

Einfluss von Silber auf die Vitalität
von Biofilmen klinisch relevanter Bakterien.
Induziert Silber den
„viable but nonculturable“-Zustand?

Alexa Margareta Königs



**Einfluss von Silber auf die Vitalität von Biofilmen
klinisch relevanter Bakterien.
Induziert Silber den „viable but nonculturable“-Zustand?**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg Essen

Alexa Margareta Königs

geboren in Viersen

Biofilm Centre
Aquatische Mikrobiologie
der Universität Duisburg-Essen

Essen 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2010 bis September 2014 im Arbeitskreis Aquatische Mikrobiologie von Prof. Dr. Hans-Curt Flemming am Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 7.7.2015

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Curt Flemming

Gutachter: Prof. habil. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski

Vorsitzender: Professor Dr. rer. nat. Christian Mayer

Für meine Familie.

*Schmerzt Dich in tiefer Brust
das harte Wort: „Du musst!“,
so macht nur eins dich wieder still,
das stolze Wort: „Ich will!“*

- Autor unbekannt -

Mein aufrichtiger Dank gilt:

Hans-Curt

Doktorvater, Inspiration und Unterhaltung pur!
Ein besonders aufrichtiger Dank gilt dir.

Stephan Barcikowski

Vielen Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Jost

Danke, dass du einen Bruchteil deines Wissens mit
Engelsgeduld an mich weitergegeben hast!

Bundesministerium für Bildung und Forschung

Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung!

Arbeitsgruppe Mikrobiologie

Danke für die wundervolle Zeit!

Conny

Herzlichsten Dank an die Heldin des Alltags!

Marina, Witold und Gaby

Danke an meine „Mitbewohner“ für den
riesigen Spaß und die inspirierenden Gespräche!

Julia

Danke für deine tolle Leistung und dein
Durchhaltevermögen bei der DVC-Methode!

Irina

Danke für deine tolle Arbeit und deinen
unerschrockenen Umgang mit tausenden von Agarplatten!

Simone, Julia, Alexander

Danke für jede einzelne DAPI-Probe!

Witold

Schön, dass du deine
2D-DIGE-Expertenkenntnisse mit mir geteilt hast!

Marina

Danke für die schönen Veggie-Abende!

Anika und Lena

Danke für die tolle Zeit im Studium (und danach)!

Meine „Mädels daheim“

Es heißt Freundschaft, weil man mit den
richtigen Freunden alles schafft!

Paul und Dominik

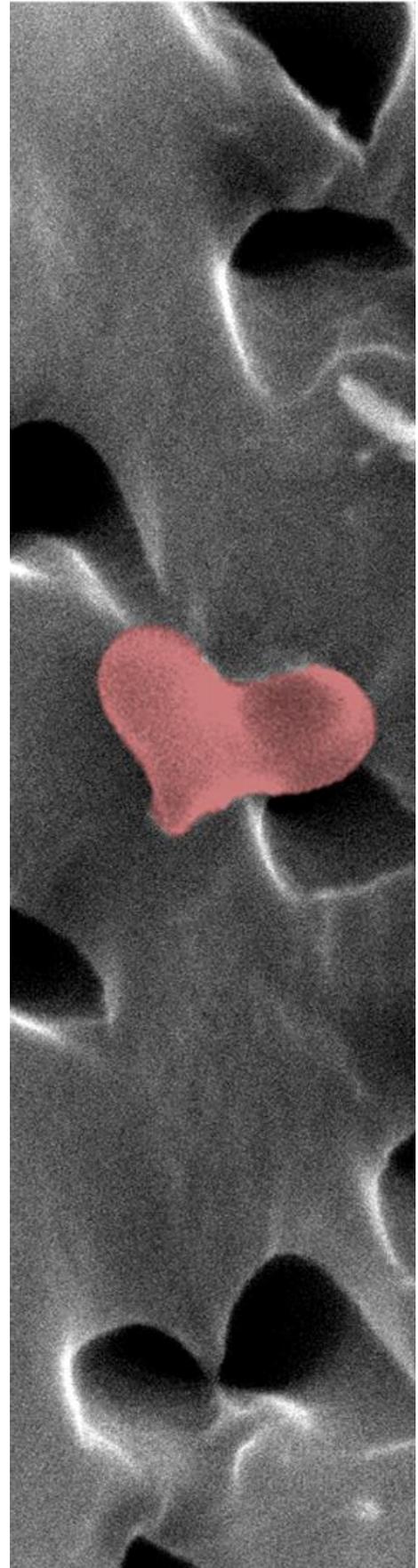
Danke, dass es euch gibt!

Friedrich, Therese, Julia und Britta

Danke an die allergrößten Unterstützer ihres Nesthäkchens!

Thilo

Danke für deine Geduld!



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungen	xvi
Zusammenfassung	xx
1 Einleitung.....	1-1
1.1 Medizinische Biofilmesdown	1-1
1.2 Klinisch relevante Bakterien in Biofilmen	1-3
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1-3
1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	1-6
1.2.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1-8
1.3 Silber als antimikrobielles Agens.....	1-9
1.3.1 Nanosilber	1-10
1.3.2 Wirkmechanismen von Silber.....	1-12
1.3.3 Silber in Medizinprodukten	1-16
1.3.4 Humantoxikologie von Silber	1-21
1.4 Der “viable but nonculturable”-Zustand.....	1-22
2 Ziele.....	2-30
3 Material	3-31
3.1 Bakterienstämme	3-31
3.2 Chemikalien	3-32
3.3 Oligonukleotidsonden	3-34

3.4	Primer und Sonden	3-34
3.5	Enzyme	3-34
3.6	Materialien	3-34
3.7	Geräte	3-35
3.8	PC-Software	3-36
3.9	Kommerziell erhältliche Kits	3-37
3.10	Nährmedien	3-37
3.11	Puffer und Stammlösungen	3-38
4	Methoden	4-47
4.1	Reinigen der Glasgeräte	4-47
4.2	Charakterisierung der AgNPs	4-47
4.2.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	4-48
4.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	4-48
4.2.3	Rasterelektronenmikroskopie	4-48
4.2.4	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	4-48
4.3	Charakterisierung der klinisch relevanten Bakterienstämme	4-50
4.3.1	Vorbereitung der Bakterien.....	4-50
4.3.2	Wuchsverhalten	4-50
4.3.3	Biofilmbildung	4-50
4.3.4	Gentamicinresistenz.....	4-51
4.3.5	Lipaseaktivität.....	4-52
4.4	Methoden zur Quantifizierung von Bakterien	4-52
4.4.1	Koloniezahlbestimmung.....	4-52
4.4.2	Gesamtzellzahl.....	4-52
4.4.3	LIVE/DEAD-Färbung.....	4-53
4.5	Molekularbiologische Methoden	4-54
4.5.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	4-54
4.5.2	Propidiummonoazid Real Time Quantitative TaqMan™ PCR (PMA-qPCR).....	4-56
4.6	Biochemische Methoden	4-59
4.6.1	Bestimmung des ATP-Gehalts	4-59
4.6.2	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE).....	4-60
4.7	Rasterelektronenmikroskopie	4-65

4.8	Einfluss von Silber auf das Wachstum	4-66
4.8.1	Minimale Hemmkonzentration und minimale bakterizide Konzentration	4-66
4.8.2	Einfluss von Silber auf das Wuchsverhalten.....	4-67
4.9	Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung	4-67
4.10	Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme und planktonische Bakterien	4-68
4.11	Einfluss von Silber auf planktonische <i>P. aeruginosa</i> in Suspension	4-70
4.12	Antimikrobielle Wirksamkeit AgNP-dotierter Medizinprodukte.....	4-71
4.12.1	AgNP-dotierte Medizinprodukte	4-71
4.12.2	Wachstumshemmung	4-72
4.12.3	Biofilmbildung auf AgNP-dotierten Medizinprodukten	4-72
4.13	Statistik.....	4-73
5	Ergebnisse.....	5-74
5.1	Charakterisierung der AgNPs	5-74
5.1.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	5-74
5.1.2	Elektronenmikroskopie	5-76
5.1.3	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	5-79
5.2	Charakterisierung der medizinisch relevanten Bakterienstämme	5-82
5.2.1	Wuchsverhalten	5-83
5.2.2	Biofilmbildung	5-84
5.2.3	Gentamicinresistenz.....	5-86
5.2.4	Lipaseaktivität.....	5-87
5.3	Einfluss von Silber auf das Wachstum	5-88
5.3.1	Minimale Hemmkonzentration und minimale bakterizide Konzentration.....	5-88
5.3.2	Einfluss von Silber auf das Wuchsverhalten.....	5-90
5.4	Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung.....	5-93
5.5	Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme und planktonische Bakterien	5-99
5.6	Einfluss von Silber auf die Vitalität von <i>P. aeruginosa</i>	5-106
5.6.1	Optimierung der PMA-qPCR.....	5-106
5.6.2	Einfluss von Silber auf die Vitalität etablierter Biofilme und planktonische Bakterien	5-107
5.6.3	Einfluss von Silber auf die Vitalität planktonischer Bakterien in Suspension ..	5-111

5.6.4	Einfluss von Silber auf die Morphologie etablierter Biofilme und planktonischer Bakterien	5-117
5.6.5	Proteomanalytik der Biofilme im VBNC-Zustand	5-125
5.7	Wirkmechanismen von Silber	5-132
5.8	Antimikrobielle Wirksamkeit AgNP-dotierter Medizinprodukte.....	5-135
5.8.1	Wachstumshemmung	5-135
5.8.2	Biofilmbildung auf AgNP-dotierten Medizinprodukten	5-136
6	Diskussion	6-152
6.1	Eigenschaften der AgNPs und deren Verhalten in Nährmedien.....	6-152
6.2	Einfluss von Silber auf das Wachstum	6-155
6.3	Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung	6-161
6.4	Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme	6-163
6.5	Der silberinduzierte VBNC-Zustand	6-166
6.5.1	Vorhandensein von DNA	6-167
6.5.2	Membranintegrität.....	6-167
6.5.3	Vorhandensein von zellulärer Energie	6-169
6.5.4	Vorhandensein von ribosomaler RNA	6-170
6.5.5	Morphologie	6-171
6.5.6	Netzdiagramme zur Darstellung des VBNC-Zustandes	6-171
6.5.7	Proteomanalytik von <i>P. aeruginosa</i> im VBNC-Zustand.....	6-177
6.6	Wirkmechanismen von Silber bei <i>P. aeruginosa</i>	6-183
6.7	Silber in Medizinprodukten.....	6-185
6.8	Schlussfolgerungen.....	6-189
7	Literatur	7-192
	Publikationsliste	7-223
	Erklärung	7-224
	Lebenslauf	7-225

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nomenklatur und Hierarchie von mit Nanoobjekten verbundenen Begriffen (nach ISO TS 27687).....	1-10
Abbildung 2: Anzahl der Publikationen über Nanosilber basierend auf einer Literaturrecherche bei „Web of Science“. Aufgelistet sind Publikationen welche einen der Begriffe „nanosilver, nano silver, nanosilver particles, silver nanoparticles“ im Titel beinhalten. Stand: 29.12.14.	1-12
Abbildung 3: Wirkmechanismen von Silber bei Bakterien.....	1-14
Abbildung 4: Angenommene Funktion der Genprodukte, hergeleitet von Homologien bekannter Proteine (Silver, 2003).	1-16
Abbildung 5: Vitalitätsparameter einer Bakterienzelle, welche experimentell nachgewiesen werden können. Modifiziert nach Hammes et al. (2011).	1-24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der PMA-qPCR Methode zur Unterscheidung von membranintakten und membrangeschädigten Zellen.	1-27
Abbildung 7: Plasmonresonanz der AgNPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) bei 300-540 nm in PFD bei 20 °C (a) und 36 °C (b), in SBF bei 36 °C (c), in SBF mit Glucose bei 36 °C (d) in LB-Medium bei 20 °C (e) und 36 °C (f), in NB-Medium bei 36 °C und CASO-Medium bei 36 °C, n=3.	5-75
Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der AgNPs bei 200.000-facher Vergrößerung. Kohlenstoff-Sputtering (4 nm). Pfeile zeigen AgNPs (exemplarisch), n=1. ...	5-76
Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der AgNPs in PFD ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei unterschiedlichen Vergrößerungen, n=1.	5-77
Abbildung 10: Größenverteilung der AgNPs, ermittelt aus den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, n=208.....	5-78

Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der AgNPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) nach Inkubation in verdünntem LB-Medium (1 zu 10 in PFD) (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$). 5-78

Abbildung 12: Größenverteilung der AgNPs, ermittelt aus den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der AgNPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) nach Inkubation in verdünntem LB-Medium (1 zu 10 in entionisiertem Wasser) ($36 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h), $n=120$ 5-79

Abbildung 13: Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der AgNPs in PFD ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), Auftragung nach Anzahl in % (a), Auftragung nach Streulichtintensität in % (b), $n=1$ 5-80

Abbildung 14: Dynamische Lichtstreuung der AgNPs nach Intensität, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag in PFD (0 h), in LB-Medium (0 h, 24h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $36 \text{ }^\circ\text{C}$). Auftragung nach Streulichtintensität, $n=1$ 5-81

Abbildung 15: Ladungsverteilung (Zetapotential) der AgNPs in PFD, $n=1$ 5-82

Abbildung 16: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* AdS (a), *S. aureus* ATCC 6538 (b) und *S. epidermidis* ATCC 35984 (c) in LB-, NB- und CASO-Medium in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten ($36 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 h), $n=3$ 5-83

Abbildung 17: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im Mikrotiterplatten-Assay (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), $n=3$ 5-85

Abbildung 18: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in NB-Medium im Mikrotiterplattenverfahren (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), $n=3$ 5-85

Abbildung 19: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in CASO-Medium im Mikrotiterplatten-Assay (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), $n=3$ 5-86

Abbildung 20: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* AdS (a, b), *S. aureus* ATCC 6538 (c, d), *S. epidermidis* ATCC 35984 (e, f) in LB-Medium (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$) mit unterschiedlichen Konzentrationen von AgNPs ($0-250 \mu\text{g mL}^{-1}$) (a, c, e) und AgNO_3 ($0-10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (b, d, f). ... 5-92

Abbildung 21: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3. 5-94

Abbildung 22: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) und die Biofilmbildung von *S. aureus* ATCC 6535, 24 h, 36 °C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3. 5-95

Abbildung 23: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) von *S. epidermidis* ATCC 35984, 24 h, 36 °C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3. 5-95

Abbildung 24: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS im Mikrotiterplatten-Verfahren in LB-Medium (24 h, 36 °C). n=3. 5-97

Abbildung 25: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl von planktonischen Bakterien und Biofilmen von *S. aureus* ATCC 6538 im Mikrotiterplatten-Verfahren in LB-Medium (24 h, 36 °C). n=3. 5-98

Abbildung 26: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wuchsphase von *P. aeruginosa* AdS in PFD (24 h, 36 °C). n=3-7. 5-100

Abbildung 27: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von suspendierten, etablierten Biofilmen von *P. aeruginosa* AdS in PFD (24 h, 36 °C). n=2-6. 5-101

Abbildung 28: Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* AdS in SBF, Inkubation für 5 d bei 36 °C. Ausgangszellzahl 1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹ (a). Einfluss von AgNPs auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wuchsphase von *P. aeruginosa* AdS in simulierter Körperflüssigkeit (24 h, 36 °C). n=3. 5-102

Abbildung 29: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) (500, 1000 und 5000 µg mL⁻¹ Ag) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischer Bakterien in der stationären Wuchsphase von *S. aureus* ATCC 6538, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode) und der Zellen mit rRNA (FISH). n=2-6. 5-104

- Abbildung 30: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten, suspendierten Biofilmen von *S. aureus* ATCC 6538 in PFD (24 h, 36 °C). n=2-6..... 5-105
- Abbildung 31: Optimierung der PMA-qPCR nach Nkuipou-Kenfack et al. (2013). Planktonische, membranintakte Zellen von *P. aeruginosa* AdS nach Exposition mit PFD (mit und ohne Hitzebehandlung, 30 min, 65 °C), AgNO₃ (25 µg mL⁻¹), NaCl (0,85 % (w/v)) und Isopropanol (70 % (v/v)) bei 36 °C für 24 h. Bestimmung der membranintakten Zellen (a) und der Koloniezahl (b) nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. 5-107
- Abbildung 32: Einfluss von AgNPs (0-1000 µg mL⁻¹) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD-Färbung und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter GloTM-Kit). Planktonische Bakterien. N_{Ag}: planktonische Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs, N₀: planktonische Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNO₃. n=3 5-109
- Abbildung 33: Einfluss von AgNO₃ (0- 100 µg mL⁻¹) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD[®]-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter GloTM-Kit). n=3 5-110
- Abbildung 34: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von *P. aeruginosa* AdS in LOC (36 °C, 24 h). Ausgangszellzahl 1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹, n=3. 5-113
- Abbildung 35: Einfluss von AgNPs (100 µg L⁻¹) (a), AgNO₃ (100 µg L⁻¹) (b), Isopropanol (70 % (v/v)) (c) und Hitze (30 min, 65 °C) auf die Vitalität (Koloniezahl, Gesamtzellzahl, Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung und PMA-qPCR)) von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen (1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹) in PFD nach 24 h bei 36 °C. N₀: 1,3 x 10⁶ KBE pro Kavität, 1,1 x 10⁶ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), 2,25 x 10⁵ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD) und 1,1 x 10⁶ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). 5-114
- Abbildung 36: Durchflusszytometrie: Prozentualer Anteil membranintakter und membrangeschädigter Bakterien (a). Einfluss von LOP-Wasser als silberfreie Kontrolle (b), AgNPs (100 µg L⁻¹) (c), AgNO₃ (100 µg L⁻¹) (d), Hitze (30 min, 65 °C) (e) Isopropanol (70 % (v/v)) (f) und auf die Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung, Durchflusszytometrie) von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen (1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹) suspendiert in LOP nach 24 h bei 36 °C. Q: Verhältnis SYTO 9 gefärbte Zellen und Propidiumiodid gefärbte Zellen, n=3. 5-116

- Abbildung 37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit PFD (silberfreie Kontrolle) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-118
- Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit AgNPs (500 µg mL⁻¹ Ag) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-119
- Abbildung 39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit Silbernitrat (25 µg mL⁻¹) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-120
- Abbildung 40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* AdS Biofilmzellen, welche mit PFD (Kontrolle) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-121
- Abbildung 41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* AdS Biofilmzellen, welche mit AgNPs (500 µg mL Ag⁻¹) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und die zugehörigen EDX-Spektren (c, e) gemessen im roten Kasten in den Ausschnitten (d, f). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-122
- Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* AdS Biofilmzellen, welche mit Silbernitrat (25 µg mL⁻¹ Ag) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (d) im roten Kasten in Ausschnitt (e). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1. 5-123
- Abbildung 43: Zelllängen planktonischer Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silberexposition (AgNPs und AgNO₃), \bar{X} = mittlere Zelllänge, n=30. 5-124
- Abbildung 44: 2D-DIGE der planktonischen Bakterien der Kontrolle (a), der silberexponierten Bakterien (Silbernitrat (25 µg mL⁻¹ Ag)) (b), das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat (c) und das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat und des internen Standards (d), *P. aeruginosa* AdS, aus drei biologischen Proben. 5-126

- Abbildung 45: 2D-DIGE der planktonischen Bakterien der Kontrolle (a), der silberexponierten Bakterien (Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$)) (b), das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat (c) und das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat und des internen Standards (d), *P. aeruginosa* AdS, aus drei biologischen Proben.....5-127
- Abbildung 46: Überlagertes 2D-DIGE Bild der planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silber (Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$)). Rote Markierungen zeigen signifikant unterschiedliche Spots.5-128
- Abbildung 47: Überlagertes 2D-DIGE Bild der Biofilme von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$). Rote Markierungen zeigen signifikant unterschiedliche Spots.5-129
- Abbildung 48: Koloniezahl und Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa* AdS (planktonische Bakterien und Biofilme) ohne Silber (a), in Anwesenheit von AgNPs ($9,25 \text{ mM}$) (b) und AgNO_3 ($0,59 \text{ mM}$) (c) in HEPES-Puffer (100 mM , $\text{pH } 7$). Exposition für 24 h bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Zugabe von unterschiedlichen Substanzen (Natriumpyruvat (100 mM), D-Mannitol (100 mM), Katalase ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), Ascorbinsäure (10 mM), L-Cystein (10 mM), N-Acetylcystein (10 mM)). $n=2-6$5-134
- Abbildung 49: Hemmhoftest der gentamicinhaltigen Knochenzement bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 mit unterschiedlichen AgNP-Konzentrationen ($0-5 \text{ mg g}^{-1} \text{Ag}$). Aufsicht auf Agarplatten mit Prüfkörpern in der Mitte.5-136
- Abbildung 50: Mit Kristallviolett angefärbte Biofilme von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement ohne AgNPs (a) und mit AgNPs, 3 (b), 4 (c), 5 (d) mg g^{-1} nach 7 d in LB-Medium ($36 \text{ }^\circ\text{C}$).5-137
- Abbildung 51: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, $n=3$5-139
- Abbildung 52: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *S. aureus* ATCC 6538 auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, $n=3$5-140
- Abbildung 53: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, $n=3$5-141
- Abbildung 54: Planktonisches Wachstum (a, c) und Biofilmbildung (b, d) von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement mit Gentamicin mit und ohne AgNPs, $n=3$5-142

Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c), 5 mg g⁻¹ Ag (d) und mit Gentamicin (e) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-143

Abbildung 56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* AdS auf Titan ohne Silber (a) und mit Silber (2,5 %) (b) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-144

Abbildung 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 3538 auf Knochenzement ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c), 5 mg g⁻¹ Ag (d) und mit Gentamicin (e) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-145

Abbildung 58: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 6538 auf Titan ohne Silber (a) und mit 2,5 % Ag (b) nach 24 h bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-145

Abbildung 59: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 6538 auf Kollagen ohne Silber (a) und mit 200 mg g⁻¹ Ag (b) nach 24 h bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung. n=2 5-146

Abbildung 60: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c), 5 mg g⁻¹ Ag (d) und mit Gentamicin (e) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-146

Abbildung 61: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement mit Gentamicin ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c) und 5 mg g⁻¹ Ag (d) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-147

Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Titan ohne Silber (a) und mit 2,5 % Ag (b) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung. n=2 5-147

Abbildung 63: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Kollagen ohne Silber (a) und mit 200 mg g⁻¹ Ag (b) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2. 5-148

- Abbildung 64: Koloniezahl (KBE), Gesamtzellzahl (qPCR) und membranintakte Bakterien (PMA-qPCR) von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement (3, 4, 5 mg g⁻¹ Ag) (a), Knochenzement mit Gentamicin ohne Silber (b) und Titan (0, 2,5 %) (c), Inkubation in LB-Medium, 36 °C, 24 h. N_{Ag}: KBE, membranintakte Zellen und Gesamtzellzahl pro Prüfkörper mit AgNPs, N₀: KBE, membranintakte Zellen und Gesamtzellzahl pro Prüfkörper ohne AgNPs, n=3-5. 5-151
- Abbildung 65: Einfluss von AgNPs (500 und 1000 µg mL⁻¹) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD[®]-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter Glo[™]-Kit)..... 6-173
- Abbildung 66: Einfluss von AgNO₃ (25 und 100 µg mL⁻¹) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD[®]-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter Glo[™]-Kit)..... 6-174
- Abbildung 67: Einfluss von AgNPs (100 µg L⁻¹) (a), AgNO₃ (100 µg L⁻¹) (b), Isopropanol (70 % (v/v)) (c) und Hitze (30 min, 65 °C) auf die Vitalität (Koloniezahl, Gesamtzellzahl, Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung und PMA-qPCR) von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen (1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹) in PFD nach 24 h bei 36 °C..... 6-175

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteil von <i>P. aeruginosa</i> an Infektionen (Jarvis & Martoos, 1992; Mena & Gerba 2009; Torres et al., 1990), a) bezogen auf alle Sterbefälle.	1-4
Tabelle 2: Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i> (Blier et al. 2012; van Delen, 2004; Hahn, 1997; Lamont et al., 2002; Lau et al., 2004; Pearson et al., 2000; Pearson & Pesci, 1997; Smith 2003; Vasil, 1986; Winkler et al., 1985).	1-5
Tabelle 3: Anteil von <i>S. aureus</i> an Infektionen (Hahn et al., 2001c; Jarvis & Martoos, 1992).	1-7
Tabelle 4: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> (Foster, 2005; Archer, 1998).	1-7
Tabelle 5: Anteil von <i>S. epidermidis</i> (a) koagulase-negative Staphylokokken) an Infektionen (Hahn et al., 2001b; Jarvis & Martoos, 1992).	1-8
Tabelle 6: Virulenzfaktoren von <i>S. epidermidis</i> (Otto, 2009).	1-9
Tabelle 7: Einfluss von silberhaltigen Medizinprodukten oder silberhaltigen Materialien für Medizinprodukte auf die Inhibierung der Biofilmbildung und der Inaktivierung von Bakterien in Biofilmen in der Literatur.	1-18
Tabelle 8: Parameter und Nachweismethoden für die Vitalität von Bakterien (modifiziert nach Hammes et al., 2011).	1-25
Tabelle 9: Chemikalien	3-32
Tabelle 10: Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).	3-34
Tabelle 11: Primer und Sonden für die quantitative Real Time Quantitativen TaqMan™ PCR (qPCR).	3-34
Tabelle 12: Enzyme.....	3-34

Tabelle 13: Materialien	3-34
Tabelle 14: Geräte	3-35
Tabelle 15: PC-Software	3-36
Tabelle 16: Kommerziell erhältliche Kits.....	3-37
Tabelle 17: Geräteeinstellungen der Durchflusszytometrie.....	4-54
Tabelle 18: Optimierung der PMA-qPCR, Variationen der PMA-Konzentration, der Inkubationszeit und die Temperatur nach Nocker et al., 2007 und Nkuipou-Kenfack et al., 2013.....	4-58
Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der qPCR für <i>P. aeruginosa</i>	4-59
Tabelle 20: Temperaturprofil der qPCR für <i>P. aeruginosa</i>	4-59
Tabelle 21: Programm für die isoelektrische Fokussierung (Gesamtvoltstunden: 97.100 Vh).	4-62
Tabelle 22: Photomultiplier-Einstellungen des Laserscanners zur Bildgebung der 2D-DIGE.	4-63
Tabelle 23: Substanzen in HEPES (100 mM) – Endkonzentrationen im Testsystem.	4-69
Tabelle 24: Übersicht der AgNP-dotierten Medizinprodukte.....	4-72
Tabelle 25: Z-Average und Polydispersitätsindex (PDI) der AgNPs in Wasser nach 0 h, in LB-Medium nach 0 h, in LB-Medium nach 24-stündiger Inkubation bei 20 °C und bei 36 °C.	5-81
Tabelle 26: Wachstumsraten (μ), Verdopplungszeiten (t_d) und die maximale Zelldichte der Bakterienstämme <i>P. aeruginosa</i> AdS, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 in LB-, NB- und CASO-Medium. n=3.....	5-84
Tabelle 27: Durchmesser der Hemmhöfe beim Hemmhoftest mit Gentamicin (10 μ g pro Blättchen) der Bakterienstämme <i>P. aeruginosa</i> AdS, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 und der entsprechende Gentamicin-Breakpoint. ¹ (EUCAST, 2013a), n=1.	5-87
Tabelle 28: Qualitativer Nachweis der Lipaseaktivität nach Howe und Ward (1976) auf LB-Agar, 36 °C, 48 h. +: Lipaseaktivität, -: keine Lipaseaktivität, Exemplarische Darstellung der Aufsicht auf die Kolonien mit einer Stereolupe (6,8-fache Vergrößerung): Positivkontrolle <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (a) und Negativkontrolle <i>E. coli</i> ATCC 1177 (b).	5-88

Tabelle 29: Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Silber (AgNPs und AgNO₃) bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im statischen Mikrotiterplattenverfahren, 24 h, 36 °C, n=3.....5-89

Tabelle 30: MHK und MBK von Silber (AgNPs und AgNO₃) bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im Schüttelwasserbad (180 Upm) in Reagenzgläsern (24 h, 36 °C), n=3.....5-90

Tabelle 31: pH-Werte von LOP-Wasser, AgNP-Dispersionen und Silbernitratlösung (10, 100 und 500 µg mL⁻¹) in LOP-Wasser bei 21,5-22 °C.5-111

Tabelle 32: Identifizierung der Proteine aus silberexponierten *P. aeruginosa* AdS Biofilmen mittels LC-MS. ^{a)}Spotnummer bezogen auf Abbildung 47. Identifikation mittels MASCOT Datenbank. Weitere Informationen: Pseudomonas.com.....5-130

Tabelle 33: Gesamtzellzahl (qPCR) von *P. aeruginosa* AdS auf den Prüfkörpern.....5-149

Tabelle 34: Literaturübersicht zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von AgNPs bei *P. aeruginosa*. nb: nicht bestimmt, kA: keine Angaben.....6-156

Tabelle 35: Literaturübersicht zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von Silberionen bei *P. aeruginosa*. nb: nicht bestimmt.6-158

Tabelle 36: Literaturrecherche zur Proteomanalytik (2D-PAGE) von silberexponierten Bakterien.6-179

Tabelle 37: Literaturrecherche zur Proteomanalytik (2D-PAGE) von Bakterien im VBNC-Zustand; Liu & Libchaber, 2004; Hong et al., 2006; Li et al., 2014.....6-181

Abkürzungen

2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
2D-PAGE	Zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese
ad	addierte, auffüllen auf
ATP	Adenosintriphosphat
AgNPs (AgNP)	Nanosilber
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
CASO	Casein-Soja-Pepton
CHAPS	[3-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CF	Zystischer Fibrose
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVC	“Direct-Viable-Count”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie

ESEM	Rasterelektronenmikroskop, “Environmental Scanning Electron Microscope”
EUCAST	“The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GZZ	Gesamtzellzahl
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
IAI	Implantat-assoziierte Infektionen, „implant-associated infections“
ID	Implantate, welche im Körper verweilen, „indwelling medical devices“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient
LB-Agar	„Lysogeny Broth“-Agar
LB-Medium	„Lysogeny Broth“-Medium
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung
LOP	Wasser, ROTIPURAN® „Low Organic Purity“
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MRSA	methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

MRSE	methicillinresistenter <i>Staphylococcus epidermids</i>
MS-Wasser	Massenspektroskopie-Wasser
NA-Agar	Nähragar
NB-Medium	Nährmedium
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD)
p. a.	für die Analyse, „per analysis“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Polydispersitätsindex
PFD	Partikelfreies, entionisiertes Wasser
PMA	Propidiummonoazid
PMA-qPCR	Propidiummonoazid Real Time Quantitative TaqMan™ PCR
PMMA	Polymethylmethacrylat
qPCR	Real Time Quantitative TaqMan™ PCR
SBF	Simulierte Körperflüssigkeit, „Simulated body fluid“
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Tagat® TO V	Polyoxyethylen-glyceroltrioleat
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitanmonolaurat
Tween 80	Polyoxyethylene (80)-sorbitanmonooleat
TAI	Gewebe-assoziierte Infektionen, “tissue-associated infections”

Abkürzungen

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
VBNC	lebend, aber nicht kultivierbar, "viable but nonculturable"-Zustand
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projekts „Nanosilber – Wirkmechanismen und Untersuchungen ihrer möglichen Interaktionen mit Geweben, Zellen und Molekülen. Definition ihres relevanten Unverträglichkeitspotentials“ durchgeführt (www.nanosilver-project.info).

Die antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber (AgNPs) wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits anhand von dispergierten AgNPs und andererseits anhand von AgNP-haltigen Medizinprodukten (Knochenzemente, Knochenimplantate und Kollagenfolien) untersucht.

In den meisten Studien wird die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber ausschließlich anhand von planktonischen Bakterien untersucht, ohne die Lebensform des Biofilms zu berücksichtigen. Da Biofilme jedoch für einen Großteil der Infektionen im Menschen verantwortlich sind, ist die Berücksichtigung von Biofilmen bei der Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber besonders wichtig. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs und Silbernitrat anhand von planktonischen Bakterien und Biofilmen untersucht. AgNPs waren in der Lage das Wachstum der klinisch relevanten Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* vollständig zu hemmen. Zudem zeigten AgNPs das Potential, die Biofilmbildung dieser Bakterienstämme zu inhibieren. AgNPs zeigten auch eine inaktivierende Wirkung (Abnahme der Koloniezahlen) auf bereits etablierte Biofilme und planktonische Bakterien in der stationären Wuchsphase. Biofilme waren jedoch deutlich weniger empfindlich gegen AgNPs als planktonische Bakterien. Vergleicht man die Wachstumshemmung, die Hemmung der Biofilmbildung und die Inaktivierung von Biofilmen durch AgNPs mit Silbernitrat (beruhend auf theoretisch berechneter Silberbasis), dann ist die Wirksamkeit von AgNPs deutlich geringer als die von Silbernitrat.

Die Tatsache, dass die Bakterien nach Silber-Exposition nicht mehr kultivierbar waren, muss nicht bedeuten, dass sie abgetötet wurden. Unter für sie ungünstigen Bedingungen können Bakterien in einen nicht kultivierbaren (viable but nonculturable (VBNC)-Zustand) übergehen. In diesem Zustand sind sie unter den Kultivierungsbedingungen, unter denen sie norma-

lerweise wachsen, nicht mehr kultivierbar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sie wieder in den kultivierbaren Zustand zurückkehren, denn diese Bakterien sind nicht tot und weisen einen Erhaltungsstoffwechsel auf. Es gibt bisher keine Studie, in der ein silberinduzierter Übergang in den VBNC-Zustand untersucht wurde. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit kulturelle und kultivierungsunabhängige Methoden eingesetzt, um den physiologischen Zustand von silberexponiertem *P. aeruginosa*, unter Berücksichtigung des VBNC-Zustandes, zu untersuchen.

Es wurde festgestellt, dass *P. aeruginosa* in Gegenwart von Silber (AgNPs und Silbernitrat) in einen nicht kultivierbaren Zustand überging, in dem unterschiedliche Vitalitätsparameter, sowohl bei Biofilmen als auch bei planktonischen Bakterien, noch nachweisbar waren. Die silberexponierten Bakterien wiesen das Vorhandensein von DNA (DAPI-Färbung) und ribosomaler RNA (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), Erhalt der Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung und Propidiummonoazid Real Time Quantitative TaqMan PCR (PMA-qPCR)), das Vorhandensein von ATP und eine nicht zerstörte Zellmorphologie (Rasterelektronenmikroskopie) auf. Betrachtet man die Vitalitätsfaktoren einzeln, dann ist keiner von ihnen allein aussagekräftig. Betrachtet man sie jedoch in der Summe, dann ergibt sich klar, dass diese Bakterien nicht abgetötet wurden, sondern sich im VBNC-Zustand befanden.

Es wurde zudem untersucht, ob sich das Proteom von *P. aeruginosa* im silberinduzierten VBNC-Zustand gegenüber der silberfreien Kontrolle verändert hat. Sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals zur Charakterisierung des Proteoms von VBNC-Bakterien eingesetzt und stellte sich als geeignete Methode heraus, um die Veränderung des Protein-Fingerabdrucks von Bakterien im VBNC-Zustand zu untersuchen. Es wurden sowohl Proteine herauf- als auch herunterreguliert.

Es gibt unterschiedliche Wirkmechanismen von Silber gegenüber Bakterien. Anhand von planktonischen Bakterien und Biofilmen von *P. aeruginosa* wurde untersucht, ob die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Interaktion mit Thiolgruppen im verwendeten Testsystem eine Rolle spielen. Hierzu wurden Scavenger für reaktive Sauerstoffspezies und SH-Gruppen enthaltene Substanzen zu silberexponierten Zellen gegeben. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid scheint lediglich bei der Wirkung von AgNPs eine Rolle zu spielen. Die Interaktion von Silber mit Thiolgruppen (beispielsweise an Proteinen) scheint sowohl im Falle von Silbernitrat als auch im Falle der AgNPs eine wichtige Rolle bei der antibakteriellen Wirkung auf *P. aeruginosa* zu spielen.

Zusätzlich zu den Versuchen mit AgNP-Dispersionen wurden AgNP-dotierte Medizinprodukte (Knochenzement mit und ohne Gentamicin, Titan und Kollagenfolien) bezüglich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit, der Hemmung der Biofilmbildung und des Einflusses auf die Vitali-

tät von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht. Die *in vitro* ermittelten Ergebnisse der AgNP-dotierten Medizinprodukte in LB-Medium zeigten bei den drei Bakterienspezies keinen inhibierenden Effekt auf die Biofilmbildung. Zudem wurde kein bedeutender Einfluss auf die Vitalität der Biofilme im Vergleich zu den silberfreien Medizinprodukten festgestellt. In der Fachliteratur gibt es widersprüchliche Ergebnisse zur Wirksamkeit von (nano-)silberhaltigen Medizinprodukten. Dies gilt sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Untersuchungen. Es fehlen, abgesehen von silberhaltigen Wundauflagen, bislang klinische Studien, die die Wirksamkeit von silberhaltigen Medizinprodukten, wie Knochenzementen oder Knochenimplantaten, nachweisen. Es gibt zudem Studien, die zeigen, dass das therapeutische Fenster von Silber sehr schmal ist und unter körperähnlichen Bedingungen weiter geschmälert wird.

Aufgrund des silberinduzierten VBNC-Zustandes und der geringen Effektivität der AgNPs in den Medizinprodukten, sollte der Einsatz von AgNPs in Medizinprodukten kritisch betrachtet werden.

1 Einleitung

1.1 Medizinische Biofilmesdown

Bei einem Großteil bakterieller Infektionen (etwa 65 %) im menschlichen Körper sind Biofilme involviert (Bjarnsholt et al., 2013; Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2004, Williams & Ramage, 2015). Biofilme sind definiert als mikrobielle Aggregate, welche sich an Grenzflächen bilden und von einer selbst produzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben sind (Flemming & Wingender, 2010). EPS sind Biopolymere mikrobiologischen Ursprungs, welche in hohem Maße hydratisiert sind und eine Matrix bilden, die den Biofilm zusammenhält. Diese Biopolymere bestehen größtenteils aus Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und Nukleinsäuren. Dispersions-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den EPS halten den Biofilm zusammen und verhindern, dass er in sich zusammenfällt (Flemming & Wingender, 2002; Mayer et al., 1999). Biofilme sind sowohl in der Umwelt, in technischen Systemen und im klinischen Bereich die vorherrschende Lebensform von Mikroorganismen (Irie et al., 2004).

Die Ausbildung eines Biofilms erfolgt normalerweise in mehreren Schritten. Anhand von Reinkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden folgende Schritte der Biofilmbildung beschrieben: Primäradhäsion (reversibel und irreversibel), Ausbildung von Mikrokolonien, Wachstum/Reifung und Dispersion (Hall-Stoodley et al., 2004). Marshall et al. (1971) beschrieben die Primäradhäsion anhand von *Pseudomonas* sp. an Oberflächen als einen zweistufigen Prozess. Bei der reversiblen Anheftung werden Bakterien nur schwach an der Oberfläche festgehalten und Brownsche Molekularbewegung ist noch vorhanden. Bei der irreversiblen Adhäsion ist keinerlei Bewegung mehr feststellbar. Die Anheftung wird von verschiedenen Bedingungen, wie dem Substratum, dem „Conditioning Film“, der Hydrodynamik, dem Medium und den Eigenschaften der Zellen beeinflusst (Donlan & Costerton, 2002). Nach der Anheftung vermehren sich die Mikroorganismen und bilden Mikrokolonien und EPS, die diese umgeben. Anschließend wird durch Wachstum/Reifung ein Biofilm ausgebildet (Hall-Stoodley et al., 2004; Sauer et al., 2002). Durch Dispersion und Abschälen („slough-

hing off“) können einzelne Zellen oder ganze Teile des Biofilms abgelöst und transportiert werden (Flemming, 1991). Bei manchen Mikroorganismen handelt es sich dabei um einen aktiven Prozess, der unter anderem dazu beiträgt andere ökologische Nischen zu erreichen (Hall-Stoodley et al., 2004). Sauer et al. (2002) zeigten durch die Untersuchung des Proteoms von *P. aeruginosa*-Biofilmen, dass sich die Physiologie der Biofilmzellen in den verschiedenen Phasen dieses Lebenszyklus deutlich voneinander unterscheidet. Sie zeigten auch, dass planktonische Zellen mehr Ähnlichkeit mit den Zellen im Stadium der Dispersion als mit Zellen in der Reifephase haben.

Man spricht von einer Infektion, wenn Mikroorganismen einen Makroorganismus kolonisieren und sich vermehren (Madigan et al., 2003). Eine daraus resultierende Schädigungs- und/oder Abwehrreaktion im Wirt nennt man Infektionskrankheit (Hahn et al., 2001a; Madigan et al., 2003). Eine Infektion besteht aus vier Schritten: Adhärenz, Invasion, Etablierung und Schädigung. Pathogene Bakterien weisen unterschiedliche Virulenzfaktoren auf. Virulenzfaktoren können Strukturelemente (z.B. Motilität) oder Stoffwechselprodukte (z.B. Toxine) sein, welche eine Ansiedlung von Bakterien begünstigen oder eine Schädigungsreaktion hervorrufen können (Hahn et al., 2001b).

Biofilm-assoziierte Infektionen können dadurch entstehen, dass sich Biofilme auf abiotischen (Medizinprodukte) oder biotischen Oberflächen (Gewebe) im menschlichen Körper bilden. In der Klinik unterscheidet man zwischen Infektionen welche im Zusammenhang mit Medizinprodukten stehen (IAI – vom englischen: implant-associated infections) und Infektionen, welche auf und in Geweben entstehen (TAI – vom englischen: tissue-associated infections) (Jass et al., 2003). Zu den Bakterien die häufig von Implantaten, welche im Körper verweilen (ID – vom englischen indwelling medical devices), isoliert werden und zu prothesenassoziierten Infektionen führen können, gehören unter anderem die grampositiven Staphylokokken wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* und das gramnegative Bakterium *P. aeruginosa* (Donlan, 2001; Hall-Stoodley et al., 2004). Zu den ID, welche im Körper mit Biofilmen besiedelt werden können, gehören zentrale Venenkatheter, Endotrachealtuben, Intrauterinpressare, Herzklappenersatz, Herzschrittmacher, Dialysekatheter, prothetischer Gelenkersatz, Paukendrainagen, Harnwegskatheter und Stimmprothesen (Jass et al., 2003). Es gibt unterschiedliche Eintragungswege für Mikroorganismen in den menschlichen Körper und auf IDs. Die Mikroorganismen können entweder beim Einbringen der Medizinprodukte, durch eine zeitweilige Bakteriämie oder beim Entfernen des Medizinprodukts in den Körper oder an das Medizinprodukt gelangen (Tunney et al., 1996). Nach dem Einsetzen von Medizinprodukten kann es zu akuten, subakuten und späten Infektionen kommen (Gristina & Kolkin, 1983). Akute Infektionen treten innerhalb von 12 Wochen nach der Operation auf. Eine subakute Infektion tritt innerhalb eines und eine späte Infektion nach mehr als einem Jahr auf.

Planktonische Bakterien werden normalerweise im Körper durch die humorale oder zelluläre Autoimmunabwehr erkannt und durch Antikörper oder Phagozytose bekämpft. Zudem

können sie, sofern sie empfänglich für Antibiotika sind, durch diese therapiert werden. Adhärenente Bakterien hingegen sind im Biofilm sowohl gegen die körpereigene Abwehr als auch gegen Antibiotika geschützt (Bardouniotis et al., 2001; Costerton et al., 1999; Donlan und Costerton, 2002). Aus diesem Grund sind Biofilme häufige Verursacher von persistierenden Infektionen (Markowska et al., 2013). Phagozyten des Wirtes setzen bei einer Infektion phagolytische Enzyme frei, um den Biofilm zu bekämpfen. Wenn Phagozyten ihr Ziel, die geschützten Biofilmorganismen, verfehlen, dann werden diese Enzyme im umliegenden Gewebe freigesetzt. Diesen Vorgang nennt man frustrierte Phagozytose. Umliegendes Gewebe selbst kann in diesem Fall durch die Enzyme geschädigt werden. Durch diesen Prozess kann wiederum eine Dispersion von Biofilmzellen ausgelöst und die Infektion somit verbreitet werden (Costerton et al., 1999).

Etwa 3,5 % der Patienten auf Allgemeinstationen und 15 % der Patienten auf Intensivstationen in deutschen Krankenhäusern erleiden eine nosokomiale Infektion (Daschner, 2012). Nosokomiale Infektionen sind definiert als eine „Reaktion auf das Vorhandensein von Mikroorganismen oder ihrer Toxine und das Vorliegen von lokalen oder systemischen Infektionszeichen. Es dürfen bei einer solchen Infektion keine Hinweise existieren, dass die Infektion bei der Aufnahme in das Krankenhaus bereits vorhanden oder in der Inkubationsphase war“ (RKI, 2011). Am häufigsten treten Harnwegsinfektionen, Venenkathetersepsis, Beatmungspneumonien und postoperative Wundinfektionen auf (Daschner, 2012).

1.2 Klinisch relevante Bakterien in Biofilmen

Zu den häufigsten Erregern von nosokomialen Infektionen gehören *P. aeruginosa*, *S. aureus* und koagulase-negative Staphylokokken wie beispielsweise *S. epidermidis* (Archer, 1998; Donlan, 2001; Foster et al., 2014; Hall-Stoodley et al., 2004; Moazami-Goudarzi & Eftekhar, 2013; Vuong & Otto, 2002). Diese drei Bakterien bilden Biofilme und können bei biofilm-assoziierten Infektionen im Menschen involviert sein.

1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist von sehr hoher klinischer Relevanz und gehört zu den Bakterienspezies, welche am häufigsten für nosokomiale Infektionen im Menschen verantwortlich sind (Moazami-Goudarzi & Eftekhar, 2013). *P. aeruginosa* bildet Biofilme und ist einer der am besten untersuchtesten Biofilm-Modellorganismen (Jensen et al., 2014; Watnick, 2000). Das gramnegative Bakterium ist chemoorganotroph, stäbchenförmig, nicht sporenbildend und monotrich polar begeißelt (Cryz, 1984; Madigan et al., 2003; Steinmetz, 2012). Diese Bakterienspezies kann sich, sowohl in einer aeroben als auch in einer anoxischen Umgebung,

vermehrten und Sauerstoff oder Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor für die Atmung nutzen (Bjarnsholt et al., 2013).

Die erste wissenschaftliche Studie über *P. aeruginosa* wurde von Carl Gessard im Jahr 1882 veröffentlicht (Cryz, 1984). Er isolierte dieses Bakterium aus Wundverbänden, die eine blau-grüne Färbung aufwiesen. Er beschrieb eine Nachweismethode, die sich das blau-grüne Leuchten des Pigments Pyocyanin, welches *P. aeruginosa* bildet, bei UV-Bestrahlung zu Nutze macht. Auch heute noch ist die typische blau-grün Färbung von infizierten Wunden ein erstes Anzeichen für *P. aeruginosa* Infektionen (Cryz, 1984). Nach dieser Färbung wurde *P. aeruginosa* benannt (aerugo – aus dem lateinischen: Grünspan) (Vogt et al., 2001).

P. aeruginosa ist ein fakultativ pathogener Verursacher von lokalen und systemischen Infektionen. Hierbei kann es sich sowohl um akute als auch um chronische Infektionen handeln (Goodman et al., 2004; Modak & Fox, 1981). *P. aeruginosa* ist der fünfthäufigste Verursacher von nosokomialen Infektionen und ist für 10 % aller im Krankenhaus zugezogenen Infektionen verantwortlich (Mena & Gerba 2009; Obritsch et al., 2005). Dieses Bakterium verursacht Ohr-, Augen- und Hautinfektionen, welche meist durch den Kontakt mit kontaminiertem Wasser (z.B. in Schwimmbädern) oder durch das Tragen von Kontaktlinsen entstehen (Mena & Gerba, 2009). *P. aeruginosa* kann besonders für immunsupprimierte Patienten eine große Gefahr darstellen. Diese Bakterienspezies verursacht Wundinfektionen, Sepsis, Endokarditis, Osteomyelitis, Keratitis, Endophthalmitis, Meningitis, Pneumonien (besonders bei Mukoviszidose-Patienten), Harnwegsinfektionen, gastrointestinale Infektionen und besiedelt häufig Wunden, insbesondere von Brandopfern (Botzenhart & Döring, 1993; Mena & Gerba, 2009). Nosokomiale Sepsis und Pneumonie, welche durch *P. aeruginosa* ausgelöst werden, haben eine hohe Letalitätsrate (Steinmetz, 2012). Bei Infektionen von Brandwunden mit letalem Verlauf macht *P. aeruginosa* als Verursacher einen Anteil von 70 % aus (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anteil von *P. aeruginosa* an Infektionen (Jarvis & Martoee, 1992; Mena & Gerba 2009; Torres et al., 1990), a) bezogen auf alle Sterbefälle.

Krankheit	Anteil (%) der Infektionen, die durch <i>P. aeruginosa</i> verursacht werden
Brandwundeninfektion ^{a)}	70
Otitis externa	70
Infektionen der Atemweg	5-16,9
Infektionen chirurgischer Wunden	8,2
Sepsis	3,6
Harnwegsinfekte	12

Eine bedeutende Rolle spielt *P. aeruginosa* bei Patienten, welche an Zystischer Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, erkrankt sind (Oliver et al., 2000). Die Zystische Fibrose ist eine unheilbare Erbkrankheit, bei der durch Drüsen (zum Beispiel in den Atemwegen) ein zu

zähflüssiger Schleim gebildet wird (Liechti et al., 1992). Ein dadurch erschwerter Sekretabfluss führt dazu, dass die Lungen von CF-Patienten häufig mit *P. aeruginosa* besiedelt sind (Oliver et al., 2000). Bei *P. aeruginosa* unterscheidet man zwischen mukoiden und nicht-mukoiden Stämmen (Phillips, 1969). Mukoide Stämme unterscheiden sich von anderen Stämmen durch ihre Fähigkeit das Exopolysaccharid Alginate zu bilden (Linker & Jones, 1964). Die Besiedler der Lungen von CF-Patienten sind für gewöhnlich mukoide *P. aeruginosa* Stämme (Govan et al., 1996). Einmal in der Lunge, können diese Stämme Biofilme bilden und nur selten inaktiviert werden (Bjarnsholt et al., 2009; Govan et al., 1996). Alginate schützt die Bakterien im Körper vor Phagozytose (Steinmetz, 2012). Dies führt zu chronischen Infektionen, welche die Krankheitssymptome von CF noch deutlich verschlimmern (Govan et al., 1996).

P. aeruginosa besitzt sowohl zelluläre als auch extrazelluläre Virulenzfaktoren (Tabelle 2). Es handelt sich um ein Zusammenspiel von einer Reihe von Virulenzfaktoren, die dazu führen, dass *P. aeruginosa* den menschlichen Körper kolonisiert, Biofilme bildet, Gewebe nekrotisiert, in die Blutbahn übergeht und lokale und systemische Entzündungsreaktionen auslöst (van Delen, 2004).

Tabelle 2: Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* (Blier et al. 2012; van Delen, 2004; Hahn, 1997; Lamont et al., 2002; Lau et al., 2004; Pearson et al., 2000; Pearson & Pesci, 1997; Smith 2003; Vasil, 1986; Winkler et al., 1985).

Virulenzfaktoren	Funktion/Mechanismus
Flagellum Typ IV Pili	Anheftung
Alginate Superoxid Dismutase Katalase	Schutz gegen Abwehrmechanismen
Elastase A, B Alkalische Protease	Gewebeschädigung
Rhamnolipide Phospholipasen	Hämolyse
N-Acyl-Homoserin-Lactone	Quorum Sensing
Cyanwasserstoff Exotoxin A Pyocyanin	Toxine

Dieses Bakterium ist ubiquitär verbreitet. Man findet dieses Bakterium in Böden, Oberflächenwasser, gelegentlich im Trinkwasser, im Menschen und in Tieren und auf der Oberfläche von Obst und Gemüse. Es ist zudem in der Lage sich auf den meisten feuchten Oberflächen wie Waschbecken, Luftbefeuchter, Schläuchen von Beatmungs- und Infusionsgeräten, Baby-Inkubatoren, Desinfektionsmittel, Seifen und Waschlappen zu vermehren und Biofilme zu bilden (Bjarnsholt et al., 2013; Elrod & Braun, 1942; Kominos et al., 1972; Mena & Gerba, 2009; Vogt et al., 2001). Übertragungswege von *P. aeruginosa* sind Kontakt, Inhalation und

selten die Ingestion (Döring et al., 1996; Vogt et al., 2001). Dieses Bakterium kann durch Wasser, Nahrungsmittel, Badegewässer aber auch von Mensch zu Mensch übertragen werden. In Haushalten sind die meisten Abflüsse von Waschbecken, Duschen, Toiletten und Badewannen mit *P. aeruginosa* besiedelt (Döring et al., 1996).

P. aeruginosa ist resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika. Dieser Keim besitzt eine intrinsische Resistenz gegen Antibiotika wie Aminoglykoside, Fluorchinolone und β -Lactame (Breidenstein et al., 2011). Diese Resistenzen sind in der geringen Permeabilität der äußeren Membran begründet (Hancock, 1998; Nicas & Hancock, 1983). Oftmals sprechen *P. aeruginosa* Infektionen nicht auf für dieses Bakterium spezifischen Antibiotika an, weshalb es zu chronischen Infektionen kommt (Costerton et al., 1999).

1.2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus gehört zu den wichtigsten opportunistischen Erregern beim Menschen und ist einer der häufigste Verursacher von nosokomialen Infektionen (Archer, 1998; Foster et al., 2014). Hierzu trägt auch die Eigenschaft von *S. aureus*, Biofilme zu bilden, bei (Post et al., 2014). *S. aureus* ist ein fakultativ pathogenes Bakterium. Bei vielen Menschen besiedelt *S. aureus* die Haut und die oberen Atemwege, ohne dabei Infektionen auszulösen (RKI, 2014). Etwa 20-50 % der gesunden Erwachsenen sind mit *S. aureus* besiedelt (Ashiq, 1989; Gatermann, 2012; Noble et al., 1967; Lowy, 1998). Diese Spezies ist gram-positiv, chemoorganotroph, verwertet Kohlenhydrate fermentativ, ist nicht beweglich, nicht sporenbildend und kugelförmig (Haufenkokken) (Gatermann, 2012; Hahn et al., 2001c). *S. aureus* kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (fakultativ anaerob) wachsen (Gatermann, 2012). Durch seine gold-gelbe Pigmentierung unterscheidet sich *S. aureus* von anderen Staphylokokken („*aureus*“ – aus dem lateinischen: golden) (Lowy, 1998). Obwohl er ein häufiger Besiedler des Menschen ist, kann *S. aureus* jedoch auch schwerwiegende Infektionen beim Menschen auslösen. Diese können sowohl ambulant als auch nosokomial zugezogen sein (Cosgrove et al., 2003; Steinberg et al., 1996).

Dieses Bakterium ist Verursacher einer Reihe von oberflächlichen und tief-invasiven Infektionen. Es ist ein Hauptverursacher von Haut-, Gewebe-, Atemwegs-, Knochen- und Gelenkinfektionen (Gatermann, 2012; Hahn et al., 2001c; Lowy, 1998). 70-80 % aller Wundinfektionen sind auf *S. aureus* zurückzuführen (Tabelle 3). Zudem können durch dieses Bakterium lebensbedrohliche Krankheiten wie Bakteriämie, Endokarditis, metastatische Infektionen und Sepsis verursacht werden (Lowy, 1998). *S. aureus* bildet Toxine, welche dem Menschen schaden können. Das Staphylokokken-Enterotoxin führt zu Erbrechen und Durchfall. Das toxische Schocksyndrom und das „Staphylococcal scalded skin syndrome“ sind ebenfalls Symptome der Toxine von *S. aureus* (Gatermann, 2012).

Tabelle 3: Anteil von *S. aureus* an Infektionen (Hahn et al., 2001c; Jarvis & Martoee, 1992).

Krankheit	Anteil (%) der Infektionen, die durch <i>S. aureus</i> verursacht werde
Wundinfektionen	70-80
Osteomyelitiden	50-60
Infektionen chirurgischer Wunden	17,1
Infektionen der Atemwege	16,1
Sepsis	16,5-30
Endokarditis	bis 30

Auch *S. aureus* besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren, welche auf unterschiedliche Weisen wirken und Krankheiten beim Menschen hervorrufen können (Tabelle 4).

Tabelle 4: Virulenzfaktoren von *S. aureus* (Foster, 2005; Archer, 1998).

Virulenzfaktoren	Mechanismus
Kapsel	
Protein A	
Koagulase	Schutz vor
Fettsäure-metabolisierende Enzyme	Abwehrmechanismen
Leucocidin	
Protease	
Nuklease	
Lipase	Eindringen ins Gewebe
Hyaluronidasen	
Staphylokinase	
Toxic Shock Syndrom Toxin	
Enterotoxin	Sepsis-Syndrom
Exfoliatives Toxin	

Die Übertragung von *S. aureus* geschieht größtenteils über Schmierinfektionen, z.B. bei der Übertragung durch die Hände von Krankenhauspersonal von einem Patienten zum nächsten. Etwa 80 % aller klinisch assoziierten *S. aureus* Stämme bilden Penicillase und sind gegen Penicillin und dessen Derivate resistent (Gatermann, 2012). Methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind *S. aureus* Stämme, welche gegen alle Arten von β -Lactamantibiotika, einschließlich Methicillin, resistent sind (Zhao et al., 2001). Sie besitzen ein membrangebundenes Penicillinbindeprotein (PBP2 a), welches sich von denen der anderen β -Lactamresistenten Bakterien unterscheidet. Methicillin, welches normalerweise nicht durch Penicillasen abgebaut wird, kann von methicillinresistenten Bakterien abgebaut werden (Peltroche-Llacsahuanga & Lütticken, 1998). Die meisten MRSA-Stämme besitzen auch eine Multiresistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika (Klevens et al., 2014). Infektionen mit antibiotikaresistenten Mikroorganismen resultieren in einer höheren Morbidität und Mortalität als ähnliche Infektionen mit antibiotikasensitiven Stämmen (Acar, 1997; Cosgrove et al., 2003).

1.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, welches von großer klinischer Bedeutung und für eine Vielzahl von nosokomialen Infektionen verantwortlich ist (Vuong & Otto, 2002). *S. epidermidis* bildet Biofilme und ist das Bakterium, welches am häufigsten an IAI im Menschen beteiligt ist (O’Gara & Humphreys, 2001; Vuong & Otto, 2002). Diese Bakterienspezies ist grampositiv, rund (Haufenkokken) und fakultativ anaerob (aerobe Atmung oder Fermentation) (Gatermann, 2012; Otto, 2009). *S. epidermidis* gehört zu den koagulase-negativen Staphylokokken und grenzt sich durch diese Eigenschaft von *S. aureus* ab (Vuong & Otto, 2002). Wie *S. aureus* besiedelt *S. epidermidis* üblicherweise die menschliche Haut und Schleimhäute ohne eine Infektion hervorzurufen. Diese Bakterienspezies macht den Hauptteil der menschlichen Bakterienflora auf der Haut aus (Hahn et al., 2001a). In Bezug auf Infektionen von Kunststoffimplantaten (Endoplastitis) ist *S. epidermidis* einer der bedeutendsten Pathogene überhaupt (Gatermann, 2012). Bei etwa 50 % aller Infektionen von Gelenkimplantaten ist *S. epidermidis* beteiligt (Tabelle 5). Das Bakterium verursacht zudem häufig Peritonitis (Infektion im Zusammenhang mit Peritonealdialyse), Endokarditis, und Sepsis.

Tabelle 5: Anteil von *S. epidermidis*, a) koagulase-negative Staphylokokken, an Infektionen (Hahn et al., 2001b; Jarvis & Martoos, 1992).

Krankheit	Anteil (%) der Infektionen, die durch <i>S. epidermidis</i> verursacht werden
Gelenkimplantateinfektion	50
Peritonitis bei Peritonealdialyse	50
Shunt-assoziierte Meningitis	50
Endokarditis	40
Sepsis	27,9 ^{a)}
Infektionen chirurgischer Wunden	12,6 ^{a)}
Katheterinfektion	10-30

S. epidermidis wird z.B. durch das Einbringen von Medizinprodukten aus Kunststoff (Herzklappen, Gelenkprothesen, Kathetern) in den Körper gebracht (Hahn et al., 2001c). Diese Bakterienspezies besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren (Tabelle 6).

Tabelle 6: Virulenzfaktoren von *S. epidermidis* (Otto, 2009).

Virulenzfaktoren	Mechanismus
Bifunktionales Autolysin Teichonsäure Elastin-Bindeprotein Bifunktionales Autolysin	Biofilmbildung – durch Primäranheftung an abiotische Oberflächen
Poly-N-Acetylglucosamin Biofilm-assoziiertes Protein Akkumulation-assoziiertes Protein Teichonsäure	Interzelluläre Aggregation
Poly-N-Acetylglucosamin γ -Polyglutaminsäure	Schützende Exopolymere
Metalloprotease Aps-System	Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide
Phenol-lösliches Modulin	Toxine
Cystein-Protease Metalloprotease, Elastase, <i>S. aureus</i> Aureolysin Homolog Glutamylendopeptidase und Serinprotease <i>S. aureus</i> V8 Protease Homolog Lipasen	Exotoxine
Staphyloferrin	Sonstige

S. epidermidis ist resistent gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Er gilt als Reservoir für Resistenzgene, welche er bei einer Infektion durch horizontalen Gentransfer, an andere Bakterien weitergeben kann (Neu, 1992). *S. epidermidis* bildet β -Lactamasen und ist somit resistent gegen β -Lactamantibiotika. Durch ein verändertes PBP2-Protein gibt es auch methicillinresistente Stämme (methicillinresistente *S. epidermidis* - MRSE). Durch phosphorylierende und adenylierende Enzyme sind sie zudem in der Lage Amidoglycoside abzubauen und unschädlich zu machen. Ein verändertes DNA-Gyrase-Protein sorgt für eine gute Verträglichkeit von Fluorchinolonen (Neu, 1992).

1.3 Silber als antimikrobielles Agens

Silber wurde schon lange vor der Entdeckung der Mikroorganismen im 17. Jahrhundert empirisch als antimikrobielles Agens eingesetzt (Alexander 2009; Marx & Barillo, 2014). Seit der Antike wird Silber beispielsweise genutzt, um Wasser zu konservieren und Infektionen zu behandeln. Im 19. Jahrhundert (vor der Entdeckung der Antibiotika), wurde Silber vermehrt zu medizinischen Zwecken eingesetzt. Silbernitrat, auch Höllenstein genannt, wurde bereits 1884 in Form von Augentropfen zur Prävention von Bindehautentzündungen von Säuglingen eingesetzt. Zudem wurde Silber bereits damals zur Behandlung von Brandwunden in Wundauflagen verwendet (Russell und Hugo, 1994). Vor der Entdeckung von Antibiotika war Silber die wichtigste antimikrobielle Substanz in der Medizin. Mit der Kommerzialisierung der

klinischen Anwendung von Antibiotika in den 1940er Jahren ist Silber in der Medizin immer mehr in Vergessenheit geraten (Alexander, 2009). Durch die Bildung von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika ist Silber heutzutage wieder von größerer Bedeutung für medizinische Anwendungen (Schierholz, 1998). Hierbei wurde das Interesse im letzten Jahrzehnt mehr und mehr auf Silber in seiner nanopartikulären Form gelenkt.

1.3.1 Nanosilber

Der Begriff „Nano“ stammt aus dem altgriechischen und bedeutet „Zwerg“ (Jopp, 2006). Nanomaterialien sind laut ISO TS 27687 definiert als Materialien im nanoskaligen Bereich (1-100 nm). Nanomaterialien können in „Nanoobjekte“ (alle drei Außenmaße im Nanomaßstab), Nanofasern (zwei Außenmaße im Nanomaßstab) und Nanoplättchen (ein Außenmaß im Nanomaßstab) unterteilt werden (Abbildung 1).

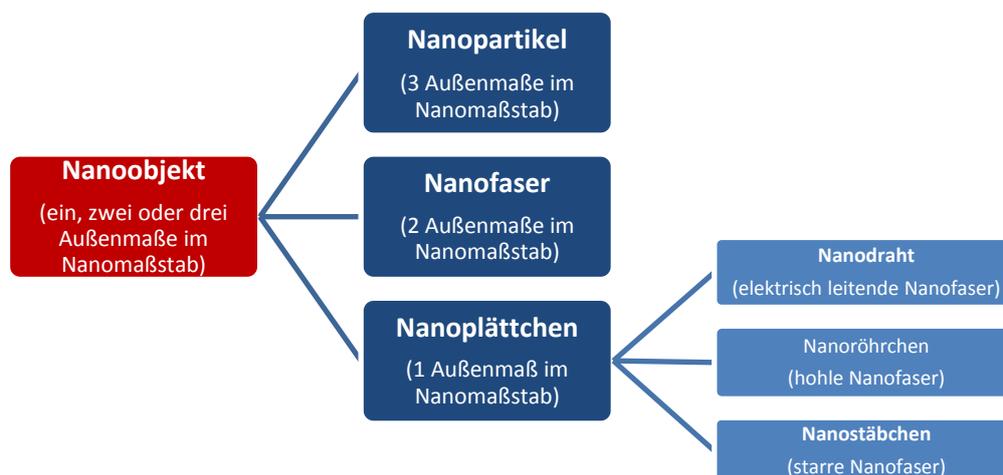


Abbildung 1: Nomenklatur und Hierarchie von mit Nanoobjekten verbundenen Begriffen (nach ISO TS 27687).

Die wissenschaftliche Definition von Nanomaterialien geht jedoch über die der ISO TS 27687 hinaus. Sie geht, neben den Dimensionen, noch auf die Eigenschaften von Nanomaterialien ein. Laut dieser wissenschaftlichen Definition handelt es sich bei Nanomaterialien um absichtlich hergestellte Partikel, die mindestens eine Eigenschaft besitzen, die das Material im nicht-nanoskaligen Bereich nicht besitzt (Auffan et al., 2009).

Als Nanotechnologie bezeichnet man die Manipulation von Materialien durch chemische und/oder physikalische Prozesse zur Erlangung von Materialien mit bestimmten Eigenschaften für spezifische Anwendungen im nanoskaligen Bereich (EPA, 2007). Die Nanotechnologie ist heute bereits ein Multi-Milliardengeschäft und es wird erwartet, dass der Nanotechnologie-Markt bis 2015 auf 1 Billion US-\$ wächst (Stone, 2009).

Nanosilberpartikel (AgNPs) können auf unterschiedliche Weisen (physikalisch, chemisch und biologisch) hergestellt werden. Zu den physikalischen Methoden gehören beispielsweise die Laser-Ablation oder die Kathodenzerstäubung (Grade et al., 2014; Kurihara et al., 2005). Bei der chemischen Herstellung von AgNPs werden Silberionen durch ein Reduktionsmittel, wie z.B. Hydrazin oder Citrat, zu metallischem Silber reduziert (Abou El-Nour et al., 2010). Dies führt dann zu Clustern und anschließend zu Nanopartikeln. Entweder dient das Reduktionsmittel selbst als Stabilisator oder es werden Stabilisatoren hinzugegeben (Cavaliere et al., 2014). Bei der biologischen Synthese von Nanopartikeln wird der natürliche Mechanismus von Pflanzen, Pilzen, Hefen oder Bakterien, Metallionen zu detoxifizieren, genutzt. Mikroorganismen reduzieren ionisches Silber mit Hilfe von Enzymen und bilden AgNPs (Malarkodi et al., 2013; Maliszewska et al., 2009). Dieser Prozess kann intra- oder extrazellulär stattfinden.

AgNPs sind ein Depot für Silberionen. Durch Korrosion werden Silberionen aus AgNPs freigesetzt (Chernousova & Epple, 2013). Diese Eigenschaft macht AgNPs besonders attraktiv für den Einsatz als antimikrobielles Agens. Nanopartikel haben aufgrund ihrer geringen Größe ein besonders großes Oberfläche zu Volumen Verhältnis, welches im Falle von AgNPs die Abgabe von Silberionen begünstigt (Rai et al., 2009). AgNPs werden häufig in Alltagsprodukten eingesetzt. So gibt es unter anderem kommerziell erhältliche Produkte wie Zahnbürsten, Zahnpasta, Bettwäsche, Shampoo und Babyflaschen, welche AgNPs enthalten (Kim et al., 2008). Im Jahr 2014 listete das „Project of emerging nanoparticles“ (<http://www.nanotechproject.org>) 437 kommerziell erhältliche Produkte, die AgNPs enthalten.

Dessen Nutzen und Unbedenklichkeit in Alltagsprodukten ist jedoch sehr umstritten (BfR, 2009). Neben dem wirtschaftlichen Interesse an AgNPs gab es in den letzten Jahren auch ein enormes wissenschaftliches Interesse. Dies bezog sich weitgehend auf die Herstellung, die Anwendung, die Toxizität auf Mensch und Umwelt und auf die antimikrobielle Wirksamkeit. Seit dem Jahr 2000, in dem insgesamt 48 Publikationen über AgNPs erschienen, ist die Zahl der Publikationen über Nanosilber jedes Jahr gestiegen und im Jahr 2014 erschien in etwa die 30-fache Menge an Publikationen über AgNPs (Abbildung 2).

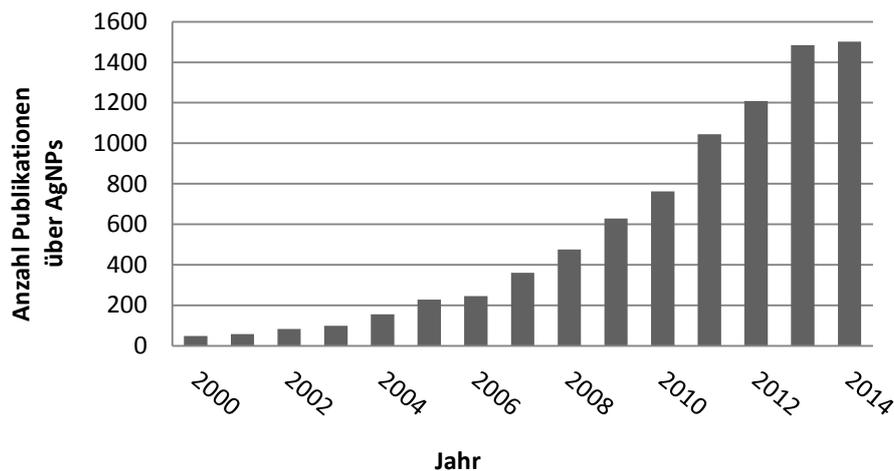


Abbildung 2: Anzahl der Publikationen über Nanosilber basierend auf einer Literaturrecherche bei „Web of Science“. Aufgelistet sind Publikationen welche einen der Begriffe „nanosilver, nano silver, nanosilver particles, silver nanoparticles“ im Titel beinhalten. Stand: 29.12.14.

1.3.2 Wirkmechanismen von Silber

Die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs beruht größtenteils auf der Abgabe von Silberionen (Navarro, 2008; Sotiriou & Pratsinis, 2010). Es wird jedoch vermutet, dass auch die nanopartikuläre Form selbst einen antimikrobiellen Effekt hat (Fabrega et al., 2009). Le et al. (2012) zeigten, dass sich AgNPs an die Zellmembran von Bakterien anheften und sie dort schädigen. Es ist jedoch schwer zu unterscheiden, ob diese antimikrobiellen Effekte wiederum auf eine lokal sehr hohe Silberionenkonzentration zurückzuführen sind. Andere metallische Nanopartikel (z.B. Gold) weisen keine antimikrobiellen Eigenschaften auf (Kim et al., 2007).

Die antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber ist abhängig von der Größe, der Konzentration und der Form der Partikel sowie deren Stabilität in biologischen Medien (Cavalieri et al., 2001).

Diese Wirkmechanismen von Silber sind häufig in der Literatur für Silbersalze beschrieben (Russel et al., 1994; Kora und Arunachalam, 2011). Die Kenntnisse zu den Mechanismen der Wirksamkeit von AgNPs sind weniger gut erforscht. Der Botaniker Carl von Nägeli prägte bereits 1893 den Begriff „oligodynamischer Effekt“. Er beschrieb, dass Silberionen und andere Metallionen in bereits sehr geringen Konzentrationen einen antimikrobiellen „oligodynamischen“ Effekt aufwiesen (Flemming, 1987). Carl Nägeli beobachtete einen antimikrobiellen Effekt von stark verdünnten Metallsalzen auf Algen (Neisser & Eichbaum, 1932; Nägeli, 1893).

Es gibt unterschiedliche Hypothesen zur Wirkung von Silberionen auf Bakterien. Die Schädigung von Bakterien durch Silber ist nicht auf einen spezifischen Prozess zurückzuführen. Silber wirkt auf unterschiedliche Weisen und an zahlreichen Bestandteilen der Bakterienzellen (Abbildung 3). Silberionen interagieren beispielsweise mit Elektronendonatoren wie Thiol-, Amino-, Imidazol-, Carboxylat- und Phosphatgruppen an unterschiedlichen Zellkomponenten (Schierholz, 1998; Percival et al., 2005; Cavalieri et al., 2014). Silberionen können deshalb unter anderem die Struktur und Funktion von Proteinen beeinträchtigen, Nucleinsäuren und die Zellmembran schädigen. Ein weiterer beschriebener Wirkmechanismus ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Bakterienzelle. Silberionen führen bei Bakterien zu einer erhöhten Respirationsrate. Da reaktive Sauerstoffspezies als Nebenprodukte der Atmungskette entstehen, wird vermutet, dass diese durch erhöhte Respirationsraten auch vermehrt entstehen können (Park et al., 2009). Die bereits erwähnte Interaktion der Silberionen mit Proteinen kann indirekt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen, indem Enzyme der Atmungskette wie die NADH- und die Succinatdehydrogenase geschädigt werden (Park et al., 2009; Bragg & Rannie, 1974). Dies führt wiederum dazu, dass ein Elektronenfluss zum Sauerstoff nicht einwandfrei funktioniert (Park et al., 2009).

Zu reaktiven Sauerstoffspezies gehören einerseits Sauerstoffradikale wie das Hydroxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal (HO^{\cdot}), das Peroxylradikal (ROO^{\cdot}), das Hydroperoxylradikal (HOO^{\cdot}) und andererseits nicht-radikalische Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hyperchlorige Säure ($HOCl$) und Ozon (O_3) (Bayr, 2005). Reaktive Sauerstoffspezies greifen Makromoleküle (DNA, RNA, Lipide und Proteine) in der Zelle an. Sie können zum Aufbrechen von Einzel- oder Doppelsträngen in der DNA führen, da sowohl Zucker als auch Basen angegriffen werden (Sies & Menck, 1992; Sies, 1993; Cabiscol et al., 2000). Hierdurch kann eine Replikation der DNA verhindert werden. Außerdem können Mutationen an der DNA entstehen. Peroxidation von Lipiden (oxidativer Abbau) führt in Bakterienzellen zu einer Zunahme der Fluidität der Zellmembran. Membranproteine können hierdurch nicht mehr stabilisiert und die Eigenschaften der Zellmembran verändert werden. Die Zelle muss mehr Energie aufwenden, um die Membranintegrität aufrecht zu erhalten (Cabiscol et al., 2000; Humphries & Szweda, 1998).

Die Interaktion von Silber mit funktionellen Gruppen und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies können also zu schwerwiegenden Veränderungen in der Zelle führen. Diese Prozesse können zu einem Verlust der Funktion von Membran und Proteinen, Verhinderung der DNA-Replikation und zur Auslösung von Mutationen führen (Cabiscol et al., 2000).

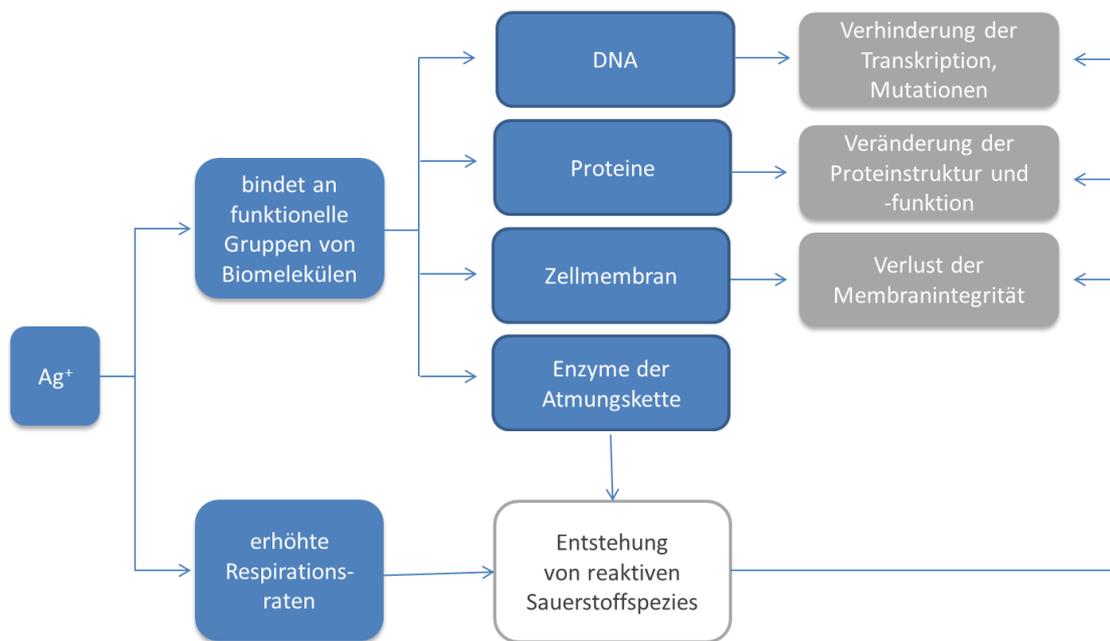


Abbildung 3: Wirkmechanismen von Silber bei Bakterien.

Die antibakterielle Wirksamkeit von Silber ist von verschiedenen Aspekten wie der Bakterienart, den inhärenten Eigenschaften (z.B. Gramverhalten) und dem physiologischen Zustand (planktonische Bakterien oder Biofilme) abhängig. Die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs wird in den meisten Studien an planktonischen Bakterien demonstriert (Chernousova und Epple, 2013). In den letzten Jahren sind jedoch einige Veröffentlichungen erschienen, welche sich mit der Problematik der Biofilme im Zusammenhang mit der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber beschäftigen. Um die Bildung von bakteriellen Biofilmen zu verhindern, müssen deutlich höhere Silberkonzentrationen (10 bis 100-fach) als bei planktonischen Bakterien eingesetzt werden (Bjarnsholt et al., 2007; Percival et al., 2007).

Es wurde häufig gezeigt, dass gramnegative Bakterien beispielsweise empfindlicher gegen Silber sind als grampositive Bakterien (Guzman et al., 2012). Die Zellwand scheint also eine Barriere gegen Silberionen darzustellen. Ein Schutzmechanismus von Bakterien gegen toxische Metallionen ist die Lebensform von Bakterien in Biofilmen. Biofilme können Metallionen binden (Flemming 1995; Späth et al., 1998). Die Sorption von toxischen Metallionen in der EPS kann zur Detoxifizierung der Ionen beitragen (Flemming & Wingender, 2010). Hierbei sind hauptsächlich geladene Polysaccharide und Proteine mit funktionellen Gruppen wie Phosphat und Sulfat beteiligt (Flemming & Wingender, 2010). Joshi et al. (2012) zeigten, dass die Zugabe von EPS und Xanthan zu *Escherichia coli* die Bakterien vor der antibakteriellen Wirkung von Silber schützt. Ionen binden nicht nur an Bestandteile der EPS, sondern auch an Zellbestandteile (Zellwand, Zellmembran oder Bestandteilen im Zytoplasma). Späth

et al. (1998) zeigten jedoch im Falle von Cadmium, dass ein Großteil des Metalls an die EPS bindet und nur ein kleiner Anteil (5-12 %) an die Zellen selbst. EPS kann eine schützende Barriere für Bakterien gegen toxische Metallionen sein (Comte et al., 2006).

Seit der Entstehung des Lebens auf der Erde vor etwa 4 Milliarden Jahren sind Mikroorganismen toxischen Schwermetallen ausgesetzt (Silver & Phung, 2005). So ist es naheliegend, dass Mikroorganismen Toleranzen und Resistenzmechanismen gegenüber Schwermetallen wie Silber, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink entwickelt haben, um ihr Überleben zu sichern (Silver & Phung, 1996). Wegen seiner antimikrobiellen Wirksamkeit wird Silber vermehrt in Alltagsprodukten und Produkten im klinischen Bereich eingesetzt. Es wird vermutet, dass der unkontrollierte Einsatz von Silber als antimikrobielles Agens weltweit zu einer Zunahme von silberresistenten Bakterien führt (Gupta & Silver, 1998). Das Auftreten von Silberresistenzen wurden in der Vergangenheit in der Literatur häufig berichtet. Hierbei wurden Silberresistenzen besonders in Bereichen entdeckt, in denen hohe Silberkonzentrationen die vorhandenen Bakterien bezüglich ihrer Silbertoleranz selektierten (Trevors, 1987). Im medizinischen Bereich wurde von silberresistenten Bakterien besonders in Brandkliniken berichtet, da Brandwunden oftmals mit silberhaltigen Wundauflagen behandelt werden (Bridges et al., 1979; Percival et al., 2005).

Schwermetallresistenzen beruhen meist auf energieabhängigen Efflux-Mechanismen, mit denen die Metallionen aus der Zelle transportiert werden können (Silver, 2003) (Abbildung 4). Dies geschieht meist mit Hilfe von ATPasen oder chemiosmotischen Kation/Proton Antiportern (Silver et al., 1999). Silberresistenz, welche eingehend an *Salmonella* untersucht wurde, ist plasmidkodiert. Der Gencluster, der die Silberresistenz kodiert, besteht aus insgesamt neun Genen (Silver, 2003).

