

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

**Untersuchung über die Fähigkeit zur Bildung von Mikrokolonien darmpathogener  
*Escherichia coli* auf abiotischen Oberflächen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von  
Sandra Jünger, geb. Budke  
aus Ibbenbüren

Münster 2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

Referent: PD Dr. med. Friedrich, Institut für Hygiene

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Harmsen, Klinik für Parodontologie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch  
Referent: PD Dr. med. Friedrich, Institut für Hygiene  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Harmsen, Klinik für Parodontologie

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Untersuchung über die Fähigkeit darmpathogener *Escherichia coli* zur Bildung von  
Mikrokolonien auf abiotischen Oberflächen

Sandra Jünger

Die Infektion und Besiedlung mit Erregern wie *Escherichia coli* (*E. coli*) spielt eine immer größere Rolle in der Behandlung der Patienten. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse die Fähigkeit von *E. coli* zur Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen, wie sie z.B. in Kathetern Anwendung finden, zu untersuchen. Des Weiteren ist die Biofilmbildung auf Oberflächen der Trinkwasserzubereitung und -verteilung aus hygienischer Sicht ebenfalls von großer Bedeutung. Grundlage der Biofilmbildung ist die Fähigkeit zur Bildung von Mikrokolonien auf biotischen und abiotischen Oberflächen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden anhand verschiedener abiotischer Materialien (Glas, PVC und Kupfer) untersucht, in welchem Umfang unterschiedliche darmpathogene *E. coli* Stämme zur Biofilmbildung auf diesen Materialien in der Lage sind. Die Untersuchungen erfolgten in Verdünnungsreihen. Die Mikrokoloniebildung wurde semiquantitativ per Lichtmikroskop und Fluoreszenz-Mikroskopie verifiziert. Ergebnis der Untersuchungen war, dass spezifische *E. coli* Stämme, insbesondere enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und enteropathogene *E. coli* (EPEC) im Vergleich zum apathogenen Laborstamm vermehrt zu Mikrokoloniebildung in der Lage sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Art des Materials eine Rolle spielt. So konnte sowohl auf Glas als auch auf PVC eine ausgeprägte Mikrokoloniebildung schon nach 24h nachgewiesen werden. Dieselbe Untersuchung mit Kupfer hingegen zeigte signifikant bei keinem der untersuchten Stämme Wachstum. Kupfer hemmte in allen Untersuchungen die Mikrokoloniebildung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Materialabhängigkeit und die Pathovar-spezifische Variabilität bei der Mikrokoloniebildung von *Escherichia coli*.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2009

<b><u>Inhaltverzeichnis</u></b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Mikrokoloniebildung	1
1.2 Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	4
<b>2. Material und Methoden</b>	6
2.1 Geräte	6
2.2 Bakterienstämme	6
2.3 Untersuchtes Material zur Biofilmbildung	7
2.4 Nährmedien	7
2.5 Wachstumsbedingungen	8
2.6 Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	9
2.7 Verdünnungsreihe	9
2.8 Wachstumskinetik	10
2.9 Untersuchung der inkubierten Platten	10
2.10 Quantifizierung der Adhärenz	10
2.11 Statistische Berechnung	11
<b>3. Ergebnisse</b>	12
3.1 Untersuchung der Biofilmbildung auf Glas	12
3.2 Untersuchung der Biofilmbildung auf PVC	23
3.3 Untersuchung der Biofilmbildung auf Kupfer	35
3.4 Wachstumsverhalten der <i>E. coli</i> Spezies auf verschiedenen Materialien	36
<b>4. Diskussion</b>	39
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	44
<b>6. Danksagung</b>	47
<b>7. Lebenslauf</b>	48

## 1. Einleitung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist ein gut bekanntes und untersuchtes Phänomen von z.B. *Staphylococcus epidermidis* oder *Pseudomonas aeruginosa*. Bedingt durch diese Fähigkeit treten neue Möglichkeiten zum Überleben und zur Ausbreitung der Bakterien auf, die sowohl in Industrie als auch in der Medizin eine immer bedeutendere Rolle spielen. Unter klinischen Gesichtspunkten ist es daher von Interesse, zu untersuchen, ob auch *E. coli*, unter anderem EHEC, als Erreger des HUS, eine abiotische Adhärenz an z.B. Wasserleitungen bilden kann. Dieser Beweis würde ein großes Feld neuer Infektionspotentiale eröffnen.

### 1.1 Mikrokoloniebildung

Unter einer Mikrokolonie versteht man eine strukturierte Gemeinschaft von Zellen, umgeben von einer eigenen Polysaccharidschicht, die sich an biotische und abiotische Oberflächen anhaftet (1). Diese Polysaccharidschicht nimmt wichtige Stabilisierungs- und Schutzfunktionen wahr. So sind z.B. Bakterien, die von einem Biofilm umgeben sind, gegenüber antibiotischen Substanzen oder Schwankungen der Umgebungskonditionen (pH, O<sub>2</sub> oder Nährstoffgehalt) deutlich resistenter als planktonische Zellen. (2) Verschiedene Mechanismen können für die Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen verantwortlich sein. So ist eine verlangsamte Penetration der Antibiotika durch den Biofilm denkbar, oder das verlangsamte Wachstum der Mikrokolonie verlängert die benötigte Wirkzeit des Antibiotikums. (2) Als weitere Hypothese wäre denkbar, dass die Antibiotika-Resistenz durch pH – Unterschiede und den Anfall von Abbauprodukten im Inneren des Biofilms beeinflusst wird. (3) Des Weiteren ist die Biofilmbildung von bestimmten Genprodukten, die je nach Spezies unterschiedlich sind, abhängig.

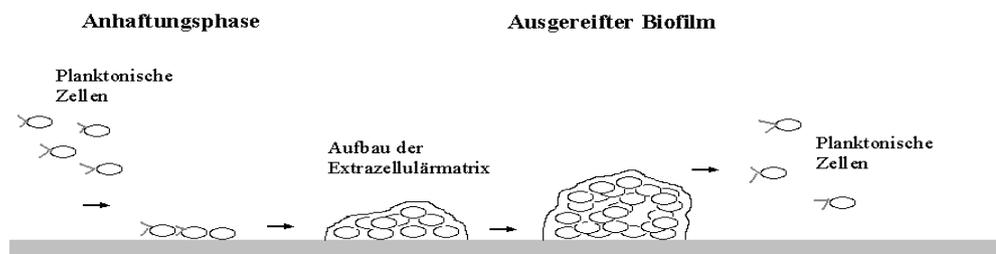
Die Art der Oberfläche kann in biotische und abiotische Medien, die jeweils eine andere Wachstumsart erfordern, aufgeteilt werden. Spricht man von biotischen Oberflächen, so handelt es sich um lebende Oberflächen, wie z.B. Endothelzellen. Bei abiotischen Oberflächen geht es um physikalisch und chemisch inerte Substanzen, wie z.B. PVC oder Glas. (4)

Den eigentlichen Aufbau der Mikrokolonie kann man in zwei Stadien einteilen: 1. Das Andock-Stadium und 2. das Anheftungs-Stadium. Im ersten Stadium bewegt sich das Bakterium sehr dicht an die gebotene Oberfläche heran (ca.  $< 1\text{nm}$ ). Hier wurden Unterschiede zwischen den Bakterienspezies beobachtet. Manche bewegen sich von einander weg, so dass eine einschichtige Kolonie entsteht, manche Bakterienstämme hingegen formen Mikrokolonien. (4) Von entscheidender Relevanz für die Biofilmbildung scheinen hierbei drei Zellprozesse zu sein, die Bildung von Flagella, Curli und Typ I Fimbrien. (5) Die reversible Adhäsion an die Oberfläche wird durch physikalische Kräfte bewirkt, wie elektrostatische Anziehung, van der Waals Kräfte, hydrophobe/-phile Interaktion und die Umgebungstemperatur.

Im zweiten Stadium findet die irreversible Adhärenz an die Oberfläche statt. Dies geschieht durch das Zusammenwirken von verschiedenen Adhäsionsfaktoren und der Oberfläche. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Bakterien mit der Bildung der Exopolysaccharidmatrix. Durch diese Matrix wird die Mikrokolonie bzgl. der Adhärenz unabhängig von physikalischen Faktoren.

Innerhalb der Matrix laufen nun Zellteilung und Zelltod sowie die weitere Bildung von Glycocalyx durch Interaktion mit organischen und anorganischen Molekülen ab. In diesem Stadium kann man sich das Aussehen des Biofilms vorstellen wie einen Schwamm oder einen Pilz. Alle Arten von Biofilmen sind sehr wasserhaltig und bestehen zu 73 – 98 % aus nichtzellulärem Material, wie der Polysaccharidmatrix. Die Versorgung der Zellen im Inneren des Biofilms wird durch von der Matrix gebildete Wasser-Kanäle gewährleistet. (6)

Dennoch wird die Wachstumsrate der Bakterien limitiert durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen und der Möglichkeit der „Abfallentsorgung“. Dadurch kommt es zu einer Stagnation des Wachstums. Jetzt wird ein dynamisches Stadium erreicht, indem Bakterien aus den äußeren Lagen des Biofilms wieder zu planktonischen Zellen werden, und sich vom Biofilm trennen. (1)



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Entwicklung eines Biofilms. Bedingt durch die Oberflächencharakteristika und molekülvermittelten Zellverbindungen heften sich die ersten Zellen an die Oberfläche. Im nächsten Schritt werden Mikrokolonien geformt, die von einer Polysaccharidmatrix umgeben werden. Innerhalb dieser Kolonie findet nun Zellteilung und Wachstum des Biofilms statt. Nach Erreichen einer gewissen Größe werden wieder Zellen vom Biofilm abgestoßen und werden zu planktonischen Zellen.

Bei der Entstehung von Biofilmen durch *E. coli* Stämme spielt die Expression verschiedener Gene eine große Rolle. So wurden bereits 2002 in einer Studie von Trémoulet et al. (7) 17 verschiedene Proteine differenziert, von denen die meisten bei der Biofilmentstehung hoch reguliert waren. Des Weiteren wurde bei *E. coli* Stämmen eine Mutation des *ompR234* festgestellt. Diese Mutation führt dazu, dass das Gen *csgA*, das für die Bildung von Fimbrien verantwortlich ist, überexprimiert wird. Dadurch ist unter anderem die Adhärenz der *E. coli* Zellen an verschiedenen biotischen Oberflächen möglich. (8) In nachfolgenden Studien wurde ein komplexes Netzwerk von Prozessen auf zellulärer, molekularer und genetischer Ebene aufgedeckt. Durch unterschiedliche Up und Down Regulation der verschiedenen Mechanismen, ist der Biofilm in der Lage, sich an diverse Umweltbedingungen anzupassen. (1)

## 1.2 Enteropathogene *Escherichia coli*

Die Untersuchung der Mikrokoloniebildung von *E. coli* ist von Bedeutung, um einen Verbreitungsweg der enteropathogenen *Escherichia coli* zu verifizieren. Während die meisten physiologisch im Darm vorkommenden Colibakterien apathogen sind, konnten die ersten enteropathogenen *E. coli* (EHEC) zum ersten Mal in den USA 1982 isoliert werden. 1985 wurde ein weiterer darmpathogener Keim (EAEC) beschrieben. Erste epidemische Durchfallerkrankungen mit darmpathogenen *E. coli* wurden Mitte der 80iger Jahre untersucht. Insgesamt sind heute fünf pathogene Wirkgruppen bekannt: 1. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), 2. Enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), 3. Enteropathogene *E. coli* (EPEC) und eine Untergruppe, die sogenannten diffus adhärierenden *E. coli* (DAEC), 4. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) 5. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Während ETEC und EIEC hauptsächlich in den wärmeren Klimazonen vorkommen, sind EPEC, EAEC und EHEC auch bei uns nach den Salmonellen zusammen mit *Campylobacter* der zweithäufigste Erreger der bakteriellen Enteritis geworden. Bisher wurden drei Hauptübertragungswege festgestellt: 1) durch kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser oder auch das Baden in kontaminiertem Oberflächenwasser. 2) Kontaktinfektion von Mensch zu Mensch. 3) Kontakt mit infizierten Tieren. Die Infektion durch Lebensmittel und Trinkwasser stellt allerdings den häufigsten Übertragungsweg dar. (10)

Die Symptome der Erkrankung durch enteropathogenen *Escherichia coli* sind vielfältig. Häufig bedingt durch eine Enterotoxinbildung können wässrige Diarrhöen mit Unterbauchschmerzen und vor allem bei Kindern, Fieber, Übelkeit und Erbrechen, Blut- und Mucosaauflagerungen des Stuhls, bis hin zu einer hämorrhagischen Kolitis sowie Infektionen des Uro-Genitaltrakts auftreten. Auch septische Verläufe und eine *E.coli* verursachte Meningitis des Säuglings werden beschrieben. Etwa 80% der Erkrankungen treten bei Kindern unter 14 Jahren auf, während die Infektion bei Erwachsenen häufig asymptomatisch bleibt oder sich nur als selbst limitierende, uncharakteristische Diarrhöe zeigt. Eine der häufigsten extraintestinalen Komplikationen der durch EHEC bedingten Enteritis ist das hämolytisch urämische Syndrom. Folgen des HUS können ein Hirnödem mit nachfolgenden neurologischen Symptomen wie zerebralen Krampfanfällen, Koma, Ataxie oder Paresen sein.

Häufig wurden auch bleibende Nierenschädigung bis zur Dialysepflichtigkeit und Nierentransplantation beobachtet (12).

Eine antibiotische Therapie ist zumindest während der akuten Krankheitsphase kontraindiziert, da durch den Einsatz von Antibiotika die Toxinfreisetzung erhöht wird, und die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung des HUS dadurch ansteigt (10).

Die Ursache dieser unterschiedlichen Pathogenitäten ist in der großen Variation von Pathogenitätsgenen zu sehen. Diese wurden sowohl auf Pathogenitätsinseln als auch Plasmide und Bakteriophagen, als Träger der Gene, isoliert. Viele Pathogenitätsfaktoren wurden per Gentransfer an die darmpathogenen *E. coli* übertragen. Dadurch ist zu erklären, dass sich das Virulenzprofil ständig und mitunter kurzfristig verändert.

Aus diesem Grund ist nicht nur die Therapie der Infektion Focus der Forschung, sondern auch die Prophylaxe der Infektionen mit enteropathogenen *Escherichia coli*.

Diese besteht zumeist daraus, häufige Infektionsquellen zu meiden sowie strenge Hygienevorschriften einzuhalten.

Da auch Trinkwasser als mögliche Quelle der Übertragung gilt, ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, ob *E. coli* und im Speziellen enterohämorrhagische *E. coli* zur Mikrokoloniebildung auf unterschiedlichen Oberflächen befähigt ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Nährböden: Columbia Blutagarplatten, Rodak Abklatschplatten	Eigenherstellung
Kühl- und Gefrierschränke	Kirsch, Offenburg
Brutschrank „Function Line“	Heraeus, Hamburg
Sicherheitswerkbank, Typ HSP 18, Hera Safe	Heraeus, Hamburg
Heißluftsterilisator GFL 7105	Melag, Berlin
Mikroskop 49 30 11 - 9901	Zeiss, Jena
Kamera für Fluoreszenz	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop, MC 63 A	Zeiss, Jena
Färbetrog Typ Hellendahl, Borosilikatglas für 16 Objektträger	Eigenherstellung
Bechergläser DIN 12331 DURAN	Schott, Mainz
Pipetten verschiedene Modelle	Eppendorf, Hamburg
Ösen, steril	Nunc Brand Products, Rochester, NY, USA
Filter Millipore Membran Filter	Millipore, Schwalbach
Farbfilme 200 – 400 ASA	Kodak, Stuttgart

### 2.2 Bakterienstämme

In diesen Versuchsreihen wurde die Adhärenz eines enteroaggregativen *E. coli* (EAEC 17-2), eines enteropathogenen *E. coli* (EPEC 2348/69) und dem Laborstamm *E. coli* (C600) untersucht.

