

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

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