellzahl zwischen Kontrolle und polarisiertem Trinkwasserbiofilm sich kaum (Faktor 4) unterscheidet, scheint die Ursache des morphologischen Unterschieds in der Beeinflussung der EPS-Matrix/-Produktion zu liegen.

Ein weiterer Einflussfaktor des quorum sensing Systems ist der pH-Wert, da die AHL-Signalmoleküle bei einem kritischen pH-Wert über 8,0 chemisch abgebaut werden (Schäfer et al. 2000). AHL-Signalmoleküle werden nicht nur chemisch, sondern auch durch zahlreiche Mikroorganismen hydrolysiert. Vor allem in Mischpopulationen können AHL-Signalmoleküle schnell abgebaut werden (Zhang et al. 2002, Huang et al. 2003, Lin et al. 2003). Dass natürliche Biofilme AHL-Signalmoleküle produzieren, zeigten McLean et al. 1997, der in Süßwasserbiofilmen AHL-Signalmoleküle gemessen hat.

Bezogen auf die Unterschiede im Biofilmwachstum der Trinkwasserbakterien in Abhängigkeit einer Polarisation der Aufwuchsfläche, könnten die veränderten Umweltbedingungen die Expression des quorum sensing Systems der anhaftenden Bakterien beeinflussen. Dies würde wiederum die Regulation weiterer Systeme wie Zellteilung, Protein- und Polysaccharidsynthese beeinflussen und damit die veränderte Biofilmstruktur resultieren. Mögliche Veränderungen der Umweltbedingungen durch elektrische Polarisation wären ein veränderter pH-Wert an der Aufwuchsfläche, veränderte Population bedingt durch veränderte Wechselwirkungen/ Anziehungskräfte, oxidativer oder osmotischer Stress an der Aufwuchsfläche. Welche Bedingungen durch elektrische Polarisation beeinflusst werden und sich auf das quorum sensing System und letztendlich auf die Biofilmentwicklung der Trinkwasserbakterien auswirken, kann mit dem jetzigen Kenntnisstand nicht belegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Physiologie 7 Tage polarisierter Trinkwasserbiofilme beeinträchtigt war (3.5). Als potentielle Ursache kommen Einflüsse a) auf die EPS-Produktion b) auf die Wechselwirkungen der vorhandenen EPS c) auf den Anabolismus (Protein-Polysaccharidsynthese und d) auf das quorum sensing System in Frage.

4.4 Einfluss elektrischer Polarisation auf die Physiologie von Bakterien

Die Unterschiede im Adhäsionsmuster (Abbildung 31) nach der bakteriellen Primäradhäsion und in der veränderten Struktur des Biofilms nach 7 Tagen Inkubation (Abbildung 39) auf gepulst polarisierten ITO-Aufwuchsflächen deuten auf eine physiologische Reaktion der anhaftenden Bakterien auf die physico-chemischen Veränderungen hin. Um den Zustand der Bakterien nach gepulster Polarisation zu beschreiben, wurden verschiedene Methoden eingesetzt, die unterschiedliche Prozesse in der Bakterienzelle nachweisen.

Mittels Pipemidinsäure wurde die Zellteilungsfähigkeit über die Hemmung der DNA-Gyrase bei *S. maltophilia* und bei Trinkwasserbakterien in Abhängigkeit einer gepulsten Polarisation untersucht. Mittels eines Luziferase-Luziferin-Enzymtests wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der Trinkwasserbakterien nach Polarisation bestimmt. Mit einer RNA-Sonde EUB338 für Eubakterien wurde die ribosomale Aktivität der Bakterien untersucht. Um einen Einfluss auf die Membranintegrität zu prüfen, wurden die Trinkwasserbakterien nach Polarisation mit Propidiummonoazid behandelt und mittels einer quantitativen PCR analysiert. Für die Untersuchung eines Einflusses auf die Populationsdiversität wurden dieselben Proben mittels DGGE untersucht. Für alle Methoden wurden die Trinkwasserbiofilme nach 7 Tagen auf einer polarisierten Aufwuchsfläche und der Kontrolle isoliert und anschließend entsprechend untersucht. Um zu prüfen, ob die potentielle Beeinflussung der Zellwandintegrität und Populationsdiversität reversibel war, wurden Trinkwasserbiofilme nach Polarisation für 24 Stunden regeneriert und anschließend mittels quantitativer PCR und DGGE analysiert.

Mittels Pipemidinsäure wurde gezeigt, dass nach einer 20 stündigen gepulsten Polarisation weder *S. maltophilia* noch Trinkwasserbakterien in der Lage waren zu elongieren. Dies weist eine Schädigung der Zellteilungsfähigkeit nach. Wurde die Polarisationsdauer auf 5 bzw. 3 Stunden reduziert, so nahm die Teilungsfähigkeit von *S. maltophilia* zu. Während nach 5 Stunden 12 % teilungsfähig waren, waren es nach 3 Stunden noch 24 %. Im Vergleich dazu waren auf der Kontrolle stets mindestens 60 % teilungsfähig, da nur mindestens 2-3 fach elongierte Bakterien in die Auswertung einbezogen wurden (siehe 2.7.5.2 auf Seite 48). Diese Ergebnisse zeigen, dass abhängig von der Dauer einer gepulsten Polarisation der Aufwuchsfläche die anhaftenden Bakterien geschädigt werden. Da die Pipemidinsäure die ATP-abhängige GyrB-Unterheit

der DNA-Gyrase hemmt, weisen diese Ergebnisse auf eine reduzierte Aktivität der DNA-Gyrase hin (Maxwell et al. 2005, Bates et al. 2007). Die geringere Enzymaktivität könnte folglich auf einen reduzierten ATP-Gehalt zurückgeführt werden. Die Messung des intrazellulären ATPs der Bakterien zeigte einen um 50 % geringeren ATP-Gehalt in polarisierten Bakterien in Vergleich zur Kontrolle. Allerdings waren die Messungen von einer hohen Standardabweichung begleitet. Dies könnte eine Ursache der geringeren Teilungsfähigkeit der Bakterien auf polarisierten ITO-Aufwuchsflächen sein.

Wie die DNA-Gyrase ist auch die bakterielle Proteinsynthese an den Ribosomen von ATP abhängig. Es ist für die Akitvierung der Aminosäuren und Verknüpfung dieser an die tRNA notwendig. Daher ist RNA nur in Stoffwechsel aktiven Bakterien vorhanden. Sollte eine elektrische Polarisierung einen Einfluss auf die bakterielle Aktivität haben, würden mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und einer 16S rRNA Sonde weniger Bakterien nachweisbar sein als in der Kontrolle. Die FISH-Technik wies einen um 50 % geringeren Anteil an ribosomal aktiven Bakterien im Vergleich zur Kontrolle nach, die mit der EUB338 Sonde nachweisbar waren.

Der Stoffwechsel, damit die Aufnahme von Nährstoffen und die ATP-Synthese sind unter anderem von einem elektrochemischen Gradienten und der Protonentranslokation über die Cytoplasmamembran abhängig. Daher wurde ein potenzieller Einfluss auf die Membranintegrität der polarisierten Bakterien vermutet. Würde die Membranintegrität gestört sein, so würde dies ebenfalls das Membranpotential beeinträchtigen und damit die in der Membran lokalisierten Prozesse wie z.B. die Atmungskette und die ATP-Synthese. Mittels Propidiummonoazid (PMA) wurde die Integrität der Membran untersucht. Dieses Molekül kann nur in Zellen mit beeinträchtigter Membranintegrität eindringen und deren DNA blockieren. Die quantitative PCR zeigte keine Schädigung der Membranintegrität durch gepulste Polarisierung. Wogegen eine PCR-DGGE derselben Proben nach Auftrennung der Mischpopulation in einzelnen Bakterienarten einen Einfluss auf die Membranintegrität zeigte. Zusätzlich zeigte die Auftrennung der Mischpopulation der polarisierten und nicht polarisierten Trinkwasserbiofilme Unterschiede in dessen Populationsdiversität auf.

Andere Arbeitsgruppen, die ebenfalls Effekte elektrischer Polarisierung auf planktonische oder sessile Bakterien untersuchten, verwendeten meist die klassische Kultivierungsmethode (KBE) auf Nährmedienplatten, um eine

Schädigung der Wachstumsfähigkeit der Bakterien zu prüfen (Rabnovitch et al. 2006, van der Borden et al. 2005, Lim et al. 2003, Gottenbos et al. 2001, Park et al. 2003). Diese Methode nimmt oft viele Tage in Anspruch bis erste Kolonien auf Nähragar-Platten zu erkennen sind. Zusätzlich besteht bei Mischkulturen aus Trinkwasser die Problematik, dass nur ein Bruchteil dieser Bakterien auf bisher bekannten Nähr-Agarmedien im Labor kultivierbar ist. Daher können die KBE/mL einen Minderbefund darstellen. Einen Verlust der Wachstumsfähigkeit der anhaftenden Bakterien zeigte Park et al. 2003 nach einer Polarisierung der Aufwuchsfläche mit + 1200 mV bzw. 1 A nach einer Sekunde mittels KBE/mL nach Kultivierung in NB-Bouillon. Mit Erhöhung des Potentials nahm die Wachstumsaktivität der Bakterien ab. Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) zeigte Park et al. Poren und Schäden in der Zellwand (Park et al. 2003), die auf eine Schädigung der Zellwandintegrität hinweisen können. Ähnliche Daten zeigte Giladi et al. 2008, der in Abhängigkeit der Stärke des angelegten elektrischen Feldes zwischen zwei Elektroden von 0,1 V/cm bis 4,5 V/cm mit einer Frequenz von 10 MHz nach 6 Stunden Polarisierung eine Abnahme der Viabilität der planktonischen Bakterien mittels KBE nachwies. Dabei verringerte die höchste Feldstärke die Wachstumsfähigkeit von *S. aureus* um 70 %. DelPozo et al. 2009 untersuchte die schädigende Wirkung von geringen Stromdichten auf der Aufwuchsfläche auf die Wachstumsfähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* Biofilmen. Vergleichbar mit dem Testsystem der vorliegenden Arbeit testete DelPozo et al. 2009 eine 7 Tage andauernde Polarisierung mit einer Stromdichte von 20 μ A bis 2000 μ A (2 mA). Es wurde eine Abhängigkeit der Viabilität der Bakterien von der Polarisierungsstärke und Dauer festgestellt. Mittels Kultivierung zeigte er nach 7 Tagen Polarisierung mit 2000 μ A eine um 3,5 Log-Stufen Reduktion von KBE/ml von *P. aeruginosa* Biofilmen nach. Während in unserem Testsystem der pH-Wert stabil zwischen 7,5 und 8,5 lag, stieg der pH-Wert bei DelPozo et al. 2009 auf bis zu 12 an. Daher darf der Einfluss des pH-Wertes auf die Viabilität der Bakterien nicht außer Acht gelassen werden. In der Arbeit von Del Pozo et al. 2009 fehlen Angaben über das entstandene Potential. Würde es über der Zersetzungsspannung von Wasser liegen, könnte eine Elektrolyse die Ergebnisse von DelPozo et al. 2009 beeinflusst haben. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der gewählten Polarisierungsart mit einem ständig gepulsten Potential das Risiko von Nebenreaktionen umgangen (Matyeeva et al. 2005). Daher wird die verringerte

Wachstumsfähigkeit, nachgewiesen mit PA, in der vorliegenden Arbeit allein auf die elektrische Polarisierung zurückgeführt.