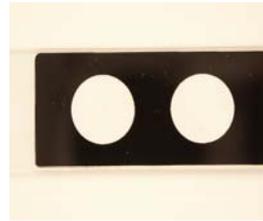
Als Positivkontrolle bei den Versuchen mit Fluorocult® Brila-Bouillon wurde *E. coli* ATCC 25922 verwandt, dieser wurde schon in anderen Gewässeruntersuchungen mit dem Fluorocult® Brila-Bouillon als Positivkontrolle eingesetzt.

### 2.3 Untersuchte Materialien zur Biofilmbildung

Objektträger

Diagnostika Objektträger 76 x 26 mm,  
2/15mm K41

Firma Engelbrecht



PVC

Platten 76 x 26 mm, Stärke 2,5 mm



Kupfer

Platten 76 x 26 mm, Stärke 2 mm



### 2.4 Nährmedien

#### TSB – Medium

Trypticase Soy Broth	30,0g /l
Hefe Extrakt	3,0g /l
Agar	15,0g /l
pH	7,0 – 7,2

#### Fluorocult® Brila-Boullion

Peptone	10,0 g /l
Lactose	10,0 g /l
Ox bile, getrocknet	20,0 g /l
Brilliant grün	0,0133 g /l
L-Tryptophan	1,0 g /l
4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid	0,1 g /l
pH	7,2 $\pm$ 0,2

Medium wird 15 min bei 121° C autoklaviert

### **MSM - Medium (Minimal Salt Medium) / mit Hefe**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g /l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g /l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g /l
MgSO <sub>4</sub>	0,1 g /l
Hefe Extrakt	1 mg /l

zusätzlich: 0,04% D-Glucose

Das Medium wurde bei 121° C, 15 psi für 20 min sterilisiert

### **MSM - Medium (Minimal Salt Medium) / ohne Hefe**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g /l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g /l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g /l
MgSO <sub>4</sub>	0,1 g /l

zusätzlich: 0,04% D-Glucose

Das Medium wurde bei 121° C, 15 psi für 20 min sterilisiert

### **MEM – Medium (Gewebekulturmedium)**

MEM – Earle (1x) von Biochrom Berlin

NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g /l
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	0,518 g /l

## **2.5 Wachstumsbedingungen**

Zuerst wurde eine Bakteriensuspension hergestellt. Dazu wurde in die Färbetröge 60 ml Nährmedium (je nach Versuch TSB, MEM oder MSM) gegeben. Im nächsten Schritt wurden in diese Tröge die unterschiedlichen Materialien gestellt, die auf bakterielle Adhärenz getestet werden sollten. Bevor die Materialien in den Versuchen verarbeitet werden konnten, wurden diese vorher mit 96% igem Ethanol desinfiziert. In die Tröge wurden einige Kolonien der jeweiligen Teststämme gegeben. Diese Suspension wurde über Nacht bei 37° C im Brutschrank bebrütet. Im minimalen Salz Medium allerdings war eine Bebrütungszeit von 72 h notwendig um erstes Wachstum nachzuweisen.

## **2.6 Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung**

Alle Präparate wurden ohne weitere Fixierung nach dem Trocknen gefärbt. Für die Färbung der Objektträger wurde die Methylenblaufärbung benutzt. Im ersten Schritt wurde Methylenblau ohne weitere Fixierung auf die Glasfläche gegeben und 30 sec. auf der Fläche belassen. Nach dem Färben wurde das Präparat mit Wasser abgespült, um Farbreste zu entfernen und dann luftgetrocknet. Dieser Schritt des Färbens musste allerdings nur bei den Glas – Objektträgern durchgeführt werden. Bei PVC und Kupfer wurde mit Fluoreszenzmarkierung der Bakterien gearbeitet. Dazu wurden die Bakterien in Fluorocult®-Brila Boullion inkubiert, das Fluoreszenzmerkmal konnte sich so an die Oberflächen der Bakterien anlagern. Zuletzt wurden die Objektträger unter dem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

## **2.7 Verdünnungsreihe**

Bei der Verdünnungsreihe wurden fünf Verdünnungsstufen angesetzt. Man geht von 60 ml Nährmedium aus. In die erste Verdünnungsstufe wurde in 60 ml Nährmedium eine koloniebildende Einheit (KBE) der unterschiedlichen Bakterienstämme gegeben. Aus dieser Suspension wurden nach gründlichem Durchmischen der Suspension 0.6 ml heraus pipettiert und in den nächsten Trog mit ebenfalls 60 ml Medium gegeben, so dass sich eine (1: 100) Verdünnung ergibt. Dieses Prinzip wurde weiterverfolgt bis zu einer Verdünnung von 1: 10<sup>8</sup>, so dass nach Fertigstellung der Verdünnungsreihe fünf Tröge mit je 60ml Nährmedium und Bakterienverdünnung vorhanden sind. In jedes dieser fünf Tröge wurden dann drei Platten des jeweils zu untersuchenden Materials eingesetzt und im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Bei Untersuchungen mit Glas wurde TSB-Medium verwendet. Wurden allerdings PVC und Kupfer untersucht, so wurde ein fluoreszierendes Medium (Fluorocult® Brila-Boullion) verwendet. Dieses Medium führt dazu, dass die untersuchten *E. coli* Stämme durch eine Veränderung ihrer Glukuronidase bei der Untersuchung mit fluoreszierendem Licht besser zu erkennen waren.

## **2.8 Wachstumskinetik**

In jeden zu untersuchenden Trog wurden drei Platten des jeweils zu untersuchenden Mediums (Glas, PVC, Kupfer) gestellt, so dass diese von allen Seiten von der Bakteriensuspension umspült werden konnten. Diese Platten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem ständig inkubierten Trog entfernt. Insgesamt wurden die Bakteriensuspensionen für 24 h bei 37° C im Brutschrank gehalten. Nach 4 h wurde dabei die erste Platte aus der Bakteriensuspension entfernt und quantitativ untersucht. Nach 8 h wurde der Versuch für die zweite Platte beendet. Die dritte Platte bleibt während der vollständigen 24 h im Brutschrank inkubiert, um erst nach Beendigung der 24 h die quantitative Untersuchung abzuschließen. Durch diesen Versuchsaufbau können über den Zeitraum eines Tages zu unterschiedlichen Einzelzeitpunkten Aussagen zum Adhäsionsverhalten der Bakterienstämme gemacht werden.

## **2.9 Untersuchungen der inkubierten Platten**

Die Platten wurden mit dem Mikroskop auf die gebildeten Adhärenzen auf den verschiedenen Oberflächen untersucht. Die Glasplatten (Objektträger) wurden mit dem Lichtmikroskop untersucht. Bei Kupfer und PVC wurde mit dem Fluoreszenz-Mikroskop gearbeitet. Die Untersuchung unter dem Licht- oder Fluoreszenz-Mikroskop wurde direkt nach der Beendigung der Inkubation im Brutschrank durchgeführt. Zur Auswertung der Platten wurden zusätzlich Fotos mit der Aufsetzkamera des Mikroskops gemacht. Dazu wurden 200 ASA Filme benutzt. Es wurde mit einer Belichtungszeit von 40 sec. gearbeitet.

## **2.10 Quantifizierung der Adhärenz**

Um die gebildeten Adhärenzen auf den verschiedenen Materialien quantitativ bestimmen zu können, wurden bei ständig gleich bleibender Vergrößerung (10 x 100) die Anzahl der adhärrierenden Bakterien pro Gesichtsfeld ausgezählt. Die Auszählung wurde bei 20 Gesichtsfeldern pro Präparat durchgeführt. Dieses Verfahren wurde sowohl im Lichtmikroskop als auch im Fluoreszenz –Mikroskop angewendet. Um die Adhärenz auf den untersuchten Präparaten zu verifizieren, wurde von den entnommenen Präparaten direkt nach dem Entfernen aus dem Trog ein Abklatsch mit Rodak

Abklatschplatten gemacht. Diese Abklatschplatten wurden dann für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für die quantitative Auswertung der Platten wurde jeweils ein 1cm<sup>2</sup> großes Feld ausgezählt und mit dem Ergebnis der Gesichtsfeldauszählung auf Korrelation verglichen. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Untersuchungen war die Beurteilung des Bakterienwachstums in den jeweiligen Suspensionsverdünnungen. Hierzu wurden ebenfalls nach 4 h, 8 h und 24 h je 1ml der Suspension auf eine Columbia Blutagarplatte mit dem Acht-Ösen-Ausstrich ausgestrichen und für 24 h bei 37°C bebrütet. Nach 24 h wurden die Kolonie bildenden Einheiten auf der Blutagarplatte ausgezählt. Die hier ermittelten Werte wurden wiederum mit den Werten der Gesichtsfeldzählung verglichen, und auf Korrelation untersucht. Die ermittelten Daten des Acht-Ösen-Ausstrichs und der Gesichtsfeldzählung wurden graphisch dargestellt.

### **2.11 Statistische Berechnung**

Der Vergleich zwischen den Bakterienanzahlen pro Gesichtsfeld wurde statistisch mittels  $\chi^2$  -Test analysiert. Es wurde auch das Verhältnis zwischen Wachstum und Ausprägung der Mikrokoloniebildung berechnet. Ein p-Wert von < 0,05 galt als statistisch signifikant. Für Ausgangswerte <5 wurde der Fisher's exact- Test angewendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der Mikrokoloniebildung auf Glas

##### 3.1.1 Wachstumsversuch über 24 h

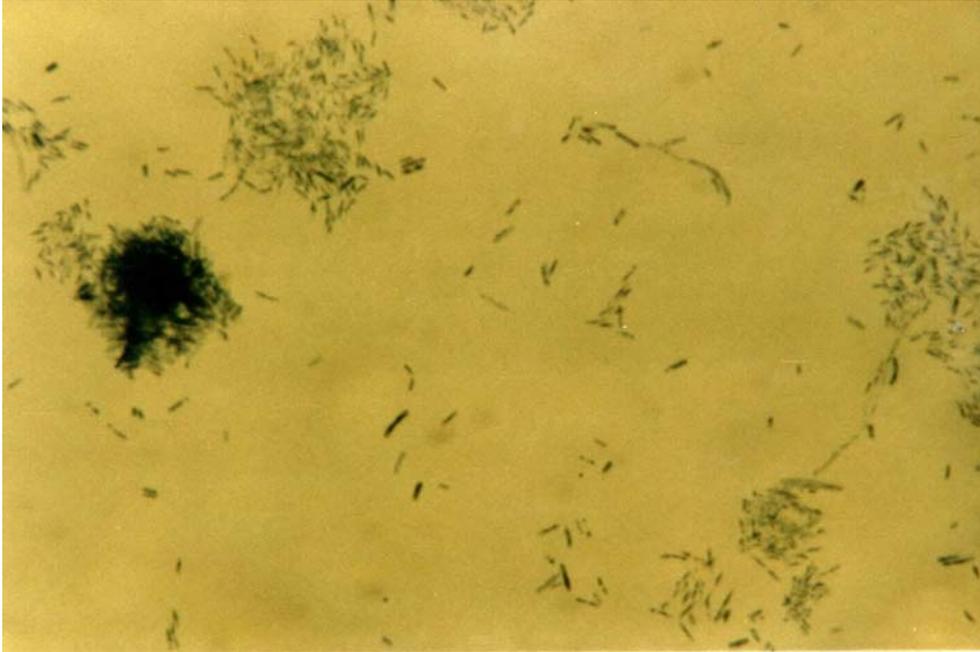
Nach 24 h Inkubation zeigte sich bei allen drei getesteten *E. coli* Stämmen die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Je nach Stamm war diese mehr oder weniger ausgeprägt. Die stärkste Adhäsion zeigte sich bei enteroaggregativen *E. coli* (EAEC 17-2). Hier findet sich eine Mikrokoloniebildung, in der die einzelnen Mikrokolonien miteinander in Kontakt treten, so dass auch flächendeckendes Wachstum auf der Glasoberfläche beobachtet werden kann. Man kann die Mikrokoloniebildung von EAEC auch als diffus adhärierend bezeichnen (Abb. 2).

Bei dem zweiten getesteten Stamm, einem enteropathogenen *E. coli* (EPEC 2348/69) wurde ebenfalls eine Mikrokoloniebildung auf der Glasoberfläche nach 24 h Inkubation nachgewiesen. Dieses Wachstum stellt sich allerdings eher durch kleinere Mikrokolonien dar, die nicht miteinander in Kontakt treten.

Als letzten Stamm wurde der Laborstamm C600 untersucht. Dieser diente als Kontrolle, um einen Stamm zu untersuchen, der keine Pathogenitätsfaktoren beinhaltet. Die hier beobachtete Adhärenz fand nicht in Mikrokolonien statt, sondern liegt als Einzelwachstum auf der gesamten Glasoberfläche, vor (Abb. 3).



**Abb. 2:** Lichtmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von EAEC 17-2 auf Glasoberflächen nach 24h Inkubation.



**Abb. 3:** Lichtmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von C600 auf Glasoberflächen nach 24h Inkubation.

### **3.1.2 Kinetikversuch zur quantitativen Beurteilung der Mikrokoloniebildung**

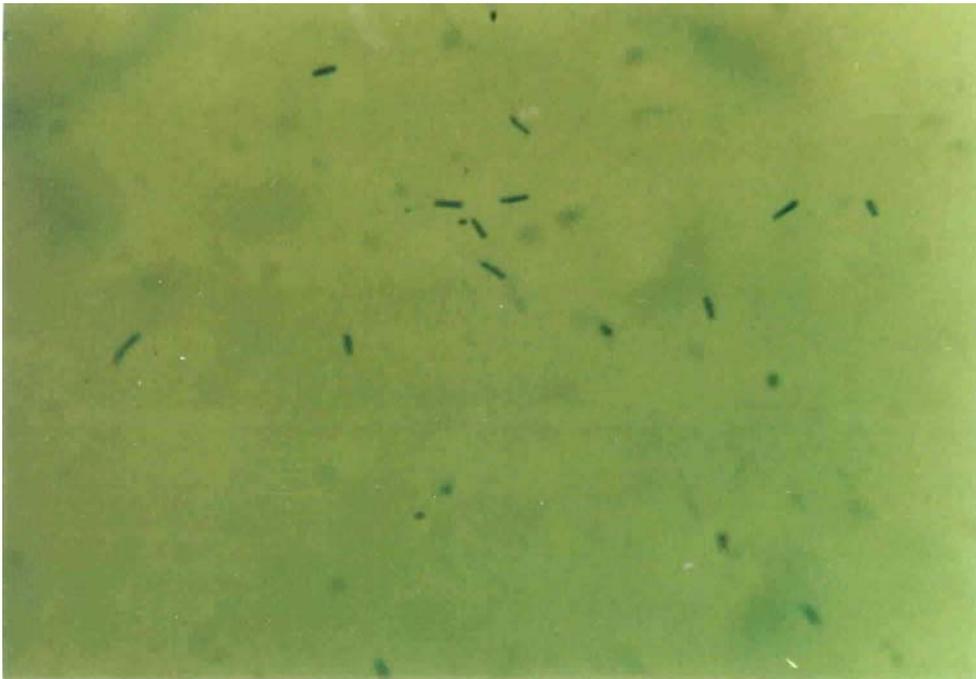
Als Resultat dieses Versuches zeigte sich, dass alle drei getesteten Stämme trotz geringer Bakterienanzahl in Suspension zur Mikrokoloniebildung befähigt sind (s. Tab 1 -3). Dieses wurde in mehrfach durchgeführten identischen Versuchsanordnungen bestätigt.

