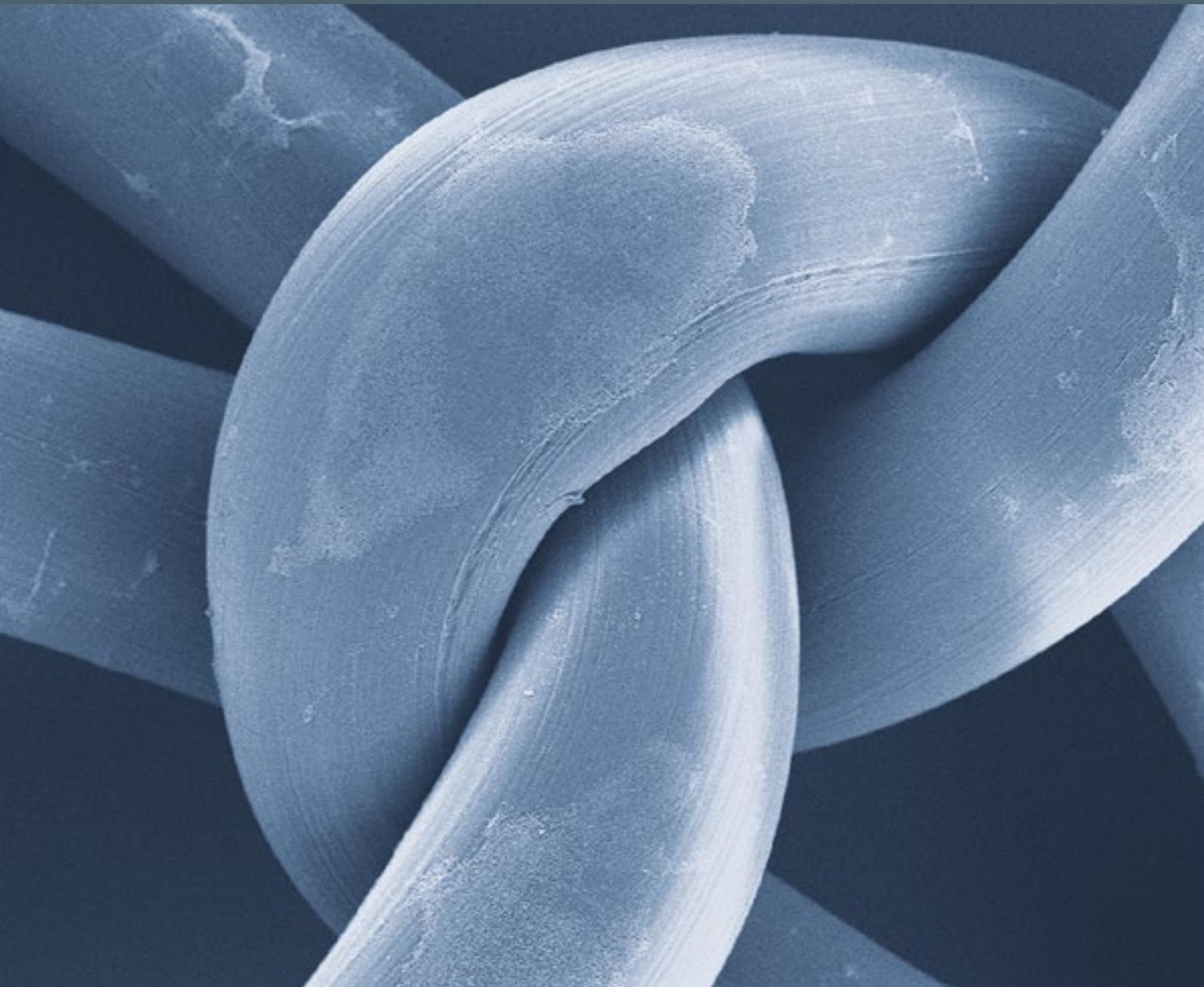
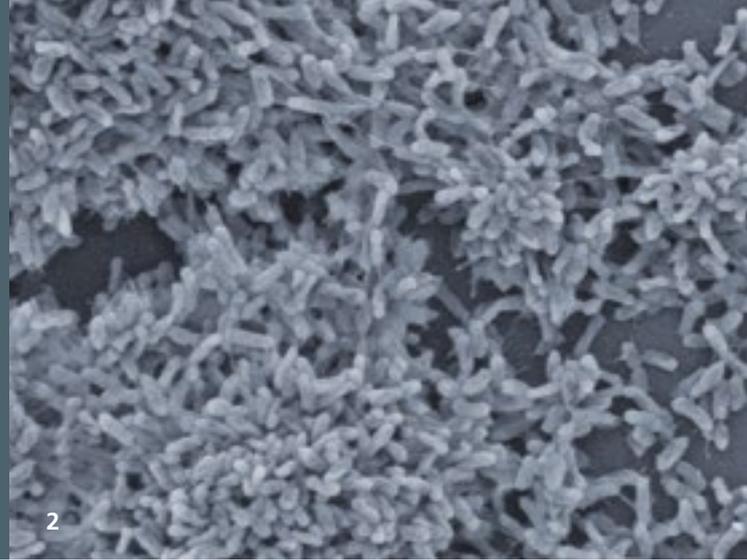


**MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
ANTIMIKROBIELLER UND PHOTOKATALYTISCH
AKTIVER OBERFLÄCHEN**





MIKROORGANISMEN AN OBERFLÄCHEN

Mikroorganismen an Oberflächen sind in der Natur weit verbreitet. Bakterien, Pilze und Algen haben sich an ein Wachstum an verschiedenen Oberflächen angepasst und profitieren in erheblichem Maß von dieser an den jeweiligen Standort adaptierten Lebensweise, beispielsweise auf Steinen in einem Bach, aber auch in Rohrleitungen. Sichtbar wird ihr Wachstum für das menschliche Auge dann, wenn Biofilme sich in exorbitantem Ausmaß entwickeln. Häufig bewirkt das mikrobielle Wachstum eine Schädigung des Materials oder eine Funktionsminderung technischer Einrichtungen. Treten Biofilme in der Klinik, beispielsweise auf Implantaten, auf, können sie gesundheitliche Probleme beim Menschen verursachen. Die Entwicklung von Biofilmen beginnt zunächst völlig harmlos: Einzelne Zellen von Mikroorganismen heften sich an Oberflächen an und vermehren sich im feuchten Milieu. Viele Bakterienarten sind in der Lage, eine Schleimschicht aufzubauen, die ihnen einerseits als Schutz vor Umwelteinflüssen dient. Andererseits versetzt sie die Organismen in die Lage, Nährstoffe selbst aus einer sehr nährstoffarmen Umgebung anzureichern.