Die Problematik der KBE-Bestimmung eines potentiellen Minderbefunds erkannte auch Kalmbach et al. 1997, der die Pipemidinsäurebehandlung in Kombination mit der FISH-Technik einsetzte, um noch unbekanntes, im Labor nicht kultivierbare Bakterien aus dem Trinkwasser, sowie ihre Kapazität Nährstoffe aufzunehmen nachzuweisen. Juhna et al. 2008, wählte diese Art der Wiederbelebung („resuscitation“) der Bakterien aus dem VBNC (viable but not cultivable) Zustand in gering dosierter Nährstoffbouillon mit Pipemidinsäure zum Nachweis der Viabilität von *Escherichia coli* in Biofilmen aus Trinkwasserleitungen. So konnten Junha et al. 2007a und 2007b im Gegensatz zu Kultivierungsmethoden und Enzymnachweisen mittels Pipemidinsäure und FISH mit 16S-RNA-Sonden diesen Keim nachweisen. Da diese Methode sensitiver und schneller ist als die Kultivierung auf Nährmedienplatten und nur Gyrase-aktive Bakterien auf das Antibiotikum Pipemidinsäure reagieren, wurde sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich an das hier entwickelte Testsystem angepasst und eingesetzt. Daher konnte mittels Pipemidinsäure nach einer 20 stündigen Polarisierung ein vollständiger Verlust der Zellteilungsfähigkeit und damit eine Inaktivierung der Bakterien nachgewiesen werden. Während Bakterien auf der Kontrolle in der Lage waren, die ihnen zur Verfügung gestellte C-Quelle innerhalb von 24 Stunden aufzunehmen und als Energiequelle für Zellwachstum zu nutzen, wiesen polarisierte Bakterien keine Veränderungen auf und verblieben als kleine Zellen in dem Status wie direkt nach der Polarisierung. In weiteren Versuchen wurde vergleichbar zu DelPozo et al. 2009 gezeigt, dass die Inaktivierung abhängig von der Dauer der Polarisierung war. Mit zunehmender Polarisationsdauer (3 Std. < 5 Std. < 20 Std.) stieg die Anzahl geschädigter Bakterien. Je länger polarisiert wurde, umso weniger Bakterien elongierten im Vergleich zur nicht polarisierten Kontrolle. Die Elongation der Bakterien auf der Kontrolle in Anwesenheit von Pipemidinsäure weist die Aktivität des Gyrase-Systems nach. Diese Enzyme sind für die Replikation der DNA und Zellwandsynthese bzw. Zellteilung erforderlich. Da dieses Enzym von ATP abhängig ist, könnte die Inaktivierung mit einem geringen ATP-Gehalt in der Zelle zusammenhängen.

Um zu prüfen ob die Inaktivierung der Zellteilungsfähigkeit mit einem reduzierten ATP-Gehalt und geringerer Aktivität weiterer Systeme einhergeht, wurden die ATP-Messung und die FISH-Technik eingesetzt. Die ATP-Messung wies zwar eine hohe Standardabweichung auf, aber im Mittel wurde ein um 50

% geringerer intrazellulärer ATP-Gehalt festgestellt. Die hohe Standardabweichung kann mit der Heterogenität einer Mischpopulation zusammenhängen, die auch in Parallelansätzen Unterschiede aufweisen kann. Da viele Enzyme unter Energieverbrauch also ATP-Hydrolyse agieren, können die geringeren ATP-Konzentrationen polarisierter Bakterien in Zusammenhang mit der ausbleibenden Elongation aufgrund nicht vorhandener Gyraseaktivität gestellt werden. Stirbt eine Zelle ab, so verbleibt das ATP noch lange in der Zelle, da ein Zelltod nicht sofort mit einer Lyse einhergeht. Folglich kann auch nach Tagen in toten Bakterien noch ATP nachgewiesen werden. Daher weist die Pipemidinsäuremethode eine 100 % -ige Inaktivierung der Bakterien nach, aber die ATP-Messung kann noch intrazellulär konserviertes ATP nachweisen. So kann der geringere ATP-Gehalt die Folgerung aus der Pipemidinsäure-Behandlung einer geringeren Enzymaktivität in polarisierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle stützen. Allerdings muss beachtet werden, dass es sich im Vergleich zu den mittels Pipemidinsäure nachweislich aktiven Bakterien im Kontrollbiofilm, in den polarisierten Bakterien anhand des ATP-Gehalts nicht zwingend noch um aktive Bakterien handeln muss.

Im Vergleich zur ATP-Messung ist der Nachweis von Bakterien mittels FISH verlässlicher. Durch die EUB338 16S-RNA-Sonde konnten im Kontrollbiofilm zwischen 60 % und 80 % der Bakterien nachgewiesen werden. Dagegen waren nur 10 – 20 % der polarisierten Bakterien mit der gleichen Sonde nach Polarisation nachweisbar. 16S-RNA wird nur in aktiven Bakterien nachgewiesen, wenn in diesen Transkription an Ribosomen erfolgt. Die reduzierte ATP-Menge sowie die geringere Anzahl RNA-markierter Bakterien nach Polarisation weisen auf eine reduzierte Aktivität polarisierter Bakterien hin. Die 40 – 20 % der Gesamtzellzahl nicht durch die EUB338-Sonde nachgewiesenen Bakterien im Kontroll-Trinkwasserbiofilm könnten einen zu geringen RNA-Gehalt aufweisen, oder nicht die passende Sequenz für diese EUB338-Sonde aufweisen. Eine weitere Erklärung der fehlenden Bakterien könnte die gewählte Methode zur Permeabilisierung und Fixierung der Bakterien sein. Die in dieser Arbeit angewandte Methode nach Amman et al. 1995 ist hauptsächlich für gram-negative Bakterien und nur für wenige gram-positive Bakterien geeignet. In nachfolgenden Untersuchungen sollte eine optimierte Permeabilisierung zeigen, ob noch andere Bakterienarten wie z.B. gram-positive oder Corynebakterien nachgewiesen werden können. Dafür sollte ein Mix aus verschiedenen RNA-Sonden eingesetzt werden, um ein möglichst weites Spektrum der im Trinkwasser potentiell vorkommenden Bakterien

nachweisen zu können. So wurde in einem Review von Amann und Fuchs (2008) eine Kombination aus drei EUB-Sonden (338, 338-II und 338-III) beschrieben. Mit dieser modifizierten FISH-Technik könnte ein weiterer Anteil der im Kontrollbiofilm aktiven Bakterien nachgewiesen werden. Unter dieser Annahme kann gefolgert werden, dass nach Polarisation mindestens 50 %- 70 % weniger Bakterien eine geringere ribosomale Aktivität aufweisen. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus der Pipemidinsäurebehandlung, der ATP-Messung sowie der FISH-Technik darauf hin, dass eine gepulste Polarisation mit einem Puls von $- 600 \text{ mV} / + 600 \text{ mV}$ an der Aufwuchsfläche ITO eine Schädigung bzw. Inaktivierung von anhaftenden Bakterien zur Folge hat.

Um zu untersuchen ob die nachgewiesene Schädigung auf eine herabgesetzte Membranintegrität zurückzuführen ist, wurde mittels Propidiummonoazid die Membranintegrität polarisierter und nicht polarisierter Bakterien untersucht. In anderen Arbeitsgruppen wurde meist die so genannte Live-Dead-Färbung eingesetzt, um zwischen geschädigten und lebenden Zellen zu unterscheiden. Dabei dringt Propidiumiodid (PI) nur in Zellwand geschädigte und SYTO9 in alle Bakterien ein. In einer aktuellen Arbeit (Hong et al. 2008) wurden nach Polarisation der Aufwuchsfläche ($15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für 40 Minuten) mehr *P. aeruginosa* PA01 Zellen mit Propidiumiodid angefärbt als Bakterien die nicht polarisiert wurden. Hong et al. 2008 interpretierte die PI-gefärbten Bakterien als eine Inaktivierung durch elektrische Polarisation. Wobei beachtet werden muss, dass eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran nicht zwingend mit der irreversiblen Schädigung und folglich Abtötung der Bakterien einhergeht. Zum Beispiel das als Elektroporation beschriebene Verfahren wird zum gezielten Einbringen von Fremd-DNA (Plasmide) durch Induktion von Poren in der Zellmembran in Bakterien genutzt. Dabei werden die Bakterien nicht zwingend letal geschädigt. Die Methode der Elektroporation mittels gepulst elektrischer Felder (PEF pulsed electric field) wurde zur Desinfektion von Lösungen getestet (Castro et al. 1993, Liu et al. 1997, Wouters et al. 1999, Wouters et al. 2001). Dabei wird die PEF-Behandlung mit einer Stärke von $20 \text{ kV}/\text{cm}^2$ für kurze Inkubationszeiten von 500 ns bis $4 \mu\text{s}$ eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass durch den Einsatz solcher elektrischer Felder eine Reduktion von 6-Log-Stufen pro mL der Bakterien z.B. in Nahrungsmittellösungen erzielt werden kann (Quin et al. 1996, Castro et al. 1993, Wouters et al. 1999). Die nachgewiesene Inaktivierung durch elektrische Polarisation einer Aufwuchsfläche (sessile Bakterien) wird mit der Elektroporation (elektrische Felder) planktonischer

Bakterien verglichen, wobei durch die hohen Spannungen lokale Membranstabilitäten verursacht werden und dadurch Poren entstehen. Diese Poren werden durch elektrochemische Kompression der Zellmembran und durch die Zugspannung, induziert durch den elektrischen Einfluss, hervorgerufen (Wouters et al. 1999). Diese derzeit diskutierte Theorie beinhaltet die Annahme, dass durch elektrische Polarisierung ein Ladungstransfer und eine Ladungsakkumulation über die Zellmembran stattfinden (Wouters et al. 1999). Solche Poren konnte Rowan et al. 2000 mittels Transmissions Elektronenmikroskopie TEM bei *B. cereus* nach Behandlung mit 30 kV/cm in einem elektrischen Feld mit 6000 Pulsen (je 500 ns) nachweisen. Das in der vorliegenden Arbeit polarisierte Potential von - 600 mV /+ 600 mV war sehr gering. Allerdings wurde diese Polarisierung nicht nur wenige Mikrosekunden (μ s) oder Nanosekunden (ns), sondern über 7 Tage durchgeführt. Es wurde vermutet, dass die lang andauernd geringe Polarisierung eine potentielle Schädigung hervorrufen kann. Daher wurde mittels Propidiummonoazid eine Schädigung der Membranintegrität untersucht (Nocker et al. 2003, 2007). Mit dieser Methode haben Rieder et al. 2008 eine Schädigung der Bakterien aus Klinikabwässern durch die Behandlung eines gepulsten elektrischen Feldes nachgewiesen. In Anlehnung an diese Arbeit wurden sowohl polarisierte als auch nicht polarisierte Trinkwasserbiofilme von ITO isoliert, mit Propidiummonoazid behandelt und mittels quantitativer PCR und PCR-DGGE untersucht.