Als Kontrollstamm wurde ein C600 Stamm im Bezug auf die Mikrokoloniebildung auf Glas untersucht. Bei diesem *E. coli* Stamm zeigte sich schnell eine Adhärenz zur Glasoberfläche. Es konnte schon nach 4h bis zu einer Verdünnung von  $10^6$  vereinzelte Adhärenz von Bakterien auf der Glasoberfläche nachgewiesen werden. In der Ausgangsverdünnung mit 1 KBE pro 60ml Nährmedium zählten wir pro Gesichtsfeld auf der Glasoberfläche etwa 20-30 adherierende Bakterien (Abb. 4). Auf den zugehörigen Blutagarplatten zeigte sich ein korrelierendes Bild. Schon nach 4h war das Wachstum aus den 1:1 und 1:100 Verdünnungen als flächendeckend, rasenartig zu beschreiben. Allerdings schien hier die Zeit zu kurz, um eine Adhärenz auszubilden, da trotz des starken Wachstums in der Suspension nur wenige Bakterien auf der Glasfläche nachweisbar waren (Tab.1). In den stärkeren Verdünnungen ( $1:10^4$  und  $1:10^6$ ) fand man noch vereinzelte Bakterien auf Agarplatten und Glasflächen. Man konnte weder auf der

Blutagarplatte noch auf der Glasoberfläche Wachstum oder Adhärenz in der höchsten Verdünnung (1:10<sup>8</sup>) nachweisen (Tab. 1).

Nach 8h ließen sich auf den Blutagarplatten der Acht-Ösen-Ausstriche keine einzelnen KBE mehr differenzieren, da sich hier ein flächiges Wachstum auf der Platte darstellte. Auf den Objektträgern ließ sich nach 8h eine deutlich ausgeprägtere Adhärenz darstellen, als noch nach 4h. In der 1:1 Suspension konnten wir nach dieser Zeit 300-400 Einzelbakterien differenzieren. In den höheren Verdünnungsstufen, konnte man allerdings immer noch nur vereinzelte Adhärenz zur Glasoberfläche nachweisen (Tab. 2).

Nach 24h konnten wir eine relativ flächig wachsende Adhärenz von C600 auf Glas darstellen. In der 1:1 Verdünnung waren bis etwa 800-1000 Bakterien pro Gesichtsfeld adhären (Abb. 5) und auch in der 1:10<sup>6</sup> Verdünnung konnten wir mit 20-30 Bakterien pro Gesichtsfeld nachweisen. Allerdings fand man bei C600 kaum Mikrokolonien, sondern nur einzeln angelegte Bakterien, die aber nach längerer Inkubationszeit so dicht nebeneinander lagen, dass sich eine dichte Fläche von Bakterien bildete (Tab.3).



**Abb. 4:** Lichtmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von C600 auf Glasoberflächen nach 4h Inkubation der 1:1 Verdünnung.(1 KBE auf 60 ml Nährmedium)

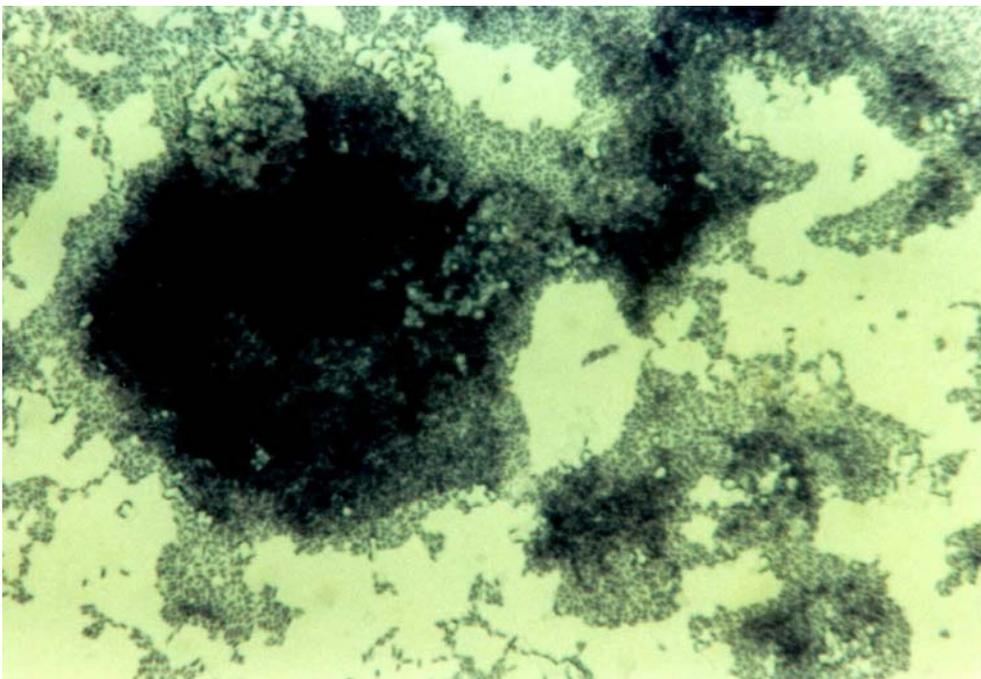


**Abb. 5:** Lichtmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von C600 auf Glasoberflächen nach 24h Inkubation der 1:100 Verdünnung.(Ausgangslösung:1 KBE auf 60 ml Nährmedium)

Bei EPEC 2348/69 beobachtete man nach 4h trotz eines rasenartigen Wachstums auf der Blutagarplatte aus 1ml ausgestrichener Suspension im Gegensatz zu C600 auf dem Glasobjektträger nur vereinzelt Wachstum von *E. coli*. Je höher die Verdünnungsstufe war, desto weniger Bakterien ließen sich im Ausstrich nachweisen. In der  $1:10^6$  Verdünnung ließen sich auf der Columbia Blutagarplatte noch ca.100 KBE nachweisen, während auf der Ausstrichplatte aus der  $10^8$  Verdünnung kein Wachstum mehr nachweisbar war. Die Gesichtsfeldauszählung ergab nur eine beginnende Mikrokoloniebildung in der ersten Verdünnungsstufe (1 KBE auf 60ml Nährmedium) (Tab. 1).

Nach 8h konnte auf allen Ausstrichplatten ein Wachstum von bis zu 300 KBE aus der Verdünnung  $10^8$  ausgezählt werden. Diese Zunahme an Bakterienwachstum in der Suspension spiegelte sich auch in der Anzahl der pro Gesichtsfeld ausgezählten EPEC wieder. Hier fanden sich auf den Objektträgern aus der 1:1 und der 1:100 Verdünnung etwa 3-4 Mikrokolonien mit insgesamt 30 – 40 Bakterien pro Gesichtsfeld. In den Verdünnungsstufen  $1:10^4$  und  $1:10^6$  fand man nur noch vereinzelt 2-3 Bakterien pro Gesichtsfeld. In der höchsten Verdünnung mit  $10^8$  konnte auch nach 8h keine Mikrokoloniebildung auf der Glasoberfläche beobachtet werden (Tab.2).

Nach der endgültigen Inkubationszeit von 24h zeigte sich ein deutlich ausgeprägteres Wachstum als noch nach 8h. Nach 24h ließen sich in den Acht-Ösen-Ausstrichen aller Verdünnungsstufen, wie schon bei C 600, keine einzelnen KBE mehr abgrenzen, so dass man das Wachstum auf den Platten als rasenartig bezeichnen konnte. Dieses Bild spiegelte sich auch in der Gesichtsfeldauszählung wieder. Auch hier konnte man in den Verdünnungen 1:1 und 1:100 kaum einzelne Mikrokolonien ausmachen, da alle miteinander verwoben waren und sich so ein flächiger Biofilm nach 24h darstellt (Abb.5). In der nächsten Verdünnungsstufe bei  $10^4$  konnte man pro Gesichtsfeld etwa 1-2 Mikrokolonien differenzieren. In der höchsten Verdünnung mit  $10^8$  ließ sich auch nach 24h noch kein Wachstum von EPEC auf der Glasoberfläche nachweisen (Tab. 3).

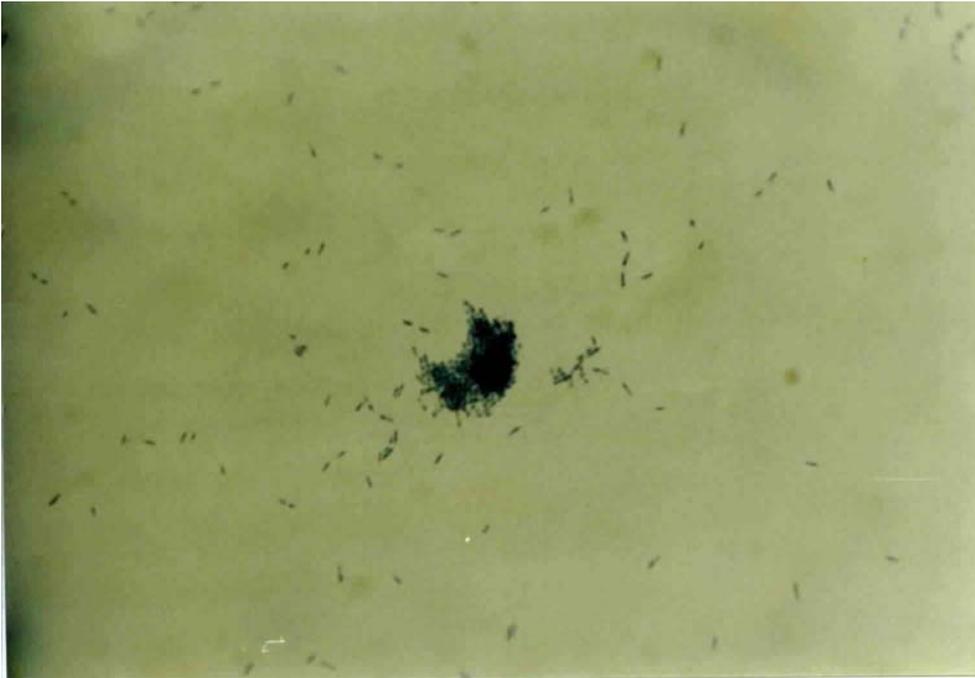


**Abb. 6:** Lichtmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von EPEC 2348/69 auf Glasoberflächen nach 24h Inkubation der 1:1 Verdünnung. (Ausgangslösung: 1 KBE auf 60 ml Nährmedium)

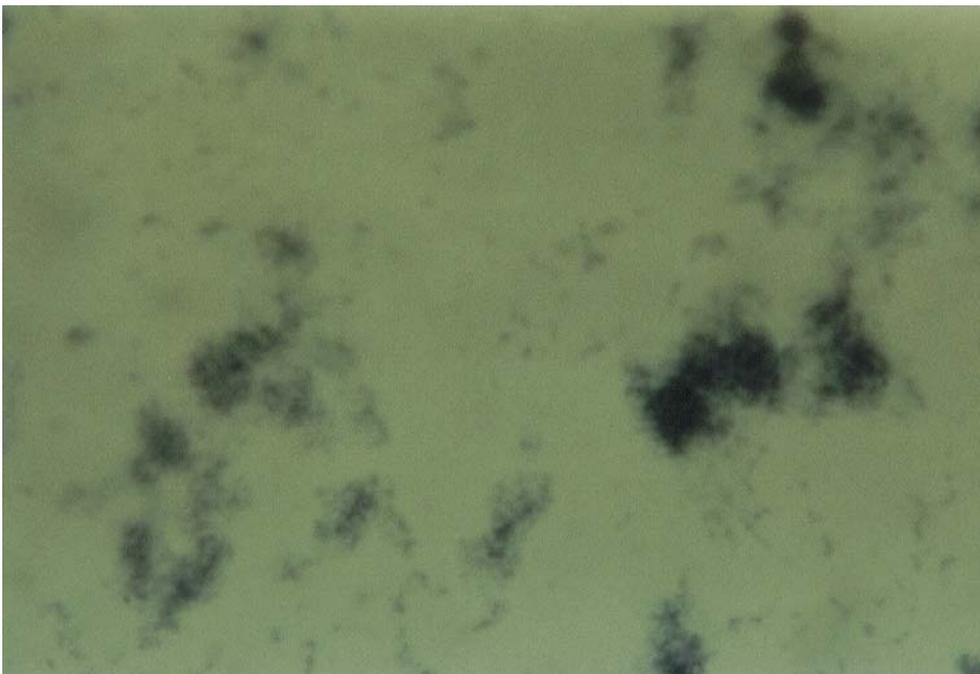
Eine identische Versuchsreihe wurde auch mit EAEC 17-2, einem enteroaggregativen *E. coli* durchgeführt. In den fünf Verdünnungsstufen wurden wiederum drei Objektträger 4h, 8h oder 24h inkubiert. Es zeigte sich hier sowohl in Qualität als auch in Quantität eine veränderte Art der Mikrokoloniebildung. So konnten wir bei der Bestimmung der KBE pro 1ml Suspension im Acht-Ösen-Ausstrich ein ähnliches Bild

beobachten, vergleichbar mit den Resultaten der EPEC Versuchsreihe. Auch bei EAEC konnte man in der Verdünnungen 1KBE pro 60ml und in der 1:100 Verdünnung keine Differenzierung einzelner KBE nachweisen. Eine genauere quantitative Aussage konnte man in den Verdünnungen  $1:10^4$  (1000 KBE) und  $1:10^8$  (200 KBE) treffen. Wie bei EPEC konnte in der stärksten Verdünnung keinerlei Wachstum nachgewiesen werden (Tab.1). Dieses sich hier darstellende Bild stand in Korrelation zu den nach 4h untersuchten Objektträgern. Bei der Gesichtsfeldauszählung konnte man im 1:1 Ansatz ca. 100-200 Einzelbakterien nachweisen (Abb.7). In der 1:100 Verdünnung waren es noch 5-10 Einzelbakterien, während in den höheren Verdünnungen nur noch vereinzelt Bakterien zu differenzieren waren. Auch auf dem Objektträger ließ sich bei einer Verdünnung von  $1:10^8$  keine Adhärenz zur Oberfläche erkennen

Nach 8h zeigte sich dahingehend ein Unterschied zur EPEC-Untersuchung als die Anzahl der KBE pro 1ml Suspension nun in keiner Verdünnungsstufe mehr zu differenzieren war. Ähnlich stellte sich auch das Bild der Gesichtsfeldauszählung nach 8h dar. Auch hier zeigte sich eine deutliche stärker ausgeprägte Adhärenz von EAEC zu Glas als von EPEC. Auf dem Objektträger aus der 1:1 Verdünnung stellte sich ein flächiges Wachstum mit ca. 500 Bakterien pro Gesichtsfeld dar, und selbst in den stärksten Verdünnungen konnte man in einigen Gesichtsfeldern noch bis zu 200 Bakterien differenzieren. Auch waren die Bakterien nach 8h schon teilweise nicht mehr als Einzelbakterien adhären, sondern lagerten sich in kleinen Mikrokolonien zusammen (Tab.2). Nach 24h Inkubation und der Beendigung dieses Versuches konnte man wie schon nach 8h auf den Blutagarplatten keinen Unterschied machen zwischen den einzelnen Verdünnungen. Auf den Glasoberflächen konnten wir eine starke Ausprägung der Mikrokoloniebildung von EAEC nachweisen (Abb.8). So konnte man nach 24h Inkubation in der Ausgangssuspension 5-6 nicht klar voneinander abgrenzbare Mikrokolonien differenzieren. Selbst in der  $1:10^8$  Verdünnung hatten die etwa 20-30 differenzierten Bakterien die Tendenz zur Mikrokoloniebildung (Tab.3).