Definition und Charakterisierung von Biofilmen

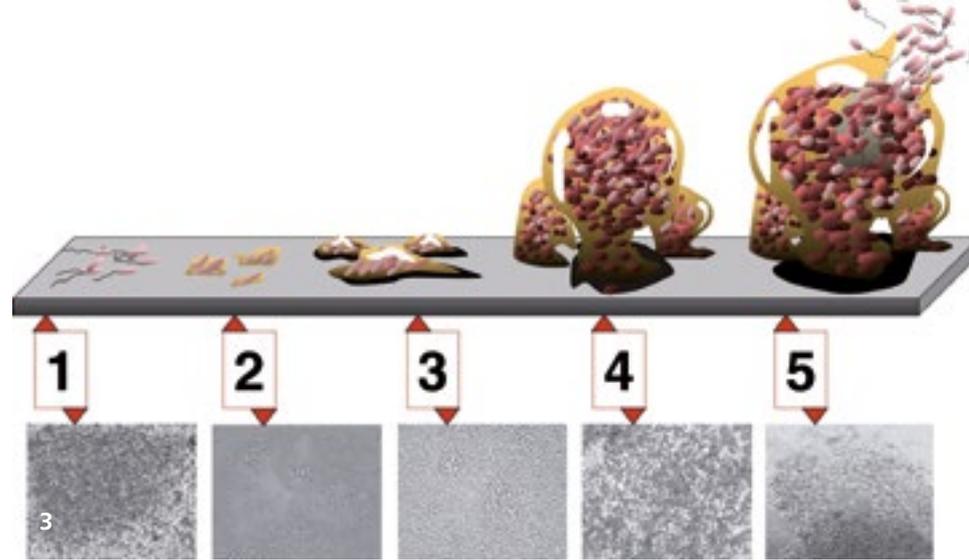
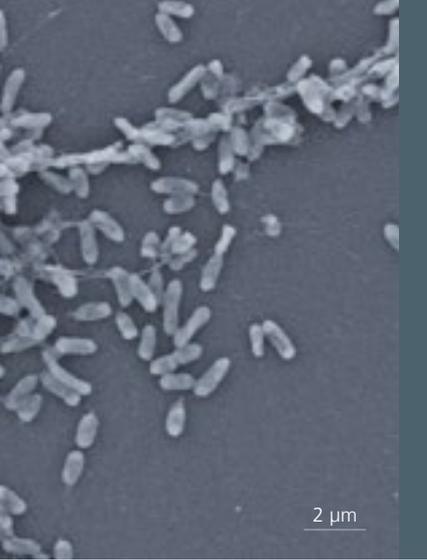
Biofilme sind Lebensgemeinschaften von Bakterien, Pilzen oder Algen, die sich an Oberflächen anheften und dort aufwachsen. Sie sind an die jeweilige Umgebung angepasst und verfügen über eine höhere Resistenz gegenüber Umgebungsbedingungen als frei schwimmende Zellen. Der Stoffwechsel von in Biofilmen organisierten Individuen unterscheidet sich von dem planktonischer Zellen.

Biofilme sind charakterisiert dadurch, dass die Zellen von einer mikrobiell induzierten Matrix, meist aus Polysacchariden, umgeben sind, die von einer wässrigen Lösung durchströmt sind. Sie können aus Individuen einer einzigen Spezies oder aus Mischpopulationen verschiedener Organismenarten zusammengesetzt sein (Bild 1). Die in Biofilmen organisierten Mikroorganismen nutzen Stoffwechseleigenschaften der anderen Spezies oder deren Schutzmechanismen oder metabolisieren in Biofilmen Zellen oder Zellteile anderer Mikroorganismen. Die Biofilmbildung ist von genetischen Faktoren abhängig und reguliert. Dabei sind die Bildung und der Austausch sogenannter Signalmoleküle für die mikrobielle Kommunikation entscheidend.

Das Beispiel eines Biofilms der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ist in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme in Bild 2 dargestellt. Deutlich erkennbar ist die dreidimensionale Struktur der auf einer Polycarbonatoberfläche angesiedelten Bakterienzellen.

Wirtschaftliche Bedeutung

Allein in Deutschland werden die Kosten, die durch pilzbedingte Schäden in Altbauten verursacht werden, auf 210 Mio Euro pro Jahr geschätzt. Dazu kommen rund 1,5 Mrd Euro pro Jahr durch die Verschlechterung des Wirkungsgrades von Wärmetauschern und 12,5 Mrd Euro pro Jahr für Korrosionsschäden – von diesen sind ca. 20 Prozent mikrobiell bedingte Schäden. Auch im Gesundheitssektor werden enorme An-



strebungen unternommen, um das Wachstum von Biofilmen an natürlichen Oberflächen wie Zahnmaterial, aber auch an synthetischen Materialien wie Implantaten, Kathetern oder medizinischen Geräten zu verhindern – auch wegen enormer Folgekosten im Falle einer Schädigung des Menschen.