Propidiummonoazid (PMA) dringt in Membran geschädigte Bakterien ein und bindet nach Bestrahlung mit Licht (460 nm) kovalent an die DNA. Die von PMA blockierte DNA in Membran geschädigten Bakterien wird in einer PCR nicht amplifiziert. Mit dieser Methode wurden mittels quantitativer RT-PCR keine Unterschiede zwischen einem 7 Tage polarisierten und nicht polarisierten Trinkwasserbiofilm festgestellt. In allen Proben war stets der gleiche Anteil Bakterien nicht von PMA penetriert worden. Die Analyse derselben Bakterien mittels PCR-DGGE zeigte allerdings einige Unterschiede auf. Hier war bei zwei Bakterienarten eine Beeinträchtigung der Membranintegrität mittels PMA nachweisbar. Diese Daten deuten darauf, dass verschiedene Bakterien einer Mischpopulation unterschiedlich auf elektrische Polarisierung reagieren und unterschiedlich sensitiv demgegenüber sind. Dies wurde an dem unterschiedlichen Bandenmuster der PCR-DGGE im Vergleich der Kontrolle mit dem polarisierten Trinkwasserbiofilm deutlich. In Abhängigkeit einer Polarisierung waren einige Bakterienarten der polarisierten ITO-Aufwuchsfläche nicht

nachweisbar (Bande Nr. 1, 2 und 4), die aber auf der Kontrolle deutlich erkennbar waren. Dies deutet darauf hin, dass durch die veränderten Oberflächenbedingungen einige Bakterienarten eher abgestoßen und andere angezogen wurden bzw. gewachsen sind. Wurden die Biofilme nach Polarisation regeneriert, veränderte sich das Bandenmuster. Danach waren einige Bakterien nicht mehr (Bande Nr. 1, 3), oder erst danach (Bande Nr. 2, 4) nachweisbar. Diese Verschiebung der Populationsdiversität weist auf einen Einfluss der an der polarisierten Aufwuchsfläche wachstumsfähigen Bakterien hin. Während der andauernden Polarisation werden einige Bakterien reprimiert, wogegen andere sich bevorzugt etablieren.

Diese Daten weisen eine physiologische Reaktion der Bakterien auf die physico-chemische Beeinflussung durch gepulste Polarisation von 7 Tagen nach. Für eine Trinkwasserpoptation wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal auf verschiedenen Ebenen Einflüsse elektrischer Polarisation einer Aufwuchsfläche auf die Physiologie der Bakterien beschrieben. Es wurden eine Beeinträchtigung der Physiologie der Bakterien sowie ein Einfluss auf die Populationsdiversität einer Trinkwassermischkultur nachgewiesen.

In Folge dessen stellt sich die Frage, wie eine elektrische Polarisation einer Aufwuchsfläche zu einer Beeinflussung und Schädigung intrazellulärer Prozesse bzw. Enzyme führen kann. Die Polarisation beeinflusst direkt die elektrostatischen Kräfte zwischen Bakterienoberfläche und Aufwuchsfläche. Hier stellt sich die Frage, wie weit diese Beeinflussung sich über die Zellwand und Cytoplasmamembran in das Zellinnere auswirken kann. Bakterien besitzen viele Redoxsysteme und Stoffwechselprozesse, die von einem gerichteten Elektronen- bzw. Protonenfluss über die Cytoplasmamembran abhängig sind. Diese Redoxreaktionen und Enzymreaktionen finden an membrangebundenen Proteinkomplexen statt. Das wichtigste Redoxsystem ist das NAD^+/NADH -System, das ein wichtiger Beteiligter an der Elektronentransportkette ist und Cofaktor bei zahlreichen Enzymen wie z.B. der NADH Dehydrogenase (Citrat Zyklus). Ein weiterer Elektronenakzeptor ist das Cytochrome bc_1 , das Elektronen vom Quinon zum Cytochrom c überträgt. Dieser Schritt ist für die ins Zellinnere gerichtete Elektronentransportkette (Atmungskette) wichtig, da damit der Protonenexport aus der Bakterienzelle (Erhalt des pH-Wertes im Cytosol) und damit die ATPase zur Energiegewinnung angetrieben werden. Letztendlich hält die Translokation von Elektronen und Protonen das Membranpotential aufrecht (Brooijmans et al. 2007, Feniouk et al. 2007, Kashket 1981, Padan et al. 1987)

und beeinflusst damit die Aktivität weiterer Prozesse der Bakterienzelle (Kashket et al. 1980). Dazu zählen z.B. die Nährstoffaufnahme, Translokationen von Ionen (z.B. Na^+ , K^+ , OH^-) über Transmembrankanäle und Enzymreaktionen im Citrat-Zyklus oder Synthesen von neuen Molekülen, um nur einige Beispiele zu nennen. Da es eine Vielzahl von Prozessen und deren Abhängigkeit voneinander nicht geklärt sind, ist es schwierig vorherzusagen, welcher Prozess zuerst beeinflusst wird.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Aktivität der Bakterien nach Polarisierung stellte sich die Frage, ob die Effekte (höhere Primäradhäsion, kein mehrschichtiges Wachstum, weniger ATP, geringere ribosomale Aktivität) mit der Diversität der Mischpopulation zusammen hängen können. Wie im Abschnitt (4.2) bereits diskutiert, können unterschiedliche Bedingungen an einer Aufwuchsfläche einen Selektionsdruck für Bakterien ausüben. Während für die Bakterienart x diese Bedingungen attraktiv sind, können sie für die Bakterien y repulsiv sein. Im Bezug auf die Aktivität könnte der geringere ATP-Gehalt nicht nur durch eine Schädigung der Bakterien hervorgerufen sein, sondern das Resultat einer Selektion durch Polarisierung. So ist nicht auszuschließen, dass durch die gewählte Polarisierungsroutine ATP-reichere, also besonders aktive Bakterien, abgestoßen wurden. Ähnliches gilt für die FISH nachgewiesenen Bakterien. Wie jede Methode ist auch diese von einer Nachweisgrenze – einer Mindestmenge an RNA-Molekülen – abhängig. Daher ist nicht auszuschließen, dass Bakterien mit geringer Aktivität aufgrund zu geringer RNA-Menge oder aufgrund nicht ausreichender Porosität (siehe oben) mit der EUB-Sonde nicht markiert werden konnten. Die Ergebnisse der Populationsanalyse deuten darauf hin, dass die nachgewiesenen geringeren Aktivitäten (ATP, RNA) nicht nur mit einer Schädigung, sondern auch mit einer Selektion der Population im Trinkwasserbiofilm zusammen hängen. Es wäre möglich, dass besonders aktive Bakterien an die polarisierte Aufwuchsfläche angezogen werden und besonders sensitiv gegenüber der Polarisierung sind, wodurch diese stark geschädigt werden. Es wäre aber auch denkbar, dass wenig aktive Bakterien aufgrund anziehender elektrostatischer Kräfte angezogen und aktivere durch dieselben Kräfte abgestoßen werden. In dieser Art könnte man jede Kombination aus Reaktion auf physio-chemische Oberflächeneigenschaften und physiologische Reaktion der verschiedenen Bakterienarten aufzählen.

Interessant ist, dass nach einer Regeneration die Population sich erneut ändert. Danach werden Bakterienarten wieder nachweisbar, die unter polarisierten

Bedingungen nicht sichtbar waren (Bande 2 und 4). Dies deutet darauf, dass die Selektion nur solange anhält wie die Polarisation andauert. Sobald sich die Bedingungen an der Aufwuchsfläche erneut ändern, können andere zuvor reprimierte Bakterienarten sich aufgrund verbesserter Bedingungen wieder etablieren. Es wäre möglich, dass diese Bakterienarten in den polarisierten Biofilmen vorhanden sind, aber in so geringen Zelldichten, dass sie nicht nachweisbar sind. Passen sich die Oberflächeneigenschaften der Kontrolloberfläche wieder an, so können sich diese Bakterien (Bande 2 und 4) wieder etablieren. Sie werden dann sowohl im polarisierten Biofilm wie bereits im Kontrollbiofilm nachweisbar. Die Polarisation könnte die Bakterien in einen VBNC-Zustand versetzt haben und als der Stressfaktor Polarisation abgestellt wurde, konnten die Bakterien wieder aktiv werden.

Des Weiteren stützt der Nachweis des Einflusses auf die Diversität die Erklärung aus Abschnitt (4.2) zu der stets erhöhten Primäradhäsion der Bakterien. Unter jeder gewählten Polarisationsroutine wurde eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Adhäsion der Trinkwasserbakterien festgestellt. Daher wurde angenommen, dass die unterschiedlich erzeugten elektrostatischen Oberflächeneigenschaften (konstant stark positiv über konstant stark negativ bis zu ständig gepulst) stets andere Bakterienarten anziehen bzw. abstoßen. Mit den Ergebnissen der PCR-DGGE Analyse kann diese Aussage bekräftigt werden.

4.5 Einfluss elektrischer Polarisation auf bereits etablierte Biofilme

Der Einfluss elektrischer Polarisation wurde während der frühen Phase der Adhäsion (Primäradhäsion Phase 1-2) und der frühen Phase der Biofilmbildung (Wachstumsphase Phase 3) untersucht. Die Polarisation während der Wachstumsphase führte zu deutlichen Unterschieden zwischen Kontrolle und polarisiertem Trinkwasserbiofilm und zu einer Beeinträchtigung der Physiologie polarisierter Bakterien. Ziel war es zu prüfen, wie bereits etablierte Trinkwasserbiofilme auf elektrische Polarisation reagieren. Daher wurde ein Einfluss auf eine potenzielle Biofilmablösung untersucht. Dazu wurden 4 Tage und zwei Wochen alte Trinkwasserbiofilme mit einem gepulsten Potential polarisiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein 4 Tage alter Biofilm durch gepulste Polarisation größtenteils abgelöst werden konnte, aber ein zwei Wochen alter Biofilm dadurch nicht nachweislich beeinflusst wurde.

Andere Autoren wie Hong et al. 2008 führten ähnliche Versuche zur Ablösung von primär adhären *P. aeruginosa* PAO1 Bakterien durch. Nach einer Primäradhäsion von 90 min starteten die Autoren die Polarisation mit $-15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bzw. $+15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf der Oberfläche, an der die Bakterien adhären waren. Nach 20 min Polarisation mit $-15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ wurde eine Ablösung von 80 % des Ausgangsbiofilms publiziert. Im gleichen Zeitraum führte die Polarisation mit $+15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ zu einer Ablösung von nur 20 %. Hong et al. 2008 schlossen daraus, dass durch repulsive elektrostatische und elektrophoretische Kräfte die Ablösung erzielt wurde. Die nicht abgelösten Bakterien wurden durch andere Kräfte bedingt durch die Heterogenität der Bakterienoberfläche (van der Mei und Busscher 2001, siehe 4.2) fest an die Oberfläche gebunden. Auf der mit $+15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ polarisierten Oberfläche beobachtete Hong et al 2008 eine ständige Bewegung der adhären Bakterien ohne eine starke Ablösung. Im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit polarisierten Biofilmen (4 Tage) waren die bei Hong et al. 2008 polarisierten Biofilme sehr jung (90 min) und noch in der frühen Phase der Biofilmbildung und nicht ein bereits etablierter Biofilm. Folglich werden die interzellulären anziehenden Kräfte in 4 Tage alten Biofilmen stärker sein, da hier mehr EPS vorhanden sind, als nach 90 min Primäradhäsion. Van Borden et al. 2005 führte ähnliche Versuche mit gleich alten Biofilmen (90 min) von *S. epidermidis* auf ITO durch. In dieser Arbeit wurde die Ablösung durch ein Potential (1,5 – 1,7 V) und durch einen Strom (15, 60 und 100 μA), der für 150

min amplifiziert wurde, getestet. Allerdings erlaubt die Geometrie der Durchflusszelle keine Integration einer Referenzelektrode, sodass eine Kontrolle der Polarisierung nicht möglich war. Zwar hat van der Borden et al. 2005 eine Ablösung des Biofilms nach 133 min um 75 % mit 100 μA (2 Hz = 120 Pulse pro Minute) festgestellt, aber inwieweit das Potential die kritische Grenze von ± 800 mV überschritt, worüber Elektrolyse einsetzen kann, ist aufgrund der fehlenden Referenzelektrode nicht überprüfbar. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse können durch die Verwendung der Referenzelektrode, die gewählten elektrochemischen Bedingungen an den Aufwuchsflächen, als abgesichert betrachtet werden. Dennoch fällt im Vergleich der in der vorliegenden Arbeit polarisierten Biofilme und der bisher untersuchten Biofilme anderer aktueller Publikationen auf, dass bisher keine Einflüsse elektrischer Polarisierung auf Biofilme, ältere als 25 - 90 Minuten, untersucht bzw. publiziert hat (van der Borden et al. 2004 und 2005; Poortinga et al. 2000 und 2001a,b, Hong et al. 2008). Die bisher publizierten Daten befassen sich ausschließlich mit Reinkulturbiofilmen wie z.B. *P. aeruginosa* oder *S. epidermidis*. Eine geeignete Polarisationsroutine für eine gezielte Ablösung eines Reinkulturbiofilms, ist einfacher zu identifizieren als für einen Trinkwasserbiofilm unbekannter Zusammensetzung. Reinkulturen kann man auf Hydrophobizität, Zetapotential und EPS hin untersuchen, wodurch eine Abschätzung der herrschenden Kräfte möglich ist. Dagegen kann in einem Mischkulturbiofilm eher eine Anpassung an die geschaltete Polarisierung erfolgen, wodurch nie eine Polarisierung mit ausschließlich repulsiver Auswirkung auf alle Bakterien erzielt werden kann. 15 – 90 Minuten junge Biofilme sind dünne Monolayer, die kein komplexes Netzwerk aus EPS aufweisen, die den Biofilm stabilisieren könnten. Folglich ist die Ablösung 90 Minuten junger Reinkulturbiofilme – eher eine Ablösung während der Primäradhäsion – wahrscheinlicher als die eines 4 Tage alten Mischkulturbiofilms. Mit zunehmendem Alter des Biofilms nimmt die Anzahl der physico-chemischen Wechselwirkungen im Biofilm aufgrund ansteigender Biomasse (Zellen, EPS) zu.

Dies zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da durch Polarisierung keine ausreichende Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Bakterienzelle und ITO-Oberfläche in einem mehrschichtigen zwei Wochen alten Trinkwasserbiofilm für eine nachweisbare Ablösung erzielt werden konnte. Ein solcher Biofilm besteht aus einer Vielzahl von Bakterien, von denen nur wenige mit der Oberfläche in direktem Kontakt stehen. Die meisten Bakterien haften, in

das Milieu ragend, in einer EPS-Matrix. Hier spielen die schon zuvor diskutierten Netzwerkeigenschaften der EPS und damit einhergehenden Kräfte eine große Rolle. Diese stabilisieren den Biofilm, sodass die Beeinflussung elektrostatischer Oberflächeneigenschaften von ITO die Struktur nicht ändern kann. Ein hoher Anteil an 1,3 bzw. 1,4 verknüpften Monomeren (Glukose, Fruktose, Mannose) wie im Polymer Xanthan gibt dem Biofilm besondere Stabilität. Saure Polysaccharide wie Uronsäuren bzw. Moleküle wie Pyruvat erhöhen den Anteil an ionischen Wechselwirkungen, da diese Bausteine als Polyanionen fungieren (Sutherland 2001). Stoodley et al. 1997 untersuchten die Wirkung einer Polarisierung auf einen im Durchfluss entstandenen 3 Tage alten Mischbiofilm aus *K. pneumoniae*, *P. fluorescens*, und *P. aeruginosa*. Dieser Biofilm ist vom Alter und den Anzuchtbedingungen mit den 4 Tage alten Trinkwasserbiofilmen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Stoodley et al. 1997 beobachtete wie der Biofilm in gleicher Frequenz wie die Polarisierung auf und ab geschaltet wurde, kontrahierte und nach der Polarisierung in den Ausgangszustand zurück fiel/ging (Stoodley, et al. 1997). Aber eine Ablösung von Zellaggregaten wurde nicht festgestellt. Die Autoren schlossen daraus, dass durch die Polarisierung eine Beeinflussung der Ladungen an den EPS zur reversiblen Umlagerung der EPS-Matrix und damit zur Kontraktion des Biofilms führte. Diese Erklärung wäre auch auf die in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbare Ablösung anwendbar. Es erklärt, warum nach 4 Tagen Anzucht der Biofilm nur teilweise abgelöst werden konnte, und ein zwei Wochen alter Biofilm unverändert blieb. In einem zwei Wochen alten Trinkwasserbiofilm herrschte ein solch starkes Netzwerk, das nicht durch Änderung elektrostatischer Kräfte an der Aufwuchsfläche geschwächt werden konnte. Die Annahme, eine Schwächung elektrostatischer Kräfte an der Grenzfläche zwischen Biofilm und Aufwuchsfläche könnte durch eine gepulste Polarisierung erzielt werden, konnte hiermit nicht messbar nachgewiesen werden. Weder Strukturänderungen noch eine im CLSM sichtbare Ablösung wurden festgestellt, was damit die hohe Stabilität eines zwei Wochen alten Trinkwasserbiofilms nachweist.

5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die bekannten Theorien, wie die DLVO und thermodynamische Theorie, nicht für Vorhersagen für das Adhäsionsverhalten von Bakterien an eine Oberfläche geeignet sind. Aber es wurde eine physiologische Reaktion der anhaftenden Bakterien in Abhängigkeit der getesteten Polarisierung der Aufwuchsfläche gezeigt. Zwar wurde keine starke Verringerung der Gesamtzellzahl, aber eine starke Beeinträchtigung der bakteriellen Aktivität nachgewiesen. Dies ist ein vielversprechender Ansatz für die Praxis, da weniger aktive Bakterien eine geringere Biofilmbildung aufwiesen und in der Praxis geringeres Biofouling verursachen würden. Das stark verringerte Volumen der Trinkwasserbiofilme nach Polarisierung weist auf einen geringeren EPS-Gehalt hin. Hier könnten anschließende EPS-Analysen Informationen über Einflüsse elektrischer Polarisierung auf die EPS-Matrix liefern. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Gene des quorum sensing Systems in Abhängigkeit einer Polarisierung beeinflusst und deren Expression reguliert werden. Dies könnte Erkenntnisse darüber liefern, ob der festgestellte Einfluss auf die Biofilmstruktur während der Wachstumsphase mit der Expression von Genen des quorum sensing Systems zusammenhängt.

Die veränderte Populationsdiversität des Trinkwasserbiofilms könnte auch auf unterschiedlich stark Biofilm bildende Bakterienarten hinweisen. Eine Identifikation der unter polarisierten und nicht polarisierten Bedingungen auf ITO wachsenden Bakterienarten wäre interessant. Versuche mit diesen Isolaten könnten Aufschluss über die Einflüsse elektrischer Polarisierung auf deren Biofilmbildung und Aktivität liefern.

Versuche mit polarisierten Trinkwasserbiofilmen in Kombination mit Bioziden bzw. Desinfektionsmitteln könnten Informationen über den Einfluss der EPS-Matrix auf die Sensitivität eines Biofilms gegenüber Chemikalien liefern. Diese Ansätze könnten das Potenzial elektrischer Polarisierung zur Hemmung des Biofouling in der Praxis z.B. auf Filtrationsmembranen feststellen.

Die Anwendung von polarisierten Polypyrrol-Aufwuchsflächen zeigte eine geringere Adhäsion der Bakterien. Nachfolgend sollten Versuche zur potenziellen Hemmung des Biofilmwachstums auf Polypyrrol-Aufwuchsflächen durchgeführt werden. Dies könnte das Potenzial dieses Systems als neue Antifoulingstrategie für Filtrationsmembranen feststellen.

6 Literaturverzeichnis

Absolom, D.R. (1988) The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Can. J. Microbiol.* 34 (3), 287-298.

Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J., Neumann, A.W. (1983) Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1), 90-97.

Abu-Lail, N.I., Camesano, T.A. (2006) Specific and nonspecific interaction forces between *Escherichia coli* and silicon nitride, determined by poisson statistical analysis. *Langmuir.* 22 (17), 7296-7301.

Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., Rouxhet, P.G. (2001) Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods.* 45 (2), 119-126.

Albers, B., Rckwitz, R., Raubuch, M. Zelles L. (1996) Adenylates and adenylate energy charge. S. 246-252 In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., MArgesin, R.: *Methods in soil biology*, Springer, Berlin

Alexander, E., Pham, D., Steck, T.R. (1999) The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8), 3754-3756.

Allison, D.G. (2003) The biofilm matrix. *Biofouling.* 19 (2), 139-150.

Amann, R., Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (5), 339-348.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6), 1919-1925.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 (1), 143-169.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 4 1563-1589.

Ateh, D.D., Navsaria, H.A., Vadgama, P. (2006) Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *J. R. Soc. Interface.* 3 (11), 741-752.

Azeredo, J., Oliveira, R. (2000) The role of exopolymer in the attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. *Biofouling* 16, 59-67

Barker, M.M., Gourse, R.L. (2001) Regulation of rRNA transcription correlates with nucleoside triphosphate sensing. *J. Bacteriol.* 183 (21), 6315-6323.

Bates, A.D., Maxwell, A. (2007) Energy coupling in type II topoisomerases: why do they hydrolyze ATP? *Biochemistry.* 46 (27), 7929-7941.

Berg, G., Roskot, N., Smalla, K. (1999) Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11), 3594-3600.

Berney, M., Vital, M., Hulshoff, I., Weilenmann, H.U., Egli, T., Hammes, F. (2008) Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Res.* 42 (14), 4010-4018.

Berry, D., Xi, C., Raskin, L. (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (3), 297-302.

Black, M.T., Stachyra, T., Platel, D., Girard, A.M., Claudon, M., Bruneau, J.M., Miossec, C. (2008) Mechanism of action of the antibiotic NXL101, a novel nonfluoroquinolone inhibitor of bacterial type II topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (9), 3339-3349.

Boe-Hansen, R., Martiny, A.C., Arvin, E., Albrechtsen, H.J. (2003) Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. *Water Sci. Technol.* 47 (5), 91-97.

Boks, N.P., Norde, W., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (2008) Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology.* 154 (Pt 10), 3122-3133.

Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (2), 179-230.

Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (1996) Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on the co-adhesion of oral microbial pairs. *Microbiology.* 142 (Pt 9), 2355-2361.

Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. (2006) How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (23), 8646-8649.

Brooijmans, R.J., Poolman, B., Schuurman-Wolters, G.K., de Vos, W.M., Hugenholtz, J. (2007) Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. *J. Bacteriol.* 189 (14), 5203-5209.

Bryers, J.D. (2008) Medical biofilms. Wiley Periodicals, Inc; *Biotechnol. Bioeng.* 100 (1), 1-18.

Bunker, S.T., Bates, T.C., Oliver, J.D. (2004) Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded gfp- and lux-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ. Biosafety Res.* 3 (2), 83-90.

Busalmen, J.P., de Sanchez, S.R. (2001) Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to nonpolarized and polarized thin films of gold. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7), 3188-3194.

Busscher, H.J., Norde, W., van der Mei, H.C. (2008) Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (9), 2559-2564.

Busscher, H.J., van der Mei, H.C. (1997) Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv. Dent. Res.* 11 (1), 24-32.

Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W., de Jong, H.P., Arends, J. (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (5), 980-983.

Castro, A.J., Barbosa-CaÂnovas, G.V. and Swanson, B.G. (1993) Microbial inactivation of foods by pulsed electric Fields. *J. of Food Proc. and Pres.* 17, 47±73.

Characklis, W. G. (1990) Biofilm processes, S. 195 – 232 In: Biofilms, (Hrsg.): Characklis, W. G.; Marshall, K. C. John Wiley & Sons, New York

Chicote, E., Garcia, A.M., Moreno, D.A., Sarro, M.I., Lorenzo, P.I., Montero, F. (2005) Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (4), 155-162.

Chopra, K.L., Major, S., Pandya, D.K. (1983) Transparent Conductors - A. Status Review, *Thin Solid Films*, 102, 1-46.

Christensen, B.E., Kjosbakken, J., Smidsrod, O. (1985) Partial Chemical and Physical Characterization of Two Extracellular Polysaccharides Produced by Marine, Periphytic *Pseudomonas* sp. Strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (4), 837-845.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41 435-464.

Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35 299-324.

Cowan, M.M., Van der Mei, H.C., Stokroos, I., Busscher, H.J. (1992) Heterogeneity of surfaces of subgingival bacteria as detected by zeta potential measurements. *J. Dent. Res.* 71 (11), 1803-1806.

Critchley, M.M., Cromar, N.J., McClure, N.C., Fallowfield, H.J. (2003) The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94 (3), 501-507.

Curran, S., A. Stark-Hauser, and S. Roth: (1997) "Polyacetylene", In: *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers – Conductive Polymers: Synthesis and Electrical Properties*, H.S. Nalwa (Ed.), John Wiley 2 (1997) 1, Chichester, England.

Davey, M.E., O'toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4), 847-867.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280 (5361), 295-298.

de Kerchove, A.J., Elimelech, M. (2005) Relevance of electrokinetic theory for "soft" particles to bacterial cells: implications for bacterial adhesion. *Langmuir.* 21 (14), 6462-6472.

de Kievit, T.R. (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 11 (2), 279-288.

de Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B.H. (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4), 1865-1873.

de Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., Rosales, M., Azzuz, A.C., Alcantara, N., Martinez, M.B., Giron, J.A. (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell. Microbiol.* 5 (9), 625-636.

de Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., Rosales, M., Azzuz, A.C., Martinez, M.B., Giron, J.A. (2002) Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), 918-923.

del Pozo, J.L., Rouse, M.S., Mandrekar, J.N., Steckelberg, J.M., Patel, R. (2009) The electricidal effect: reduction of *Staphylococcus* and *pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electrical current. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (1), 41-45.

DeLuca, M., McElroy, W.D. (1974) Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry*. 13 (5), 921-925.

Denton, M., Kerr, K.G. (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1), 57-80.

Derjaguin, B. W., and L. Landau. (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolyte. *Acta Physiochim.* 14:633-662

DeTraglia, M.C., Brand, J.S., Tometsko, A.M. (1978) Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labels for trypsin. *J. Biol. Chem.* 253 (6), 1846-1852.

Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P., Winzer, K. (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 8 (6), 1095-1104.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), 881-890.

Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55 (3), 395-424.

Dunne, W.M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2), 155-166.

Eichenlaub, S., Kumar, G., Beaudoin, S. (2006) A modeling approach to describe the adhesion of rough, asymmetric particles to surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2), 656-664.

Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U. (2004) Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Res.* 38 (5), 1197-1206.

Evans, G. P. (1990) In *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, edited by H. Gerischer and C. W. Tobias (VCH, Amsterdam, 1990), Vol. 1;

Feniouk, B.A., Suzuki, T., Yoshida, M. (2007) Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit epsilon in bacterial ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 282 (1), 764-772.

Feniouk, B.A., Yoshida, M. (2008) Regulatory mechanisms of proton-translocating F(O)F (1)-ATP synthase. *Results Probl. Cell Differ.* 45 279-308.

Feser, R., von Franqué, O., Siedlarek, W. (2001) Einfluss der Oberflächenbehandlung auf Fotoeffekt und Potentialverteilung an Kupferrohren. *Materials and Corrosion*, 52, 362-367

Fillingame, R.H. (1997) Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol.* 200 (Pt 2), 217-224.

Flemming, H.-C. (2008) Biofilms In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000342.pub2

Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J. Bacteriol.* 189 (22), 7945-7947.

Flemming, H.-C., Leis, A. (2002) Sorption properties of biofilms, S. 2958 – 2967

In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 5, Hrsg.: Bitton, G. John Wiley & Sons, Inc., New York

Flemming, H.C., Wingender, J. (2001a) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43 (6), 1-8.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2001b) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci. Technol.* 43 (6), 9-16.

Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2001c) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit*, 31 (3), 169 – 180

Flemming, H.-C. (1998) Biofilme in Trinkwassersystemen – Teil I: Übersicht GWF Wasser Abwasser, 139 (13), S. 65 – 72

Flemming H.-C. (1995) Sorption sites in biofilms *Wat. Sci. Technol.*, 32 (8), 27 – 33

Gambhir, A., Gerard, M., Jain, S.K., Malhotra, B.D. (2001) Characterization of DNA immobilized on electrochemically prepared conducting polypyrrole-polyvinyl sulfonate films. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 96 (1-3), 303-309.

Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W. (2001) The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*--a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Sci. Technol.* 43 (6), 159-167.

Gennis, R. B. (1987) The cytochromes of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.* 46, 387–399.

Giladi, M., Porat, Y., Blatt, A., Wasserman, Y., Kirson, E.D., Dekel, E., Palti, Y. (2008) Microbial growth inhibition by alternating electric fields. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (10), 3517-3522.

Gottenbos, B., Grijpma, D.W., van der Mei, H.C., Feijen, J., Busscher, H.J. (2001) Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (1), 7-13.

Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (1999) Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods Enzymol.* 310 523-534.

Gregory, J. (1975) Interfacial Phenomena S. 53-90 In: Ives, K. (Hrsg.): The scientific Basis of Filtration, Noordhoff, Leyden

Grey, B., Steck, T.R. (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (11), 5325-5327.

Grobe, S., Wingender, J., Flemming, H.C. (2001) Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 204 (2-3), 139-142.

Gunasekera, T.S., Sorensen, A., Attfield, P.V., Sorensen, S.J., Veal, D.A. (2002) Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), 1988-1993.

Guyard, S., Mary, P., Defives, C., Hornez, J.P. (1999) Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *J. Appl. Microbiol.* 86 (5), 841-850.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2), 95-108.

Hamaker, H.C. (1937) The London-Van der Waals Attraction Between Spherical Particles. *Physica IV* 10, 1058-1072

Hara, K.Y., Mori, H. (2006) An efficient method for quantitative determination of cellular ATP synthetic activity. *J. Biomol. Screen.* 11 (3), 310-317.

Hayashi, H., Tsuneda, S., Hirata, A., Sasaki, H. (2001) Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 22 (2), 149-157.

Hazan, Z., Zumeris, J., Jacob, H., Raskin, H., Kratysh, G., Vishnia, M., Dror, N., Barliya, T., Mandel, M., Lavie, G. (2006) Effective prevention of microbial biofilm formation on medical devices by low-energy surface acoustic waves. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (12), 4144-4152.

Haznedaroglu, B.Z., Bolster, C.H., Walker, S.L. (2008) The role of starvation on *Escherichia coli* adhesion and transport in saturated porous media. *Water Res.* 42 (6-7), 1547-1554.

Heurlier, K., Denervaud, V., Pessi, G., Reimann, C., Haas, D. (2003) Negative control of quorum sensing by RpoN (σ_{54}) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185 (7), 2227-2235.

Hixon, S.C., White, W.E., Jr, Yielding, K.L. (1975) Selective covalent binding of an ethidium analog to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labelling. *J. Mol. Biol.* 92 (2), 319-329.

Hong, S.H., Jeong, J., Shim, S., Kang, H., Kwon, S., Ahn, K.H., Yoon, J. (2008) Effect of electric currents on bacterial detachment and inactivation. *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2), 379-386.

Hong, Y., Brown, D.G. (2008) Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface. *Langmuir.* 24 (9), 5003-5009.

Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., Leadbetter, J.R. (2003) Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10), 5941-5949.

Jain, A., Gupta, Y., Agrawal, R., Khare, P., Jain, S.K. (2007) Biofilms--a microbial life perspective: a critical review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 24 (5), 393-443.

Jayaraman, A., Wood, T.K. (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10 145-167.

Jenkinson, H.F., Lamont, R.J. (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8 (2), 175-200.

Joux, F., Lebaron, P. (1997) Ecological Implications of an Improved Direct Viable Count Method for Aquatic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (9), 3643-3647.

Jucker, B.A., Harms, H., Zehnder, A.J. (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J. Bacteriol.* 178 (18), 5472-5479.

Juhas, M., Eberl, L., Tummeler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 7 (4), 459-471.

Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N.F., Menard-Szczebara, F., Castagnet, S., Feliars, C., Keevil, C.W. (2007) Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (22), 7456-7464.

Juhna, T., Birzniece, D., Rubulis, J. (2007) Effect of Phosphorus on survival of *Escherichia coli* in drinking water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (11), 3755-3758.

K, P.J., Lee MS, Lee DH, Park BJ, Han DW, Uzawa M, Takatori. (2003) Inactivation of bacteria in seawater by low-amperage electric current. Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, Seodaemun-ku, Seoul 120-752, Korea. parkjc@yumc.yonsei.ac.kr; *Applied & Environmental Microbiology.* 4 (69), 2405-2408.

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997) Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (11), 4164-4170.

Karl, D.M. (1980) Cellular nucleotide measurement and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44, 739-796

Kashket, E.R. (1981) Proton motive force in growing *Streptococcus lactis* and *Staphylococcus aureus* cells under aerobic and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 146 (1), 369-376.

Kashket, E.R., Blanchard, A.G., Metzger, W.C. (1980) Proton motive force during growth of *Streptococcus lactis* cells. *J. Bacteriol.* 143 (1), 128-134.

Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., Barer, M.R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73 (2), 169-187.

Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.C., Wingender, J. (2003) Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206 (6), 563-573.

Kilb, B., Kuhlmann, B., Eschweiler, B., Preuß, G., Ziemann, E., Schöttler, U. (1998) Darstellung der mikrobiellen Besiedlungsstruktur verschiedener Grundwasserhabitats durch Anwendung molekularbiologischer Methoden. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26 (6) 349-354

Kirisits, M.J., Parsek, M.R. (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell. Microbiol.* 8 (12), 1841-1849.

Kjelleberg, S., Molin, S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (3), 254-258.

Kocherginsky, N. (2008) Acidic lipids, H(+)-ATPases, and mechanism of oxidative phosphorylation. Physico-chemical ideas 30 years after P. Mitchell's Nobel Prize award. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*

Kolter, R., Siegele, D.A., Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47 855-874.

Kramlinger, V.M., Hiasa, H. (2006) The "GyrA-box" is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J. Biol. Chem.* 281 (6), 3738-3742.

Kreft, J.U., Wimpenny, J.W. (2001) Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci. Technol.* 43 (6), 135-141.

Lagaly, G., Schulz, O., Zumeihl, R. (1997) Dispersionen und Emulsionen: eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale. Steinkopff Verlag Darmstadt

Langille, S.E., Weiner, R.M. (1998) Spatial and temporal deposition of hyphomonas strain VP-6 capsules involved in biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (8), 2906-2913.

Langmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J., Stenstrom, T.A. (2005) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2), 706-712.

Langmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J., Stenstrom, T.A. (2005) Biofilms in an urban water distribution system: measurement of biofilm biomass, pathogens and pathogen persistence within the Greater Stockholm Area, Sweden. *Water Sci. Technol.* 52 (8), 181-189.

Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B. (2000) Use of an enzyme-linked lectin sorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5), 1851-1856.

Lim, T.K., Murakami, T., Tsuboi, M., Yamashita, K., Matsunaga, T. (2003) Preparation of a colored conductive paint electrode for electrochemical inactivation of bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 81 (3), 299-304.

Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., Zhang, L.H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47 (3), 849-860.

Lisle, J.T., Broadaway, S.C., Prescott, A.M., Pyle, B.H., Fricker, C., McFeters, G.A. (1998) Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (12), 4658-4662.

Liu, W.K., Tebbs, S.E., Byrne, P.O., Elliott, T.S. (1993) The effects of electric current on bacteria colonising intravenous catheters. *J. Infect.* 27 (3), 261-269.

Liu, Y., Strauss, J., Camesano, T.A. (2007) Thermodynamic Investigation of *Staphylococcus epidermidis* interactions with protein-coated substrata. *Langmuir.* 23 (13), 7134-7142.

Liu, Y., Yang, C.H., Li, J. (2007) Influence of extracellular polymeric substances on *Pseudomonas aeruginosa* transport and deposition profiles in porous media. *Environ. Sci. Technol.* 41 (1), 198-205.

Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J.H. (2004) The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (2), 143-148.

Loder, T.C. and P.S. Liss (1985) COntroll by organic coatings of the surface charge of estuarine suspended particles. *Imunol. Oceanogr.* 30, 418-421

Looijesteijn, P.J., van Casteren, W.H., Tuinier, R., Doeswijk-Voragen, C.H., Hugenholtz, J. (2000) Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *J. Appl. Microbiol.* 89 (1), 116-122.

Luo, Q., Wang, H., Zhang, X., Qian, Y. (2005) Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* (1), 423-427.

Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L., Garabetian, F. (2005) Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Res.* 39 (2-3), 380-388.

Lyklema, J. (1999) Elektrische Doppelschichten: Elektrostatik und Elektrodynamik. *Chem. Ing. Tech.* 71, Nr. 12, S. 1364-1369

Lyklema, J. (2000) Fundamentals of Interface and Colloid Science. Volume 1: Fundamentals. London: Academic Press

Manzini, G., Xodo, L., Barcellona, M.L., Quadrifoglio, F. (1985) Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 13 (24), 8955-8967.

Marshall, K.C. (1992) Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News*. 58 202-207.

Marshall, K.C. (1986) Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25 (1), 59-86.

Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R. (1971) Mechanism of the initial event in the sorption of marine bacteria to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68 337-348.

Matyeva, E. (2005) Electrochemistry of the Indium-Tin Oxide Electrode in 1m NaOH Electrolyte. *J. Electrochem. Soc.* 152 (9), 138-145

Matz, C., Jurgens, K. (2001) Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2), 814-820.

Maxwell, A., Costenaro, L., Mittelheiser, S., Bates, A.D. (2005) Coupling ATP hydrolysis to DNA strand passage in type IIA DNA topoisomerases. *Biochem. Soc. Trans.* 33 (Pt 6), 1460-1464.

Maxwell, A., Lawson, D.M. (2003) The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (3), 283-303.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1), 3-16.

McLean, R.J., Whiteley, M., Stickler, D.J., Fuqua, W.C. (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 154 (2), 259-263.

Murray, H.D., Schneider, D.A., Gourse, R.L. (2003) Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol. Cell.* 12 (1), 125-134.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (3), 695-700.

Nakamura, R., Kai, F., Okamoto, A., Newton, G.J., Hashimoto, K. (2009) Self-constructed electrically conductive bacterial networks. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48 (3), 508-511.

Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Takeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mizuta, Y., Kohno, S. (2008) The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61 (5), 375-378.

Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Takeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mizuta, Y., Kohno, S. (2008) The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61 (5), 375-378.

Neu, T.R., Marshall, K.C. (1990) Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J. Biomater. Appl.* 5 (2), 107-133.

Nocker, A., Camper, A.K. (2006) Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (3), 1997-2004.

Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K. (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods.* 67 (2), 310-320.

Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K., Brousseau, R. (2008) Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J. Microbiol. Methods.*

Nocker, A., Sossa, K.E., Camper, A.K. (2007) Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 70 (2), 252-260.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K. (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (16), 5111-5117.

Nollmann, M., Crisona, N.J., Arimondo, P.B. (2007) Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie.* 89 (4), 490-499.

Okochi, M., Lim, T.K., Nakamura, N., Matsunaga, T. (1997) Electrochemical disinfection of drinking water using an activated-carbon-fiber reactor capable of monitoring its microbial fouling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1), 18-22.

Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43 Spec No 93-100.

Owen, R.J. (1995) Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 9 (3), 415-446.

Padan, E., Schuldiner, S. (1987) Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell. *J. Membr. Biol.* 95 (3), 189-198.

Palleroni, N.J., Bradbury, J.F. (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (3), 606-609.

Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science.* 260 (5111), 1127-1130.

Peterson, A.A., Fesik, S.W., McGroarty, E.J. (1987) Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (2), 230-237.

Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., Di Bonaventura, G. (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol. Lett.* 287 (1), 41-47.

Poortinga, A.T., Bos, R., Busscher, H.J. (2001a) Lack of effect of an externally applied electric field on bacterial adhesion to glass. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 20 (2), 189-194.

Poortinga, A.T., Bos, R., Busscher, H.J. (2001b) Reversibility of Bacterial Adhesion at an Electrode Surface. *Langmuir.* 17 2851-2856.

Poortinga, A.T., Bos, R., Busscher, H.J. (2000) Controlled electrophoretic deposition of bacteria to surfaces for the design of biofilms. John Wiley & Sons, Inc; *Biotechnol. Bioeng.* 67 (1), 117-120.

Poortinga, A.T., Bos, R., Busscher, H.J. (1999) Measurement of charge transfer during bacterial adhesion to an indium tin oxide surface in a parallel plate flow chamber. *J. Microbiol. Methods.* 38 (3), 183-189.

Poortinga, A.T., Smit, J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (2001) Electric field induced desorption of bacteria from a conditioning film covered substratum. John Wiley & Sons, Inc; *Biotechnol. Bioeng.* 76 (4), 395-399.

Popovich, N.D., Eckhardt, A.E., Mikulecky, J.C., Napier, M.E., Thomas, R.S. (2002) Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids. *Talanta.* 56 (5), 821-828.

Porter, K. G.; Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic Microflora *Limnol. Oceanogr.*, 25 (5), S. 943 – 948

Postollec, F., Norde, W., de Vries, J., Busscher, H.J., van der Mei, H.C. (2006) Interactive forces between co-aggregating and non-co-aggregating oral bacterial pairs. *J. Dent. Res.* 85 (3), 231-234.

Pourbaix M. (1974) *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions.* National Association of Corrosion Engineers

Quelas, J.I., Lopez-Garcia, S.L., Casabuono, A., Althabegoiti, M.J., Mongiardini, E.J., Perez-Gimenez, J., Couto, A., Lodeiro, A.R. (2006) Effects of N-starvation and C-source on Bradyrhizobium japonicum exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Arch. Microbiol.* 186 (2), 119-128.

Qin, B.-L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Barbosa-CaÂnovas, G.V. and Swanson, B.G. (1996) Nonthermal pasteurisation of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 603±627.

Quintero, E.J., Weiner, R.M. (1995) Evidence for the Adhesive Function of the Exopolysaccharide of Hyphomonas Strain MHS-3 in Its Attachment to Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5), 1897-1903.

Rabinovitch, C., Stewart, P.S. (2006) Removal and inactivation of Staphylococcus epidermidis biofilms by electrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), 6364-6366.

Rahmati-Bahram, A., Magee, J.T., Jackson, S.K. (1997) Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in Stenotrophomonas maltophilia. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 (1), 19-24.

Rao, S.P., Alonso, S., Rand, L., Dick, T., Pethe, K. (2008) The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (33), 11945-11950.

Raptis, L., Vultur, A., Brownell, H.L., Tomai, E., Anagnostopoulou, A., Arulanandam, R., Cao, J., Firth, K.L. (2008) Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol. Biol.* 423 173-189.

Raptis, L.H., Brownell, H.L., Liu, S.K., Firth, K.L., MacKenzie, L.W., Stiles, C.D., Alberta, J.A. (1995) Applications of electroporation of adherent cells in situ, on a partly conductive slide. *Mol. Biotechnol.* 4 (2), 129-138.

Rickard, A.H., Leach, S.A., Buswell, C.M., High, N.J., Handley, P.S. (2000) Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific-growth-phase-dependent lectin-saccharide interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), 431-434.

Rieder, A., Schwartz, T., Schon-Holz, K., Marten, S.M., Suss, J., Gusbeth, C., Kohnen, W., Swoboda, W., Obst, U., Frey, W. (2008) Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *J. Appl. Microbiol.* 105 (6), 2035-2045.

Rijnaarts, H.H., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J. (1993) Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (10), 3255-3265.

Roth, S. (1994) „Leitfähige Polymere – Physikalische Konzepte und praktische Anwendungen“, In: *Kunststoffmetallisierung und leitende Polymere – 15. Ulmer Gespräch*, DGO VDI-TZ, Eugen G. Leuze Verlag 1993, S. 65 Galvanotechnik – Leiterplatten-Technik 85 (11), 3618

Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., Farish, O. (2000) Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (2), 110-114.

Rutter, P.R., and Vincent (1984) Physicochemical interactions of substratum, microorganism, and fluid phase. S. 221-38 In: K.C. Marshall (Hrsg.): *Microbial adhesion and aggregation*. Springer-Verlag AG. Berlin

Ryu, J.H., Kim, H., Beuchat, L.R. (2004) Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J. Food Prot.* 67 (10), 2123-2131.

Sakuragi, Y., Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189 (14), 5383-5386.

Sarro, M.I., Garcia, A.M., Moreno, D.A., Montero, F. (2007) Development and characterization of biofilms on stainless steel and titanium in spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (6), 433-441.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184 (4), 1140-1154.

Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000) Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol.* 305 288-301.

Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E., Streit, W.R. (2003) Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12), 7298-7309.

Schneider, D.A., Gourse, R.L. (2004) Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. *J. Biol. Chem.* 279 (9), 8262-8268.

Schneider, R.P., Leis, A. (2002). Conditioning films in aquatic environments. In: Bitton, G. (Hrsg.): Encyclopedia of environmental microbiology, Vol 2, S. 928-941, Jon Wiley and Sons, New York

Schopf, J.W. Hayes, J.M., Walter, M.R. (1983) Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: J.W. Schopf (Hrsg.): Earth's earliest biosphere, S. 361-384, Princeton Univ. Press, New Jersey,

Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185 (7), 2066-2079.

Shinohara, H., Kojima, J., Yaoita, M., Aizawa, M. (1989a) Electrically stimulated rupture of cell membranes with a conducting polymer coated electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 276 (22), 23-35

Shinohara, H., Kojima, J., Aizawa, M. (1989b) Electrically controlled ion transfer and pH change near a conducting polymer-coated electrode. *J. Electroanal. Chem.* 266, 297-308

Silbaq, F.S. (2009) Viable ultramicrocells in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 106 (1), 106-117.

Simoës, L.C., Simoës, M., Oliveira, R., Vieira, M.J. (2007) Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *J. Basic Microbiol.* 47 (2), 174-183.

Singh, A., Pyle, B.H., McFeters, G.A. (1989) Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *J. Microbiol. Methods.* 10 91-101.

Soni, K.A., Balasubramanian, A.K., Beskok, A., Pillai, S.D. (2008) Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media. *Curr. Microbiol.* 56 (1), 93-97.

Späth, R., Flemming, H.-C., Wuertz, S. (1998): Sorption properties of biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 37, 207-210

Stanley, P.E. McCarthy, B.J., R. Smither (1989) ATP-Luminescence – Rapid methods in Microbiology. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Stoodley, P., deBeer, D., Lappin-Scott, H.M. (1997) Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (9), 1876-1879.

Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1999) The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ. Microbiol.* 1 (5), 447-455.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 187-209.

Streger, S.H., Vainberg, S., Dong, H., Hatzinger, P.B. (2002) Enhancing transport of hydrogenophaga flava ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (11), 5571-5579.

Suarez-Herrera, M.F., Feliu, J.M. (2008) Polymerization of polypyrrole on single crystal platinum electrodes: a surface structure sensitive reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (46), 7022-7030.

Sutherland, I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 147 (Pt 1), 3-9.

Sutherland, I.W. (1990) Exopolysaccharide structure, *Biotechnology of microbial exopolysaccharides* S. 20-37, Cambridge University Press

Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., Wilson, W.D. (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry.* 31 (12), 3103-3112.

Thony-Meyer, L. (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (3), 337-376.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* 151 (Pt 5), 1313-1323.

Tourillon, G. (1986) In: „*Handbook of Conducting Polymers*“ (T.A. Skotheim), Marcel Dekker, Inc., New York; 293

Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A. (2003) Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 223 (2), 287-292.

Ubbink, J., Schar-Zammaretti, P. (2005) Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques. *Micron*. 36 (4), 293-320.

Ukuku, D.O., Jin, T., Zhang, H. (2008) Membrane damage and viability loss of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg by thermal death time disk treatment. *J. Food Prot.* 71 (10), 1988-1995.

van der Borden, A.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (2005) Electric block current induced detachment from surgical stainless steel and decreased viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Biomaterials*. 26 (33), 6731-6735.

van der Borden, A.J., van der Werf, H., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (2004) Electric current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms from surgical stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), 6871-6874.

van der Mei, H.C., Busscher, H.J. (2001) Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2), 491-494.

van Loosdrecht, M.C., Heijnen, J.J., Eberl, H., Kreft, J., Picioreanu, C. (2002) Mathematical modelling of biofilm structures. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81 (1-4), 245-256.

van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J. (1987) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (8), 1898-1901.

van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (8), 1893-1897.

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A.J.B. (1989) Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17, 1-15.

van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J. (1990a) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* 54 (1), 75-87.

van Loosdrecht, M.C., Norde, W., Zehnder, A.J. (1990b) Physical chemical description of bacterial adhesion. *J. Biomater. Appl.* 5 (2), 91-106.

van Merode, A.E., Pothoven, D.C., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Krom, B.P. (2007) Surface charge influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 102 (5), 1254-1260.

van Merode, A.E., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Krom, B.P. (2006a) Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 188 (7), 2421-2426.

van Merode, A.E., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Waar, K., Krom, B.P. (2006b) Enterococcus faecalis strains show culture heterogeneity in cell surface charge. *Microbiology*. 152 (Pt 3), 807-814.

van Oss, C.J. (2007) Development and applications of the interfacial tension between water and organic or biological surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 54 (1), 2-9.

van Oss, C.J. (2003) Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. John Wiley & Sons, Ltd; *J. Mol. Recognit.* 16 (4), 177-190.

Van Oss, C.J. (1995) Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Mol. Immunol.* 32 (3), 199-211.

Van Oss, C.J. (1994) Polar Lewis acid-base interactions. In: *Interfacial Forces in Aqueous Media*, S 18-46. Marcel Dekker, New York.

van Oss, C.J. (1989) Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biophys.* 14 (1), 1-16.

Van Oss, C.J., Good, R.J. and Chaudhury, M.K. (1986) The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in 'hydrophobic interactions' between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378-390.

Vanhoof, R., Sonck, P., Hannecart-Pokorni, E. (1995) The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35 (1), 167-171.

Velasco, S., Arskold, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radstrom, P., van Niel, E.W. (2006) Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Int. J. Food Microbiol.* 111 (3), 252-258.

Velten, S., Hammes, F., Boller, M., Egli, T. (2007) Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. *Water Res.* 41 (9), 1973-1983.

Verwey, E. J. W., and J. G. Overbeek. (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids. *Elsevier, Amsterdam*.

Vesper, S., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S., Vesper, A. (2008) Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J. Microbiol. Methods.* 72 (2), 180-184.

Vigeant, M.A., Ford, R.M., Wagner, M., Tamm, L.K. (2002) Reversible and irreversible adhesion of motile *Escherichia coli* cells analyzed by total internal reflection aqueous fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (6), 2794-2801.

Visser, J. (1972) On Hamaker Constants: A Comparison between Hamaker Constants and Lifshitz-Van der Waals Constants. *Adv. Coll. Inter. Sci.* 3, 331-363

Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G. (1999) Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1636-1643.

Waar, K., van der Mei, H.C., Harmsen, H.J., de Vries, J., Atema-Smit, J., Degener, J.E., Busscher, H.J. (2005) Atomic force microscopy study on specificity and non-specificity of interaction forces between *Enterococcus faecalis* cells with and without aggregation substance. *Microbiology.* 151 (Pt 7), 2459-2464.

Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185 (7), 2080-2095.

Wagner, V.E., Frelinger, J.G., Barth, R.K., Iglewski, B.H. (2006) Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol.* 14 (2), 55-58.

Wake, H., Takahashi, H., Takimoto, T., Takayanagi, H., Ozawa, K., Kadoi, H., Okochi, M., Matsunaga, T. (2006) Development of an electrochemical antifouling system for seawater cooling pipelines of power plants using titanium. *Biotechnol. Bioeng.* 95 (3), 468-473.

Walker, J.J., Spear, J.R., Pace, N.R. (2005) Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature.* 434 (7036), 1011-1014.

Walker, S.L. (2005) The role of nutrient presence on the adhesion kinetics of *Burkholderia cepacia* G4g and ENV435g. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 45 (3-4), 181-188.

Waring, M.J. (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13 (1), 269-282.

Wegner, G. (1981) Polymere mit metallähnlicher Leitfähigkeit - Ein Überblick über Synthese, Struktur und Eigenschaften. *Angw. Chem.* 93 (4), 352-371

Weidler, G.W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F.W., Heinen, W., Stan-Lotter, H. (2007) Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1), 259-270.

Weisser, J., Wiedemann, B. (1986) Inhibition of gyrase by 4-quinolones: effect on the structure of DNA. *Infection.* 14 Suppl 3 S183-5.

Westerman, R.B., He, Y., Keen, J.E., Littledike, E.T., Kwang, J. (1997) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157. *J. Clin. Microbiol.* 35 (3), 679-684.

Wingender, J.; Jaeger, K.-E. (2002) Extracellular enzymes in biofilms, S. 1207 – 1223 In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 3, Hrsg.: Bitton, G. John Wiley & Sons, Inc., New York

Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (1999a) What are bacterial extracellular polymeric substances? Kap. 1, S. 1 – 19 In: *Microbial Extracellular Polymeric Substances* Hrsg.: Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Wingender, J.; Neu, T. R.; Flemming, H.-C. (1999b) *Microbial Extracellular Polymeric Substances* Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Wloka, M.; Rehage, H.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. (2004) Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels. *Coll. Poly. Sci.*, 282, 1067 – 1076

Wodtke, J; Löhr, J. F. (2008) Das infizierte Implantat Orthopäde, 37, 257 – 269

Wouters, P.C., Bos, A.P., Ueckert, J. (2001) Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7), 3092-3101.

Wouters, P.C., Dutreux, N., Smelt, J.P., Lelieveld, H.L. (1999) Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12), 5364-5371.

Yamashita, Y., Kunimori, A., Takehara, T. (1991) Effect of calcium ions on cell surface electrostatics of *Bacteroides gingivalis* and other oral bacteria. *Zentralbl. Bakteriologie.* 275 (1), 46-53.

Yang, L., Li, Y., Erf, G.F. (2004) Interdigitated Array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Chem.* 76 (4), 1107-1113.

Yoshikawa, S., Caughey, W.S. (1992) Infrared evidence of azide binding to iron, copper, and non-metal sites in heart cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 267 (14), 9757-9766.

Zhang, H.B., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (7), 4638-4643.

Zita, A., Hermansson, M. (1994) Effects of Ionic Strength on Bacterial Adhesion and Stability of Floccs in a Wastewater Activated Sludge System. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (9), 3041-3048.

Zughaier, S.M., Ryley, H.C., Jackson, S.K. (1999) Lipopolysaccharide (LPS) from *Burkholderia cepacia* is more active than LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *Infect. Immun.* 67 (3), 1505-1507.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anna Rumpf, die vorliegende Arbeit mit dem Titel
"Effekte elektrischer Polarisierung elektrisch leitender Oberflächen auf die
bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung"
selbstständig verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel
und Quellen verwendet.
Weiterhin erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei
keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Duisburg, den 17.02.2008

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Rumpf', written in a cursive style.

Anna Rumpf



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name/Vorname: Rumpf Anna Katharina
Adresse: Geibelstr. 6, 47057 Duisburg
Geburtsdatum/-ort: 03.01.1980 in Gleiwitz
Familienstand: ledig

Schulbildung

1999 – 2000 **Franz-Haniel-Gymnasium** Duisburg-Homberg
Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

10/2000 – 04/2005 **Studium der Biologie** an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

04/2004 – 03/2005 **Diplomarbeit** am Institut für Biotechnologie I (Prof. Sahn) des Forschungszentrums Jülich GmbH, bei Herrn Prof. Dr. R. Freudl
Abschluss: Diplom-Biologin

11/2005 – 04/ 2009 **Promotion** zum Dr.rer.nat im Fachbereich Chemie, Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen
Thema: „Effekte elektrischer Polarisation leitender Oberflächen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung“
Betreuer: Herr Prof. Dr. H.-C. Flemming
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. B. Siebers

Stipendien

- 06/2006 – 06/2009 **DBU-Stipendiatin** des Promotionsstipendienprogramms der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU)
Betreuer: Herr Dr. M. Hempel
- 2008 **RISE-Stipendium** des DAAD
Für einen Forschungsassistenten aus den USA
- 01/2008 **DGF-Stipendium**
Für eine Kongressreise nach Singapur

Berufliche Tätigkeiten

- 11/2005 – heute **IWW Zentrum Wasser**, angewandte Mikrobiologie,
wissenschaftliche Angestellte
- 03/2005 – 10/2005 **Stadtwerke Duisburg**, betrieblicher Umweltschutz
- 07/2002 – 10/2002 **Henkel KGaA**, VTB/Forschung Hygiene
Durchführung antimikrobieller
Tests/Oberflächenadhäsionstests
- 02/2001 – 04/2001 **Bayer AG, Labor** Physiologie Herbizide
Experimentelle Analyse der Physiologie von Herbiziden

Weitere Tätigkeiten

- 09/2008 **Forschungszentrum Karlsruhe**, IFG
Vertiefung der Methoden RT-PCR und PCR-DGGE
Betreuer: Herr Dr. T. Schwartz
- 09/2007 – 12/2007 **Universität Duisburg-Essen**, Technische Chemie II
Projektarbeit: „Synthese und Charakterisierung von stimuli-responsiven Polymeren für schaltbare Anti-Biofouling-Beschichtungen“,
Betreuer: Herr Prof. Dr. M. Ulbricht

Publikationen

Q. Yang, **A. Rumpf**, G. Schaule, M. Ulbricht (2009). "Grafted Glycopolymer-based Receptor Mimics on Polymer Support for Selective Adhesion of Bacteria". eingereicht bei *Biomacromolecules*.

G. Schaule, **A. Rumpf**, C. Weidlich, K.-M. Mangold and H.-C. Flemming, (2008). "Effects of electric polarization of indium tin oxide (ITO) and polypyrrole on biofilm formation". *Water Sci Technol.* 2008;58 (11):2165-2172

C. Weidlich, K.-M. Mangold, G. Schaule, **A. Rumpf** (2008). Entwicklung von Membran-Beschichtungen aus leitfähigen Polymeren zur Verhinderung von Biofouling. *Vom Wasser Das Journal* (in Vorbereitung)

D. Reinhardt, S. Brodmann, **A. Rumpf** (2008) Befragung der Referenten zur „Nachhaltigkeit in der Chemie“. Tagungsband zur 13. Internationalen Sommerakademie der Deutschen Bundesstiftung Umwelt.

Tagungen/Konferenzen

02/2006
Frankfurt/Main
DECHEMA Arbeitsausschuss „Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz“ **Vortrag** zu den aktuellen Ergebnissen des AiF-Projektes „Entwicklung von Beschichtungen aus leitfähigen Polymeren auf Membranen zur Verhinderung von Biofilmbildung und Verstärkung der Wirkung von Bioziden“

09/2006
Amsterdam
IWA Biofilm Technologies Conference VI: „Influence of electrically conductive polymers on biofilm formation and detachment“, **Poster** (ausgezeichnet mit dem Poster Award)

02/2007
Frankfurt/Main
DECHEMA Arbeitsausschuss „Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz“ **Vortrag** zu den aktuellen Ergebnissen des AiF-Projektes „Entwicklung von Beschichtungen aus leitfähigen Polymeren auf Membranen zur Verhinderung von Biofilmbildung und Verstärkung der Wirkung von Bioziden“

04/2007
Toulouse
BES 2007 International symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics: “Development of conducting polymer layers on membranes to prevent biofouling and enhance biocide effects”, **Poster**

05/2007 Passau	GDCH Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft: „Influence of electrically conductive polymers on biofilm formation and detachment”, Poster
06/2007 Berlin	Woche der Umwelt „innovativer Umweltschutz“ beim Bundespräsidenten im Schloss Bellevue: „Präsentation der Funktionsweise der Membranbeschichtungen, sowie der Effekte elektrischer Polarisierung auf Biofilme“, Poster
07/2007 Ostritz – St. Marienthal	Internationale Sommerakademie der DBU „Nachhaltigkeit in der Chemie“: Interviews mit den Referenten sowie Verfassung eines Artikels zum Tagungsband der Sommerakademie, Artikel : „Befragung der Referenten im Rahmen der 13. Internationalen Sommerakademie zum Thema „Nachhaltigkeit in der Chemie“, Abschnitt 5: „Die Bedeutung der Interdisziplinarität für eine nachhaltige Entwicklung“
09/2007 Dresden	3 rd International Symposium on Reactive Polymers in Inhomogeneous Systems, in Melts, and at Interface: „Development of conducting polymer layers on membranes to prevent biofouling and enhance biocide effects”, Poster
01/2008 Frankfurt am Main	ProcessNet-Arbeitsausschuss „Membrantechnik“: „Entwicklung von Beschichtungen aus leitfähigen Polymeren auf Membranen zur Verhinderung von Biofilmbildung, Vortrag
01/2008 Singapur	IWA-Biofilm Technologies: “Influence of Polarization of electric conductive Polymers on bacterial adhesion“, Vortrag
03/2008 Frankfurt/Main	VAAM Jahrestagung, “Effect of electrical polarization on biofilm development and biofilm structure”, Vortrag
04/2008 Trier	GDCH Jahrestagung der wasserchemischen Gesellschaft: “Entwicklung von Membran-Beschichtungen aus leitfähigen Polymeren zur Verhinderung von Biofouling“, Poster

10/2008 Gießen	Electrochemistry: Crossing boundaries, 1. gemeinsame Tagung der GDCh, DECHEMA, DBG, AGEF, GfKORR, DGO: „Conducting Polymers Layers on Membranes for Prevention of Biofouling“, Vortrag
10/2008 Garching bei München	Biofilms III - International Conference, „Effects of electrical polarization on biofilm development and biofilm structure“, Vortrag
03/2009 Bochum	How dead is dead, “Effects of electrical Polarization on bacterial biofilm formation and bacterial activity”, Poster