**Abb. 7:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von EAEC 17-2 nach Inkubation über 4h in 1:1 Verdünnung. (Ausgangslösung 1KBE auf 60ml Nährmedium)



**Abb. 8:** In Lichtmikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von EAEC 17-2 nach Inkubation über 24h 1:1 verdünnt. (Ausgangslösung 1KBE auf 60ml Nährmedium)

### 3.1.3 Vergleichende Zusammenfassung des Wachstumsverhaltes der *E. coli* Stämme auf Glas

In der kinetischen Auswertung der Versuche zeigten sich sehr deutliche Unterschiede bezüglich der Anzahl der adhärierenden Bakterien bei den drei getesteten Stämmen (C600, EAEC 17-2, EPEC 2348/69).

Es zeigte sich, dass EAEC 17-2 in allen getesteten Verdünnungsstufen am stärksten und schnellsten an Glas adhärert. C 600 zeigte zwar insgesamt ein eher mäßiges Wachstum auf Glas, dies war allerdings deutlich stärker ausgeprägt, als dies bei EPEC 2348/69 der Fall ist.

So bildete EAEC 17-2 in der Ausgangsverdünnung (1 KBE pro 60ml Nährmedium) innerhalb von 24h Mikrokolonien von durchschnittlich 1200 Bakterien pro Gesichtsfeld. Im selben Zeitraum adhärten etwa 900 Bakterien von Stamm C600 auf Glas. Hingegen blieb das Wachstum von EPEC 2348/69 mit ca. 100 Bakterien relativ gering. Das Wachstumsverhalten der drei Stämme allerdings war nahezu identisch, da in allen Versuchen der 1. Verdünnungsstufe von 8h Inkubation auf 24h Inkubation in etwa eine Verdreifachung der Bakterienadhärenz auf Glas stattfand (Abb. 9).

Auch auf den Objektträgern aus der 1:100 Verdünnung ließ sich eine ähnliche Tendenz, das Adhärenzverhalten betreffend beobachten. Sowohl bei C600 als auch bei EPEC 2348/69 konnte eine durchschnittliche Verdreifachung der anhaftenden Bakterien festgestellt werden. Bei EAEC 17-2 war hier eine deutlich ausgeprägtere Biofilmbildung nachweisbar, da sich die Anzahl der Bakterien pro Gesichtsfeld von 8h auf 24h durchschnittlich verdreifachte (Abb.10).

In der 1:10<sup>4</sup> Verdünnung stellte sich dasselbe Bild wie in der vorhergehenden Verdünnungsstufe dar. Auch hier verdreifachte sich die Anzahl der am Biofilm beteiligten Bakterien von 8h auf 24h auf ca. 100 (C600) bzw. 30 (EPEC 2348/69). Im selben Zeitraum fand bei EAEC 17-2 eine Biofilmentwicklung von 100 auf 500 Bakterien pro Gesichtsfeld statt (Abb.11).

Im direkten Vergleich von C600 zu EAEC ergab sich statistisch signifikant in allen Verdünnungsstufen ein höheres Wachstum von EAEC. 1:1 Verdünnung:  $\chi^2 = 75,71$ ;  $CI_{95}[3,9; 10,92]$ ;  $p < 0,00001$ . 1:100 Verdünnung:  $\chi^2 = 199,02$ ;  $CI_{95}[0,11;20]$ ;  $p < 0,0001$ . 1:10<sup>4</sup> Verdünnung :  $\chi^2 = 4,07$ ;  $CI_{95}[0,97; 4,23]$ ;  $p = 0,045$

Der direkte Vergleich von C600 zu EPEC ergab in den ersten Verdünnungsstufen ein signifikant höheres Wachstum von C600. 1:1 Verdünnung:  $\chi^2 = 8,71$ ;  $CI_{95}[0,93; 0,86]$  ;  $p = 0,00316$ . 1:100 Verdünnung:  $\chi^2 = 22,79$ ;  $CI_{95}[0,17;0,81]$ ;  $p < 0,0001$ . Bei der 1:10<sup>4</sup> Verdünnung konnte auf Grund von zu geringem Wachstum keine Signifikanz nachgewiesen werden. ( $\chi^2 = 2,79$ ;  $CI_{95}[0,01;1,59]$ ;  $p = 0,095$ )

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	≤ 10	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	100 - 200	5 - 10	≤ 10	≤ 10	k.W.
<b>C 600</b>	10 - 20	5	≤ 10	≤ 10	k.W.

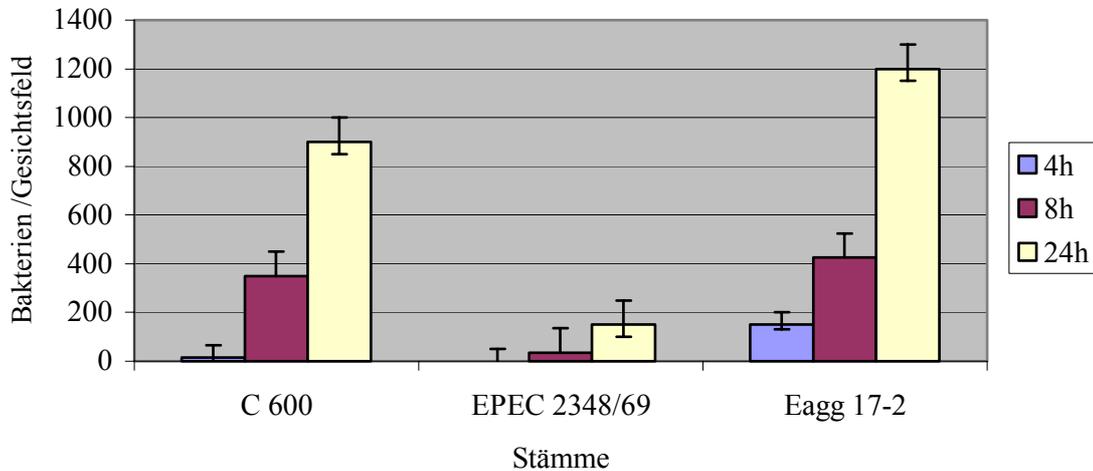
**Tab 1:** Nach 4h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem Glas Objektträger. k.W. = kein Wachstum

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	30 - 40	20 - 30	2 - 3	2 - 3	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	500	100 - 200	100	0 - 200	0 - 200
<b>C 600</b>	300 - 400	50 - 150	≤ 10	≤ 10	≤ 10

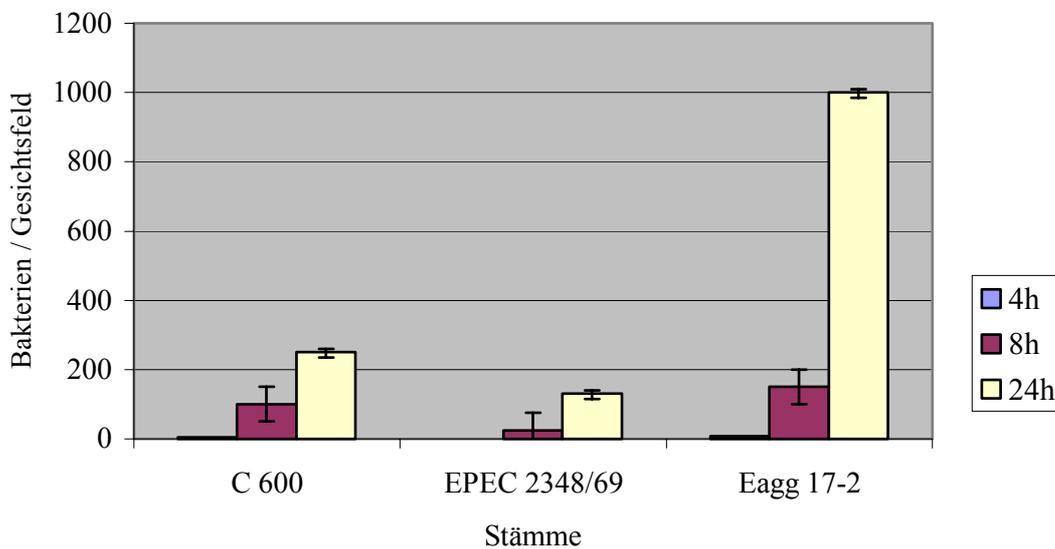
**Tab 2:** Nach 8h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem Glas Objektträger unter dem Lichtmikroskop. Quantifizierung der Fotoaufnahmen. k.W. = kein Wachstum

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	Flächig, kl.Mikrokol	Flächig, kl. Mikrokol	1 -2 Mirkokol	15 - 20	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	5-6 große Mikrokol.	5-6 kleinere Mikrokol.	1-2 Mikrokol.	1 Mikrokol	20 - 30
<b>C 600</b>	800 - 1000	200 -300	100	20 - 30	k.W.

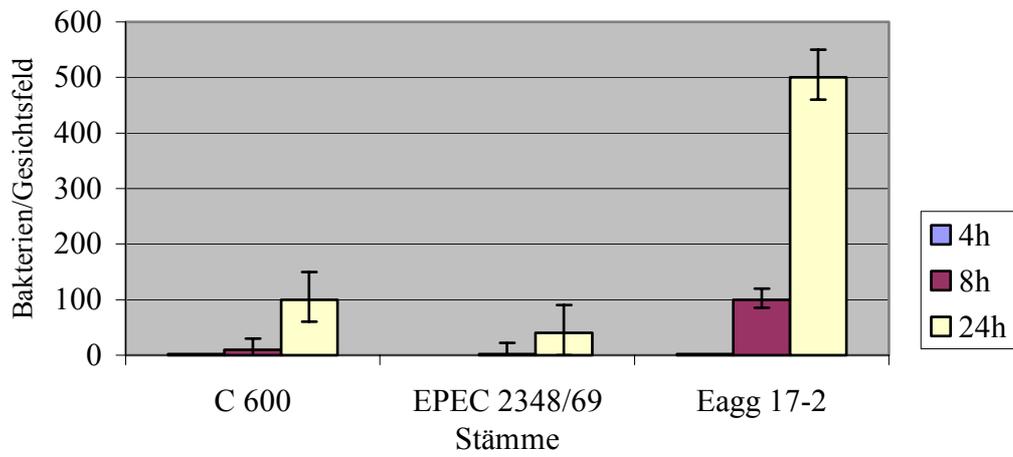
**Tab 3:** Nach 24h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem Glas Objektträger. k.W. = kein Wachstum



**Abb. 9:** Durchschnittliche Adhärenz auf Glas der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier 1:1 Verdünnung (1 KBE pro 60ml Nährmedium)



**Abb.10:** Durchschnittliche Adhärenz auf Glas der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier 1:100 Verdünnung (1 KBE pro 60 ml Nährmedium 1:100 verdünnt)



**Abb.11:** Durchschnittliche Adhärenz auf Glas der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier aus der  $1:10^4$  Verdünnung (1 KBE pro 60ml Nährmedium auf  $1:10^4$  verdünnt)

## **3.2 Untersuchung der Mikrokoloniebildung auf PVC mit Fluoreszenztechnik**

### **3.2.1 Wachstumsversuch über 24 h**

Nachdem nun bewiesen war, dass alle drei untersuchten Stämme auf Glasoberflächen adhären können, wurde der Versuch mit PVC wiederholt, um festzustellen, ob auch hier Biofilmbildung stattfinden kann.

Da es sich bei diesem Material um ein nicht durchleuchtungsfähiges Material handelte, wurden die *E. coli* Stämme in einem bestimmten fluoreszierenden Medium (Fluorocult®) inkubiert. Diese Medium erlaubte, dass die Glucuronidase der *E. coli* durch den Kontakt mit Methylumbelliferyl-glucuronid (MUG) gespalten wurde in Glucuronsäure und das fluoreszierende Methylumbelliferon.

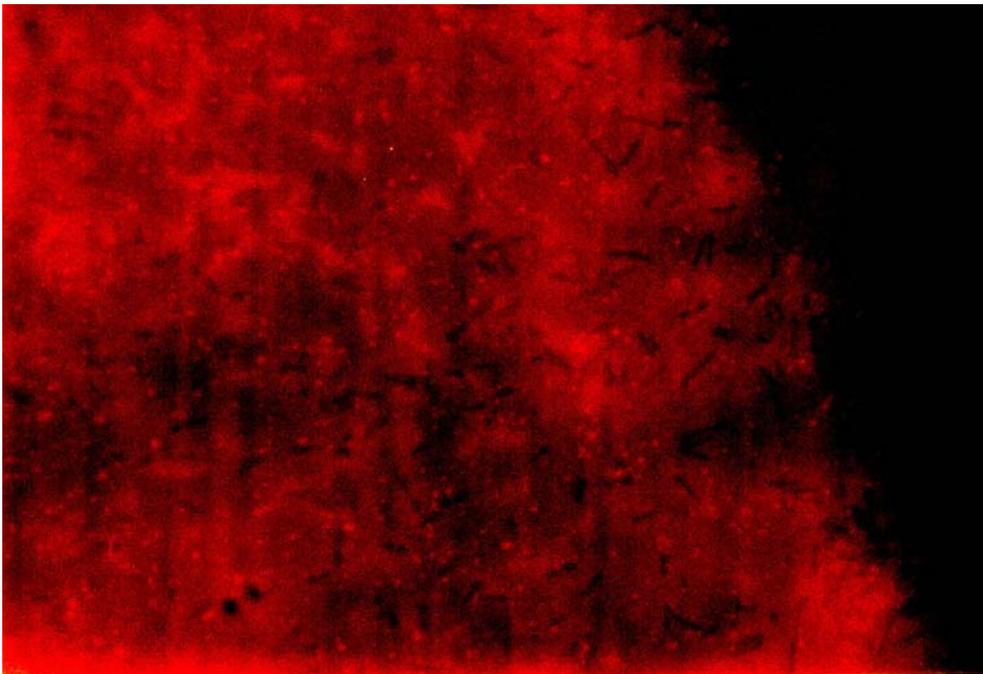
Nach 24h Inkubation zeigte sich bei allen drei Stämmen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop eine Adhärenz zu PVC. Diese war wie auch schon bei Glas bei den verschiedenen Stämmen unterschiedliche ausgeprägt. Auf der Platte, die mit EAEC inkubiert wurde, erkannten wir, wie schon auf Glas, deutlich ausgeprägte Mikrokoloniebildung, welche besonders ausgeprägt an der Wasser – Luft – Grenze auf der Platte ausgebildet war.

Auch bei EPEC konnten Adhärenzen zu PVC beobachtet werden. Diese waren aber weniger ausgeprägt als bei EAEC, so dass man nur kleine Mikrokolonien beobachten konnte, während die Mehrzahl der Bakterien einzeln vorlag.

Bei der Untersuchung mit C600 zeigte sich ein ähnliches Bild, wie wir es schon auf Glas beobachten konnten. Die Bakterien des C600 Stamms bildeten in diesem ersten qualitativen Versuch keine Mikrokolonien auf PVC nach 24h. Hier konnte man zwar eine große Anzahl von Bakterien differenzieren, allerdings adhärten diese einzeln an der Oberfläche, so dass zwar eine flächige Besiedlung mit C600 stattfand, die einzelnen Bakterien aber kaum Kontakt zueinander haben.



**Abb. 12:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von EAEC 17-2 auf PVC-Oberflächen nach 24h Inkubation.



**Abb. 13:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Mikrokoloniebildung von C600 auf PVC-Oberflächen nach 24h Inkubation

### **3.2.2 Kinetikversuch zur quantitativen Beurteilung der Mikrokoloniebildung auf PVC**

In diesem zweiten Kinetikversuch wurde das Wachstumsverhalten der drei Stämme EPEC 2348/69, EAEC 17-2 und C600 auf PVC untersucht. Ziel des Versuches war, Ähnlichkeiten zwischen der Mikrokoloniebildung auf Glas und der Mikrokoloniebildung auf PVC nachweisen zu können.

Zuerst wurden 3 Platten PVC in den jeweiligen Verdünnungsstufen aus der mit EPEC beimpften Suspension 4h, 8h oder 24h inkubiert.

Zuerst wurde der Versuch wiederum mit C600 als Kontrollstamm durchgeführt. So konnten wir nach 4h auf der PVC Platte aus der Ausgangslösung nur vereinzelte Bakterien (etwa 1 – 2 pro Gesichtsfeld) nachweisen (Abb. 14), obwohl das Wachstum aus der Ausgangslösung auf der Ausstrich-Platte, wie schon im Glasadhärenzversuch, schon nach 4h als rasenartig zu bezeichnen war. Dies war ein Hinweis dafür, dass die Mikrokoloniebildung auf PVC mehr Zeit in Anspruch nimmt als auf Glas (Tab. 4). In allen anderen Verdünnungsstufen ließ sich nach 4h noch keine Adhärenz auf PVC nachweisen, während auf der Blutagarplatte aus der 1:100 Verdünnung ca. 1000 KBE zu differenzieren waren. Auf den Blutagarplatten ließ sich bis zur 1: 10<sup>6</sup> Verdünnung Wachstum nachweisen.

Nach 8h war die Mikrokoloniebildung von C600 ausgeprägter als nach 4h, da nach 8h auf der Platte aus der Ausgangslösung schon 50 – 100 adhärente Bakterien pro Gesichtsfeld differenziert werden können. Auf der PVC-Platte aus der 1:100 Verdünnung konnten nach 8h 20 – 40 Bakterien pro Gesichtsfeld erkannt werden. Allerdings lagen die adhärennten Bakterien in den meisten Fällen als Einzelbakterien vor, nur wenige waren zu kleinen Mikrokolonien a 3-5 Bakterien verbunden (Tab. 5). Aus den angelegten Acht-Ösen-Ausstrichen war das Wachstum nach 8 h bis zu einer Verdünnung von 1: 10<sup>4</sup> rasenartig war. Nur auf der Agarplatte aus der 1: 10<sup>6</sup> Verdünnung ließen sich etwa 360 KBE pro 1ml differenzieren. In der höchsten Verdünnungsstufe war kein Wachstum nachweisbar.

Nach 24h war das Bild auf den PVC-Platten vergleichbar mit dem aus den Versuchen mit Glas, einschränkend ließ sich bei PVC feststellen, dass die Adhärenz von C600 auf PVC zwar flächendeckend war, aber wie schon bei Glas beobachtet, lagerten sich die einzelnen Bakterien weniger zu mehrschichtigen Mikrokolonien zusammen, sondern

bildeten vielmehr eine einfache Schicht. Auf der PVC-Platte aus der Ausgangslösung erkannten wir etwa 200 Bakterien pro Gesichtsfeld (Abb.15). Auch in den höheren Verdünnungsstufen ließ sich nach 24h Adhärenz von C600 zu PVC nachweisen (Tab.6). So konnten auf der Platte aus der  $10^6$  Verdünnung immer noch ca. 5 vereinzelt Bakterien pro Gesichtsfeld ausgemacht werden. Gleichzeitig konnte man das Wachstum auf den Ausstrichplatten wie schon nach 8h in allen Verdünnungsstufen als rasenartig bezeichnen.

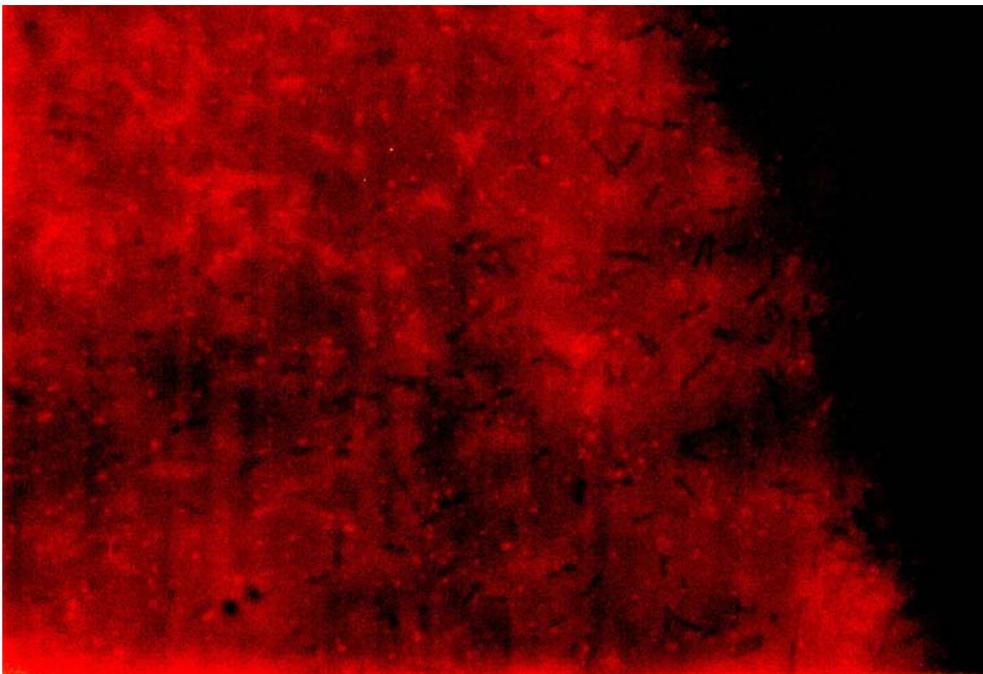
In einem weiteren Versuch wurde auch EPEC 2348/69 auf die quantitative Adhärenzfähigkeit hin untersucht. Auf den Blutagarplatten zeigte sich bei EPEC ein nahezu identisches Bild wie auch schon in der Versuchsreihe mit Glas. So konnte man in der Ausgangssuspension und auch in der 1:100 Verdünnung keine Einzelkolonien auf der Agarplatte differenzieren. Aus dem Acht-Ösen-Ausstrich der  $10^4$  Verdünnung gingen ca. 520 KBE hervor. In der höchsten Verdünnungsstufe ( $10^8$ ) ließ sich, wie auch schon in den vorhergehenden Versuchen, keinerlei Wachstum auf der Columbia-Platte nachweisen (Tab. 4). Schaute man sich die PVC Stücke unter dem Fluoreszenzmikroskop an, so ließ sich auch hier, wie schon auf Glas, eine Adhärenz von Einzelbakterien nachweisen. So adhärten in der Ausgangssuspension schon ca. 10 Bakterien pro Gesichtsfeld auf der Kunststoffoberfläche. Selbst in der  $1:10^4$  Verdünnung ließen sich noch vereinzelt Bakterien auf der Oberfläche nachweisen.

Nach 8h stieg die Anzahl der adhärierenden Bakterien auf 25 Bakterien pro Gesichtsfeld, die allerdings als Einzelbakterien vorlagen. In der  $1:10^4$  Verdünnung konnte man pro Gesichtsfeld etwa 2-3 Bakterien ausmachen. Die Auswertung der Blutagarplatten zeigte ein ähnliches Bild wie schon bei Glas. Bis zu einer Verdünnung von  $10^6$  konnte kein Einzelkoloniewachstum differenziert werden, und auch in der  $1:10^6$  Verdünnung war das Wachstum mit 2000 KBE sehr dicht. Dies zeigte, dass die Mikrokoloniebildung nicht nur abhängig war von der Anzahl der Bakterien des einwirkenden Mediums, sondern auch von der Zeitspanne der Inkubation (Tab.5).

Am Ende der Inkubationszeit nach 24h erkannten wir auf den Blutagarplatten jeglicher Verdünnung ein flächendeckendes, rasenartiges Wachstum des EPEC Stammes. Auf den PVC Stücken konnte man nach 24h auch erste kleinere Mikrokolonien beobachten, die allerdings nur aus wenigen Bakterien bestehen. In der 1:1 Verdünnung ließen sich etwa 100 Bakterien pro Gesichtsfeld in mehreren kleinen Mikrokolonien beobachten.

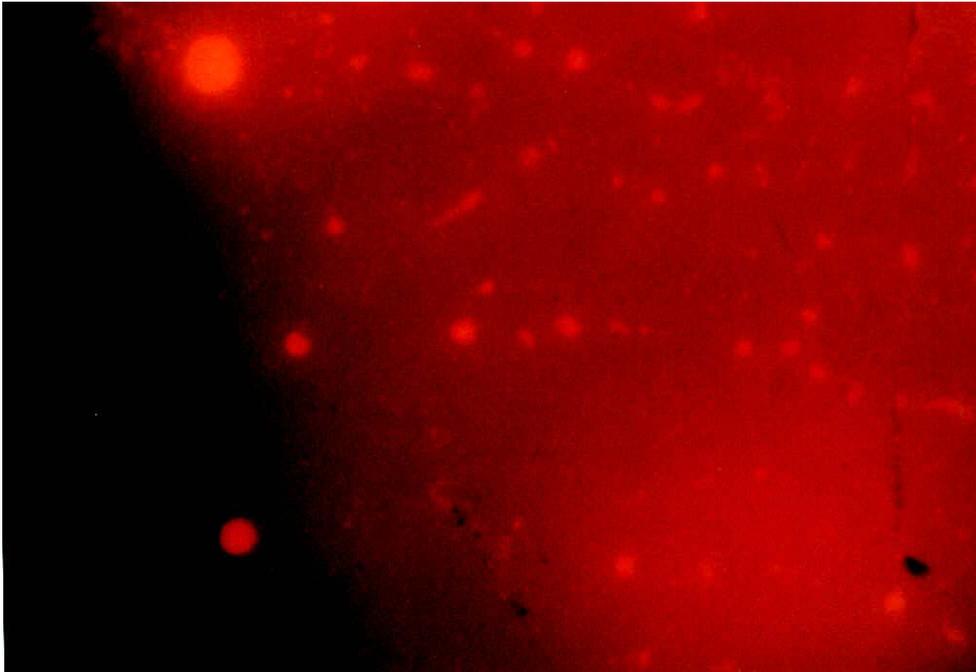


**Abb. 14:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von C600 nach Inkubation über 4h in 1:1 Verdünnung (Ausgangslösung: 1KBE auf 60 ml Nährmedium)



**Abb. 15:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von C600 nach Inkubation über 24h in 1:100 Verdünnung (1KBE auf 60 ml Nährmedium, 1:100 verdünnt)

Auch in der 1: 100 Verdünnung ließen sich noch etwa 50 Bakterien in Mikrokolonien nachweisen. In den höheren Verdünnungen sah man nur noch vereinzelt einzeln vorliegende Bakterien. In der  $1:10^8$  Verdünnung wurde während des ganzen Versuches keine Adhärenz auf PVC nachgewiesen (Tab. 11 / 12).



**Abb. 16:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von EPEC 2348/69 nach Inkubation über 24h in 1:1 Verdünnung (1KBE auf 60 ml Nährmedium)

In einem weiteren Versuch wurde die Biofilmbildung von EAEC auf PVC mit dem selbem Versuchsaufbau untersucht. Die ausgestrichenen Blutagarplatten zeigten ein ähnliches Bild wie schon bei der Untersuchung mit Glas.

Bei Auswertung der Ausstrich-Platten konnten wir in den ersten drei Verdünnungsstufen (1:1, 1:100,  $1:10^4$ ) keine einzelnen KBE differenzieren, da das Bakterienwachstum als flächendeckend angesehen werden konnte. Auch in der  $10^6$  Verdünnung konnten etwa 400 KBE ausgezählt werden. Entgegen allen Erwartungen konnten auch auf der Platte aus der  $10^8$  Verdünnung in einer der drei Versuchsanordnungen 11 KBE ausgezählt werden (Tab.8). Dies konnte aber dadurch bedingt sein, dadurch dass die zuerst überimpfte Ausgangskolonie sehr groß war, und somit Bakterien bis in die letzte Verdünnungsstufe überimpft wurden. Entgegen der Tendenz auf den Blutagarplatten konnte man nach 4h kaum Adhärenzen von EAEC auf

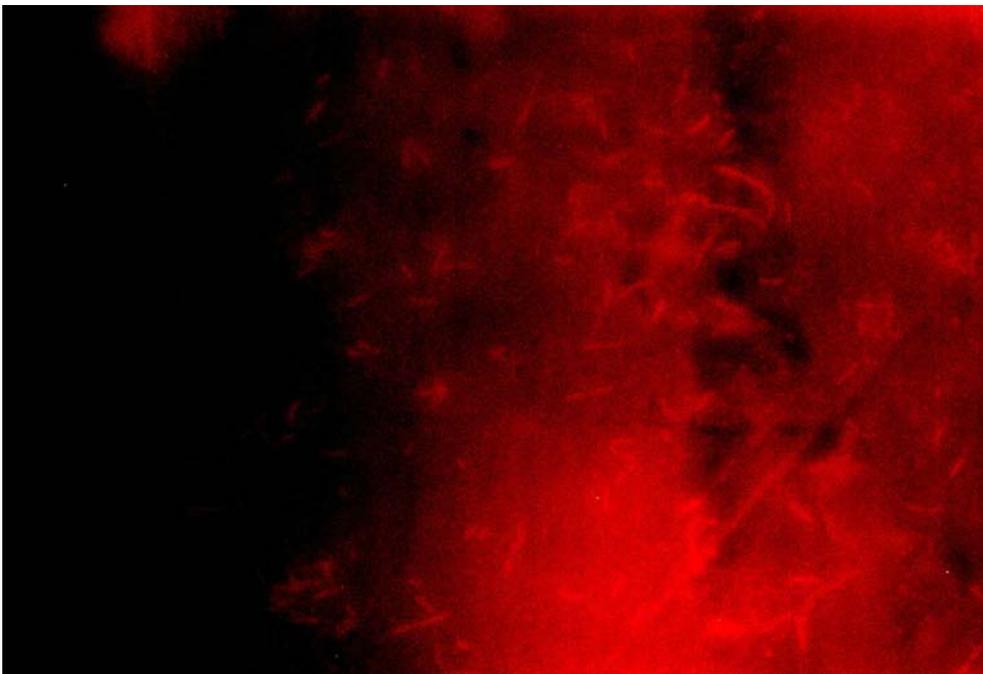
dem PVC nachweisen (Tab. 4). Ursächlich konnte hier die zu kurze Inkubationszeit im Verhältnis zur Bakterienzahl sein, so dass der weitere Verlauf des Versuches entscheidet war. Nur auf der PVC-Platte aus der Ausgangslösung konnten etwa 10 – 20 adhärierende Bakterien pro Gesichtsfeld gezählt werden.

Nach 8h Inkubation entwickelten sich aus der Ausgangslösung die ersten mittelgroßen Mikrokolonien von etwa 40 Bakterien pro Kolonie auf der PVC – Platte. Pro Gesichtsfeld erkannte man etwa 3-4 solcher Mikrokolonien und auch einige einzel adhärente Bakterien, so dass insgesamt etwa 200 Bakterien pro Gesichtsfeld (Abb. 17) adhärten. In der 1:100 Verdünnung zählten wir ca. 30 – 40 Bakterien in kleineren Mikrokolonien pro Gesichtsfeld. Noch in der  $10^4$  verdünnten Suspension konnten 8 – 10 EAEC pro Gesichtsfeld auf der PVC-Platte nachgewiesen werden (Tab. 9). Dieses Ergebnis zeigte, dass etwa 8h nötig sind um erste reelle Mikrokoloniebildung auf PVC nachweisen zu können, während die Anzahl der Bakterien in Suspension schon sehr viel früher deutlich höher war. Denn auch nach 8h war das Bakterienwachstum auf den Ausstrich-Platten ähnlich hoch, wie schon nach 4h. Nur in den  $10^6$  und  $10^8$  Verdünnungen hat noch eine merkliche Zunahme der Bakterienanzahl auf 1000 bzw. 100 KBE stattgefunden.

Nach 24h war das Wachstum auf den Ausstrich-Platten aller Verdünnungsstufen als rasenartig zu bezeichnen, so dass keinerlei KBE mehr differenziert werden konnte (Tab.6). Auch auf den mikroskopisch untersuchten PVC-Platten war nach 24h noch einmal eine Zunahme der Mikrokoloniegröße zu verzeichnen. Man fand pro Gesichtsfeld auf der Platte aus der Ausgangssuspension 5-6 größere Mikrokolonien mit bis zu 300 Bakterien pro Kolonie (Abb. 18). In der  $10^4$  Verdünnung ließen sich noch etwa 10 Bakterien pro Gesichtsfeld auszählen.



**Abb. 17:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von EAEC nach Inkubation über 8h in 1:1 Verdünnung (1KBE auf 60 ml Nährmedium)



**Abb. 18:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Mikrokoloniebildung von EAEC nach Inkubation über 24h in 1:1 Verdünnung (1KBE auf 60 ml Nährmedium)

### **3.2.3 Vergleichende Zusammenfassung der Wachstumskinetik von *E. coli* Stämmen auf PVC**

Die Auswertung der Kinetik auf PVC zeigte insgesamt eine geringere Adhärenz der untersuchten Stämme auf PVC. In der Ausgangsverdünnung war die Adhärenz von EAEC 17-2 im Vergleich zu den anderen Bakterienstämmen am stärksten ausgeprägt. Nach 24h adhärten durchschnittlich 250 Bakterien. Nach 8h waren es allerdings schon 175 Bakterien pro Gesichtsfeld, so dass hier ein sehr geringer Zuwachs innerhalb von 16h zu verzeichnen ist. Bei C600 und EPEC 2348/69 konnte man nach zögerlichem Beginn der Adhärenz nach 4h, im Zeitraum von 8h bis 24h Inkubation jeweils eine Verdreifachung der Adhärenzzahlen beobachten. Insgesamt war die Anhaftung bei C600 mit ca. 200 Bakterien pro Gesichtsfeld ausgeprägter als bei EPEC 2348/69 mit nur 100 anhaftenden Bakterien (Abb. 19). In der 1:100 Verdünnung zeigte C 600 die besten Adhärenzeigenschaften der drei Stämme. EPEC 2348/69 und EAEC17-2 zeigten mit durchschnittlich 50 adhärierenden Bakterien pro Gesichtsfeld nach 24h ein etwa identisches Wachstum. Dieses erfolgte bei EAEC 17-2 eher stetig mit einer Verdoppelung der Zahlen zwischen 8h und 24h Inkubation. Die Adhärenz von EPEC 2348/69 erfolgte eher explosionsartig, da nach 4h nur vereinzelte Bakterien nachgewiesen wurden, nach 24h Inkubation aber eine Verfünffachung des 8h-Wertes auf 50 Bakterien pro Gesichtsfeld stattgefunden hatte (Abb. 20). Ein sehr ähnliches Bild konnte man auch in der  $1:10^4$  Verdünnung beobachten, obwohl das Wachstum insgesamt deutlich schwächer ausgeprägt war. Bei C600 ließ sich eine sprunghafte Entwicklung der Adhärenz auf PVC beobachten, da bis 8h nach Versuchsbeginn kaum Adhärenz nachgewiesen werden konnte, nach 24h allerdings das Wachstum auf PVC mit 20 Bakterien pro Gesichtsfeld am stärksten ausgeprägt war. Bei EAEC 17-2 und EPEC 2348/69 zeigte sich wieder ein ähnliches Wachstumsverhalten mit durchschnittlich 8 adhärierenden Bakterien pro Gesichtsfeld. In beiden Fällen findet der Hauptanteil der Adhärenz ab der 8. Stunde der Inkubation statt. Bei EAEC 17-2 ließen sich nach 8h Inkubation bereits 6 Bakterien pro Gesichtsfeld nachweisen. Hingegen fand man bei EPEC 2348/69 eher gelegentlich adhärierende Bakterien auf PVC nach 8h, so dass hier ein deutlich größerer Zuwachs stattfand (Abb. 21).

Im direkten Vergleich von C600 zu EAEC ergab sich nur in der 1:1 Verdünnung bei Wachstumsvergleich nach 4h zu 24h statistisch signifikant ein höheres Wachstum von

EAEC. ( $\chi^2 = 4,11$ ;  $CI_{95}[1,05;168,94]$ ;  $p < 0,016$ . Die 1:100 Verdünnung:  $\chi^2 = 1,65$ ;  $CI_{95}[0,77; 2,9]$ ;  $p < 0,199$  und die 1:10<sup>4</sup> Verdünnung wiesen keine Signifikanz auf.

Der direkte Vergleich von C600 zu EPEC ergab ebenfalls nur in der ersten Verdünnungsstufe ein signifikant höheres Wachstum von C600. 1:1 Verdünnung:  $\chi^2 = 3,14$ ;  $CI_{95}[0,3;0,95]$ ;  $p = 0,02$ . Bei der 1:100 Verdünnung:  $\chi^2 = 2,95$ ;  $CI_{95}[0,21; 1,18]$ ;  $p < 0,086$  und bei der 1:10<sup>4</sup> Verdünnung konnte auf Grund von zu geringem Wachstum ebenfalls keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. ( $\chi^2 = 0,28$ ;  $CI_{95}[0,01;20,82]$ ;  $p = 0,577$ )

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	10	5	0 - 1	k.W.	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	10 - 20	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<b>C 600</b>	0-2	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.

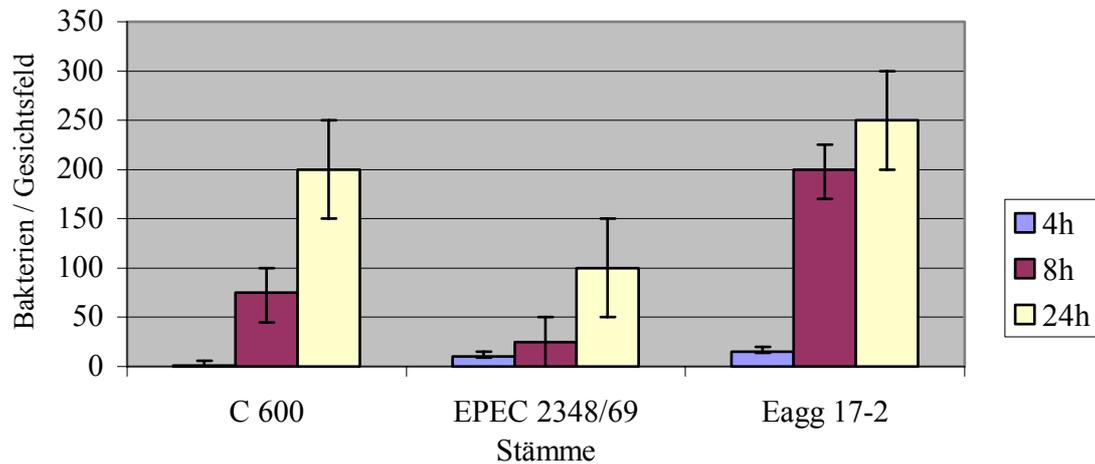
**Tab 4:** Nach 4h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem PVC Objektträger. k.W. = kein Wachstum

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	25	10	2 - 3	k.W.	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	200	20 - 40	5 - 10	k.W.	k.W.
<b>C 600</b>	50 - 100	20 - 40	k.W.	k.W.	k.W.

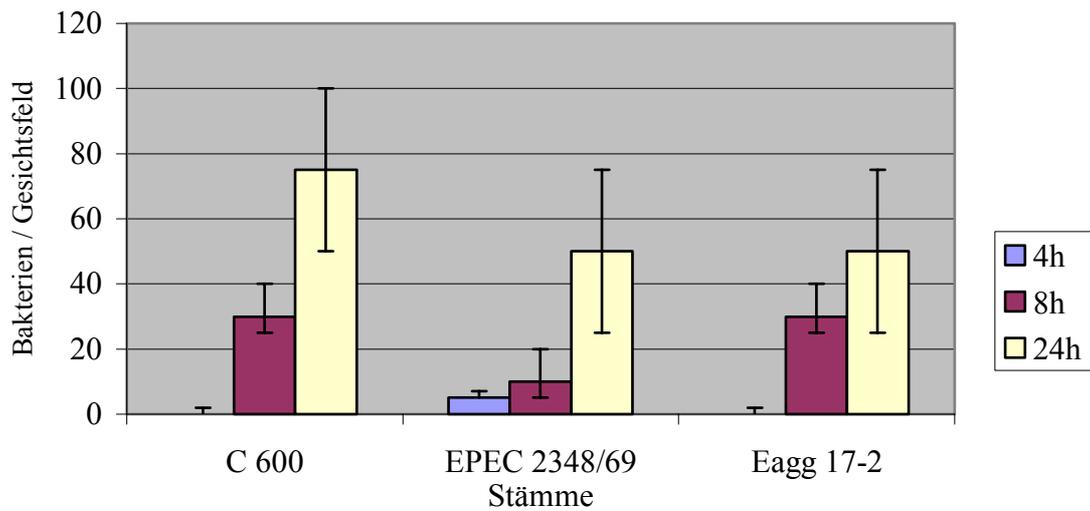
**Tab 5:** Nach 8h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem PVC Objektträger k.W. = kein Wachstum

Verdünnungen	1:1	1:100	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>8</sup>
<b>Stamm</b>					
<b>EPEC 2348/69</b>	100	50	10	2 - 3	k.W.
<b>EAEC 17-2</b>	200 - 300	50	10	k.W.	k.W.
<b>C 600</b>	200	50 - 100	20	0 - 5	k.W.

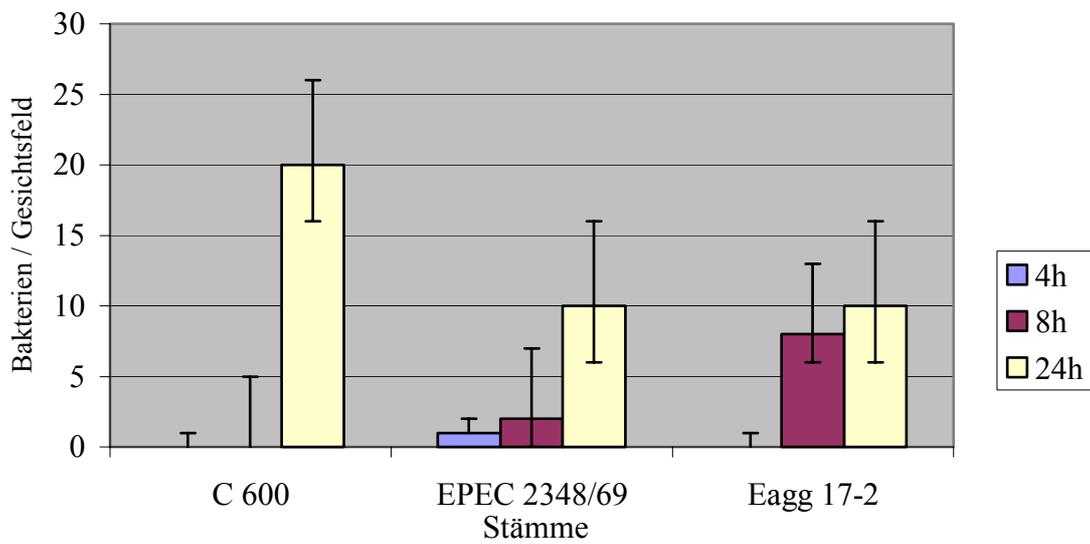
**Tab 6:** Nach 24h Inkubation in unterschiedlich verdünnten KBE / Nährmediumsverhältnis Auszählung der Bakterien / Gesichtsfeld auf einem PVC-Objekträger. k.W. = kein Wachstum



**Abb. 19:** Durchschnittliche Adhärenz auf PVC der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier 1:1 Verdünnung ( 1 KBE pro 60ml Nährmedium)



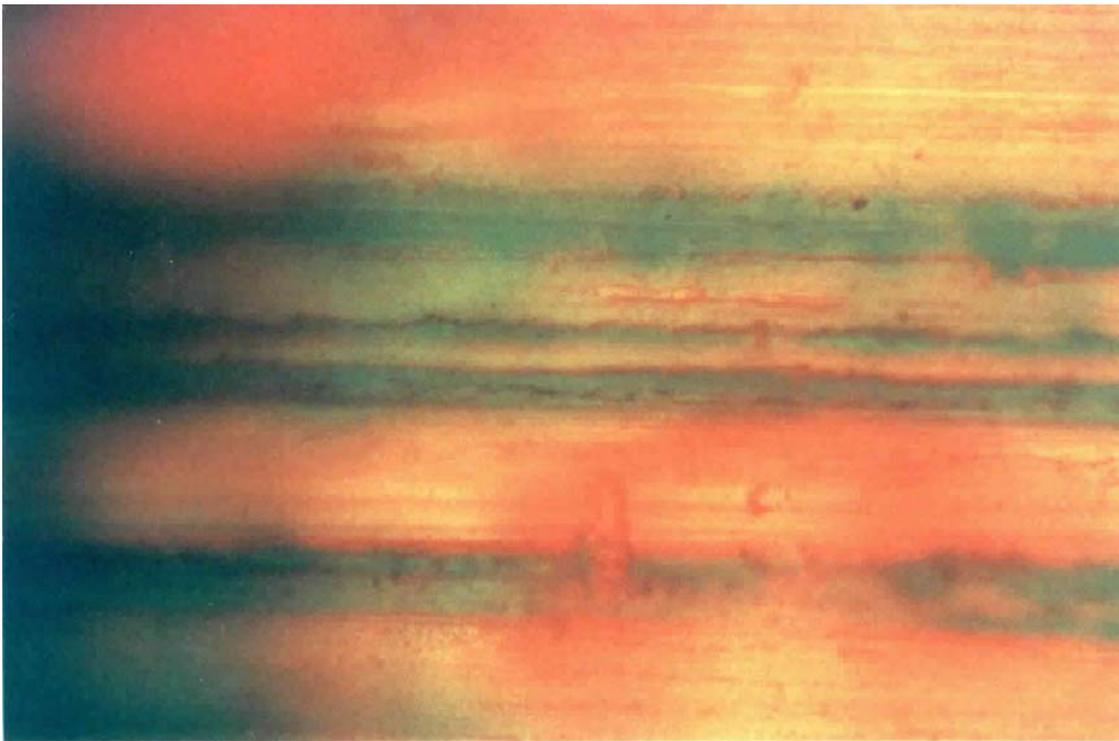
**Abb. 20:** Durchschnittliche Adhärenz auf PVC der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier 1:100 Verdünnung (1 KBE pro 60 ml Nährmedium auf 1:100 verdünnt)



**Abb. 21:** Durchschnittliche Adhärenz auf PVC der drei untersuchten Stämme C600, EPEC, Eagg pro Gesichtsfeld des Mikroskop nach 4h, 8h, 24h. Hier 1:10<sup>4</sup> Verdünnung (1 KBE pro 60ml Nährmedium auf 1:10<sup>4</sup> verdünnt)

### 3.3 Untersuchung der Mikrokoloniebildung auf Kupfer

In einer dritten Versuchsreihe wurde das Adhärenzverhalten der drei untersuchten Bakterienstämme auf Kupfer untersucht. Auf keiner der untersuchten Kupfer-Platten bei keinem der drei Bakterienstämme konnte eine Adhärenz zu diesem Material festgestellt werden. Um Fehlerquellen auszuschließen wurden auch hier wieder Ausstrich-Platten der verdünnten Suspensionen angelegt, um zu beweisen, dass sich in den Medien überhaupt Bakterien befinden. Wie erwartet, war das Wachstum auf dem Blutagarplatten nach 24h bei allen Bakterien in allen Verdünnungsstufen rasenartig und im Aussehen der Platten mit den vorhergehenden Versuchen vergleichbar. Trotz mehrmaliger Wiederholung der Versuchsreihen mit Kupfer konnte nach 24h keinerlei Mikrokoloniebildung oder auch nur Einzeladhärenz zu Kupfer dieser getesteten Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 22).



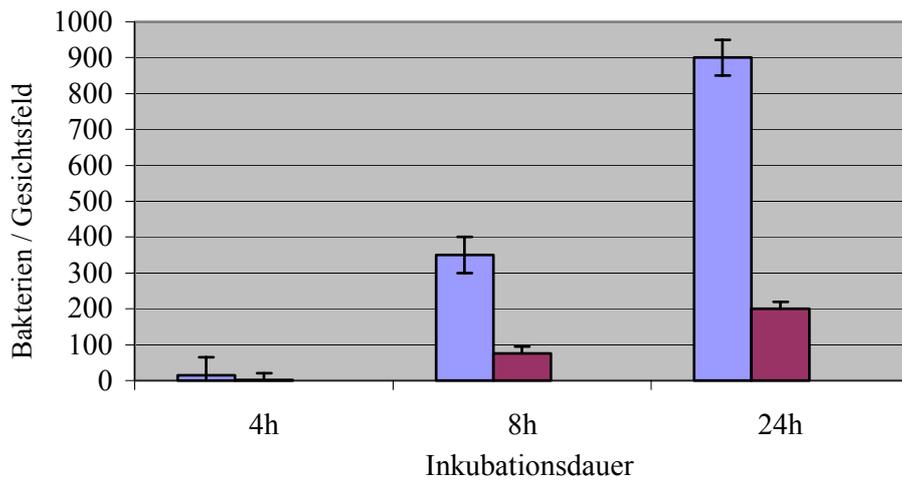
**Abb. 22:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Kupfer-Platte nach 24 h Inkubation in EAEC 17-2 beimpfter Suspension

### **3.4 Wachstumsverhalten der *E. coli* Spezies auf verschiedenen Materialien**

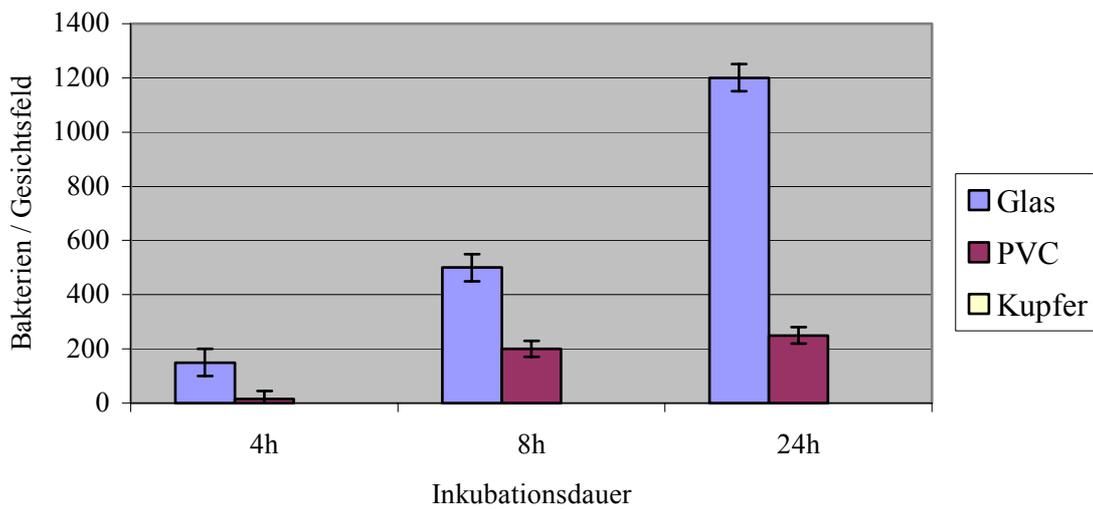
Bei der untersuchten C600 Spezies ließ sich eine deutliche Präferenz für die Mikrokoloniebildung auf Glas erkennen. Hier war das Wachstum schon nach 8h erheblich stärker als das Wachstum auf PVC nach 24h ist. Des Weiteren konnte man beobachten, dass der Zeitpunkt der ersten Adhärenz auf Glas bei 4h lag, auf PVC konnten die ersten Adhärenzen erst nach 8h erkannt werden. C 600 schien aber nicht befähigt zu sein auf Kupfer zu adhären, da hier auch nach 24h keinerlei Adhärenzen sichtbar waren (Abb.23).

Der enteroaggregative *E. coli* zeigte ein sehr ausgeprägtes Wachstum auf Glas, das auch schon nach 4h deutlich zu sehen war. Die Adhärenzen auf Glas waren schon nach 8h etwa doppelt so stark wie bei der Untersuchung auf PVC, nach 24h war die Mikrokoloniebildung sogar sechs mal stärker, da die Adhärenz auf Glas zwischen der achten Stunde und der 24. Stunde weiter fortschritt, auf PVC allerdings in diesem Zeitraum die Anzahl der Bakterien pro ausgezähltem Gesichtsfeld nahezu konstant blieb. Auch der EAEC 17-2 bildete keine Adhärenzen auf Kupfer (Abb.24).

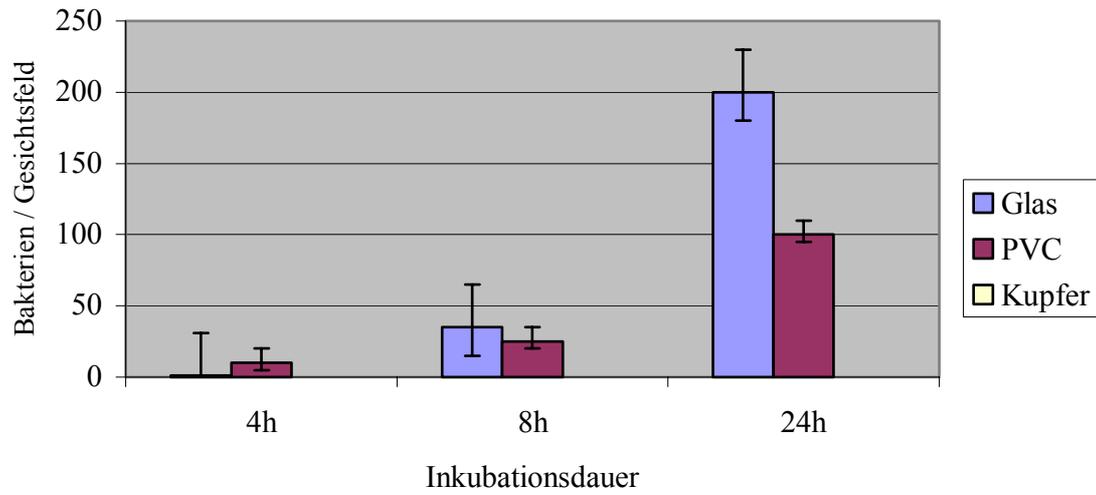
Der EPEC 2348/69 zeigte die deutlichste der erkennbaren Adhärenzen auf Glas, allerdings ist diese Anhaftung mit bis zu 200 Bakterien pro Gesichtsfeld eher gering ausgeprägt. Auf PVC ließen sich ebenfalls nach 4h erste Anhaftungen erkennen, im Verlauf dieses Versuches war die Adhärenz auf PVC mit 100 Bakterien pro Gesichtsfeld nach 24h deutlich gering ausgeprägt. Der Versuch mit Kupfer-Platten zeigte bei EPEC 2348/69 wiederum keine erkennbaren Bakterienadhärenzen.



**Abb. 23:** Wachstumsverhalten von C600 auf Glas, PVC und Kupfer pro Gesichtsfeld des Mikroskops nach 4h, 8h, 24h.



**Abb. 24:** Wachstumsverhalten von Eagg 17-2 auf Glas, PVC und Kupfer pro Gesichtsfeld des Mikroskops nach 4h, 8h, 24h.



**Abb. 26:** Wachstumsverhalten von EPEC 2348/69 auf Glas, PVC und Kupfer pro Gesichtsfeld des Mikroskops nach 4h, 8h, 24h Inkubation.

#### 4. Diskussion

Die Bedeutung der Fähigkeit zur Mikrokoloniebildung von darmpathogenen *Escherichia coli* ist ein bisher wenig untersuchtes Phänomen, während es schon ausführliche Untersuchungen zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* gibt. So spielt sowohl die Adhärenz an intestinale Zellen als auch an abiotischen Materialien, wie ZVK und Katheter, eine bedeutende Rolle bei der Pathogenität der Bakterien. Unsere quantitativen Versuche zur Mikrokoloniebildung zeigten, dass alle von uns getesteten Bakterienstämme (C600, EAEC 17-2, EPEC 2348/69) an Glas und PVC adhären können. Es zeigte sich, dass EAEC 17-2 eine deutlich ausgeprägtere Fähigkeit zur Mikrokoloniebildung besitzt als andere hier getestete Stämme (C600 und EPEC 2348/69). Während der 24-stündigen Inkubation entwickelte sich eine nach wenigen Stunden nach zuweisenden difusen Adhärenz bis hin zu dem so genannten „Honigwaben-Muster“, das die ganze Fläche überdeckte. Dieses Phänomen des „Honigwaben-Musters“ wurde auch schon in früheren Untersuchungen als typisches Wachstumsverhalten für enteroaggregative *E.coli* beschrieben (14). Für diese Art der Mikrokoloniebildung gibt es besonders im Bezug auf die Adhärenz an intestinale Mucosazellen der Bakterien verschiedene Erklärungsansätze. Eine Kontrollfunktion wird hier dem Genlocus *aggR* zugeschrieben (15). Dieser Genlocus ist unter anderem verantwortlich für die Expression von zwei Fimbrientypen AAF/I und AAF/II (16). Diese Fimbrien sind neben einer Vielzahl von Genen wie *Fis* und *Yafk* (14), die ebenfalls verbunden sind mit der Aktivität des *aggR* Gens, notwendig für die Adhärenz von EAEC an die Mucosazellen des Darms. (17) Bei EAEC 17-2 konnten diese Gene nicht festgestellt werden, obwohl dieser Stamm zur Biofilmbildung in der Lage ist. Es konnte gezeigt werden, dass Typ I Pili mit einer FimH Mutation eine entscheidende Rolle bei der initialen Adhärenz sowohl auf biotischen als auch besonders auf abiotischen Oberflächen spielt (18). So konnte in einem Versuch mit abiotischen Substanzen, beobachtet werden, dass nur *E. coli* an der Oberfläche adhärten, die eine FimH Mutation enthielten. Ohne die Pili konnte keine Adhärenz nachgewiesen werden (18). In weiteren Schritten der Biofilmbildung erscheint auch die Einwirkung von Flagellen von Bedeutung zu sein. (5) Besonders bei der Adhärenzuntersuchung mit PVC zeigte sich eine sehr gute Adhärenz der *E. coli* Spezies unter Einflussnahme der Flagellen der *E. coli*. Allerdings ist auch hier die Anwesenheit der Typ I Pili, wie auch

der Curli für die erste noch reversible Adhärenz auf abiotischen Oberflächen unabdingbar. Es ist also anzunehmen, dass dieselben hier aufgeführten Faktoren auch für die beobachtete starke Mikrokoloniebildung von enteroaggregativen *E. coli* auf Glas und PVC verantwortlich sind.

Auch bei C600 entwickelte sich innerhalb von 4h eine erkennbare Adhärenz sowohl auf Glas als auch auf PVC. Das Wachstum auf den abiotischen Oberflächen war hier jedoch flächig gleichmäßig verteilt und zeigt nicht das für EAEC klassische „Honigwabemuster“. So zeigten auch schon vorhergehende Versuche mit *E. coli* K-12 die Ausbildung dicker Mikrokolonien nach 24h Inkubation (13), so wie dies auch übereinstimmend in unseren hier vorliegenden Versuchen beobachtet wurde. Bei C 600 wurden, anders als bei den EAEC Spezies, bestimmte Autoaggregationsgene entdeckt, die bei der Biofilmbildung deutlich stärker exprimiert wurden als bei planktonischen Zellen (19). So wurden bei *E. coli* K-12 das z.B. Antigen 43 (Ag43), *FlhDC*, *OmpR* und *RcsCDB* (3, 20) bei der Biofilmbildung als bedeutsam für die initiale Adhäsion und die Kolonisation der abiotischen Oberflächen identifiziert. Das Antigen 43 wurde bei Bakterien, die an der Biofilmbildung beteiligt sind, deutlich stärker exprimiert als bei Zellen, die nicht adhärten, sondern planktonisch im Inkubationsmedium vorhanden sind. Als ein weiteres Gen von Bedeutung wurde der sigma Faktor *RpoS* identifiziert (21), dieser reguliert die zelluläre Antwort auf verschiedenste äußere Einflüsse, wie osmotische Dysregulation, Sauerstoffmangel etc. Auch dieser Genlocus wird bedingt durch die veränderten Umgebungsbedingungen in einer Mikrokolonie verstärkt exprimiert (20). Für die Dicke und Ausbreitung der Mikrokolonien und Biofilme scheint das Protein *OmpA* von entscheidender Bedeutung zu sein. Abschließende Untersuchungen stehen hierzu allerdings nach aus. (21) Ebenfalls wurden bei K-12 Stämmen wie auch schon bei den enteroaggregativen *E. coli*, Typ 1 Fimbrien und Flagella für die Adhärenzbildung verantwortlich gemacht. Die Fimbrien sind sowohl wichtig bei der ersten Adhärenz der Bakterien an abiotische Oberflächen wie Glas oder PVC, als auch für die dreidimensionale Gestaltung der Mikrokolonien. Neben den schon in ihrer Bedeutung bewiesenen Genloci geht man davon aus, dass *E. coli* noch weitere Mechanismen besitzt, um besonders auf abiotischen Materialien zu adhärten, die durch physikalisch und chemische Faktoren beeinflusst werden (22, 20). Dewanti stellte in verschiedenen Versuchen zur Biofilmbildung von *E. coli* fest, dass bei Inkubation in

Miminal Salt Medium die adhärierenden Zellen kleiner sind und die Masse an Polysaccharidmatrix größer ist. Dieses konnte auch in unserer Versuchsreihe reproduziert werden. Hier zeigte sich auch, dass die Fähigkeit zur Mikrokoloniebildung deutlich abgeschwächt ist bei niedrigen Temperaturen oder unter anaeroben Konditionen (24).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch bei C600 verschiedene Mechanismen für die Mikrokoloniebildung auf Glas und PVC verantwortlich sind. Schembri macht für die Mikrokoloniebildung auf inerten Materialien zum Beispiel TypI Fimbrien, Pili und Antigen 43 verantwortlich (19). Ebenfalls ist auch die *RpoS* Expression von Bedeutung (21). Viele sind ähnlich der Gene, die bei der Biofilmbildung von EAEC eine Rolle spielen, einige scheinen aber auch C600-typisch zu sein. Zum Beispiel wurden auch bei Adhärenzen von EAEC Fimbrien und Typ I Pili für die Adhärenz verantwortlich gemacht (16), wie auch bei C600 (20). Das *rpoS* –Gen ist allerdings bisher nur im Zusammenhang mit *E. coli* K12 gefunden worden. Dadurch kann möglicherweise auch das andersartige und weniger stark ausgeprägte Wachstum von C 600 gegenüber den enteroaggregativen Stämmen auf Glas und PVC begründet werden. Von allen drei getesteten Stämmen zeigt EPEC 2348/69 die geringste Adhärenz an Glas und PVC. Während der Versuche konnte man zu dem Schluss kommen, dass grundsätzlich mehr planktonische Zellen notwendig sind, um erste Adhärenzen an abiotischen Oberflächen zu ermöglichen, denn bei der Auswertung unserer Daten wurde deutlich, dass EPEC 2348/69 nach Inkubation in den verschiedenen Verdünnungsstufen nur in der Ausgangsverdünnung und in der 1:100 Verdünnung gute Adhärenz zeigte. Des Weiteren scheint bei enteropathogenen *E.coli* eine längere Zeitspanne bis zu ersten reversiblen Anhaftungen nötig zu sein. In der Vergangenheit wurden mehrere Studien darüber angestrengt, welche Faktoren für die Pathogenität der enteropathogenen *E. coli* verantwortlich sind. Eine zentrale Rolle dabei scheinen Pathogenitätsinseln des Genoms zu spielen, hier insbesondere die LEE (25). Auf der LEE sind alle notwendigen Gene lokalisiert, die für eine Adhärenz an intestinalen Zellen benötigt werden. Besonders hervorzuheben ist hier der für das Intimin kodierende *eae*-Genlocus. Verantwortlich für die primäre Adhärenz an biotischen Oberflächen sind vor allem Fimbrien vom Typ IV, die auch als „bundle-forming pili“ (BFP) bekannt sind (25). Die Bedeutung der Adhärenz-Fimbrien für pathogene und enteroaggregative *E.coli* konnte in jüngster Zeit

auch von Reisner et al. nachgewiesen werden (26). Im zweiten Schritt erfolgt die irreversible Adhärenz an die Zellen durch die A/E Läsion, diese bewirkt eine Umstrukturierung des Cytoskeletts der Wirtszelle (27). Dadurch kann das Bakterium eine feste Bindung mit der Wirtszelle eingehen, ohne allerdings in den Intrazellulärraum vorzudringen. Man geht davon aus, dass in diesem Zusammenhang auch das Typ III Sekretionssystem eine Rolle spielt, dieses verändert durch unterschiedliche Gene (*espA*, *espB*, *espD*) ebenfalls den Aufbau der äußeren Zellhülle (27). Erst vor kurzem wurden auch bei EPEC die Flagellen als weiter wichtiger Baustein der Mikrokoloniebildung sowohl auf biotischen als auch möglicherweise auf abiotischen Oberflächen, erkannt (28). Es konnte gezeigt werden, dass die Flagella von Typ III direkt beteiligt sind an der Adhärenzbildung, dabei aber auch das Typ III Sekretionssystem sowie die LEE unterstützen. Der in diesem Versuch ebenfalls getestete EPEC 2348/69 adhärte unter Vorhandensein der Flagella in kleinen Mikrokolonien an Gewebezellen. Fraglich bleibt allerdings weiterhin, ob für die Adhärenz von EPEC 2348/69 an abiotischen Oberflächen dieselben Faktoren verantwortlich sind. Die in unseren Versuchen vorgefundenen Mikrokolonien zeigen deutlich und reproduzierbar einen ähnlichen Aufbau bei Anzucht auf Glas und PVC.

Bei Shiga Toxin produzierenden EHEC allerdings konnten auch, wie schon bei enteroaggregativen *E. coli*, Typ I Pili und Fimbrien als wichtige Faktoren für die Mikrokoloniebildung identifiziert werden (29). So konnte festgestellt werden, dass auch bei EHEC die Fimbrien zur Adhäsion an abiotische Oberflächen wie Glas oder PVC notwendig sind. Daraus ließe sich die Schlussfolgerung ziehen, dass EPEC möglicherweise noch einen ähnlichen Mechanismus zur Mikrokoloniebildung besitzen, wie EHEC, da diese beiden *E. coli*-Spezies sich grundsätzlich nur durch die fehlende Shiga Toxin Bildung unterscheiden.

Neben Glas und PVC wurden in den hier vorliegenden Versuchen auch Untersuchungen mit Kupferplatten gemacht. Allerdings zeigte sich auf keiner Kupferplatte ein Anzeichen für die Möglichkeit der Biofilmentstehung, während die Adhärenz auf Glas und PVC in etwa gleich stark ausgeprägt war, obwohl die Studie von Qureshi et al. (30) zeigt, dass die Adhärenz zu PVC besser ist. Dies soll dadurch bedingt sein, dass Glas in der Regel eine zu glatte Oberfläche für die Anhaftung von Bakterien besitzt, während PVC eine gröbere Oberfläche hat. Dieses kann aber anhand unserer Ergebnisse und

auch anhand anderer Studien, die eine gute Biofilmbildung auf Glas nachweisen konnten (7, 14, 31), nicht bestätigt werden. Kupfer scheint durch eine bakterizide Wirkung auf die getesteten *E. coli* Stämme keine Mikrokoloniebildung zu ermöglichen. Diese Eigenschaft wurde schon früher genutzt, indem man Wasser bevorzugt in Kupfer oder Silberkesseln aufbewahrt. Wichtig für die bakterizide Wirkung des Kupfers ist unter anderem der Kupferionengehalt in der Lösung (32). So kann eine Kupferkonzentration von 10 – 100 µg / l mikrobiologische Metabolismen verhindern. Liegen die Bakterien jedoch schon als Biofilme vor, so zeigen sie eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Kupfer als planktonische Zellen. Die Biofilme sind dabei zwar von einer Schicht toter Bakterien überzogen, das Innere der Kolonien wird dadurch aber am Leben erhalten (33). In unseren Versuchen werden die *E. coli* Spezies dem Kupfer von Beginn der Inkubation an ausgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt sind alle Bakterien noch in der planktonischen Phase und sind somit dem Kupfer ohne den Schutzmantel der Polysaccharidmatrix ausgesetzt. Andererseits findet man aber auch Untersuchungen, die Biofilme trotz Vorhandensein von Kupfer, nachgewiesen haben (34). Beispielsweise hat man Mikrokoloniewachstum schon immer in Kupferleitungen feststellen können. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Bakterien hier über einen langen Zeitraum dem Medium Kupfer ausgesetzt sind und eine Nische entwickelt haben. Während einer Inkubationszeit von 120h konnte eine Verringerung der Bakterienanzahl durch Vorhandensein von Kupfer erzielt werden. Bei längerer Inkubationszeit kehrte sich dieser Reduktionsprozess allerdings um, und auch hier wurden steigende Bakterienzahlen nachgewiesen (32). Bei einer Kontaktzeit von 24h konnte eine minimale mikrobizide Konzentration von 3µg / ml Kupfersulfat festgestellt werden. In dieser Konzentration wurde Kupfersulfat lange als Konservierungsmittel (Anstrichkonservierung) verwendet. Es lässt sich also letztendlich nicht eindeutig klären, warum alle getesteten *E. coli* Stämme keinerlei Adhärenz auf Kupfer zeigten. Weitere Studien müssen die Bedeutung verschiedener Gene bei der Mikrokolonie- und Biofilmbildung auf abiotischem Material, sowie das fehlende Wachstum auf Kupfer klären. Des Weiteren müssen Untersuchungen folgen, die das genaue Verhalten von *E. coli* an ZVK und Kathetern in entsprechenden Nährlösungen wie z.B. Soja untersuchen, da hierin der direkte Nutzen für die Patientenversorgung zu sehen ist, um eventuelle Infektions- und Sepsisquellen auszuschließen.

## 5. Literaturverzeichnis

- (1) **Dunne W M J** (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155-66
- (2) **Donlan R M, Costerton J W** (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15 : 167-93
- (3) **Stewart P S, Costerton J W** (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358 (9276): 135-8
- (4) **Costerton J W** (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11 (3-4): 217-21; discussion 237-9
- (5) **Prüss B C** (2006) A Complex Transcription Network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 6: 3731 – 3739
- (6) **Stoodley P, Sauer K, Davies D G, Costerton J W** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209
- (7) **Tremoulet F, Duche O, Namane A, Martinie B, Labadie J** (2002) A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol Lett* 215 (1): 7-14
- (8) **Kuchma S L, O'Toole G A** (2000) Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 11 (5): 429-33
- (9) **Karch H, Friedrich A, Kuzius T, Bielaszewska M** (2002) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: current status and future directions for control of human infections. *Biotest Bulletin* 6: 253 – 263
- (10) **Karch H, Bockenmühl J, Huppertz HI** (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*. *Deutsches Ärzteblatt* 97 (36): 2314 – 2318
- (11) **Allerberger F, Soler B, Caprioli A, Karch H** (1997) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and hemolytic-uremic syndrome. *Wien Klin Wochenschr* 109 (17): 669-77
- (12) **Corrigan J J J, Boineau F G** (2001) Hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Rev* 22 (11): 365-9
- (13) **Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P** (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* 180 (9): 2442-9

- (14) **Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, Phillips A D, Nataro J P** (2001) Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41 (5): 983-97
- (15) **Czczulin J R, Whittam T S, Henderson I R, Navarro-Garcia F, Nataro J P** (1999) Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67 (6): 2692-9
- (16) **Nataro J P, Deng Y, Maneval D R, German A L, Martin W C, Levine M M** (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60 (6): 2297-304
- (17) **Czczulin J R, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary M H, Navarro-Garcia F, Nataro J P** (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 65 (10): 4135-45
- (18) **Pratt L A, Kolter R** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30 (2): 285-93
- (19) **Schembri M A, Hjerrild L, Gjermansen M, Klemm P** (2003) Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* 185 (7): 2236-42
- (20) **Schembri M A, Kjaergaard K, Klemm P** (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48 (1): 253-67
- (21) **Adams J L, McLean R J** (1999) Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 65 (9): 4285-7
- (22) **Reisner A, Haagensen J A J, Schembri M A, Zechner E L, Molin S** (2003) Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* 48 (4): 933-46
- (23) **Orme R** (2006) Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpY. *Proteomics* 6: 4269 – 4277
- (24) **Dewanti R, Wong A C** (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 26 (2): 147-64
- (25) **Donnenberg M S, Kaper J B, Finlay B B** (1997) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 5 (3): 109-14

- (26) **Reinsver A** (2006) In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology* 5: 3572 - 3581
- (27) **Celli J, Deng W, Finlay B B** (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* 2 (1): 1-9
- (28) **Giron J A, Torres A G, Freer E, Kaper J B** (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 44 (2): 361-79
- (29) **Cookson A L, Cooley W A, Woodward M J** (2002) The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* 292 (3-4): 195-205
- (30) **Qureshi F M, Badar U, Ahmed N** (2001) Biosorption of copper by a bacterial biofilm on a flexible polyvinyl chloride conduit. *Appl Environ Microbiol* 67 (9): 4349-52
- (31) **Banning N, Toze S, Mee B J** (2003) Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology* 149 (Pt 1): 47-55
- (32) **Kielemoes J, Verstraete W** (2001) Influence of copper-alloying of austenitic stainless steel on multi-species biofilm development. *Lett Appl Microbiol* 33 (2): 148-52
- (33) **Teitzel G M, Parsek M R** (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69 (4): 2313-20
- (34) **Critchley M M, Cromar N J, McClure N, Fallowfield H J** (2001) Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems. *J Appl Microbiol* 91 (4): 646-51

## **Danksagungen**

Zunächst möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Hygiene , Westfälische Wilhelms-Universität Münster für die freundliche Aufnahme und vielfältige Unterstützung bedanken.

Meinen Dank auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Karch (Direktor des Instituts für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster), der das Thema der Arbeit anregte.

Für eine sehr gute Betreuung und Begleitung während der gesamten Zeit, sowie die Übernahme der Dissertation, möchte ich mich besonders bei PD Dr. med. A. Friedrich (Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität) bedanken.

Schließlich danke ich Herrn Grischa Jünger, der mir in der letzten Zeit bis zur Vollendung dieser Dissertation unterstützend zur Seite stand, sowie Herrn Roland Siegers, der mir bei der äußeren Gestaltung der Arbeit sehr behilflich war.

## Curriculum Vitae

27.01.1979	Sandra Jünger, geb. Budke, geboren in Ibbenbüren als zweites Kind von Reinhold und Karin Budke, geb. Heinemann
1985 – 89	Besuch der Friedrich – Adolf – Krummacher – Grundschule in Tecklenburg
1989 – 98	Besuch des Graf – Adolf – Gymnasium in Tecklenburg
1996	6 Monate Schüleraustausch an der Dungog High School, NSW, Australien
25.05.1998	Abitur
06.-10.1998	Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der DRK Rettungsschule Münster
1998 – 2005	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen – Wilhelms - Universität Münster
30.03.2001	Ärztliche Vorprüfung (Physikum) am
11.04.2002	Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
16.04.2004	Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
03.05.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen) nach dem Praktischen Jahr am Klinikum Osnabrück.
07.06.2005	Approbation als Ärztin.
01.07.- 31.12.2005	Assistenzärztin im Grafschafter Klinikum Nordhorn in der Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Seit 01.01.2006	Assistenzärztin am Mathias Spital in Rheine in der Abteilung Anästhesiologie und Intensivmedizin