Ein aus zwei Komponenten bestehendes Sensor/Responder System (SilRS) reguliert ein periplasmatisches Bindeprotein (SilE) und zwei Effluxpumpen (eine P-Typ ATPase und ein aus drei Proteinen bestehendes chemiosmotisches RND Ag(I)/H⁺ Austauschsystem) (Silver et al., 1999; Silver, 2003). Sil-Gene wurden beispielsweise auch bei klinischen Isolaten von Enterobakterien und MRSA nachgewiesen (Loh et al., 2009; Silver, 2003).

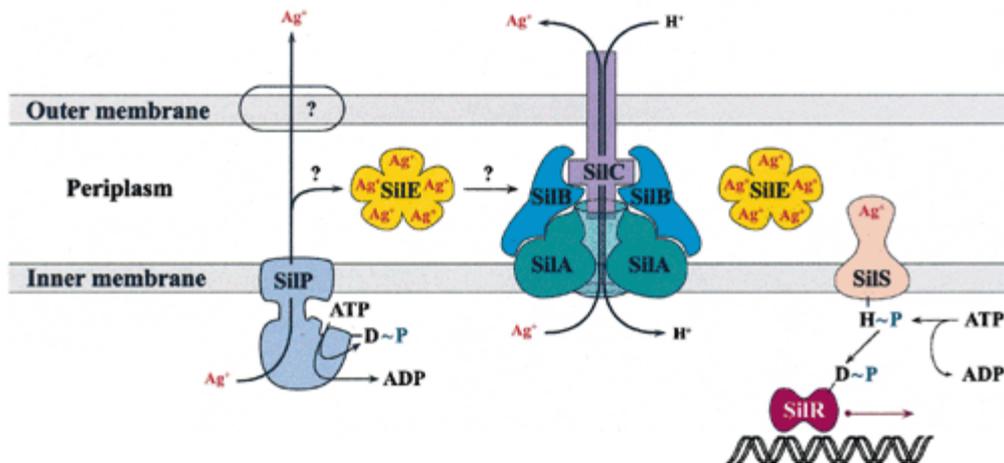


Abbildung 4: Angenommene Funktion der Genprodukte, hergeleitet von Homologien bekannter Proteine (Silver, 2003), Copyright © 2006, John Wiley and Sons. Outer membrane: Äußere Membran, Periplasm: Periplasma, Inner membrane: Innere Membran.

Durch die Exposition von Bakterien mit Silber kann es zu sogenannten Co-Resistenzen kommen. Diese können auftreten, wenn die Gene, die zwei unterschiedliche Resistenzen kodieren, auf dem gleichen Plasmid liegen (Baker-Austin et al., 2006). Das Plasmid, welches Gene der Silberresistenz aufweist, weist zudem noch Gene für einige Antibiotikaresistenzen auf (Silver, 2003). Der Zusammenhang zwischen vermehrter Antibiotikaresistenz durch Exposition von Bakterien mit Silber wurde bereits in der Literatur beschrieben (Wright et al. 2006; Baker-Austin et al., 2006; Içgen & Yilmaz, 2014). Aufgrund dieses Zusammenhangs muss der Einsatz von Silber besonders in Alltagsprodukten kritisch betrachtet werden.

1.3.3 Silber in Medizinprodukten

Silber wurde schon lange vor der Entdeckung der Mikroorganismen im 17. Jahrhundert empirisch als antimikrobielles Agens eingesetzt (Alexander, 2009). Durch die Bildung von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika ist Silber, insbesondere AgNPs, heutzutage wieder von größerer Bedeutung für medizinische Anwendungen (Schierholz, 1998). Silber wird beispielsweise in Venenkathetern, Wundauflagen, Pflastern und Endotrachealtuben als antimikrobielles Agens eingesetzt. Es gibt unterschiedliche Wege mit denen Silber in oder auf ein Medizinprodukt integriert wird. Als Beschichtung wird Silber in Form von elementarem Silber oder AgNPs auf Medizinprodukte aufgebracht. Silber wird zudem in die Matrix von Medizinprodukten in Form von elementarem Silber, AgNPs, Silbersalzen, Komplexen oder Chelaten eingebracht. Elementares Silber, AgNPs, Silbersalze, Komplexe und Chelate können auch in einer Polymermatrix als Beschichtung auf Medizinprodukte aufgetragen werden (Brooks et al., 2013; Poulter et al., 2013).

Silber hat antimikrobielle Eigenschaften und wirkt auch gegen Biofilme (Choi et al., 2010). Schierholz (1998) listete allein 28 Studien in denen die Wirksamkeit von Silber in Medizinprodukten *in vitro* und im *in vivo* Tierversuch nachgewiesen wurde. Abgesehen von der Anwendung auf Brandwunden gibt es jedoch relativ wenige klinische Studien, die die Wirksamkeit von Silber *in vivo* beweisen (Schierholz, 1998). Liedberg und Lundeberg (1989) zeigten, dass silberbeschichtete Katheter die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* verhinderten. In einer klinischen Studie wurde jedoch gezeigt, dass silberbeschichtete Katheter nosokomiale Harnwegsinfektionen nicht verhindern können (Srinivasan et al., 2006; Bjarnsholt et al., 2007). Obwohl einige Studien bezüglich der Wirkung von silberhaltigen Medizinprodukten auf die Inhibierung der Biofilmbildung und der Inaktivierung von Biofilmen existieren (Tabelle 7), lassen die meisten Studien die Lebensform des Biofilms unbeachtet und konzentrieren sich auf planktonische Bakterien. Die maximale Inkubationszeit dieser Untersuchungen beträgt 3 Tage (Tabelle 7). Die Adaption von Bakterien an Silber und eine mögliche Repopulation wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Tabelle 7: Einfluss von silberhaltigen Medizinprodukten oder silberhaltigen Materialien für Medizinprodukte auf die Inhibierung der Biofilmbildung und der Inaktivierung von Bakterien in Biofilmen in der Literatur. a) Medizinprodukt oder Material zum Einsatz in Medizinprodukten, b) Methode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber. PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, AP Medium: „Alginate promoting“-Medium, kA: keine Angaben.

Medizinprodukt ^{a)}	Silber-spezies	Konzentration	Biofilmmodell	Bakterienstamm	Exposition	Methode ^{b)}	Wirkung	Quelle
Endotrachealschlauch (PVC)	AgNO ₃	5-5,9 %	Anheftungs-Assay in PBS	<i>P. aeruginosa</i> (4 Stämme)	6 h	Mikroskopische Zählung	Verhinderung der Anheftung (100 %)	Balazs et al., 2004
Endotrachealschlauch (PVC)	AgNO ₃	5-5,9 %	Etablierte Biofilme AP Medium, 37 °C, 24-72 h	<i>P. aeruginosa</i> (4 Stämme)	72 h	Kultivierung	Abnahme der kultivierbaren Bakterien um 8 log Stufen (72 h)	Balazs et al., 2004
Wundauflage	Silber Sulfadiazine	1, 5, 10 µg mL ⁻¹	Etablierte Biofilme, Durchflusskammer, 4 d	<i>P. aeruginosa</i>	24 h	CLSM, Propidiumiodid	1 µg mL ⁻¹ kein Effekt 5-10 µg mL ⁻¹ Effektiv gegen etablierte Biofilme	Bjarnsholt et al., 2007
Knochenimplantate (Titan)	AgNPs	kA	Anheftungs-Assay in CASO-Medium	<i>S. epidermidis</i>	24 h	Rasterelektronenmikroskopie	Geringere Kolonisierung durch Silber	Gasquères et al., 2012
Polyethylen-terephthalat	Metallisches Silber	kA	Anheftungs-Assay in CASO	<i>S. epidermidis</i>	24 h	LIVE/DEAD-Kit	Geringere Kolonisierung und Abnahme der membranintakten Bakterien durch Silber	Klueh et al., 2000
Urinalkatheternmaterial (Latex)	kA	kA	Biofilmbildung auf Katheternmaterial, Künstliche Blase, Durchfluss	<i>P. aeruginosa</i>	10 h	Rasterelektronenmikroskopie	Kein Biofilm auf silberhaltigen Kathetern	Liedberg & Lundeberg, 1989
Phosphatglas	Ag ₂ SO ₄	1/5/10/15 mol%	Biofilmbildung auf Phosphatglas, „constant depth film fermentor“	<i>Streptococcus sanguis</i>	24 h	Kultivierung, Rasterelektronenmikroskopie	Vollständige Abnahme kultivierbarer Bakterien nach 24 h bei 5 mol% Ag und nach 6 h bei 10 mol% Ag	Mulligan et al., 2003

Tabelle 7: Einfluss von silberhaltigen Medizinprodukten oder silberhaltigen Materialien für Medizinprodukte auf die Inhibierung der Biofilmbildung und der Inaktivierung von Bakterien in Biofilmen in der Literatur. a) Medizinprodukt oder Material zum Einsatz in Medizinprodukten, b) Methode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber. PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, AP Medium: „Alginate promoting“-Medium, kA: keine Angaben.

Medizinprodukt ^{a)}	Silber-spezies	Konzentration	Biofilmodell	Bakterienstamm	Exposition	Methode ^{b)}	Wirkung	Quelle
Phosphatglas	Ag ₂ SO ₄	1/5/10/15 mol%	Biofilmbildung auf Phosphatglas, „constant depth film fermentor“	<i>Streptococcus sanguis</i>	24 h	Kultivierung, Rasterelektronenmikroskopie	Vollständige Abnahme kultivierbarer Bakterien nach 24 h bei 5 mol% Ag und nach 6 h bei 10mol % Ag	Mulligan et al., 2003
Wandauflage Raylon/Polyester	AgNPs	10-fach niedrigere Ag-Konzentration als Wandauf-lage mit Silberionen	Biofilmbildung auf Poloxamer-Gel, 35 °C	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> VRE MRSA	24 h	Hemmhofstest	Inhibierung der Biofilmbildung, besser als Wundauf-lage mit AgNPs	Percival et al., 2007
Wandauflage Hydrofibre®	Ionisches Silber	10-fach höhere Ag-Konzentration als Wandauf-lage mit AgNPs	Biofilmbildung auf Poloxamer-Gel, 35 °C	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i> VRE, MRSA	24 h	Hemmhofstest	Inhibierung der Biofilmbildung, schlechter als Wundauf-lage mit Silberionen	Percival et al., 2007
Wandauflage Hydrofibre®	Ionisches Silber	1,2 % (w/v) Ag	Etablierte Biofilme, 24 h, LabTeck	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. cloacae</i>	48 h	<i>In situ</i> Fluoreszenz, LIVE/DEAD-Färbung	Inaktivierung aller Stämme innerhalb 24 h	Percival et al., 2008
Wandauflage Hydrofibre®	AgNPs	kA	Etablierte Biofilme, 24 h, LabTeck	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. cloacae</i>	48 h	<i>In situ</i> Fluoreszenz, LIVE/DEAD-Färbung	Inaktivierung aller Stämme innerhalb 24 h	Percival et al., 2008

Tabelle 7: Einfluss von silberhaltigen Medizinprodukten oder silberhaltigen Materialien für Medizinprodukte auf die Inhibierung der Biofilmbildung und der Inaktivierung von Bakterien in Biofilmen in der Literatur. a) Medizinprodukt oder Material zum Einsatz in Medizinprodukten, b) Methode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber. PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, AP Medium: „Alginate promoting“-Medium, kA: keine Angaben.

Medizinprodukt ^{a)}	Silberspezies	Konzentration	Biofilmodell	Bakterienstamm	Exposition	Methode ^{b)}	Wirkung	Quelle
Phosphatglas	Ag ₂ SO ₄	10,15,20 mol%	Biofilmbildung auf Phosphatglas, „constant depth film fermentor“, 37 °C	<i>S. aureus</i>	48 h	Kultivierung CLSM, LIVE/DEAD-Färbung	Abnahme der kultivierbaren Bakterien nach 24 h, Vermehrung nach 48 h Untere Schicht inaktivierte Bakterien, obere Schicht lebende Bakterien	Valappil et al., 2007
Sol-Gel beschichtete Glasobjektträger	AgNO ₃	Freisetzungsratesrate in PBS d=0 ~700 ppb d=1 ~100 ppb d=6 ~10 ppb	Biofilmbildung auf Objektträgern eingetaucht in nährstoffreiche Bakteriensuspension	<i>S. epidermidis</i>	10 d 37 °C	Rasterelektronenmikroskopie	Verminderte Anheftung, Vermeidung von Biofilmbildung über 10 d	Stobie et al., 2008

1.3.4 Humantoxikologie von Silber

Beim Einsatz von silberhaltigen Medizinprodukten ist es besonders bedeutsam, dass genaue Informationen zur Biokompatibilität vorliegen. Der natürliche Silberspiegel im Blut des Menschen liegt zwischen 0-10 ng g⁻¹ (Ahrens et al., 2006). Silber wird beispielsweise über Wasser oder die Nahrung (Silber als Lebensmitteladditiv) aufgenommen (Ahrens et al., 2006; BfR, 2009). Es ist jedoch kein essenzielles Spurenelement (Marx & Barillo, 2014). In Oberflächengewässern beträgt die durchschnittliche natürliche Silberkonzentration etwa 0,2-0,3 µg L⁻¹ (WHO, 1996). Die deutsche Trinkwasserverordnung von 1990 wies einen Grenzwert von 0,01 mg L⁻¹ für Silber auf (TrinkwV, 1990). In der Novellierung der Trinkwasserverordnung von 2001 ist jedoch kein Grenzwert für Silber im Trinkwasser aufgeführt (TrinkwV, 2001).

Niedrige Silberkonzentrationen können vom Körper beim Transport angeheftet an Proteine und über die Leber ausgeschieden werden (Ahrens et al., 2006). Hohe Silberkonzentrationen können jedoch beim Menschen Nebenwirkungen hervorrufen. Das mit Abstand bekannteste Krankheitsbild, welches im Zusammenhang mit Silber steht, ist die Argyrie. Unter Argyrie versteht man die Intoxikation von Silber im menschlichen Körper (systemisch oder lokal), welche bereits zur makroskopischen irreversiblen Verfärbung von Haut und/oder Gewebe durch Silberablagerungen geführt hat (Ahrens et al., 2006; Kobert, 1893). Bis zum Jahre 1939, in der Zeit vor den klinischen Anwendung der Antibiotika, in der Silber sehr häufige Anwendung in der Medizin fand, wurde in der Literatur lediglich von 239 Argyrie-Fällen nach medizinischer Silberbehandlung berichtet (Alexander, 2009). Kobert berichtet jedoch 1893 bereits, dass nicht die Anwendung, sondern der Missbrauch von Silber in hohen Dosen oder über sehr lange Zeiträume zu Argyrie führt. Es gibt jedoch auch heute noch Fälle von Argyrie infolge medizinischer Anwendung von Silber. Es gibt beispielsweise einige Fälle bei denen die topische Anwendung von Silber auf Brandwunden einen erhöhten Silberspiegel in Haut, Zahnfleisch, Blut, Urin, Leber, Niere und der Hornhaut verursachte und zu Argyrie, Augenverletzungen, Leukopenie, Nieren-, Leberschäden und Schädigung von neurologischem Gewebe führte (Abraham et al. 1991, Trop et al., 2006).

AgNPs unterscheiden sich, wie alle Nanomaterialien, in ihren Eigenschaften vom Bulk-Material. Wegen fehlender Daten und der Verunsicherung über die Toxizität von AgNPs wurden diese in den letzten Jahren intensiv bezüglich ihrer Toxizität untersucht. Die Toxizität von AgNPs ist abhängig von der Form, der Größe der AgNPs und deren Stabilisierung. Zudem ist die Toxizität zeit- und dosisabhängig. Chernousova & Eppe (2013) zeigten anhand einer umfangreichen Literaturstudie, dass das sogenannte therapeutische Fenster von AgNPs sehr schmal ist und dass sich die toxikologischer Daten der Wirkung von AgNPs auf einzellige Mikroorganismen, Zellen und mehrzellige Organismen sogar überschneiden. Das enge therapeutische Fenster wurde auch in weiteren Studien nachgewiesen (Grade et al. 2012a, Greulich et al., 2012).

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen zur Toxizität von AgNPs. Christensen et al. (2010) evaluierten die Toxizität von AgNPs anhand eines groß angelegten Forschungsprojekts der EU „Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety“ und ergänzen die Daten aus der Literatur. Als größtes Problem deuten sie in dieser Studie die fehlenden Daten und das fehlende Verständnis bezüglich der tatsächlichen Konzentrationen, denen der Mensch in der Realität ausgesetzt ist. Ohne diese Daten bleibt eine Evaluierung von Toxizitätsstudien schwierig. Die Ingestion von kolloidalen Silberlösungen (häufige Selbsttherapie) und dermale Exposition durch AgNP-haltige Wundauflagen bergen Risiken gegenüber der Gesundheit des Menschen. Das Risiko von Alltagsprodukten über ingestive und dermale Expositionen, kann ebenfalls aufgrund der fehlenden Daten bezüglich der tatsächlichen exponierten Konzentrationen, nicht eingeschätzt werden (Christensen et al., 2010; Stone, 2009). Es wird jedoch vermutet, dass die Exposition mit Silber aus Alltagsprodukten geringer ist, als die Konzentrationen, bei denen ein schädlicher Effekt auftritt (Christensen et al., 2010)

Ein Problem ist zudem die Unterscheidung zwischen der Toxizität des freigesetzten Silberions und der des Nanopartikels (Lubick, 2008). AgNPs als Dispersion (in Konzentrationen die *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* nicht hemmen) ist beispielsweise zytotoxisch gegenüber mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten und wurde von beiden Zelltypen aufgenommen (Pauksch et al., 2014). Die gleichen AgNPs (in ihrer immobilisierten Form auf Titanimplantaten) zeigten keine Anzeichen von Toxizität gegenüber den gleichen Zelllinien über einen Zeitraum von 21 d (Pauksch et al., 2013). Bei diesen Implantaten geht man davon aus, dass Silber idealerweise nur in der Form von Ionen freigesetzt wird und deshalb nicht zytotoxisch ist. Eine lokal zu hohe Silberionenkonzentration kann aber auch toxisch wirken (Schwenke et al., 2013). Es ist also bei Medizinprodukten besonders wichtig und schwierig eine kontrollierte Freisetzung von Silberionen zu gewährleisten.

1.4 Der „viable but nonculturable“-Zustand

Die Kultivierung von Bakterien durch Nährmedien ist eine weitverbreitete Methode und wurde bereits zu Zeiten von Robert Koch im 19. Jahrhundert eingesetzt. Sie wird routinemäßig im klinischen Bereich, in der Trinkwasseranalytik und im Lebensmittelbereich eingesetzt (Busch, 2010; Hahn et al., 2001c; TrinkwV, 2001). Zudem wird sie häufig eingesetzt, um die Wirksamkeit antimikrobieller Stoffe (z.B. Silber) zu beurteilen. Bakterien, welche mit den üblichen Kultivierungsbedingungen nicht mehr nachweisbar sind, müssen jedoch nicht zwangsläufig abgetötet sein. 1982 beschrieben Xu et al. zum ersten Mal einen Zustand von Bakterien (*E. coli* und *Vibrio cholerae*) bei dem diese mit den üblichen Kultivierungsbedingungen nicht mehr nachweisbar, aber dennoch nicht tot waren. Heute beschreibt man diesen Zustand als den „viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand. Bakterien können unter für sie ungünstigen Bedingungen in diesen Zustand übergehen. Bakterien in diesem Zustand sind unter den Kultivierungsbedingungen, unter denen sie normalerweise wachsen, nicht mehr

kultivierbar. Der Einsatz von Kulturverfahren kann also dazu führen, dass diese Bakterien nicht detektiert werden.

Unterschiedliche Einflüsse wie Nährstoffmangel, Desinfektionsmittel, Inkubation außerhalb des Temperaturoptimums, veränderte osmotische Konzentrationen oder Schwermetallionen wie Kupfer können bei Bakterien den VBNC-Zustand induzieren (Dwidjosiswojo et al., 2011; Oliver, 2010). Hierbei handelt es sich um Stressoren, die ohne den Übergang in den VBNC-Zustand voraussichtlich zum Tod der Bakterien führen würden (Oliver, 2005).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Bakterien aus dem VBNC-Zustand wieder in den kultivierbaren Zustand zurückkehren, denn diese Bakterien sind nicht tot und weisen Erhaltungsstoffwechsel auf (Li et al., 2014; Oliver, 2005; Oliver, 2010). Hebt man diesen jeweiligen Stress wieder auf, dann können Bakterien in den kultivierbaren Zustand zurückgeführt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch kein silberinduzierter VBNC-Zustand in der Literatur beschrieben.

Der VBNC-Zustand wurde in den letzten Jahrzehnten bei zahlreichen grampositiven und gramnegativen Bakterien nachgewiesen (Li et al., 2014). Dieser Zustand wurde bereits bei 85 Bakterienspezies nachgewiesen. Bei 67 dieser Bakterienspezies handelt es sich um pathogene Bakterien. Darunter befinden sich auch Pathogene wie *Vibrio cholerae* oder *Mycobacterium tuberculosis* (Downing et al., 2005; Fakruddin et al., 2013). Auch die medizinisch relevanten Bakterien, welche in dieser Arbeit untersucht wurden (*P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*), können in den VBNC-Zustand übergehen (Li et al., 2014; Watson et al., 1998; Zandri et al., 2012). Medizinisch relevante Bakterien können sowohl in der Umwelt als auch im menschlichen Körper im VBNC-Zustand verharren und anschließend in den kultivierbaren Zustand zurückgeführt werden und zudem ihre Infektiosität wiedererlangen (Lleò et al., 2007). Im menschlichen Körper können Bakterien vielen Stressoren, wie dem Immunsystem oder der Exposition mit Antibiotika, ausgesetzt sein. Deshalb wird angenommen, dass die meisten Bakterien im Körper sich nicht in einem wachsenden Zustand befinden, sondern in einem physiologischen Zustand, bei dem keine Zellteilung stattfindet (u.a. VBNC-Zustand) (Lleò et al., 2007).

Der VBNC-Zustand spielt eine zentrale Rolle bei Biofilm-assoziierten Infektionen. Bakterien in diesem Zustand werden mit den üblichen Kultivierungsmethoden nicht mehr erfasst. Bakterien im VBNC-Zustand sind deutlich unempfindlicher gegen Antibiotika als wachsende Bakterien (Oliver, 2010). Die Unempfindlichkeit gegen Antibiotika und die fehlende Detektion von VBNC-Bakterien durch Kultivierungsmethoden erschweren eine gezielte Behandlung von Infektionen mit den geeigneten Medikamenten (Fux et al., 2005; Oliver, 2010; Rhoads, 2012; Zandri et al., 2012).

Zur Beurteilung der Vitalität von Bakterien gibt es nicht einen Goldstandard (Hammes et al., 2011). Sind Bakterien kultivierbar, dann steht fest, dass sie lebendig sind. Sind sie jedoch

nicht kultivierbar, dann bedeutet es nicht, dass die Bakterien auch tot sind. Es benötigt eine Vielzahl von Parametern (Abbildung 5) und Methoden (Tabelle 8) um die Vitalität von Bakterien einzuschätzen. Grundvoraussetzung dafür, dass eine Zelle eventuell noch lebendig ist, ist das Vorhandensein von DNA, das Vorhandensein eines Minimums an Energie und eine intakte Zellmembran (Hammes et al., 2011).

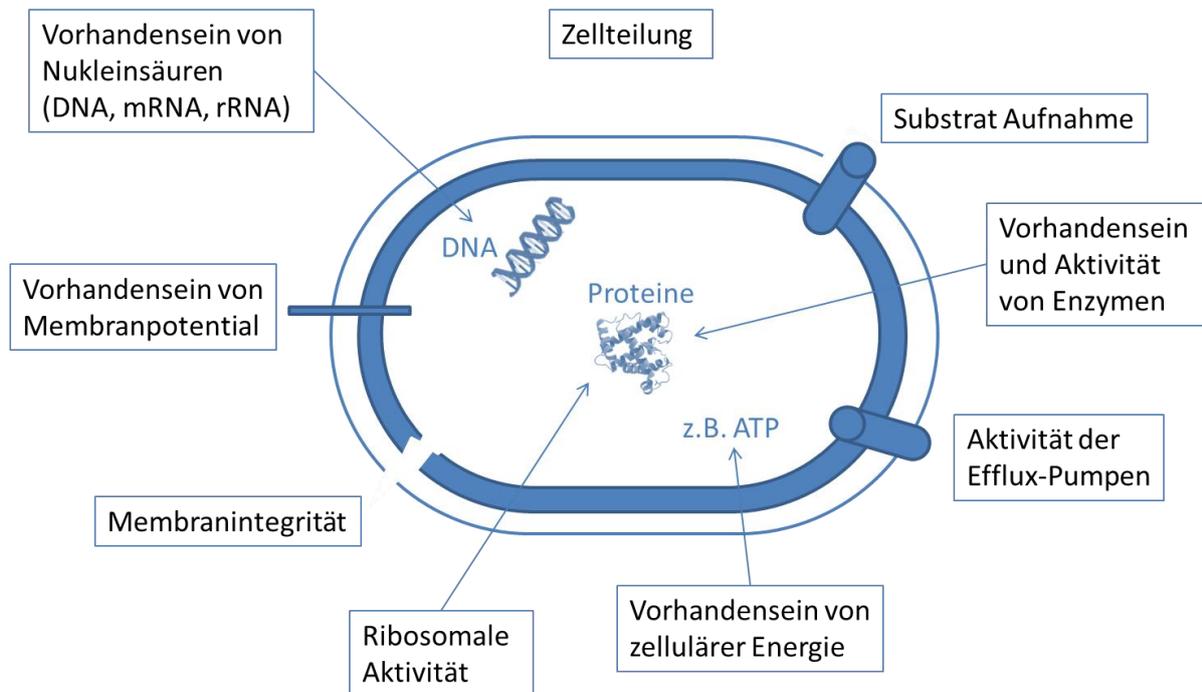


Abbildung 5: Vitalitätsparameter einer Bakterienzelle, welche experimentell nachgewiesen werden können. Modifiziert nach Hammes et al. (2011).

Tabelle 8: Parameter und Nachweismethoden für die Vitalität von Bakterien (modifiziert nach Hammes et al., 2011).

	Parameter	Methode	Quelle
Metabolismus	Zellteilung	Koloniezahlbestimmung	
		Direct-Viable-Count (DVC)	Koruge et al., 1979
	Substrataufnahme	2-NBDG-Färbung (Glucose-Aufnahme)	Berney et al., 2006
	Vorhandensein und Aktivität von Enzymen	Reduktion von Tetrazoliumsalzen	Roslev & King, 1993
	Aktivität der Effluxpumpen	Ethidiumbromid-Färbung	Berney et al., 2006
	Vorhandensein von zellulärer Energie	ATP-Bestimmung	La Duc et al., 2007
	Ribosomale Aktivität	RT-PCR	Yaron & Matthews, 2002
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)		Karner & Fuhrman, 1997	
Membran	Membranintegrität	Propidiumiodid-Färbung (LIVE/DEAD)	Boulos et al., 1999
		Propidiummonoazid-quantitative PCR (PMA-qPCR)	Nocker et al., 2006
	Membranpotential	Oxonol-Färbung (DiBAC4(3))	Strathmann & Wingender, 2004
Rhodamin 123-Färbung		Lopez-Amoros et al., 1995	
Nukleinsäuren	Vorhandensein von DNA	Gesamtzellzahlbestimmung (z.B. DAPI, SYTO 9)	Zweifel & Hagstrom, 1995; Hammes et al., 2008
	Vorhandensein von mRNA	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	del Mar Lleo et al., 2000
		Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)	Cools et al., 2006
	Vorhandensein von rRNA	RT-PCR	Yaron & Matthews, 2002
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)		Karner & Fuhrman, 1997	

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von Methoden zur Beurteilung der Vitalität von silberexponierten Bakterien eingesetzt. Hierzu gehörten die LIVE/DEAD-Färbung und die Propidiummonoazid Real Time Quantitative TaqMan™ PCR (PMA-qPCR) zur Untersuchung der Membranintegrität, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Hinweis auf ribosomale Aktivität und die Bestimmung des Adenosintriphosphat (ATP)-Gehaltes zur Untersuchung des Energiestoffwechsels. Die Gesamtzellzahlbestimmung weist das Vorhandensein von DNA nach und die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) erlaubt eine Charakterisierung des VBNC-Zustandes bezüglich seiner Proteinexpression.

Die **LIVE-DEAD-Färbung** ermöglicht eine Untersuchung der Membranintegrität von Bakterien durch Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen (Oliver, 2010). Diese Methode basiert auf der Anwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen: Propidiumiodid und SYTO 9 (Boulos et al., 1999). Propidiumiodid ist ein selektiver Farbstoff, welcher nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen kann, da er von intakten Zellmembranen zurückgehalten wird (Hammes et al., 2011). SYTO 9 hingegen ist membranpermeabel und färbt alle Zellen an. SYTO 9 gefärbte, membranintakte Zellen fluoreszieren grün und eine Kombination beider Farbstoffe in membrangeschädigten Bakterien führt zu einer roten Fluoreszenz. Hierbei quencht Propidiumiodid die Emission von SYTO 9 durch Förster-Resonanzenergietransfer (Boulos, 1999; Stocks, 2004). Zudem verdrängt Propidiumiodid SYTO9 von der DNA-Bindestelle (Stocks, 2004). Die Quantifizierung von membrangeschädigten und membranintakten Zellen, welche mit dem LIVE-DEAD-Kit angefärbt wurden, kann entweder durch Visualisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop oder mit der Durchflusszytometrie durchgeführt werden (Stocks, 2004). Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen, anhand von chemischen oder physikalischen Charakteristika oder bezüglich ihrer Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, automatisch gezählt (Shapiro, 2005).

Die **PMA-qPCR** (Abbildung 6) ist eine weitere Methode zur Untersuchung der Membranintegrität von Bakterien und zur Quantifizierung von membrangeschädigten und membranintakten Zellen. Die PMA-qPCR wird in der Wissenschaft derzeit als eine der erfolgsversprechenden Methoden zur Detektion des VBNC-Zustandes gehandelt (Cenciarini-Borde et al., 2009). Durch die Kombination mit der qPCR erreicht sie sehr geringe Nachweisgrenzen (Heid et al., 1996).

PMA ist wie Propidiumiodid impermeabel für intakte Zellmembranen. Es kann jedoch in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen und dort zwischen den Basen der DNA interkalieren. Durch eine Photoaktivierung wird ein Nitrenintermediat gebildet, welches kovalent an die DNA bindet. Überschüssiges PMA in der Lösung wird photolysiert und zu Hydroxylamin umgewandelt, welches nicht mehr in der Lage ist eine Bindung mit der DNA einzugehen (Cenciarini-Borde et al., 2009; Hixon et al., 1975; Nocker et al., 2006; Nocker et al., 2007). Durch die Bindung von PMA an die DNA wird diese wasserunlöslich. Nocker et al. (2006) zeigten, dass die DNA von geschädigten Bakterien aufgrund der nicht vorhandenen Löslichkeit während der Extraktion der genomischen DNA verloren geht. Zudem kann die DNA der

geschädigten Zellen, sollte sie bei der DNA-Extraktion nicht entfernt worden sein, bei einer PCR nicht mehr vervielfältigt werden.

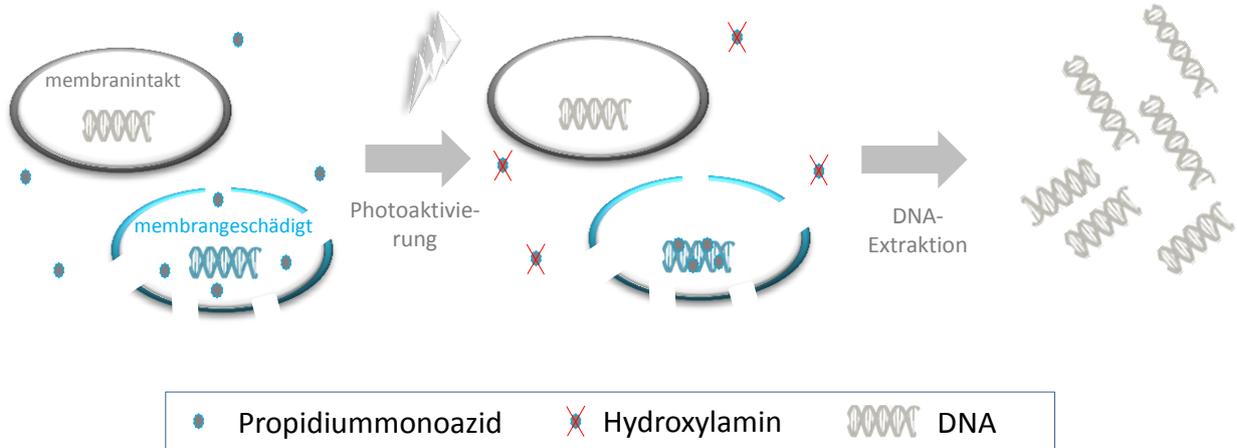


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PMA-qPCR Methode zur Unterscheidung von membranintakten und membrangeschädigten Zellen.

Anschließend kann zur Quantifizierung der Bakterien eine Real-Time quantitative PCR durchgeführt werden. Heid et al. (1996) entwickelten, beruhend auf der 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase, welche von Holland et al. (1991) beschrieben wurde, eine Methode zur Quantifizierung von DNA.

Die sogenannte TaqMan-PCR ist eine sehr schnelle, sensitive und präzise Methode und deckt zudem einen sehr weiten Quantifizierungsbereich ab (Heid et al., 1996). Grundsätzlich ist die PCR eine Methode, bei der eine spezifische Region einer DNA amplifiziert wird (Erlich, 1989). Diese Methode kann in drei generelle Schritte unterteilt werden: Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA aufgetrennt. In dem man die Temperatur anschließend verringert, binden spezifische Primer, welche als Startsequenz für die Polymerase dienen, während der Annealingphase an die einzelsträngige DNA. Bei der Elongation beginnt die Polymerase mit dem Verlängern der komplementären DNA-Stränge mit freien Nukleotiden (Erlich, 1989).

Die qPCR basiert z.B. auf der Messung einer fluoreszierenden Sonde (Heid et al., 1996). Die Sonde besitzt einen Reporter (Donor-Fluorochrom) an ihrem 3'-Ende und einen Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) an ihrem 5'-Ende. Diese bindet zwischen den beiden Primern an die DNA, sodass sie von der Polymerase, welche eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, während der Synthese des neuen DNA Stranges zersetzt wird (Mülhardt, 2006). Solange Reporter und Quencher noch an die Enden der Sonde gebunden sind, wird die Reporterfluoreszenz durch so genannten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) unterdrückt und vom Quencher absorbiert. Aufgrund der räumlichen Trennung von Reporter und Quencher steigt das Signal des Reporters während der Amplifikation an. Somit kann das Fluoreszenz-Signal zur Quantifi-

zierung von DNA genutzt werden, indem man sie mit einem Referenzstandard vergleicht (Heid et al., 1996; Mülhardt, 2006).

Die **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung** (FISH) ist eine Methode zur gleichzeitigen Visualisierung, Identifikation und Quantifizierung von Mikroorganismen. Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden werden verwendet, um Bakterienzellen damit zu markieren. Die Sonden dringen in die Zellen ein und binden spezifisch an die komplementäre Sequenz von Nukleinsäuren (z.B. des 16S rRNA Transkripts) (Moter & Göbel, 2000). Ribosomale RNA kommt in den Ribosomen vor und ist an der Proteinbiosynthese beteiligt (Madigan et al., 2003). Ribosomale RNA liegt in einer sehr hohen Anzahl von Kopien vor, weshalb sie ein beliebtes Target für Untersuchungen der RNA ist (Cenciarini et al., 2008). Die FISH gibt also Auskunft über die Anwesenheit von Ribosomen und kann somit ergänzend als Vitalitätsfaktor verwendet werden. FISH gefärbte Zellen können durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.

Eine weitere, biochemische Methode zur Beurteilung der Vitalität von Mikroorganismen ist die **Bestimmung des ATP-Gehaltes**. Der ATP-Gehalt wird mit der Luciferase-Reaktion bestimmt. Unter Verbrauch von Sauerstoff setzt das Enzym Luciferase (vom Leuchtkäfer) Luciferin zu Oxyluciferin um. Chemisch gebundene Energie wird in Form von Lichtenergie freigesetzt. ATP wird in AMP und Phosphat gespalten. Der Gehalt an ATP ist proportional zur Intensität des gemessenen Lichtes.



ATP ist ein Energiespeicher in der Zelle und wird durch die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat gebildet. Eine Bakterienzelle enthält ungefähr 10^{-18} mol ATP (Squirrell et al., 2002).

Um die Physiologie von VBNC-Bakterien zu charakterisieren und besser zu verstehen, werden häufig Methoden aus den Bereichen Genomics (z.B. Microarrayanalyse) oder Proteomics (z.B. zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D-PAGE)) eingesetzt (Alleron et al., 2013). Einige Proteine werden bei Bakterien, die sich im VBNC-Zustand befinden herauf- und andere herunterreguliert (Li et al., 2014). Ein Tool, das zur Charakterisierung des Proteinmusters von VBNC-Bakterien in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist die **zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)**. Die 2D-DIGE ist eine biochemische Methode zur Proteomanalyse, welche das Prinzip der 2D-PAGE durch das Einbringen von Fluoreszenzfarbstoffen erweitert. Bei der 2D-PAGE werden Proteine orthogonal bezüglich unterschiedlicher physikochemischen Charakteristika separiert (Garfin, 2003). Mit dieser Methode kann man mehrere Tausend Proteine in einer Probe trennen (Lilley et al., 2001). Die Trennung beruht in der ersten Dimension auf der Ladung der Proteine und in der zweiten Dimension auf ihrer Molekülmasse (Garfin, 2003). Die Trennung bezüglich der Ladung

wird durch isoelektrische Fokussierung (IEF) erreicht. Dies ist eine Methode zur Trennung von Proteinen, beruhend auf ihrem isoelektrischen Punkt in einem stabilisierten pH-Gradienten (Walker, 2002). Proteine wandern bei der IEF in einem elektrischen Feld in einem pH-Gradienten, bis sie den Punkt, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, erreicht haben (Hallbach, 2006). Die Auftrennung nach Molekülmasse wird dann mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Anschließend werden die Proteine beispielsweise mit Coomassieblau oder Silbernitrat angefärbt (Rabilloud, 2002; Ünlü et al., 1997).

Die 2D-DIGE beruht auf den gleichen Trennprinzipien wie die 2D-PAGE. Bei der 2D-DIGE werden jedoch die Proteine und Peptide vor der Trennung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3 und Cy5) angefärbt. Vorteil der 2D-DIGE gegenüber der herkömmlichen 2D-PAGE ist, dass man zwei Proben auf einem Gel vergleichen kann und die Intensität der jeweiligen Spots bestimmen kann (Ünlü et al., 1997; Beckett, 2012).

Um zwei Proben zu vergleichen, werden diese mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt (Beckett, 2012). Ein interner Standard wird hergestellt, indem beiden Proben gepoolt werden und mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Die gefärbten Proben werden anschließend ebenfalls bezüglich ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Die 2D-DIGE überwindet die Probleme der schlechten Vergleichbarkeit verschiedener Proben, die aufgrund der hohen Gel-zu-Gel-Variationen bei der 2D-PAGE auftreten. Diese Methode erlaubt es minimale Änderungen von Proteinen in zwei unterschiedlichen Proben statistisch signifikant auszuwerten (Minden et al., 2009). Die Proteine können anschließend aus dem Gel extrahiert und gereinigt werden und beispielsweise mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) identifiziert werden.

2 Ziele

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts „Nanosilberpartikel – Wirkmechanismen und Untersuchungen ihrer möglichen Interaktionen mit Geweben, Zellen und Molekülen. Definition ihres relevanten Unverträglichkeitspotentials“ durchgeführt (www.nanosilver-project.info). Neben der Untersuchung von AgNPs in Form einer Dispersion, wurde der Effekt von AgNP-haltigen Medizinprodukten (Knochenzemente, Knochenimplantate und Kollagenfolien) auf Bakterien untersucht.

In dieser Arbeit soll der Einfluss von AgNPs auf die klinisch relevanten Bakterien *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht werden. In den meisten Studien wird die Effektivität von Silber ausschließlich anhand von planktonischen Bakterien untersucht ohne die Lebensform des Biofilms zu berücksichtigen. Zudem liegen keine Untersuchungen vor, die einen silberinduzierten Übergang in den VBNC-Zustand berücksichtigen.

Folgende Fragestellungen sollen in dieser Arbeit untersucht werden:

- Welchen Effekt haben AgNPs auf die klinisch relevanten Bakterien in der planktonischen Phase und in Biofilmen?
- Sind AgNPs in der Lage die Biofilmbildung zu inhibieren und die Bakterien in etablierten Biofilmen zu inaktivieren?
- Welchen Einfluss haben die AgNPs auf den physiologischen Zustand von klinisch relevanten Bakterien? Induziert Silber den VBNC-Zustand?
- Welchen Einfluss haben AgNP-haltige Medizinprodukte auf die Biofilmbildung und die Vitalität von klinisch relevanten Bakterien?

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Escherichia coli ATCC 11775

Herkunft: DSMZ

Ursprünglich isoliert aus Urin

Pseudomonas aeruginosa AdS

Herkunft: Stammsammlung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen

Ursprünglich isoliert aus der Trinkwasser-Installation einer Schule, Wasser einer Selbstschlussarmatur in Deutschland, (Moritz et al., 2010)

Pseudomonas aeruginosa PAO1

Herkunft: Stammsammlung Universität Bochum

Ursprünglich isoliert aus einer menschlichen Wunde in Australien (Holloway, 1955)

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Herkunft: DSMZ

Ursprünglich isoliert aus menschlicher Wunde

Staphylococcus epidermidis ATCC 35984

Herkunft: DSMZ

Ursprünglich isoliert aus Katheter Sepsis, Tennessee, USA

3.2 Chemikalien

Tabelle 9: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit, Konzentration	Summenformel	Hersteller
Acetonitril	LC-MS Grade	C ₂ H ₃ N	Fluka
N-Acetylcystein	bioreagent	C ₅ H ₉ NO ₃ S	Sigma
Agarose	Research-Grade	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Bio-Rad
AgPURE™ Matrix			ras materials
AgPURE™ W10	Ag 10 % (w/v)		ras materials
Ameisensäure	LC-MS Grade	CH ₂ O ₂	Fluka
Ammoniumhydrogencarbonat	LC-MS Grade	NH ₄ HCO ₃	40867 Fluka
Ascorbinsäure	≥ 99,5 %	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma
Calciumchlorid	≥ 99 %	CaCl ₂	Fluka
[3-(3-Cholanamido-propyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS)	≥ 98 %	C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S	Calbiochem
Citifluor AF2			Citifluor Ltd
L-Cystein	≥ 98.5 %	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Sigma
DeStreak-Lösung			GE Healthcare
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	≥ 98 %	C ₁₆ H ₁₅ N ₅	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	99 %	K ₂ HPO ₄	Merck
Dimethylarsinsäure	ca. 98 %	C ₂ H ₇ AsO ₂	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥ 99,5 %	C ₂ H ₆ OS	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	98-102 %	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Honeywell Specialty Chemicals
Dithiothreitol (DTT)		C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Sigma
Essigsäure	LC-MS Grade		Fluka
Ethanol	99,9 %	C ₂ H ₆ OH	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	99-102 %	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ Na ₄ O	Sigma
FCM Kalibrierungspierlen 3 µm			Partec
FCM Reinigungslösung			Partec
FCM Sheath-Lösung			Partec
Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	2 N		Sigma
Formaldehyd	(36.5-38 %)	CH ₂ O	Sigma
Formamid	≥ 99,5 %, p.a.	CH ₃ NO	Roth
Glutaraldehyd-Lösung	25 % in H ₂ O	C ₅ H ₈ O ₂	Sigma
Glycerol	ACS	C ₃ H ₈ O ₃	Merck
Harnstoff	≥ 99,5 %, BioUltra	CH ₄ N ₂ O	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	≥ 99,5 % p.a.	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Roth
Immersionöl Typ N			Leica
Iodacetamid	BioUltra	C ₂ H ₄ INO	Sigma
Kaliumchlorid	99,5 %	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,5 %	KH ₂ PO ₄	Fluka
Kristallviolett	ACS	C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃	Merck
Lowry-Reagenz			Sigma
Lysin		C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	Sigma
Lysostaphin	99,7 %, units		Sigma
Magnesiumchlorid	99-101 %	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck

Tabelle 9: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit, Konzentration	Summenformel	Hersteller
D-Mannitol	≥ 99,5 %	C ₆ H ₁₆ O ₆	Fluka
Massenspektrometrie-Wasser (MS-Wasser)	LC-MS Grade	H ₂ O	Fluka
Methanol	LC-MS Grade	CH ₄ O	Fluka
Natriumchlorid	99,9 %	NaCl	AnalaR NORMAPUR
Natriumhydrogencarbonat	99,5 %	NaHCO ₃	AppliChem
Natriumhydroxid	p.a.	NaOH	KFM Applichem
Natriumlaurylsulfat (SDS)	≥ 98,5 %	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Serva
Natriumpyruvat	≥ 99 %	C ₃ H ₃ NaO ₃	Sigma
Natriumsulfat	≥ 99 %	Na ₂ SO ₄	Roth
Natriumthioglycolat	≥ 96,5 %	HSCH ₂ COONa	Sigma
Natriumthiosulfat	≥ 97 %	Na ₂ O ₃ S ₂	Merck
Paraformaldehyd	95-100,5 %	(CH ₂ O) _n	Merck
Pharmalytes	(pH 3-10)		GE Healthcare
Phosphorpentoxid		P ₄ O ₁₀	J.T. Baker
pH Pufferlösung Trace	pH 4,006 ± 0,02		WTW
pH Pufferlösung Trace	pH 6,865 ± 0,02		WTW
pH Pufferlösung Trace	pH 9,180 ± 0,02		WTW
Polyoxyethylen-glyceroltrioleat (Tagat® TO V)	100 %		Evonic
Polyoxyethylen (20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	Ph. Eur.	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Roth
Polyoxyethylene (80)- sorbitanmonooleat (Tween 80)	reinst	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	Roth
2-Propanol	≥ 99 %	C ₃ H ₈ O	Sigma
Propidiummonoazid		C ₂₇ H ₃₂ N ₆ ²⁺	Biotium
Protease-Inhibitor-Cocktail			Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	10 mg mL ⁻¹		New England Biolabs
BSA	≥ 96 %		Sigma
Salpetersäure	65 %, p.a.	HNO ₃	Bernd Kraft
Salzsäure	37 % puriss., p.a.	HCl	AVS Tritonorm
SDS-Laufpuffer			GE Healthcare
Silbernitrat	puriss, p.a.	AgNO ₃	Sigma
TAE-Puffer	50 x		Bio-Rad
Thioharnstoff	GR for analysis	CH ₄ N ₂ S	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	≥ 99,9 % p.a.	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	BioUltra	C ₉ H ₁₅ O ₆ P	Sigma
Wasser (ROTIPURAN®)	p.a., ACS		Roth
Wasser (für die Molekularbiologie)	BioScience-Grade, nuklease-frei, auto- klaviert, DEPC- behandelt	H ₂ O	Roth
Wasser (ROTIPURAN® Low Organic puri- ty) (LOP)	TOC-Gehalt < 20 pbb		Roth

3.3 Oligonukleotidsonden

Tabelle 10: Oligonukleotidsonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

Sonde	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Quelle
Psae16S-182	CCA CTT TCT CCC TCA GGA CG	5'-CY3	Wellinghausen et al., 2005
Staur	GAA GCAS AGC TTC TCG TCC G	5'-CY3	Trebesius et al., 2000

3.4 Primer und Sonden

Tabelle 11: Primer und Sonden für die quantitative Real Time Quantitativen TaqMan™ PCR (qPCR).

Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Quelle
Vorwärts-Primer, PA23FP	TCCAAGTTTAAGGTGGTAGGCTG	keine	Schwartz et al., 2006
Rückwärts-Primer, PA23RPb	ACCACTTCGTCA- TCTAAAAGACGAC	keine	Schwartz et al., 2006
Taqman®-Sonde, PA23FAM	AGGTAAATCCGGGGTTTCAAGGCC	5'-FAM, 3'-TAM	Schwartz et al., 2006

3.5 Enzyme

Tabelle 12: Enzyme

Enzym	Reinheit, Konzentration	Hersteller
Benzonase	> 99 %, 25 U μL^{-1}	Novagen
Katalase	≥ 10000 units mg^{-1}	Sigma
Trypsin	Proteomics grade	Sigma

3.6 Materialien

Tabelle 13: Materialien

Materialien	Hersteller
Aufquellschale	GE Healthcare
Bottle Top Filter, 0,2 μm	NALGENE
C18-SPE Disks (C18, Durchmesser. 47 mm, Partikelgröße 12 μm)	EMPORE™ SPE Disks
Dialyse-Schläuche (MWCO: 12-14 kDa)	Visking
Elektroden-Papierblöckchen	GE Healthcare
Exsikkator	DURAN, Lenz
Gentamicin Testblättchen, 10 μg	Oxoid
IPG Streifen pH 3-10 linear, 24 cm	GE Healthcare
Kupfernetzchen, Holey Carbonfilm 400 mesh	Okenshoy
Luftdichte Aufbewahrungsbox	GE Healthcare
Membranfilter, schwarz, Polycarbonat, Porengröße 0,2 μm	Millipore
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH

Tabelle 13: Materialien

Materialien	Hersteller
Microseal® 'B' Film	Bio-Rad
Mikrotiterplatten, Brand Plates® pureGrade™ Standard, Polystyrol, transparent, 96 Kavitäten, Flachboden, steril	Brand
Mikrotiterplatten, Brand Plates® pureGrade™ Standard, Polystyrol, transparent, 96 Kavitäten, U-Boden, steril	Brand
Mikrotiterplatten, Brand Plates® pureGrade™ Standard, Polystyrol, weiß, 96 Kavitäten, Flachboden, steril	Brand
Mikrotiterplatten qPCR (hard shell) 96 Kavitäten WHT/CLR	Bio-Rad
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 mL, 2 mL	eppendorf
Objektträger für FISH, epoxybeschichtet (8 Vertiefungen, 6 mm), schwarz	Roth
pH-Indikatorpapier	Merck Millipore
Polyacrylamidgele 12,5 % (255 x 196 x 1 mm)	GE Healthcare
Röhrchen Durchflusszytomatrie	Sarstedt
Spritzen 20 mL	B. Braun
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur plus, Porengröße: 0,2 µm	Sarstedt
Sterile Wattestäbchen EUROTURBO®	Dentalab
Thoma-Zählkammer, 0,0025 mm ²	Labor-Optik
Vakuum-Filtrationseinheit, 6-fach	Millipore
VIT®-Reaktor (FISH)	Vermicon
Zellkulturplatten, 24 Kavitäten, transparent, Flachboden	Sarstedt
Zellkulturplatten, 6 Kavitäten, transparent, Flachboden	Sarstedt
Zentriugenröhrchen	Sorvall
Zetasizer Nano Cell (Küvette)	Malvern

3.7 Geräte

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	BP 210	Sartorius
Binokular	MZ6	Leica
Lampe	KL1500	
Brutschrank 20 °C	ICP 500	Memmert
Brutschrank 36 °C	B6120	Heraeus
Durchflusszytometer	CyFlow®	Partec GmbH
Energiedispersives Röntgenfluoreszenzspektrometer	EDAX EDX-Analysis System	Genesis
Epifluoreszenzmikroskop	Leitz Laborlux S	Leitz
Objektiv	PL Fluotar 100 x/ 1,32 Oil	
Okular	2 x Periplan 10 x/ 18	
UV-Einheit	HBO 50	
Epifluoreszenzmikroskop	Eclipse Ni-E	Nikon Instruments
Objektiv	CFI Planochromat DM 100 x Oil	
Okular	CFI Okular 10 x/22	
Halogen-Lampe	12 V 100 W	
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf
High-Resolution Ion Beam Coater	681	Gatan

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Hybridisierungssofen	Shake 'n' Stack	Thermo Electron Corporation
IEF-System	Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit	GE Healthcare
Kühlzentrifuge	RC26 PLUS	Sorvall
Rotor	SS-34	Sorvall
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Laser-Scanner	Typhoon FLA 9500	GE Healthcare
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite® 200 PRO	Tecan
pH-Meter	WTW (pH 540 GLP)	Multical
Phasenkontrastmikroskop	DLMS	Leica
Objektiv	CPLAN 40 x / 0,35 PH 2	
Okular	HC PLAN 10 x / 20	
PhAST Blue		GenIUL
Rasterelektronenmikroskop	ESEM Quanta 400 FEG	FEI
Reagenzglasschüttler	Vortex-genie 2	Scientific Industries
Real-Time PCR	CFX96 Touch	Bio-Rad
Schüttelwasserbad	GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH
SDS-Gelelektrophorese System	Ettan™ DALTsix modular system	GE Healthcare
Transmissionselektronenmikroskop	CM 200 FEG	Philips
Thermomixer	Thermomixer comfort	eppendorf
Schaukel-Plattform	WT 15	Biometra
Ultraschallgerät	W-250	Branson
Vakuumzentrifuge	RVC 2-25	Christ
Waage	Extend	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ	Millipore
Wasserbad	Typ 1013	GFL
Wipptisch	WT 15	Biometra
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zetasizer	Nano S	Malvern

3.8 PC-Software

Tabelle 15: PC-Software

Software	Version	Hersteller
CFX-Manager	3.0	Bio-Rad
Decodon Delta 2D		Dodecan GmbH
Dispersion Technology Software	5.10	Malvern Instruments Ltd.
FlowMax®	2.4	Partec
GLOMAX SIS	v1.10.0	Promega GmbH
Image J - Image Processing and Analysis in Java	1.48v	National Institute of Health, USA
MASCOT Datenbank	2.3	Matrix Science
Microsoft Office	2010	Microsoft Corporation
NIS Elements Imaging Software	4.10.01	Nikon Instruments

3. Material

Software	Version	Hersteller
Origin Pro – Data Analysis and Graphing Software	9.1 G	OriginLab Corp.
Proteome Discoverer	1.4	ThermoScientific
Tecan i-control software	1.8	Tecan Austria GmbH

3.9 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 16: Kommerziell erhältliche Kits.

Kit	Hersteller
DIGE Buffer Kit	GE Healthcare
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Molecular Probes
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit	Invitrogen
VeriQuest™ Probe qPCR Master Mix (2X) USB	Affymetrix

3

3.10 Nährmedien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Nährmedien nach Herstellerangaben angesetzt. Die Nährmedien wurden in entionisiertem Wasser gelöst und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Casein-Soja-Pepton-Agar (CASO-Agar), Merck

Zusammensetzung (g L⁻¹): Pepton aus Casein (15), Pepton aus Sojamehl (5), Natriumchlorid (5), Agar-Agar (15), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

Casein-Soja-Pepton-Medium (CASO-Medium), Merck

Zusammensetzung (g L⁻¹): Pepton aus Casein (15), Pepton aus Sojamehl (5), Natriumchlorid (5), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

LB- Agar (Lennox) (LB-Agar), Carl Roth GmbH

Zusammensetzung (g L⁻¹): Rindfleisch (dehydriert aus 300 g Aufguss), Casein (Hydrolysat) (17,5), Stärke (1,5), Agar (17), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

LB-Agar mit Tween 20

Zusammensetzung: LB-Lennox Agar (35 g L⁻¹), Calciumchlorid (0,1 g), Tween 20 (10 mL), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

LB-Agar mit Tween 80

Zusammensetzung: LB-Lennox Agar (35 g L⁻¹), Calciumchlorid (0,1 g), Tween 20 (10 mL), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

LB-Agar mit TAGAT TO

Zusammensetzung: LB-Lennox Agar (35 g L⁻¹), Calciumchlorid (0,1 g), Tween 20 (10 mL), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

LB-Medium (Lennox) (LB-Medium), Carl Roth GmbH

Zusammensetzung (g L⁻¹): Trypton (10), Hefeextrakt (5), Natriumchlorid (5), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

Müller-Hinton-Agar (MH-Agar), Oxoid

Zusammensetzung (g L⁻¹): Rindfleischextrakt (2), Säurehydrolysat aus Casein (17,5), Stärke (1,5), Agar (17), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

Nähragar (NA-Agar), Merck

Zusammensetzung (g L⁻¹): Pepton aus Fleisch (5), Fleischextrakt (3), Agar-Agar (12), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

Nährmedium (NB-Medium), Merck

Zusammensetzung (g L⁻¹): Pepton aus Fleisch (5), Fleischextrakt (3), entionisiertes Wasser (ad 1 L).

3.11 Puffer und Stammlösungen

N-Acetylcystein-Lösung (20 mM) in HEPES (200 mM)

N-Acetylcystein	0,326 g
HEPES (200 mM)	ad 20 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Agarose (0,5 % (w/v))

Agarose	0,5 g
50 x TAE Puffer	2 mL
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Die Agarose wurden durch Erhitzen gelöst und bis zur Verwendung bei 55 °C gelagert.

Ameisensäure (5 % (v/v))

Ameisensäure	50 µL
MS-Wasser	950 µL

Lagerung bei Raumtemperatur für mehrere Wochen.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM)

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 8 (100 mM)	1 mL
MS-Wasser	3 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (100 mM)

Ammoniumhydrogencarbonat	0,395 g
MS-Wasser	ad 50 mL

Lagerung bei Raumtemperatur für mehrere Wochen.

3. Material

Ammoniumhydrogencarbonat in Acetonitril (50 % (v/v))

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (100 mM)	25 mL
Acetonitril	25 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Ascorbinsäure-Lösung (20 mM) in HEPES (200 mM)

Ascorbinsäure	0,3522 g
HEPES (200 mM)	ad 100 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

AgPURE W10-Dispersion (AgNPs) (1000 µg mL⁻¹ Ag)

AgPURE™ W10	901 µL
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Die Dispersion wurde für mindestens eine Minute durch Rühren mit einem Magnetrührer homogenisiert. Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und anschließend wieder für mindestens eine Minute homogenisiert. Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der Verwendung angesetzt und maximal über einen Zeitraum von 3 h im Dunkeln bis zu Ihrem Einsatz gelagert.

Benzonase-Puffer (pH 8)

TRIS	6,057 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 mL
entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

BSA-Stammlösung (400 µg mL⁻¹)

BSA	2 mg
entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Die Lösung wurde bei 4 °C für zwei Monate gelagert.

Cy2/Cy3/Cy6-Stammlösung

Cy2/Cy3/Cy6	5 nmol
Dimethylformamid (unter Argon-Atmosphäre entnommen)	6 µL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

L-Cystein-Lösung (20 mM)

L-Cystein	0,2432 g
HEPES (200 mM)	ad 100 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

DAPI-Stammlösung, 25 µg mL⁻¹ in Formaldehyd (2 % (v/v))

DAPI	12,5 mg
Formaldehyd	27 ml
Entionisiertes Wasser	ad 500 mL

Die Lösung wurde durch einen Bottle-Top-Filter (Nalgene®) mit einer SFCA-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

DAPI in PBS (1 µg mL⁻¹)

DAPI-Stammlösung (25 µg/mL in Formaldehyd (2 % (v/v)))	40 µL
PBS	960 µL

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

3. Material

Dimethylarsinsäure-Puffer (0,067 mol, pH 6,2)

Dimethylarsinsäure	0,145 g
Entionisiertes Wasser	20 mL

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

DMSO (20 % (v/v))

DMSO	0,5 mL
Wasser (für die Molekularbiologie)	ad 10 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

EDTA (0,25 mM)

EDTA	104,5 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

Die Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Essigsäure (50 mM)

Essigsäure	0,3 g
MS-Wasser	ad 100 mL

Lagerung bei Raumtemperatur für mehrere Wochen.

Ethanol (50 % (v/v)) in PBS

Ethanol	10 mL
PBS	10 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Equilibrierlösung

Harnstoff (6 M)	72 g
SDS (2 % (w/v))	4 g
TRIS (50 mM, pH 8,8)	7 mL
Glycerol (30 % (v/v))	70 mL
MilliQ Wasser	200 mL

Die Lösung wurde bei - 20 °C gelagert.

Equilibrierlösung mit DTT (1 %)

DTT	1 g
Equilibrierlösung	ad 100 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Equilibrierlösung mit Iodoacetamid (2,5 %)

DDT	2,5 g
Equilibrierlösung	ad 100 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Ethanol (50, 80, 96 % (v/v))

Ethanol	50, 80, 96 mL
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 100 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Gensondensuspension (1 µg µL⁻¹)

Gensonde	10 µg
Wasser (für die Molekularbiologie)	10 µL

Das Lyophilisat wurde in 10 µL Wasser gelöst.

3. Material

Gensondensuspension (50 ng μL^{-1})

Gensonde (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Wasser (für die Molekularbiologie))	10 μL
Wasser (für die Molekularbiologie)	190 μL

Die Lösung wurde aliquotiert (20 μL) und bei -20 °C gelagert.

Gensondensuspension in Hybridisierungspuffer (5 ng μL^{-1})

Gensonde (50 ng mL^{-1})	100 μL
Hybridisierungspuffer	900 μL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Glutaraldehyd (5 % (v/v)) in Dimethylarsinsäure-Puffer

Glutaraldehyd	5
Dimethylarsinsäure-Puffer	ad 100 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

HEPES-Puffer, 200 mM, pH 7

HEPES	4,776 g
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt und die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert und bei 4 °C gelagert.

Hybridisierungspuffer

<i>P. aeruginosa</i>	Endkonzentration	Zugabe der Stammlösung (μL)
Wasser (ROTIPURAN®)		399
NaCl (5 M)	0,9 M	180
TRIS, pH 8 (1 M)	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	40 %	400

Die Lösung wurde immer unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Hybridisierungspuffer

<i>S. aureus</i>	Endkonzentration	Zugabe der Stammlösung (μL)
Wasser (ROTIPURAN®)		499
NaCl (5 M)	0,9 M	180
TRIS, pH 7,6 (1 M)	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	30 %	300 μL

Die Lösung wurde immer unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Iodoacetamid (55 mM)

Iodoacetamid	0,0407 g
MS-Wasser	4 mL

Iodoacetamid wurde vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Iodoacetamid wurde in 4 mL MS-Wasser gelöst. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt und im Dunkeln gelagert.

Isopropanol-Lösung (70 % (v/v))

Isopropanol	30 mL
entionisiertes Wasser	70 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Katalase-Lösung (50, 100, 150, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Ascorbinsäure	2,5, 5, 7,5, 10 mg
HEPES (200 mM, pH 7)	ad 100 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

3. Material

Kristallviolett-Lösung (0,1 % (v/v))

Kristallviolett	0,1 g
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Labeling-Puffer

Harnstoff (7 M)	21 g
Thioharnstoff (2 M)	7,6 g
CHAPS (4 %)	2 g
TRIS (30 mM)	0,182 g
MilliQ Wasser	ad 50 mL

5 mL Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

Lowry-Reagenz (5 % w/v)

Lowry-Reagenz	2 g
Entionisiertes Wasser	ad 40 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C für einen Monat gelagert.

2 x Lysis-Puffer

Harnstoff (7 M)	21 g
Thioharnstoff (2 M)	7,6 g
CHAPS (4 %)	2 g
MilliQ Wasser	ad 50 mL

5 mL Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

2x Lysis-Puffer mit DDT (2 % (w/v)) und IPG Puffer (2 % (v/v))

2 x Lysispuffer	5 mL
DTT	0,1 g
Pharmalyte	100 µL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

LC-MS-Lösung - Ameisensäure (0,1 % (v/v))

Ameisensäure	1 µL
MS-Wasser	999 µL

Lagerung bei Raumtemperatur für mehrere Wochen.

Lysozym (1 mg mL⁻¹)

Lysozym	0,1 g
TRS-HCl (10 mM, pH 8)	ad 100 mL

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Lysostaphin (1 mg mL⁻¹) in TRIS-HCl (pH 8)

Lysostaphin	0,005 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 100 mL

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Lysozym (1 mg mL⁻¹) und Lysostaphin (10 µg/mL) in TRIS-HCl (pH 8)

Lysozym	0,1 g
Lysostaphin in TRIS-HCl (10 mM, pH 8)	1 mL
TRIS-HCl (10 mM, pH 8)	ad 100 mL

Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

3. Material

D-Mannitol-Lösung (200 mM) in HEPES (200 mM)

D-Mannitol	0,364 g
HEPES (200 mM)	ad 20 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und bei 4 °C gelagert.

Natriumchlorid (5 M)

Natriumchlorid (5 M)	292,2 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Natriumpyruvat-Lösung (200 mM) in HEPES (200 mM)

Natriumpyruvat	0,44 g
HEPES (200 mM)	ad 20 mL

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Natriumthioglycolat-Lösung, 0,2 % (w/v), Natriumthiosulfat, 0,292 % (w/v)

Natriumthioglycolat	0,02 g
Natriumthiosulfat	0,0292 g
Entionisiertes Wasser	ad 10 mL

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Natriumthioglycolat-Lösung, 1,4 % (w/v), Natriumthiosulfat, 2,044 % (w/v)

Natriumthioglycolat	0,14 g
Natriumthiosulfat	0,2044 g
Entionisiertes Wasser	ad 10 mL

Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und bei 4 °C gelagert.

Paraformaldehyd (4 % (v/v)) in PBS

Paraformaldehyd	4 g
PBS	ad 100 mL

Paraformaldehyd wurde in etwa 65 mL bei 50 °C gelöst und nach Abkühlen mit PBS auf 100 mL auffüllen. Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Partikelfreies entionisiertes Wasser (PFD)

Entionisiertes Wasser

Entionisiertes Wasser wurde durch einen Bottle-Top-Filter (Nalgene®) mit einer SFCA-Membran filtriert und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Phenol-Reagenz (20 % (v/v))

Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	1 mL
Entionisiertes Wasser	ad 5 ml

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

Natriumchlorid	8 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,81g
Kaliumdihydrogendiphosphat	0,24 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

Alle Komponenten wurden in Wasser (900 mL) gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und die Lösung auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

3. Material

Physiologische Kochsalzlösung (0,85 % (w/v))

Natriumchlorid	8,5 g
Entionisiertes Wasser	ad 1 L

Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Physiologische Kochsalzlösung (0,85 % (w/v))

Natriumchlorid	8,5 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Propidiummonoazid (PMA) (20 mmol L⁻¹)

PMA	1 mg
DMSO (20 (v/v))	97,85 µL

Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Protease-Inhibitor-Cocktail

Protease-Inhibitor-Cocktail	0,022 g
DMSO	0,1 mL
PFD	0,4 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

SDS-Lösung (10 % (w/v))

SDS	10 g
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Salzsäure (1 M)

Salzsäure	36,46 g
Entionisiertes Wasser	ad 1 L

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Silbernitrat-Stammlösung (100 µg mL⁻¹)

Silbernitrat (AgNO ₃)	0,0157 g
Entionisiertes Wasser	ad 100 mL

Die Lösung wurde für mindestens eine Minute homogenisiert. Die Lösung wurde durch eine Cellulose-Acetat Membran (SFCA) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und anschließend wieder für mindestens eine Minute homogenisiert. Alle Lösungen wurden stets frisch angesetzt und maximal über einen Zeitraum von 3 h im Dunkeln bis zu Ihrem Einsatz gelagert.

Simulierte Körperflüssigkeit (Simulated Body Fluid, SBF)

1 Natriumchlorid (NaCl)	7,996 g
2 Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	0,350 g
3 Kaliumchlorid (KCl)	0,224 g
4 Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	0,174 g
5 Magnesiumchlorid (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0,305 g
6 Salzsäure 1 M (HCl)	40 mL
7 Calciumchlorid (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0,368 g
8 Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	0,071 g
9 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 g
10 Entionisiertes Wasser	ad 1 L

750 mL Wasser wurden in einem Becherglas vorgelegt auf 36,5 °C erhitzt. Die Temperatur wurde konstant gehalten. Die Chemikalien wurden in oben vorgegebener Reihenfolge (# 1-8) nach und nach zugegeben, sobald sich die vorherige Chemikalie vollständig gelöst hatte. Chemikalie # 9 wurde in Portionen < 1 g zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M Salzsäure auf 7,25 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen Messkolben überführt, mit entionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und geschüttelt. Nach Abkühlen der Lösung (auf 20 °C) wurde erneut auf 1 L mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Simulierte Körperflüssigkeit mit Glucose (SBF mit Glucose)

SBF, pH 7,25 (auf 900 mL aufgefüllt)	900 mL
D-Glucose (50 mmol)	100 mL

Die beiden Lösungen wurden separat für 20 min bei 121 °C autoklaviert, anschließend zusammengegeben und bei 4 °C gelagert.

StageTip-Lösung A - Ameisensäure (0,5 % (v/v))

Ameisensäure	10 µL
MS-Wasser	1980 µL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

StageTip-Lösung B - Ameisensäure (0,5% (v/v)) in Acetonitril (80 % (v/v))

Ameisensäure	10 µL
Acetonitril	1600 mL
MS-Wasser	390 µL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (10 mM)

TCEP	0,287 mg
MS-Wasser	10 mL

TCEP wurde vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Tris-Puffer (1 M), pH 7,6

TRIS	121,14 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

TRIS in etwa 650 mL Wasser lösen, mit 7 M HCl auf pH 7,6 einstellen und anschließend auf 1 L mit Wasser auffüllen. Die Lösung wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

TRIS-Puffer (1 M), pH 8,0/8,8

TRIS	121,14 g
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 1 L

TRIS in etwa 650 mL Wasser lösen, mit 7 M HCl auf pH 8,0/8,8 einstellen und anschließend auf 1 L mit Wasser auffüllen. Die Lösung wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

3. Material

Trypsin-Lösung (10 ng μL^{-1})

Trypsin-Lösung (100 ng μL^{-1})	20 μg
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM)	90 μL

Um das Trypsin vollständig wiederherzustellen, wurde es nach Zugabe des Resuspendierungspuffers für 15 min inkubiert. Aliquots zu je 10 μL wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 6 Monate gelagert. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Trypsin-Lösung (100 ng μL^{-1})

Trypsin	20 μg
50 mM Essigsäure	200 μL

Um das Trypsin vollständig wiederherzustellen, wurde es nach Zugabe des Resuspendierungspuffers für 15 min inkubiert. Aliquots zu je 10 μL wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 6 Monate gelagert.

Waschpuffer *P. aeruginosa*

Komponenten	Stammlösungen (μL)
NaCl (5 M)	280
Tris, pH 8 (1 M)	500
SDS (10 %)	25
EDTA	500
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 25 mL

Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

Waschpuffer *S. aureus*

Komponenten	Stammlösungen (μL)
NaCl (5 M)	560
Tris, pH 7,6 (1 M)	500
SDS (10 %)	25
Wasser (ROTIPURAN®)	ad 25 mL

Die Lösung wurde immer frisch vor der Verwendung angesetzt.

4 Methoden

4.1 Reinigen der Glasgeräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Glasgeräte, die mit AgNPs und Silbernitrat in Kontakt kamen, wurden einer Säurebehandlung unterzogen. Hierzu wurden alle Glasgeräte dreimal mit entionisiertem Wasser und anschließend zweimal mit Salpetersäure (12,5 % (v/v)) ausgespült. Danach wurden die Glasgeräte für 24 h in Salpetersäure (12,5 % (v/v)) inkubiert und anschließend dreimal mit entionisiertem Wasser und in der Spülmaschine gereinigt.

4.2 Charakterisierung der AgNPs

Die in dieser Arbeit verwendeten AgNPs tragen den Markennamen AgPURE™ W10 und werden von der Firma ras Materials, Regensburg hergestellt. Der Herstellungsprozess dieser Nanopartikel entspricht dem des Nanomaterials „NM-300 Silver“, welches von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) als ein repräsentativ hergestelltes Nanomaterial verwendet wird. Diese AgNPs wurden durch chemische Reduktion von Silbernitrat mit Wasser als Lösungsmittel synthetisiert. Als Reduktionsmittel wurde Hydrazinhydrat eingesetzt. Bei dem Produkt handelt es sich um eine AgNP-Dispersion mit einem Silbergehalt von 10 % (w/w). Die wässrige Dispersion enthält zudem zwei Emulgatoren (Polyoxyethylen-25-Glycerol-Trioleate (TAGAT TO V) und Sorbitan-Mono-Laurat (Tween 20) zur Stabilisierung der Partikel (jeweils 4 % (w/w)). Bei der Herstellung der Partikel entsteht Ammoniumnitrat und ist zu 7,5 % (w/w) enthalten.

4.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Plamonresonanz wurden Absorptionsspektren (300-550 nm) der AgNPs aufgenommen. In 100 mL Erlenmeyerkolben wurden AgNP-Dispersionen ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in einem Gesamtvolumen von 50 mL des jeweiligen Testmediums angesetzt. Es wurden die Medien PFD, SBF, SBF mit Glucose, LB-, NB- und CASO-Medium untersucht. Diese Ansätze wurden für 7 d bei 20 und 36 °C statisch inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8, 24 h sowie 2, 3, 4 und 7 d) wurden Proben entnommen und jeweils 200 μL in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten und runder Bodenform (Polystyrol) überführt (8-fach Bestimmung). Anschließend wurden Absorptionsspektren (300-550 nm) mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Typ: Tecan Reader Infinite 200, Tecan) aufgenommen. Die Absorption ergibt sich aus der Differenz der Absorption des jeweiligen Mediums mit und ohne AgNPs.

4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Dispersion der AgNPs wurde in PFD verdünnt ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), auf ein Kupfernetz (Okenshoy) aufgetragen und getrocknet. Die Aufnahmen wurden anschließend mit einem Transmissionselektronenmikroskop (CM 200 FEG, Philips) mit einer Feldemissionskathode (Schottky-Emitter) und einer SuperTWIN-Linse aufgenommen (Linsenparameter: f : 1,7 mm, C_s : 1,2 mm, C_c : 1,2 mm). Dieses Gerät besitzt eine Punktauflösung von 0,24 nm, eine Linienauflösung von 0,1 nm und eine Strahlspannung von 200 kV. Die Partikelgrößenverteilung wurde anschließend manuell mit der Software Image J anhand der fotografischen Aufnahmen bestimmt. Die Partikelgröße wurde mit Hilfe der Software ausgemessen.

4.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM Quanta 400 FEG, FEI) auf Kohlenstoffträgern im Rasterelektronenmikroskopie-Modus durchgeführt. Die AgNPs wurden vor der Mikroskopie mit einem High Resolution Ion Beam Coater 681 (Gatan) mit einer Kohlenstoffschicht von 3 nm besputtert.

4.2.4 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurde die AgNP-Dispersion in PFD verdünnt ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Um die Veränderung der AgNPs in LB-, NB-, CASO-Medium zu verfolgen, wurde eine AgNP-Dispersion mit einem Silbergehalt von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ in einem Gesamtvo-

lumen von 50 mL des jeweiligen Mediums angesetzt. Als Referenz wurde jeweils die gleiche Lösung ohne AgNPs angesetzt. Nach Zugabe der Partikel wurde die dynamische Lichtstreuung bestimmt. Eine Probe wurde bei 20 °C und die andere bei 36 °C gelagert. Nach 24 h wurde erneut die dynamische Lichtstreuung bestimmt.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels Dynamischer Lichtstreuung wurden 750 µL der zu untersuchenden AgNP-Dispersion in eine Küvette (Zetasizer Nano Cell, Malvern) pipettiert und mit einem Analysegeräten für Partikel- und Molekülgrößenbestimmung (Zetasizer Nano S, Malvern) analysiert. Die zu untersuchenden Proben wurden vor der Messung für 2 min in der Messzelle äquilibriert. Es wurde jeweils erst die Dynamische Lichtstreuung und anschließend das Zeta-Potential gemessen.

Der hydrodynamische Durchmesser wurde von der Software (Dispersion Technology Software, Malvern) über die Stokes-Einstein-Gleichung berechnet:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

D_H : Hydrodynamischer Durchmesser

k: Boltzmann – Konstante ($J K^{-1}$)

T: Absolute Temperatur (K)

η : Viskosität des Lösungsmittels ($N m s^{-1}$)

D: Translatationaler Diffusionskoeffizient ($m^2 s^{-1}$)

(Kato, 2014; Malvern, 2012)

Der Z-Average-Wert ist ein nach Intensität gewichtetes Mittel der hydrodynamischen Größe eines Ensembles von Partikeln, welche mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt wurde. Der Polydispersitätsindex (PDI) gibt Auskunft über die Heterogenität der Größenverteilung (Kato, 2014). Ein PDI von 0 bis 0,1 entspricht einer monodispersen Größenverteilung der Partikel.

Beide Parameter (Z-Average-Wert und PDI) wurden über Autokorrelationsfunktionen der Malvern Dispersion Technology Software nach ISO 13321 (Teil 8) berechnet (Malvern, 2012).

4.3 Charakterisierung der klinisch relevanten Bakterienstämme

4.3.1 Vorbereitung der Bakterien

Wenn nicht anders erwähnt wurde eine Vorkultur von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 hergestellt, indem Einzelkolonieausstriche der Bakterienstämme auf LB-Agar angelegt wurden. Diese wurden für 24 h bei 36 °C inkubiert. In einem Reagenzglas wurden 5 mL LB-Medium mit einigen Einzelkolonien der ersten Vorkultur angeimpft. Diese Flüssigkultur wurde bei 36 °C und 180 Upm für 18 h in einem Schüttelwasserbad inkubiert.

4.3.2 Wuchsverhalten

Vorkulturen von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 wurden, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, hergestellt. Neben LB-Medium wurden zudem noch NB- und CASO-Medium eingesetzt, um Vorkulturen der Bakterienstämme herzustellen. Nach 18 h wurde die Kultur 1:100 in 5 mL des jeweiligen Mediums verdünnt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µL der verdünnten Kultur in Achtfachbestimmung in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Flachboden, transparent, Polystyrol) pipettiert. Als Sterilitätskontrolle wurden 8 Kavitäten ausschließlich mit dem jeweiligen Nährmedium beimpft.

Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurden die Mikrotiterplatten bei 36 °C statisch inkubiert und die Absorption der Kultur bei 570 nm über einen Zeitraum von 48 h mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) gemessen.

4.3.3 Biofilmbildung

Zur Bestimmung der Biofilmbildung wurden die Mikrotiterplatten wie in Abschnitt 4.3.2 beimpft und ebenfalls bei 36 °C statisch inkubiert. Nach 24 h wurde die Absorption der Kultur photometrisch bei 570 nm mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) detektiert. Aus jeder Kavität wurden 90 µL der planktonischen Bakterien mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden die Biofilme zweimal mit 200 µL PFD gewaschen, um verbliebene planktonische und nur leicht adhärierte Bakterien zu entfernen.

Zur Färbung der angehefteten Zellen (Biofilme) wurden 125 µL einer 0,1%igen (w/v) Kristallviolettlösung in die Kavitäten pipettiert. Die Kristallviolettlösung wurde nach 20 min durch Abpipettieren entfernt und die Kavitäten dreimal mit jeweils 200 µL PFD gewaschen. An-

schließlich wurden die Mikrotiterplatten auf einem Handtuchpapier invertiert und verbleibende Flüssigkeit leicht ausgeklopft.

Die Mikrotiterplatten wurden für mindestens 24 h getrocknet. Kristallviolett wurde mit 200 µL 30%iger Essigsäure aus den Biofilmen gelöst (Inkubation 30 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurde die Absorption der Kristallviolettlösung bei 570 nm mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) gemessen. Ab einem Messwert von 3,6 wurde die Kristallviolettlösung mit Essigsäure (30 % (v/v) verdünnt), da sich die Absorption über diesem Wert in Bezug auf die Kristallviolettkonzentration nicht mehr linear verhält (Daten nicht gezeigt).

Das Wachstum und die Biofilmbildung wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Wachstum/Biofilmbildung} = \bar{x}_{AP} - \bar{x}_{AM}$$

\bar{x} : arithmetisches Mittel

A: Absorption bei 570 nm

P: unbekannte Probe

M: unbeimpftes Medium

Die Nachweisgrenze (NG) wurde folgendermaßen berechnet:

$$NG: \bar{x}_{AM} \mp 3 \sigma_{AM}$$

σ : Standardabweichung

4.3.4 Gentamicinresistenz

Zur Untersuchung der Gentamicinresistenz wurde eine Agardiffusionsmethode nach EUCAST (2009) durchgeführt. Hierzu wurden einige Kolonien einer Übernachtskultur der Testorganismen *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 auf MH-Agar in physiologischer Kochsalzlösung ($1-2 \times 10^8$ Zellen mL⁻¹) suspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Thoma-Zählkammer eingestellt. Ein steriles Wattestäbchen wurde in die Bakteriensuspension eingetaucht, überschüssige Flüssigkeit abgestrichen und eine MH-Agarplatte mit der Bakteriensuspension flächendeckend inokuliert. Anschließend wurden Gentamicin-Testblättchen (10 µg) auf die Agaroberfläche aufgelegt. Die Agarplatten wurden invertiert und bei 36 °C inkubiert. Nach 16-20 h wurde der Hemmhofdurchmesser bestimmt. Die Interpretation der Ergebnisse wurde nach EUCAST (2013a) durchgeführt. Der EUCAST-Breakpoint ist ein bestimmter Hemmhofdurchmesser, bei dessen Überschreitung ein Bakterium als sensitiv gegen den jeweiligen Stoff eingestuft wird. Wird der Breakpoint nicht über-

schritten, dann gelten die Bakterien als gentamicinresistent. Im Falle von Gentamicin liegt dieser für *P. aeruginosa* bei 15 mm, für *S. aureus* bei 18 mm und für *S. epidermidis* bei 22 mm (EUCAST, 2013a).