Vermeidung und Bekämpfung von Biofilmen

Haben sich Biofilme erst einmal an einer Oberfläche niedergelassen, ist ihnen meist schwer beizukommen. In dieser Lebensform sind sie deutlich resistenter als Einzelzellen und widerstehen in vielen Fällen selbst hoch dosierten Desinfektions- und Reinigungsmitteln. Um Biofilme schon an der Entstehung zu hindern, ist daher die Anwendung geeigneter antimikrobieller Oberflächenmodifikationen, beispielsweise durch Anbindung biozider Substanzen oder photokatalytische Ausrüstung, angezeigt. Eine entsprechende Oberflächengestaltung kann die mikrobielle Adhäsion an der Materialoberfläche oder die Vermehrung der Zellen von vorneherein unterbinden. Am Fraunhofer IGB haben Grenzflächenforscher in Zusammenarbeit mit Mikrobiologen und Zellbiologen bereits verschiedene Oberflächenausrüstungen entwickelt. Ihre Charakterisierung kann mit Hilfe physikalischer und chemischer Verfahren erfolgen, ihre biologische Wirksamkeit lässt sich allerdings nur mit lebenden Systemen nachweisen.

Technische Lösungen zur Vermeidung und Bekämpfung von mikrobiellem Wachstum an Oberflächen

Physikalische Maßnahmen

- Veränderung von Umgebungsbedingungen (z. B. Kühlung oder Erhitzung)
- Beeinflussung durch Änderung der Strömungsbedingungen oder mechanische Entfernung
- Strahlung
- Oberflächeneigenschaften

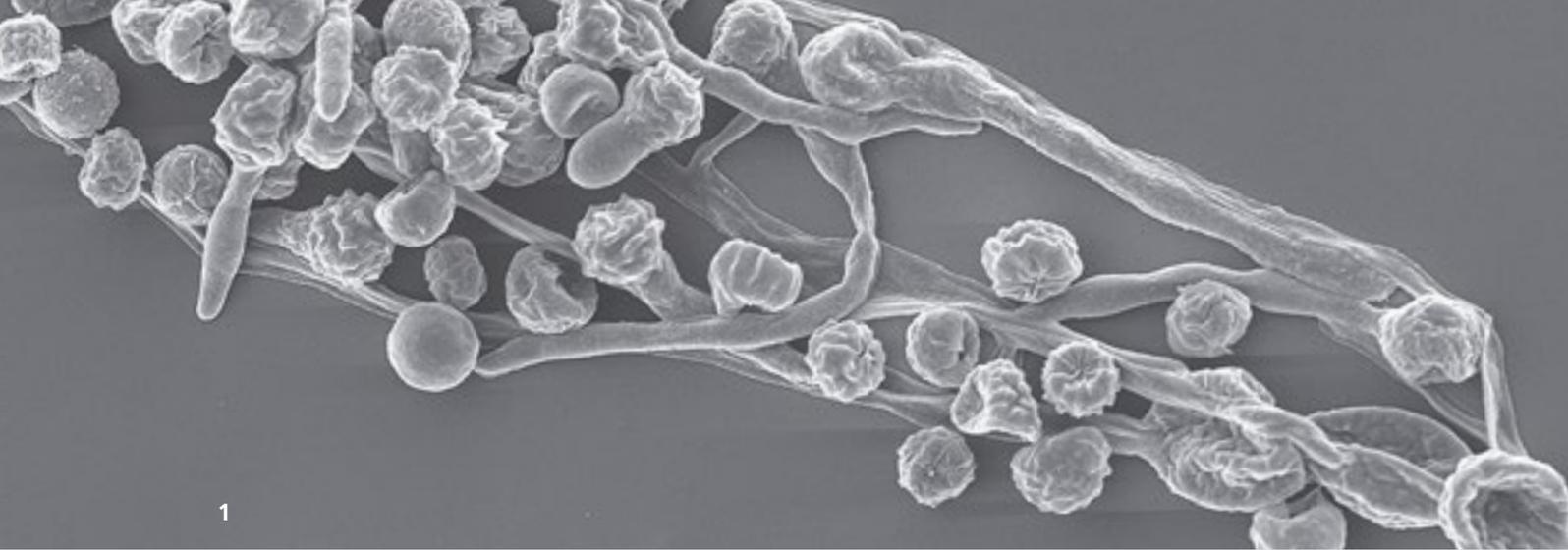
Chemische Maßnahmen

- Reinigung und/oder Desinfektion
- pH-Wert-Änderungen
- Eigenschaften von Oberflächen

Biologische Maßnahmen

- Antibiotisch wirksame Stoffe
- Störung der Zell-Zell-Kommunikation

- 1 *Biofilm einer natürlichen Mischpopulation auf einer porösen Oberfläche.*
- 2 *Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms von Pseudomonas aeruginosa. Stäbchenförmige Zellen in Matrix eingebettet, dreidimensionale Struktur erkennbar.*
- 3 *Schematische Darstellung der Biofilmentwicklung.* © D. Davis



1

BIOFILMBILDUNG

Die Biofilmbildung erfolgt in mehreren Stufen. Sie ist nicht nur von der Art der Mikroorganismen und deren Eigenschaften abhängig, sondern wird auch von den Oberflächeneigenschaften der zu besiedelnden Materialien sowie den Umgebungsbedingungen beeinflusst. Hierzu zählen neben dem Nährstoffangebot auch Wassergehalt, Temperatur oder die Strömungsbedingungen. Bei der Entwicklung eines Biofilms (Bild 3, Seite 3) heften sich zunächst die frei schwimmenden planktonischen Zellen an eine Oberfläche an. Bei diesem noch reversiblen Vorgang spielen Van-der-Waalsche Kräfte eine Rolle. Bei der darauf folgenden Entwicklung von Monolayern und Mikrokolonien vermitteln sogenannte Adhäsine die ersten Bindungen mit der Materialoberfläche. Dieser Vorgang ist nur bedingt reversibel. Der Schleim, der den Biofilm durchzieht und umgibt, basiert auf Polysacchariden, welche die Mikroorganismen selbst produzieren. Diese Struktur lässt sich auch durch kräftiges Spülen nicht mehr von der Oberfläche entfernen. Aus dem Biofilm werden einzelne Zellen freigesetzt, die sich wieder ansiedeln und einen neuen Biofilm bilden können.

In Biofilmen können Mikroorganismen nicht nur Nährstoffe akkumulieren. Sie bieten der Population auch Schutz vor chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen wie Desinfektionslösungen oder Strahlung. Soll die Entwicklung von Biofilmen wirksam und nachhaltig vermieden werden, muss man bereits in einem sehr frühen Stadium der Biofilmbildung eingreifen oder sie von vornherein, beispielsweise durch eine entsprechende antimikrobielle Ausrüstung der Oberfläche, unterbinden.



2

NACHWEISVERFAHREN

Am Fraunhofer IGB werden seit mehr als 20 Jahren Mikroorganismen an Oberflächen untersucht und für verschiedene biotechnische Anwendungen gezielt eingesetzt. Basierend auf den Erfahrungen im Umgang mit immobilisierter Biomasse haben wir verschiedene Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Biofilmen entwickelt. Heute stehen zahlreiche Standardmethoden sowie anwendungsorientierte Verfahren zur Verfügung, die – abhängig von den spezifischen Anforderungen und Zielsetzungen unserer Auftraggeber – optimiert und etabliert werden.

Auch größere experimentelle Serien gehören zu unserem Leistungsangebot. Bestehende Verfahren entwickeln wir laufend weiter; im Rahmen von Forschungsprojekten etablieren wir gemeinsam mit industriellen Partnern neue Prüfmethoden.

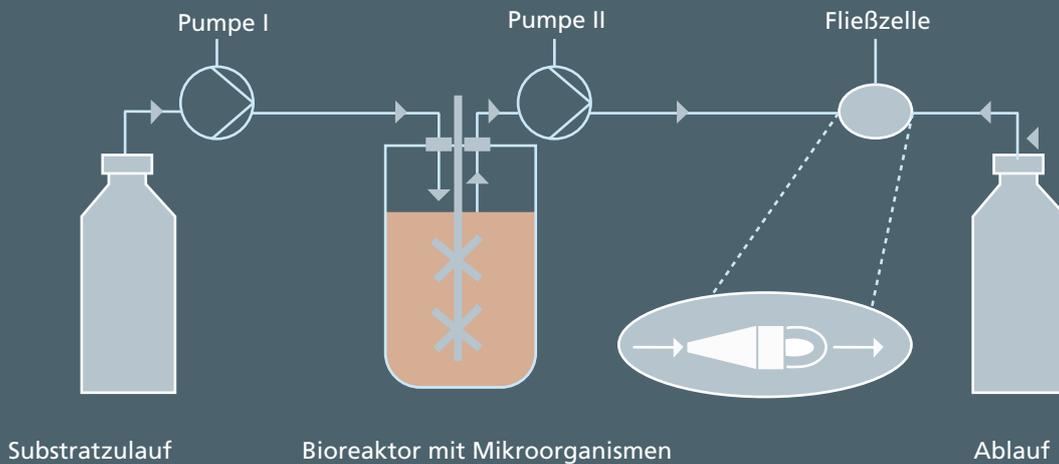
Während verschiedene Parameter, welche die Oberflächeneigenschaften von Materialien charakterisieren, mit ebenfalls am Fraunhofer IGB etablierten physikalischen oder chemischen Verfahren nachgewiesen werden können, ist der Nachweis der Inaktivierung von Mikroorganismen auf biologische Methoden angewiesen. Inaktivierung bedeutet den Verlust der Vermehrungsfähigkeit und ist eine Grundvoraussetzung, um die weitere Entwicklung und Verbreitung der mikrobiellen Zellen zu unterbinden.

Anforderungen an biologische Prüfverfahren zur Bewertung antimikrobieller oder photokatalytisch aktiver Oberflächen

- Qualitative Bewertung
- Quantitative Bewertung
- Reproduzierbarkeit
- Vergleichbarkeit
- Erfassung der Umgebungsbedingungen (Temperatur, Wassergehalt, Strahlung, Strömungsbedingungen)
- Anwendungsnähe
- Aufklärung von Wirkmechanismen

1 *Aspergillus niger.*

2 *Beispiel eines Freilandprüfstands zur Langzeituntersuchung photokatalytischer Oberflächen.*



1

Etablierte Bewertungsverfahren

Im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB werden verschiedene **Standardverfahren** wie Japanischer Industriestandard JIS 2801, Agardiffusionstest, ASTM-Standards (ASTM 21-09) sowie American Military Standard Mil-Std-810F eingesetzt, um Oberflächen biologisch zu bewerten, da diese Tests häufig von Kunden gewünscht werden.

Die Praxis hat gezeigt, dass diese Standards und Normen den Anforderungen, die in Forschung und Entwicklung benötigt werden, nicht in jedem Fall entsprechen. Das bestehende Spektrum an Verfahren wurde deshalb erweitert und umfasst derzeit: **Screening-Tests** nach wirksamen Substanzen, die bereits bei der Auswahl von Komponenten, aber auch für orientierende Untersuchungen eingesetzt werden. Ein **Adhäsionstest** zur Bewertung der Adhäsionseigenschaften und der Biofilmbildung unter statischen und dynamischen Bedingungen wurde etabliert. Verschiedene **Fließzellenmodelle** (Bild 1) stehen zur Verfügung, um den Einfluss von Strömungseigenschaften bei den Untersuchungen zu berücksichtigen.

Weitere **anwendungsorientierte sowie Freilanduntersuchungen** (Bild 2, Seite 5) wurden in den letzten Jahren entwickelt und überprüft und für zahlreiche verschiedene Anwendungen angepasst.

Die bekannten Standardverfahren stoßen an ihre Grenzen, wenn Prüfkörper unterschiedlicher Morphologie und Zusammensetzung untersucht werden sollen. Mit der zur Verfügung stehenden Ausrüstung prüfen wir Pulver, Suspensionen oder Lösungen, die als Ausgangsmaterialien eingesetzt werden sollen. Flachsubstrate aus Glas, Metall, Kunststoffen verschiedener Abmessungen können ebenfalls bewertet werden. Verfahren zur biologischen Charakterisierung von 3D-Prüfkörpern, Geweben, Vliesen und Lumina wie Schlauchmaterial oder Katheter wurden bereits erfolgreich in den jeweils geeigneten Testverfahren eingesetzt.

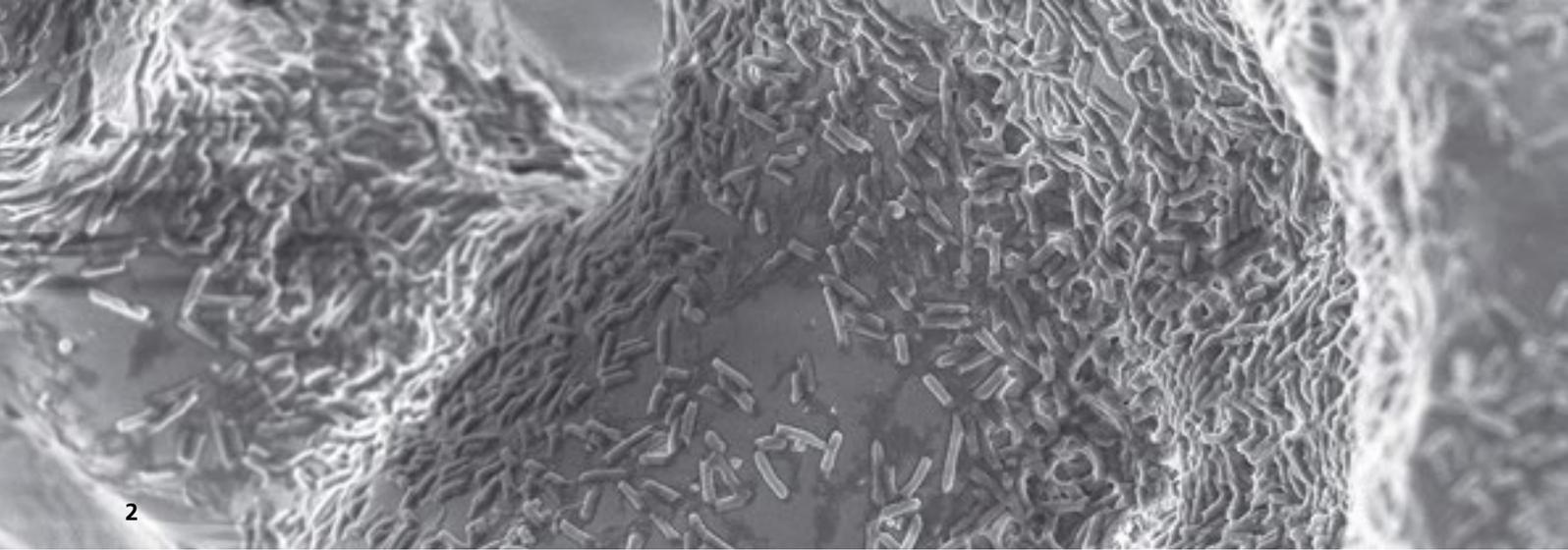
Zielbranchen

Oberflächen, die für verschiedenste Anwendungsbereiche beschichtet oder als compoundierte Produkte hergestellt werden, untersuchen wir mit verschiedenen, dem Anwendungsfall und der Fragestellung entsprechenden mikrobiologischen Prüfverfahren:

- Medizintechnik (Zahnersatz, Implantate, Katheter)
- Technische Anwendungen (Filtrationseinheiten, Filter, Klimaanlage)
- Konsumgüter
- Fahrzeugbau
- Textilien
- Bauindustrie

1 *Fließzelle zur Prüfung antimikrobieller Eigenschaften.*

2 *E. coli.*



Testorganismen

Als Testorganismen werden Bakterien, Pilze und Algen eingesetzt. Das Spektrum umfasst die Untersuchung mit definierten Teststämmen axenischer Kulturen (z. B. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Scenedesmus spec.*) sowie den Einsatz von standorttypischen Mischpopulationen. Die Auswahl der Testorganismen orientiert sich an der Zellwandzusammensetzung der Organismen, bekannten Resistenzen, genetisch bedingten Stoffwechseleigenschaften, angestrebten Anwendungsgebieten der Produkte sowie der Biofilmbildung.

Aufgrund der Ausstattung und fachlichen Qualifikation sind am Fraunhofer IGB Arbeiten mit Mikroorganismen der Risikogruppe 1 und 2 möglich. Entwickelt wurden außerdem gentechnisch veränderte Stämme relevanter Organismen, welche fluoreszierende Proteine produzieren, die abhängig vom Stadium der Biofilmbildung exprimiert werden.

Ausstattung

Mikrobiologische Laboratorien mit einer modernen Ausstattung sowie ein entsprechend qualifiziertes Team erlauben den Umgang mit Mikroorganismen der Risikogruppen 1 und 2. Für Untersuchungen an photokatalytisch ausgerüsteten Oberflächen stehen Aktivierungseinheiten zur Verfügung, in denen unter definierten Bedingungen eine biologische Charakterisierung der Prüfkörper erfolgen kann. Freilandexperimente zur Untersuchung von Witterungseinflüssen werden auf Anfrage geplant.

Leistungsangebot

- Bewertung der mikrobiellen Belastung auf Oberflächen und in prozessberührten Medien (z. B. Wasser, Ausgangsmaterialien, Produkte)
- Entwicklung von Verfahren zur Verminderung mikrobieller und chemischer Belastung in unterschiedlichen Bereichen (z. B. Sterilisationsverfahren, Standzeitverlängerung von Reinigungsbädern, Prozesswasseraufbereitung, kostengünstige Aufarbeitung von Prozessmedien, Abwasseraufbereitung)
- Entwicklung von innovativen Werkstoffen zur Reduzierung der Biofilmbildung an Verpackungsmaterialien, Rohrleitungen, medizinischen Gütern und/oder für die Gestaltung von Arbeitsflächen
- Bewertung der antimikrobiellen Eigenschaften speziell ausgerüsteter Oberflächen

Kontakt

M. Sc. Lukas Kriem
Telefon +49 711 970-4212
lukas.kriem@igb.fraunhofer.de

M. Sc. Bryan Lotz
Telefon +49 711 970-4217
bryan.lotz@igb.fraunhofer.de

**Fraunhofer-Institut
für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik IGB**

Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Telefon +49 711 970-4401
Fax +49 711 970-4200
info@igb.fraunhofer.de
www.igb.fraunhofer.de

Fraunhofer IGB Kurzprofil

Das Fraunhofer IGB entwickelt und optimiert Verfahren, Produkte und Technologien für die Geschäftsfelder Gesundheit, Chemie und Prozessindustrie sowie Umwelt und Energie. Wir verbinden höchste wissenschaftliche Qualität mit professionellem Know-how in unseren Kompetenzfeldern – stets mit Blick auf Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit. Komplettlösungen vom Labor- bis zum Pilotmaßstab gehören dabei zu den Stärken des Instituts. Kunden profitieren auch vom interdisziplinären Austausch zwischen den fünf FuE-Abteilungen in Stuttgart und den Institutsteilen an den Standorten Leuna und Straubing. Das konstruktive Zusammenspiel der verschiedenen Disziplinen am Fraunhofer IGB eröffnet neue Ansätze in Bereichen wie Medizintechnik, Nanotechnologie, industrieller Biotechnologie oder Umwelttechnologie. Das Fraunhofer IGB ist eines von 69 Instituten und Forschungseinrichtungen der Fraunhofer-Gesellschaft, Europas führender Organisation für angewandte Forschung.

www.igb.fraunhofer.de

Bleiben Sie mit uns in Verbindung:

