

Entwicklung eines Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Analyse von Biofilmen mittels automatisierter Fluoreszenzmikroskopie

Von der Fakultät für Umwelt und Naturwissenschaften
der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.)

Juliane Becker
aus Finsterwalde

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Peter Schierack
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Günther
Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	5
Abstract	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Bakterielle Biofilme	9
1.1.1 Stadien der Biofilmbildung	10
1.1.2 Zusammensetzung und Funktion der Biofilmmatrix	12
1.1.3 Antibiotikaresistenz in Biofilmen	14
1.1.4 Vorkommen von Biofilmen	15
1.2 <i>Escherichia coli</i>	16
1.2.1 Pathogene <i>Escherichia coli</i>	17
1.2.1.1 Intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>	17
1.2.1.2 Extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>	19
1.2.2 Biofilmbildung und Biofilm-assoziierte Faktoren bei <i>Escherichia coli</i>	20
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> und Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.3.1 Biofilmbildung bei <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.4 Methoden der Biofilmanalytik	25
1.4.1 Plattformen der <i>in vitro</i> Biofilmbildung	25
1.4.2 Mikroskopische Verfahren in der Biofilmanalytik.....	26
1.4.3 Färbemethoden von Biofilmen.....	27
1.4.4 Methoden der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung im Biofilm.....	27
1.4.5 Quantifizierung von Biofilmen auf Oberflächen	28
1.5 Zielstellung	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Bakterienstämme	31
2.2 Nährmedien und -agar	31
2.3 Puffer und Lösungen	32
2.4 Farbstoffe	32
2.5 Verwendete Antibiotika	32
2.6 Oligonukleotide	33
2.7 Chemikalien.....	33
2.8 Geräte.....	34
2.9 Verbrauchsmaterialien.....	35

Inhaltsverzeichnis

2.10 Mikrobiologische Methoden	35
2.10.1 Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien.....	35
2.10.2 Kongorotagarassay	35
2.10.3 Calcofluoragarassay.....	36
2.10.4 Motilitätsassay	36
2.10.5 Biofilmbildung	37
2.10.6 Biofilmbildung für die Materialanalyse	37
2.10.7 Bestimmung der MHK	37
2.10.8 Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit in Biofilmen	38
2.11 Färbemethoden.....	38
2.11.1 Kristallviolett-färbung.....	38
2.11.2 SYTO 9-Färbung	38
2.11.3 Lebend-/Totfärbung	39
2.11.4 Propidiumjodidfärbung	39
2.12 Molekularbiologische Methoden	40
2.12.1 Herstellung von Bakterienlysaten zur Gewinnung der Gesamt-DNA.....	40
2.12.2 Polymerasekettenreaktion	40
2.12.3 Agarosegelelektrophorese	40
2.13 Materialanalyse	40
2.13.1 Materialien/Coupons	40
2.13.2 Oberflächentopographie	41
2.14 Mikroskopische Methoden	41
2.14.1 VideoScan-Fluoreszenzmikroskopie	41
2.14.1.1 Messung der Fluoreszenzintensität	41
2.14.1.2 Erstellung von Übersichtsaufnahmen	42
2.14.2 AKLIDES®-Fluoreszenzmikroskopie	42
2.14.2.1 Bildaufnahme für die Materialanalyse	42
2.14.2.2 Erstellung von Übersichts- und Detailaufnahmen	42
2.14.2.3 Messung der Fluoreszenzintensität	43
2.15 Statistische Methoden	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Untersuchung der <i>in vitro</i> Biofilmbildung	44
3.1.1 Prinzip des Biofilmassays und der Messmethode	44
3.1.1.1 Kultivierung und Färbung	44
3.1.1.2 Messung der Fluoreszenzintensität als Maß für die Stärke der Biofilmbildung	45

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.3 Erstellung von Übersichtsaufnahmen eines Biofilms	45
3.1.2 Charakterisierung klinischer, humaner <i>E. coli</i> -Isolate	46
3.1.2.1 Detektion Biofilm-assoziiertes Gene	46
3.1.2.2 Analyse der Curli- und Celluloseexpression	47
3.1.2.3 Überprüfung der Motilität	49
3.1.2.4 Screening der Biofilmbildung mit Kristallviolett	50
3.1.2.5 Screening der Biofilmbildung mit der VideoScan-Technologie	51
3.2 Analyse dreidimensionaler Biofilme auf Materialien	56
3.2.1 Prinzip der Materialanalyse	56
3.2.1.1 Bildaufnahme und Softwareanalyse	57
3.2.2 Untersuchung der Biofilmbildung von <i>E. coli</i> auf Glas, Stahl und Titan	59
3.2.2.1 Optische Oberflächenmessung und Rauheitsmessung	59
3.2.2.2 Quantifizierung adhärenter Bakterien	61
3.2.2.3 Bestimmung der besiedelten Fläche	63
3.2.2.4 Bestimmung der Biofilmdicke	64
3.3 Etablierung von Antibigrammen für Biofilme	65
3.3.1. Prinzip der Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Biofilmen	65
3.3.2 Analyse der Antibiotikaempfindlichkeit in MSSA- und MRSA-Biofilmen	66
3.3.2.1 Untersuchung der Biofilmbildung der MSSA- und MRSA-Isolate	66
3.3.2.2 Ermittlung der MHK	66
3.3.2.3 Effekt der Antibiotika auf die Biofilmbildung	67
3.3.2.4 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit in MSSA- und MRSA-Biofilmen	70
4. Diskussion	76
4.1 Untersuchung des Genotyps und Phänotyps in Zusammenhang mit der Biofilmbildung	76
4.2 Analyse dreidimensionaler Biofilme auf Materialoberflächen	80
4.3 Etablierung einer Methode für die Antibiotikaempfindlichkeitstestung in Biofilmen	82
5. Schlussfolgerung und Ausblick	86
6. Literaturverzeichnis	87
7. Publikationsliste	105
Abkürzungsverzeichnis	107
Abbildungsverzeichnis	108
Tabellenverzeichnis	109
Danksagung	110

Zusammenfassung

Biofilme sind Zusammenschlüsse von Mikroorganismen, die eingebettet in einer selbstproduzierten Matrix vor äußeren Umwelteinflüssen geschützt sind und eine erhöhte Toleranz gegenüber Antinfektiva aufweisen. Im Bereich der Humanmedizin werden 65-80 % aller bakteriellen Infektionen mit Biofilmen assoziiert. Problematisch ist die fehlende Biofilmanalytik in der Routinediagnostik, die auch von der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten gefordert wird. So fehlen standardisierte Methoden für den mikroskopischen Nachweis einer Biofilm-assoziierten Infektion, die *in situ* Quantifizierung von Bakterien auf Implantaten und die Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit von Bakterien in Biofilmen.

Escherichia coli (*E. coli*) gilt als Erreger von Biofilm-assoziierten Infektionen. Die Biofilmbildung ist ein hochkomplexer Prozess mit Beteiligung einer Vielzahl an Genen. Für viele nicht-pathogene *E. coli* wurden bereits Biofilm-assoziierte Gene identifiziert, doch ist deren Rolle bei der Biofilmbildung pathogener Vertreter unzureichend untersucht. Auch *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wird oft in Biofilmen identifiziert und multiresistente Keime, wie der Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), erschweren die ohnehin schon komplizierte Therapie und Eradikation der Erreger bei Biofilm-assoziierten Infektionen. Zu diesen zählen auch Implantatinfektionen, welche durch zunehmende Operationen im Bereich der Orthopädie und Kardiologie ansteigen. Das Forschungsinteresse an neuen Oberflächenbeschichtungen und innovativen Materialien mit antimikrobieller und antiadhäsiver Wirkung ist hoch, jedoch fehlen auch in diesem Bereich Methoden für die *in situ* Evaluierung dieser Oberflächen.

Mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden wurden diese verschiedenen Schwerpunkte im Bereich der bakteriellen Biofilmanalytik beleuchtet. Basierend auf der an der Hochschule Lausitz entwickelten VideoScan-Technologie wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden für die Untersuchung von Biofilmen entwickelt. Es wurde ein Modul geschaffen, welches qualitative und quantitative Aussagen über die allgemeine Fähigkeit von Bakterien zur Biofilmbildung treffen kann. Mit Anwendung dieser Methode konnte der Zusammenhang zwischen den genotypischen und phänotypischen Merkmalen von 187 klinischen *E. coli*-Isolaten und deren Biofilmbildung untersucht werden. Ein weiteres Modul erlaubte die Untersuchung der mit *E. coli* besiedelten Materialien Glas, Stahl und Titan. Insgesamt 44 Materialstücke (Coupons) wurden auf die Anzahl adhärenter Bakterien, die besiedelte Fläche und die maximal gebildete Biofilmdicke untersucht. Das dritte und letzte Modul fand Anwendung in der Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit von *S. aureus* während der Biofilmbildung und unterschiedlich reifer *S. aureus*-Biofilme.

Bei der Untersuchung verschiedener *E. coli*-Pathotypen konnte eine allgemein hohe Prävalenz von Biofilm-assoziierten Genen nachgewiesen werden. Das Screening der Isolate auf ihr Potenzial zur Biofilmbildung in unterschiedlichen Kulturmedien ergab, dass enteroaggregative *E. coli* (EAEC) die stärksten

Zusammenfassung

Biofilme ausbildeten, obwohl diese eher geringe Prävalenzen für die Biofilm-assoziierten Gene *papC*, *fimH* und *fliC* aufwiesen. Weder die Motilität der EAEC noch die Produktion der Biofilmmatrixbestandteile Curli-Fimbrien und Cellulose korrelierten mit der Biofilmbildung. Weiterhin konnte mit dem bildgebenden Verfahren das charakteristische Muster der EAEC-Biofilme nachgewiesen werden, welches sich in der Bildung dicker, bakterieller Aggregate äußerte.

Mit dem zweiten etablierten Modul wurde die Besiedelbarkeit verschiedener Materialien (Stahl, Glas, Titan) mit *E. coli* untersucht. Es zeigte sich, dass Titan im Vergleich zu Glas eine signifikant höhere Besiedlung mit *E. coli* aufwies. Dieses Ergebnis war auch auf die besiedelte Fläche zu übertragen. Bei der Analyse der insgesamt 72 Bilder pro Materialstück ergab sich für Titan eine durchschnittlich besiedelte Fläche von 84 % pro Bild. Bei der Untersuchung der Biofilmdicke wiesen Stahl und Titan im Vergleich zu Glas signifikant höhere Werte auf. Biofilme mit gleicher maximaler Höhe konnten auf fast allen Titancoupons gefunden werden.

Für die Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit wurden zunächst 18 Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) und 24 MRSA mit Anwendung der automatisierten Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Biofilmbildung untersucht. Hierbei wurden stärkere Biofilme bei den MSSA-Isolaten und allgemein dickere Biofilme in den nährstoffreichen Medien gebildet. Je ein MSSA- und ein MRSA-Isolat wurden auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit während der Biofilmbildung untersucht. Die vier getesteten Antibiotika Ampicillin, Vancomycin, Tigecyclin und Rifampicin konnten bei gleichen bzw. etwas höheren Konzentrationen im Vergleich zu der zuvor ermittelten MHK die Biofilmbildung verhindern. Die Applikation der Antiinfektiva auf verschiedene Biofilmreifestufen zeigte eine Abnahme der antimikrobiellen Wirkung bei steigender Biofilmreife. Eine bakterizide Wirkung konnte meist nur bei unreifen, 4 h alten Biofilmen beobachtet werden. Subinhibitorische Konzentrationen förderten hingegen die Biofilmbildung. Das bildgebende Verfahren deckte außerdem Strukturveränderungen in Form von großen Bakterienaggregaten bestehend aus lebenden Zellen bei subinhibitorischen Konzentrationen an Vancomycin auf.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Technologie konnten Biofilme quantitativ und qualitativ untersucht werden. Es konnte ein Einblick in die Fähigkeit zur Biofilmbildung verschiedener *E. coli*-Pathotypen und *S. aureus*-Isolate gewonnen werden. Neben der Messung der Stärke der Biofilmbildung konnten durch das bildgebende Verfahren strukturelle Eigenschaften wie die charakteristische Aggregatbildung der EAEC während der Biofilmbildung oder die Bildung großer Bakterienkolonien beim MRSA-Isolat in Gegenwart von Vancomycin detektiert werden. Weiterhin konnten Biofilme auf besiedelten Materialien charakterisiert werden. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die etablierte Methode eine umfangreiche Analyse von Biofilmen für verschiedene Fragestellungen ermöglicht.

Abstract

Biofilms are associations of microorganisms embedded in a self-produced matrix that are protected from external environmental influences and exhibit increased tolerance to anti-infectives. In human medicine, 65-80% of all bacterial infections are associated with biofilms. The lack of biofilm analysis in routine diagnostics, which is also demanded by the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, is problematic. There is a lack of standardized methods for microscopic detection of biofilm-associated infection, *in situ* quantification of bacteria on implants, and testing of antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms.

Escherichia coli (*E. coli*) is considered a causative agent of biofilm-associated infections. Biofilm formation is a highly complex process involving a large number of genes. Biofilm-associated genes have been identified for many nonpathogenic *E. coli*, but their role in biofilm formation of pathogenic representatives is insufficiently studied. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is also often identified in biofilms, and multidrug-resistant pathogens, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), impede the already complicated treatment and eradication of pathogens in biofilm-associated infections. These also include implant infections, which are on the rise due to increasing operations in the fields of orthopedics and cardiology. Research interest in new surface coatings and innovative materials with antimicrobial and antiadhesive activity is high, but methods for *in situ* evaluation of these surfaces are also lacking in this field.

With the methods established in this work, these different focus areas in the field of bacterial biofilm analysis were regarded. Based on the VideoScan technology developed at the Lausitz University of Applied Sciences, fluorescence microscopic methods for the investigation of biofilms were developed. A module for qualitative and quantitative analysis of the general ability of bacteria to form biofilms was developed. Using this method, the relationship between the genotypic and phenotypic characteristics of 187 clinical *E. coli* isolates and their biofilm formation could be studied. Another module allowed the study of *E. coli* colonized materials glass, steel and titanium. A total of 44 pieces of material (coupons) were examined for the number of adherent bacteria, the colonized area and the maximum biofilm thickness. The third and final module was used to investigate the antibiotic sensitivity of *S. aureus* during biofilm formation and differentially mature *S. aureus* biofilms.

Examination of different *E. coli* pathotypes revealed a generally high prevalence of biofilm-associated genes. Screening of isolates for their potential to form biofilms in different culture media revealed that enteroaggregative *E. coli* (EAEC) formed the strongest biofilms, although they had rather low prevalences for the biofilm-associated genes *papC*, *fimH*, and *fliC*. Neither the motility of EAEC nor the pro-

Abstract

duction of the biofilm matrix components curli fimbriae and cellulose correlated with biofilm formation. Furthermore, the imaging technique was able to detect the characteristic pattern of EAEC biofilms, which was manifested in the formation of thick bacterial aggregates.

The second established module was used to investigate the colonizability of different materials (steel, glass, titanium) with *E. coli*. It was found that titanium showed significantly higher colonization with *E. coli* compared to glass. This result could also be transferred to the colonized surface. Analysis of the total of 72 images per piece of material revealed an average colonized area of 84 % per image for titanium. When examining the biofilm thickness, steel and titanium showed significantly higher values compared to glass. Biofilms with the same maximum height were found on almost all titanium coupons.

To investigate antibiotic susceptibility, 18 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and 24 MRSA were examined for biofilm formation using automated fluorescence microscopy. Stronger biofilms were formed in the MSSA isolates and generally thicker biofilms in the nutrient-rich media. One MSSA and one MRSA isolate each were tested for their antibiotic sensitivity during biofilm formation. The four antibiotics tested, ampicillin, vancomycin, tigecycline and rifampicin, were able to prevent biofilm formation at the same or slightly higher concentrations compared to the MIC previously determined. Application of the anti-infectives to different levels of biofilm maturity showed a decrease in antimicrobial effect with increasing biofilm maturity. A bactericidal effect was mostly observed only on immature, 4 h old biofilms. Subinhibitory concentrations, on the other hand, promoted biofilm formation. The imaging technique also revealed structural changes in the form of large bacterial aggregates consisting of live cells at subinhibitory concentrations of vancomycin.

With the technology developed in this work, biofilms could be analyzed quantitatively and qualitatively. Insights into the biofilm formation ability of various *E. coli* pathotypes and *S. aureus* isolates were obtained. In addition to measuring the strength of biofilm formation, structural properties such as the characteristic aggregate formation of EAEC during biofilm formation or the formation of large bacterial colonies in the MRSA isolate in the presence of vancomycin could be detected by the imaging method. Furthermore, biofilms on colonized materials could be characterized. Within this work it could be shown that the established method allows a comprehensive analysis of biofilms for different questions.

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Biofilme

Grundsätzlich gibt es in der Natur zwei verschiedene mikrobielle Lebensformen: die freischwimmenden, planktonischen Bakterien und die sessilen Bakterien, welche verschiedenste Oberflächen besiedeln. Letztere bezeichnet man als mikrobielle Biofilme, wobei diese die dominante Daseinsform mikrobiellen Lebens darstellen (Costerton *et al.*, 1995). So wird allgemein angenommen, dass 99,9 % aller Bakterien in Biofilmen existieren (Donlan and Costerton, 2002). Die erste Beschreibung von Biofilmen reicht bis in das Jahr 1683 zurück, als Antoni van Leeuwenhoek den Belag von Zähnen mit seinem primitiven, aber effektivem Mikroskop untersuchte und Aggregate von „animalcules“ beschrieb. Dennoch wurde die Existenz mikrobieller Biofilme erst im Jahr 1940 anerkannt (Roberts *et al.*, 1999), als Heukelekian und Heller über die Entstehung von bakteriellem Schleim und dem Wachstum von Bakterien auf Oberflächen berichteten (Heukelekian and Heller, 1940). Zobell beschrieb bereits 1943 viele der heute bekannten, grundlegenden Charakteristika von sessilen, mikrobiellen Gemeinschaften und beobachtete, dass die Anzahl von Bakterien adhärirt an einer Oberfläche im Gegensatz zur umgebenden Flüssigkeit immens höher war (Zobell, 1943). Im Jahr 1978 wurde die Bezeichnung „Biofilm“ erstmalig von der Arbeitsgruppe um J. W. Costerton eingeführt (Costerton *et al.*, 1978). Der Begriff Biofilm beschreibt eine Ansammlung von Mikroorganismen, die untereinander und/oder an biotischen oder abiotischen Grenzflächen haften und in einer selbstproduzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind (Costerton *et al.*, 1995).

Biofilme gelten als die älteste Lebensform auf Erden und als „Pioniere der Evolution“. Die ältesten Funde weisen auf versteinerte Biofilme hin, die in 3,5 Milliarden Jahre alten stromatolithischen Gesteinsformationen gefunden wurden (Flemming, 2014). Biofilme werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen und Protozoen gebildet. Sie können sich in einer breiten Spanne von Umweltbedingungen wie bei einem pH-Wert von 0 bis 13 und bei Temperaturen von -12°C bis 125°C ausbilden. Biofilme findet man auf jeder denkbaren Oberfläche und sie können abhängig von der Spezies und den Umweltbedingungen als Mono- und Multispezies-Biofilme auftreten (Costerton *et al.*, 1995; Tolker-Nielsen and Molin, 2000). Man findet Biofilme auf festen Oberflächen wie. z.B. Steinen im Fluss, als schwimmende Aggregate (*flocs* oder *floating biofilms*), als dichte, mikrobielle Matten oder als Pellikel (*floating pellicle*) an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit (Flemming, 2014).

Wechseln planktonische Bakterien ihre Lebensweise und werden sessil, so kommt es zu einer drastischen Veränderung in der Genexpression (Sauer, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu 38 %

des *E. coli*-Genoms von der Veränderung der Lebensweise hin zum Biofilm betroffen sind (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Weiterhin haben die im Biofilm vorherrschenden Bedingungen Ähnlichkeit mit denen einer planktonischen Kultur in der stationären Phase. Dazu zählen z.B. Änderungen des pH-Wertes, eine geringe Nährstoffverfügbarkeit und die Anhäufung toxischer Stoffe. So konnte man nachweisen, dass in dem einer stationären Phase ähnlichen Zustand des Biofilms dieselben Gene induziert werden, welche auch in der stationären Phase bei planktonischen Bakterien eine Rolle spielen (Schembri *et al.*, 2003a; Beloin *et al.*, 2004). Biofilme bestehen aus phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen mit spezialisierten Zelltypen, die zwar das gleiche genetische Repertoire, aber eine unterschiedliche Genexpression aufweisen (Fux *et al.*, 2005; An and Parsek, 2007; Spormann, 2008; Stewart and Franklin, 2008).

1.1.1 Stadien der Biofilmbildung

Der Vorgang der Biofilmbildung wird von unterschiedlichsten Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Osmolarität und Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst. Biofilme sind sehr heterogene, dynamische Systeme und jede Biofilmgemeinschaft ist einzigartig (Tolker-Nielsen and Molin, 2000). So weisen unterschiedliche Spezies und sogar unterschiedliche Stämme einer Spezies ganz individuelle Reaktionen auf sich ändernde Umweltbedingungen auf. Dennoch gibt es ein allgemein akzeptiertes und universelles Schema für den Verlauf der Entstehung eines Biofilms (Abb. 1).

1. Phase: Initiale und reversible Adhäsion an einen konditionierten Film

Der Transport der Bakterien zur Oberfläche erfolgt entweder willkürlich durch die Strömung einer Flüssigkeit oder durch aktive Fortbewegung mit Hilfe von Flagellen oder Fimbrien. Auf biotischen Oberflächen, wie z.B. menschlichem Gewebe, wird die Bindung der freischwimmenden Bakterien durch spezifische Adhäsion mittels Lektinen oder Adhäsinen vermittelt. Auf abiotischen Oberflächen adhäreren die planktonischen Bakterienzellen über nicht-spezifische Interaktionen wie elektrostatische Wechselwirkungen, Brown'sche Bewegung, Gravitationskraft oder van der Waals Kräfte (Gottenbos *et al.*, 2002). Meist spielen hier Auflagerungen von organischen Makromolekülen am Substrat eine große Rolle und ermöglichen durch die Bildung einer konditionierten Oberfläche die Anheftung der Bakterien. Die initiale Adhäsion ist ein reversibler Schritt, der stark durch die umgebenden Bedingungen wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur (Fletcher, 1988; Danese *et al.*, 2000a) und auch durch die Oberflächeneigenschaften selbst beeinflusst wird. Eine wichtige Rolle bei den abiotischen Substraten spielen die Rauheit und die Chemie der Oberfläche. So werden raue Oberflächen bevorzugt, da es hier zur Verringerung der Scherkräfte kommt und eine Oberflächenvergrößerung vorliegt (Donlan, 2002). Weiterhin haben die physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche einen Einfluss auf die Biofilmbildung. Mikroorganismen favorisieren hydrophobe, nicht-polare Oberflächen wie Plastik im Gegensatz

Einleitung

zu hydrophilen Materialien wie z.B. Glas oder Metall (Fletcher and Loeb, 1979; Pringle and Fletcher, 1983; Bendinger *et al.*, 1993).

2. Phase: Irreversible Adhäsion

Der Wechsel von der reversiblen zur irreversiblen Adhäsion wird beschrieben als der Übergang von einer schwachen Interaktion der Bakterienzelle mit dem Substrat zu einer dauerhaften Bindung. Dabei spielt die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eine Rolle. In dieser Phase der Biofilmbildung sind weiterhin bakterielle Adhäsine wie Fimbrien, Pili, Kapseln und Oberflächenproteine beteiligt (Kuchma and O'Toole, 2000).

3. Phase: Bildung von Mikrokolonien und Bildung der EPS

In dieser Phase kommt es zur weiteren Produktion der EPS, die die Bakterien als Matrix umgibt und die noch unreife Biofilmstruktur stabilisiert. Durch die Aggregation der adhären Zellen, die Zellteilung und die Rekrutierung weiterer planktonischer Zellen aus der Umgebung kommt es zur Mikrokoloniebildung. Dieses Stadium kann bereits wenige Stunden nach dem Kontakt des Mikroorganismus mit der Oberfläche beobachtet werden (Flemming, 2014).

4. Phase: Reifung des Biofilms

Diese Phase ist vergleichbar mit der stationären Phase einer planktonischen Kultur, in der sich das Biofilmwachstum und die Abtrennung von einzelnen Bakterienzellen oder ganzen Aggregaten die Waage hält. Der reife Biofilm stellt nun eine heterogene Masse dar, die mit Poren und Wasserkanälen durchzogen ist. Reife Biofilme weisen Nährstoff-, pH-Wert- und Sauerstoffgradienten auf. Die Bakterienzellen nahe der Oberfläche sind höheren Konzentrationen an Sauerstoff ausgesetzt, während in den tieferen Schichten des Biofilms nahezu anaerobe Bedingungen herrschen (Lewandowski, 1994).

5. Phase: Ablösung/Dispersion

Im reifen Biofilm kommt es immer wieder zum passiven Ablösen einzelner Bakterienzellen oder ganzer Teile des Biofilms von der Peripherie. Weiterhin gibt es sogenannte Schwärmerzellen, die aktiv den Biofilm verlassen (Donlan, 2002). In der letzten Phase der Biofilmentwicklung, der Dispersion, wird jedoch zu einem bestimmten Zeitpunkt eine kritische Masse erreicht und an der Peripherie kommt es dazu, dass einige Bakterienzellen in den planktonischen Zustand übergehen und den Biofilm aktiv ver-

Einleitung

lassen, um weitere Oberflächen zu kolonisieren. Bei Nahrungsmangel kommt es zur veränderten Genexpression, die dazu führt, dass die Bakterien die für die Flagellensynthese benötigten Gene exprimieren und Enzyme ausscheiden, die die extrazelluläre Matrix abbauen (O'Toole *et al.*, 2000).

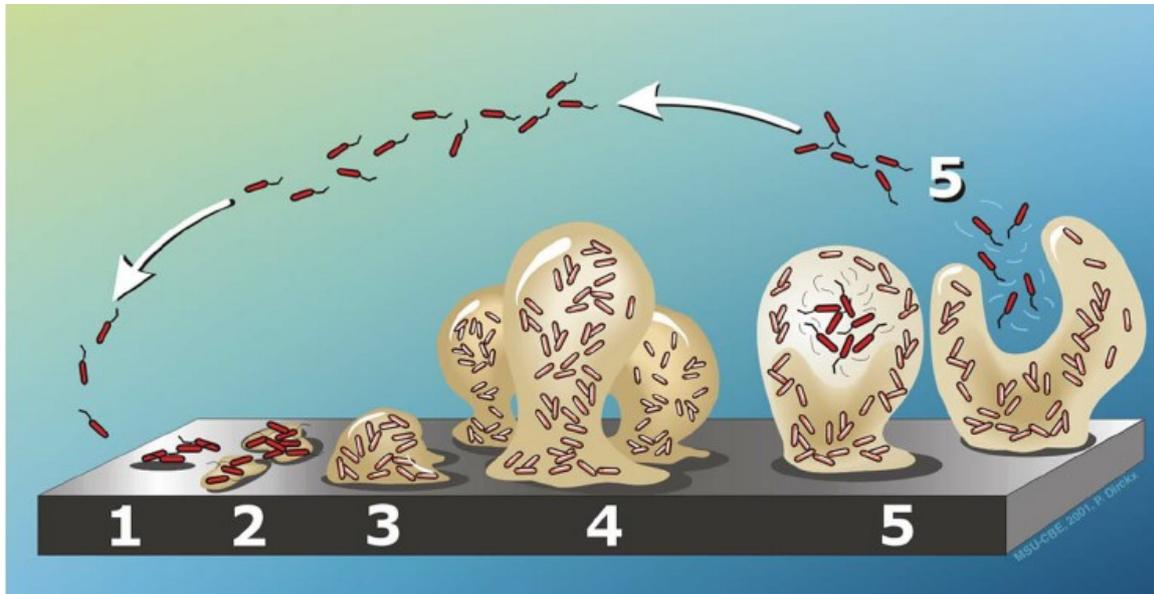


Abb. 1: Schematische Darstellung der Stadien der Biofilmbildung

(1) In der Phase der initialen Adhäsion kommt es zur reversiblen Anheftung planktonischer Bakterien an eine Oberfläche. (2) Durch die Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen kommt es zur irreversiblen Bindung der Bakterien. (3) Durch Zellteilung und Adhäsion weiterer Bakterienzellen kommt es zur Bildung von Mikrokolonien. (4) Der reife Biofilm mit einer charakteristischen, dreidimensionalen Struktur entsteht. (5) In der Phase der Dispersion kommt es zum Ablösen von Bakterienzellen oder Clustern aus dem reifen Biofilm (Van Houdt and Michiels, 2005).

1.1.2 Zusammensetzung und Funktion der Biofilmmatrix

Das Hauptcharakteristikum, welches im Biofilm lebende Bakterien von planktonischen Bakterien unterscheidet, ist die extrazelluläre Matrix, die die Bakterien im Biofilm umgibt und die dessen Architektur bestimmt (Sutherland, 2001). Abhängig von der Spezies beträgt der Anteil der Mikroorganismen im Biofilm 5-25 %, wohingegen der Matrixanteil 75-95 % ausmachen kann (Costerton *et al.*, 1987; Geesey, 1994). Die Biofilmmatrix ist ein wichtiger und komplexer Bestandteil und gilt als Grundgerüst des Biofilms. Sie besteht aus Polymeren mikrobiellen Ursprungs wie Polysacchariden, Glykoproteinen, Proteinen, Lipiden, Phospholipiden, Metaboliten und Nukleinsäuren (Branda *et al.*, 2005; Flemming and Wingender, 2010). Der Hauptanteil der Biofilmmatrix ist jedoch Wasser mit bis zu 97 % (Flemming *et al.*, 2016). Die Zusammensetzung der Matrix ist sehr unterschiedlich und abhängig von Faktoren wie Nährstoffen, Scherkräften oder Temperatur.

Von großer Bedeutung sind die in der Biofilmmatrix vorkommenden Nukleinsäuren, wie die extrazelluläre DNA (eDNA), die eine Rolle bei der Zellkommunikation spielt und essentiell für die Stabilität des

Einleitung

Biofilms ist (Petersen 2005, Steinberger 2005,Whitchurch 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)-Biofilmen mit DNase I zu einer signifikanten Reduktion der Biofilmbiomasse führte (Hall-Stoodley *et al.*, 2008). Neben Wasser als Hauptbestandteil der Matrix sind die Exopolysaccharide zu nennen. Hierzu zählen z.B. Poly- β -1,6-N-Acetylglukosamin (β -1,6-GlcNac oder PGA), Kolansäure und Cellulose. PGA spielt in der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) eine Rolle und trägt zu deren Virulenz bei (Mack *et al.*, 1996; Rupp *et al.*, 2001; Götz, 2002; Maira-Litrán *et al.*, 2002). Aber auch bei *E. coli* konnte man zeigen, dass PGA bei der Anheftung der Bakterien an abiotische Oberflächen, der Zell-Zell-Adhäsion und der Biofilmbildung involviert ist (Wang *et al.*, 2004). Die Kolansäure, oder auch das M-Antigen (Grant *et al.*, 1969), ist ein negativ geladenes Polymer, welches unter bestimmten Umweltbedingungen eine Schutzkapsel um die Bakterienzelle ausbildet und auch in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird. Sie ist vor allem bei *E. coli*, aber auch bei anderen Vertretern der *Enterobacteriaceae* zu finden (Van Houdt and Michiels, 2005) und ist neben der Anheftung an Oberflächen notwendig für die Entstehung der dreidimensionalen Biofilmstruktur (Danese *et al.*, 2000b). Vor allem bei *E. coli* und *Salmonella* konnte ein weiteres Polymer als Bestandteil der Exopolysaccharide in der Matrix identifiziert werden (Zogaj *et al.*, 2001a). Cellulose, ein Glukosepolymer mit β -1,4 glykosidischer Bindung, spielt bei den *Enterobacteriaceae* außerhalb des Wirts eine große Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und der Biofilmbildung (Römling, 2002).

Die EPS als Kennzeichen eines Biofilms hat zahlreiche und vielseitige Funktionen. Sie vermittelt mechanische Stabilität, ist formgebend und trägt zur Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche bei. Bakterien im Biofilm werden durch die schützende Matrix nicht so leicht durch die Strömung der umgebenden Flüssigkeit weggeschwemmt. Die Biofilmmatrix ermöglicht durch den engen räumlichen Zusammenhalt der Mikroorganismen eine stabile Zell-Zell-Kommunikation. Diese erfolgt über das sogenannte Quorum sensing. Hier werden Signalmoleküle, auch als Autoinducer bezeichnet, synthetisiert und in das umgebende Milieu abgegeben. Das Quorum sensing ist zell-dichteabhängig und dient zum Austausch von Informationen. Diese interzelluläre Kommunikation führt bei hoher Zelldichte zur Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts und damit zur Induktion bzw. Repression Quorum sensing-kontrollierter Gene (Camilli and Bassler, 2006). Die Matrix spielt weiterhin eine wichtige Rolle als Diffusionsbarriere. Nährstoffe im Biofilm werden nicht rausgewaschen, sondern akkumulieren und die Diffusion der von den Bakterien produzierten extrazellulären Enzyme in die Umgebung wird verhindert. Dadurch erlaubt die Biofilmmatrix eine effektivere Nährstoffverwertung und schafft ein vorteilhaftes Milieu für die Bakterien im Biofilm. Durch die unterschiedlichsten Bestandteile der Matrix wird

Einleitung

zudem eine Wasserrückhaltung und somit ein Schutz vor Austrocknung gewährleistet. Weiterhin bietet sie Schutz vor pH-Wert-Schwankungen, Stress und der Immunabwehr des Wirts (Antikörper-Opsonisierung, Makrophagen).

1.1.3 Antibiotikaresistenz in Biofilmen

Das Aufkommen von Antibiotika nach der Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming im Jahr 1929 war ein großer Durchbruch in der Behandlung von bakteriellen Infektionen, die als Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung galten. Bereits 1940 gab es jedoch erste Berichte von Resistenzen gegen Antibiotika (Abraham and Chain, 1940), welche seitdem stetig und dramatisch zunehmen. Auch Biofilmbakterien sind bekannt für ihre hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen wie z.B. Antibiotika (Costerton *et al.*, 1999; Stewart and Costerton, 2001). In einem Biofilm gibt es hierbei unterschiedliche Phänotypen, nämlich die Toleranz, die Resistenz und die Persistenz, die dazu beitragen können, dass Bakterien höheren Konzentrationen an antimikrobiellen Substanzen standhalten können. So ist die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) eines Antibiotikums bei im Biofilm lebenden Bakterien 10- bis 1000-fach höher im Vergleich zu planktonisch lebenden Bakterien (Mah and O'Toole, 2001).

Toleranz ermöglicht Bakterienzellen, eine vorübergehende Exposition gegenüber Antibiotika bei Konzentrationen zu überleben, die sonst für sie tödlich wären (Kester and Fortune, 2014). Unterschiedlichste Mechanismen tragen dazu bei. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die EPS-Matrix als eine initiale Barriere dient, die dazu beitragen kann, dass die Penetration von antimikrobiellen Substanzen verzögert wird (Mah and O'Toole, 2001). Ein weiterer Faktor, der zur Toleranz beitragen kann, ist das langsame Wachstum und ein veränderter Stoffwechsel von Bakterienzellen im reifen Biofilm (Brown *et al.*, 1988; Wentland *et al.*, 1996) aufgrund von Nährstofflimitierungen. Im Biofilm herrscht eine Heterogenität, die durch Gradienten an Nährstoffen, pH-Wert, Abfallprodukten, Sauerstoff und Signalmolekülen gekennzeichnet ist. Die äußere Schicht des Biofilms ist aerob und metabolisch aktiv. In den inneren Schichten herrscht ein anaerobes Milieu mit Nährstoffdefiziten (Bjarnsholt *et al.*, 2013; Costerton *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2004).

Resistenzen werden in primäre und sekundäre Resistenz unterschieden. Eine primäre bzw. natürliche Resistenz beschreibt die Unwirksamkeit von Antibiotika einer bestimmten Gattung oder Spezies. Eine sekundäre Resistenz hingegen ist genetisch erworben und kann an nachfolgende Generationen weitergegeben werden. Solche Antibiotikaresistenzen entstehen typischerweise durch Mechanismen, die die Interaktion eines Wirkstoffes mit seinem Ziel blockieren. Diese Resistenzen können durch genetische Mutation des Targets, enzymatische Deaktivierung des Antibiotikums, Antibiotikaexport über Effluxpumpen oder Verringerung der Zelldurchlässigkeit entstehen (Kester and Fortune, 2014). Durch

Einleitung

die enge, räumliche Nähe der Bakterien in einem Biofilm wird zudem der Austausch von genetischem Material und somit auch von Resistenzgenen oder -plasmiden untereinander leichter ermöglicht. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit von Bakterien im Biofilm gegenüber Antibiotika wird neben der Vererbung und dem horizontalen Gentransfer durch das Auftreten von Persisterzellen ermöglicht. Im Gegensatz zur Resistenz und Toleranz, welche Eigenschaften von ganzen Bakterienpopulationen darstellen, ist Persistenz die Fähigkeit einer klonalen Bakteriensubpopulation, die Exposition gegenüber hohen Antibiotikakonzentrationen zu überleben. Persistenz wird typischerweise beobachtet, wenn der Hauptteil der Bakterienpopulation schnell abgetötet wird, während eine Subpopulation über einen viel längeren Zeitraum fortbesteht (Gefen and Balaban, 2009). In Biofilmen, die extrem unanfällig gegenüber Antibiotika sind, findet man Subpopulationen von dormanten, sich nicht teilenden Persisterzellen (Lewis, 2005, 2010).

1.1.4 Vorkommen von Biofilmen

Biofilme sind eine ubiquitäre Lebensform und können jede erdenkliche Oberfläche besiedeln. Neben dem positiven Nutzen von Biofilmen bei der Reinigung von Abwässern oder der Reinigung von Abluft, stellen sie auch einen unerwünschten Störfaktor in industriellen Prozessen, in Trinkwasserleitungen, in Wasseraufbereitungssystemen (*Biofouling*), in der Lebensmittelindustrie und in der Schifffahrt dar. Im Bereich der Material- und Grenzflächenforschung ist die Suche nach unbesiedelbaren Materialien bisher erfolglos.

Als natürlich vorkommende Biofilme besiedeln diese als Standortflora z.B. die Mundhöhle und die Haut. Bakterielle Gemeinschaften spielen eine Rolle im Abbau und Verfügbarmachen von Nährstoffen (Dethlefsen *et al.*, 2007; Macfarlane and Dillon, 2007), in der Synthese von Vitaminen und der Unterstützung des Immunsystems, indem sie eine Schutzfunktion gegenüber der Besiedlung von exogenen Pathogenen übernehmen (Costerton *et al.*, 1999; Wilson, 2005). Bakterien machen bis zu 90 % der Zellen im menschlichen Körper aus und sind dort adhären oder mit Oberflächen assoziiert (Henderson and Wilson, 1998). Das Verhältnis zwischen dem Wirt und seiner Mikrobiota befindet sich in einem ausbalancierten Gleichgewicht, jedoch kann es unter bestimmten Bedingungen zusammenbrechen und in einer Infektionskrankheit resultieren. Bakterien in der sogenannten Plaque, dem Zahnbelag und natürlichen Biofilm im Mundraum, können somit zu Infektionen wie Karies und Parodontitis führen. Eine Auflistung von Infektionen, die mit der Bildung von Biofilmen assoziiert werden, ist in Tabelle 1 dargestellt. Laut den Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) und den Nationalen Gesundheitsinstituten (*National Institutes of Health*, NIH) werden 65-80 % aller bakteriellen Infektionen beim Menschen mit Biofilmen assoziiert (Potera, 1999).

Tab. 1: Biofilm-assoziierte Infektionen beim Menschen*

Krankheit oder Infektion	Beteiligte Mikroorganismen
Pneumonie bei Zystischer Fibrose	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Bakterielle Prostatitis	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Parodontitis	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Karies	Gram-positive Kokken z.B. Streptokokken
Nekrotisierende Faszitis	Streptokokken Gruppe A
Cholangitis	Darmbakterien z.B. <i>Escherichia coli</i>
Bakterielle Endokarditis	Streptokokken der Gruppe viridans, Staphylokokken
Wundinfektionen	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Cystitis	<i>Escherichia coli</i>
Osteomyelitis	<i>Staphylococcus aureus</i>

* zusammengetragen aus (Costerton *et al.*, 1999; Donlan and Costerton, 2002; Lebeaux *et al.*, 2013)

Biofilme können sich außerdem auf implantierbaren Medizinprodukten ausbilden und dabei zu schwer behandelbaren, nosokomialen und chronischen Infektionen führen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Donlan, 2008; Hatt and Rather, 2008). Es wird angenommen, dass die Bildung mikrobieller Gemeinschaften mit der Pathogenität der Mikroorganismen assoziiert ist (Parsek and Singh, 2003; Parsek and Fuqua, 2004) und dass Bakterien, die in Biofilmen persistieren, die Hauptursache für chronische und rezidivierende Infektionen sind (Costerton *et al.*, 1999). In den Vereinigten Staaten sind 60-70 % aller nosokomialen Infektionen in der Implantationschirurgie auf bakterielle Biofilme zurückzuführen (Bryers, 2008). So konnte man Biofilme auf medizinischen Geräten, Implantatmaterialien und Prothesen wie z.B. Herzklappen, Herzschrittmachern, zentralen Venenkathetern, Blasenkathe tern, Gelenkprothesen, Zahnimplantaten und Kontaktlinsen nachweisen. Strategien zur Bekämpfung Implantat-assoziiertes Biofilme befassen sich mit der Herstellung innovativer Oberflächen und Materialbeschichtungen.

1.2 *Escherichia coli*

Die Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde 1885 zum ersten Mal als *Bacterium coli commune* von Theodor Escherich aus der Faeces des Menschen isoliert (Escherich, 1885). *E. coli* gehört taxonomisch zum Phylum *Proteobacteria*, zur Klasse *Gammaproteobacteria*, zur Ordnung *Enterobacteriales* und zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Garrity *et al.*, 2005) und ist als Gram-negatives Stäbchen der am besten untersuchte Modellorganismus. Das Bakterium ist nicht-sporenbildend, peritrich begeißelt und weist eine Länge von etwa 1 bis 3 µm auf (Dworkin and Falkow, 2006). *E. coli* besiedelt als fakultativ anaerober Mikroorganismus innerhalb weniger Stunden nach der Geburt den Gastrointestinaltrakt von Neugeborenen und koexistiert als Kommensale im menschlichen Wirt (Drasar and Hill, 1974). Human fäkale *E. coli* (HFEC) gelten für gewöhnlich als harmlose Bakterien, können jedoch beim geschwächten oder immunsupprimierten Wirt als intra- und extraintestinales Pathogen Infektionen verursachen. Humaninfektionen werden verursacht durch kontaminierte Lebensmittel (z.B. Fleisch, Salat), kontami-

niertes Trinkwasser oder durch direkte Übertragung von Mensch zu Mensch aufgrund von Hygienemängeln (Berger *et al.*, 2010). *E. coli* ist der häufigste Erreger humaner, bakterieller Infektionen. Aus diesen Infektionen resultieren drei allgemeine Syndrome: (1) Harnwegsinfektionen, (2) Sepsis und Meningitis, (3) Darm- bzw. Durchfallerkrankungen (Nataro and Kaper, 1998). Pathogene *E. coli* werden in zwei große Gruppen unterteilt: intestinal pathogene *E. coli* (InPEC) und extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC). Anhand von vorhandenen Virulenzgenen, Infektionsmechanismen und Adhäsionsmustern erfolgt eine weitere Unterteilung in verschiedene Pathotypen. Zu den InPEC gehören diffus-adhärenzte *E. coli* (DAEC), adhärenz-invasive *E. coli* assoziiert mit Morbus Crohn (AIEC oder wie auch in dieser Arbeit mit CAEC (Crohn's-assozierte *E. coli*) abgekürzt), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC) einschließlich enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) and enteroinvasive *E. coli* (EIEC). Die ExPEC beinhalten uropathogene *E. coli* (UPEC), Neugeborenen-Meningitis verursachende *E. coli* (NMEC), Sepsis-assozierte *E. coli* (SEPEC; in dieser Arbeit mit SAEC (Sepsis-assozierte *E. coli*) abgekürzt), sowie aviärpathogene *E. coli* (APEC) (Nataro and Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Croxen and Finlay, 2010; Clements *et al.*, 2012; Vogeleer *et al.*, 2014). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Pathotypen näher beschrieben.

1.2.1 Pathogene *Escherichia coli*

1.2.1.1 Intestinal pathogene *Escherichia coli*

Adhärenz-invasive *E. coli* assoziiert mit Morbus Crohn (AIEC bzw. CAEC)

Boudeau *et al.* untersuchten 1999 einen *E. coli*-Stamm, isoliert aus der Dünndarmmukosa eines Patienten mit Morbus Crohn, und stellten bei diesem Isolat außergewöhnlich invasive Fähigkeiten fest. Im Gegensatz zu anderen invasiven Bakterien ist der Invasionsprozess bei AIEC nicht nur abhängig von der Beteiligung der Wirtszell-Aktin-Mikrofilamente sondern auch von Mikrotubuli. Zudem wurden keine Gene detektiert, welche für bekannte Proteine kodieren, die im Invasionsprozess von ETEC, EIEC oder EPEC involviert sind (Boudeau *et al.*, 1999), so dass daraus die Pathogruppe AIEC hervorging, welche eine hohe genotypische Variabilität aufweist (Martinez-Medina and Garcia-Gil, 2014). So wurden für die Gruppe der AIEC bisher keine einzigartigen Gensequenzen detektiert, jedoch findet man viele Virulenz-assozierte Gene, die für ExPEC typisch sind (Martinez-Medina *et al.*, 2009a, 2009b). Beim Adhäsions- und Invasionsprozess spielen Typ I-Pili, Flagellen-vermittelte Motilität und das Lipoprotein YfgL eine essentielle Rolle (Boudeau *et al.*, 2001; Barnich *et al.*, 2003; Rolhion *et al.*, 2005). Ein charakteristisches phänotypisches Merkmal von AIEC ist die Biofilmbildung. Es konnte gezeigt werden, dass AIEC-Stämme stärkere Biofilmbildner im Vergleich zu Nicht-AIEC-Stämmen, isoliert aus der intestinalen Mukosa, sind, wobei das Vorhandensein der Flagellen-vermittelten Motilität ausschlaggebend ist (Martinez-Medina *et al.*, 2009a).

Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

EPEC ist der Pathotyp, der als erster beschrieben wurde. Je nach Vorhandensein des EPEC *adherence factor*-Plasmids (pEAF) (Tobe *et al.*, 1999) kann man diesen Pathotyp in typische EPEC (tEPEC) und atypische EPEC (aEPEC) unterscheiden (Kaper *et al.*, 2004). Auf dem EAF-Plasmid sind Virulenzfaktoren, u.a. Typ IV-Fimbrien, wie *bundle-forming pili*, kodiert, die an der Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle beteiligt sind (Girón *et al.*, 1991). Ein Charakteristikum für EPEC sind sogenannte *Attaching and Effacing*-Läsionen am Dünndarmepithel. Hierbei kommt es zu einer sehr engen Anheftung der Bakterien an die Epithelzellmembran mit Zerstörung der Mikrovilli. Weiterhin erfolgen ausgeprägte Zytoskelettveränderungen und Anhäufungen von polymerisiertem Aktin. Durch die histopathologischen Veränderungen kommt es zur Bildung von podestartigen Strukturen unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien. Die Zerstörung der Mikrovilli führt zu einem verringerten Resorptionsvermögen der Darmepithelzellen. Eine EPEC-Infektion geht mit wässriger Diarrhoe, Erbrechen und Fieber einher (Nataro and Kaper, 1998). Als Verursacher von Säuglingsentzündungen führen EPEC in Entwicklungsländern noch heute zur Säuglingssterblichkeit (Nataro and Kaper, 1998; Clarke, 2001).

Enterotoxische *E. coli* (ETEC)

ETEC besitzen als Virulenzfaktoren hitzlabile (*heatlabile enterotoxins*, LT) und/oder hitzestabile Enterotoxine (*heatstable enterotoxins*, ST) (Levine, 1987). Bei einer Infektion kolonisieren ETEC mit Hilfe verschiedenster Fimbrien und weiterer Kolonisationsfaktoren die Dünndarmmukosa, produzieren Enterotoxine und verursachen dadurch Diarrhoe (Sack, 1980; Nataro and Kaper, 1998). ETEC-Infektionen führen zu Diarrhoe bei Säuglingen und Kleinkindern in Entwicklungsländern und sind die häufigste Ursache der Reisediarrhoe (Black, 1990; Nataro and Kaper, 1998). Die Durchfallerkrankung zeigt Cholera-ähnliche Symptome und kann sowohl einen milden als auch einen schweren Verlauf aufweisen. Sie geht einher mit wässriger Diarrhoe, Erbrechen und starker Dehydrierung. In sehr schweren Fällen endet die Infektion letal und ist bei Kindern in Entwicklungsländern für mehrere zehntausend Todesfälle pro Jahr verantwortlich (Qadri *et al.*, 2005).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

EAEC wurden erstmalig 1987 beschrieben. Dieser zunächst als enteroadherent-aggregative *E. coli* bezeichnete und später in enteroaggregative *E. coli* (EAEC) umbenannte Pathotyp ist durch die charakteristische aggregative Adhärenz (AA) auf HEp-2-Zellen gekennzeichnet. Die Form der Aggregate ähnelt gestapelten Ziegelsteinen (*stacked-brick*) (Nataro *et al.*, 1987; Nataro and Kaper, 1998). Der AA-Phänotyp ist mit dem Vorhandensein aggregativer Adhärenzfimbrien (AAF), flexiblen Fimbrien mit 2 bis 3 nm im Durchmesser, assoziiert (Nataro *et al.*, 1992). Bakterienstämme dieses Pathotyps sekretieren keine LT oder ST. EAEC adhären an die Mukosa des Dün- und Dickdarmepithels und fördern die

Einleitung

Sekretion des Mukus in der Mukosa. Sie sind in der Lage, diesen Mukus zu binden (Wanke *et al.*, 1990) und bilden dicke, aggregierende Biofilme. Eine Infektion mit EAEC resultiert in persistenter, wässriger Diarrhoe vor allem bei Kindern, aber auch bei Erwachsenen sowohl in Entwicklungsländern als auch in den Staaten der ersten Welt (Kaper *et al.*, 2004; Sarantuya *et al.*, 2004). Des Weiteren ist eine Infektion mit EAEC als zweithäufigste Ursache der Reisediarrhoe assoziiert (Shah *et al.*, 2009).

1.2.1.2 Extraintestinal pathogene *Escherichia coli*

Uropathogene *E. coli* (UPEC)

Zu den häufigsten extraintestinalen Infektionen gehören Harnwegsinfektionen (englisch *urinary tract infections*, UTI) die mit bis zu 80 % durch UPEC verursacht werden. Hierzu zählen Krankheitsbilder wie Cystitis und Pyelonephritis. Als intestinale Keime sind UPEC in der Lage, von der Harnröhre über die Harnblase bis in die Nieren aufzusteigen. Bei dieser komplexen Pathogenese sind verschiedenste Virulenzfaktoren wie Pili, z.B. Typ I-Fimbrien und P-Fimbrien, sekretierte Toxine und Kapseln beteiligt (Johnson, 1991; Wiles *et al.*, 2008). Nach dem Eintritt der UPEC in den Urogenitaltrakt kommt es zur Typ I-Fimbrien-vermittelten Adhäsion an und Invasion in das Uroepithel. Durch komplexe Interaktionen kommt es zur lokalen Aktin-Reorganisation, die zur Umhüllung und letztendlich zur Internalisierung der adhärenierten Bakterien führt. In den Zellen entstehen Biofilm-ähnliche Komplexe, die als *intracellular bacterial communities (IBC)* oder *pods* bezeichnet werden und als Reservoir für rezidivierende Infektionen dienen können (Mulvey *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003). Die Anheftung und Invasion der UPEC führt zur Apoptose und zum Ablösen der Blasenepithelzellen.

Sepsis-assoziierte *E. coli* (SEPEC bzw. SAEC)

Wie beim Pathovar AIEC beschrieben, weist die Pathogruppe SEPEC ebenso kein spezifisches Repertoire an Virulenzgenen auf, sondern ist vielmehr heterogen. So besitzen zwar alle SEPEC-Stämme Virulenzfaktoren wie Adhärenzpili, diese unterscheiden sich jedoch zwischen den einzelnen Stämmen. Man findet z.B. P-Pili oder Typ I-Pili, die für die Adhäsion wichtig sind. Ein weiterer Virulenzfaktor, der variiert, ist die Kapsel (K-1 Polysaccharidkapsel und Typ IV-Kapsel) (Mokady *et al.*, 2005). Den meisten Sepsis-Stämmen gemein ist das Colicin V-Plasmid, welches eine Rolle bei der Eisenaufnahme und der Serumresistenz spielt (Valvano and Crosa, 1984; Waters and Crosa, 1986, 1991; Zgur-Bertok *et al.*, 1990). Zu den schwerwiegenden Erkrankungen, die durch SEPEC verursacht werden, zählen die neonatale Sepsis und die Sepsis beim Erwachsenen.

1.2.2 Biofilmbildung und Biofilm-assoziierte Faktoren bei *Escherichia coli*

Motilität: Flagellen

Bei gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, die im Allgemeinen beweglich sind, wird die Motilität durch Flagellen vermittelt. Die Fähigkeit motiler Bakterien, sich mit Hilfe von Flagellen oder Pili fortzubewegen, wird generell für eine effiziente Anheftung der Zellen an eine Oberfläche benötigt. In einer Studie von Pratt und Kolter war die Hälfte der Mutanten unfähig, Biofilme zu bilden, da die Insertionen zur Störung der Flagellenfunktionen führten. Weiterhin konnten mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die Motilität von Bakterien sowohl die initiale Adhäsion an eine Oberfläche als auch die Fortbewegung darauf fördert (O'Toole and Kolter, 1998a; Pratt and Kolter, 1998). Wood *et al.* zeigten eine direkte Korrelation der Motilität von *E. coli* K-12 und der Fähigkeit zur Biofilmbildung auf. Dennoch gibt es Studien, die darauf hinweisen, dass die Motilität durch Flagellen nicht essentiell für die initiale Adhäsion und die Bildung von Biofilmen ist (Pratt and Kolter, 1999; Sheikh *et al.*, 2001). Prigent-Combaret *et al.* konnten in einem nicht-motilen Stamm, welcher eine Überexpression der Oberflächenadhäsine Curli-Fimbrien aufwies, zeigen, dass die Motilität durch Flagellen weder für die initiale Adhäsion noch für die Biofilmentwicklung benötigt wird (Prigent-Combaret *et al.*, 2000).

Adhäsine: Curli-Fimbrien

Curli sind proteinartige, extrazelluläre Fasern erstmalig beschrieben in *E. coli* (Olsén *et al.*, 1993). Diese Filamente aggregieren an der Zelloberfläche zu einer Länge zwischen 0,5 bis 1 µm langen Strukturen. Curli-Fimbrien vermitteln die Adhäsion, Kolonisierung, Zell-Zell-Interaktionen und Biofilmbildung der Bakterien (Prigent-Combaret *et al.*, 2000). Bei der Synthese der Curli-Fimbrien in *E. coli* sind sechs Gene beteiligt, welche in zwei divergent transkribierten Operonen lokalisiert sind. Das *csgBA* Operon kodiert hierbei für die strukturellen Komponenten der Curli; das *csgDEFG* Operon kodiert für den Transkriptionsregulator CsgD und die Exportmaschinerie (CsgE-G). *CsgA* kodiert für die Untereinheiten der Curli-Fimbrien, welche nach Sekretion anschließend durch das Nukleatorprotein CsgB in der Außenmembran verankert werden. Mit Hilfe von Curli-Fimbrien können Bakterien an biotische und abiotische Oberflächen binden und sie ermöglichen außerdem die Reifung des Biofilms. Weiterhin sind Curli-Fimbrien in der Lage, Cellulose zu binden.

Adhäsine: Typ I-Fimbrien

Hierbei handelt es sich um fadenförmige, proteinartige Adhäsine, die sowohl bei kommensalen als auch pathogenen *E. coli*-Isolaten vorkommen (Sauer *et al.*, 2000). Die Mannose-abhängige Adhäsion an eukaryotische Zellen durch Typ I-Fimbrien (Duncan *et al.*, 2005) gilt als Virulenzfaktor bei pathogenen *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004). Pro Bakterienzelle findet man auf der Oberfläche zwischen 100-500 Fimbrien mit einer Länge von 0,2 bis 2 µm. Typ I-Fimbrien gelten als ausschlaggebend für die Bildung

Einleitung

von *E. coli*-Biofilmen auf abiotischen Oberflächen (Pratt and Kolter, 1998; Moreira *et al.*, 2003; Orndorff *et al.*, 2004). Das Gen *fimH*, welches das Adhäsion an der Spitze der Fimbrie kodiert (Krogfelt *et al.*, 1990), spielt hierbei eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine *fimH*-Mutante eine verringerte Bindung an Polyvinylchlorid aufwies (Pratt and Kolter, 1998). Die Expression von Typ I-Fimbrien wird durch Adhäsion und Biofilmbildung in der frühen und späten Phase induziert (Beloïn *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004).

Adhäsine: Pyelonephritis-assoziierte Fimbrien (P-Fimbrien)

P-Fimbrien werden meistens mit Infektionen assoziiert, die durch UPEC ausgelöst werden (Connell *et al.*, 1993; Lane and Mobley, 2007). Diese Fimbrien binden spezifisch an Rezeptoren, die auf Zellen der oberen Harnwege (Harnleiter, Niere) zu finden sind (Kuehn *et al.*, 1992). Weiterhin sind P-Fimbrien wichtig für die Kolonisierung und Persistenz von *E. coli* im Darm und ermöglichen eventuell eine Ausbreitung der Bakterien in die Harnwege (Herías *et al.*, 1995; Wold *et al.*, 1992). Verschiedene Studien zeigen eine signifikante Assoziation von *pap* Genen mit der Fähigkeit der Biofilmbildung in *E. coli* (Fattahi *et al.*, 2015; Tajbakhsh *et al.*, 2016).

Oberflächenproteine: Antigen 43

Diderichsen konnte 1980 zeigen, dass eine Mutation des Gens *flu* die Flockenbildung von *E. coli* am Boden des Reagenzglases verhinderte und die Morphologie der Kolonien auf Kulturplatten veränderte (Diderichsen, 1980). Das Gen *flu*, oder auch *agn43*, kodiert für das Antigen 43 (Ag43) (Hasman *et al.*, 1999; Henderson and Owen, 1999), ein Protein an der äußeren Membran von *E. coli*, welches sowohl in kommensalen als auch in pathogenen *E. coli*-Isolaten gefunden werden kann. Die meisten Stämme haben hierbei mehrere Kopien des Gens im Genom, wohingegen *E. coli* K-12 nur eine Kopie aufweist. Ag43 zählt zu den Autotransporterproteinen (Henderson *et al.*, 1998) mit Selbsterkennung. Bei der Familie der Autotransporterproteine sind alle Informationen, die für den Transport an die äußere Membran und die Sekretion über die Zellhülle benötigt werden, im Protein selbst enthalten. Die durch Ag43 geförderte Zell-Zell-Adhäsion führt in der Flüssigkultur zur Autoaggregation der Bakterienzellen, erkennbar durch eine Verklumpung mit anschließender Sedimentation. Bei sessilen Bakterien nimmt Ag43 eine Schlüsselrolle ein, indem es die Adhäsion der Zellen untereinander unterstützt und somit zur dreidimensionalen Entwicklung des Biofilms beiträgt (Owen *et al.*, 1996; Henderson *et al.*, 1997; Hasman *et al.*, 1999; Kjaergaard *et al.*, 2000a; Schembri *et al.*, 2003b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Oberflächenprotein die Bildung von Multispezies-Biofilmen fördert (Kjaergaard *et al.*, 2000b).

Matrixbestandteile: Cellulose

Cellulose ist ein Polysaccharid und Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand. Zunächst wurde angenommen, dass Cellulose außerhalb der Pflanzenwelt nur von einigen Bakterien produziert wird. Inzwischen weiß man jedoch, dass die Celluloseproduktion ein weitverbreitetes Phänomen bei den *Enterobacteriaceae* wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Serovar *Enteritidis*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. und kommensalen sowie pathogenen *E. coli* ist. Der fluoreszente Farbstoff Calcofluor, der von der Cellulose gebunden wird, erlaubt hierbei ein vorteilhaftes Screening für die Celluloseproduktion von Bakterien (Zogaj *et al.*, 2001a; Solano *et al.*, 2002; Römling *et al.*, 2003; Zogaj *et al.*, 2003; Römling, 2005; Da Re and Ghigo, 2006; Uhlich *et al.*, 2006). Die Gene für die Cellulosesynthese werden konstitutiv exprimiert und sind in zwei divergent transkribierten Operationen, *bcsABZC* und *bcsEFG*, lokalisiert. BcsA ist ein Protein der Cytoplasmamembran mit Cellulosesynthaseaktivität. In *E. coli* korreliert die Celluloseproduktion mit der Biofilmbildung, wobei eine Behandlung mit Cellulase zur Zerstörung des Biofilms führt (Zogaj *et al.*, 2001b; Römling, 2002; Zogaj *et al.*, 2003; Da Re and Ghigo, 2006). Die Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien kann mit Hilfe des Kongorotagars untersucht werden. Werden beide Biofilm-assoziierten Faktoren exprimiert, so bildet *E. coli* den *rdar* (*red, dry and rough*) Morphotyp aus. Die Expression dieses Morphotypes ist jedoch abhängig von der Wachstumsphase und der Temperatur. Er wird in der stationären Phase, bei Temperaturen unter 30°C und bei geringen Salzkonzentrationen gebildet (Römling *et al.*, 1998a).

In der *in vitro* Analyse von Biofilmen gehört *E. coli* zu den meist untersuchten Modelorganismen. Die hier erwähnten Biofilm-assoziierten Faktoren und deren Funktion in der Biofilmbildung wurden hauptsächlich in Studien untersucht, die mit nicht-pathogenen Laborstämmen wie *E. coli* K-12 durchgeführt wurden (Danese *et al.*, 2000b; Domka *et al.*, 2007; Pratt and Kolter, 1998; Reisner *et al.*, 2003; Schembri *et al.*, 2003a). Durch den extensiven Fokus auf die Analyse der Biofilmbildung nicht-pathogener *E. coli*-Stämme gibt es weniger Studien über die Biofilmbildung von pathogenen *E. coli* und auch der Einfluss der Biofilm-assoziierten Faktoren ist unzureichend erläutert. Es gibt nur eine Studie, die das Potential der Biofilmbildung und die genetischen Faktoren verschiedenster *E. coli*-Pathotypen miteinander vergleicht (Reisner *et al.*, 2006) und nur UPEC, EAEC und AIEC sind bekannt für ihr Potenzial, Biofilme auszubilden.

Es gibt verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien, die darauf hinweisen, dass die genetische Ausstattung von verschiedenen Pathotypen für eine erhöhte Biofilmbildung verantwortlich und somit die Fähigkeit zur Biofilmbildung ein spezifisches Charakteristikum für bestimmte Pathotypen ist. EAEC adhären an die Mukosa des Dün- und Dickdarms und formen dort dicke, aggregierende Biofilme, in denen die Bakterien von einer extrazellulären Matrix umgeben sind (Vial *et al.*, 1988; Hicks *et al.*, 1996; Nataro

et al., 1996). Wakimoto *et al.* untersuchten insgesamt 1042 *E. coli*-Isolate von Kindern mit Durchfallerkrankungen und konnten zeigen, dass EAEC-Isolate im Vergleich zu anderen Isolaten eine signifikant stärkere Biofilmbildung aufwiesen (Wakimoto *et al.*, 2004). Weiterhin analysierten Mohamed *et al.* EAEC-Isolate von Reisenden in Entwicklungsländern und konnten bestätigen, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung ein weitverbreitetes Phänomen des EAEC-Pathotyps ist (Mohamed *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu *E. coli* K-12, bei dem die Motilität durch Flagellen mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung korreliert, konnte man zeigen, dass es bei einem nicht-motilen EAEC-Stamm zu keiner Beeinträchtigung in der Biofilmbildung kam. Weiterhin hatte die Anwesenheit von Mannose, welches von FimH der Typ I-Fimbrien gebunden wird und diese somit für eine Adhäsion blockiert, keinen Einfluss auf die Biofilmbildung (Sheikh *et al.*, 2001), obwohl Typ I-Fimbrien als kritisch für die Biofilmbildung in *E. coli* K-12 gelten (Pratt and Kolter, 1998; Orndorff *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen heben hervor, wie komplex und divers die Biofilmbildung und die daran beteiligten Faktoren sind und verdeutlichen, dass Biofilm-assoziierte Komponenten, die in nicht-pathogenen Stämmen essentiell sind, einen anderen Einfluss in der Biofilmbildung von Umweltisolaten und klinischen Isolaten aufweisen.

1.3 *Staphylococcus aureus* und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*

S. aureus wurde erstmals durch Ogston in den 1880er Jahren in der eitrigen Flüssigkeit eines Beinabszesses identifiziert und offiziell von Rosenbach isoliert (Newsom, 2008). Die Gram-positiven, kokkenförmigen Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5 – 1,5 µm sind nicht motil. Sie gehören zu den nichtsporenbildenden, fakultativen Anaerobiern und sind durch die Bildung von Zellclustern gekennzeichnet (Harris *et al.*, 2002). Das Bakterium kommt sowohl als Kommensale als auch als pathogener Keim vor. Etwa 30 % der Menschen ist mit *S. aureus* in der Nase oder auf der Haut kolonisiert (Wertheim *et al.*, 2005). Zu den von *S. aureus* verursachten Erkrankungen zählen die Endokarditis, Sepsis, Osteomyelitis, Wundinfektionen, Pneumonie, Meningitis, Haut- und Weichteilinfektionen und das *Toxic shock-Syndrom* (Lowy, 1998; Peacock and Paterson, 2015; Tong *et al.*, 2015). Das Bakterium verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren (z.B. Protein A, Fibronectin-Bindeprotein, Toxine wie Hämolsine, Enterotoxine oder *Toxic shock syndrom* Toxin), die die Kolonisierung von Gewebe, die Zerstörung von Gewebe und die Invasion in verschiedenste Wirtszellen fördern (Dinges *et al.*, 2000; Dziewanowska *et al.*, 1999; Lowy, 1998).

Die erste Resistenz gegenüber Penicillinen, vermittelt über das β -Laktamase-Gen, trat 1940 auf. Innerhalb eines Jahres nach Entwicklung des ersten halbsynthetischen Penicillins namens Methicillin im Jahr 1959 wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) identifiziert (Knox, 1960). Die Methicillinresistenz wird durch das *mecA* Gen vermittelt und durch horizontalen Gentransfer eines mobilen genomischen Elements, das *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec), weitergegeben (Katayama *et al.*, 2000). Das Gen *mecA* kodiert für das Penicillin-Bindeprotein 2a (PBP2a), welches als

Enzym für die Quervernetzung des Peptidoglykans innerhalb der Bakterienzellwand verantwortlich ist. Dieses Enzym zeigt eine geringe Affinität gegenüber β -Laktamen und vermittelt somit die Resistenz gegen diese Antibiotikaklasse (Hartman and Tomasz, 1984). MRSA sind ubiquitär zu finden und gelten als Verursacher nosokomialer Infektionen. Sie besiedeln vorrangig hospitalisierte Patienten, sind aber auch in der restlichen Bevölkerung als *community acquired* MRSA (CA-MRSA) nachzuweisen.

1.3.1 Biofilmbildung bei *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist bekannt für seine Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Wirtsgeweben und Implantaten und verursacht dadurch chronische Infektionen z.B. bei Osteomyelitis, Endokarditis, Zystischer Fibrose oder im Zuge der Katheterisierung (Chatterjee *et al.*, 2014; Kiedrowski and Horswill, 2011; Lister and Horswill, 2014; Parsek and Singh, 2003). Die Biofilmbildung bei *S. aureus* besteht aus fünf Schritten: Anheftung, Vermehrung, Exodus, Reifung und Dispersion (Moormeier *et al.*, 2014). Für die Anheftung auf biotischen Oberflächen nutzt *S. aureus* eine Vielzahl von Zellwand-verankerten Proteinen, die spezifisch für unterschiedliche Matrixkomponenten des Wirts wie z.B. Fibrinogen, Kollagen oder Fibronectin sind. Ein Teil dieser für die Anheftung benötigten Oberflächenproteine gehört zu der Gruppe der *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs), die gleichzeitig Virulenzfaktoren darstellen. Bei der Anheftung auf abiotischen Flächen spielen diese Faktoren jedoch keine wesentliche Rolle. Hier kommt es durch elektrostatische und hydrophobe Interaktionen zur Adhäsion der Bakterienzellen an die Oberfläche. Nach der Anheftungsphase kommt es zur Vermehrung durch Zellteilung. Um die noch jungen Tochterzellen vor Scherkräften zu schützen, stabilisiert *S. aureus* mit Hilfe von Zellwand-verankerten Proteinen, wie z.B. Fibronectin-Bindeproteine, Protein A oder Bap (*biofilm-associated protein*), die Zell-Zell-Interaktion. Anschließend folgt die Exodus-Phase, die durch eine koordinierte Freisetzung der Bakterienzellen etwa 6 h nach Beginn der Vermehrungsphase gekennzeichnet ist. Dieses frühe Dispersions- oder Ausbreitungsereignis geht mit der Bildung von Mikrokolonien einher und führt zur Umstrukturierung des Biofilms, die durch die Degradation von eDNA vermittelt wird. Die Reifung des Biofilms ist durch Zellteilung und die Bildung der Biofilmmatrix gekennzeichnet (Moormeier and Bayles, 2017). Die Biofilmmatrix, welche den Zusammenhalt der Zellen in der Gemeinschaft ermöglicht, besteht bei *S. aureus* u.a. aus Teichonsäuren (Hussain *et al.*, 1993), eDNA und dem Polysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular antigen*) oder PNAG (*polymeric N-acetyl-glucosamine*) (Mack *et al.*, 1996; O’Gara, 2007). Während der Biofilmreifung entstehen metabolisch unterschiedliche Mikrokolonietypen. Diese Diversität könnte der Vorbereitung auf unvorhersehbare Umweltbelastungen dienen und bietet eine schnellere Anpassung bei Nährstoff- oder Sauerstoffmangel. Die Dispersion als letzte Phase während der Biofilmbildung wird durch das Quorum-sensing gesteuert, welches abhängig von der Zelldichte und der Akkumulation von Signalmolekülen ist. Bei *S. aureus* wird die Dispersion über das *auto-inducing peptide* (AIP) als Signalmolekül gesteuert. Nach

Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes werden verschiedene Virulenzfaktoren und Biofilm-assoziierte Gene exprimiert, was letztendlich zur Auflösung des Biofilms führt (Moormeier and Bayles, 2017).

1.4 Methoden der Biofilmanalytik

1.4.1 Plattformen der *in vitro* Biofilmbildung

Bei den Methoden der *in vitro* Biofilmbildung unterscheidet man offene, dynamische und geschlossene, statische Systeme. Zu den offenen, dynamischen Systemen, die oft nicht für Hochdurchsatzanalysen geeignet sind und hohe technische Fertigkeiten fordern, zählen z.B. die Flusszellen bzw. Flusskammern. Hier gibt es zum einen Flusszellen im Großformat, die herausnehmbare Materialstücke (Coupons) enthalten, auf deren Oberfläche die Mikroorganismen adhären. Zum anderen gibt es Flusszellen im Kleinformat für die mikroskopische Beobachtung. Hierbei handelt es sich um dünnwandige, transparente Kammern, die kontinuierlich mit Kulturmedium durchspült werden. Der Vorteil dieser Zellen ist die Möglichkeit der Echtzeitbeobachtung der Biofilme unter dem Mikroskop, jedoch verbunden mit hohen Kosten und vorhandener Expertise. Ein weiteres System sind rotierende Biofilmreaktoren, mit denen man z.B. die Besiedlung von Mikroorganismen auf verschiedensten Materialien als Coupons testen kann. Die Couponhalter werden bestückt, in den Reaktor eingesetzt und es erfolgt ein kontinuierliches Zu- und Abführen des Nährmediums. Durch die Rotation des inneren Zylinders im Reaktor kann die Anheftung der Mikroorganismen unter verschiedensten Flussgeschwindigkeiten analysiert werden.

Zu den geschlossenen, statischen *in vitro* Systemen gehören Mikrotiterplatten (MTP), die einfach in der Handhabung und für Hochdurchsatzanalysen und Screeningverfahren geeignet sind (O'Toole and Kolter, 1998b; O'Toole *et al.*, 1999). Eine weitere Methode und ein Variationsmodell der MTP ist der *Calgary biofilm device*. Hierbei handelt es sich um eine MTP mit einem Deckel, der Zapfen besitzt, die in die Wells der MTP hineinragen. Hier findet die Adhäsion und die Bildung der Biofilme durch die inokulierten Mikroorganismen statt (Ceri *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2006). Die Verwendung von MTP hat viele Vorteile wie die Automatisierbarkeit, Parallelisierung und Kostenreduktion für verwendete Medien. MTP finden in unterschiedlichsten Fragestellungen der Biofilmforschung Anwendung. Sie werden genutzt für die Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit von Mikroorganismen (Djordjevic *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2010) oder für das Screening verschiedenster Antibiotika, Desinfektionsmittel, Chemikalien und Pflanzenextrakte auf antimikrobielle und Anti-Biofilm-Effekte (Amorena *et al.*, 1999; Pitts *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Shakeri *et al.*, 2007; Quave *et al.*, 2008).

1.4.2 Mikroskopische Verfahren in der Biofilmanalytik

Die Erkenntnisse im Gebiet der Biofilmforschung haben sich mit der Etablierung von Methoden zur Untersuchung und Charakterisierung von Biofilmen entwickelt. Unzählige frühere Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biofilme beruhen auf der Rasterelektronenmikroskopie (REM), deren hochauflösende Eigenschaft von großem Vorteil ist. In der Probenaufbereitung für diese Methode nutzt man eine aufsteigende Lösungsmittelreihe zur Dehydrierung der Probe. Diese Dehydrierung ist notwendig, da hydrierte Proben nicht kompatibel mit dem bei der Methode verwendeten Vakuum und dem Laserstrahl sind. Hierbei wird jedoch ein Nachteil der Methode aufgezeigt, denn die harschen Bedingungen bei der Probenvorbehandlung führen zu Artefakten. Weiterhin wird die Zusammensetzung der Probe enorm verändert, wenn man bedenkt, dass die Biofilmmatrix aus bis zu 97 % Wasser bestehen kann (Flemming *et al.*, 2016). Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), eine weitere Methode und die Standardtechnik der Elektronenmikroskopie, bietet eine Auflösung von bis zu 0,1 nm (Bergmans *et al.*, 2005). Die TEM ist eine ausgezeichnete Methode für die Visualisierung von Bakterien mit der umgebenden Biofilmmatrix, jedoch ist auch sie sehr zeitaufwendig und komplex. Die verschiedenen Arten der Elektronenmikroskopie fanden in vielen Studien zur Untersuchung und Charakterisierung von Biofilmen auf medizinischen Geräten und Implantatmaterialien (Raad *et al.*, 1993; Stickler *et al.*, 1998; Abd El-Baky, 2012) und in Humaninfektionen (Nickel and Costerton, 1992; Ferguson and Stolz, 2005) Anwendung. Diese Technologien bieten mit ihrem hohen Auflösungsvermögen und der großen Tiefenschärfe detaillierte Einsichten in die Ultrastruktur der Biofilmbakterien, jedoch sind sie nicht für eine Quantifizierung oder ein Hochdurchsatzscreening geeignet.

In den 1980er Jahren wurde die konfokale Laserscanningmikroskopie (*confocal laser scanning microscopy, CLSM*) entwickelt, die allgemein zur Fluoreszenzmikroskopie zählt und mit der Biofilme von nun an *in situ* untersucht werden können. Bei dieser Methode wird im Vergleich zur REM zwar eine geringere Auflösung erreicht, jedoch kann man die Biofilmmatrix unverändert und intakt betrachten. Durch die Anregung von Elektronen im für die Färbung verwendeten Fluorophor mit einem Laserstrahl wird das emittierte Licht von einem Detektor erfasst. Anschließend werden entsprechende Pixelinformationen erzeugt, die zu einem Bild zusammengefügt werden. Bei dieser Methode werden in vorher definierten Abständen optische Schnitte durch die x-, y- und z-Ebene des zu untersuchenden Objektes gelegt, so dass dreidimensionale Bildrekonstruktionen erstellt werden können.

Eine weitere Methode ist die Epifluoreszenzmikroskopie, die eine etablierte Technik in der Analyse von Biofilmen darstellt (Davies *et al.*, 1998; Djordjevic *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2011; Montañez-Izquierdo *et al.*, 2012; Anastasiadis *et al.*, 2014). Hier werden, wie auch bei der CLSM, Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der untersuchten Objekte eingesetzt. Auch an der BTU Cottbus-Senftenberg wurde für die Multiparameterdiagnostik eine anpassungsfähige und vielseitige Plattform entwickelt,

die auf der vollautomatisierten Fluoreszenzmikroskopie basiert. Die VideoScan-Technologie besteht aus kommerziell erhältlicher Standardhardware und einer selbstentwickelten Software, die einen modularen Aufbau aufweist. Diese Plattform ermöglicht die Analyse von Multiplexassays wie z.B. Mikropartikel-, Tröpfchen-, Zell-basierten Assays und Assays in Lösungen (Frömmel *et al.*, 2013a; Rödiger *et al.*, 2013; Kolenda *et al.*, 2018). So erlaubt die VideoScan-Technologie z.B. unter Nutzung spezieller Bildverarbeitungsfunktionen ein Screening zur Untersuchung der Zytotoxizität und der Adhäsionsrate von Bakterien auf verschiedenen Epithelzelllinien (Frömmel *et al.*, 2013a, 2013b) sowie den Nachweis von Autoantikörpern auf immobilisierten Zellen (Hiemann *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wird die Adaption der VideoScan-Technologie für die Anwendung bei der qualitativen und quantitativen Analyse von Biofilmen beschrieben.

1.4.3 Färbemethoden von Biofilmen

Die Kristallviolett-Färbung ist eine Methode zur Bestimmung der Biomasse von Biofilmen (Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2000). Hierbei kommt es durch den basischen Farbstoff Kristallviolett zur Anfärbung negativ geladener Bakterien und Polysaccharide der EPS (Li *et al.*, 2003). Diese indirekte Färbemethode wird vorwiegend für die Untersuchung der *in vitro* Biofilmbildung genutzt. Als Alternative zum Kristallviolett wird der Farbstoff Safranin verwendet. Für die direkte Anfärbung der adhären-ten Bakterien wird 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) verwendet, welches an AT-reiche Regionen der doppelsträngigen DNA lebender und toter Bakterien bindet (Schwartz *et al.*, 2003). Weitere Farbstoffe sind z.B. 1,9-Dimethyl-Methylenblau (DMMB), spezifisch für die Quantifizierung von *S. aureus*-Biofilmen (Toté *et al.*, 2008), und Fluoresceindiacetat (FDA), ein Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung vitaler Zellen. Eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erlaubt die Anfärbung mit einer Kombination aus den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 9 und Propidiumjodid (PI). Bei der Lebend-/Totfärbung (*LIVE/DEAD staining*) bindet das membrangängige, grün fluoreszierende SYTO 9 an die DNA von toten und lebenden Zellen (Honraet and Nelis, 2006). Der rot fluoreszierende DNA-Farbstoff PI hingegen kann nur in tote Zellen mit geschädigter Membran eindringen (Boulos *et al.*, 1999; Peeters *et al.*, 2008). Der Farbstoff PI verdrängt den Farbstoff SYTO 9 in toten Zellen aufgrund einer stärkeren Affinität zur DNA und löscht damit die SYTO 9 Emission aus (Stocks, 2004).

1.4.4 Methoden der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung im Biofilm

Etablierte Standardmethoden für die Erstellung von Antibiotikaresistenzprofilen sind z.B. die Makro- bzw. Mikrodilutionsmethode oder der Agardiffusionstest (Bauer *et al.*, 1966; Ericsson and Sherris, 1971; Khan *et al.*, 2019), die jedoch nur Aussagen über die Empfindlichkeit von planktonischen Bakterienzellen gegenüber antimikrobiellen Substanzen treffen. Hiermit kann die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) ermittelt werden, die die kleinste Konzentration beschreibt, welche benötigt wird, um einen Mikroorganismus im Wachstum zu hemmen oder abzutöten. Klinische MHK-Grenzwerte

(*Breakpoints*) definieren, ob ein Erreger sensibel, intermediär oder resistent auf eine antimikrobielle Substanz reagiert. Diese Grenzwerte werden über das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) und die international anerkannten Standards des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) vorgegeben und kontrolliert.

Wie bereits beschrieben, sind im Biofilm lebende Bakterien viel resistenter und Antibiotikabehandlungen mit Konzentrationen, die bei planktonischen Bakterien Wirkung zeigen, sind meist nicht erfolgreich. Die Entwicklung von auf Biofilme abgestimmten Antibiotikaempfindlichkeitstests ist von großem Interesse. Eine Methode ist der quantitative Assay mit Nutzung von MTP und Kristallviolett zur Anfärbung der Biofilme. Hierbei werden Biofilme in MTPs generiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Testsubstanzen inkubiert. Für die Quantifizierung der Biofilme werden diese nach Entfernen der Flüssigkeit aus den Wells der MTPs gefolgt von einem optionalen Waschschrift mit Kristallviolett gefärbt. Anschließend wird das an den Biofilm gebundene Kristallviolett mit Ethanol herausgelöst und die Absorption mittels Spektrophotometer bestimmt. Umso mehr Farbstoff von dem im Well vorhandenen Biofilm gebunden wurde, umso größer ist die Absorption.

Eine weitere Methode ist das *Calgary biofilm device* (Ceri *et al.*, 1999) oder der MBEC Assay® (Fa. Innovotech) bei dem, wie bereits beschrieben, die Biofilmbildung an den Zapfen der MTP stattfindet. Der Deckel der MTP mit Zapfen wird auf eine Platte mit inokulierten Bakterien gesetzt. Nach der Bildung der Biofilme wird der Deckel in eine frische MTP überführt, welche die zu testenden Agenzien in unterschiedlichen Konzentrationen enthält. Nach der Inkubation werden die Deckel gewaschen und in eine Platte mit Antibiotika-freiem Medium überführt. Die Biofilme werden mittels Zentrifugation oder Ultraschall von den Zapfen gelöst und es wird entweder die optische Dichte (OD) gemessen, um eine Biofilmhemmung durch die antimikrobiellen Stoffe zu ermitteln, oder die abgelösten Bakterien werden ausplattiert, um die Lebendzellzahl zu bestimmen (Harrison *et al.*, 2010; Macia *et al.*, 2014).

1.4.5 Quantifizierung von Biofilmen auf Oberflächen

Der Goldstandard, um eine Quantifizierung von adhärennten Bakterienzellen auf einer Oberfläche vorzunehmen, ist die Kulturplattenmethode mit anschließender Keimzahlbestimmung. Hierfür wird der Biofilm mittels Ultraschall, Abkratzen oder Vortexen von der Oberfläche abgelöst. Die resuspendierten und somit verteilten Biofilmbakterien werden anschließend auf Nährmedien ausplattiert, inkubiert und es werden die koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) gezählt (Hannig *et al.*, 2007). So kann man zwar sehr präzise die Anzahl der lebenden Bakterienzellen ermitteln, jedoch weist diese Methode viele Nachteile auf. Sie ist zeitintensiv und selektiert bestimmte Bakterienspezies. Zudem können lebende, aber nicht kultivierbare (*viable but not culturable*, VBNC) Mikroorganismen nicht erfasst werden und der Phänotyp Biofilm kann ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Einleitung

Diese Methode stellt noch immer den Goldstandard dar, zeigt mit ihren Nachteilen aber die Notwendigkeit einer neuen Methode für die Visualisierung, Quantifizierung und Identifizierung von Bakterien in Biofilmen auf. Die Richtlinien für die Diagnostik von Biofilm-assoziierten Infektionen sehen die alleinige Verwendung dieser Methode als problematisch an (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Weiterhin wird gefordert, dass standardisierte Antibiogramme für Biofilme etabliert werden, da bisherige Antibiogramme nur eine Aussage über die Empfindlichkeit verschiedener Antibiotika auf planktonische Bakterien treffen können. Die Routinediagnostik von Biofilmen verlangt nach einer bildbasierten Methode mit mikroskopischer Detektion von in einer Matrix eingebetteten mikrobiellen Aggregaten (Høiby *et al.*, 2015).

1.5 Zielstellung

Die Arbeit teilt sich in drei große Aufgabenbereiche auf, wobei jeder dieser Bereiche die Entwicklung von Fluoreszenzmikroskopie-basierenden Methoden für die Analyse von Biofilmen und deren praktische Anwendung zur Untersuchung einer biologischen Fragestellung beinhaltet.

Erstes Ziel meiner Arbeit war die Etablierung einer bildbasierten Screeningmethode zur Untersuchung der bakteriellen Biofilmbildung. Dabei sollte zum einen eine qualitative Analyse der Biofilme ermöglicht werden, die eine Aussage über das Vorhandensein eines Biofilms erlaubt. Zum anderen sollte eine quantitative Analyseverfahren entwickelt werden, mit der man die Stärke der Biofilmbildung bestimmen kann. In Anwendung der neu etablierten Methode sollte die Fähigkeit von kommensalen und pathogenen *E. coli*-Isolaten zur Biofilmbildung bestimmt werden. Es sollte überprüft werden, ob die Biofilmbildung ein Charakteristikum für einen bestimmten *E. coli*-Pathotypen ist oder eine allgemeine Eigenschaft von Bakterien darstellt. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Biofilm-assoziierten Faktoren mit der Biofilmbildung der *E. coli*-Isolate besteht. So sollten Aussagen über den Zusammenhang des Auftretens eines bestimmten genetischen Repertoires mit der Biofilmbildung getroffen werden. Hierbei wurde untersucht, ob die in nicht-pathogenen *E. coli* bekannten und für die Biofilmbildung kritischen Faktoren mit der Biofilmbildung von pathogenen *E. coli* assoziiert sind.

Der zweite Abschnitt der Arbeit befasste sich mit der Entwicklung einer Methode für die Quantifizierung von Bakterien auf unterschiedlichen Oberflächen. Hiermit sollten Aussagen über die Anzahl adhärenter Bakterien, die von Bakterien besiedelte Fläche und die maximal gebildete Biofilmdicke ermöglicht werden. Für die Anwendung der etablierten Methode sollten, in Zusammenarbeit mit der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, die Materialien Glas, Stahl und Titan mit *E. coli* in einer Flusskammer besiedelt werden, um mögliche Unterschiede in der Besiedlungsfähigkeit der Materialien und der Biofilmdicke zu identifizieren.

Der dritte und letzte Teil der Arbeit befasste sich mit der Entwicklung einer Methode zur Antibiotikaempfindlichkeitstestung von Bakterien im Biofilm. Hier sollte der Einfluss von Antibiotika auf die Biofilmbildung von MSSA- und MRSA-Isolaten untersucht und mit zuvor ermittelten MHK-Werten verglichen werden. Weiterhin sollte die antimikrobielle Wirkung von Antiinfektiva auf unterschiedliche Reifestufen des Biofilms untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Tab. 2: Humane, klinische *E. coli*- und Kontrollisolate* für die Charakterisierung hinsichtlich Biofilm-assoziiertes Gene, Curli- und Celluloseproduktion, Motilität und Biofilmbildung

Gruppe	Anzahl	Herkunft
Human fäkale <i>E. coli</i> (HFEC)	24	Prof. L. K. Nolan, Iowa State University, USA
Human uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	24	Prof. L. K. Nolan, Iowa State University, USA
Human enterotoxische <i>E. coli</i> (EPEC)	24	Dr. D. Meissner, Hameln Labor Hildesheim, Hameln
Human atypisch enteropathogene <i>E. coli</i> (aEPEC)	24	Dr. D. Meissner, Hameln Labor Hildesheim, Hameln
Human enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	24	Dr. D. Meissner, Hameln Labor Hildesheim, Hameln
Human Sepsis-assoziierte <i>E. coli</i> (SAEC)	24	Dr. T. Juretzek, Carl-Thiem-Klinikum gGmbH, Cottbus
Human Morbus Crohn-assoziierte <i>E. coli</i> (CAEC)	19	Dr. A. Swidsinski, Charité Humboldt Universität, Berlin
Aviär fäkale <i>E. coli</i> (AFEC)	24	Prof. L. K. Nolan, Iowa State University, USA

* Alle Isolate gehören zur Stammsammlung von Prof. Dr. Peter Schierack.

Tab. 3: Bakterienisolate* als Kontrollen für verschiedenste Assays und Überprüfung der Biofilmbildung

Interne Stamm-Nr.	Bakterium	Herkunft
1	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN)	Mutaflor®; Ardeypharm, Herdecke; Nissle, 1918
6	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	nicht bekannt
6101	<i>E. coli</i> K-12 MG1655 F'tet <i>traD</i>	Dr. J.-M. Ghigo, Pasteur Institut Paris, Frankreich
-	<i>E. coli</i> K-12 TG1 DSM-6056	Leibniz Institut DSMZ GmbH, Braunschweig
4561	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mikrobiologie, Klinikum Niederlausitz GmbH, Lauchhammer
6097	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO I)	Prof. G. Döring, Eberhard-Karls Universität, Tübingen
7107	<i>Candida tropicalis</i>	Mikrobiologie, Klinikum Niederlausitz GmbH, Lauchhammer
7104	<i>Candida albicans</i>	Mikrobiologie, Klinikum Niederlausitz GmbH, Lauchhammer
6348	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Dr. T. Juretzek, Carl-Thiem-Klinikum gGmbH, Cottbus
6095	<i>Staphylococcus aureus</i>	Prof. G. Döring, Eberhard-Karls Universität, Tübingen
-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Dr. T. Juretzek, Carl-Thiem-Klinikum gGmbH, Cottbus
6982	Methicillin-sensitiver <i>S. aureus</i>	Mikrobiologie, Klinikum Niederlausitz GmbH, Lauchhammer
3281	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	Mikrobiologie, Klinikum Niederlausitz GmbH, Lauchhammer

* Alle Isolate gehören zur Stammsammlung von Prof. Dr. Peter Schierack.

2.2 Nährmedien und -agar

Alle Nährmedien in Tabelle 4 wurden nach der Herstellung in ddH₂O und Einstellung des pH-Wertes bei 121°C für 20 min im Autoklaven sterilisiert. Empfindliche Zusätze wie Glukose oder Farbstoffe wurden im Nachhinein unter der Sterilbank hinzugegeben. Die Zusammensetzung der Medien ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt und bezieht sich auf 1 l Gesamtvolumen.

Tab. 4: Zusammensetzung verwendeter Nährmedien und -agar

Flüssigmedium	Zusammensetzung
LB	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,2
TSB	17 g/l Trypton, 3 g/l Sojamehlpepton, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l K ₂ HPO ₄ , 2,5 g/l D-Glukose, pH 7,3
BHI	37 g/l Brain Heart Infusion-Medium als Fertigpulver, pH 7,4 (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland)
M63	2 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 13,6 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,5 mg/l FeSO ₄ x 7H ₂ O, pH 7, nach dem Autoklavieren 50 ml einer 20 %-igen Glukosestocklösung und 1 ml einer 1 M MgSO ₄ -Stocklösung dazu
M9	5x M9-Salzlösung: 64 g/l Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O, 15 g/l KH ₂ PO ₄ , 2,5 g/l NaCl, 5 g/l NH ₄ Cl, nach dem Autoklavieren 200 ml sterile M9-Salzlösung mit 2 ml einer 1M MgSO ₄ -Stocklösung, 4g Glukose, 1 mM Thiamin und 20 mg/l Prolin mischen und auf 1l mit sterilem ddH ₂ O auffüllen

Material und Methoden

Festmedium	Zusammensetzung
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar pH 7,2
LB-Weichagar	LB-Medium mit 2,5 g/l Agar-Agar pH 7,2
M9-Agar	M9-Medium mit 15 g/l Agar-Agar
CHROMagar™ Orientation	33 g/l CHROMagar™ Orientation als Fertigpulver (Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland)
CHROM-MRSA-Agar	Gebrauchsfertige Agarplatten (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
COS-Agar	Gebrauchsfertige Agarplatten (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
Kongorotagar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 15g/l Agar-Agar, nach dem Autoklavieren 40 µg/ml Kongorot und 20 µg/ml Brilliant Blau R250, pH 7,2
Calcofluoragar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar-Agar, nach dem Autoklavieren 200 µg/ml Calcofluor, pH 7,2

2.3 Puffer und Lösungen

Die in Tabelle 5 aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in ddH₂O hergestellt. Stammlösungen, PBS und NaCl wurden bei 121°C für 20 min im Autoklaven sterilisiert. Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt und bezieht sich auf 1 l Gesamtvolumen.

Tab. 5: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösung	Zusammensetzung
1 x PBS	8 g/l NaCl, 1,43 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,2 g/l KCl, pH 7,4
1 x TBE	10,8 g/l Tris, 5,5 g/l Borsäure, 0,75 g/l EDTA, pH 7,0
1 x PBST	0,02 % Tween20 in 1 x PBS
6 x DNA-Ladepuffer	1 mM TrisHCl, 50 % Glycerin, 100 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol
0,9 % NaCl	9 g NaCl
95 % Ethanol	950 ml EtOH
EDTA-Stammlösung	0,5 M, pH 8,0
TrisHCl-Stammlösung	10 mM, pH 8,0
Referenzbead-Lösung	2,5 ml 1 x PBS-T, 0,5 ml A310 Beads, 7,5 ml ddH ₂ O (Gesamtvolumen 10 ml)

2.4 Farbstoffe

Tab. 6: Verwendete Farbstoffe

Farbstoff	Firma
Brilliant Blau R250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calcofluor	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kongorot	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumjodid (PI)	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
SYTO 9	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.5 Verwendete Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika (lyophilisiert) wurden in sterilem ddH₂O gelöst und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 7: Verwendete Antibiotika

Substanz	Stocklösung	Bezugsquelle
Tetrazyklin	20 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	100 mg/ml	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Vancomycin	5 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tigecyclin	1 mg/ml	JK-Scientific, Lommel, Belgien
Rifampicin	10 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

2.6 Oligonukleotide

Für die Gene *fimH*, *agn43*, *papC* und *fliC* wurden die Primersequenzen aus zuvor veröffentlichten Studien entnommen und mit BLAST verifiziert. Für die Gene *bcsA* und *csgA* wurden Nukleotidsequenzen aus hochkonservierten Genombereichen mit Hilfe der Sequenzdatenbank (GenBank, NCBI) ausgewählt und mittels BLAST überprüft. Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen. Sie wurden in sterilem ddH₂O gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl (100 μM) eingestellt.

Tab. 8: Verwendete Primerpaare für die Detektion Biofilm-assoziiierter Gene in *E. coli*

Gen	Primersequenz (5'-3') (f: forward, r: reverse)	Produkt (bp)	Quelle
<i>agn43/flu</i>	f GGGTAAAGCTGATAATGTCG r GTTGCTGACAGTGAGTGTGC	508	(Ulett <i>et al.</i> , 2007)
<i>bcsA</i>	f GCTTCTCGGCGCTAATGTTG r GAGGTATAGCCACGACGGTG	826	(Schiebel <i>et al.</i> , 2017)
<i>papC</i>	f TGATATCACGCAGTCAGTAGC r CCGGCCATATTCACATAAC	501	(Janssen <i>et al.</i> , 2001)
<i>csgA</i>	f GCAATCGTATTCTCCGGTAG r GATGAGCGGTCGCGTTGTTA	418	(Schiebel <i>et al.</i> , 2017)
<i>fimH</i>	f TGCAGAACGGATAAGCCGTGG r GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	506	(Johnson and Stell, 2000)
<i>fliC</i>	f ATGGCACAAGTCATTAATACCCAAC r CTAACCTGCAGCAGAGACA	1497	(Fields <i>et al.</i> , 1997)

2.7 Chemikalien

Tab. 9: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
10 x BioTherm Puffer ohne MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland
100 bp DNA-Leiter (gebrauchsfertig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Agarose NEEO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
BioTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-Glukose	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland

Material und Methoden

EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eisensulfat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	VWR GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Magnesiumsulfat	AppliChem GmbH, Gatersleben, Deutschland
Magnesiumchlorid	Rapidozym GmbH, Berlin, Germany
Microbeads (DAPI, A310 Coumarin/Rhodamin)	PolyAn GmbH, Berlin, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sojamehlpepton	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.8 Geräte

Tab. 10: Verwendete Geräte

Gerät	Bezugsquelle
96-Well Plattenreader	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
Autoklav	Systec GmbH, Linden
Biomek 2000 Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Brutschrank C150	Binder GmbH, Tuttlingen
Electrophoresis Power supply MP-300V	Major Science, USA
Feinwaage	Atilon Satorius, Deutschland
Geldokumentationssystem BioDoc Analyzer	Biometra, Deutschland
Inkubator UFB 500	Memmert, Deutschland
Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH
Mikrozentrifuge	Carl Roth
Minitron Rührgerät	Infors AG, Schweiz
NewView 5022 (WLSI)	Zygo, USA
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten, Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Seven Easy pH-Meter	Mettler Toledo, Schweiz
Sterilbank Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	Atilon Satorius, Deutschland
Zentrifuge	ThermoFisher
Mikroskopiekomponenten	
Olympus PlanApoN 1,25 x/0,04 (VideoScan)	Olympus Corporation, Japan
Olympus UPlanSApo 4 x/0,164 (VideoScan)	Olympus Corporation, Japan
Olympus UPlanFLN 4x/0,13 (AKLIDES®)	Olympus Corporation, Japan
Olympus LUCPlanFLN 20x/0,45 (AKLIDES®)	Olympus Corporation, Japan
Fluoreszenzmikroskop IX-81	Olympus Corporation, Japan
Kamera	KAPPA opto-electronics GmbH, Deutschland
Kondensator	Olympus Corporation, Japan
SYTO 9 Filter: Anregungsfilter 422/45 nm; dichroitischer Spiegel 482 nm; Emissionsfilter 489/42 nm	Semrock, USA
PI Filter: Anregungsfilter 531/40 nm; dichroitischer Spiegel 562 nm; Emissionsfilter 593/40 nm	Semrock, USA

Material und Methoden

Objektträgertisch Scan Stage IM 120 x 100	Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Deutschland
Xenonlampe (75 W)	Olympus Corporation, Japan
Halogenlampe (12 V, 100 W)	Olympus Corporation, Japan
LED	CoolLED, UK

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tab. 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Bezugsquelle
Coupons aus Glasmaterial	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalküvetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Falcontubes (15 ml, 50 ml)	Biochrom AG, Deutschland
Filterpipettenspitzen für PCR	Ratiolab, Deutschland
Implantat-Stahlcoupons	Königsee Implantat GmbH, Allendorf, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Ratiolab, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,65 ml, 1,5 ml, 5 ml)	Carl Roth GmbH Co. KG, Deutschland
Serologische Pipetten	Biochrom AG, Deutschland
Titancoupons	Königsee Implantat GmbH, Allendorf, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.10 Mikrobiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien

Für die Kultivierung der Bakterien wurden diese aus der entsprechenden Kryokultur (-80°C) auf CHROM-Agar (*E. coli*), COS-Agar (MSSA) und CHROM-MRSA-Agar (MRSA) ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für den Stamm *E. coli* MG1655 F'tet *traD* (*E. coli* MG1655 F') wurde Tetrazyklin zur Selektion eingesetzt und in entsprechender Konzentration dem Nährmedium (Endkonzentration 7,5 µg/ml) zugefügt. Die Agarplatten wurden maximal zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt.

Für die Herstellung einer Übernachtskultur (ÜNK) wurde mit Hilfe eines Zahnstochers eine Bakterienkolonie von der Agarplatte entnommen und in ein Eppendorf-Tube mit LB-Medium inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm ÜN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD_{600 nm} der Bakterien bestimmt, die abhängig vom Bakterienstamm bei ungefähr 1,5 lag. Eine OD_{600 nm} von 1 entspricht in etwa 3 x 10⁸ koloniebildenden Einheiten pro ml (3 x 10⁸ CFU/ml).

Zur langfristigen Aufbewahrung der Bakterien in der Stammsammlung wurde eine ÜNK des entsprechenden Stammes in 700 µl LB-Medium hergestellt. Von der Bakterienkultur wurden 600 µl mit 150 µl 80 %-igem Glycerin vermischt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.10.2 Kongorotagarassay

Zum Nachweis der Synthese von Curli-Fimbrien und Cellulose wurde der Farbstoff Kongorot verwendet, welcher an diese Matrixkomponenten bindet (Hammar *et al.*, 1995; Römling *et al.*, 2000). Hierfür

wurden die *E. coli*-Isolate auf LB-Agarplatten mit Kongorot ausgestrichen und für 24 h bei 37°C bzw. 48 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten hinsichtlich der Koloniemorphologie beurteilt und in bestimmte Morphotypen nach folgender Klassifikation eingeteilt: der *red, dry and rough* (rdar) Morphotyp produziert Curli-Fimbrien und Cellulose; der *brown, dry and rough* (bdar) Morphotyp produziert Curli-Fimbrien; der *smooth and white* (saw) Morphotyp produziert weder Curli-Fimbrien noch Cellulose (Römling *et al.*, 1998a, 2000). Jedes Isolat wurde in drei unabhängigen Experimenten auf Curli- und Celluloseproduktion überprüft. Der Curli und Cellulose produzierende Stamm *E. coli* Nissle (EcN) diente als Positivkontrolle (Grozdanov *et al.*, 2004).

2.10.3 Calcofluoragarassay

Zur Überprüfung der Celluloseproduktion in Bakterien und als eine Bestätigung der korrekten Beurteilung der Morphotypen mit Hilfe des Kongorotagarassays wurde der fluoreszente Farbstoff Calcofluor verwendet. Dieser Farbstoff bindet an β -[1,3]- und β -[1,4]-D-Glukane und wird routinemäßig verwendet, um die Celluloseproduktion von Bakterien auf Agarplatten oder mit der Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen (Spiers *et al.*, 2003; Zogaj *et al.*, 2001b, 2003). Hierzu wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Calcofluor ausgestrichen und diese für 24 h bei 37°C bzw. 48 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Isolate auf Celluloseproduktion beurteilt, indem die Kolonien auf den Agarplatten unter UV-Licht (366 nm) betrachtet wurden. Eine Fluoreszenz zeigt eine Synthese des Matrixbestandteils Cellulose an; bei nicht-fluoreszierenden Kolonien liegt keine Celluloseproduktion vor. Jedes Isolat wurde in drei unabhängigen Experimenten auf Celluloseproduktion überprüft. Der Cellulose produzierende Stamm EcN diente als Positivkontrolle (Grozdanov *et al.*, 2004).

2.10.4 Motilitätsassay

Die Motilität von Bakterien, auch als *swimming motility* bezeichnet, wird über die Flagellen der Bakterien vermittelt. Um die Motilität der Bakterien zu bestimmen, wurden ÜNK der zu untersuchenden Isolate in 1 ml LB-Medium hergestellt. Mit einem sterilen Zahnstocher, der zuvor kurz in die ÜNK getaucht wurde, wurden die Bakterienkulturen in die Mitte des LB-Weichagars eingebracht. Die Platten wurden anschließend bei 37°C ÜN inkubiert. Eine positive Motilität wurde durch ein diffuses Wachstum des Bakterienisolats im Agar ausgehend von der Inokulationsstelle mit einem Durchmesser der Wachstumszone > 5 mm angezeigt. Ein nicht-motiler Bakterienstamm wurde durch ein begrenztes Wachstum an der Inokulationsstelle mit einem Durchmesser der Wachstumszone \leq 5 mm nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente der motile Stamm *E. coli* K12 MG1655.

2.10.5 Biofilmbildung

Die Biofilmbildung wurde nach einem modifizierten Protokoll von O'Toole und Kolter (O'Toole and Kolter, 1998b) durchgeführt. Dazu wurden ÜNK der zu untersuchenden Isolate in 1 ml LB-Medium hergestellt. Am nächsten Tag wurde die OD_{600 nm} gemessen und auf 1 eingestellt (OD_{600 nm} 1 ~ 3 x 10⁸ CFU/ml). Anschließend wurden die Kulturen im entsprechenden Medium 1:100 verdünnt. Für die Biofilmbildung wurden die Medien LB, TSB, BHI und M63 untersucht. Es wurden 100 µl der verdünnten Kultur in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert und diese für 48 h bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm *E. coli* MG1655 F'. Medium ohne Bakterien wurde als Negativkontrolle verwendet. Alle äußeren Wells an den Rändern der 96-Well Platte wurden ausgelassen, da es bei der anschließenden Inkubation mit 37°C zur Evaporation des Mediums kam („Randeffekt“). Diese Wells wurden dafür mit ddH₂O gefüllt. Jedes Isolat wurde in den Nährmedien LB, TBS, BHI und M63 als Triplikat in drei unabhängigen Experimenten getestet.

2.10.6 Biofilmbildung für die Materialanalyse

Diese Arbeiten wurden von der BAM durchgeführt. Als Biofilmbildner wurde *E. coli* TG1 verwendet. Eine Kolonie einer M9-Agarplatte wurde verwendet, um *E. coli* ÜN in 20 ml LB-Medium bei 37°C und 120 rpm zu kultivieren. Anschließend wurden 3 ml Bakteriensuspension für 2 min bei 5000 x g zentrifugiert und im gleichen Volumen M9-Medium resuspendiert. Nach der Messung der OD_{600 nm} wurde die Suspension mit M9-Medium auf eine OD_{600 nm} von 0,005 verdünnt. Die Biofilmbildung erfolgte in einem von der BAM entwickelten Flusskammersystem (Menzel *et al.*, 2016). Die Flusskammern bzw. -zellen enthielten sogenannte Coupons (Materialstücke wie z.B. Glas oder Metall) und wurden mit 200 ml frisch zubereiteter Bakteriensuspension (OD_{600 nm} von 0,005) inokuliert. Nach einer ersten Sedimentationsphase von 1 h wurde alle 15 min 4 ml frisches M9-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 18 h bei 37°C wurden die kolonisierten Coupons entfernt und mit steriler 1 x PBS-Lösung gewaschen. Nach der Fixierung der anhaftenden Bakterien mit 3,7 % Formaldehyd in 1 x PBS für 2 h bei 4°C wurden die Coupons mit sterilem ddH₂O gespült, für 30 min luftgetrocknet und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.7 Bestimmung der MHK

Die MHK-Bestimmung wurde mit Hilfe des VITEK®2 im Institut für Klinische Chemie, Labordiagnostik und Mikrobiologie der Klinikum Niederlausitz GmbH bestimmt. Das Prinzip des VITEK®2 beruht auf der Mikrodilutionsmethode. Die Bakterien wurden von der Agarplatte entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung auf einen McFarland von 0,5-0,63 verdünnt, um ein standardisiertes Inokulum zu erhalten. Danach wurden die gerätespezifischen Kartuschen, die bereits Antibiotika enthalten, mit der Bakterienverdünnung vom Gerät befüllt und inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine automatische Trübungsmessung. Anhand der Messergebnisse wurde ein Resistenzprofil erstellt. Für

Staphylokokken erfolgte die Testung 25 unterschiedlicher Antibiotika bzw. Antibiotikakombinationen, ein Cefoxitin-Screen und die Überprüfung der induzierbaren Clindamycinresistenz.

2.10.8 Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit in Biofilmen

Für die Untersuchung des Effekts der Antibiotika auf die Biofilmbildung wurden die MSSA- und MRSA-Biofilme zunächst, wie beschrieben (2.10.5 Biofilmbildung), in BHI-Medium vorbereitet und zeitgleich Antibiotika in einer geometrischen Konzentrationsreihe dazugegeben. Für die Untersuchung des Effekts der Antibiotika auf unterschiedliche Reifestufen von Biofilmen (4 h, 8 h, 16 h, 24 h) wurden diese zunächst für die jeweilige Zeit bei 37°C inkubiert und anschließend mit Antibiotika versetzt. Alle Platten wurden nach Applikation der Antibiotika für weitere 24 h bei 37°C inkubiert und mit der Lebend-/Totfärbung gefärbt.

2.11 Färbemethoden

2.11.1 Kristallviolett färbung

Der basische Farbstoff Kristallviolett bindet an negativ geladene Oberflächenmoleküle und Polysaccharide der Biofilmmatrix (Li *et al.*, 2003). Da mit diesem Farbstoff sowohl lebende und tote Zellen, als auch Matrixbestandteile angefärbt werden, kann der Kristallviolettassay zur Bestimmung der Biomasse eines Biofilms genutzt werden. Die Färbung wurde nach dem Protokoll von Christensen *et al.* durchgeführt (Christensen *et al.*, 1985). Die Überstände in den Wells der 96-Well Platte wurden vorsichtig abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 100 µl ddH₂O, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Nach der Färbung mit 100 µl einer 0,1 %-igen Kristallviolettlösung für 10 min erfolgten zwei weitere Waschschriffe. Um den an den Biofilm gebundenen Farbstoff zu extrahieren, erfolgte eine Inkubation mit 100 µl 95 %-igem Ethanol für 10 min. Die Entfärbelösung wurde in eine frische 96-Well Platte transferiert, um schließlich deren Absorption bei 570 nm (OD_{570 nm}) mit einem 96-Well Plattenreader zu ermitteln. Jedes Isolat wurde in LB-Medium als Triplikat in drei unabhängigen Experimenten getestet. Die Stärke der Biofilmbildung wurde mit Hilfe der Klassifikation von Stepanović *et al.* ermittelt (Stepanović *et al.*, 2000). Basierend auf dem Mittelwert der gemessenen Absorption wurden die Bakterienisolate in vier Kategorien eingeteilt: kein Biofilmbildner, schwacher, moderater und starker Biofilmbildner. Der cut-off Wert (OD_c) ist hierbei definiert als der Wert, der drei Standardabweichungen über der mittleren OD_{570 nm} der Negativkontrolle liegt. So ergibt sich für die Klassifikation folgende Einteilung: OD ≤ OD_c: kein Biofilmbildner, OD_c < OD ≤ 2 x OD_c: schwacher Biofilmbildner, 2 x OD_c < OD ≤ 4 x OD_c: moderater Biofilmbildner, 4 x OD_c < OD: starker Biofilmbildner.

2.11.2 SYTO 9-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 (Excitation/Emission: 485 nm/498 nm) bindet durch passive Diffusion über die Zellmembran an die DNA und RNA lebender und toter Bakterienzellen (Boulos *et al.*, 1999).

Material und Methoden

Ein wesentlicher Anteil der Biofilmmatrix ist extrazelluläre DNA (Whitchurch *et al.*, 2002), so dass SYTO 9 zur Quantifizierung der Biofilmbiomasse genutzt werden kann. Für die Färbung der Biofilme wurden die Überstände in den Wells der 96-Well Platte vorsichtig abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 100 µl 0,9 %-igem NaCl, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Danach erfolgte ein Färbeschrift mit 50 µl des grün fluoreszierenden DNA-Farbstoffs SYTO 9 (Endkonzentration 5 µM in 0,9 % NaCl). Nach der Inkubation im Dunkeln für 10 min wurden die Wells der 96-Well Platten erneut mit 100 µl 0,9 % NaCl gewaschen und mit 100 µl 0,9 % NaCl befüllt. In jedes Well mit potentiell Biofilm wurden 50 µl DAPI-Beads (1:10.000 in ddH₂O) für die automatisierte Fokussierung pipettiert. Weiterhin wurden in den Wells B1-D1 10 µl Referenzbeads mit 100 µl 0,9 % NaCl (Rhodamin-/Coumarin-markierte Beads) und in die Wells E1-G1 100 µl 0,9 % NaCl als Leerwert pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit der VideoScan-Technologie analysiert.

2.11.3 Lebend-/Totfärbung

Die Lebend-/Totfärbung dient der fluoreszenzmikroskopischen Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Während der grün fluoreszierende Farbstoff SYTO 9 an die DNA und RNA aller Zellen bindet, kann der rot fluoreszierende Farbstoff PI (Excitation/Emission: 535 nm/617 nm) nur in tote Zellen mit geschädigter Membran eindringen (Boulos *et al.*, 1999; Peeters *et al.*, 2008). Der Farbstoff PI verdrängt den Farbstoff SYTO 9 in toten Zellen aufgrund einer stärkeren Affinität zu den Nukleinsäuren und löscht damit die SYTO 9 Emission aus (Stocks, 2004). Für die Färbung der Biofilme wurden die Überstände in den Wells der 96-Well Platte vorsichtig abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 100 µl 0,9 %-igem NaCl, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Danach erfolgte ein Färbeschrift mit 50 µl der Farbstoffmischung aus SYTO 9 (Endkonzentration 5 µM in 0,9 % NaCl) und PI (Endkonzentration 270 µM in 0,9 % NaCl). Nach der Inkubation im Dunkeln für 10 min wurden die 96-Well Platten erneut mit 100 µl 0,9 % NaCl und mit 100 µl 0,9 % NaCl befüllt. In jedes Well mit potentiell Biofilm wurden 50 µl DAPI-Beads (1:10.000 in ddH₂O) für die automatisierte Fokussierung pipettiert. Weiterhin wurden in die Wells B1-D1 10 µl Referenzbeads mit 100 µl 0,9 % NaCl (Rhodamin-/Coumarin-markierte Beads) und in die Wells E1-G1 100 µl 0,9 % NaCl als Leerwert pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit der VideoScan-Technologie analysiert.

2.11.4 Propidiumjodidfärbung

Die von der BAM besiedelten Coupons wurden an der BTU-Cottbus-Senftenberg mit PI (Endkonzentration 270 µM in 0,9 % NaCl) für 10 min im Dunkeln gefärbt, mit 0,9 % NaCl gewaschen, getrocknet und bis zur mikroskopischen Analyse im Dunkeln gelagert.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Herstellung von Bakterienlysaten zur Gewinnung der Gesamt-DNA

Für die Herstellung der Lysate wurden ÜNK der Bakterienisolate in 1 ml LB-Medium hergestellt. Die ÜNK wurden bei 4°C und 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl ddH₂O resuspendiert. Anschließend folgte die Lyse der Bakterien bei einer Inkubation für 10 min bei 99°C im Heizblock. Nach einer weiteren Inkubation der Lysate für 15 min auf Eis wurden diese erneut bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die DNA enthaltenden Überstände wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.12.2 Polymerasekettenreaktion

Für den Nachweis von Biofilm-assoziierten Genen in den *E. coli*-Isolaten wurde eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) angewendet. Als Templat wurden bakterielle Hitzelysate verwendet. Bei jeder durchgeführten PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle (ddH₂O) mitgeführt. Die PCR wurde für jedes Gen und jedes Isolat zwei Mal durchgeführt. Aufgrund der großen Probenmenge bei dem Screening der 187 *E. coli*-Isolate wurde der automatisierte Pipettierroboter Biomek 2000 für das Pipettieren der PCR-Ansätze verwendet. Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen (Endkonzentration in Klammern): 1,5 µl 10 x PCR Puffer (1 x), 1,2 µl 50 mM MgCl₂ (4 mM), 0,3 µl 10 mM dNTPs (0,2 mM), 0,6 µl 10 pM Primer (f) (0,4 µM), 0,6 µl 10 pM Primer (r) (0,4 µM), 0,1 µl 5 U BioTherm™ Taq DNA-Polymerase (0,5 U), 1µl DNA enthaltendes Bakterienlysat, 9,7 µl ddH₂O.

Die PCR erfolgte im Eppendorf Cycler mit folgendem Programm: 95°C für 3 min, 30 Zyklen 94°C für 30 sek (Denaturierung), 60°C für 30 sek (Annealing) und 72°C für 1 min (Elongation), 72°C für 5 min.

2.12.3 Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Größenauftrennung von amplifizierten DNA-Fragmenten nach der PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1,5 %-ige Agarosegele mit 1 x TBE-Puffer hergestellt. Zum Beladen des Gels wurden 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl des 6 x Ladepuffers gemischt und auf das Gel aufgetragen. Für die Größenbestimmung wurde der 100 bp Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 45 min. Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt und das Gel mittels UV-Licht ausgewertet.

2.13 Materialanalyse

2.13.1 Materialien/Coupons

Diese Arbeiten wurden von der BAM durchgeführt. Coupons aus Glasmaterial wurden von Hand auf eine Größe von 37 x 13 x 1 mm zugeschnitten. Implantatstahlcoupons und Titancoupons im Format

37 x 13 x 1 mm wurden bereits in entsprechender Größe gekauft. Nach einem Waschschrift in Waschmittellösung wurden die Coupons 20 min in 70 %-igem Ethanol desinfiziert, luftgetrocknet und aseptisch in die Strömungskammern eingebracht.

2.13.2 Oberflächentopographie

Diese Arbeiten wurden von der BAM durchgeführt. Um die Oberfläche von Stahl und Titan zu charakterisieren, wurden die Materialien mit Hilfe der Weißlicht-Scanning-Interferometrie (WLSI) untersucht. Dieses Verfahren stellt eine schnelle und berührungslose Oberflächentexturmessung dar. Mit dem NewView 5022 und einer optischen Gesamtvergrößerung von 1000 wurde ein 3D-Oberflächenprofil der Materialien erstellt (Messbereich 140 µm x 100 µm, laterale, beugungsbegrenzte Auflösung ca. 0,6 µm).

2.14 Mikroskopische Methoden

2.14.1 VideoScan-Fluoreszenzmikroskopie

Die auf vollautomatischer Fluoreszenzmikroskopie basierende VideoScan-Technologie ist eine vielseitige Plattform und ermöglicht die Analyse fluoreszenter Objekte. Sie wurde an der Hochschule Lausitz in Kooperation mit Industriepartnern entwickelt. Das motorisierte, inverse Fluoreszenzmikroskop besteht aus handelsüblichen Hardwarekomponenten und einer Software, welche innerhalb der Arbeitsgruppe selbst entwickelt wird. Die Bilder werden durch eine automatisierte Fokussierung der Kamera aufgenommen und mit Hilfe modernster, digitaler Bildverarbeitungstechniken verarbeitet. Diese Technologie ermöglicht die Analyse von Multiplex-Assays wie Mikropartikel-, Droplet-, zellbasierten und Biofilm-Assays oder Assays in Lösung (Frömmel *et al.*, 2013a; Kolenda *et al.*, 2018; Rödiger *et al.*, 2013; Schiebel *et al.*, 2017).

2.14.1.1 Messung der Fluoreszenzintensität

Für die Bewertung der Stärke der Biofilmbildung eines Bakterienisolats wurde die Fluoreszenzintensität (FI) eines Wells (Durchmesser 6 mm) mit dem in der Arbeitsgruppe Multiparameterdiagnostik entwickelten Softwarepaket FastFluoScan unter Verwendung eines 1,25 x-Objektivs quantifiziert (Olympus PlanApoN 1,25/0,04). Hierfür wurde ein Filtersatz verwendet, welcher der SYTO 9-Färbung entspricht (Anregungsfilter: 422-467 nm, dichroitischer Spiegel: 482 nm, Emissionsfilter: 489-531 nm). Um eine Verfälschung der Messwerte zu vermeiden, wird die Hintergrund-FI der MTP von jedem erzeugten FI-Wert abgezogen. Dafür wurden bei jeder analysierten Platte drei Wells mit 0,9 % NaCl als Leerwert mitgeführt. Zudem wurden bei jeder zu messenden Wellplatte drei Wells mit Rhodamin-/Coumarin-kodierten Referenzmikropartikeln in 0,9 % NaCl mitgeführt. Diese dienen als geräteinterne Kontrolle, als allgemeine Referenzierung und dazu, um inter- und intraassay-Variationen zu vermeiden. Die ge-

messenen FI der Kontrollen und der mit SYTO 9 gefärbten Biofilme wurden auf die mittlere FI der Referenzmikropartikel bezogen. Die referenzierten FI wurden als Median der relativen FI (relFI) in willkürlich definierten Einheiten (*arbitrary units*; A.U.) ausgedrückt. Die relFI korreliert mit der Stärke der Biofilmbildung in den Wells der MTP.

2.14.1.2 Erstellung von Übersichtsaufnahmen

Um eine qualitative Aussage über die Fähigkeit der Isolate zur Biofilmbildung treffen zu können, erfolgte eine automatische Aufnahme eines Übersichtsbildes aus jedem Well der 96-Well Platte durch Fokussierung auf den Wellboden. Als Fokussierhilfe wurden in jedes Well DAPI-Beads pipettiert, wodurch eine korrekte Fokussierung und Wellbodendetektion gewährleistet werden konnte. Zur Erstellung eines Wellübersichtsbildes erfolgte die Aufnahme 12 kleinerer Einzelbilder mit dem 4 x Objektiv (Olympus UPlanSApo 4 x/0,164) durch die Kamera, welche automatisch zu einem Übersichtsbild zusammengesetzt wurden. Die Übersichtsbilder eines Wells wurden anschließend zu einem 96-Well Plattenübersichtsbild zusammengesetzt, um so einen guten Überblick über die Biofilmbildung zu erhalten und die einzelnen Isolate und deren Replikate besser vergleichen zu können.

2.14.2 AKLIDES®-Fluoreszenzmikroskopie

Die Analysen der Besiedlung unterschiedlicher Materialien und die Etablierung von Antibigrammen wurden mit Hilfe der AKLIDES®-Technologie durchgeführt. Das Konzept der AKLIDES®-Technologie basiert auf den Fokussierungsalgorithmen der VideoScan-Technologie. Die Hardware entspricht dem des VideoScan-Systems, bis auf die LEDs als Lichtquelle.

2.14.2.1 Bildaufnahme für die Materialanalyse

Für die Aufnahme der Übersichtsbilder wurde ein 4 x Objektiv (Olympus UPlanFLN 4 x/0,13) verwendet. Die detaillierte Bildaufnahme von 72 Positionen pro Coupon wurde unter Nutzung des 20 x Objektivs (Olympus LUCPlanFLN 20 x/0,45) durchgeführt. Außerdem wurde ein für die PI-Färbung entsprechender Filter verwendet (Anregungsfilter: 531/40 nm, dichroitischer Spiegel: 562 nm, Emissionsfilter: 593/40 nm).

2.14.2.2 Erstellung von Übersichts- und Detailaufnahmen

Um eine qualitative Aussage über die Fähigkeit der Isolate zur Biofilmbildung treffen zu können, erfolgte eine automatische Aufnahme eines Übersichtsbildes aus jedem Well der 96-Well Platte durch Fokussierung auf den Wellboden. Als Fokussierhilfe wurden in jedes Well DAPI-Beads pipettiert, wodurch eine korrekte Fokussierung und Wellbodendetektion gewährleistet werden konnte.

Das Erstellen von Übersichtsaufnahmen erfolgte mit dem 1,25 x Objektiv (Olympus PlanApoN 1,25 x/0,04) und den entsprechenden Filtern für die SYTO 9- und PI-Färbung. Hierbei wurden zwei Bilder aufgenommen und dann zu einem Übersichtsbild zusammengefügt. Die einzelnen Übersichtsbilder

Material und Methoden

wurden dann zu einem 96-Well Plattenübersichtsbild zusammengefügt. Die Aufnahme von Detailbildern wurde unter Nutzung des 20 x Objektivs (Olympus LUCPlanFLN 20 x/0,45) und den entsprechenden Filtern für die SYTO 9- und PI-Färbung durchgeführt. Hierbei wurden 10 Bildaufnahmen pro Well von Bereichen mit den stärksten Fluoreszenzsignalen angefertigt.

2.14.2.3 Messung der Fluoreszenzintensität

Die Ermittlung der FI nach der Lebend-/Totfärbung der Biofilme erfolgte durch Analyse der Übersichtsaufnahmen. Die FI wurde dabei über die Pixelhelligkeit bestimmt. Hierbei wurden auch die Belichtungszeit, das Kamera-Binning, die Wellfläche und die Pixelgröße berücksichtigt:

$$\frac{\sum(\text{Pixelhelligkeit})/\text{Belichtungszeit}}{\text{Fläche} * (\text{Binning} * \text{Pixelgröße}/1000)^2}$$

Die Berechnung der relFI-Werte nach der Lebend-/Totfärbung erfolgte wie zuvor beschrieben (2.14.1.1 Messung der Fluoreszenzintensität).

2.15 Statistische Methoden

Bei der Untersuchung der *in vitro* Biofilmbildung verschiedener *E. coli*-Pathotypen, wurde der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) verwendet, um statistisch signifikante Unterschiede für die allgemeinen Genprävalenzen und die Prävalenzen von Genen zwischen verschiedenen Pathotypen zu bestimmen. *P*-Werte für der Vergleich der Prävalenzen eines Gens zwischen allen Pathotypen wurden mit Hilfe des Proportions-Tests für multiple Gruppen berechnet. Für den Vergleich der Prävalenzen eines Gens zwischen verschiedenen Pathotypen wurden die berechneten *p*-Werte mit Hilfe einer Benjamini-Hochberg *p*-Wert-Korrektur angepasst. Pearson's χ^2 -Test mit Yates' Kontinuitätskorrektur wurde verwendet, um die Korrelation von *fliC* und der Motilität und die Korrelation zwischen dem VideoScan- und Kristallviolett-Assay zu bestimmen. Um signifikante Unterschiede in der Fähigkeit zur Biofilmbildung eines Pathotyps zu finden, wurden die Medianwerte für Isolate, die zu verschiedenen Pathotypen gehören, unter Verwendung des Wilcoxon-Test (Benjamini-Hochberg *p*-Wert-Korrektur) verglichen. *P*-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Für die Analyse der Biofilmbildung auf unterschiedlichen Materialien wurden alle Daten mit dem ggpubr-Paket (v. 0.2.1) in der integrierten Entwicklungsumgebung Rkward (Rödiger *et al.*, 2012) (v. 0.7.0z+0.7.1+devel1) untersucht. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Liegt der *p*-Wert unter dem Signifikanzniveau 0,05, wurde festgestellt, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gibt. Der Wilcoxon-Rangsummen-Test mit Bonferroni-Korrektur wurde für den mehrfachen, paarweisen Vergleich zwischen Gruppen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der *in vitro* Biofilmbildung

3.1.1 Prinzip des Biofilmassays und der Messmethode

Um die Fähigkeit eines Bakteriums zur Biofilmbildung zu untersuchen, wird als häufigste Methode die Kristallviolett-Färbung angewendet. Hierbei werden sowohl die Bakterienzellen als auch die Biofilmmatrixbestandteile angefärbt. Nach anschließender Messung der OD, gibt die Menge des gebundenen Farbstoffes letztendlich Auskunft über das Potenzial eines Bakteriums zur Biofilmbildung. Diese Vorgehensweise liefert jedoch keine Information über die Verteilung der Bakterien und die Struktur des Biofilms. Um diese wenig aussagekräftige Methode zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ein Biofilmassay etabliert, mit dem über ein bildbasiertes Verfahren Aussagen über das Vorhandensein eines Biofilms und die Stärke der Biofilmbildung getroffen werden können. Dazu wurde die VideoScan-Technologie für die Detektion und Quantifikation von bakteriellen Biofilmen adaptiert. Im Allgemeinen folgte der Ablauf des Biofilmassays dem Schema in Abbildung 2.

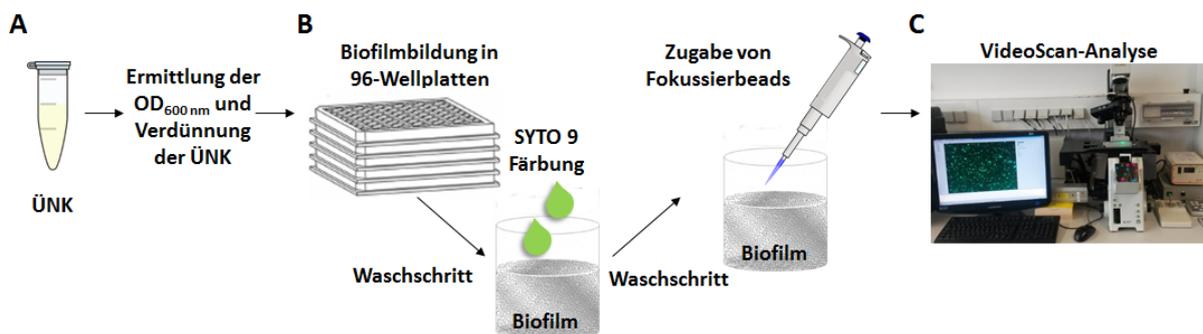


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Biofilmassays

(A) Nach der Herstellung der ÜNK erfolgte die Messung der OD_{600nm} mit anschließender Verdünnung im entsprechenden Medium. (B) Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend in 96-Well Platten pipettiert und diese für 48 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschr. zur Entfernung der nicht-adhärenenten Bakterienzellen mit anschließender SYTO 9-Färbung der Biofilme und einem weiteren Waschschr., um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von Fokussierbeads für die automatisierte Analyse. (C) Die gefärbten Biofilme wurden mit der VideoScan-Technologie analysiert.

3.1.1.1 Kultivierung und Färbung

Zur Etablierung des Assays wurden nach intensiver Literaturrecherche zunächst verschiedene Bakterienstämme, Kultivierungsbedingungen und Färbeprotokolle getestet und optimiert. Hierbei konnte der Stamm *E. coli* MG1655 F' (Ghigo, 2001) als sehr starker Biofilmbildner bestätigt werden, welcher seitdem als Positivkontrolle bei der Untersuchung der Biofilmbildung von *E. coli*-Stämmen verwendet wird. Dieser Bakterienstamm trägt ein konjugatives Plasmid, welches zu einer erhöhten Biofilmbildung führt (Ghigo, 2001; Reisner *et al.*, 2003, 2006). Der F-Pilus unterstützt hierbei die initiale Adhäsion, die

Ergebnisse

Biofilmmreifung und die Stabilisierung der Biofilmstruktur durch unspezifische Bindung an abiotische Oberflächen und Vermitteln des Zell-Zell-Kontakts (Ghigo, 2001; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Reischer *et al.*, 2003). Da die Materialeigenschaften einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben, wurden unterschiedliche Materialien verschiedener Hersteller verwendet. Aufgrund der Ergebnisse wurden alle Biofilme in 96-Well Platten aus Polystyrol mit flachem Boden kultiviert. Für die Biofilmbildung wurden alle untersuchten Stämme bei 37°C kultiviert, so dass eine Temperatur verwendet wurde, die der Isolationsumgebung der Bakterien entsprach. Weiterhin wurden die Biofilme unter statischen Bedingungen kultiviert, da die in dieser Arbeit untersuchten humanen Bakterienisolate vorwiegend geringen Scherkräften ausgesetzt sind. Für die Färbung der Biofilme wurde der membrangängige Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 ausgewählt, weil dieser an die DNA sowohl lebender als auch toter Bakterienzellen bindet. Da extrazelluläre DNA einen wesentlichen Anteil in einem Biofilm ausmacht, kann der Farbstoff ebenfalls zur Anfärbung der Biofilmbiomasse genutzt werden. Zudem eignet sich SYTO 9 in Kombination mit dem Farbstoff PI zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterienzellen, so dass, wie später beschrieben, der Einfluss antimikrobieller Substanzen untersucht werden kann.

3.1.1.2 Messung der Fluoreszenzintensität als Maß für die Stärke der Biofilmbildung

Um die Stärke der Biofilmbildung anzugeben, wurde ein Messmodul entwickelt, mit dem die Fluoreszenzintensität des gefärbten Biofilms im Well ermittelt werden kann. Für die Referenzierung der Fluoreszenzintensitäten und auch um intra- und interassay Variationen zu vermeiden, wurden geeignete Mikropartikel eingesetzt, die Fluoreszenzfarbstoffe enthalten (Coumarin/Rhodamin), welche äquivalent zu den genutzten Fluoreszenzfarbstoffen waren. Die Messung einer 96-Well Platte (bei voller Belegung und mit Kontrollen 70 zu messende Wells) dauerte etwa 10 min.

3.1.1.3 Erstellung von Übersichtsaufnahmen eines Biofilms

Weiterhin wurde in Zusammenarbeit mit einem Informatiker ein Messmodul für eine automatisierte Bildaufnahme entwickelt, um eine qualitative Aussage über die Biofilmbildung treffen zu können. Diese Bildaufnahmen geben Aufschluss darüber, ob ein Isolat unter den gewählten Kultivierungsbedingungen in der Lage ist, einen Biofilm zu etablieren. Weiterhin erhält man eine Information über die räumliche Verteilung und die Struktur des Biofilms innerhalb des Wells. Da eine Biofilmbildung unterschiedlich stark ausfallen kann, wurden pro Well jeweils zwei Aufnahmen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufgenommen, so dass auch bei einer sehr starken Biofilmbildung die räumliche Verteilung und die Struktur des Biofilms innerhalb des Wells zu erkennen ist. Um eine automatisierte Fokussierung des Wellbodens bei der Bildaufnahme gewährleisten zu können, wurden DAPI-Beads verwendet. Die Bildaufnahme einer 96-Well Platte (bei voller Belegung und mit Kontrollen 70 zu messende Wells) dauerte etwa 30 min. Während der Entwicklung des Verfahrens wurden verschiedenste

Ergebnisse

Mikroorganismen verwendet. In Abbildung 3 sind beispielhaft unterschiedliche Formen und Stärken von Biofilmen abgebildet. Umso höher der Anteil weißer Bereiche in einem Well, desto mehr Biofilm wurde gebildet.

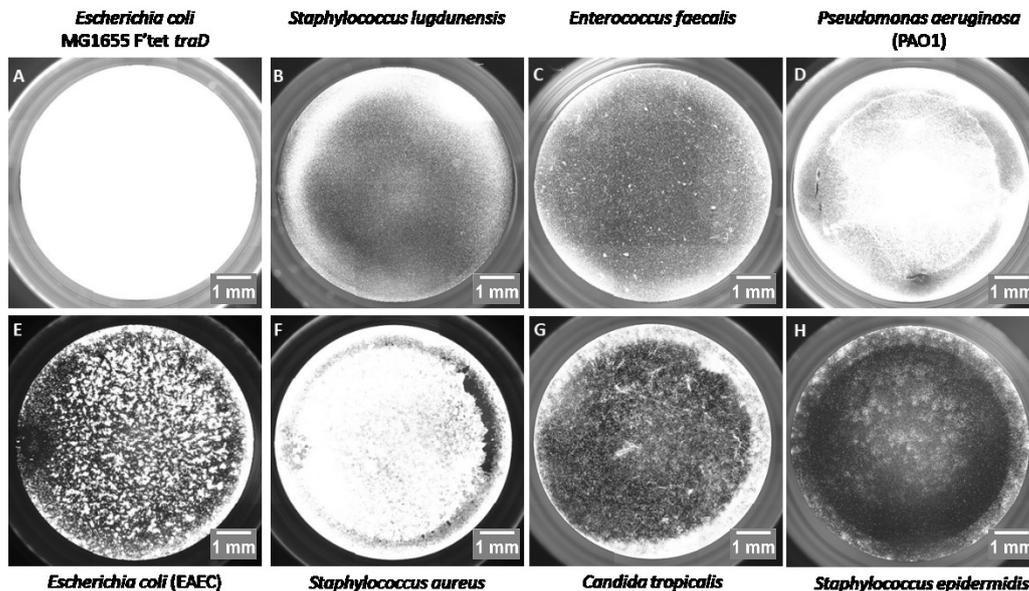


Abb. 3: Übersichtsaufnahmen unterschiedlicher Mikroorganismen

(A) *Escherichia coli* MG1655 F' in M63-Medium (B) *Staphylococcus lugdunensis* in BHI-Medium (C) *Enterococcus faecalis* in BHI-Medium (D) *Pseudomonas aeruginosa* in TSB-Medium mit 1 % Glukose (E) *Escherichia coli* (EAEC) in TSB-Medium mit 1 % Glukose (F) *Staphylococcus aureus* in M63-Medium (G) *Candida tropicalis* in YPD-Medium mit 0,2 % Dextrose (H) *Staphylococcus epidermidis* in M63-Medium.

3.1.2 Charakterisierung klinischer, humaner *E. coli*-Isolate

3.1.2.1 Detektion Biofilm-assoziiierter Gene

Um den Genotyp der unterschiedlichen *E. coli*-Isolate hinsichtlich des Vorhandenseins von Genen zu überprüfen, die mit der Biofilmbildung assoziiert werden, wurden Bakterienlysate hergestellt und diese für die PCR eingesetzt. Es wurden insgesamt 187 *E. coli*-Isolate auf das Vorkommen von Biofilm-assoziierten Genen untersucht. Die Amplifikation der Gene wurde mittels Kapillarelektrophorese analysiert und ausgewertet. Diese Analyse wurde für jedes Isolat in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Jedes der Biofilm-assoziierten Gene konnte in allen acht Pathotypen detektiert werden. Die Prävalenz dieser Gene innerhalb der verschiedenen Pathotypen ist in Tabelle 12 aufgeführt. Die höchste Prävalenz wurde für die Gene *csgA* (99,5 %), *bcsA* (96,3 %), *fimH* (92 %) und *fliC* (77 %) ermittelt. Eine niedrigere Prävalenz wiesen die Gene *agn43* (43,3 %) und *papC* (33,7 %) auf. Die höchste Anzahl an Genen pro Pathotyp konnte in UPEC-Isolaten (86,9 %) gefolgt von SAEC-Isolaten (85,1 %) detektiert

Ergebnisse

werden. Die geringste Anzahl an Biofilm-assoziierten Genen wiesen die Gruppen CAEC und EPEC (71,4 %) auf.

Die Prävalenz der Gene *agn43*, *fimH*, *fliC* und *papC* wies signifikante Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen *E. coli*-Pathotypen auf. So zeigten EAEC mit 18 von 24 Isolaten eine höhere Prävalenz des Gens *agn43* im Vergleich zu EPEC ($p < 0,01$), ETEC ($p < 0,01$), CAEC ($p < 0,01$) und AFEC ($p < 0,05$). Der Pathotyp EPEC wies mit nur 3 von 24 Isolaten eine geringe Prävalenz des gleichen Gens gegenüber Isolaten aus den Gruppen SAEC ($p < 0,01$), UPEC ($p < 0,05$) und HFEC ($p < 0,05$) auf. Das Gen *fimH* war im Pathotyp EAEC mit 16 von 24 Isolaten weniger prävalent gegenüber Isolaten aus den Gruppen AFEC, EPEC, SAEC und UPEC ($p < 0,05$). Das Biofilm-assoziierte Gen *fliC* wurde in nur 12 von 24 Isolaten des Pathotyps EAEC und damit seltener als in ETEC-Isolaten ($p < 0,05$) nachgewiesen. Mit 16 von 24 Bakterienstämmen des Pathotyps UPEC wurde das Gen *papC* häufiger nachgewiesen als in ETEC- oder EAEC-Isolaten ($p < 0,01$). Weiterhin konnte das Gen *papC* mit einer signifikant geringeren Prävalenz in Isolaten des Pathotyps ETEC nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Isolaten aus den Gruppen SAEC ($p < 0,01$) und HFEC ($p < 0,05$) wurde *papC* hier nur in einem von insgesamt 24 Isolaten nachgewiesen.

Tab. 12: Prävalenz der Biofilm-assoziierten Gene in 187 *E. coli*-Isolaten

Gen	Anzahl der Isolate eines Pathotyps mit detektiertem Gen in %								p-Wert*
	HFEC	UPEC	ETEC	EPEC	EAEC	SAEC	CAEC	AFEC	
<i>agn43</i>	54,2	58,3	25	12,5 ^{#1}	75 ^{#2}	62,5	21,1	33,3	0,0001
<i>bcsA</i>	95,8	100	100	83,3	100	100	89,5	100	0,0165
<i>papC</i>	41,7	66,7 ^{#3}	4,2 ^{#4}	33,3	12,5	50	26,3	33,3	0,0002
<i>csgA</i>	95,8	100	100	100	100	100	100	100	0,4470
<i>fimH</i>	91,7	100	87,5	100	66,7 ^{#5}	100	89,5	100	0,0002
<i>fliC</i>	83,3	83,3	95,8	70,8	50 ^{#6}	83,3	73,7	75	0,0208

* p-Wert für den Vergleich der Prävalenz eines Gens innerhalb aller Pathotypen

die Prävalenz dieses Gens war bei dem Vergleich der Prävalenz zwischen zwei Pathotypen signifikant unterschiedlich

¹ geringer im Vergleich zu SAEC, UPEC, HFEC

² höher im Vergleich zu EPEC, ETEC, CAEC, AFEC

³ höher im Vergleich zu ETEC, EAEC

⁴ geringer im Vergleich zu SAEC, HFEC

⁵ geringer im Vergleich zu AFEC, EPEC, SAEC, UPEC

⁶ geringer im Vergleich zu ETEC

3.1.2.2 Analyse der Curli- und Celluloseexpression

In *Salmonella* und *E. coli* ist die Biofilmbildung mit der Expression von Curli-Fimbrien und Cellulose assoziiert (Vidal *et al.*, 1998; Zogaj *et al.*, 2001a; Solano *et al.*, 2002). Mit Hilfe des Farbstoffes Kongorot, der an Curli-Fimbrien und den Matrixbestandteil Cellulose bindet, kann man die Expression dieser Biofilm-assoziierten Komponenten nachweisen. Es werden hierbei unterschiedliche Morphotypen unterschieden: rdar, bdar, pdar und saw. Durch den Einfluss der Temperatur auf die Expression von Curli-Fimbrien und Cellulose wurden die Isolate bei 28°C und 37°C untersucht. Folgende Kontrollen wurden

Ergebnisse

verwendet: *E. coli* Nissle für den rdar Morphotyp, *E. coli* MG1655 F' für den bdar Morphotyp und EAEC Stamm 5044 für den saw Morphotyp (Abb. 4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt. Bei einer Inkubation der Platten bei 28°C zeigten 52 Isolate (27,8 % der Gesamtisolate) den rdar Morphotyp, der auf die Koexpression von Curli und Cellulose hinweist. Insgesamt 61 Isolate (32,6 %) wiesen den Curli produzierenden bdar Morphotyp und 74 Isolate (39,6 %) den saw Morphotyp auf, der auf fehlende Curli- und Celluloseproduktion hindeutet. Bei einer Inkubation der Bakterien bei 37°C konnten mit 27 Isolaten (14,4 %) nur noch etwa halb so viele rdar Morphotypen detektiert werden. Der bdar Morphotyp wurde bei 72 Isolaten (38,5 %), der saw Morphotyp bei insgesamt 88 (47,1 %) Isolaten nachgewiesen. Der pdar Morphotyp konnte bei keinem der untersuchten Isolate identifiziert werden. Bei der Analyse der Ergebnisse auf eine eventuelle Korrelation des Auftretens eines Morphotyps mit einem bestimmten Pathotyp konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Der Calcofluoragarassay diente als eine weitere Methode für den Nachweis der Celluloseproduktion der Bakterienisolate. Da die Beurteilung des Morphotyps auf dem Kongorotagar durch die Vielfältigkeit in der Koloniemorphologie nicht immer eindeutig ist, wurde der Calcofluoragarassay als eine Bestätigung hinzugezogen. Der fluoreszente Farbstoff Calcofluor bindet an die von den Bakterien synthetisierte Cellulose und kann im UV-Bereich sichtbar gemacht werden. Demnach korreliert eine Celluloseproduktion mit der Stärke der Fluoreszenz. Als Positivkontrolle diente der Stamm *E. coli* Nissle und als Negativkontrolle der EAEC Stamm 5644 (Abb. 4). Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 13 dargestellt. Alle Ergebnisse vom Kongorotagarassay stimmten mit denen des Calcofluoragarassays überein.

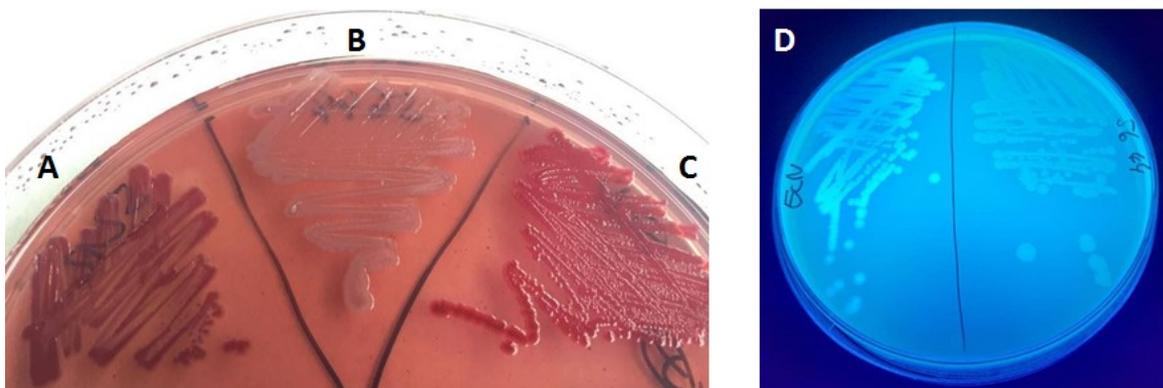


Abb. 4: Kontrollen für den Nachweis der Curli- und Celluloseproduktion

Die Bakterienisolate wurden auf Kongorot- bzw. Calcofluor-haltigen Agarplatten ausgestrichen und bei 28°C für 48 h bzw. bei 37°C für 24 h inkubiert. (A) Der EPEC-Stamm 5212 wies den Curli produzierenden bdar Morphotyp auf. (B) Der saw Morphotyp, der durch fehlende Curli- und Cellulosesynthese gekennzeichnet ist, konnte bei dem EAEC-Stamm 5644 nachgewiesen werden. (C) Die Positivkontrolle *E. coli* Nissle zeigte den rdar Morphotyp mit einer dunkelroten, rauen und trockenen Koloniemorphologie. (D) Die unter dem UV-Licht stark fluoreszierende Positivkontrolle *E. coli* Nissle (linke Agarplattenhälfte) wies auf eine Celluloseproduktion hin. Bei dem nicht fluoreszierenden EAEC-Stamm 5644 (rechte Agarplattenhälfte) kam es nicht zur Cellulosesynthese.

Tab. 13: Vorkommen des Morphotyps auf Kongorotagar und der Fluoreszenz auf Calcofluoragar in den untersuchten *E. coli*-Isolaten*

Pathotyp	Inkubation bei 28°C			Inkubation bei 37°C			Fluoreszenz Calcofluoragar	
	Morphotyp Kongorotagar			Morphotyp Kongorotagar				
	rdar	bdar	saw	rdar	bdar	Saw		
HFEC	9 (37,5)	5 (20,8)	10 (41,7)	9 (37,5)	2 (8,3)	7 (29,2)	15 (62,5)	2 (8,3)
UPEC	6 (25)	7 (29,2)	11 (45,8)	6 (25)	4 (16,7)	12 (50)	8 (33,3)	4 (16,7)
ETEC	4 (16,7)	11 (45,8)	9 (37,5)	4 (16,7)	2 (8,3)	11 (45,8)	11 (45,8)	2 (8,3)
EPEC	5 (20,8)	10 (41,7)	9 (37,5)	5 (20,8)	3 (12,5)	5 (20,8)	16 (66,7)	3 (12,5)
EAEC	6 (25)	5 (20,8)	13 (54,2)	6 (25)	4 (16,7)	9 (37,5)	11 (45,8)	4 (16,7)
SAEC	9 (37,5)	8 (33,3)	7 (29,2)	9 (37,5)	3 (12,5)	15 (62,5)	6 (25)	3 (12,5)
CAEC	6 (31,6)	6 (31,6)	7 (36,8)	6 (31,6)	5 (26,3)	4 (21,1)	10 (52,6)	5 (26,3)
AFEC	7 (29,2)	9 (37,5)	8 (33,3)	7 (29,2)	4 (16,7)	9 (37,5)	11 (45,8)	4 (16,7)

*angegeben ist die Anzahl der Isolate eines Pathotyps (Anzahl der Isolate eines Pathotyps in %)

3.1.2.3 Überprüfung der Motilität

Um die Motilität der Bakterienisolate zu überprüfen, wurden diese auf das Schwärmverhalten im Weichagar untersucht. Ein Durchmesser der Wachstumszone von > 5 mm um die Einstichstelle der Inokulation wurde als motil gewertet. Ein lokales Wachstum an der Einstichstelle wurde als nicht-motiles Verhalten eingeordnet. Abbildung 5 zeigt beispielhaft ein motiles und ein nicht-motiles Bakterienisolat.



Abb. 5: Nachweis der Motilität im Weichagar

Die Inokulation der Bakterien erfolgte in der Mitte der Agarplatten, welche anschließend bei 37°C für 16 h inkubiert wurden. (A) Der motile *E. coli* Stamm MG1655 F' zeigte ein diffuses Wachstum um die Einstichstelle. (B) Der nicht-motile SAEC Stamm wies ein begrenztes Wachstum um die Einstichstelle auf.

Insgesamt 139 (74 %) Isolate wiesen eine Motilität auf. Die höchste Anzahl motiler Bakterienisolate wies die Gruppe HFEC mit insgesamt 22 von 24 Isolaten (92 %) auf (Abb. 6). Die geringste Anzahl an motilen Isolaten wurde in der Gruppe AFEC mit 14 von 24 Isolaten (58 %) gefunden. Bei der Untersuchung der Motilität konnte kein Pathotyp identifiziert werden, der eine signifikant höhere bzw. niedrigere Motilität aufwies. Unter den insgesamt 139 motilen Bakterienisolaten konnte nur für 114 (79 %)

Ergebnisse

Isolate eine Amplifikation des *fliC* Gens nachgewiesen werden. Das Vorliegen des Gens *fliC* korrelierte mit dem motilen Phänotyp der untersuchten Isolate ($p < 0,01$).

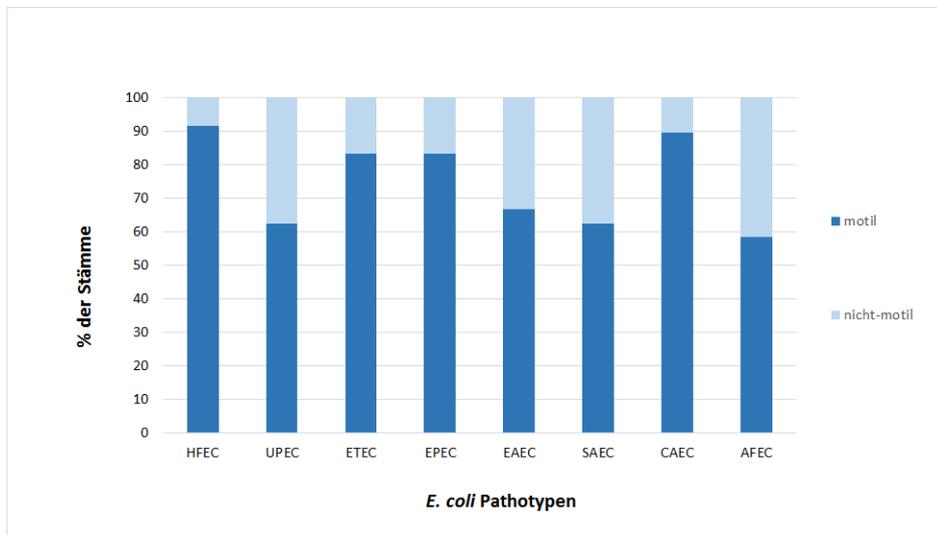


Abb. 6: Motilität der *E. coli*-Pathotypen

Die Motilität der Bakterien wurde mittels Weichagar untersucht. Die meisten motilen Isolate konnten der Gruppe HFEC zugeordnet werden. Die Gruppe AFEC hingegen wies weniger motile Isolate auf.

3.1.2.4 Screening der Biofilmbildung mit Kristallviolett

Als Goldstandard für die Untersuchung der Biofilmbildung wird der Farbstoff Kristallviolett verwendet, der sowohl lebende und tote Bakterienzellen als auch Matrixbestandteile anfärbt und damit zur Bestimmung der Biomasse geeignet ist. Er diente in dieser Arbeit dazu, die mit der VideoScan-Technologie für die Bakterienisolate ermittelte Fähigkeit zur Biofilmbildung zu bestätigen. Insgesamt wurde die Biofilmbildung von 187 *E. coli*-Isolaten in LB-Medium mit Hilfe der Kristallviolett-färbung bestimmt.

Der Ablauf des Kristallviolettassays war bis zum Zeitpunkt der Messung äquivalent zum Biofilmassay mittels SYTO 9-Färbung. Nach der Färbung der Biofilme mit einer Kristallviolettlösung wurde die Absorption ($OD_{570\text{ nm}}$) des an den Biofilm gebundenen Farbstoffes gemessen und eine entsprechende Bewertung der Ergebnisse nach der Klassifikation von Stepanović *et al.* vorgenommen. Hierbei wird zunächst ein cut-off (OD_c) festgelegt, welcher definiert ist als der Wert, der drei Standardabweichungen über der mittleren $OD_{570\text{ nm}}$ der Negativkontrolle liegt. In diesem Assay diente steriles LB-Medium mit einer mittleren $OD_{570\text{ nm}}$ von $0,100 \pm 0,036$ als Negativkontrolle. Somit ergab sich ein cut-off von 0,208. Dementsprechend waren Isolate mit einer $OD_{570\text{ nm}}$ unter 0,208 keine Biofilmbildner. Isolate mit einer $OD_{570\text{ nm}}$ über 0,208 wurden in die Kategorien schwacher, moderater und starker Biofilmbildner eingeteilt.

Ergebnisse

Mit dem Kristallviolettassay konnten 179 (96 %) der insgesamt 187 *E. coli*-Isolate als Biofilmbildner identifiziert werden. Acht Isolate lagen unterhalb des cut-offs und wurden als Nicht-Biofilmbildner eingestuft. Die OD_{570 nm} Werte der Isolate in den acht verschiedenen Pathotypen lagen im Bereich zwischen 0,172 bis 3,074. Eine schwache Biofilmbildung (OD_{570 nm} > 0,208 und ≤ 0,416) konnte bei 77 (41 %) Isolaten nachgewiesen werden. Als moderate Biofilmbildner (OD_{570 nm} > 0,416 und ≤ 0,832) konnten 65 (35 %) Isolate identifiziert werden. Insgesamt 37 Isolate (20 %) wurden als starke Biofilmbildner (OD_{570 nm} > 0,832) eingestuft, wobei die Mehrheit dieser Kategorie dem Pathotyp EAEC angehörte. In dieser Gruppe zeigten 14 (58 %) Isolate eine starke Biofilmbildung mit einem Höchstwert von 3,074. Die Positivkontrolle *E. coli* MG1655 F' ergab im Vergleich dazu einen Wert von 3,599. Der Pathotyp mit den wenigsten starken Biofilmbildner war EPEC mit nur einem Isolat (4 %). Die Ergebnisse der Biofilmbildung mit Einteilung nach der Klassifikation von Stepanović *et al.* sind in Abbildung 7 dargestellt.

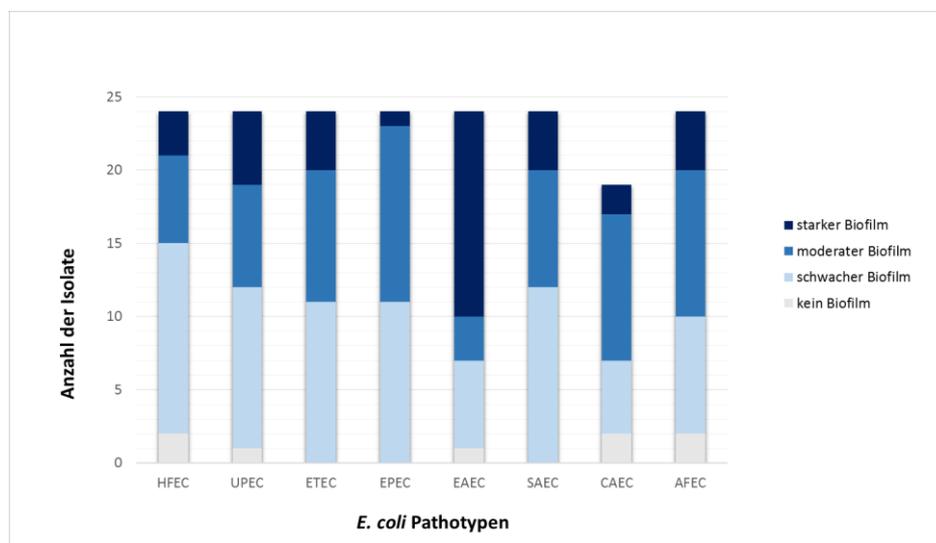


Abb. 7: Einteilung der Biofilmbildung nach der Klassifikation von Stepanović *et al.*

Nach Festlegung eines cut-offs, der sich an der Negativkontrolle orientiert, konnten die 187 *E. coli*-Isolate anhand der OD_{570 nm} Messwerte in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die Klassifikation nach Stephanović *et al.* unterteilt den Biofilmphänotyp in kein, schwacher, moderater und starker Biofilm. Der Pathotyp EAEC weist mit 14 Isolaten den Hauptteil der starken Biofilmbildner auf. Der Pathotyp EPEC enthält die wenigsten Isolate mit starker Biofilmbildung.

3.1.2.5 Screening der Biofilmbildung mit der VideoScan-Technologie

Die VideoScan-Technologie wurde in der vorliegenden Arbeit für die Detektion und Quantifikation von bakteriellen Biofilmen adaptiert und für die Analyse der Biofilmbildung der Isolate aus acht unterschiedlichen Pathotypen angewendet. Es wurde die Biofilmbildung in den Medien LB, TSB, BHI und M63 untersucht. Um das Potential eines Bakteriums zur Biofilmbildung quantifizieren zu können, wurden zunächst die Fluoreszenzintensitäten der mit SYTO 9 gefärbten Biofilme ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die mitgeführten Referenzbeads bezogen und als relative Fluoreszenzin-

Ergebnisse

tensität (relFI) angegeben. Um zwischen einem Biofilmbildner und einem Nicht-Biofilmbildner unterscheiden zu können, wurden ähnlich wie beim Kristallviolettassay, basierend auf der relFI der Negativkontrollen (Medien ohne Bakterien), cut-offs definiert. Diese entsprachen für LB-Medium 0,013, für TSB-Medium 0,011, für BHI-Medium 0,012 und für M63-Medium 0,006.

Mit der VideoScan-Technologie konnten insgesamt 163 (87 %) Isolate als Biofilmbildner und 24 (13 %) als Nicht-Biofilmbildner identifiziert werden. Die relFI zwischen den Pathotypen unterschieden sich signifikant (95 % Konfidenzlevel). Die ermittelten relFI lagen bei der Inkubation der Bakterien in LB-Medium zwischen 0,006 (EPEC-Isolat) und 0,159 (EAEC-Isolat), in TSB-Medium zwischen 0,007 (EPEC-Isolat) und 0,250 (EAEC-Isolat), in BHI-Medium zwischen 0,010 (CAEC-Isolat) und 0,292 (EAEC-Isolat) und in M63-Medium zwischen 0,003 (SAEC-Isolat) und 0,335 (EPEC-Isolat). Die Positivkontrolle *E. coli* MG1655 F' erzielte eine relFI von 0,366 in LB-Medium, 0,406 in TSB-Medium, 0,345 in BHI-Medium und 0,774 in M63-Medium.

Der allgemein höchste relFI-Wert wurde bei einem EPEC-Isolat in M63-Medium ermittelt, wobei dieser Pathotyp in den Vollmedien eine sehr geringe Fähigkeit zur Biofilmbildung aufwies. Die Isolate mit der signifikant stärksten Biofilmbildung in nährstoffreichem Medium konnten dem Pathotyp EAEC zugeordnet werden ($p < 0,01$). Die allgemein höchsten relFI-Werte konnten bei der Inkubation der 187 Bakterienisolate in BHI-Medium erzielt werden. Die Verteilung der relFI für jeden der acht *E. coli*-Pathotypen ist in Abbildung 8 dargestellt.

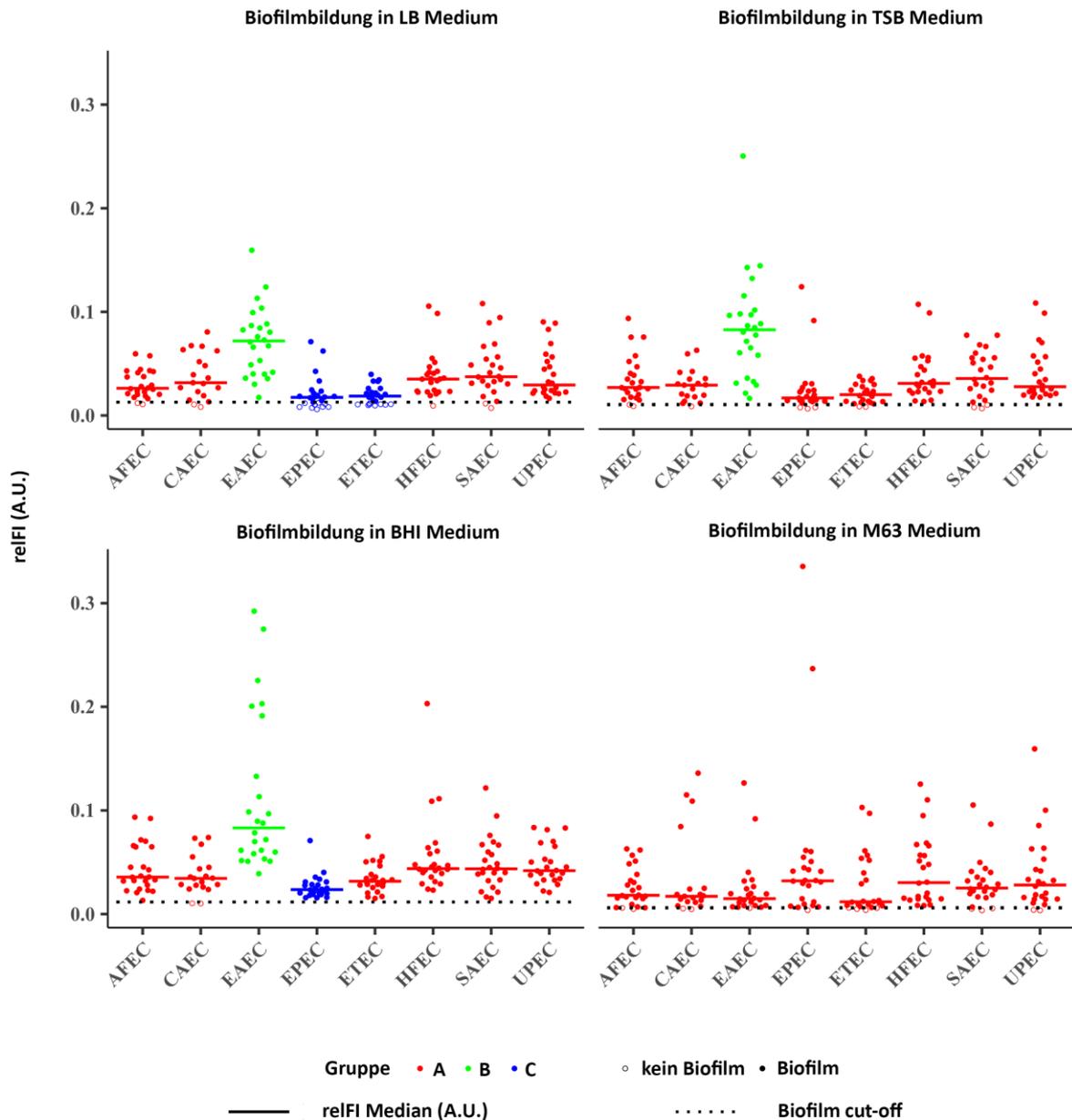


Abb. 8: Fluoreszenzintensitäten der mit SYTO 9 gefärbten Biofilme

Die insgesamt 187 *E. coli*-Isolate wurden auf Biofilmbildung in vier verschiedenen Medien (LB, TSB, BHI und M63) mit Hilfe der VideoScan-Technologie untersucht. Nach der SYTO 9-Färbung der Biofilme wurden die Fluoreszenzintensitäten (relFI in A.U.) gemessen. Jeder Punkt präsentiert den Median der relFI aus dem insgesamt dreimal jeweils in Triplikaten durchgeführten Assay. Der cut-off für jedes Medium wird durch eine gepunktete Linie dargestellt und trennt die Biofilmbildner von den Nicht-Biofilmbildnern. In den Vollmedien LB, TSB und BHI erreichten EAEC-Isolate die höchsten relFI, was sich signifikant von den anderen Pathotypen unterschied. Die Pathotypen wurden zur besseren Darstellung der Signifikanzen für jedes Medium in Gruppen eingeteilt. Die Pathotypen der Gruppe A unterscheiden sich signifikant von denen der Gruppe B. So weisen z. B. die Pathotypen AFEC, CAEC, HFEC, SAEC und UPEC aus Gruppe A in LB-Medium signifikant höhere relFI im Vergleich zu EPEC und ETEC aus Gruppe C und signifikant niedrigere relFI im Vergleich zu EAEC (Gruppe B) auf.

Ergebnisse

Nach der Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte die automatische Übersichtsaufnahme der einzelnen Wells in der 96-Well Platte (Abb. 9). Die einzelnen Übersichtsbilder der Wells wurden zu einem 96-Well Plattenübersichtsbild zusammengefügt, um einen besseren Überblick über die gesamte Platte zu erhalten (Abb. 10). Dies vereinfacht zum einen den Vergleich der Biofilmbildung eines Isolates in verschiedenen Kulturmedien und zum anderen den Vergleich der Biofilmbildung der Isolate untereinander. Diese qualitative Analyse erlaubt eine Aussage über die allgemeine Fähigkeit eines Isolats zur Biofilmbildung und gibt Auskunft über die Struktur und die Verteilung des Biofilms im Well.

Die einzelnen Übersichtsbilder in Abbildung 9 stellen beispielhaft die Vielfältigkeit der unterschiedlichen Stärken und Strukturen der gebildeten Biofilme dar. So zeigt Abbildung 9A die Positivkontrolle *E. coli* MG1655 F' in LB-Medium (relFI von 0,4398), welche einen sehr starken und dichten Biofilm nach 48-stündiger Inkubation ausbildete. In Abbildung 9B sieht man eine starke Biofilmbildung am Wellrand und einen weniger starken, aber dennoch dichten Biofilm am Wellboden, gebildet durch ein HFEC-Isolat in M63-Medium (relFI 0,1102). Einen eher schwachen, gleichmäßig im Well verteilten Biofilm wies ein UPEC-Isolat in M63-Medium (relFI 0,0369) in Abbildung 9C auf. Die charakteristische Biofilmbildung von EAEC-Isolaten ist in Abbildung 9D zu sehen. Das EAEC-Isolat, inkubiert in BHI-Medium, bildete dicke, dreidimensionale Bakterienaggregate aus (relFI 0,2763). Mit Ausnahme des Pathotyps EAEC konnte keine weitere Korrelation zwischen einem Pathotyp und einer bestimmten Biofilmstruktur gefunden werden. Insgesamt konnten diese typischen, aggregierenden Biofilmstrukturen bei 21 von 24 EAEC-Isolaten nachgewiesen werden.

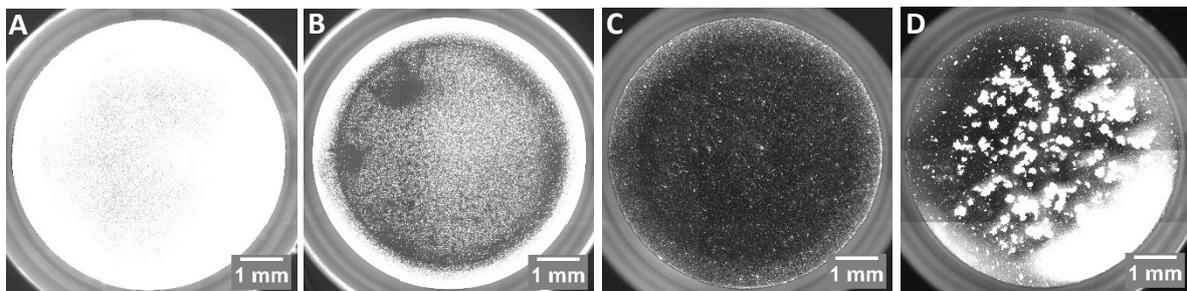


Abb. 9: Übersichtsbilder der einzelnen Wells mit *E. coli*-Biofilmen

Nach der Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte die automatische Bildaufnahme der Biofilme in den einzelnen Wells. (A) Die Positivkontrolle *E. coli* MG1655 F' in LB-Medium mit gleichmäßig über das Well verteilter und starker Biofilmbildung. (B) Das HFEC-Isolat in M63-Medium wies einen sehr starken Biofilm am Rand und einen schwächeren Biofilm im Zentrum des Wells auf. (C) Ein UPEC-Isolat mit schwacher Biofilmbildung in M63-Medium. (D) Der charakteristische Biofilm mit Bildung von dicken, dreidimensionalen Aggregaten eines EAEC-Isolates in BHI-Medium.

Ergebnisse

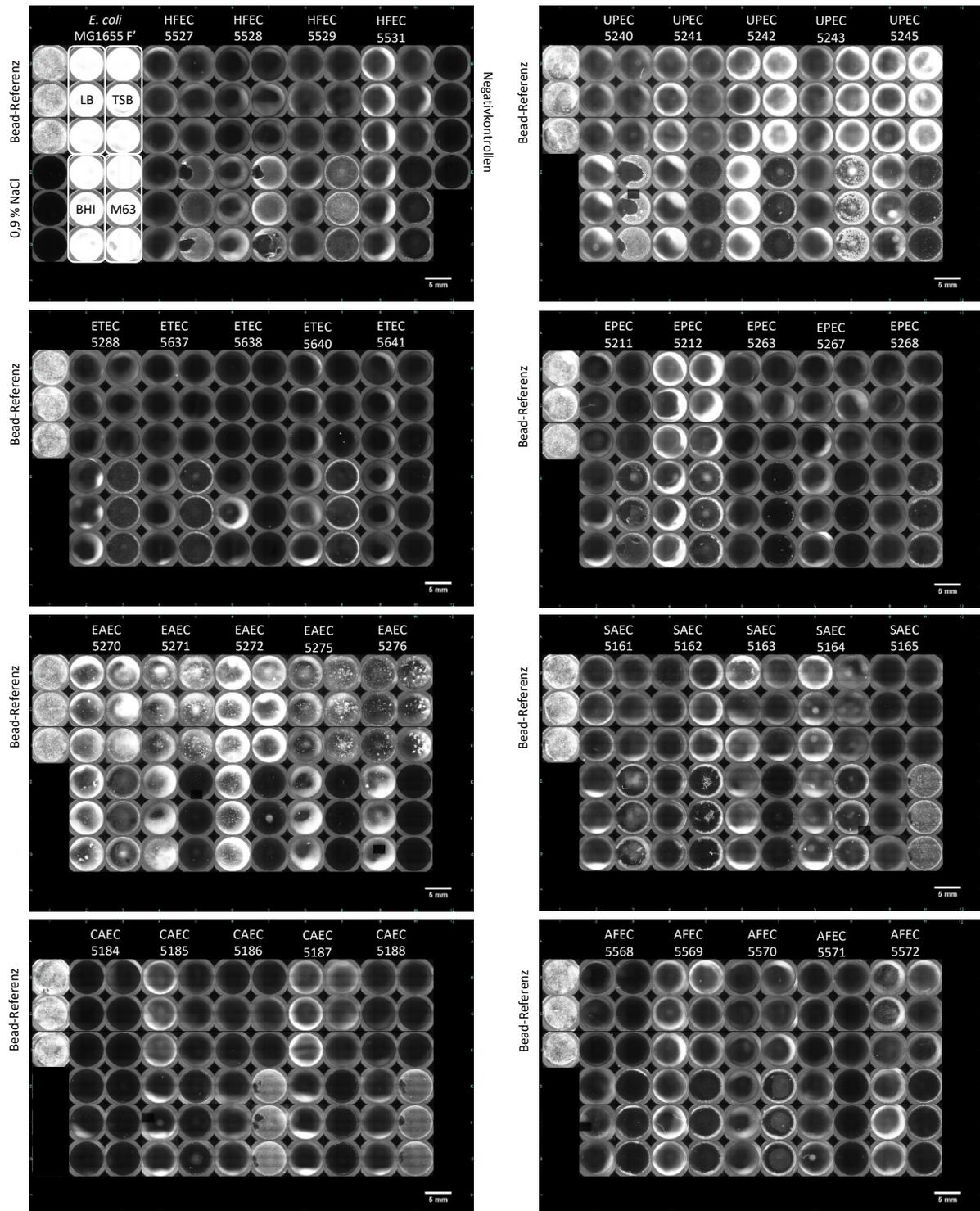


Abb. 10: Übersichtsbilder der 96-Well Platten mit *E. coli*-Biofilmen

Die Übersichtsbilder der einzelnen Wells wurden für eine bessere Übersicht zu 96-Well Plattenübersichtsbildern zusammengefügt. Jedes Isolat wurde auf Biofilmbildung in vier verschiedenen Medien im Triplikot untersucht. Die Plattenanordnung ist hierbei immer identisch. In den Wells B1-D1 befanden sich die Referenzbeads. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden bei jeder Durchführung des Assays auf einer Platte mitgeführt. Das erste 96-Well Plattenübersichtsbild oben links zeigt beispielhaft die Positivkontrolle (Wells B2-D2 in LB, Wells E2-G2 in BHI, Wells B3-D3 in TSB, Wells E3-G3 in M63) und die Negativkontrollen (Medium ohne Bakterien, Well B12 in LB, Well C12 in TSB, Well D12 in BHI, Well E12 in M63). Zusätzlich zeigt das Bild die Biofilmbildung von vier HFEC-Isolaten. Die weiteren 96-Well Plattenübersichtsbilder zeigen jeweils fünf Isolate der Gruppen UPEC, ETEC, EPEC, EAEC, SAEC, CAEC und AFEC.

3.2 Analyse dreidimensionaler Biofilme auf Materialien

3.2.1 Prinzip der Materialanalyse

Ein wichtiger Bereich der Materialforschung ist die Besiedlung von Oberflächen durch Mikroorganismen. Um die bakterielle Kolonisation auf Materialien zu untersuchen, werden die Bakterien z.B. mittels Ultraschall abgelöst und auf Agarplatten aufgebracht. Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwändig und in der Durchführung fehleranfällig. Da es bisher keine standardisierte Methode für die mikroskopische Auswertung besiedelter Materialien gibt, wurde die AKLIDES®-Technologie für die quantitative Analyse dreidimensionaler Biofilme angepasst und damit verschiedene Materialien der BAM untersucht.

Um die von der BAM erhaltenen Materialien (Coupons) mit der AKLIDES®-Technologie zu analysieren, wurde zunächst in Zusammenarbeit mit der Fakultät Maschinenbau, Elektro- und Energiesysteme an der BTU Cottbus-Senftenberg eine Metallplatte als Probenhalter (Abb. 11) angefertigt. Diese Metallplatte, welche die Breite und Länge einer 96-Well Platte aufweist, besitzt Kavitäten (Messfelder) mit einem Durchmesser von etwa 15 mm und diente als Auflagefläche für bis zu 12 Coupons. Für diese 12 Messfelder wurde einmalig eine Kalibrierung am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, um eine automatische Ansteuerung der Messfelder bei der Analyse der Coupons gewährleisten zu können. Die mit PI gefärbten Coupons wurden dann auf dem Probenhalter platziert und es folgte eine automatische Bildaufnahme mit anschließender Analyse durch die eigens dafür entwickelte Software.

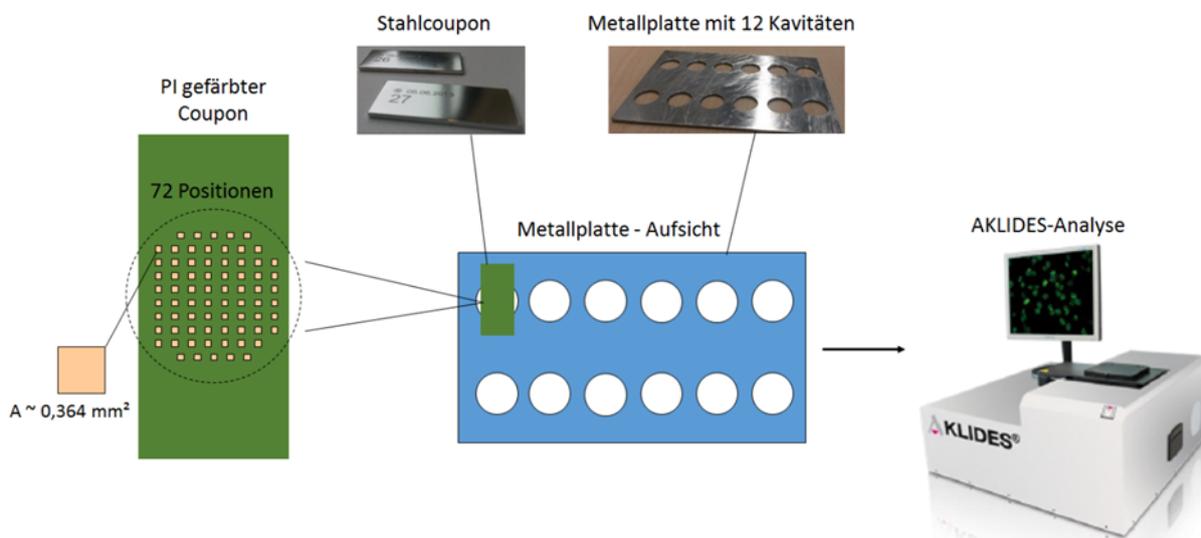


Abb. 11: Aufbau der Couponanalyse mit der AKLIDES®-Technologie

Mit der speziell angefertigten Metallplatte, die als Probenhalter für die Coupons diente, wurde die bakterielle Adhäsion auf den Materialien untersucht. Die Coupons wurden mit der gefärbten Seite nach unten auf dem Probenhalter platziert und über eine automatische Ansteuerung und Bildaufnahme erfolgte die Analyse der Coupons. Pro Materialstück wurden Bilder von 72 Positionen aufgenommen und anschließend mit der Software ausgewertet.

3.2.1.1 Bildaufnahme und Softwareanalyse

Unter Nutzung eines entsprechenden Filtersets für die PI-Färbung erfolgte die Bildaufnahme als Graustufenbild durch eine automatische Fokussierung der Couponoberfläche. Insgesamt wurden pro Materialstück 72 Bilder mit jeweils einer Bildfläche von $0,364 \text{ mm}^2$ aufgenommen. Dies entspricht einer gescannten Fläche von etwa 26 mm^2 pro Coupon. Die Quantifizierung der Bakterienzellen pro Bild erfolgte über die Pixelhelligkeit. In Vorexperimenten wurden zunächst Bilder analysiert, um die Pixelhelligkeit eines Bakteriums zu ermitteln. Für eine automatische Analyse der Bilder musste hierfür ein Schwellenwert festgelegt werden, ab dem ein Pixel als Bakterium angesehen und somit vom Hintergrund unterschieden werden konnte. Ein zu hoher Schwellenwert schließt Bakterien aus, die nicht gut fokussiert oder zu schwach gefärbt sind. Ein zu niedriger Schwellenwert würde Pixel mit einschließen, die kein Bakterium sondern nur Hintergrundrauschen darstellen. Da die Bakterien auf den verschiedenen Materialien und auch innerhalb eines Materials eine gleichmäßige Färbung aufwiesen, konnte ein einheitlicher Schwellenwert der Pixelhelligkeit von 15 definiert werden. Als Kontrolle wurden hier manuell Bakterien in Bildern mit geringer Bakterienbesiedlung ausgezählt, um den Schwellenwert zu kontrollieren. Weiterhin wurden die Bilder auf die durchschnittliche Bakteriengröße analysiert und es wurde ein Schwellenwert von 20 Pixeln ermittelt, was ungefähr einer Fläche von $2,37 \mu\text{m}^2$ und somit einer Länge von $2,5 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ entspricht und somit mit den Literaturangaben übereinstimmt (Grossman *et al.*, 1982; Nelson and Young, 2000). Außerdem wurde ein Grenzwert für einen dünnen Biofilm mit einer Dicke bis zu $20 \mu\text{m}$ festgelegt. Biofilme, die dicker als $20 \mu\text{m}$ sind, konnten nicht mit der Methode der Bakterienquantifizierung über die Pixelhelligkeit ausgewertet werden, da die maximale Pixelhelligkeit mit einem Wert von 255 limitiert ist. All diese Parameter wurden für die automatisierte Bildanalyse in die Software integriert. Nach dem Starten der Messung für die automatisierte Bildaufnahme wurden durch das AKLIDES[®]-System zunächst spezifische Parameter wie z.B. der Fluoreszenzfilter, die Koordinaten für die Bildaufnahme, die festgelegte Belichtungszeit und die Größe eines Bakteriums geladen. Als erstes wurden die Messfelder identifiziert und mit einem 4 x-Objektiv Übersichtsbilder der 12 Kavitäten aufgenommen. Auf diesen Übersichtsbildern wurden dann automatisch die 72 Positionen für die anschließende Detailaufnahme markiert. Das System steuerte dann automatisch die nächste Position an, stellte das 20 x Objektiv und die vordefinierte Belichtungszeit ein und ermittelte die Fokusebene. Nach der Bildaufnahme wurden die Bilder mittels Software analysiert. Mit Hilfe der festgelegten Schwellenwerte wurden die Bilder dann binarisiert. Über die Helligkeit eines einzelnen Bakteriums konnten somit einschichtige Biofilme erkannt werden. Hellere Bereiche wurden als mehrschichtige Biofilme mit übereinanderliegenden Bakterien interpretiert und anhand ihrer Helligkeitsstufen klassifiziert. Diese Helligkeitsstufen stellten ein lineares Verhältnis dar. Die erste Stufe beinhaltete Bereiche mit Helligkeitswerten vom Schwellenwert bis zum Zweifachen des Schwellenwertes und beschrieb somit einen einschichtigen Biofilm. Die nächste Stufe umfasste

Ergebnisse

Werte vom Zweifachen bis zum Dreifachen des Schwellenwertes, welche durch zweischichtige Biofilme gebildet wurden. Wurden diese Helligkeitsstufen zugeordnet, wurde anschließend die Bakteriengröße mit einbezogen. Die kategorisierten Bereiche wurden durch die Größe eines Bakteriums geteilt und mit der Anzahl der Schichten von übereinanderliegenden Bakterien multipliziert. Somit erhielt man die absolute Bakterienzahl pro Bild, die letztendlich als Bakterien pro mm^2 angegeben wurde. Pro Bild dauerte diese Vorgehensweise etwa 20 sek und wurde mit jedem weiteren aufgenommenen Bild durch eine verbesserte Fokusstrategie beschleunigt. Weiterhin wurde durch die Unterscheidung zwischen einem Bakterium und dem Hintergrund über die Pixelhelligkeit die besiedelte Couponfläche in den Graustufenbildern ermittelt. Abbildung 12 zeigt den Ablauf der Couponanalyse mit der AKLIDES®-Technologie.

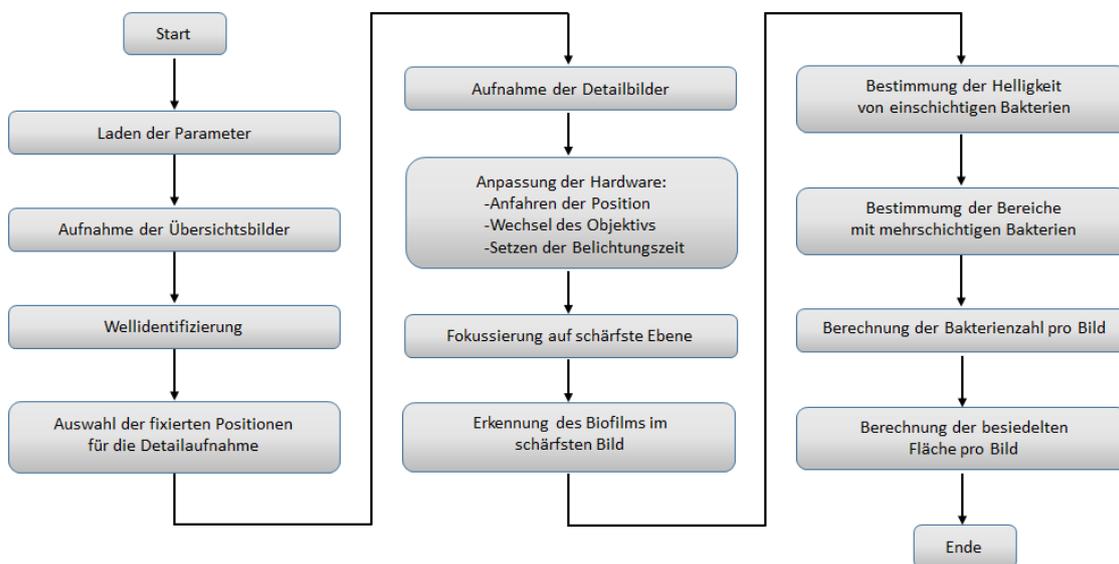


Abb. 12: Ablauf der Softwareanalyse bei der Untersuchung besiedelter Coupons

Die Arbeitsschritte in der Abbildung präsentieren den schrittweisen Prozess der Bildaufnahme und -analyse mit der entwickelten Software. Dieser Prozess dauert weniger als 20 sek pro Bild und wird mit jedem weiteren Bild durch eine verbesserte Fokusstrategie beschleunigt.

Um eine Aussage über die Dicke eines Biofilms treffen zu können, wurde ein Höhenprofil von jedem Bild erstellt. Für eine bessere Darstellung wurden für die Höhenprofile zusätzlich 3D-Darstellungen unter Nutzung des ImageJ 1.5 Plugins „Interactive 3D Surface Plot“ erstellt. Zunächst wurde eine Unterscheidung zwischen Bakterium und Hintergrund vorgenommen und im Bild markiert. Dieser Vorgang diente des Weiteren auch zur Ermittlung der besiedelten Fläche. Der sogenannte *FindMaxima* Algorithmus wurde dann auf die Höhenprofile angewendet, um die maximalen Werte der „Peaks“ in der z-Ebene zu ermitteln und letztendlich die maximalen Höhen des gebildeten Biofilms pro Bild zu erhalten. Hierfür wurde ein weiterer Schwellenwert für die Ermittlung der Höhen in den Bildern festgelegt. Nur

Ergebnisse

die „Peaks“ oder „Gipfel“, die höher als 2 μm sind (entspricht theoretisch mehr als zwei übereinanderliegenden Bakterien), werden in die Analyse mit einbezogen. In Abbildung 13 ist die Ermittlung der höchsten Punkte der z-Ebene am Beispiel eines Bildes von einem Titancoupon veranschaulicht.

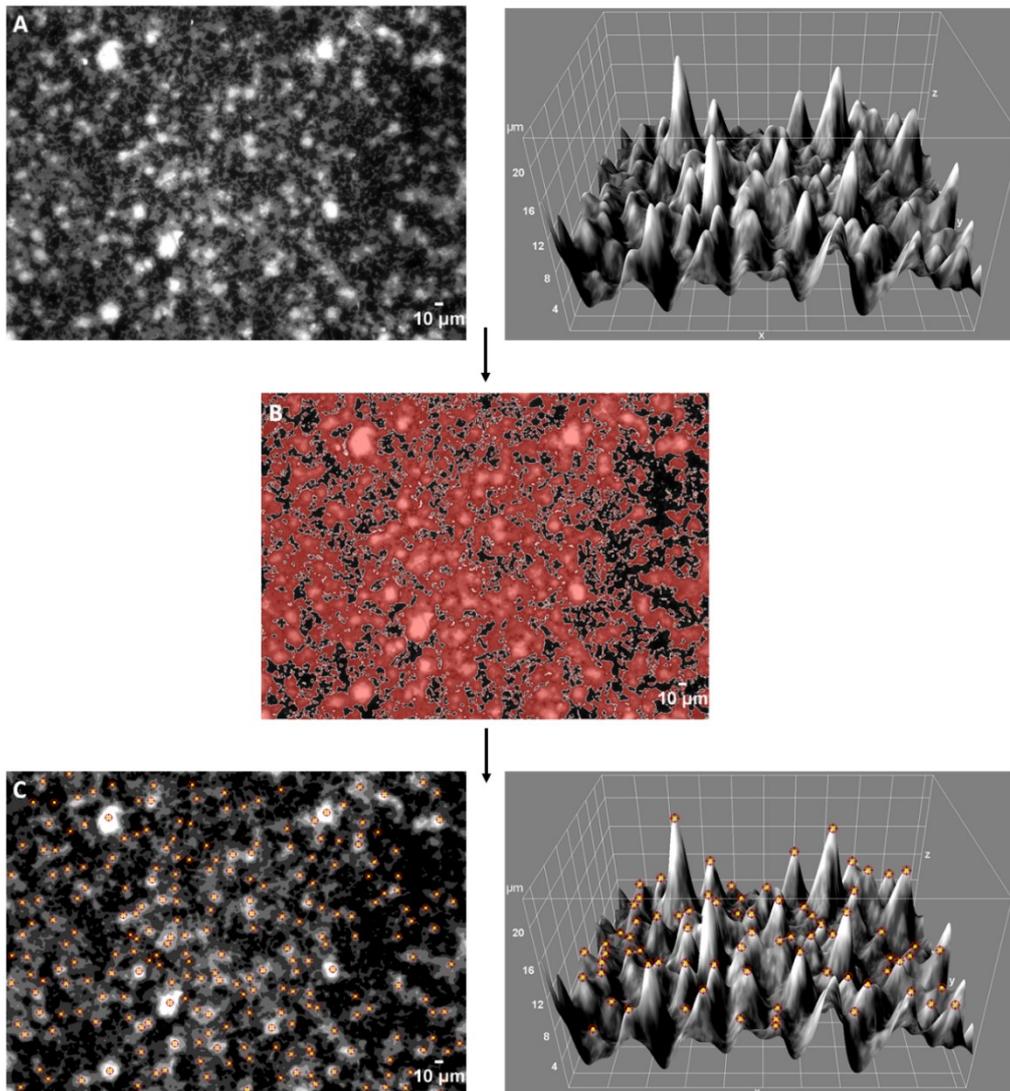


Abb. 13: Ermittlung der Höhe eines Biofilms

Die mittels AKLIDES[®] aufgenommenen Bilder (20 x-Objektiv) wurden in Höhenprofile umgewandelt und mit ImageJ in einer 3D-Ansicht dargestellt (A). Die besiedelten Flächen in den Bildern wurden markiert (B) und der *FindMaxima* Algorithmus wurde auf die Höhenprofile angewendet (C). Auf diese Weise wurden alle „Peaks“ mit einer Höhe über 2 μm markiert und die Marker zur besseren Darstellung auf die 3D-Ansicht übertragen.

3.2.2 Untersuchung der Biofilmbildung von *E. coli* auf Glas, Stahl und Titan

3.2.2.1 Optische Oberflächenmessung und Rauheitsmessung

Zur Charakterisierung der Oberfläche von Stahl und Titan wurden diese mit Hilfe der WLSI analysiert. Dadurch erhielt man ein 3D-Profil mit Aussagen zur Oberflächenbeschaffenheit und Rauheit des Ma-

Ergebnisse

terials. Diese Methode wurde von Matthias Weise an der BAM durchgeführt und die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Analyse zeigte, dass beide Materialien einen Wellencharakter aufwiesen. Zudem konnte bei Titan eine Mikrorauheit des Materials nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt die 3D-Profile der Materialien Stahl und Titan.

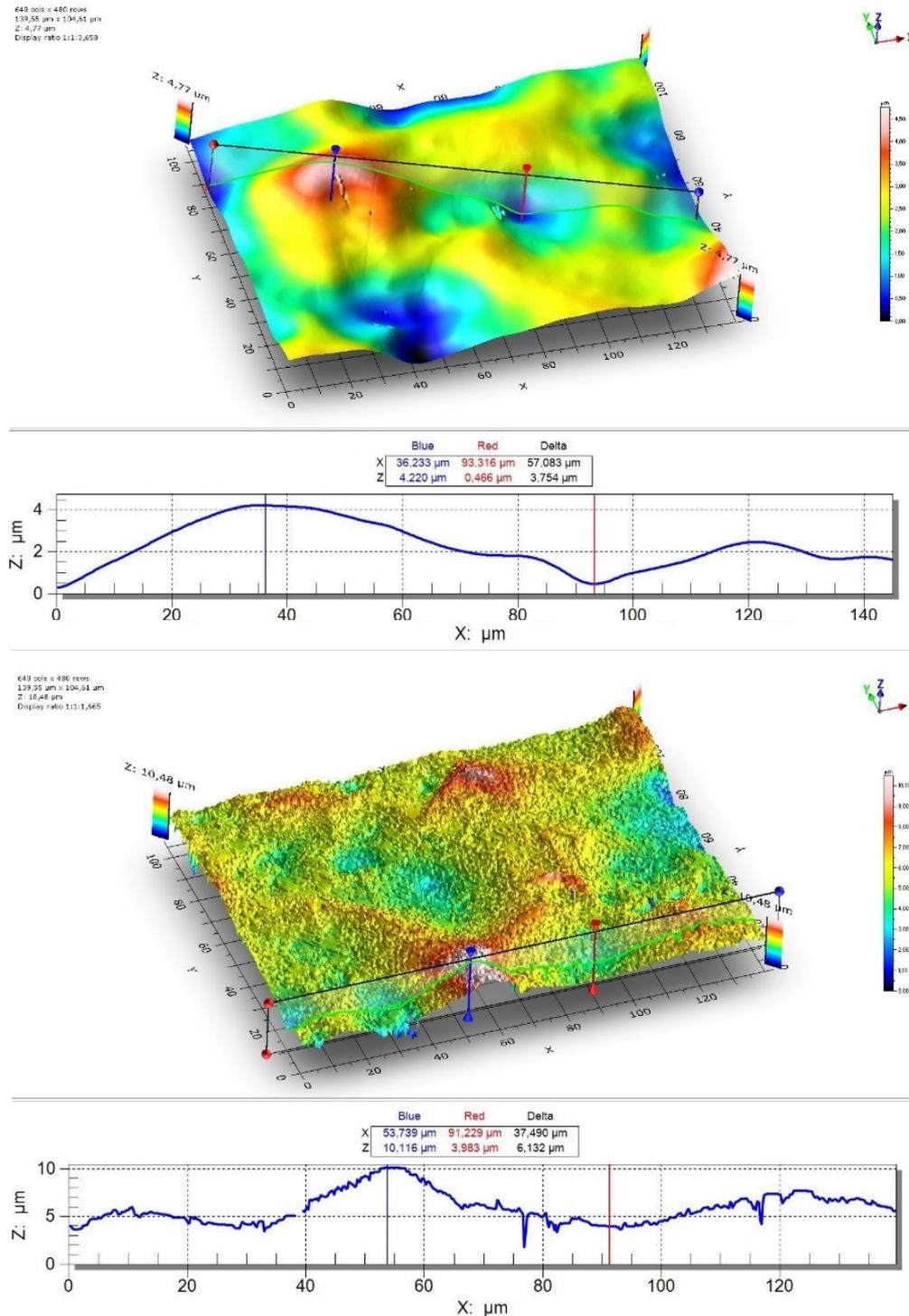


Abb. 14: Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit von Stahl und Titan

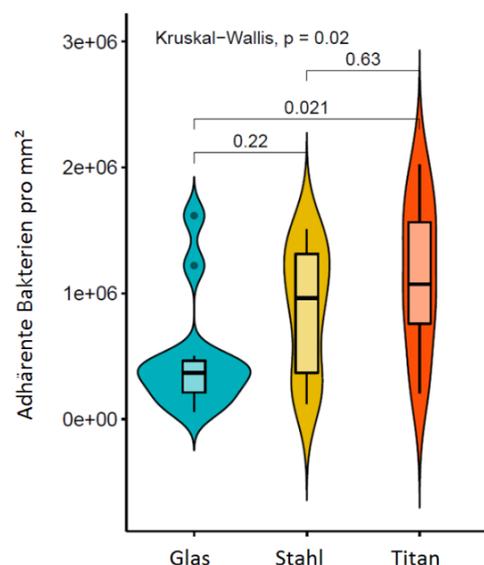
Mit Hilfe der WLSI wurde die Oberflächentextur der Materialien Stahl und Titan untersucht. Die Abbildung zeigt jeweils ein 3D-Profil eines Abschnitts der Coupons (Stahl oben, Titan unten). Bei den Materialien konnte ein Wellencharakter der Oberfläche nachgewiesen werden. Zusätzlich ist bei Titan eine klare Mikrorauheit der Oberfläche zu erkennen.

3.2.2.2 Quantifizierung adhärenter Bakterien

Für die Untersuchung der Biofilmbildung von *E. coli* auf verschiedenen Materialien wurden 12 Glas-, 16 Stahl- und 16 Titancoupons analysiert. Von jedem Coupon wurden mit Hilfe der automatisierten AKLIDES®-Technologie 72 Bilder generiert und durch die Software analysiert. Bilder und Ergebnisse, die Artefakte aufwiesen, wurden händisch entfernt und von der Datenanalyse ausgeschlossen. Pro Bild wurden nach der Softwareanalyse die absolute Anzahl adhärenter Bakterien und die Anzahl adhärenter Bakterien pro mm² erhalten. Für die Auswertung wurde jeweils der Median der adhärenten Bakterien pro mm² für jeden Coupon und pro Material berechnet.

Unter Anwendung der etablierten Methode zeigten Glascoupons die niedrigste Anzahl an adhärenenten Bakterien mit einem Minimum von 61.036 Bakterien pro mm², einem Median von 369.729 Bakterien pro mm² und einem Maximum von 503.337 Bakterien pro mm². Der Median bei den Stahlcoupons lag bei 960.630 Bakterien pro mm² und war somit ca. 2,6-fach höher im Vergleich zu Glas, aber dennoch nicht signifikant ($p = 0,22$). Die geringste Anzahl an Bakterien pro mm² auf Stahlcoupons lag bei 121.009, die maximale Anzahl bei 1.510.205. Das Material mit der höchsten Anzahl an adhärenenten Bakterien und somit der stärksten Biofilmbildung war Titan. Hier konnte ein Median von 1.072.611 Bakterien pro mm² ermittelt werden, wobei der niedrigste Wert bei 205.135 Bakterien pro mm² und der höchste Wert bei 2.022.273 Bakterien pro mm² lag. Im Vergleich zum Material Glas war die bakterielle Adhäsion auf Titan 2,9-fach und somit signifikant höher ($p = 0,021$). Der Violin-Plot kombiniert mit einem Box-Plot in Abbildung 15 zeigt signifikante Unterschiede ($p = 0,02$) bei der bakteriellen Anheftung auf den drei Materialien. Der Violin-Plot ist eine Erweiterung des Box-Plots und dient zur besseren Darstellung der Dichte und Verteilung der einzelnen Werte.

Abb. 15: Adhäsion der Bakterien auf Glas, Stahl und Titan
Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten signifikante Unterschiede bei der Adhäsion der Bakterien auf den drei verschiedenen Materialien gefunden werden. Beim paarweisen Vergleich sieht man jedoch, dass sich nur die Materialien Glas und Titan signifikant voneinander unterscheiden. Die größte Anzahl an adhärenenten Bakterien konnte auf den Titancoupons nachgewiesen werden. Der Violin-Plot zeigt eine relativ gleichmäßige Verteilung der Werte bei Stahl und Titan. Die Werte bei Glas liegen, bis auf zwei Ausreißer, eher dicht beieinander und sind alle gleich niedrig.



Ergebnisse

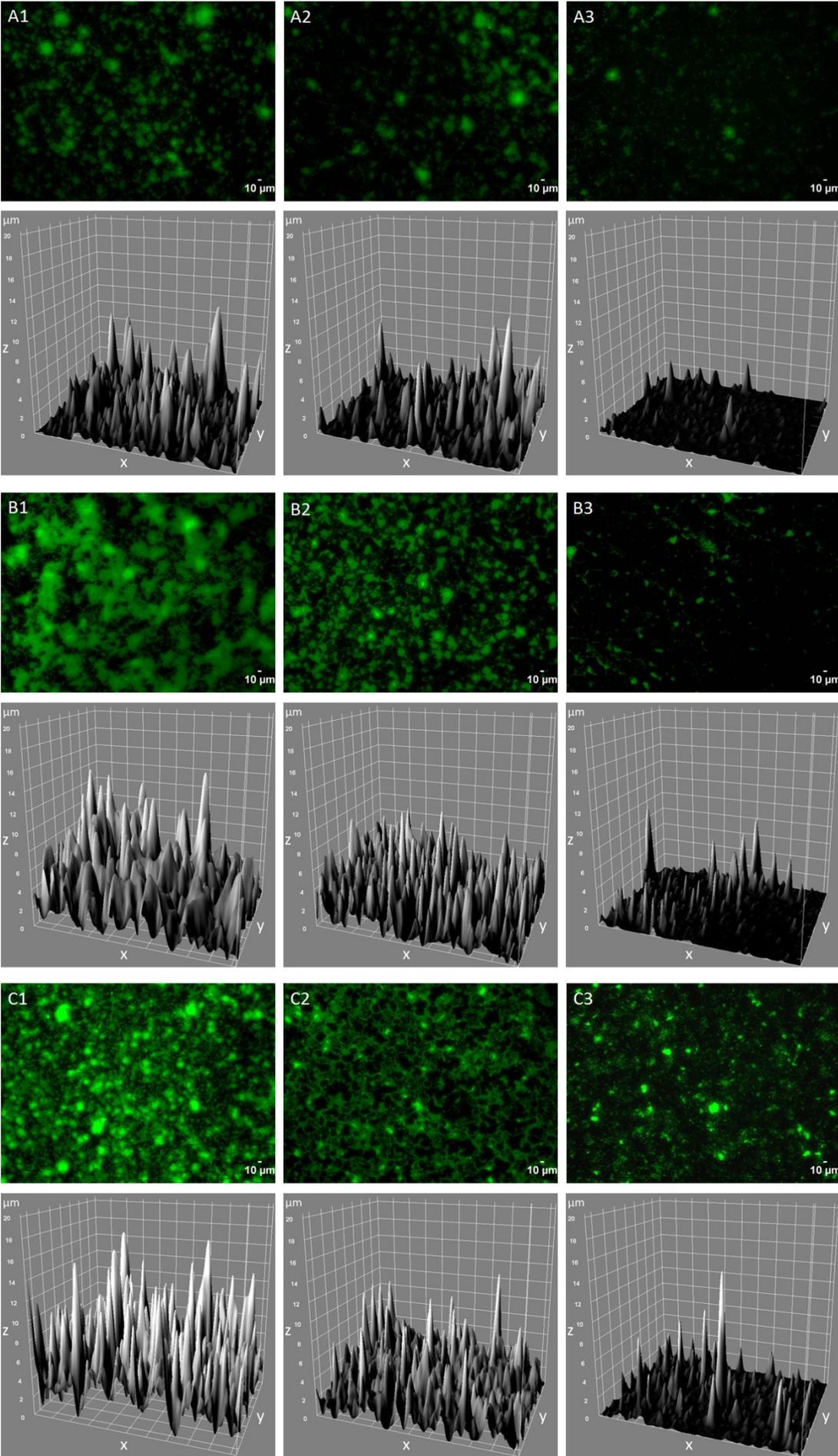


Abb. 16: AKLIDES®-Aufnahmen der Biofilme mit 3D-Darstellung der Höhenprofile

Die Materialien Glas (A1-3), Stahl (B1-3) und Titan (C1-3) wurden auf die Besiedlung durch *E. coli* in der Flusszelle untersucht. Mit Hilfe der AKLIDES®-Technologie erfolgte die automatische Bildaufnahme (20 x-Objektiv) gefolgt von einer Softwareanalyse. Die PI-gefärbten (grün) Coupons weisen eine Kolonisation von Bakterien unter Bildung dreidimensionaler Biofilme auf, wobei die stärkste Biofilmbildung bei Titan nachgewiesen werden konnte. Diese Bilder präsentieren jeweils das Minimum (A3-C3), den Median (A2-C2) und das Maximum (A1-C1) der absoluten Anzahl an adhärenen Bakterien für das jeweilige Material. Unter jeder Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme ist die entsprechende 3D-Darstellung abgebildet.

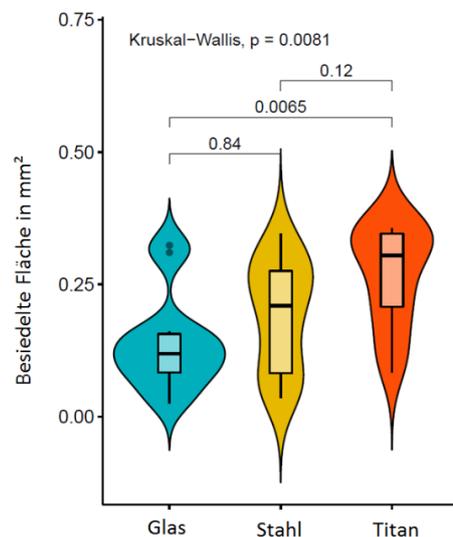
In Abbildung 16 sind repräsentative Bilder der Biofilmbildung von *E. coli* auf den drei Materialien gezeigt. Diese Bilder präsentieren jeweils das Minimum, den Median und das Maximum der absoluten Anzahl an adhärenen Bakterien für das jeweilige Material. Weiterhin sind dazu die entsprechenden Höhenprofile als 3D-Darstellung abgebildet. Umso heller ein „Peak“ oder „Gipfel“ erscheint, desto größer ist die Pixelhelligkeit und desto höher und dicker ist der gebildete Biofilm. Die Bilder verdeutlichen, dass die stärkste Biofilmbildung bei Titan nachgewiesen wurde.

3.2.2.3 Bestimmung der besiedelten Fläche

Um die durch *E. coli* besiedelte Fläche pro Bild zu ermitteln, wurden die Graustufenbilder anhand der Pixelhelligkeit mit Hilfe der Software ausgewertet. Durch den festgelegten Schwellenwert der Pixelhelligkeit von 15 konnte die Unterscheidung zwischen Bakterium und Hintergrund vorgenommen werden. Die besiedelte Fläche pro Bild wurde in mm² angegeben. Für die Auswertung wurde jeweils der Median für jeden Coupon und pro Material berechnet (Abb. 17). Die maximal besiedelbare Fläche beträgt pro Bild 0,364 mm². Bei den Glascoupons wurde ein Median der besiedelten Fläche von 0,119 mm² erreicht, was etwa 33 % der Bildfläche entspricht. Mit einem Median von 0,210 mm² und somit etwa 58 % besiedelter Fläche wiesen die Stahlcoupons zwar eine höhere, aber nicht signifikante Kolonisierung auf. Mit einer mit Bakterien bedeckten Fläche von etwa 84 % pro Bild und einem Median von 0,305 mm² wiesen die Titancoupons die größte und im Vergleich zu Glas signifikant höhere Besiedelbarkeit auf. Die Ergebnisse der Bakterienquantifizierung sind mit den Ergebnissen der besiedelten Fläche konsistent.

Abb. 17: Kolonisierte Fläche auf Glas, Stahl und Titan

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den mit *E. coli* besiedelten Flächen der unterschiedlichen Materialien. Ein paarweiser Vergleich ergab, dass die besiedelte Fläche bei Titan im Vergleich zu Glas signifikant größer ist. Bei dem Material Glas liegen die Werte, bis auf zwei Ausreißer, im unteren Bereich dicht beieinander; bei Stahl und Titan sind sie eher gleichmäßig über den Wertebereich verteilt.



3.2.2.4 Bestimmung der Biofilmdicke

Um die Dicke der dreidimensionalen Biofilme zu bestimmen, wurde ein Höhenprofil von jedem Bild erstellt und davon eine 3D-Darstellung mit dem Programm ImageJ generiert. Mit dem *FindMaxima* Algorithmus, der auf die Höhenprofile angewendet wurde, wurden die Höhen der „Peaks“ oder „Gipfel“ der dreidimensionalen Biofilme in μm erhalten. Für die Auswertung wurde jeweils die maximale Höhe (95 % Quantil aller Werte) eines jeden Bildes genutzt, um den Median der maximalen Höhe in μm pro Coupon zu erhalten (Abb. 18).

Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnten erneut signifikante Unterschiede zwischen den drei Materialien nachgewiesen werden. Der paarweise Vergleich ergab, dass im Vergleich zu Glascoupons signifikant dickere Biofilme auf Stahl- und Titancoupons gebildet wurden. Während bei Stahl größere Höhenwerte auftraten, waren die Werte für Glas gleichmäßig verteilt. Obwohl die Werte für die Anzahl der adhären-ten Bakterien und die kolonisierte Fläche von Titan eine größere Spannweite aufwiesen, konnten Biofilme mit der gleichen maximalen Höhe auf fast allen Titancoupons gefunden werden.

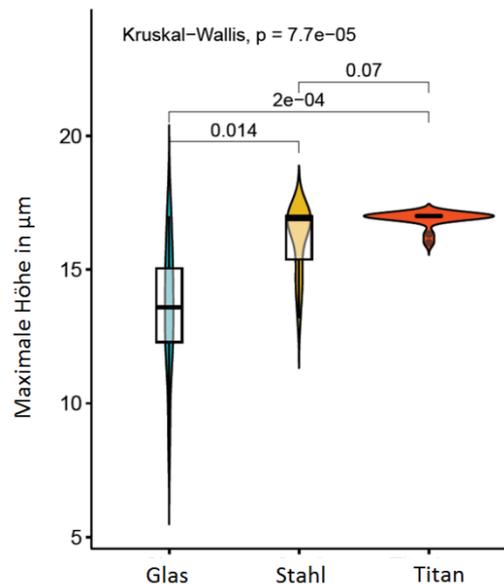


Abb. 18: Biofilmdicke auf Glas, Stahl und Titan

Der Violin-Plot mit Box-Plot-Overlay zeigt die maximalen Höhen der von *E. coli* gebildeten Biofilme auf Glas, Stahl und Titan. Im Vergleich zu Stahl und Titan wurden auf den Glascoupons deutlich dünnere Biofilme gebildet. Die Höhenwerte bei den Glascoupons sind gleichmäßig verteilt, während bei Stahl mehr höhere Werte auftreten. Bei Titan sind die Biofilme auf allen Coupons mit Ausnahme von zwei Ausreißern gleichmäßig hoch.

3.3 Etablierung von Antibiotogrammen für Biofilme

3.3.1. Prinzip der Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Biofilmen

Um die Antibiotikaempfindlichkeit von Bakterien zu bestimmen, werden Antibiotogramme z.B. mit Hilfe des Agardiffusionstests oder der Dilutionsmethode erstellt. Die Ergebnisse liefern jedoch nur eine Aussage über die Antibiotikaempfindlichkeiten planktonischer Bakterien und sind für den Einsatz bei im Biofilm lebenden Bakterien nicht gültig. Da es bisher keine bildbasierte Methode für die Erstellung von Biofilm-Antibiotogrammen in der Routinediagnostik gibt, wurde die AKLIDES®-Technologie für die Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit von Biofilmbakterien adaptiert. Im Allgemeinen folgte der Ablauf des Assays dem Schema in Abbildung 19. Da eine Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien in Biofilmen ermöglicht werden sollte, wurde die Lebend-/Totfärbung (SYTO 9/PI) angewendet, um den Einfluss der Antiinfektiva beurteilen zu können.

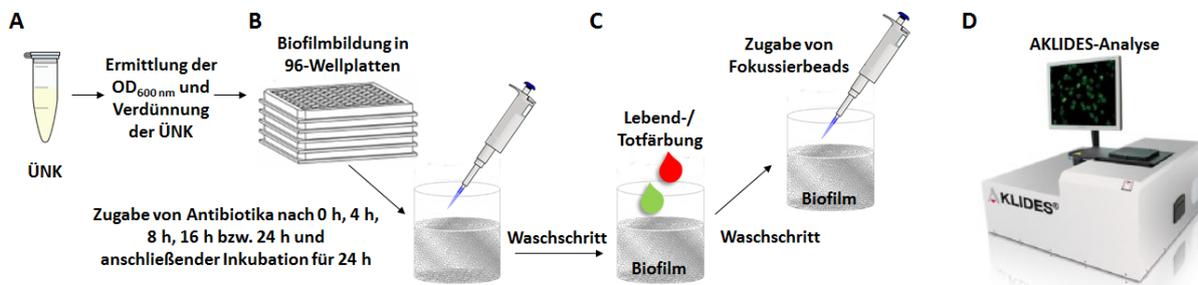


Abb. 19: Schematische Darstellung der Antibiotikabehandlung der Biofilme

(A) Nach der Herstellung der ÜNK erfolgte die Messung der OD_{600 nm} mit anschließender Verdünnung im entsprechenden Medium. (B) Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend in 96-Well Platten pipettiert. Die Zugabe von Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen fand nach 0 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h Inkubation der Biofilme bei 37°C statt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h gefolgt von einem Waschschritt zur Entfernung der nicht-adhärenen Bakterienzellen. Die Biofilme wurden mit SYTO 9 (grün) und PI (rot) gefärbt und ein weiteres Mal gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von Fokussierbeads für die automatisierte Analyse. (C) Die gefärbten Biofilme wurden mit der AKLIDES®-Technologie analysiert.

Bei der automatisierten AKLIDES®-Analyse erfolgten für jedes Well die Aufnahme eines Übersichtsbildes, die Ermittlung der Fluoreszenzintensität (analog zur VideoScan-Technologie) und Detailaufnahmen von 10 Stellen mit den stärksten Fluoreszenzsignalen im Well. Für die Messung wurden ebenfalls Referenzbeads und Fokussierbeads verwendet.

3.3.2 Analyse der Antibiotikaempfindlichkeit in MSSA- und MRSA-Biofilmen

3.3.2.1 Untersuchung der Biofilmbildung der MSSA- und MRSA-Isolate

Zunächst wurden 18 MSSA- und 24 MRSA-Isolate auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Hierfür wurden die Isolate in verschiedenen Kulturmedien bei 37°C für 48 h inkubiert. Die Biofilme wurden gewaschen, mit SYTO 9 gefärbt, erneut gewaschen und es erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse. Um eine qualitative Aussage über die Fähigkeit zur Biofilmbildung treffen zu können, wurden hier nur Übersichtsaufnahmen erstellt, um für die weiteren Untersuchungen jeweils ein MSSA- und ein MRSA-Isolat mit einer soliden Biofilmbildung zu identifizieren.

Alle *S. aureus*-Isolate waren in der Lage, Biofilme zu bilden. Bei den MRSA-Isolaten fiel auf, dass diese stärkere Biofilme in den nährstoffreichen Medien (LB, TSB und BHI) als im M63-Medium generierten. Weiterhin zeigten die Übersichtsaufnahmen eine viel stärkere Biofilmbildung bei den MSSA-Isolaten. Wie auch bei den MRSA-Isolaten fiel die Biofilmbildung bis auf die Ausnahme eines Isolates (MSSA 7820) im Minimalmedium M63 schwächer aus. In Abbildung 20 sind exemplarisch Übersichtsbilder von zwei 96-Well Platten dargestellt. Für die weiteren Experimente wurden jeweils ein MRSA- (Isolat Nr. 3281) und ein MSSA-Isolat (Isolat Nr. 6982) ausgewählt. Alle weiteren Untersuchungen zur Biofilmbildung erfolgten im BHI-Medium.

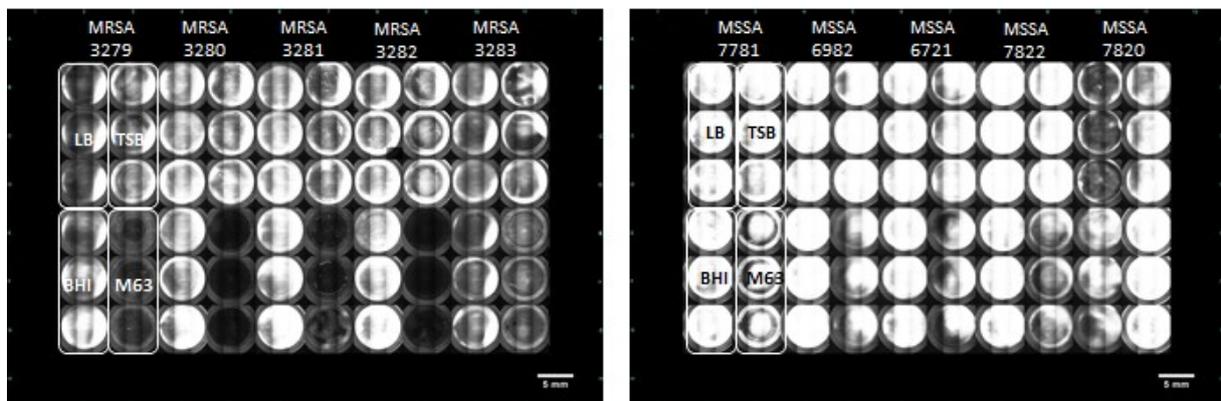


Abb. 20: Übersichtsbilder der 96-Well Platten mit *S. aureus*-Biofilmen

Die Abbildung zeigt die Biofilmbildung von je fünf MRSA- (links) bzw. MSSA-Isolaten (rechts). Jedes Isolat wurde auf Biofilmbildung in vier verschiedenen Medien im Triplikat untersucht. Die MSSA-Isolate bilden, erkennbar an der intensiveren Färbung, stärkere Biofilme aus. Bis auf das Isolat MSSA 7820 ist die Biofilmbildung im Vergleich zum Minimalmedium M63 in den nährstoffreichen Medien stärker ausgeprägt.

3.3.2.2 Ermittlung der MHK

Die Empfindlichkeitsprüfung von Antibiotika wurde mit dem VITEK®2 in der Mikrobiologie der Klinikum Niederlausitz GmbH am Standort Lauchhammer durchgeführt. Tabelle 14 zeigt das Resistenzprofil der beiden Isolate. Das MSSA-Isolat war gegenüber allen getesteten Wirkstoffen sensibel. Der MRSA-Stamm zeigte Resistenzen gegenüber Antibiotika aus der Gruppe der Penicilline, Cephalosporine,

Ergebnisse

Carbapeneme, Fluorchinolone, Tetracycline, Makrolide, Lincosamide und war zudem auch positiv im Cefoxitinscreening (früher als Methicillin- oder Oxacillinscreening durchgeführt), welches zur Bestätigung eines MRSA diente. Da eine Auswahl dieser Antibiotika für die Anwendung im Biofilm vorgesehen war, wurden vor allem Antibiotika ausgewählt, auf die das MRSA-Isolat sensibel reagiert. Antibiotika, gegen die Isolate bereits in der planktonischen Lebensform resistent sind, zeigen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Wirkung auf im Biofilm lebende Bakterien. Für die Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit in den Biofilmen der beiden *S. aureus*-Isolate wurden vier Antibiotika aus vier unterschiedlichen Wirkstoffklassen ausgewählt: Ampicillin (Penicilline), Tigecyclin (Glycylcycline), Vancomycin (Glycopeptide) und Rifampicin (Ansamycine). Für jedes Isolat wurde die Konzentration so gewählt, dass sie einen Wert unterhalb der ermittelten MHK lag.

Tab. 14: Antibiotikaresistenzprofil mit entsprechenden MHK-Werten

Antibiotika	Antibiotikagruppe	MRSA (3281)		MSSA (6982)	
		MHK µg/ml	Interpretation	MHK µg/ml	Interpretation
Benzylpenicillin	Penicilline	≥ 0,5	R	≤ 0,03	S
Oxacillin	Penicilline	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Ampicillin	Penicilline	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Piperacillin	Penicilline	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Ampicillin/Sulbactam	Penicilline	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Piperacillin/Tazobactam	Penicilline	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Cefazolin	Cephalosporine	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Cefuroxim	Cephalosporine	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Imipinem	Carbapeneme	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Levofloxacin	Fluorchinolone	≥ 8	R	≤ 0,12	S
Moxifloxacin	Fluorchinolone	≥ 8	R	≤ 0,12	S
Gentamicin	Aminoglykoside	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
Tetracyclin	Tetracycline	2	R	≤ 1	S
Tigecyclin	Glycylcycline	≤ 0,12	S	≤ 0,12	S
Erythromycin	Makrolide	≥ 8	R	1	S
Clindamycin	Lincosamide	≥ 4	R	0,25	S
Vancomycin	Glykopeptide	≤ 0,5	S	1	S
Teicoplanin	Glykopeptide	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
Daptomycin	Cyclische Lipopeptide	0,25	S	0,25	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	Diaminopyrimidine	≤ 10	S	≤ 10	S
Rifampicin	Ansamycine	≤ 0,03	S	≤ 0,03	S
Fusidinsäure	Steroid-Antibiotika	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
Fosfomycin	Phosphonsäurederivate	≤ 8	S	≤ 8	S
Linezolid	Oxazolidinone	1	S	2	S
Mupirocin	Lokalantibiotika	≤ 2	S	≤ 2	S
Cefoxitin-Screen	Cephalosporine	POS	+	NEG	-
Induzierbare Clindamycinresistenz	Lincosamid	NEG	-	NEG	-

3.3.2.3 Effekt der Antibiotika auf die Biofilmbildung

Um den Einfluss der verschiedenen Antibiotika auf die Ausbildung eines Biofilms und die Vitalität der Bakterien im bereits gebildeten Biofilm zu testen, wurden diese in unterschiedlichen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert. Der Effekt der antibakteriellen Substanzen auf die Ausbil-

Ergebnisse

Die Bildung eines Biofilms wurde untersucht, indem diese zeitgleich mit der hergestellten Bakterienverdünnung in die 96-Well Platten pipettiert und für 24 h bei 37°C inkubiert wurden („0 Stunden Biofilm“). Abhängig von der jeweils eingesetzten Konzentration konnte bei allen vier verwendeten Antibiotika eine Verhinderung der Biofilmbildung beobachtet werden. Diese Konzentration wird als *biofilm prevention concentration* (BPC) bezeichnet (Fernández-Olmos *et al.*, 2012; Macia *et al.*, 2014). Die mittels VITEK®2 ermittelte Ampicillinresistenz des MRSA-Isolates konnte mit der AKLIDES®-Technologie bestätigt werden. Hier lag die BPC bei 1024 µg/ml, bzw. im Bereich zwischen 512-1024 µg/ml. Beim MSSA-Isolat konnten bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml Ampicillin keine lebenden Bakterien und bei einer Konzentration von 2 µg/ml Ampicillin kein Biofilm mehr nachgewiesen werden (Abb. 21).

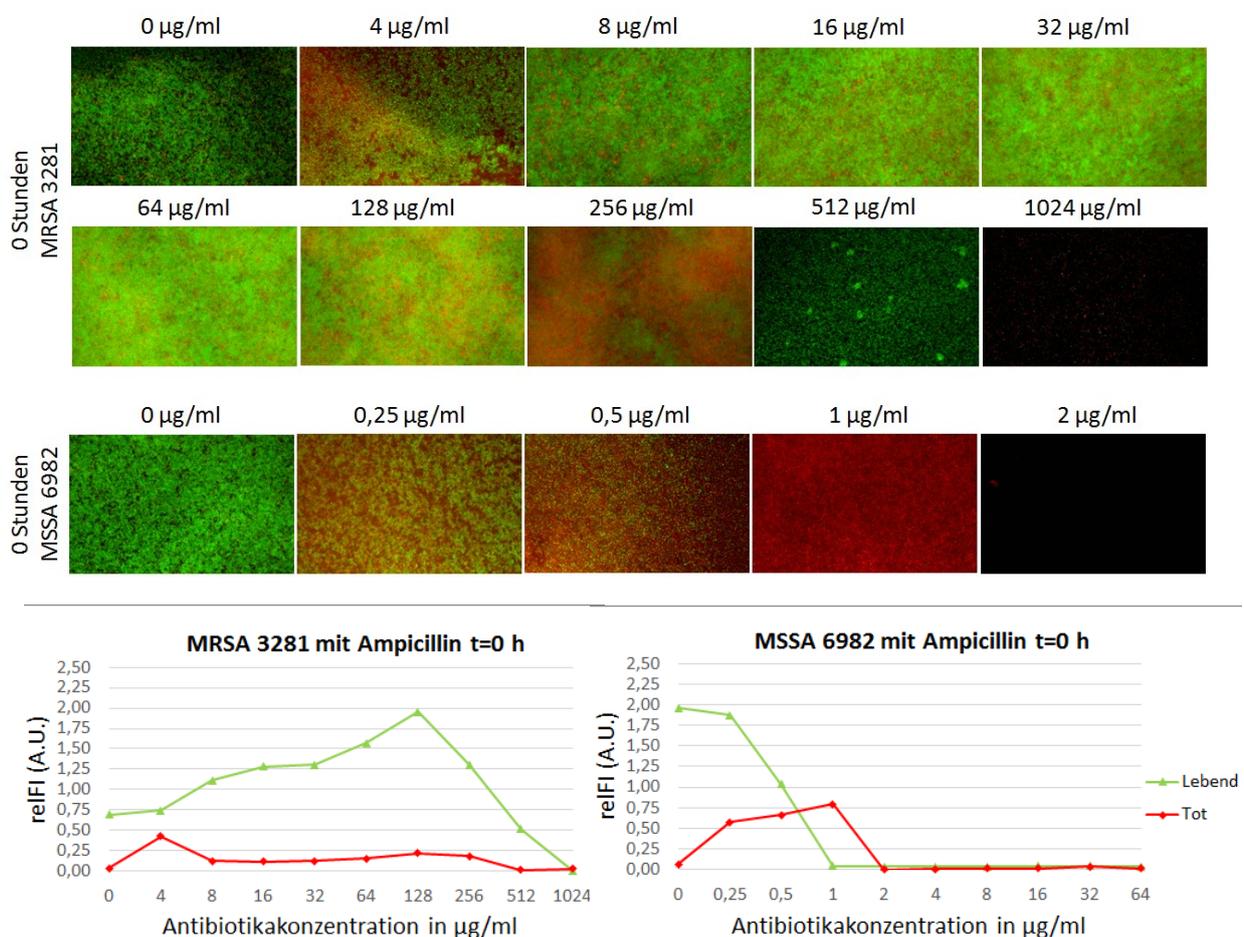


Abb. 21: Einfluss von Ampicillin auf die Biofilmbildung der *S. aureus*-Isolate

Bei der Herstellung der Biofilme wurden den Bakterienverdünnungen in steigenden Konzentrationen Antibiotika zugegeben, um deren Effekte auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Wells mit der Lebend-/Totfärbung (grüne Bakterien/rote Bakterien) gefärbt und es erfolgte die automatisierte Messung der Fluoreszenzintensität (relFI) und die Aufnahme von Detailbildern mit einem 20 x-Objektiv. Bei den Detailbildern ist zu berücksichtigen, dass diese repräsentativ für die Areale im Well sind, welche die höchste Fluoreszenzintensität aufweisen. Bei der Koinkubation der Bakterien mit Ampicillin, konnte die Resistenz des MRSA-Isolates mit der AKLIDES®-Technologie bestätigt werden. Erst ab einer Konzentration > 1024 µg/ml sah man eine Verhinderung der Biofilmbildung, erkennbar an einem schwarzen Detailbild ohne Bakterien. Beim MSSA-Isolat konnte die Biofilmbildung bereits bei Anwesenheit von 2 µg/ml Ampicillin verhindert werden.

Ergebnisse

Im Antibiogramm wurden die *S. aureus*-Isolate unter Nutzung von Vancomycin als sensibel eingestuft. Auch bei der Analyse der Ausbildung eines Biofilms in Gegenwart von Vancomycin konnte hier eine geringe BPC nachgewiesen werden. Die BPC des MRSA-Isolates lag bei 2 µg/ml. Eine Konzentration von 4 µg/ml war notwendig, um die Biofilmbildung des MSSA-Isolates zu verhindern (Abb. 22). Die Detailbilder und Fluoreszenzintensitäten der Biofilme ohne Antibiotika (0 µg/ml) verdeutlichen hier auch nochmal die stärkere Biofilmbildung des MSSA-Isolates im Vergleich zum MRSA-Isolat.

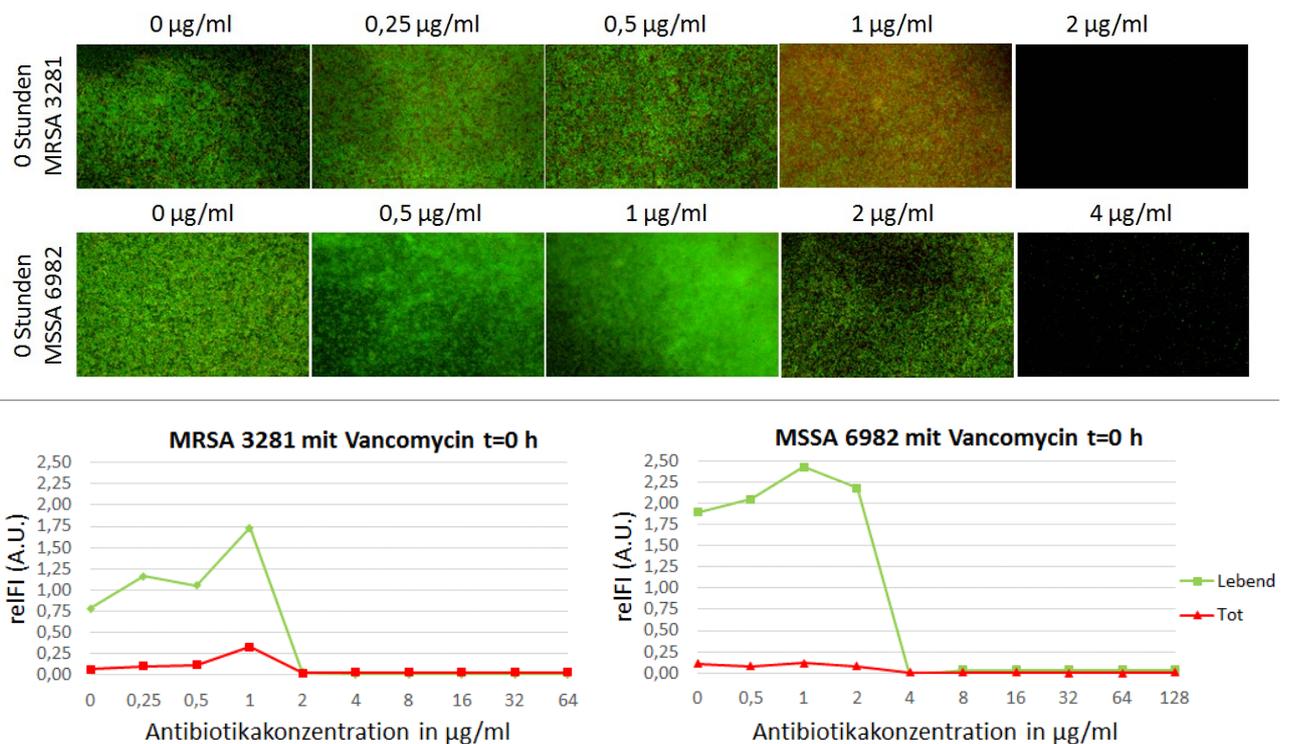


Abb. 22: Einfluss von Vancomycin auf die Biofilmbildung der *S. aureus*-Isolate

Bei der Koinkubation der Bakterien mit 2 µg/ml Vancomycin konnte die Ausbildung eines MRSA-Biofilms verhindert werden. Eine Konzentration von 4 µg/ml war notwendig, um die Biofilmbildung des MSSA-Isolates zu unterbinden.

Bei der Koinkubation von Tigecyclin und Rifampicin mit den *S. aureus*-Isolaten konnten im Vergleich zu Ampicillin und Vancomycin geringere BPC erzielt werden. Die Isolate bildeten bei einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Tigecyclin keine messbaren Biofilme mehr aus. Rifampicin stellte sich als das effektivste Antibiotikum heraus. Bereits bei einer Konzentration von 0,03 µg/ml kam es zur Verhinderung der Ausbildung von Biofilmen. In Tabelle 15 sind die MHK und BPC der *S. aureus*-Isolate gegenübergestellt. Auch wenn die MHK und BPC nicht direkt miteinander vergleichbar sind, so konnten die Ergebnisse der VITEK®2-Analyse prinzipiell bestätigt werden. Die Ampicillinresistenz des MRSA-Isolates zeigte sich auch bei dem Versuch, die Biofilmbildung zu verhindern, da hierfür sehr hohe Antibiotikakonzentrationen notwendig waren. Für Rifampicin konnten für die MHK und die BPC sogar gleiche Werte ermittelt werden.

Tab. 15: Gegenüberstellung der MHK und BPC der *S. aureus*-Isolate

Antibiotikum	MRSA 3281		MSSA 6982	
	MHK µg/ml	BPC µg/ml	MHK µg/ml	BPC µg/ml
Ampicillin	4	1024	0,25	2
Vancomycin	0,5	2	1	4
Tigecyclin	0,12	0,5	0,12	0,5
Rifampicin	0,03	0,03	0,03	0,03

3.3.2.4 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit in MSSA- und MRSA-Biofilmen

Die Wirkung der Antiinfektiva auf die im bereits gebildeten Biofilm lebenden Bakterien wurde durch Zugabe der Wirkstoffe nach 4 h, 8 h, 16 h bzw. 24 h der Biofilmbildung und weiterer Inkubation für 24h bei 37°C analysiert. Die Antibiotika wurden in unterschiedlichen Konzentrationen als geometrische Verdünnungsreihe auf die Biofilme appliziert. Hierbei sollte untersucht werden, wie die Reife des Biofilms mit der Wirkung des Antibiotikums (Abtöten oder Wachstumshemmung der Bakterien) korreliert. Abbildung 23 zeigt beispielhaft die Wirkung von steigenden Vancomycinkonzentrationen auf unterschiedliche Reifestufen der *S. aureus*-Biofilme.

Bei der Untersuchung des Effekts von Vancomycin (eingesetzte Konzentrationen: MRSA-Isolat 0,25-64 µg/ml; MSSA-Isolat 0,5-128 µg/ml) konnte allgemein festgestellt werden, dass mit steigender Vancomycinkonzentration sowohl die Anzahl lebender als auch toter Bakterien zunächst zunimmt. Je nach Reife des Biofilms kann man ab einer bestimmten Konzentration von Vancomycin, eine Abnahme der Anzahl lebender und toter Bakterien erkennen.

Die bakteriozide Wirkung des Vancomycin konnte man verstärkt in den weniger reifen Biofilmen (4 h Biofilm) erkennen. Bei Zugabe von 4 µg/ml Vancomycin nimmt die Anzahl lebender Bakterien im Biofilm der beiden *S. aureus*-Isolate ab. Mit Hilfe der gemessenen Fluoreszenzintensitäten und Detailbilder kann man erkennen, dass diese Biofilme nur noch vereinzelt lebende Bakterien aufweisen und zum Hauptteil aus abgetöteten Bakterien bestehen.

Mit zunehmender Reife der Biofilme (8 h, 16 h und 24 h) nimmt die antibakterielle Wirkung des Vancomycin ab. Bei den 8 h alten Biofilmen der *S. aureus*-Isolate kann man erst bei Zugabe hoher Vancomycinkonzentrationen abgetötete Bakterien in den Detailbildern erkennen. Wie bereits bei der Untersuchung des Effektes von Antibiotika auf die Ausbildung von Biofilmen gezeigt wurde, reagiert der MRSA beim Vergleich der beiden Isolate sensibler auf Vancomycin. Die reiferen Biofilme (16 h und 24 h) des MSSA-Isolates weisen selbst bei hohen Vancomycinkonzentrationen kaum tote Bakterien auf.

Ergebnisse

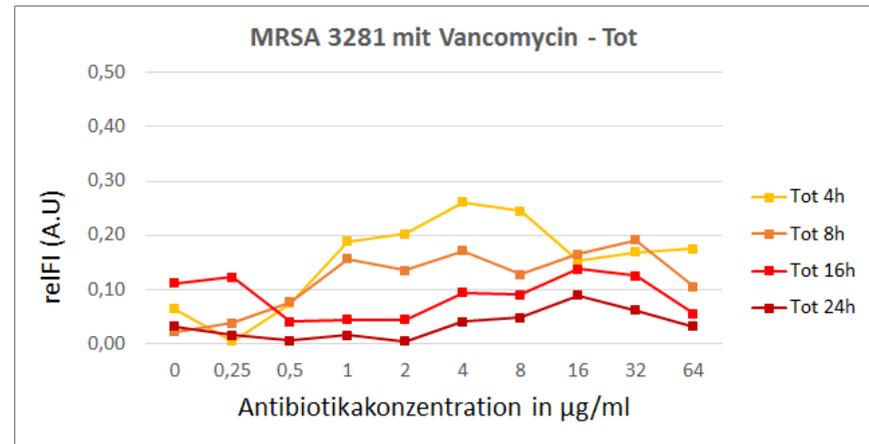
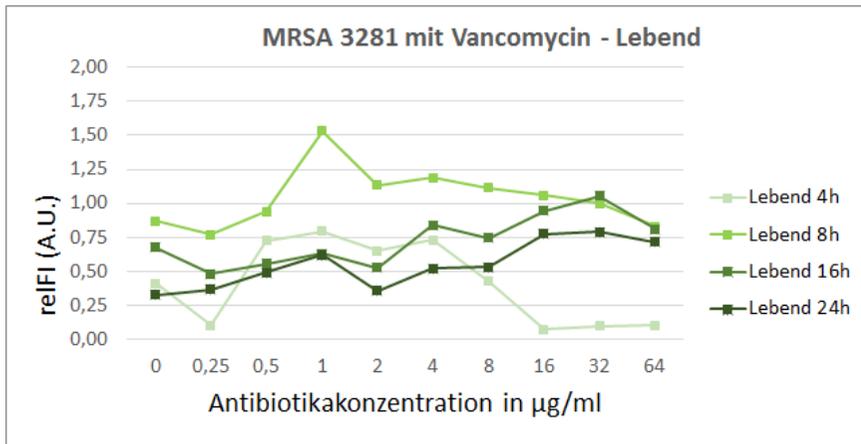
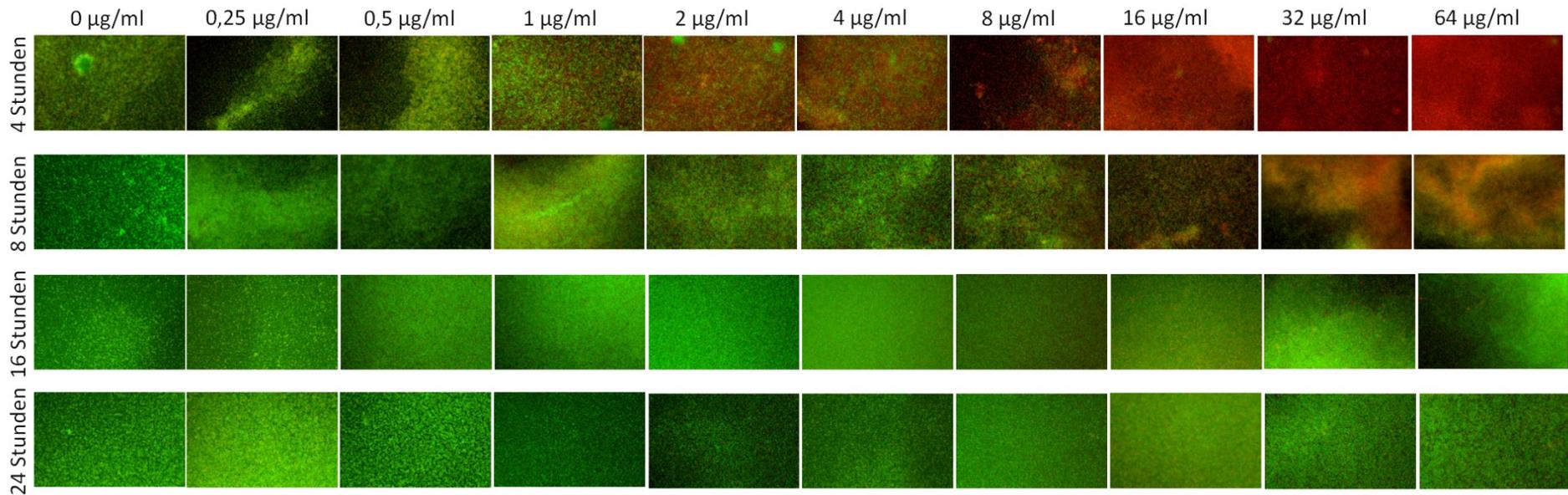
Bei der Zugabe von Ampicillin (eingesetzte Konzentrationen: MRSA-Isolat 4-1024 µg/ml; MSSA-Isolat 0,5-128 µg/ml) auf die 4 h alten Biofilme sah man wie auch beim Einsatz von Vancomycin beim MRSA-Isolat zunächst eine Zunahme der Anzahl lebender und toter Bakterien im Biofilm. Erst bei einer Konzentration von 256 µg/ml Ampicillin wurden die Bakterien im Biofilm abgetötet. Auch beim MSSA-Isolat konnte man die antibakterielle Wirkung gut nachweisen. Bei mehr als 4 h alten Biofilmen war nach der Analyse der Detailbilder und der gemessenen Fluoreszenzintensitäten keine nennenswerte Veränderung im Biofilm zu erkennen.

Eine Zugabe von Tigecyclin (eingesetzte Konzentrationen: 0,06-16 µg/ml) zu einem 4 h alten MSSA-Biofilm führte schon ab einer geringen Konzentration von 0,5 µg/ml zu einer Reduktion des Biofilms. Der Biofilm wurde teilweise aufgelöst und es waren nur noch dünner besiedelte und somit schwächere Biofilme zu erkennen. Die Anzahl der lebenden Bakterien in Biofilmen, die älter als 4 h waren, blieb trotz steigender Antibiotikakonzentration konstant.

Die Inkubation der Biofilme mit Rifampicin (eingesetzte Konzentrationen: 0,03-8 µg/ml) führte im Vergleich zur Kontrolle ohne Antibiotika zu schwächer ausgebildeten Biofilmen. Abgetötete Bakterienzellen waren jedoch kaum zu finden. Die Biofilmdicke schien jedoch deutlich reduziert zu sein.

Ergebnisse

A Vancomycin – MRSA 3281



Ergebnisse

B Vancomycin – MSSA 6982

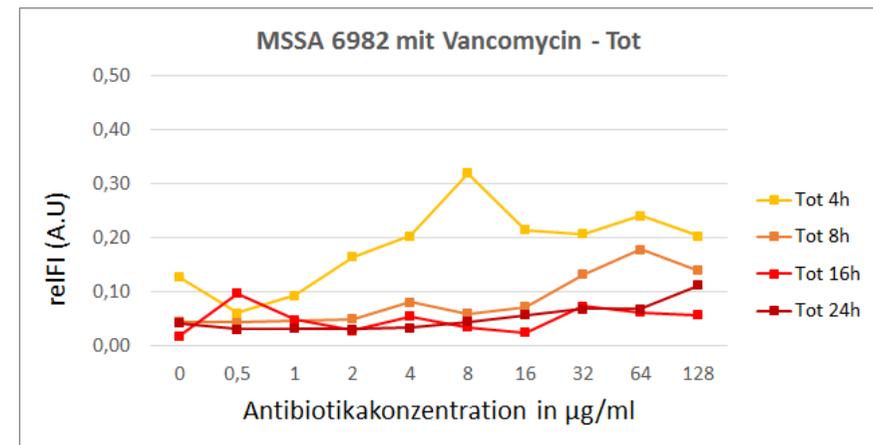
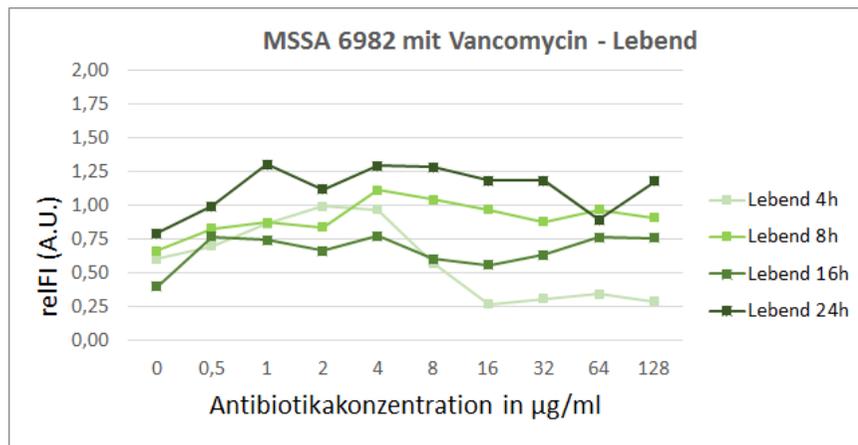
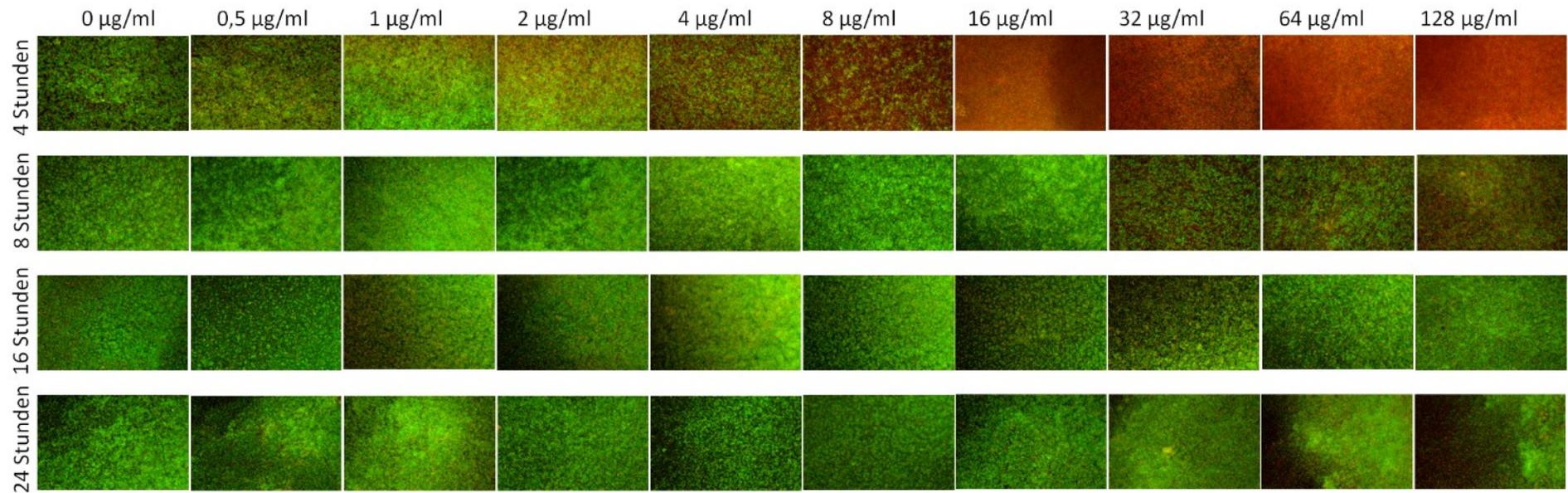


Abb. 23: Detailaufnahmen und Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlich reifen *S. aureus*-Biofilme nach Zugabe steigender Vancomycinkonzentrationen

Der bakteriozide Effekt des Vancomycins war bei beiden Isolaten im 4 h alten Biofilm gut zu erkennen. Mit Zugabe steigender Antibiotikakonzentrationen war eine Zunahme der toten Bakterienzellen zu sehen und zu messen. Beim MRSA-Isolat (A) sah man einen Abfall der Anzahl lebender Bakterien ab 4 µg/ml Vancomycin, die ab einer Konzentration von 16 µg/ml nahezu gegen 0 ging. Beim MSSA-Isolat (B) war das ähnlich, jedoch waren selbst bei der höchsten Antibiotikakonzentration noch viele lebende Bakterienzellen in den Detailbildern zu sehen. Je reifer die Biofilme waren, desto weniger antibakterielle Effekte waren zu verzeichnen.

Bei der Analyse der Detailbilder war bei der Inkubation der 4 h alten Biofilme mit Vancomycin eine strukturelle Veränderung der Biofilme zu erkennen (Abb. 24). Schon bei geringen Konzentrationen des Antibiotikums bildete das MRSA-Isolat größere Kolonien oder Aggregate von lebenden Bakterienzellen aus, die mit steigender Antibiotikakonzentration abnahmen. Diese Strukturen wurden ausschließlich beim 4 h alten Biofilm mit Vancomycin-Koinkubation beobachtet. Beim MSSA-Isolat trat die Bildung von kleineren Zellverbänden oder Herden von toten und lebenden Bakterien auf, wobei Letztere mit steigender Antibiotikakonzentration abnahmen. Die Aufnahmen der *S. aureus*-Biofilme mit Koinkubation von 8 µg/ml Vancomycin deuten an, dass die noch wenigen, verbliebenen Zellverbände aus lebenden Bakterienzellen unterhalb der toten Bakterien liegen.

Allgemein zeigen die Ergebnisse, dass die Biofilmbildung selbst bei vorliegender Resistenz im Fall des MRSA-Isolates verhindert werden konnte. Bei 4 h alten Biofilmen konnte mit hohen Konzentrationen von Vancomycin und Ampicillin ein Abtöten der Bakterien im Biofilm erreicht werden. Bei Biofilmen mit einer Reife von 8 h und mehr konnte man beim Einsatz der vier verschiedenen Antibiotika kaum eine bakterizide Wirkung sehen.

Ergebnisse

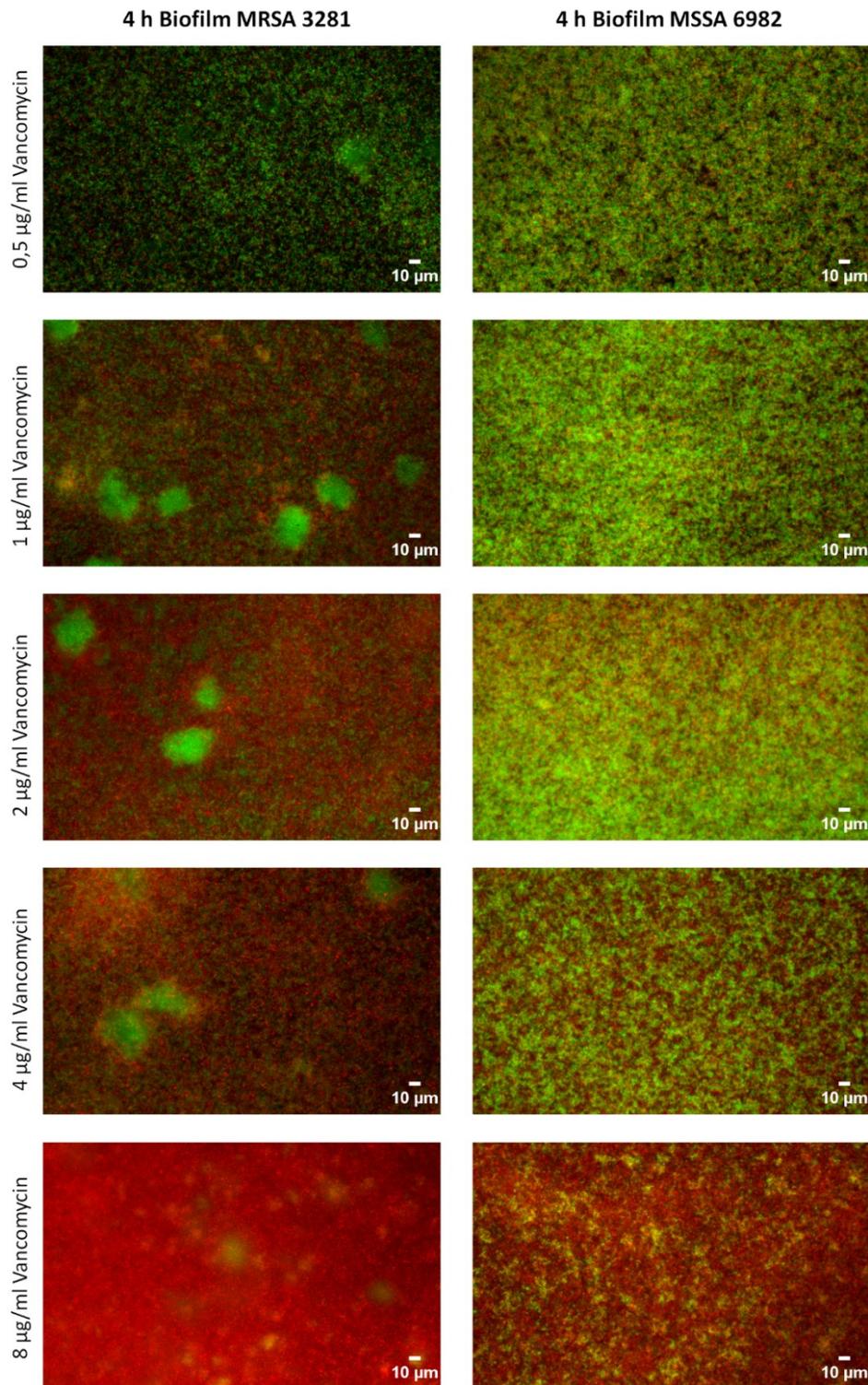


Abb. 24: Strukturelle Veränderungen der *S. aureus*-Biofilme mit steigender Antibiotikakonzentration

In der Abbildung sieht man die Veränderung der 4 h alten Biofilme mit zunehmender Vancomycinkonzentration. Allgemein war ein Anstieg der Gesamtzellzahl im Biofilm zu erkennen. Die antibiotische Wirkung war beim MSSA-Isolat anfangs weniger ausgeprägt, was an der allgemein stärkeren Biofilmbildung liegen könnte. Auch strukturelle Veränderungen konnten mit der AKLIDES®-Technologie identifiziert werden. Beim MRSA-Isolat war ab der Koinkubation mit 1 µg/ml Vancomycin eine Bildung großer Kolonien oder Aggregate von lebenden Zellen zu erkennen, die mit steigender Konzentration abzunehmen schienen. Der MSSA-Biofilm wies bei steigenden Konzentrationen im Vergleich zum MRSA-Isolat eine Bildung kleinerer Zellverbände von lebenden Bakterien auf, die bis zu einer Konzentration von 8 µg/ml deutlich weniger wurden.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des Genotyps und Phänotyps in Zusammenhang mit der Biofilmbildung

In dieser Arbeit wurden 187 *E. coli*-Isolate auf einen möglichen Zusammenhang des Geno- und Phänotyps verschiedener *E. coli*-Pathotypen mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Hierbei wurde das Vorhandensein Biofilm-assoziiierter Gene (Genotyp), die Motilität, die Curliexpression und die Celluloseproduktion (Phänotyp) analysiert. Mit der VideoScan-Technologie wurde eine neue Screeningmethode für die Analyse der Biofilmbildung etabliert. Diese basiert auf vollautomatisierter Fluoreszenzmikroskopie und ermöglicht ein bildbasiertes Hochdurchsatzscreening von Biofilmen.

Bei der Untersuchung Biofilm-assoziiierter Gene wurde eine hohe Prävalenz festgestellt, was darin begründet sein kann, dass die Mehrzahl der Mikroorganismen in der Natur als Biofilme existiert. Besonders für pathogene Bakterien ist die Biofilmbildung ein wichtiger Schritt während des Infektionsprozesses des Wirts und trägt deswegen zur Pathogenität der Erreger bei (Parsek and Singh, 2003). Bei *E. coli* ist die Motilität weit verbreitet und wird bei pathogenen Bakterien als Virulenzfaktor angesehen (Duan *et al.*, 2013; Josenhans and Suerbaum, 2002; Van Houdt and Michiels, 2005). Das Gen, welches für die Flagellin-Untereinheit FliC der *E. coli*-Flagelle kodiert (Macnab, 1992; Macnab R.M., 1996), wurde bei 144 (77 %) der *E. coli*-Isolate detektiert. Bei der Untersuchung der Motilität im Weichagar konnten insgesamt 139 (74 %) motile Isolate identifiziert werden. Von diesen 139 Isolaten konnte bei 25 (18 %) Isolaten keine Amplifikation des *fliC* Gens nachgewiesen werden. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein, dass innerhalb der verschiedenen *E. coli*-Isolate Sequenzvariationen des Gens (Reid *et al.*, 1999) und/oder die Expression eines anderen oder neuen Flagellin-Gens vorlagen (Ratiner, 1998). Pratt und Kolter zeigten in einer Studie, dass nicht Chemotaxis, sondern Motilität bei *E. coli* für die Bildung eines Biofilms notwendig ist (Pratt and Kolter, 1998). Dennoch sind auch nicht-motile Bakterien in der Lage, auf Oberflächen zu adhären und Biofilme zu bilden (Pratt and Kolter, 1999). Eine Studie von Sheikh *et al.* zeigte, dass eine unbewegliche EAEC-Mutante Biofilme auf Kunststoff- und Glasoberflächen bilden konnte. Das Ausmaß der Biofilmbildung unterschied sich dabei nicht von dem des Wildtyps (Sheikh *et al.*, 2001). Dieser Fakt wird auch durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Im Vergleich zu den HFEC-Isolaten, bei denen 92 % motil waren, konnte nur bei 67 % der EAEC-Isolate eine Motilität im Weichagar nachgewiesen werden, obwohl EAEC-Isolate als die stärksten *E. coli*-Biofilmbildner identifiziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Motilität kein notwendiger Faktor für die Biofilmbildung ist, da keine Korrelation zwischen der Motilität und der Biofilmbildung gefunden werden konnte.

Adhäsine sind weitere Faktoren, die eine bedeutende Rolle bei der Biofilmbildung einnehmen. Weit verbreitet bei kommensalen und pathogenen *E. coli* sind die Typ I Fimbrien (Sauer *et al.*, 2000). An der Spitze dieser Fimbrien befindet sich das Protein FimH, welches die Haftfähigkeit der Fimbrien vermittelt (Kisiela *et al.*, 2011). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Fimbrien eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen tragen, da es bei *fimH*-Mutanten zu einer verminderten initialen Anheftung kam (Moreira *et al.*, 2003; Orndorff *et al.*, 2004; Pratt and Kolter, 1998). Die Ergebnisse der PCR ergaben ein Fehlen von *fimH* bei 33,3 % der EAEC-Isolate. Dies bedeutet, dass diese Adhäsine beim Pathotyp EAEC wahrscheinlich nicht entscheidend für die Biofilmbildung sind und es andere Adhäsine, wie z.B. aggregative Adhärenzfimbrien gibt, welche die initiale Adhäsion während der Biofilmbildung vermitteln (Sheikh *et al.*, 2001).

P-Fimbrien gehören ebenfalls zur Gruppe der Adhäsine und werden über das *pap*-Gencluster kodiert. *PapC*, welches für ein Membranprotein, das beim Aufbau der P-Fimbrien benötigt wird, gehört ebenfalls zu den Biofilm-assoziierten Genen. Diese Pyelonephritis-assoziierten Pili (*pap*) werden beim Pathotyp UPEC gefunden und nehmen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese ascendierender Harnwegsinfektionen, wie z.B. der Pyelonephritis, ein (Källenius *et al.*, 1981; Plos *et al.*, 1995). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten wurde für *papC* eine hohe Prävalenz von 66,7 % beim Pathotyp UPEC nachgewiesen. Da EAEC-Isolate als stärkste Biofilmbildner jedoch eine signifikant geringere Prävalenz ($p < 0,01$) aufwiesen, konnte dieses Gen nicht mit der Biofilmbildung von EAEC assoziiert werden. Da es auch keine Korrelation zwischen der *in vitro* Biofilmbildung der UPEC-Isolate und *papC* gab, kann vermutet werden, dass dieses eher eine Rolle bei der Kolonisierung von Uroepithelzellen *in vivo* spielt (Lane and Mobley, 2007).

Ein Charakteristikum von Biofilmen ist ihre extrazelluläre Matrix. Bei *E. coli* machen Curli-Fimbrien den Hauptbestandteil der Matrix aus. In verschiedenen Studien wurde herausgefunden, dass CsgA, die große Untereinheit der Curli-Fimbrien, wichtig für die Anheftung an Oberflächen, die Zellaggregation und die Biofilmbildung ist (Olsén *et al.*, 1993; Uhlich *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 1998). In der Arbeit von Frömmel *et al.* wurden 317 *E. coli*-Isolate auf Virulenz-assoziierte Gene untersucht und dabei wiesen 90,0 % der Isolate *csgA* auf (Frömmel *et al.*, 2013b). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine sehr hohe Prävalenz für *csgA* (99,5 %) gefunden werden. Dies wird dadurch bestätigt, dass Curli hochkonserviert bei *E. coli* sind (Römling *et al.*, 1998a). Cellulose ist eine weitere Komponente, die in *E. coli*-Biofilmen vorkommt. BcsA, welches für die katalytische Untereinheit der Cellulosesynthese fungiert, ist ebenfalls weit verbreitet bei *E. coli* (Da Re and Ghigo, 2006; Zogaj *et al.*, 2001b) und wurde auch in dieser Arbeit bei 180 (96,3 %) Isolaten nachgewiesen. Um eine mögliche Korrelation der Expression von Curli und Cellulose mit der Biofilmbildung zu untersuchen, wurden die Isolate auf Kongorot- und Calcofluoragar (Römling *et al.*, 1998b, 2000) bei 28°C und 37°C inkubiert und die Koloniemorphologie untersucht. Bei

Diskussion

37°C wurden weniger Curli exprimierende Isolate gefunden, was erwartet wurde, da die Curliexpression ein temperaturregulierter Prozess ist (Arnqvist *et al.*, 1992; Olsén *et al.*, 1989). Es konnte keine Assoziation zwischen der Curli- oder der Celluloseproduktion gefunden werden, obwohl diese bekannt dafür sind, die Biofilmbildung zu fördern. Selbst die stärksten Biofilmbildner des Pathotyps EAEC produzierten weder Cellulose noch Curli. Im Gegensatz dazu gab es Isolate aus anderen Gruppen wie den ETEC, die beides exprimierten und kaum Biofilme bildeten. Da die Curliexpression bei 37°C unterdrückt wird, zeigen die Ergebnisse deutlich, dass diese Komponente unter den hier untersuchten Bedingungen nicht kritisch für die Biofilmbildung der pathogenen Isolate ist.

Das letzte Biofilm-assoziierte Gen, das untersucht wurde, gehört zur Gruppe der Autoporterproteine und ist dafür bekannt, die Adhäsion zwischen einzelnen Bakterienzellen zu fördern. Das Antigen 43 (Ag43), kodiert durch das Gen *agn43* oder *flu*, befindet sich in der äußeren Membran und führt während der Biofilmbildung zur Autoaggregation der Bakterienzellen. Dadurch wird auch die Struktur dreidimensionaler Biofilme begünstigt (Hasman *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 1997; Kjaergaard *et al.*, 2000a; Owen *et al.*, 1996; Schembri *et al.*, 2003b). In biofilmbildenden Bakterien konnte eine höhere Expression von *agn43* nachgewiesen werden und eine Deletion führte zur Verringerung der Biofilmbildung (Kjaergaard *et al.*, 2000a; Schembri *et al.*, 2003a). Bei der Untersuchung der Prävalenz in dieser Arbeit wiesen die Mehrzahl der EAEC- (75 %), SAEC- (62,5 %) und UPEC-Isolate (58,3 %) das Gen *agn43* auf. Dies wird u.a. auch in den Studien von Conceição *et al.* und Lüthje und Brauner bestätigt (Conceição *et al.*, 2012; Lüthje and Brauner, 2010). Beim Screening der Isolate mit der VideoScan-Technologie fiel auf, dass es bei EAEC zu einer starken Aggregatbildung kam. Obwohl Ag43 die Aggregatbildung fördert (Kjaergaard *et al.*, 2000b) und trotz der hohen Prävalenz bei den EAEC, konnte keine signifikante Korrelation zwischen diesem Gen und der Biofilmbildung gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses Biofilm-assoziierte Gen nicht kritisch für die Bildung von Biofilmen ist, dafür aber die Aggregation bei EAEC-Biofilmen auf abiotischen Oberflächen unterstützt.

Obwohl bisher in einigen Studien Gene identifiziert wurden, die für die Biofilmbildung kritisch sind, kann man die Resultate der Studien nur schwer miteinander vergleichen. Dies zeigt die Schwierigkeit in der Biofilmanalytik auf, denn es ist nahezu unmöglich, vergleichende Analysen durchzuführen, wenn die Durchführung der Experimente (unterschiedliche Stämme, Medienzusammensetzung, statische/rotierende Inkubation, Inkubationszeit, Temperatur, Färbung) variiert. Globale Standardverfahren sind nötig, um aussagekräftige Ergebnisse und Vergleiche erzielen zu können.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren für das Screening der Biofilmbildung mittels Fluoreszenzmikroskopie etabliert und mit der Kristallviolett-Färbung als Goldstandard verglichen. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigte eine signifikante Korrelation zwischen dem Biofilmmassay mittels Kristallviolett-

Diskussion

und SYTO 9-Färbung (Korrelationseffizient nach Pearson $r = 0,5887$; $p = 7,953e-19$; 95 % Konfidenzintervall). Mit dem Kristallviolettassay wurden acht Isolate (4 %) als Nicht-Biofilmbildner identifiziert, wohingegen bei der VideoScan-Methode 24 Isolate (13 %) gefunden wurden, die keinen Biofilm bildeten. Der Großteil bei letztere Methode (17 von 24 Isolaten) gehörte der Gruppe der ETEC und EPEC an. Diese wiesen bei der Kristallviolettmethode eine schwache bis moderate Biofilmbildung auf. Eine Erklärung für die unterschiedliche Klassifizierung der Isolate innerhalb der beiden Methoden könnte die Biofilmbildung der EPEC und ETEC an der Peripherie der Wells sein, die sich als ringförmiger Biofilm am Wellrand äußert. Bei beiden Pathotypen konnte gezeigt werden, dass diese Biofilme an der Grenzschicht zwischen Luft und Flüssigkeit bilden, die als schwimmende Biofilme oder Pellikel bezeichnet werden (Nascimento *et al.*, 2014; Weiss-Muszkat *et al.*, 2010). Diese Form der Biofilmbildung wird mit der VideoScan-Technologie nicht detektiert. Hiermit werden Biofilme nachgewiesen, die sich am Wellboden bilden, was von Vorteil ist, wenn es um die Analyse der Besiedelbarkeit neuartiger Materialien oder Oberflächenbeschichtungen geht. Die Identifizierung von schwimmenden Pellikelbiofilmen ist bei dieser Fragestellung nicht von Bedeutung.

Insgesamt wurden mit der VideoScan-Technologie große Unterschiede bei der Biofilmbildung innerhalb der unterschiedlichen Gruppen nachgewiesen. Wie andere Studien bestätigen (Dewanti and Wong, 1995; Reisner *et al.*, 2006), hat auch das Nährmedium einen großen Einfluss. Insgesamt wurde die Biofilmbildung bei Inkubation in BHI-Medium verstärkt, was auf die im BHI-Medium enthaltenen, essentiellen Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und Vitamine, die das Bakterienwachstum fördern, zurückzuführen sein könnte. Bei Betrachtung der Fähigkeit zur Biofilmbildung der unterschiedlichen Pathotypen wies der Pathotyp EAEC eine signifikant stärkere Biofilmbildung auf ($p < 0,01$). Mit dem bildbasierten Verfahren konnte zudem die Bildung dicker Aggregate bei den EAEC als Charakteristikum dieser Biofilme nachgewiesen werden.

Mit der in dieser Arbeit etablierten und auf klinische Isolate angewandte Methode konnte im Vergleich zur Kristallviolett-färbung nicht nur die Stärke der Biofilmbildung untersucht, sondern auch Informationen über die Struktur und die Verteilung des Biofilms auf der Oberfläche erhalten werden. Als automatisiertes und bildgebendes Verfahren liefert sie einen Mehrwert für den Anwender. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zudem darauf hin, dass das Vorhandensein oder das Fehlen von Genen oder phänotypischen Merkmalen keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Biofilmbildung der unterschiedlichen Gruppen liefert. Die Biofilm-assoziierten Faktoren, die bei nicht-pathogenen Erregern als kritisch für die Biofilmbildung angesehen werden, sind nicht unbedingt auf klinische Isolate zu übertragen. Dies deutet auf weitere, noch unbekannte Faktoren hin, die zum Prozess der Biofilmbildung beitragen und das Überleben der Bakterien und deren Virulenz im Wirt unterstützen. Denkbar

wäre, dass die Biofilmbildung von EAEC-Isolaten zur Etablierung von Langzeitkolonisation und chronischen Infektionen beiträgt, bei der die in einer Biofilmmatrix eingebetteten Bakterien vor dem Immunsystem des Wirtes und antimikrobiellen Mitteln geschützt sind. Es ist zu vermuten, dass verschiedene Bakterienstämme unterschiedliche Faktoren mit ähnlichen Funktionen für den Prozess der Biofilmbildung nutzen. Jeder dieser Stämme könnte eine einzigartige Kombination solcher Faktoren aufweisen. Das unterschiedliche Genom der vielen *E. coli*-Stämme weist auf eine erfolgreiche evolutionäre Strategie hin, die es den Stämmen ermöglicht, viele unterschiedliche Bereiche im Wirt zu kolonisieren.

4.2 Analyse dreidimensionaler Biofilme auf Materialoberflächen

Die Besiedlung biotischer und abiotischer Oberflächen durch Mikroorganismen ist ein allgegenwärtiges Problem. Im Bereich der Medizin spielen sie u.a. beim Einsatz von Kathetern oder orthopädischen Implantaten eine große Rolle. Bisher gibt es jedoch keinen Goldstandard für die mikroskopische Beurteilung von Materialien und neuen Materialbeschichtungen hinsichtlich ihrer Bakterienbesiedlung. In dieser Arbeit wurde ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren etabliert, um eine automatisierte Analyse dreidimensionaler *E. coli*-Biofilme auf unterschiedlichen Materialien durchzuführen. Dabei wurde eine Quantifizierung, die Bestimmung der besiedelten Fläche und eine Untersuchung der Biofilmdicke vorgenommen.

Als Materialien im Bereich der Implantatchirurgie kommen bevorzugt Stahl und Titan zum Einsatz. Die Materialien Glas, Stahl und Titan wurden nach der Inkubation mit *E. coli* unter Nutzung einer Flusszelle auf ihre Besiedlung mit Biofilmen untersucht. Glas weist eine glatte Oberfläche auf, was bedeutet, dass die bakterielle Adhäsion und die Ausbildung von Biofilmen weniger begünstigt wird (Scheuerman *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde im Vergleich zu Titan eine signifikant geringere Kolonisierung durch Bakterien festgestellt. Sowohl die Anzahl adhärenter Bakterien als auch die besiedelte Fläche waren allgemein niedrig. Die maximale Biofilmdicke variierte dabei sehr. Dahingehend wiesen die Stahlcoupons eine breitere Verteilung der Anzahl adhärenter Bakterien und der besiedelten Fläche auf und die Biofilme waren dicker. Die höchste Anzahl an adhärenenten Bakterien mit einheitlich dicken Biofilmen wiesen jedoch die Titancoupons auf.

Die Materialien Stahl und Titan wurden von der BAM mit Hilfe der WLSI auf ihre Oberflächenbeschaffenheit untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass beide Materialien einen Wellencharakter aufweisen. Zudem konnte man beim Titan eine Mikrorauheit nachweisen. Damit verfügen die Titancoupons über eine erhöhte Rauheit, die wiederum zu einer Vergrößerung der Oberfläche und somit zu einer verstärkten Besiedelbarkeit mit Bakterien führt (Charaklis *et al.*, 1990; Gharechahi *et al.*, 2012; Teug-

Diskussion

hels *et al.*, 2006). Die Rauheit könnte zudem dazu beitragen, dass die Scherkräfte während der Inkubation mit den Bakterien in der Flusszelle vermindert wurden und die Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche erleichtert wurde (Donlan, 2002).

Abhängig von der Spezies und der Anzahl der Mikroorganismen kann die Adhäsion auf Oberflächen stark variieren (Petty *et al.*, 1985; Printzen, 1996). Des Weiteren wird die Adhäsion durch die physikalischen und elektrochemischen Eigenschaften des Materials beeinflusst (Quirynen and Bollen, 1995; Wu-Yuan *et al.*, 1995). Obwohl in Vorversuchen von Menzel *et al.* gezeigt wurde, dass die Kolonisation unabhängig von der Position der Coupons in der Flusszelle ist (Menzel *et al.*, 2016), konnten wir ein unterschiedliches Ausmaß der Biofilmbildung innerhalb eines Materials beobachten. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Materialien zeigte für einige Coupons eine breite Verteilung in den Werten der besiedelten Flächen. So gab es Coupons, die eher stark besiedelt waren und welche mit wenig adhärenen Bakterienzellen. Dies könnte in der Heterogenität der Bakterienzellen innerhalb der Kultur begründet liegen. So konnten Davis *et al.* zeigen, dass Bakterien heterogene Populationen bilden, die zwar das gleiche genetische Repertoire aufweisen, jedoch in unterschiedlichen Phänotypen auftreten (Davis and Isberg, 2016). Dies kann z.B. die Zellgröße, die Oberflächenladung der Bakterienzelle oder der Ausbildung einer Flagelle betreffen (van Merode *et al.*, 2006).

Obwohl Biofilme und deren Beseitigung in der Industrie sehr hohe Kosten erzeugen und Biofilm-assoziierte Infektionen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität beitragen, gibt es bisher keine standardisierten Verfahren, die eine direkte Quantifizierung der adhärenen Bakterien erlauben. Im Gegensatz zu den herkömmlich genutzten Methoden wie dem Entfernen der Bakterien durch Ultraschall gefolgt vom Ausplattieren der Bakterien auf geeigneten Nährmedien ist die *in situ* Analyse von Biofilmen weniger anfällig. Beim Nutzen von Ultraschall kann es zum unvollständigen Ablösen der Bakterien und auch zur unvollständigen Trennung von Bakterienaggregaten kommen. Durch die Dauer der Inkubation ist die Methode zeitaufwändiger und mit mehr Arbeitsschritten und höherem Materialeinsatz verbunden. Zudem spiegelt sie nicht den von der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (*ESCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) geforderten Detektion des Biofilm-Phänotyps wieder.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode erlaubt eine standardisierte und automatisierte Analyse unterschiedlichster Materialien und liefert Aussagen über die Anzahl adhärenen Bakterien im dreidimensionalen Biofilm. Außerdem können damit die besiedelte Fläche auf dem Material und die Biofilmdicke bestimmt werden. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, spielt die Biofilmdicke eine entscheidende Rolle

bei der Untersuchung der Wirkung antimikrobieller Substanzen. Auch bei der Untersuchung der Effekte variierender Strömungsgeschwindigkeiten ist die Messung der Biofilmdicke von hoher Bedeutung.

4.3 Etablierung einer Methode für die Antibiotikaempfindlichkeitstestung in Biofilmen

Die Biofilmbildung von *S. aureus* wurde als wichtiger Faktor der Pathogenese identifiziert, der zum Schutz vor dem Immunsystem und Antibiotika beiträgt und für chronische oder persistierende Infektionen verantwortlich gemacht wird (Stewart and Costerton, 2001). *S. aureus*-Isolate sind bekannt für ihr Potential, Biofilme zu bilden (Piechota *et al.*, 2018). So konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass 100% der untersuchten Isolate in der Lage waren, Biofilme auszubilden. Bei der Untersuchung der insgesamt 42 *S. aureus*-Isolate konnte eine allgemein stärkere Biofilmbildung in den Vollmedien, vor allem im BHI-Medium, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird durch weitere Studien, die sich mit der Biofilmbildung von *S. aureus* befassen, bestätigt (2017; Wijesinghe *et al.*, 2019). Es war zudem zu beobachten, dass die MSSA-Isolate stärkere Biofilme als die MRSA-Isolate ausbildeten.

MRSA sind resistent gegen β -Lactam-Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine oder Carbapeneme. Laut den Informationen des Robert-Koch-Instituts sind weitere 72 % aller MRSA aus Mitteleuropa resistent gegen Erythromycin, 94 % resistent gegen Chinolone und 66 % resistent gegen Clindamycin. Dieses Resistenzprofil wurde auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten MRSA-Isolat identifiziert. Um den Effekt verschiedener Antibiotika auf die Biofilmbildung und auf reife Biofilme zu testen, wurde ein Assay etabliert, der auf fluoreszenzmikroskopische Analysen der mittels Lebend-/Totfärbung gefärbten Biofilme basiert. Es erfolgte zunächst die Messung der Fluoreszenzintensität von lebenden und toten Bakterienzellen. Zudem wurden unter Nutzung des bildbasierten Verfahrens mit automatisierter Bildaufnahme Übersichts- und Detailbildern erstellt, um einen Eindruck über die Struktur des Biofilms im Well zu erhalten.

Die Untersuchung des Effektes von Vancomycin, Ampicillin, Tigecyclin und Rifampicin auf die Ausbildung eines Biofilms zeigte, dass die Biofilmbildung beider *S. aureus*-Isolate verhindert werden konnte. Trotz der vorliegenden Ampicillinresistenz des MRSA-Isolates konnte die Biofilmbildung bei einer Konzentration von 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ unterbunden werden. Die BPC (*biofilm prevention concentration*), also die niedrigste Konzentration, die bei simultaner Zugabe von Antibiotika und Bakterieninokulum die Biofilmbildung hemmt (Fernández-Olmos *et al.*, 2012; Macia *et al.*, 2014), entsprach bei Verwendung von Rifampicin dem ermittelten MHK.

Diskussion

Die *minimal biofilm eradication concentration* (MBEC) ist ein weiterer Parameter, der die niedrigste Konzentration beschreibt, die benötigt wird, um einen vorhandenen Biofilm zu eradizieren (Macia *et al.*, 2014). Eine vollständige Entfernung des Biofilms konnte mit keinem der verwendeten Antibiotika erreicht werden. Um diesen Effekt zu sehen, müsste man eventuell die Antibiotikakonzentrationen erhöhen, zumal bei hohen Dosen an Antibiotika oft eine Abnahme der lebenden und toten Bakterien beobachtet werden konnte, was für eine bereits einsetzende Reduktion des Biofilms spricht. Dennoch ist es fraglich, ob die zum Abtöten des kompletten Biofilms benötigten Konzentrationen auf die klinische Anwendung übertragbar und *in vivo* zu erreichen sind. Die klinische Interpretation der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bezieht pharmakologische Parameter wie die Gewebeverteilung, die erreichbare Konzentration im Zielgewebe und Toxizitätsgrenzen mit ein und hängt stark vom Erregertyp, dem Infektionsort, der Applikationsform und Dosierung des Antibiotikums ab. So schreibt das Nationale Antibiotika-Sensitivitäts-Komitee bei bakteriellen Infektion z.B. Dosierungsangaben für Vancomycin mit 1 g Vancomycin alle 12 h für 2 Wochen vor (Trampuz and Zimmerli, 2006). Dabei wird eine Serumkonzentration von 10-15 mg/l mit Spitzenwerten von 25-40 mg/l erreicht (James and Gurk-Turner, 2001; Thomson *et al.*, 2009). Für die Antibiotikatherapie bei Infektionen mit biofilmbildenden Erregern sind diese Konzentrationen evtl. nicht übertragbar.

Das bakterizid wirkende Vancomycin gehört zur Gruppe der Glykopeptidantibiotika und hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand durch Blockierung der Quervernetzung. Durch den steigenden osmotischen Druck in der Bakterienzelle wird diese löchrig und lysiert (Kiamco *et al.*, 2015; Kiedrowski and Horswill, 2011). Es gilt als Reserve-Antibiotikum bei resistenten Isolaten und wird prinzipiell bei der Behandlung von Biofilminfektionen mit MRSA eingesetzt (Archer *et al.*, 2011). Bei der Applikation von Vancomycin konnte man den bakteriziden Effekt des Antibiotikums bei 4 h alten Biofilmen sehen, jedoch befanden sich bei Zugabe der höchsten Antibiotikakonzentration sowohl beim MSSA- als auch beim MRSA-Isolat noch immer lebende Bakterienzellen im Biofilm. Am Beispiel von Ampicillin und Vancomycin konnte verdeutlicht werden, dass die Wirkung von Antibiotika mit zunehmender Reife des Biofilms abnimmt. Als Grund hierfür wird die erschwerte Penetration von Antibiotika durch die Biofilmmatrix diskutiert, die speziell für Vancomycin beobachtet wurde (Singh *et al.*, 2010).

Rifampicin wirkt als Breitbandantibiotikum bakterizid gegen *S. aureus* und ist als eines der wenigen Antibiotika dafür bekannt, metabolisch ruhende, sesshafte Bakterienzellen abzutöten (Blaser *et al.*, 1995; Perlroth *et al.*, 2008; Widmer *et al.*, 1990; Zimmerli *et al.*, 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass dieses antimikrobielle Agens in der Lage ist, die Biofilmdicke zu verringern und im Vergleich zu anderen verwendeten Antibiotika, Bakterien auch in reiferen Biofilmen abzutöten. *In vivo* Studien, die sich mit der Wirkung von Rifampicin bei Implantat-assoziierten Staphy-

Diskussion

lokokkeninfektionen beschäftigten, konnten eine schnelle Resistenzentwicklung gegen Rifampicin beobachten, so dass es meist in Kombination mit anderen Substanzen eingesetzt wird (Perlroth *et al.*, 2008). Für weitere Untersuchungen der Antibiotikawirkung auf die in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Biofilme wäre hier eine Kombination von Vancomycin und Rifampicin denkbar.

Auffällig bei der Anwendung von Vancomycin und Ampicillin war der Anstieg der Menge lebender Bakterien bei steigender Antibiotikakonzentration. Dieser Effekt könnte eine allgemeine Stressantwort darstellen und als Schutzmechanismus für die Biofilmbakterien dienen, um sich auf die bevorstehende antibakterielle Wirkung der Antiinfektiva vorzubereiten. Kaplan *et al.* konnten zeigen, dass die Biofilmbildung bei subinhibitorischen Konzentrationen von Methicillin zunahm (Kaplan *et al.*, 2012). Auch eine Studie von Mirani und Jamil stellte fest, dass sublethale Konzentrationen von Vancomycin nachweislich zur Steigerung der *S. aureus*-Biofilmbildung führen kann (Mirani and Jamil, 2011). Viele Arbeiten weisen darauf hin, dass subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen die vermehrte Expression der Biofilmmatrix fördern (Berlutti *et al.*, 2014; Hoffman *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2011; Sailer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2014). Der Effekt der Stimulation der Biofilmbildung kann auch eine klinische Relevanz haben, wenn die eingesetzte Dosis bei der Antibiotikatherapie zu gering ist und somit die Biofilmbildung noch mehr stimuliert wird, und bestätigt umso mehr den Bedarf einer standardisierten Methode für die Testung dieser durch Antibiotika-induzierbaren Stimulation der Biofilmbildung. Des Weiteren wird durch den Einsatz zu geringer Mengen an antimikrobiellen Substanzen die Entstehung von Resistenzen gefördert (Andersson and Hughes, 2012; Hao *et al.*, 2014; Hughes and Andersson, 2012).

Unter Anwendung der bildbasierten Methode konnten zudem strukturelle Veränderungen beim MRSA-Isolat identifiziert werden. Bevor die Antibiotikakonzentration erreicht wurde, die zum Abtöten der Mehrzahl der Bakterien im MRSA-Biofilm führte, bildete das Isolat große Aggregate bestehend aus lebenden Zellen. Diese Aggregate scheinen vor der Wirkung des Antibiotikums geschützt zu sein und könnten durch die sublethale Antibiotikakonzentration zustande kommen. Bakterienzellen in Aggregaten sind dafür bekannt, vor antimikrobiellen Verbindungen geschützt zu sein (Anderson and O'Toole, 2008; Hoyle and Costerton, 1991).

Der bisherige Goldstandard zur Erstellung von Antibioogrammen hat nur wenig Aussagekraft, wenn eine Biofilm-assoziierte Infektion vorliegt. Die MHK von planktonischen Bakterienzellen ist nicht auf Biofilmbakterien übertragbar und es fehlen Methoden für die standardisierte Ermittlung der MHK im Biofilm. Vor Einsatz einer Therapie sollte ein auf den Erreger der Biofilm-assoziierten Infektion abgestimmtes Antibiotikaresistenzprofil erstellt werden, welches aus dem Einsatz der Wirkstoffe im Biofilm-Phänotyp hervorgeht. So könnte man die im Biofilm noch wirksamen Antibiotika herauskristallisieren und

der Entstehung von Resistenzen vorbeugen. Dies gilt jedoch nur für Biofilme in der frühen Entwicklungsphase, da, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, die Wirkung der Antibiotika mit zunehmender Reife des Biofilms abnimmt. Bei etablierten Biofilminfektionen führt meist, speziell im Bereich der Implantat-assoziierten Infektionen, nur noch eine Sanierung des Infektionsherdes zur vollständigen Eradikation. Der Großteil der Erkenntnisse bezüglich der Biofilmtoleranz wurde aus *in vitro* Studien gewonnen. Es bleibt jedoch fraglich, ob diese Ergebnisse die *in vivo* Effektivität von Antibiotika vorhersagen können. Die Biofilmbildung läuft *in vivo* unter anderen Bedingungen ab. An einem Infektionsort sind die Bakterien meist von Gewebe umgeben und den Bakterien stehen nicht immer frische Nährstoffe zur Verfügung. Ein großer Unterschied ist auch die Zugänglichkeit von Antibiotika zum Biofilm. *In vitro* werden sie direkt appliziert; *in vivo* müssen sie viele Barrieren überwinden und manchmal auch tief in ein Gewebe eindringen können (Coenye *et al.*, 2018). Auch wenn die angewandte Methode nicht die *in vivo* Bedingungen widerspiegelt, liefert sie im Vergleich zur Bestimmung von Antibioogrammen in planktonischen Bakterienkulturen einen bedeutenden Mehrwert für den Anwender.

Im Vergleich zu bestehenden Verfahren wie z.B. der Anwendung der Kristallviolettfärbung von Biofilmen (Christensen *et al.*, 1985) oder dem *Calgary biofilm device* (Ceri *et al.*, 1999) bei der Empfindlichkeitstestung von Antibiotika, weist die hier angewendete Methode Vorteile auf. Mit der hier angewandten Färbung kann im Vergleich zur Färbung der Biomasse mittels Kristallviolett auch eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen vorgenommen werden, die essentiell für die Untersuchung der Antibiotikawirksamkeit ist. Beim *Calgary biofilm device* werden die adhärennten Bakterien meist mittels Ultraschall von den Zapfen der Wellplattendeckel gelöst und es wird die Lebendzellzahl nach Ausplattieren ermittelt. Diese Methode spiegelt jedoch nicht den Biofilm-Phänotyp wieder. Die AKLI-DES®-Technologie ist ein bildgebendes Verfahren, welches nicht nur Informationen über die Fähigkeit zur Biofilmbildung gibt, sondern auch Einblicke in die Struktur und deren Veränderungen bei Applikation antimikrobieller Substanzen liefert. Die in dieser Arbeit etablierte, automatische Analyse der Antibiotikawirkung auf Biofilme kann zudem für die Testung neuer antibakterieller Substanzen und deren Effekt auf die Biofilmbildung und etablierte Biofilme angewandt werden. Zudem könnten damit auch neuartige Oberflächenbeschichtungen und deren Einfluss auf die Adhäsion von Mikroorganismen untersucht werden.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Methoden für die Untersuchung der Biofilmbildung sind vielseitig und die Biofilmbildung selbst ist ein hochkomplexer Prozess. Unterschiedliche Zusammensetzungen der Medien, Inkubationszeiten und -temperaturen, Zellzahlen des Inokulums und Färbemethoden existieren und machen einen Vergleich der Ergebnisse unmöglich. Deswegen ist eine Standardisierung der Biofilmbildung und –analyse sinnvoll. Die etablierte Technologie bietet umfangreiche Möglichkeiten für die Analyse von Biofilmen. Der Vorteil der Technologie ist die Automatisierung der Messung, die Bildgebung, der Multiplexgrad durch Untersuchung verschiedener Bedingungen zugleich und die Möglichkeit, eine standardisierte Analyse durchzuführen, die einen Vergleich unterschiedlicher Proben erlaubt. Sie kann u.a. angewendet werden für die Analyse der allgemeinen Fähigkeit zur Biofilmbildung, beim Screening von Mutantbibliotheken bei der Untersuchung von biofilmrelevanten Genen, für die Testung antimikrobieller Substanzen auf ihre Fähigkeit die Biofilmbildung zu verhindern oder Biofilme zu eradizieren und für die Untersuchung der Besiedelbarkeit neuartiger Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen.

Die VideoScan-Technologie konnte bereits für das Screening der Biofilmbildung klinischer *E. coli*-Pathotypen (Schiebel *et al.*, 2017), klinischer *P. aeruginosa*-Isolate (Awan *et al.*, 2019) und multiresistenter *E. coli* (Olowe *et al.*, 2019) angewendet und publiziert werden. Zukünftig wäre es sehr nützlich, die Analyse der Biofilmmatrix zu adaptieren. Damit könnte man z.B. den Effekt subinhibitorischer Konzentrationen auf die Biofilmbildung genauer untersuchen. Eine sublethale Dosis an Antibiotikum soll zu Steigerung der Biofilmmatrix führen, deren einzelne Bestandteile (Cellulose, PIA, Colansäure, Curli) man markieren und fluoreszenzmikroskopisch nachweisen könnte. Auch die Untersuchung gemischter Biofilme gekoppelt mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zur spezifischen Erregeridentifizierung wäre ein weiterer Ansatz für die Anpassung der Technologie. Weiterhin sollte die Technologie auch Anwendung bei der Analyse klinischer Implantate finden, um die Methode unter realen Bedingungen zu testen. Durch die hohe Anpassungsfähigkeit der VideoScan-Technologie könnte somit ein umfangreiches Analysewerkzeug im Bereich der Biofilmforschung geschaffen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abd El-Baky, R.M. (2012). Application of Scanning Electron Microscopy for the Morphological Study of Biofilm in Medical Devices. In *Scanning Electron Microscopy*, (InTechOpen), p.
- Abraham, E.P., and Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* *146*, 837.
- Almeida, C., Azevedo, N.F., Santos, S., Keevil, C.W., and Vieira, M.J. (2011). Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLOS ONE* *6*, e14786.
- Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J.L., and Hernández-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* *44*, 43–55.
- An, D., and Parsek, M.R. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 292–296.
- Anastasiadis, P., Mojica, K.D.A., Allen, J.S., and Matter, M.L. (2014). Detection and quantification of bacterial biofilms combining high-frequency acoustic microscopy and targeted lipid microparticles. *J. Nanobiotechnology* *12*, 24.
- Anderson, G.G., and O'Toole, G.A. (2008). Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 85–105.
- Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S.J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* *301*, 105–107.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *15*, 162–172.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., and Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* *2*, 445–459.
- Arnqvist, A., Olsén, A., Pfeifer, J., Russell, D.G., and Normark, S. (1992). The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.* *6*, 2443–2452.
- Awan, A.B., Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Sarwar, Y., Schierack, P., and Ali, A. (2019). Association of biofilm formation and cytotoxic potential with multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *EXCLI J.* *18*, 79–90.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional cooperation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* *48*, 781–794.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* *45*, 493–496.

- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., et al. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* *51*, 659–674.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H., Altendorf, K., and Zehnder, A.J. (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 3973–3977.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* *12*, 2385–2397.
- Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek, B., Quirynen, M., and Lambrechts, P. (2005). Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int. Endod. J.* *38*, 775–788.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., and Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 791–808.
- Black, R.E. (1990). Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.* *12 Suppl 1*, S73-79.
- Blaser, J., Vergères, P., Widmer, A.F., and Zimmerli, W. (1995). In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1134–1139.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* *67*, 4499–4509.
- Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* *39*, 1272–1284.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., and Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* *37*, 77–86.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* *13*, 20–26.
- Brown, M.R., Allison, D.G., and Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* *22*, 777–780.
- Bryers, J.D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 1–18.
- Camilli, A., and Bassler, B.L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* *311*, 1113–1116.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., and Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1771–1776.

Charaklis, McFeters, and Marshall (1990). Physiological ecology in biofilm systems. In: Charaklis WG, Marshall KC, Eds. Wiley series in ecological and applied microbiology.

Chatterjee, S., Maiti, P., Dey, R., Kundu, A., and Dey, R. (2014). Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Ann. Med. Health Sci. Res.* 4, 100–104.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., and Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006.

Clarke, S.C. (2001). Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 93–98.

Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87.

Coenye, T., Goeres, D., Van Bambeke, F., and Bjarnsholt, T. (2018). Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 570–572.

Conceição, R.A., Ludovico, M.S., Andrade, C.G.T.J., and Yano, T. (2012). Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 417–424.

Connell, H., de Man, P., Jodal, U., Lincoln, K., and Svanborg, C. (1993). Lack of association between hemolysin production and acute inflammation in human urinary tract infection. *Microb. Pathog.* 14, 463–472.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.

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

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.

Costerton, J.W., Montanaro, L., and Arciola, C.R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int. J. Artif. Organs* 28, 1062–1068.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.

Da Re, S., and Ghigo, J.-M. (2006). A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 3073–3087.

Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., and Kolter, R. (2000a). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 37, 424–432.

- Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000b). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* *182*, 3593–3596.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* *280*, 295–298.
- Davis, K.M., and Isberg, R.R. (2016). Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *38*, 782–790.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., and Relman, D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* *449*, 811–818.
- Dewanti, R., and Wong, A.C. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* *26*, 147–164.
- Diderichsen, B. (1980). *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *141*, 858–867.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 16–34, table of contents.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., and McLandsborough, L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 2950–2958.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T.K. (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* *9*, 332–346.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* *8*, 881–890.
- Donlan, R.M. (2008). Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *322*, 133–161.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 167–193.
- Drasar, B.S., and Hill, M.J. (1974). *Human intestinal flora* (Academic Press).
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., and Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* *53*, 1–8.
- Duncan, M.J., Mann, E.L., Cohen, M.S., Ofek, I., Sharon, N., and Abraham, S.N. (2005). The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. *J. Biol. Chem.* *280*, 37707–37716.
- Dworkin, M., and Falkow, S. (2006). *The prokaryotes. a handbook on the biology of bacteria* Vol. 6. Vol. 6. (New York: Springer).
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase Are Required for Internalization of *Staphylococcus aureus* by Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *67*, 4673–4678.

- Ericsson, H.M., and Sherris, J.C. (1971). Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] Microbiol. Immunol.* 217, Suppl 217:1+.
- Escherich (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings (Fort Med 3 [16]).
- Fattahi, S., Kafil, H.S., Nahai, M.R., Asgharzadeh, M., Nori, R., and Aghazadeh, M. (2015). Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran. *GMS Hyg. Infect. Control* 10.
- Ferguson, B.J., and Stolz, D.B. (2005). Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* 19, 452–457.
- Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Maiz, L., Lamas, A., Baquero, F., and Cantón, R. (2012). In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 173–176.
- Fields, P.I., Blom, K., Hughes, H.J., Hessel, L.O., Feng, P., and Swaminathan, B. (1997). Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1066–1070.
- Flemming, H.-C. (2014). The Biofilm Mode of Life. In *Ecological Biochemistry*, G.-J. Krauss, and D.H. Nies, eds. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 277–291.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.
- Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.* 170, 2027–2030.
- Fletcher, M., and Loeb, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 67–72.
- Frömmel, U., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Groß, J., Rödiger, S., Wex, T., Ansorge, H., Zinke, O., Schröder, C., et al. (2013a). Adhesion patterns of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines. *Gut Pathog.* 5, 31.
- Frömmel, U., Lehmann, W., Rödiger, S., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Groß, J., Roggenbuck, D., Zinke, O., Ansorge, H., et al. (2013b). Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5814–5829.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 34–40.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., and Bergey, D.H. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 2 Vol. 2 (New York: Springer).
- Geesey, G.G. (1994). *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems* (CRC Press).

- Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.* *33*, 704–717.
- Gharechahi, M., Moosavi, H., and Forghani, M. (2012). Effect of Surface Roughness and Materials Composition. *J. Biomater. Nanobiotechnology* *3*, 720–726.
- Ghigo, J.M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* *412*, 442–445.
- Girón, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* *254*, 710–713.
- Gottenbos, B., Busscher, H., Mei, H.C., and Der, V. (2002). Pathogenesis and prevention of bio-material centered infections. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* *13*, 717–722.
- Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* *43*, 1367–1378.
- Grant, W.D., Sutherland, I.W., and Wilkinson, J.F. (1969). Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* *100*, 1187–1193.
- Grossman, N., Ron, E.Z., and Woldringh, C.L. (1982). Changes in cell dimensions during amino acid starvation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *152*, 35–41.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2004). Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nis-1917. *J. Bacteriol.* *186*, 5432–5441.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 95–108.
- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J., Johnson, C., Hu, F.Z., Stoodley, P., Ehrlich, G.D., et al. (2008). Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* *8*, 173.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., Costerton, J.W., Moter, A., and Bjarnsholt, T. (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *65*, 127–145.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., and Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* *18*, 661–670.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch. Oral Biol.* *52*, 1048–1056.
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., and Yuan, Z. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front. Microbiol.* *5*, 288.
- Harris, L.G., Foster, S.J., and Richards, R.G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cell. Mater.* *4*, 39–60.

Harrison, J.J., Ceri, H., Yerly, J., Stremick, C.A., Hu, Y., Martinuzzi, R., and Turner, R.J. (2006). The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol. Proced. Online* 8, 194–215.

Harrison, J.J., Stremick, C.A., Turner, R.J., Allan, N.D., Olson, M.E., and Ceri, H. (2010). Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat. Protoc.* 5, 1236–1254.

Hartman, B.J., and Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158, 513–516.

Hasman, H., Chakraborty, T., and Klemm, P. (1999). Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol.* 181, 4834–4841.

Hatt, J.K., and Rather, P.N. (2008). Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 163–192.

Henderson, B., and Wilson, M. (1998). Commensal communism and the oral cavity. *J. Dent. Res.* 77, 1674–1683.

Henderson, I.R., and Owen, P. (1999). The Major Phase-Variable Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Structurally Resembles the Immunoglobulin A1 Protease Class of Exported Protein and Is Regulated by a Novel Mechanism Involving Dam and OxyR. *J. Bacteriol.* 181, 2132–2141.

Henderson, I.R., Meehan, M., and Owen, P. (1997). Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 149, 115–120.

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 6, 370–378.

Herías, M.V., Midtvedt, T., Hanson, L.A., and Wold, A.E. (1995). Role of *Escherichia coli* P fimbriae in intestinal colonization in gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* 63, 4781–4789.

Heukelekian, H., and Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J. Bacteriol.* 40, 547–558.

Hicks, S., Candy, D.C., and Phillips, A.D. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* 64, 4751–4760.

Hiemann, R., Büttner, T., Krieger, T., Roggenbuck, D., Sack, U., and Conrad, K. (2009). Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun. Rev.* 9, 17–22.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G.L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., et al. (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21 Suppl 1, S1-25.

Honraet, K., and Nelis, H.J. (2006). Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 64, 217–224.

- Hoyle, B.D., and Costerton, J.W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res. Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech. Pharm.* 37, 91–105.
- Hughes, D., and Andersson, D.I. (2012). Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 555–560.
- James, C.W., and Gurk-Turner, C. (2001). Recommendations for monitoring serum vancomycin concentrations. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 14, 189–190.
- Janssen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.C., and Wieler, L.H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 291, 371–378.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 80–128.
- Johnson, J.R., and Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181, 261–272.
- Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 291, 605–614.
- Källenius, G., Svenson, S.B., Hultberg, H., Möllby, R., Helin, I., Cedergren, B., and Winberg, J. (1981). OCCURRENCE OF P-FIMBRIATED *ESCHERICHIA COLI* IN URINARY TRACT INFECTIONS. *The Lancet* 318, 1369–1372.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., and Horswill, A.R. (2012). Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 3, e00198-12.
- Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549–1555.
- Kester, J.C., and Fortune, S.M. (2014). Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 91–101.
- Khan, Z.A., Siddiqui, M.F., and Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics* 9.
- Kiamco, M.M., Atci, E., Khan, Q.F., Mohamed, A., Renslow, R.S., Abu-Lail, N., Fransson, B.A., Call, D.R., and Beyenal, H. (2015). Vancomycin and Maltodextrin Affect Structure and Activity of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 2562–2570.
- Kiedrowski, M.R., and Horswill, A.R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1241, 104–121.
- Kisiela, D.I., Kramer, J.J., Tchesnokova, V., Aprikian, P., Yarov-Yarovoy, V., Clegg, S., and Sokurenko, E.V. (2011). Allosteric Catch Bond Properties of the FimH Adhesin from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Biol. Chem.* 286, 38136–38147.

- Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Hasman, H., and Klemm, P. (2000a). Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* *182*, 4789–4796.
- Kjaergaard, K., Schembri, M.A., Ramos, C., Molin, S., and Klemm, P. (2000b). Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ. Microbiol.* *2*, 695–702.
- Knox, R. (1960). A New Penicillin (BRL 1241) Active Against Penicillin-resistant Staphylococci. *Br. Med. J.* *2*, 690–693.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schiebel, J., Rödiger, S., Sauer, L., Szabo, I., Orłowska, A., Weinreich, J., Nitschke, J., Böhm, A., et al. (2018). Adhesion of *Salmonella* to Pancreatic Secretory Granule Membrane Major Glycoprotein GP2 of Human and Porcine Origin Depends on FimH Sequence Variation. *Front. Microbiol.* *9*.
- Krogfelt, K.A., Bergmans, H., and Klemm, P. (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* *58*, 1995–1998.
- Kuchma, S.L., and O'Toole, G.A. (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* *11*, 429–433.
- Kuehn, M.J., Heuser, J., Normark, S., and Hultgren, S.J. (1992). P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* *356*, 252–255.
- Lane, M.C., and Mobley, H.L.T. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* *72*, 19–25.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., and Beloin, C. (2013). From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* *2*, 288–356.
- Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* *155*, 377–389.
- Lewandowski, Z. (1994). Dissolved oxygen gradients near microbially colonized surfaces. In *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems.*, (Lewis), pp. 175–188.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem. Biokhimiia* *70*, 267–274.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 357–372.
- Li, X., Yan, Z., and Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol. Read. Engl.* *149*, 353–362.
- Lister, J.L., and Horswill, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*, 178.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* *339*, 520–532.
- Lüthje, P., and Brauner, A. (2010). Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 2316–2317.
- Macfarlane, S., and Dillon, J.F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 1187–1196.

- Macia, M.D., Rojo-Moliner, E., and Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* *20*, 981–990.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* *178*, 175–183.
- Macnab, R.M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* *26*, 131–158.
- Macnab R.M. (1996). Flagella and Motility. In *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umberger (Eds.), ed. (Washington, DC: ASM Press), p. pp.123-145.
- Mah, T.F., and O’Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* *9*, 34–39.
- Maira-Litrán, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* *70*, 4433–4440.
- Martinez-Medina, M., and Garcia-Gil, L.J. (2014). *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* *5*, 213–227.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L.J. (2009a). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli*(AIEC). *BMC Microbiol.* *9*, 202.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009b). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 872–882.
- Menzel, F., Conradi, B., Rodenacker, K., Gorbushina, A.A., and Schwibbert, K. (2016). Flow Chamber System for the Statistical Evaluation of Bacterial Colonization on Materials. *Materials* *9*.
- van Merode, A.E.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., and Krom, B.P. (2006). Influence of Culture Heterogeneity in Cell Surface Charge on Adhesion and Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* *188*, 2421–2426.
- Mirani, Z.A., and Jamil, N. (2011). Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* *51*, 191–195.
- Mohamed, J.A., Huang, D.B., Jiang, Z.-D., DuPont, H.L., Nataro, J.P., Belkind-Gerson, J., and Okhuysen, P.C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 121–126.
- Mokady, D., Gophna, U., and Ron, E.Z. (2005). Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *295*, 455–462.

- Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., and Rodríguez-Jerez, J.J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control* 23, 470–477.
- Moormeier, D.E., and Bayles, K.W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* 104, 365–376.
- Moormeier, D.E., Bose, J.L., Horswill, A.R., and Bayles, K.W. (2014). Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *MBio* 5, e01341-14.
- Moreira, C.G., Carneiro, S.M., Nataro, J.P., Trabulsi, L.R., and Elias, W.P. (2003). Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 79–85.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494–1497.
- Nascimento, H.H., Silva, L.E.P., Souza, R.T., Silva, N.P., and Scaletsky, I.C.A. (2014). Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. *BMC Microbiol.* 14, 184.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., and Levine, M.M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6, 829–831.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Maneval, D.R., German, A.L., Martin, W.C., and Levine, M.M. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* 60, 2297–2304.
- Nataro, J.P., Hicks, S., Phillips, A.D., Vial, P.A., and Sears, C.L. (1996). T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* 64, 4761–4768.
- Nawaz, S., Khan, M.M., Noack, J., Awan, A.B., Schiebel, J., Roggenbuck, D., Schierack, P., Sarwar, Y. and Ali, A. (2020). Rapid Detection of Biofilm Formation by Zoonotic Serovars of *Salmonella enterica* and Avian Pathogenic *E. coli* Isolates from Poultry. *Pak Vet J* 40(4): 527-530.
- Nelson, D.E., and Young, K.D. (2000). Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 1714–1721.
- Newsom, S.W.B. (2008). Ogston's coccus. *J. Hosp. Infect.* 70, 369–372.
- Nickel, J.C., and Costerton, J.W. (1992). Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis. *J. Urol.* 147, 398–400; discussion 400-401.
- O'Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 179–188.
- Olowe, O.A., Adefioye, O.J., Ajayeoba, T.A., Schiebel, J., Weinreich, J., Ali, A., Burdukiewicz, M., Rödiger, S., and Schierack, P. (2019). Phylogenetic grouping and biofilm formation of Multidrug Resistant *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals and Food products in South-west Nigeria. *Sci. Afr.* e00158.

- Olsén, A., Jonsson, A., and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652–655.
- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., and Normark, S. (1993). The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7, 523–536.
- Orndorff, P.E., Devapali, A., Palestrant, S., Wyse, A., Everett, M.L., Bollinger, R.R., and Parker, W. (2004). Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infect. Immun.* 72, 1929–1938.
- O’Toole, G.A., and Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- O’Toole, G.A., and Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28, 449–461.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- O’Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 91–109.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H., and Henderson, I. (1996). Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16, 63–76.
- Parsek, M.R., and Fuqua, C. (2004). Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *J. Bacteriol.* 186, 4427–4440.
- Parsek, M.R., and Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 677–701.
- Peacock, S.J., and Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577–601.
- Peeters, E., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* 72, 157–165.
- Perlroth, J., Kuo, M., Tan, J., Bayer, A.S., and Miller, L.G. (2008). Adjunctive Use of Rifampin for the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review of the Literature. *Arch. Intern. Med.* 168, 805–819.
- Petty, W., Spanier, S., Shuster, J.J., and Silverthorne, C. (1985). The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J. Bone Joint Surg. Am.* 67, 1236–1244.
- Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., and Woźniak-Kosek, A. (2018). Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelter, N., and Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* 54, 269–276.

- Plos, K., Connell, H., Jodal, U., Marklund, B.-I., Mårild, S., Wettergren, B., and Svanborg, C. (1995). Intestinal Carriage of P Fimbriated *Escherichia coli* and the Susceptibility to Urinary Tract Infection in Young Children. *J. Infect. Dis.* *171*, 625–631.
- Potera, C. (1999). Forging a link between biofilms and disease. *Science* *283*, 1837, 1839.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* *30*, 285–293.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 598–603.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., and Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *181*, 5993–6002.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., and Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* *2*, 450–464.
- Pringle, J.H., and Fletcher, M. (1983). Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* *45*, 811–817.
- Printzen, G. (1996). Relevance, pathogenicity and virulence of microorganisms in implant related infections. *Injury* *27*, S/C9-S/C15.
- Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A.S.G., and Sack, R.B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 465–483.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., and Bennett, B.C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* *118*, 418–428.
- Quirynen, M., and Bollen, C.M. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J. Clin. Periodontol.* *22*, 1–14.
- Raad, I., Costerton, W., Sabharwal, U., Sacilowski, M., Anaissie, E., and Bodey, G.P. (1993). Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J. Infect. Dis.* *168*, 400–407.
- Ratiner, Y.A. (1998). New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* *180*, 979–984.
- Reid, S.D., Selander, R.K., and Whittam, T.S. (1999). Sequence diversity of flagellin (fliC) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *181*, 153–160.
- Reisner, A., Haagen, J.A.J., Schembri, M.A., Zechner, E.L., and Molin, S. (2003). Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* *48*, 933–946.
- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., and Molin, S. (2006). In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J. Bacteriol.* *188*, 3572–3581.

- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W., and Wood, T.K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *64*, 515–524.
- Ren, D., Zuo, R., González Barrios, A.F., Bedzyk, L.A., Eldridge, G.R., Pasmore, M.E., and Wood, T.K. (2005). Differential Gene Expression for Investigation of *Escherichia coli* Biofilm Inhibition by Plant Extract Ursolic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 4022–4034.
- Roberts, S.K., Bass, C.J., Brading, M., Lappin-Scott, H.M., and Stoodley, P. (1999). Biofilm formation and structure: what's new? In *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*, H.H. Newman, and M. Wilson, eds. (Bioline), pp. 15–35.
- Rödiger, S., Friedrichsmeier, T., Kapat, P., and Michalke, M. (2012). Rkward: A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R. *J. Stat. Softw.* *49*, 1–34.
- Rödiger, S., Schierack, P., Böhm, A., Nitschke, J., Berger, I., Frömmel, U., Schmidt, C., Ruhland, M., Schimke, I., Roggenbuck, D., et al. (2013). A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *133*, 35–74.
- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J. Bacteriol.* *187*, 2286–2296.
- Römmling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* *153*, 205–212.
- Römmling, U. (2005). Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *62*, 1234–1246.
- Römmling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., and Normark, S. (1998a). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* *180*, 722–731.
- Römmling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., and Normark, S. (1998b). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* *28*, 249–264.
- Römmling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., and Reinköster, J. (2000). *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* *36*, 10–23.
- Römmling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., and Tschäpe, H. (2003). Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *293*, 273–285.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C., and Götz, F. (2001). Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J. Infect. Dis.* *183*, 1038–1042.
- Sack, R.B. (1980). Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. *J. Infect. Dis.* *142*, 279–286.

- Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., Erdene, S., Nataro, J.P., Sheikh, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., et al. (2004). Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 133–139.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* *4*, 219.
- Sauer, F.G., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., and Hultgren, S.J. (2000). Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 65–72.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., and Klemm, P. (2003a). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* *48*, 253–267.
- Schembri, M.A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., and Klemm, P. (2003b). Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J. Bacteriol.* *185*, 2236–2242.
- Scheuerman, null, Camper, null, and Hamilton, null (1998). Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *J. Colloid Interface Sci.* *208*, 23–33.
- Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Ali, A., Roggenbuck, D., Rödiger, S., and Schierack, P. (2017). Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical *Escherichia coli* Isolates of Different Pathotypes. *Appl Env. Microbiol* *83*, e01660-17.
- Schwartz, T., Hoffmann, S., and Obst, U. (2003). Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* *95*, 591–601.
- Shah, N., DuPont, H.L., and Ramsey, D.J. (2009). Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *80*, 609–614.
- Shakeri, S., Kermanshahi, R.K., Moghaddam, M.M., and Emtiazi, G. (2007). Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling* *23*, 79–86.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A.D., and Nataro, J.P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *41*, 983–997.
- Simões, L.C., Simões, M., and Vieira, M.J. (2010). Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* *98*, 317–329.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1955–1958.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* *43*, 793–808.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., and Rainey, P.B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* *50*, 15–27.
- Spormann, A.M. (2008). Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *322*, 17–36.

- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* *40*, 175–179.
- Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond. Engl.* *358*, 135–138.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 199–210.
- Stickler, D., Morris, N., Moreno, M.C., and Sabbuba, N. (1998). Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *17*, 649–652.
- Stocks, S.M. (2004). Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *61*, 189–195.
- Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* *9*, 222–227.
- Tajbakhsh, E., Ahmadi, P., Abedpour-Dehkordi, E., Arbab-Soleimani, N., and Khamesipour, F. (2016). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* *5*.
- Teughels, W., Assche, N.V., Sliepen, I., and Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* *17*, 68–81.
- Thomson, A.H., Staatz, C.E., Tobin, C.M., Gall, M., and Lovering, A.M. (2009). Development and evaluation of vancomycin dosage guidelines designed to achieve new target concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 1050–1057.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C.G., Schoolnik, G.K., Ohtsubo, E., and Sasakawa, C. (1999). Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect. Immun.* *67*, 5455–5462.
- Tolker-Nielsen, null, and Molin, null (2000). Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb. Ecol.* *40*, 75–84.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* *28*, 603–661.
- Toté, K., Vanden Berghe, D., Maes, L., and Cos, P. (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* *46*, 249–254.
- Trampuz, A., and Zimmerli, W. (2006). Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* *37*, S59–S66.
- Uhlich, G.A., Cooke, P.H., and Solomon, E.B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 2564–2572.

Ulett, G.C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J.-M., and Schembri, M.A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect. Immun.* *75*, 3233–3244.

Valvano, M.A., and Crosa, J.H. (1984). Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain ColV plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.* *46*, 159–167.

Van Houdt, R., and Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* *156*, 626–633.

Vial, P.A., F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Eds.), Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P., Maneval, D., Elsayed, A., and Levine, M.M. (1988). Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* *158*, 70–79.

Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., and Lejeune, P. (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* *180*, 2442–2449.

Vogeleer, P., Tremblay, Y.D.N., Mafu, A.A., Jacques, M., and Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* *5*.

Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J.P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., and Kawano, Y. (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *71*, 687–690.

Wang, X., Preston, J.F., and Romeo, T. (2004). The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* *186*, 2724–2734.

Wanke, C.A., Cronan, S., Goss, C., Chadee, K., and Guerrant, R.L. (1990). Characterization of binding of *Escherichia coli* strains which are enteropathogens to small-bowel mucin. *Infect. Immun.* *58*, 794–800.

Waters, V.L., and Crosa, J.H. (1986). DNA environment of the aerobactin iron uptake system genes in prototypic ColV plasmids. *J. Bacteriol.* *167*, 647–654.

Waters, V.L., and Crosa, J.H. (1991). Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* *55*, 437–450.

Weiss-Muszkat, M., Shakh, D., Zhou, Y., Pinto, R., Belausov, E., Chapman, M.R., and Sela, S. (2010). Biofilm Formation by and Multicellular Behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an Atypical Enteropathogenic Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 1545–1554.

Wentland, E.J., Stewart, P.S., Huang, C.T., and McFeters, G.A. (1996). Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol. Prog.* *12*, 316–321.

Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., and Stewart, P.S. (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 6188–6196.

Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* *5*, 751–762.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.

Widmer, A.F., Frei, R., Rajacic, Z., and Zimmerli, W. (1990). Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J. Infect. Dis.* 162, 96–102.

Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranayake, L., and Weerasekera, M. (2019). Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med. Princ. Pract. Int. J. Kuwait Univ. Health Sci. Cent.* 28, 28–35.

Wiles, T.J., Kulesus, R.R., and Mulvey, M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11–19.

Wilson, M. (2005). *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease* (Cambridge, UK: Cambridge University Press).

Wold, A.E., Caugant, D.A., Lidin-Janson, G., de Man, P., and Svanborg, C. (1992). Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. *J. Infect. Dis.* 165, 46–52.

Wu-Yuan, C.D., Eganhouse, K.J., Keller, J.C., and Walters, K.S. (1995). Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J. Oral Implantol.* 21, 207–213.

Zgur-Bertok, D., Modric, E., and Grabnar, M. (1990). Aerobactin uptake system, ColV production, and drug resistance encoded by a plasmid from an urinary tract infection *Escherichia coli* strain of human origin. *Can. J. Microbiol.* 36, 297–299.

Zimmerli, W., Frei, R., Widmer, A.F., and Rajacic, Z. (1994). Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33, 959–967.

Zobell, C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity¹. *J. Bacteriol.* 46, 39–56.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001a). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452–1463.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001b). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452–1463.

Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., and Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 71, 4151–4158.

7. Publikationsliste

Veröffentlichungen

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Ali, A., Roggenbuck, D., Rödiger, S., and Schierack, P. (2017). Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. *Appl Env. Microbiol* 83. doi: 10.1128/AEM.01660-17

Kolenda, R., Burdukiewicz, M., **Schiebel, J.**, Rödiger, S., Sauer, L., Szabo, I., Orłowska, A., Weinreich, J., Nitschke, J., Böhm, A., Gerber, U., Roggenbuck, D., and Schierack, P. (2018). Adhesion of *Salmonella* to pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 of human and porcine origin depends on *fimH* sequence variation. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01905

Jurischka, C., Dinter, F., Sowa, M., Noack, J., **Schiebel, J.**, Roggenbuck, D., Schierack, P., and Rödiger, S. (2018). Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. *J. Cell. Biotechnol.* 4, 15–22.

Awan, A.B., **Schiebel, J.**, Böhm, A., Nitschke, J., Sarwar, Y., Schierack, P., and Ali, A. (2019). Association of biofilm formation and cytotoxic potential with multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *EXCLI J.* 18, 79–90.

Olowe, O.A., Adefioye, O.J., Ajayeoba, T.A., **Schiebel, J.**, Weinreich, J., Ali, A., Burdukiewicz, M., Rödiger, S., and Schierack, P. (2019). Phylogenetic grouping and biofilm formation of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food products in south-west Nigeria. *Sci. Afr.* e00158.

Jurischka, C., Dinter, F., Efimova, A., Weiss, R., **Schiebel, J.**, Schulz, C., Fayziev, B., Schierack, P., Fischer, T., and Rödiger, S. (2020). An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2020;75(1):57-84. doi: 10.3233/CH-190713. PMID: 31929149.

Schiebel, J., Noack, J., Rödiger, S., Kammel, A., Menzel, F., Schwibbert, K., Weise, M., Böhm, A., Nitschke, J., Elimport, A., Roggenbuck, D., and Schierack, P. (2020). Analysis of three-dimensional biofilms on different material surfaces. *Biomaterials Science*, 8(12), 3500-3510.

Nawaz, S., Khan, M.M., Noack, J., Awan, A.B., **Schiebel, J.**, Roggenbuck, D., Schierack, P., Sarwar, Y., and Ali, A. (2020). Rapid detection of biofilm formation by zoonotic serovars of *Salmonella enterica* and avian pathogenic *E. coli* isolates from poultry. *Pak Vet J* 40(4): 527-530.

Konferenzteilnahmen und -beiträge

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Qualitative and quantitative high-throughput screening of biofilms by automated fluorescence microscopy. **Biofilms 6 in Wien** 11.05.-13.05.2014.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Qualitative and quantitative high-throughput screening of biofilms by automated fluorescence microscopy. **4. Gemeinsamer Kongress der DGHM & VAAM in Dresden** 05.10.-08.10.2014.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Orthogonal planar biofilm assay: a novel method to assess biofilm formation of pathogens. **Days on bioanalysis 2014 in Potsdam** 06.11.-07.11.2014.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Screening for biofilm formation of *E. coli* pathotypes by automated fluorescence microscopy. **6th Congress of European Microbiologists-FEMS in Maastricht** 07.06.-11.06.2015.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rapsch, K., Rödiger, S., Schierack, P. Screening for biofilm formation of *E. coli* pathotypes and determination of the effect of antimicrobial peptides on biofilm formation by automated fluorescence microscopy. **67. Jahrestagung DGHM in Münster** 27.09.-30.09.2015.

Kramer, T., **Schiebel, J.,** Zelck, C., Weinreich, J., Schierack, P., Rödiger, S. Genotyping and gene expression analysis of putative reference genes in Enterobacteriaceae. **67. Jahrestagung DGHM in Münster** 27.09.-30.09.2015.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Rapsch, K., Rödiger, S., Schierack, P. VideoScan: a novel method for investigating biofilms. **26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-ECCMID in Amsterdam**, 09.04.-12.04.2016. (ePoster Vortrag).

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Investigation of *E. coli* pathotypes for biofilm formation in association with their phenotypic and genotypic characteristics. **68. Jahrestagung DGHM in Ulm** 11.09.-14.09.2016.

Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Rödiger, S., Schierack, P. Genotypic and phenotypic characteristics and biofilm formation of human clinical *Escherichia coli* isolates. **5. Gemeinsamer Kongress der DGHM & VAAM in Würzburg** 05.03.-08.03.2017.

Abkürzungsverzeichnis

aEPEC	Atypische enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
AFEC	Aviär fäkale <i>Escherichia coli</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BPC	<i>biofilm-prevention concentration</i>
CAEC	Crohn's-assozierte <i>Escherichia coli</i>
CFU	Koloniebildende Einheiten (englisch <i>colony forming units</i>)
EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	extrazelluläre DNA
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
HFEC	Human fäkale <i>Escherichia coli</i>
LB	Luria-Bertani Medium
M63	Minimalmedium M63
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MTP	Mikrotiterplatte
PGA	Poly- β -1,6-N-Acetylglukosamin
PI	Propidiumjodid (englisch <i>Propidium iodide</i>)
relFI (A.U.)	Relative Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einheit (englisch <i>arbitrary units</i>)
SAEC	Sepsis-assozierte <i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TSB	Tryptische Soja Bouillon
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Stadien der Biofilmbildung.....	12
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Biofilmassays.....	44
Abb. 3: Übersichtsaufnahmen unterschiedlicher Bakteriengattungen	46
Abb. 4: Kontrollen für den Nachweis der Curli- und Celluloseproduktion.....	48
Abb. 5: Nachweis der Motilität im Weichagar	49
Abb. 6: Motilität der <i>E. coli</i> -Pathotypen.....	50
Abb. 7: Einteilung der Biofilmbildung nach der Klassifikation von Stepanović <i>et al.</i>	51
Abb. 8: Fluoreszenzintensitäten der mit SYTO 9 gefärbten Biofilme.....	53
Abb. 9: Übersichtsbilder der einzelnen Wells mit <i>E. coli</i> -Biofilmen.....	54
Abb. 10: Übersichtsbilder der 96-Well Platten mit <i>E. coli</i> -Biofilmen	55
Abb. 11: Aufbau der Couponanalyse mit der AKLIDES®-Technologie.....	56
Abb. 12: Ablauf der Softwareanalyse bei der Untersuchung besiedelter Coupons.....	58
Abb. 13: Ermittlung der Höhe eines Biofilms	59
Abb. 14: Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit von Stahl und Titan	60
Abb. 15: Adhäsion der Bakterien auf Glas, Stahl und Titan	61
Abb. 16: AKLIDES®-Aufnahmen der Biofilme mit 3D-Darstellung der Höhenprofile	63
Abb. 17: Kolonisierte Fläche auf Glas, Stahl und Titan.....	63
Abb. 18: Biofilmdicke auf Glas, Stahl und Titan	64
Abb. 19: Schematische Darstellung der Antibiotikabehandlung der Biofilme	65
Abb. 20: Übersichtsbilder der 96-Well Platten mit <i>S. aureus</i> -Biofilmen.....	66
Abb. 21: Einfluss von Ampicillin auf die Biofilmbildung der <i>S. aureus</i> -Isolate	68
Abb. 22: Einfluss von Vancomycin auf die Biofilmbildung der <i>S. aureus</i> -Isolate	69
Abb. 23: Detailaufnahmen und Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlich reifen <i>S. aureus</i> -Biofilme nach Zugabe steigender Vancomycinkonzentrationen.....	74
Abb. 24: Strukturelle Veränderungen der <i>S. aureus</i> -Biofilme mit steigender Antibiotikakonzentration	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biofilm-assoziierte Infektionen beim Menschen*	16
Tab. 2: Humane, klinische <i>E. coli</i> - und Kontrollisolate* für die Charakterisierung hinsichtlich Biofilm-assoziiierter Gene, Curli- und Celluloseproduktion, Motilität und Biofilmbildung.....	31
Tab. 3: Bakterienisolate* als Kontrollen für verschiedenste Assays und Überprüfung der Biofilmbildung	31
Tab. 4: Zusammensetzung verwendeter Nährmedien und -agar	31
Tab. 5: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	32
Tab. 6: Verwendete Farbstoffe	32
Tab. 7: Verwendete Antibiotika	33
Tab. 8: Verwendete Primerpaare für die Detektion Biofilm-assoziiierter Gene in <i>E. coli</i>	33
Tab. 9: Verwendete Chemikalien	33
Tab. 10: Verwendete Geräte	34
Tab. 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien	35
Tab. 12: Prävalenz der Biofilm-assoziierten Gene in 187 <i>E. coli</i> -Isolaten	47
Tab. 13: Vorkommen des Morphotyps auf Kongorotagar und der Fluoreszenz auf Calcofluoragar in den untersuchten <i>E. coli</i> -Isolaten*	49
Tab. 14: Antibiotikaresistenzprofil mit entsprechenden MHK-Werten	67
Tab. 15: Gegenüberstellung der MHK und BPC der <i>S. aureus</i> -Isolate.....	70

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe und der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Peter Schierack für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, für die zahlreichen Gespräche, für die vielen Ideen und auch dafür, dass man die Chance hatte, sich stetig weiterzuentwickeln. Ein besonderer Dank geht auch an Stefan Rödiger, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, mich stets mit neuen Lösungsansätzen und bei Statistikfragen unterstützt und mich aufgemuntert hat, wenn es eben auch mal nicht so gut lief. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Alexander Böhm, Jörg Nitschke, Jonas Noack und Michal Burdukiewicz. Ohne euch wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr habt immer geduldig versucht jede Idee umzusetzen, auch wenn sie manchmal noch so verrückt war. Ein großes Dankeschön geht auch an Jörg Weinreich und Andrea Krause, die mir bei allen Fragen im Laboralltag weitergeholfen haben. Ein besonderer Dank geht an meine KollegInnen aus dem Büro: Franziska Dinter, Christin Bartlitz und Christoph Jurischka. Mit euch war es nie langweilig; wir hatten eine wunderschöne Zeit. Ein besonderes Dankeschön geht an Rafal Kolenda. Du hast mich immer aufgemuntert, so oft mit mir diskutiert, mich unterstützt und bist in dieser besonderen Zeit ein guter Freund für mich geworden.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Matthias bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist, hinter mir stehst und mich so sehr unterstützt.