4.3.5 Lipaseaktivität

Es wurde überprüft, ob Emulgatoren (Tween 20 und Tagat TO), welche als Zusätze die AgNP-Dispersion stabilisieren, von den Bakterienstämmen *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 durch Lipasen gespalten werden. Hierzu wurde ein qualitativer Lipase-Test nach Howe & Ward (1976) durchgeführt. LB-Agar wurde mit 0,01 % (w/v) Calciumchlorid versetzt. Zudem wurden jeweils mit 1 % (v/v) Emulgatoren Tween 20, Tagat TO oder Tween 80 (als Positivkontrolle) zu dem LB-Agar gegeben. Als Negativkontrolle diente LB-Agar, der ausschließlich Calciumchlorid (0,01 %) enthielt. Es wurden Einzelkolonieausstriche der Bakterienstämme auf dem Agar angefertigt. Als Positivkontrolle für ein Bakterium, das Lipasen spaltet diente *P. aeruginosa* PAO1 und als Negativkontrolle für ein Bakterium, das keine Lipasen spaltet *E. coli* ATCC 11775. Nach 48-stündiger Inkubation bei 36 °C wurden die Platten bei 6,4-facher Vergrößerung mit einem Binokular betrachtet und das Vorhandensein von Präzipitaten im Agar beurteilt. Wurde der Emulgator durch Lipasen gespalten, dann wurden um die Bakterienkolonien Calciumfettsäurepräzipitate sichtbar.

4.4 Methoden zur Quantifizierung von Bakterien

4.4.1 Koloniezahlbestimmung

Zu untersuchende Bakteriensuspensionen und deren dezimale Verdünnungen in PFD wurden jeweils in Duplikaten (100 µL) auf LB-Agar ausplattiert und die Agarplatten wurden für 24 h bei 36 °C inkubiert. Agarplatten mit Koloniezahlen zwischen 10-300 pro Agarplatte wurden ausgewertet. Bei Proben, bei denen die unverdünnte Probe weniger als 10 Kolonien auf dem Agar aufwies, wurden auch diese ausgezählt. Die Ergebnisse werden angegeben als koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL oder Kavität im Falle der Mikrotiterplattenversuche.

4.4.2 Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 1 mL DAPI-Lösung (25 µg mL⁻¹ in Formaldehyd (2 % (v/v))) zu 4 mL der zu untersuchenden Probe oder deren Verdünnungen in PFD gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde eine Membran-

filtration (schwarze Polycarbonatfilter, Porengröße: 0,2 μm) mittels einer 6-fach Vakuum-Filtrationseinheit durchgeführt. Die Filter wurden bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt und bei 4 °C gelagert. Die Auszählung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Laborlux S, Leitz) bei 1000-facher Vergrößerung. Hierzu wurden die Membranfilter auf einem Objektträger in Citifluor AF eingebettet und mit Immersionsöl betrachtet. Es wurden mindestens 20 Zählfelder oder 400 Zellen ausgezählt. Die Ergebnisse werden angegeben als Gesamtzellzahl pro mL oder Kavität.

Zusätzlich zur Gesamtzellzahlbestimmung wurden die DAPI-gefärbten Bakterien auf den Filtern zur Bestimmung der Zelllängen verwendet. Die Messung der Zelllängen wurde mit der NIS Elements Imaging Software (Nikon Instruments) durchgeführt.

4.4.3 LIVE/DEAD-Färbung

Zur Untersuchung der Membranintegrität von *P. aeruginosa* wurde das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (für die Mikroskopie) eingesetzt. Dieses Kit ist eine Kombination aus zwei Farbstoffen: SYTO 9 und Propidiumiodid. SYTO 9 ist ein Farbstoff, der alle Bakterien anfärbt, wobei Propidiumiodid nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen kann und dort, wo beide Farbstoffe in Kombination in die Zelle eindringen, das Signal von SYTO 9 quencht.

Mikroskopie

Eine Mischung aus jeweils 1,5 μL der beiden Farbstofflösungen SYTO 9 und Propidiumiodid wurde hergestellt, wobei das Propidiumiodid vorher 1:200 in DMSO verdünnt wurde. Zu 1 mL Bakteriensuspension und deren dezimale Verdünnungen in PFD wurden 3 μL der Farbstoff-Mixtur gegeben (Endkonzentration: 5 mM (SYTO 9) und 0,15 mM (Propidiumiodid)). Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden 3 mL PFD zu der Probe gegeben und eine Membranfiltration (schwarze Polycarbonatfilter, Porengröße: 0,2 μm) mittels einer 6-fach Vakuum-Filtrationseinheit durchgeführt. Zur Mikroskopie wurde der Filter auf einem Objektträger in Citifluor AF eingebettet und bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl ausgezählt (Leitz Mikroskop). SYTO 9-gefärbte (grün fluoreszierende Zellen) wurden als membranintakte Bakterien und Propidiumiodid-gefärbte Zellen (rot fluoreszierende Zellen) als membrangeschädigt ausgewertet.

Durchflusszytometrie

Eine Mischung aus jeweils 1,5 μL der beiden Farbstoffe SYTO 9 und Propidiumiodid wurden hergestellt, wobei Propidiumiodid vorher 1:200 in DMSO verdünnt wurde. Zu 0,5 mL Bakteriensuspension wurden 3 μL der Farbstoff-Mixtur gegeben (Endkonzentration: 10 mM (SYTO 9) und 0,3 mM (Propidiumiodid)). Die Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Vor der Messung wurde die Bakteriensuspension 1:10 in PFD verdünnt. Die Analyse wurde mit einem Durchflusszytometer (CyFlow[®], Partec GmbH) durchgeführt. Der „Trigger“ lag auf dem Bereich FL 1 (Tabelle 17). Vor jeder Messung wurde das CyFlow[®] mit Kalibrierungssperlen (3 μm Partec) kalibriert.

Tabelle 17: Geräteeinstellungen der Durchflusszytometrie.

Parameter	Stellfaktor
Vorwärtsstreuung (FCS)	350
Seitwärtsstreuung (SSC)	400
Fluoreszenz 1 (FL1)	572 nm
Fluoreszenz 3 (FL 3)	700 nm
Auslöseparameter	FL1
Geschwindigkeit	3 $\mu\text{L sec}^{-1}$

Die Auswertung wurde mit der Software FlowMax[®] der Firma Partec durchgeführt.

4.5 Molekularbiologische Methoden**4.5.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**Fixierung

Zur Fixierung der Bakterien wurden 2 mL einer Bakteriensuspension bei 4 °C für 5 min bei 10964 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 mL Paraformaldehyd (4 % (w/v)) in PBS aufgenommen und bei 4 °C inkubiert. Nach 1 h wurde die Probe erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zweimal in PBS gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde das Zellpellet, abhängig von der Zellzahl in 0,2 mL Ethanol (50 % (w/v) in PBS) aufgenommen. Die fixierten Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Hybridisierung von *P. aeruginosa*

Zur Hybridisierung von *P. aeruginosa* wurden jeweils 10 µL der fixierten Proben auf einem epoxybeschichteten Diagnostika-Objektträger mit acht Vertiefungen aufgetragen und bei 46 °C getrocknet. Anschließend wurde eine Ethanol-Reihe durchgeführt, indem der Objektträger jeweils nacheinander für 3 min in Ethanol (50, 80, 96 % (v/v)) getaucht wurde. Der Objektträger wurde erneut bei Raumtemperatur getrocknet. In einem VIT[®]-Reaktor (Vermicon) wurden 900 µL Hybridisierungspuffer (NaCl (0,9 M), TRIS (pH 8, 20 mM), SDS (0,01 % (w/v)), Formamid (40 % (v/v))) vorgelegt, um eine feuchte Kammer zu schaffen. Anschließend wurden jeweils 10 µL der Gensondensuspension (5 µg µL⁻¹ in Hybridisierungspuffer) auf eine Vertiefung des Objektträgers gegeben. Der Objektträger wurde in einem Reaktor für 90 min bei 46 °C inkubiert. Ein weiterer Reaktor wurde in der Zwischenzeit mit 25 mL Waschpuffer (TRIS, pH 8 (20 mM), NaCl (56 mM), EDTA (5 mM) und SDS (0,01 % (w/v))) gefüllt und auf 46 °C im Hybridisierungssofen vorgewärmt. Die Objektträger wurden anschließend in den Reaktor mit dem Waschpuffer überführt und 15 min bei 46 °C inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in einem Becherglas mit kaltem entionisiertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. 10 µL DAPI-Lösung (1 µg mL⁻¹ in PBS) wurden jeweils auf die Vertiefungen des Objektträgers pipettiert und die Objektträger im Dunkeln inkubiert. Nach 20 min wurde der Objektträger erneut in einem Becherglas mit kaltem entionisiertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger bei 4 °C gelagert.

Hybridisierung von *S. aureus*

Zur Hybridisierung von *S. aureus* wurden jeweils 10 µL der fixierten Proben auf einem epoxybeschichteten Diagnostika-Objektträger mit acht Vertiefungen aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend wurde eine Ethanol-Reihe durchgeführt, indem der Objektträger jeweils nacheinander für 3 min in Ethanol (50, 80, 96 % (v/v)) getaucht wurde. Die fixierten Proben wurden mit 6 µL Lysozym (1 mg mL⁻¹) und Lysostaphin (10 µg mL⁻¹) in 10 mM Tris-HCl (pH 8) versetzt und bei 36 °C inkubiert. Um diese Lösung zu entfernen, wurde erneut eine Ethanolreihe durchgeführt und die Probe anschließend luftgetrocknet. In einem FISH-Reaktor (Vermicon) wurden 900 µL Hybridisierungspuffer (NaCl (0,9 M), TRIS (pH 8, 20 mM), SDS (0,01 % (w/v)), Formamid (40 % (v/v))) vorgelegt, um eine feuchte Kammer zu schaffen. Anschließend wurden jeweils 10 µL der Gensondensuspension (0,5 µg µL⁻¹ in Hybridisierungspuffer) auf eine Vertiefung des Objektträgers gegeben. Der Objektträger wurde in einem Reaktor für 90 min bei 46 °C inkubiert. Ein weiterer Reaktor wurde in der Zwischenzeit mit 25 mL Waschpuffer (TRIS, pH 8 (20 mM), NaCl (56 mM), EDTA (5 mM) und SDS (0,01 % (w/v))) gefüllt und ebenfalls auf 46 °C vorgewärmt. Die Objektträger wurden anschließend in den Reaktor mit dem Waschpuffer überführt und 15 min bei 48 °C inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in einem Becherglas mit kaltem PBS gespült und mit Druckluft ge-

trocknet. 10 µL DAPI-Lösung (1 µg mL⁻¹ in PBS) wurden jeweils auf die Vertiefungen des Objektträgers pipettiert und die Objektträger im Dunkeln inkubiert. Nach 20 min wurde der Objektträger erneut in einem Becherglas mit kaltem PBS gespült und mit Druckluft getrocknet. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger bei 4 °C gelagert.

Auswertung

Die Proben auf dem Objektträger wurden mit Citifluor AF2 überschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Zur mikroskopischen Betrachtung wurde Immersionsöl aufgetragen und die FISH-positiven Zellen bei 1000-facher Vergrößerung gezählt. Die Auszählung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Eclipse Ni-E, Nikon Instruments). Es wurden mindestens 20 Zählfelder oder 400 Zellen ausgezählt. Die Ergebnisse wurden angegeben als Zellen pro mL oder Kavität. Anhand der ermittelten Gesamtzellzahl (Abschnitt 4.4.2) wurde die Anzahl der FISH-positiven Bakterien berechnet.

$$\text{Zellen mL}^{-1} = \frac{\bar{x}_Z \text{ DAPI}}{\bar{x}_Z \text{ FISH}} \text{ GZZ}$$

\bar{x} : arithmetisches Mittel

Z: Zellen pro Zählfeld

GZZ: Gesamtzellzahl

4.5.2 Propidiummonoazid Real Time Quantitative TaqMan™ PCR (PMA-qPCR)

DNA-Extraktion

Die genomische DNA wurde mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben für gramnegative Bakterien durchgeführt.

0,5 mL der Bakteriensuspension wurde bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 180 µL „Buffer ATL“ resuspendiert. 20 µL Proteinase K wurden zum resuspendierten Pellet gegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit einem Reagenzglasschüttler homogenisiert und die Zellen bei 56 °C für 1,5 h lysiert. Alle 10 min wurde die Probe für 15 sec geschüttelt (Thermomixer comfort, Eppendorf). Nach der Lyse wurde die Probe für 15 sec mit einem Reagenzglasschüttler gemischt. „Buffer AL“ und Ethanol (96 %) wurden zu gleichen Teilen vereint und 400 µL dieser Mischung zu den Proben gegeben. Die Probe wurde mit einem Reagenzglasschüttler homo-

genisiert. Zum Binden der DNA an eine Membran wurde die Probe in die Säule (DNeasy Mini Spin Column) pipettiert, welche in einem Auffangröhrchen platziert wurde und bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß platziert und der erste Waschschrift wurde durchgeführt, indem 500 µL „Buffer AW1“ auf die Säule pipettiert wurde. Anschließend wurde bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß platziert und der zweite Waschschrift wurde durchgeführt, indem 500 µL „Buffer AW2“ auf die Membran pipettiert wurde. Anschließend wurde bei 20.000 x g für 3 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen platziert und zur Elution der DNA wurden 200 µL „Buffer AE“ direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 1 min wurde die Probe erneut bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das Eluat bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C gelagert.

Herstellung der Standards für die qPCR

Eine Kultur von *P. aeruginosa* AdS wurde auf LB-Agar angelegt und bei 36 °C für 24 h inkubiert. Einige Einzelkolonien dieser Kultur wurden in Wasser (für die Molekularbiologie) suspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Thoma-Zählkammer auf 1×10^8 Zellen mL^{-1} eingestellt. Die Zellzahlbestimmung wurde zusätzlich sowohl kulturell (Abschnitt 4.4.1) als auch mit der DAPI-Methode (Abschnitt 4.4.2) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit extrahiert. Aus der genomischen DNA von *P. aeruginosa* AdS wurden vor jeder qPCR Messung DNA-Standards in Wasser (für die Molekularbiologie) hergestellt, die einer Ausgangszellzahl von (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 Zellen mL^{-1}) entsprachen.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts des DNA-Standards für die qPCR wurde mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA nach Herstellerangaben (Life Technologies) durchgeführt. Es wurden Kalibrierstandards aus λ -DNA (0, 2, 20, 200, 2000 ng mL^{-1}) in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) hergestellt. Das Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz wurde 200-fach in TE-Puffer verdünnt. 100 µL der Probe (10-fach verdünnt in Wasser (für die Molekularbiologie)) und die Standards wurden jeweils in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten pipettiert (weiß, Flachboden) und mit 100 µL Pico-Green Reagenz versetzt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Fluoreszenz in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) bestimmt (Absorption: 480 nm, Emission: 520 nm). Eine Kalibriergerade der Standards wurde erstellt und die DNA-Konzentration durch lineare Regression ermittelt.

Behandlung mit PMA

Standardmäßig wurden 1,25 μL PMA (20 mmol L^{-1}) zu 0,5 mL Bakteriensuspension gegeben, um eine PMA-Endkonzentration von 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ zu erhalten. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde eine Photoaktivierung mit einem Photoaktivierungssystem (PhAST Blue) für 15 min durchgeführt. Zur Unterscheidung der membranintakten und membrangeschädigten Bakterien wurde immer ein Duplikat mitgeführt, welches keiner Photoaktivierung unterzogen wurden.

Zu Optimierung der PMA-qPCR wurde die PMA-Konzentration, Kontaktzeit von PMA mit der Probe und die Inkubationstemperatur von PMA mit der Probe variiert (Tabelle 18).

Tabelle 18: Optimierung der PMA-qPCR, Variationen der PMA-Konzentration, der Inkubationszeit und der Temperatur nach Nocker et al., 2007 und Nkuipou-Kenfack et al., 2013.

PMA Konzentration (μM)	Inkubationszeit (min)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
50	5	22
		40
	30	22
		40
100	5	22
		40
	30	22
		40

Untersucht wurden für die Optimierung planktonische Bakterien, welche im Mikrotiterplattensystem unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden (Abschnitt 4.10). Die Bakterien wurden folgendermaßen für 24 h bei 36 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert: PFD, NaCl (0,85 % (w/v)), Isopropanol (70 % (v/v)), Silbernitrat (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Eine von zwei mit PFD exponierten Kavitäten wurde nach der 24-stündigen Inkubation für 30 min bei 65 $^{\circ}\text{C}$ mit Hitze in einem Thermoblock behandelt.

qPCR

Zur Quantifizierung von *P. aeruginosa* wurde eine qPCR (CFX96 Touch, Bio-Rad) durchgeführt. Jede unbekannte Probe, jeder DNA-Standard und jede Kontrolle ohne Template-DNA (NTC) wurde in Duplikaten quantifiziert. Das Volumen jedes Ansatzes betrug 50 μL (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der qPCR für *P. aeruginosa*.

Substanz	Konzentration	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (μL)	Endkonzentration
VeriQuest™ Probe qPCR	1x	25	
Primer Pa23FP	10 pmol μL^{-1}	1,5	300 nM
Primer Pa23RP	10 pmol μL^{-1}	1,5	300 nM
Taqman-Sonde Pa23FAM	10 pmol μL^{-1}	1	200 nM
Rinderserumalbumin	10 mg mL^{-1}	1	200 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Wasser (für die Molekularbiologie)	-	15	-
Template	-	5	-

Das verwendete Temperaturprofil der qPCR ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Temperaturprofil der qPCR für *P. aeruginosa*.

Schritt	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (min)
1. Inkubation	50	2
2. Aktivierung	95	10
3. Denaturierung	95	0,15
4. Annealing und Elongation	60	1

Schritt 3-4: 40 Zyklen

Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software CFX-Manager (Bio-Rad) durchgeführt.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Bestimmung des ATP-Gehalts

Das BacTiter-Glo™ Reagenz wurde hergestellt, indem lyophilisiertes BacTiterGlo™-Substrat mit BacTiter-Glo™-Puffer nach Herstellerangaben (Promega) vermischt wurde, nachdem beides Raumtemperatur erreicht hatte. Bei jeder Messung wurde eine Kalibrierung (1 μM -1 pM ATP) und eine Blindwert (PFD) in Doppelbestimmung mitgemessen. Verdünnungen der Proben und der Kalibrierstandards wurden in PFD hergestellt. 100 μL der Proben und der Kalibrierstandards wurden in Duplikaten in Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL) gegeben und mit 100 μL des Bactiter-Glo™-Reagenz vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz an einem Luminometer (Promega GloMax® 20/20) bestimmt. Eine Kalibriergerade der Standards wurde erstellt und die ATP-Konzentration durch lineare Regression ermittelt.

Die Nachweisgrenze (NG) wurde folgendermaßen berechnet:

$$NG = \bar{x}L_{PFD} \mp 3 \sigma L_{PDF}$$

\bar{x} : arithmetisches Mittel

L_{PFD} : Lumineszenz (relative Lichteinheiten) von PFD

σ : Standardabweichung

4.6.2 Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Probenaufschluss

Zellpellets (Abschnitt 4.10) wurden in 9 mL PFD und 50 μ L Protease-Inhibitor-Cocktail (23 mM AEBSF, 2 mM Bestatin, 100 mM EDTA, 0.3 mM E-64; 0.3 mM Pepstatin A) aufgenommen und mit einem Reagenzglasschüttler dispergiert. Die dispergierten Zellen wurden mittels Ultraschall (Ultrasonic-Disintegrator Sonifier W-250 - 60 Watt, 90 % Duty Cycle) aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen (unter Eiskühlung) sechsmal 30 sec mit Ultraschall behandelt. Zwischen den sechs Intervallen wurden jeweils 1 min Pause eingelegt.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden im Anschluss einer DNase-Behandlung unterzogen. Hierzu wurden 1 mL Benzonase-Puffer (500 mM TRIS, 10 mM $MgCl_2$) und 10 μ L Benzonase (Endkonzentration: 65 U mL^{-1}) zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben.

Die Benzonase-behandelten Proben wurden zweimal für 1 h und einmal für 18 h gegen 5 L entionisiertes Wasser bei 4 °C dialysiert. Die Dialyse-Schläuche (MWCO: 12-14 kDa; Visking) wurden zuvor für 1h in entionisiertem Wasser aufgekocht.

Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein nach Peterson (1979) modifizierter Lowry-Assay (Lowry, 1951) unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenzien (Sigma) durchgeführt. Als Kalibrierstandard für die Proteinbestimmung diente BSA. Aus der BSA-Stammlösung (400 μ g mL^{-1}) wurden Kalibrierstandards (0, 20, 40, 60 μ g mL^{-1}) in entionisiertem Wasser hergestellt.

Für die Proteinbestimmung wurden jeweils 0,5 mL Probe und deren Verdünnungen oder Kalibrierstandards in Doppelbestimmung in Reagenzglasröhrchen überführt. 0,5 mL des Lowry-Reagenzes (45,03 % SDS, 38,49 % Natriumcarbonat, 15,13 % Lithiumhydroxid-Monohydrat, 1,35 % Kupfer(II)-tartrat) wurden zu 0,5 mL der dialysierten Proben gegeben. Nach kurzem Schütteln auf einem Reagenzglasschüttler, wurden die Proben 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,25 mL Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (61,2 % Wasser, 12,2 % Lithiumsulfat, 2 % Natriumwolframat Dihydrat, 9,5 % Salzsäure (≥ 25 %), 6,9 % wässrige Phosphorsäure-Lösung, 2 % Natriummolybdat-Dihydrat) zu den

Proben gegeben und erneut auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 300 µL der Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 750 nm gemessen.

Eine Kalibriergerade der BSA-Standards wurde erstellt und die Proteinkonzentration als BSA-Äquivalent durch lineare Regression ermittelt.

12 Proben (Abschnitt 4.10) (jeweils 75 µg Protein) wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur Trockene vakuumzentrifugiert. Die Proben wurden bis zum CyDye-Labeling bei -20 °C gelagert.

2D-DIGE -CyDye-Labeling

Die Proben in Form von Zellpellets wurden in 30 µL DIGE-labeling Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 30 mM TRIS) aufgenommen.

Es wurden folgende interne Standards hergestellt:

Planktonische Bakterien: jeweils 10 µL der Probe der planktonischen Bakterien aus drei unabhängigen Versuchen (mit und ohne Silbernitrat-Exposition), wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen vereint.

Biofilme: jeweils 10 µL der Probe der Biofilme aus drei unabhängigen Versuchen (mit und ohne Silbernitrat-Exposition) wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen vereint.

Durch Auftropfen von jeweils 2 µL der Proben auf pH-Teststreifen, wurde der pH-Wert bestimmt. Der optimale pH-Wert liegt bei 8,5 und der minimale pH-Wert bei 8,0. Für die 2D-DIGE wurden vorerst die IPG-Streifen für das Cup-Loading rehydratisiert. Hierzu wurden 15 µL Pharmalytes (pH 3-10) zu 3 mL DeStreak-Lösung gegeben. 450 µL der Lösung wurden jeweils in die Schächte der Aufquellschale pipettiert und sechs IPG-Streifen (pH 3-10, 24 cm) mit der Gelseite nach unten in die Schächte gelegt. Die IPG-Streifen wurden in einer luftdichten Aufbewahrungsbox mindestens 6 h bei Raumtemperatur rehydratisiert.

2,6 µL der CyDye-Stammlösungen (Cy2, Cy3, Cy6) wurden jeweils mit 3,9 µL wasserfreiem Dimethylformamid verdünnt. 3 µL Cy2 wurden zu 60 µL der internen Standards gegeben. Jeweils 1 µL Cy3 wurden zu den Proben ohne Silbernitrat-Exposition und 1 µL Cy5 zu den silberexponierten Proben gegeben. Bei der dritten biologischen Probe wurde ein sogenannter „Dye-Swap“ durchgeführt. Hier wurden die Proben jeweils mit einem anderen Farbstoff als bei den ersten beiden biologischen Proben angefärbt. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert. Um überschüssigen CyDye abzubinden, wurden jeweils 1 µL Lysin (10 mM) zu den Proben gegeben. Die Proben wurden erneut für 10 min unter Eiskühlung inkubiert.

Pro Gel wurden 20 µL des internen Standards der planktonischen Bakterien mit 20 µL der Proben (planktonische Bakterien mit und ohne Silbernitrat-Exposition) vereint. Es wurden jeweils drei biologische Proben verwendet. Anschließend wurden 60 µL 2x Lysis-Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % DDT, 2 % Pharmalytes) zu den Gemischen gegeben. Mit den Biofilmproben wurde, äquivalent zu den planktonischen Bakterien, verfahren.

Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden die IPG-Streifen mit der Gel-Seite nach oben in eine IEF-Schale überführt. Elektroden-Papierblöcke wurden mit MilliQ Wasser befeuchtet, an den beiden Enden der IPG-Streifen platziert und die Elektroden daran befestigt. Die Cups wurden am anodischen Ende befestigt und die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet. Die Proben wurden in die Cups pipettiert und mit 20 µL Mineralöl überschichtet. Die IEF wurde nach folgendem Programm durchgeführt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Programm für die isoelektrische Fokussierung (Gesamtvoltstunden: 97.100 Vh).

Schritt	Modus	Spannung [V]
1	Step	150
2	Step	300
3	Step	500
4	Grad	1.000
5	Grad	8.000
6	Step	8.000
7	Grad	10.000
8	Step	10.000

SDS-PAGE

Zur Äquilibration der fokussierten IPG-Streifen wurden 100 mL Äquilibrationlösung mit DTT (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris (pH 8,8), 30 % Glycerol, 1 % DTT) auf die Streifen in der IEF-Schale geben und für 15 min unter leichtem Schaukeln auf einer Schaukel-Plattform inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit verworfen und 100 mL Äquilibrationlösung mit Iodoacetamid (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris (pH 8,8), 30 % Glycerol, 2,5 % Iodoacetamid) bedeckt. Nach 15-minütiger Inkubation unter leichtem Schaukeln wurde die Äquilibrationlösung verworfen.

Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Ebene wurde ein Elektrophoresesystem (Etan™ DALTsix) in Kombination mit kommerziell erhältlichem 12,5 %igem Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Gele wurden zunächst mit entionisiertem Wasser gewaschen. Zum Waschen der IPG-Streifen wurden diese kurz in SDS-Laufpuffer getaucht. Anschließend wurde der IPG-

Streifen auf die obere Kante des SDS-Gels platziert. 10 μL Proteinmarker wurden auf einen Elektrodenwick pipettiert und nach Trocknung bei Raumtemperatur auf das SDS-Gel links neben den IPG-Streifen aufgelegt. Der IPG-Streifen wurde mit 2 mL Agarose (0,5 % (w/v)) überschichtet.

Der Anoden-Laufpuffer (DIGE-Buffer-Kit) wurde in die untere Puffer-Kammer geben. Die Kammer wurde mit MilliQ Wasser bis zur 4,5 L Fülllinie aufgefüllt. Das Polyacrylamidgel wurde in den Kassettenträger der Gelkassette platziert. 2-fach konzentrierter Kathoden-Laufpuffer (DIGE-Buffer-Kit) wurde auf 1,2 L mit MilliQ Wasser aufgefüllt und in die obere Puffer-Kammer geben. Der Füllstand des Anoden-Laufpuffers wurde mit MilliQ Wasser auf dieselbe Höhe wie die des Kathoden-Laufpuffers gebracht.

Die Gelelektrophorese wurde bei 17 °C mit 12,5 mA und 1,5 W pro Gel durchgeführt.

Die Bilddokumentation wurde mit einem Laserscanner (Typhoon FLA 9000, GE Healthcare) mit folgenden Photomultiplier-Einstellungen durchgeführt (Tabelle 22). Die Auswertung wurde mit der Software Decodon Delta 2D durchgeführt.

Tabelle 22: Photomultiplier-Einstellungen des Laserscanners zur Bildgebung der 2D-DIGE.

Probe	Farbstoff	Elektrische Spannung [V]
Biofilm	Cy2	700
	Cy3	550
	Cy4	650
Planktonisch	Cy2	650
	Cy3	550
	Cy4	650

Reinigung der Proteinspots

Nachdem das Gel gescannt wurde, wurde dieses aus dem Scanner entnommen und das obere Glas wurde vorsichtig entfernt. Das gescannte Bild wurde in Originalgröße des Gels ausgedruckt, die signifikant unterschiedlich exprimierten Spots markiert und als Schablone zum Ausstechen der Spots verwendet. Die Glasplatte wurde nun mit dem Gel nach oben auf dem Bild platziert und ausgerichtet. Zur Orientierung dienten die IPG-Streifen. 43 der 86 unterschiedlich exprimierten Spots der Biofilme und zehn der 17 unterschiedlich exprimierten Spots der planktonischen Bakterien wurden mit einem Korkbohrer ausgestanzt und in eine Mikrotiterplatte transferiert. Die ausgestanzten Gelstücke wurden zuerst dreimal mit 100 μL MS-Wasser für 15 min unter starkem Schütteln (Heizblock mit Schüttelfunktion, Eppendorf) gewaschen, um alle Pufferbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die Mischung für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Gelstücke dreimal mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat (100 mM) unter starkem Schütteln für 10 min gewaschen. Die Mischung wurde für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert und

der Überstand verworfen. 200 μL TCEP (10 mM) wurden zu den Gelstücken gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 62 °C wurde die Mischung für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurden umgehend 200 μL Iodoacetamid (55 mM) zu den Gelstücken gegeben. Auf einer Schaukel-Plattform wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Diese Mischung wurde für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Gelstücke mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat in Acetonitril (50 % (v/v)) unter starkem Schütteln für 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Mischung für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Darauf wurden 50 μL Acetonitril (100 %) zu den Gelstücken gegeben. Das Acetonitril wurde anschließend mit einer Pipette entnommen.

Die Proben wurden in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac) für 5 min getrocknet. 20 μL Trypsin (10 ng μL^{-1}) wurde zu den getrockneten Proben gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gelstücke vollständig mit Ammoniumhydrogencarbonat (25 mM) bedeckt und die Mikrotiterplatten wurden verschlossen und mit Parafilm versiegelt. Die Proben wurden bei 37 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach 16 h wurden die Proben für 10 sec bei 16.000 x g zentrifugiert.

Die Überstände wurden in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Zu den verbliebenen Gelstücken wurden 50 μL Ameisensäure (5 % (v/v)) gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und mit dem Überstand der Trypsin-Behandlung vereint.

50 μL Acetonitril (100 %) wurden zu den Gelstücken gegeben und die Ansätze wurden unter starkem Schütteln (Heizblock) für 15 min inkubiert. Dieser Überstand wurde ebenfalls entnommen und mit dem übrigen Überstand vereint. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt bis das Gel durchsichtig wurde. In einem Vakuumkonzentrator wurde das Volumen auf ein Endvolumen von 40-50 μL eingeeengt (3-5 h bei 30 °C).

Da die Lösungen des Gel-Verdau noch tryptische Peptide, unverdautes Trypsin, Salze und Gelreste enthielten, wurden diese mit StageTips (C18-Filtermaterial) aufgereinigt. Die Stage-Tips wurden in einer Pipettenspitzenbox platziert.

Zur Konditionierung des C18-Materials wurden 50 μL Methanol in die StageTips pipettiert und 5 min bei 600 x g zentrifugiert. 50 μL der StageTip-Lösung B wurden auf den Filter gegeben und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. 50 μL der StageTip-Lösung A wurden auf den Filter gegeben und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.

Die Proben aus dem Gel-Verdau wurden auf die StageTip gegeben und für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Danach wurden die Stage-Tips mit 50 μL der StageTip-Lösung A gewaschen und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Filtrat wurde verworfen.

Die StageTips wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit Halterung für die StageTips überführt. Um die gebundenen Peptide zu eluieren, wurden 50 µL der StageTip-Lösung B auf das C18 Material gegeben und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Eluat wurde mit einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von < 20 µL eingengt. 10 µL der LC-MS-Lösung wurden zur Verdünnung zu den Proben gegeben. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Flüssigchromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung (LC-MS)

Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte mittels LC-MS. Die LC-MS wurde auftragsweise am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen von Dr. Farnusch Kaschani durchgeführt. Erhaltene MS-Spektren wurden zur Identifizierung unter Anwendung der Software Proteome Discoverer 1.4 (ThermoScientific) mit Proteinen der MASCOT Datenbank abgeglichen.

4.7 Rasterelektronenmikroskopie

Mit Suspensionen von *P. aeruginosa* wurde eine Dead-End-Membranfiltration (schwarze Polycarbonatfilter, Porengröße: 0,2 µm) durchgeführt. In eine Mikrotiterplatte mit sechs Kavitäten wurden 8 mL Glutaraldehyd (5 % (v/v)) in Dimethylarsinsäure-Puffer vorgelegt und die Filter darin inkubiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden die Proben entnommen und in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid mit angelegtem Vakuum getrocknet. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem ESEM Quanta 400 FEG (FEI) auf Kohlenstoffträgern durchgeführt. Die Proben wurden zuvor mit Hilfe eines High Resolution Ion Beam Coater 681 mit einer Kohlenstoffschicht von 3 nm besputtert. Mit einem energie-dispersiven Röntgenfluoreszenzspektrometer (EDX, EDAX EDX-Analysis System, Genesis) wurde Silber in den Proben detektiert und quantifiziert.

4.8 Einfluss von Silber auf das Wachstum

4.8.1 Minimale Hemmkonzentration und minimale bakterizide Konzentration

Mikrotiterplattenverfahren

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Mikrotiterplattenverfahren wurde in Anlehnung an EUCAST (2003) durchgeführt. Flüssigkulturen von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium (Abschnitt 4.3.1) wurden 1:50 in 5 mL doppelt konzentriertem LB-Medium verdünnt. Die Ausgangskoloniezahl (KBE mL⁻¹) wurde bestimmt, indem die Bakteriensuspension dezimal in PFD verdünnt und die Koloniezahl bestimmt wurde (Abschnitt 4.4.1). AgNPs und Silbernitrat (ebenfalls in doppelter Konzentration) wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten geometrisch in PFD verdünnt (Endvolumen 50 µL). Anschließend wurden 50 µL der verdünnten Bakteriensuspension hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Mikrotiterplatten wurden bei 36 °C für 24 h statisch inkubiert. Die MHK wurde optisch abgelesen. Sie entspricht der niedrigsten Konzentration eines Stoffes, bei der keine sichtbare Trübung des Mediums auftritt. Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration wurde Silber in den Proben neutralisiert (Endkonzentration: Natriumthioglycolat 0,1 % (w/v) und Natriumthiosulfat 0,14 % (w/v)). Aliquots der nicht getrübbten Kavitäten und deren Verdünnungen in PFD wurden auf LB-Agar ausplattiert (24 h, 36 °C). Die Kolonien wurden ausgezählt und die bakterizide Konzentration (MBK) berechnet. Diese entspricht der Konzentration, bei der 99,9 % der Ausgangskoloniezahl nicht mehr kultivierbar sind.

Reagenzglasverfahren

Vorkulturen von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 wurden hergestellt (4.3.1). Nach 18 h wurden die Bakterien auf 1×10^5 Zellen mL⁻¹ mit einer Thoma-Zählkammer eingestellt. 1 mL der zu testenden Substanz (AgNPs oder Silbernitrat) wurde jeweils in ein Reagenzglas gegeben und 1 mL des jeweiligen Bakterienstammes wurde zugegeben. Diese Mischung wurde für 24 h bei 36 °C in einem Schüttelwasserbad (180 Upm) inkubiert. Die MHK wurde optisch abgelesen. Sie entspricht der niedrigsten Konzentration eines Stoffes, bei der keine sichtbare Trübung des Mediums auftritt.

4.8.2 Einfluss von Silber auf das Wuchsverhalten

Mikrotiterplatten wurden mit *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium mit und ohne Zugabe von Silber (AgNPs und Silbernitrat), wie in Abschnitt 4.8.1 beschrieben, angeimpft.

Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurden die Mikrotiterplatten bei 36 °C statisch inkubiert und die Absorption der Kultur bei 570 nm über einen Zeitraum von 48 h mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) gemessen.

4.9 Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung

Wie in Abschnitt 4.8.1 beschrieben, wurden Mikrotiterplatten mit Silber (AgNPs und Silbernitrat) und den Bakteriensuspensionen (*P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984) beimpft und für 24 h statisch bei 36 °C inkubiert. Für die Untersuchung der planktonischen Bakterien wurden 90 µL der planktonischen Bakterien in ein Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) überführt. Hiervon wurden 65 µL entnommen und in ein weiteres Mikrozentrifugenröhrchen mit 585 µL PFD gegeben.

Die noch an den Wandungen der Mikrotiterplatte angehefteten Biofilme wurden zweimal mit 200 µL PFD gewaschen. Zur Bestimmung der Kultivierbarkeit und der Gesamtzellzahl wurden die Biofilme in 100 µL PFD resuspendiert. Hierzu wurde der Biofilm mit einer Pipettenspitze am Rand und am Boden der einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte abgeschabt. Durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren der Resuspendierungslösung wurde der Biofilm homogenisiert. Anschließend wurden 65 µL der abgelösten Biofilme entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß mit 585 µL PFD gegeben. Das Silber in den Proben mit den planktonischen Bakterien und den abgelösten Biofilmproben, wurde anschließend durch die Zugabe von 50 µL Natriumthioglycolat (1,4 %) und Natriumthiosulfat (2,04 %) neutralisiert. Die Endkonzentration betrug 0,1 % (w/v) Natriumthioglycolat und 0,14 % (w/v) Natriumthiosulfat. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Bakterien mit PFD verdünnt. Von diesen Proben wurde die Kultivierbarkeit (Abschnitt 4.4.1) und die Gesamtzellzahl (Abschnitt 4.4.2) bestimmt.

Zur Bestimmung der Biomasse der Biofilme wurden diese nach dem Waschschrift, wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, mit Kristallviolett gefärbt und quantifiziert.

4.10 Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme und planktonische Bakterien

Mikrotiterplatten-Assay

Vorkulturen von *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 wurden, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, in LB-Medium hergestellt. Nach 18 h wurde die Kultur 1:100 in 5 mL LB-Medium verdünnt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µL der verdünnten Kultur in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Flachboden, transparent, Polystyrol) pipettiert. Als Sterilitätskontrolle wurden 8 Kavitäten ausschließlich mit LB-Medium beimpft.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C wurden 90 µL der planktonischen Bakterien für die Exposition mit AgNPs und Silbernitrat aus den Kavitäten der Mikrotiterplatte entnommen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) überführt. Hiervon wurden 65 µL entnommen und in ein weiteres Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Die planktonischen Bakterien wurden dann bei 10477 x g für 10 min bei 18 °C zentrifugiert und das überstehende Medium abpipettiert. Anschließend wurden die Bakterien in 200 µL PFD aufgenommen und zweimal auf die gleiche Weise durch Zentrifugation gewaschen. Die planktonischen Bakterien wurden anschließend mit 100 µL der jeweiligen Testsubstanz (AgNPs, Silbernitrat oder PFD als Kontrolle ohne Silber) aufgenommen. Unverzüglich nach Zugabe der Substanzen wurde das Zellpellet mit einem Reagenzglasschüttler homogenisiert.

Die Biofilme aus den gleichen Kavitäten wurden zweimal mit PFD gewaschen. Hierzu wurden 200 µL der Flüssigkeit vorsichtig auf den Biofilm pipettiert und anschließend wieder entnommen. Danach wurden 100 µL der jeweiligen Testsubstanz (AgNPs, Silbernitrat oder PFD als Kontrolle ohne Silber) auf den Biofilm pipettiert.

Parallel dazu wurden suspendierte Biofilme mit Silber exponiert. Dazu wurden aus weiteren Kavitäten die planktonischen Bakterien entfernt, verworfen und die Biofilme, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Die Biofilme wurden anschließend mit 100 µL der jeweiligen Testsubstanz (AgNPs, Silbernitrat oder PFD als Kontrolle ohne Silber) durch Abschaben mit einer Pipettenspitze suspendiert.

Die planktonischen Bakterien, die angehefteten Biofilme und die suspendierten Biofilme, welche alle mit AgNPs, Silbernitrat und PFD versehen wurden, wurden anschließend für 24 h bei 36 °C statisch inkubiert. Als Kontrolle ohne Silber diente PFD.

Nach 24 h wurden jeweils 100 µL einer Neutralisationslösung (Endkonzentration: Natriumthioglycolat 0,1 % (w/v) und Natriumthiosulfat 0,14 % (w/v)) zu den unterschiedlichen Proben (planktonische Bakterien, Biofilme, suspendierte Biofilme) gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurden 180 µL der jeweiligen Probe entnommen und in 1620 µL entionisiertem Wasser verdünnt. Die angehefteten Biofilme wurden vor der Entnahme suspendiert.

Von diesen Proben wurde im Falle von *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 die Kultivierbarkeit (Abschnitt 4.4.1) die Gesamtzellzahl (Abschnitt 4.4.2) und das Vorhandensein von ribosomaler RNA (Abschnitt 4.5.1) bestimmt. Exemplarisch für *P. aeruginosa* AdS wurde die Membranintegrität (Abschnitt 4.5.2 und 4.5.2) und der ATP-Gehalt (4.6.1) bestimmt. Zudem wurden von *P. aeruginosa* rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abschnitt 4.7) erstellt.

Wirkmechanismen

Die Untersuchungen der Wirkmechanismen von Silber wurden ebenfalls anhand von in Mikrotiterplatten angezüchteten und silberexponierten etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* durchgeführt. Zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Silber wurden unterschiedliche Substanzen bezüglich ihrer Schutzwirkung gegen den antimikrobiellen Effekt von Silber auf *P. aeruginosa* getestet. Planktonische Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS (LB, 24 h, 36 °C) wurden mit Silber (AgNPs und Silbernitrat) in Kombination mit unterschiedlichen Substanzen (Ascorbinsäure, N-Acetylcystein, L-Cystein, Katalase und Natriumpyruvat (Tabelle 23) exponiert, um die Wirkmechanismen von Silber zu untersuchen.

Planktonische Bakterien und Biofilme wurden im Mikrotiterplattenverfahren angezüchtet, separiert und gewaschen (Abschnitt 4.10). Die Silberlösungen wurden doppelt konzentriert (AgNPs 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und Silbernitrat 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) in PFD angesetzt. Die Substanzen wurden ebenfalls doppelt konzentriert in HEPES (200 mM, pH 7) angesetzt.

AgNPs, Silbernitratlösung oder PFD wurden jeweils mit den Substanzen (Tabelle 23) zu gleichen Teilen vereint. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 μL des Reaktionsmixes, einerseits zu den planktonischen Bakterien, andererseits zu den Biofilmen gegeben. Die Proben wurden bei 36 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Koloniezahl (Abschnitt 4.4.1) und die Gesamtzellzahl (Abschnitt 4.4.2) bestimmt.

Tabelle 23: Substanzen in HEPES (100 mM) – Endkonzentrationen im Testsystem.

Testsubstanz	Endkonzentration
Ascorbinsäure	10 mM
N-Acetylcystein	10 mM
L-Cystein	10 mM
Katalase	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Natriumpyruvat	100 mM

Probenvorbereitung für die 2D-DIGE

Vorkulturen von *P. aeruginosa* AdS wurden, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, angelegt. Die Flüssigkultur wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µL der verdünnten Kultur in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Flachboden) pipettiert. Es wurden insgesamt vier Mikrotiterplatten angeimpft. Pro Platte wurden 80 Kavitäten mit *P. aeruginosa* beimpft. Die Inkubation der vier Mikrotiterplatten erfolgte bei 36 °C. Nach 24 h wurden aus jeder beimpften Kavität 90 µL der planktonischen Bakterien entnommen. Von jeweils zwei Mikrotiterplatten wurden die Bakteriensuspensionen in einer Pipettierwanne gesammelt und jeweils in ein Zentrifugenröhrchen überführt (2 x 8 mL). Der Rest der planktonischen Bakterien (aus den anderen zwei Mikrotiterplatten) wurde verworfen. Die planktonischen Bakterien wurden zentrifugiert (1900 x g, 15 min, 9-11 °C). Anschließend wurden diese zweimal mit 8 mL PFD gewaschen und der Überstand wurde verworfen. Die planktonischen Bakterien einer Mikrotiterplatte wurden in 8 mL PFD und die der anderen in 8 mL Silbernitratlösung (25 µg mL⁻¹) aufgenommen. Die angehefteten Biofilme wurden in der Mikrotiterplatte jeweils zweimal mit 200 µL PFD durch Pipettieren gewaschen. Die Biofilme aus jeweils zwei Mikrotiterplatten wurden mit PFD und die Biofilme der anderen zwei Mikrotiterplatten mit Silbernitratlösung (25 µg mL⁻¹) exponiert. Hierzu wurden jeweils 100 µL der jeweiligen Lösungen in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Planktonische Bakterien und Biofilme wurden bei 36 °C inkubiert.

Nach 24 h wurden sowohl planktonische Bakterien als auch die Biofilme mit Neutralisationslösung versetzt (0,14% Natriumthiosulfat, 0,1% Natriumthioglycolat). Die Biofilme wurden mit Hilfe einer Pipette von den Wandungen der Mikrotiterplatte gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Biofilme aus zwei Mikrotiterplatten wurden zu einer Probe vereinigt. Anschließend wurden die planktonischen Bakterien und die Biofilme für 15 min bei 4° C und 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Es wurden insgesamt drei unabhängige biologische Proben für die Untersuchung mit der 2D-DIGE (Abschnitt 4.6.2) hergestellt.

4.11 Einfluss von Silber auf planktonische *P. aeruginosa* in Suspension

Die Vitalität von *P. aeruginosa* wurde neben den Bakterien aus Mikrotiterplatten zusätzlich anhand von in entionisiertem Wasser suspendierten planktonischen *P. aeruginosa* Zellen untersucht. Hierzu wurde eine Vorkultur von *P. aeruginosa* AdS hergestellt, indem Einzelkoloniausstriche der Bakterienstämme auf LB-Agar angelegt wurden. Diese wurden für 24 h bei 36 °C inkubiert. In einem Erlenmeyerkolben (100 mL) wurden 20 mL LB-Medium mit einigen Einzelkolonien der ersten Vorkultur angeimpft. Diese Flüssigkultur wurde bei 36 °C und 180 Upm in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 24 h wurde die Flüssigkultur zentrifugiert (1900 x g, 15 min, 9-11 °C) und der Überstand verworfen. Die Bakteriensuspension

wurde zweimal mit 20 mL Wasser mit niedrigem Gesamtkohlenstoff-Gehalt (Wasser, ROTI-PURAN® Low Organic Purity) (LOP-Wasser) durch Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen gewaschen und anschließend wieder in 20 mL LOP-Wasser aufgenommen. Mit einer Thoma-Zählkammer wurde in LOP-Wasser eine Zellzahl von 4×10^7 Zellen mL^{-1} eingestellt. In 100 mL Erlenmeyerkolben wurde jeweils 39 mL LOP-Wasser (als Kontrolle) AgNPs, Silbernitrat ($0\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$) und 1 mL der Bakteriensuspension hinzugegeben, um eine Bakterienendkonzentration von 1×10^6 Zellen mL^{-1} zu erreichen. Die Testansätze wurden im Dunkeln bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Für eine kinetische Untersuchung wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 4, 8, 24 h) Proben entnommen und die Koloniezahl (Abschnitt 4.4.1) und die Gesamtzellzahl (Abschnitt 4.4.2) bestimmt. Nach 24 h wurde zudem die Membranintegrität der Bakterien untersucht. Hierzu wurde das LIVE/DEAD-Kit eingesetzt (Detektion mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie) (Abschnitt 4.4.3) und die PMA-qPCR (Abschnitt 4.5.2) eingesetzt. Als Funktionskontrolle für geschädigte Bakterien bei den Vitalitätsuntersuchungen dienten Isopropanol (70 %) und eine Hitzebehandlung von 30 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.12 Antimikrobielle Wirksamkeit AgNP-dotierter Medizinprodukte

4.12.1 AgNP-dotierte Medizinprodukte

Es wurden drei unterschiedliche AgNP-dotierte Medizinprodukte (Knochenzemente mit und ohne Gentamicin, Knochenimplantate und Wundauflagen) untersucht (Tabelle 24). Diese wurden von der Firma aap biomaterials (Dieburg) hergestellt. Die Knochenzemente bestehen aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit und ohne Gentamicin und wurden vor dem Aushärten mit unterschiedlichen Konzentrationen der AgNPs (AgPURE W10, rent a scientist) ($0, 3, 4$ und 5 mg g^{-1} Ag in PMMA) versetzt. Die Knochenimplantate bestehen aus Titan (TiAl6V4-Eli) und wurden mit AgNPs (AgPURE W50, rent a scientist) durch plasmaelektrolytische Oxidation (PEO) beschichtet. Die Konzentrationsangaben der Titan-Prüfkörper beziehen sich auf die Silberkonzentration im Elektrolyten, der für die PEO verwendet wurde ($2,5 \mu\text{g g}^{-1}$). Die tatsächliche Silberkonzentration auf der Oberfläche beträgt etwa $14,3 \mu\text{g cm}^{-3}$. Kollagenfolien zur Wundabdeckung wurden aus Schweinekollagen gewonnen und mit AgNPs (AgPURE W10) ($200 \mu\text{g mg}^{-1}$) versetzt. Alle Prüfkörper hatten einen Durchmesser von 10 mm, die Knochenzement- und die Titan-Prüfkörper besitzen eine Dicke von 2 mm und die Kollagenfolie von weniger als 1 mm.

Tabelle 24: Übersicht der AgNP-dotierten Medizinprodukte.

Material	Ag (AgNPs)	Foto der jeweiligen Prüfkörper mit steigender Silberkonzentration von links nach rechts
Knochenzemente	0, 3, 4, 5 mg g ⁻¹	
Knochenzemente mit Gentamicin	0, 3, 4, 5 mg g ⁻¹	
Titan	0, 2,5 % (w/v)	
Kollagen	0, 200 mg g ⁻¹	

4.12.2 Wachstumshemmung

LB-Agarplatten wurden mit *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, nach EUCAST (2009) angeimpft. Anschließend wurden die Prüfkörper (Knochenzemente mit und ohne Gentamicin und Titan) auf die Agaroberfläche aufgelegt. Nach 24 h bei 36 °C wurden die entstandenen Hemmhöfe um die Medizinprodukte ausgemessen und in Anlehnung an EUCAST (2013b) ausgewertet.

4.12.3 Biofilmbildung auf AgNP-dotierten Medizinprodukten

Die Prüfkörper (Knochenzement mit und ohne Gentamicin, Titan und Kollagen) wurden jeweils in eine Kavität von Mikrotiterplatten mit 6 Kavitäten gelegt. Diese wurden mit 7 mL einer Bakteriensuspension (mit 1×10^5 Zellen mL⁻¹ *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538, oder *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium) überschichtet, sodass die Prüfkörper vollständig untergetaucht waren. Die Ansätze wurden anschließend für 24 h bei 36 °C inkubiert.

Zur Untersuchung der Biofilmbildung wurden die Prüfkörper nach 24 h mit einer Pinzette aus den Kavitäten entnommen und zweimal gewaschen, um nicht adhärierte und planktonische Bakterien zu entfernen. Hierzu wurden die Prüfkörper kopfüber in ein Becherglas mit PFD getaucht.

4.12.3.1 Quantifizierung der Biofilmbildung

Zur Quantifizierung der Biofilmbildung wurde die Oberseite der Prüfkörper nach dem Waschen mit 25 µL Kristallviolett (0,1 % (w/v)) überschichtet. Nach 30 min wurden die Prüfkörper erneut zweimal gewaschen, indem sie in PFD getaucht wurden. Zum Lösen des Kristallvi-

olett, wurden die Prüfkörper kopfüber in jeweils eine Kavität einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten gelegt, welche jeweils 200 μL Essigsäure (30 % (v/v)) enthielten. Nach 30 min wurden die Prüfkörper entnommen und erneut mit 100 μL Essigsäure abgespült. Die Absorption der Lösung wurde bei 570 nm mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) detektiert und als Maß für die Biofilmbildung aufgetragen.

4.12.3.2 Visualisierung der Biofilme

Zur Visualisierung der Bakterien auf den Prüfkörpern, wurden diese nach dem Waschen in eine feuchte Kammer (Petrischale mit getränktem Zellstoff) überführt und mit dem LIVE/DEAD-Kit angefärbt. 80 μL einer Mischung der Farbstoffe SYTO 9 (5 μM) und Propidiumiodid (30 μM) wurden auf jeden Prüfkörper pipettiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Prüfkörper in einem Becherglas mit 40 mL PFD gewaschen. Die Visualisierung der Bakterien auf den Prüfkörpern wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Nikon) durchgeführt. Hierzu wurden die Prüfkörper auf einem Objektträger in Citifluor AF eingebettet und bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet.

4.12.3.3 Vitalität der Biofilme

Zur genaueren Untersuchung der Vitalität (exemplarisch für *P. aeruginosa*) der Bakterien auf den Prüfkörpern, wurden die Prüfkörper nach dem Waschschrift jeweils in ein Röhrchen mit 2 mL PFD überführt und die Bakterien von den Prüfkörpern abgelöst, indem sie für 2 min kontinuierlich auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt wurden. Es wurde die Koloniezahl (Abschnitt 4.4.1) bestimmt und die membranintakten und -geschädigten Bakterien mit der PMA-qPCR quantifiziert (Abschnitt 4.5.2).

4.13 Statistik

Zur Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein gepaarter Studentscher t-Test mit zweiseitiger Verteilung durchgeführt. Die Signifikanz wurde anhand des Signifikanzwertes p beurteilt ($p < 0,05$ signifikant, $p < 0,01$ sehr signifikant).

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der AgNPs

Bei den in dieser Arbeit verwendeten AgNPs handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Produkt (AgPURE W10, RAS Materials, Regensburg). Um das Verhalten der AgNPs in unterschiedlichen Medien zu untersuchen und mehr über deren Eigenschaften zu erfahren, wurde eine Charakterisierung der Partikel bezüglich ihrer Größe und deren Verteilung, ihres Zeta-potentials und ihrer Stabilität in unterschiedlichen Medien durchgeführt. Als Medien wurden partikelarmes entionisiertes Wasser (PFD), Simulierte Körperflüssigkeit (SBF) mit und ohne D-Glucose (50 mM), NB-, LB- und CASO-Medium eingesetzt.

5.1.1 UV/Vis-Spektroskopie

Als Maß für die Stabilität der AgNPs in unterschiedlichen Medien wurde die Oberflächen-Plasmonresonanz der AgNPs durch Messung von Absorptionsspektren bestimmt. Durch den Plasmonresonanzeffekt der AgNPs kann bestimmt werden, ob die Partikel sich in einem Medium durch die Freisetzung von Silberionen auflösen oder aggregieren/agglomerieren (Jensen et al., 2000). Die AgNPs zeigten einen für AgNPs charakteristischen Peak bei 412 nm. Flacht dieser Peak ab oder verschiebt sich, dann weist dies auf eine Veränderung der Partikel hin. Die Absorptionsspektren der AgNPs in PFD blieben über einen Zeitraum von 7 d sowohl bei 20 °C als auch bei 36 °C konstant (Abbildung 7 a, b). In SBF und SBF mit Glucose war innerhalb der ersten 6 h keine Abflachung der Peaks zu verzeichnen. Die Partikel blieben stabil. Nach 24 h war der Peak deutlich abgeflacht (Abbildung 7 c, d). Die Stabilität der AgNPs in allen getesteten Nährmedien zur Anzucht von Bakterien bei 36 °C lässt sich folgendermaßen einordnen: NB > LB > CASO (Abbildung 7 e-h). In LB-Medium war zusätzlich zu einer zeitabhängigen Änderung der Plasmonresonanz auch ein Effekt der Temperatur auf die Veränderung der AgNPs zu erkennen. Bei 36 °C erfolgte die Abnahme der Plasmonresonanz schneller als bei 20 °C (Abbildung 7 e, f).

5. Ergebnisse

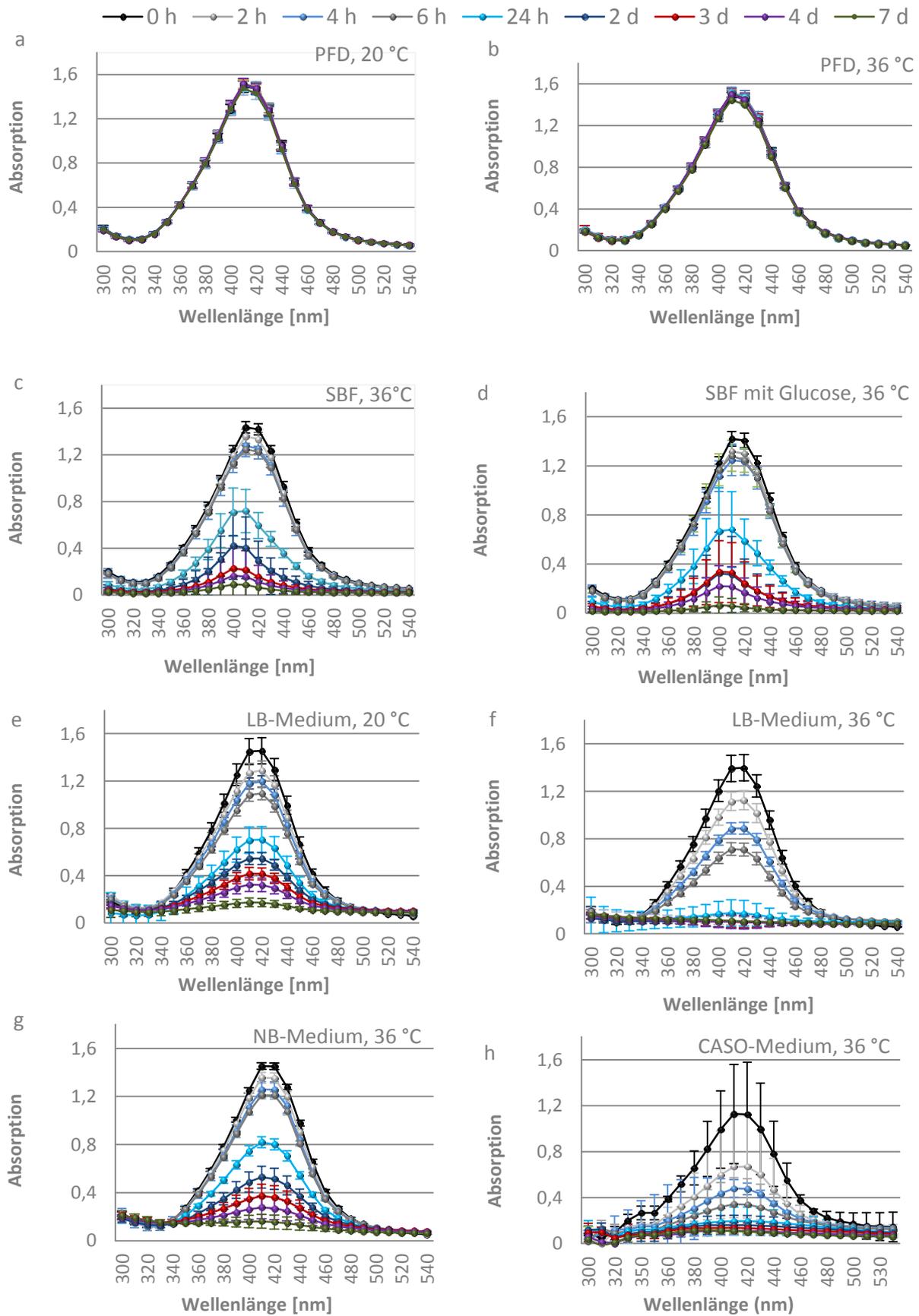


Abbildung 7: Plasmonresonanz der AgNPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) bei 300-540 nm in PFD bei 20 °C (a) und 36 °C (b), in SBF bei 36 °C (c), in SBF mit Glucose bei 36 °C (d) in LB-Medium bei 20 °C (e) und 36 °C (f), in NB-Medium bei 36 °C und CASO-Medium bei 36 °C, n=3.

Da sich NB-Medium in Abschnitt 5.2 als nicht besonders gut geeignetes Nährmedium herausstellte, um den Einfluss von Silber auf das Wachstum und die Biofilmbildung der Bakterienstämme *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* zu untersuchen und die AgNPs in CASO-Medium besonders instabil waren, wurde LB-Medium als Nährmedium für Bakterien ausgewählt. In den folgenden Abschnitten wird die Charakterisierung der AgNPs neben PFD (Expositionsmedium für Silber bei etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien) auch in LB-Medium (Expositionsmedium für Silber unter wachsenden Bedingung) durchgeführt.

5.1.2 Elektronenmikroskopie

Zur weiteren Charakterisierung der AgNPs wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die AgNPs visualisiert. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden einerseits zur Visualisierung, andererseits zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung erstellt.

Abbildung 8 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der AgNPs. Die AgNPs wurden vor der Durchführung der Aufnahmen mit Kohlenstoff besputtert. Die AgNPs wiesen eine relativ heterogene Partikelgrößenverteilung auf.

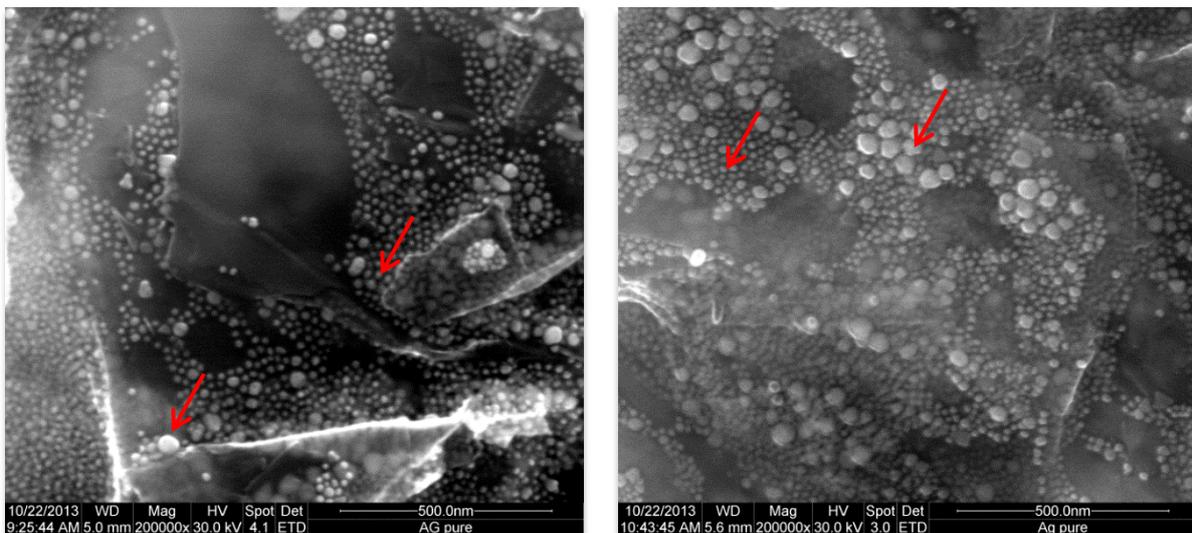


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der AgNPs bei 200000-facher Vergrößerung. Kohlenstoff-Sputtering (4 nm). Pfeile zeigen AgNPs (exemplarisch), n=1.

Um die Größe der AgNPs und deren Verteilung zu ermitteln, wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt (Abbildung 9). Hierzu wurde die AgNP-Dispersion in PFD verdünnt ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) und auf ein Kupfernetz aufgetragen. Die AgNPs wiesen, wie auch bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 8) zu erkennen, eine sphärische Geometrie mit allen drei Dimensionen im Nanomaßstab ($< 100 \text{ nm}$) auf. Auch

hier zeigte sich eine relativ heterogene Größenverteilung der Partikel. Die Partikel wiesen eine kristalline und facettierte Struktur auf. Bei einigen Partikeln war eine ikosaedrische Form zu erkennen.

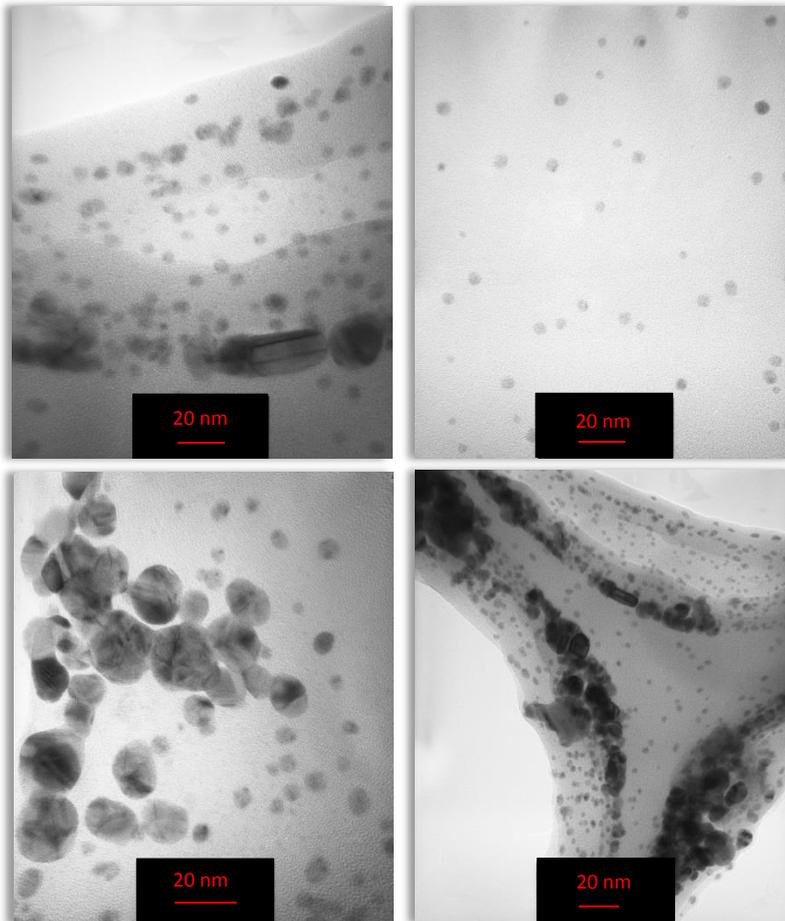


Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der AgNPs in PFD ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei unterschiedlichen Vergrößerungen, $n=1$.

Die Bestimmung der Größenverteilung der Nanopartikel wurde anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Der mittlere Durchmesser der Partikel betrug $6,73 \pm 4,8 \text{ nm}$ ($n=208$), der maximale Durchmesser $32,53 \text{ nm}$. Der Großteil der AgNPs ($81,7 \%$) waren kleiner als 10 nm (Abbildung 10).

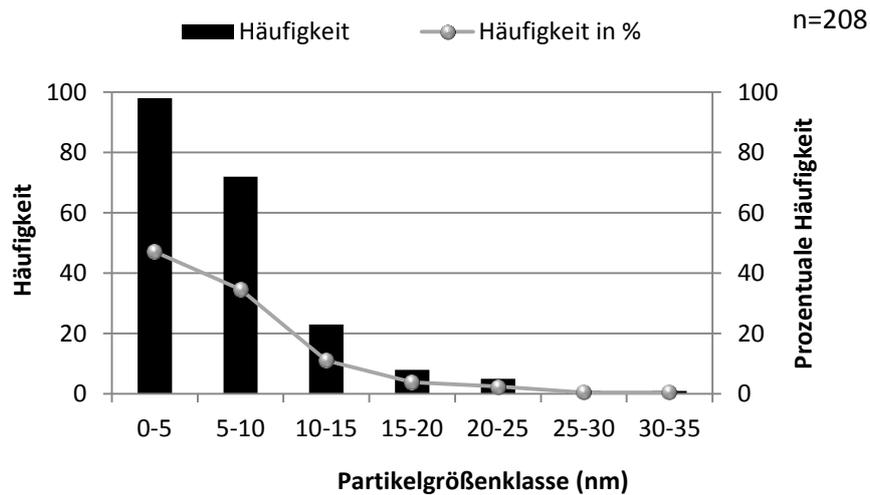


Abbildung 10: Größenverteilung der AgNPs, ermittelt aus den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, n=208.

Bei der Untersuchung der Plasmonresonanz (Abschnitt 5.1.1) war bereits zu erkennen, dass die Partikel sich in LB-Medium, im Vergleich zu den Partikeln in PFD, verändern. Um die Veränderungen der AgNPs bei Inkubation in LB-Medium (1 zu 10 in PFD) zu untersuchen, wurden diese im Medium für 24 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurden ebenfalls transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt (Abbildung 11). Das Medium wurde verdünnt, da unverdünntes LB-Medium die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen störte.

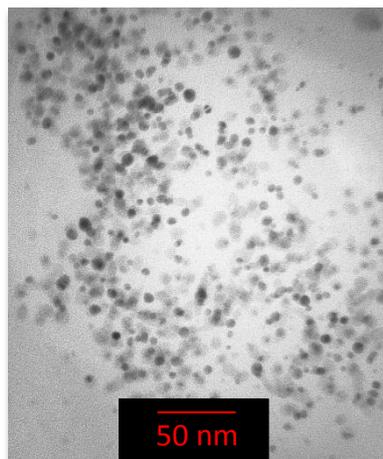


Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der AgNPs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) nach Inkubation in verdünntem LB-Medium (1 zu 10 in PFD) (24 h, 36 °C).

Die Bestimmung der Partikelgröße der in LB-Medium inkubierten AgNPs wurde ebenfalls anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Der mittlere Durchmesser der Partikel war kleiner als vor der Inkubation im LB-Medium und betrug $4,98 \pm 1,64$ nm, der maximale Durchmesser 9,72 nm. Alle Partikel (100 %) waren kleiner als 10 nm (Abbildung 12).

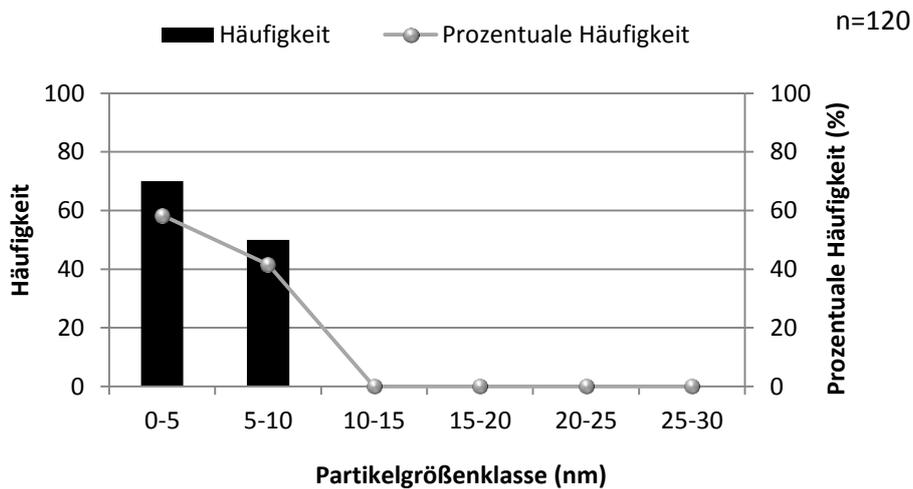


Abbildung 12: Größenverteilung der AgNPs, ermittelt aus den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, nach Inkubation in verdünntem LB-Medium (1 zu 10 in entionisiertem Wasser) (36 °C, 24 h), n=120.

Es war also eine Verringerung der Größe der Partikel in verdünntem LB-Medium, im Vergleich zu den ursprünglichen Partikeln, zu verzeichnen. Nach 24-stündiger Inkubation im Nährmedium waren keine Partikel mehr vorhanden, welche größer als 10 nm waren.

5.1.3 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Der hydrodynamische Durchmesser beschreibt den Durchmesser eines Partikels inklusive seiner Hydrat- oder Solvathülle (Jun et al., 2008). Zur weiteren Charakterisierung der AgNPs wurde der hydrodynamische Durchmesser der AgNPs mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

Die dynamische Lichtstreuung der AgNPs ergab ein Maximum der Anzahl der AgNPs zwischen 1-2 nm (Abbildung 13 a) und ein Maximum bei 50 nm bei einer Auftragung nach Streulichtintensität (Abbildung 13 b).

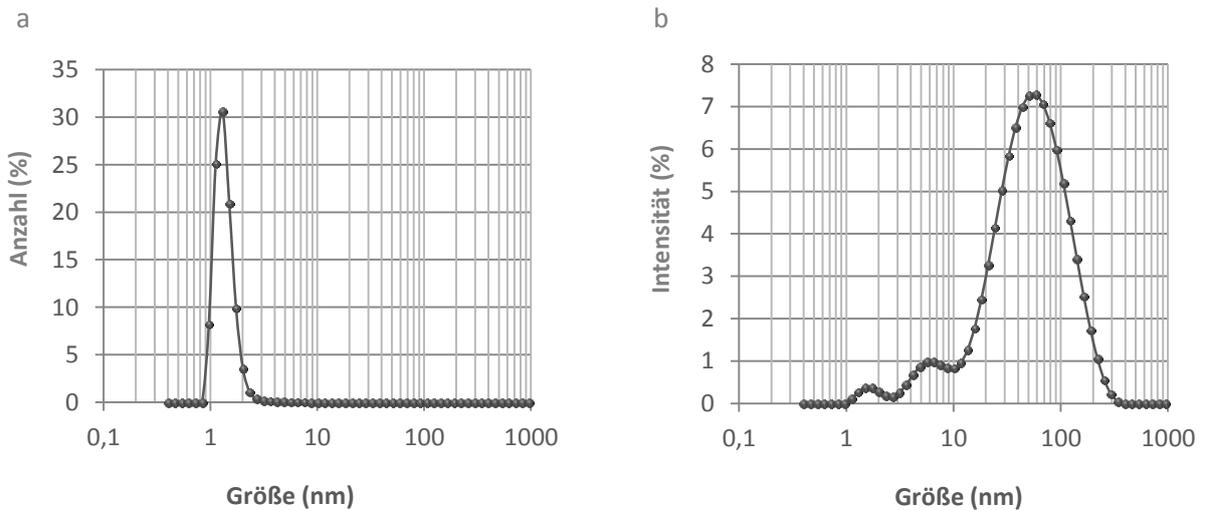


Abbildung 13: Mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der AgNPs in PFD ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), Auftragung nach Anzahl in % (a), Auftragung nach Streulichtintensität in % (b), $n=1$.

Der Z-Average Wert ist ein nach Intensität gewichtetes Mittel der hydrodynamischen Größe eines Ensembles von Partikeln, welches mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt wurde. Der PDI gibt Auskunft über die Homogenität bzw. Heterogenität der Größenverteilung. Der Z-Average Wert der AgNPs in PFD betrug $35,62 \text{ nm}$ und der PDI $0,472$.

Die Detektion der Plasmonresonanz und die Transmissionselektronenmikroskopie der AgNPs in LB-Medium zeigten eine deutliche Veränderung der Partikel innerhalb von 24 h. Um diesen Effekt (Auflösung oder Aggregation/Agglomeration) genauer zu untersuchen, wurden die AgNPs zusätzlich nach Inkubation in LB-Medium mit der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Das Peakmaximum der AgNPs in LB-Medium verschiebt sich bereits sofort nach Zugabe der AgNPs zum Medium (0 h) zu einem größeren hydrodynamischen Durchmesser als bei den AgNPs in PFD. Sowohl bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ als auch bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ist eine Aggregation/Agglomeration der Partikel nach 24 h zu erkennen. Das Peakmaximum liegt nach 24-stündiger Inkubation bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium bei 700 nm .

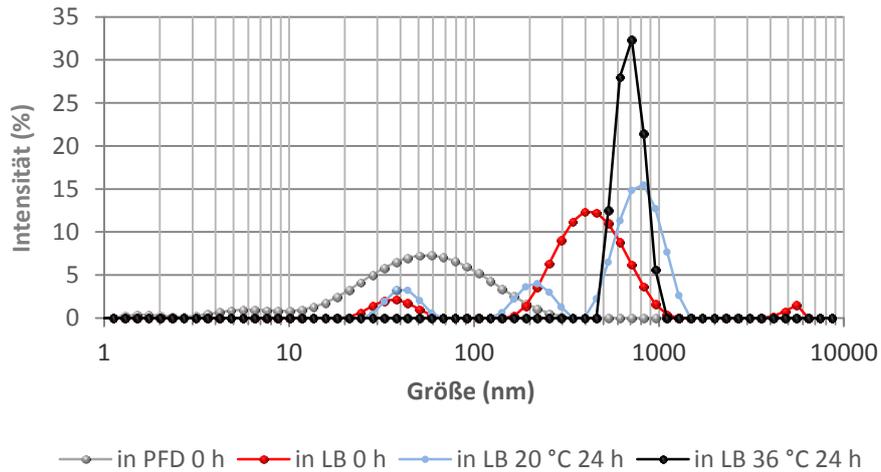


Abbildung 14: Dynamische Lichtstreuung der AgNPs nach Intensität (%), $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag in PFD (0 h), in LB-Medium (0 h, 24 h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $36 \text{ }^\circ\text{C}$). Auftragung nach Streulichtintensität, $n=1$.

Der Z-Average Wert und der PDI der AgNPs nahm ebenfalls temperaturabhängig und zeitabhängig zu (Tabelle 25).

Tabelle 25: Z-Average und Polydispersitätsindex (PDI) der AgNPs in Wasser nach 0 h, in LB-Medium nach 0 h, in LB-Medium nach 24-stündiger Inkubation bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$.

AgPURE ($20 \mu\text{g/mL}$)	Z-Average	PDI
in PFD (0 h)	35,62	0,47
in LB-Medium (0 h)	282	0,55
in LB-Medium (24 h, $20 \text{ }^\circ\text{C}$)	743,5	0,72
in LB-Medium (24 h, $36 \text{ }^\circ\text{C}$)	1632	0,94

Die AgNPs in PFD wiesen ein Zetapotential von etwa 0 auf (Abbildung 15).

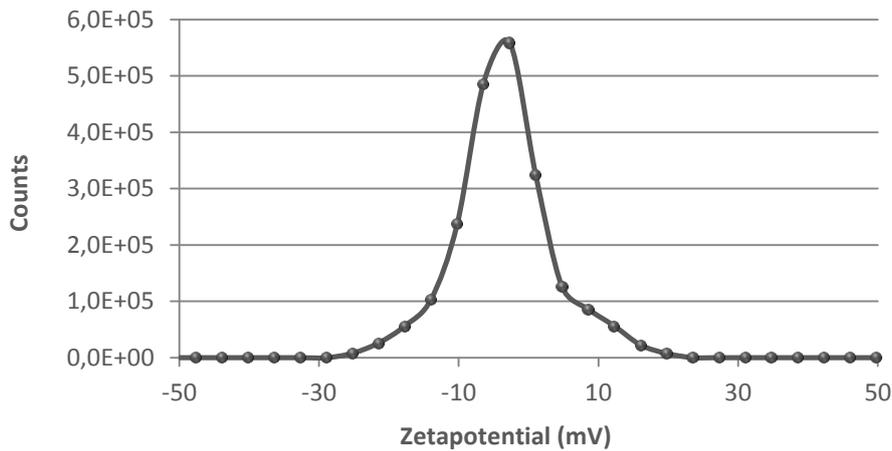


Abbildung 15: Ladungsverteilung (Zetapotential) der AgNPs in PFD, n=1.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die AgNPs eine relativ heterogene Größenverteilung aufwiesen. Sie waren in PFD bei 36 °C für 7 d stabil (UV-Vis Spektroskopie). Die Stabilität der AgNPs in Nährmedien war am besten in NB-, gefolgt von LB- und CASO-Medium. LB-Medium wurde für mikrobiologische Experimente (Einfluss von Silber auf das Wachstum und die Biofilmbildung, Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme) ausgewählt, da alle drei Teststämme darin gut wuchsen, Biofilme in Mikrotiterplatten bildeten und die Stabilität der AgNPs besser war als in CASO-Medium.

5.2 Charakterisierung der medizinisch relevanten Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismen (*P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984) wurden ausgewählt, da sie von hoher Relevanz im klinischen Bereich sind. Alle drei Vertreter sind opportunistische Krankheitserreger, welche nosokomiale Infektionen auslösen. Die Bakterienstämme wurden bezüglich ihres Wachstumsverhalten und der Biofilmbildung in Mikrotiterplatten in unterschiedlichen Nährmedien untersucht, um ein geeignetes Medium auszuwählen, welches für die Untersuchungen des Einflusses von Silber auf das Wachstum, die Biofilmbildung und die inaktivierende Wirkung gegenüber etablierten Biofilmen, geeignet ist. Zudem wurde untersucht, ob die Bakterien die Emulgatoren, welche die in dieser Arbeit verwendete AgNP-Dispersion (AgPURE W10) stabilisieren, durch Lipasen spalten können. Zuletzt wurde untersucht, ob Bakterien sensitiv oder resistent gegenüber Gentamicin sind, da einige in dieser Arbeit untersuchten Medizinprodukte Gentamicin enthalten.

5.2.1 Wuchsverhalten

Um das Wachstum der Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in unterschiedlichen Nährmedien (NB-, LB-, CASO-Medium) zu untersuchen, wurden Wachstumskurven dieser Bakterienstämme bei 36 °C über einen Zeitraum von 48 h aufgenommen, indem die Absorption bei 570 nm photometrisch detektiert wurde (Abbildung 16).

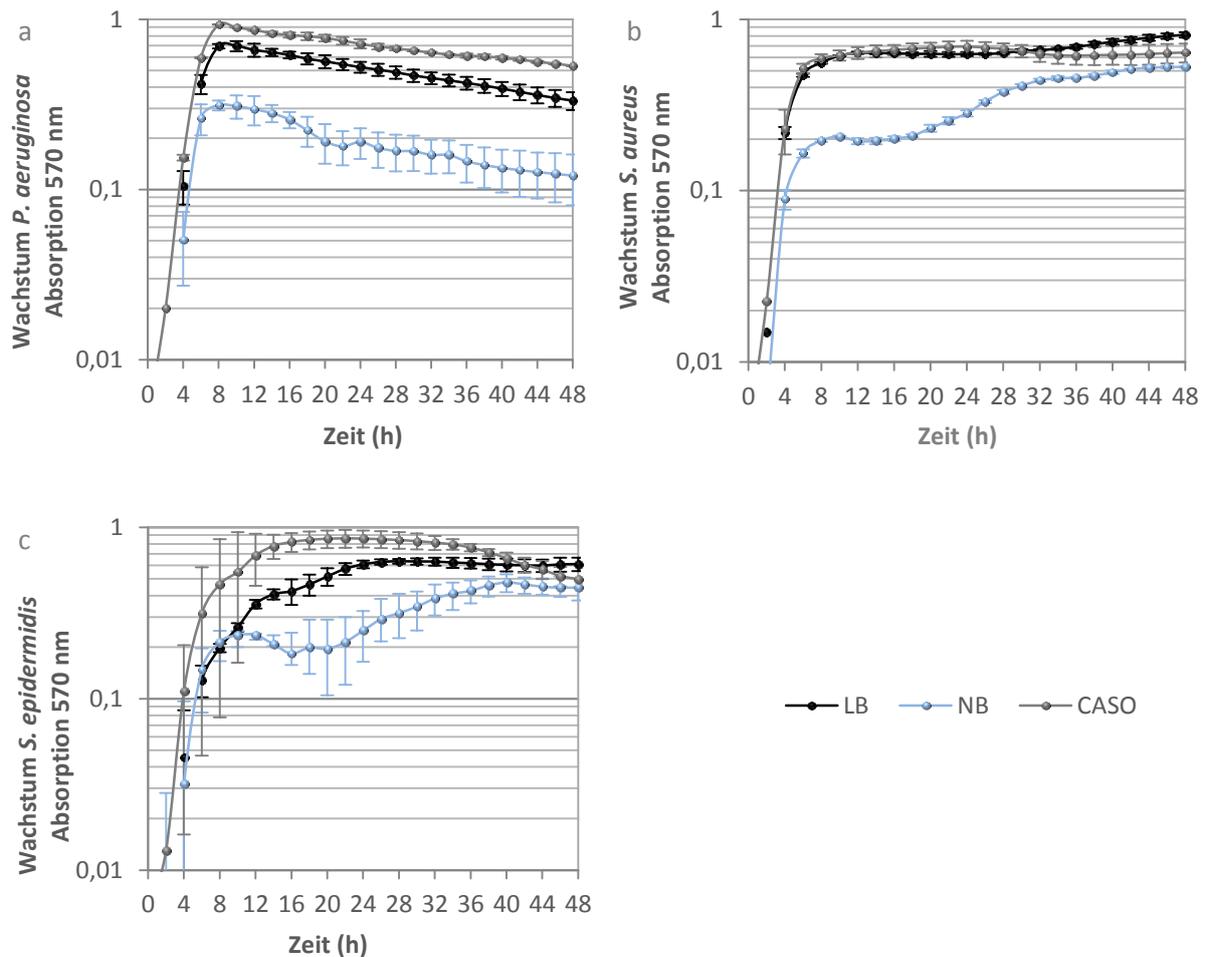


Abbildung 16: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* AdS (a), *S. aureus* ATCC 6538 (b) und *S. epidermidis* ATCC 35984 (c) in LB-, NB- und CASO-Medium in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (36 °C, 48 h), n=3.

P. aeruginosa wuchs von allen drei getesteten Bakterienstämmen in allen drei Medien am schnellsten (niedrigste Verdopplungszeit von 1,5 h), gefolgt von *S. aureus* (1,7-2,3 h) und *S. epidermidis* (4,2-9,2 h). *S. aureus* und *S. epidermidis* wuchsen in NB deutlich langsamer als in LB und CASO (Tabelle 26). Die höchsten maximalen Zelldichten wurden bei allen drei Bakterienstämmen in CASO-Medium erreicht und die niedrigsten in NB-Medium.

Tabelle 26: Wachstumsraten (μ), Verdopplungszeiten (t_d) und die maximale Zelldichte der Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-, NB- und CASO-Medium. n=3

Medium:	Wachstumsraten, μ			Verdopplungszeiten, t_d (h)			Maximale Zelldichte Absorption 570 nm (Zeit)		
	LB	NB	CASO	LB	NB	CASO	LB	NB	CASO
<i>P. aeruginosa</i>	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5	0,69 (10 h)	0,31 (8 h)	0,93 (8 h)
<i>S. aureus</i>	0,4	0,3	0,4	1,8	2,3	1,7	0,64 (14 h)	0,52 (48 h)	0,69 (24 h)
<i>S. epidermidis</i>	0,1	0,1	0,2	5,3	9,2	4,2	0,61 (32 h)	0,48 (40 h)	0,86 (22 h)

Die höchsten Wachstumsraten und maximalen Zelldichten wiesen die drei Bakterienstämme in CASO-, gefolgt von LB- und NB-Medium auf.

5.2.2 Biofilmbildung

Um die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in verschiedenen Nährmedien (LB-, NB-, CASO-Medium) zu untersuchen, wurden diese in Mikrotiterplatten im jeweiligen Nährmedium für 24 h bei 36 °C inkubiert. Das Wachstum (Zunahme der Zelldichte der Kultur in den Kavitäten) wurde gemessen, indem die Absorption bei 570 nm aufgenommen wurde.

Anschließend wurden die planktonischen Bakterien aus den Kavitäten der Mikrotiterplatte entfernt, die angehefteten Biofilme gewaschen und anschließend mit Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett, welches mit Essigsäure (30 % (v/v)) wieder abgelöst wurde, wurde photometrisch nachgewiesen und kann als Maß für die Biofilmbildung angesehen werden.

Die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* weist in LB-Medium keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede zwischen den drei Bakterienstämmen auf (Abbildung 17).

5. Ergebnisse

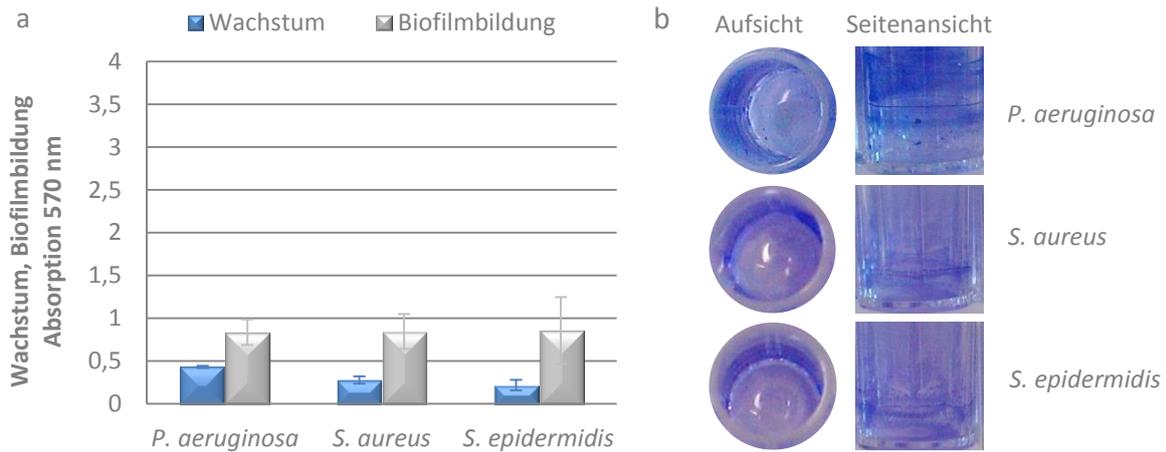


Abbildung 17: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im Mikrotiterplatten-Assay (24 h, 36 °C). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), n=3.

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* war in NB-Medium deutlich höher als die von *P. aeruginosa* und *S. aureus*, welche sich nicht signifikant ($p > 0,05$) voneinander unterscheiden (Abbildung 18).

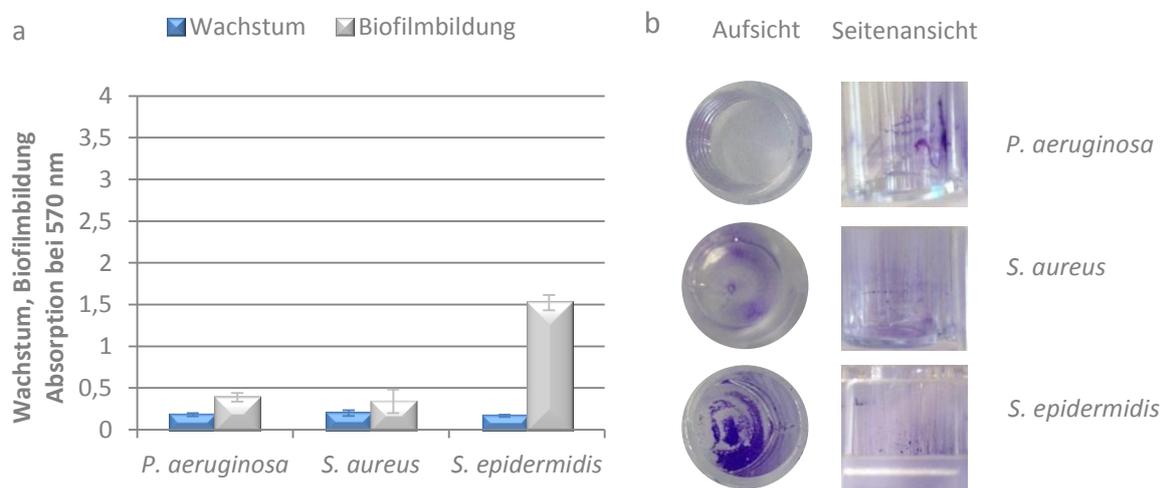


Abbildung 18: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in NB-Medium im Mikrotiterplattenverfahren (24 h, 36 °C). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), n=3.

Die Biofilmbildung aller Bakterienstämme in CASO-Medium unterschied sich jeweils signifikant ($p < 0,05$) voneinander (Abbildung 19). Die höchste Biofilmbildung in diesem Medium wies *S. epidermidis* auf, gefolgt von *P. aeruginosa* und *S. aureus*.

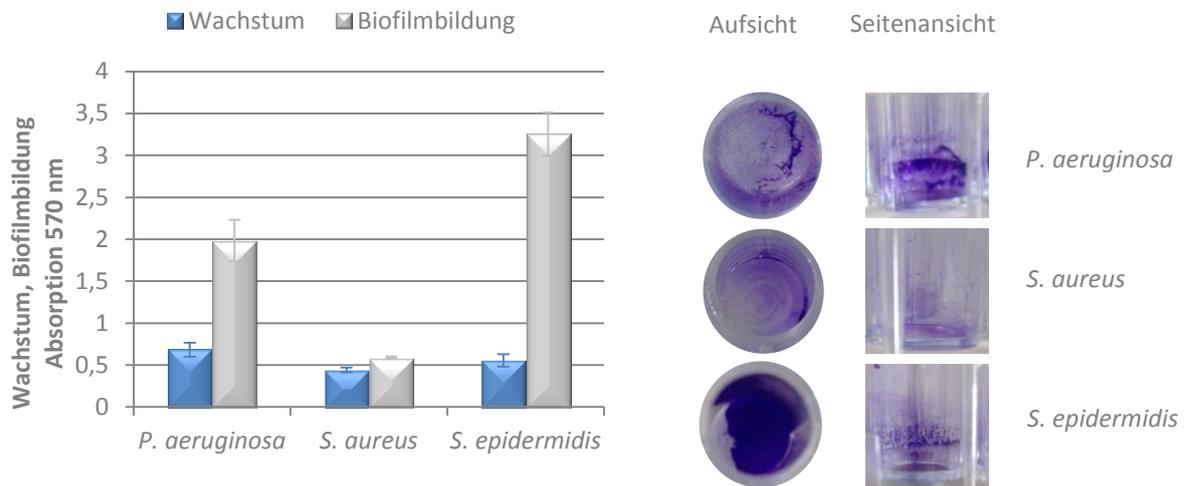


Abbildung 19: Wachstum und Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in CASO-Medium im Mikrotiterplatten-Assay (24 h, 36 °C). Wachstum: Absorption der Kultur bei 570 nm, Biofilmbildung: mit Kristallviolett gefärbte Biomasse des Biofilms. (a); Angeheftete, mit Kristallviolett gefärbte Biofilme in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (b), n=3.

Alle drei Bakterienstämme zeigten ein deutlich geringeres Wachstum in NB- als in LB- und CASO-Medium. In NB- und CASO-Medium war die Biofilmbildung von *S. aureus* sehr gering und die entstandene Biofilmmasse (Kristallviolett) bei den unterschiedlichen Bakterienstämmen sehr unterschiedlich. In LB-Medium bildeten nicht nur *S. aureus*, sondern auch die anderen beiden Teststämme ähnlich stark ausgeprägte Biofilme (bezogen auf die mit Kristallviolett angefärbte Biomasse). Aus diesen Gründen ist LB-Medium gut geeignet, um den Einfluss von Silber auf das Wachstum und die Biofilmbildung dieser Bakterienstämme vergleichend zu untersuchen.

5.2.3 Gentamicinresistenz

In einigen der in dieser Arbeit untersuchten Knochenzemente ist Gentamicin enthalten. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 eine Gentamicinresistenz aufweisen. Hierzu wurde eine Einordnung nach EUCAST mittels Hemmhofstest durchgeführt. Die Bakterien wurden auf MH-Agar ausgestrichen und die Blättchen, welche Gentamicin (10 µg) enthalten, auf die Agaroberfläche aufgelegt und bei 36 °C für 24 h inkubiert. Gentamicin diffundiert durch den Agar

und kann zu einer Hemmung des Wachstums gentamicinsensitiver Bakterien führen. Ein Maß für die Sensitivität des Bakteriums gegen Gentamicin ist somit der Durchmesser des entstandenen Hemmhofes. Ist der Durchmesser des Hemmhofes kleiner als der angegebene EUCAST-Breakpoint (spezifisch für unterschiedliche Bakteriengruppen) werden die Bakterien als resistent gegenüber Gentamicin eingestuft.

P. aeruginosa und *S. aureus* erwiesen sich als gentamicinsensitiv und *S. epidermidis* als gentamicinresistent (Tabelle 27).

Tabelle 27: Durchmesser der Hemmhöfe beim Hemmhofetest mit Gentamicin (10 µg pro Blättchen) der Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 35984 und der entsprechende Gentamicin-Breakpoint. ^{a)}EUCAST, 2013a, n=1.

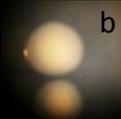
Bakterienstamm	Hemmhof \varnothing (mm)	EUCAST Breakpoint ^{a)} \varnothing (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	22,2	15
<i>S. aureus</i>	21,4	18
<i>S. epidermidis</i>	13,8	22

5.2.4 Lipaseaktivität

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete AgNP-Dispersion ist mit den zwei Emulgatoren Polyoxyethylen-glyceroltrioleat (Tagat TO) und Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) stabilisiert. Lipasen sind Enzyme, die Esterbindungen in Lipiden hydrolysieren und Fettsäuren freisetzen (Jaeger et al., 1994). Es wurde untersucht, ob die Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in der Lage sind, diese Emulgatoren als Komponenten der AgNP-Dispersion abzubauen und somit eventuell die Stabilisierung der AgNPs beeinflussen können. Ein qualitativer Lipase-Test (Howe & Ward, 1976) mit den entsprechenden Substanzen wurde durchgeführt. Hierzu wurden die Emulgatoren in LB-Agar eingebettet und die Bakterien auf den Medien ausgestrichen. Mikroskopisch wurde untersucht, ob sich um die Kolonien Ablagerungen bildeten. Bei diesen Ablagerungen handelte es sich um Fettsäurepräzipitate, welche entstehen, wenn die Bakterien die Emulgatoren durch Lipasen spalten. Da *E. coli* keine Lipaseaktivität aufweist, wurde dieses Bakterium als Negativkontrolle eingesetzt (Kouker und Jaeger, 1987). Bei *P. aeruginosa* PAO1 ist bekannt, dass das Bakterium in der Lage ist Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monoolleat (Tween 80) durch Lipasen zu spalten (Howe und Ward, 1976).

Bei allen Bakterienstämmen, ausgenommen der Negativkontrolle (*E. coli* ATCC 11775), war Präzipitatbildung im Agar zu verzeichnen (Tabelle 28). Als Positivkontrolle wurde *P. aeruginosa* PAO1 in Kombination mit Tween 80 als Lipasesubstrat verwendet.

Tabelle 28: Qualitativer Nachweis der Lipaseaktivität nach Howe und Ward (1976) auf LB-Agar, 36 °C, 48 h. +: Lipaseaktivität, -: keine Lipaseaktivität, Exemplarische Darstellung der Aufsicht auf die Kolonien mit einer Stereolupe (6,8-fache Vergrößerung): Positivkontrolle *P. aeruginosa* PAO1 (a) und Negativkontrolle *E. coli* ATCC 1177 (b).

Bakterienstamm	Tween 80	Tween 20	TAGAT-TO	Kontrolle ohne Emulgator	
<i>P. aeruginosa</i> AdS (Positivkontrolle)	+	+	+	-	 a
<i>E. coli</i> ATCC 1177 (Negativkontrolle)	-	-	-	-	
<i>P. aeruginosa</i> AdS	+	+	+	-	 b
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+	+	+	-	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	+	+	+	-	

5.3 Einfluss von Silber auf das Wachstum

5.3.1 Minimale Hemmkonzentration und minimale bakterizide Konzentration

Um bakteriostatische und bakterizide Effekte von AgNPs und Silbernitrat auf die Bakterienstämme *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 zu untersuchen, wurden die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt. Die MHK ist die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Stoffes ($\mu\text{g mL}^{-1}$), der unter definierten *in vitro* Bedingungen das Vorhandensein von sichtbarem Wachstum eines Mikroorganismus in einer definierten Zeitperiode verhindert (EUCAST, 2003). Die MBK ist die niedrigste Konzentration einer Substanz, die benötigt wird, um Bakterien abzutöten (EUCAST, 2000). Beide Parameter werden häufig (auch für Silber) in der Literatur angewendet (Chernousova & Epple, 2013), um die Sensitivität von Bakterien gegenüber einem antibakteriellen Stoff zu untersuchen. Die Ergebnisse der MHK und MBK sind stark abhängig von der Methode. Zwei Verfahren wurden zur Bestimmung der MHK durchgeführt.

Mikrotiterplattenverfahren

Beim ersten Verfahren zur Bestimmung der MHK und der MBK (Mikrotiterplattenverfahren) wurden die Bakterien (ca. 1×10^5 Zellen mL^{-1}) mit unterschiedlichen Silberkonzentrationen (0-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) und 0-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) in geometrischer Verdünnung) in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten in LB-Medium (100 μL) statisch bei 36 °C inkubiert. Nach 24 h wurde die Trübung der Ansätze in den Kavitäten visuell beurteilt. Aufgrund der

Färbung der AgNPs konnte keine photometrische Detektion der Trübung der Kavitäten durchgeführt werden. Die niedrigste Konzentration von Silber, bei der keine Trübung auftrat (Wachstumshemmung), wurde als MHK abgelesen. Zur Ermittlung der MBK wurden die Bakterien der nicht getrübbten Kavitäten auf LB-Agar ausplattiert. Die niedrigste Silberkonzentration, welche zu einer Abnahme von 99,9 % der Anzahl der kultivierbaren Bakterien führte, wurde als MBK angegeben.

Bezogen auf die theoretisch berechnete Silberkonzentration zeigte Silbernitrat einen größeren Effekt auf die Wachstumsinhibierung aller drei Bakterienstämme als die AgNPs (Abbildung 20). Die MHK von Silbernitrat ($5\text{-}10\ \mu\text{g mL}^{-1}\ \text{Ag}$) war deutlich geringer als die der AgNPs ($31,3\text{-}250\ \mu\text{g mL}^{-1}\ \text{Ag}$). *P. aeruginosa* ist empfindlicher gegenüber AgNPs und Silbernitrat als *S. aureus* und *S. epidermidis*.

Die MBK war bei allen drei Bakterienstämmen entweder gleich groß oder maximal 2-fach größer als die MHK (Tabelle 29).

Tabelle 29: Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Silber (AgNPs und AgNO_3) bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im statischen Mikrotiterplattenverfahren, 24 h, 36 °C, n=3.

Bakterienstamm	Ag (AgNPs) in $\mu\text{g mL}^{-1}$		Ag (AgNO_3) in $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>P. aeruginosa</i>	$31,3 \pm 0$	$62,5 \pm 0$	5 ± 0	5 ± 0
<i>S. aureus</i>	250 ± 0	250 ± 0	10 ± 0	20 ± 0
<i>S. epidermidis</i>	$52,1 \pm 18,0$	$125 \pm 108,3$	$13,0 \pm 4,5$	$44,3 \pm 31,6$

Reagenzglasverfahren

Beim zweiten Verfahren zur Bestimmung der MHK wurden die Bakterien (1×10^6 Zellen) mit unterschiedlichen Silberkonzentrationen in Reagenzgläsern mit LB-Medium und Silber (AgNPs sowie Silbernitrat) (2 mL) in einem Schüttelwasserbad (180 Upm) bei 36 °C inkubiert. Nach 24 h wurde die Trübung der Ansätze in den Reagenzgläsern visuell beurteilt. Die niedrigste Konzentration, bei der keine Trübung auftrat, wurde als MHK abgelesen.

Bezogen auf die theoretisch berechnete Silberkonzentration war die MHK ebenfalls bei allen drei getesteten Bakterienstämmen im Falle von Silbernitrat geringer als bei den AgNPs (Tabelle 30). In Anwesenheit von Silbernitrat waren die MHK-Werte größer als beim Mikrotiterplattenverfahren. Bei Exposition mit AgNPs ist der MHK Wert von *P. aeruginosa* etwa zweimal so hoch wie im Mikrotiterplattenverfahren. Bei den anderen beiden Bakterienstämmen (*S. aureus* und *S. epidermidis*) liegen die Werte unter denen, die im Mikrotiterplattenverfahren ermittelt wurden. Jedoch zeigte auch dieser MHK-Test, dass von den AgNPs

deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten als vom Silbernitrat, um eine Wachstumshemmung aller Bakterienstämme zu erreichen.

Tabelle 30: Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Silber (AgNPs und AgNO₃) bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 in LB-Medium im Schüttelwasserbad (180 Upm) in Reagenzgläsern (24 h, 36 °C), n=3.

Bakterienstamm	MHK Ag (AgNPs) in µg mL ⁻¹	MHK Ag (AgNO ₃) in µg mL ⁻¹
<i>P. aeruginosa</i>	75 ± 0	12,5 ± 0
<i>S. aureus</i>	100 ± 0	25 ± 0
<i>S. epidermidis</i>	75 ± 0	12,5 ± 0

5.3.2 Einfluss von Silber auf das Wuchsverhalten

Um den Einfluss von Silber auf das Wuchsverhalten von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der Bakterienstämme in An- und Abwesenheit von AgNPs und Silbernitrat in LB-Medium photometrisch (570 nm) in Mikrotiterplatten bei 36 °C über 24 h aufgenommen.

Ohne Silber erreicht *P. aeruginosa* AdS in LB-Medium die stationäre Wuchsphase nach etwa 8 h (Absorption: 0,68) (Abbildung 20 a).

In Anwesenheit von 10 µg mL⁻¹ Ag (AgNPs) war das Wachstum verzögert und die stationäre Wuchsphase wurde erst etwa nach 21 h erreicht (Abbildung 20 a). Bei 20 µg mL⁻¹ Ag wurde nach 24 h lediglich eine Absorption von 0,32 nachgewiesen (Kontrolle ohne Silber nach 24 h: 0,47). 50 µg mL⁻¹ Ag hemmten das Wachstum von *P. aeruginosa* vollständig.

In Anwesenheit von Silbernitrat hingegen führte schon eine Konzentration von 5 µg mL⁻¹ Ag zu einer Verzögerung des Wachstums (Abbildung 20 b). Die stationäre Wuchsphase war im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber um etwa 10 h verzögert. Eine vollständige Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* wurde durch 10 µg mL⁻¹ Ag erreicht.

Ohne Silber erreichte *S. aureus* die stationäre Wuchsphase nach 13 h (Abbildung 20 c).

Bei 20 µg mL⁻¹ Ag (AgNPs) war bis zum Erreichen der stationären Phase kein Einfluss auf das Wuchsverhalten zu erkennen (Abbildung 20 c). Nach 15 h nahm jedoch die Absorption im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber ab. 50 µg mL⁻¹ Ag führten zu einer deutlichen Wachstumshemmung. Nach 24 h war erst eine Absorption von 0,25 erreicht (Kontrolle ohne Silber: 0,47). Eine vollständige Wachstumshemmung von *S. aureus* wurde durch 100 µg mL⁻¹ Ag erreicht.

Silbernitrat hingegen führte bereits ab $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag zu einer deutlichen Verzögerung des Wachstums (Abbildung 20 d). Nach 24 h war trotz der Verzögerung die stationäre Wachstumsphase erreicht. $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten zu einer deutlichen und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag zu einer vollständigen Wachstumshemmung.

Ohne Silber erreichte *S. epidermidis* nach etwa 24 h die stationäre Wachstumsphase und wies eine Absorption von 0,4 auf (Abbildung 20 e).

Im Vergleich zu *P. aeruginosa* und *S. aureus* hatte 10 und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. epidermidis* (Abbildung 20 e). $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag verzögerten deutlich das Wachstum (Absorption 0,24 nach 24 h). Bei 150 und $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag war nach etwa 14 h eine verzögerte Latenzphase zu erkennen.

$7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) führten zu einer leicht abgeflachten Wachstumskurve von *S. epidermidis* (Abbildung 20 f). Nach 24 h war jedoch die gleiche Absorption wie bei der silberfreien Kontrolle erreicht. 10 und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten zu einer vollständigen Wachstumshemmung.

In Bezug auf die zugesetzte Silberkonzentration waren *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* empfindlicher gegenüber Silbernitrat als gegenüber AgNPs. *P. aeruginosa* ist empfindlicher gegen Silber als *S. aureus* und *S. epidermidis*.

Um den Einfluss der Anionen in Silbersalzen zu untersuchen, wurde zusätzlich zum Silbernitrat exemplarisch der Einfluss von Silbersulfat auf das Wachstum von *P. aeruginosa* untersucht. Es wurden keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Hemmkonzentration im Vergleich zu Silbernitrat festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit der unterschiedlichen Anionen hatte in diesem Fall keinen Einfluss.

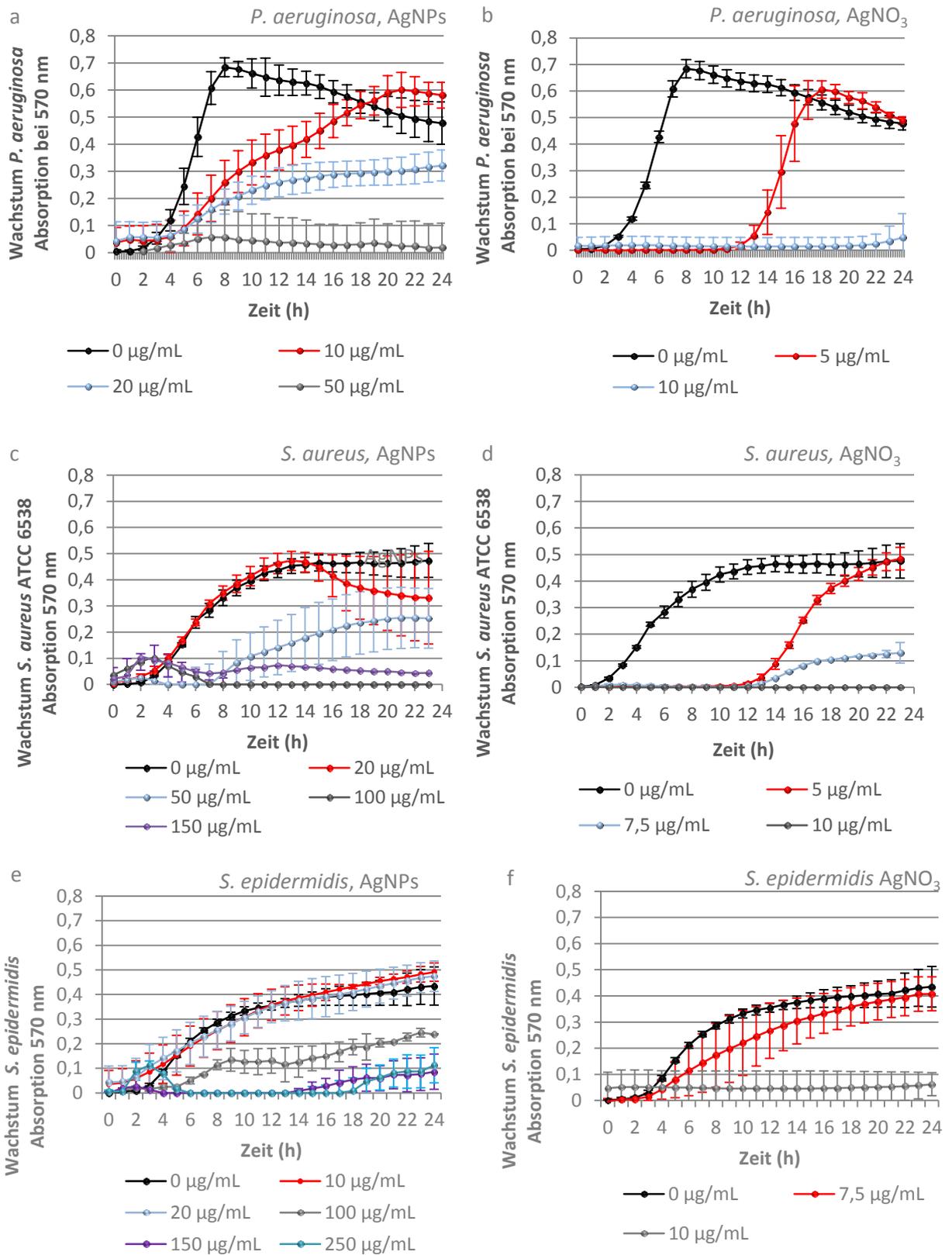


Abbildung 20: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* AdS (a, b), *S. aureus* ATCC 6538 (c, d), *S. epidermidis* ATCC 35984 (e, f) in LB-Medium (24 h, 36 °C) mit unterschiedlichen Konzentrationen von AgNPs (0-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (a, c, e) und AgNO_3 (0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (b, d, f).

5.4 Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung

Kristallviolett-Assay

Wie bereits in den vorherigen Experimenten ermittelt, besitzen sowohl AgNPs als auch Silbernitrat die Fähigkeit das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Um den Einfluss von AgNPs und Silbernitrat auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 zu untersuchen, wurde ein Mikrotiterplatten-Verfahren etabliert. Die Bakterienstämme wurden mit und ohne Silber in Mikrotiterplatten in LB-Medium statisch bei 36 °C inkubiert. Nach 24 h wurde das Wachstum (Zunahme der Zelldichte der Kultur in den Kavitäten) durch die Messung der Absorption der Kultur nachgewiesen. Anschließend wurden die planktonischen Bakterien aus den Kavitäten entfernt und die entstandenen, angehefteten Biofilme gewaschen, um nicht adhärierte Zellen zu entfernen. Die entstandene Biomasse der Biofilme in den Kavitäten wurde mit Kristallviolett angefärbt. Kristallviolett ist ein kationischer Farbstoff, welcher mit negativ geladenen Gruppen, wie Carboxylgruppen oder Phosphatgruppen, an Bakterienzellen und der EPS interagiert und Salze bildet. Kristallviolett, welches mit Essigsäure (30 % (v/v)) wieder abgelöst wurde, wurde photometrisch (570 nm) nachgewiesen und kann als Maß für die Biofilmbildung angesehen werden.

Sowohl AgNPs als auch Silbernitrat führten bei allen drei Bakterienstämmen neben einer Inhibierung des Wachstums auch zu einer Inhibierung der Biofilmbildung (Abbildung 21-23).

Subinhibitorische Konzentrationen von AgNPs (4 und 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) führten bei *P. aeruginosa* im Vergleich zur silberfreien Kontrolle zu einer signifikant ($p < 0,05$) vermehrten Biofilmbildung im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber, obwohl die Zelldichte der Kultur nicht zugenommen hat.

Eine Konzentration von 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten im Vergleich zur silberfreien Kontrolle zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* (Abbildung 21 a). Die geringe Abnahme der Biofilmbildung bei der gleichen Konzentration war nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). 31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums und der Biofilmbildung.

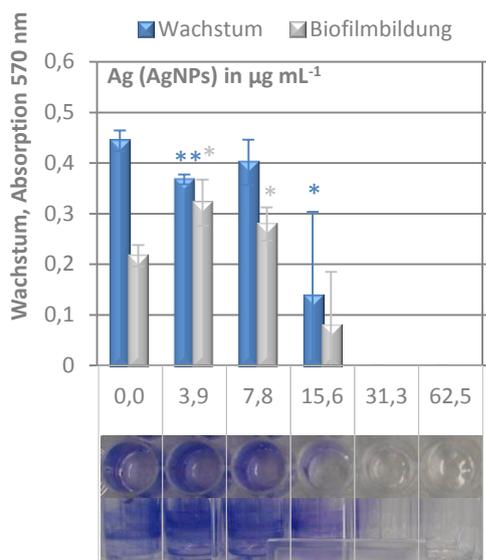
Auch bei der Exposition mit Silbernitrat führten subinhibitorische Konzentrationen zu einer signifikant ($p < 0,01$) vermehrten Biofilmbildung im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber, obwohl auch hier die Zelldichte nicht zunahm (Abbildung 21 b). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auf Silber zurückzuführen ist und um auszuschließen, dass das Nitrat aus dem verwendeten Silbernitrat als Nährstoff einen Einfluss auf die Biofilmbildung hatte, wurden äquivalente Nitratkonzentrationen (in Form von Natriumnitrat) in das Versuchssystem (ohne Silber) eingesetzt. Natriumnitrat führte zu keiner signifikanten Veränderung der Biofilmbildung (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wurde durch Silbernitrat bei 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag vollständig gehemmt.

Das Wachstum von *S. aureus* wurde im Vergleich zu *P. aeruginosa* erst bei höheren Silberkonzentrationen gehemmt.

AgNPs führten ab $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag zu einer Inhibierung der Biofilmbildung, obwohl die Zelldichte der Kultur nicht abnahm (Abbildung 22 a). Das Wachstum war erst ab einer Konzentration von $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag gehemmt. Die Absorption der Kultur und die Biofilmbildung von *S. aureus* war bei $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag aus Silbernitrat vollständig gehemmt (Abbildung 22 b).

$3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten zu einer signifikant stärkeren Biofilmbildung von *S. epidermidis* ($p < 0,01$) als in der Kontrolle ohne Silber. Silbernitrat führte, wie bei den anderen beiden Bakterienstämmen, ab $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums und der Biofilmbildung (Abbildung 23 b). Die AgNPs führten wie bei *S. aureus* auch bei *S. epidermidis* ab $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,01$) der Biofilmbildung, wobei eine vollständige Hemmung des Wachstums und der Biofilmbildung bei $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag erreicht wurde (Abbildung 23 a).

a *P. aeruginosa*



b *P. aeruginosa*

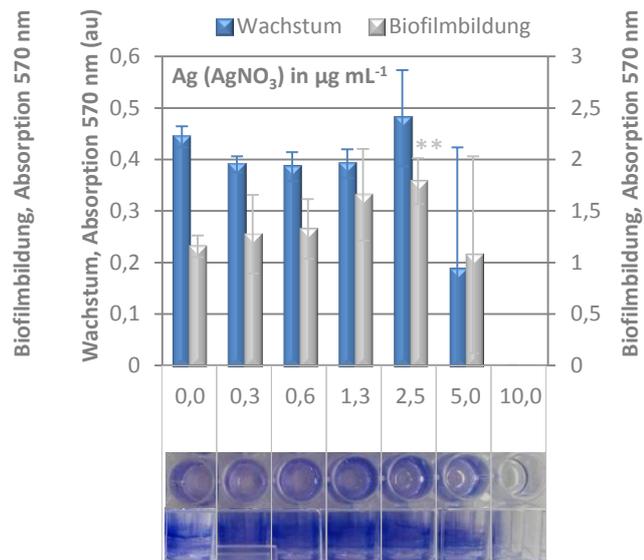
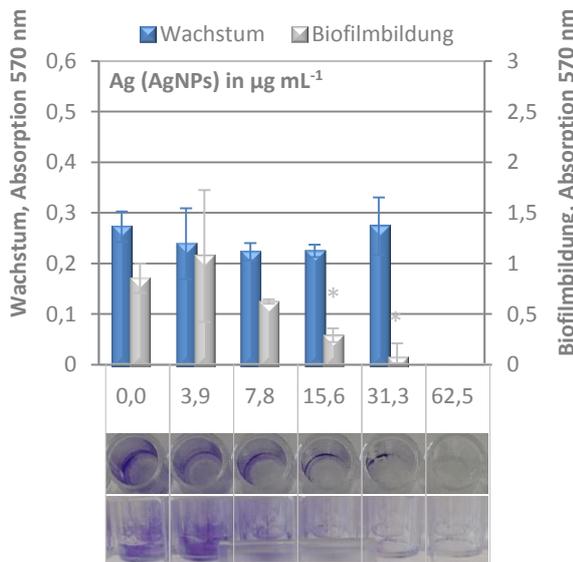


Abbildung 21: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 ° C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3.

5. Ergebnisse

a *S. aureus*



b *S. aureus*

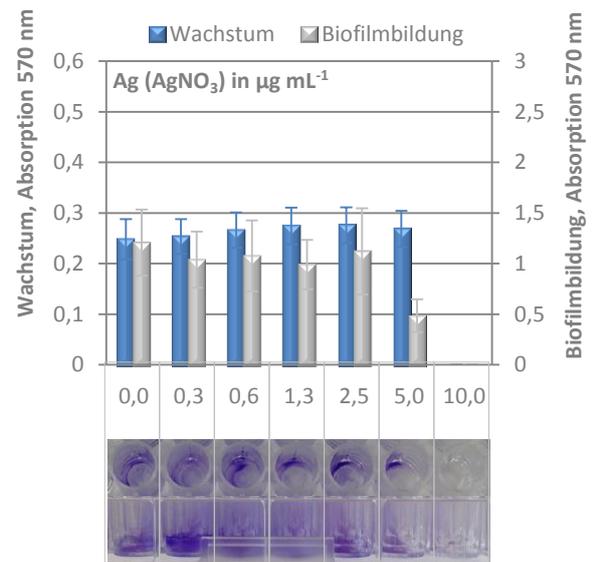
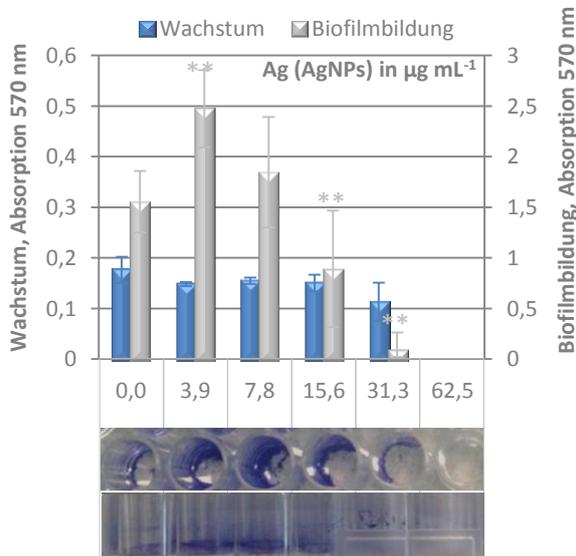


Abbildung 22: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) und die Biofilmbildung von *S. aureus* ATCC 6535, 24 h, 36 °C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3.

a *S. epidermidis*



b *S. epidermidis*

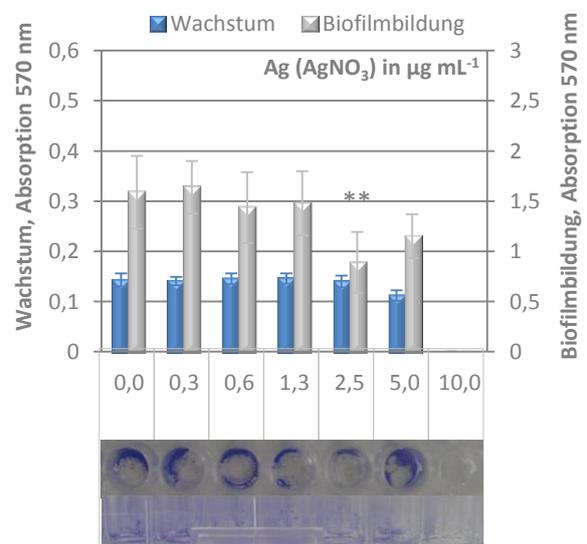


Abbildung 23: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf das Wachstum (Absorption der Kultur bei 570 nm) und die Biofilmbildung (Absorption Kristallviolett bei 570 nm) von *S. epidermidis* ATCC 35984, 24 h, 36 °C. Aufsicht und Seitenansicht der mit Kristallviolett gefärbten Biofilme in den Kavitäten, n=3.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl AgNPs als auch Silbernitrat das Potential aufwiesen, das Wachstum und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 zu inhibieren. Bezogen auf die theoretisch eingesetzte Silberkonzentration, zeigte Silbernitrat bei geringeren Konzentrationen einen inhibierenden Effekt auf alle drei Bakterienstämme als die AgNPs. Bei *P. aeruginosa* führten niedrige Konzentrationen von Silbernitrat und AgNPs und bei *S. epidermidis* niedrige Konzentrationen von Silbernitrat zu einer erhöhten Biofilmbildung, wobei die Zelldichte nicht beeinflusst wurde.

Kultivierbarkeit und Gesamtzellzahl

Um den Einfluss von AgNPs und Silbernitrat auf das Wachstum und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 detaillierter zu untersuchen, wurden diese Bakterienstämme wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, in An- und Abwesenheit von AgNPs und Silbernitrat in LB-Medium in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten bei 36 °C statisch inkubiert. Nach 24 h wurden die planktonischen Bakterien von den Biofilmen separiert. Die Biofilme wurden gewaschen, um nicht adhärierte Bakterien zu entfernen, und von den Wänden der Mikrotiterplatte abgeschabt. Von beiden Fraktionen (planktonische Bakterien und Biofilme) wurden jeweils die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl bestimmt. In diesem Experiment wurde also einerseits der Einfluss von Silber auf die Wachstumshemmung und andererseits auf die Kultivierbarkeit sowie die Gesamtzellzahl der gehemmten Bakterien im Inokulum untersucht. Die Ergebnisse sind als Änderung der Gesamtzellzahl bzw. der Kultivierbarkeit von Bakterien, welche mit Silber exponiert wurden (N_{Ag}), im Vergleich zur Gesamtzellzahl oder Kultivierbarkeit von Bakterien, welche nicht mit Silber exponiert wurden (N_0), in logarithmischer Form ($\log N_{Ag}/N_0$) dargestellt.

Die Ausgangszellzahl von *P. aeruginosa* (Inokulum) in den Kavitäten betrug jeweils ca. 1×10^6 Zellen pro Kavität. In der Kontrolle ohne Silber waren nach 24-stündiger Inkubation 2×10^9 planktonische Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl) vorhanden. Die Konzentration der kultivierbaren Bakterien betrug etwa 1×10^8 KBE pro Kavität. Die Gesamtzellzahl der nicht mit Silber exponierten Biofilme lag bei 7×10^7 Zellen und der Anteil der kultivierbaren Bakterien bei 2×10^7 KBE pro Kavität. Die Differenz zwischen Kultivierbarkeit und Gesamtzellzahl betrug also bei den planktonischen Bakterien eine log-Stufe und bei den Biofilmen etwa 0,5 log-Stufen.

Ab einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) wurde das Wachstum der planktonischen Bakterien und der Biofilme deutlich gehemmt (Abbildung 24 a). Es wurde eine geringere Gesamtzellzahl in der planktonischen Fraktion ($2,4 \times 10^7$ Zellen pro Kavität) und bei den Biofilmen ($2,3 \times 10^6$ Zellen pro Kavität) nachgewiesen als in den Kontrollen ohne Silber. Der Anteil der kultivierbaren Bakterien lag bei den planktonischen Bakterien bei $1,3 \times 10^5$ Zellen pro Kavität (Differenz zur Gesamtzellzahl: 2 log-Stufen) und bei den Biofilmen bei $1,8 \times 10^5$ Zellen pro Kavität (Differenz zur Gesamtzellzahl: eine log-Stufe). Bei der doppelten AgNP-

Konzentration ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) lag die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien und der Biofilme in einem ähnlichen Bereich wie bei $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag. Die planktonischen Bakterien waren bei dieser Konzentration mit dem angewendeten Kulturverfahren nicht mehr nachweisbar (Differenz zur Gesamtzellzahl: 7 log-Stufen), wobei die Anzahl der kultivierbaren Bakterien der Biofilme nicht deutlich geringer war als bei $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag.

Silbernitrat ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) führte zu keiner Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* (Abbildung 24 b). Bei den planktonischen Bakterien hat die Kultivierbarkeit im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber um etwa 0,5 log-Stufen abgenommen. Die Kultivierbarkeit der Biofilme blieb unverändert. Ab $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag wurde das Wachstum deutlich gehemmt. Die planktonischen Bakterien wiesen eine um eine und die Biofilme um 0,5 log-Stufen geringere Gesamtzellzahl auf als die Bakterien der Kontrolle. Die Differenz zwischen Gesamtzellzahl und planktonischen Bakterien betrug bei den planktonischen Bakterien 1,5 und bei den Biofilmen eine log-Stufe. Die Wachstumshemmung war bei $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ noch deutlicher ausgeprägt. Die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien war 3 log-Stufen und die der Biofilme eine log-Stufe geringer als die der Kontrolle ohne Silber. Die Differenz der Kultivierbarkeit zur Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien ist auf zwei log-Stufen gestiegen und die der Biofilme lag bei dieser Konzentration bei einer log-Stufe.

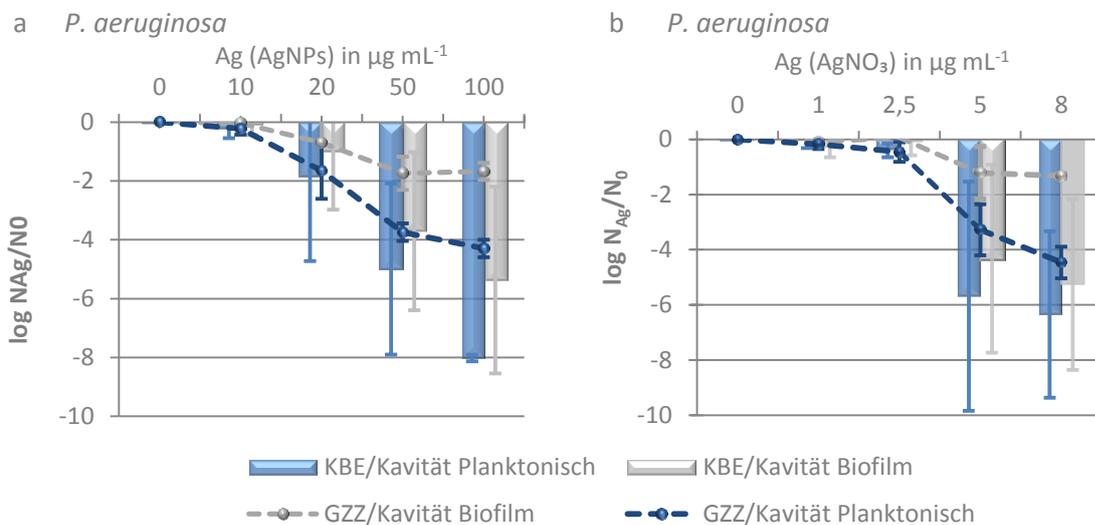


Abbildung 24: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS im Mikrotiterplatten-Verfahren in LB-Medium (24 h, 36 °C). N_{Ag} : Koloniebildende Einheiten (KBE) oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs oder AgNO₃. N_0 : Koloniebildende Einheiten (KBE) oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNPs oder AgNO₃. Planktonische Bakterien N_0 : 1×10^8 KBE pro Kavitat und 2×10^9 Zellen pro Kavitat, Biofilm N_0 : 2×10^7 KBE pro Kavitat und 7×10^7 Zellen pro Kavitat, n=3.

Die Koloniezahl der planktonischen Bakterien von *S. aureus* in der Kontrolle, welche ohne Silber inkubiert wurde, betrug nach 24 h durchschnittlich 1×10^8 KBE pro Kavität und die Gesamtzellzahl 6×10^8 Zellen pro Kavität (Differenz: 0,5 log-Stufen) (Abbildung 25 a). Von den Biofilmzellen waren 3×10^7 kultivierbare Bakterien pro Kavität vorhanden und die Gesamtzellzahl lag bei 5×10^8 Zellen pro Kavität (Differenz: eine log-Stufe).

$100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) hemmten das Wachstum von *S. aureus*. Die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien und der Biofilme sind jeweils etwa 2 log-Stufen geringer als bei der silberfreien Kontrolle. Die Diskrepanz zwischen der Gesamtzellzahl und der Koloniezahl lag bei den planktonischen Bakterien bei 4 und bei den Biofilmen bei 2 log-Stufen. Ab einer Konzentration von $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag betrug die Differenz, durch eine nahezu vollständige Abnahme der kultivierbaren planktonischen Bakterien, 6 log-Stufen.

$5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) führen zu keiner Wachstumshemmung der planktonischen Bakterien und der Biofilme (Abbildung 25 b). Die Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien nahm jedoch um etwa 0,5 log-Stufen ab. $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag führten zu einer vollständigen Wachstumshemmung der planktonischen Bakterien und Biofilme (Abnahme der Gesamtzellzahl um jeweils 2 log-Stufen). Die Differenz zwischen Gesamtzellzahl und Kultivierbarkeit stieg bei den planktonischen Bakterien auf 4 und bei den Biofilmen auf 3 log-Stufen an. Mit steigender Silberkonzentration (20 und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) nahm die Konzentration der kultivierbaren planktonischen Bakterien weiter ab (Differenz zur Gesamtzellzahl: 5 log-Stufen). Die Kultivierbarkeit der Biofilme hingegen nahm nicht weiter ab.

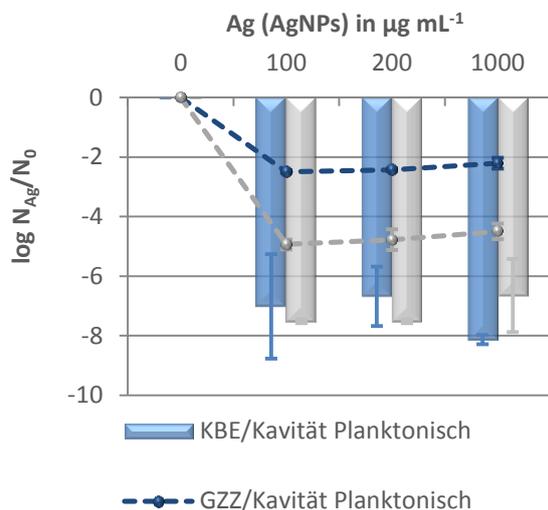
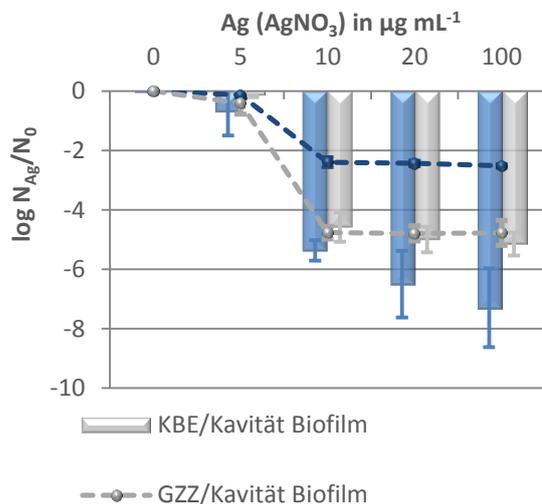
a *S. aureus*b *S. aureus*

Abbildung 25: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO_3 (b) auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl von planktonischen Bakterien und Biofilmen von *S. aureus* ATCC 6538 im Mikrotiterplatten-Verfahren in LB-Medium (24 h, 36°C). N_{Ag} : Koloniebildende Einheiten (KBE) oder Gesamtzellzahl (GZZ) planktonischer Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs oder AgNO_3 , N_0 : Koloniebildende Einheiten (KBE) oder Gesamtzellzahl (GZZ) planktonischer Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNPs oder AgNO_3 . Planktonische Bakterien N_0 : 1×10^8 KBE pro Kavität und 6×10^8 Zellen pro Kavität, Biofilm N_0 : 3×10^7 KBE pro Kavität und 5×10^8 Zellen pro Kavität, $n=3$.

Mit steigender Silberkonzentration wurde das Wachstum von *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 zunehmend gehemmt. Die Differenz zwischen Gesamtzellzahl und Kultivierbarkeit nahm mit zunehmender Silberkonzentration zu. Die Differenz zwischen der Kultivierbarkeit und der Gesamtzellzahl ist bei den planktonischen Bakterien größer als bei den Biofilmen. *P. aeruginosa* und *S. aureus* waren beide empfindlicher gegen Silbernitrat als gegen AgNPs. Bezogen auf die theoretisch berechnete Silberkonzentration, wurde eine zehnfach höhere Konzentration an AgNPs benötigt, um die gleichen Wirkung wie bei Silbernitrat zu erreichen.

5.5 Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme und planktonische Bakterien

Neben der Wachstumshemmung und der Inhibierung von Biofilmen durch AgNPs und Silbernitrat, wurde untersucht, ob Silber das Potential besitzt, bereits etablierte Biofilme zu inaktivieren. Hierzu wurden *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 in Mikrotiterplatten in LB-Medium bei 36 °C angezüchtet. Nach 24 h wurden die planktonischen Bakterien aus den Kavitäten entfernt. Beide Fraktionen (planktonische Bakterien und Biofilmzellen) wurden mit PFD gewaschen, um Medienbestandteile und nicht adhärenzte Bakterien bei den Biofilmen zu entfernen. Anschließend wurden die planktonischen Bakterien und Biofilme getrennt mit AgNPs und Silbernitrat exponiert. Parallel fand eine Exposition von suspendierten Biofilmen mit Silber statt. Planktonische Bakterien, angeheftete und suspendierte Biofilme wurden bei 36 °C für 24 h inkubiert. Zwei Versuchsreihen wurden durchgeführt. Um Interaktionen von Nährmedienbestandteilen und Silber auszuschließen, wurden die Silberlösungen in PFD zugegeben. Um körperähnliche Bedingungen zu simulieren, wurde *P. aeruginosa* AdS exemplarisch mit den AgNPs in SBF exponiert.

Exposition von *P. aeruginosa* mit Silber in PFD

Die Inkubation von *P. aeruginosa* AdS mit PFD bei 36 °C für 24 h hatte keinen Einfluss auf die Kultivierbarkeit der Bakterien. Die Exposition von *P. aeruginosa* (etablierte Biofilme und Bakterien in der stationären Wuchsphase) mit AgNPs und Silbernitrat führten jeweils zu einer Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien (Abbildung 26). Auch bei den suspendierten Biofilmen führten AgNPs und Silbernitrat zu einer Abnahme der Koloniezahl (Abbildung 27).

Die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien und Biofilme blieb bei allen getesteten Silberkonzentrationen der AgNPs (0-1000 µg mL⁻¹) konstant (Abbildung 26 a). Die Bakterien wurden nicht lysiert. 200 µg mL⁻¹ Ag führten zu einer Abnahme der Anzahl der kultivierbaren planktonischen Bakterien (2 log-Stufen) und der Biofilme (1,5 log-Stufen). 500-1000 µg mL⁻¹ Ag führten zu einer vollständigen Abnahme der kultivierbaren planktonischen Bakterien (7

log-Stufen), wobei die Konzentration der kultivierbaren Bakterien der Biofilme nur um 2,5 log-Stufen abnahm.

Auch bei allen getesteten Silberkonzentrationen aus Silbernitrat (0-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) waren keinerlei Änderungen der Gesamtzellzahl zu verzeichnen (Abbildung 26 b). Eine Abnahme der kultivierbaren planktonischen Bakterien um 6 log-Stufen zu erreichen, wurde eine 20-fach niedrigere Silberkonzentration (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) im Vergleich zu Silber in seiner nanopartikulären Form benötigt. Bei der höchsten getesteten Konzentration (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) war bei den Biofilmen lediglich eine Abnahme von 3 log-Stufen zu verzeichnen.

Die planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* waren also deutlich empfindlicher gegenüber Silber als die etablierten Biofilme.

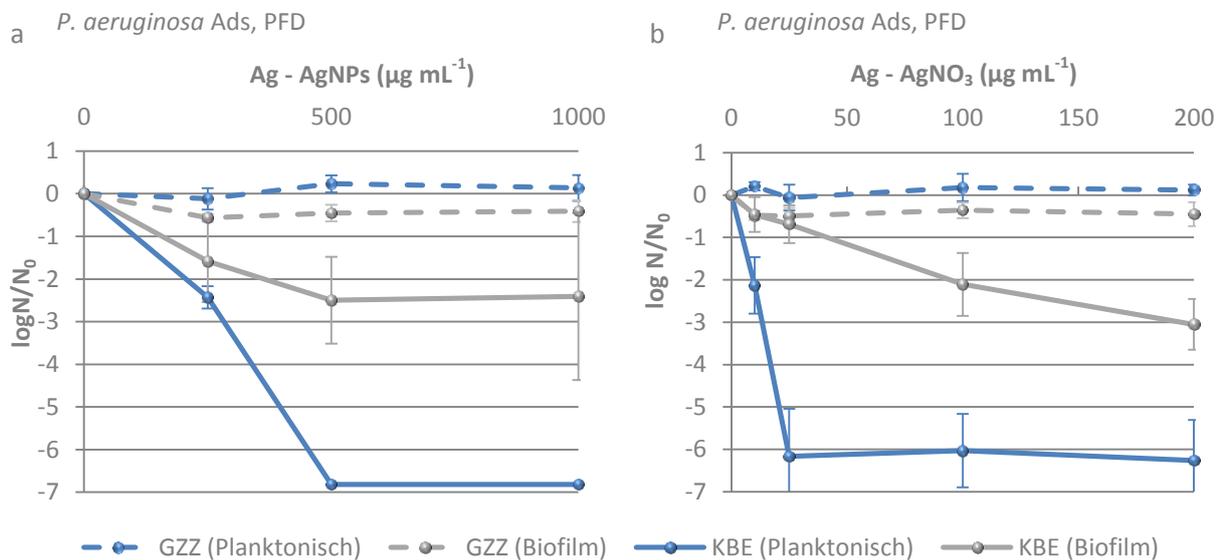


Abbildung 26: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS in PFD (24 h, 36 °C). N_{Ag} : KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs oder AgNO₃, N_0 : KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNPs oder AgNO₃. Planktonische Bakterien N_0 : $6,6 \times 10^6$ KBE pro Kavität und $3,7 \times 10^8$ Zellen pro Kavität, Biofilm N_0 : $5,3 \times 10^6$ KBE pro Kavität und $1,5 \times 10^8$ Zellen pro Kavität, n=3-7.

Wurden suspendierte Biofilmzellen mit AgNPs und Silbernitrat exponiert, dann waren diese deutlich empfindlicher gegenüber Silber als angeheftete Biofilme (Abbildung 27). Zudem sind suspendierte Biofilme empfindlicher gegenüber AgNPs als planktonische Bakterien. AgNPs (Abbildung 27 a) führten ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag und Silbernitrat (Abbildung 27 b) ab 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag zu einer deutlichen Abnahme der Kultivierbarkeit der suspendierten Biofilme (5 log-Stufen). Wie bei den nicht angehefteten Biofilmen und den plank-

tonischen Bakterien, führte keine der eingesetzten Silberkonzentrationen zu einer Veränderung der Gesamtzellzahl.

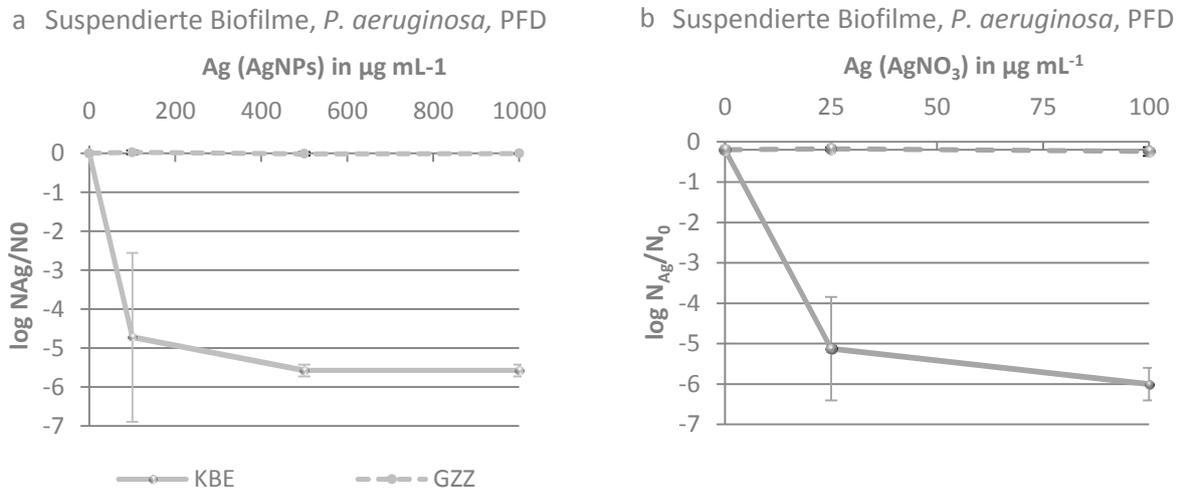


Abbildung 27: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO_3 (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von suspendierten, etablierten Biofilmen von *P. aeruginosa* AdS in PFD (24 h, 36 °C). N_{Ag} : KBE oder Gesamtzellzahl der suspendierten Biofilme in Anwesenheit von AgNPs oder AgNO_3 , N_0 : KBE oder Gesamtzellzahl der suspendierten Biofilme in Abwesenheit von AgNPs oder AgNO_3 . Suspendiertere Biofilm N_0 : $1,2 \times 10^6$ KBE pro Kavität und $3,9 \times 10^7$ Zellen pro Kavität, n=2-6.

Die Differenz zwischen Gesamtzellzahl und der Anzahl kultivierbarer Bakterien nahm mit steigender Silberkonzentration zu. Biofilme von *P. aeruginosa* waren deutlich weniger empfindlich gegenüber Silber (AgNPs und Silbernitrat) als planktonische Bakterien. Suspendierte Biofilme von *P. aeruginosa* waren hingegen deutlich empfindlicher gegenüber Silber (AgNPs und Silbernitrat) als angeheftete Biofilme. Die Biofilmzellen schienen also im Biofilm geschützt zu sein.

Bezogen auf die theoretisch berechnete Silberkonzentration, zeigte Silbernitrat eine deutlich höhere inaktivierende Wirksamkeit (Abnahme der Kultivierbarkeit) als die AgNPs.

Exposition von *P. aeruginosa* mit Silber in SBF

Um die Wirkung von AgNPs unter körperähnlichen Bedingungen zu testen, wurde neben PFD auch Simulierte Körperflüssigkeit (SBF) als Expositionsmedium eingesetzt. SBF ist eine Lösung, deren Osmolarität in etwa der von menschlichem Plasma entspricht (Tanahashi & Matsuda, 1997). SBF enthält jedoch keine Proteine. Simulierte Körperflüssigkeit enthält eine Vielzahl von Ionen, welche mit Silber interagieren können (Abschnitt 3.11). Vor der Exposition von *P. aeruginosa* AdS mit AgNPs und Silbernitrat in SBF wurde untersucht, ob sich

P. aeruginosa AdS in SBF (wie auch in PFD) nicht vermehrt, aber auch seine Kultivierbarkeit nicht verliert. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mL^{-1} in 20 mL SBF inkubiert. Die Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* blieb innerhalb von 5 d in SBF konstant (Abbildung 28 a). Es war weder Wachstum noch eine deutliche Abnahme der Anzahl der kultivierbaren Bakterien zu beobachten.

Wie bei der Exposition von *P. aeruginosa* mit AgNPs in PFD, blieb auch bei der Exposition mit AgNPs ($500\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) in SBF die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien und den angehefteten Biofilmen konstant. Die Inkubation mit $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ führte zu einer Abnahme der kultivierbaren Bakterien von 5 und mit $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu einer Abnahme von 6 log-Stufen (Abbildung 28 b).

Die Abnahme der Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* durch AgNPs ist in SBF etwas geringer als in PFD.

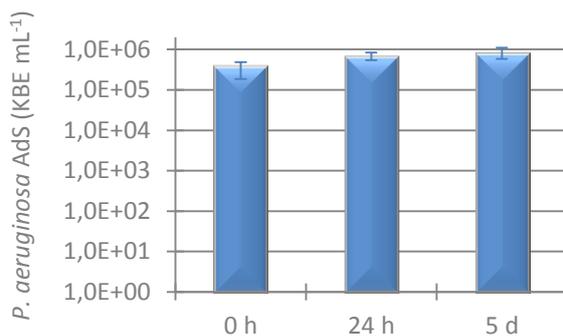
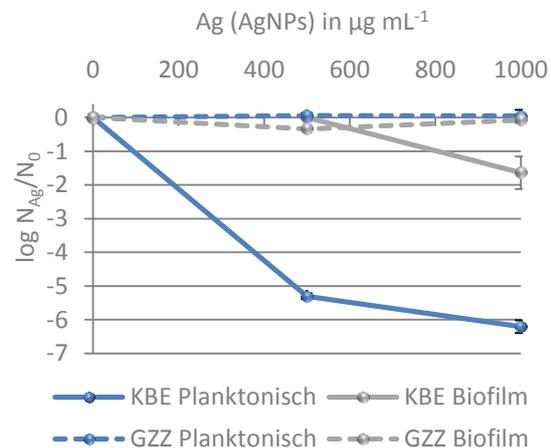
a *P. aeruginosa*, SBFb *P. aeruginosa*, SBF

Abbildung 28: Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* AdS in SBF, Inkubation für 5 d bei 36°C . Ausgangszellzahl 1×10^6 Zellen mL^{-1} (a). Einfluss von AgNPs auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS in simulierter Körperflüssigkeit (SBF) (24 h, 36°C). N_{Ag} : KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNO_3 , N_0 : KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNO_3 (b). Planktonische Bakterien N_0 : $6,11 \times 10^7$ KBE pro Kavität und $2,29 \times 10^8$ Zellen pro Kavität. Biofilm N_0 : $8,59 \times 10^6$ KBE pro Kavität und $5,22 \times 10^7$ Zellen pro Kavität, $n=3$.

Exposition von *S. aureus* mit Silber in PFD

Die Exposition mit AgNPs und Silbernitrat in PFD führte auch bei *S. aureus* zu einer Abnahme der Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien und der angehefteten und suspendierten Biofilme (Abbildung 29 und 30). Bei allen AgNP-Konzentrationen blieb die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien, der angehefteten Biofilme (Abbildung 29) und der suspendierten Biofilme konstant (Abbildung 30). Die Zellen wurden nicht lysiert.

Alle AgNP-Konzentrationen ($500-5000 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$) führten basierend auf der Kultivierbarkeit lediglich zu einer Abnahme von einer log-Stufe bei den Biofilmzellen (Abbildung 29 a). $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ führten bei den planktonischen Bakterien ebenfalls zu einer Abnahme der Kultivierbarkeit von einer und $1000-5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu einer Abnahme von 2 log-Stufen. Eine vollständige Abnahme der Kultivierbarkeit wurde auch bei den höheren Silberkonzentrationen weder bei planktonischen Bakterien noch bei Biofilmen nicht erreicht.

Silbernitrat ($1000-5000 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$) führte hingegen bei den planktonischen Bakterien (Abbildung 29 b) und den suspendierten Biofilmen (Abbildung 30) zu einer leichten Abnahme der Gesamtzellzahl (0,5-1 log-Stufen). Die Gesamtzellzahl der angehefteten Biofilme blieb konstant (Abbildung 29 b). Bei Exposition mit $500-1000 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$ nahm die Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien um etwa 2-3 log-Stufen und die der Biofilme um etwa 0,5 log-Stufen ab. Die größte Abnahme der kultivierbaren Bakterien war bei $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu verzeichnen (5 log-Stufen bei den planktonischen Bakterien und 5 log-Stufen bei den Biofilmen). Im Falle von *P. aeruginosa* führte Silbernitrat in 200-fach geringerer Konzentration ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) bereits zu einer vollständigen Abnahme der Anzahl der kultivierbaren planktonischen Bakterien (Abbildung 26).

Ein weiterer Parameter zur Untersuchung des physiologischen Zustandes von *S. aureus* wurde untersucht. Neben der Kultivierbarkeit und der Gesamtzellzahl wurde zusätzlich die FISH-Methode zur Quantifizierung der mit AgNPs und Silbernitrat exponierten *S. aureus* Zellen eingesetzt (Abbildung 29). Mit der FISH-Methode werden Bakterien mit ribosomaler RNA durch Oligonukleotidsonden nachgewiesen. Bei allen getesteten Silberkonzentrationen blieben nahezu alle Zellen (bezogen auf die Gesamtzellzahl) FISH-positiv.

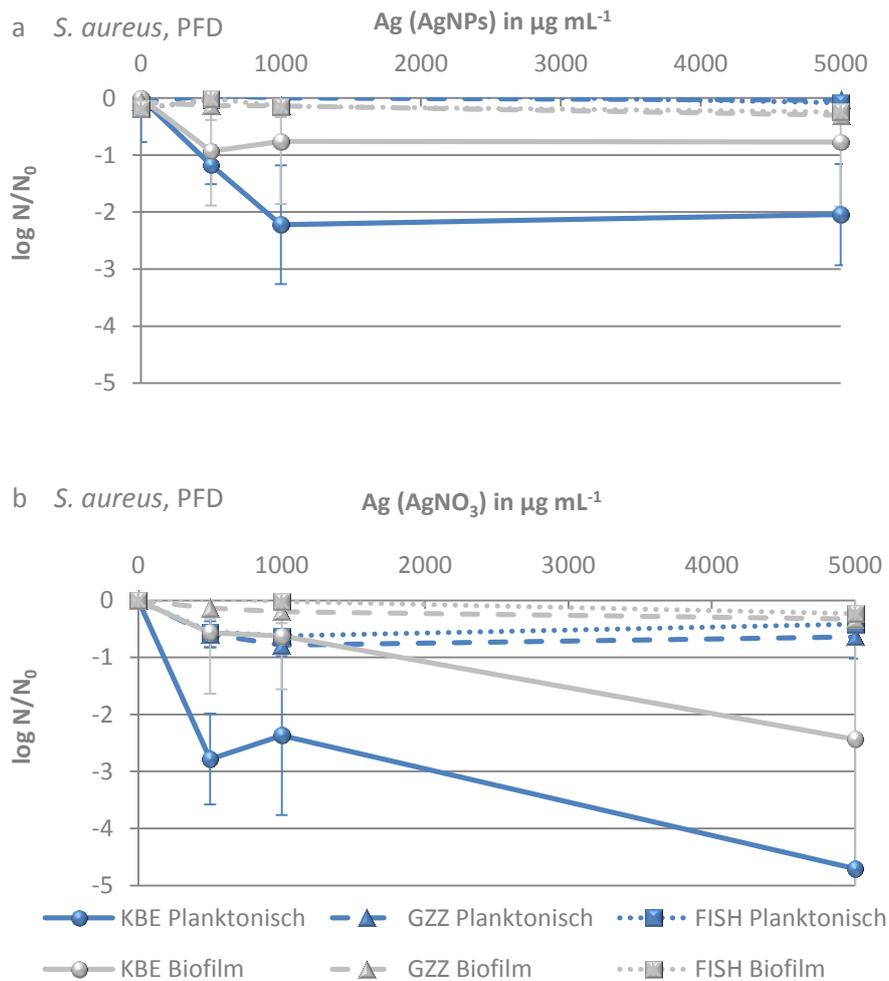


Abbildung 29: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO_3 (b) ($500, 1000$ und $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischer Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *S. aureus* ATCC 6538, 24 h, 36°C . Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36°C , 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode) und der Zellen mit rRNA (FISH). Planktonische Bakterien N_0 : $2,8 \times 10^5$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $4,7 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,1 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH). Biofilme N_0 : $5,8 \times 10^6$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $1,3 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,21 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH). $n=2-6$.

Suspendierte man die Biofilme bei der Silberexposition, dann waren diese empfindlicher gegenüber AgNPs und Silbernitrat (Abbildung 30). 500-5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs) führen zu keiner Änderung der Gesamtzellzahl (Abbildung 30). Bei 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) nimmt die Gesamtzellzahl leicht um 0,5 log-Stufen ab (Abbildung 30). Die kultivierbaren suspendierten Biofilmzellen werden bei 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag um 3 und bei 1000-5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ um 4 log-Stufen reduziert. Silbernitrat (5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) führt zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit von suspendierten *S. aureus* Biofilmen.

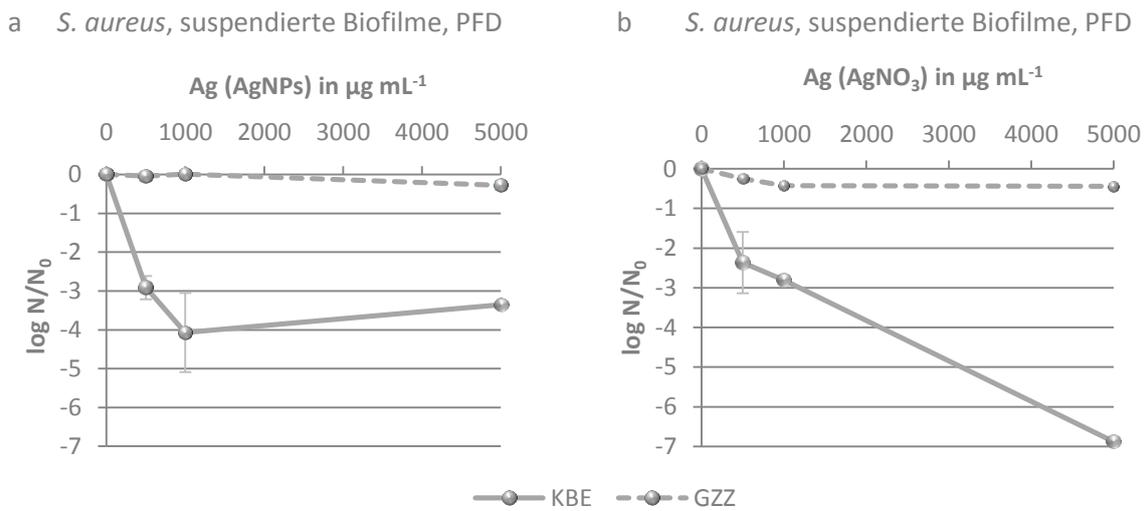


Abbildung 30: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO_3 (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von etablierten, suspendierten Biofilmen von *S. aureus* ATCC 6538 in PFD (24 h, 36 °C). N_{Ag} : KBE oder Gesamtzellzahl suspendierter Biofilme in Anwesenheit von AgNO_3 , N_0 : KBE oder Gesamtzellzahl suspendierter Biofilme in Abwesenheit von AgNO_3 . N_0 : $6,8 \times 10^6$ KBE pro Kavität und $1,6 \times 10^8$ Zellen pro Kavität, $n=2-6$.

Planktonische Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS waren empfindlicher gegenüber AgNPs und Silbernitrat als die von *S. aureus* ATCC 6538. Planktonische Bakterien beider Bakterienspezies waren empfindlicher gegen AgNPs und Silbernitrat als die angeheftete Biofilme. Suspendierte man die Biofilme, dann wurden diese deutlich empfindlicher gegen Silber als angeheftete Biofilme.

5.6 Einfluss von Silber auf die Vitalität von *P. aeruginosa*

In den meisten Studien wird die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber anhand kultureller Methoden untersucht (Chernousova & Epple, 2013). Ein etwaiger Übergang in den VBNC-Zustand wurde bis heute jedoch nicht berücksichtigt. Bakterien im VBNC-Zustand sind mit den üblichen Kultivierungsbedingungen, bei denen sie normalerweise wachsen, nicht mehr nachweisbar. Sie sind jedoch nicht tot, sondern weisen noch metabolische Aktivität auf (Oliver, 2010). Unterschiedliche Einflüsse wie fehlende Nährstoffe, Desinfektion, Inkubation außerhalb des Temperaturoptimums, veränderte osmotische Konzentrationen oder Schwermetallionen können bei Bakterien den VBNC-Zustand induzieren (Oliver, 2010; Lee et al., 2007; Dwidjosiswojo et al., 2011). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch kein silberinduzierter VBNC-Zustand in der Literatur beschrieben. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit anhand von kulturellen und kulturunabhängigen Methoden untersucht, ob Silber den Übergang in den VBNC-Zustand induziert. Es wurden die Kultivierbarkeit, der ATP-Gehalt, die Membranintegrität (LIVE/DEAD-Kit, PMA-qPCR), das Vorhandensein von ribosomaler RNA (FISH) als Vitalitätsmarker und das Vorhandensein von DNA (DAPI-Methode) untersucht.

5.6.1 Optimierung der PMA-qPCR

Die PMA-qPCR ist eine Methode zur Unterscheidung zwischen Bakterien mit intakter und geschädigter Zellmembran. In dieser Arbeit wurde die Methode für *P. aeruginosa* nach Nocker et al. (2007) durchgeführt. In einer neueren Studie (Nkuipou-Kenfack et al., 2013) wurden unterschiedliche Modifikationen an dieser Methode vorgenommen, um die Detektion membrangeschädigter Bakterien zu verbessern. Analog wurden in der vorliegenden Arbeit für *P. aeruginosa* folgende Parameter variiert: PMA Konzentration (10 und 50 μM), Kontaktzeit des PMA mit der Probe (5 und 30 min), Inkubationstemperatur des PMA und der Probe vor der Photoaktivierung (22 °C und 40 °C). Hierzu wurden planktonische Bakterien aus dem Mikrotiterplatten-Verfahren (Abschnitt 4.10) aus den Kavitäten entnommen, gewaschen und mit PFD, physiologischer Kochsalzlösung (0,85 % (w/v) NaCl, Silbernitrat (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und Isopropanol (70 % (w/w)) für 24 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten der Inkubationsbedingungen für PMA angewendet. Unter Standardbedingungen (50 μM PMA, Kontaktzeit mit der Probe 5 min und 22 °C Inkubationstemperatur) in PFD wurden $3,9 \times 10^6$ membranintakte Zellen pro Kavität mit der PMA-qPCR detektiert. Parallel wurde die Kultivierbarkeit bestimmt (Abbildung 31 b). Die Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien, welche mit Silbernitrat und Isopropanol inkubiert wurden, nahm vollständig ab (7 log-Stufen). Bei Inkubation mit PFD und physiologischer Kochsalzlösung war keine Abnahme (1×10^7 Zellen pro Kavität) zu verzeichnen. Bei den unterschiedlichen Inkubationsmethoden von PMA wurden keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Anzahl der membranintakten Bakterien im Vergleich zu den Standardbedingungen festgestellt (Abbildung 31 a).

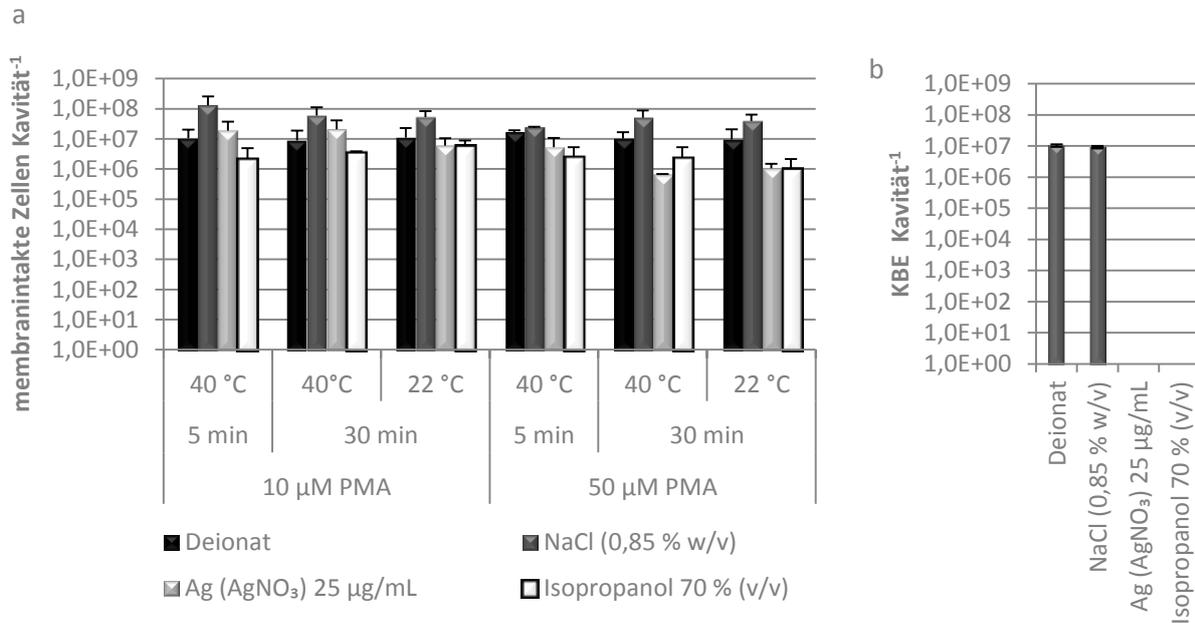


Abbildung 31: Optimierung der PMA-qPCR nach Nkuipou-Kenfack et al. (2013). Planktonische, membranintakte Zellen von *P. aeruginosa* AdS nach Exposition mit PFD (mit und ohne Hitzebehandlung, 30 min, 65 °C), AgNO₃ (25 µg mL⁻¹), NaCl (0,85 % (w/v)) und Isopropanol (70 % (v/v)) bei 36 °C für 24 h. Bestimmung der membranintakten Zellen (a) und der Koloniezahl (b) nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

5.6.2 Einfluss von Silber auf die Vitalität etablierter Biofilme und planktonische Bakterien

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Vitalitätsparameter silberexponierter Bakterien wurden in dieser Arbeit exemplarisch anhand von *P. aeruginosa* durchgeführt. Da es nicht einen bestimmten Parameter zur Beurteilung der Vitalität von Bakterien gibt, wurden unterschiedliche Methoden angewendet, um die Vitalität silberexponierter Bakterien zu untersuchen.

Die Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* nahm mit zunehmender Silberkonzentration, sowohl in Gegenwart von AgNPs (Abbildung 32) als auch von Silbernitrat (Abbildung 33), ab. Ein vollständige Abnahme (> 6 log-Stufen) der Kultivierbarkeit wurde durch 25 µg mL⁻¹ Ag des Silbernitrats und 500 µg mL⁻¹ Ag der AgNP erreicht. Bei den gleichen Silberkonzentrationen war bei den Biofilmen keine vollständige Abnahme der Anzahl kultivierbarer Bakterien zu erkennen (maximal 2 log-Stufen). Bei allen getesteten Konzentrationen blieb sowohl die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien als auch die der Biofilme konstant.

Die LIVE/DEAD-Methode überprüft, ob die Bakterien Membranintegrität aufweisen oder ob die Zellmembran geschädigt ist (Boulos et al., 1999). Bei dieser Methode werden die Bakterien mit zwei Farbstoffen angefärbt. SYTO 9 färbt alle Bakterienzellen, unabhängig von ihrer

Membranintegrität. Propidiumiodid hingegen dringt ausschließlich in Zellen mit geschädigter Zellmembran ein und färbt diese rot. Planktonische Bakterien und Biofilme, die nicht mit Silber exponiert wurden, wiesen membranintakte Zellen auf, die etwa der Anzahl der kultivierbaren Bakterien entsprach (Abbildung 32, 33). Die Anzahl der membranintakten Bakterien blieb aber auch nach Exposition mit Silber (AgNPs und Silbernitrat) sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen konstant.

PMA-qPCR ist eine molekularbiologische Methode, die die Membranintegrität von Bakterien überprüft (Boulos et al., 1999; Nocker et al., 2007). PMA dringt in Bakterien mit geschädigter Zellmembran ein und interkaliert dort in die DNA. Durch Photoaktivierung bindet der Farbstoff kovalent an die DNA, welche dann in der qPCR nicht mehr vervielfältigt und detektiert werden kann. Bei allen getesteten Silberkonzentrationen (AgNPs und Silbernitrat) und Bakterienfraktionen (planktonische Bakterien und Biofilme) war eine Abnahme der membranintakten Bakterien um etwa 2 log-Stufen zu verzeichnen (Abbildung 32,33). Die Diskrepanz von membranintakten und kultivierbaren Bakterien liegt in der planktonischen Phase bei etwa 6 log-Stufen, wobei die PMA-qPCR bei den Biofilmen mit der Zahl der kultivierbaren Bakterien übereinstimmt.

Mit der FISH-Methode wird die 16S rRNA von Bakterien durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden nachgewiesen. Diese Methode gibt Auskunft über das Vorhandensein von rRNA, als charakteristischer Bestandteil von Ribosomen und Hinweis auf Proteinbiosynthese (Moter & Göbel, 2000). Die Anzahl der FISH-positiven Bakterien blieb bei allen getesteten Silberkonzentrationen konstant. Dies gilt sowohl für die planktonischen Bakterien als auch für die Biofilme (Abbildung 32,33).

ATP ist der Energieträger in der Bakterienzelle und wurde luminometrisch nachgewiesen. Sowohl bei den planktonischen Bakterien, als auch bei den Biofilmen war nach der Exposition mit Silbernitrat und AgNPs ATP nachweisbar (Abbildung 32, 33).

P. aeruginosa, welcher sich aufgrund der Exposition mit Silber in einem nicht kultivierbaren Zustand befand, wies DNA (Nachweis über DAPI-Methode), ribosomale RNA (Nachweis über FISH), Membranintegrität (Nachweis über PMA-qPCR und LIVE/DEAD-Färbung) und ATP auf.

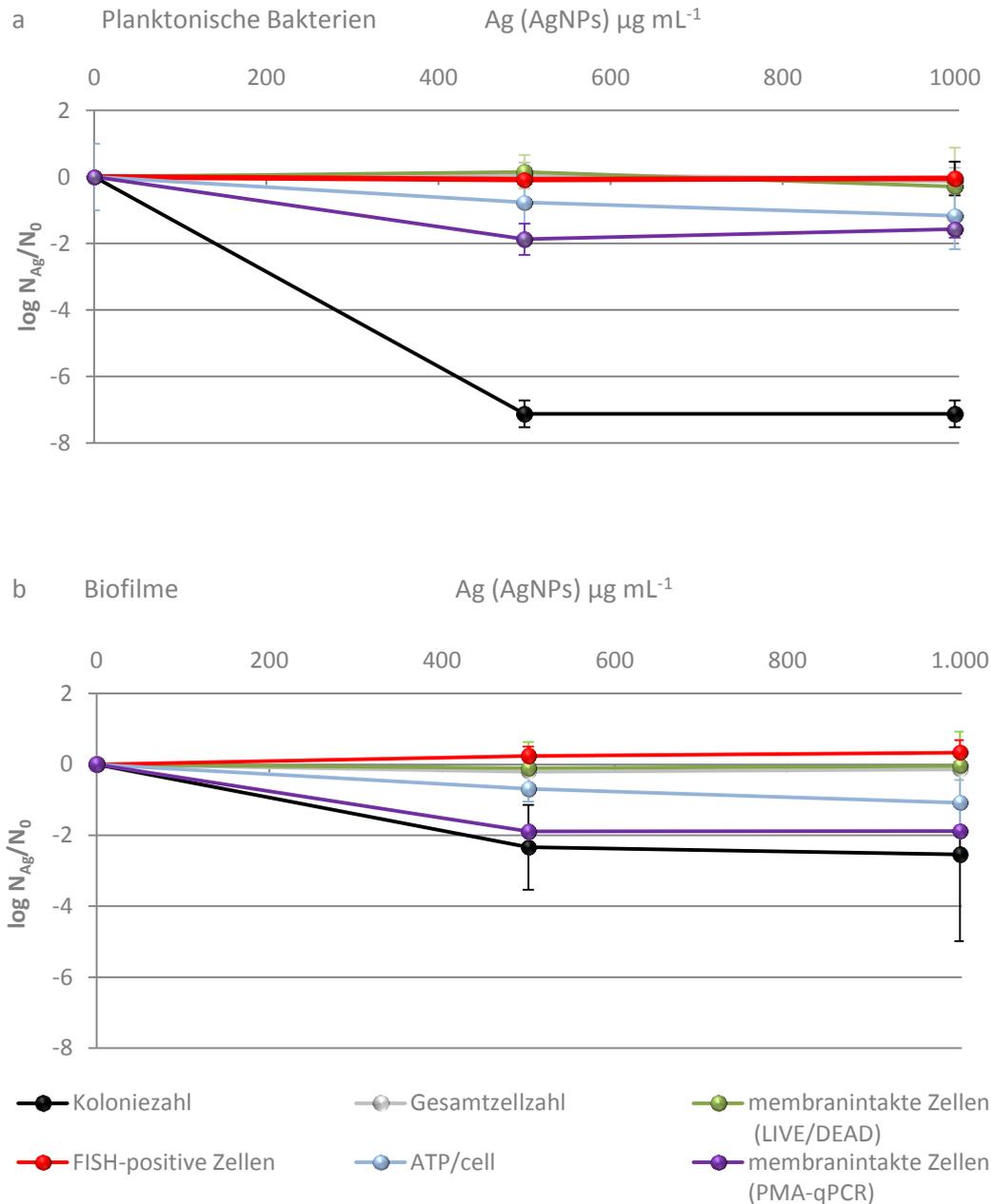


Abbildung 32: Einfluss von AgNPs ($0-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD-Färbung und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter GloTM-Kit). Planktonische Bakterien. N_{Ag} : planktonische Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs, N_0 : planktonische Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNO_3 . N_0 : $1,67 \times 10^7$ KBE pro Kavität (Koloniezahl) $7,6 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,4 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), 4×10^8 Zellen pro Kavität (FISH), $0,018 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $3,9 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). Biofilme N_0 : $7,7 \times 10^6$ KBE pro Kavität (Koloniezahl) $1,2 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,0 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), $2,3 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH), $0,33 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). $n=3$

5. Ergebnisse

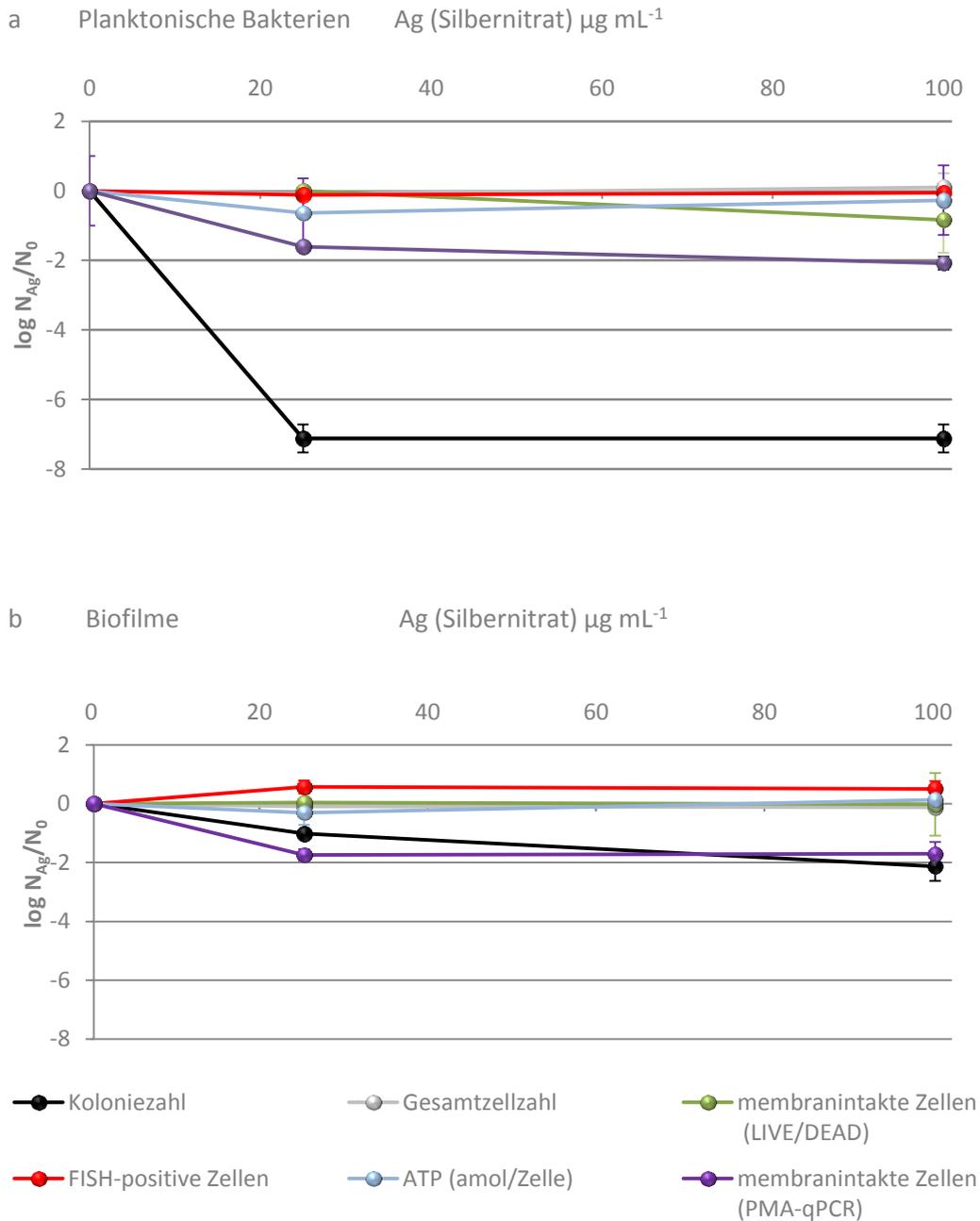


Abbildung 33: Einfluss von AgNO_3 ($0-100 \mu\text{g mL}^{-1}$) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD®-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter Glo™-Kit). N_{Ag} : planktonische Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von AgNPs, N_0 : planktonische Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von AgNO_3 . Planktonische Bakterien N_0 : $1,67 \times 10^7$ KBE pro Kavität (Koloniezahl) $7,6 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,4 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), 4×10^8 Zellen pro Kavität (FISH), $0,018 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $3,9 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). Biofilme N_0 : $7,7 \times 10^6$ KBE pro Kavität (Koloniezahl) $1,2 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,0 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), $2,3 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH), $0,33 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). $n=3$

5.6.3 Einfluss von Silber auf die Vitalität planktonischer Bakterien in Suspension

Neben den Untersuchungen der Vitalität von *P. aeruginosa* im Mikrotiterplattensystem wurden Untersuchungen anhand von planktonischen Bakterien in entionisiertem Wasser durchgeführt. Der kupferinduzierte VBNC-Zustand von *P. aeruginosa* AdS wurde 2011 von Dwidjosiswojo et al. beschrieben. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass *P. aeruginosa* in einen kultivierbaren Zustand zurückgeführt werden kann. Analog zu diesen Untersuchungen wurde ein silberinduzierter Übergang von *P. aeruginosa* in den VBNC-Zustand und eine Rückführung in den kultivierbaren Zustand im gleichen Testsystem untersucht. Es wurden ausschließlich planktonische Zellen untersucht, welche in Wasser mit niedrigem Gesamtkohlenstoff-Gehalt (Wasser, ROTIPURAN® Low Organic Purity) (LOP) mit und ohne AgNPs und Silbernitrat suspendiert waren.

Hierbei wurde *P. aeruginosa* AdS (1×10^6 Zellen/mL) für 24 h bei unterschiedlichen Konzentrationen der AgNPs und Silbernitrat ($10\text{-}500 \mu\text{g L}^{-1}$) bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in 40 mL Wasser mit niedrigem Gesamtkohlenstoff-Gehalt (Wasser, ROTIPURAN® Low Organic Purity) (LOP-Wasser) inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h wurden die Koloniezahl und die Gesamtzellzahl der Bakterien suspensionen bestimmt.

Die pH-Werte in den Lösungen wurde durch AgNPs und Silbernitrat in den verwendeten Konzentrationen ($10\text{-}500 \mu\text{g L}^{-1}$) nicht beeinflusst (Tabelle 31).

Tabelle 31: pH-Werte von LOP-Wasser, AgNP-Dispersionen und Silbernitratlösung ($10, 100$ und $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) in LOP-Wasser bei $21,5\text{-}22 \text{ }^\circ\text{C}$.

Lösung/Dispersion	Konzentration ($\mu\text{g L}^{-1}$ Ag)	pH
PFD	0	6,22
	10	6,26
AgNPs	100	6,24
	500	6,82
	10	6,19
AgNO ₃	100	6,10
	500	5,57

Die Inkubation von *P. aeruginosa* AdS in LOP für 24 h bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ hat keinen deutlichen Einfluss auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa*. Es findet kein Wachstum statt und die Bakterien werden durch LOP selbst nicht geschädigt. Bei allen getesteten Silberkonzentrationen war sowohl durch AgNPs als auch durch Silbernitrat kein Einfluss auf die Gesamtzellzahl zu verzeichnen (Abbildung 34).

Alle getesteten Silberkonzentrationen ($10\text{-}500\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag aus AgNPs und Silbernitrat) führten innerhalb von 24 h zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* (Abbildung 34).

$10\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (AgNPs) führten innerhalb von 8 h zu keiner Veränderung der Anzahl der kultivierbaren Bakterien (Abbildung 34 a). Ein Einfluss von $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (AgNPs) auf die Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* war nach 8 h zu verzeichnen (2 log-Stufen). $500\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (AgNPs) führten bereits nach 2 h zu einer Abnahme der Kultivierbarkeit von etwa 2 log-Stufen und zu einer vollständigen Abnahme innerhalb von 4 h.

Auch $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) führten innerhalb von 8 h zu keiner deutlichen Verringerung der kultivierbaren Bakterien (Abbildung 34 b). Bei $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) war nach 4 h eine Abnahme von 1,5 log-Stufen und nach 6 h eine vollständige Abnahme der Kultivierbarkeit zu verzeichnen. $500\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) führten wie bei den AgNPs nach 4 h zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa*.

Bei niedrigeren Konzentrationen ($10\text{-}100\ \mu\text{g L}^{-1}$) sind leichte Unterschiede der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silbernitrat und AgNPs verzeichnen. Silbernitrat führte bei gleicher Silberkonzentration zu einer größeren Abnahme der Kultivierbarkeit. Beide Silberspezies führten hingegen bei $500\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ag zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa*.

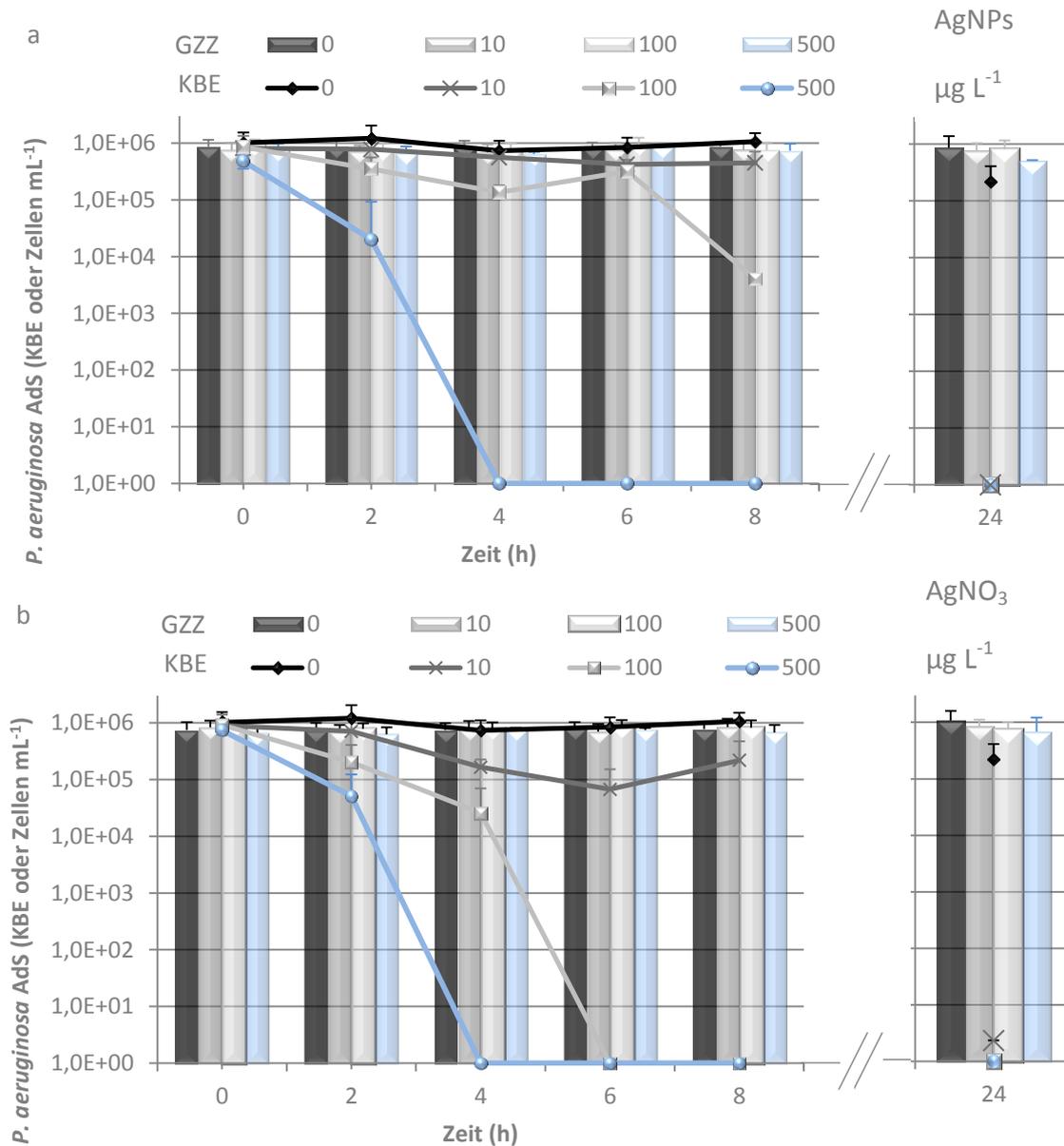


Abbildung 34: Einfluss von AgNPs (a) und AgNO₃ (b) auf die Kultivierbarkeit (KBE) und die Gesamtzellzahl (GZZ) von *P. aeruginosa* AdS in LOP-Wasser (36 °C, 24 h). Ausgangszellzahl 1×10^6 Zellen mL⁻¹, n=3.

Um die Vitalität von *P. aeruginosa* AdS nach Exposition mit AgNPs und Silbernitrat genauer zu untersuchen, wurde eine Inkubation mit jeweils 100 µg mL⁻¹ Ag ausgewählt und eine Inkubationszeit von 24 h (vollständige Abnahme der Kultivierbarkeit). Als Kontrolle für effektive Abtötung von Bakterien wurden Isopropanol (70 % (v/v)) und Hitze (30 min bei 65 °C) eingesetzt. Folgende kulturunabhängigen Methoden wurden zur Detektion der Membrintegrität eingesetzt: PMA-qPCR und die LIVE-DEAD-Methode mit mikroskopischer Detektion und Detektion mit der Durchflusszytometrie. Diese Methoden detektieren die Integrität der Zellmembran. Zusätzlich wurde die Gesamtzellzahlbestimmung mit DAPI durchgeführt. Dar-

gestellt ist die Abnahme des jeweiligen Vitalitätsparameter der silberexponierten Bakterien (N_{Ag}) im Vergleich zum jeweiligen Vitalitätsparameter der Kontrolle ohne Silber (N_0) in logarithmischer Form (Abbildung 35). Im Falle der Exposition mit Silber (AgNPs und Silbernitrat), Isopropanol und der Hitzebehandlung war eine vollständige Abnahme der Anzahl der kultivierbaren Bakterien zu erkennen. Die Gesamtzellzahl blieb bei allen untersuchten Proben, sowohl nach Silberexposition als auch nach der Exposition mit Isopropanol und der Hitzebehandlung, konstant. *P. aeruginosa*, welcher mit Silber exponiert wurde, wies noch eine große Anzahl von Bakterien mit intakter Zellmembran auf (PMA-qPCR, LIVE-DEAD-Methode). Bei Inkubation mit Isopropanol und dem Einsatz von Hitze im Vergleich zu silberexponierten Bakterien traten deutliche Unterschiede auf. Mit der LIVE/DEAD-Methode wurden bei den Bakterien, welche mit Isopropanol und Hitze behandelt wurden, keine membranintakten Zellen detektiert. Mit der PMA-qPCR wurden noch membranintakte Bakterien detektiert. Das Muster des Netzdiagrammes von silberexponierten Bakterien unterscheidet sich deutlich von denen der Muster für geschädigte Zellen (Isopropanol und Hitze).

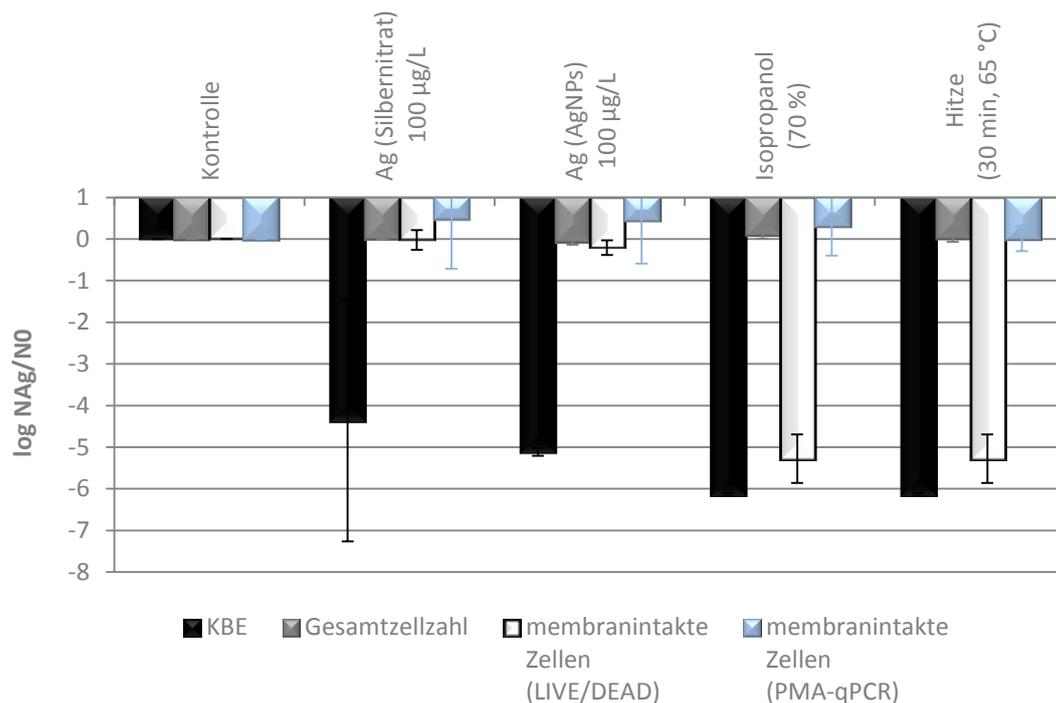


Abbildung 35: Einfluss von AgNPs ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (a), AgNO_3 ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (b), Isopropanol (70 % (v/v)) (c) und Hitze (30 min, 65°C) auf die Vitalität (Koloniezahl, Gesamtzellzahl, Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung und PMA-qPCR)) von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen (1×10^6 Zellen mL^{-1}) in PFD nach 24 h bei 36°C . N_0 : $1,3 \times 10^6$ KBE pro Kavität, $1,1 \times 10^6$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $2,25 \times 10^5$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD) und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR).

Die Durchflusszytometrie wurde angewendet, um membranintakte Bakterien von membran-geschädigten nach Anfärben mit dem LIVE/DEAD-Kit zu unterscheiden. Bei der Durchflusszytometrie entstehen Verteilungsmuster von Bakterienzellen. In einem Diagramm wurde die rote Fluoreszenz FL3 (Propidiumiodid - membrangeschädigte Bakterien) gegen die grüne Fluoreszenz (SYTO 9 - membranintakte Bakterien) aufgetragen. Zwei unterschiedliche Bereiche wurden als membranintakte (SYTO 9-gefärbte) und membrangeschädigte (Propidiumiodid-gefärbte) Bakterien definiert.

Bei der Kontrolle ohne Silber (Abbildung 36 a) zeigte sich ein Muster der Durchflusszytometrie mit vornehmlich membranintakten Bakterien (SYTO 9). In den Kontrollen mit Bakterien, welche mit Isopropanol und Hitze behandelt wurden, verschiebt sich das Muster deutlich in die Region der membrangeschädigten Bakterien (Propidiumiodid) (Abbildung 36 d, e). Bei den nicht kultivierbaren Bakterien, welche mit Silber exponiert wurden, befinden sich die Bakterien, wie bei der Kontrolle, mehr im Bereich der membranintakten Bakterien. Bei der silberfreien Kontrolle lag die Anzahl der membranintakten Bakterien bei über 80 % (Abbildung 36 d). Bei Exposition mit AgNPs wurden ebenfalls über 80 % membranintakte Bakterien nachgewiesen. In Anwesenheit von Silbernitrat lag der Anteil der kultivierbaren Bakterien bei über 60 %. Bei Exposition mit Isopropanol wurden nur noch etwa 20 % und nach Hitzebehandlung etwa 5 % membranintakte Bakterien detektiert.

Die Verteilung der Bakterien in den Diagrammen der Durchflusszytometrie unterschied sich deutlich voneinander. Bei Exposition mit AgNPs und Silbernitrat verschieben sich membranintakten Bakterien im Vergleich zur silberfreien Kontrolle innerhalb des Bereiches SYTO 9. Die Q-Werte geben das Verhältnis von SYTO 9 gefärbten Zellen zu Propidiumiodid gefärbten Zellen an. Die Q-Werte der AgNP exponierten Bakterien (0,2) unterschieden sich nicht von dem der Bakterien der Kontrolle ohne Silber (0,2). Der Q-Wert der Bakterien, welche mit Silbernitrat exponiert wurden, war mit einem Wert von 0,5 etwas höher als der der Bakterien der Kontrolle. Bei Isopropanol und Hitze exponierten Bakterien unterschieden sich die Muster sehr deutlich von denen der silberexponierten Bakterien. Das Muster ist zum Bereich Propidiumiodid (membrangeschädigt) verschoben. Der Q-Wert der mit Hitze exponierten Bakterien betrug 3,1 und der mit Isopropanol exponierten Bakterien 14,5. Damit unterscheiden sie sich deutlich von denen der silberexponierten Bakterien und der Kontrolle.

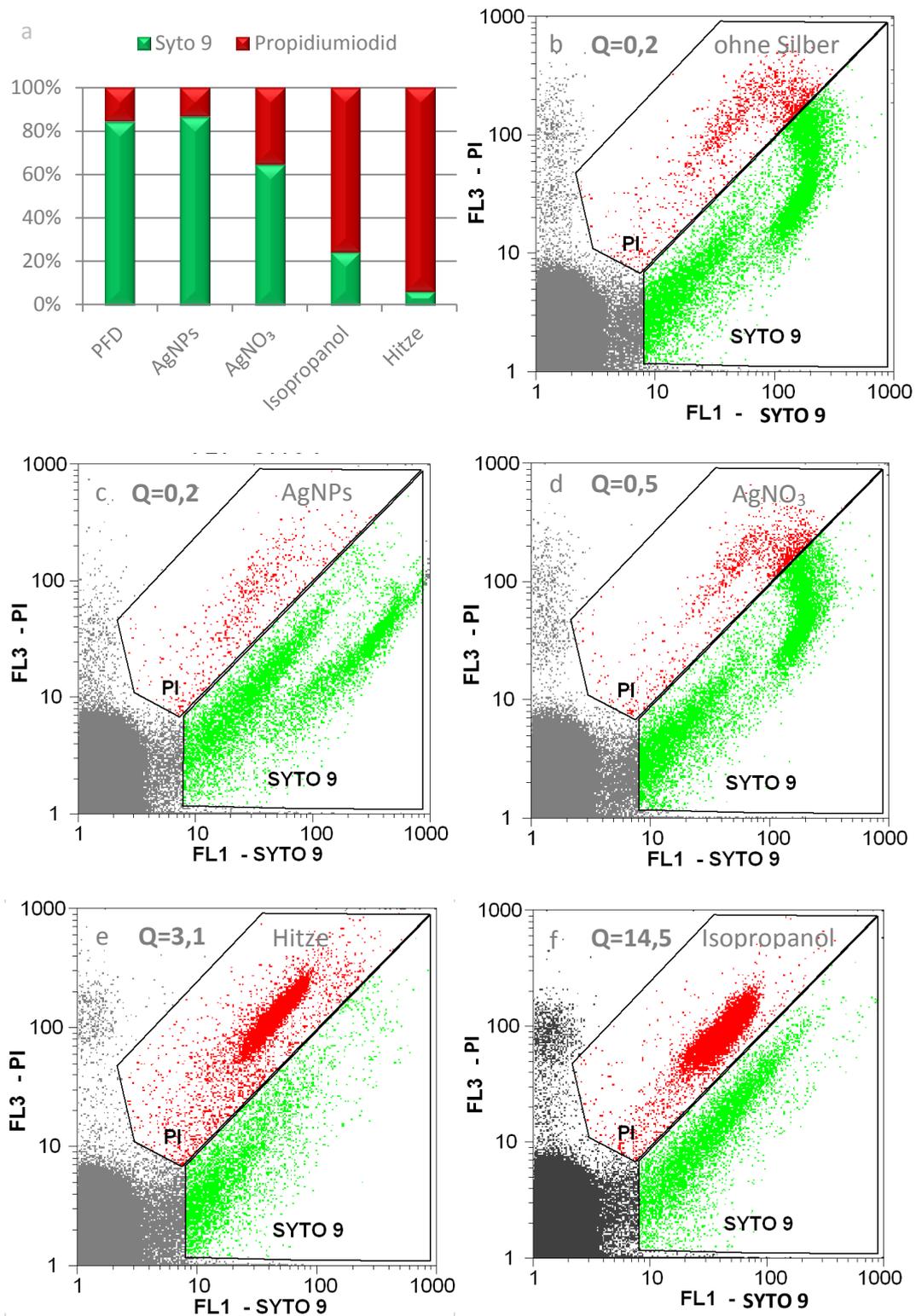


Abbildung 36: Durchflusszytometrie: Prozentualer Anteil membranintakter und membrangeschädigter Bakterien (a). Einfluss von LOP-Wasser als silberfreie Kontrolle (b), AgNPs ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (c), AgNO₃ ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (d), Hitze (30 min, 65°C) (e) Isopropanol (70 % (v/v)) (f) und auf die Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung, Durchflusszytometrie) von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen (1×10^6 Zellen mL^{-1}) suspendiert in LOP nach 24 h bei 36°C . Q: Verhältnis SYTO 9 gefärbte Zellen und Propidiumiodid gefärbte Zellen, n=3.

Bakterien, welche sich im VBNC-Zustand befinden, können aus diesem Stadium wiederbelebt werden, sodass sie wieder kultivierbar sind und auch ihre Infektiosität wiedererlangen können. Unterschiedliche Einflüsse wie fehlende Nährstoffe, Desinfektion, Inkubation außerhalb des Temperaturoptimums, veränderte osmotische Konzentrationen oder Schwermetallionen können bei Bakterien den VBNC-Zustand induzieren. Entfernt man diese Einflüsse, können die Bakterien wiederbelebt werden (Oliver, 2010; Lee et al., 2007; Dwidjosiswojo et al., 2011). In dem hier beschriebenen Testsystem wurden unterschiedliche Verfahren angewendet, um die Bakterien aus dem VBNC-Zustand wiederzubeleben. Es wurden folgende Verfahren angewendet: Abbinden des Silbers mit Natriumthioglycolat (0,1 und 0,2 %), Natriumthioglycolat und Natriumthiosulfat (0,1 % und 0,146 %), DDTC (100 µM) und Waschen der Zellen auf einem Membranfilter mit entionisiertem Wasser. Bei keinem der Verfahren konnten die Bakterien aus dem VBNC-Zustand wiederbelebt werden (Daten nicht gezeigt).

5.6.4 Einfluss von Silber auf die Morphologie etablierter Biofilme und planktonischer Bakterien

Um etwaige morphologische Veränderungen von *P. aeruginosa* AdS (planktonische Bakterien und Biofilme) durch die Exposition mit AgNPs und Silbernitrat zu untersuchen, wurden die Zellen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Es wurde untersucht, ob die Zellen durch Silber geschädigt wurden oder ob sie sich verändert haben. Bakterien, welche sich im VBNC-Zustand befinden, können zudem ihre Zellmorphologie ändern. Chaiyanan et al. (2001) zeigten anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass *Vibrio cholerae* im VBNC-Zustand seine Morphologie änderte. Die stäbchenförmigen Bakterien waren in eine Kokkenform geschrumpft.

Für diese Untersuchungen wurde *P. aeruginosa* AdS im Mikrotiterplattenverfahren (Abschnitt 4.10) angezüchtet sowie die planktonischen Bakterien und die etablierten Biofilme mit AgNPs und Silbernitrat in PFD exponiert (24 h, 36 °C). Anschließend wurden diese auf Polycarbonatfilter filtriert und fixiert. Die Proben wurden mit Kohlenstoff besputtert, rasterelektronenmikroskopisch untersucht und Silber mit einer EDX-Sonde detektiert.

Abbildung 37 zeigt planktonische Bakterien der silberfreien Kontrolle bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und ein ausgewähltes EDX-Spektrum (c), welches im Bereich einer Bakterienzelle (d) aufgenommen wurde. Die Bakterien hatten eine einheitliche Form (länglich, oval mit rundlichen Zellpolen) und wiesen keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Morphologie auf. Es lagen keine Hinweise auf Zelllyse vor. Es wurde kein Silber bei der EDX-Analyse auf dem Filtermaterial und auf den Zellen detektiert (Abbildung 37 c, d).

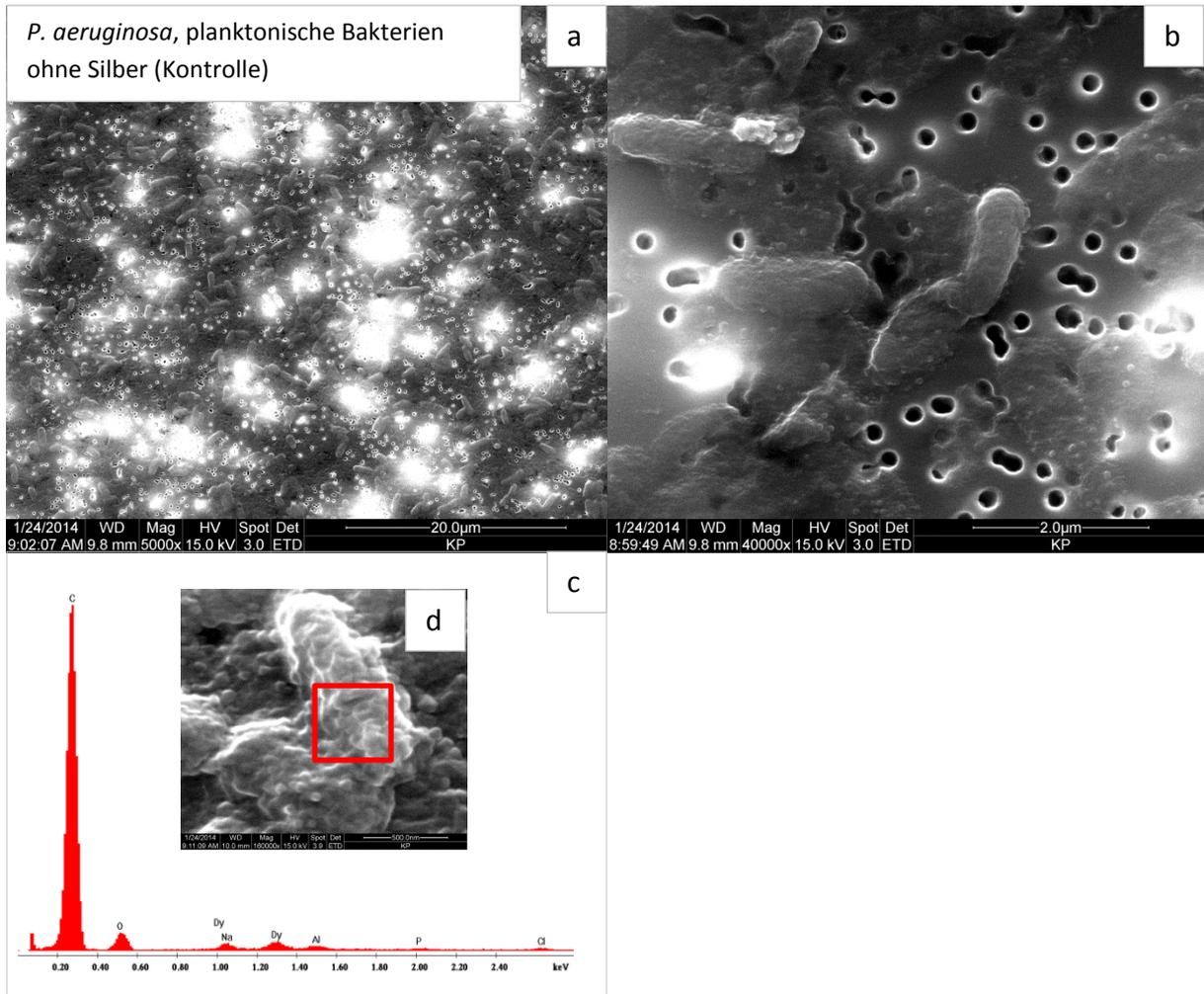


Abbildung 37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit PFD (silberfreie Kontrolle) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1.

Mit AgNPs ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) exponierte planktonische Bakterien weisen im Vergleich zur silberfreien Kontrolle ebenfalls größtenteils keine veränderte Zellmorphologie auf (Abbildung 38 a, b). Mit Kulturverfahren waren die Bakterien bei dieser Silberkonzentration nicht mehr nachweisbar (Abschnitt 5.5). Die Zellen wiesen jedoch Einstülpungen und Dellen auf. Zudem konnte in oder auf den Bakterienzellen Silber detektiert werden (Abbildung 38 c, d). Um die Bakterien waren deutliche AgNP-Agglomerate zu erkennen (helle Bereiche – siehe Pfeil), welche als Silber mit der EDX-Sonde identifiziert wurden.

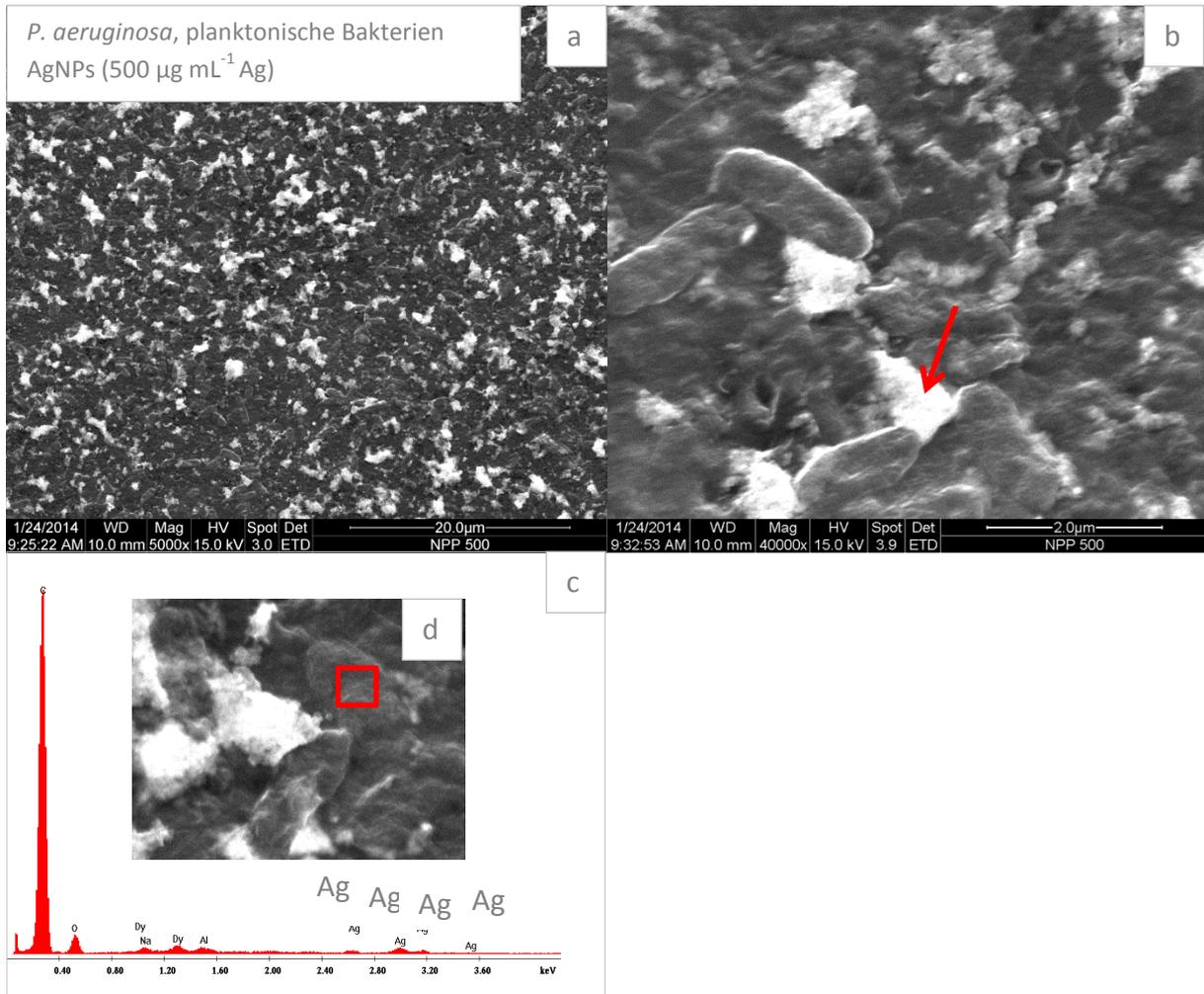


Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit AgNPs (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1.

Mit Silbernitrat (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) exponierte planktonische Bakterien wiesen eine ähnliche Zellmorphologie wie unbehandelte Zellen auf (Abbildung 39 a, b). Obwohl die planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* bei dieser Silberkonzentration mit dem Kulturverfahren nicht mehr nachweisbar waren (Abschnitt 5.5), waren keine deutlichen Schädigungen oder Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zur silberfreien Kontrolle zu erkennen. In und auf den Bakterienzellen und auf dem Filtermaterial konnte kein Silber detektiert werden (Abbildung 39 c, d).

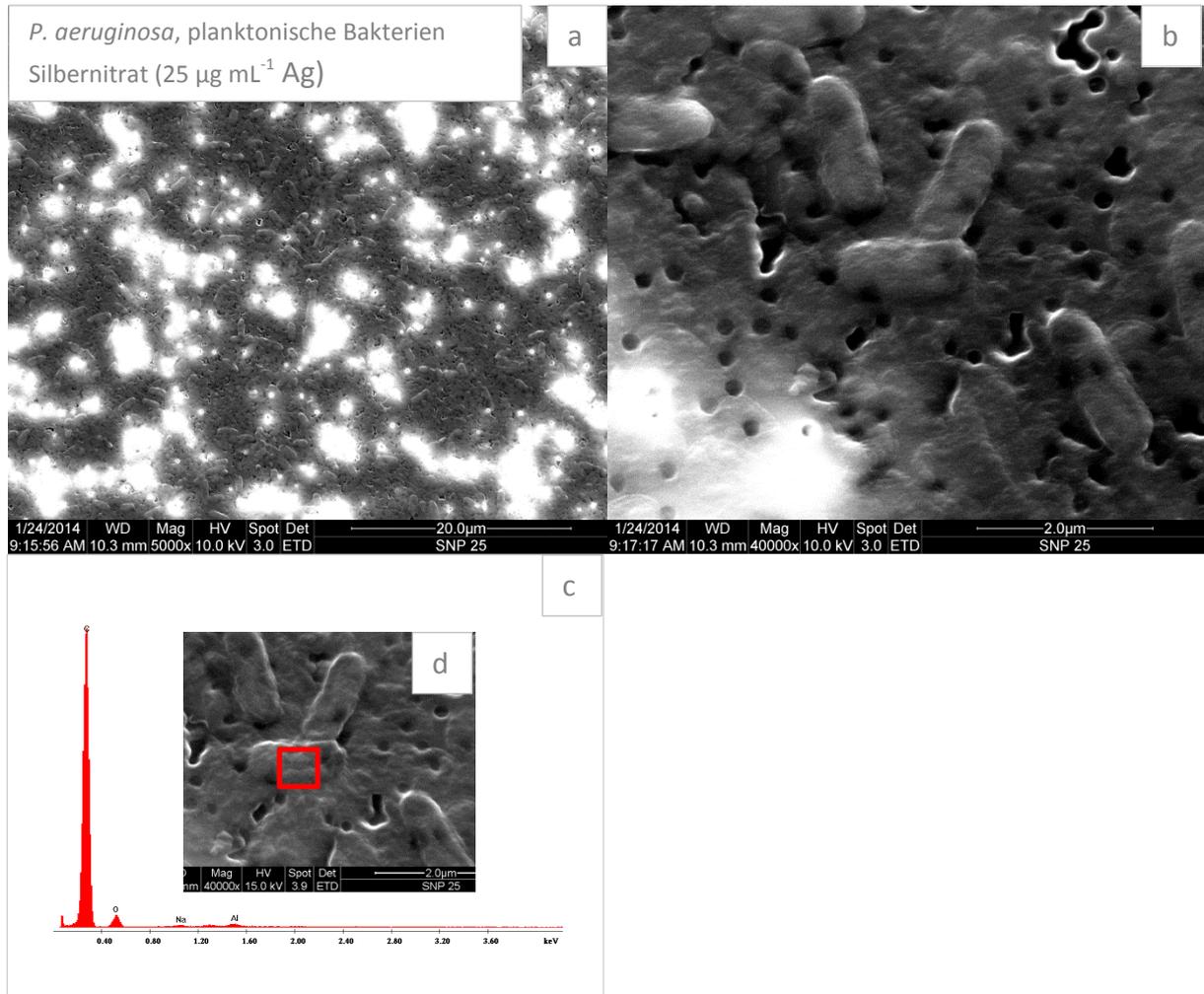


Abbildung 39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von planktonischen *P. aeruginosa* AdS Zellen, welche mit Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36°C , 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) gemessen im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), $n=1$.

Neben den planktonischen Bakterien wurden auch die Biofilme auf morphologische Veränderungen bei den gleichen Silberkonzentrationen wie bei den planktonischen Bakterien untersucht. Die Morphologie der Biofilmzellen unterschied sich von der der planktonischen Bakterien (Abbildung 36). Die Biofilmzellen wiesen jedoch wie die planktonischen Bakterien in der silberfreien Kontrolle eine intakte Zellmorphologie und keine auffälligen Veränderungen auf (Abbildung 40 a, b). Es wurde kein Silber mit der EDX-Sonde detektiert (Abbildung 40 c, d).

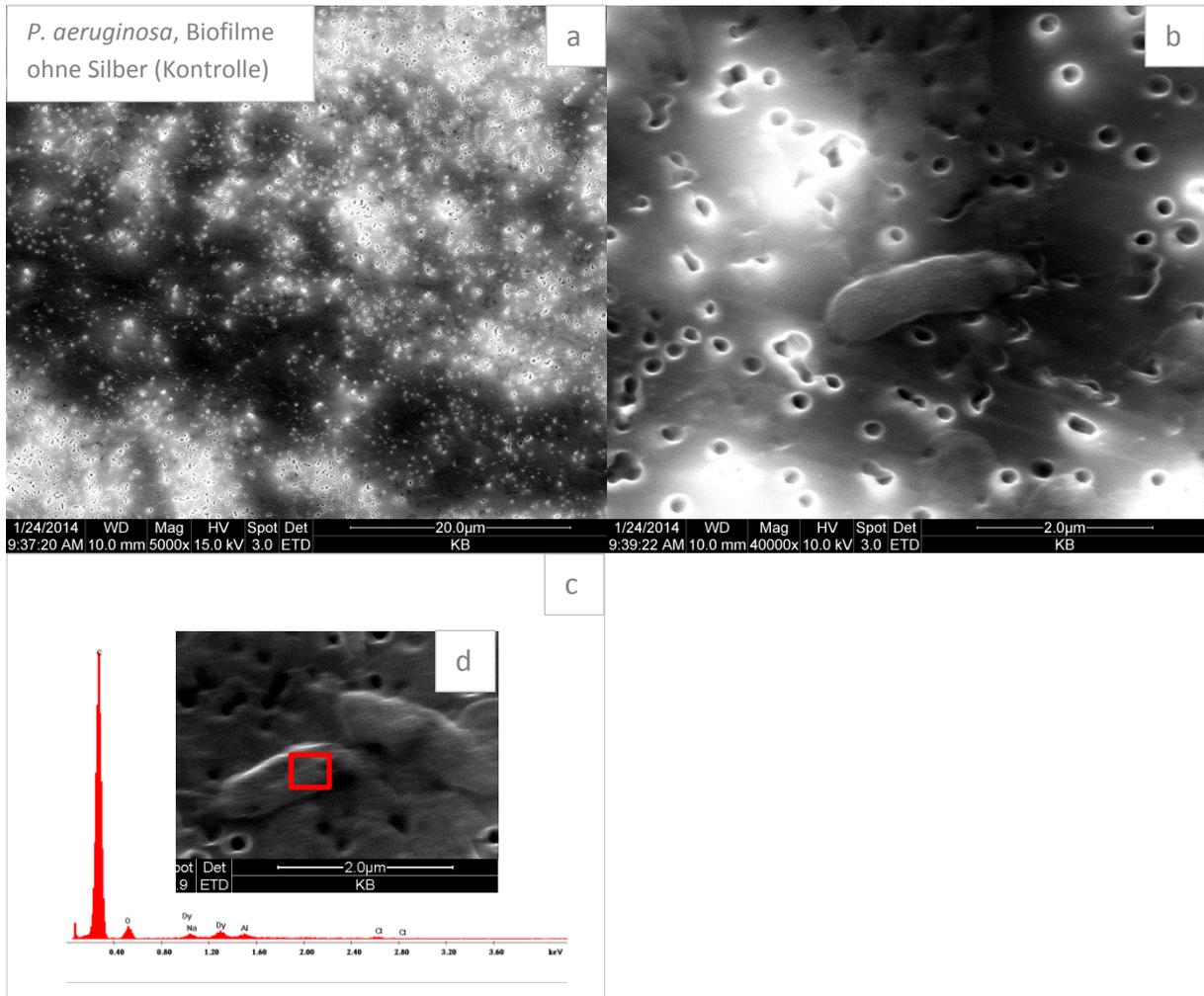


Abbildung 40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* AdS Biofilmzellen, welche mit PFD (Kontrolle) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36 °C, 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (c) im roten Kasten in Ausschnitt (d). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), n=1.

AgNPs ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag) führten zu einer Abnahme der Kultivierbarkeit der Biofilmzellen um 2 log-Stufen. Die entsprechenden Biofilmzellen wiesen größtenteils eine intakte Zellmorphologie auf (Abbildung 41 a, b). In und auf den Bakterien konnte kein Silber detektiert werden (Abbildung 41 c, d). Im extrazellulären Bereich waren helle Bereiche (siehe Pfeil) zu erkennen, welche mit der EDX-Analyse als Silber identifiziert wurden. Hierbei handelt es sich vermutlich um AgNP-Agglomerate (Abbildung 41 e, f).

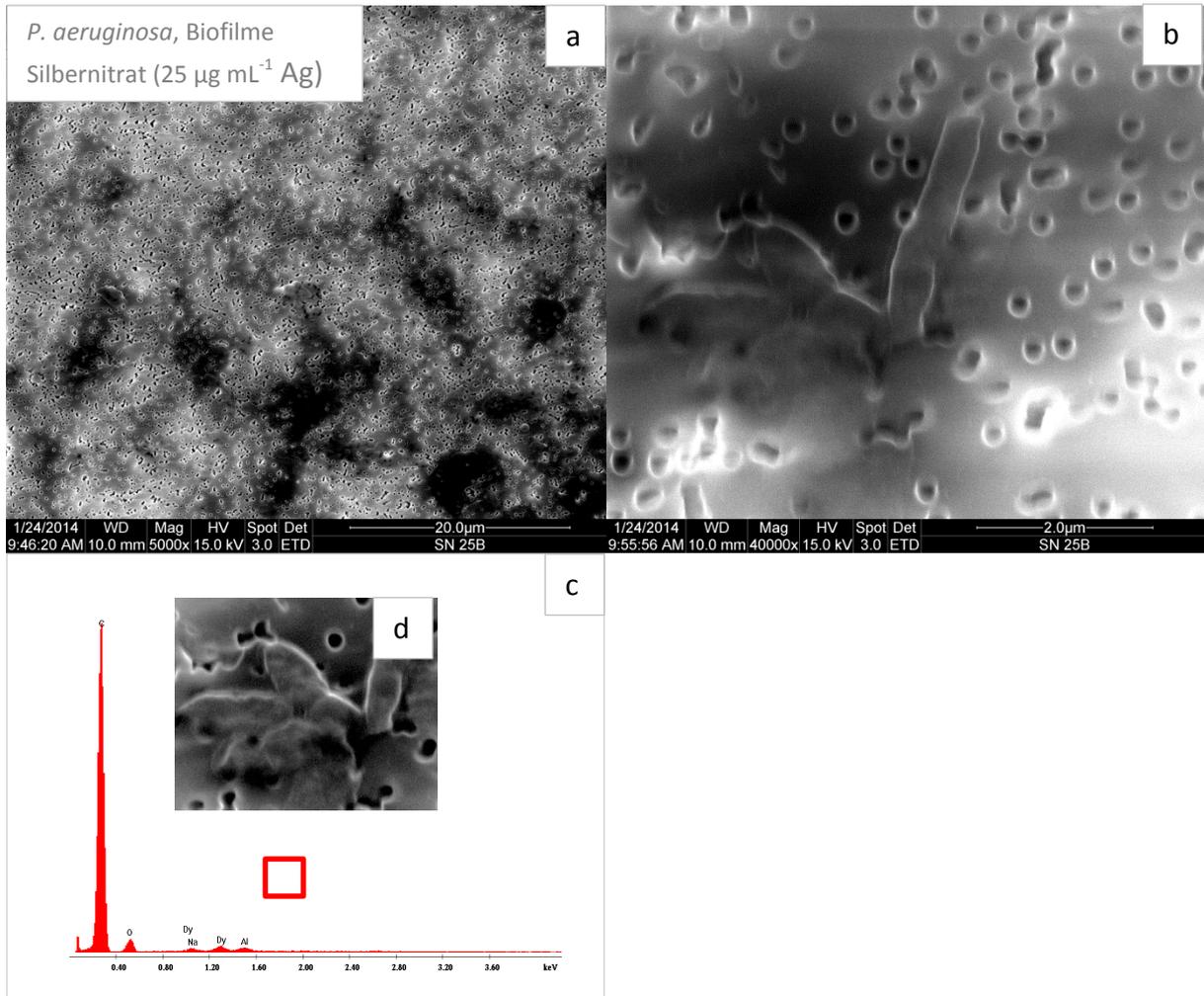


Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* AdS Biofilmzellen, welche mit Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$) im Mikrotiterplattenverfahren exponiert wurden (36°C , 24 h) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a, b) und das zugehörige EDX-Spektrum (d) im roten Kasten in Ausschnitt (e). Kohlenstoff-Sputtering (4 nm), $n=1$.

Eine Reaktion von Bakterien auf Stressoren (z.B. Mangel an Nährstoffen) kann das Schrumpfen der Bakterien sein (Barcina et al., 1997). Aus diesem Grund wurden die Zelllängen von planktonischen Bakterien und Biofilmzellen mit und ohne Exposition von AgNPs und Silbernitrat bestimmt.

Die Zelllängen von planktonischen Bakterien und Biofilmzellen, welche nicht mit Silber behandelt wurden, unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,001$) (Abbildung 43). Die Biofilmzellen waren im Durchschnitt länger als die planktonischen Bakterien. Jedoch waren sowohl bei den Biofilmen als auch bei den planktonischen Bakterien keine signifikanten Unterschiede bei Bakterien mit und ohne Silberexposition (AgNPs (500 und $1000 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$) und Silbernitrat (25 und $100 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$) zu verzeichnen.

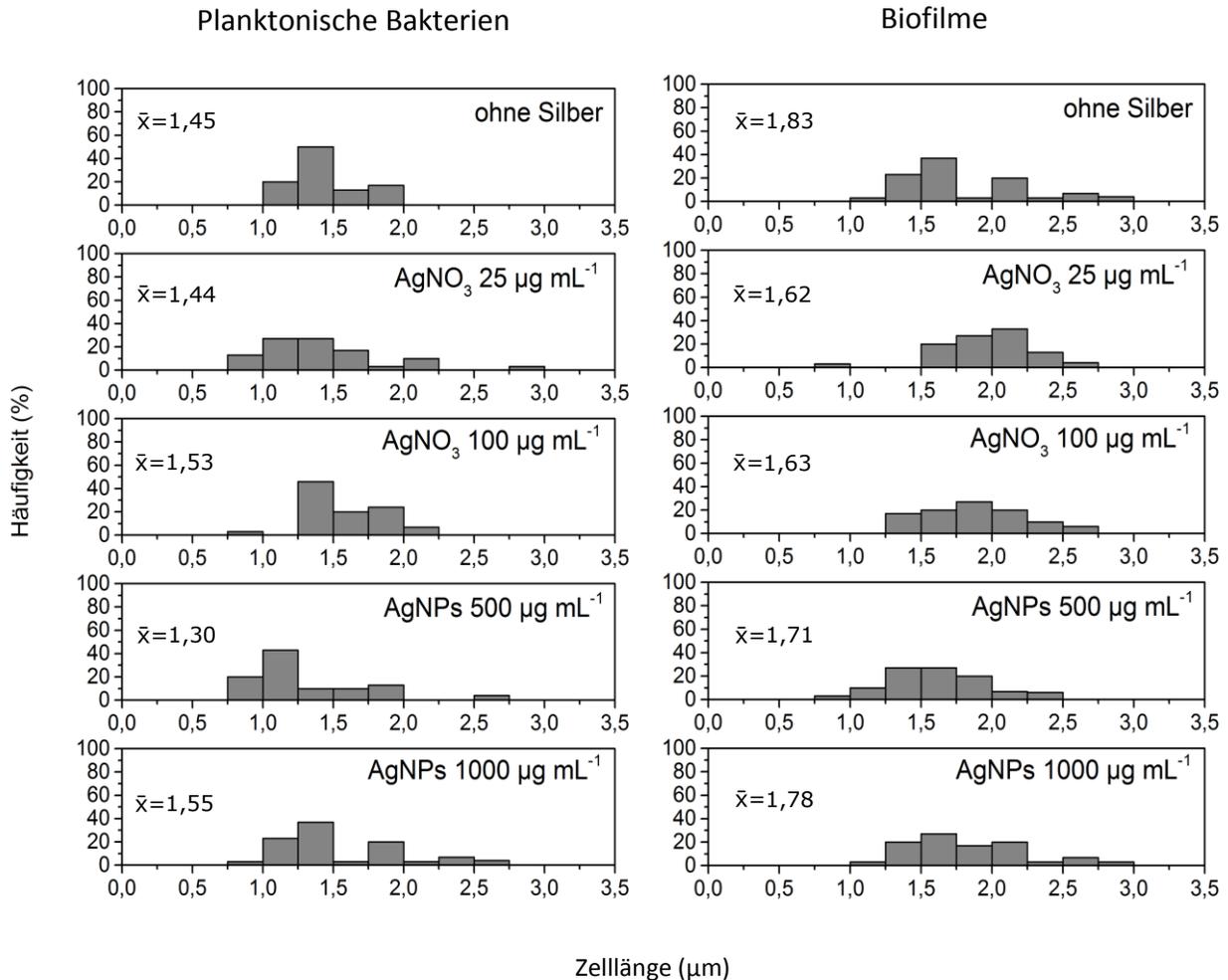


Abbildung 43: Zelllängen planktonischer Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silberexposition (AgNPs und AgNO₃), \bar{x} = mittlere Zelllänge, n=30.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die Morphologie der planktonischen Bakterien und der Biofilmzellen von *P. aeruginosa* unterschieden. AgNPs und Silbernitrat hatten keinen deutlichen Einfluss auf die Morphologie der Zellen und die Zelllängen der Biofilme. Silbernitrat (25 µg mL⁻¹) führte auch bei den Silberkonzentrationen, welche bei den planktonischen *P. aeruginosa* zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit führten, zu keinen morphologischen Veränderungen und auch zu keiner Änderung der Zelllänge. Die Inkubation mit den AgNPs (500 µg mL⁻¹), welche ebenfalls zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien führten, zeigte einige Dellen und Einstülpungen an der Zelloberfläche, aber keine Veränderung der Zelllänge. Diese Dellen und Einstülpungen waren der einzige Effekt von Silber auf *P. aeruginosa*, welcher bei den Untersuchungen des Einflusses von Silber auf die Morphologie von *P. aeruginosa* festgestellt wurde. Die AgNPs lagerten sich an der Filteroberfläche und an den Zellen ab.

5.6.5 Proteomanalytik der Biofilme im VBNC-Zustand

Zur Proteomanalyse der silbernitratexponierten planktonischen Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* wurde eine 2D-DIGE durchgeführt. Planktonische Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* wurden mit Silbernitrat und PFD als silberfreie Kontrolle (36 °C, 24 h) exponiert, die Proteine extrahiert und miteinander verglichen. Bei der 2D-DIGE wurden drei verschiedene Farbstoffe eingesetzt. Mit dem ersten Farbstoff wurde die Kontrolle ohne Silber (Abbildung 44 a, 45 a) und mit dem zweiten die silberbehandelten Bakterien angefärbt (Abbildung 44 b, 45 b). Zusätzlich wurden die beiden Proben zu einem internen Standard gepoolt und mit einem dritten Farbstoff gefärbt (Abbildung 44, 45 d). Abbildung 44 c und 45 c zeigen jeweils die überlagerten Bilder der planktonischen Bakterien und der Biofilme mit und ohne Silberexposition.

Sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen war mit und ohne Silber ein sehr ähnliches Proteinmuster zu erkennen.

Bei den planktonischen Bakterien wurden mit der 2D-DIGE insgesamt 961 Spots detektiert. Es unterschieden sich 17 Spots signifikant ($p < 0,05$) von denen der Kontrollen ohne Silber (Abbildung 46). Anhand der Intensität der Farbstoffe konnte ebenfalls beurteilt werden, ob die Proteinmenge der sich unterscheidenden Proteinspots bei silberexponierten Bakterien zu- oder abnahm. Die Intensität von zehn Proteinspots nahm bei Silberexposition ab und bei sieben nahm sie zu. Bei den Biofilmen wurden insgesamt 1081 Proteinspots detektiert, wovon sich 86 Spots signifikant unterschieden (Abbildung 47). Bei den Biofilmen nahm die Intensität von 32 Proteinspots zu und von 54 Proteinspots ab.

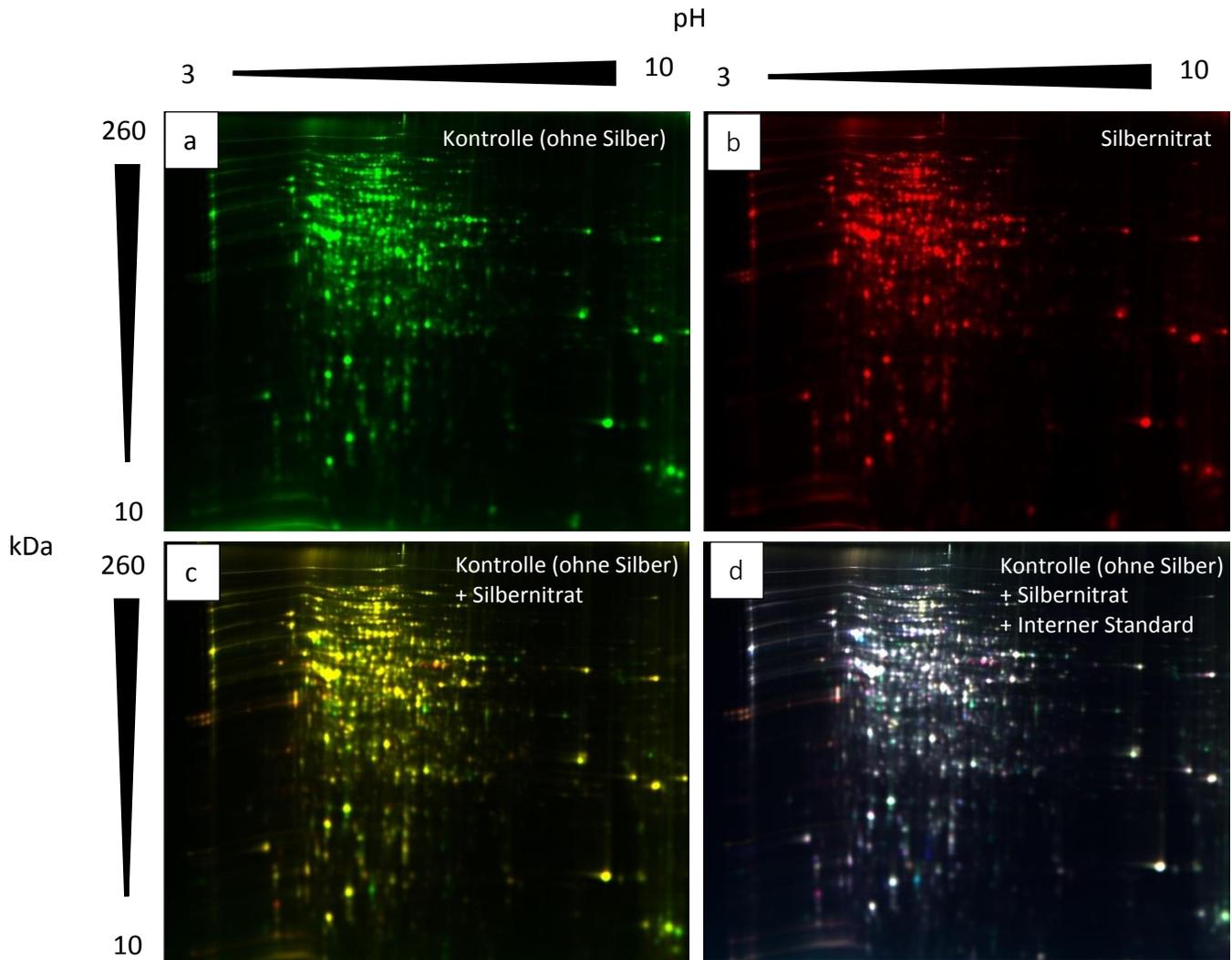


Abbildung 44: 2D-DIGE der planktonischen Bakterien der Kontrolle (a), der silberexponierten Bakterien (Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$)) (b), das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat (c) und das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat und des internen Standards (d), *P. aeruginosa* AdS, aus drei biologischen Proben.

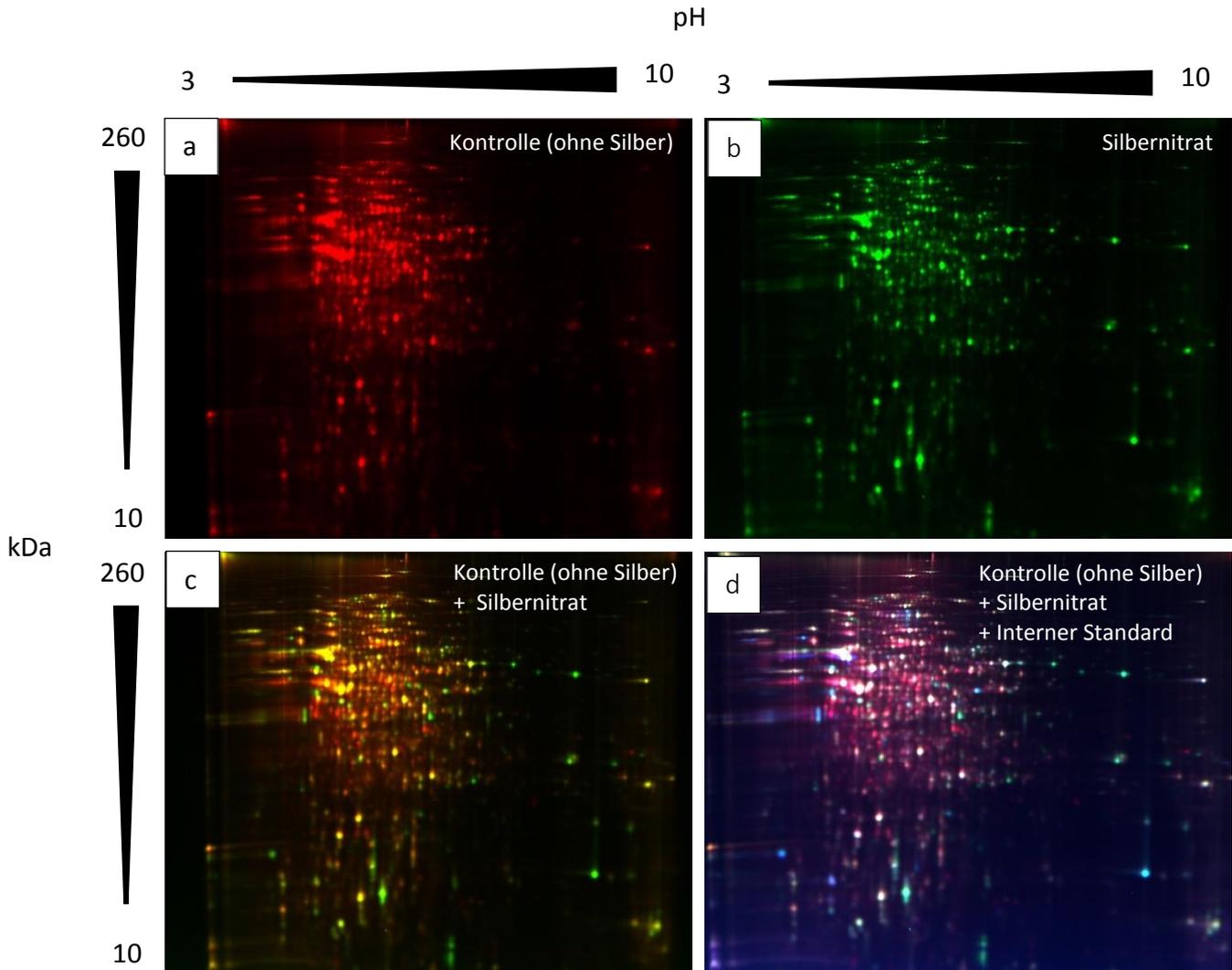


Abbildung 45: 2D-DIGE der planktonischen Bakterien der Kontrolle (a), der silberexponierten Bakterien (Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ag}$)) (b), das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat (c) und das überlagerte Bild der beiden Proben mit und ohne Silbernitrat und des internen Standards (d), *P. aeruginosa* AdS, aus drei biologischen Proben.

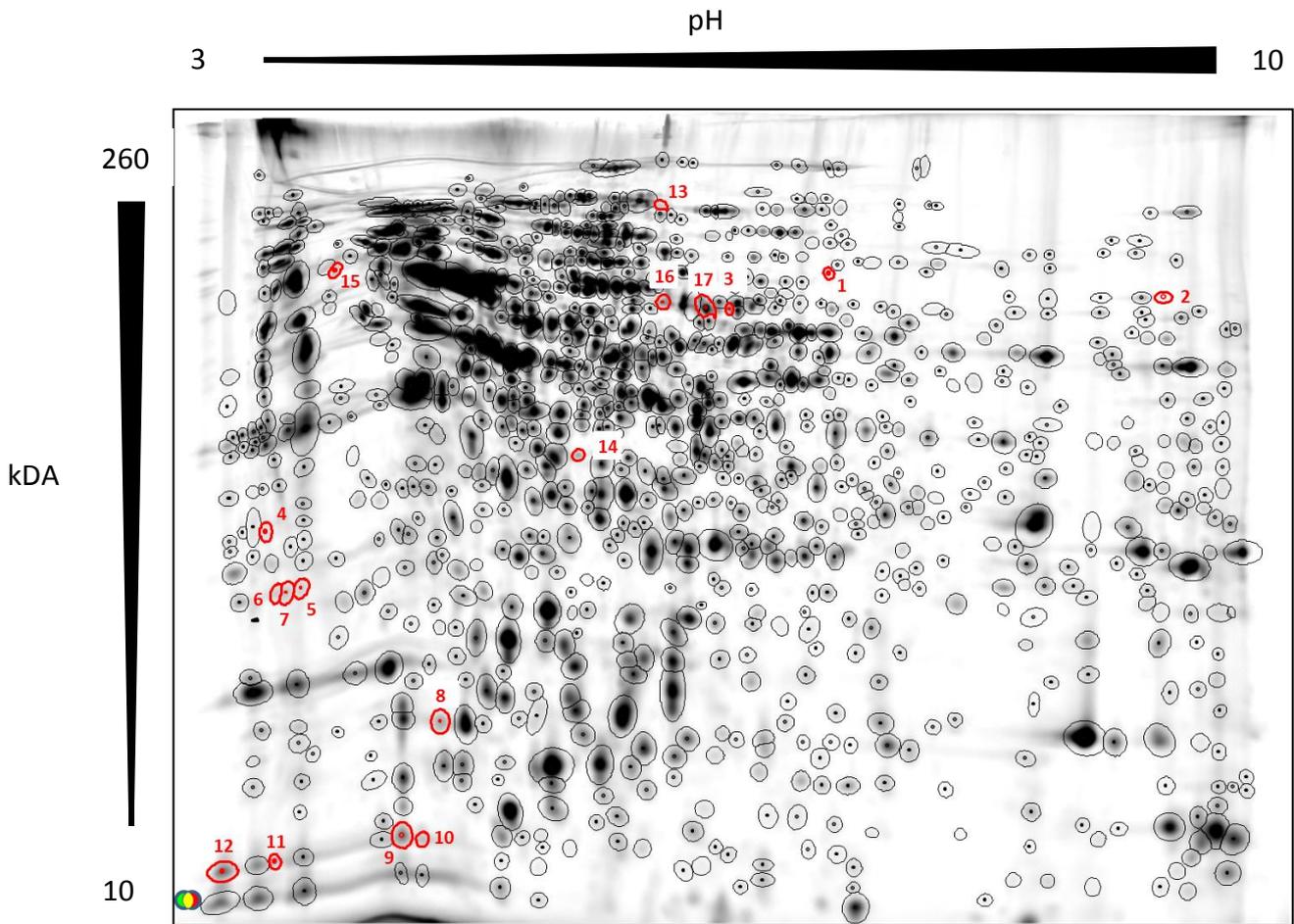


Abbildung 46: Überlagertes 2D-DIGE Bild der planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silber (Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag)). Rote Markierungen zeigen signifikant unterschiedliche Spots.

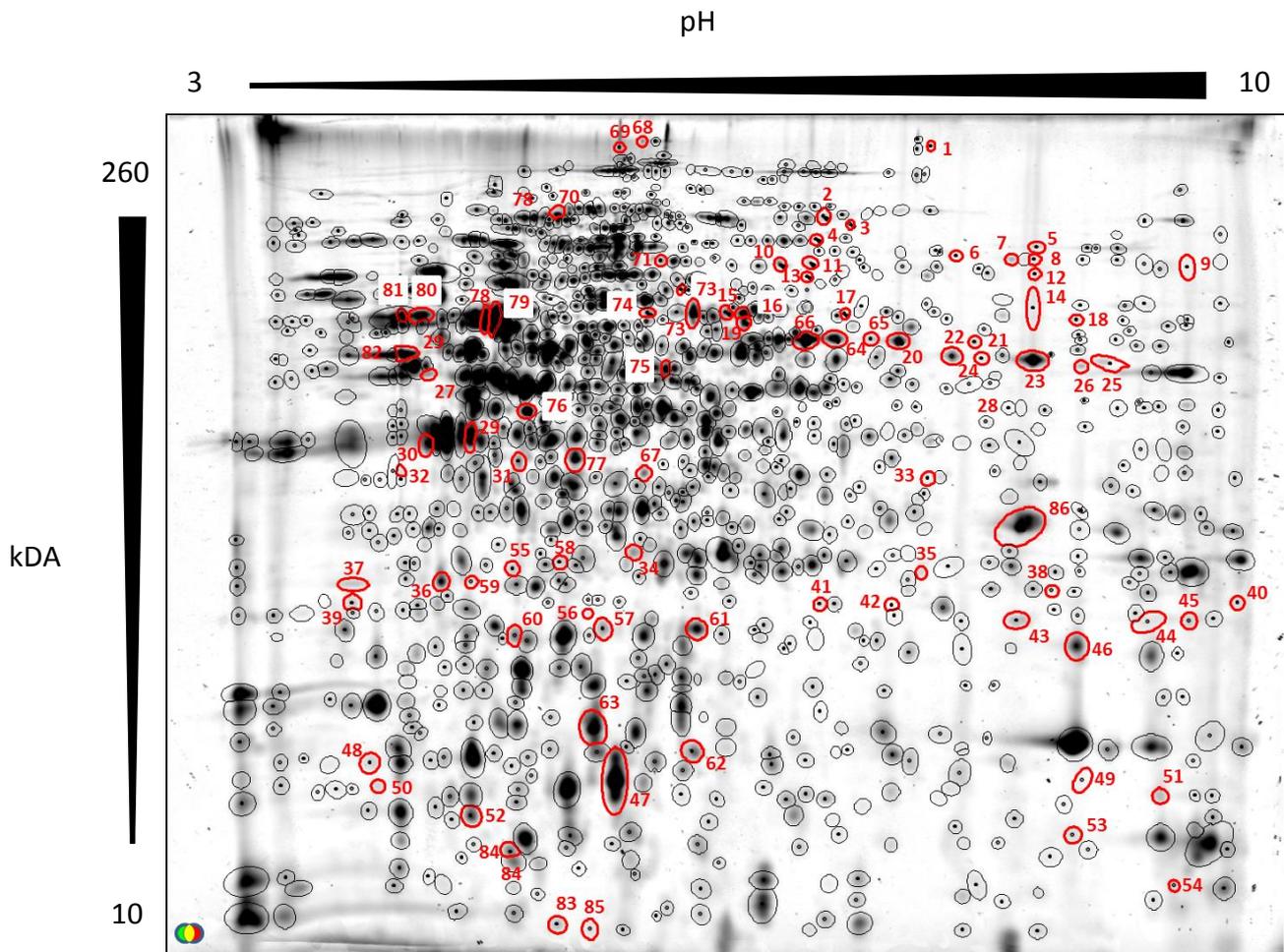


Abbildung 47: Überlagertes 2D-DIGE Bild der Biofilme von *P. aeruginosa* AdS mit und ohne Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag). Rote Markierungen zeigen signifikant unterschiedliche Spots.

Von den sich signifikant unterscheidenden Spots wurden Spots ausgewählt, welche sich um einen Faktor von 2 bezüglich ihrer Herauf- oder Herabregulierung geändert haben. Diese wurden dann aus den 2D-DIGE Gelen entfernt, aufgereinigt und mittels LC-MS untersucht.

Es konnten 20 unterschiedliche Proteine mittels Abgleich der LC-MS Daten mit einer Datenbank identifiziert werden (Tabelle 32).

Tabelle 32: Identifizierung der Proteine aus silberexponierten *P. aeruginosa* AdS Biofilmen mittels LC-MS. ^{a)}Spotnummer bezogen auf Abbildung 47. Identifikation mittels MASCOT Datenbank. Weitere Informationen: Pseudomonas.com.

Spot ^{a)}	Nummer	Beschreibung	Zellkompartiment	Molekulare Funktion	Regulationsfaktor
10	PA1737	Wahrscheinliche 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	Zytoplasma	Transport und Metabolismus von Lipiden	↓ 3,73
19	PA2014	Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase beta-Untereinheit	Zytoplasma	Transport und Metabolismus von Lipiden	↓ 2,08
21	PA3299	Fettsäure-CoA-Ligasen	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Transport und Metabolismus von Lipiden	↓ 3,80
36	PA4847	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein	unbekannt	Transport und Metabolismus von Lipiden	↓ 4,72
30	PA0552	Phosphoglyceratkinase	Zytoplasma	Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten	↓ 2,22
55	PA1013	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide Synthase	Zytoplasma	Transport und Metabolismus von Nukleotiden	↑ 3,59
52	PA0962	wahrscheinliches DNA-binde Stressprotein	Zytoplasma Extrazellulär	Transport und Matabolismus anorganischer Ionen	↓ 2,40
29	PA2951	Elektronentransferierende Flavoprotein alpha-Untereinheit	Periplasma	Energieproduktion und -konservierung	↑ 3,73
31	PA5554	ATP-Synthase beta Untereinheit	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Energieproduktion und -konservierung	↑ 2,01
83	PA5553	ATP-Synthase epsilon Untereinheit	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Energieproduktion und -konservierung	↑ 2,76

Tabelle 32: Identifizierung der Proteine aus silberexponierten *P. aeruginosa* AdS Biofilmen mittels LC-MS. ^{a)}Spotnummer bezogen auf Abbildung 47. Identifikation mittels MASCOT Datenbank. Weitere Informationen: Pseudomonas.com.

Spot ^{a)}	Nummer	Beschreibung	Zellkompartiment	Molekulare Funktion	Regulationsfaktor
74	PA5556	ATP-Synthase alpha Untereinheit	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Energieproduktion und -konservierung	↑ 2,22
46	PA5555	ATP-Synthase Gamma Untereinheit	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Energieproduktion und -konservierung	↓ 2,34
66	PA1587	Dihydropyridyl-Dehydrogenase-glc	Zytoplasma Äußere Membranvesikel	Energieproduktion und -konservierung	↓ 2,55
60	PA3529	Peroxioredoxin C	ZytoplasmaPeriplasma	Posttranslationale Modifikation Proteinumsatz Chaperone	↑ 3,39
70	PA3987	Leucyl-tRNA-Synthetase	Zytoplasma	Translation Ribosomale Struktur Biogenese	↓ 2,44
76	PA2613	konserviertes hypothetisches Protein	Zytoplasma	Replikation Rekombination und Reparatur	↓ 2,99
85	PA2853	Äußeres Membranlipoprotein OprI Precursor	Äußere Membran Äußere Membranvesikel	unbekannt	↓ 2,78
67	PA0852	Chitin-Bindeprotein CbpD Precursor	Extrazellulär	unbekannt	↓ 2,02
22	PA3922	konserviertes hypothetisches Protein	unbekannt	unbekannt	↓ 5,94

5.7 Wirkmechanismen von Silber

Die Wirkmechanismen, die bei der Interaktion von Silber, insbesondere AgNPs, mit Bakterien auftreten, sind nicht vollständig erforscht. Es gibt unterschiedliche Hypothesen bezüglich der Wirkmechanismen von Silber bei Bakterien. Zwei Hypothesen wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Holt & Bard, 2005) und die Interaktion von Silber mit funktionellen Gruppen (Thiolgruppen – Modelle für Proteine) (Schierholz, 1998; Percival et al., 2005)

Um zu untersuchen, welche Wirkmechanismen bei Exposition von Biofilmen und planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* AdS im Mikrotiterplattensystem nach Exposition mit AgNPs und Silbernitrat stattfinden, wurden unterschiedliche Substanzen ausgewählt, von denen zuvor beschrieben wurde, dass sie die Wirkung von Silber inhibieren: Natriumpyruvat (Matsumura et al., 2003), D-Mannitol (Matsumura et al., 2003), Katalase (Inoue et al., 2002), Ascorbinsäure (Kora & Arunachalam, 2010) (als Radikalfänger) und N-Acetylcystein (Liau et al., 1997) und L-Cystein (Kim et al., 2007) (als Substanzen zur Interaktion mit Thiolgruppen). Ascorbinsäure ist zusätzlich als Reduktionsmittel für Silber und N-Acetylcystein als Radikalfänger bekannt (Gillissen et al., 1997; Songping & Shuyuan, 2005).

In Vorversuch wurde festgestellt, dass die Substanzen selbst in einem ungepufferten wässrigen System den pH-Wert verändern und somit die Bakterien schädigen könnten. Aus diesem Grund wurde HEPES-Puffer (100 mM) eingesetzt, um den Einfluss der Substanzen auf die Silberwirkung zu untersuchen und einen Einfluss des pH-Wertes auf die Bakterien auszuschließen. In 100 mM HEPES lag der pH-Wert der angesetzten Lösungen zwischen pH 6,6-7.

Der Einfluss der ausgewählten Substanzen auf die Silberwirkung wurde für *P. aeruginosa* im Mikrotiterplattensystem (Abschnitt 4.10) an etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase untersucht. Vor Zugabe der AgNPs (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht 9,25 mM Ag) und Silbernitrat (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht 0,59 mM Ag) wurden diese jeweils mit den unterschiedlichen Substanzen in HEPES-Puffer (100 mM) vermischt und für 5 min inkubiert. Die Substanzen wurden im Vergleich zu AgNPs und Silbernitrat im Überschuss zugegeben (17- bis 170-fach bezogen auf Molarität). Anschließend wurde diese Mischung zu den stationären planktonischen Bakterien und Biofilmen gegeben und für 24 h bei 36 °C inkubiert.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Änderung der Kultivierbarkeit oder Gesamtzellzahl (mit und ohne Silberexposition) durch Zugabe der Substanzen (N_M) im Vergleich zur Kultivierbarkeit und Gesamtzellzahl ohne Zugabe der Substanzen (N_0) in logarithmischer Form ($\log N_M/N_0$).

Ohne Silber betrug die Gesamtzellzahl der planktonischen Bakterien durchschnittlich $1,2 \times 10^9$ Zellen pro Kavität und die der Biofilme $4,7 \times 10^7$ Zellen pro Kavität. Die Konzentrati-

on der kultivierbaren planktonischen Bakterien betrug durchschnittlich $6,1 \times 10^7$ Zellen pro Kavität und die der Biofilmzellen $1,4 \times 10^7$ Zellen pro Kavität.

Die Substanzen selbst hatten keinen Einfluss auf die Kultivierbarkeit und die Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa* (Biofilme und planktonische Bakterien) (Abbildung 48 a). Die Gesamtzellzahl blieb bei allen Bedingungen (mit und ohne Silber/ mit und ohne Substanzen) konstant.

Die Exposition mit AgNPs (9,25 mM Ag) führte bei den planktonischen Bakterien zu einer Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien um 3-4 log-Stufen. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien der Biofilme wurde um 1-2 log-Stufen verringert.

In Anwesenheit der Radikalfänger (Natriumpyruvat, D-Mannitol) sowie der Katalase wurde eine geringere Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien durch AgNPs bei planktonischen Bakterien im Vergleich zur jeweiligen Probe ohne Substanz nachgewiesen (Abbildung 48 b). Es wurde eine leichte Schutzwirkung gegen den inaktivierenden Silbereffekt gezeigt. Bei den Biofilmzellen wurde dieser Effekt nicht festgestellt.

Durch Zugabe der Substanzen, die die Interaktion von Silber mit Thiolgruppen bewirken können (Ascorbinsäure, L-Cystein und N-Acetylcystein), wurde ein deutlich geringerer inaktivierender Effekt (Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien) durch AgNPs bei planktonischen Bakterien und auch bei Biofilmen erzielt (Abbildung 48 b). Die Substanzen zeigten eine Schutzwirkung gegenüber Silber.

Eine Exposition mit Silbernitrat (0,59 mM Ag) führten bei den planktonischen Bakterien zu einer vollständigen Hemmung der kultivierbaren planktonischen Bakterien. Die Konzentration der kultivierbaren Biofilmzellen nahm um 1 bis 2 log-Stufen ab (Abbildung 48 c).

Bei Zugabe der Substanzen für Radikalfänger (Natriumpyruvat, D-Mannitol), sowie der Katalase, wurde keine deutliche Änderung der Kultivierbarkeit durch Silbernitrat, im Vergleich zur jeweiligen Probe ohne Substanz, nachgewiesen (Abbildung 48 b). Es wurde sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen keine Schutzwirkung gegen den inaktivierenden Silbereffekt detektiert.

Bei Zugabe von Ascorbinsäure, L-Cystein und N-Acetylcystein hingegen, führte Silbernitrat mit den Substanzen zu einer geringeren Abnahme der Kultivierbarkeit als ohne die Zugabe der Substanzen. Dieser Effekt gilt sowohl für planktonische Bakterien als auch für Biofilme.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und L-Cystein bei den planktonischen Bakterien und den Biofilmen, sowohl im Falle der AgNPs als auch bei Silbernitrat, eine Schutzwirkung aufwiesen. Natriumpyruvat, D-Mannitol und Katalase hingegen zeigten lediglich bei den planktonischen Bakterien, welche mit AgNPs exponiert wurden, eine Schutzwirkung.

5. Ergebnisse

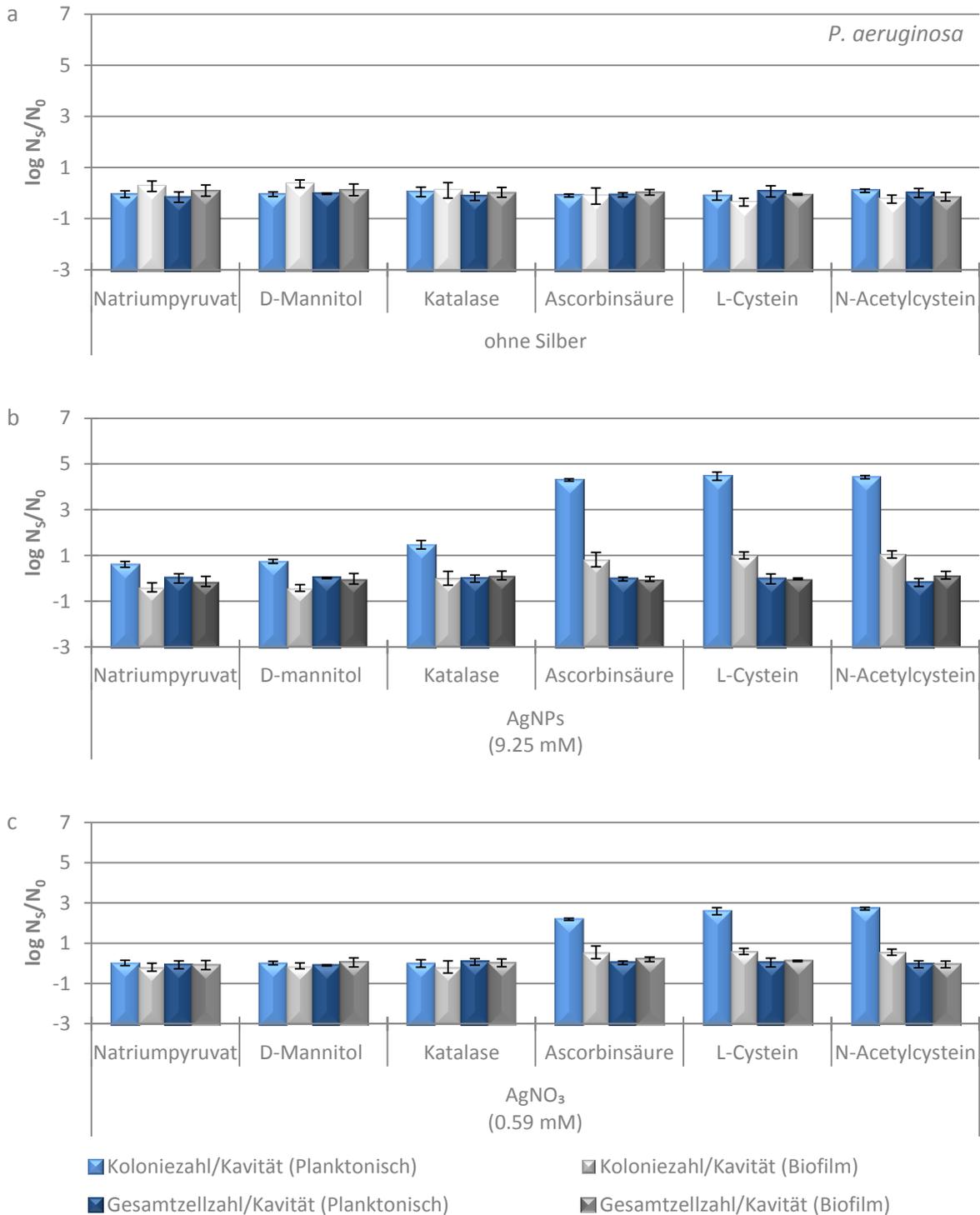


Abbildung 48: Koloniezahl und Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa* AdS (planktonische Bakterien und Biofilme) ohne Silber (a), in Anwesenheit von AgNPs (9,25 mM) (b) und AgNO₃ (0,59 mM) (c) in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7). Exposition für 24 h bei 36 °C unter Zugabe von unterschiedlichen Substanzen (Natriumpyruvat (100 mM), D-Mannitol (100 mM), Katalase (0,05 mg mL⁻¹), Ascorbinsäure (10 mM), L-Cystein (10 mM), N-Acetylcystein (10 mM)). N_s: KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Anwesenheit von Substanzen, N₀: KBE oder Gesamtzellzahl planktonischer Bakterien und Biofilme in Abwesenheit von Substanzen. N₀: 1,2 x 10⁹ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl) und 6,1 x 10⁷ Zellen pro Kavität (Koloniezahl) der planktonischen Bakterien, 4,7 x 10⁷ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl) und 1,4 x 10⁷ Zellen pro Kavität (Koloniezahl) der planktonischen Bakterien, n=2-6.

5.8 Antimikrobielle Wirksamkeit AgNP-dotierter Medizinprodukte

Zusätzlich zu den Versuchen mit AgNP-Dispersionen wurden AgNP-dotierte Medizinprodukte (Knochenzement mit und ohne Gentamicin, Titan und Kollagenfolien) bezüglich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit, der Hemmung der Biofilmbildung und des Einflusses auf die Vitalität von *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Medizinprodukte (Knochenzemente, Knochenimplantate und Wundauflagen), wurden im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts „Nanosilber - Wirkmechanismen und Untersuchungen ihrer möglichen Interaktionen mit Geweben, Zellen und Molekülen. Definition Ihres relevanten Unverträglichkeitspotentials.“ hergestellt. Die Knochenzemente bestehen aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit und ohne Gentamicin und enthalten unterschiedliche AgNP-Konzentrationen. Die Knochenimplantate bestehen aus Titan und wurden mit AgNPs durch plasmaelektrolytische Oxidation (PEO) beschichtet. Kollagenfolien zur Wundabdeckung wurden aus Schweinekollagen gewonnen und mit AgNPs versetzt. Die Medizinprodukte wurden in Form von Prüfkörpern (Durchmesser: 1 cm) seitens der Hersteller zur Verfügung gestellt. Der Einfluss der silberhaltigen Medizinprodukte auf die Bakterien wurde untersucht und mit dem von AgNP-freien Medizinprodukten verglichen.

P. aeruginosa und *S. aureus* ATCC 6538 sind gentamicinsensitiv und *S. epidermidis* ATCC 35984 ist gentamicinresistent (Abschnitt 5.2.3).

5.8.1 Wachstumshemmung

Um einen etwaigen wachstumshemmenden Effekt der Prüfkörper (Knochenzement mit und ohne Gentamicin (0, 3, 4 und 5 mg g⁻¹ Ag) sowie Titan (0 und 2,5 % Ag)) auf die Testorganismen *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 zu untersuchen, wurde ein Agardiffusionstest in Anlehnung an EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) durchgeführt. Hierzu wurden Bakterien auf MH-Agar ausgestrichen und die Prüfkörper auf die Agaroberfläche aufgelegt. Stoffe, die von dem Prüfkörper in den Agar diffundieren, können so zu einer Hemmung des Bakterienwachstums führen. Nach 24 h bei 36 °C wurde ein etwaiger Hemmhof um den Prüfkörper vermessen.

Bei den Knochenzementen ohne Gentamicin und dem Titan waren bei keiner Silberkonzentration und bei keinem der Teststämme Hemmhöfe um die Prüfkörper zu erkennen. Bei den Knochenzementen mit Gentamicin waren um alle Prüfkörper und bei allen Testorganismen Hemmhöfe vorhanden. Die Hemmhofdurchmesser waren jedoch unabhängig von der An- oder Abwesenheit von AgNPs und deren Konzentration (Abbildung 49). Der antimikrobielle Effekt war nicht auf Silber zurückzuführen. In den Hemmhöfen des gentamicinresistenten *S. epidermidis* waren im Vergleich zu den anderen Stämmen kleine Kolonien in den Hemmhöfen vorhanden. Dies wird nach EUCAST nicht als Hemmhof betrachtet (EUCAST, 2013b)

Es wurde also in diesem Testsystem kein wachstumshemmender Effekt, durch AgNPs in den Prüfkörpern, festgestellt. *P. aeruginosa* und *S. aureus* waren empfindlicher gegenüber Gentamicin als *S. epidermidis*. Offensichtlich gab es keine Freisetzung von Silber in das umgebende Agarmedium in wachstumshemmenden Konzentrationen.

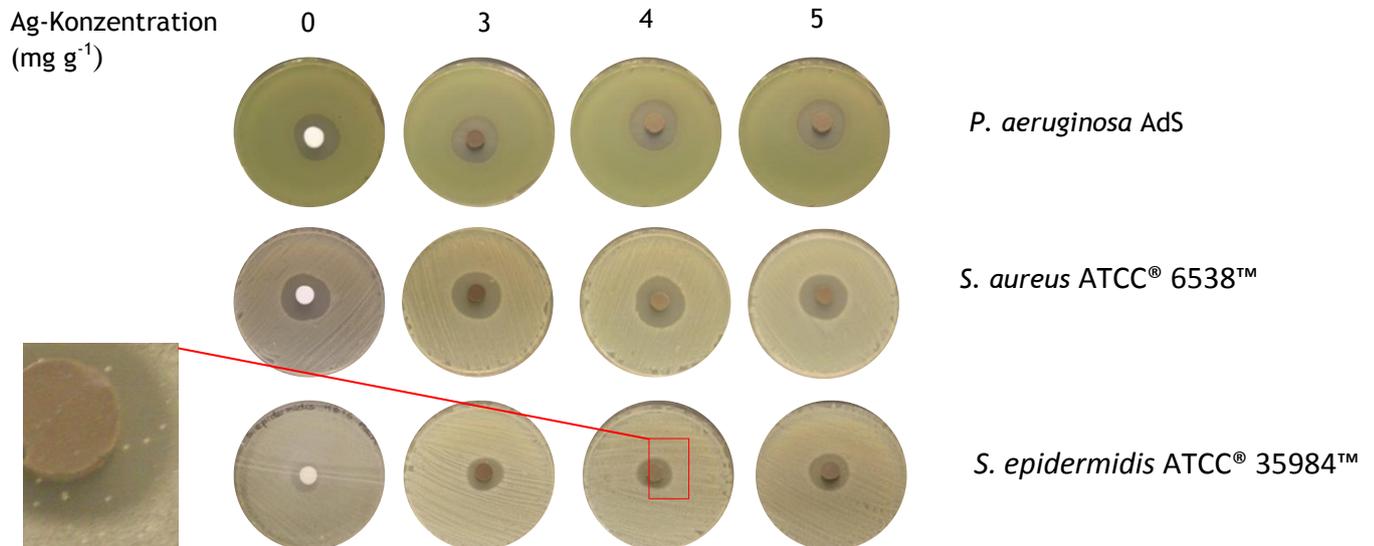


Abbildung 49: Hemmhofstest der gentamicinhaltigen Knochenzement bei *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 mit unterschiedlichen AgNP-Konzentrationen (0-5 mg g⁻¹ Ag). Aufsicht auf Agarplatten mit Prüfkörpern in der Mitte.

5.8.2 Biofilmbildung auf AgNP-dotierten Medizinprodukten

Um zu untersuchen, ob AgNPs in immobilisierter Form in den Prüfkörpern (Knochenzemente mit und ohne Gentamicin sowie Titan) zu einer Hemmung der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 führt, wurden Biofilme auf den Prüfkörpern mit und ohne Silber angezchtet und das Ausmaß der Biofilmbildung quantifiziert und verglichen. Zudem wurde untersucht, ob die Vitalität der Bakterien durch AgNP-haltige Medizinprodukte beeinflusst wird.

Hierzu wurden die Prüfkörper jeweils in eine Kavität einer Mikrotiterplatte mit 6 Kavitäten gelegt. Untersucht wurden Knochenzemente ohne Gentamicin mit unterschiedlichen AgNP-Konzentrationen (0, 3, 4, 5 mg g⁻¹ Ag) und Titan (0, 2,5 % Ag) in Kombination mit *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*. Die gentamicinhaltigen Knochenzemente (0, 3, 4, 5 mg g⁻¹ Ag) wurden zusätzlich mit dem gentamicinresistenten Bakterienstamm *S. epidermidis* getestet. Der Prüfkörper in den Mikrotiterplatten wurde mit einer Bakteriensuspension in LB-Medium überschichtet. Zur Vermehrung der Bakterien und der Biofilmbildung auf den Prüfkörpern wurde der Ansatz bei 36 °C für 24 h und 7 d inkubiert.

5.8.2.1 Quantifizierung der Biofilmbildung

Nach 24 h und 7 d wurden die Prüfkörper (Abschnitt 5.8.2) entnommen, die nicht adhären-ten Bakterien durch Waschen entfernt und die Oberseiten der Prüfkörper (Biofilme) mit Kristallviolett gefärbt. Zudem wurde die Absorption des Überstandes der Kultur bei 570 nm bestimmt, um die Vermehrung der Bakterien in der flüssigen Phase zu beurteilen.

Die mit Kristallviolett gefärbten Oberseiten der Knochenzement-Prüfkörper sind exemplarisch für *P. aeruginosa* AdS in Abbildung 50 dargestellt.

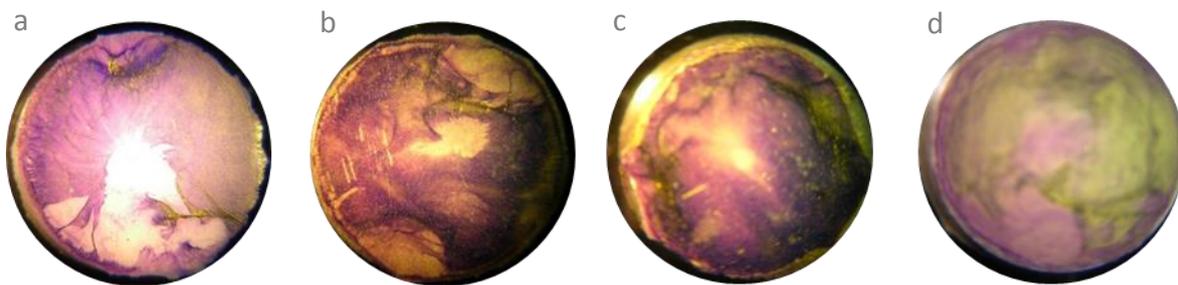


Abbildung 50: Mit Kristallviolett angefärbte Biofilme von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement ohne AgNPs (a) und mit AgNPs, 3 (b), 4 (c), 5 (d) mg g⁻¹ nach 7 d in LB-Medium (36 °C).

Nach Trocknung der Prüfkörper wurde das Kristallviolett durch Eintauchen der Prüfkörper in Essigsäure (30 % (v/v)) abgelöst und die Absorption der wässrigen Lösung photometrisch bei 570 nm bestimmt.

P. aeruginosa wuchs in allen Kavitäten (Knochenzemente mit und ohne Silber sowie Titan mit und ohne Silber) zu einer stark getrübbten Kultur heran. Im Vergleich zu der Absorption nach 24 h hat die Absorption der Bakterien nach 7 d bei keinem der Prüfkörper weiter signifikant ($p > 0,05$) zugenommen (Abbildung 51 a, c, e, g). Auch die Biofilmbildung nach 7 d unterschied sich nicht signifikant ($p > 0,05$) von der nach 24 h (Abbildung 51 b, d, f, h). Die Biofilmbildung war generell auf den Knochenzementen höher als auf Titan. Nach 24 h und 7 d war sowohl bei den Knochenzementen als auch bei Titan kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen der Absorption der Kultur und der Biofilmbildung von AgNP-haltigen Prüfkörpern und den silberfreien Kontrollen zu erkennen.

Auch *S. aureus* ist in allen Kavitäten (Knochenzement mit und ohne AgNPs sowie Titan mit und ohne AgNPs) zu einer stark getrübbten Kultur angewachsen. Sowohl das Wachstum in den Kavitäten (Abbildung 52 a, c, e, g) als auch die Biofilmbildung (Abbildung 52 b, d, f, h) auf den Prüfkörpern, war nach 7 d nicht signifikant ($p > 0,05$) höher als nach 24 h. Dies betraf sowohl die Knochenzement- als auch die Titan-Prüfkörper. Im Vergleich zur silberfreien Kontrolle wurde das Wachstum von *S. aureus* innerhalb von 24 h und 7 d in den Kavitäten durch die silberhaltigen Prüfkörper (Knochenzemente und Titan) nicht signifikant ($p > 0,05$) gehemmt. Wie auch bei *P. aeruginosa* war die Biofilmbildung auf den Knochenzementen gene-

rell höher als auf Titan. Zudem wurden sowohl bei Knochenzement als auch bei Titan keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen der Biofilmbildung auf den silberfreien und auf den AgNP-dotierten Prüfkörpern festgestellt. Dies betraf sowohl die Inkubationszeit von 24 h als auch von 7 d.

Auch bei *S. epidermidis* waren alle Kavitäten der Mikrotiterplatten gleichmäßig bewachsen. Bei diesem Bakterienstamm war jedoch zu erkennen, dass er dazu tendierte am Boden der Mikrotiterplatte zu sedimentieren. Die Absorption der Kultur (Abbildung 53 a, c, e) war bei allen Prüfkörpern nach 7 d etwas höher als nach 24 h und die Biofilmbildung (Abbildung 53 b, d, f) etwas niedriger. Sowohl nach 24 h als auch nach 7 d gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen der Biofilmbildung und dem Wachstum der Kultur auf silberfreien und AgNP-dotierten Prüfkörpern. Dies traf sowohl für die Knochenzemente als auch für Titan zu.

Auch bei den Knochenzementen mit Gentamicin war kein statistisch signifikanter Unterschied der Hemmung der Biofilmbildung sowie des Wachstums der Kultur zwischen den silberhaltigen und den silberfreien Prüfkörpern zu verzeichnen (Abbildung 54).

Das Wachstum von *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurde in den Kavitäten mit den Knochenzementen mit Gentamicin vollständig gehemmt (Daten nicht gezeigt).

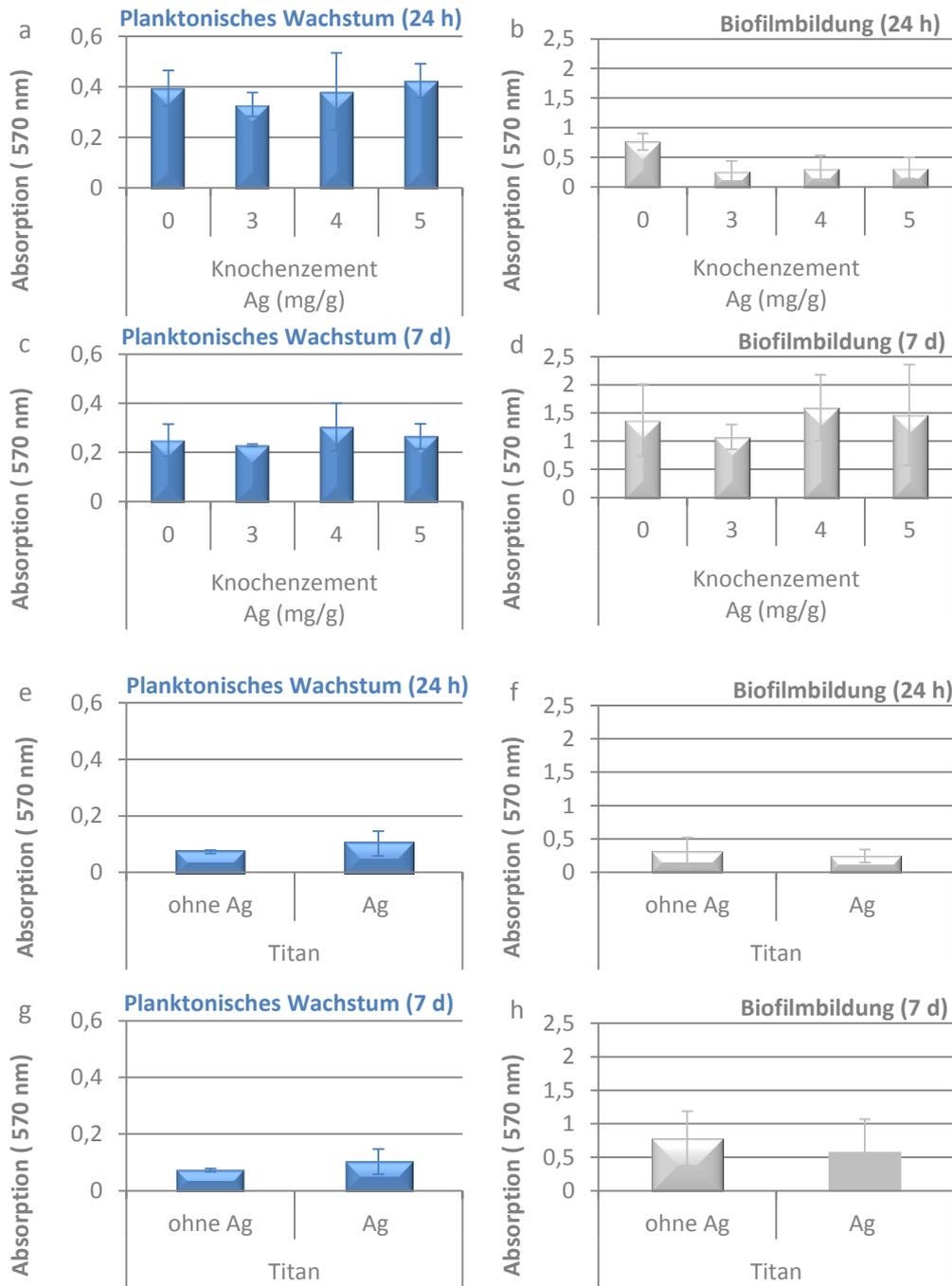


Abbildung 51: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, n=3.

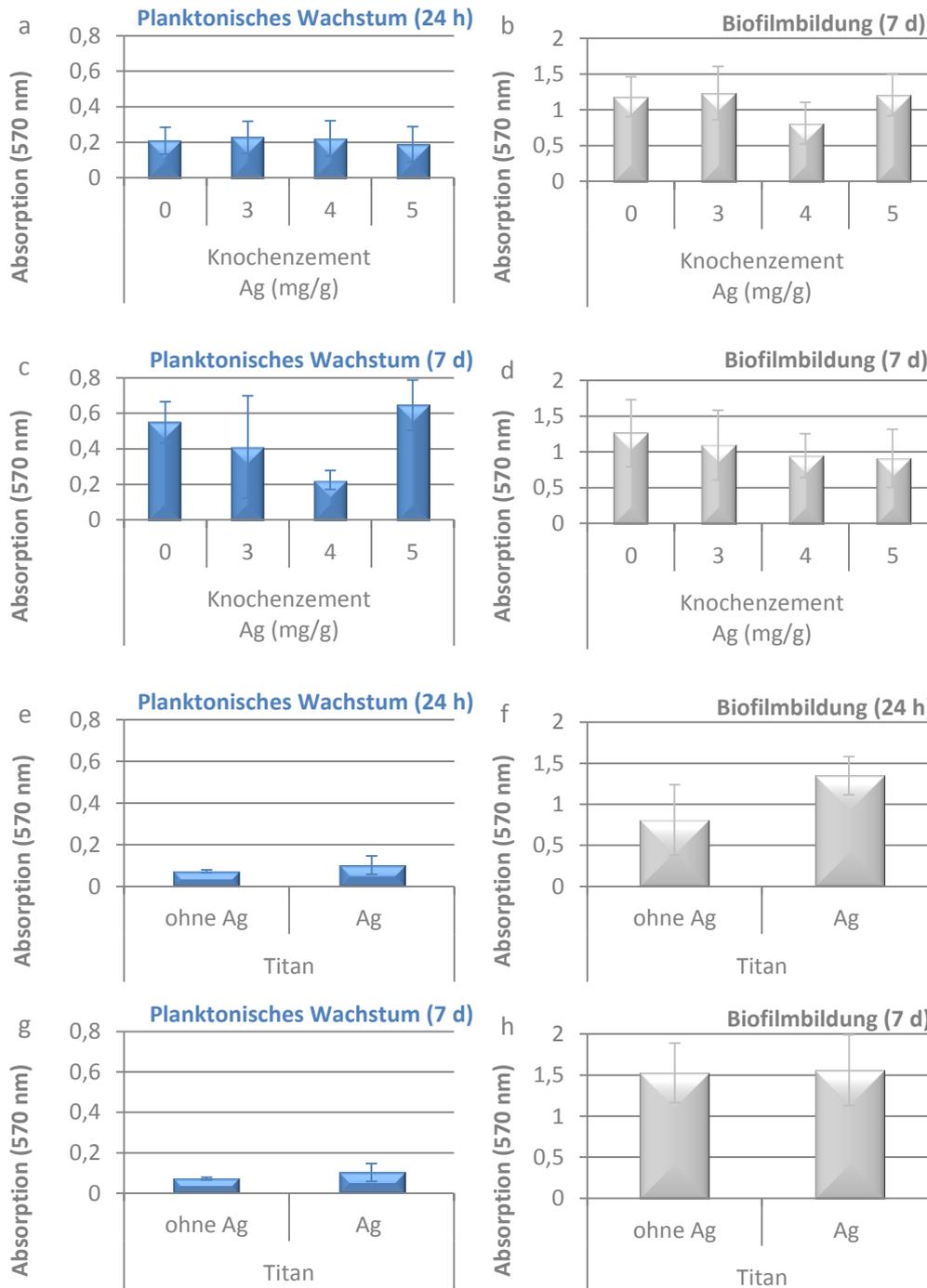


Abbildung 52: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *S. aureus* ATCC 6538 auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, n=3.

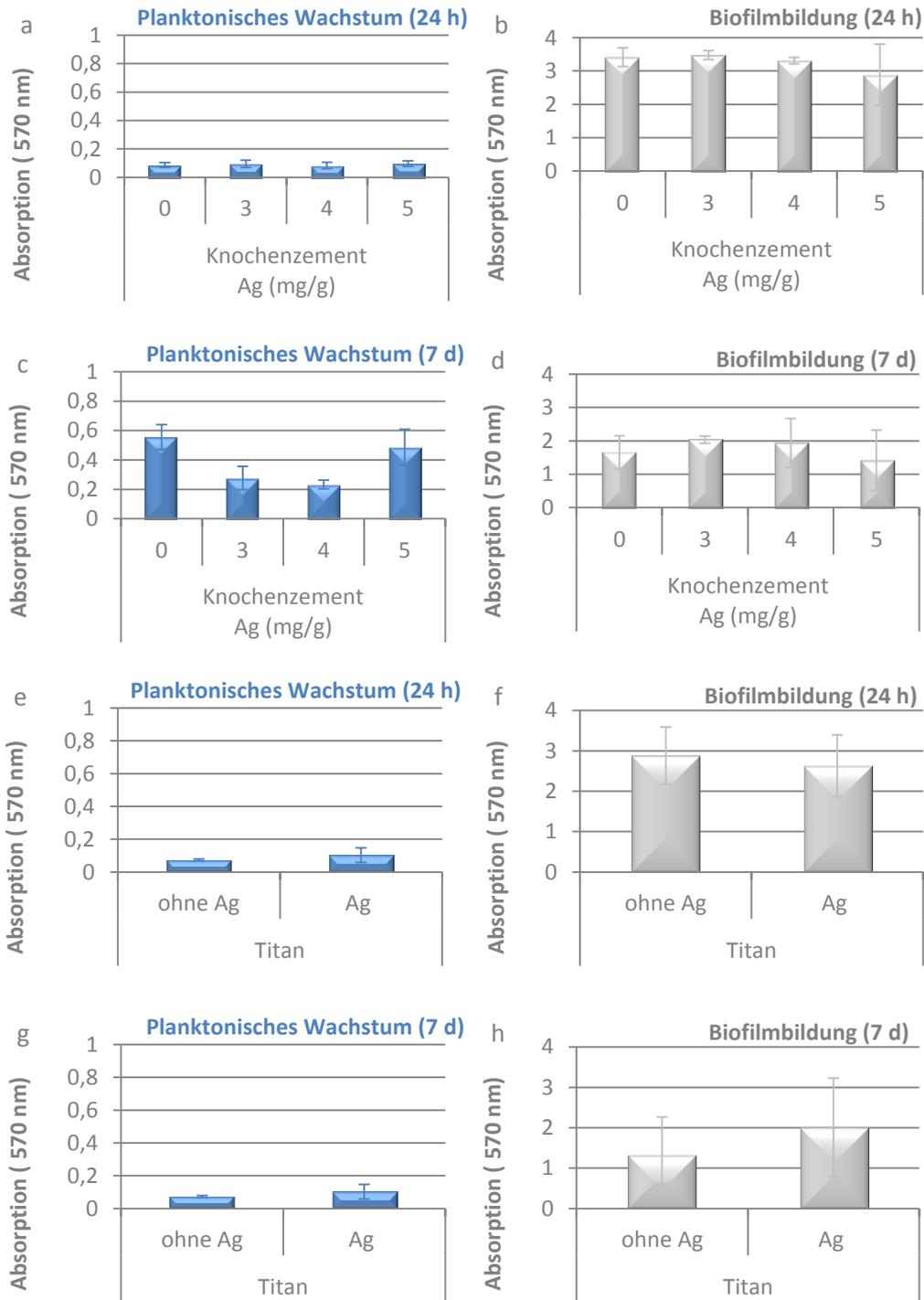


Abbildung 53: Planktonisches Wachstum (a, c, e, g) und Biofilmbildung (b, d, f, h) von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement- und Titan-Prüfkörpern mit und ohne AgNPs, n=3.

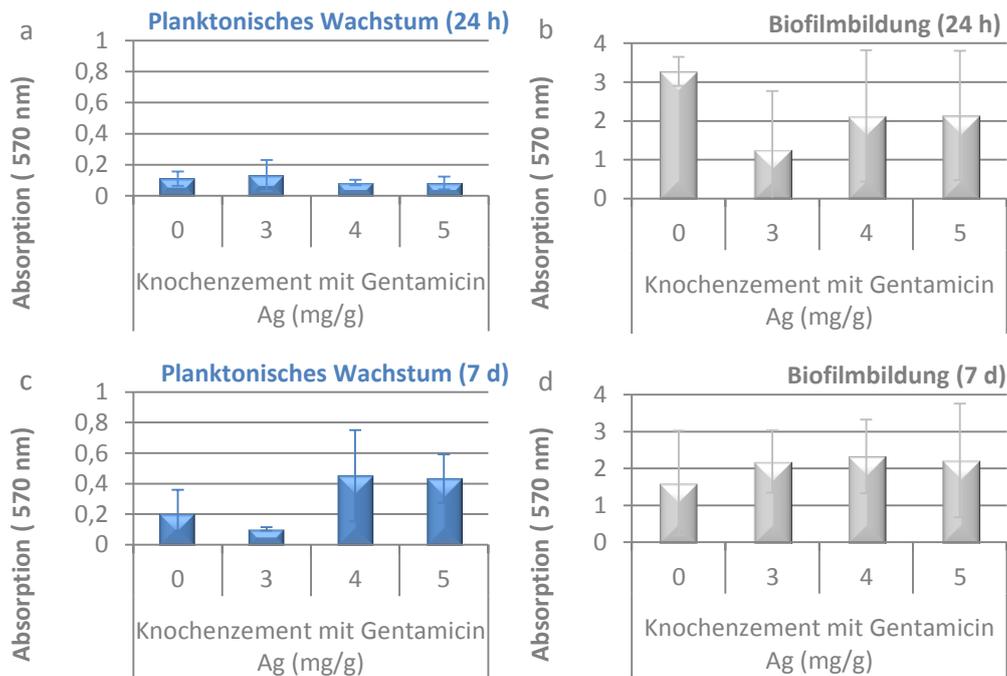


Abbildung 54: Planktonisches Wachstum (a, c) und Biofilmbildung (b, d) von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement mit Gentamicin mit und ohne AgNPs, n=3.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die AgNPs in den Prüfkörpern weder die Biofilmbildung noch das Wachstum der Kultur im Überstand von *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 hemmten. Es gab auch keinen konzentrationsabhängigen Effekt der AgNPs in den Knochenzementen.

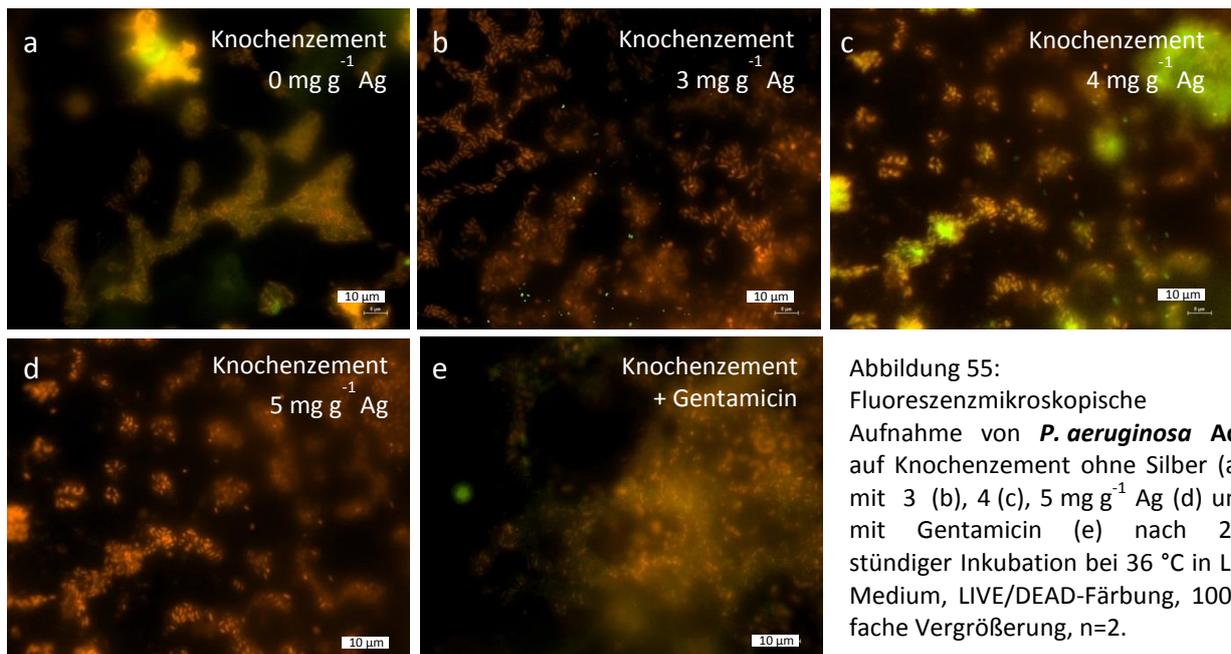
P. aeruginosa AdS und *S. aureus* ATCC 6538 wurden durch das in den Prüfkörpern enthaltene Gentamicin vollständig gehemmt, der gentamicinresistente *S. epidermidis* ATCC 35984 nicht.

5.8.2.2 Visualisierung der Vitalität der Bakterien auf den Medizinprodukten

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 auf silberdotierten Knochenzementen, Titan und Kollagenfolien Biofilme bilden. Die Biofilmbildung wurde durch die Anwesenheit von AgNPs nicht gehemmt. Um die Vitalität der Bakterien auf der Oberfläche der Prüfkörper zu visualisieren, wurden diese auf der Prüfkörperoberfläche mit dem LIVE/DEAD-Kit angefärbt. Eine quantitative Aussage ist mit dieser Methode nicht möglich. Hierzu wurden AgNP-dotierte Medizinprodukte mit *P. aeruginosa* AdS, *S. aureus* ATCC 653, *S. epidermidis* ATCC 35984 in 7 mL LB-Medium (1×10^5 Zellen mL^{-1}) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit sechs Kavitäten gegeben und bei 36 °C statisch inkubiert. Nach 24 h wurden die Prüfkörper entnommen, in PFD gewaschen, die Biofilme mit dem LIVE/DEAD-Kit angefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung direkt auf der Prüfkörperoberfläche mit der Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Mit der LIVE/DEAD-Färbung unterscheidet man zwischen membrangeschädigten und membranin-

takten Bakterien. Bakterien, die noch Membranintegrität aufweisen fluoreszieren grün und membrangeschädigte Zellen rot.

Bei *P. aeruginosa* waren auf den Knochenzementen Zellcluster, aber auch freie Flächen ohne angeheftete Bakterien, zu erkennen (Abbildung 55). Bezüglich der Vitalität der Bakterien waren keine eindeutigen Unterschiede im Vergleich zur silberfreien Kontrolle zu erkennen. Sowohl auf den Knochenzementen ohne AgNPs als auch mit AgNPs, war ein Großteil der Bakterien rot gefärbt.



Auf den Titan Prüfkörpern waren ebenfalls Zellcluster und freie Flächen zu beobachten. Auf dem Titan mit AgNPs waren mehr Bakterien zu erkennen als auf der silberfreien Kontrolle. Bezüglich der Vitalität waren zwischen der silberfreien Kontrolle und dem silberbeschichteten Titan keine Unterschiede zu erkennen. Die meisten Bakterien wiesen eine intakte Zellmembran auf (grüne fluoreszierende Zellen) (Abbildung 56).

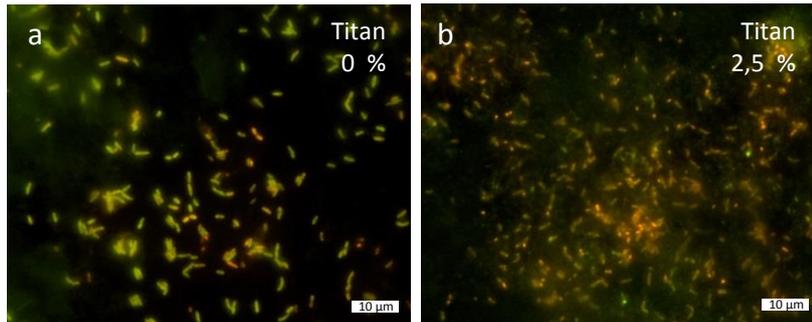


Abbildung 56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* AdS auf Titan ohne Silber (a) und mit Silber (2,5 %) (b) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2.

Auch die dritte Gruppe (Kollagenfolien mit und ohne Silber) wurde getestet. Es wurde festgestellt, dass sich die Kollagenfolien in Anwesenheit von *P. aeruginosa* innerhalb von 24 h bei 36 °C auflösen. Deshalb konnten keine fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden. *P. aeruginosa* besitzt Kollagenasen. Hierbei handelt es sich um eine extrazelluläre Protease, welche in der Lage ist Kollagen abzubauen (Diener et al., 1973).

Bei der Inkubation mit *S. aureus* waren die Knochenzemente ohne Gentamicin vollständig mit adhärennten Bakterien bedeckt (Abbildung 57). Mit steigender Silberkonzentration nahm die Konzentration von rot gefärbten (membrangeschädigten Bakterien) zu. Dennoch war der Anteil der membranintakten Bakterien noch relativ hoch. Beim Knochenzement mit Gentamicin, wurde das Wachstum deutlich gehemmt (Abbildung 57 e). Es waren nur sehr vereinzelte Zellen auf dem Prüfkörper vorhanden.

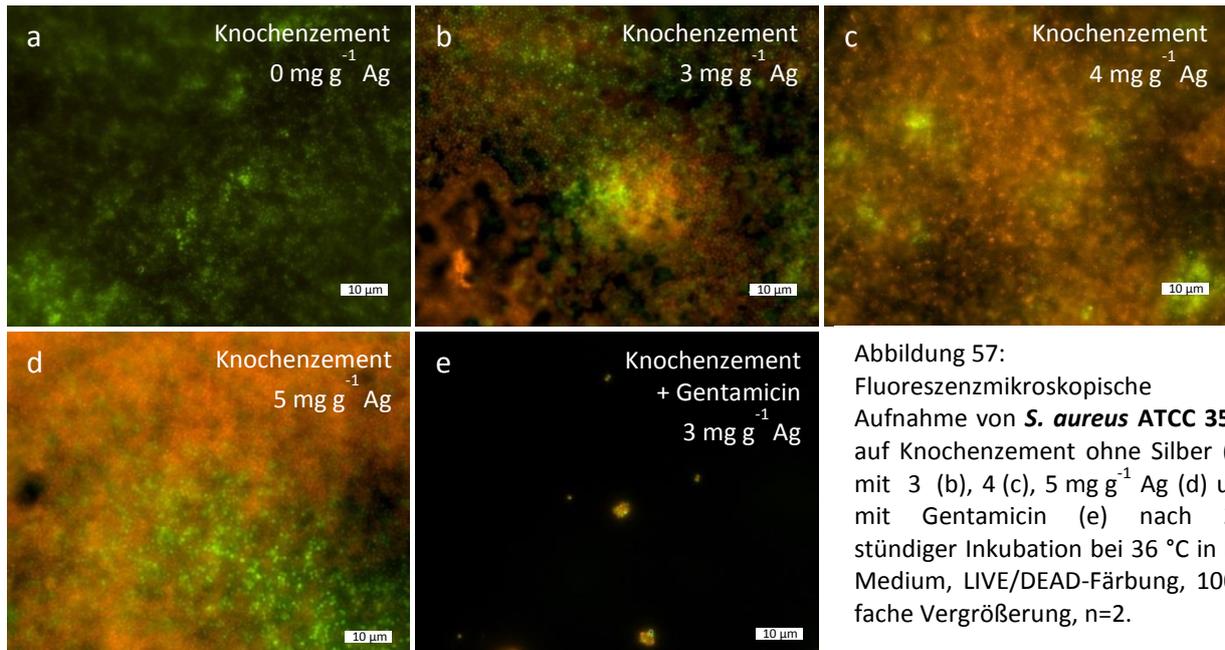


Abbildung 57:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 3538 auf Knochenzement ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c), 5 mg g⁻¹ Ag (d) und mit Gentamicin (e) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2.

Die Titan-Prüfkörper waren großflächig mit *S. aureus* bedeckt (Abbildung 58). Dennoch waren auch einige unbedeckte Bereiche vorhanden. Es ist keine Abnahme der Vitalität durch Silber im Vergleich zur Kontrolle ohne Silber zu verzeichnen. Sowohl auf der Kontrolle als auch auf dem AgNP-haltigen Titan waren grün fluoreszierende Zellen zu erkennen.

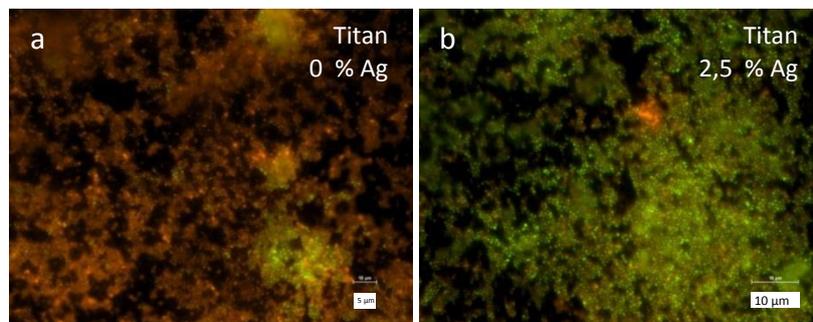


Abbildung 58: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 6538 auf Titan ohne Silber (a) und mit 2,5 % Ag (b) nach 24 h bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2.

In Anwesenheit von *S. aureus* ATCC 6538 wurden die Kollagenfolien nicht wie bei *P. aeruginosa* AdS aufgelöst, obwohl auch *S. aureus* Kollagenasen besitzt (Dinges et al., 2000). Auf den Kollagen-Prüfkörpern mit und ohne Silber hat *S. aureus* einen größtenteils flächendeckenden Biofilm gebildet (Abbildung 59). Auf beiden Prüfkörpern (mit und ohne Silber) waren grün fluoreszierende Zellen zu verzeichnen. Bezüglich der Vitalität der Bakterien waren also keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

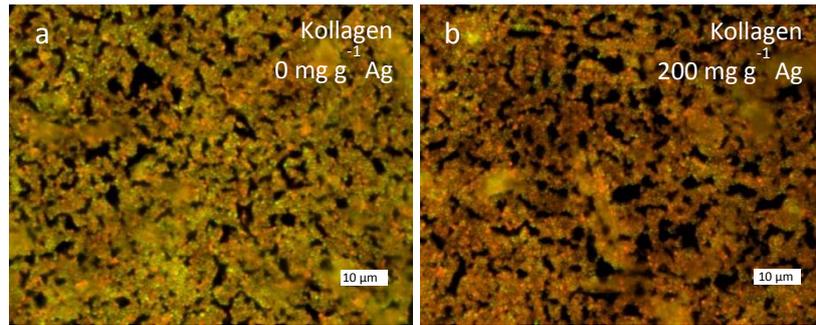


Abbildung 59: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* ATCC 6538 auf Kollagen ohne Silber (a) und mit $200 \text{ mg g}^{-1} \text{ Ag}$ (b) nach 24 h bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung. $n=2$

S. epidermidis hat flächendeckend Biofilme auf Knochenzement (mit und ohne Silber) gebildet (Abbildung 60). Die Zellen der Kontrolle ohne Silber fluoreszierten grün. Auch die Knochenzemente mit 4 und $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ Ag}$ wiesen grün fluoreszierende Zellen auf. Bei der niedrigsten Silberkonzentration ($3 \text{ mg g}^{-1} \text{ Ag}$) hatte der Anteil an rot fluoreszierenden Zellen (membrangeschädigten Bakterien) deutlich zugenommen.

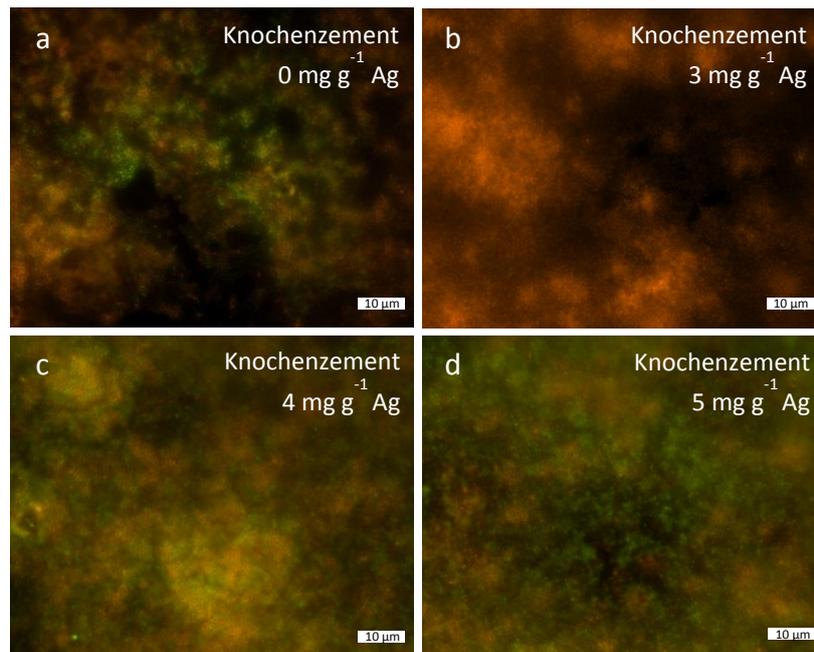


Abbildung 60: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c), $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ Ag}$ (d) und mit Gentamicin (e) nach 24-stündiger Inkubation bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, $n=2$.

Im Vergleich zu den anderen Teststämmen (*P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538), ist *S. epidermidis* ATCC 35984 gentamicinresistent. Diese Resistenz wurde mittels EUCAST-Methode überprüft (Abschnitt 5.2.3). Dieser Stamm bildet im Vergleich zu den anderen Teststämmen auch auf Knochenzementen mit Gentamicin Biofilme (Abbildung 61). Sowohl auf der silberfreien Kontrolle als auch auf den AgNP-haltigen Prüfkörpern waren vornehmlich

grün fluoreszierende Zellen vorhanden. Es war also kein Unterschied bezüglich der Vitalität der Biofilme auf den Prüfkörpern mit und ohne AgNPs zu verzeichnen.

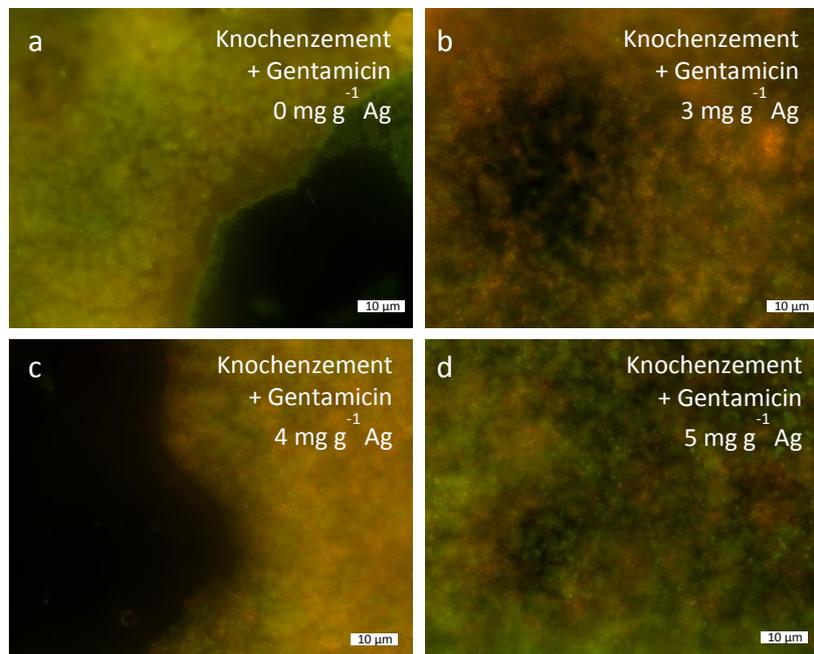


Abbildung 61: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Knochenzement mit Gentamicin ohne Silber (a), mit 3 (b), 4 (c) und 5 mg g⁻¹ Ag (d) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2.

S. epidermidis bildete auf den Titan-Prüfkörpern (Abbildung 62) und den Kollagenfolien (Abbildung 63) flächendeckende Biofilme. Auch bei den Titanprüfkörpern und den Kollagenfolien war kein Einfluss von AgNPs auf die Biofilmbildung oder die Vitalität von *S. epidermidis* zu erkennen. Bei beiden Prüfkörpern (mit und ohne AgNPs) waren vornehmlich grün fluoreszierende Zellen vorhanden.

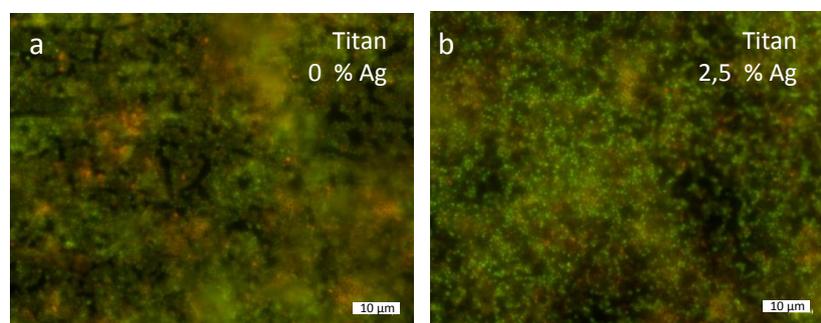


Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Titan ohne Silber (a) und mit 2,5 % Ag (b) nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, n=2

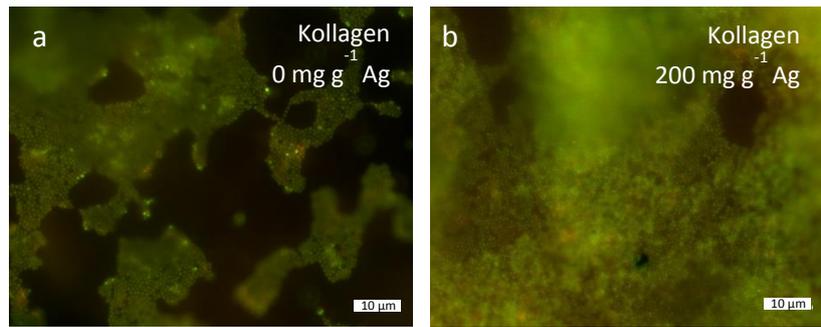


Abbildung 63: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* ATCC 35984 auf Kollagen ohne Silber (a) und mit $200 \text{ mg g}^{-1} \text{ Ag}$ (b) nach 24-stündiger Inkubation bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ in LB-Medium, LIVE/DEAD-Färbung, 1000-fache Vergrößerung, $n=2$.

Prinzipiell waren auf allen Prüfkörpern ohne Gentamicin bei allen drei Bakterienstämmen Biofilme nachzuweisen. Die Biofilmbildung wurde nicht durch die Anwesenheit von AgNPs gehemmt. *S. aureus* ATCC 6538 und *S. epidermidis* ATCC 35984 bildeten dichtere Biofilme auf den Prüfkörpern als *P. aeruginosa* AdS.

Die Vitalität von *P. aeruginosa* AdS wurde nicht eindeutig durch AgNPs in den Knochenzementen beeinflusst. Im Falle von *S. aureus* ATCC 6538 war bei den Knochenzementen ein silberkonzentrationsabhängiger Effekt auf die Vitalität zu verzeichnen. Es waren jedoch bei der höchsten AgNP-Konzentration noch membranintakte Bakterien zu verzeichnen. Im Falle von *S. epidermidis* wurde die Vitalität durch Knochenzement mit der niedrigsten Silberkonzentration beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen war dies nicht der Fall.

Die silberhaltigen Titan-Prüfkörper und Kollagenfolien hatten keinen Einfluss auf die Vitalität aller drei Bakterienstämme.

Das Wachstum und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* AdS und *S. aureus* ATCC 6538 wurde in den Kavitäten und auf den Oberflächen der Knochenzemente mit Gentamicin deutlich gehemmt. Der gentamicinresistente Stamm *S. epidermidis* ATCC 35984 hat flächendeckend Biofilme auf den Knochenzementen mit Gentamicin gebildet. Die Vitalität wurde nicht durch Anwesenheit von AgNPs in den Prüfkörpern beeinflusst.

5.8.2.3 Vitalität der Biofilme auf den Medizinprodukten

Um die antimikrobielle Wirksamkeit und eine etwaige Inhibierung der Biofilmbildung der Prüfkörper (Knochenzement mit und ohne Gentamicin, Titan) auf *P. aeruginosa* AdS genauer zu untersuchen, wurden diese, wie in Abschnitt 5.8.2 beschrieben, mit *P. aeruginosa* in LB-Medium überschichtet und für 24 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurden zunächst die Prüfkörper gewaschen, um nicht adhärierte Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Biofilmzellen von der Prüfkörper-Oberfläche abgelöst. Es wurden die Kultivierbarkeit, der Anteil von membranintakten Bakterien (PMA-qPCR) sowie die Summe aller Bakterien (Gesamtzellzahl - qPCR) bestimmt. Als Kriterium für die Vitalität der Bakterien wurden die Kultivierbarkeit und die Membranintegrität herangezogen.

Die Kavitäten der Knochenzement-Prüfkörper ohne Gentamicin sowie der Titan-Prüfkörper waren nach 24 h, durch starkes Bakterienwachstum, unabhängig vom Silbergehalt, getrübt. Die Kavitäten der Knochenzemente mit Gentamicin waren hingegen nicht getrübt. Das Wachstum von *P. aeruginosa* war bei den gentamicinhaltigen Prüfkörpern deutlich gehemmt.

Bei allen Knochenzementen ohne Gentamicin waren die Bakterien in den Kavitäten der Mikrotiterplatte gewachsen. Die Zellzahl auf den Prüfkörpern betrug 2,3 bis $6,4 \times 10^7$ Zellen pro Prüfkörper (Tabelle 33).

Tabelle 33: Gesamtzellzahl (qPCR) von *P. aeruginosa* AdS auf den Prüfkörpern.

Material	Ag-Konzentration	Gesamtzellzahl (qPCR) pro Prüfkörper (0,785 cm ²)
Knochenzement	0 mg g ⁻¹	$6,4 \times 10^7$
	3 mg g ⁻¹	$3,9 \times 10^7$
	4 mg g ⁻¹	$2,5 \times 10^7$
	5 mg g ⁻¹	$2,3 \times 10^7$
Knochenzement + Gentamicin	0 mg g ⁻¹	$3,3 \times 10^7$
	5 mg g ⁻¹	$5,2 \times 10^7$
Titan	0 % (w/w)	$1,5 \times 10^7$
	2,5 (w/w)	$9,2 \times 10^7$

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind dargestellt als Änderung der Kultivierbarkeit, der Gesamtzellzahl und der membranintakten Bakterien auf Prüfkörpern mit AgNPs (N_{Ag}) im Vergleich zu den silberfreien Kontrollen (N_0) in logarithmischer Form ($\log N_{Ag}/N_0$) (Abbildung 64).

Bei allen in den Knochenzementen enthaltenen Silberkonzentrationen (0-5 mg g⁻¹), hat die Gesamtzellzahl (qPCR), im Vergleich zur silberfreien Kontrolle, nicht abgenommen (Abbildung 64 a). Es wurde kein deutlicher Unterschied zwischen der Gesamtzellzahl (qPCR), der Kultivierbarkeit und den membranintakten Bakterien nachgewiesen. Der Anteil der kulti-

vierbaren und membranintakten *P. aeruginosa* auf den Prüfkörpern wurde nicht durch das Vorhandensein von AgNPs beeinflusst (Abbildung 64 a).

Auf den Knochenzement-Prüfkörpern mit Gentamicin wies *P. aeruginosa* eine um etwa 3 log-Stufen niedrigere Gesamtzellzahl auf, als auf den Knochenzement-Prüfkörpern ohne Gentamicin (Tabelle 33). Kulturell waren die Bakterien auf Knochenzement mit Gentamicin nicht mehr nachweisbar. Sowohl die Gesamtzellzahl (qPCR) als auch die kultivierbaren und membranintakten Bakterien unterscheiden sich nicht deutlich in Abhängigkeit von der Silberkonzentration in den Prüfkörpern (Abbildung 64 b).

Auf den Titan-Prüfkörpern wurden $9,2 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^7$ Zellen (qPCR) detektiert (Tabelle 33). Es wurde also kein deutlicher Unterschied der Gesamtzellzahl (qPCR) auf den Prüfkörpern mit und ohne AgNPs festgestellt. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien hingegen war bei den silberdotierten Titan-Prüfkörpern um eine log-Stufe niedriger als bei Titan ohne Silber. Bei der Anzahl der membranintakten Bakterien hingegen war mit und ohne Silber kein deutlicher Unterschied zu verzeichnen.

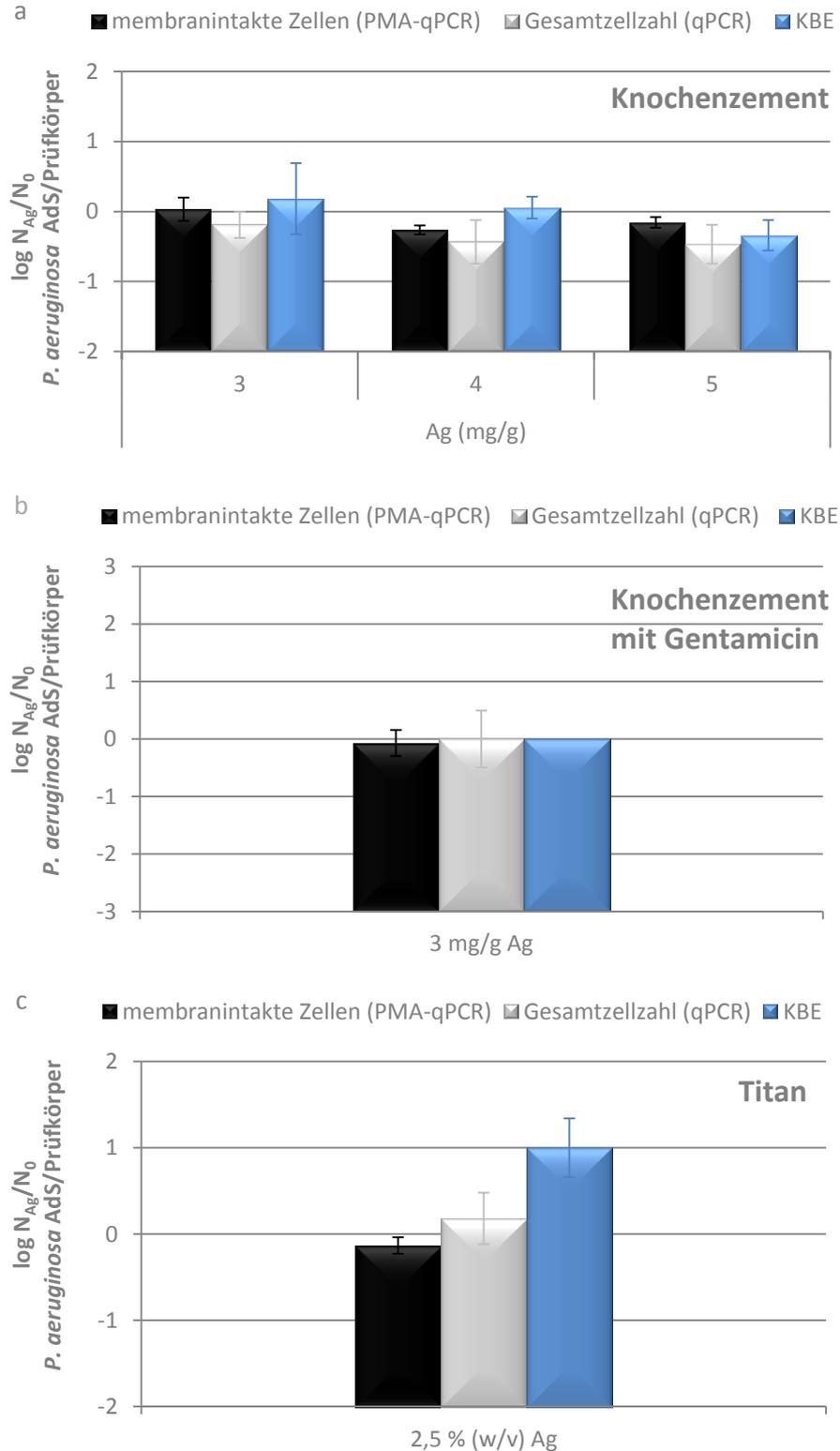


Abbildung 64: Koloniezahl (KBE), Gesamtzellzahl (qPCR) und membranintakte Bakterien (PMA-qPCR) von *P. aeruginosa* AdS auf Knochenzement (3, 4, 5 mg g⁻¹ Ag) (a), Knochenzement mit Gentamicin ohne Silber (b) und Titan (0, 2,5 %) (c), Inkubation in LB-Medium, 36 °C, 24 h. N_{Ag} : KBE, membranintakte Zellen und Gesamtzellzahl pro Prüfkörper mit AgNPs, N_0 : KBE, membranintakte Zellen und Gesamtzellzahl pro Prüfkörper ohne AgNPs, n=3-5.

6 Diskussion

6.1 Eigenschaften der AgNPs und deren Verhalten in Nährmedien

Um das Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten AgNPs in unterschiedlichen Medien zu untersuchen, wurde eine Teil-Charakterisierung der Partikel durchgeführt. Eine Charakterisierung der Partikel bezüglich ihrer Größe und deren Verteilung, ihres Zetapotentials und ihrer Stabilität in unterschiedlichen biologischen Nährmedien wurde durchgeführt.

Die Partikelgrößenbestimmung der AgNPs mittels TEM ergab einen mittleren Partikeldurchmesser von $6,73 \pm 4,8$ nm. Die Partikelgröße bewegte sich über eine Spanne von 1,9-32,5 nm, wovon jedoch 81,7 % kleiner als 10 nm und 96,7 % kleiner als 20 nm waren. Der Hydrodynamische Durchmesser (Z-Average-Wert, Dynamische Lichtstreuung) betrug 35,62 nm.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AgNPs sind kommerziell erhältlich (AgPURE W10 – ras materials GmbH) und entsprechen dem NM300 Material, welches von der OECD zur Beurteilung der Sicherheit von Nanopartikeln verwendet wird (Kaegi et al., 2011; Klein et al., 2011). Dieses Material wurde in einem Bericht des „Joint Research Centre“ der Europäischen Kommission untersucht und charakterisiert (Klein et al., 2011). In dieser Studie wurde anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass zwei Partikelgrößen in der Dispersion dominieren (5,42 und 15,03 nm). Der maximale Durchmesser, der ermittelt wurde (32,59 nm) entspricht in etwa dem, der in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde (32,5 nm) (Klein et al., 2011). Klein et al. (2011) haben anhand der dynamischen Lichtstreuung einen Durchmesser von 50-70 nm ermittelt. Der mit DLS bestimmte Durchmesser (Auftragung nach Streulichtintensität/Z-Average-Wert) der Partikel ergab in der vorliegenden Arbeit ebenfalls einen deutlich größeren Partikeldurchmesser als der, der bei der Größenbestimmung mit der Transmissionselektronenmikroskopie ermittelt wurde. Zum einen liegt dies daran, dass bei der Dynamischen Lichtstreuung die Solvat- und Hydrathülle von Partikeln mitgemessen wird, wohingegen bei der Transmissionselektronenmikroskopie nur der metallische Kern abgebildet wird (Jun et al., 2008). Die AgNPs sind durch die Emulgatoren Tween 20 und Tagat TO stabilisiert. Zum anderen besitzt die Methode der Dy-

namischen Lichtstreuung zur Partikelgrößenbestimmung einige Limitierungen. Die Intensität des gestreuten Lichtes ist proportional zur sechsten Potenz des Partikelradius (Rayleigh-Streuung). Aus diesem Grund können wenige große Partikel in der Dispersion zu einer Überschätzung des Partikeldurchmessers bei Auftragung nach Streulichtintensität führen (Demeester et al., 2005). Der PDI der AgNPs in entionisiertem Wasser betrug 0,472. Der PDI gibt Auskunft über die Heterogenität der Größenverteilung einer Dispersion (Kaegi et al., 2011). Ein PDI von 0,472 beschreibt eine heterogene Größenverteilung (Malvern, 2012).

Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie) zeigten, dass eine relativ heterogene Partikelgrößenverteilung vorliegt. Polydisperse AgNP-Dispersionen sind instabiler als streng monodisperse Dispersionen. Bei der sogenannten Ostwald-Reifung verringert sich der Massefluss mit geringerer Differenz der Partikelradien (Pacholski et al., 2002). Eine heterogene Partikelgrößenverteilung führt somit zu einer tendenziellen Größenveränderung der Partikel über die Zeit.

Man unterscheidet bei der Stabilisierung von Nanopartikeln zwischen elektrostatischer und sterischer Stabilisierung (Jiang et al., 2009). Die Bestimmung des Zetapotentials ergab in etwa ein Potential von 0 mV. Ein Zetapotential von 0 mV würde bei ausschließlich elektrostatisch stabilisierten Partikeln zügig zu einer Destabilisierung der Partikel führen. Da die Partikel jedoch durch die Emulgatoren sterisch stabilisiert sind, ist dies nicht der Fall. Die Stabilität der AgNPs unterschied sich, je nachdem in welchem Medium die AgNPs dispergiert waren.

Es wurde festgestellt, dass die Stabilität der Bakterien sowohl abiotisch (Nährmedien) als auch biotisch (bakterielle Enzyme) beeinflusst werden kann. Bei den Nährmedien, welche für Untersuchungen von silberexponierten Bakterien unter wachsenden Bedingungen bei 36 °C eingesetzt wurden, lies sich die Stabilität folgendermaßen einordnen: NB > LB > CASO. Es wurde nachgewiesen, dass alle drei verwendeten Bakterienstämme (*P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*) in der Lage sind die Emulgatoren, welche die AgNPs stabilisieren, durch Lipasen zu spalten. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Eigenschaft zusätzlich die Stabilität der AgNPs beeinflusst, wenn diese mit den Bakterienstämmen inkubiert werden.

Da LB-Medium für das Wachstum und die Biofilmbildung der Bakterien besser geeignet war als NB- und erste Untersuchungen zeigten, dass die AgNPs in CASO-Medium sehr instabil waren, wurde LB-Medium ausgewählt und das Verhalten der AgNPs in diesem Medium genauer untersucht. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Partikel nach 24-stündiger Inkubation bei 36 °C in LB-Medium ihre Größe verringerten und somit scheinbar Silberionen abgaben. Die Untersuchungen der Dynamischen Lichtstreuung zeigten jedoch auch, dass die Partikel in LB sofort nach Zugabe der AgNPs zum LB-Medium agglomerieren/aggregieren und die Partikelgröße nach 24 h noch einmal deutlich zugenommen hat. Ob es sich um eine Agglomeration oder um eine Aggregation der Partikel handelt ist nicht klar (Jiang et al., 2009). Zudem kann auch eine Proteinkorona zur Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers führen (Kaur und Tripathi et al., 2011). Auch hier

sind wieder die Limitierungen der Dynamischen Lichtstreuung zu beachten. Jedoch ergibt sich ein deutlicher Trend, der darauf hinweist, dass die Partikel in LB-Medium destabilisiert werden und agglomerieren/aggregieren. Sheng und Liu (2011) beobachteten einen ähnlichen Effekt von AgNPs in PBS. Der Peak der Partikelgrößenverteilung, welche mittels DLS bestimmt wurde, verschiebt sich bei AgNPs in PBS bereits nach 0 h zu einer größeren Partikelgröße als bei den AgNPs in Wasser. Nach 24 h Inkubation ist das Peakmaximum ebenfalls weiter zu einer größeren Partikelgröße verschoben. Zhou et al. (2012) untersuchten drei unterschiedliche AgNPs, welche in LB inkubiert waren und zeigten mittels Transmissions-elektronenmikroskopie, dass die AgNPs aggregierten.

Loza et al. (2014b) zeigten, dass Silberionen in der Anwesenheit von Chlorid in einem Medium als Silberchlorid ausfallen und dass sich hierbei Silberchlorid-Nanopartikel bilden können. Die Größe der entstandenen Silberchlorid-Nanopartikel war abhängig von der Proteinkonzentration im jeweiligen Medium. In LB-Medium beispielsweise wurden die Partikel nur 50 nm groß, in PBS hingegen 500-1000 nm. Es wird vermutet, dass die Proteine im Medium eine Corona um die Partikel bilden, die diese von der Reifung abhält. In ihre Studie über den Einfluss von Halogeniden in Nährmedien auf die Toxizität von Silberionen auf Bakterien zeigten Gupta & Maynes (1998), dass Natriumchloridkonzentrationen von 10 g L^{-1} die Toxizität von Silbernitrat verstärken. Loza et al. (2014a) untersuchten in einer weiteren Studie zudem das Verhalten von AgNPs in biologischen Medien. Sie zeigten, dass AgNPs durch Anwesenheit von molekular gelöstem Sauerstoff oxidiert werden und somit Silberionen freisetzen. Sie zeigten zudem, dass AgNPs in Medien mit Cystein (als Modell für schwefelhaltige Proteine) interagierten. Cystein kann die Oberfläche der AgNPs blockieren und dadurch eine weitere Freisetzung von Silberionen verhindern. In der Anwesenheit von Chlorid im Medium wurden die freigesetzten Silberionen ebenfalls umgehend als Silberchlorid gefällt. Hierbei bildeten sich Silberchlorid-Nanopartikel. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die Zugabe von BSA im Nährmedium die Wirkung von AgNPs auf Bakterien abschwächt (Grade et al., 2012b).

Es gibt also zahlreiche Interaktionen von AgNPs und Silberionen mit Bestandteilen von biologischen Medien, die die Partikel und deren Bioverfügbarkeit verändern. Aussagen über die tatsächlich vorliegenden, bioverfügbaren Silberionen- und AgNP-Konzentrationen gestaltet sich schwierig. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die wichtigsten Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber auf Bakterien unter nicht wachsenden Bedingungen in entionisiertem Wasser durchgeführt.

In den Medien, die für Versuche unter nicht wachsenden Bedingungen verwendet wurden (PFD, SBF) war die Stabilität der AgNPs folgendermaßen einzuordnen: PFD > SBF. In PFD waren die Partikel über einen Zeitraum von 7 d bei 36 °C stabil. Aus diesem Grund wurde PFD als Medium ausgewählt. Um körperähnliche Bedingungen zu simulieren, wurde SBF in ausgewählten Versuchen eingesetzt.

6.2 Einfluss von Silber auf das Wachstum

Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob und in welchen Konzentrationen AgNPs und Silbernitrat in der Lage sind, das Wachstum von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* zu hemmen. Um erste Anhaltspunkte zum Vergleich der Bakterienstämme zu erhalten und um einen etwaigen Unterschied zwischen AgNPs und Silbernitrat zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die MHK und die MBK von AgNPs und Silbernitrat in LB-Medium bestimmt.

AgNPs führten in einem Konzentrationsbereich von 31 bis 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, bei allen drei Bakterienstämmen im Mikrodilutionsverfahren zu einer Inhibierung des Wachstums in LB-Medium. Vergleicht man die Wachstumshemmung durch AgNPs mit der von Silbernitrat (beruhend auf theoretisch berechneter Silberbasis), dann ist die Wirksamkeit von AgNPs deutlich (4-12,5-fach) geringer als die von Silbernitrat. *P. aeruginosa* war empfindlicher gegen Silber (AgNPs und Silbernitrat) als *S. aureus* und *S. epidermidis*.

Die meisten Daten zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber in der Literatur beruhen auf Untersuchung der MHK und der MBK (Chernousova & Epple, 2012). Die Bestimmung der MHK ist jedoch eine Methode, welche Limitierungen besitzt. Da diese Untersuchungen unter wachsenden Bedingungen durchgeführt werden, muss ein Nährmedium mit Silber versetzt werden. Silber interagiert mit den Bestandteilen des Nährmediums und ist somit eventuell in einer anderen Form, z.B. agglomeriert/aggregiert oder nicht mehr bioverfügbar, vorhanden. Diese bedeutet, dass die tatsächliche Expositionskonzentration unbekannt bleibt. Zudem handelt es sich um ein Verfahren, welches lediglich auf der Kultivierbarkeit von Bakterien beruht. Trotzdem werden diese Methoden sehr häufig in der Fachliteratur eingesetzt, um die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber aufzuzeigen. Obwohl die Methode Limitierungen aufweist, kann die relative Wirksamkeit von Silber abgeschätzt werden.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber in der Literatur wird zudem durch die Anwendung von unterschiedlichen Verfahren der MHK- und MBK-Bestimmung erschwert. Exemplarisch für *P. aeruginosa* wurde eine ausführliche Literaturrecherche bezüglich der MHK und MBK von AgNPs (Tabelle 34) und Silberionen (Tabelle 35) durchgeführt.

Tabelle 34: Literaturübersicht zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von AgNPs bei *P. aeruginosa*. nb: nicht bestimmt, kA: keine Angaben.

Bakterienstamm	Methode MHK	Inkubation	Ausgangszellichte	MHK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Definition MBK	MBK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Silberspezies	Partikel- durchmesser (nm)	Quelle
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bouillon- verdünnungs- verfahren	TRIS, 32 °C, 24 h	5×10^7 KBE mL^{-1}	0,36	Vollständige Wachstums- hemmung auf CASO-Agar, 24 h, 35 °C	0,36	AgNPs einge- schlossen in PVOH-b-PAN Mizellen	60	Bryaskova et al., 2010
					(100 μL Aliquots aus MHK- Untersuchung)				
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Mikrodilution	MH, 24 h, 37 °C	10^5 KBE mL^{-1}	3,12	Vollständige Wachstums- hemmung bei „Spot- Inoculation“ der Suspension aus MHK-Untersuchungen auf MH-Agar, 24 h, 37 °C	12,5	AgNPs	6,5-43,8	Jain et al., 2009
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27852	Mikrodilution, Wachstums- inhibierung > 95 %	MH, 18 h, 36 °C	1×10^6 Zellen mL^{-1}	25	nb	nb	AgNPs + β -CD (20 mM) + β -CD (10 mM) + β -CD (5 mM)	4-7	Jaiswal et al., 2010
				12,5					
<i>P. aeruginosa</i>	Agardilution	MH, 18 h, 37 °C	$1,4 \times 10^7$ Zellen Platte^{-1}	5	nb	nb	AgNPs + SDS	23-67	Kora et al., 2009
<i>P. aeruginosa</i> Isolat aus Entsalzungs- Anlage	Bouillon- verdünnungs- verfahren	NB, 24 h, 36 °C	10^6 KBE mL^{-1}	2	Vollständige Wachstums- hemmung mittels Agardilution, 18 h, 37 °C	> 3	AgNPs + SDS		Kora & Arunachalam, 2010

Tabelle 34 (Fortsetzung): Literaturübersicht zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von AgNPs bei *P. aeruginosa*. nb: nicht bestimmt, kA: keine Angaben.

Bakterienstamm	Methode MHK	Inkubation	Ausgangszellidichte	MHK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Definition MBK	MBK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Silberspezies	Partikel-durchmesser (nm)	Quelle
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Mikrodilution	Brain-Heart-Infusion-Broth, 24 h, 37 °C	kA	0,4	nb	nb	AgNPs	20-25	Martinez-Gutierrez et al., 2010
			10 μL						
<i>P. aeruginosa</i>	Agardilution	LB, 37 °C	Suspension, OD (595 nm): 0,5	75	nb	nb	AgNPs	16	Morones et al., 2005
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Bouillon-verdünnungsverfahren	NB, 24 h, 30 °C	1×10^5 KBE mL^{-1}	8	nb	nb	AgNPs	8,3 nm	Radzig et al., 2013
<i>P. aeruginosa</i> LMG 9009	Mikrodilution	CASO, 24 h, 37 °C	5×10^7 KBE mL^{-1}	500	Vollständige Abnahme der Koloniezahl auf CASO-Agar nach 24-stündiger Exposition mit Silber bei 37 °C in CASO-Medium oder Trinkwasser	> 500 (CASO)	AgNPs	20 nm	Sintubin et al., 2011
						3,1 (Trinkwasser)			
<i>P. aeruginosa</i> LMG 9009	Mikrodilution	CASO, 24 h, 37 °C	5×10^7 KBE mL^{-1}	12,5	Vollständige Abnahme der Koloniezahl auf CASO-Agar nach 24-stündiger Exposition mit Silber bei 37 °C in TSB oder Trinkwasser	100 (CASO)	AgNPs	11,2 nm	Sintubin et al., 2011
						0,25 (Trinkwasser)			

Tabelle 35: Literaturübersicht zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von Silberionen bei *P. aeruginosa*. nb: nicht bestimmt.

Bakterienstamm	Methode MHK	Inkubation	Ausgangszellichte	MHK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Definition MBK	MBK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Silberspezies	Quelle
<i>P. aeruginosa</i> 92 klinische Isolate	Agardilution	NA,	$\sim 1 \times 10^6$ Zellen mL^{-1}	0,039 (4 Stämme)	nb	nb	AgNO_3	Cason et al., 1966
		37 °C, 24 h		0,02 (53 Stämme) 0,01 (35 Stämme)				
<i>P. aeruginosa</i>	nb	nb	nb	nb	Abnahme der Koloniezahl um 99,9 % nach 96 h bei 37 °C in entionisiertem Wasser	0,02	AgCl	Huang et al., 2008
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Mikrodilution	MAB, 24 h, 37 °C	Keine Angaben	0,26 (Ag)	nb	nb	AgNO_3	De Prijck et al., 2007
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Mikrodilution	NB 24 h 30 °C	1×10^5 KBE mL^{-1}	0,15-0,3	nb	nb	AgNO_3	Radzig et al., 2009
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Bouillon- verdünnungs- verfahren	NB, 24 h, 30 °C	1×10^5 KBE mL^{-1}	0,3	nb	nb	AgNO_3	Radzig et al., 2013
<i>P. aeruginosa</i> LMG 9009	Mikrodilution	CASO, 24 h, 37 °C	5×10^7 KBE mL^{-1}	12,5	Vollständige Abnahme der Koloniezahl auf CASO-Agar nach 24-stündiger Exposition mit Silber bei 37 °C in TSB oder Trinkwasser	50 (CASO) 0,1 (Trinkwasser)	AgNO_3	Sintubin et al., 2011

Generell fallen die meisten Ergebnisse der MHK und MBK von AgNPs in der Literatur eher geringer aus als die, die in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden (Chernousova und Epple, 2012; Tabelle 34 und 35). In der vorliegenden Arbeit betrug die MHK der AgNPs je nach Bakterienstamm und Testsystem 31-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und die MBK 62,5-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die MHK der Silberionen (Silbernitrat) betrug je nach Bakterienstamm und Testsystem 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und die MBK 5-44 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Im Falle von *P. aeruginosa* lag die ermittelte MHK der AgNPs in der vorliegenden Arbeit bei 31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und die MBK bei 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die MHK von *P. aeruginosa* der Literaturrecherche liegt zwischen 0,36 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, die MBK zwischen 0,36 und >500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabelle 34). Somit liegen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse im Rahmen der Ergebnisse aus der Fachliteratur. Die ermittelte MHK und MBK der Silberionen (Silbernitrat) lag in der vorliegenden Arbeit bei 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die MHK von *P. aeruginosa* der Literaturrecherche liegt zwischen 0,036 und 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und die MBK zwischen 0,02 und 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabelle 35). Somit liegen auch diese ermittelten Ergebnisse im Bereich der Werte aus der Literaturrecherche.

Um den Einfluss von AgNPs und Silbernitrat auf das Wachstum der Bakterienstämme detaillierter zu untersuchen, wurden Wuchskurven über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen. Auch hier waren alle drei Teststämme *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* in Bezug auf die zugesetzte Silberkonzentration empfindlicher gegenüber Silbernitrat als gegen AgNPs. Es war jedoch auch zu erkennen, dass das Wachstum teilweise verzögert war, obwohl nach 24 h die gleiche Zelldicht wie bei der Kontrolle erreicht war.

Das gramnegative Bakterium *P. aeruginosa* war empfindlicher gegen Silber (AgNPs und Silbernitrat) als die grampositiven Bakterien *S. aureus* und *S. epidermidis*. Dass grampositive Bakterien unempfindlicher gegenüber Silber sind als gramnegative Bakterien, wurde auch in anderen Studien gezeigt (Fayaz et al., 2010; Guzman et al., 2012; Kawahara et al., 2000). Gramnegative Bakterien besitzen im Vergleich zu grampositiven Bakterien eine Zellwand mit wenig Peptidoglycan (Madigan et al., 2003). Es wird vermutet, dass Silberionen mit dem Peptidoglycan interagieren und deshalb bei grampositiven Bakterien weniger Silber die Cytoplasmamembran erreicht (Kawahara et al., 2000). In der grampositiven Zellwand sind Teichonsäuren und Teichuronsäuren vorhanden (Parija, 2009). Teichonsäuren enthalten Phosphodiester und Teichuronsäuren Carboxylgruppen, welche zu einer negativen Ladung der Zelloberfläche beitragen. Somit kann eine Interaktion der Zelloberfläche mit positive geladenen Ionen wie Silberionen stattfinden (Naja und Volesky, 2011). Jedoch besitzt auch die gramnegative Zellwand, welche Lipopolysaccharide und Phospholipide enthält, eine negative Ladung und kann mit positiv geladenen Ionen interagieren. Die grampositive Zellwand ist jedoch deutlich dicker als die von gramnegativen Bakterien (Remacle, 1990). So ist die Barriere Zellwand vor der inneren Membran bei grampositiven Bakterien dicker als bei gramnegativen Bakterien.

Es liegt eine große Spanne zwischen den MHK-Werten, welche in der Fachliteratur ermittelt wurden. Die Ergebnisse der MHK und der MBK sind stark abhängig vom Nährmedium, der Form, Größe und Funktionalisierung der AgNPs, der Stabilität der AgNPs im Nährmedi-

um/Testsystem und der Bakterienspezies bzw. dem Bakterienstamm (Cavalieri et al., 2014). Martinez-Castanon et al. (2008) verglichen beispielsweise die antibakterielle Wirkung von unterschiedlich großen AgNPs (7, 29, 89 nm) gegen *E. coli* und *S. aureus*. Je kleiner die AgNPs waren, desto besser war deren bakteriostatische Wirkung. Die Anzahl an Silberatomen pro Nanopartikel kann theoretisch anhand folgender Formel berechnet werden (Liu et al., 2007; Sriram et al., 2010).

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} N_A \leftrightarrow N = D^3 * 30,89602$$

N	-	Anzahl der Silberatome
ρ	-	Dichte von Silber im kubisch flächenzentrierten Gitter (10,5 g cm ⁻³)
D	-	Durchschnittlicher Durchmesser der AgNPs
M	-	Atommasse Silber (107,868 g mol ⁻¹)
N_A	-	Avogadro-Konstante (6,023 x 10 ²³ mol ⁻¹)

Die Anzahl der Silberatome in einem Nanopartikel ist abhängig vom Partikeldurchmesser. Laut dieser Formel besitzen AgNPs mit einer Größe von 1 nm etwa 30 und mit 100 nm etwa 30.896.020 Silberatome. Obwohl größere AgNPs mehr Silberatome enthalten, ist das Oberflächen- zu Volumen-Verhältnis bei kleinen AgNPs größer. Dieses Verhältnis begünstigt die Abgabe von Silberionen in Bezug zur Größe.

Ein Vergleich der Daten der vorliegenden Arbeit mit der Fachliteratur gestaltet sich aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Arten von AgNPs schwierig. Zudem variieren die Angaben der Silberkonzentrationen in der Fachliteratur oder sind teilweise nicht präzise. Konzentrationsangaben in der vorliegenden Arbeit beziehen sich stets auf die reine Silberkonzentration.

Obwohl die Bestimmung der MHK und der MBK nicht die optimale Methode zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber ist, zeichneten sich folgende Trends ab: AgNPs sind in der Lage das Wachstum klinisch relevanter Bakterien (*P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*) zu hemmen. Vergleicht man die Wachstumshemmung durch AgNPs mit der von Silbernitrat (beruhend auf theoretisch berechneter Silberbasis), dann ist die Wirksamkeit von AgNPs deutlich geringer als die von Silbernitrat.

Anhand von Suspensionsversuchen wurde die Wirkung von Silbernitrat und AgNPs auf *P. aeruginosa* in entionisiertem Wasser untersucht. Bei diesen Untersuchungen von planktonischen Bakterien von *P. aeruginosa* (1 x 10⁶ Zellen mL⁻¹) in entionisiertem Wasser, wurde eine Kinetik der Silberwirkung über 24 h bestimmt. 10 µg L⁻¹ führten innerhalb von 24 h zu einer vollständigen Abnahme der kultivierbaren Bakterien (MBK). Die Gesamtzellzahl blieb bei allen getesteten Konzentrationen und Zeitpunkten konstant. Nach 24 h war kein Unterschied zwischen der Wirkung von AgNPs und Silberionen (basierend auf theoretisch berechneter Silberkonzentration) zu beobachten. Die Wirkung von AgNPs und Silbernitrat ist auch innerhalb der ersten 8 h ähnlich. Lediglich im Falle von 100 µg L⁻¹ führte Silbernitrat nach 8 h

zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit, wobei bei den mit AgNP-exponierten Bakterien lediglich eine Abnahme um 2 log-Stufen stattfand.

Im Vergleich zur MBK in LB-Medium wurde in entionisiertem Wasser (planktonische Bakterien suspendiert in entionisiertem Wasser) eine deutlich niedrigere Konzentration an AgNPs und Silbernitrat benötigt, um eine Abnahme der kultivierbaren Bakterien zu erreichen. Interessanterweise ist auch der Unterschied zwischen AgNPs und Silbernitrat sehr gering. Im Gegensatz zu AgNPs in biologischen Medien, ist in entionisiertem Wasser die Freisetzung von Silberionen nicht durch eine Proteinkorona gehemmt und die Partikel werden nicht destabilisiert (Laza et al., 2014a).

Wie stark das Ergebnis der MBK von dem Medium anhängig ist, zeigten nicht nur die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sondern auch beispielsweise die Ergebnisse von Sintubin et al. (2011). Die hier ermittelte MBK von AgNPs war in CASO-Medium bis zu 400 mal größer als in Trinkwasser. Trinkwasser enthält deutlich weniger Substanzen mit denen Silber interagieren kann. Aus diesem Grund ist in Trinkwasser eine größere Menge Silber bioverfügbar. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse wiesen in LB-Medium ebenfalls eine deutlich höhere MBK in LB-Medium als in entionisiertem Wasser auf. Die Daten sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da sie in zwei unterschiedlichen Testsystemen ermittelt wurden. Entionisiertes Wasser enthält keine Substanzen, welche mit Silber interagieren können, weshalb man davon ausgehen kann, dass ein Großteil des Silbers in einer bioverfügbaren Form vorliegt. Huang et al. (2008) untersuchten die Wirksamkeit von Silberchlorid auf planktonische *P. aeruginosa* Zellen (3×10^6 Zellen mL^{-1}) in entionisiertem Wasser. Sie beobachteten eine Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien (99,9 %) nach 96 h bei 37 °C durch $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag. Yamanaka et al. (2005) untersuchten die Wirkung von Silberionen (900 ppb) auf *E. coli* (1×10^6 - 1×10^7 KBE mL^{-1}) in Wasser. Planktonische Zellen wurden in Wasser mit Silberionen für bis zu 24 h inkubiert. Nach 24 h war eine deutliche Abnahme (> 7 log-Stufen) aufgrund von Silberexposition zu beobachten. Hwang et al. (2006) untersuchten den Einfluss von Silber ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) auf *P. aeruginosa* (1×10^5 Zellen mL^{-1}) in synthetischem Trinkwasser. Nach 8 h wurde eine vollständige Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien festgestellt. Wie auch in der vorliegenden Arbeit führten in den genannten Studien niedrige Silberkonzentrationen (im Vergleich zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Silber in Nährmedium) zu einer Hemmung der kultivierbaren Bakterien.

6.3 Einfluss von Silber auf die Biofilmbildung

Um den Einfluss von AgNPs und Silbernitrat auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* zu untersuchen, wurde ein Mikrotiterplatten-Verfahren etabliert. Die Bakterienstämme wurden mit und ohne Silber in Mikrotiterplatten in LB-Medium angezchtet. Das Wachstum (Zunahme der Zelldichte der Kultur in den Kavitäten) wurde durch die Messung der Absorption der Kultur nachgewiesen. Die Biomasse der Biofilme in den Kavitäten wurde mit Kristallviolett angefärbt. Kristallviolett ist ein kationischer Farbstoff,

welcher mit negativ geladenen Gruppen an Bakterienzellen und der EPS, wie Carboxylgruppen oder Phosphatgruppen, interagiert und Salze bildet.

Sowohl AgNPs als auch Silbernitrat wiesen neben wachstumshemmenden Eigenschaften auch das Potential auf, die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*, zu inhibieren. Bezogen auf die theoretisch eingesetzte Silberkonzentration, zeigte Silbernitrat bei geringeren Konzentrationen einen inhibierenden Effekt auf die Biofilmbildung aller drei Bakterienstämme als die AgNPs. Silbernitrat führte in dieser Arbeit in LB-Medium, bei allen drei getesteten Bakterienarten, zu einer Hemmung der Biofilmbildung ab $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. In Form von AgNPs wurde etwa die 1,5 bis 3-fache Menge Silber benötigt, um die Biofilmbildung der Bakterienstämme zu hemmen.

Mikrotiterplatten-Assays wurden auch in anderen Untersuchungen eingesetzt, um die Biofilmbildung von Bakterien zu vergleichen und die Inhibierung der Biofilmbildung durch antimikrobielle Substanzen zu untersuchen. Auch im Falle von Silber wurden bereits Mikrotiterplatten-Assays eingesetzt, um dessen biofilminhibierende Eigenschaften zu untersuchen. Obwohl Studien zur biofilminhibierenden Wirkung von AgNPs und Silbernitrat gegen *P. aeruginosa* vorliegen, gibt es keine äquivalenten Daten für *S. aureus*. Im Falle von *S. epidermidis* liegen diese lediglich für AgNPs vor. Shahrokh & Emtiazi (2009) zeigten, dass in Anwesenheit von AgNPs ($1-2 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei verschiedenen *Bacillus* Spezies die Biofilmbildung in Nährbouillon um 88-96 % inhibiert war. Radzig et al. (2013) beobachteten eine signifikant verringerte Biofilmbildung bei Zugabe von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ AgNPs (8,3 nm) bei *E. coli*, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ AgNPs bei *P. aeruginosa* und $10-20 \mu\text{g mL}^{-1}$ AgNPs bei *Serratia proteamaculans* in NB-Medium. In Anwesenheit von Silbernitrat wurde die Biofilmbildung dieser Bakterien bereits bei Silberkonzentrationen von $0,3-1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ gehemmt. Die inhibitorischen Konzentrationen von Silbernitrat gegenüber *P. aeruginosa* waren niedriger als diejenigen, welche in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden. Im Falle der AgNPs wurden etwa 2-fach niedrigere Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit benötigt, um die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* zu inhibieren. Allerdings wurde als Nährmedium NB-Medium eingesetzt. In einer Studie, bei der Ag-MCNPs (Molecular capped-silver nanoparticles, 8 nm) in LB-Medium eingesetzt wurden, wurden höhere AgNP-Konzentrationen ($90-180 \mu\text{g mL}^{-1}$) als in der vorliegenden Arbeit benötigt, um eine deutliche Inhibierung der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* zu erreichen (Dror-Ehre et al., 2010). Kalishwaralal et al. (2010) verwendeten biogene AgNPs (50 nm), um die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* zu inhibieren. Ab einer Konzentration von 100 nM AgNPs wurden die Biofilme bereits vollständig gehemmt. Die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wurde durch die Anwesenheit von $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ Silbernitrat gehemmt (Radzig et al., 2009).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für die Variationen dieser Ergebnisse. Ähnlich wie bei der Wachstumshemmung der Bakterien, ist die Biofilmbildung abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie dem Testsystem, dem Nährmedium, dem Bakterienstamm und der Silberspezies.

Im Falle von *P. aeruginosa* führten in der vorliegenden Arbeit subinhibitorische Konzentrationen von Silbernitrat und AgNPs zu einer erhöhten Biofilmbildung (Biomassebestimmung mit Kristallviolett), wobei keine Zunahme der Zelldichte festgestellt wurde. Der gleiche Effekt wurde im Falle von *S. epidermidis* bei subinhibitorischen Konzentrationen von Silbernitrat festgestellt. Da Kristallviolett auch extrazelluläres Material anfärbt, ist davon auszugehen, dass die Bildung von EPS durch Silberexposition erhöht war.

Shahrokh & Emtiazi (2009) zeigten ebenfalls, dass subinhibitorische Konzentrationen von AgNPs zu einer erhöhten Biofilmbildung führten. Dass subinhibitorische Konzentrationen antimikrobieller Stoffe zu einer vermehrten Biofilmbildung führen, wurde auch in anderen Studien gezeigt. Wang et al. (2010) beobachteten, dass die Biofilmbildung von *S. epidermidis* in Anwesenheit dreier Makrolide um bis zu 20 % erhöht war. Anhand von *P. aeruginosa* PAO1 wurde gezeigt, dass subinhibitorische Konzentrationen von Tobramycin zu einer erhöhten Biofilmbildung führten (Hoffman et al., 2005). Obwohl die Zelldichte der Kulturen nicht zunahm, wurde eine erhöhte Biofilmbildung (Kristallviolettfärbung) nachgewiesen. Sollten Bakterien in Konzentrationsbereichen, die unter der bakteriostatischen Konzentration liegen, mit den Bioziden in Kontakt kommen, dann kann dies die Biofilmbildung induzieren oder verstärken und die Bakterien somit wiederum unempfindlicher gegen die Biozide machen, da sie im Biofilm gegen diese geschützt sind (Davies, 2003; Stewart & Costerton, 2001).

6.4 Einfluss von Silber auf etablierte Biofilme

Neben dem Potential von Silber, die Biofilmbildung zu inhibieren, wurde auch die Inaktivierung von bereits etablierten Biofilmen (in adhärierter und suspendierter Form) durch Silber (AgNPs und Silbernitrat) untersucht und mit der Inaktivierung von planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase verglichen. Die Anzucht der Bakterien erfolgte im Mikrotiterplatten-Assay (LB-Medium). Die Exposition von *P. aeruginosa* und *S. aureus* (etablierte Biofilme und planktonische Bakterien in der stationären Wachstumsphase) erfolgte in entionisiertem Wasser für 24 h bei 36 °C. Exposition mit AgNPs und Silbernitrat führte jeweils zu einer Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien. Auch bei den suspendierten Biofilmen führten AgNPs und Silbernitrat zu einer Abnahme der Koloniezahl. Bei allen Untersuchungen blieb die Gesamtzellzahl der Bakterien konstant. Das weist darauf hin, dass Zellen nicht lysiert wurden und kein Verlust der DNA stattfand. Um etablierte Biofilme und planktonische Bakterien in der stationären Wachstumsphase zu inaktivieren (Abnahme der Koloniezahl), mussten deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden als es bei der Inhibierung der Biofilmbildung nötig war. Und das obwohl die Untersuchungen im Vergleich zu denen der Inhibierung der Biofilmbildung nicht in LB-Medium, sondern in entionisiertem Wasser durchgeführt wurden.

25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) und 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ag (AgNPs) führten zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit von planktonischen *P. aeruginosa*. Die Konzentration der kulti-

vierbaren Zellen im Biofilm nahm lediglich um 1-2 log-Stufen ab. Planktonische Bakterien und Biofilme von *P. aeruginosa* waren empfindlicher gegenüber AgNPs und Silbernitrat als die von *S. aureus*. Planktonische Bakterien beider Bakterienspezies waren empfindlicher gegen AgNPs und Silbernitrat als angeheftete Biofilme. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden Biofilme zu Einzelzellen suspendiert. Suspendierte Biofilme waren deutlich empfindlicher gegen Silber als angeheftete Biofilme. Es gibt nur wenige Untersuchungen zur Inaktivierung von Biofilmen durch AgNP-Dispersionen und Silberionen in Lösung. Es gibt jedoch einige wenige Studien in denen die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs (als Dispersion) und Silbersalzen (in Lösung) gegen etablierte Biofilme untersucht wurden. Diese Studien unterscheiden sich jedoch durch das Testsystem oder die Parameter der Detektion der antimikrobiellen Wirksamkeit von denen der vorliegenden Arbeit.

Zu diesen wenigen Studien gehört die von Choi et al. (2010). Diese Studie zeigte, dass zur Inaktivierung von etablierten *E. coli* Biofilmen eine etwa 4-fach höhere Konzentration eingesetzt werden musste als zur Inaktivierung von planktonischen Bakterien. Etablierte Biofilme (Mikrotiterplattenverfahren) wurden in dieser Studie mit unterschiedlichen AgNP-Konzentrationen in NB-Medium überschichtet und die bakterielle Aktivität mit der Mikrorespirometrie untersucht. Zur Inaktivierung der Biofilme (Abnahme der aktiven Zellfraktion – Mikrorespirometrie) wurden $38 \mu\text{g mL}^{-1}$ AgNPs und $< 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Silbernitrat, zur Inaktivierung der planktonischen Bakterien $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ AgNPs und $< 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Silbernitrat, benötigt. Zudem untersuchten sie die Proliferation von silberexponierten (AgNPs und Silbernitrat in NB-Medium), etablierten Biofilmen mit der Kristallviolett-Färbung. Sie beobachteten, dass $19 \mu\text{g mL}^{-1}$ (AgNPs) und $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Silbernitrat) die weitere Biofilmbildung der silberexponierten, etablierten Biofilme um 70 % hemmten. Radzig et al. (2013) untersuchten den Effekt von AgNPs auf etablierte Biofilme auf Glasobjektträgern. Sie ermittelten mittels LIVE/DEAD-Färbung, dass $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu einer nahezu vollständigen Abnahme membranintakter *E. coli* im Biofilm führten.

Biofilme sind generell unempfindlicher gegen Biozide als planktonische Bakterien (Davies, 2003; Stewart & Costerton, 2001). Dies gilt auch für toxische Metalle (Booth et al., 2011). Biofilme können Ionen, unter anderem Metallionen, binden (Flemming 1995; Flemming & Leis, 2002; Späth et al., 1998). Ionen binden entweder an die EPS oder an Zellbestandteile. EPS bilden im Biofilm eine Schutzbarriere gegen Biozide wie z.B. Metallionen. Hierbei sind besonders die Polysaccharide und Proteine beteiligt (Flemming & Wingender, 2010). Es gibt unterschiedliche Hypothesen, die die Toleranz von Biofilmen gegen Biozide beschreiben. Bakterien weisen unterschiedliche phänotypische Eigenschaften auf, je nachdem ob diese in der planktonischen Phase oder im Biofilm vorkommen (Sauer et al., 2002; Shen et al., 2011). Aus diesem Grund können sie auch unterschiedlich auf Biozide reagieren. Es ist möglich, dass Biozide beispielsweise aufgrund der Reaktions-Diffusions-Hemmung nur langsam oder unvollständig die Tiefen des Biofilms erreichen (Stewart & Costerton, 2001; Stewart, 2002).

An sich stellt ein Biofilm keine Diffusionsbarriere dar, da die EPS-Matrix fast vollständig aus Wasser besteht. Biozide, z.B. Antibiotika, können jedoch in der Matrix von Bestandteilen der

EPS inaktiviert oder zurückgehalten werden. Im Falle von Silberionen und AgNPs mit positiver Oberflächenladung ist zu erwarten, dass diese mit negativ geladenen Bestandteilen der EPS-Matrix interagieren (Stewart & Costerton, 2001). Joshi et al. (2012) zeigten bei einem Vergleich von EPS-produzierenden und nicht EPS-produzierenden *E. coli*, dass die EPS die Bakterien vor AgNPs schützen. Zudem zeigten sie, dass AgNPs in der Anwesenheit von EPS zu Aggregation tendieren, was die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs verringert. Peulen et al. (2011) zeigten, dass Diffusionskoeffizienten von AgNPs in Biofilmen, mit zunehmendem Partikeldurchmesser, abnahmen. Zudem nahm die Diffusion der AgNPs im Biofilm mit zunehmender Akkumulation von AgNPs ab. Choi et al. (2010) zeigten, dass AgNPs in Biofilmen aggregieren. Sie vermuteten, dass die AgNP-Aggregation und verringerte Diffusion von AgNPs und Silberionen zu einer erhöhten Toleranz von Biofilmen gegen AgNPs beiträgt.

Das Vorhandensein von Gradienten in einem Biofilm (z.B. Nährstoffe, Sauerstoff, pH) kann Bakterien in einen nicht oder nur sehr langsam wachsenden Zustand überführen. Einige Biozide, wie z.B. das Antibiotika Penicillin, sind jedoch nur unter wachsenden Bedingungen wirksam (Stewart, 2002). Zudem können Biozide und ihre Wirkung durch die veränderten Bedingungen ebenfalls beeinflusst werden (Stewart und Costerton, 2001). Im Falle von AgNPs ist bekannt, dass diese ohne das Vorhandensein von Sauerstoff keine Silberionen abgeben und deren antimikrobielle Wirksamkeit deshalb deutlich verringert ist (Xiu et al., 2012). Somit ist die Wirkung von AgNPs in sauerstoffarmen oder anaeroben Bereichen des Biofilms verringert.

Wie auch planktonische Bakterien, besitzen Biofilmzellen Mechanismen der Stressantwort (z.B. generelle, stringente oder oxidative Stressantwort), mit denen sie sich gegen Stress wie beispielsweise Temperaturänderungen, Nährstoffmangel oder Biozide schützen können (Swiecilo & Zych-Wezyk, 2013). Bei Biofilmen kommen die gleichen Mechanismen zum Tragen, jedoch haben diese oftmals die Möglichkeit sich besser an Stress zu adaptieren, da andere Schutzmechanismen dazu führen, dass die Bakterien dem Stress eher langsamer ausgesetzt sind als es bei planktonischen Bakterien der Fall wäre (Stewart, 2002). Booth et al. (2011) untersuchten die unterschiedliche Stressantwort von planktonischen Zellen und Biofilmen auf Kupfer anhand von *Pseudomonas fluorescens*. Sie zeigten, dass sich die metabolischen Veränderungen, die aufgrund von Kupferexposition stattfanden, in planktonischen Bakterien und Biofilmen deutlich unterschieden.

In Biofilmen gibt es zudem das Phänomen der sogenannten "Persister". Es handelt sich um Zellen, welche sich in einem Zustand befinden oder aufgrund von Stressoren in diesen übergehen, in dem sie eine sehr breite Resistenz gegen Stressoren aufweisen (Lewis, 2007; Conlon et al., 2015). Bei Persister-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation, die nur einen sehr kleinen Anteil von Biofilmzellen ausmacht. Häufig überleben Persister die Inaktivierung eines Biofilms und können somit nach Aufhebung des Stresses erneut Biofilme bilden (Lewis, 2007). Es gibt demnach zahlreiche Gründe, weshalb Biofilme unempfindlicher gegen antimikrobielle Stoffe, wie toxische Silberionen, sind als ihr planktonischer Gegenpart (Lewis, 2007).

Suspendierte, vereinzelt Biofilmzellen waren deutlich empfindlicher gegen Silber als angeheftete Biofilme. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass nicht nur der unterschiedliche physiologische Zustand der Zellen, sondern auch deren Anordnung in einem Biofilm für die Empfindlichkeit gegenüber Silber verantwortlich ist. Stewart et al. (2001) untersuchten den Einfluss von Hypochlorit und Chlorosulfamat auf Biofilme, planktonische Bakterien und suspendierte Biofilme. Sie zeigten, dass Biofilme deutlich unempfindlicher gegen diese Biozide waren als die planktonischen Bakterien. Sie zeigten zudem auch, dass suspendierte Biofilme ebenso empfindlich gegen die Biozide waren wie die planktonischen Bakterien. Es macht also einen großen Unterschied, ob man Biofilme in Suspension oder angeheftet an eine Oberfläche untersucht. Für Silber sind ähnliche Studien nicht bekannt.

Die Wirkung von AgNPs in SBF war etwas geringer als in PFD. Die leicht abgeschwächte Wirkung der AgNPs in SBF liegt voraussichtlich daran, dass Pufferbestandteile von SBF mit Silber interagieren können. Es sind jedoch keine organischen Bestandteile vorhanden, die die Abgabe von Silberionen stören.

6.5 Der silberinduzierte VBNC-Zustand

Der VBNC-Zustand ist eine Überlebensstrategie von Bakterien (Oliver, 2005; Oliver, 2010). Bakterien in diesem Zustand sind unter den Kultivierungsbedingungen, unter denen sie normalerweise wachsen, nicht mehr kultivierbar. Unterschiedliche Einflüsse, wie Nährstoffmangel, Desinfektionsmittel, Inkubation außerhalb des Temperaturoptimums, veränderte osmotische Konzentrationen oder Schwermetallionen wie Kupfer, können bei Bakterien den VBNC-Zustand induzieren (Dwidjosiswojo et al., 2011; Oliver, 2010).

Kupferionen induzieren bei *P. aeruginosa* den VBNC-Zustand (Dwidjosiswojo et al., 2011). Zudem wurde bereits beschrieben, dass ein Mangel an Nährstoffen, zu niedrige Temperaturen sowie Chlor den VBNC-Zustand in *P. aeruginosa* auslösen können (Bedard et al., 2014; Li et al., 2014; Leung et al., 1995; Oliver, 2005). Ob auch Silber einen Übergang in den VBNC-Zustand induzieren kann, wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden kulturelle und kulturunabhängige Methoden eingesetzt, um die Vitalität und den physiologischen Zustand von nicht kultivierbaren, silberexponierten *P. aeruginosa* zu beurteilen. Diese Untersuchungen wurden exemplarisch an *P. aeruginosa* durchgeführt.

Bei *P. aeruginosa*, welcher sich aufgrund der Exposition mit Silber (AgNPs und Silbernitrat) in der vorliegenden Arbeit in einem nicht kultivierbaren Zustand befand, wurden unterschiedliche Vitalitätsparameter nachgewiesen. *P. aeruginosa* wies DNA (Nachweis über DAPI-Methode), ribosomale RNA (Nachweis über FISH), Membranintegrität (Nachweis über PMA-qPCR und LIVE/DEAD-Färbung) und ATP auf. Dies gilt sowohl für planktonische Bakterien als auch für Biofilme.

6.5.1 Vorhandensein von DNA

Bei allen getesteten Silberkonzentrationen (AgNPs und Silbernitrat) war bei *P. aeruginosa* (planktonische Bakterien und Biofilme) trotz Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien, keine Abnahme der Gesamtzellzahl zu verzeichnen. Eine Grundvoraussetzung dafür, dass eine Zelle noch lebendig sein kann, ist das Vorhandensein von Nukleinsäuren (Hammes et al., 2011).

Ohne intakte Nukleinsäuren ist eine Zelle nicht in der Lage ihre lebensnotwendigen Funktionen aufrecht zu erhalten (Replikation und Proteinbiosynthese). Das Vorhandensein von DNA weist darauf hin, dass die Zelle noch intakt ist. Die silberexponierten Zellen waren nicht lysiert. Auch bei den Suspensionsversuchen (planktonische Bakterien in entionisiertem Wasser) wurde keine Abnahme der Anzahl der Zellen mit intakter DNA festgestellt. Als Kontrolle für inaktivierte Zellen wurde *P. aeruginosa* mit Isopropanol (70 %) und Hitze (65 °C, 30 min) behandelt (Cenciarini et al., 2008; Molecular Probes, 2004). Sowohl bei Isopropanol- als auch bei hitzebehandelten Zellen wurde keine Abnahme der Gesamtzellzahl (Zellen mit intakter DNA) festgestellt. Inaktivierte Zellen zeigten also ebenfalls die Anwesenheit von intakter DNA. DNA ist ein langlebiges Molekül und kann nach dem Zelltod noch einige Zeit in der Zelle persistieren (Hammes et al., 2011). Dupray et al. (1997) untersuchten die Persistenz von *Salmonella*-DNA in Meerwasser. Gereinigte *Salmonella*-DNA war noch 2-8 d mit einer PCR-basierten Methode in Meerwasser nachweisbar. *Salmonella*-DNA aus inaktivierten Zellen sogar 10-55 d. Romanowski et al. (1992) wiesen ebenfalls mit PCR basierten Methoden eine Halbwertszeit von 9-28 h für gereinigte *E. coli*-DNA in Boden nach. *Pseudomonas aureofaciens*-DNA persistierte mehrere Wochen in Bodenproben (England et al., 1997).

Diese Versuche zeigten, dass obwohl die Abwesenheit von Nukleinsäuren ein klares Zeichen für den Zelltod ist, ihre Anwesenheit kein eindeutiges Anzeichen dafür ist, dass eine Zelle lebendig ist (Hammes et al., 2011). Das Vorhandensein von DNA bei silberexponierten unkultivierbaren *P. aeruginosa* zeigte, dass die Zellen nicht zerstört waren.

6.5.2 Membranintegrität

Eine weitere Grundvoraussetzung dafür, dass eine Zelle lebendig ist, ist das Vorhandensein einer intakten Zellmembran (Hammes et al., 2011). Die Zellmembran schützt das Zellinnere vor der äußeren Umwelt und hält ihr inneres Milieu aufrecht (Madigan et al., 2003). Die Zerstörung der Zellmembran ist meist irreversibel und führt in den meisten Fällen zum Zelltod (Hammes et al., 2011; Joux & Lebaron, 2000). Die Integrität der Zellmembran wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits mittels LIVE-DEAD-Färbung und andererseits mit der PMA-qPCR bestimmt. Die LIVE-DEAD-Färbung ist häufig die Methode der Wahl, um erste Untersuchungen des VBNC-Zustandes durchzuführen (Li et al., 2014). Sie ermöglicht eine Untersuchung der Membranintegrität von Bakterien durch Anfärben mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen: Propidiumiodid und SYTO 9 (Boulos et al., 1999; Oliver, 2010). Propidiumiodid

ist ein Farbstoff, welcher nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen kann, da er von intakten Zellmembranen zurückgehalten wird (Hammes et al., 2011). SYTO 9 hingegen ist membranpermeabel und färbt alle Zellen an. Obwohl diese Methode häufig die Methode der Wahl zur Untersuchung des VBNC-Zustandes ist, wird empfohlen diese Methode aufgrund ihrer Limitierungen in Kombination mit anderen kulturunabhängigen Methoden einzusetzen (Berney et al., 2007). Die Ergebnisse der LIVE/DEAD-Färbung sind beispielsweise stark abhängig von den eingesetzten Konzentrationen von Propidiumiodid und SYTO 9 (Li et al., 2014). Der Einsatz der LIVE/DEAD-Färbung, insbesondere die Konzentrationen der Farbstoffe, müssen auf jedes Bakterium und die jeweiligen Bedingungen abgestimmt werden. Zudem müssen Kontrollen für inaktivierte Bakterien eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Farbstoffkonzentrationen in Vorversuchen auf das Testsystem abgestimmt. Die Quantifizierung von membranbeschädigten und membranintakten Zellen, welche einer LIVE-DEAD-Färbung unterzogen wurden, kann entweder durch Visualisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop oder mit der Durchflusszytometrie durchgeführt werden (Stocks, 2004).

Mit der LIVE/DEAD-Färbung wurde bei den Mikrotiterplattenuntersuchungen bei den silberexponierten planktonischen Bakterien und Biofilmzellen eine Abnahme der Konzentration membranintakter Bakterien von maximal 0,5 log-Stufen beobachtet. Die Suspensionsversuche zeigten keine Abnahme der membranintakten Zellen bei silberexponiertem *P. aeruginosa*. Es ist also ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Zellen nicht abgetötet waren. Als Kontrolle für inaktivierte Zellen wurde *P. aeruginosa* ebenfalls mit Isopropanol (70 %) und Hitze (65 °C, 30 min) behandelt. In beiden Fällen hatte die Anzahl der membranintakten Zellen vollständig abgenommen.

Bei der Durchflusszytometrie entstehen Verteilungsmuster membranintakter und membranbeschädigter Zellen. Betrachtet man diese Muster, dann sind ganz eindeutige Unterschiede zwischen silberexponierten, unkultivierbaren Bakterien und den Kontrollen für inaktivierte Bakterien zu erkennen. Die Verteilungsmuster membranintakter und membranbeschädigter Zellen zeigten, dass die Muster der silberexponierten Bakterien eher denen der Bakterien ähneln, welche ausschließlich mit entionisiertem Wasser exponiert wurden. Das Muster von Isopropanol- und hitzebehandelten Zellen verschiebt sich im Vergleich dazu sehr deutlich in den Bereich der membranbeschädigten Zellen. Der Quotient der membranbeschädigten und der membranintakten Zellen nahm bei Exposition mit Isopropanol und nach Hitzebehandlung zu, wobei der der silberexponierten Zellen eher dem der Kontrolle ohne Silber entsprach.

Die LIVE/DEAD-Färbung wurde bereits häufig für den Nachweis des VBNC-Zustandes in Bakterien angewendet (Adams et al., 2003; Alexander et al., 1999; Lindbäck et al., 2010). Eine intakte Zellmembran allein ist jedoch kein Anzeichen dafür, dass eine Zelle lebendig ist. Es zeigt lediglich, dass die Zelle an der Membran nicht beschädigt ist. Bei den Untersuchungen der silberexponierten Zellen bezüglich der Membranintegrität mittels LIVE/DEAD-Färbung

sind also keine Veränderungen der Zellmembran zu verzeichnen, die auf eine Zerstörung der Zellen hinweisen würden.

Die PMA-qPCR ist ebenfalls eine Methode zur Untersuchung der Membranintegrität von Bakterien und zur Quantifizierung von membrangeschädigten und membranintakten Zellen (Nocker et al. 2006). Propidiummonoazid (PMA) ist wie Propidiumiodid impermeabel für intakte Zellmembranen. Es kann jedoch in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen und dort zwischen den Basen der DNA interkalieren. Durch die Photoaktivierung wird ein Nitrenintermediat gebildet, welches kovalent an die DNA bindet. Die DNA von membrangeschädigten Zellen kann dann bei der qPCR nicht mehr amplifiziert werden (Nocker et al., 2006).

Die Ergebnisse der Anzahl der membranintakten Zellen im Mikrotiterplattenverfahren, welche mit der PMA-qPCR nachgewiesen wurden, wichen von denen, welche mit der LIVE/DEAD-Färbung nachgewiesen wurden, ab. Die membranintakten Zellen nahmen bei den Mikrotiterplattenversuchen sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen um etwa 2-log Stufen ab. Bei den Suspensionsversuchen (planktonische Bakterien in entionisiertem Wasser), wurde keine Abnahme der membranintakten Bakterien festgestellt. Die Bakterien, welche mit Isopropanol und Hitze inaktiviert wurden, zeigten lediglich eine Abnahme der mit PMA-qPCR detektierten, membranintakten Zellen von 0,5-1 log-Stufen. Die PMA-qPCR ist eine relativ neue Methode, welche jedoch als sehr vielversprechend angesehen wurde (Cenciarini-Borde et al., 2009). Es wurde jedoch auch berichtet, dass die PMA-qPCR die Anzahl der membrangeschädigten Zellen unterschätzen kann (Nkuipou-Kenfack et al., 2013). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Modifikationen an dieser Methode vorgenommen (Inkubationszeit PMA und Zellen, PMA-Konzentration, Inkubationstemperatur). Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Ausbeute der membrangeschädigten Zellen festgestellt. Die Anzahl membrangeschädigter Zellen nahm also bei den Kontrollen für inaktivierte Zellen nicht vollständig ab, die Ergebnisse wichen von denen der LIVE/DEAD-Färbung ab und alle in der Literatur angegebenen Modifikationen der Methode ergaben keine Änderungen der Ergebnisse. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der PMA-qPCR eher kritisch zu betrachten und weiterer Forschungsbedarf ist vorhanden.

6.5.3 Vorhandensein von zellulärer Energie

Die Konzentration von ATP in einer Zelle korrespondiert häufig mit ihrer metabolischen Aktivität (Hammes et al., 2010). ATP ist ein Energiespeicher in der Zelle und wird durch die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat gebildet.

Die Zellen der Biofilme enthielten mehr ATP pro Zelle als die planktonischen Bakterien. Bei den silberfreien Kontrollen der Biofilme wurden durchschnittlich $0,3 \text{ amol Zelle}^{-1}$ und bei denen der planktonischen Bakterien $0,02 \text{ amol Zelle}^{-1}$ detektiert. Dies entspricht in etwa den ermittelten Werten von Hammes et al. (2008) für autochthone Bakterienflora im Trinkwas-

ser. Die Spanne der experimentell ermittelten Werte an ATP pro Zelle schwankt jedoch in der Fachliteratur erheblich ($0,001\text{-}2500\text{ amol Zelle}^{-1}$) (Brovko et al., 1999; Hattori et al., 2003; Kurath & Morita, 1983; Ng et al., 1985; Shama & Malik, 2013; Siebel et al., 2008; Squirrel et al., 2002; Stanley, 1989). Die Menge an ATP ist abhängig vom jeweiligen physiologischen Zustand der Bakterien (Tholozan, 1999). Der ATP-Gehalt von silberexponierten Zellen nahm ab, aber es war noch ATP vorhanden (Abnahme < 1 log-Stufe). Das Vorhandensein von ATP ist somit ebenfalls ein Hinweis dafür, dass die Zellen nicht tot sind. Ortega-Calvo et al. (2011) untersuchten die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs (100 und 150 nm) und Silbernitrat auf *Pseudomonas putida*. $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ der AgNPs (100 nm) führten zu einer Abnahme von etwa 10 % des ATP-Gehaltes. Die Exposition mit AgNPs (150 nm) führten zu einer Abnahme von etwa 40 % bei der gleichen Konzentration. Eine Exposition mit $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) führte dazu, dass ATP nicht mehr nachweisbar war.

6.5.4 Vorhandensein von ribosomaler RNA

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem keine Abnahme der Anzahl von FISH-positiven Zellen bei silberexponierten Biofilmen und planktonischen Bakterien (*P. aeruginosa* und *S. aureus*) beobachtet. Mit der FISH-Methode weist man das Vorhandensein von ribosomaler RNA nach. RNA ist aufgrund der ubiquitär vorhandenen RNase deutlich weniger persistent als DNA (Cenciarini et al., 2008). Trotzdem kann RNA unter Umständen nach dem Zelltod in der Zelle persistieren. Ribosomale RNA liegt in einer sehr hohen Anzahl von Kopien vor, weshalb sie ein beliebtes Target für Untersuchungen der RNA (z.B. FISH) ist.

In einem Übersichtsartikel wurden Untersuchungen von ribosomaler RNA zusammengefasst, bei denen Bakterien auf unterschiedliche Weisen inaktiviert und anschließend das Vorhandensein von ribosomaler RNA untersucht wurden. Bei einigen Studien war die ribosomale RNA unmittelbar nach der Inaktivierung der Bakterien nicht mehr nachweisbar (z.B. nach Autoklavieren von *Campylobacter jejunii*) und bei anderen war ribosomale RNA für 2 h (Hitzebehandlung, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min von *E. coli*) bis hin zu 3 d (Rifampicinbehandlung von *Mycobacterium tuberculosis*) nachweisbar (Cenciarini-Borde et al., 2009).

Das Vorhandensein von ribosomaler RNA ist demnach ein Hinweis auf das Vorhandensein von Ribosomen. Es ist ein Indiz für ribosomale Aktivität und damit auch für die Produktion von Proteinen, wenn auch kein absoluter Beweis. Dass keine Abnahme der Anzahl FISH-positiver Zellen stattfand, obwohl die Kultivierbarkeit silberexponierter Bakterien abnahm, ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass die Zellen nicht zwangsläufig abgetötet sein müssen.

6.5.5 Morphologie

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde untersucht, ob die Zellen nach der Exposition mit Silber ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (Silbernitrat) und $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs)) noch intakt waren oder ob sie morphologische Auffälligkeiten aufweisen. Die Zellen, welche mit Silbernitrat behandelt wurden (planktonische Zellen und Biofilme) zeigten keinerlei morphologische Veränderungen. Dies ist ein ergänzendes Indiz dafür, dass die Bakterien nicht zerstört/inaktiviert sind. Im Falle der AgNP-behandelten Zellen war keine Veränderung der Zellmorphologie der Biofilmzellen zu erkennen. Bei den planktonischen Bakterien zeigten sich jedoch Einstülpungen und Dellen an den Zelle. Die Zellmembranen erschienen allerdings immer noch intakt. Die veränderte Morphologie bei den AgNP-behandelten, planktonischen Zellen weist auf einen Unterschied in der Wirkung von AgNPs und Silbernitrat hin. Le et al. (2012) zeigten, dass sich AgNPs an die Zellmembran von Bakterien anheften und sie dort schädigen können. Im Falle der AgNP-exponierten Zellen, konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich AgNPs auf bzw. in der Zelle detektiert werden. Bei der Bestimmung der Zelllänge von planktonischen Bakterien und Biofilmen wurde festgestellt, dass die Biofilmzellen länger waren als die planktonischen Bakterien. Die Zelllängen haben sich jedoch durch Silberexposition nicht verändert. Chaiyanan et al. (2001) zeigten anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass *Vibrio cholerae* im VBNC-Zustand seine Morphologie ändert. Die stäbchenförmigen Bakterien waren in eine Kokkenform geschrumpft. Dies war im Falle von silberexponiertem *P. aeruginosa* nicht zu beobachten.

6.5.6 Netzdiagramme zur Darstellung des VBNC-Zustandes

Es gibt in der Fachliteratur unterschiedliche Ansichten zur Interpretation und Gewichtung der verschiedenen experimentell ermittelbaren Vitalitätsparameter von Bakterien (z.B. Hammes et al., 2011). In seiner Darstellung von Vitalitätsfaktoren zeigt Hammes et al. (2011) einen Punkt an dem eine Zelle irreversibel geschädigt ist. Der VBNC-Zustand beinhaltet unspezifische Antworten auf unterschiedliche Stressoren. Die Interpretation der Daten kann demnach nur schwer verallgemeinert werden. Auch der Punkt, an dem eine Zelle irreversibel geschädigt ist, kann anhand von einzelnen Parametern nur schwer bestimmt werden.

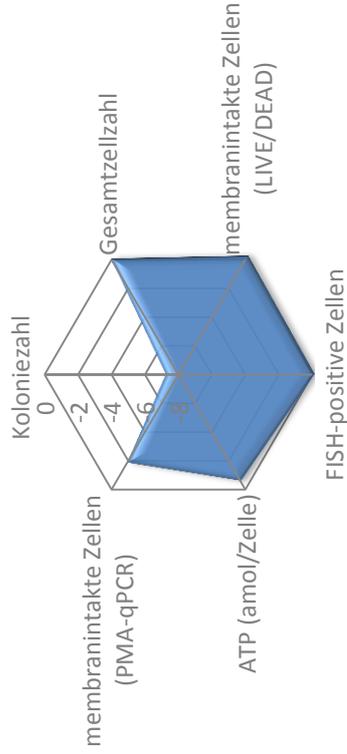
In der vorliegenden Arbeit wurde eine alternative Darstellung von Vitalitätsparametern von Bakterien im VBNC-Zustand eingeführt (Abbildung 65-67). Die Daten wurden in einem Netzdiagramm aufgetragen. Dieses Netzdiagramm zeigt die Änderungen der Vitalitätsfaktoren von silberexponierten Bakterien (N_{Ag}) im Vergleich zu den Vitalitätsfaktoren der Bakterien, die nicht mit Silber exponiert wurden (N_0) in logarithmischer Form ($\log N_{\text{Ag}}/N_0$). Die Vitalitätsmarker wurden jeweils auf einer Achse aufgetragen und über Flächen miteinander verbunden. Somit wurde eine Normierung der unterschiedlichen Parameter gewährleistet. Unterschiede und Änderungen bezüglich der Vitalität von Bakterien, können also anhand der Fläche und des Musters des Netzdiagrammes abgelesen und beurteilt werden. Die Auftragung in einem Netzdiagramm,

ermöglicht es eine Fläche bzw. ein Muster zu erzeugen, welches alle Parameter in einem Diagramm vereint. Unterschiedlich behandelte Zellen können so auf einen Blick miteinander verglichen werden. Anhand der Fläche, aber auch anhand des Musters des Netzdiagramms, kann eine Einschätzung der Vitalität von nicht kultivierbaren Bakterien abgegeben werden. Die Muster, welche bei dieser Darstellung entstehen, zeigen eine physiologische Antwort des Organismus auf Stress.

P. aeruginosa

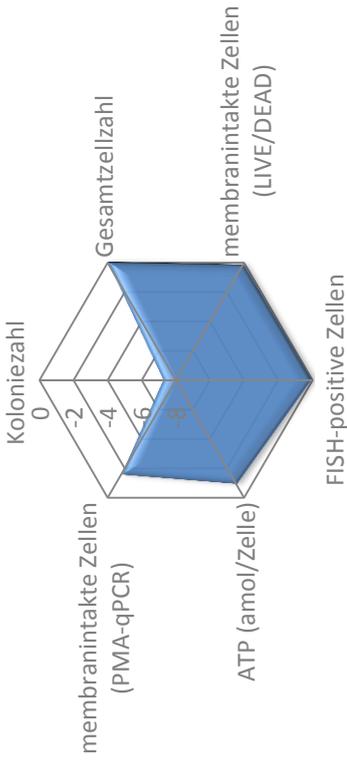
Planktonische
Bakterien

500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs)



FISH-positive Zellen

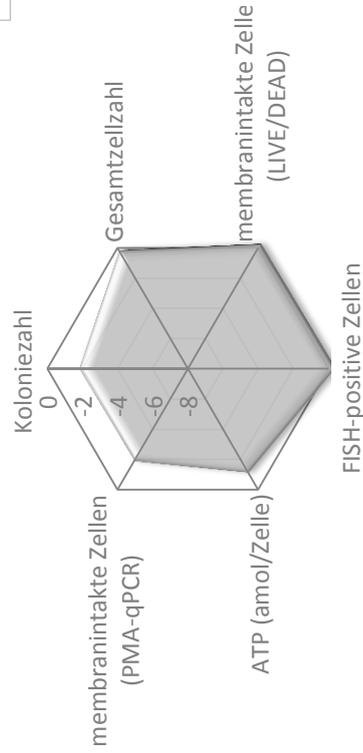
1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNPs)



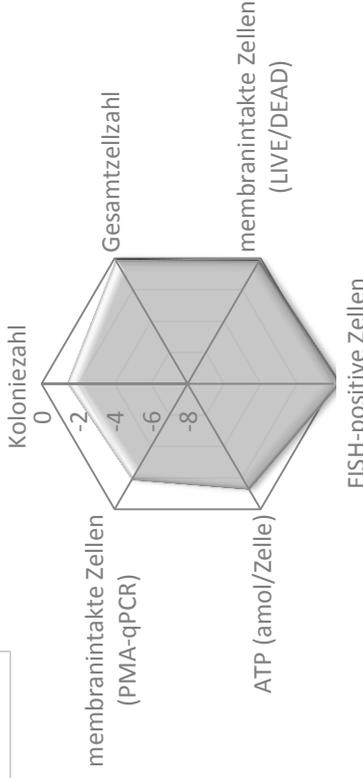
FISH-positive Zellen

$\log N_{\text{Ag}}/N_0$

Biofilme



FISH-positive Zellen



FISH-positive Zellen

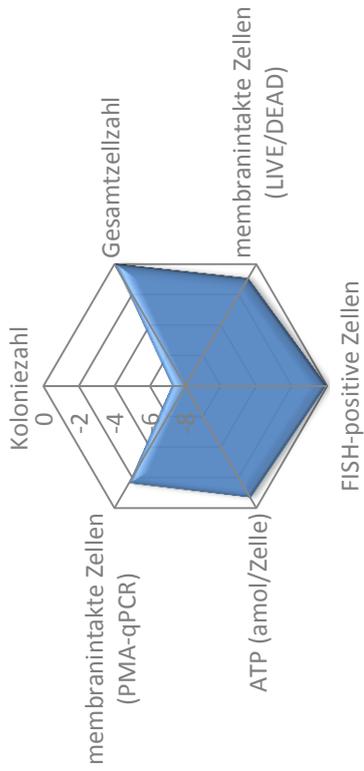
Abbildung 65: Einfluss von AgNPs (500 und 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36 °C. Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36 °C, 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD®-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter Glo™ -Kit). Planktonische Bakterien N_0 : $1,67 \times 10^7$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $7,6 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,4 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), $4,0 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (FISH), $0,018$ amol ATP Zelle⁻¹ und $3,9 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). Biofilme N_0 : $7,7 \times 10^6$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $1,2 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,0 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), $2,3 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH), $0,33$ amol ATP Zelle⁻¹ und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR).

P. aeruginosa

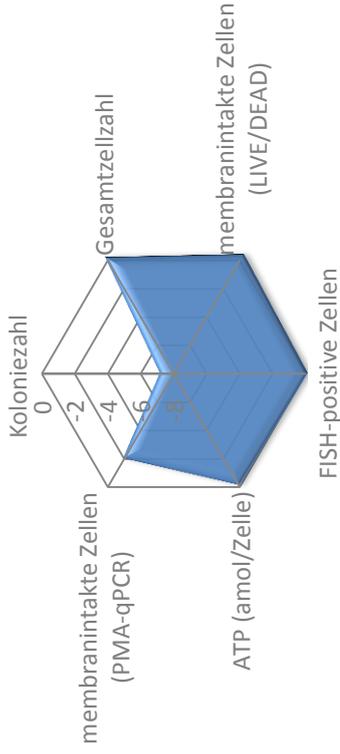
25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNO_3)

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag (AgNO_3)

Planktonische
Bakterien



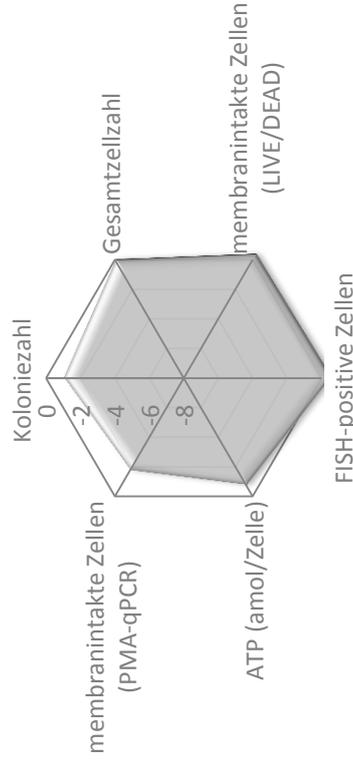
FISH-positive Zellen



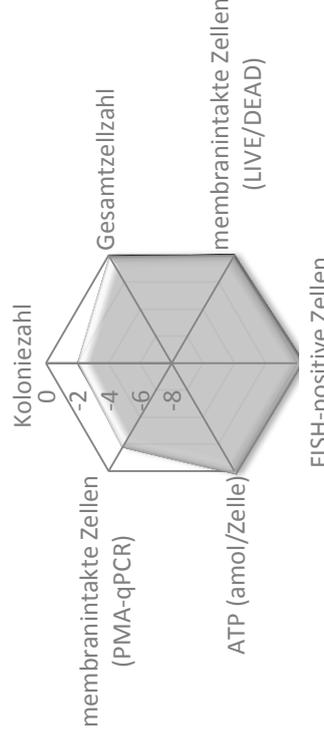
FISH-positive Zellen

$\log N_{\text{Ag}}/N_0$

Biofilme



FISH-positive Zellen



FISH-positive Zellen

Abbildung 66: Einfluss von AgNO_3 (25 und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) auf die Vitalität von etablierten Biofilmen und planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase von *P. aeruginosa* AdS, 24 h, 36°C . Bestimmung der Koloniezahl (LB, 36°C , 24 h), der Gesamtzellzahl (DAPI-Methode), der membranintakten Bakterien mit der LIVE/DEAD®-Methode und der PMA-qPCR, der Zellen mit rRNA (FISH) und des ATP-Gehalts (Bactiter Glo™-Kit). Planktonische Bakterien N_0 : $1,67 \times 10^7$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $7,6 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,4 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), 4×10^8 Zellen pro Kavität (FISH), $0,018 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $3,9 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR). Biofilme N_0 : $7,7 \times 10^6$ KBE pro Kavität (Koloniezahl), $1,2 \times 10^8$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $1,0 \times 10^7$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD), $2,3 \times 10^7$ Zellen pro Kavität (FISH), $0,33 \text{ amol ATP Zelle}^{-1}$ und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR).

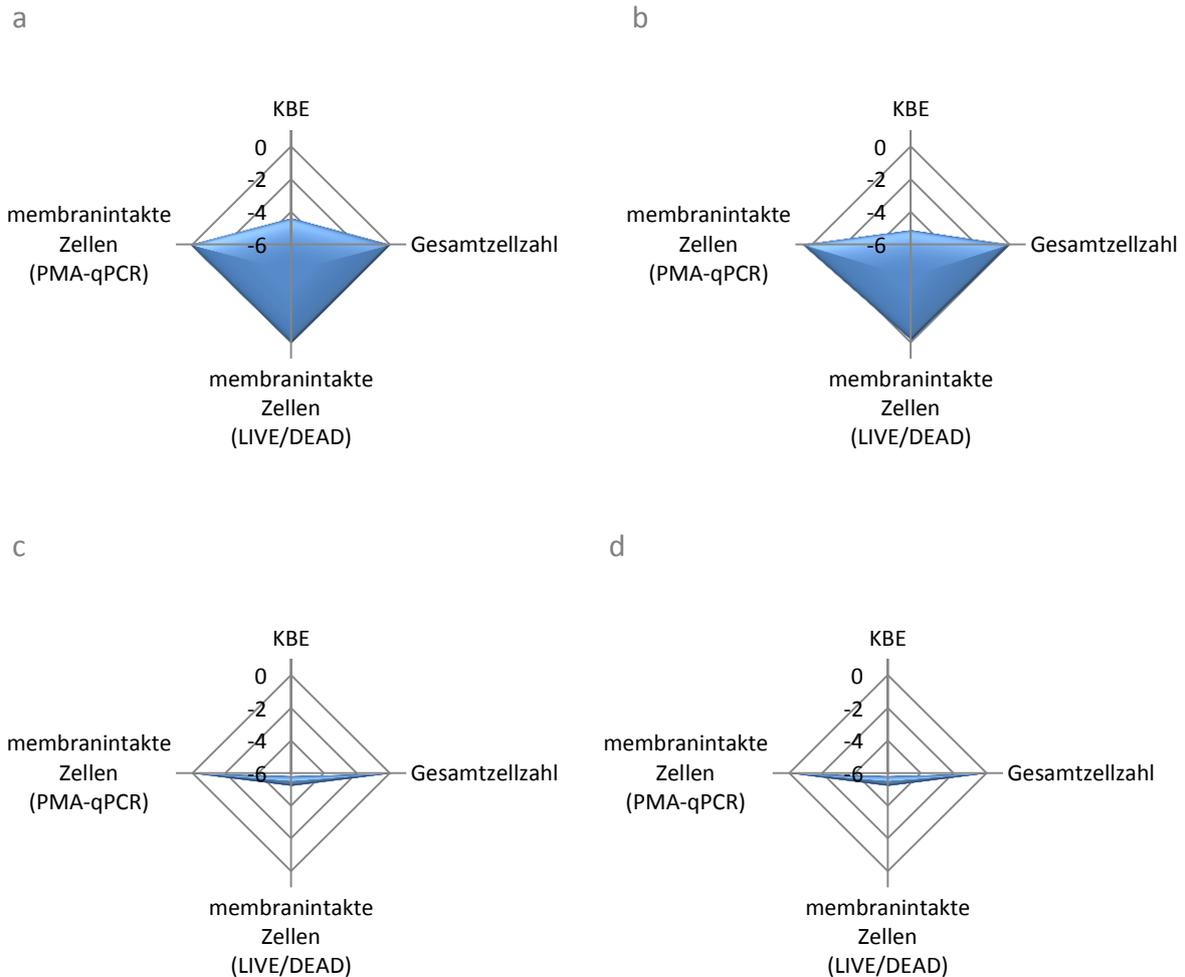


Abbildung 67: Einfluss von AgNPs ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (a), AgNO_3 ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) (b), Isopropanol (70 % (v/v)) (c) und Hitze (30 min, $65 \text{ }^\circ\text{C}$) auf die Vitalität (Koloniezahl, Gesamtzellzahl, Membranintegrität (LIVE/DEAD-Färbung und PMA-qPCR)) von planktonischen *P. aeruginosa AdS* Zellen (1×10^6 Zellen mL^{-1}) in PFD nach 24 h bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$. N_0 : $1,3 \times 10^6$ KBE pro Kavität, $1,1 \times 10^6$ Zellen pro Kavität (Gesamtzellzahl), $2,3 \times 10^5$ membranintakte Zellen pro Kavität (LIVE/DEAD) und $1,1 \times 10^6$ membranintakte Zellen (PMA-qPCR).

Betrachtet man so diese Parameter für die silberexponierten Zellen, dann ist deutlich zu erkennen, dass sie sich im Prinzip nur durch die Abnahme der Kultivierbarkeit von der silberfreien Kontrolle unterscheiden. Die Muster der Netzdiagramme der Zellen, welche als Kontrolle für inaktivierte Zellen verwendet wurden (Abbildung 67 c, d), unterscheiden sich jedoch deutlich von denen der silberexponierten Zellen und denen der silberfreien Kontrollen. Die aufgetragene Fläche ist deutlich kleiner und das Muster ist verschoben. Aufgrund der Betrachtung aller Parameter kann eine Abtötung der Bakterien durch Silber ausgeschlossen werden. Die Darstellung im Netzdiagramm erwies sich als gut geeignete Darstellung zur Beurteilung von Bakterien im VBNC-Zustand.

Die meisten bisher in der Literatur gezeigten Daten zur Inaktivierung von Bakterien und Biofilmen durch Silber, beruhen auf kulturabhängigen Methoden. Der VBNC-Zustand wurde nicht berücksichtigt. Es gibt jedoch einige Studien, bei denen auch kulturunabhängige Methoden verwendet wurden, um die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber zu untersuchen. Keine der Studien stellt Daten zur Kultivierbarkeit denen von kulturunabhängigen Verfahren gegenübergestellt.

Hwang et al. (2006) exponierten *P. aeruginosa* mit Silbernitrat in synthetischem Trinkwasser. Sie beobachteten eine Inaktivierung (vollständige Abnahme der Membranintegrität mit der LIVE/DEAD-Färbung) von *P. aeruginosa* nach 8 h bei einer Silberkonzentration von $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Theophel et al. (2014) untersuchten den Einfluss von AgPURE W10 auf klinische Isolate von *Enterococcus faecium*. Sie stellten fest, dass eine Exposition mit 0,006 % AgNPs in Puffer zu einer Abnahme von 70 % der membranintakten Bakterien führt. Sie setzten das LIVE/DEAD Kit nach Herstellerangaben ohne Informationen zur Optimierung oder Verdünnung von Farbstoffen ein. Radzig et al. (2013) untersuchten den Effekt von AgNPs auf Biofilme, welche auf Glasobjektträgern angezüchtet wurden, mittels LIVE/DEAD Kit. Sie beobachteten, dass AgNPs ($100\text{-}150 \mu\text{g mL}^{-1}$) zu einer nahezu vollständigen Abnahme der membranintakten Bakterien führte. Bei der Kontrolle ohne Silber waren fast ausschließlich membranintakte Bakterien zu erkennen. Roe et al. (2008) setzten zur Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit von AgNP-funktionalisierten Kunststoff-Kathetern das Tetrazoliumsalz XTT ein. XTT wird in der Zelle zu unlöslichem Formazan reduziert. Es weist somit die Atmungsaktivität und die Aktivität von Enzymen der Atmungskette (Dehydrogenase) nach (Hammes et al., 2011). Bei *E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus*, koagulase-negativen Staphylokokken und *P. aeruginosa* wurde nach 24 h eine Abnahme der planktonischen Bakterien um 100 % festgestellt. Nach 72 h wurde eine Abnahme um 50-87 % der Biofilmbakterien detektiert. Choi et al. (2010) untersuchten den Einfluss von AgNPs und Silbernitrat auf etablierte Biofilme mit der Mikrorespirometrie. Hierbei wurde der Sauerstoffverbrauch der silberexponierten Bakterien ermittelt. Silber (AgNPs und Silbernitrat) führte konzentrationsabhängig zu einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs. Die Autoren diskutieren zwar, dass es eine Diskrepanz zwischen der Mikrorespirometrie und der Kultivierbarkeit der Bakterien geben müsste, da beispielsweise geschädigte Bakterien nicht mehr auf Agar wachsen könnten, aber trotzdem noch Sauerstoff verbrauchen könnten. Sie stellen jedoch keinen Bezug zum VBNC-Zustand dar. Zudem setzen sie keine Kulturverfahren ein, um die Diskrepanz der beiden Methoden experimentell zu ermitteln. Percival et al. (2011) untersuchten die antimikrobielle Wirksamkeit von silberhaltigen Wundauflagen gegen planktonische *S. aureus* und *P. aeruginosa* mittels LIVE/DEAD-Färbung und Durchflusszytometrie. Sie konnten keinen signifikanten antimikrobiellen Effekt von Silber auf die Bakterien erkennen. Zwar erwähnen die Autoren das Problem, dass Bakterien im VBNC-Zustand nicht durch Kultivierungsmethoden erfasst werden, aber sie vergleichen die Daten, welche mit kulturunabhängigen Methoden ermittelt wurden, nicht mit Kulturverfahren. Es gibt also Untersuchungen, die die Vitalität von Bakterien nach Silberexposition mit kulturunabhängigen Methoden zeigten. Es gibt jedoch keine Untersu-

chungen die Kultivierungsmethoden und kultivierungsunabhängige Methoden im gleichen Testsystem eingesetzt und vergleichend gegenüberstellen.

Bakterien im VBNC-Zustand können in den kultivierbaren Zustand zurückgeführt werden. Die Aufhebung der Stressoren, die den Zustand ausgelöst haben, das Hinzufügen von Nährstoffen, die Veränderung der Temperatur oder die Passage durch einen Wirt, können dazu führen, dass die Bakterien wieder kultivierbar und auch infektiös werden (Oliver, 2005; Oliver, 2010). Dwidjosiswojo et al. (2011) zeigten, dass *P. aeruginosa*, welcher sich in einem kupferinduzierten VBNC-Zustand befindet, durch Aufhebung des Kupferstressen in den kultivierbaren Zustand zurückgeführt werden kann („Resuscitation“). Zudem wies *P. aeruginosa* nach der Rückführung in den kultivierbaren Zustand wieder zytotoxische Eigenschaften auf. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Rückführung in den kultivierbaren Zustand erreicht. Es handelt sich jedoch häufig um ein kleines Fenster an Bedingungen, welche eine Rückführung der Bakterien in den kultivierbaren Zustand ermöglichen. Der VBNC-Zustand wurde bereits in 85 unterschiedlichen Bakterienspezies nachgewiesen. Bei lediglich 26 dieser Spezies wurde die „Resuscitation“ der Bakterien gezeigt. Möglicherweise wurden bei den verbleibenden Spezies noch nicht die richtigen Bedingungen gefunden. Aus diesem Grund sollte auch bei weiteren Untersuchungen zum silberinduzierten VBNC-Zustand an diesem Punkt angeknüpft werden. Bei der Untersuchung der Rückführung in den kultivierbaren Zustand ist es besonders wichtig zwischen „Resuscitation“ und dem Wachsen von einzelnen Bakterien zu unterscheiden (Dukan et al., 1997). Es ist nicht auszuschließen, dass eine Interaktion von Silber mit Bestandteilen im Körper, zu einer Verringerung des bioverfügbaren Silbers führt. Eine Rückführung von VBNC-Zellen in den kultivierbaren Zustand ist nicht ausgeschlossen.

Die vorliegende Arbeit ist demnach die erste Untersuchung, die die Silberwirkung vom Gesichtspunkt des VBNC-Zustandes betrachtet und diesen nachgewiesen hat.

6.5.7 Proteomanalytik von *P. aeruginosa* im VBNC-Zustand

Die 2D-DIGE wurde eingesetzt, um das Proteom von *P. aeruginosa*, welcher sich im silberinduzierten VBNC-Zustand befand, zu untersuchen. Exemplarisch wurde hierfür die Exposition mit Silbernitrat ausgewählt, da die Wirkung von AgNPs ebenfalls auf der Freisetzung von Silberionen zu beruhen scheint (Xiu et al., 2012). Das Proteom von silberexponierten *P. aeruginosa* wurde mit dem von nicht silberexponierten *P. aeruginosa* in der planktonischen Phase und im Biofilm verglichen. Trotz der Vorteile der 2D-DIGE gegenüber der konventionellen 2D-PAGE ist bis heute keine Studie bekannt, die diese Methode zur Charakterisierung des VBNC-Zustandes einsetzte. Vorteil der 2D-DIGE gegenüber der herkömmlichen 2D-PAGE ist, dass man zwei Proben auf einem Gel direkt vergleichen und die Intensität der jeweiligen Spots quantifizieren kann (Ünlü et al. 1997; Beckett 2012).

Etablierte Biofilme und planktonische Bakterien in der stationären Wachstumsphase wurden mit Silbernitrat ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 24 h bei 36°C exponiert. Die Proteinmuster der planktonischen

Bakterien unterschieden sich deutlich von denen der Biofilme. Dies wurde auch zuvor in anderen Studien anhand von *P. aeruginosa* gezeigt (Sauer et al., 2002).

Sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen war mit und ohne Silber ein sehr ähnliches Proteinmuster zu erkennen. Bei den planktonischen Bakterien wurden im 2D-Gel insgesamt 961 Spots detektiert. Es unterschieden sich 17 Spots signifikant ($p < 0,05$) von denen der Kontrollen ohne Silber. Die Intensität von zehn Proteinspots nahm durch Silberexposition ab und bei sieben nahm diese zu. Bei den Biofilmen wurden insgesamt 1081 Proteinspots detektiert, wovon sich 86 Spots signifikant unterschieden. Hierbei nahm die Intensität von 32 Proteinspots zu und die von 54 Proteinspots ab. Von diesen Biofilmproben konnten 20 unterschiedliche Proteine mittels LC-MS identifiziert werden. Hiervon wurden insgesamt sechs herauf- und 14 herunterreguliert.

Die Proteine, welche heraufreguliert waren, erfüllen folgende Funktionen: Transport und Metabolismus von Nukleotiden, Energieproduktion und Konservierung und Proteinbiosynthese. Zu den Funktionen der Proteine, welche herunterreguliert wurden, gehören: Transport und Metabolismus von Lipiden, Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten, Proteinbiosynthese, Replikation, Rekombination und Reparatur, Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen. Die Funktion von drei herunterregulierten Proteinen ist unbekannt.

Auch in anderen Studien wurde das Proteom von silberexponierten *E. coli* untersucht (Tabelle 36). Hierbei wurde jedoch kein Bezug zum VBNC-Zustand hergestellt. Yamamata et al., 2005 stellten beim Einsatz der konventionellen 2D-PAGE ebenfalls fest, dass Proteine, die an der Energiegewinnung beteiligt sind, heraufreguliert wurden. In einer weiteren Studie von Lok et al. (2006) wurde wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass Proteine, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind, ebenfalls heraufreguliert wurden. Hierzu gehörten in beiden Studien Chaperone.

Tabelle 36: Literaturrecherche zur Proteomanalytik (2D-PAGE) von silberexponierten Bakterien.

Spezies	Ag-Exposition	Heraufregulierte Proteine	Funktion	Herunterregulierte Proteine	Quelle	
<i>E. coli</i>	900 ppb Ag ⁺ in Wasser, 3 h	30S ribosomale Untereinheit Protein 2	Proteinbiosynthese			
		Succinyl-CoA Synthetase	Energiegewinnung		Yamamata et al., 2005	
		Maltose Transporter	Energiegewinnung	keine		
		Fructose-Biphosphat-Aldolase	Kohlenhydratmetabolismus			
		Hypothetisches Protein	unbekannt			
<i>E. coli</i>	0,8 nM AgNPs, 30 min	Vorläufer des äußeren Membranproteins A	Stressabwehr			
		Vorläufer des äußeren Membranproteins C	Stressabwehr			
		Vorläufer des äußeren Membranproteins F	Stressabwehr			
		Vorläufer des periplasmatischen Oligopeptid Bindeprotein	Stressabwehr	keine	Lok et al., 2006	
		Vorläufer des D- Methioninbindenden Lipoprotein	Stressabwehr			
		Einschlusskörper Bindeprotein B	Chaperone			
		30S ribosomale Untereinheit S6	Proteinbiosynthese			

In weiteren Studien wurde das Proteom von Bakterien im VBNC-Zustand untersucht (Tabelle 37). Hierbei wurden unterschiedliche Auslöser für den VBNC-Zustand anhand unterschiedlicher Bakterienspezies untersucht.

Im Falle von *Legionella pneumophila*, welches sich aufgrund von Monochloramin-Exposition im VBNC-Zustand befand, wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, Proteine heraufreguliert, welche an Stoffwechsel und Energieproduktion beteiligt sind (Alleron et al., 2013). Es wurden keine Proteine festgestellt, die herunterreguliert wurden. Lai et al. (2009) untersuchten das Proteom von *Vibrio parahaemolyticus*, welcher sich aufgrund von sechswöchiger Exposition bei niedriger Temperatur (4 °C) im VBNC-Zustand befand. Sie zeigten, dass Proteine, die an der Proteinbiosynthese und der Energieproduktion (ATP-Synthase) beteiligt sind, wie auch in der vorliegenden Arbeit, im VBNC-Zustand heraufreguliert waren. Heim et al. (2002) zeigten bei VBNC-Zellen von *Enterococcus faecalis* eine Zunahme von Proteinen, welche an der Energiegewinnung, der Proteinbiosynthese und dem Lipidmetabolismus beteiligt waren. Dies wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit festgestellt. Der VBNC-Zustand wurde durch 20-tägige Inkubation bei niedrigen Temperaturen (20 °C) induziert. Bei *E. coli*, welcher sich aufgrund von H₂O₂-Exposition im VBNC-Zustand befand, wurde ebenfalls ein äußeres Membranprotein, dessen Funktion unbekannt ist, im VBNC-Zustand hochreguliert (Asakura et al., 2007).

Obwohl Ähnlichkeiten zu erkennen sind, scheint die Veränderung der Proteinexpression im VBNC-Zustand von der Bakterienspezies und dem Auslöser des VBNC-Zustandes abhängig zu sein. Es muss zudem beachtet werden, dass zum Beispiel im Falle von Silber eine Veränderung des Proteinmusters auch auf die schädigende Wirkung von Silber auf Proteine zurückzuführen sein könnte. Gleiches gilt für andere Stressoren wie H₂O₂. Auch wenn sich Bakterien durch den VBNC-Zustand vor Silber schützen, heißt das nicht, dass sie gar nicht geschädigt werden können. Diese Unterschiede zwischen silberexponierten Bakterien und der silberfreien Kontrolle müssen jedoch nicht ausschließlich auf dem VBNC-Zustand beruhen (Lok et al., 2006). Es ist möglich, dass andere Anpassungsmechanismen dafür verantwortlich sind. In den Studien von Lok et al. (2006) und Yamamata et al. (2005) wurde der VBNC-Zustand nicht berücksichtigt. Da keine Kulturverfahren eingesetzt wurden, ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich die untersuchten Bakterien im VBNC-Zustand befanden. Die 2D-DIGE stellte sich in der vorliegenden Arbeit als geeignete Methode zur Untersuchung des Proteoms von Bakterien im VBNC-Zustand heraus.

Tabelle 37: Literaturrecherche zur Proteomanalytik (2D-PAGE) von Bakterien im VBNC-Zustand; Liu & Libchaber, 2004; Hong et al., 2006; Li et al., 2014.

Spezies	VBNC-Auslöser	Heraufregulierte Proteine	Funktion	Herunterregulierte Proteine	Funktion	Quelle
<i>L. pneumophila</i>	Monochloramin-Exposition	"macrophage infectivity potentiator protein"	Virulenz			Alleron et al., 2013
		Hypothetisches Protein	Virulenz			
		Proteolytische Untereinheit (Protease)	Virulenz			
		Äußeres Membranprotein	Virulenz			
		Enoyl-Reduktase	Stoffwechsel und Energieproduktion			
		Elektronentransferierendes Flavoprotein (alpha Untereinheit)	Stoffwechsel und Energieproduktion	keine	keine	
		Elektronentransferierendes Flavoprotein (beta Untereinheit)	Stoffwechsel und Energieproduktion			
		50S ribosomales Protein (L25)	Stoffwechsel und Energieproduktion			
		50S ribosomales Protein (L1)	Stoffwechsel und Energieproduktion			
		<i>E. faecalis</i>	Inkubation in Seewasser für 20 Tage bei 4 °C	Homolog des Elongationsfaktors von <i>Listeria innocua</i>	Proteinbiosynthese	
Fructose-Bisphosphat-Aldolase	Glykolyse			Nicht identifiziertes Protein	Nicht bekannt	
Wahrscheinliches katabolisches Regulatorprotein	Proteinbiosynthese					

Tabelle 37 (Fortsetzung): Literaturrecherche zur Proteomanalytik (2D-PAGE) von Bakterien im VBNC-Zustand; Liu & Libchaber, 2004; Hong et al., 2006; Li et al., 2014.

Spezies	VBNC-Auslöser	Heraufregulierte Proteine	Funktion	Herunterregulierte Proteine	Funktion	Quelle
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Inkubation in Meerwasser Salzmedium bei 4 °C für sechs Wochen.	Homolog der DNA-gelenkten RNA Polymerase (alpha Untereinheit)	Proteinbiosynthese			
		IMP Cyclohydrolase	Proteinbiosynthese			
		Ribosomales Protein S1	Proteinbiosynthese			
		Homolog des Elongationsfaktors TU	Proteinbiosynthese			
		Elongationsfaktor EF-G	Proteinbiosynthese			
		ATP-Synthase (F1 alpha Untereinheit)	Energiegewinnung	keine	keine	Lai, 2009
		Dihydropolypyllysinrest-Acetyltransferase	Gluconeogenese			
		Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Energiegewinnung			
		Homolog des Peroxiredoxin	Antioxidantien			
		Konserviertes hypothetisches Protein	unbekannt			
<i>E. coli</i>	H ₂ O ₂ -Exposition	Äußeres Membranprotein W	unbekannt	Peroxiredoxin AhpCF	Abwehr von oxidativem Stress	Asakura et al., 2007
				Peroxiredoxin AceF	Abwehr von oxidativem Stress	

6.6 Wirkmechanismen von Silber bei *P. aeruginosa*

Die Wirkmechanismen, die bei der Interaktion von Silber mit Bakterien auftreten, sind nicht vollständig erforscht. Es gibt unterschiedliche Hypothesen zur Wirkung von Silberionen auf Bakterien. Die Schädigung von Bakterien durch Silber ist nicht auf einen spezifischen Prozess zurückzuführen. Silber wirkt auf unterschiedliche Weisen und an zahlreichen Bestandteilen der Bakterienzelle (Abbildung 3). Silberionen interagieren beispielsweise mit Elektronendonatoren wie Thiolgruppen an unterschiedlichen Zellkomponenten wie z.B. Proteinen (Schierholz, 1998; Percival et al., 2005; Cavalieri et al., 2014; Lemire et al., 2013). Ein weiterer beschriebener Wirkmechanismus ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Bakterienzelle (Park et al., 2009; Lemire et al., 2013).

Um zu untersuchen, welche Wirkmechanismen bei Exposition von planktonischen Bakterien und Biofilmen mit AgNPs und Silbernitrat entstehen, wurden unterschiedliche Substanzen ausgewählt, die entweder als Scavenger für reaktive Sauerstoffspezies fungieren oder eine SH-Gruppe enthalten: Natriumpyruvat, D-Mannitol, Katalase, Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und L-Cystein. Der Einfluss der ausgewählten Substanzen auf die Silberwirkung wurde im Mikrotiterplatten-Assay exemplarisch für *P. aeruginosa* untersucht. Vor Zugabe von Silbernitrat/AgNPs wurden die Substanzen jeweils mit den unterschiedlichen Substanzen in HEPES-Puffer (Endkonzentration 100 mM) vermischt. Anschließend wurde diese Mischung zu den planktonischen Bakterien in der stationären Wachstumsphase und Biofilmen gegeben. AgNPs (9,25 mM) und Silbernitrat (0,59 mM) führten zu einer vollständigen Abnahme der Kultivierbarkeit bei den planktonischen Bakterien und zu einer Abnahme von 1-2 log-Stufen bei den Biofilmen.

Natriumpyruvat kann Wasserstoffperoxid spalten. Es entsteht Carbonsäure, Wasser und Kohlenstoffdioxid (Bunton, 1949; Matsumura et al., 2003). Natriumpyruvat (100 mM) zeigte sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen keine Schutzwirkung gegen Silbernitrat. Bei den planktonischen Bakterien, welche mit AgNPs exponiert wurden, wies Natriumpyruvat eine leichte Schutzwirkung auf. Matsumura et al. (2003) beobachteten bei *E. coli* ebenfalls eine Schutzwirkung von Natriumpyruvat (0,1 %) gegen die inaktivierende Wirkung von Silber (Silberzeolith).

D-Mannitol ist ein Zuckeralkohol und ein spezifischer Scavenger für freie Hydroxylradikale (Bruce & Reiser, 2011; Desesso et al., 1994). Auch Mannitol (100 mM) zeigte sowohl bei den planktonischen Bakterien als auch bei den Biofilmen keine Schutzwirkung gegen Silbernitrat. Bei den planktonischen Bakterien, welche mit AgNPs exponiert wurden, wies Natriumpyruvat eine leichte Schutzwirkung auf. Matsumura et al. (2003) beobachteten bei *E. coli* eine Schutzwirkung von Mannitol (5 mM) gegen die inaktivierende Wirkung von Silberzeolith.

Ascorbinsäure ist ein Radikalfänger für das Hydroperoxyradikal und kann dieses unter der Entstehung von Wasserstoffperoxid reduzieren (Niki, 1991). Ascorbinsäure ist jedoch auch in der Lage Silberionen zu reduzieren (Niki, 1991). Ascorbinsäure (10 mM) zeigte eine Schutzwirkung gegen Silber (AgNPs und Silbernitrat). Bei der Zugabe von Ascorbinsäure zu den Silberlösungen wurden Verfärbungen sichtbar, die auf eine Reduktion des Silbers hinwiesen. Kora & Arunachalam (2011) kultivierten *P. aeruginosa* auf AgNP-haltigem MH-Agar ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Das Wachstum von *P. aeruginosa* wurde gehemmt. Wurde der Agar zusätzlich mit Ascorbinsäure (10 mM) versetzt, dann war eine Schutzwirkung gegen die AgNPs zu erkennen.

Katalase ist ein Enzym, das die Spaltung von Wasserstoffperoxid katalysiert (Imlay, 2003). Wie auch Natriumpyruvat und D-Mannitol wies Katalase ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) keine Schutzwirkung gegen Silbernitrat, aber eine leichte Schutzwirkung gegen AgNPs bei planktonischen Zellen auf. Inoue et al. (2002) zeigten, dass Katalase ($0,008 \text{ g}$) eine Schutzwirkung gegen Silberzeolith aufwies. Sowohl N-Acetylcystein (10 mM) als auch L-Cystein (10 mM) zeigten bei planktonischen Bakterien und Biofilmen eine Schutzwirkung gegen Silbernitrat und AgNPs. N-Acetylcystein enthält eine Thiolgruppe (Jepsen et al., 1992). Diese kann mit Silberionen eine Bindung eingehen. N-Acetylcystein kann jedoch auch als Radikalfänger dienen. N-Acetylcystein kann oxidiert werden und Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren (Gillissen et al., 1997). Die Aminosäure L-Cystein, welche ebenfalls eine Thiolgruppe besitzt, ist in der Lage mit Silberionen eine Bindung einzugehen (Ralph et al., 1994). Liao et al. (1997) zeigten, dass sowohl N-Acetylcystein als auch L-Cystein die Wirkung von Silbernitrat (0,1 und 1 % (w/v)) bei *P. aeruginosa* neutralisiert. Kora & Arunachalam (2011) supplementierten MH-Agar mit AgNPs ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Das Wachstum von *P. aeruginosa* wurde gehemmt. Supplementierten sie den Agar zusätzlich mit N-Acetylcystein (10 mM), dann war eine Schutzwirkung zu erkennen. Eine weitere Studie zeigte, dass N-Acetylcystein (10 mM) bei *E. coli* eine Schutzwirkung, sowohl gegen Silbernitrat (33 nM) als auch gegen AgNPs (33 nM), aufwies. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies involviert war. Sie gehen jedoch nicht darauf ein, dass N-Acetylcystein eine Thiolgruppe besitzt, mit der Silber interagieren kann. Die Studien in denen für N-Acetylcystein und L-Cystein eine Schutzwirkung gegen Silber nachgewiesen wurde, bestätigen die Ergebnisse, welche in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden.

Zusammenfassend ist demnach festzustellen, dass Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und L-Cystein bei den planktonischen Bakterien und den Biofilmen, sowohl bei AgNPs als auch bei Silbernitrat, eine Schutzwirkung aufwiesen. Dieser Mechanismus wurde auch in anderen Studien beobachtet. Die Interaktion von Silber mit Thiolgruppen (beispielsweise an Proteinen) scheint, sowohl im Falle von Silbernitrat als auch im Falle der AgNPs, eine wichtige Rolle bei der antibakteriellen Wirkung auf Bakterien zu spielen. Da Ascorbinsäure auch ein Reduktionsmittel für Silber ist, ist die Wirkung als Radikalfänger von etwaigen reaktiven Sauerstoffspezies, welche durch die Anwesenheit von Silber in der Zelle entstehen könnten, schwer einzuschätzen. Es ist aber gleichzeitig ein Hinweis darauf, dass die Wirkung der AgNPs maßgeblich durch die Anwesenheit von Silberionen bestimmt wird, da freie Silberio-

nen reduziert werden und die Wirkung von Silber somit abgeschwächt ist. Natriumpyruvat, D-Mannitol und Katalase zeigten lediglich bei den planktonischen Bakterien, die mit AgNPs exponiert wurden, eine Schutzwirkung. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid scheint bei der Wirkung von AgNPs eine Rolle zu spielen.

6.7 Silber in Medizinprodukten

Zusätzlich zu den Versuchen mit AgNP-Dispersionen wurden AgNP-dotierte Medizinprodukte (Knochenzement mit und ohne Gentamicin, Titan sowie Kollagenfolien) bezüglich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit, der Hemmung der Biofilmbildung und des Einflusses auf die Vitalität klinisch relevanter Bakterien (*P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis*) untersucht. Es wurde untersucht, ob eine Anwendung als Medizinprodukt aus Sicht der antimikrobiellen Wirksamkeit, sinnvoll ist. Es gibt viele unterschiedliche Arten von silberhaltigen Medizinprodukten. Als Beschichtung wird Silber, in Form von elementarem Silber oder AgNPs, auf Medizinprodukte aufgebracht. Silber wird zudem in die Matrix von Medizinprodukten, in Form von elementarem Silber, AgNPs, Silbersalzen, Komplexen oder Chelaten, eingebracht. Elementares Silber, AgNPs, Silbersalze, Komplexe und Chelate können auch in einer Polymermatrix als Beschichtung auf Medizinprodukte aufgetragen werden (Brooks et al., 2013; Poulter et al., 2013).

Knochenzement ist ein permanentes Implantat, bei dem eine Langzeitfreisetzung von Silber gewünscht ist. Die Knochenzemente bestehen aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit und ohne Gentamicin und wurden vor dem Aushärten mit unterschiedlichen Konzentrationen der AgNPs (AgPURE W10, rent a scientist) (0, 3, 4 und 5 mg g⁻¹ Ag in PMMA) versetzt. Knochenzemente werden verwendet, um künstliche Gelenkkörper im Körper zu befestigen. Gentamicin ist ein Amidoglycosid-Antibiotika, welches wirksam gegen Staphylokokken (*S. aureus* und *S. epidermidis*), *P. aeruginosa* und Enterobakterien ist (Miksits & Dierich, 2001). Die Anzahl der gentamicinresistenten *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* steigt jedoch an. Amidoglycosid-Antibiotika binden an bakterielle Ribosomen und führen damit zur direkten Hemmung der Proteinbiosynthese (Miksits & Dierich, 2001). Gentamicin wird in der Praxis häufig in Knochenzementen eingesetzt, um Infektionen vorzubeugen (Masri et al., 1998). Eine Elution in simulierter Körperflüssigkeit (SBF) ergab, dass innerhalb der ersten sechs Stunden etwa 0,5 µg g⁻¹ Ag und innerhalb von 8 Tagen noch einmal insgesamt 0,5 µg g⁻¹ Ag freigesetzt wurden (Sattig, 2014). SBF besitzt in etwa den gleichen pH-Wert und die gleiche Osmolarität wie menschliches Blutplasma (Kokubo, 1998). Es sind jedoch keine Proteine enthalten. Im menschlichen Körper führt die Anwesenheit von Proteinen voraussichtlich zu einer verringerten Freisetzung von Silberionen (Loza et al., 2014a). In dem, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testsystem, wurde LB-Medium eingesetzt. Diese Medium enthält Proteine, Peptide und Aminosäuren. Schwefelhaltige Aminosäuren oder BSA könnten mit den AgNPs interagieren, die Freisetzung von Silberionen verhindern und die antimikrobielle

Wirksamkeit verringern (Loza et al., 2014a; Grade et al., 2012b). Diese Bedingungen sind auch im menschlichen Körper zu erwarten, wo die Medizinprodukte von Blut, Plasma und Gewebeflüssigkeit umgeben sind. Silberionen können lediglich von den AgNPs auf der Oberfläche der Knochenzemente abgegeben werden, während die AgNPs im Inneren des Knochenzementes immobilisiert sind. Inwiefern die Ionen aus dem Inneren durch etwaige Poren, die bei der Freisetzung von Silber entstehen könnten, nach außen nachdiffundieren können ist nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde keine biofilminhibierende Wirkung der silberdotierten Knochenzemente festgestellt. Im Falle von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* wurde kein Einfluss der AgNPs auf die Vitalität beobachtet. Die Anzahl membranintakter Bakterien von *S. aureus* nahm mit steigender AgNP-Konzentration auf den Knochenzementen ab (nicht quantifiziert). Es waren jedoch auch bei der höchsten AgNP-Konzentration noch membranintakte Bakterien vorhanden.

Bei den Knochenzementen, die sowohl Gentamicin und AgNPs enthielten, war keine Wirkung festzustellen, die auf AgNPs zurückzuführen ist. Das Wachstum von *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurde vollständig durch das enthaltene Gentamicin gehemmt. Deshalb konnte eine mögliche synergistische Wirkung von AgNPs und Gentamicin nicht festgestellt werden. *S. epidermidis* bildete aufgrund seiner Gentamicinresistenz auf Knochenzement mit Gentamicin ähnlich stark ausgeprägte Biofilme, wie auf den gentamicinfreien Produkten. Auch bei *S. epidermidis* war kein inhibierender Effekt durch Silber zu verzeichnen.

Alt et al. (2004) zeigten in einem Proliferationstest, dass AgNP-haltiger Knochenzement (1 % AgPURE) das Wachstum eines MRSA-Stammes hemmt. Spadaro et al. (1979) untersuchten Silbersulfat-haltigen Knochenzement. Sie beobachteten einen inhibierenden Effekt durch Silber (0,05 % (w/w)) mittels Hemmhofstest gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus*. Zudem zeigten die Knochenzemente *in situ* eine gute Biokompatibilität in Kaninchen. Moojen et al. (2009) untersuchten die antimikrobielle Wirksamkeit von silberhaltigem Knochenzement *in vivo* im Tiermodell. Silberhaltige Knochenzemente (0,6-1 %) zeigten im Infektionsmodell keinen antimikrobiellen Effekt im Vergleich zur silberfreien Kontrolle. Ein Fallbeispiel aus der Praxis zeigte, dass ein Patient, bei dem AgNP-haltiger Knochenzement eingesetzt und nach fünf Jahren aufgrund von Komplikationen wieder entfernt wurde, im Vergleich zum natürlichen Silberspiegel im Menschen, eine 1000-fach erhöhte Silberkonzentration im Serum um die Prothese aufwies (Harden et al., 2007; Lansdown, 2007; Sudmann et al., 1994). Zudem wurden auch systemisch erhöhte Silberkonzentrationen ermittelt. Er litt unter schweren neurologischen Defiziten und die Prothese hatte sich gelockert. Es wurde vermutet, dass die Komplikationen aufgrund von Silber aufgetreten waren. Von einem ähnlichen Fall wurde auch von Vik et al. (1985) berichtet.

Aus diesen Studien geht hervor: Die Wirkung von silberhaltigen Knochenzementen gegen MRSA, andere *S. aureus* Stämme und *P. aeruginosa* wurde lediglich mittels Kulturverfahren beobachtet. Lediglich in einer Studie wurde Silber in Form von AgNPs eingesetzt. Hier wurde

mittels Kulturverfahren nachgewiesen, dass der AgNP-haltige Knochenzement das Wachstum von MRSA hemmt. Es sind jedoch keine kulturunabhängigen Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von silberhaltigen Knochenzementen bekannt. Die antimikrobielle Wirksamkeit von silberhaltigem Knochenzement konnte zudem bis dato nicht im *in vivo* Tiermodell bestätigt werden. Zudem ist keine klinische Studie bekannt, die die antimikrobielle Wirkung von silberhaltigem Knochenzement bestätigt.

Die Knochenimplantate aus Titan sind ein Beispiel für ein nicht permanentes Implantat, bei dem jedoch eine Langzeitfreisetzung von Silber gewünscht ist. Die Knochenimplantate bestehen aus Titan (TiAl6V4-Eli) und wurden mit AgNPs (AgPURE W50, rent a scientist) durch plasmaelektrolytische Oxidation (PEO) beschichtet (Gasqueres 2012). Knochenimplantate und Schrauben werden zur Fixierung von Knochenfrakturen eingesetzt (Albrektsson et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde keine biofilminhibierende Wirkung der Knochenimplantate auf *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* festgestellt. Es wurde zudem auch kein Einfluss, der AgNPs auf den Implantaten, auf die Vitalität beobachtet. Die Knochenimplantate aus Titan, welche verwendet wurden, enthalten auf der Oberfläche $14,3 \mu\text{g cm}^{-1}$ Ag. Eine Elution in SBF ergab, dass innerhalb von 15 Tagen kontinuierlich täglich zwischen 0,8 und $1,2 \text{ ng mm}^2$ Silber (keine Speziestrennung) freigesetzt wurden (Sattig, 2014). Gasqueres et al. (2012) untersuchten Titanstäbchen, welche durch die gleiche Technik und mit den gleichen AgNPs beschichtet wurden. Die Stäbchen wurden mit *S. epidermidis* (1×10^6 Zellen mL^{-1}) in 1 mL CASO-Medium inkubiert. Die Veränderung der Koloniezahl über die Zeit wurde bestimmt. Nach 12 h wurde eine vollständige Abnahme der Koloniezahl beobachtet. Zudem wurden nach 3-stündiger Inkubation rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt, die eine Abnahme der adhärennten Zellen auf der Oberfläche zeigten. Ewald et al. (2006) inkubierten silberbeschichtete Titanstäbe mit *S. epidermidis* und *Klebsiella pneumoniae* in LB-Medium für 24 h bei 37 °C. Anschließend wurde, der Anteil der adhärennten Zellen durch Anfärben mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff, bestimmt. Sie beobachteten eine signifikante Abnahme der adhärennten Zellen. Die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNP-beschichteten Titan-Prüfkörpern gegen *P. aeruginosa* wurde von Flores et al. (2010) untersucht. Sie inkubierten die Prüfkörper für 4 h in Nährmedium mit 1×10^{10} KBE mL^{-1} . Mit kulturellen Methoden wurde eine leichte Hemmung der Bakterien durch die AgNP-Beschichtung festgestellt. Untersuchungen der Oberfläche nach LIVE/DEAD-Färbung zeigten, dass die Anzahl der membranintakten Zellen um 20 % abnahm. Allerdings war auf der silberfreien Kontrolle lediglich ein Anteil von 40 % membranintakter Zellen vorhanden. Es gibt keine Aussagen über die Gesamtzellzahl. In einer weiteren Studie wurde Titan mit einer Mischung aus Nanotitan und -silber beschichtet (Li et al., 2009). Die Prüfkörperoberflächen wurden mit *E. coli* benetzt, mit einem Polyethylenfilm abgedeckt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Abnahme von 100 % der kultivierbaren Bakterien beobachtet. Auch Mo et al. (2009) untersuchten auf eine ähnliche Weise Titan, welches mit einem Silber-Hydroxylapatit/Titan Nanokomposit beschichtet wurde. Sie beobachteten eine Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Bakterien um etwa 2 log-Stufen bei *E. coli* und *S. aureus*. Mit dieser Methode untersuchten Wan et al. (2007) auch Titan, welches durch Ionenimplan-

tation mit Silber beschichtet wurde. Sie beobachteten eine Abnahme der kultivierbaren Bakterien (*S. aureus*) um 100 %. In einer *in vivo* Studie am Kaninchen wurden silberbeschichtete Endoprothesen aus Titan untersucht (Gosheger et al., 2004). Es wurde im Infektionsmodell gezeigt, dass die Infektionsrate bei *S. aureus* um 40 % gesenkt werden konnte. Zudem wurden keine toxischen Nebenwirkungen des Silbers festgestellt. Es wurden jedoch deutlich erhöhte Silberkonzentrationen in Blut und den Organen nachgewiesen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Titan-Prüfkörper zeigten keine zytotoxische Wirkung gegenüber mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten über einen Zeitraum von 21 d (Pauksch et al., 2013). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass silberbeschichtete Endoprothesen beim Menschen zwar ebenfalls erhöhte Silberkonzentrationen im Blut verursachen, aber dass keinerlei toxische Nebenwirkungen auftraten (Hardes et al., 2007). Die Wirksamkeit der Silberbeschichtung wurde jedoch nicht in der klinischen Studie untersucht.

Aus den oben genannten Studien geht hervor: Eine antimikrobielle Wirkung von silberdotiertem Titan mittels Kulturverfahren wurde also gegen *S. epidermidis* (nanopartikuläres Silber), *S. aureus* und *E. coli* (nicht nanopartikuläres Silber) beobachtet. Auch mit kulturunabhängigen Verfahren konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* auf nanosilberdotiertem Titan gehemmt ist. Weitere kulturunabhängige Untersuchungen zeigten, dass die Biofilmbildung auf Titan, welches nicht nanopartikuläres Silber enthielt, bei *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* ebenfalls gehemmt war. Zudem wurde eine leichte Abnahme der Vitalität von *P. aeruginosa* auf Titan (nicht nanopartikuläres Silber) beobachtet. *In vivo* wurden eine Abnahme der Infektionsrate um 40 % festgestellt. Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine antimikrobielle Wirkung der verwendeten Knochenimplantate nachwies, zeigen die Daten der Literatur durchaus eine antimikrobielle Wirkung.

Die Kollagenfolie ist ein resorbierbares Material, bei dem eine Kurzzeitfreisetzung von Silber gewünscht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss von Silber in den Kollagenfolien auf die Vitalität *S. aureus* und *S. epidermidis* beobachtet. *P. aeruginosa* war sogar in der Lage die silberhaltigen Kollagenfolien innerhalb von 24 h abzubauen. *P. aeruginosa* besitzt Kollagenasen. Hierbei handelt es sich um eine extrazelluläre Protease, welche in der Lage ist, Kollagen abzubauen (Diener et al., 1973). Der Abbau des Medizinprodukts ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass in diesem Testsystem keine antimikrobielle Wirksamkeit durch die AgNPs gegen *P. aeruginosa* gegeben war. Silber findet in der Praxis häufig in Wundauflagen Anwendung, insbesondere bei Brandopfern (Percival et al., 2005). Kollagenfolie ist ein resorbierbares Material, welches beispielsweise Anwendung in der Wundabdeckung findet. Diese Wundauflagen wurden aus Schweinekollagen gewonnen und mit AgNPs (AgPURE W10) ($200 \mu\text{g mg}^{-1}$) versetzt. Ein vergleichbares Produkt, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (silberhaltige Kollagenfolie), ist nicht bekannt. Jones et al. (2004) beobachteten die antimikrobielle Wirksamkeit von Wundauflagen (Hydrofiber®), welche Silberionen abgeben, anhand von kulturellen Verfahren gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen (unter anderen *P. aeruginosa*, *S. aureus* und MRSA). Auch Maneerung et al. (2008) wiesen mittels Kulturmethoden eine antimikrobielle Wirksamkeit von AgNP-haltigen Wundauflagen gegen

E. coli und *S. aureus* nach Percival et al. (2008) untersuchte die Wirksamkeit von silberhaltigen Wundauflagen gegen etablierte Biofilme von *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* und *S. aureus*. Sie beobachteten eine Abnahme von 90 % der membranintakten Bakterien (mittels LIVE/DEAD-Färbung). In einer weiteren Studien untersuchten Percival et al. (2011) die antimikrobielle Wirksamkeit von silberhaltigen Wundauflagen gegen *S. aureus* und *P. aeruginosa* mittels LIVE/DEAD-Färbung und Durchflusszytometrie. Sie konnten keinen signifikanten antimikrobiellen Effekt von Silber auf die Bakterien nachweisen. Atiyeh et al. (2007) führten eine ausführliche Literaturrecherche bezüglich des Einsatzes von Silber in Wundauflagen (Brandwunden) durch. Sie stellten fest, dass es eine Vielzahl von klinischen Studien gibt, die die antimikrobielle Wirksamkeit von Silber nachgewiesen haben. Sie kritisieren jedoch, dass nur wenige Informationen zur Interaktion von Silber mit oder Ablagerung von Silber in Geweben vorhanden sind. Zudem gibt es nur wenige Informationen dazu, wie viele Brandwunden sich ohne antimikrobielle Wundauflagen infizieren würden und wie silberhaltige Wundauflagen auf bereits infizierte Wunden wirken.

In der Fachliteratur wurde sowohl von (Nano-)silberhaltigen Medizinprodukten berichtet, die eine antimikrobielle Wirksamkeit aufwiesen. Genauso wurden aber auch Studien veröffentlicht, die keine Wirksamkeit nachweisen konnten. Dies gilt sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Untersuchungen. Es fehlen jedoch klinische Studien, die die Wirksamkeit von silberhaltigen Medizinprodukten nachweisen. Diese liegen lediglich für silberhaltige Wundauflagen vor.

Obwohl die Wirksamkeit von (nano-)silberhaltigen Medizinprodukten in anderen Studien nachgewiesen wurde, konnte eine ausreichende antimikrobielle Wirksamkeit, der in dieser Arbeit verwendeten Medizinprodukte, nicht nachgewiesen werden.

6.8 Schlussfolgerungen

AgNPs und Silberionen (aus Silbernitrat) sind effektiv gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Beide Silberspezies wiesen neben wachstumshemmenden Eigenschaften auch das Potential auf, die Biofilmbildung einer Vielzahl von Bakterien zu hemmen und etablierte Biofilme zu inaktivieren. In vielen Studien wird Silber, insbesondere AgNPs, als geeignet für den Einsatz in Medizinprodukten dargestellt. Es wird ausgiebig an der Herstellung von neuen silberhaltigen Medizinprodukten geforscht. Ein etwaiger Vorteil (antimikrobielle Wirksamkeit) von silberhaltigen Medizinprodukten, muss jedoch kritisch gegen eine mögliche Schädigung des Menschen durch Silber abgewogen werden. Die Effektivität von Silbersalzen oder AgNPs und die mögliche toxische Wirkung auf den Menschen sind jedoch abhängig von der Konzentration des bioverfügbaren Silbers. Besonders in Medizinprodukten, die im Körper von einer sehr komplexen Matrix umgeben sind, ist die Vorhersage, wie viel AgNPs oder Silberionen freigesetzt werden, nicht zuverlässig zu beantworten.

Jeder Einsatz von antimikrobiellen Stoffen zur Therapie beim Menschen muss auf dem Prinzip der selektiven Toxizität von Paul Ehrlich beruhen. Dieses Prinzip besagt, dass ein Stoff selektiv wirken muss. Dies bedeutet, dass es in Konzentrationen eingesetzt wird, die den Mikroorganismus schädigen, aber den Menschen nicht (Fuhrmann et al., 2006; Madigan et al., 2003). Greulich et al. (2012) verglichen die antimikrobielle Wirksamkeit von AgNPs und Silberionen mit der toxischen Wirkung gegen eukaryotische Zellen. Sie zeigten, dass das sogenannte therapeutische Fenster von AgNPs und Silberionen, sehr schmal ist. Das therapeutische Fenster ist der Konzentrationsbereich, der antimikrobiell wirksam ist und dem Menschen keinen Schaden zufügt. In einer umfassenden Literaturrecherche stellten Chernousova und Epple (2012) fest, dass die Wirkung von Silber gegen Bakterien eher überschätzt und die toxische Wirkung auf eukaryotische Zellen eher unterschätzt wird. Auch Grade et al. (2012a) zeigten, dass der Konzentrationsbereich, bei dem Bakterien durch Silber geschädigt werden und eukaryotische Zellen nicht, sehr schmal ist. Zudem wurde gezeigt, dass BSA im Medium zwar die Wirkung von AgNPs gegen Bakterien abschwächt, jedoch nicht die toxische Wirkung gegen eukaryotische Zellen mindert (Grade et al., 2012b). Das bedeutet, dass das therapeutische Fenster unter körperähnlichen Bedingungen vermutlich weiter geschmälert wird.

Bei subinhibitorischen Konzentrationen von Silber besteht die Gefahr einer vermehrten Biofilmbildung oder eines Übergangs von Bakterien in den VBNC-Zustand. Bei einer zu hohen Silberkonzentration besteht die Gefahr von toxikologischen Nebenwirkungen beim Menschen. Die in dieser Studie verwendeten Medizinprodukte zeigten in einer Biokompatibilitätsstudie keine toxikologischen Nebenwirkungen. Es wurde jedoch auch keine deutlich effektive Wirkung gegen Bakterien im verwendeten Testsystem ermittelt. Es muss also kritisch abgewogen werden, ob der Einsatz der Medizinprodukte sinnvoll ist. Bei den Knochenzementen besteht beispielsweise die Überlegung AgNPs in der Praxis lediglich zusätzlich zu Gentamicin in die Matrix des Knochenzements einzubringen. So könnten durchaus Bakterien, welche gegen Gentamicin eine Resistenz aufweisen, durch das Silber inaktiviert oder vom Anheften an die Oberfläche der Medizinprodukte abgehalten werden. Bei den Kollagenfolien ist davon auszugehen, dass sich nicht nur Silberionen, sondern ganze AgNPs aus dem Material lösen, da Kollagen im Körper resorbiert wird. In vielen Studien wird *in vitro* und im *in vivo* Tiermodell gezeigt, dass silberhaltige Medizinprodukten biokompatibel sind (z.B. Gosheger et al., 2004). Trotzdem darf nicht vergessen werden, dass erst klinische Studien zeigen, ob die Medizinprodukte im Menschen verträglich sind oder nicht. Ein Praxisbeispiel zeigte z.B. die Unverträglichkeit von silberbeschichteten Herzklappen im Menschen, obwohl das Produkt *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell als biokompatibel eingestuft wurde (Tweden et al., 1997). Aufgrund massiver Nebenwirkungen wurde das Produkt nach einer klinischen Studie wieder zurückgezogen (Tweden et al., 1997; Butany et al., 2002; Schaff et al., 2002).

Im Zusammenhang mit Silber in Medizinprodukten wird auch immer wieder das Thema der Silberresistenz diskutiert. Silberresistenzen existieren und die Mechanismen sind mittlerweile gut beschrieben (Silver, 2003). Durch die Exposition von Bakterien mit Silber kann es zudem zu sogenannten Co-Resistenzen mit Antibiotikaresistenzen kommen. Der Zusammenhang zwischen vermehrter Antibiotikaresistenz durch Exposition von Bakterien mit Silber

wurde bereits in der Literatur beschrieben (Wright et al. 2006; Baker-Austin et al., 2006; Içgen & Yilmaz, 2014). Aufgrund dieses Zusammenhanges, muss der Einsatz von Silber besonders in Alltagsprodukten kritisch betrachtet werden. Eine neuere Studie von Sterling (2014) schätzt jedoch Silberresistenzen im klinischen Bereich als ein eher geringes Problem ein.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass Silber bei *P. aeruginosa* den VBNC-Zustand induzieren kann. *P. aeruginosa* ist von sehr hoher klinischer Relevanz und gehört zu den Bakterienspezies, welche am häufigsten für nosokomiale Infektionen im Menschen verantwortlich sind (Moazami-Goudarzi & Eftekhar, 2013). Im Falle von Kupfer wurde nachgewiesen, dass der gleiche Bakterienstamm aus dem VBNC-Zustand zurückgeführt werden konnte und anschließend seine Infektiosität wiedererlangte (Dwidjosiswojo et al., 2011). Silber interagiert im menschlichen Körper mit einer Vielzahl von Bestandteilen in Geweben, Blut und Serum. Diese Interaktionen können dazu führen, dass Silber in einer niedrigeren bioverfügbaren Form vorliegt und der Silberstress für Bakterien somit abnehmen kann (Grade et al., 2012b). Es wurde an einer Vielzahl von grampositiven und gramnegativen pathogenen Bakterien gezeigt, dass die Aufhebung des Stresses, der den VBNC-Zustand induziert, zu einer Resuscitation führen kann (Oliver, 2010; Li et al., 2014). Besonders aufgrund der neuen Erkenntnis, dass Silber (AgNPs und Silbernitrat) den VBNC-Zustand in Bakterien auslöst, sollte der Einsatz von Silber in Medizinprodukten kritisch betrachtet werden. Zudem sollte beim Einsatz von Silber gegen Infektionen in der klinischen Praxis in Betracht gezogen werden, kulturelle Untersuchungen von Bakterien durch kulturunabhängige Methoden zu ergänzen.

7 Literatur

Abou El-Nour, K.M.M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Ammar, R.A.A., 2010.

Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab. J. Chem. 3, 135–140.

Abraham, T.W., Conyers, R.A.J., Coombs, C.J., Masterton, J.P., 1991.

Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients. Clin. Chem. 37, 1683–1687.

Acar, J.F., 1997.

Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. Clin. Infect. Dis. 24 Suppl 1, 17–18.

Adams, B.L., Bates, T.C., Oliver, J.D., 2003.

Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7462–7466.

Ahrens, H., Gosheger, G., Streitbürger, a., Gebert, C., Harges, J., 2006.

Antimikrobielle Silberbeschichtung von Tumorprothesen. Der Onkol. 12, 145–151.

Alexander, E., Pham, D., Steck, T.R., 1999.

The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3754–3756.

Alexander, J.W., 2009.

History of the medical use of silver. Surg. Infect. 10, 289–292.

Alleron, L., Khemiri, A., Koubar, M., Lacombe, C., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T., Frere, J., 2013. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. Water Res. 47, 6606–6617.

Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., Schnettler, R., 2004.

An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials 25, 4383–4391.

Archer, G.L., 1998.

Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26, 1179–1181.

Asakura, H., Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S., Makino, S., 2007.

Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in the oxidation-induced viable but non-culturable state. Microbiol. Immunol. 51, 875–881.

Ashiq, B., 1989.

The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. A hospital study “screening of hospital personnel” for nasal carriage of *Staph aureus*. J. Pak. Med. Assoc. 39, 35–38.

Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S. a, 2007.

Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. Burns 33, 139–148.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V, Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009.

Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. 4, 634–641.

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J. V, 2006.

Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol. 14, 176–182.

Balazs, D.J., Triandafillu, K., Wood, P., Chevolut, Y., van Delden, C., Harms, H., Hollenstein, C., Mathieu, H.J., 2004.

Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. Biomaterials 25, 2139–2151.

Barcina, I., Lebaron, P., Vives-Rego, J., 1997.

Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. FEMS Microbiol. Ecol. 23, 1–9.

Bardouniotis, E., Huddleston, W., Ceri, H., Olson, M.E., 2001.

Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. FEMS Microbiol. Lett. 203, 263–267.

Barillo, D.J., Marx, D.E., 2014.

Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. Burns 40 Suppl 1, S3–8.

Bayr, H., 2005.

Reactive oxygen species. Crit. Care Med. 33, S498–S501.

Beckett, P., 2012.

The Basics of 2D DIGE. In: Cramer, R., Westermeier, R. (Hrsg.), Methods of Molecular Biology 854. Difference Gel Electrophoresis (DIGE). Humana Press, Towota, New Jersey, 9–19.

Bedard, E., Charron, D., Lalancette, C., Deziel, E., Prevost, M., 2014.

Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 226-234

Berney, M., Weilenmann, H.-U., Egli, T. 2006.

Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology* 152, 1719-1729.

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., Egli, T., 2007.

Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 73, 3283-3290.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., 2013.

The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 21, 466–474.

Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Kristiansen, S., Phipps, R., Nielsen, A.K., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Givskov, M., 2007.

Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS* 115, 921–928.

Blier, A.-S., Vieillard, J., Gerault, E., Dagorn, A., Varacavoudin, T., Le Derf, F., Orange, N., Feuilloy, M., Lesouhaitier, O., 2012.

Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide production by a polarographic approach. *J. Microbiol. Methods* 90, 20–24.

Booth, S.C., Workentine, M.L., Wen, J., Shaykhtudinov, R., Vogel, H.J., Ceri, H., Turner, R.J., Weljie, A.M., 2011.

Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J. Proteome Res.* 10, 3190–3199.

Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, J.C., Desjardins, R., 1999.

Methods 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.

Bragg, P.D., Rainnie, D.J., 1974.

The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 20, 883–889.

Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E.W., 2011.

Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19, 419–426.

Bridges, K., Kidson, A., Lowbury, E.J., Wilkins, M.D., 1979.

Gentamicin- and silver-resistant pseudomonas in a burns unit. *Br. Med. J.* 1, 446–449.

Brooks, B. D.; Brooks; A. E., Gaigner, D.W., 2013.

Antimicrobial devices in preclinical development and clinical use. In: Moriarty, T. F., Zaat, S. Bussher, H. J. (Hrsg), *Biomaterials Associated Infections*. Springer, New York, USA, 307-355.

Poulter, N., Vasilev, K., Griesser, S. S., Griesser, J., 2013.

Silver containing biomaterials. In: Moriarty, T. F., Zaat, S. Bussher, H. J. (Hrsg), Biomaterials Associated Infections. Springer, New York, USA, 307-355.

Brovko, L.Y., Froudjian, V.G., Babunova, V.S., Ugarova, N.N., 1999.

Quantitative assessment of bacterial contamination of raw milk using bioluminescence. J. Dairy Res. 66, 627-631.

Bruice, P.Y., Reiser, O., 2011.

Organische Chemie: Studieren kompakt. Pearson Deutschland GmbH, Wiesbaden.

Bryaskova, R., Pencheva, D., Kyulavska, M., Bozukova, D., Debuigne, A., Detrembleur, C., 2010.

Antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-b-poly(acrylonitrile) based micelles loaded with silver nanoparticles. J. Colloid Interface Sci. 344, 424-428.

Bundesinstitut für Risikobewertung., 2009.

BfR rät von Nanosilber in Lebensmitteln und Produkten des täglichen Bedarfs ab. Stellungnahme Nr. 024/2010 des BfR vom 28. Dezember 2009.

Bunton, C.A., 1949.

Oxidation of α -diketones and α -keto-acids by hydrogenperoxide. Nature 163, 444.

Busch, U., 2010.

Molekulare Lebensmittelanalytik. In: Busch, U. (Hrsg.), Molekularbiologische Methoden in Der Lebensmittelanalytik. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1-4.

Butany, J., Scully, H.E., VanArsdell, G., Leask, R., 2002.

Prosthetic heart valves with silver-coated sewing cuff fabric: early morphological features in two patients. Can. J. Cardiol. 18, 733-738.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000.

Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int. Microbiol. 3, 3-8.

Cason, J.S., Jackson, D.M., Lowbury, E.J.L., Ricketts, C.R., 1966.

Antiseptic and Aseptic Prophylaxis for Burns: Use of Silver Nitrate and of Isolators. Br. Med. J. 2, 1288-1294.

Cavaliere, F., Tortora, M., Stringaro, A., Colone, M., Baldassarri, L., 2014.

Nanomedicines for antimicrobial interventions. J. Hosp. Infect. 88, 183-190.

Cenciarini, C., Courtois, S., Raoult, D., La Scola, B., 2008.

Influence of long time storage in mineral water on RNA stability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* after heat inactivation. PLoS One 3, 1-8.

Cenciarini-Borde, C., Courtois, S., La Scola, B., 2009.

Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Futur. Med.* 4, 45–64.

Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T., Colwell, R.R., 2001.

Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 331–341.

Chernousova, S., Epple, M., 2013.

Silber als antibakterielles Agens: Ion, Nanopartikel, Metall. *Angew. Chemie* 125, 1678–1696.

Cho, M., Yoon, J., 2007.

The application of bioluminescence assay with culturing for evaluating quantitative disinfection performance. *Water Res.* 41, 741–746.

Choi, O., Yu, C.-P., Esteban Fernández, G., Hu, Z., 2010.

Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* 44, 6095–6103.

Christensen, F.M., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Hankin, S., Peters, S., Aschberger, K., 2010.

Nano-silver - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology* 4, 284–295.

Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006.

Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochem.* 41, 815–823.

Conlon, B. P., Rowe, S. E., Lewis, K., 2015.

Persisten cell in biofilm associated infections. In: Donelli, G. (Hrsg.), *Biofilm-based healthcare-associated infections*. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 831, 1-9

Cools, I., Uyttendaele, M., D’Haese, E., Nelis, H.J., Debevere, J., 2006.

Development of a real-time NASBA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* cells. *J. Microbiol. Methods* 66, 313–320.

Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., Carmeli, Y., 2003.

Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 36, 53–59.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999.

Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.

Cryz, S.J., 1984.

Pseudomonas aeruginosa infections. In: Germanler, R. (Hrsg.), Bacterial Vaccines. San Diego, pp. 317–345.

Daschner, F., 2012.

Hysterie in Deutschland. Dtsch. Arztebl. 109, 1314.

Davies, D., 2003.

Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat. Rev. Microbiol. 2, 114–122

De Prijck, K., Nelis, H., Coenye, T., 2007.

Efficacy of silver-releasing rubber for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in water. Biofouling 23, 405–411.

Del Mar Lleo, M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C., Canepari, P., 2000.

mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4564–4567.

Demeester, J., De Smedt, S.S., Sanders, N.N., Hastraete, J., 2005.

Light scattering. In: Jiskoot, W., Crommelin, D. (Eds.), Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals. American Association of Pharmaceutical Scientists, Arlington, 245–270.

Desesso, J.M., Scialli, A.R., Goeringer, G.C., 1994.

D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. Teratology 49, 248–259.

DIN CEN ISO/TS 27687:2008-11

Nanotechnologien – Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte – Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen (ISO/TS 27687:2008).

DIN ISO 13321:2004-10

Partikelgrößenanalyse –Photonenkorrelationsspektroskopie (ISO 13321:1996).

Diener, B., Carrick, L., Berk, R.S., 1973.

In vivo studies with collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 7, 212–217.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000.

Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16–34.

Donlan, R.M., 2001.

Biofilms and device-associated infections. Emerg. Infectious Dis. 7, 277–281.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002.

Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167–193.

Döring, G., Jansen, I.S., Hajo, N., Grupp, H., Frank, F., Botzenhart, K., Magdorf, K., Wahn, U., 1996.

Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr. Pulmonol.* 100, 90–100.

Downing, K.J., Mischenko, V. V, Shleeva, M.O., Young, D.I., Young, M., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S., Mizrahi, V., 2005.

Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect. Immun.* 73, 3038–3043.

Dror-Ehre, A., Adin, A., Markovich, G., Mamane, H., 2010.

Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. *Water Res.* 44, 2601–2609.

Dukan, S.A.M., Le, Y., Monod, I.J., 1997.

Recovery of culturability of an HOCl-stressed population of *Escherichia coli* after incubation in phosphate buffer: resuscitation or regrowth? *Appl Environ. Microbiol.* 63, 4204–4209.

Dupray, E., Caprais, M.P., Derrien, a., Fach, P., 1997.

Salmonella DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.* 82, 507–510.

Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M.M., Dopp, E., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2011.

Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 485–492.

Elrod, R.P., Braun, A.C., 1942. *Pseudomonas aeruginosa*; its role as a plant pathogen. *J. Bacteriol.* 44, 633–645.

England, L.S., Lee, H., Trevors, J.T., 1997. Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in soil. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1521–1527.

EPA (United States Environmental Protection Agency), 2007.

Nanotechnology White Paper. Science Policy Council U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460.

Erlich, H.A., 1989.

Polymerase chain reaction. *J. Clin. Immunol.* 9, 437–447.

EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2000.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 509–515.

EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2009.

Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method, Version 1.0.

EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2013a.

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 3.0.

EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), 2013b.

Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing, Version 3.0.

Ewald, A., Glückermann, S.K., Thull, R., Gbureck, U., 2006.

Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. Biomed. Eng. Online 5, 22.

Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, C., Lead, J.R., 2009.

Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organism matter. Environ. Sci. Technol 43, 7285-7290.

Fakruddin, M., Mannan, K.S. Bin, Andrews, S., 2013.

Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. ISRN Microbiol. 2013, 1–6.

Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T., Venketesan, R., 2010.

Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine nanotechnology, Biol. Med. 6, 103–109.

Flemming, H.-C., 1987.

Microbial growth on ion exchanger. Wat. Res. 21, 745–756.

Flemming, H.-C., 1991.

Biofilme und Wassertechnologie. Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. gwf Wasser Abwasser 132, 197–205.

Flemming, H.-C., 1995.

Sorption sites of biofilms. Water Sci. Technol. 32, 27–33.

Flemming, H.-C., Leis, A., 2002

Sorption properties of biofilms. In: Flemming, H.-C. (Hrsg.): Biofilms. In: Bitton, G. (Hrsg.): Encyclopedia of Environmental Microbiology 5, 2958-2967

Flemming, H.C., Wingender, J., 2002.

Was Biofilme zusammenhält. Chemie unserer Zeit, 30–41.

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010.

The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–633.

Flores, C.Y., Diaz, C., Rubert, A., Benítez, G. a, Moreno, M.S., Fernández Lorenzo de Mele, M. a, Salvarezza, R.C., Schilardi, P.L., Vericat, C., 2010.

Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Colloid Interface Sci. 350, 402–408.

Foster, T.J., Geoghegan, J. a, Ganesh, V.K., Höök, M., 2014.

Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat. Rev. Microbiol. 12, 49–62.

Fuhrmann, G. F., Aigner, A., Büch, T., Legrum, W., Steffen, C., 2006.

Toxikologie für Naturwissenschaftler: Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie. Springer Science & Business Media, Wiesbaden, Deutschland.

Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005.

Survival strategies of infectious biofilms. TRENDS Microbiol. 13, 34–40.

Garfin, D.E., 2003.

Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. Trends Anal. Chem. 22, 263–272.

Gasquères, C., Schneider, G., Nusko, R., Maier, G., Dingeldein, E., Eliezer, a., 2012.

Innovative antibacterial coating by anodic spark deposition. Surf. Coatings Technol. 206, 3410–3414.

Gatermann, S., 2012.

Staphylokokken. In: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg, 187–197.

Gillissen, A., Jaworska, M., Orth, M., Coffiner, M., Maes, P., App, E.M., Cantin, A.M., Schultze-Werninghaus, G., 1997.

Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcystein, to augment cellular oxidant defence *in vitro*. Respir. Med. 91, 159–168.

Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., Lory, S., 2004.

A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. Dev. Cell 7, 745–754.

Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Gonsel, A., Kemper, F.H., Winkelmann, W., Von Eiff, C., 2004.

Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model-an analysis of the infection rate and toxicological side effects. Biomaterials 25, 5547–5556.

Govan, J.R.W., Deretic, V., Colonization, E., Environmental, D., 1996.

Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 60, 539–574.

Grade, S., Eberhard, J., Neumeister, A., Wagener, P., Winkel, A., Stiesch, M., Barcikowski, S., 2012a.

Serum albumin reduces the antibacterial and cytotoxic effects of hydrogel-embedded colloidal silver nanoparticles. *RSC Adv.* 2, 7190–7196.

Grade, S., Eberhard, J., Wagener, P., Winkel, A., Sajti, C.L., Barcikowski, S., Stiesch, M., 2012b.

Therapeutic Window of Ligand-Free Silver Nanoparticles in Agar-Embedded and Colloidal State: In Vitro Bactericidal Effects and Cytotoxicity. *Adv. Eng. Mater.* 14, B231–B239.

Grade, S., Eberhard, J., Jakobi, J., Winkel, A., Stiesch, M., Barcikowski, S., 2014.

Alloying colloidal silver nanoparticles with gold disproportionally controls antibacterial and toxic effects. *Gold Bull.* 47, 83–93.

Greulich, C., Braun, D., Peetsch, A., Diendorf, J., Siebers, B., Epple, M., Köller, M., 2012.

The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Adv.* 2, 6981–6987.

Gristina, A.G., Kolkin, J., 1983.

Total joint replacement and sepsis. *J. Bone Jt. Surg.* 65, 128–134.

Gupta, A., Maynes, M., 1998.

Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Applid Environ. Microbiol.* 64, 5042–5045.

Guzman, M., Dille, J., Godet, S., 2012.

Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 8, 37–45.

Hahn, H.P., 1997.

The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene* 192, 99–108.

Hahn, H., Miksits, K., Bhakdi, S., 2001a.

Infektion. In: Hahn, H. Falke, D. Kaufmann, S. H. E. Ullmann, U. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 20–36.

Hahn, H., Miksits, K., Bhakdi, S., 2001b.

Virulenz. In: Hahn, H. Falke, D. Kaufmann, S. H. E. Ullmann, U. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 19.

Hahn, H., Miksits, K., Gatermann, S., 2001c.

Staphylokokken. In: Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 199–211.

Hahn, H., Miksits, K., Bhakdi, S., 2001d.

Pathogenität. In: Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin, Heidelberg, 17–18.

Hallbach, J., 2006.

Klinische Chemie für den Einstieg. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004.

Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2, 95–108.

Hammes, F., Berney, M., Egli, T., 2011.

Cultivation-independent assessment of bacterial viability. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 124, 123–150.

Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., Egli, T., 2008.

Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. Water Res. 42, 269–277.

Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., Egli, T., 2010.

Measurement and interpretation of microbial adenosine triphosphate (ATP) in aquatic environments. Wat. Res. 44, 3915–3923.

Hancock, R.E., 1998.

Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin. Infect. Dis. 27, 93–99.

Hardes, J., Ahrens, H., Gebert, C., Streitbuerger, A., Buerger, H., Erren, M., Günsel, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Winkelmann, W., Gosheger, G., 2007.

Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. Biomaterials 28, 2869–2875.

Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J., 2007.

Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 5, 928–938.

Hattori, N., Sakakibara, T., Kajiyama, N., Igarashi, T., Maeda, M., Murakami, S., 2003.

Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. Anal. Biochem. 319, 287–295.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996.

Real time quantitative PCR. Genome Res. 6, 986–994.

Heim, S., Del Mar Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C. a., Canepari, P., 2002.

The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. J. Bacteriol. 184, 6739–6745.

Hixon, S.C., White JR, W.E., Yielding, K.L., 1975.

Selective covalent binding of an ethidium analog to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labeling. *J. Mol. Biol.* 92, 319–329.

Hoffman, L.R., D'Argenio, D. a, MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R. a, Miller, S.I., 2005.

Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171–1175.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991.

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276–7280.

Holloway, B.W., 1955.

Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13, 572–581.

Holt, K.B., Bard, A.J., 2005.

Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+ . *Biochemistry* 44, 13214–13223.

Hong, H., Patel, D.R., Tamm, L.K., van den Berg, B., 2006.

The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J. Biol. Chem.* 281, 7568–77.

Huang, H.-I., Shih, H.-Y., Lee, C.-M., Yang, T.C., Lay, J.-J., Lin, Y.E., 2008.

In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res.* 42, 73–80.

Humphries, K.M., Szweda, L.I., 1998.

Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37, 15835–15841.

Hwang, M.G., Katayama, H., Ohgaki, S., 2006.

Accumulation of copper and silver onto cell body and its effect on the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 54, 29-34.

Icgen, B., Yilmaz, F., 2014.

Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak river isolates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93, 735–743.

Imlay, J.A., 2003.

Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.

Irie, Y., Mattoo, S., Yuk, M.H., 2004.

The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 186, 5692–5698.

- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994.**
Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 29–63.
- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J.M., Omray, P., Khandelwal, S., Paknikar, K.M., 2009.**
Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol. Pharm.* 6, 1388–1401.
- Jaiswal, S., Duffy, B., Jaiswal, A.K., Stobie, N., McHale, P., 2010.**
Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using beta-cyclodextrin as a capping agent. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 280–283.
- Jarvis, W.R., Martoote, W.J., 1992.**
Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 19–24.
- Jass, J., Surmann, S., Walker, J., 2003.**
Microbial Biofilms in Medicin. In: Jass, J., Surmann, S., Walker, J. (Eds.), *Medical Biofilms, Detection, Prevention and Control*. John Wiley & Sons Ltd., Southern Gate, England, 1–28.
- Jensen, T.R., Malinsky, M.D., Haynes, C.L., Van Duyne, R.P., 2000.**
Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 104, 10549–10556.
- Jensen, P. Ø., Briaies, A., Brochmann, R. P., Wang, H., Kragh, K. N., Kolpen, M., Hempel, C., Bjarnsholt, T., Høiby, N., Ciofu, O., 2014.**
Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog. Dis.*, 70, 440–443.
- Jepsen, S., Herlevsen, P., Knudsen, P., Bud, M.I., Klausen, N.O., 1992.**
Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit. Care Med.* 20, 918–923.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2008.**
Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* 11, 77–89.
- Jones, S.A., Bowler, P.G., Walker, M., Parsons, D., 2004.**
Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. *Wound repair Regen.* 12, 288–294.
- Jopp, K., 2003.**
Nanotechnologie - Aufbruch ins Reich der Zwerge, Springer Gabler, Wiesbaden.
- Joshi, N., Ngwenya, B.T., French, C.E., 2012.**
Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. *J. Hazard. Mater.* 241–242, 363–370.

Joux, F., Lebaron, P., 2000.

Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* 2, 1523–1535.

Jun, Y.W., Lee, J.H., Cheon, C., 2008.

Chemisches Design von leistungsfähigen Nanosonden für die Kernspintomographie. *Angew. Chemie* 120, 5200–5213.

Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H., 2011.

Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3902–3908.

Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S.R.K., Deepak, V., Gurunathan, S., 2010.

Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 79, 340–344.

Kato, H., 2014.

Size determination of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering, in: Guo C, Cai W, Singh S, Z.H. (Hrsg.), *Nanomaterials : Processing and Characterization with Lasers*.

Karner, M., Fuhrman, J.A., 1997.

Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1208–1213.

Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., Uchida, M., 2000.

Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent. Mater.* 16, 452–455.

Kaur, H., Tripathi, S.K., Tripathi, S.K., Dharamvir, K., Kumar, R., Saini, G.S.S., 2011.

Interaction of Silver Nanoparticles with Plasma Proteins. *AIP Conf. Proc.* 1393 1393, 143–144.

Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., 2008.

Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583.

Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D.H., Cho, M.-H., 2007.

Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 95–101.

Klein, C.L., Comero, S., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T.A.J., Doren, E. Van, Mast, P.-J., De Temmerman, J., Wick, P., Krug, H., Locoro, G., Kördel, W., Friedrichs, S., Maier, G., Werner, J., Linsinger, T., Gawlik, B.M., 2011.

NM-Series of representative manufactured nanomaterials NM-300 silver. Characterisation, stability, homogeneity. JRC Scientific and Technical Reports.

Klevens, R.M., Morrison, M.A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Craig, A.S., Zell, E.R., Fosheim, G.E., Mcdougal, L.K., Carey, R.B., Fridkin, S.K., 2014.

Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 298, 1763–1771.

Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, a, Bryers, J.D., 2000.

Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. J. Biomed. Mater. Res. 53, 621–631.

Kobert, R., 1893.

Ueber Argyrie in Vergleich zur Siderose. Arch. Dermatol. Syph. 25, 773–789.

Kokubo, T., 1998.

Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. Acta mater. 46, 2519–2527.

Kominos, S.D., Copeland, C.E., Grosiak, B., Postic, B., 1972.

Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. Appl. Microbiol. 24, 567–570.

Kora, A.J., Arunachalam, J., 2010.

Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. World J. Microbiol. Biotechnol. 27, 1209–1216.

Kora, A.J., Manjusha, R., Arunachalam, J., 2009.

Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles: Synthesis and characterization. Mater. Sci. Eng. C 29, 2104–2109.

Koruge, K., Simidu, U., Taga, N., 1979.

A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. 25, 415–420.

Kouker, G., Jaeger, K.E., 1987.

Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl. Environ. Microbiol. 53, 211–213.

Kurath, G., Morita, R.Y., 1983.

Starvation-Survival Physiological Studies of a Marine *Pseudomonas* sp.. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1206–1211.

Kurihara, K., Rockstuhl, C., Nakano, T., Arai, T., Tominaga, J., 2005. The size control of silver nano-particles in SiO₂ matrix film. *Nanotechnology* 16, 1565–1568.

La Duc, M.T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K., 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2600–2611.

Lai, C.-J., Chen, S.-Y., Lin, I.-H., Chang, C.-H., Wong, H.-C., 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 118–124.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7072–7077.

Lansdown, A.B.G., 2007. Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 237–250.

Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., Kong, F., 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* 10, 599–606.

Le, A. T, Le, T. T., Tram, H. H., Dang, D. A., Tran, Q. H., Vu, D. L., 2012. Powerful colloidal silver nanoparticles for the prevention of gastrointestinal bacterial infections. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 3, 045007, 1-10.

Lee, D.-G., Park, S.J., Kim, S.-J., 2007. Influence of pipe materials and VBNC cells on culturable bacteria in a chlorinated drinking water model system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1558–1562.

Lemire, J. a, Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384.

Leung, K., Cassidy, M.B., Holmes, S.B., Lee, H., Trevors, J.T., 1995. Survival of k-carrageenan-encapsulated and unencapsulated *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells in forest soil monitored by polymerase chain reaction and spread plating. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 71–82.

Lewis, K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48–56.

Li, B., Liu, X., Meng, F., Chang, J., Ding, C., 2009. Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings. *Mater. Chem. Phys.* 118, 99–104.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014.

The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258.

Liu, S., Libchaber, A., 2004.

Production and assay of a transcription activator CRP in coupled in vitro transcription and translation. *Biotechniques* 36, 596–600.

Liau, S.Y., Read, D.C., Pugh, W.J., Furr, J.R., Russell, a D., 1997.

Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 279–283.

Liechti, M.E., Kistler, M., Kraemer, R., 1992.

Die Cystische Fibrose (CF): eine Erbkrankheit. In: Kraemer, R. (Hrsg.), *Cystische Fibrose/Mukoviszidose*. Birkhäuser, Basel, Schweiz.

Liedberg, H., Lundeberg, T., 1990.

Silver alloy coated catheters reduce catheter-associated bacteriuria. *Br. J. Urol.* 65, 379–381.

Lilley, S.L., Razzaq, A., Dupree, P., 2001.

Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 46–50.

Lindbäck, T., Rottenberg, M.E., Roche, S.M., Rørvik, L.M., 2010.

The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* 41, 1-10.

Linker, A., Jones, R., 1964.

A Polysaccharide resembling Alginate from a *Pseudomonas* Micro-organism. *Nature* 204, 187–188.

Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q., 2007.

Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 58, 3–7.

Lleò, M.D.M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C., Canepari, P., 2007. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ. Microbiol.* 9, 2313–2320.

Loh, J. V., Percival, S.L., Woods, E.J., Williams, N.J., Cochrane, C. a, 2009. Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int. Wound J.* 6, 32–38.

Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., Tam, P.K., Chiu, J., Che, C., 2006.

Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver research articles 916–924.

Lopez-Amoros, R., Comas, J., Vives-Rego, J., 1995.

Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using Rhodamine 123, Propidium Iodide, and Oxonol. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2521–2526.

Lowy, F.D., 1998.

Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. 339, 520–532.

Loza, K., Diendorf, J., Sengstock, C., Ruiz-Gonzalez, L., Gonzalez-Calbet, J.M., Vallet-Regi, M., Köller, M., Epple, M., 2014a.

The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. J. Mater. Chem. B 2, 1634.

Loza, K., Sengstock, C., Chernousova, S., Köller, M., Epple, M., 2014b.

The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride. RSC Adv. 4, 35290.

Lubick, N., 2008.

Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles - or both? Environ. Sci. Technol. 42, 8917.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951.

Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003.

Brock Mikrobiologie. Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin.

Malarkodi, C., Rajeshkumar, S., Paulkumar, K., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Annadurai, G., 2013.

Bacterial synthesis of silver nanoparticles by using optimized biomass growth of *Bacillus* sp. Nanosci. Nanotechnol. An Int. J. 3, 26–32.

Maliszewska, I., Szewczyk, K., Waszak, K., 2009.

Biological synthesis of silver nanoparticles. J. Phys. Conf. Ser. 146, 1–6.

Malvern, 2012.

Dynamic light scattering: An introduction in 30 Minutes. Technical note MRK656-01.

Maneerung, T., Tokura, S., Rujiravanit, R., 2008.

Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydr. Polym. 72, 43–51.

Markowska, K., Grudniak, A.M., Wolska, K.I., 2013.

Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. Acta Biochim. Pol. 60, 523–530.

Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971.

Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68, 337–348.

Martínez-Castañón, G.A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J.R., Ruiz, F., 2008.

Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanoparticle Res.* 10, 1343–1348.

Martinez-Gutierrez, F., Olive, P.L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E.M., Ruiz, F., Bach, H., Av-Gay, Y., 2010.

Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine* 6, 681–688.

Marx, D.E., Barillo, D.J., 2014.

Silver in medicine: The basic science. *Burns* 40 Suppl 1, S9–S18.

Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T., 2003.

Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4278–4281.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.-C., 1999.

The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 3–16.

Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009.

Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71–115.

Miksits, K., Dierich, M.P., 2001.

Amidoglykoside. In: Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg, S. 846–847.

Minden, J.S., Dowd, S.R., Meyer, H.E., Stühler, K., 2009.

Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S156–161.

Mo, A., Liao, J., Xu, W., Xian, S., Li, Y., Bai, S., 2008.

Preparation and antibacterial effect of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium. *Appl. Surf. Sci.* 255, 435–438.

Moazami-Goudarzi, S., Eftekhar, F., 2013.

Assessment of carbapenem susceptibility and multidrug-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* burn isolates in Tehran. *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 162–165.

Modak, S.M., Fox, C.L., 1981.

Sulfadiazine silver-resistant *Pseudomonas* in burns. New topical agents. Arch. Surg. 116, 854–857.

Molecular Probes, 2004.

LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kits. Product Information.

Moojen, D.J.F., Vogely, H.C., Fleer, A., Verbout, A.J., Castelein, R.M., Dhert, W.J. a, 2009.

No efficacy of silver bone cement in the prevention of methicillin-sensitive *Staphylococcal* infections in a rabbit contaminated implant bed model. J. Orthop. Res. 27, 1002–1007.

Moritz, M.M., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010.

Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 190–197.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005.

The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16, 2346–2353.

Moter, A., Göbel, U.B., 2000.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods 41, 85–112.

Mülhardt, C., 2006.

Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics, 5. Ed., Elsevier GmbH, München.

Mulligan, A.M., Wilson, M., Knowles, J.C., 2003.

Effect of increasing silver content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. J. Biomed. Mater. Res. A 67, 401–412.

Nägeli, C., 1893.

Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. Neue Denkschriften der schweizerischen naturforschenden Gesellschaft 33, 1–51.

Naja, G., Volesky, B., 2011.

Equilibrium, Kinetic and Dynamic Modelling of Biosorption Process. In: Kotrba, P., Mackove, M., Mecek, T. (Hrsg.), Microbial Biosorption of Metals. Springer, Berlin, Heidelberg, 19–58.

Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2008.

Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Technol. 42, 8959–8964.

Neisser, M., Eichbaum, F., 1932.

Die „oligodynamische Metallwirkung“ in Theorie und Praxis. In: Weichardt, W. (Hrsg.), Ergebnisse Der Hygiene Bakteriologie Immunitätsforschung Und Experimentellen Therapie. Springer, Berlin, Heidelberg, 170–226.

Neu, H.C., 1992.

The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064-1073.

Ng, L., Taylor, D.E., Stiles, M.E., 1985.

Estimation of *Campylobacter* spp. in broth culture by bioluminescence assay of ATP. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 730–732.

Nicas, T.I., Hancock, R.E., 1983.

Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant. *J. Bacteriol.* 153, 281–285.

Niki, E., 1991.

Action of ascorbic acid as a scavenger and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1119S–1124S.

Nkuipou-Kenfack, E., Engel, H., Fakh, S., Nocker, A., 2013.

Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *J. Microbiol. Methods* 93, 20–24.

Noble, W.C., Valkenburg, H. a, Wolters, C.H., 1967.

Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J. Hyg. (Lond).* 65, 567–573.

Nocker, A., Cheung, C.-Y., Camper, A.K., 2006.

Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 67, 310–330.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K., 2007.

Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ. Microbiol.* 73, 5111–5117.

Obritsch, M.D., Pharm, D., Fish, D.N., Maclaren, R., Jung, R., 2005.

Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 25, 1353–1364.

O’Gara, J., Humphreys, H., 2001.

Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *J. of Med. Microbiol.*, 50, 582-587

Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., Blazquez, J., 2000.

High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251–1253.

Oliver, J.D., 2005.

The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100.

Oliver, J.D., 2010.

Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 415–425.

Ortega-Calvo, J.-J., Molina, R., Jimenez-Sanchez, C., Dobson, P.J., Thompson, I.P., 2011.

Bacterial tactic response to silver nanoparticles. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 526–534.

Otto, M., 2009.

Staphylococcus epidermidis - the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 555–567.

Pacholski, C., Kornowski, A., Weller, H., 2002.

Selbstorganisation von ZnO: von Nanopartikeln zu Nanostäbchen. *Angew. Chemie* 2, 1234–1237.

Parija, S.C., 2009.

Textbook of microbiology and immunology. Elsevier India, Haryana.

Park, H.-J., Kim, J.Y., Kim, J., Lee, J.-H., Hahn, J.-S., Gu, M.B., Yoon, J., 2009.

Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.* 43, 1027–1032.

Pauksch, L., Hartmann, S., Rohnke, M., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R., Lips, K.S., 2014.

Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater.* 10, 439–449.

Pauksch, L., Hartmann, S., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R., Lips, K.S., 2013.

Biocompatibility of an antibacterial nanosilver-coated titanium implant on primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Int. J. Biol. Med. Res.* 3, 3719–3726.

Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H., Prince, A., 2000.

Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68, 4331–4334.

Pearson, J.P., Pesci, E.C., 1997.

Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179, 5756–5767.

Peltroche-Llacsahuanga, H., Lütticken, G.H.R., 1998.

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) - Klinische Implikationen. *Der Chir.* 69, 801–805.

Percival, S.L., Bowler, P.G., Dolman, J., 2007.

Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int. Wound J.* 4, 186–191.

Percival, S.L., Bowler, P., Woods, E.J., 2008.

Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound repair Regen.* 16, 52–57.

Percival, S.L., Bowler, P.G., Russel, D., 2005.

Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60, 1–7.

Percival, S.L., Slone, W., Linton, S., Okel, T., Corum, L., Thomas, J.G., 2011.

Use of flow cytometry to compare the antimicrobial efficacy of silver-containing wound dressings against planktonic *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Wound Repair Regen.* 19, 436–441.

Peulen, T.-O., Wilkinson, K., J., 2011.

Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3367–3373.

Peterson, G.L., 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 220, 201–220.

Phillips, I., 1969.

Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *Med. Microbiol.* 2, 9–16.

Post, V., Wahl, P., Uckay, I., Zimmerli, W., Corvec, S., Loiez, C, Ochsnerand, P., Moriarty, F., 2014.

Biofilm formation and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from orthopedic implant related infections depend on type of device. *Bone Joint J. (Supp 11)*, 283.

Rabilloud, T., 2002.

Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3-10.

Radzig, M.A., Koksharova, O.A., Khmel', I.A., 2010.

Antibacterial effects of silver ions on growth of gram-negative bacteria and biofilm formation. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 24, 194–199.

Radzig, M.A., Nadochenko, V.A., Koksharova, O.A., Kiwi, J., Lipasova, V.A., Khmel, I.A., 2013.

Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 102, 300–306.

Rai, M., Yadav, A., Gade, A., 2009.

Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27, 76–83.

Ralph, T.R., Hitchman, M.L., Millington, J.P., Walsh, F.C., 1994.

The electrochemistry of L-cystine and L-cysteine. Part 1: thermodynamic and kinetic studies. *J. Electroanal. Chem.* 375, 1–15.

Remacle, J., 1990.

The cell wall and metal binding. In: Volesky, B. (Hrsg.), Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Rhoads, D.D., Cox, S.B., Rees, E.J., Sun, Y., Wolcott, R.D., 2012.

Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. BMC Infect. Dis. 12, 321–329.

Robert Koch-Institut, 2011.

Definition nosokomiales Infektionen (CDC-Definitionen), 7. Ed. , Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. Robert Koch-Institut.

Robert Koch-Institut, 2014.

Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 57, 695–732.

Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B., Roulet, J.-B., 2008.

Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. J. Antimicrob. Chemother. 61, 869–876.

Romanowski, G., Lorenz, M.G., Saylor, G., 1992.

Persistence of free plasmid DNA in soil Monitored by various methods, including a transformation assay persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3012–3019.

Roslev, P., King, G.M., 1993.

Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2891–2896.

Russell, A.D., Hugo, W.B., 1994.

Antimicrobial activity and action of silver. Prog. Med. Chem. 31, 351–370.

Sattig, C., 2014.

Abschlussbericht: Nanosilberpartikel Projekt.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002.

Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184, 1140–1154.

Schaff, H. V., Carrel, T.P., Jamieson, W.R.E., Jones, K.W., Ruffilanchas, J.J., Cooley, D.A., Hetzer, R., Stumpe, F., Dubeau, D., Moseley, P., Van Boven, W.J., Grunkemeier, G.L., Kennard, E.D., Holubkov, R., 2002.

Paravalvular leak and other events in silzone-coated mechanical heart valves: A report from AVERT. Ann. Thorac. Surg. 73, 785–792.

Schierholz, J.M., Lucas, L.J., Rump, A., Pulverer, G., 1998.

Efficacy of silver-coated medical devices. *J. Hosp. Infect.* 40, 257–262.

Schwartz, T., Volkmann, H., Kirchen, S., Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Jansen, B., Obst, U., 2006.

Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 158–167.

Schwenke, A., Wagener, P., Weiß, A., Klimenta, K., Wiegel, H., Sajti, L., Barcikowski, S., 2013.

Laserbasierte Generierung matrixbinderfreier Nanopartikel-Polymerkomposite für bioaktive Medizinprodukte. *Chemie Ing. Tech.* 85, 740–746.

Shahrokh, S., Emtiazi, G., 2009.

Toxicity and unusual biological behavior of nanosilver on gram positive and negative bacteria assayed by microtiter-plate. *Eur. J. Biol. Sci.* 1, 28–31.

Shama, G., Malik, D.J., 2013.

The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 115–125.

Shapiro, H.M., 2005.

Practical flow cytometry. 4. Ed., John Wiley & Sons, New York.

Sheng, Z., Liu, Y., 2011.

Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* 45, 6039–6050.

Siebel, E., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2008.

Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drink. Water Eng. Sci. Discuss.* 1, 71–86.

Silver, S., 2003.

Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2-3), 341–353. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00047-0.
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0168-6445(03)00047-0/full)

Silver, S., Gupta, A., Kazuaki, M., Lo, J.-F., 1999.

Resistance to Ag(I) cations in bacteria: Environments, Genes and Proteins. *Met. Based. Drugs* 315-320.

Silver, S., Phung, L.T., 1996.

Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 753–789.

Sintubin, L., De Gusseme, B., Van der Meeren, P., Pycke, B.F.G., Verstraete, W., Boon, N., 2011.

The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 153–162.

Smith, R., 2003.

P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 56–60.

Songping, W., Shuyuan, M., 2005.

Preparation of ultrafine silver powder using ascorbic acid as reducing agent and its application in MLCI. *Mater. Chem. Phys.* 89, 423–427.

Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E., 2010.

Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5649–5654.

Spadaro, J. a., Webster, D. a., Becker, R.O., 1979.

Silver Polymethyl Methacrylate Antibacterial Bone Cement. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 143, 266–270.

Späth, R., Flemming, H.-C., Wuerzt, S., 1998.

Sorption properties of biofilms. *water Sci. Technol.* 37, 207–210.

Squirrel, D.J., Price, R.L., Murphy, M.J., 2002.

Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. *Anal. Chim. Acta* 457, 109–114.

Srinivasan, A., Karchmer, T., Richards, A., Song, X., Perl, T.M., 2006.

A prospective trial of a novel, silicone-based, silver-coated foley catheter for the prevention of nosocomial urinary tract infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 38–43.

Sriram, M.I., Kanth, S.B.M., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S., 2010.

Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int. J. Nanomedicine* 5, 753–762.

Stanley, P.E., 1989.

A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4, 375–380.

Steinberg, J.P., Clark, C.C., Hackman, B.O., 1996.

Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin. Infect. Dis.* 23, 255–259.

Steinmetz, I., 2012.

Nichtfermentierende Bakterien: Pseudomonas, Burkholderis, Stenotrophomonas, Acinetobacter. In: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg, 265–274.

Stewart, P.S., 2002.

Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int. J. Med. Microbiol. 292, 107–113.

Stewart P. S., Rayner J., Roe F., Rees W. M., 2001.

Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. J Appl Microbiol. 91, 525-532.

Stewart, P.S., William Costerton, J., 2001.

Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358, 135–138.

Stobie, N., Duffy, B., McCormack, D.E., Colreavy, J., Hidalgo, M., McHale, P., Hinder, S.J., 2008.

Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. Biomaterials 29, 963–969.

Stocks, S.M., 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, *BacLight*. Cytom. Part A 61, 189–195.

Stone, V., 2009.

Engineered Nanoparticles : Review of Health and Environmental Safety. Project report.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002.

Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187–209.

Strathmann, M., Wingender, J., 2004.

Use of an oxonol dye in combination with confocal laser scanning microscopy to monitor damage to *Staphylococcus aureus* cells during colonisation of silver-coated vascular grafts. Int. J. Antimicrob. Agents 24, 234–240.

Sudmann, E., Vik, H., Rait, M., Todnem, K., Andersen, K.J., Julsham, K., Flesland, O., Rungby, J., 1994.

Systemic and local silver accumulation after total hip replacement using silver-impregnated bone cement. Med. Prog. Through Technol. 20, 179-184.

Swicilo, A., Zych-Wezyk, I., 2013.

Bacterial stress response as an adaption to life in a soil environment. Environ. Stud. 22, 1577-1587.

Tanahashi, M., Matsuda, T., 1997.

Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J. Biomed. Mater. Res.* 34, 305–315.

Theophel, K., Schacht, V.J., Schlüter, M., Schnell, S., Stingu, C.-S., Schaumann, R., Bunge, M., 2014.

The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 5, 1–10.

Tholozan, J.L., Cappelier, J.M., Tissier, J.P., Delattre, G., 1999.

Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1110–1116.

Torres, A., Aznar, R., Gatell, J., Jiménez, P., González, J., Ferrer, A., Celis, R., Rodríguez-Roisin, R., 1990.

Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 142, 523–528.

Trebesius, K., Leitritz, L., Adler, K., Schubert, S., Autenrieth, I.B., Heesemann, J., 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med. Microbiol. Immunol.* 188, 169–175.

Trevors, J.T., 1987.

Silver resistance and accumulation in bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 331–333.

TrinkwV, 1990.

Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung – TrinkwV), in der Fassung der Bekanntmachung vom 5. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2613, ber. 23 Januar 1991, BGBl. I S. 227) – BGBl. 111 2126-1-7.

TrinkwV, 2001.

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001), in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. August 2013 (BGBl. I S. 2977), die durch Artikel 4 Absatz 22 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist.

Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., Goessler, W., 2006.

Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma* 60, 648–652.

Tunney, M.M., Gorman, S.P., Patrick, S., 1996.

Infection associated with medical devices. *Rev. Med. Microbiol.* 7, 195–205.

Tweden, K.S., Cameron, J.D., Razzouk, A.J., Holmberg, W.R., Kelly, S.J., 1997.

Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves. *J. Heart Valve Dis.* 6, 553–561.

Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997.

Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071–2077.

Valappil, S.P., Pickup, D.M., Carroll, D.L., Hope, C.K., Pratten, J., Newport, R.J., Smith, M.E., Wilson, M., Knowles, J.C., 2007.

Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver-doped phosphate-based glasses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4453–4461.

Van Delen, C., 2004.

Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Ramos, J.-L. (Hrsg.), *Virulence and Gene Regulation*. Springer, Berlin, Heidelberg, 3–45.

Vasil, M.L., 1986.

Pseudomonas aeruginosa: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108, 800–805.

Vik, H., Andersen, K.J., Julshamm, K., Todnem, K., 1985.

Neuropathy caused by silver absorption from arthroplasty cement. *Lancet* 1, 872.

Vogt, K., Hahn, H., Miksits, K., 2001.

Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*. In: Hahn, H., Falke, D., Ullmann, U., Kaufmann, S.H.E. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 295–303.

Vuong, C., Otto, M., 2002.

Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect.* 4, 481–489.

Walker, J.M., 2002.

Isoelectric focusing of proteins in ultra-thin polyacrylamide gels. In: Walker, J.M. (Hrsg.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Towota, New Jersey, S. 125–129.

Wan, Y.Z., Raman, S., He, F., Huang, Y., 2007.

Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. *Vacuum* 81, 1114–1118.

Wang, Q., Sun, F.-J., Liu, Y., Xiong, L.-R., Xie, L.-L., Xia, P.-Y., 2010.

Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in ica-ADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2707–2711.

Watnick, P., 2000.

Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679.

Watson, S.P., Clements, M.O., Foster, S.J., 1998.

Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 180, 1750-1758

Wellinghausen, N., Köthe, J., Wirths, B., Poppert, S., Ko, J., Sigge, A., 2005.
Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative , oxidase-positive rods , including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa* , from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4070–4075.

Williams, C, Ramage, G., 2015.

Fungal biofilms in human disease. In: Donelli, G. (Hrsg.), Biofilm-based healthcare-associated infections. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 831, 1-9.

WHO, 1996.

Silver in drinking-water. In: *Guidelines for drinking-water quality*. World Health Organization, Geneva, 1–9.

Winkler, U., Wingender, J.K.J., Jäger, K.-E., 1985.

Klinische schrift Infektionen der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Cystischen Fibrose. *Klin. Wochenschr.* 63, 490–498.

Wright, M.S., Loeffler Peltier, G., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006.

Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 293–302.

Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. 2012.

Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano letters*, 12, 4271-4275.

Yamanaka, M., Hara, K., Kudo, J., 2005.

Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7589–7593.

Yaron, S., Matthews, K.R., 2002.

A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 : investigation of specific target genes. *J. Appl. Microbiol.* 92, 633–640.

Zandri, G., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Talevi, S., Manso, E., Donelli, G., Biavasco, F., 2012.

Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E259–E261.

Zhao, W., Hu, Z., Okubo, S., Hara, Y., 2001.

Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1737–1742.

Zhou, Y., Kong, Y., Kundu, S., Cirillo, J.D., Liang, H., 2012.

Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and bacillus Calmette-Guérin. *J. Nanobiotechnology* 10, 19.

Zweifel, U.L., Hagstrom, A., 1995.

Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2180-2185.

Publikationsliste

A. M. Königs, H.-C. Flemming, J. Wingender (2015): The effect of silver nanoparticles on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Front. Microbiology, topic Nanoparticle-Biofilm interactions, in Vorbereitung.

A. M. Pillen, H.-C. Flemming, J. Wingender (2014): The effect of silver nanoparticles on the viability of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Posterbeitrag, „Biofilms 6“-Konferenz, Wien, Österreich.

A. M. Pillen, H.-C. Flemming, J. Wingender (2014): The viable but non-culturable state in *Pseudomonas aeruginosa* is induced by nanosilver. Vortrag: „Nanotechnology in Medicine“-Konferenz, London, Großbritannien.

A. M. Pillen, C. Rosengarten, H.-C. Flemming, J. Wingender (2013): Antimikrobielle Wirkung von Nanosilber auf Biofilme von klinisch relevanten Bakterien. Posterbeitrag, „Drittes Clustertreffen NanoCare/NanoNature“, Frankfurt am Main, Deutschland. Posterpräsentation.

A. M. Pillen, H.-C. Flemming, J. Wingender (2012): Antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber und Silbersalzen auf planktonische Bakterien und Biofilme. Posterbeitrag „Zweites Clustertreffen NanoCare/NanoNature“, Frankfurt am Main, Deutschland.

A. M. Pillen, H.-C. Flemming, J. Wingender (2012): The effect of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Posterbeitrag, „Biofilms 5“-Konferenz, Paris, Frankreich.

A. M. Pillen, H.-C. Flemming, J. Wingender (2011): Antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber und mögliche Resistenzbildung. Posterbeitrag, Clustertreffen NanoCare/NanoNature, Frankfurt am Main, Deutschland.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Einfluss von Silber auf die Vitalität von Biofilmen klinisch relevanter Bakterien. Induziert Silber den „viable but nonculturable“-Zustand?“

selber verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Januar 2015

Alexa Margareta Königs

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten"