

# Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

## ***In-Vitro Studie zur Wirkung probiotischer Kulturüberstände***

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Humanmedizin der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Caroline Klenk, geb. am 22.04.1989 in Rendsburg

Rostock, 2017

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

**Gutachter:**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Karsten Becker  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Universität Münster
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ingo B. Autenrieth  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Universität Tübingen

**Datum der Einreichung:** 15.06.2017

**Datum der Verteidigung:** 19.12.2017

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit .....	1
1.1	Die Gattung <i>Staphylococcus</i> .....	1
1.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
1.1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	3
1.2	Biofilme .....	4
1.3	Probiotika und Kulturüberstände .....	6
1.3.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG .....	10
1.3.2	<i>Streptococcus salivarius</i> K12 .....	10
1.4	Zielsetzung .....	12
2	Material .....	13
2.1	Bakterienstämme .....	13
2.2	Nährmedien und Puffer .....	13
2.2.1	Flüssigmedien .....	13
2.2.2	Nährmedium fest .....	14
2.2.3	Puffer .....	14
2.3	Probiotische Kulturüberstände .....	14
2.4	Humane Matrixproteine .....	14
2.5	Chemikalien und Reagenzien .....	15
2.6	Geräte und Hilfsmittel .....	15
2.7	Verbrauchsgüter .....	17
2.8	Software .....	19
3	Methoden .....	20
3.1	Kultivierung der Bakterien .....	20
3.1.1	Stammhaltung .....	20

3.1.2 Übernachtkulturen.....	20
3.1.3 Bestimmen der optischen Dichte und Lebendkeimzahl.....	20
3.1.4 McFarland Trübungsstandard.....	21
3.1.5 Herstellung von Bakterienkulturen.....	22
3.2 Probiotische Kulturüberstände .....	22
3.2.1 Herstellung probiotischer Kulturüberstände .....	22
3.2.2 Kapillaritätsbestimmung .....	23
3.2.3 Dichtebestimmung .....	24
3.3 Versuche auf festem Medium.....	24
3.3.1 Konkurrenztests .....	24
3.3.2 Agardiffusionstests.....	25
3.4 Induktion von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Biofilmen .....	25
3.4.1 Biofilmquantifizierung mittels Safraninfärbung .....	26
3.4.2 Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche.....	26
3.4.3 Einfluss des Nährmediums.....	27
3.5 Versuche zur probiotischen Wirkung der Kulturüberstände.....	27
3.5.1 Versuche zur Minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	28
3.5.2 Versuche zur zeitversetzten Einsaat der Kulturüberstände .....	29
3.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	29
3.6.1 Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie.....	30
3.6.2 Probenpräparation .....	31
3.7 Statistik .....	32
4 Ergebnisse .....	33
4.1 Korrelation der optischen Dichte zur Lebendkeimzahl von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> .....	33
4.2 Versuche auf festem Medium.....	36
4.2.1 Konkurrenztests .....	36

4.2.2 Agardiffusionstests.....	38
4.3 Eigenschaften probiotischer Kulturüberstände .....	40
4.3.1 Einfluss der Herstellungsart auf die Wirksamkeit .....	40
4.3.2 Kapillaritätsbestimmung .....	42
4.3.3 Bestimmung der Dichte sowie Oberflächenspannung .....	43
4.4 Induktion von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Biofilmen .....	45
4.4.1 Einfluss des Nährmediums.....	46
4.4.2 Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche .....	46
4.5 Versuche zur Minimalen Hemmkonzentration (MHK) probiotischer Kulturüberstände .....	48
4.5.1 Kultivierung von <i>S. aureus</i> unter Zugabe von <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand	50
4.5.2 Kultivierung von <i>S. aureus</i> unter Zugabe von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand.	52
4.5.3 Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> unter Zugabe von <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand .....	54
4.5.4 Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> unter Zugabe von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand .....	57
4.5.5 Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung probiotischer Kulturüberstände..	60
4.6 Versuche zur zeitversetzten Einsaat der Kulturüberstände .....	65
4.6.1 Kultivierung von <i>S. aureus</i> unter zeitversetzter Zugabe von <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand .....	67
4.6.2 Kultivierung von <i>S. aureus</i> unter zeitversetzter Zugabe von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand .....	69
4.6.3 Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> unter zeitversetzter Zugabe von <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand .....	71
4.6.4 Kultivierung von <i>S. epidermidis</i> unter zeitversetzter Zugabe von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand .....	72
4.6.5 Vergleich der zeitabhängigen Wirkung probiotischer Kulturüberstände .....	74
5 Diskussion .....	78

5.1	Lebendkeimzahlbestimmung von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> .....	78
5.2	Optimierung der Kultivierungsbedingungen für die <i>in-vitro</i> Biofilmbildung .....	79
5.3	Versuche auf festen Medium.....	80
5.4	Kulturüberstände – Herstellung und Eigenschaften.....	81
5.5	Versuche zur Wirkung probiotischer Kulturüberstände.....	85
6	Zusammenfassung .....	88
7	Anhang .....	89
7.1	Thesen.....	89
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	91
7.3	Tabellenverzeichnis.....	93
7.4	Abbildungsverzeichnis .....	93
7.5	Literaturverzeichnis .....	96
	Selbstständigkeitserklärung .....	110

# 1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die Mikrobiologie als Wissenschaft der Mikroorganismen beschäftigt sich mit der Erforschung grundlegender Lebensformen und -prinzipien und hat sich nach der Erfindung des Mikroskops im 17. Jahrhundert rasant entwickelt. Einen wichtigen Teilbereich dieser Disziplin stellt die Medizinische Mikrobiologie dar, die sich primär der Erforschung pathogener, sprich krankheitsauslösender Mikroorganismen widmet. Für eine zielführende Diagnostik, Therapie und Prävention von Infektionskrankheiten ist das Verständnis um die morphologische und physiologische Vielfalt des verursachenden Erregers, sowie dessen Wechselwirkungen mit seinem Wirt unabdingbar (Suerbaum und Hahn 2012). Häufig wird in diesem Zusammenhang allerdings vernachlässigt, dass Mikroorganismen von sich aus nicht nur pathogen wirken, sondern als Bestandteil der natürlichen Flora bzw. Mikrobiota – sei es auf der Haut, im Darm oder in der Mundhöhle – gerade zum Erhalt der Gesundheit beitragen (Estrela et al. 2015).

Die Entdeckung und erfolgreiche Anwendung antimikrobieller Substanzen wie den Antibiotika hat die Möglichkeiten der medizinischen Versorgung innerhalb des letzten Jahrhunderts maßgeblich vorangetrieben. Heutzutage zählen Antibiotika weltweit zu den am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl an Bakterien im Sinne eines Überlebensvorteils Resistenzmechanismen gegenüber diesen Therapeutika entwickelt haben (Holmes et al. 2016). In diesem Zusammenhang ist auch das Verständnis um die ‚Ur-Überlebensform‘ der Bakterien in sogenannten Biofilmen besonders wichtig (Donlan und Costerton 2002).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem kleinen Ausschnitt der äußerst komplexen Wechselwirkungen zwischen pathogenen und vordergründig apathogenen Mikroorganismen, die für die Weiterentwicklung zukünftiger therapeutischer und präventiver Methoden eine große Rolle spielen.

## 1.1 Die Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken sind grampositive, unbewegliche, nicht sporenbildende Bakterien der Familie der Staphylococcaceae. Der Name ‚*Staphylococcus*‘ leitet sich aus dem Griechischen ab, „*staphyle*“ bedeutet Traube, „*kokkos*“ Kugel. Die Bezeichnung ist auf die kugelförmige Morphologie bzw. die Anordnung dieser Bakterien in Trauben zurückzuführen. Eine Klassifizierung erfolgt anhand des Vorhandenseins des Enzyms Koagulase in koagulasepositive- und koagulase-negative Staphylokokken. *Staphylococcus aureus* zählt zu den koagulasepositiven-, während

*Staphylococcus epidermidis* zu den koagulasenegativen Staphylokokken gehört. Koagulasepositive Bakterien gelten im Allgemeinen als die pathogeneren Isolate (Gatermann 2012).

### 1.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* wurde erstmals im 19. Jahrhundert als wichtiger humanpathogener Keim und Verursacher von Wundinfektionen beschrieben (Ogston 1882). Bei Kultivierung auf Blutagar zeigt er typischerweise Hämolyseverhalten rund um die goldgelbfarbenen Kolonien („aureus“- golden, lat.). *S. aureus* verfügt über zahlreiche Virulenzfaktoren, die für dessen ausgesprochene Pathogenität verantwortlich sind (Archer 1998). Von diagnostischem Interesse ist hier der Nachweis der Koagulase sowie des Clumping Factors. Diese beiden Virulenzfaktoren bewirken eine Ausfällung von Fibrin, wodurch sich *S. aureus* vor der Immunantwort des Wirtes schützt und in dessen Rahmen die charakteristische Abszessbildung erfolgt. Weiterhin bedeutend ist das Fibrinolysin wodurch sich *S. aureus* über Auflösen des initial gebildeten Fibringerinnsels im Gewebe ausbreiten kann. Das Protein A sowie die Polysaccharidkapsel dienen zum Schutz vor Phagozytose und das interzelluläre Adhäsin unterstützt die Biofilmbildung. Insgesamt erweist sich *S. aureus* als ein ausgesprochen widerstandsfähiges Bakterium gegenüber potentiell Stress verursachenden Umweltbedingungen wie Hitze, UV-Strahlung, Austrocknung und pH-Veränderungen (Gatermann 2012).

Von besonderer klinischer Relevanz ist die Tatsache, dass *S. aureus* als opportunistisch pathogener Keim Haut und Schleimhäute von Menschen asymptomatisch besiedeln kann. Dauerhaft sowie temporär betroffen sind ca. 30 % der Menschen. Aufgrund ihrer Symptomlosigkeit und der damit fehlenden Warnhinweise für Betroffene sowie Personen in ihrer Umgebung sind *S. aureus*-Träger die wichtigste Infektionsquelle in der endemischen Situation. Bei Auftreten von Wunden bzw. Immundefekten kann *S. aureus* dann pathogen wirken und systemische Auswirkungen haben (Wertheim et al. 2005; Sollid et al. 2014; Becker et al. 2017).

*S. aureus* stellt weiterhin durch seine Fähigkeit Biofilm zu bilden und auf diese Weise als chronische Infektionsquelle zu dienen eine große Herausforderung hinsichtlich effektiver Präventions- sowie Therapiemöglichkeiten dar (Bhattacharya et al. 2015).

Ätiologisch kann man Krankheiten, die direkt durch *S. aureus* oder durch dessen Toxine verursacht sind, sowie einige Übergangsformen unterscheiden. Zu den direkt durch das Bakterium verursachten Krankheiten zählen Furunkel, die Mastitis puerperalis und die Osteomyelitis. Lebensmittelvergiftungen sind dagegen ein Beispiel toxinvermittelter Genese. Die

Übergangsformen beinhalten die Impetigo contagiosa, das toxische Schocksyndrom oder das Staphylococcal scalded skin syndrome (Gatermann 2012).

Therapeutisch muss die Fähigkeit der meisten *S. aureus* Stämme gegenüber einfachen β-Laktam Antibiotika, d.h. Aminopenicillinen, resistent zu sein, berücksichtigt werden. Darüber hinaus kommt es aktuell zu einer Multi-Resistenzentwicklung, z.B. bei MRSA (methicillin resistenter bzw. multi-resistenter *S. aureus*). Insbesondere in chirurgischen Fachgebieten spielt daher die Prävention von durch *S. aureus* verursachte Infektionen eine wichtige Rolle (Ma et al. 2017). Intensive Screeningprogramme sowie restriktivere Antibiotikaverordnungen bewirken eine deutliche Reduktion hinsichtlich der Verbreitung von *S. aureus* bzw. dem Vorantreiben der Resistenzentwicklung (Wertheim et al. 2004). Dennoch besteht laut der Weltgesundheitsorganisation für *S. aureus* aufgrund der genannten Resistenzentwicklung hohe Priorität bezüglich der dringlichen Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika (WHO-World Health Organization 2017).

Insgesamt ist die Morbidität bzw. Mortalität durch *S. aureus* Infektionen, insbesondere aufgrund von MRSA sowie der Fähigkeit auf passager angewandten Implantaten wie Kathetern Biofilm zu bilden, in den letzten Jahren weltweit stark angestiegen. Die sich daraus entwickelnden enormen Kosten stellen ein gesundheitsökonomisches Problem ersten Ranges dar (Klein et al. 2007; Noskin et al. 2007; Uematsu et al. 2016).

### 1.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Koagulasenegative Staphylokokken, darunter *Staphylococcus epidermidis*, gehören zu den am häufigsten im Krankenhaus isolierten Keimen. In der Minderzahl der Fälle sind sie dabei jedoch das ätiologisch relevante Agens nosokomialer Infektionen (Becker et al. 2014; Gatermann 2012). Auf Blutagarplatten zeigen *S. epidermidis* Kulturen im Unterschied zu *S. aureus* keine Hämolyse, die Kolonien haben eine weiße Farbe (Gatermann 2012). *S. epidermidis* („epidermidis“- der Haut, lat.) zählt zu der natürlichen humanen Mikrobiota der Haut und besiedelt vorrangig Nase, Axilla, Kopf, Arme und Beine (Kloss und Musselwhite 1975). Aufgrund dessen stellt das unabsichtliche Einbringen von *S. epidermidis*, beispielsweise im Rahmen von Gefäßpunktionen, einen häufigen Infektionsweg dar. Die Infektionsquellen können einerseits die patienteneigene dermale Mikrobiota, oder aber auch die Hände des medizinischen Personals sein.

*S. epidermidis* ist als Kommensale der menschlichen Hautmikrobiota ein opportunistisch pathogener Keim. Im Gegensatz zu *S. aureus* weist er kaum Virulenzfaktoren auf, die bei einer Infektion einen aggressiven Krankheitsverlauf im Wirt ermöglichen würden. Sein zentraler

Virulenzfaktor ist die ausgeprägte Fähigkeit, Biofilm zu bilden und auf diese Weise dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen (Otto 2012; Christensen et al. 1982). Zu einem späteren Zeitpunkt kann es dann zu einer Ausschwemmung der Bakterien in die Blutbahn und folglich schwerwiegenden septischen Komplikationen kommen. *S. epidermidis* ist in der Lage Biofilm auf synthetischen und nicht-synthetischen Oberflächen zu bilden und kann so jegliche Gefäßkatheter, aber auch Gefäßstents oder -shunts, sowie Herzklappen- und orthopädische Prothesen besiedeln. Da Antibiotika die im Biofilm geschützten Bakterien regelmäßig nicht oder nur in ungenügendem Maße erreichen, müssen die betroffenen medizinischen Implantate oft entfernt bzw. ersetzt werden (Becker et al. 2014).

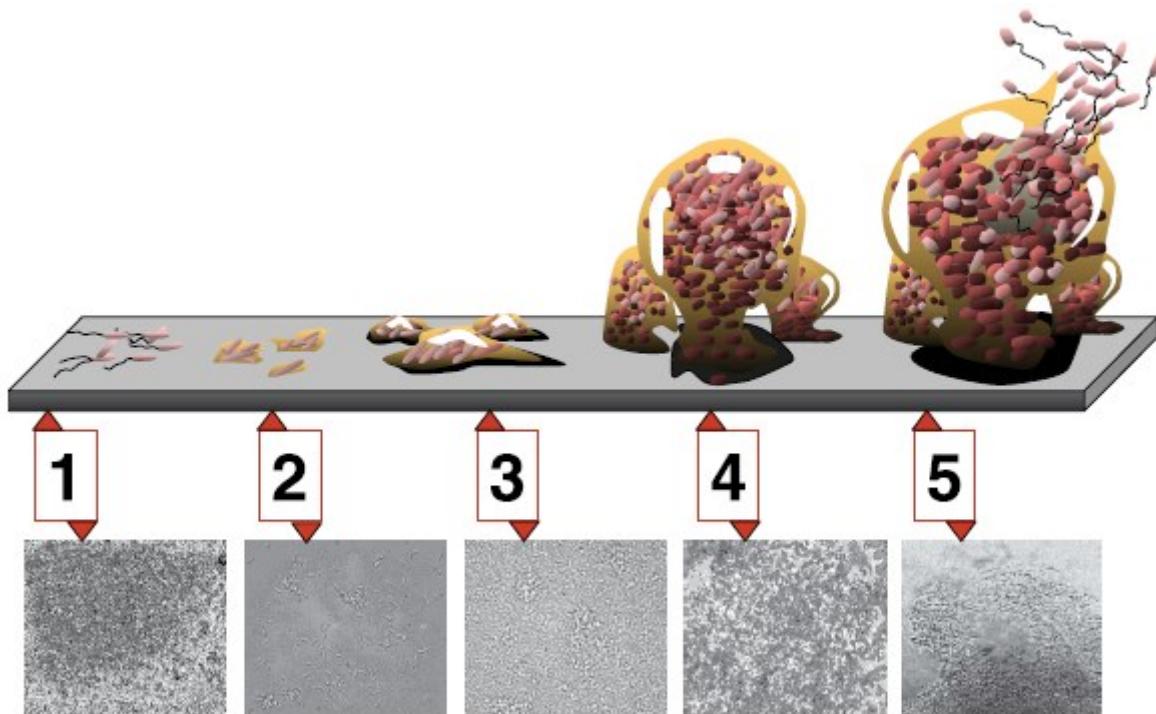
Therapeutisch stellen einerseits die häufig vorhandenen Resistenzen, vor allem gegen jegliche  $\beta$ -Laktame, und andererseits der Biofilm als chronische Infektionsquelle eine Herausforderung dar. Um Infektionen zu verhindern ist die Prävention, insbesondere mit einer strengen Einhaltung der Hygiene, von großer Bedeutung (Chessa et al. 2015).

### 1.2 Biofilme

Der Begriff ‚Biofilm‘ bezeichnet hoch komplexe, dynamische Gemeinschaften von Mikroorganismen einer oder mehrerer Spezies, die an Oberflächen adhärieren und typischerweise von einer extrazellulären polymeren Substanz (EPS) Matrix umgeben sind (Dunne Jr. 2002). Evolutionär betrachtet stellt das Wachstum in Biofilmen als ‚geschützte Nische‘ wahrscheinlich einen deutlichen Überlebens- bzw. Selektionsvorteil dar (Stoodley et al. 2002; Costerton 1995). Fossilfunde von vor bis zu 3,5 Milliarden Jahren zeigen, dass Biofilme zu den ältesten ökologischen Daseinsformen der Welt gehören (Hall-Stoodley et al. 2004). Jedoch wurde erst Mitte des 20. Jahrhunderts das Phänomen gemeinschaftlich, sessiler Ansiedlungen auf Oberflächen, in einer Art ‚Film‘ für aquatische Bakterien beschrieben (Zobell und Allen 1935; Zobell 1943).

Biofilme kommen ubiquitär in verschiedenen Ökosystemen vor und können sowohl auf biotischen als auch auf abiotischen Oberflächen entstehen (Costerton 1987). Inzwischen werden mindestens fünf Phasen der Biofilmbildung unterschieden, die teilweise als Kreislauf angesehen werden können (Monroe 2007; Moormeier und Bayles 2017). Zunächst findet die reversible Adhäsion einzelner planktonischer Bakterien an einer Oberfläche statt. Danach kommt es durch Ausbildung von extrazellulärer Matrix zu einer irreversiblen Adhäsion sowohl der Bakterien untereinander als auch der Mikrokolonien an der Oberfläche. In der dritten Phase wachsen die Mikrokolonien zu teilweise selbst mit dem bloßen Auge wahrnehmbaren Makrokolonien heran.

Anschließend differenzieren sich einzelne Abschnitte des Biofilms durch besondere metabolische Muster der darin enthaltenen Bakterien funktionell, was als Reifung bezeichnet wird. Die fünfte Phase zeichnet sich durch eine Ablösung einzelner Bakterien bzw. Bakterienpakete von Biofilm aus. Diese nunmehr wieder frei flottierenden Bakterien können an anderer Stelle neuen Biofilm bilden (Abb. 1).



**Abbildung 1: Phasen der Biofilmbildung an einer Oberfläche, schematische und rasterelektronenmikroskopische Darstellung am Beispiel eines *P. aeruginosa* Biofilms.** Phase 1: Reversible Adhäsion planktonischer Bakterien. Phase 2: Irreversible Adhäsion der Mikrokolonien durch Ausbildung von EPS. Phase 3-4: Heranreifung des Biofilms durch Wachstum, funktionelle Differenzierung. Phase 5: Lösen von Biofilmbakterien, Ausbreitung. Abb. von D. Davis, entnommen aus (Monroe 2007).

Die eher heterogene Struktur mit unterschiedlich großen Arealen sessiler Bakterien verdeutlicht die dynamische Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Umweltbedingungen. Dabei beeinflussen insbesondere das Vorhandensein von Nährstoffen sowie die Fließbedingungen in der Umgebung die Form des Biofilms (Stoodley et al. 1999; Beer et al. 1994). Innerhalb eines Biofilms prägen sich außerdem verschiedene Phänotypen der Mikroorganismen aus. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität, Funktion und Entwicklungsfolge, einerseits voneinander, sowie andererseits ebenfalls von ihrem planktonischen Pendant (Sauer et al. 2002; Stoodley et al. 2002). Diese Eigenschaften, als Ausdruck komplexer und dynamischer Regulationsvorgänge, zeichnen einen Biofilm aus. Gleichzeitig liegt darin auch die außerordentliche Widerstandsfähigkeit dieser Lebensform begründet, welche heutzutage ein großes Problem auf medizinischem und industriellem Gebiet darstellt.

Inzwischen weiß man, dass 65-80 % aller nosokomialen Infektionen ätiologisch mit der Ausbildung von Biofilmen assoziiert sind (Pletzer und Hancock 2016). Grundsätzlich kann dabei zwischen implantatassoziierten- und gewebeassoziierten Infektionen unterschieden werden. Beispiele für implantatassoziierte Infektionen sind häufig durch *S. epidermidis* verursachte Gefäßkatheter-Infektionen oder vorzugsweise durch *S. epidermidis* bzw. *S. aureus* ausgelöste Infektionen orthopädischer Implantate. Häufig auftretende gewebeassoziierte Infektionen sind die durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Pneumonie bei Zystischer Fibrose oder eine Endokarditis nach Streptokokken Infektion (Donlan und Costerton 2002; Scherr et al. 2014).

Parsek und Singh schlugen vier Kriterien zur Definition der Biofilmätiologie einer Infektion vor, welche die klinisch relevanten Eigenschaften von Biofilm verdeutlichen: Die pathogenen Bakterien adhärieren an einer Oberfläche, die Bakterien befinden sich in Ansammlungen und sind umgeben von einer Matrix oder Wirtsbestandteilen, die Infektion ist lokalisiert und zeigt sich resistent gegenüber antibiotischer Therapie, obwohl die entsprechende Sensitivität bei der planktonischen Form dieser Bakterien gegeben ist (Parsek und Singh 2003). Hierbei sticht vor allem die ausgeprägte Resistenz von Biofilm Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen heraus. Diese kann gegenüber der planktonischen Form der jeweiligen Bakterienspezies für ein bestimmtes Antibiotikum um ein Vielfaches erhöht sein (Ceri et al. 1999; Walters et al. 2003). In diesem Zusammenhang werden verschiedene Resistenzmechanismen vermutet. Einerseits kann die Matrix aus extrazellulärer Substanz als Schutzhülle dienen und auf diese Weise die Diffusion von Antibiotika verhindern. Andererseits muss auch die Heterogenität innerhalb eines Biofilms berücksichtigt werden. Dadurch sind beispielsweise sogenannte *Persister*-Bakterien aufgrund einer reduzierten Stoffwechselaktivität unempfindlich gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Prax und Bertram 2014). Des Weiteren kann eine im Rahmen der Immunantwort veränderte Wirtsumgebung die Wirkung der Antibiotika nachteilig beeinflussen (Wagman et al. 1975; Gilbert und Brown 1995).

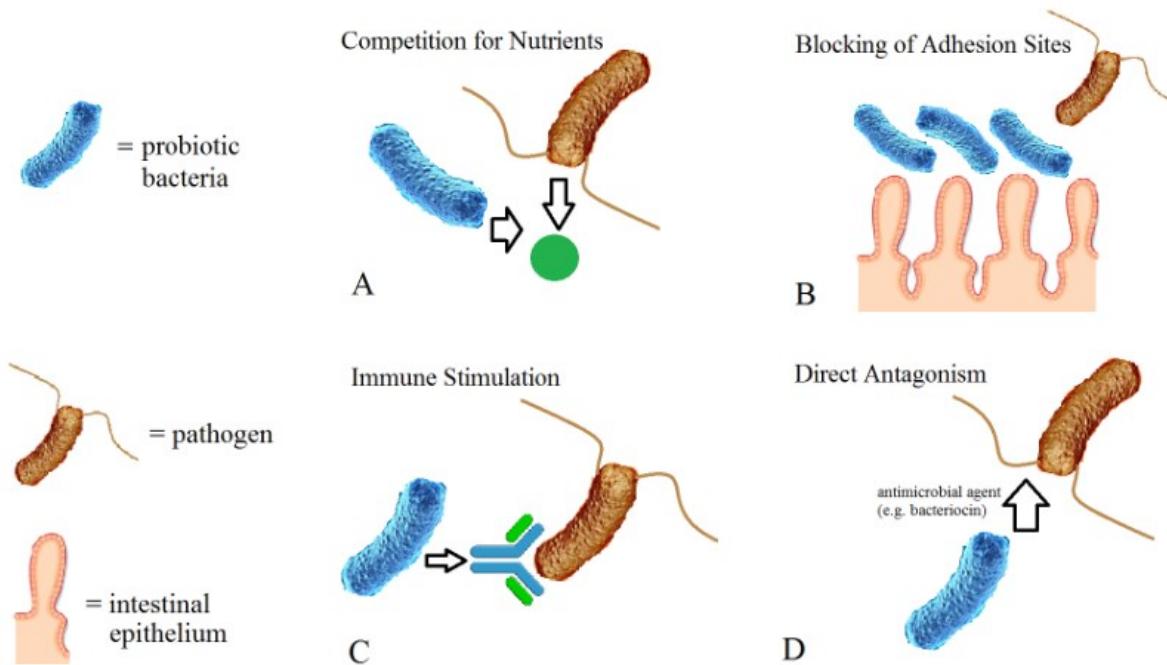
### 1.3 Probiotika und Kulturüberstände

Das Konzept der Probiotika bzw. Mikroorganismen mit einem fördernden Einfluss auf die menschliche Gesundheit ist im letzten Jahrhundert entstanden und hat sich jüngst dank eines stark gewachsenen Forschungsinteresses weiter entwickelt. Probiotika werden teilweise als Nahrungsbestandteile in sogenannten ‚functional Foods‘ vertrieben, sie finden aber auch in direkter medizinischer Applikation Anwendung.

Probiotika werden definiert als „lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung in adäquaten Mengen einen Gesundheitsvorteil des Wirtes bewirken“ (Joint FAO/WHO Working Group 2002). Der Begriff ‚Probiotikum‘ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „für das Leben“. Im Gegensatz steht dazu ‚Antibiotikum‘ („gegen das Leben“-griech.), womit ein antibakterielles Agens biologischer oder synthetischer Herkunft gemeint ist. Weiterhin gilt es, von diesen beiden Begriffen die ‚Präbiotika‘ abzugrenzen. Diese sind „nicht verdaubare Lebensmittelbestandteile, die ihren Wirt günstig beeinflussen, indem sie das Wachstum und die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Dickdarm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern“ (Gibson und Roberfroid 1995).

Laktobazillen und Bifidobakterien sind Milchsäurebakterien und Bestandteil der natürlichen Mikrobiota des Gastrointestinaltrakts. Sie werden am häufigsten als Probiotika verwendet (Rowland et al. 2010). Aber es werden beispielsweise auch einige Stämme von *Streptococcus salivarius*, welcher natürlicherweise in der Mundhöhle gesunder Menschen vorkommt, als Probiotika genutzt.

Probiotische Bakterien antagonisieren stammabhängig über eine Vielzahl von Mechanismen andere Mikroorganismen und können so ihre Wirkung entfalten (Abb. 2). Dazu gehören unter anderem: eine positive Einflussnahme auf die natürliche Mikrobiota in Gastrointestinaltrakt oder Oropharyngealraum, kompetitive Adhäsion an Mukosa sowie Stärkung der Epithelbarriere, eine positive Beeinflussung des Immunsystems über Regulationen der Immunantwort und die Ausschüttung antimikrobiell wirkender Substanzen (Bermudez-Brito et al. 2012). Im Unterschied zu pathogenen Bakterien zeichnen sich probiotische Bakterien auf diese Weise durch einen für den Organismus insgesamt positiven Effekt aus und können nur in sehr wenigen Ausnahmefällen schaden (Snydman 2008).



**Abbildung 2: Hauptwirkmechanismen probiotischer Bakterien, beispielhafte Darstellung für den Gastrointestinaltrakt.**  
A: Nährstoffkonkurrenz, B: Besetzen von Adhäsionsstellen, C: Stimulation des Immunsystems, D: Direkter Antagonismus über antimikrobielle Substanzen (z.B. Bakteriocine). Abb. modifiziert nach folgender Bildquelle URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Probiotic.png#>

In den letzten Jahren ist das Interesse an Probiotika und insbesondere den Möglichkeiten der medizinischen Applikation stark gestiegen. Diverse *in-vitro* sowie *in-vivo* Studien belegen den klinischen Nutzen probiotischer Bakterien. Probiotika werden dabei vorrangig in präventiver Absicht oder als Adjuvans verwendet. Hinsichtlich ihrer Funktion, die normale bakterielle Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt zu stärken bzw. wiederherzustellen, werden sie schon vielfach bei diversen Durchfallerkrankungen in Kindern und Erwachsenen therapeutisch angewendet (Cremonini et al. 2002; Ottman et al. 2012). Der Einfluss auf Entstehung und Verlauf verschiedenster Durchfallerkrankungen zählt zu den am meisten untersuchten klinisch relevanten Wirkungen von Probiotika. Weitere Erfolge konnten bei der Verwendung als Adjuvanz gegen infektiöse Gastritis mit *Helicobacter pylori*, sowie gegen atopisches Ekzem, Nekrotisierende Enterokolitis in Neugeborenen oder vaginale Infektionen ermittelt werden (Gupta und Garg 2009; Lievin-Le Moal und Servin 2014; O'Connor et al. 2016; Lau et al. 2016).

Schließlich stellt die steigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen eine der aktuellen globalen Herausforderungen dar, die sowohl den Bereich Gesundheit als auch Landwirtschaft und Ernährung umfasst. Neben der Verbreitung eines fundierten Wissens um die Entwicklungsmechanismen von Resistzenzen und damit einhergehend eines sensibleren Umgangs mit Antibiotika, wird auch insbesondere die Bedeutung der Prävention von Infektionskrankheiten

betont. Des Weiteren spielt selbstverständlich die Erforschung bzw. Entwicklung von neuen antimikrobiellen Substanzen für die zukünftige Behandlung von Infektionskrankheiten eine äußerst wichtige Rolle (WHO- World Health Organization 2015; Dar et al. 2016; Czaplewski et al. 2016; Lazarev und Govorun 2010). In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit auf einen möglichen probiotischen Wirkmechanismus, nämlich den Einfluss antimikrobieller Substanzen aus Kulturüberständen auf das Wachstum pathogener Bakterien, eingegangen.

### Kulturüberstände

Kulturüberstände werden durch Zentrifugation einer zuvor bebrüteten Bakterienkultur und Abheben des Nährmediums vom Sediment gewonnen. Durch anschließende Filtration können ggf. noch im Überstand vorhandene einzelne Bakterien eliminiert werden. Diese Prozessierung ermöglicht die Herstellung von zellfreien Kulturüberständen unter Beibehaltung löslicher Substanzen, die zuvor von den Bakterien in das Nährmedium sezerniert wurden. Eben diese Substanzen sind aufgrund ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber anderen Mikroorganismen interessant (Asensio und Perez-Dias 1976; Tsai et al. 2008; Mariam et al. 2014).

Bereits vor knapp 100 Jahren wurde eine antimikrobielle Substanz in den Kulturen eines *E. coli* Stammes gefunden, welche antagonistisch gegenüber anderen *E. coli* Stämmen wirkte (Waters und Crosa 1991). Silva et al. beschrieb 1987 inhibitorische Stoffe aus *L. rhamnosus* Kulturüberständen, welche *in-vitro* Wirkung gegenüber einer Reihe grampositiver und gramnegativer pathogener Keime wie Clostridien, *Enterobacter* und Staphylokokken zeigten (Silva et al. 1987).

Inzwischen weiß man, dass abhängig vom Bakterienstamm sowie den Inkubationsbedingungen eine Vielzahl aktiver Substanzen in das Nährmedium sezerniert wird und dementsprechend mit dem Kulturüberstand isoliert werden kann (Riley und Wertz 2002). Dazu zählen nicht nur antimikrobielle Agenzien wie organische Säuren, Wasserstoffperoxid oder Bakteriozine, sondern auch immunmodulatorische Stoffe (Bermudez-Brito et al. 2014; Harb et al. 2013). Die weiterführende Erforschung antimikrobieller Substanzen, den zugrundeliegenden Wirkmechanismen, sowie ihren Wirkspektren auf planktonische oder biofilmgebundene Bakterien ist für die Entwicklung zukünftiger Präventions- und Therapiemöglichkeiten von Infektionskrankheiten enorm wichtig (Varma et al. 2011; Lazarev und Govorun 2010).

In der vorliegenden Arbeit werden zwei probiotisch wirkende Bakterien, *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Streptococcus salivarius* K12, und insbesondere deren Kulturüberstände

näher untersucht. Ihre klinisch relevanten Wirkungen unterscheiden sich voneinander aufgrund der jeweiligen bakterienspezifischen Eigenschaften und Wirklokalisationen im menschlichen Körper.

### 1.3.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG

*Lactobacillus rhamnosus* GG ist ein grampositives Stäbchenbakterium der Gattung der Laktobazillen. Es gehört zu den am ausführlichsten erforschten probiotischen Bakterien, mit umfangreichen Untersuchungen zu dessen vielfältiger antimikrobieller Wirkung sowohl *in-vitro* und *in-vivo*, als auch in randomisierten klinischen Studien (Lievin-Le Moal und Servin 2014). *L. rhamnosus* GG wurde ursprünglich aus dem Stuhl eines gesunden Menschen isoliert (Gorbach 1996). Dieses Bakterium ist zwar kein dauerhafter Bestandteil der natürlichen humanen Darmmikrobiota, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es bei oraler Administration die Magen-Darm-Passage einerseits überlebt und im Folgenden den Magen-Darm-Trakt temporär besiedeln kann (Goldin et al. 1992). Der Effekt dieser Besiedlung ist in Bezug auf die Inzidenz von Diarrhoe bei Kindern (Szajewska et al. 2011), oder hinsichtlich antibiotikainduzierter Störungen im Gastrointestinaltrakt klinisch relevant (Korpela et al. 2016). In beiden Fällen ist die Gabe von *L. rhamnosus* GG zum Erhalt bzw. zur Wiederherstellung der natürlichen Darmmikrobiota erfolgreich. Unter den weiteren vielfältigen, nachgewiesenen positiven Effekten auf die Gesundheit konnte in klinischen Studien beispielsweise auch gezeigt werden, dass der präventive Zusatz von *L. rhamnosus* zu Milch das Risiko der Entwicklung von dentalem Karies senken kann (Näse et al. 2001). Ebenfalls lieferten *in-vitro* Untersuchungen Anhaltspunkte für eine durch *L. rhamnosus* GG beeinflusste Biofilmbildung verschiedener Bakterien (Jiang et al. 2016). Die bisher beschriebenen Wirkmechanismen sind insgesamt vielfältig und umfassen die Produktion antimikrobieller Substanzen (Silva et al. 1987). Die sichere Anwendung von *L. rhamnosus* GG als Probiotikum wurde ausführlich untersucht, sodass es insgesamt als weitestgehend unbedenklich eingestuft werden konnte (Snydman 2008).

### 1.3.2 *Streptococcus salivarius* K12

*Streptococcus salivarius* K12 ist ein in der natürlichen Mikrobiota des Oropharyngealraums gesunder Menschen vorkommendes, grampositives, kokkenförmiges Bakterium (Kazor et al. 2003; Carlsson et al. 1970). Der Stamm K12 wurde ursprünglich aus der Mundhöhle eines Kindes isoliert und wird inzwischen seit mehreren Jahren als Probiotikum kommerziell vertrieben (Wescombe et al. 2012). *S. salivarius* K12 zeichnet sich durch die Produktion von BLIS (*bacteriocin like inhibitory substances*) aus. Unter diesen antimikrobiell wirkenden Proteinen sind vor allem die Lantibiotika Salivaricin A2 und Salivaricin B hinsichtlich ihrer Charakteristika

und vermittelten Wirkung untersucht worden (Hyink et al. 2007). Diese Wirkung stellte ursprünglich eine *in-vitro* nachweisbare Wachstumshemmung von *Streptococcus pyogenes* dar. Inzwischen ist allerdings bekannt, dass *S. salivarius* K12 auch gegenüber einer Reihe weiterer bakterieller Erreger wie *Haemophilus influenzae* sowie gegenüber viralen Erregern und auch *Candida albicans* einen hemmenden Effekt aufweist (Ishijima et al. 2012). Insgesamt sind diverse klinisch relevante Wirkungen dieses Probiotikums im Rahmen von Studien näher untersucht worden. Dabei kann der präventive Einsatz von *S. salivarius* K12 zu einem deutlich reduzierten Wiederauftreten von sowohl bakteriell als auch viral bedingter Pharyngotonsillitis und Otitis media führen (Di Pierro et al. 2016). Beide Krankheitsbilder zählen zu den häufigsten Infektionen im Kindesalter. Des Weiteren kann durch den Erhalt des natürlichen Gleichgewichts in der oropharyngealen Mikrobiota erwachsener Menschen Halitosis vorgebeugt werden (Kazor et al. 2003). Eine protektive Wirkung zum Verhindern von dentalem Plaque wurde bisher für den *S. salivarius* Stamm M18 beschrieben (Wescombe et al. 2012). *S. salivarius* K12 wird primär präventiv, aber auch zum Wiederherstellen der natürlichen oralen Mikrobiota nach Antibiotikagabe verwendet. Der erfolgreiche Einsatz als Probiotikum zeichnet sich nicht zuletzt durch ein gutes Sicherheitsprofil mit ausgeprägter Antibiotikasensitivität sowie in immunkompetenten Menschen äußert selten auftretenden Nebenwirkungen aus (Burton et al. 2006).

## 1.4 Zielsetzung

Durch Staphylokokken ausgelöste Infektionen stellen besonders in Einrichtungen des Gesundheitswesens eine medizinische und ökonomische Herausforderung dar. Dieser Umstand liegt nicht nur in den Erkrankungen an sich begründet, sondern auch in der Fähigkeit dieser Bakterien, in Biofilmen zu persistieren und überdies gegenüber einer wachsenden Zahl antibiotischer Therapeutika ausgeprägte Resistenzen zu entwickeln.

Probiotische Bakterien werden zunehmend aufgrund ihres positiven Effekts auf die menschliche Gesundheit in den Fokus gerückt. Die nachgewiesenen Wirkungen sind sehr vielfältig und variieren je nach Bakterium, dessen Wirkort und -spektrum sowie den zugrundeliegenden Wirkmechanismen. *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Streptococcus salivarius* K12 stellen bereits seit einigen Jahren vorrangig in der Prävention verschiedenster Infektionskrankheiten etablierte Probiotika dar.

In der vorliegenden Arbeit soll die Problematik der Biofilmbildung als chronische Infektionsquelle sowie die Möglichkeit alternativer Therapie- bzw. Präventionsansätze zu Antibiotika näher beleuchtet werden. Daher wurden Kulturüberstände der probiotischen Bakterien *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 hinsichtlich ihrer *in-vitro* Wirkung auf planktonische und Biofilmformen von *S. aureus* und *S. epidermidis* im Sinne einer *proof-of-principle* Studie untersucht.

Zentrale Untersuchungspunkte waren:

1. *In-vitro* Untersuchungen des Effekts von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 auf *S. aureus* und *S. epidermidis*. Die genannten Bakterien wurden in dieser Konstellation bisher kaum zusammen erforscht.
2. Die Verwendung von sterilfiltrierten, aufkonzentrierten probiotischen Kulturüberständen als vermittelndes Agens anstelle der probiotischen Bakterien wurde hinsichtlich der Wirksamkeit überprüft.
3. Von besonderem Interesse war der Effekt der probiotischen Kulturüberstände auf den durch *S. aureus* und *S. epidermidis* gebildeten Biofilm. Dies wurde über Biofilmquantifizierung im Mikrotiterplatten-Lesegerät sowie in einer beispielhaften rasterelektronenmikroskopischen Auswertung untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Bakterienstämme

Bakterien	Kurzcharakteristika	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilmbildend, häufig ätiologisch relevanter Keim bei implantatassoziierten Infektionen	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Biofilmbildend, häufig ätiologisch relevanter Keim bei implantatassoziierten Infektionen	ATCC 35984
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Als Probiotikum therapeutische und präventive Verwendung	ATCC 53103
<i>Streptococcus salivarius K12</i>	Als Probiotikum präventiver Einsatz	Dr. J. Tagg, NZ

### 2.2 Nährmedien und Puffer

Im Folgenden sind die verwendeten Nährmedien und die Puffer-Lösung aufgeführt. Alle Nährmedien und der Puffer wurden nach der Herstellung bei 121 °C autoklaviert. Die Bestandteile beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen.

#### 2.2.1 Flüssigmedien

Die verwendeten Flüssigmedien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Flüssigmedien

<i>BHI – Brain Heart Infusion</i>	Lösen von 37 g BHI in 1 Liter Aqua dest.  Bestandteile: Hirn-Aufguss Bestandteile 12,5 g/l; Rinderherz-Aufguss Bestandteile 5 g/l, Proteosen Peptone 10 g/l, Glucose 2 g/l, Natriumchlorid (NaCl) 5 g/l, Natriumdiphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 2,5 g/l
<i>CB – Caso Bouillon</i>	Lösen von 30 g CB in 1 Liter Aqua dest.  Bestandteile: Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat) 17 g/l, Pepton aus Soja (Papainhydrolysat) 3 g/l, Natriumchlorid (NaCl) 5 g/l, di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) 2,5 g/l, Glucose-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ·H <sub>2</sub> O) 2,5 g/l

TSB – <i>Tryptic Soy Broth</i>	Lösen von 30 g TSB in 1 Liter Aqua dest. Bestandteile: Bacto Trypton (pankreatisch abgebautes Casein) 17 g/l, Bacto Soyon (peptisch abgebautes Sojabohnenmehl) 3 g/l, Glucose 2,5 g/l, Natriumchlorid (NaCl) 5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat 2,5 g/l
--------------------------------	--

### 2.2.2 Nährmedium fest

BHI Medium      Lösen von 37 g BHI und 15 g Agar (No. 3, Oxoid) in 1 Liter Aqua dest.,  
Agar No.3        Bestandteile: s. o., Autoklavieren bei 121 °C,  
                      Abkühlen auf ca. 55 °C im Wasserbad, Gießen in Petrischalen unter der  
                      Sterilbank, Aushärten-lassen des Agars über Nacht

### 2.2.3 Puffer

10x PBS –        Bestandteile: Natriumchlorid (NaCl) 80 g/l, Kaliumchlorid (KCl) 2,0 g/l,  
*phosphate*        Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 14,4 g/l,  
*buffered saline*    Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2,4 g/l,  
Stammlösung        Ad 1000 ml Aqua dest., Einstellen des pH auf 7.4

Gearbeitet wurde mit 1x PBS-Puffer. Dieser wurde aus der Stammlösung durch 1:10 Verdünnung mit Aqua dest, ggf. erneuter pH-Einstellung auf 7,4 und anschließender Autoklavierung hergestellt.

## 2.3 Probiotische Kulturüberstände

Probiotische Kulturüberstände – CFCS (*cell free culture supernatants*) – wurden aus *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) und *Streptococcus Salivarius* K12 (SK12) Kulturen gewonnen. Die Überstände wurden steril-filtriert und ggf. aufkonzentriert.

## 2.4 Humane Matrixproteine

Die verwendeten Matrixproteine wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland bezogen und sind nachfolgend aufgelistet: Fibrinogen F3879, Fibronektin F2006, Kollagen Typ I C7624.

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 3 sind Chemikalien und Reagenzien aufgelistet, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

*Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien*

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Agar Technical No. 3	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Aqua dest.	Apotheke der Universität Rostock, Deutschland
Bariumchlorid ( $\text{BaCl}_2$ )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BHI CM1135 Medium	Oxoid, Basingstoke Hampshire, England
CB Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Apotheke der Universität Rostock, Deutschland
Glutardialdehyd	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphatpuffer 0,1M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Stammlösung aus Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) und di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Safranin O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spülmittel fit®	fit GmbH, Zittau, Deutschland
TSB Medium	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

## 2.6 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 4 beinhaltet die für diese Arbeit genutzten Geräte und Hilfsmittel.

Tab. 4: Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Hersteller
Analysewaage Typ BP4100S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bechergläser	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Beschichtungsanlage BAL-TEC SCD 004 Sputter Coater	BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein
Brutschränk Binder Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Brutschränk HeraCell	Heraeus, Hamburg, Deutschland
Dampfsterilisator Vaculab PL	MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH, Planegg bei München, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav® 500	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Feinwaage AG135	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) Typ Herafreeze	Heraeus, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C) Liebherr Comfort	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierrocknungsanlage Christ Alpha 1-4	Martin Christ Gefrierrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Glasperlen (2,85-3,3 mm)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Koloniezählstift eCount™	VWR International, Wien, Österreich
Kritische Punkt Trocknungs-Anlage EMITECH K850	Quorum Technologies Ltd., Laughton East Sussex, England
Kühlschrank (+4 °C) Liebherr ProfiLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Laborflaschen DURAN® (500 ml, 1000 ml)	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Leuchtpult	Hama GmbH, Monheim, Deutschland
Lineal	Faber-Castell, Stein, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA®Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrotiterplatten- Lesegerät SpectraMax® M2 Multimode	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA
Multistepper Mutipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

pH Meter Series inoLab® pH720	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad Laboratorien GmbH, München, Deutschland
Pinzetten	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl PIPETMAN Classic®	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Finnpipette™ 10 ml, 20 ml, 50 ml	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Probenteller	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop Merlin VP compact	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Reagenzröhrchen DURAN®	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reinluftwerkbank Heraguard™	Heraeus, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage Ultra Clear Plus™	Systemische Gesellschaft Berlin, Deutschland
Stechbohrer zylindrisch	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sterilbank Typ Herasafe™	Thermo Schientific, Waltham, MA, USA
Vakuumpumpe	Welch (Ilmvac GmbH), Ilmenau, Deutschland
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industires, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Varifuge® 3.0R	Heraeus, Hamburg, Deutschland

## 2.7 Verbrauchsgüter

Tabelle 5 zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Verbrauchsgüter.

Tab. 5: Verbrauchsgüter

Verbrauchsgüter	Hersteller
24-Kavitäten-Mikrotiterplatten CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
2 ml Mikroschraubröhrchen	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland

50 ml Röhrchen CELLSTAR® Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland
96-Kavitäten-Mikrotiterplatten CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland
Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aufbewahrungsboxen für Reaktionsgefäß	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Columbia Blutagarplatten	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Deckgläschchen Thermanox™	Science Services GmbH, München, Deutschland
Eppendorfgefäß (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Flächendesinfektion Bacillol®	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Händedesinfektion AHD 2000®	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, Deutschland
Handschuhe Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland
Kapillarröhrchen Clinitubes	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Küvetten für Photometer (10x4x45 mm)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Markierband	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm M®	Bemis Corporate, Neenah, WI, USA
Petrischalen	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten CELLSTAR® (5,10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland
Spritzen 10 ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen 20 ml	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Stepper-Spitzen Combitips® Plus (10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter Sterifix® 0,2 µm	B.Braun, Melsungen, Deutschland

## 2.8 Software

Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die genutzte Software.

*Tab. 6: Software*

Software	Hersteller
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Microsoft Office 2013	Microsoft Ireland Operations Limited, Dublin, Ireland
SoftMax® Pro 5.4	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA
SmartSEM V05.07	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
IBM SPSS Statistics 20.0	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung der Bakterien

#### 3.1.1 Stammhaltung

Für die langfristige Lagerung der Bakterienstämme wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dazu wurde mittels einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie von einer Blutagarplatte entnommen und in 10 ml Bouillon übernacht kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt, 12 Stunden). Diese Übernachtkultur wurde im Anschluss zentrifugiert (5 min., 4500 UpM), das Sediment in einer Suspension aus BHI-Flüssigmedium und 60 % Glycerin im Verhältnis 1:1 resuspendiert und in Portionen zu 1.000 µl aliquotiert. Die Aufbewahrung erfolgte in Mikroschraubröhrchen bei -80 °C.

Für den regelmäßigen Gebrauch wurde je ein Aliquot eines Stamms aufgetaut, 100 µl mit einer Impföse daraus entnommen und auf Blutagarplatten ausplattiert. Die beimpften Platten wurden über Nacht bebrütet (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach Anwachsen der Keime in Form gleichartig aussehender Kolonien wurden diese als geeignet für die Durchführung weiterer Experimente erachtet und für maximal einen Monat bei + 4 °C gelagert. Danach erfolgte entweder das Überimpfen der Bakterien auf eine frische Platte oder eine erneute Entnahme und Prozessierung der Bakterien aus den eingefrorenen Proben.

#### 3.1.2 Übernachtkulturen

Zur Durchführung der Experimente wurden am Abend zuvor Übernachtkulturen der Bakterien in 10 ml des jeweils entsprechenden Mediums angesetzt. Die beimpften Röhrchen wurden für mindestens zwölf Stunden bei 37 °C unter einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre inkubiert.

#### 3.1.3 Bestimmen der optischen Dichte und Lebendkeimzahl

Anhand der optischen Dichte (OD) der beimpften und bebrüteten Bouillon konnte die Bakterienmenge bzw. nach mehreren Messungen über einen definierten Bebrütungszeitraum das planktonische Wachstum der Bakterien abgeschätzt werden. Die optische Dichte wurde bei 600 nm im Photometer gemessen. Als Referenz diente das jeweilige Medium. Ab einer OD<sub>600nm</sub> von >0,5 wurde eine stärker verdünnte Probe verwendet, um Messungenauigkeiten vorzubeugen.

In Vorversuchen wurde die optische Dichte mit der Lebendkeimzahl (LKZ) der Bakterien korreliert. Aus Übernachtkulturen von *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Anhand dieser OD konnten neue Übertagkulturen mit einem Endvolumen von 20 ml und einer Ziel-OD von 0,05 angefertigt werden. Die Übertagkulturen wurden für 8 Stunden weiter bebrütet (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Stündlich wurden der Kultur 1.000 µl entnommen, die sowohl zum Messen der optischen Dichte, als auch zum Ausplattieren und späteren Quantifizieren der gewachsenen Bakterien genutzt wurden. Aus diesen Ergebnissen konnte dann eine Regressionsgerade erstellt und eine lineare Geradengleichung errechnet werden, die den Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Lebendkeimzahl der Bakterien darstellt. Um die Lebendkeimzahl der Bakterien zu bestimmen, wurden zuvor serielle Verdünnungsreihen mit 1x PBS angefertigt und je 100 µl der zu untersuchenden Verdünnungsstufe mittels Schwenken mit sterilen Glasperlen gleichmäßig auf einer Agarplatte ausplattiert und für mindestens 12 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die Lebendkeimzahl der Bakterien wurde im Anschluss durch Auszählen der gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten und Bilden der entsprechenden Mittelwerte aus je drei Verdünnungsstufen bestimmt.

### 3.1.4 McFarland Trübungsstandard

Für einige Experimente wurde der McFarland Trübungsstandard als Indikator für die Bakteriendichte in den Proben verwendet. Prinzip des McFarland Standards ist ein visueller Vergleich der Trübung der verwendeten Bakterienkultur mit der 0,5 McFarland Standard Suspension. Durch Verdünnen mit 0,9 % NaCl kann dann gegebenenfalls die Trübung der Probe an den McFarland Standard angepasst werden. Anschließend wurde für den jeweiligen McFarland Standard die optische Dichte der Bakterienkultur im Photometer bei OD<sub>600nm</sub> bestimmt. In späteren Versuchen wurden die Proben dann auf die jeweils folgenden Ziel-ODs eingestellt:

*S. aureus*: McFarland 0,52 entsprach einer OD von 0,134

*S. epidermidis*: McFarland 0,51 entsprach einer OD von 0,132

*L. rhamnosus* GG: McFarland 0,51 entsprach einer OD von 0,122

*S. salivarius* K12: McFarland 0,51 entsprach einer OD von 0,124

### 3.1.5 Herstellung von Bakterienkulturen

Für die Herstellung von Bakterienkulturen wurden in der Regel am Tag zuvor angesetzte Übernachtkulturen verwendet (s. 3.1.2). Diese wurden nach erfolgter Inkubation zweimalig mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 Minuten, 4000 UpM), der Überstand verworfen und das Sediment mit 10 ml 1x PBS resuspendiert. Aus einer angefertigten 1:10 Verdünnungsstufe wurde dann die jeweilige OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Anhand der zuvor ermittelten Korrelation zwischen optischer Dichte und Keimzahl konnte für die jeweilige Probe mittels der gemessenen OD<sub>600nm</sub> eine reproduzierbare und gewünschte Konzentration Bakterien/ml Medium eingestellt werden. Dafür wurde ein errechnetes Volumen der gewaschenen Bakteriensuspension entnommen und auf ein definiertes Zielvolumen des entsprechenden Mediums gegeben.

## 3.2 Probiotische Kulturüberstände

### 3.2.1 Herstellung probiotischer Kulturüberstände

Es wurden drei Methoden zur Herstellung probiotischer Kulturüberstände hinsichtlich der Wirksamkeit ihres Endprodukts und dessen Handhabung miteinander verglichen: mittels Ultrafiltration, mittels gefriergetrocknetem Ultrafiltrat und mittels Lyophilisation aufkonzentrierte Kulturüberstände.

Die initialen Schritte in der Herstellung waren identisch und wurden wie folgt durchgeführt: Ansetzen von Übernachtkulturen von *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Streptococcus salivarius* K12 in 18 ml BHI-Flüssigmedium (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, mindestens 12 Stunden), dann Zentrifugation der Übernachtkulturen (15 Min., 4000 UpM, Raumtemperatur) und im Anschluss Sterilfiltration des gewonnen Kulturüberstandes. Die Porengröße des Filteraufsatzes erlaubte das Beibehalten von Bestandteilen des Kulturüberstandes mit einer Größe von unter 0,22 µm.

#### Ultrafiltration

Die Ultrafiltration beruht auf dem Prinzip, dass durch Zentrifugation der Proben die jeweiligen Bestandteile durch eine semipermeable Membran gepresst werden und durch den dabei entstehenden Druck Moleküle je nach Größe aufgeteilt werden können. Die Filter-Röhrchen (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, Merck) bestanden aus zwei Kammern, die durch den Filter mit einer Porengröße von 3K – durchlässig für Moleküle mit einem NMWL (*nominal molecular weight limit*) < 3 kDa – voneinander getrennt waren.

15 ml des sterilfiltrierten Kulturüberstandes wurden in die obere Kammer des Filter-Röhrchens gefüllt und zentrifugiert (4000 UpM, 60 Min., Raumtemperatur). Danach war im unteren Teil des Röhrchens das Ultrafiltrat mit Proteinen enthalten, für die der Filter durchlässig war und die entsprechend ein Molekülgehalt unter 3 kDa hatten. In der oberen Kammer waren einige 100 µl (i.d.R. ca. 200-300 µl) des aufkonzentrierten Produkts enthalten. Im Anschluss an diesen ersten Durchlauf konnten ggf. zusätzlich noch ‚Waschschrifte‘ angeschlossen werden, um die Proben weitestgehend zu entsalzen. Hierfür wurde das erhaltene Ultrafiltrat in der unteren Kammer verworfen, die obere Kammer des Filter-Röhrchens auf 15 ml 1x PBS aufgefüllt und die Probe erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert.

### **Lyophilisiertes Ultrafiltrat**

Eine weitere Möglichkeit war das eben beschriebene gewonnene Ultrafiltrat mit Molekülen eines NMWL < 3 kDa zu lyophilisieren und so aufzukonzentrieren.

### **Lyophilisation**

Die Lyophilisation bzw. Gefriertrocknung beruht auf dem Prinzip des Übergangs vom festen direkt in den gasförmigen Aggregatzustand eines Lösungsmittels. Dies ist möglich bei Erreichen von Temperaturen unterhalb des jeweiligen Gefrierpunktes dieses Lösungsmittels bei gleichzeitigem Bestehen eines Vakuums. Durch den Entzug von Flüssigkeit können Proben somit auf schonende Weise getrocknet werden.

Im Anschluss an die Sterilfiltration wurden die Kulturüberstände zu je 15 ml aliquotiert und eingefroren (-80 °C, mindestens 24 Std.). Danach konnten die Proben dann der Gefriertrocknung unterzogen werden. Dieser Prozess musste in der Regel mehrmals durchgeführt werden, um eine vollständige Trocknung der Probe zu erreichen. Das durch die Gefriertrocknung erhaltene Pulver aus ursprünglich 15 ml Überstand wurde in 1 ml autoklaviertem Aqua dest. gelöst. Hierdurch wurde eine 15-fache Aufkonzentrierung erreicht. Für die Durchführung der MHK- Versuche und Versuche zur zeitversetzten Einsaat wurden die Kulturüberstände stets in 30-facher Konzentration verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **3.2.2 Kapillaritätsbestimmung**

In Vorversuchen wurden die Steighöhen ausgewählter Flüssigkeiten in einer Kapillare bestimmt. Die zu testenden Flüssigkeiten wurden zu jeweils 200 µl in die Vertiefungen einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Kapillarröhrchen wurden dann mittels dünner Klebestreifen an

einem Reagenzglasständer befestigt. Unter diese Konstruktion wurde die mit den Testflüssigkeiten vorbereitete Mikrotiterplatte platziert, sodass die einzelnen Kapillarröhrchen mittig und bis in das untere Drittel der jeweiligen Vertiefungen reichten. Nach 30 Minuten wurden dann die jeweiligen Steighöhen der Testflüssigkeiten in den Kapillaren mittels eines Lineals in mm abgemessen.

Die Testflüssigkeiten umfassten sterilfiltrierte und lyophilisierte Kulturüberstände von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 in einer Höchstkonzentration vom ca. 30-fachen des Ausgangswertes sowie Testflüssigkeiten als Kontrollen. Die Positivkontrollen beinhalteten eine gesättigte Zuckerlösung (Sucrose 2,5 M), eine gesättigte Salzlösung (NaCl 5 M), herkömmliches Spülmittel und eine Mischung aus Spülmittel und Aqua dest., die Negativkontrollen dagegen BHI-Medium, Aqua dest. und PBS.

### 3.2.3 Dichtebestimmung

Anhand der Formel  $\rho = \frac{m}{V}$ , war es möglich die Dichte der einzelnen Testflüssigkeiten auszurechnen. Hier entspricht  $\rho$  der Dichte in  $\text{g}/\text{cm}^3$  bzw.  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $m$  der Masse und  $V$  dem Volumen. Die Masse der oben genannten Testflüssigkeiten wurde durch Wiegen eines mit 1.000  $\mu\text{l}$  gefüllten Eppendorf-Gefäßes auf der Feinwaage bestimmt. Durch Abwiegen des jeweiligen leeren Eppendorf-Gefäßes wurde der Tarawert ermittelt.

## 3.3 Versuche auf festem Medium

Diese Versuche wurden mit zweierlei Zielsetzung durchgeführt: zum einen wurden Bakterien kultiviert, um ein etwaiges Konkurrenzverhalten nachzuweisen und zum anderen, um Hemmwirkungen der Kulturüberstände in Form von Agardiffusionstests zu prüfen. Die Auslesung der Testergebnisse erfolgte durch makroskopische Inspektion der einzelnen BHI-Agarplatten. Es handelte sich um Vorversuche, bei denen vordergründig ein Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit (*proof of principle*) erbracht werden sollte. Daher wurden diese stetig in leicht abgewandelter Version zum Vorgängerversuch durchgeführt und sind, wenn nicht anders erwähnt, in der Regel nicht mehr als zweimalig identisch durchgeführt worden

### 3.3.1 Konkurrenztests

Über Konkurrenztests erfolgte eine erste Einschätzung des Wachstumsverhaltens der ausgewählten Bakterien in Ko-Kultur. Dabei wurde jeweils *S. aureus* bzw. *S. epidermidis* mit *L. rhamnosus* GG bzw. *S. salivarius* K12 gemeinsam auf eine Agarplatte inokuliert.

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden Übernachtkulturen angesetzt und diese am Folgetag auf einen McFarland Standard von 0,5 durch Verdünnung der entsprechenden Bakterienkultur mit 1x PBS auf eine zuvor festgelegte OD eingestellt (s. 3.1.4). 8 µl der so eingestellten Kulturen wurden auf eine BHI-Agarplatte aufgebracht, sodass sich die Tropfen der Kulturen unmittelbar nebeneinander befanden und sich fast berührten. Das Aufbringen auf die Agarplatte geschah entweder gleichzeitig oder als Variation nach bereits vorangegangener ca. 16 stündiger Inkubation und Wachstum der Staphylokokken. Genaue Parameterkonstellationen werden im Ergebnisteil ausgeführt. Nach erster bzw. erneuter Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 16 Std.) erfolgte dann die makroskopische Auswertung. Beurteilt wurde einerseits das Vorhandensein von Inhibitionszonen zwischen den Kulturen, d.h. Ränder bzw. Areale auf der Agarplatte, die frei von Bakterienkolonien waren, bzw. der makroskopische Effekt des Wachstumsverhaltens andererseits, entsprechend Überwuchern bzw. Eindringen der einen Kultur in das Areal einer anderen.

### 3.3.2 Agardiffusionstests

Bei den Agardiffusionstests wurde das Wachstumsverhalten von *S. aureus* und *S. epidermidis* unter Zugabe sterilfiltrierter Kulturüberstände der probiotischen Keime untersucht. Es wurden sowohl nicht-aufkonzentrierte als auch aufkonzentrierte Überstände verwendet.

Aus Übernachtkulturen von *S. aureus* und *S. epidermidis* wurden am Folgetag Bakteriensuspensionen (ca. 10<sup>7</sup> KBE/ ml) angefertigt und 100 µl davon auf einer BHI-Agarplatte ausplattiert. Dann wurden mittels eines sterilen Metall-Zylinders (8 mm Innendurchmesser) Kavitäten in den Agar gestanzt und diese mit 50 µl der vorbereiteten Kulturüberstände gefüllt. Alternativ wurde mit der Pinzette in Kulturüberstand getränktes steriles Löschklopfer aufgebracht. Nach Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 24 Std.) erfolgten die makroskopische Auswertung und das Messen der Inhibitionszone in mm um die Kavitäten bzw. das Löschklopfer.

## 3.4 Induktion von *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilmen

Der Einfluss von Nährmedien sowie eine Beschichtung der Versuchsoberfläche bzw. den Böden von 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten mit humanen Matrixproteinen wurden in Hinblick auf die Bildung von Biofilm durch *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht. Der quantitative Nachweis des Biofilms erfolgte über Absorptionsmessungen von Safraninfarbstoff bei OD<sub>492nm</sub> im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

### 3.4.1 Biofilmquantifizierung mittels Safraninfärbung

Zur Quantifizierung von *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilmen in den Testkavitäten wurde die Safraninfärbung genutzt. Diese ermöglichte durch das Anfärben extrazellulärer Matrix so Biofilmstrukturen makroskopisch sichtbar zu machen und über eine Absorptionsmessung im Mikrotiterplatten-Lesegerät zu objektivieren.

Für die Färbung wurde Safranin O genutzt. Zunächst erfolgte das vorsichtige Dekantieren des Inhaltes der Mikrotiterplatten über einen Abfallbehälter für infektiöse Flüssigkeiten. Dann wurden die Kavitäten zweimalig mit 1x PBS durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gespült. Nach einer kurzen Trockenperiode von wenigen Minuten wurden 200 µl einer 0,1 % Safraninlösung in jede Testkavität aufgebracht und für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde der beschriebene Waschvorgang wiederholt. Nach Trocknung der Kavitäten erfolgten eine erste makroskopische Auswertung und eine Absorptionsmessung der gefärbten Kavitätenböden im Mikrotiterplatten-Lesegerät. In diesen Messungen wurde die Absorption des gebundenen Safraninfarbstoffes bei OD<sub>492nm</sub> bestimmt. Die Nachweisgrenze für Biofilmstrukturen wurde für eine OD<sub>492nm</sub> von > 0,05 festgelegt.

### 3.4.2 Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche

Eine Beschichtung der Mikrotiterplatten mit den humanen Matrixproteinen Kollagen Typ I, Fibrinogen und Fibronektin sollte hinsichtlich der Adhärenz und Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* miteinander verglichen werden.

Die Proteinsuspensionen wurden nach Herstellerangaben zubereitet, zu ca. 500 µl aliquotiert und bei -20 °C für den weiteren Gebrauch gelagert. Die Beschichtung der Kavitäten in den Mikrotiterplatten wurde dann jeweils am Abend vor den geplanten Versuchen durchgeführt. Die jeweiligen Proteinsuspensionen wurden hierfür mit 1x PBS verdünnt, um eine Konzentration von 5 µg/ Kavität bei einem Volumen von 200 µl/ Kavität zu erreichen. Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Proteinsuspension durch Dekantieren vorsichtig aus den Testvertiefungen entfernt.

Die Mikrotiterplatten wurden dann in gleicher Weise wie für die übrigen Versuche genutzt: Aus Übernachtkulturen der Staphylokokken wurde eine Kultur (ca. 1x10<sup>6</sup> KBE/ ml, Bakterien und entsprechendes Medium) hergestellt und davon je 200 µl pro Kavität aufgebracht. Nach Ende der Inkubationsperiode (i.d.R. 24 Std, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) erfolgte der Biofilmnachweis durch Färben der Testvertiefungen mit 0,1 % Safranin.

### 3.4.3 Einfluss des Nährmediums

Die Verwendung von TSB- und CB-Nährmedien in Bezug auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* wurde miteinander verglichen.

Zunächst wurden Übernachtkulturen der Staphylokokken angesetzt, sowie 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten mit humanen Matrixproteinen beschichtet (s. 3.4.2). Am Folgetag wurden die Bakterien der Übernachtkulturen mit 1x PBS gewaschen und mit TSB- und CB-Nährmedium auf eine ungefähre Keimzahl von  $1 \times 10^6$  KBE/ ml eingestellt. Die Kulturen wurden zu 200 µl in die Kavitäten der Mikrotiterplatte aliquotiert und inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub>, 24 Std.). Im Anschluss wurde gewachsener Biofilm anhand der Safraninfärbung nachgewiesen und quantifiziert.

## 3.5 Versuche zur probiotischen Wirkung der Kulturüberstände

In Versuchsreihen zur probiotischen Wirkung der Kulturüberstände wurden diese zum einen zeitgleich aber in unterschiedlichen Konzentrationen und zum anderen zeitlich versetzt mit der Bakterieneinsaat in die Kavitäten der Mikrotiterplatten gegeben. Dabei wurde sowohl das planktonische Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* als auch die Biofilmbildung dieser Bakterienarten untersucht. Die 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten wurden dafür zuvor mit humanen Fibronektin beschichtet. Die Kulturüberstände von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 wurden mittels Lyophilisation aufkonzentriert und in ca. 30-facher Konzentration verwendet.

Die Auswertung der Versuche auf Mikrotiterplatten erfolgte über die folgenden Schritte: Der Trübningsgrad wurde zunächst makroskopisch über Vergleiche mit den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen ausgewertet und in ein Schema eingetragen. Zur Objektivierung der Ergebnisse wurde dann eine Endpunktmessung am Mikrotiterplatten-Lesegerät durchgeführt. Nachfolgend wurde in Abhängigkeit eines objektivierbaren Wachstums eine Safraninfärbung der Testkavitäten angeschlossen und die Farbintensität ebenfalls sowohl makroskopisch ausgewertet sowie über eine Absorptionsmessung im Mikrotiterplatten-Lesegerät objektiviert.

Bei den Endpunktmessungen wird die Transmission (Durchlässigkeit) von Licht mit 600 nm Wellenlänge durch die zu testenden Bakterienkulturen bzw. Medien gemessen. Anhand der *Absorbance* (Abschwächung der Strahlung), die mit dem Trübningsgrad der Bakterienkultur korreliert, konnte so das Wachstum der Bakterien in den jeweiligen Testkavitäten eingeschätzt werden. Die Auslesung der Ergebnisse zur Biofilmbildung mittels Safraninfärbung erfolgte analog den oben beschriebenen Versuchen (s. 3.4.1).

### 3.5.1 Versuche zur Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

In Versuchen zur minimalen Hemmkonzentration probiotischer Kulturüberstände wurde das planktonische Wachstum und die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* bei Zugabe unterschiedlich hoch aufkonzentrierter Kulturüberstände untersucht. Prinzip der MHK-Versuche ist die Inkubation von Bakterienkulturen gleichbleibender Konzentration mit einem antimikrobiellen Stoff in absteigender Konzentration auf einer Mikrotiterplatte. Beurteilt bzw. gemessen wird nach Inkubationsende dann der Trübungsgrad in den jeweiligen Kavitäten, welcher mit dem Bakterienwachstum korreliert. Diejenige niedrigste Konzentration der vorgelegten antimikrobiellen Substanz, die gerade das Wachstum verhindern mag und daher zu keiner Trübung in der Testkavität führt, wird als minimale Hemmkonzentration bezeichnet. Ebenfalls in den Testkavitäten gewachsener Biofilm kann im Anschluss über die Färbung mit Safranin quantifiziert werden. Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt:

Tag 1: Ansetzen von Übernachtkulturen von *S. aureus* in CB-Medium und *S. epidermidis* in TSB-Medium. Beschichten der Mikrotiterplatten mit humanen Fibronectin.

Tag 2: Zunächst wurden 200 µl des jeweiligen Kulturüberstandes in die 1. senkrechte Kavitätenreihe (‘Spalte’) sowie 100 µl für die Negativprobe in die letzte Spalte der Mikrotiterplatte gegeben. Ab der 2. Spalte wurden je 100 µl des entsprechenden Nährmediums aufgetragen. Danach wurde der Kulturüberstand durch vorsichtiges Pipettieren eines 100 µl Aliquots von Kavität zu Kavität seriell verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Einsaat von jeweils 100 µl Bakterienkultur in jede zuvor befüllte Kavität. Die Kulturen wurde dafür auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  KBE/ ml eingestellt. Durch diese Prozedur wurde die endgültige Konzentration sowohl der Bakterien als auch des Kulturüberstandes auf die Hälfte reduziert. Die Mikrotiterplatten wurden dann aerob inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub>, 24 Std.). Durch die genannten Verdünnungen ergaben sich sechs Konzentrationen bei ursprünglicher Zugabe von 30-fach aufkonzentrierten Überständen. Die Kulturüberstände hatten so de facto eine Konzentration von 15-fach, 7,5-fach, 3,75-fach, 1,8-fach, 0,9-fach und 0,46-fach der Ausgangskonzentration.

Die Mikrotiterplatten wurden stets so belegt, dass in jeder Versuchsreihe die dazugehörigen Positiv- (Staphylokokken im jeweiligen Medium) und Negativkontrollen (Medium abhängig von Staphylokokken und Kulturüberstand in Höchstkonzentration) vorhanden waren. Jeder Reihe wurde als technisches Replikat zweifach angelegt.

Tag 3: Die Auswertung erfolgte makroskopisch und im Mikrotiterplatten-Lesegerät als Endpunkt- und Absorptionsmessung.

### 3.5.2 Versuche zur zeitversetzten Einsaat der Kulturüberstände

Es wurde untersucht, ob der Zugabezeitpunkt der Kulturüberstände einen Einfluss auf Wachstum und Biofilmbildung der Staphylokokken hat. Die probiotischen Kulturüberstände wurden daher zu den Zeitpunkten 0,4 und 24 Stunden nach Einsaat der Bakterien in die Testkavitäten hinzugegeben. Die Gesamt-Inkubationsdauer betrug für diese Versuche 48 Stunden. Nachfolgend der Versuchsaufbau:

Tag 1: Übernachtkulturen wurden von *S. aureus* in CB- und von *S. epidermidis* in TSB-Medium angesetzt und die Mikrotiterplatten mit humanen Fibronectin beschichtet.

Tag 2: Die Bakterienkulturen wurden unter Verwendung des jeweiligen Nährmediums hergestellt (ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ ml) und zu je 100 µl pro Kavität, außer im Fall der Negativkontrolle, aliquotiert. Die Negativkontrollen beinhalteten je 100 µl Medium und 100 µl Kulturüberstand, sie wurden für 48 Stunden inkubiert. Um Referenzwerte für die Inkubation nach 24 und nach 48 Stunden zu erhalten, wurden 2 Positivkontrollen verwendet. Hier erfolgte außerdem die Zugabe von 100 µl des jeweiligen Mediums pro Kavität. Die vorletzte Spalte der Mikrotiterplatte entsprach der 48 Stunden Positivkontrolle. Auf einer zusätzlichen Mikrotiterplatte wurden die 24 Stunden Positivkontrollen angelegt. Es wurden direkt 100 µl Kulturüberstand in die vorgesehenen Kavitäten zur Stunde 0 zugegeben. Eine gleichmäßige Durchmischung von Bakterienkultur und Kulturüberstand im Verhältnis 1:1 wurde durch wiederholtes Betätigen der Druckpipette erreicht. Die Kulturüberstände lagen somit stets in 15-facher Konzentration vor. Die Inkubation erfolgte für insgesamt 48 Stunden mit kurzen Unterbrechungen zu den Zugabezeitpunkten nach 4 und 24 Stunden ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub>).

Tag 3: Auswertung der 24 Stunden Positivkontrolle und Zugabe der Kulturüberstände nach 24 Stunden.

Tag 4: Auswertung makroskopisch und im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

### 3.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde als zusätzliche Möglichkeit gewählt, um die Wirkung probiotischer Kulturüberstände zu untersuchen. Die Messungen im Mikrotiterplatten-Lesegerät bildeten die Grundlage für eine quantitative Auswertung der Biofilmbildung. Die Rasterelektronenmikroskopie erlaubte hingegen durch die detaillierte Darstellung der Biofilmarchitektur eine beispielhafte qualitative Auswertung der Versuchsergebnisse.

Der Versuchsablauf erfolgte analog den zuvor beschriebenen Versuchen mit entsprechend angepassten größeren Volumina (s. 3.5). Deckgläschen dienten hier als Probenträger zur Dokumentation des gewachsenen Biofilms. Die Staphylokokken wurden in unbeschichteten Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten mit je einem runden, sterilen, mit humanen Fibronectin beschichteten Kunststoff-Deckgläschen pro einer der 24 Kavitäten inkuliert und für 24 bzw. 48 Stunden unter aeroben Bedingungen inkubiert. Diese wurden nach Beenden der jeweiligen Inkubationsdauer (s. 3.5.1 und 3.5.2) den Kavitäten vorsichtig mittels einer Pinzette entnommen und einmalig mit 1x PBS gespült. Danach wurden die Deckgläschen zur Fixierung in mit 2,5 % Glutardialdehyd gefüllte Kavitäten einer neuen 24-Kavitäten-Mikrotiterplatte überführt und diese im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Die dortige Fixierung erfolgte für mindestens 24 Stunden. Die 2,5 % Glutardialdehyd Lösung wurde zuvor durch Verdünnen einer 25 % Stammlösung mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,3 hergestellt.

Im Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) der Universität Rostock fand dann die weitere Probenvorbereitung für die Nutzung im REM (Merlin VP compact, Carl Zeiss) statt. Die Proben wurden im Anschluss an die Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwärts, mittels Kritischer-Punkt-Trocknung maschinell getrocknet und mit Gold beschichtet. Anhand dieser weiteren Verarbeitungsschritte wurden die Proben für die Visualisierung im REM vakuumstabil und elektrisch leitfähig gemacht.

Hinsichtlich der Dokumentation wurde für jede Probe ein standardisiertes Vorgehen gewählt. Zunächst wurde in 100-facher Vergrößerung das gesamte Deckgläschen betrachtet bzw. abgefahren. Danach wurden Aufnahmen eines Areals in 3 Vergrößerungsstufen vorgenommen. Es wurde stets versucht möglichst genau dasselbe Untersuchungsfeld in 500-facher, 2.000-facher und 5.000-facher Vergrößerung festzuhalten. Die 500-fache Vergrößerung fungierte primär als Übersichtsaufnahme zur näheren Beurteilung des etwaig gewachsenen Biofilms und dessen Verteilung. Die 5000-fache Vergrößerung diente hingegen vordergründig zur genaueren Darstellung der Morphologie von Biofilm bzw. einzelnen Bakterien. Die 2.000-fache Vergrößerung belegte als „Zwischenaufnahme“ die Repräsentativität der 5.000-fachen Vergrößerung.

### **3.6.1 Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie**

Prinzip der REM ist das Nutzen eines Elektronenstrahls, der über die Oberfläche einer Probe wandert und dort in Wechselwirkung mit den Oberflächenelektronen tritt. Anhand der Informationen über diese Interaktionen kann ein Bild mit hoher Schärfentiefe und in starker

Vergrößerung erstellt werden. Voraussetzung hierfür ist einerseits die Anlage eines Vakuums, dementsprechend eine vorhandene Vakuumstabilität der Proben d.h. frei sein von Wasser und Lösungsmitteln und andererseits die Beschichtung der Probenoberfläche mit einem Schwermetall wie z.B. Gold.

### **3.6.2 Probenpräparation**

Die folgende Präparation der Deckgläschen fand im EMZ der Universität Rostock statt.

#### **Entwässerung:**

Die Proben wurden initial in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dafür wurden diese behutsam mit den einzelnen Probenbehältern in den Flüssigkeiten umgesetzt: Zunächst wurden die Proben zweimal in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,3 übergeführt und für 10 Sekunden inkubiert. Im Anschluss Überführung in 30 % Ethanol mit 10-sekündiger Inkubation. Dann Überführung in 50 % Ethanol mit 5 minütiger Inkubation. Danach Inkubation für 10 Minuten in 70 % Ethanol und 5 Minuten in 90 % Ethanol. Zuletzt zweimalig für je 10 Minuten in 100 % Ethanol.

#### **Trocknung:**

Im Anschluss an die Entwässerung der Proben fand die Kritische-Punkt-Trocknung in einer Trocknungsanlage statt (EMITECH K850, Quorum Technologies Ltd.). Bei der Trocknung wurde zunächst das Ethanol der Probe schrittweise durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt und daraufhin die Temperatur in der Probenkammer auf maximal 32 °C erhöht. Dies wiederum führte zu einer Erhöhung des Drucks innerhalb der Probenkammer auf 72 bar. Der kritische Punkt war erreicht, wenn das CO<sub>2</sub> vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand überging. Die Probe wurde so schonend getrocknet.

#### **Beschichtung:**

Die Beschichtung der getrockneten Präparate erfolgte mittels einer Spezialbedampfungsanlage (BAL-TEC Sputter Coater), sodass die Oberfläche der Proben mit einem 10 nm dünnen Goldfilm überzogen wurde. Dies war einerseits nötig, um die Materialien elektrisch leitfähig zu machen und eine elektrische Aufladung zu vermeiden. Andererseits ermöglichte die aufgebrachte Metallschicht das Erlangen einer höheren Signalausbeute mit entsprechend erhöhter Bildqualität.

### 3.7 Statistik

Die statistische Analyse, das Erstellen von Diagrammen und die Berechnung der Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Versuche in mindestens 3 biologischen Replikaten und jeweils einem technischen Replikat untersucht. Für die deskriptive Statistik wurden die Ergebnisse über Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Die Teststatistik wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet, welcher in der Regel als zweiseitiger Test durchgeführt wurde. Die resultierenden p-Werte wurden wie folgt festgelegt:  $p \leq 0,05$  (\*) als signifikant,  $p \leq 0,01$  (\*\*) als hoch signifikant und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) als höchst signifikant

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Korrelation der optischen Dichte zur Lebendkeimzahl von *S. aureus* und *S. epidermidis*

Eine Voraussetzung für die Durchführung der Experimente dieser Arbeit war es, die verwendeten Staphylokokkenkulturen stets in einer reproduzierbaren und definierten Konzentration anfertigen zu können. Um dies zu ermöglichen, mussten Versuche durchgeführt werden, die es erlaubten anhand der ermittelten Daten eine Korrelation zwischen optischer Dichte ( $OD_{600\text{nm}}$ ) und Lebendkeimzahlen (LKZ) von *S. aureus* und *S. epidermidis* herzustellen. Aus den Versuchsergebnissen konnte dann eine Regressionsgerade erstellt und eine lineare Geradengleichung errechnet werden, die den Zusammenhang zwischen den beiden Parametern optischer Dichte und Lebendkeimzahl der untersuchten Bakterien darstellt. Diese Geradengleichungen wurden dann für Folgeversuche genutzt, um die Konzentrationen der Staphylokokkenkulturen einzustellen.

Kulturen von *S. aureus* und *S. epidermidis* wurden in BHI-Flüssigmedium für 8 Stunden bebrütet (s. 3.1.3). Stündlich erfolgten die Messung der  $OD_{600\text{nm}}$  der Proben (Abb. 3), sowie die Bestimmung der Lebendkeimzahlen (Abb. 4).

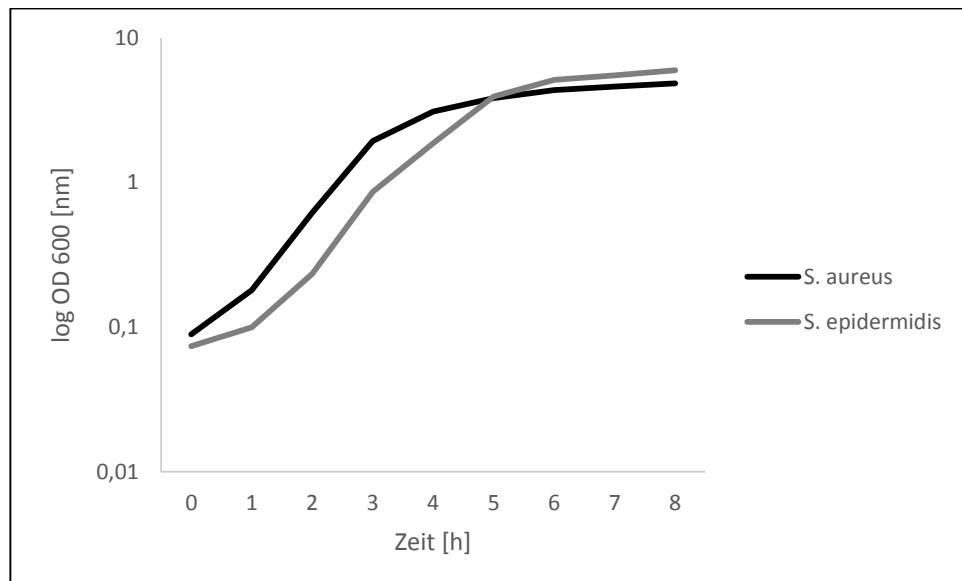
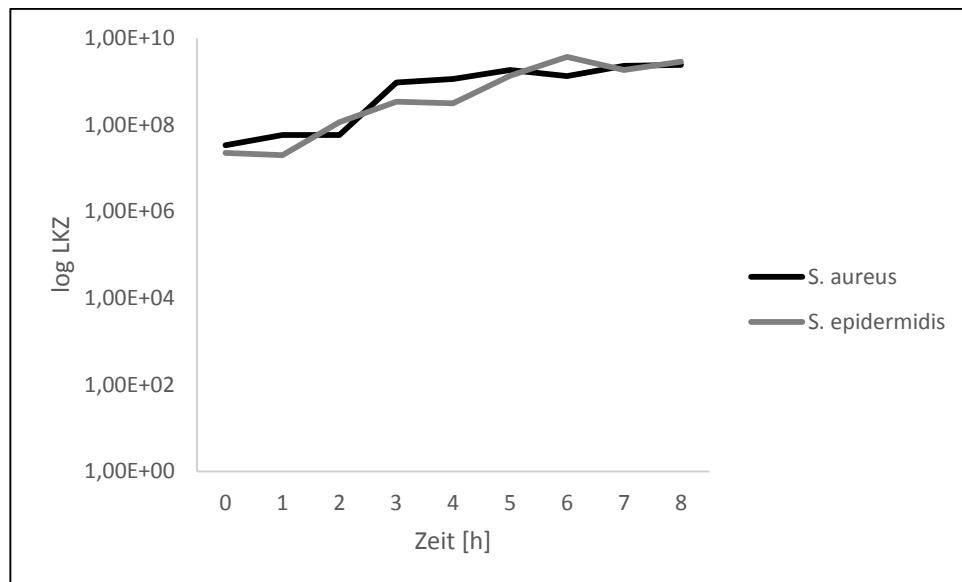


Abbildung 3: Entwicklung der optischen Dichte ( $OD_{600\text{nm}}$ ) von *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden. Dargestellt: Mittelwerte, n= 2

*S. aureus* und *S. epidermidis* zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten. Sie befanden sich nach ca. 2 Stunden Bebrütung bei 37°C in der exponentiellen Wachstumsphase. Die finale optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) nach 8 Stunden Inkubation betrug für *S. aureus* 4,84 und für *S. epidermidis* 5,98.

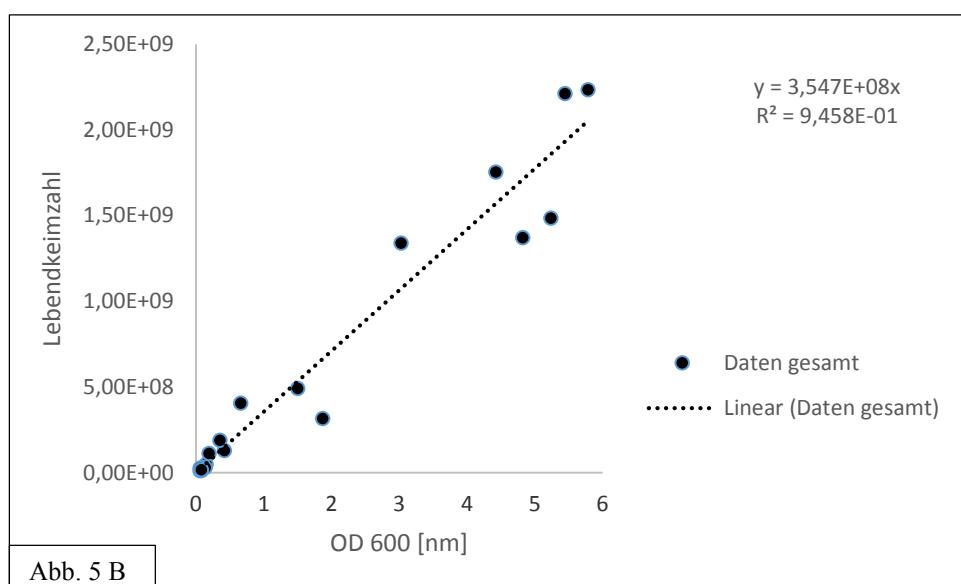
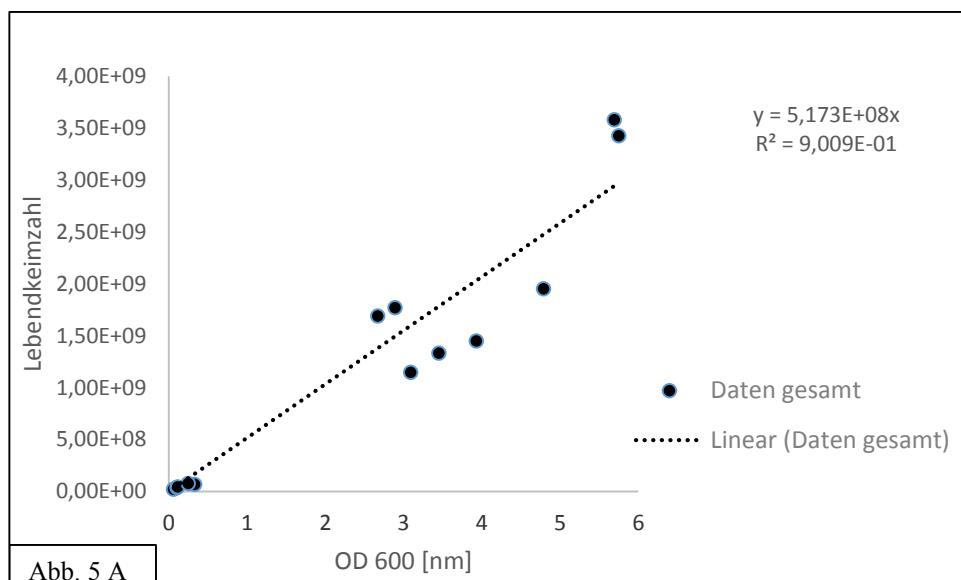
In Abbildung 4 sind die Veränderungen der Lebendkeimzahl (LKZ) von *S. aureus* und *S. epidermidis* über einen Zeitraum von 8 Stunden dargestellt.



**Abbildung 4: Entwicklung der Lebendkeimzahlen (LKZ) von *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden.** Dargestellt: Mittelwerte, n= 2.

Die Entwicklung der Lebendkeimzahlen der beiden Staphylokokken stieg ab 2 Stunden Inkubation annähernd linear in einer halblogarithmischen Darstellung an. Die Abweichungen vom linearen Kurvenverlauf erklären sich aus der geringen Anzahl von Versuchswiederholungen. Die finale Lebendkeimzahl betrug für *S. aureus* 2,44E+09 und für *S. epidermidis* 2,89E+09.

Die aus den Versuchsergebnissen ermittelten Regressionsgeraden für *S. aureus* und *S. epidermidis* sind nachfolgend dargestellt (Abb. 5 A-B).



**Abbildung 5 A-B: Korrelation zwischen optischer Dichte und Lebendkeimzahl anhand einer Regressionsgerade.** Ebenfalls abgebildet die lineare Geradengleichung für diesen Zusammenhang. *S. aureus* (Abb. 5 A), *S. epidermidis* (Abb. 5B).

Anhand der Regressionsgeraden wurden die folgenden Geradengleichungen aufgestellt. Der Lebendkeimzahl entsprach „y“ und der optischen Dichte „x“.

Für *Staphylococcus aureus*:  $y = 5,173 \times 10^8 x$

Für *Staphylococcus epidermidis*:  $y = 3,547 \times 10^8 x$

Für die Einstellung einer reproduzierbaren und definierten Bakterienkonzentration für Folgeversuche wurden in einem ersten Schritt die obenstehenden Geradengleichungen verwendet. Durch Einsetzen einer gewünschten Lebendkeimzahl in die Gleichung konnte diejenige Ziel-OD<sub>600nm</sub> ausgerechnet werden, auf die die Bakterien für den jeweils folgenden

Versuch eingestellt werden sollten. Nach Ermitteln der Ziel-OD<sub>600nm</sub> konnte dann in einem zweiten Schritt über eine weitere Rechnung anhand der untenstehenden Formel weiter verfahren werden.

$$OD\text{gemessen} \times Volumen\ A = OD\text{Ziel} \times Volumen\ Ziel$$

In dieser Formel entsprach „*ODgemessen*“ der im Photometer bestimmten OD<sub>600nm</sub> der jeweiligen Probe einer mittels 1x PBS gewaschenen und verdünnten Übernachtkultur. „*Volumen A*“ entsprach dem zu bestimmenden Ausgangsvolumen, welches aus der verdünnten Übernachtkultur entnommen werden musste. „*ODZiel*“ entsprach der Ziel-OD<sub>600nm</sub>, die mit der gewünschten Lebendkeimzahl der Bakterien korrelierte. „*Volumen Ziel*“ entsprach demjenigen Volumen der neu anzufertigenden Bakterienkultur, welches für die Durchführung des darauffolgenden eigentlichen Versuchs benötigt wurde. Es konnte also durch Messen der optischen Dichte im Photometer, sowie vorherigen Festlegung des nötigen Ziel-Volumens und Errechnen der Ziel-OD das jeweils aus der verdünnten Übernachtkultur zu entnehmende Volumen berechnet werden. Auf diese Weise wurden die Kulturen für *S. aureus* und *S. epidermidis* für Folgeversuche reproduzierbar eingestellt.

### 4.2 Versuche auf festem Medium

Für eine erste Einschätzung der antimikrobiellen Wirksamkeit von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 sowie deren Kulturüberständen gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten Staphylokokken wurden Versuche auf BHI-Agarplatten durchgeführt. Ziel war es einen antimikrobiellen Effekt durch die eben genannten probiotischen Bakterien, einerseits mittels Ko-Kultivierung und andererseits mittels Verwendung von Kulturüberständen, zu zeigen. Es handelte sich dabei um Versuche zum Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte makroskopisch, beurteilt wurden Wachstumsmuster sowie das Vorhandensein von Hemmhöfen auf den Agarplatten. Insgesamt erwiesen sich beide Versuchsreihen als nicht zielführend, sodass im Anschluss nach weiteren Möglichkeiten der Darstellung eines durch die probiotischen Bakterien vermittelten antimikrobiellen Effekts gesucht wurde.

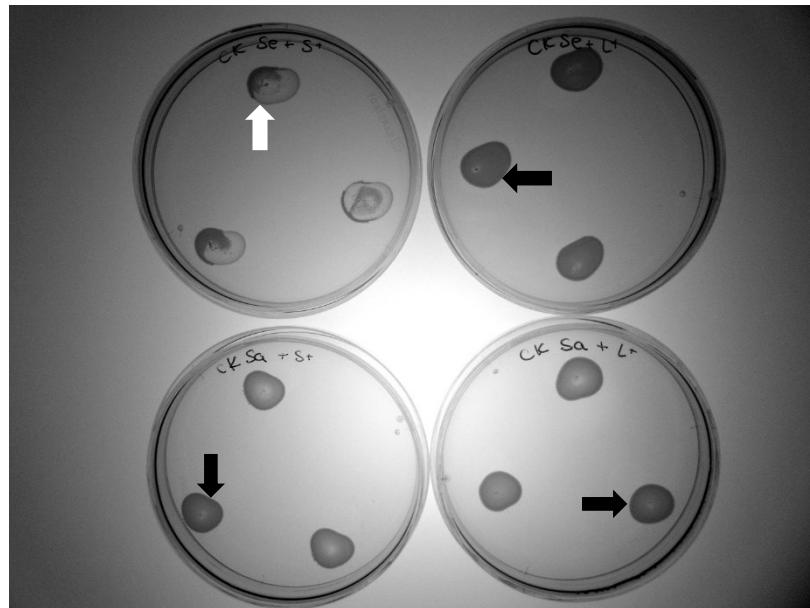
#### 4.2.1 Konkurrenztests

Ziel der Versuchsreihe zu Konkurrenztests ko-kultivierter Bakterien auf festem Medium war der direkte, makroskopisch sichtbare Nachweises der antimikrobiellen Potenz probiotischer Keime. Dabei sollten möglicherweise veränderte Wachstumsmuster bei Ko-Kultivierung von Staphylokokken mit den hier verwendeten probiotischen Keimen aufgezeigt werden. Hintergrund

war die Annahme, dass probiotische Bakterien antimikrobiell wirkende Substanzen sezernieren, die Einfluss auf das Wachstum anderer Bakterien haben könnten. Im Falle der Ko-Kultivierung könnten diese Substanzen vermehrt sezerniert werden und so direkt sichtbar das Wachstum der Nachbarkultur beeinflussen. Dies würde sich erwartungsgemäß in einem veränderten Wachstumsmuster, vornehmlich der Verdrängung der Staphylokokkenkultur durch die Kultur des probiotischen Keims oder der Ausbildung eines Hemmhofes um das angrenzende Areal der Kultur zeigen. Da auch in der natürlichen Umgebung eine Zeitfolge bei der Besiedlung von Oberflächen besteht, wurde dies im Versuchsaufbau nachvollzogen. Ferner wurden die Wachstumsbedingungen variiert. Für die Fälle des probiotischen Stamms als Erst- oder Zweitkolonisator wurde dessen Produktion von antimikrobiell wirkenden Substanzen unter diversen Inokulationsbedingungen überprüft.

Die Inokulation entsprechend präparierter Kulturen erfolgte zu jeweils 8 $\mu$ l auf BHI-Agarplatten (s. 3.3.1). Es folgen exemplarische Bilder von *S. aureus* bzw. *S. epidermidis* in Ko-Kultur mit *L. rhamnosus* GG bzw. *S. salivarius* K12 (Abb. 6, 7).

Abbildung 6 zeigt die Bakterien in übereinander inokulierten Ko-Kulturen.



**Abbildung 6:** *S. aureus* (S.a.) bzw. *S. epidermidis* (S.e.) in Ko-Kultur mit *L. rhamnosus* GG (L) und *S. salivarius* K12 (S). Staphylokokkenwachstum: dunkle Pfeile, Wachstum probiotischer Bakterien: heller Pfeil. Inokulation probiotischer Bakterien über bzw. in die Staphylokokkenkultur (+), 16 Std. 37 °C.

Bei gemeinsamer Inokulation von *S. epidermidis* mit *S. salivarius* K12 überwuchs der heller gefärbte Stamm (*S. salivarius* K12) den dunkler gefärbten (*S. epidermidis*). Dieser bzw. ein vergleichbarer Effekt konnte bei den übrigen Ko-Kulturen nicht erkannt werden.

Abbildung 7 zeigt die hier verwendeten Bakterien in benachbarten Ko-Kulturen.

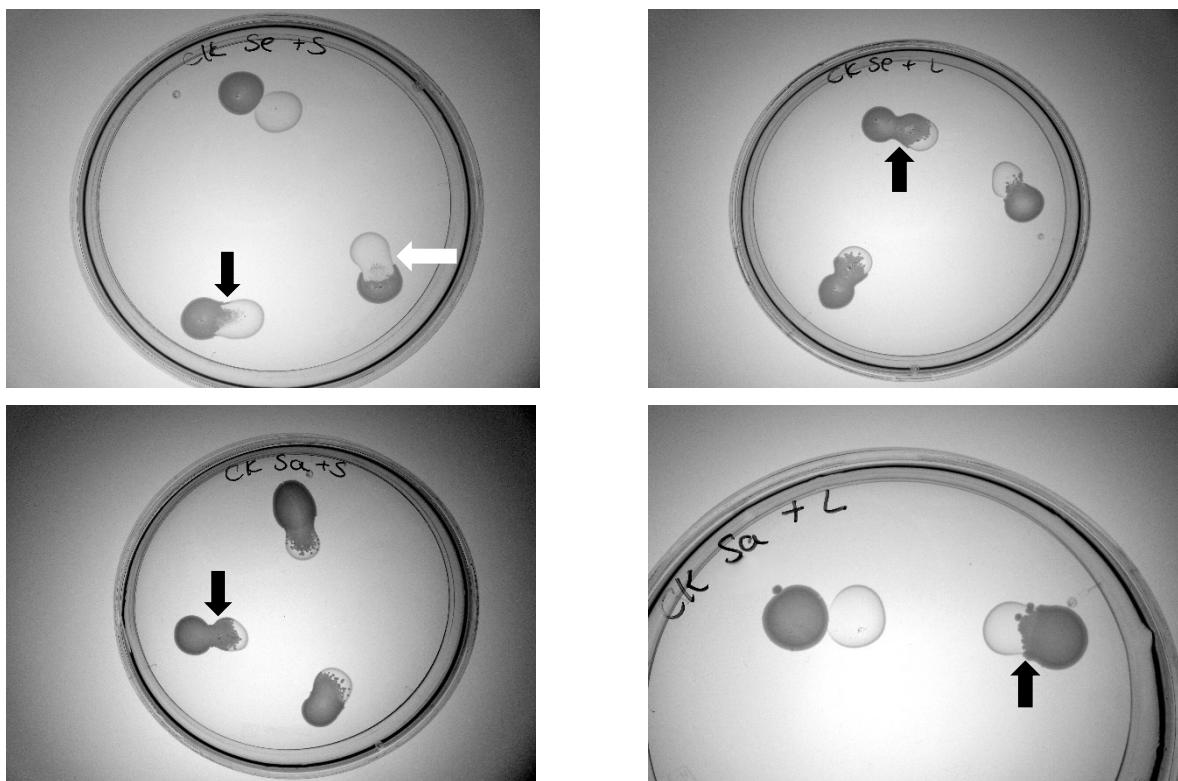


Abbildung 7: *S. epidermidis* (S.e.) bzw. *S. aureus* (S.a.) in Ko-Kultur mit *S. salivarius* K12 (S) bzw. *L. rhamnosus* GG (L). Staphylokokkenwachstum: dunkle Pfeile, Wachstum probiotischer Bakterien: heller Pfeil. Gleichzeitiges Aufbringen der Kulturen unmittelbar nebeneinander (16 Std, 37 °C).

Bei unmittelbar benachbarter Inokulation von *S. epidermidis* und *S. salivarius* K12 war zu beobachten, dass sowohl *S. salivarius* K12 in die *S. epidermidis* Kultur als auch umgekehrt *S. epidermidis* in die *S. salivarius* Kultur einwuchs. Deutlich überwuchernd wuchs *S. aureus* in die *S. salivarius* K12 Kultur bis zu deren fast vollständiger Verdrängung. In Ko-Kultur wurde *L. rhamnosus* GG stets verdrängt oder überwuchert durch die Kulturen von *S. aureus* und *S. epidermidis*.

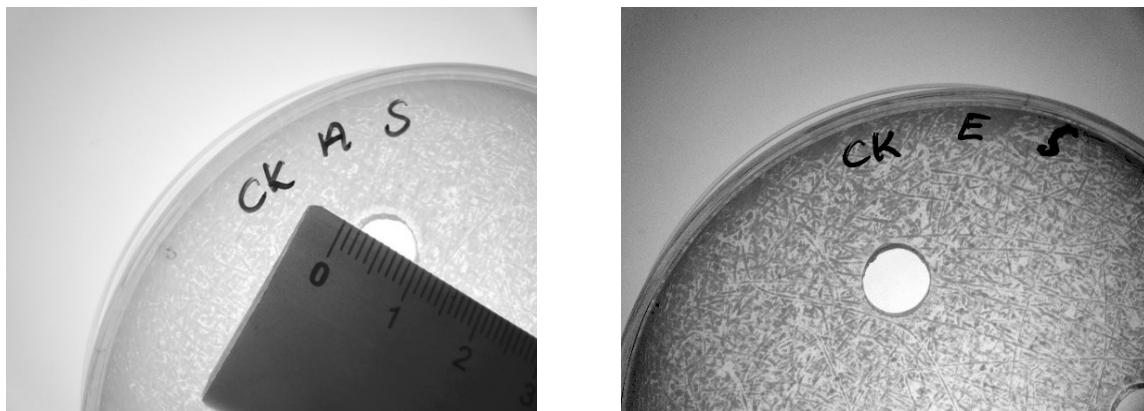
### 4.2.2 Agardiffusionstests

Als weitere Methode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung probiotischer Bakterien auf Staphylokokken wurden Agardiffusionstests durchgeführt. Ziel war es bei diesen Versuchen statt über Ko-Kultivierung einen durch in den Kulturüberständen enthaltene (Makro-)Molekülen vermittelten Einfluss auf das Wachstum der Staphylokokken zu demonstrieren. Von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 in 24-stündiger Inkubation sezernierten, möglicherweise antimikrobiell wirkenden Substanzen wurden mit dem Kulturüberstand isoliert und gemeinsam mit einer *S. aureus* oder *S. epidermidis* Kultur auf der Agarplatte inkuliert. Die Verwendung von Kulturüberständen in dieser Versuchsreihe bot weiterhin den Vorteil, dass man diese

weitestgehend beliebig aufkonzentrieren und dadurch möglicherweise in ihrer Potenz steigern, sowie unkompliziert lagern konnte. Des Weiteren konnten im Vergleich zu den erfolgten Konkurrenztests mögliche Faktoren wie Konkurrenz um Nährstoffe zwischen zwei Bakterienkulturen ausgeschlossen werden. Beurteilt wurde die Hemmhofbildung, entweder um zuvor in den Agar gestanzte Kavitäten oder um aufgebrachte Löschpapierplättchen. Zur Demonstration eines eindeutigen Effekts sollten die Hemmhöfe um die unterschiedlich konzentrierten Kulturüberstände eine Breite von mindestens 2 mm aufweisen.

Zunächst wurden die Versuche mit nicht aufkonzentrierten Überständen von *L. rhamnosus* GG Kulturen durchgeführt (nicht gezeigt). Aufgrund eines ausbleibenden inhibitorischen Effekts wurden die Überstände dann in höher aufkonzentrierter Form aufgetragen. Diese Versuchsreihe erfolgte in mehreren Ausführungen (s. 3.3.2). Parameter wie die Methode der Aufkonzentrierung der Überstände, deren Konzentrationsstufe, die Methode zur Aufbringung dieser auf die Agarplatte – in Kavitäten oder auf runden Löschpapier-Plättchen – und die Inkubationsdauer wurden gezielt verändert, um so auf jeden Fall einen Effekt auf das Wachstum zeigen zu können.

Nachfolgend ist exemplarisch die Exposition einer *S. aureus* bzw. einer *S. epidermidis* Kultur gegenüber *S. salivarius* K12 Kulturüberstand (Abb. 8) gezeigt.



**Abbildung 8: Agardiffusionstest.** *S. aureus* (A) und *S. epidermidis* (E) 'Rasen', eingestanzte Kavitäten mit *S. salivarius* K12 (S) Überstand in Höchstkonzentration, zeitgleich inkubiert (24 Std., 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Bei den durchgeführten Agardiffusionstests zeigte sich insgesamt keine eindeutige, mehrere Millimeter-messende Inhibitionszone rund um die gestanzten Kavitäten. Makroskopisch konnte daher ein inhibitorischer Effekt sowohl der unaufkonzentrierten als auch der aufkonzentrierten probiotischen Überstände auf das Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* nicht nachgewiesen werden.

### 4.3 Eigenschaften probiotischer Kulturüberstände

Über die folgenden Versuchsreihen wurden einige Eigenschaften der probiotischen Kulturüberstände näher untersucht und herausgearbeitet.

Vorrangig wurde die am besten geeignete Methode für die Aufkonzentrierung der Kulturüberstände in Bezug auf deren Handhabung und antimikrobiellen Potenz erarbeitet. Aufgrund unterschiedlicher Herstellungsprozesse resultierten auch unterschiedlich wirksame Kulturüberstände. Dies ermöglichte Rückschlüsse zu Eigenschaften wie Größe und Widerstandsfähigkeit der antimikrobiellen Substanzen.

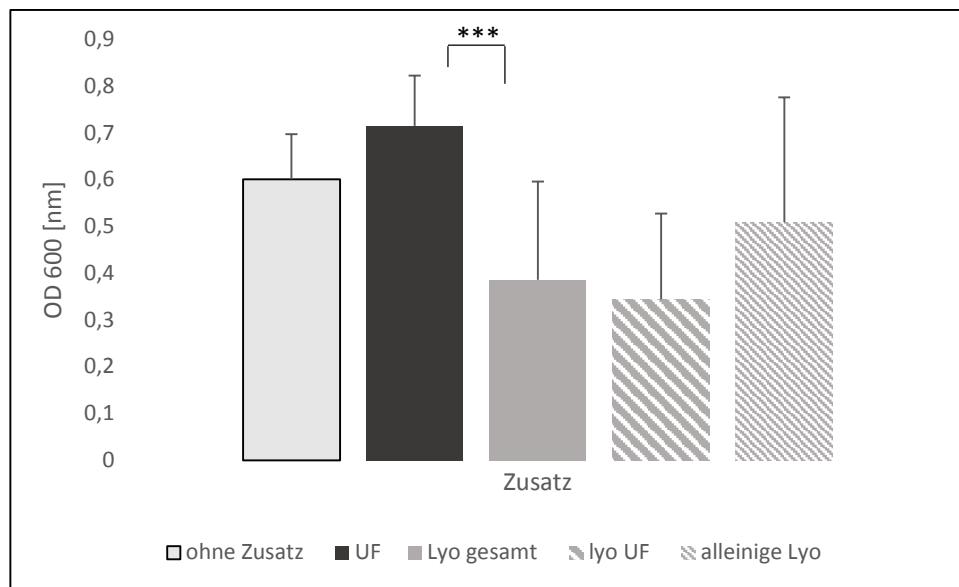
Des Weiteren wurden physikalische Eigenschaften der Kulturüberstände näher untersucht und hinsichtlich der Oberflächenspannung bewertet. Dies geschah einerseits durch eine Kapillaritätsbestimmung der zu untersuchenden Flüssigkeiten und andererseits über Bestimmung der Dichte dieser Flüssigkeiten. Diese Ergebnisse erlaubten einen Rückschluss auf eine detergierende Wirkung der Kulturüberstände.

#### 4.3.1 Einfluss der Herstellungsart auf die Wirksamkeit

Aus den Ergebnissen von Vorversuchen wurde ein Einfluss der Herstellungsart auf die Wirksamkeit der Kulturüberstände vermutet. Die unterschiedlichen Methoden der Aufkonzentrierung sollten daher hinsichtlich der Wirksamkeit ihres Endprodukts miteinander verglichen werden (s. 3.2.1). Ziel war es die für die Aufkonzentrierung am besten geeignete Methode bezüglich antimikrobieller Potenz sowie Handhabung zu ermitteln. Die Ultrafiltration bot den Vorteil einer vergleichsweise zügigen Herstellung innerhalb weniger Stunden sowie die Möglichkeit die gewonnenen Proben durch Waschvorgänge zu entsalzen. Die Lyophilisation erlaubte jedoch, dass auch kleinste Moleküle in den Kulturüberständen während der Herstellung nicht verloren gingen.

Es wurden Versuchsreihen auf Mikrotiterplatten durchgeführt, die in ihrem prinzipiellen Aufbau der Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen von Antibiotika entlehnt waren (s. 3.5.1). Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse wurden die Kulturüberstände dann für die weiteren Versuche dieser Arbeit mittels Lyophilisation aufkonzentriert.

Hinsichtlich des planktonischen Wachstumsverhaltens konnte über Endpunktmessungen (EP) im Mikrotiterplatten-Lesegerät eine erste Einschätzung der Wirksamkeit der mittels Ultrafiltration oder mittels Lyophilisation hergestellten Überstände vorgenommen werden. Nachfolgend wird der Effekt unterschiedlich aufkonzentrierter Kulturüberstände auf die optische Dichte von Bakterienkulturen aus Versuchen mit unbeschichteten Mikrotiterplatten gezeigt (Abb. 9).



**Abbildung 9: Effekt aufkonzentrierter probiotischer Kulturüberstände auf das Staphylokokkenwachstum.** Ohne Zusatz (Staphylokokken in Medium), UF (Ultrafiltration), Lyo gesamt (Lyophilisation), lyo UF (lyophilisiertes Ultrafiltrat), alleinige Lyo (alleinige Lyophilisation). Beispielhafte Darstellung für den Zusatz in 25 %iger Konzentration. Endpunktmessungen (OD<sub>600nm</sub>) nach 24 Std., n= 3. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen UF und Lyo gesamt.

Die OD<sub>600nm</sub> der Proben, die einem durch Lyophilisation aufkonzentrierten Überstand exponiert wurden, war deutlich niedriger als die im Fall der Exposition gegenüber durch Ultrafiltration aufkonzentrierter Kulturüberstände. Lyophilisiertes Ultrafiltrat und alleinige Lyophilisation wurden in der obenstehenden Abbildung unter „Lyophilisation“ zusammengefasst. Die beiden Methoden wurden zur Darstellung zusammengefasst, um eine deutlichere Abgrenzung zur Ultrafiltration zu schaffen. Des Weiteren wurden zu Übersichtszwecken Parameter wie die verwendeten Staphylokokken und die verwendeten Kulturüberstände zusammengefasst. Der Effekt bei beiden Methoden zur Lyophilisierung einzeln betrachtet erwies sich als ähnlich. Die alleinige Lyophilisation nahm eine Zwischenstellung zwischen Ultrafiltration und lyophilisiertem Ultrafiltrat ein. Das lyophilisierte Ultrafiltrat wies dabei gemessen an den niedrigsten Werten der OD<sub>600nm</sub> in der EP die stärkste Wirkung auf das Bakterienwachstum auf. Allerdings ist die Herstellung mittels Ultrafiltration und Lyophilisation besonders aufwändig und kostspielig. Daher wurde die alleinige Lyophilisation als im Vergleich zur Ultrafiltration wirksamere und in Bezug auf die Herstellung im Vergleich zum lyophilisierten Ultrafiltrat praktikablere Methode festgelegt.

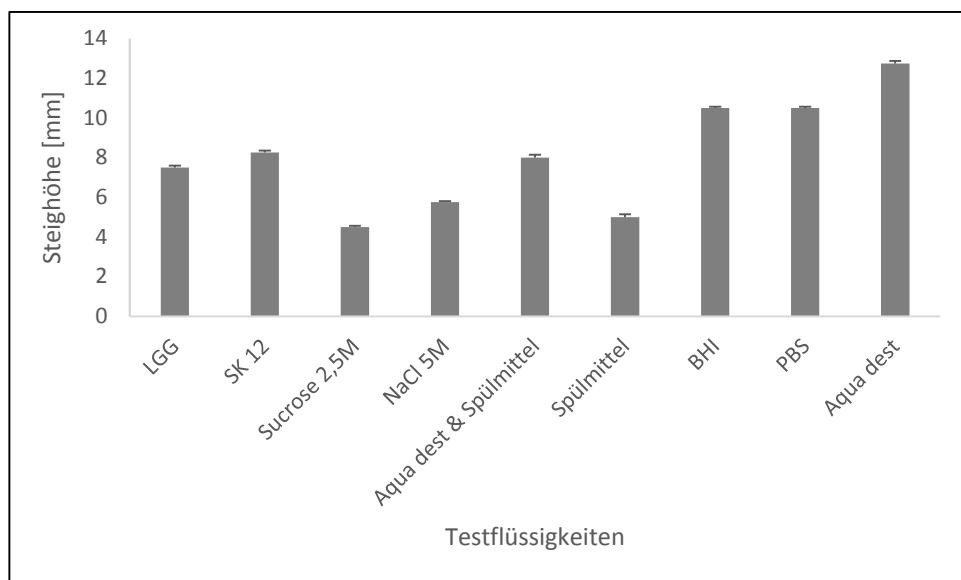
Die Versuche zum Einfluss unterschiedlich aufkonzentrierter Kulturüberstände auf das Biofilmwachstum waren aufgrund einer ungenügenden Biofilmbildung der verwendeten Bakterien nicht hinreichend aussagekräftig.

Zusammenfassend ist aus diesen Versuchen zu schließen, dass die wahrscheinlich für die antimikrobielle Wirksamkeit verantwortlichen Moleküle von einer geringen Größe sind. Bei der Ultrafiltration werden Stoffe mit einem NMWL unter 3 kDa herausgefiltert und stellen somit keinen Bestandteil der aufkonzentrierten Kulturüberstände dar. Aus diesem Grund wurde zum Vergleich die Herstellung von lyophilisierten Ultrafiltrat sowie alleinig lyophilisierter Proben vorgenommen. Die in beiden Fällen resultierende geringere optische Dichte spricht für ein verminderteres Wachstum der exponierten Bakterien und damit für die Anwesenheit von im Gegensatz zur Ultrafiltration noch vorhandenen antimikrobiellen Substanzen. Ebenfalls kann man von einer hohen Stabilität dieser Substanzen ausgehen. Im Zuge des Herstellungsprozesses wurden die Kulturüberstände mehrmals bis zu -80° C tiefgefroren und aufgetaut, ohne dass die antibiotische Wirkung verloren ging.

### 4.3.2 Kapillaritätsbestimmung

Die Kapillaritätsbestimmung, bzw. die Ermittlung der Steighöhen ausgewählter Flüssigkeiten in einer Kapillare ist für die Berechnung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten wichtig. Es war von Interesse, ob die verwendeten probiotischen Kulturüberstände die Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung der Suspensionen in den Test-Kavitäten herab- oder hinaufsetzten. Anhand der Zusammenschau dieser Ergebnisse sowie der Bestimmung der Dichte der Flüssigkeiten konnten Rückschlüsse darüber getroffen werden, ob diese detergierende Eigenschaften aufwiesen und die probiotischen Kulturüberstände so die Oberflächenadhärenz der Staphylokokken und folglich deren Biofilmbildung beeinflussen konnten.

Die Kapillarwirkung beruht auf dem Phänomen, dass Flüssigkeiten aufgrund ihrer Oberflächenspannung bei Eintauchen einer Kapillare in dieser emporsteigen. In den hier gezeigten Versuchen wurden die Messungen der aufgestiegenen Testflüssigkeiten in den Kapillaren nach 30 Minuten Steigzeit vorgenommen (s. 3.2.2 und Abb. 10).



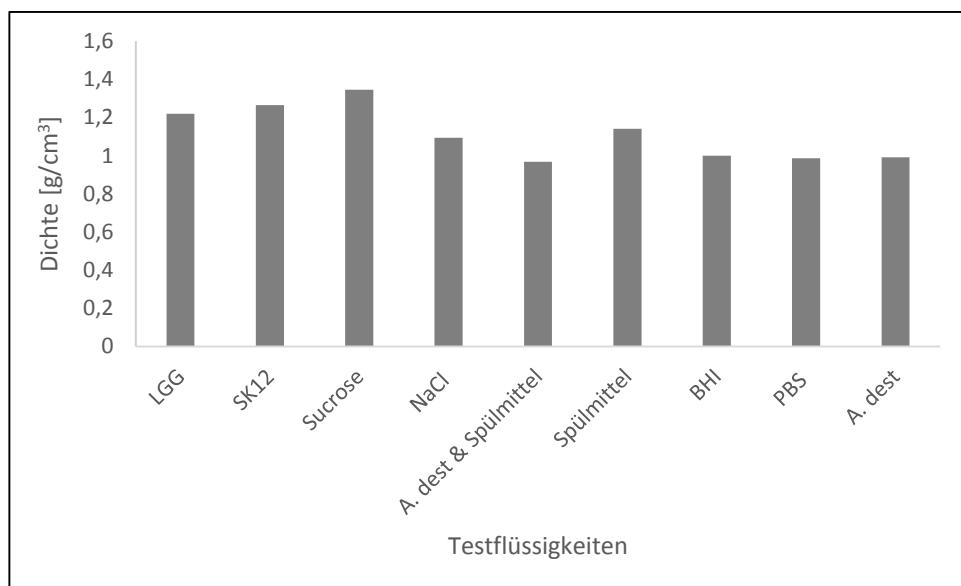
**Abbildung 10: Steighöhen ausgewählter Testflüssigkeiten in einer Kapillare.** LGG: *L. rhamnosus* GG CFCS, SK12: *S. salivarius* K12 CFCS. n=4., Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen.

Signifikante Unterschiede waren gleichermaßen zwischen LGG bzw. SK12 und Sucrose, NaCl, Spülmittel, BHI, PBS sowie Aqua dest. vorhanden (nicht dargestellt). Die probiotischen Kulturüberstände wiesen signifikant höhere Steighöhen als drei der vier Positivkontrollen, Sucrose 2,5M, NaCl 5M und Spülmittel auf. Im Gegenzug waren die Steighöhen der Kulturüberstände signifikant geringer als die der Negativkontrollen, sprich BHI, PBS und Aqua dest.

#### 4.3.3 Bestimmung der Dichte sowie Oberflächenspannung

Analog der Kapillaritätsbestimmung erfolgte die Bestimmung der Dichte als weiterer Parameter, um die Oberflächenspannung der jeweiligen Testflüssigkeiten besser einschätzen bzw. direkt ausrechnen zu können. Da die Dichte der Testflüssigkeiten Einfluss auf das eben beschriebene Phänomen der Kapillarwirkung hat, ist sie von Bedeutung für die ebenfalls im folgenden Abschnitt erläuterte Berechnung der Oberflächenspannung.

Es folgen zunächst die Ergebnisse der Dichtebestimmungen der verwendeten Testflüssigkeiten (s. 3.2.3 und Abb. 11).



**Abbildung 11: Dichte in g/cm³ ausgewählter Testflüssigkeiten.** Die Bestimmung der Dichte erfolgte über Abwiegen von mit je 1.000 µl gefüllten Eppendorf-Gefäßen auf der Feinwaage.

Die probiotischen Kulturüberstände wurden in ihrer Dichte lediglich von der Sucrose-Lösung übertroffen. Insgesamt wiesen beide Kulturüberstände eine vergleichsweise hohe Dichte auf.

Die im vorherigen Kapitel ermittelten Steighöhen der einzelnen Testflüssigkeiten sowie deren Dichtewerte korrelieren mit der Oberflächenspannung. Die Steighöhe der Testflüssigkeiten kann vornehmlich entweder aufgrund einer erhöhten Dichte erniedrigt sein oder aufgrund einer geringen Oberflächenspannung. Ein Vergleich wäre möglich zwischen Sucrose und SK12, da beide Flüssigkeiten ähnlich hohe Dichte aufwiesen aber unterschiedliche Steighöhen. Im Versuch erreichte SK12 eine höhere Steighöhe in den Kapillaren als Sucrose. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Oberflächenspannung von SK12 wesentlich höher sein müsste als die der Sucrose.

Anhand folgender Formel, und unter Kenntnis von Steighöhe und Dichte der Testflüssigkeiten sowie des Innenradius der verwendeten Kapillarröhrchen, lässt sich nun die Oberflächenspannung der verwendeten Testflüssigkeiten berechnen, um dies zu überprüfen:

$$\sigma = \frac{1}{2} \times g \times h \times r \times \rho$$

$\sigma$  = Oberflächenspannung in kg/s²

$g$  = Schwerkraftbeschleunigung 9,81 m/s²

$h$  = Steighöhe in mm

$r$  = Innenradius Kapillare 1,25 mm

$\rho$  = Dichte der Testflüssigkeiten in g/cm³

Nachfolgend die Ergebnisse für die Berechnung der Oberflächenspannung (Abb. 12):

Testflüssigkeiten	Steighöhen in mm	Dichte in g/cm <sup>3</sup>	Oberflächenspannung in kg/s <sup>2</sup>
LGG	7,5	1,2202	56,1101
SK12	8,25	1,2656	64,0176
Sucrose 2,5M	4,5	1,3451	37,1121
NaCl 5M	5,75	1,0934	38,5474
A. dest & Spülmittel	8	0,9679	47,4754
Spülmittel	5	1,1419	35,0063
BHI	10,5	1	64,3781
PBS	10,5	0,9867	63,5218
A. dest	12,75	0,9925	77,5871

Abbildung 12: Steighöhe, Dichte und Oberflächenspannung ausgewählter Testflüssigkeiten.

Durch detergierend wirkende Stoffe wie z.B. Spülmittel kann die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten bzw. die Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und fester Oberfläche reduziert werden. Dies führt dazu, dass sich Stoffe besser mischen und weniger an der Gefäßwandung adhärieren. Im Zuge der Versuche auf Mikrotiterplatten war von Interesse, ob die dort beobachteten Phänomene auf eine mögliche Oberflächenadhärenz der Zielbakterien zurückzuführen sind. Und inwiefern diese Adhärenz möglicherweise auch durch detergierende Bestandteile der verwendeten probiotischen Kulturüberstände beeinflusst werden konnte. Anhand des beispielhaften Vergleichs von SK12 mit Sucrose lässt sich schließen, dass der probiotische Kulturüberstand keine oder nur eine geringe detergierende Wirkung aufweist. Dementsprechend dürften die Oberflächenadhärenz der Zielbakterien und damit deren Fähigkeit zur Biofilmbildung nicht durch eine Detergenzwirkung beeinflusst worden sein.

#### 4.4 Induktion von *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilmen

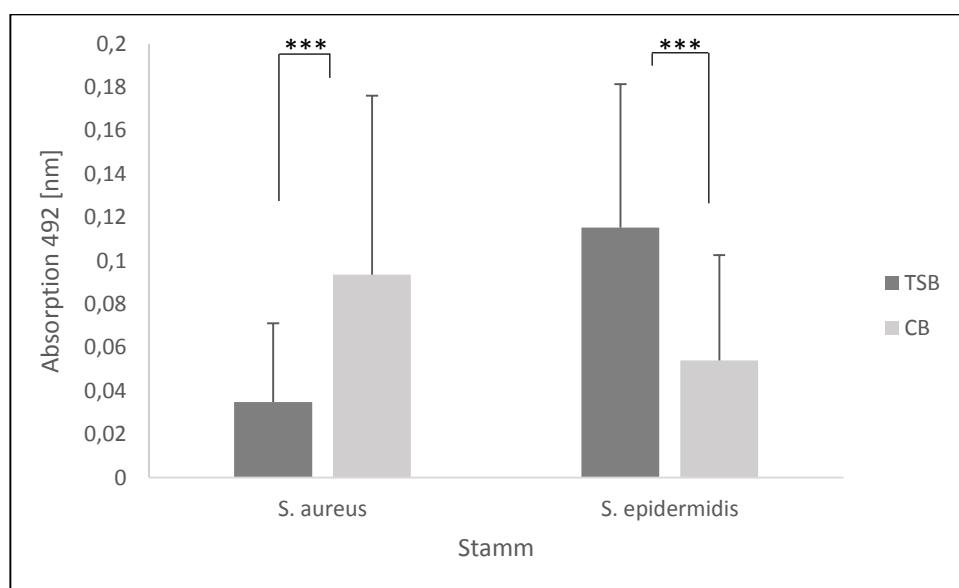
In den bisherigen Versuchen wurde eine wenn nur geringfügige Biofilmbildung bei Kultivierung von *S. aureus* und *S. epidermidis* in BHI-Nährmedium und unbeschichteten 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten beobachtet. Für Folgeversuche war jedoch ausgiebiger Biofilm Voraussetzung für den Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse. Daher mussten fördernde Kultivierungsbedingungen zur Ausbildung von Biofilm etabliert werden.

In parallelen Versuchen wurde der Einfluss zweier Nährmedien und unterschiedlicher Matrixproteine auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht und verglichen. Ziel war es die optimalen Kultivierungsbedingungen für die ergiebigste Biofilmbildung durch die Staphylokokken zu ermitteln und in weiteren Versuchen zu nutzen. Für die Quantifizierung von Biofilm mittels Safraninfärbung und anschließender Absorptionsmessung im Mikrotiterplatten-Lesegerät wurde als unterer Grenzwert eine OD<sub>492nm</sub>

von 0,05 festgelegt. Aufgrund der nachfolgend geschilderten Ergebnisse wurde in den weiteren Experimenten mit humanen Fibronektin beschichteten 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten weitergearbeitet. *S. aureus* wurde stets in CB-Nährmedium und *S. epidermidis* in TSB-Nährmedium kultiviert.

### 4.4.1 Einfluss des Nährmediums

Eine Möglichkeit das Wachstum von Biofilm zu fördern, stellt die Wahl eines geeigneten Nährmediums dar. Für diesen Zweck wurden TSB- und CB-Nährmedium in früheren Studien erfolgreich verwendet und daher hier hinsichtlich ihres Effekts auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* verglichen (s. 3.4.3 und Abb. 13).



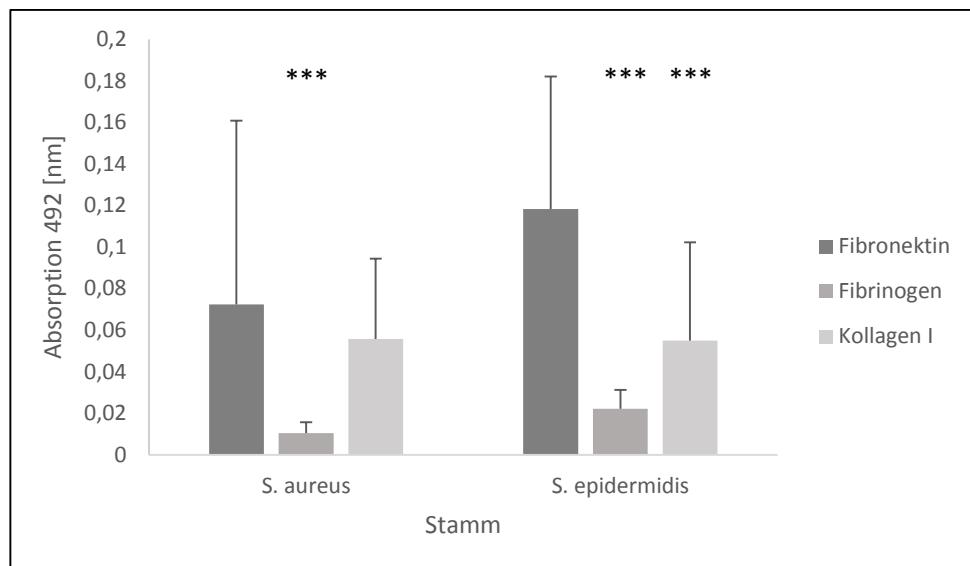
**Abbildung 13: Quantifizierung der Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* unter Verwendung von CB- und TSB-Nährmedium.** Absorptionsmessung ( $OD_{492\text{nm}}$ ) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab  $OD_{492\text{nm}} > 0,05$ . n= 3. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede (\*).

Die stärkste Safraninfarbintensität, und dementsprechend die kräftigste Biofilmbildung konnte bei der Verwendung von CB-Nährmedium bei *S. aureus* und TSB-Nährmedium bei *S. epidermidis* nachgewiesen werden. Diese Unterschiede waren trotz sehr ähnlicher Zusammensetzungen der Nährmedien höchst signifikant für jeden Stamm im Vergleich mit dem jeweils anderen Nährmedium.

### 4.4.2 Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche

Die Beschichtung der Versuchsoberfläche mit humanen Matrixproteinen stellt einen weiteren Ansatz dar die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* zu unterstützen. In der Literatur fanden sich als häufig verwendete Matrixproteine vor allem Fibrinogen, Fibronektin und Kollagen I, die daher für die folgenden Versuche ausgewählt wurden. Die Staphylokokken

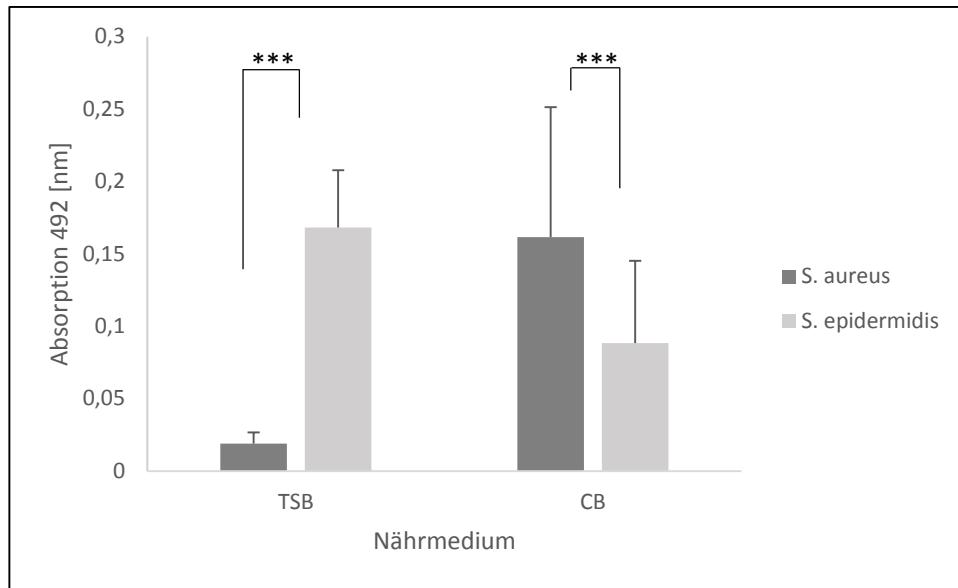
wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe auf beschichteten 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten kultiviert und gewachsener Biofilm nach 24-stündiger Inkubation im Mikrotiterplatten-Lesegerät quantifiziert (s. 3.4.2, Abb. 14).



**Abbildung 14: Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche mit humanen Fibronektin, Fibrinogen und Kollagen auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis*.** Absorptionsmessung ( $OD_{492\text{nm}}$ ) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab  $OD_{492\text{nm}} > 0,05$ . n= 3. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zu Fibronektin.

Unter Verwendung von mit humanen Fibronektin beschichteten 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten konnte die stärkste Intensität der Safraninfärbung nachgewiesen werden. Beide Staphylokokken bildeten also unter vorheriger Oberflächenbeschichtung mit Fibronektin den ergiebigsten Biofilm. Die Unterschiede zu mit Fibrinogen und Kollagen I beschichteten Testkavitäten waren für *S. epidermidis* höchst signifikant. Für *S. aureus* konnte ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Fibronektin und Fibrinogen gezeigt werden. Die statistisch signifikanten Unterschiede (\*\*\*) in dem obenstehenden Diagramm entsprechen dem jeweiligen Vergleich zu ‚Fibronektin‘.

Die vergleichsweise hohen Standardabweichungen in den Abbildungen 13 und 14 sind bedingt durch das Zusammenfassen der Ergebnisse unterschiedlicher Kombinationen von Stamm und Medium. Bei detailliertem Betrachten einzelner Konstellationen wird offensichtlich, warum sich für die Konstellation Beschichtung mit humanen Fibronektin und Verwendung von CB-Nährmedium zur Kultivierung von *S. aureus* und TSB-Nährmedium zur Kultivierung von *S. epidermidis* entschieden wurde (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Nährmedien-abhängige Biofilmbildung in mit Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatten. Absorptionsmessung ( $OD_{492\text{nm}}$ ) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab  $OD > 0,05$ .  $n= 3$ . Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede.

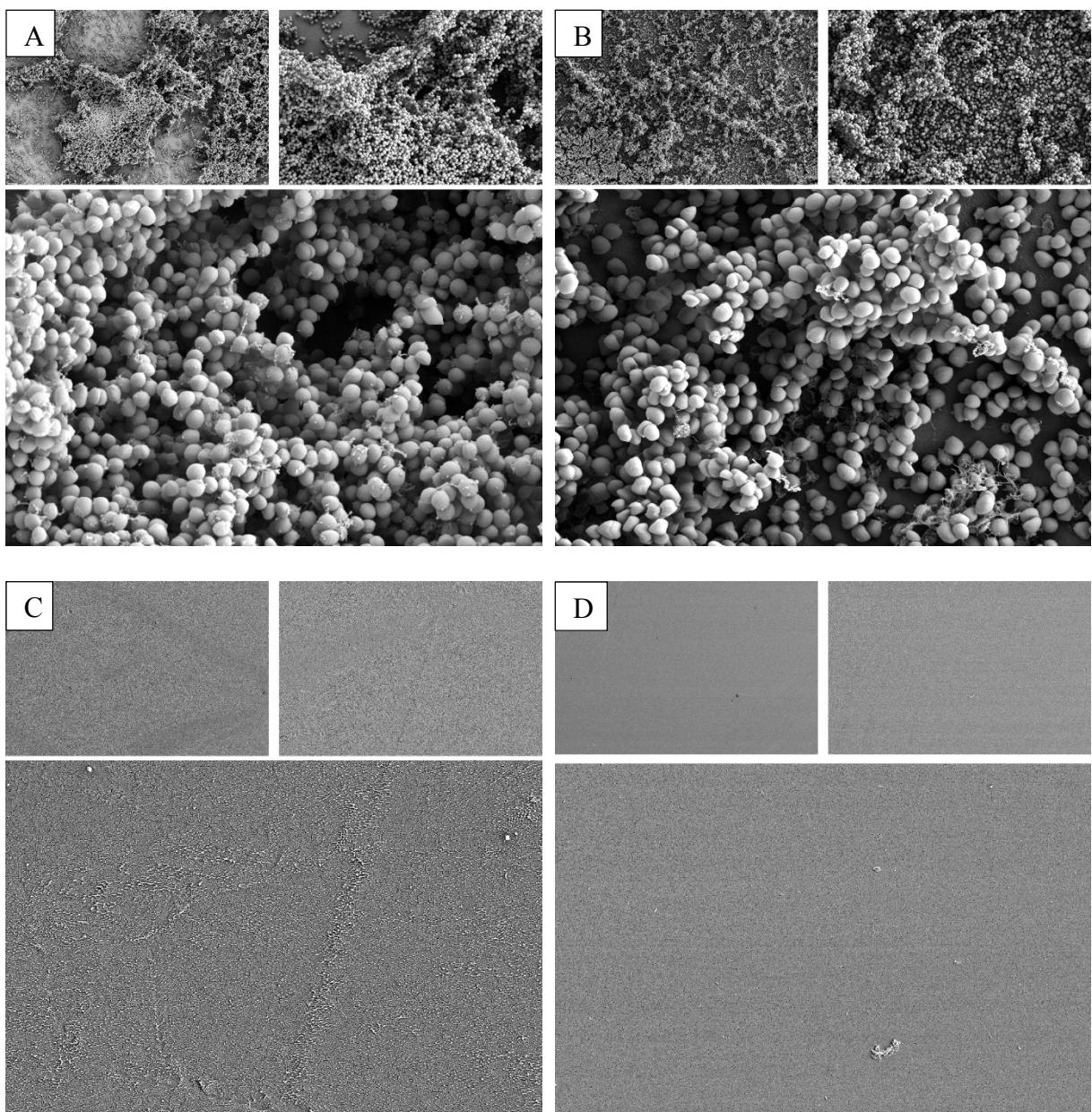
Es bestanden höchst signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Konstellationen von Stämmen und Medien. Der ergiebigste Biofilm durch *S. aureus* wurde bei Beschichtung der Versuchsoberfläche mit humanen Fibronectin und Kultivierung in CB-Nährmedium erreicht. Für *S. epidermidis* bestanden die optimalen Bedingungen für die Bildung von Biofilm ebenfalls in der Beschichtung mit Fibronectin, allerdings in Kombination mit TSB-Nährmedium.

#### 4.5 Versuche zur Minimalen Hemmkonzentration (MHK) probiotischer Kulturüberstände

Die Versuchsreihe zur minimalen Hemmkonzentration stellte eine objektive sowie genaue Möglichkeit dar, die Wirkung probiotischer Kulturüberstände auf Wachstum und Biofilmbildung ausgewählter Staphylokokken zu untersuchen. In vorangegangenen Versuchen zu Konkurrenztests und Agardiffusionstests auf festen Medien wurde grundsätzlich ein ähnliches Ziel verfolgt. Beide eher qualitativen Versuchsreihen erwiesen sich aber hinsichtlich der Demonstration eines eindeutigen, durch *L. rhamnosus* GG bzw. *S. salivarius* K12 vermittelten, vorrangig antimikrobiellen Effekts auf die Staphylokokken als nicht ausreichend. Dieser Umstand machte eine quantitative Prüfung zur Wirkung potentiell im Kulturüberstand enthaltener probiotischer Substanzen notwendig. Die Versuchsdurchführung erfolgte in mit humanen Fibronectin beschichteten 96-Kavitäten Mikrotiterplatten bzw. für die Untersuchung mittels REM auf mit Fibronectin beschichteten runden Deckgläsern (s. 3.5.1).

Der Effekt auf das planktonische Wachstum wurde über Endpunktmessungen bei OD<sub>600nm</sub> bestimmt (s. 3.5). Die Untersuchungen zur Biofilmbildung erfolgte in zwei Schritten: Vorrangig wurde die Wirkung der Kulturüberstände über Absorption des Safraninfarbstoffs im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen (s. 3.4.1). Zusätzlich wurden beispielhaft zu jedem Untersuchungszeitpunkt vorhandene Biofilmstrukturen rasterelektronenmikroskopisch dokumentiert (s. 3.6).

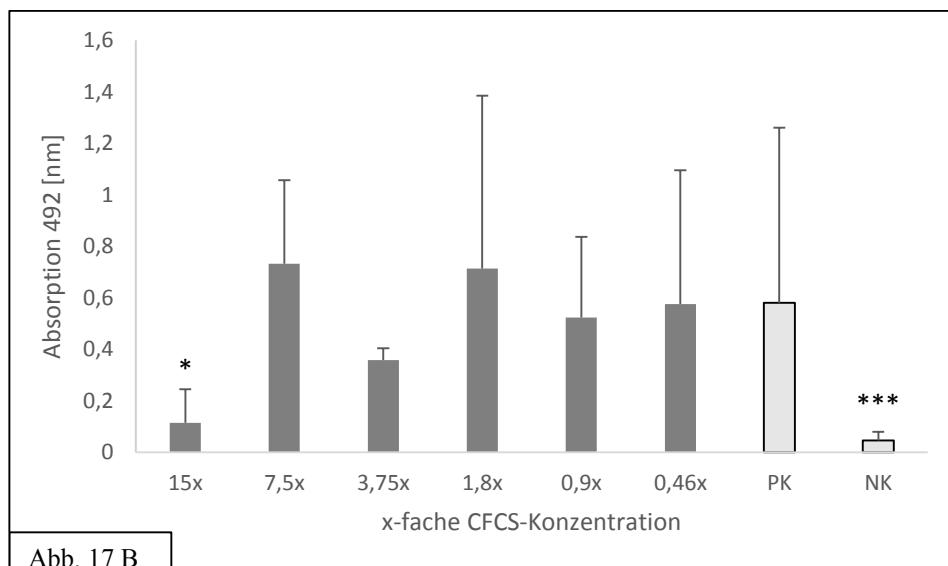
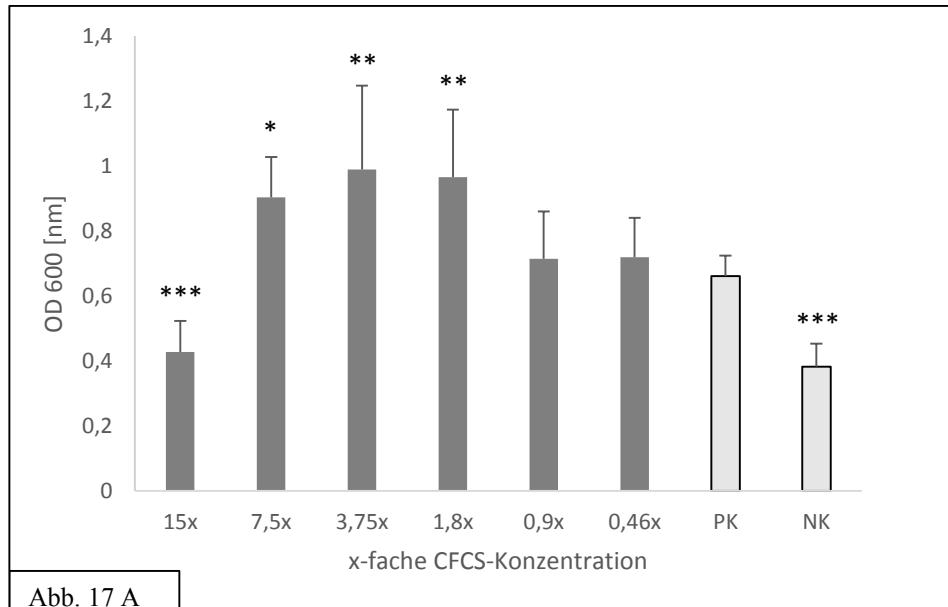
Initial erfolgt in Abbildung 16 A-D die rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Positiv- (*Staphylokokken* im jeweiligen Medium) sowie der Negativkontrollen (Kulturüberstand und Medium).



**Abbildung 16 A-D: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung.** A= *S. aureus*/ CB-Medium 24 Std. Inkubation. B = *S. epidermidis*/ TSB-Medium 24 Std. Inkubation. C= CB-Medium/ *S. salivarius* K12 CFCS, D= TSB-Medium/ *L. rhamnosus* GG CFCS.

#### 4.5.1 Kultivierung von *S. aureus* unter Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand

Nachfolgend wird die Wirkung von aufkonzentriertem *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. aureus* dargestellt (Abb. 17 A-B).



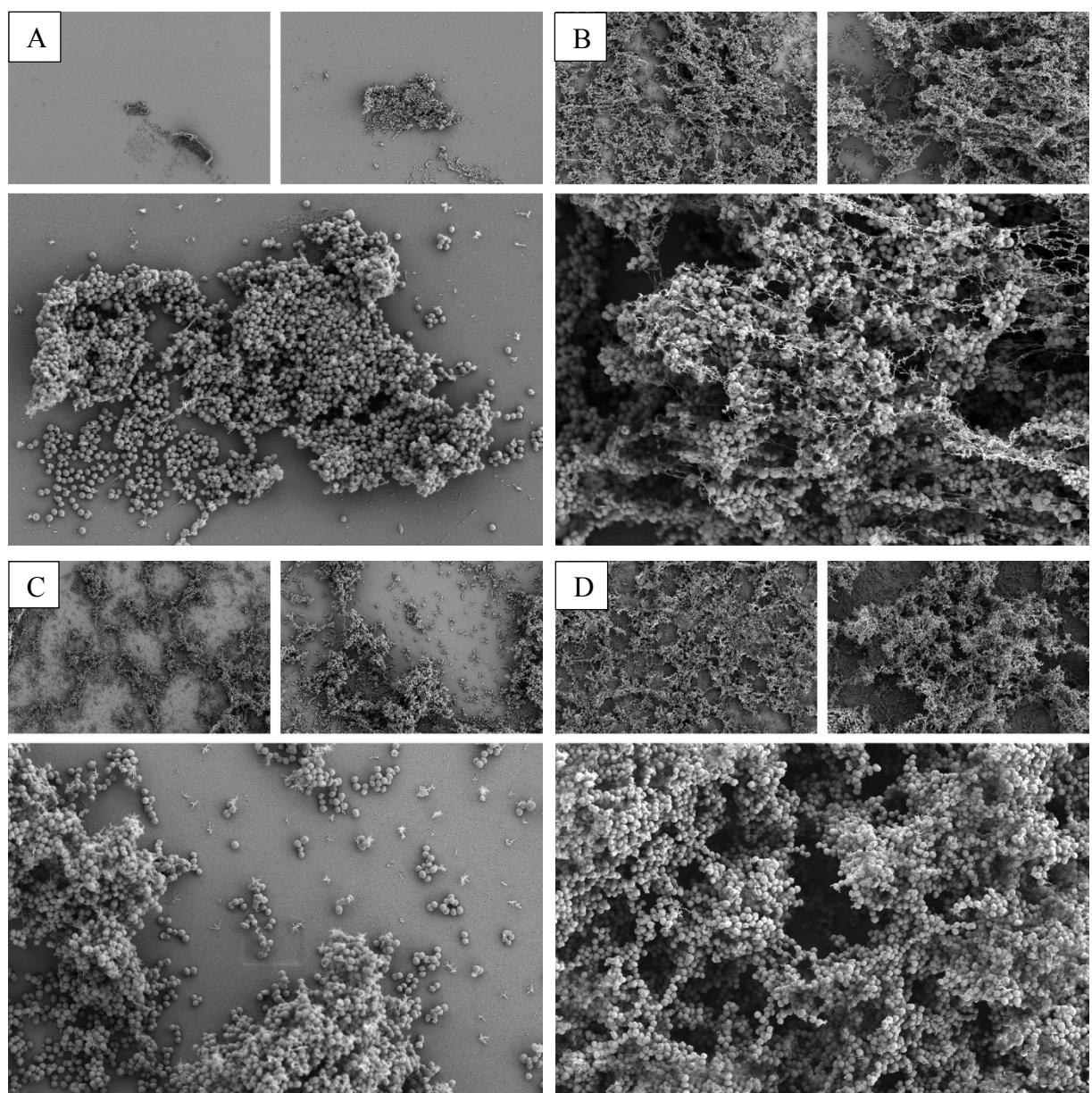
**Abbildung 17 A-B: Einfluss von x-fach aufkonzentrierten *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand (CFCS) auf das Wachstum von *S. aureus*.** Abb. 17 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>). Abb. 17 B: Safranin-Absorption (OD<sub>492nm</sub>). Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> >0,05. PK= Positivkontrolle, NK= Negativkontrolle. n= 4. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zur PK.

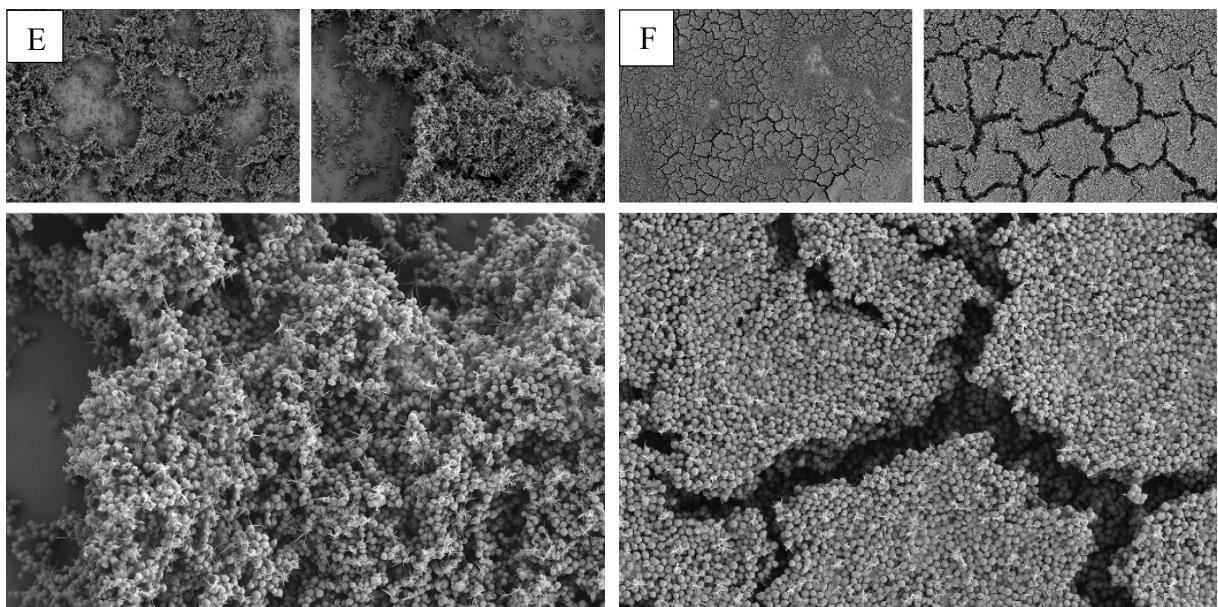
Die optische Dichte der *S. aureus* Kulturen änderte sich in Abhängigkeit der Konzentration des *L. rhamnosus* GG Überstandes. Zunächst stieg die optische Dichte der Kulturen mit wachsender Menge an Kulturüberstand, was einen Wachstums-fördernden Effekt nahelegt. Bei Verwendung von 15-fach aufkonzentrierten Überstand war dann die optische Dichte der *S. aureus* Kultur

signifikant geringer als in der dazugehörigen Positivkontrolle, was einen hemmenden Effekt insinuiert.

Über die Absorptionsmessung des Safraninfarbstoffes konnte zu jeder Konzentrationsstufe eine optische Dichte ( $OD_{492nm} > 0,05$ ) und dementsprechend Biofilm detektiert werden. Der gewachsene Biofilm war nur bei Verwendung von Kulturüberstand in Höchstkonzentration signifikant geringer als in der dazugehörigen Positivkontrolle.

Die Biofilmbildung in Abhängigkeit der Konzentrationsstufe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes wurde rasterelektronenmikroskopisch visualisiert (Abb. 18 A-F).



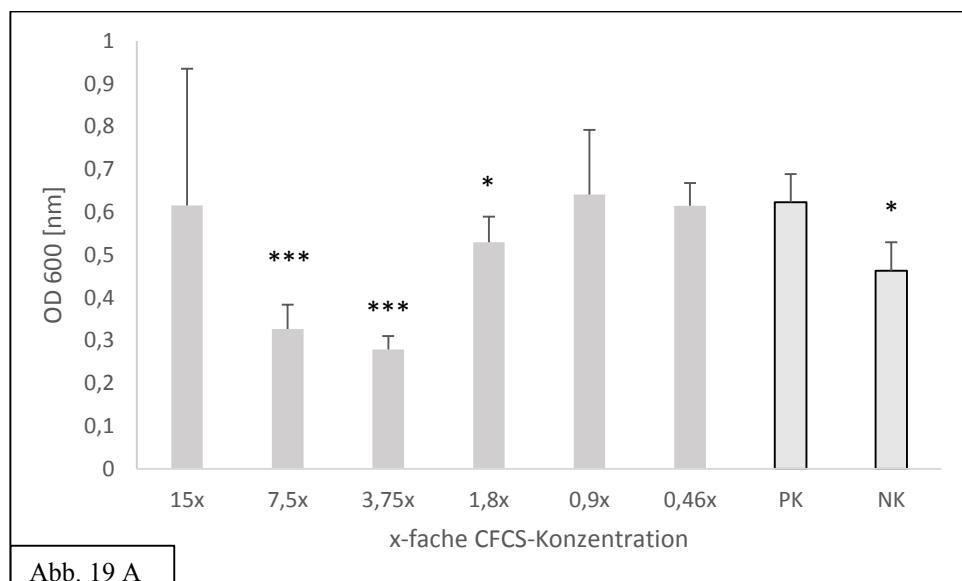


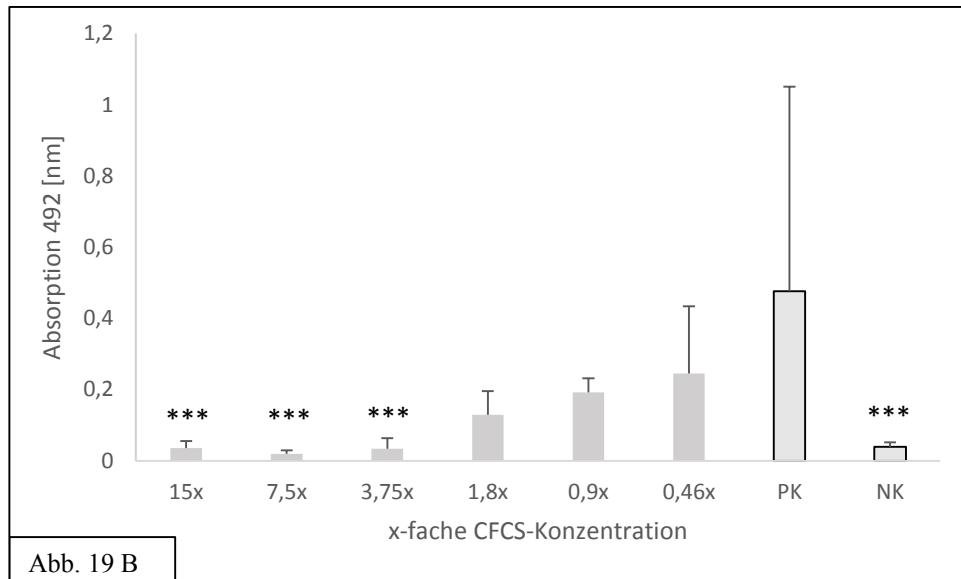
**Abbildung 18 A-F:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von *S. aureus* in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes. Darstellung der Konzentrationsstufe in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Konzentrationen wie folgt: A: 15-fach, B: 7,5-fach, C: 3,75-fach, D: 1,8-fach, E: 0,9-fach und F: 0,46-fach.

Unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt konnte stets mehrschichtiger, flächendeckender Biofilm detektiert werden. Erwartungsgemäß zeigte sich bei Verwendung der Höchskonzentration des *L. rhamnosus* GG Überstandes ein vergleichsweise geringes Biofilmwachstum.

#### 4.5.2 Kultivierung von *S. aureus* unter Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand

Der Einfluss aufkonzentrierter *S. salivarius* K12 Kulturüberstände auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. aureus* wird nachfolgend dargestellt (Abb. 19 A-B).

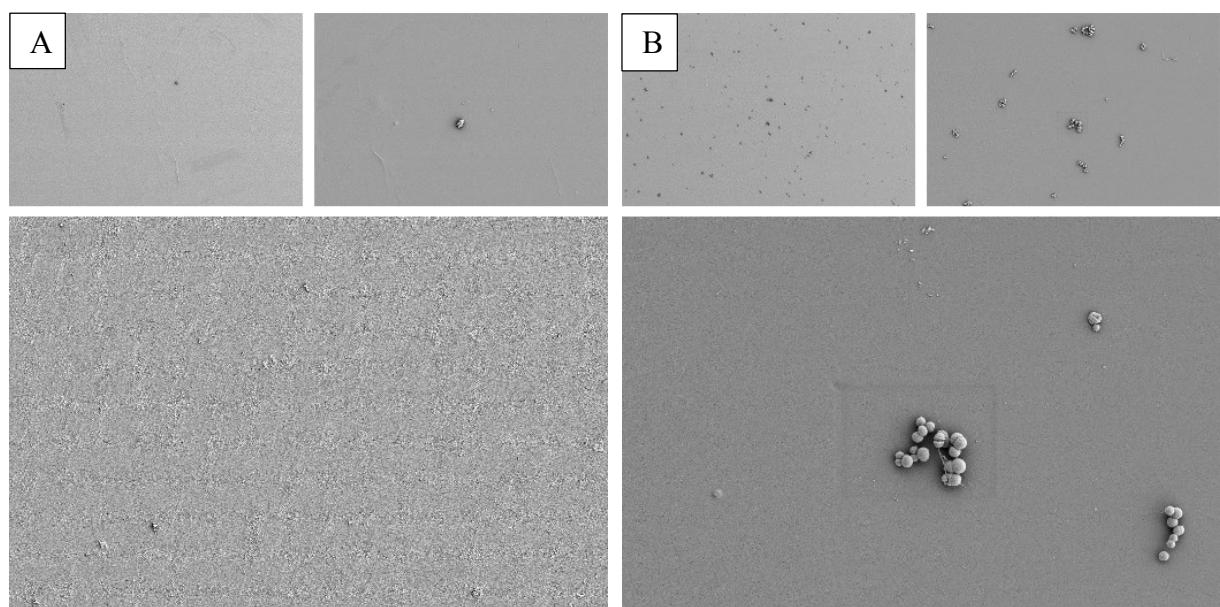


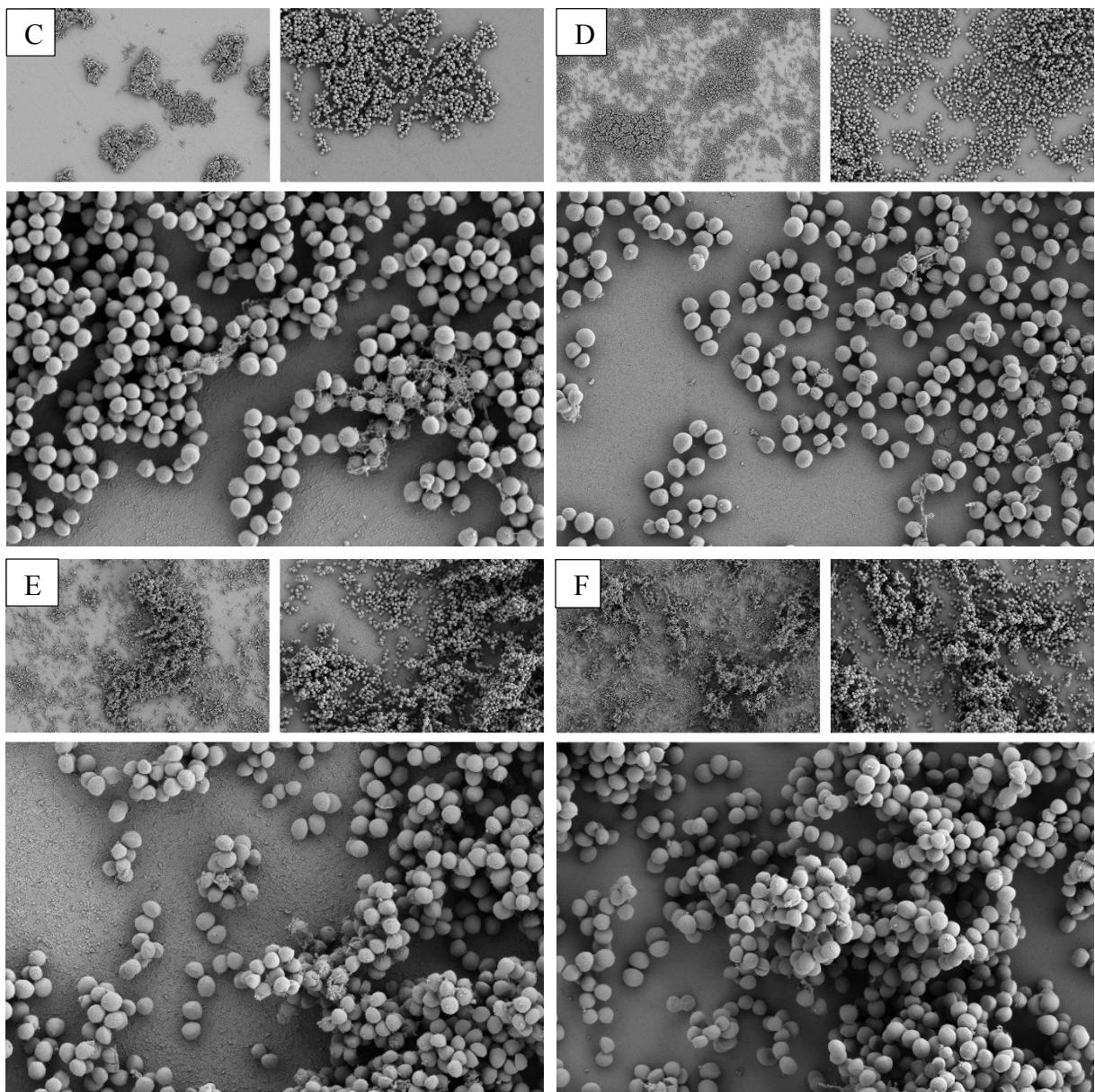


**Abbildung 19 A-B: Einfluss von x-fach aufkonzentrierten *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. aureus*.** Abb. 19 A: optische Dichte ( $OD_{600\text{nm}}$ ). Abb. 19 B: Safranin-Absorption ( $OD_{492\text{nm}}$ ). Biofilm ab  $OD_{492\text{nm}} > 0,05$ . PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle. n = 4. Mittelwerte, Standardabweichungen, signifikante Unterschiede zur PK.

Hinsichtlich der  $OD_{600\text{nm}}$  konnte mit der Verwendung von 1,8-fach aufkonzentriertem Kulturüberstand ein mit steigender Konzentration zunehmender, inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Der geringere Effekt in Höchstkonzentration ist am ehesten durch die Schwankungsbreite der entsprechenden Messergebnisse bedingt.

Der Zusammenhang zwischen steigender Konzentration des Kulturüberstands und abnehmender Biofilmmasse war in den Absorptionsmessungen bereits eindeutig ab der geringsten Konzentration zu beobachten und über alle Konzentrationsstufen konsistent. Die Biofilmbildung in Abhängigkeit der einzelnen Konzentrationsstufen des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes wurde ebenfalls exemplarisch im REM visualisiert (Abb. 20 A-F).





**Abbildung 20 A-F:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von *S. aureus* in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes. Darstellung der jeweiligen Konzentrationsstufe in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Konzentrationen wie folgt: A: 15-fach, B: 7,5-fach, C: 3,75-fach, D: 1,8-fach, E: 0,9-fach, F: 0,46-fach.

Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung des Einflusses von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf die Biofilmbildung von *S. aureus* korreliert eindeutig mit den Ergebnissen der quantitativen Messungen. Tatsächlich nahm die Masse und Schichtdicke des Biofilms mit steigender Konzentration des Kulturüberstands stetig ab, so dass schließlich bei Verwendung von 7,5- und 15-fach aufkonzentrierten Überstandes kein Biofilm mehr nachweisbar war.

#### 4.5.3 Kultivierung von *S. epidermidis* unter Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand

Nachfolgend wird der Einfluss von aufkonzentriertem *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. epidermidis* dargestellt (Abb. 21 A-B).

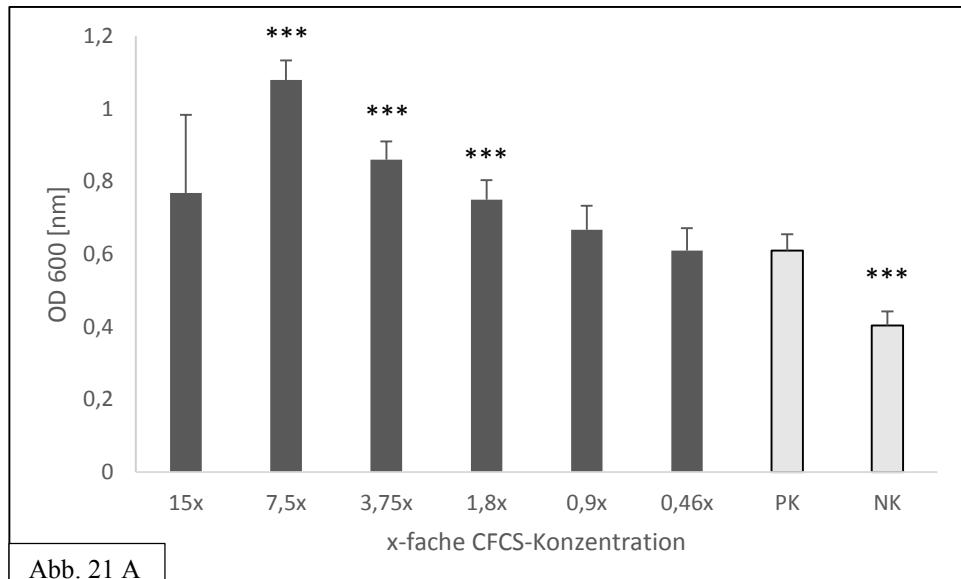


Abb. 21 A

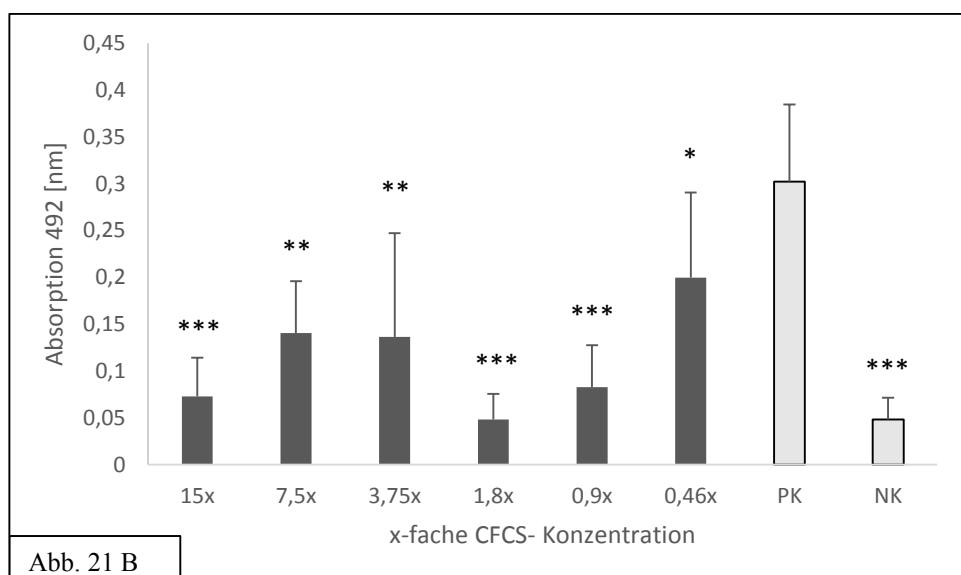


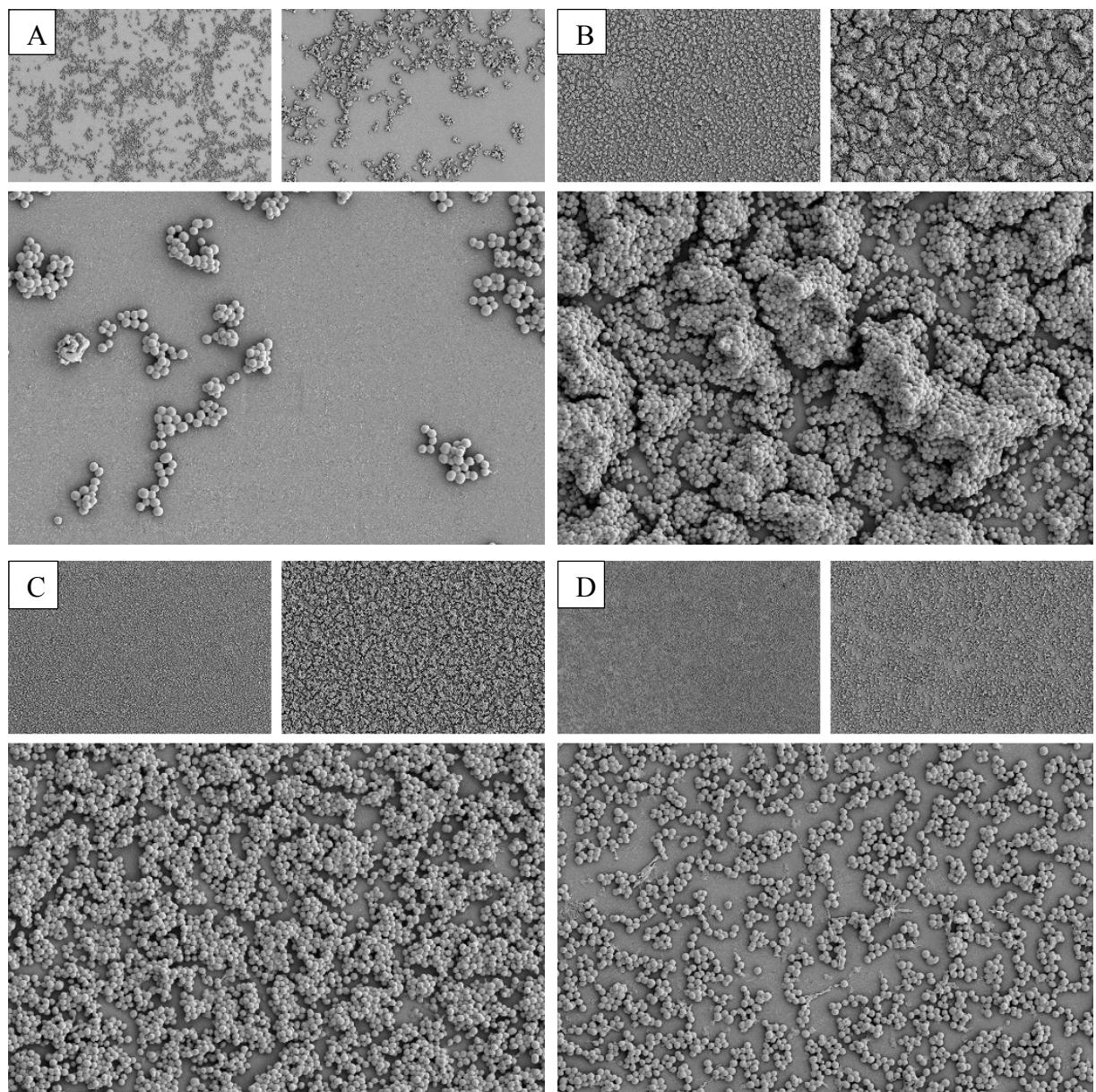
Abb. 21 B

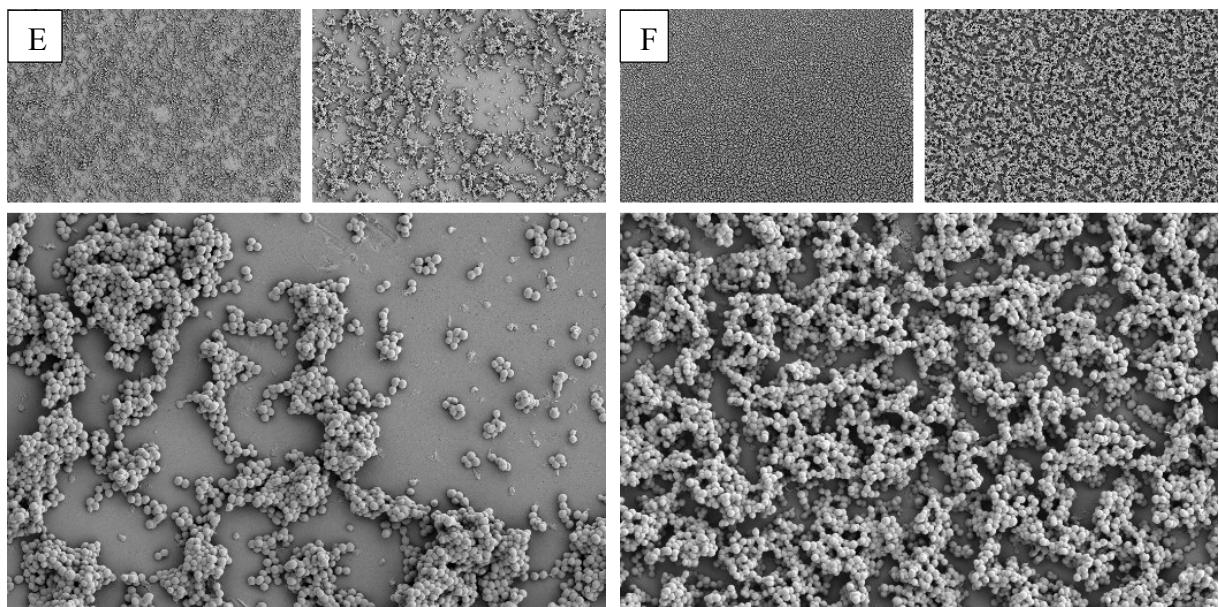
**Abbildung 21 A-B: Einfluss von x-fach aufkonzentrierten *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. epidermidis*.** Abb. 21 A: optische Dichte ( $OD_{600\text{nm}}$ ). Abb. 21 B: Safranin-Absorption ( $OD_{492\text{nm}}$ ). Biofilm: typischerweise ab  $OD_{492\text{nm}} > 0,05$ . PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle. n= 4. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zur PK.

Insgesamt wuchsen die *S. epidermidis* Kulturen in Gegenwart von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand zu einer höheren optische Dichte als in der Positivkontrolle heran. Bis zu einer 7,5-fachen Konzentration nahm der Effekt stetig zu, nur bei 15-facher Konzentration wieder ab. Zusammenfassend lässt sie eine wachstumsstimulierende Wirkung des Kulturüberstands postulieren, die möglicherweise bei sehr hohen Konzentrationen durch andere Effekte überlagert wird.

Der Einsatz des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes führte zu einem reduzierten Biofilmwachstum im Vergleich mit der Positivkontrolle. Das ungleichmäßige Bild ist wahrscheinlich auf statistische Schwankungen in dieser Untersuchung zurückzuführen.

Die Biofilmbildung in Abhängigkeit der Konzentrationsstufe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes wurde exemplarisch im REM dokumentiert (Abb. 22 A-F).



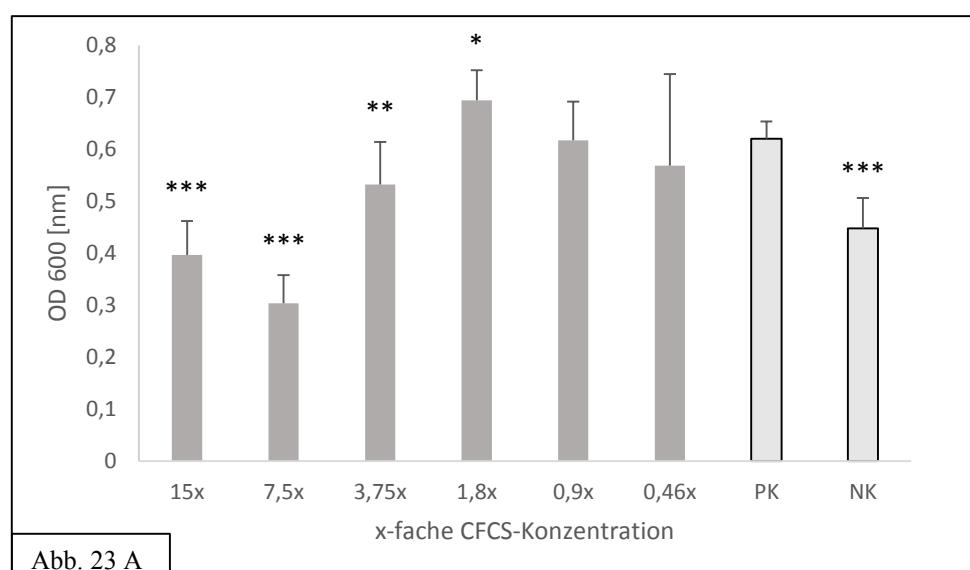


**Abbildung 22 A-F:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von *S. epidermidis* in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes. Darstellung der jeweiligen Konzentrationsstufe in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Konzentrationen wie folgt: A: 15-fach, B: 7,5-fach, C: 3,75-fach, D: 1,8-fach, E: 0,9-fach und F: 0,46-fach.

Die Ergebnisse der rasterelektronischen Untersuchung korrelieren mit denen der quantitativen Biofilmmessungen.

#### 4.5.4 Kultivierung von *S. epidermidis* unter Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand

Der Einfluss auf konzentrierter *S. salivarius* K12 Kulturüberstände auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. epidermidis* ist nachfolgend dargestellt (Abb. 23 A-B).



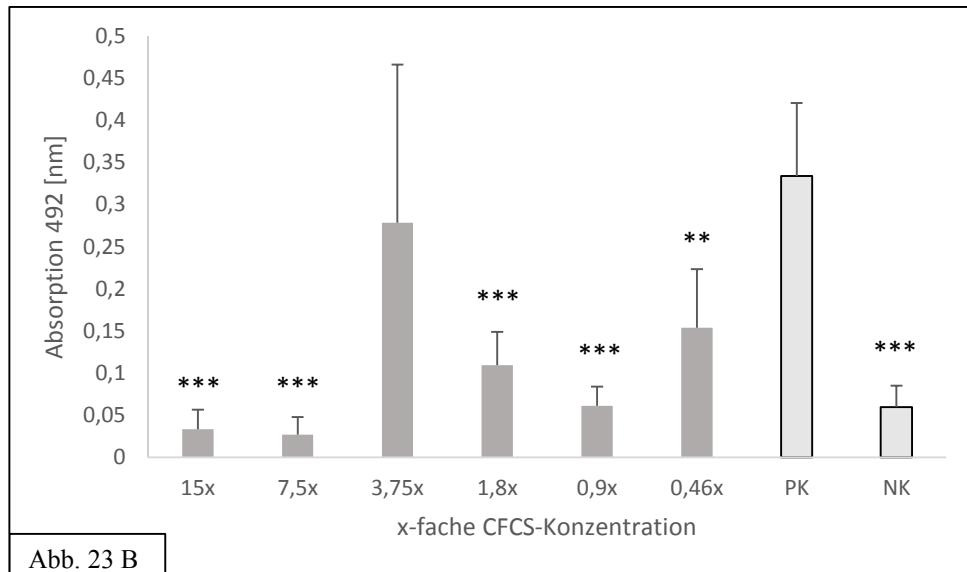


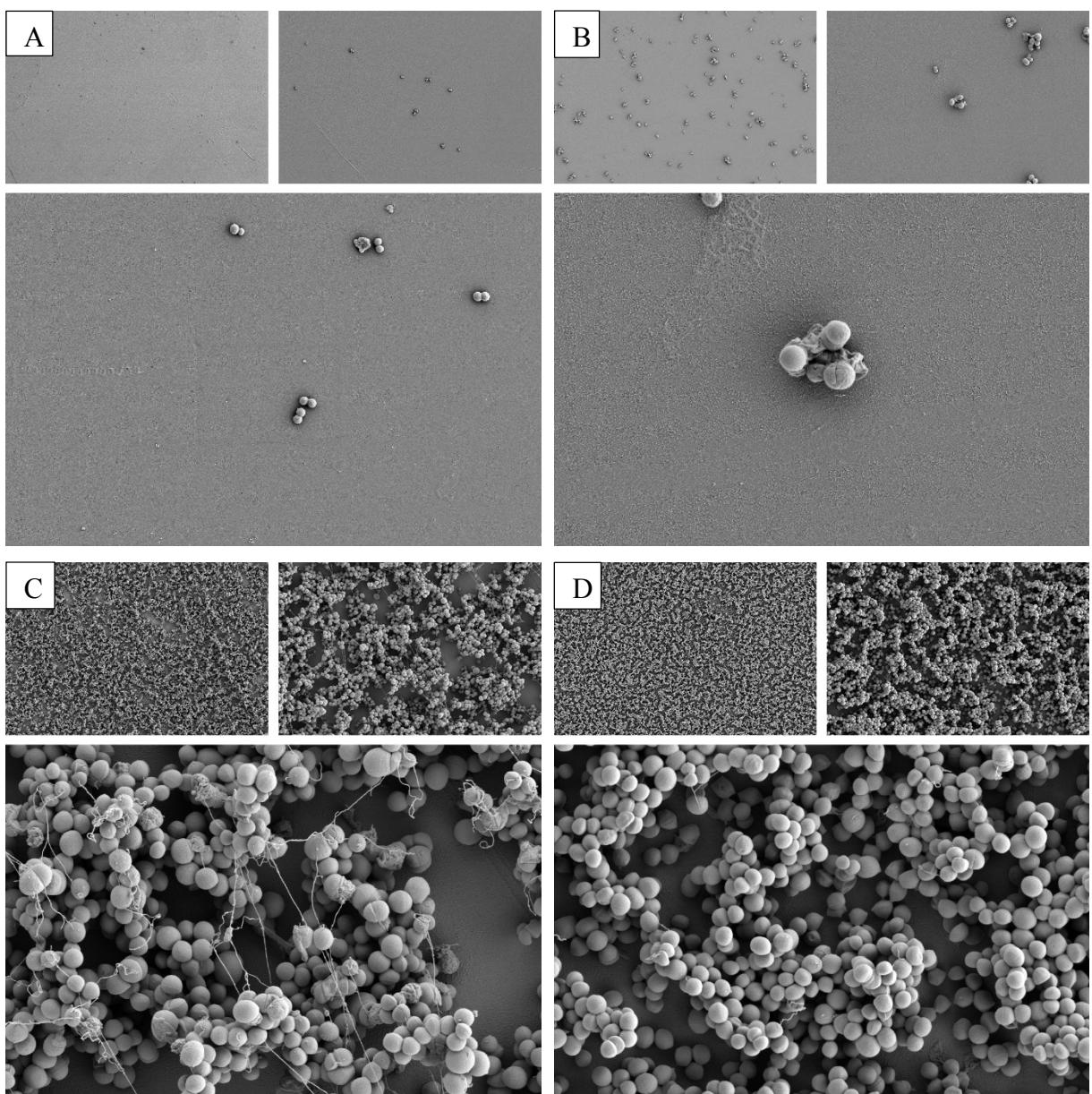
Abb. 23 B

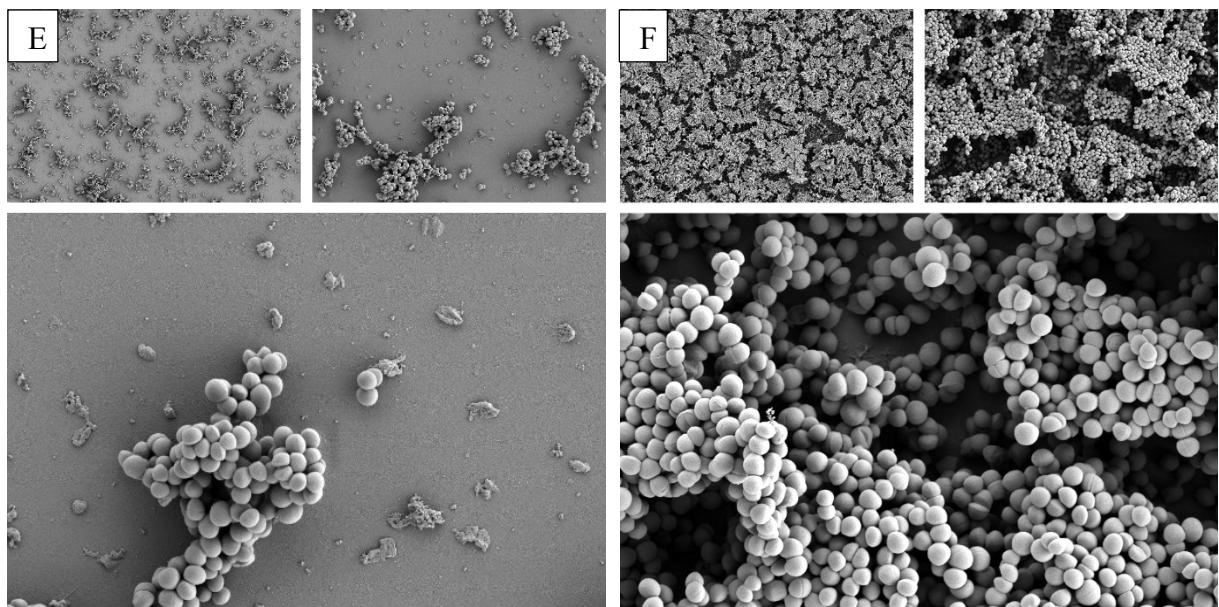
**Abbildung 23 A-B: Einfluss von x-fach aufkonzentrierten *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. epidermidis*.** Abb. 23 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>). Abb. 23 B: Safranin-Absorption (OD<sub>492nm</sub>). Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> >0,05. PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle. n=4. Dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zur PK.

Auch hier stellen sich die Messergebnisse der OD<sub>600nm</sub> zunächst uneinheitlich dar. Unter Berücksichtigung der statistischen Schwankungsbreiten ergibt sich jedoch wiederum eine Tendenz: geringe Mengen an Kulturüberstand hatten keinen oder sogar einen leicht wachstumsfördernden Effekt, ab der 3,75-fachen Konzentration dann jedoch einen zunehmend wachstumshemmenden Einfluss.

Die Biofilmbildung war unter Verwendung von Kulturüberstand deutlich reduziert, wobei dieser Effekt mit steigender Konzentration noch zunahm. Die Messwerte für die 3,75-fache Konzentration sind mit größter Wahrscheinlichkeit als Ausreißer zu betrachten.

Nachfolgend die exemplarische Visualisierung der Biofilmbildung in Abhängigkeit der Konzentrationsstufe des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes (Abb. 24 A-F).



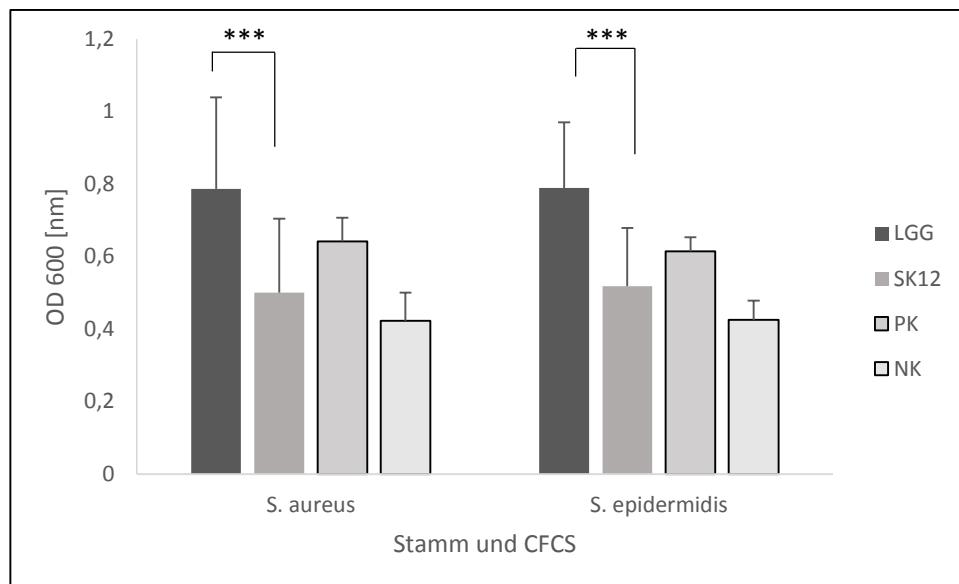


**Abbildung 24 A-F:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von *S. epidermidis* in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes. Darstellung der jeweiligen Konzentrationsstufe in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Konzentrationen wie folgt: A: 15-fach, B: 7,5-fach, C: 3,75-fach, D: 1,8-fach, E: 0,9-fach und F: 0,46-fach.

Die Ergebnisse der rasterelektronischen Untersuchung entsprechen denen der quantitativen Messungen, v.a. hohe Konzentrationen von *S. salivarius* Kulturüberstand hatten einen klar reduzierenden Effekt auf die *S. epidermidis* Biofilmmasse.

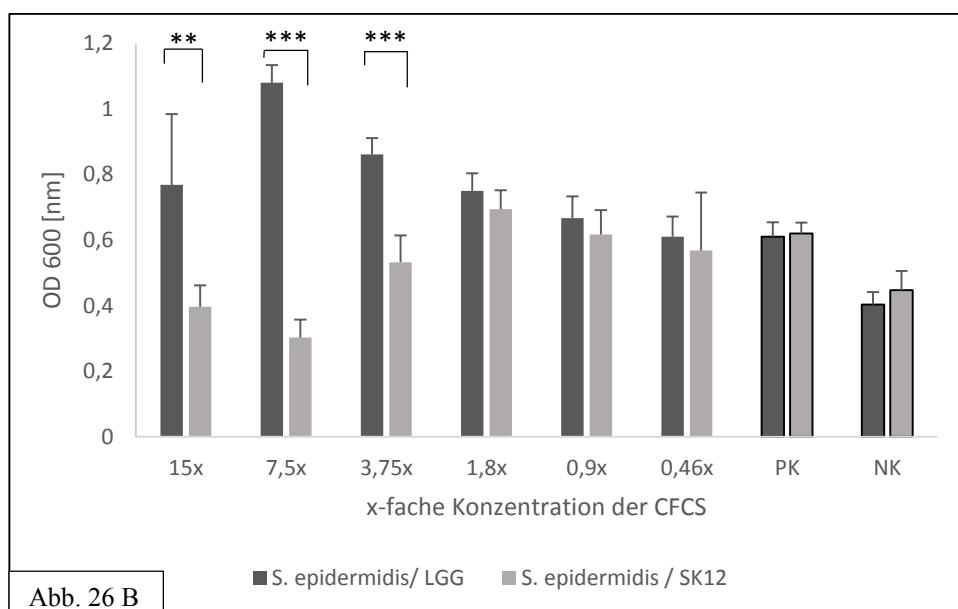
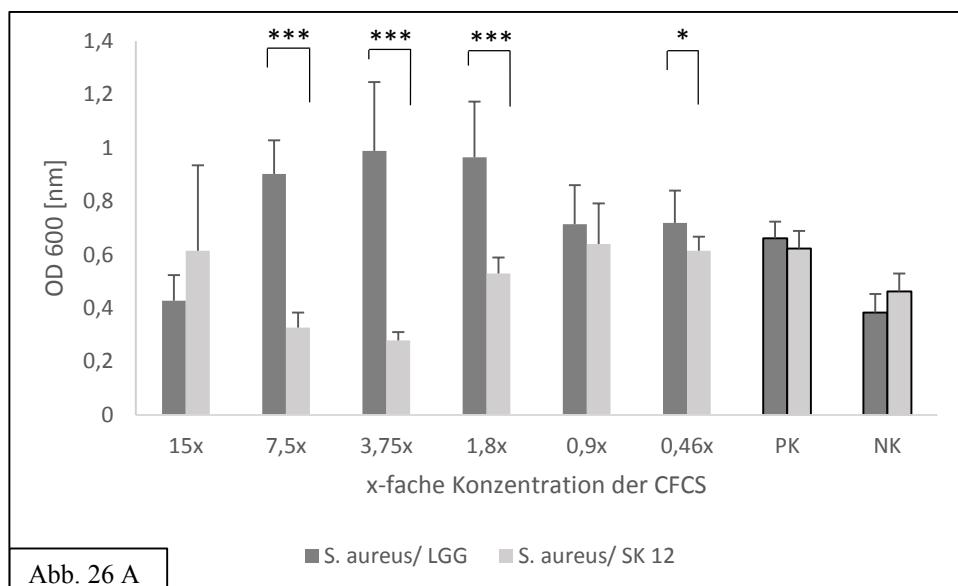
#### 4.5.5 Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung probiotischer Kulturüberstände

Der Einfluss von *L. rhamnosus* GG bzw. *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf planktonisches Wachstum und Biofilmbildung der Staphylokokken wird nachfolgend verglichen. Die Gegenüberstellung basiert auf den quantitativen Ergebnissen der Endpunkt- bzw. Absorptionsmessungen. Zunächst werden die Werte der optischen Dichte aller Konzentrationsstufen der jeweiligen Kulturüberstände bzw. die Werte der Safranin-Absorption aus je viermalig durchgeführten Versuchen für eine erste vergleichende Darstellung aufaddiert (Abb. 25, 27). Im Anschluss erfolgt dann jeweils hinsichtlich des planktonischen- und des Biofilmwachstums eine Gegenüberstellung des konzentrationsabhängigen Einflusses von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 Kulturüberstand (Abb. 26, 28).



**Abbildung 25: Effekt aufkonzentrierter probiotischer Kulturüberstände auf die optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen.** Die Werte der optischen Dichten aller Konzentrationsstufen wurden für die jeweiligen Kulturüberstände aufaddiert. LGG= *L. rhamnosus* GG CFCS, SK12= *S. salivarius* K12 CFCS. PK= Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle. n= 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede.

Bei beiden Stämmen unterschieden sich die wachstumsbeeinflussenden Effekte bei Verwendung des *S. salivarius* K12 Überstandes sowie bei Einsatz des *L. rhamnosus* GG Überstandes. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant. Tatsächlich hatte letzterer einen eher fördernden Einfluss, während der *S. salivarius* Überstand in Relation zur Positivkontrolle eine inhibierende Funktion aufwies. Das prinzipielle Muster der Wachstumsbeeinflussung durch die Kulturüberstände ähnelt sich für beide Staphylokokkenspezies, so dass man ggf. von gattungsweiten Effekten ausgehen kann. Zudem bleibt das prinzipielle Reaktionsmuster über alle Konzentrationsstufen der Kulturüberstände erhalten, nur das Ausmaß der Reaktion ist klar konzentrationsabhängig, was auf eine teils lineare oder zumindest direkte Korrelation zwischen der Konzentration der Kulturüberstände und ihrer Wirkung auf die Staphylokokken schließen lässt (Abb. 26 A-B).

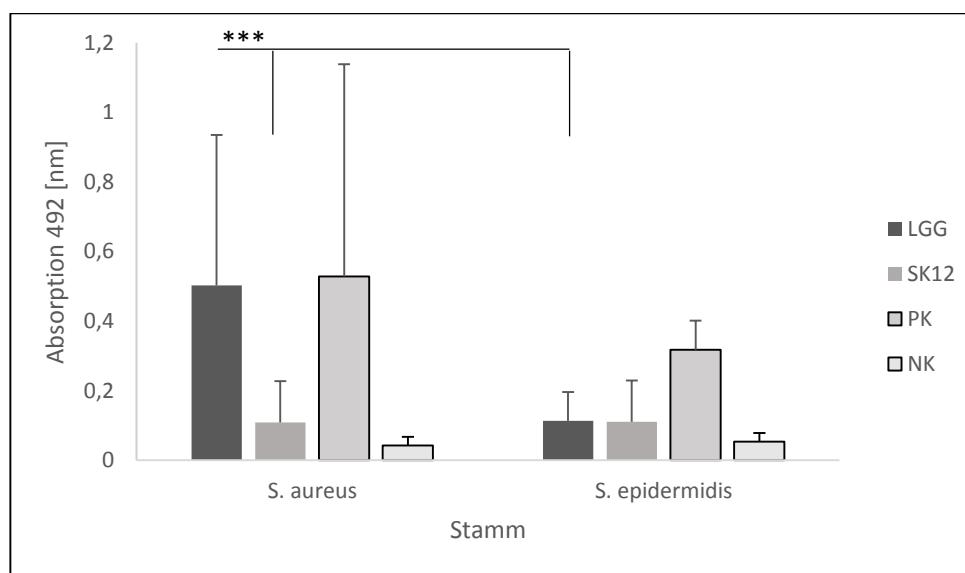


**Abbildung 26 A-B: Planktonisches Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen in Abhängigkeit des probiotischen Kulturüberstandes und der jeweiligen Konzentrationsstufe.** Endpunktmessungen (OD<sub>600nm</sub>) nach 24 Std. Inkubation. PK= Positivkontrolle, NK= Negativkontrolle. LGG= *L. rhamnosus* GG CFCS, SK12= *S. salivarius* K12 CFCS. n = 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kulturüberständen (signifikante Unterschiede zur PK in Abb. 17,19,21,23 A).

Offenbar haben die Kulturüberstände von *L. rhamnosus* auf beide Spezies bis zu einer 7,5-fachen Konzentration einen Wachstums-fördernden Einfluss und erst ab einer 15-fachen Konzentration dreht sich dieser Effekt ins Gegenteil. Dagegen haben die *S. salivarius* Kulturüberstände einen eher Wachstums-reduzierenden Einfluss, der ab einer 3,75-fachen Konzentration deutlich wird. Entsprechend sind die Effekte beider Kulturüberstände am ausgeprägtesten für den Konzentrationsbereich von 1,8- bis 7,5-fach. Insgesamt ist zu erkennen, dass eine Aufkonzentrierung der Kulturüberstände notwendig ist, um sichtbare oder statistisch relevante

Effekte gegenüber den Kontrollen zu erzielen. Diese Effekte werden ab einer ungefähr zweifachen Konzentration der Kulturüberstände relevant.

Der Einfluss probiotischer Kulturüberstände auf die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* wird nachfolgend dargestellt. Zunächst werden die Werte der Absorption bei OD<sub>492nm</sub> aller Konzentrationsstufen der jeweiligen Kulturüberstände aus viermalig durchgeföhrten Versuchen für eine erste vergleichende Darstellung aufaddiert (Abb. 27). Im Anschluss erfolgt die Gegenüberstellung des konzentrationsabhängigen Einflusses von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf das Biofilm Wachstum der Staphylokokken (Abb. 28 A-B).



**Abbildung 27: Quantitativer Biofilmnachweis in *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen in Abhängigkeit des zugesetzten probiotischen Kulturüberstandes.** Absorptionsmessungen bei OD<sub>492nm</sub> nach Safraninfärbung. LGG= *L. rhamnosus* GG CFCS, SK12= *S. salivarius* K12 CFCS. PK= Positivkontrolle, NK= Negativkontrolle. Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> von >0,05. n= 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen sowie statistisch signifikante Unterschiede.

Hier zeigen die Kulturüberstände anders als im Fall der planktonisch wachsenden Bakterien speziespezifische Effekte auf das Wachstum im Biofilm. *S. epidermidis* hat eine geringere Tendenz zur Biofilmbildung als *S. aureus*. Auf diese geringe Tendenz wirken beide Kulturüberstände gleichermaßen inhibierend mit folglich kaum noch nachweisbaren Biofilmen. Dagegen inhibiert bei *S. aureus* nur der Kulturüberstand von *S. salivarius*, während der von *L. rhamnosus* wenig bis keine Effekte zeigt. Im Vergleich zur eher wachstumsinduzierenden Wirkung dieses Kulturüberstands auf planktonisch lebende Bakterien ist dies zumindest ein relativer Effekt.

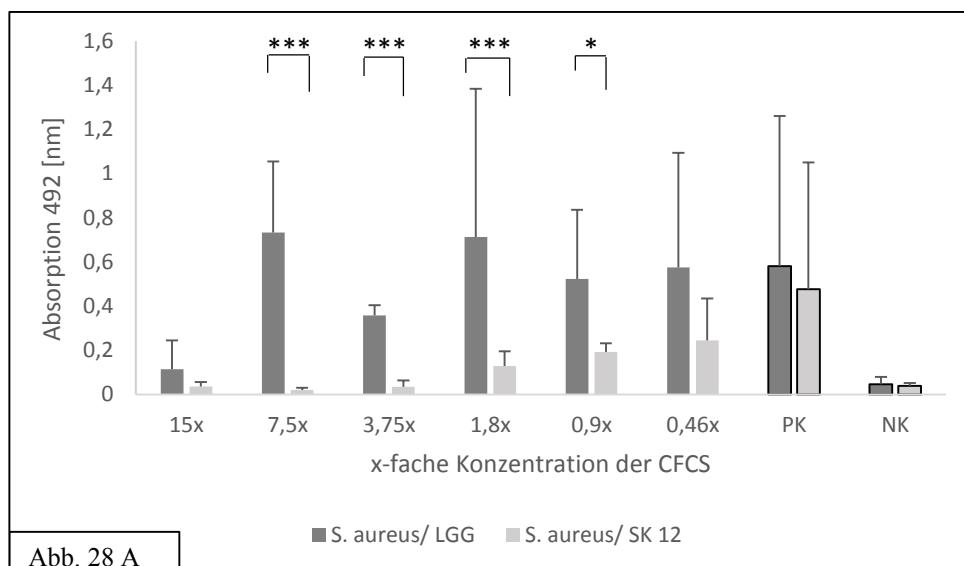


Abb. 28 A

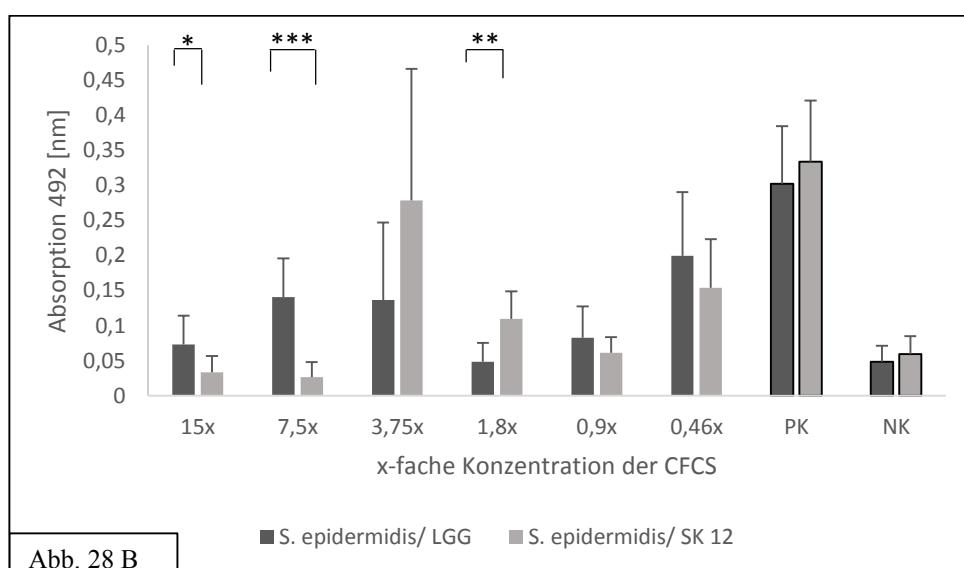


Abb. 28 B

**Abbildung 28 A-B: Quantitativer Nachweis der Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* in Abhängigkeit des verwendeten Kulturüberstandes (CFCS) sowie dessen Konzentrationsstufe.** Absorptionsmessungen (OD<sub>492nm</sub>) nach Safraninfärbung. PK= Positivkontrolle, NK= Negativkontrolle. LGG= *L. rhamnosus* GG CFCS, SK12= *S. salivarius* K12 CFCS. Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> von >0,05. n= 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den CFCS (signifikante Unterschiede zur PK in Abb. 17,19,21, 23 B).

Die Effekte der Kulturüberstände auf die Biofilmbildung der Staphylokokken hängen hier von drei Größen ab: der Staphylokokkenspezies, der Art des verwendeten Kulturüberstandes, und der jeweiligen Konzentration (Abb. 27, 28). Erstere beide Einflussgrößen wurden schon in der summarischen Darstellung offenkundig (Abb. 27). Die konzentrationsabhängigen Effekte treten bei geringeren Konzentrationen als bei den planktonisch wachsenden Bakterien auf. Wahrscheinlich der Komplexität des Messverfahrens geschuldet, sind Effekte bei steigenden Konzentrationen des Kulturüberstands inhomogener als bei den planktonisch wachsenden Bakterien. Als kritisch ist hier u.a. der Waschschritt für den Biofilm nach Abkippen des Kulturmediums zu sehen. In der Tendenz bestätigt sich aber das Ergebnis der summarischen

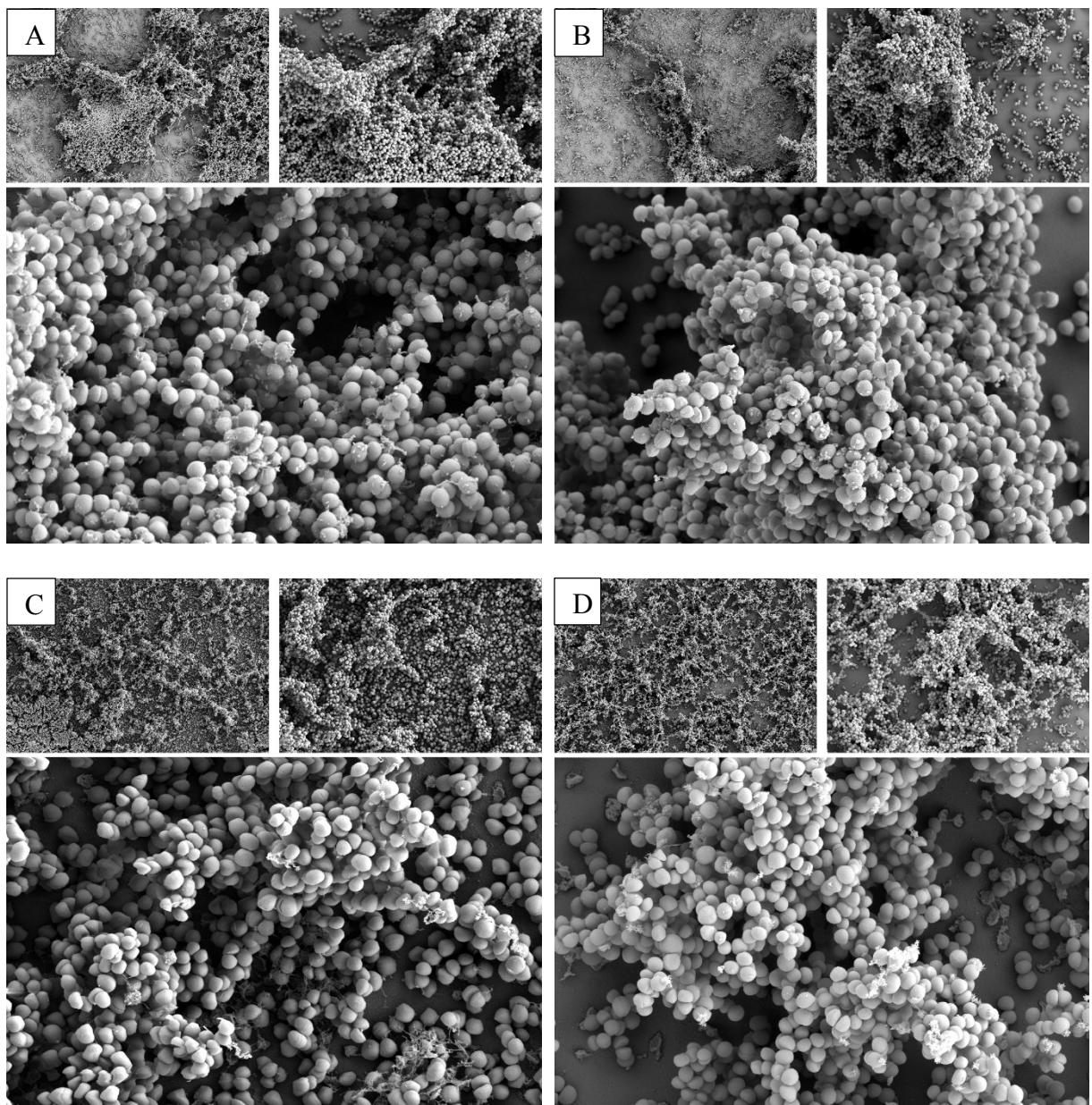
Darstellung: beide Kulturüberstände inhibieren konzentrationsabhängig die Biofilmbildung des *S. epidermidis* Stamms. Im Fall des *S. aureus* Stamms gilt dies nur für den *S. salivarius* Kulturüberstand, während der *L. rhamnosus* Kulturüberstand auch mit steigender Konzentration keinen Effekt in Relation zur Positivkontrolle hat.

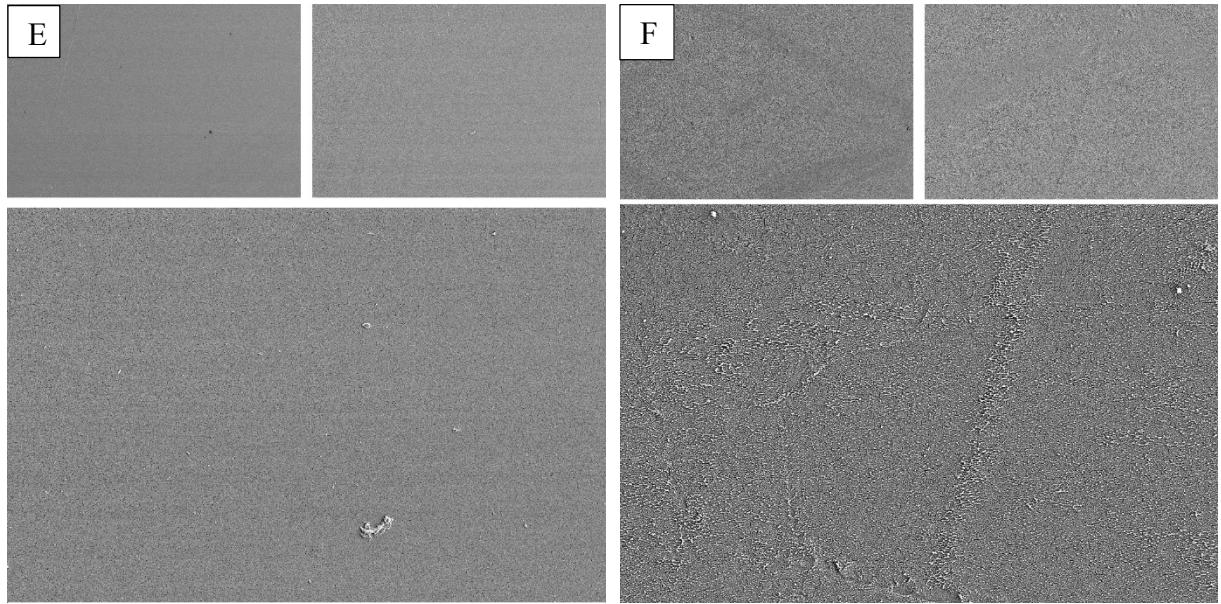
#### **4.6 Versuche zur zeitversetzten Einsaat der Kulturüberstände**

In den Versuchsreihen zur zeitversetzten Exposition der Bakterien gegenüber aufkonzentrierten Kulturüberständen war die zeitliche Komponente der darzustellenden Wirkung von Interesse. Es sollte untersucht werden, ob unterschiedlich gewählte Zugabezeitpunkte von Kulturüberstand zu den Staphylokokkenkulturen einen messbar differenzierten Einfluss auf das Wachstum haben. Daher wurden die Kulturüberstände sowohl zeitgleich (entspricht Stunde 0) mit den Staphylokokken in den Ansatz gegeben als auch in Ansätze in denen die Staphylokokken zuvor 4 bzw. 24 Stunden nur in Kulturmedium inkubiert wurden. Die Versuchsdurchführung erfolgte auf mit humanen Fibronektin beschichteten 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten bzw. runden Deckgläschchen, verwendet wurden die probiotischen Kulturüberstände in Höchstkonzentration, die Inkubationsdauer betrug insgesamt 48 Stunden (s. 3.5.2).

Analog der Versuchsreihe zur minimalen Hemmkonzentration wurde der Einfluss auf das planktonische Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* über die Auswertung von Endpunktmessungen der optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) beurteilt. Die Untersuchungen zur Biofilmbildung umfassten vordergründig den quantitativen Biofilmnachweis im Mikrotiterplatten-Lesegerät sowie eine beispielhafte qualitative Auswertung einzelner Untersuchungszeitpunkte im REM (s. 3.5).

Initial erfolgt die rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Positivkontrollen (Staphylokokken im jeweiligen Medium nach 24 und 48 Stunden Inkubation), sowie der Negativkontrollen (Kulturüberstand und Medium) in Abbildung 29 A-F.

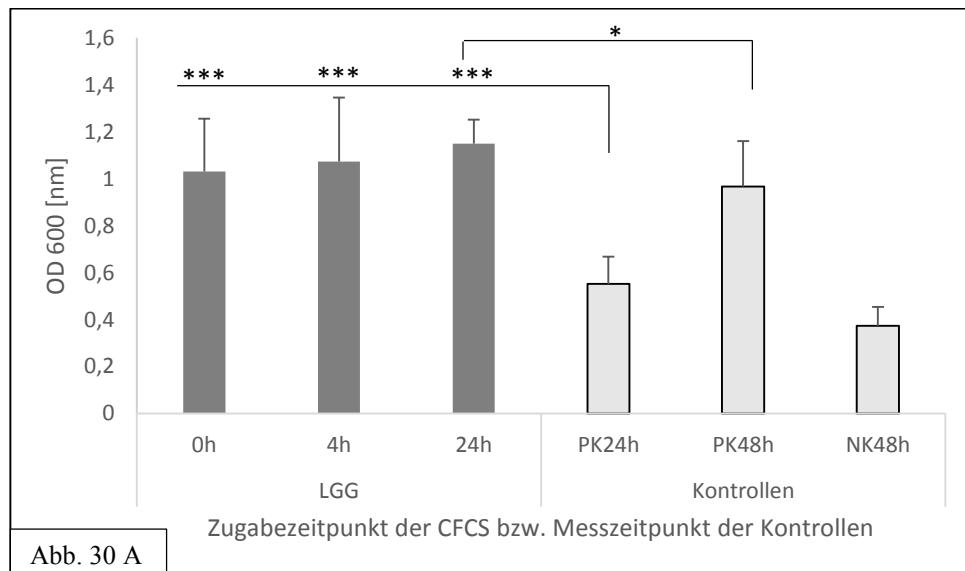


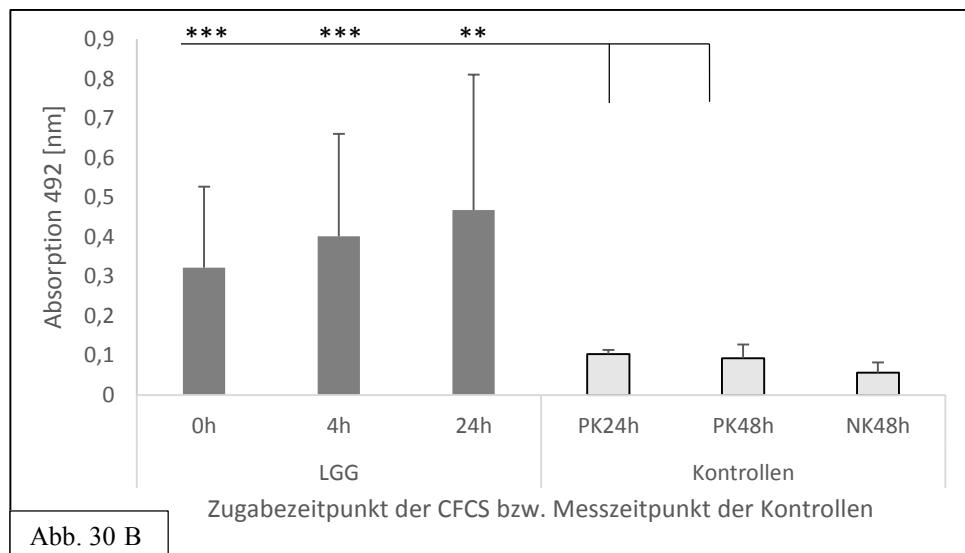


**Abbildung 29 A-F:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Kontrollen in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. A= *S. aureus*/ CB-Medium, 24 Std. Inkubation. B= *S. aureus*/ CB-Medium 48 Std. Inkubation. C= *S. epidermidis*/ TSB-Medium 24 Std. Inkubation. D= *S. epidermidis*/ TSB-Medium 48 Std Inkubation. E= TSB-Medium/ *L. rhamnosus* GG CFCS. F= CB-Medium/ *S. salivarius* K12 CFCS.

#### 4.6.1 Kultivierung von *S. aureus* unter zeitversetzter Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand

Nachfolgend wird der Einfluss des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. aureus* Kulturen gezeigt (Abb. 30 A-B).

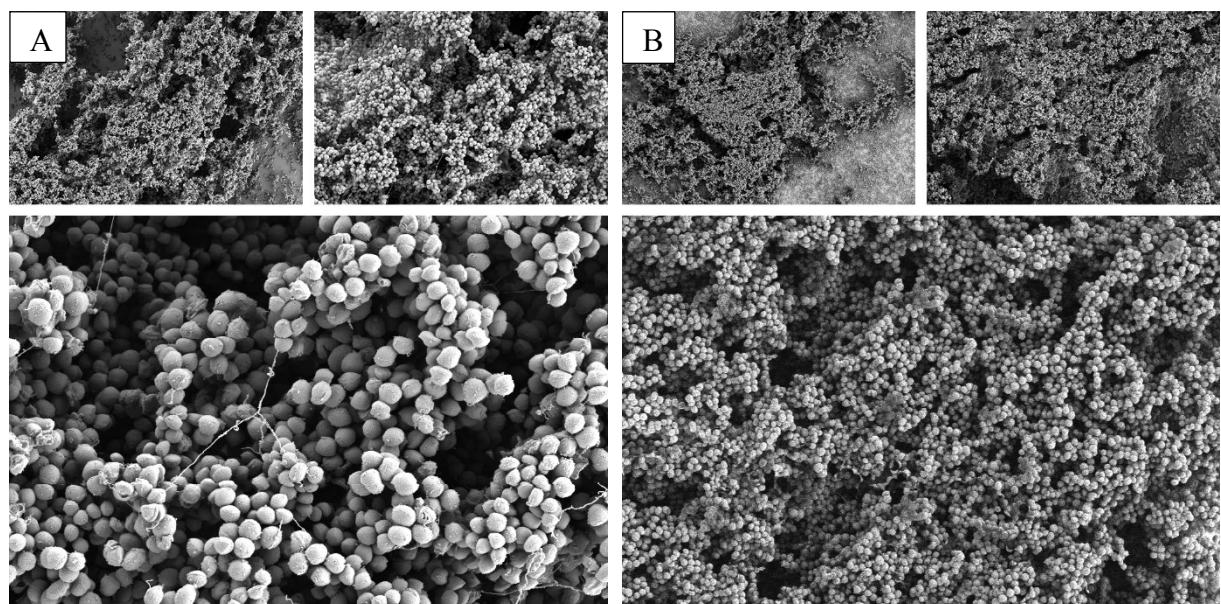




**Abbildung 30 A-B: Einfluss des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG (LGG) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von *S. aureus* Kulturen.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der *S. aureus* Kultur. Abb. 30 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>), Abb. 30 B: Safranin-Absorption (OD<sub>492nm</sub>). Biofilm ab OD<sub>492nm</sub> von >0,05. n= 4. Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zu PK nach 24 (PK24h) und 48 Std. (PK48h). Die Unterschiede der Positivkontrollen zur Negativkontrolle (NK48h) sind signifikant (nicht dargestellt).

Bei Inkubation mit *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand ergab sich im Vergleich mit den Positivkontrollen sowohl eine deutlich höhere optische Dichte der *S. aureus* Kultur als auch eine stärkere Safranin-Absorption. Es konnte daher von einem gesteigerten planktonischen- und Biofilmwachstum von *S. aureus* unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe ausgegangen werden.

Nachfolgend die Visualisierung der Biofilmbildung mittels REM (Abb. 31 A-B).



**Abbildung 31 A-B: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von *S. aureus* in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes mit *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand.** Darstellung in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Zugabezeitpunkt zur Stunde 0 (A) und 24 (B).

Sowohl bei sofortiger Zugabe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes als auch mit 24- stündiger Latenz war kräftig gewachsener, mehrschichtiger Biofilm mit Bildung extrazellulärer Matrix nachzuweisen.

#### 4.6.2 Kultivierung von *S. aureus* unter zeitversetzter Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand

*S. salivarius* K12 Kulturüberstand zeigte eine vom Zugabezeitpunkt abhängige Wirkung auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. aureus* (Abb. 32 A-B).

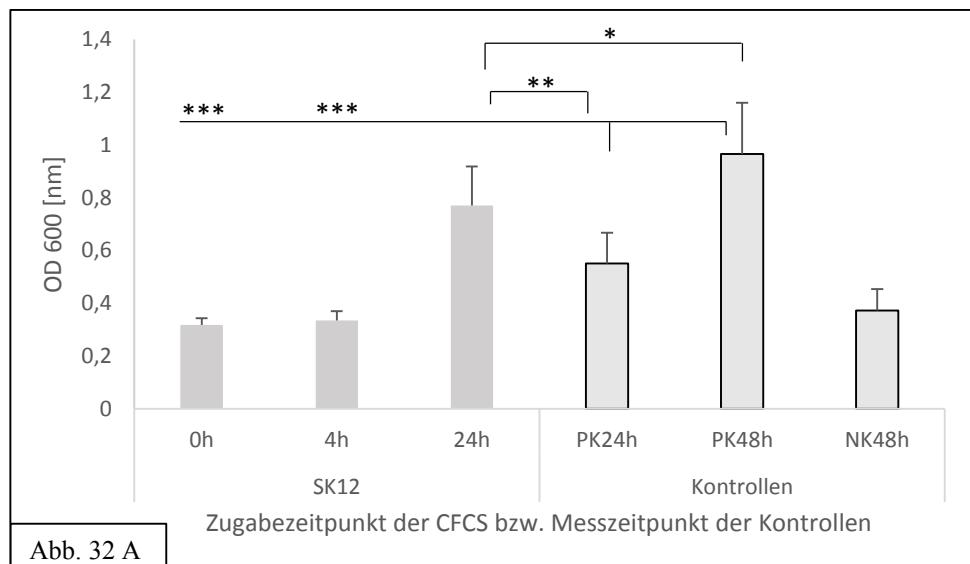


Abb. 32 A

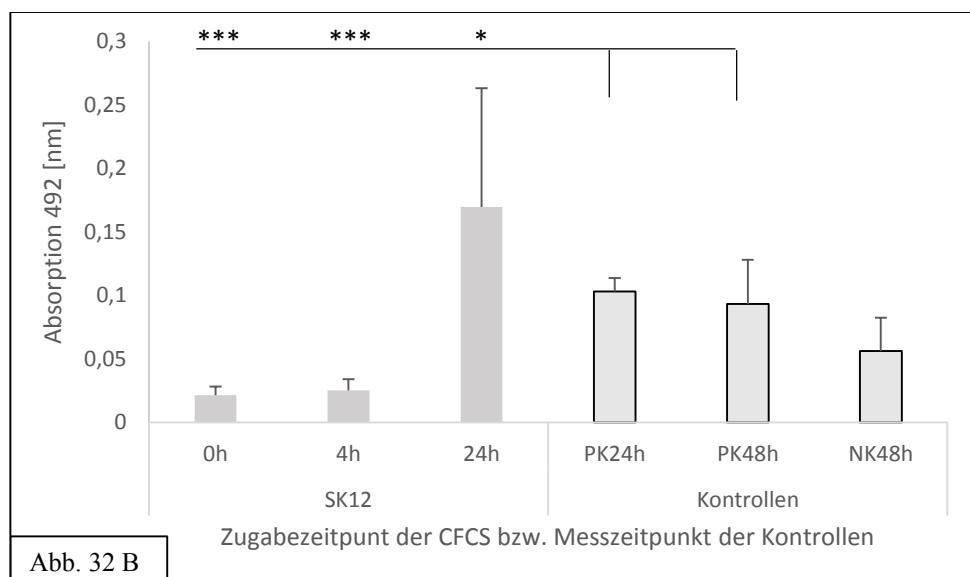


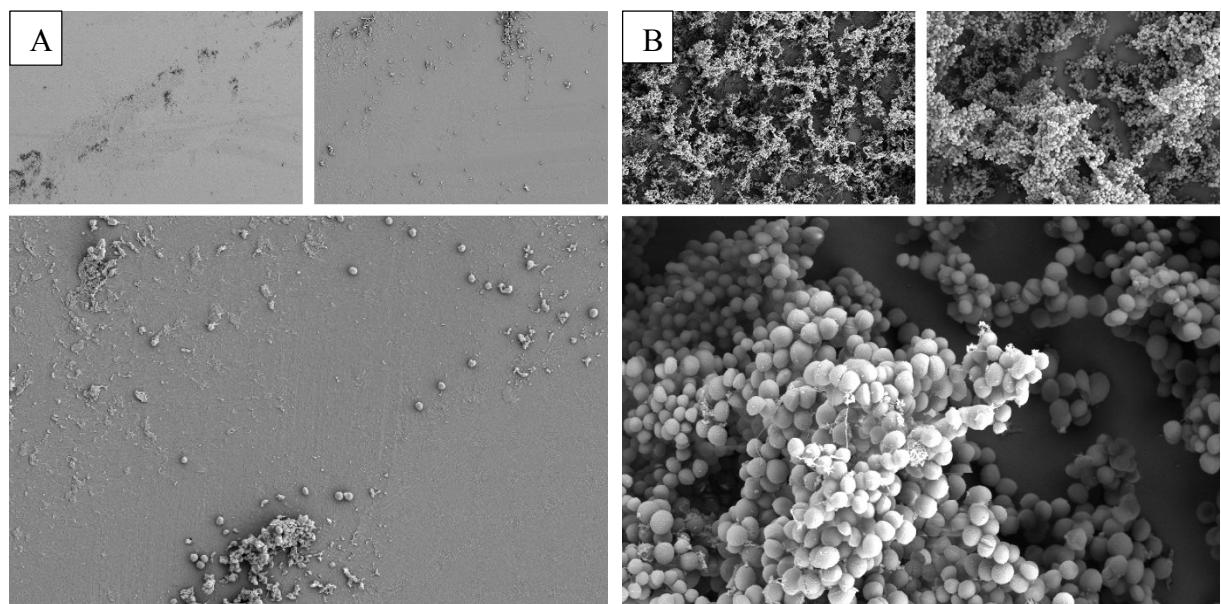
Abb. 32 B

**Abbildung 32 A-B: Einfluss des Zugabezeitpunktes von *S. salivarius* K12 (SK12) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von *S. aureus* Kulturen.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der *S. aureus* Kultur. Abb. 32 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>), Abb. 32 B: Absorption (OD<sub>492nm</sub>) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab einer OD<sub>492nm</sub> von >0,05. n= 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zu den PK nach 24 (= PK24h) und nach 48 Std. (= PK48h). Die Unterschiede der Positivkontrollen zur Negativkontrolle (= NK48h) sind signifikant (nicht dargestellt).

Bei früher Zugabe des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes zur *S. aureus* Kultur, d.h. zum Zeitpunkt 0 bzw. 4 Stunden nach Beginn der Kultur, resultierte eine statistisch höchst signifikant geringere optische Dichte im Vergleich zu beiden Positivkontrollen. Erfolgte der Zusatz 24 Stunden nach Beginn der Kultur, so war die optische Dichte der *S. aureus* Kultur im Vergleich zu den früheren Zugabezeitpunkten deutlich höher, aber immer noch signifikant niedriger als die der für 48 Stunden inkubierten Positivkontrolle.

Unter sofortiger Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand sowie der Zugabe mit 4-stündiger Latenz zu der *S. aureus* Kultur konnte kein durch *S. aureus* gebildeter Biofilm detektiert werden. Diese Ergebnisse der Absorptionsmessung waren statistisch höchst signifikant geringer als die der Positivkontrollen nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation. Die Zugabe von Kulturüberstand erst nach vorangegangener 24-stündiger Inkubation der *S. aureus* Kultur resultierte in einer in Relation zur 48 Stunden inkubierten Positivkontrolle vermehrten Biofilmbildung.

Die Biofilmbildung in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand wurde exemplarisch mittels REM dokumentiert (Abb. 33 A-B).



**Abbildung 33 A-B:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von *S. aureus* in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand. Darstellung in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Zugabezeitpunkt zur Stunde 0 (A) und 24 (B).

Auf dem Deckgläschen waren bei sofortiger gemeinsamer Inkubation einer *S. aureus* Kultur mit *S. salivarius* K12 Kulturüberstand nur vereinzelt Staphylokokken, teils gruppiert, nachzuweisen. Bei um 24 Stunden versetzter Zugabe des Kulturüberstandes ließ sich flächendeckender, mehrschichtiger *S. aureus* Biofilm detektieren.

#### 4.6.3 Kultivierung von *S. epidermidis* unter zeitversetzter Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand

Ein vom Zugabezeitpunkt abhängiger Einfluss von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. epidermidis* Kulturen wird nachfolgend gezeigt (Abb. 34 A-B).

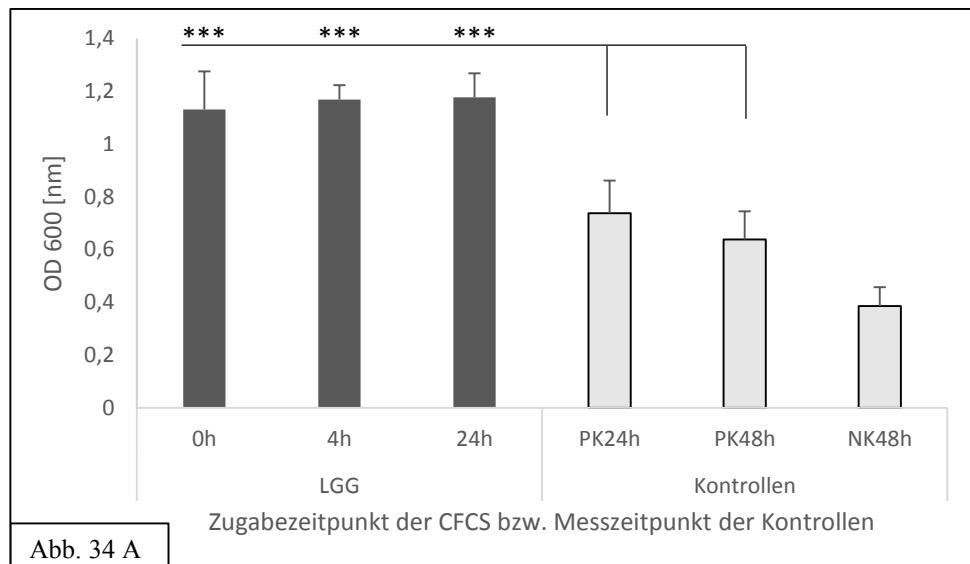


Abb. 34 A

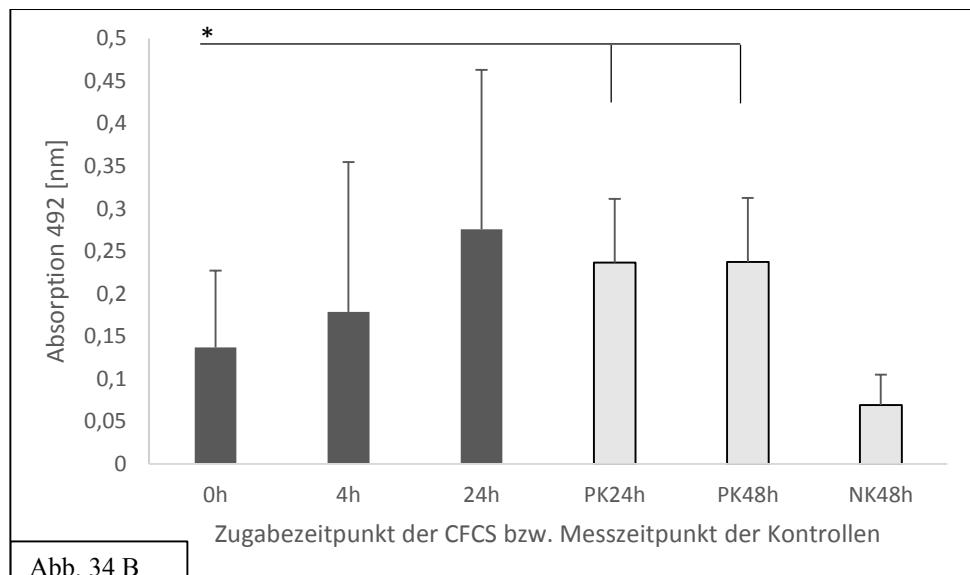


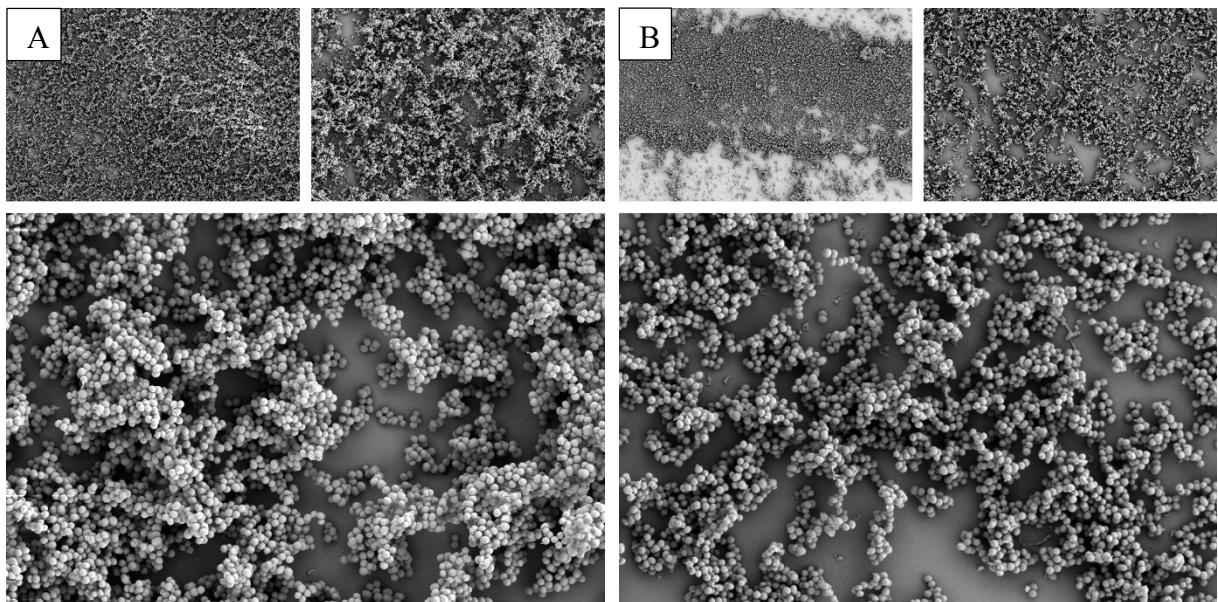
Abb. 34 B

**Abbildung 34 A-B: Einfluss des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG (LGG) Kulturüberstand auf das Wachstum von *S. epidermidis* Kulturen.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der *S. epidermidis* Kultur. Abb. 34 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>), Abb. 34 B: Absorption (OD<sub>492nm</sub>) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> >0,05. n= 4, Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zu den PK nach 24 Std. (PK24h) und 48 Std. (PK48h). Nicht dargestellt: Signifikante Unterschiede der PK's zur Negativkontrolle (NK48h).

Unabhängig vom Zeitpunkt resultierte eine im Vergleich mit den Positivkontrollen höhere optische Dichte bei Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand zu den Kulturen.

*S. epidermidis* wuchs unabhängig vom Zeitpunkt auch in Form eines Biofilms. Die Biofilmmasse war gegenüber den Positivkontrollen verringert, wenn die Zugabe sofort oder 4 Stunden nach Inkubationsbeginn erfolgte und vermehrt mit 24-stündiger Latenz.

Es folgt die Visualisierung der Biofilmbildung mittels REM (Abb. 35 A-B).

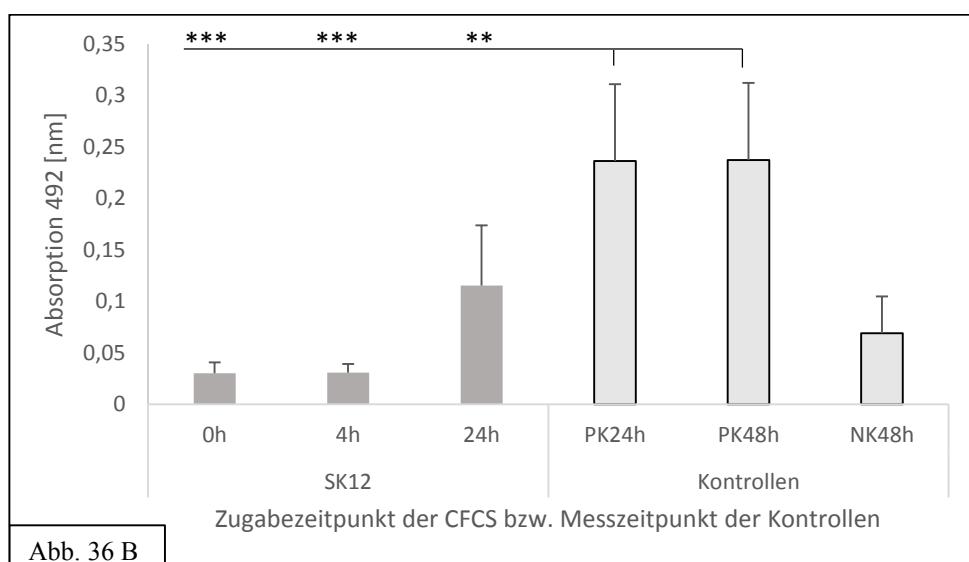
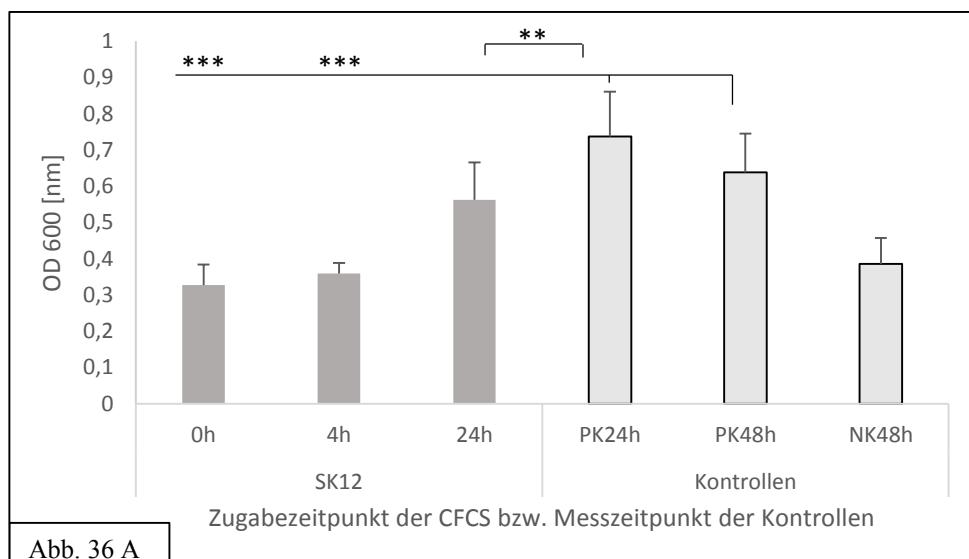


**Abbildung 35 A-B:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand. Darstellung in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Zugabezeitpunkte zu Stunde 0 (A) und 24 (B).

Sowohl bei sofortiger Zugabe des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes zur *S. epidermidis* Kultur, als auch bei um 24 Stunden versetztem Zusatz ließen sich flächige, mehrschichtige Biofilmstrukturen rasterelektronenmikroskopisch detektieren.

### 4.6.4 Kultivierung von *S. epidermidis* unter zeitversetzter Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand

Die zeitabhängige Wirkung von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand auf planktonisches- und Biofilmwachstum von *S. epidermidis* wird im Folgenden dargestellt (Abb. 36 A-B).

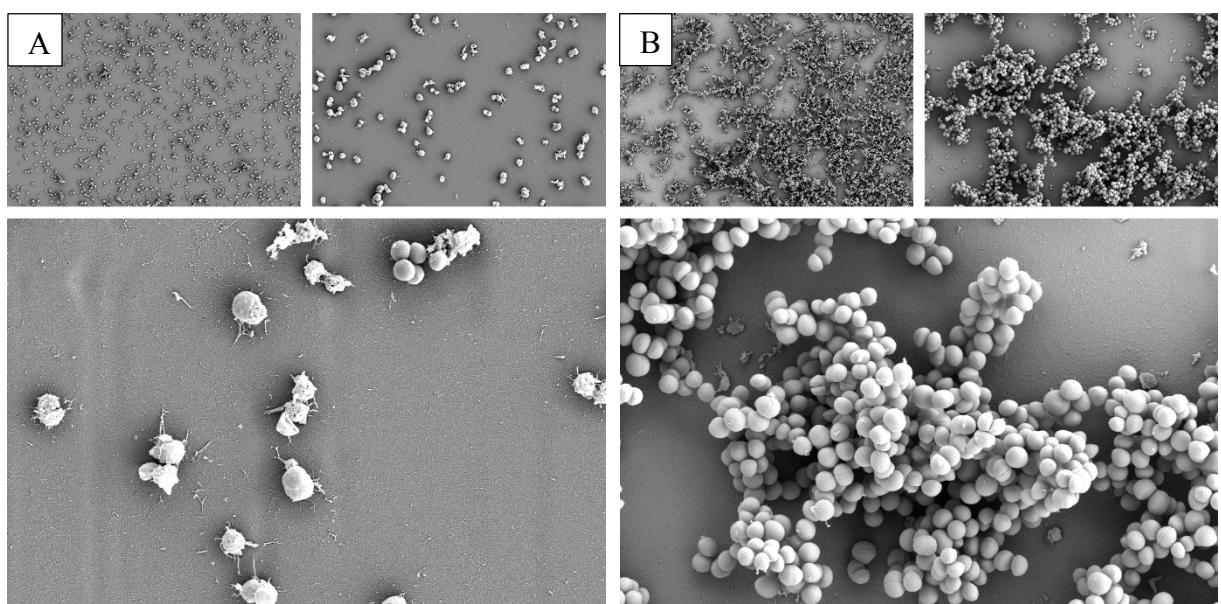


**Abbildung 36 A-B: Einfluss des Zugabezeitpunktes von *S. salivarius* K12 (SK12) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von *S. epidermidis* Kulturen.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der *S. epidermidis* Kultur. Abb. 36 A: optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>), Abb. 36 B: Absorption (OD<sub>492nm</sub>) nach Safraninfärbung. Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> von >0,05. n= 4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zu den PK nach 24 (= PK24h) und nach 48 Std. (= PK48h). Die Unterschiede der Positivkontrollen zur Negativkontrolle (= NK48h) sind jeweils signifikant (nicht dargestellt).

Die optische Dichte der *S. epidermidis* Kulturen variierte mit dem Zugabezeitpunkt. Die geringsten Werte der OD wurden bei sofortiger und um 4 Stunden verzögerter Zugabe des Kulturüberstandes zur Kultur gemessen. Diese waren im Vergleich mit den beiden Positivkontrollen statistisch höchst signifikant geringer. Erfolgte der Zusatz des Überstandes mit 24-stündiger Latenz, war die optische Dichte der Kultur am Untersuchungsende zwar höher als bei früherer Zugabe, aber immer noch statistisch hoch signifikant geringer als die der 24 Stunden Positivkontrolle.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurden deutlich reduzierte Absorptionswerte gemessen. Sofern der Zusatz sofort bzw. nach 4 Stunden erfolgte, konnte gar kein Biofilmwachstum nachgewiesen werden. Diese Unterschiede waren im Vergleich zu den Positivkontrollen statistisch höchst signifikant. Bei einer um 24 Stunden verzögerten Zugabe des Kulturüberstandes konnte zwar Biofilm detektiert werden, dieser wies jedoch statistisch hoch signifikant weniger Masse auf als in den Kontrollen. Insbesondere hinsichtlich des Vergleichs mit der 24 Stunden Positivkontrolle kann hier eine Reduktion schon präformierten Biofilms angenommen werden. Die Absorptionswerte der Negativkontrolle weisen auf eine Kontamination mit Bakterienzellen hin.

Es folgt die Visualisierung der Biofilmbildung mittels REM (Abb. 37 A-B).

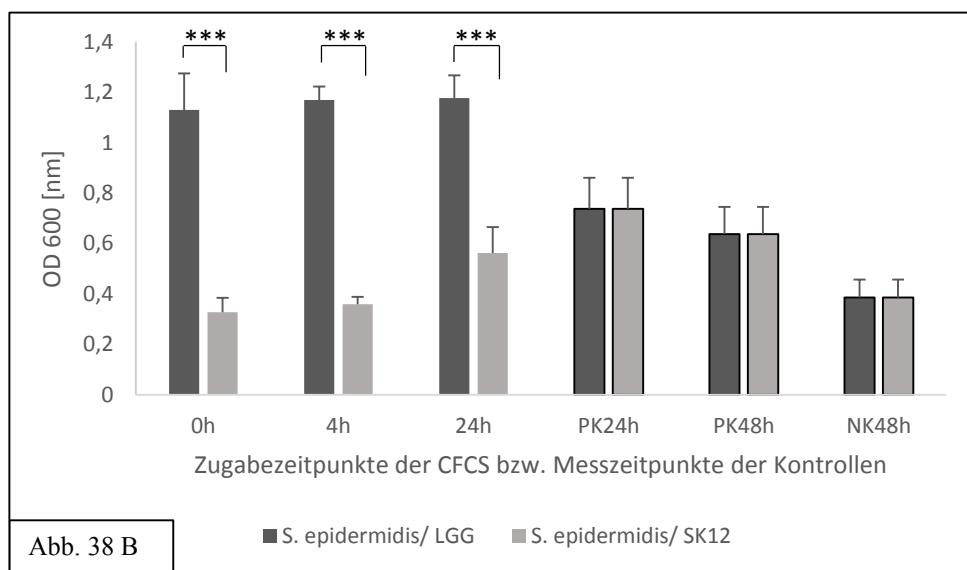
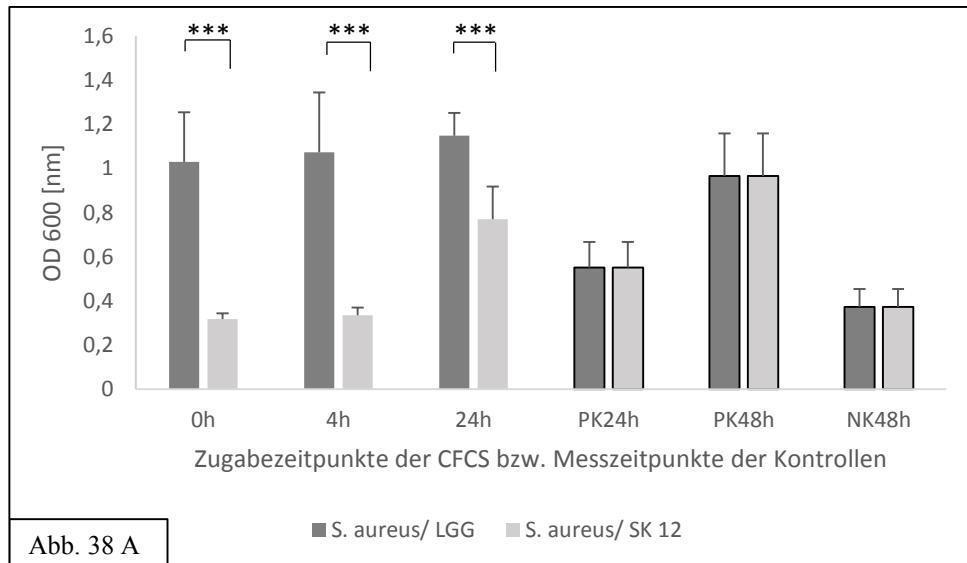


**Abbildung 37 A-B:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand. Darstellung in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. Zugabezeitpunkte zu Stunde 0 (A) und 24 (B).

Rasterelektronenmikroskopisch waren bei sofortiger Zugabe des *S. salivarius* K12 Kulturüberstandes zur *S. epidermidis* Kultur nur vereinzelt Staphylokokken nachweisbar. Bei einer um 24 Stunden verzögerten Zugabe waren Biofilmstrukturen in Form eines mehrschichtigen, flächigen Wachstums von *S. epidermidis* erkennbar.

### 4.6.5 Vergleich der zeitabhängigen Wirkung probiotischer Kulturüberstände

Der Einfluss des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 Kulturüberständen auf das Staphylokokkenwachstum wird basierend auf den quantitativen Auswertungen der Endpunkt- und Absorptionsmessungen im Folgenden gegenübergestellt (Abb. 38 A-B, Abb. 39 A-B).



**Abbildung 38 A-B: Planktonisches Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* Kulturen in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG (LGG) und *S. salivarius* K12 (SK12) Kulturüberstand.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der Staphylokokkenkulturen. Endpunktmessungen (OD<sub>600nm</sub>) im Mikrotiterplatten-Lesegerät, PK24h= Positivkontrolle nach 24 Std. sowie 48 Std. (PK48h), NK48h= Negativkontrolle nach 48 Std., n=4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kulturüberständen (signifikante Unterschiede zu den PK in Abb. 30,32,34,36 A).

Gemessen an der optischen Dichte planktonisch wachsender *S. aureus* Kulturen hat der Kulturüberstand von *L. rhamnosus* im Vergleich zur Positivkontrolle keinen bzw. einen leicht wachstumsverstärkenden Einfluss. Insbesondere für die Zugabe nach 24-stündiger Inkubation, kann dies auf die Anwesenheit zusätzlicher Nährstoffe im Kulturüberstand hindeuten. Für die optische Dichte von *S. epidermidis* Kulturen lässt sich ein eindeutiger wachstumsfördernder Einfluss verzeichnen. Der *S. salivarius* Kulturüberstand zeigt bei früher Zugabe zum Versuch die bekannt inhibierende Wirkung. Sofern die Keime zu einer gewissen Dichte herangewachsen sind, ist der Effekt deutlich geringer. Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass die optische Dichte

einer Keimsuspension nichts über die Lebensfähigkeit der darin enthaltenen individuellen Bakterienzellen aussagt – lebende und tote Bakterienzellen weisen gleichermaßen eine optische Dichte auf.

Der Einfluss des Zugabezeitpunktes probiotischer Kulturüberstände auf die Biofilmbildung von *S. aureus* bzw. *S. epidermidis* wird nachfolgend gegenübergestellt (Abb. 39 A-B).

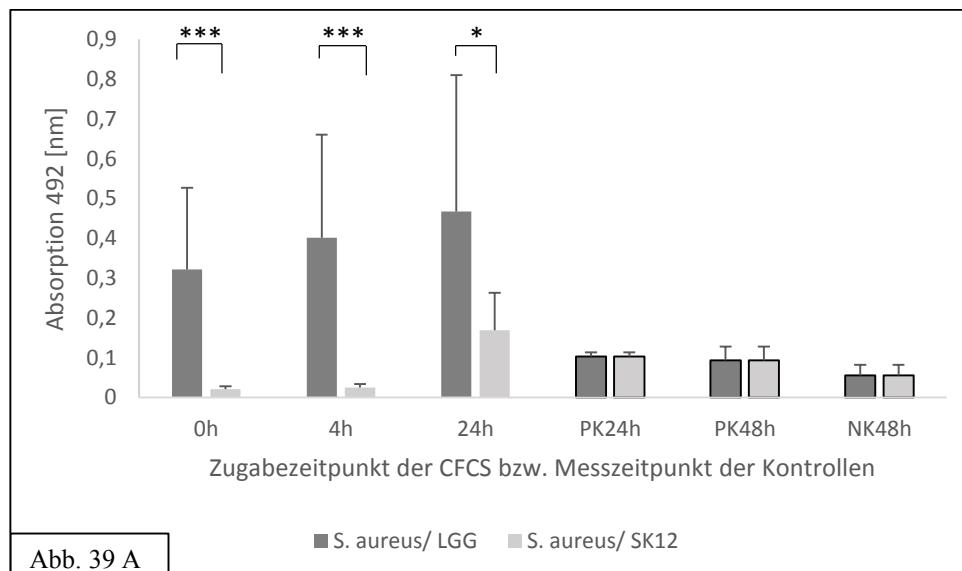
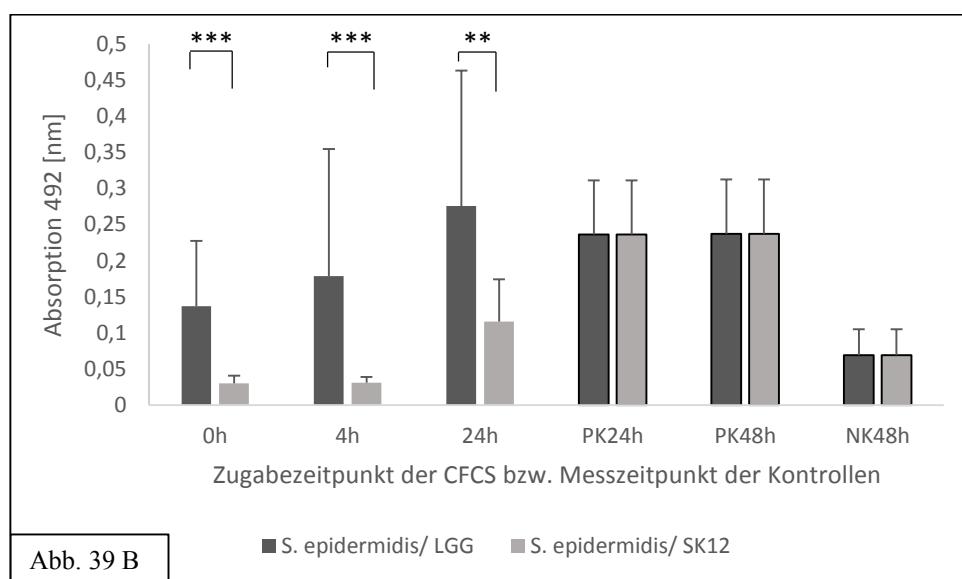


Abb. 39 A



**Abbildung 39 A-B: Biofilmwachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von *L. rhamnosus* GG (LGG) und *S. salivarius* K12 (SK12) Kulturüberständen.** Zugabe sofort (0h), nach 4 (4h) und 24 Std. (24h) Inkubation der Staphylokokkenkulturen. Absorptionsmessungen (OD<sub>492nm</sub>), Biofilm: typischerweise ab OD<sub>492nm</sub> von >0,05, PK24h= Positivkontrolle nach 24 Std. sowie 48 Std = PK48h, NK48h= Negativkontrolle nach 48 Std., n=4, dargestellt: Mittelwerte, Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kulturüberständen (signifikante Unterschiede zu den PK in Abb. 30,32,34,36 A).

Der *L. rhamnosus* Kulturüberstand hat in allen Fällen einen deutlich fördernden Einfluss auf das Biofilmwachstum des *S. aureus* Stamms, wobei der Effekt mit einer späteren Zugabe zunimmt.

Der *S. salivarius* Kulturüberstand hemmt bei früher Zugabe das Biofilmwachstum. Bei Zugabe nach einem Tag stattgehabtes Biofilmwachstum ist kein oder sogar ein leicht fördernder Einfluss zu verzeichnen. Im Fall des *S. epidermidis* Stamms haben beide Kulturüberstände bei früher Zugabe einen inhibierenden Einfluss auf das Biofilmwachstum, wobei der Effekt des *S. salivarius* Überstandes deutlich ausgeprägter ist. Werden die Überstände nach einem Tag Biofilmwachstum dazu gegeben, hat der *L. rhamnosus* Überstand keinen Effekt mehr, während für den *S. salivarius* Überstand noch ein leicht inhibierender Effekt zu verzeichnen ist. Der Vergleich mit der 24 Stunden Positivkontrolle suggeriert hier zusätzlich, dass schon präformierter Biofilm nach um 24 Stunden versetzter Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand außerdem wieder in seiner Masse reduziert werden kann.

## 5 Diskussion

Probiotika werden seit langem eingesetzt, um die Gesundheit von Menschen und Tieren zu fördern bzw. wiederherzustellen (Gasbarrini et al. 2016). Die bisherige Forschung beschäftigt sich vorrangig mit deren Wirkung im Gastrointestinaltrakt (Petrof 2009; Saxelin et al. 2005; Rowland et al. 2010). Im Zusammenhang mit Probiotika sind biofilmbildende Zielorganismen wie *S. aureus* und insbesondere *S. epidermidis* als opportunistisch pathogene Keime, die vorzugsweise Haut und Schleimhäute besiedeln, vergleichsweise wenig erforscht.

Oft bedeuten Biofilmmassozierte Infektionen aufgrund von Therapieversagen oder anderweitigen Komplikationen ein Trauma für den Patienten und dadurch bedingt erhöhte Kosten für das Gesundheitssystem (Romling und Balsalobre 2012; Chen et al. 2013). Bakterien liegen jedoch vorrangig in dieser Form vor und verantworten so ätiologisch überdurchschnittlich häufig Infektionen im klinischen Alltag. Überdies unterscheiden sie sich von ihrem planktonischen Pendant in einer deutlich reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika. Bisher gibt es noch keine breit wirkende antimikrobielle Substanz mit wirkungsvollen Antibiofilm-Eigenschaften, sodass sowohl die Prävention als auch die Therapie von biofilmmassozierten Infektionen aktuell eine große Herausforderung darstellen (Taylor et al. 2014; Di Luca et al. 2014; Hoiby et al. 2015; Bryers 2008; Pletzer und Hancock 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, inwieweit *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* als ätiologisch am häufigsten isolierte Keime bei implantatassoziierten Infektionen durch probiotische Bakterien bzw. deren Kulturüberstände in ihrem Wachstum gehemmt werden können. Von besonderem Interesse war hierbei ein möglicher Einfluss auf die für die Virulenz der Staphylokokken bedeutsame Biofilmbildung.

### 5.1 Lebendkeimzahlbestimmung von *S. aureus* und *S. epidermidis*

Im Zuge der Versuchsdurchführung war die Herstellung definierter und reproduzierbarer Konzentrationen von Staphylokokkenkulturen nötig. Dies geschah über die Korrelation von Lebendkeimzahlen in den Kulturen mit deren optischer Dichte (Madigan und Martinko 2009). Für in frischem Kulturmedium wachsende Kulturen ergab die Korrelation dieser Werte eine maßgebende Reproduzierbarkeit, auf deren Basis die Messungen durch den Fokus auf die Dichtebestimmungen vereinfacht werden konnten und die später erlangten Versuchsergebnisse ein hohes Maß an Validität erlangten.

Für die im Rahmen dieser Studie untersuchten biofilmgebundenen Bakterien korreliert die Messung des Trübungsgrades nicht mehr zwingend mit der Lebendkeimzahl. Diese Bakterien befinden sich in der stationären Phase ihres Daseins, d.h. Teilungsvorgänge kommen kaum noch vor und ein erheblicher Teil der Bakterien stirbt sukzessive ab, ohne dass sich dabei die optische Dichte des Mediums merklich ändern würde. Für quantitative Messungen von in diesem Zustand noch lebenden, teilungsfähigen Bakterien wären daher zusätzliche Ermittlungen der Lebendkeimzahl von Bedeutung. Weiterhin könnten die Lebendkeimzahlen wachsender und stationärer Bakterienkulturen miteinander verglichen werden, um so Maxima an vitalen Zellen und Absterbekinetiken zu erfassen (Ceri et al. 1999; Standar et al. 2010; Wiegand et al. 2008). Nicht berücksichtigt werden hier jedoch Bakterien, die sich im VBNC (*viable but non culturable*) Zustand befinden, d.h. die vorrübergehend unkultivierbar sind. Diese Bakterien sind zwar Bestandteil der Probe und wurden in den Endpunkt- sowie Absorptionsmessungen miterfasst, können aber über die herkömmlichen Methoden der einfachen Lebendkeimzahlbestimmung nicht detektiert werden (Hannig et al. 2010; Stiefel et al. 2016; Simoes et al. 2005). Die Bestimmung der Lebendkeimzahl als zusätzliche Auswertungsmöglichkeit der Versuche auf Mikrotiterplatten würde daher methodisch bedingt zu Ungenauigkeiten führen. Eine Lebend-Tot-Färbung mit anschließender Bestimmung des Lebendzellanteils im Fluoreszenzmikroskop könnte in diesem Fall eine sinnvolle Ergänzung darstellen (Oliver 2010; Li et al. 2014).

## **5.2 Optimierung der Kultivierungsbedingungen für die *in-vitro* Biofilmbildung**

Das Wachstum von Bakterien in Biofilmen ist ein äußerst dynamischer und komplex regulierter Prozess (Monroe 2007). Die Ausbildung von Biofilm ist grundsätzlich stark an die Bedingungen in der Umwelt gebunden, sodass hierfür fördernde Einflüsse von hemmenden Einflüssen unterschieden werden können (Hall-Stoodley und Stoodley 2002). Dabei unterscheidet sich die *in-vitro* Anzucht von Biofilmen deutlich von den Wachstumsbedingungen von *in-vivo* Biofilmen. Bei letzteren sind die Umgebungsbedingungen erheblich komplexer und können weniger kontrolliert werden (Paharik und Horswill 2016). Eine detailgetreue Nachahmung der natürlichen Verhältnisse im menschlichen Körper ist aus diesen Gründen im Labor kaum möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biofilmbildung von *S. aureus* und *S. epidermidis* hinsichtlich der Wahl des Nährmediums sowie der Beschichtung der Versuchsoberfläche mit humanen Matrixproteinen optimiert.

Die Beschichtung der Kavitäten von Mikrotiterplatten mit humanen Fibronectin führte für beide Staphylokokkenarten zur insgesamt kräftigsten Biofilmbildung und wies im Vergleich mit den

Beschichtungen mit Fibrinogen bzw. Kollagen I höchst signifikante Unterschiede auf. Die Rolle Matrixprotein-vermittelter Adhäsion von Bakterien und konsekutiver Ausbildung von Biofilm insbesondere durch Fibronectin wurde für die Biofilmgenese wiederholt in der Literatur beschrieben (Switalski et al. 1983; Navarre und Schneewind 1999; Vergara-Irigaray et al. 2009). Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Staphylokokkenarten sind zwar in der Lage, auf abiotischen Oberflächen zu adhärieren (Foster et al. 2014; Büttner et al. 2015; Becker et al. 2014), jedoch wird dies durch die Konditionierung mit organischen Makromolekülen deutlich gefördert (Speziale et al. 2014). Dieser Effekt konnte in der entsprechenden Versuchsreihe belegt und dann für Folgeversuche genutzt werden.

Des Weiteren wurde stammabhängig ein deutlicher Einfluss des Nährmediums auf die Biofilmbildung ermittelt. *S. aureus* Biofilm wuchs in CB- Nährmedium wesentlich kräftiger heran, während *S. epidermidis* Biofilm in TSB Nährmedium vermehrt gebildet wurde. Der Einfluss des verwendeten Nährmediums und dessen Zusammensetzung auf das Ausmaß der Biofilmbildung ist publizistisch dokumentiert, wobei auch innerhalb einer Art stammabhängige Unterschiede existieren (Stoodley et al. 1999; Stepanovic et al. 2007; Mack et al. 2001). Daher war es wichtig für die hier verwendeten Staphylokokken das jeweils optimale Medium zu ermitteln.

### 5.3 Versuche auf festem Medium

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Louis Pasteur das Phänomen der interbakteriellen Hemmung am Beispiel von *Bacillus anthracis*, dessen Wachstum in Ko-Kultur durch „gewöhnliche“ Bakterien, nämlich *Escherichia coli*, gehemmt wurde. Mit dem beschriebenen antagonistischen Effekt wurde somit viele Jahre vor den ersten gezielten Untersuchungen zu probiotischen Bakterien der Grundstein für die Erforschung protektiver bzw. therapeutischer Eigenschaften einiger Bakterien gelegt (Sams et al. 2014). Inzwischen werden Antagonisierungsversuche auf festen Medien regelhaft zur Evaluation einer möglichen kompetitiven bzw. antimikrobiellen Wirkung von Bakterien herangezogen. Insgesamt stellen die durchgeföhrten Versuche einfache Methoden der qualitativen Auswertung sowohl von Wachstumsmustern in Ko-Kulturen als auch der Empfindlichkeit eines Stammes gegenüber antimikrobiellen Substanzen dar (Holder und Boyce 1994; Bauer et al. 1966; Barrow 1963; Madigan und Martinko 2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten Konkurrenztests zeigten, dass sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* stets die Kultur von *L. rhamnosus* GG überwucherten bzw. verdrängten. Dies

war ebenfalls für die Konstellation *S. aureus* / *S. salivarius* K12 der Fall. Lediglich bei Ko-Kultivierung von *S. epidermidis* mit *S. salivarius* K12 zeigte sich eine die Staphylokokkenkultur verdrängender Effekt durch den probiotischen Keim. Weiterhin ließ sich in den Agardiffusionstests für keine der vier Bakterien Konstellationen ein antimikrobieller Effekt in Form von Hemmhöfen um die eingestanzten Kavitäten nachweisen.

In einigen Studien zeigte jedoch insbesondere *L. rhamnosus* GG eine von den hier demonstrierten Versuchsergebnissen abweichende Wirkung, einerseits wenn dieser Keim ko-kultiviert wurde, und andererseits wenn man dessen Kulturüberstand in Agardiffusionstests verwendete (Silva et al. 1987; Mariam et al. 2014; Karska-Wysocki et al. 2010). Das Wachstum der zu antagonisierenden Bakterien, beispielsweise der hier besonders relevanten Staphylokokken, konnte in diversen Versuchsreihen gehemmt werden. Daher erfolgte die weitere Arbeit am Nachweis einer zu erwartenden antimikrobiellen Wirkung gegenüber *S. aureus* und *S. epidermidis*. Dieses Ziel wurde einerseits über die Möglichkeit, die probiotischen Kulturüberstände aufzukonzentrieren, und andererseits über quantitative Versuche auf Mikrotiterplatten, unter Berücksichtigung sowohl des planktonischen- als auch des Biofilmwachstums, verfolgt.

## 5.4 Kulturüberstände – Herstellung und Eigenschaften

Der Einsatz von ‚Probiotika‘ umfasst per definitionem die Verabreichung lebender Bakterien an Menschen oder Tiere, typischerweise in Konzentrationen zwischen  $10^6$  –  $10^{10}$  Bakterien/ Tag (Champagne et al. 2011). Zwar werden Probiotika grundsätzlich als sicher und mit einem deutlichen Nutzen für den Menschen eingeschätzt, jedoch kann es in seltenen Fällen insbesondere bei gestörter Immunkompetenz auch zu unerwünschten Reaktionen bzw. zu durch die Bakterien verursachten septischen Komplikationen kommen (Sanders et al. 2010; Snydman 2008; Hibberd et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurde auch das Vorhandensein antibiotischer Resistenzgene beschrieben, sodass probiotische Bakterien theoretisch selbst unempfindlich gegenüber Antibiotika sein können oder diese Resistenzgene an andere Bakterien weitergeben können (Bär 2012; Imperial und Ibana 2016).

Probiotika entfalten über eine Vielzahl an Mechanismen ihre Wirkung, einige liegen in der direkten Antagonisierung anderer Keime begründet, d.h. beispielsweise in der Konkurrenz um Nährstoffe sowie der Blockade von Bindungsstellen am Epithel; wiederum andere Mechanismen beruhen auf der Sekretion antimikrobiell wirkender Substanzen (Bermudez-Brito et al. 2012; Lievin-Le Moal und Servin 2014; Wescombe et al. 2012).

Kulturüberstände enthalten aufgrund des Herstellungsprozesses keine Bakterien, sondern im Idealfall nur noch die von diesen zuvor produzierten und ins Nährmedium sezernierten aktiven Substanzen. Hinsichtlich eines möglichen zukünftigen medizinischen Einsatzes würde das den Vorteil einer im Gegensatz zu den eigentlichen ‚Probiotika‘ wesentlich sichereren bzw. unbedenklicheren Anwendung für den Patienten haben. Dies ergibt sich einerseits aus dem natürlichen Ursprung der Überstände und andererseits aus der vergleichsweise geringen Infektionsgefahr, die aufgrund der nicht mehr vorhandenen Zellen gleich Null ist. Daher könnten Kulturüberstände die Grundlage für ein Therapeutikum mit einem möglichen medizinischen Nutzen und zugleich mit guter Akzeptanz durch ÄrztInnen und PatientInnen bilden (Beristain-Bauza et al. 2016; Imperial und Ibana 2016; Harb et al. 2013). In Anbetracht der weltweit zunehmenden Resistenz gegenüber Antibiotika, sowie des Problems, dass die meisten Antibiotika außerdem nicht gegen Biofilm gebundene Bakterien wirken, stellt dies einen gangbareren alternativen Weg für eine antiinfektiöse Therapie dar (Czaplewski et al. 2016; WHO- World Health Organization 2015; Singh et al. 2010; Araujo et al. 2014).

Ein weiterer Vorteil von Kulturüberständen gegenüber Ganzzellpräparaten liegt in der Möglichkeit der Weiterverarbeitung bzw. insbesondere der Aufkonzentrierung (Champagne et al. 2011). Letztlich führt eine Aufkonzentrierung zum Erhalt stärker konzentrierter antimikrobieller Substanzen in den Proben, erwartungsgemäß könnte dies zu einer deutlichen Steigerung der vermittelten Wirkung führen (Harb et al. 2013). Die Lyophilisation gilt in diesem Zusammenhang bisher als eine vergleichsweise schonende Methode der Aufkonzentrierung bzw. Konservierung von Stoffen wie z.B. Proteinen (Noth et al. 2015; Liu 2006).

Aus diesem Grund wurde die Lyophilisation als Methode der Aufkonzentrierung für diese Arbeit hinsichtlich ihrer Praktikabilität und der Wirksamkeit des resultierenden Endproduktes untersucht. Im Vergleich mit der Ultrafiltration bot sie den Vorteil, dass alle Bestandteile des Kulturüberstandes beibehalten und aufkonzentriert werden konnten. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass eine stärker inhibierende Wirkung durch lyophilisierte-, als durch ultrafiltrierte Kulturüberstände erreicht wurde. Da im Zuge der Ultrafiltration niedermolekulare Stoffe mit einem Molekulgewicht von < 3 kDa herausgefiltert wurden, deutete dies daraufhin, dass die für die vermittelte Wirkung verantwortlichen Substanzen zu dieser Fraktion gehören.

Jedoch müssen auch Unterschiede beim Vorgang des Lyophilisierens an sich berücksichtigt werden. Diese können entsprechend je nach Art der Gefriertrocknungsanlage und Abweichungen während der einzelnen Trocknungsschritte zu einer veränderten Stabilität der Proteine führen (Roy und Gupta 2004). Das ist insbesondere für die in dieser Arbeit hergestellten

Kulturüberstände zu beachten, da diese im Zuge der Aufkonzentrierung mehrfach dem Gefriertrocknungsprozess unterzogen werden mussten. Speziell in Hinblick auf die Versuchsergebnisse des *L. rhamnosus* GG Kulturüberstandes, welcher in den Versuchen insgesamt nicht den erwarteten inhibitorischen Effekt zeigte, könnte dies eine Rolle spielen.

Die von probiotischen Bakterien sezernierten Substanzen sind vielfältig und unterscheiden sich entsprechend in ihren Wirkmechanismen. Neben der Sekretion organischer Säuren, welche über eine pH-Wert Änderung Einfluss auf andere Mikroorganismen nehmen können, demonstrieren zahlreiche antimikrobielle Substanzen einen direkten Antagonismus gegenüber anderen Mikroorganismen (Lievin-Le Moal und Servin 2014; Bermudez-Brito et al. 2012). Eine nähere Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen probiotischer Kulturüberstände wurde in anderen Studien häufig in Form von Untersuchungen zur pH- oder Proteasen-Stabilität vorgenommen (Tejero-Sariñena et al. 2012; Silva et al. 1987; Mariam et al. 2014; Beristain-Bauza et al. 2016). Beristain-Bauza beschrieb eine verringerte Wirkung von *L. rhamnosus* Kulturüberständen, wenn der pH-Wert der Probe angehoben bzw. neutralisiert wurde und einen kompletten Wirkungsverlust durch Zugabe einer Protease. Die in dieser Studie erbrachten Versuchsergebnisse sprachen also für eine Neutralisierung wirkungsvermittelnder, säurehaltiger Bestandteile in den *L. rhamnosus* Kulturüberständen, sowie für das Vorhandensein proteinöser antimikrobieller Substanzen. Da der pH-Wert in den hier durchgeführten Versuchen nicht angepasst wurde, würde dies zu einer möglichen Erklärung für die augenscheinlich ausbleibende Wirkung von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand beitragen, welcher bekanntermaßen zu einem gewissen Teil seine Wirkung über die Sekretion von Milchsäure entfaltet (Tejero-Sariñena et al. 2012). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass *S. salivarius* K12 in den hier durchgeführten Versuchen Wirkung zeigt. Dieser Keim produziert u.a. BLIS – Polypeptid-Bakteriozine – als antimikrobielle Substanzen und wirkt daher primär nicht über eine Beeinflussung des pH-Werts (Ross et al. 1993; Barbour et al. 2016).

Einige Milchsäurebakterien produzieren weiterhin noch Biotenside, welche die Biofilmbildung anderer Bakterien unterdrücken können (Van Hoogmoed et al. 2000; Busscher et al. 1997; Fariq und Saeed 2016). Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Oberflächenspannung der Kulturüberstände, um eine mögliche detergierende Wirkung der darin enthaltenen Substanzen zu berücksichtigen. Die Oberflächenspannung beider probiotischer Kulturüberstände lag höher als die von Kontrollen mit detergierenden Substanzen, z.B. Spülmittel. Auch der Vergleich der Dichte-, bzw. Kapillaritätswerte mit Spülmittel sprach gegen eine detergierende Wirkung der Kulturüberstände. Daher ist anhand der hier ermittelten Parameter ein biofilminhibierender

Einfluss durch möglicherweise in den Kulturüberständen enthaltenen Biotensiden wenig wahrscheinlich.

Zusammenfassend sprechen die beobachteten Phänomene für folgende Eigenschaften der im *S. salivarius* K12 Kulturüberstand enthaltenen antimikrobiellen Substanzen: die Molekülgröße liegt im Bereich < 3 kDa, die Wirksamkeit nach wiederholtem Einfrieren und Wiederaufstauen während des Herstellungsprozesses spricht für eine physikochemische Stabilität, die vermittelte Wirkung beruht wahrscheinlich nicht auf Biotensiden, im Wirkspektrum inbegriffen sind gleichermaßen *S. aureus* und *S. epidermidis*, die Wirkung ist augenscheinlich deutlich ausgeprägter auf Biofilm- als auf planktonische Bakterien, die Hemmwirkung auf das Biofilmwachstum ist konzentrations- und zeitabhängig und die Substanz(en) können auch präformierten Biofilm reduzieren. Es ist keine definitive Differenzierung zwischen einer bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung möglich. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen deuten jedoch auf eine erhaltene Vitalität der in reduzierter Menge vorhandenen Staphylokokken hin.

Anhand dieser Erkenntnisse können im Vergleich zu Literaturdaten Vermutungen hinsichtlich des vermittelnden Agens vorgenommen werden. Grundsätzlich finden sich zunehmend Studien zu natürlich vorkommenden antimikrobiellen Substanzen und deren potentiellem Nutzen (Czaplewski et al. 2016; Agarwal et al. 2016). Eine große Gruppe stellen hierbei die sogenannten AMP's -antimikrobielle Peptide- dar, welche als Bestandteil der Wirtsabwehr bei den meisten Lebewesen vorkommen (Lazarev und Govorun 2010; Fjell et al. 2011).

Insbesondere die Bakteriozine sind in diesem Zusammenhang interessant, da sie von Bakterien ribosomal produziert werden (Hegarty et al. 2016). Bakteriozine werden in vier Klassen eingeteilt, wobei die Klasse I die für *S. salivarius* bereits beschriebenen Lantibiotika Salivaricin A und B beinhaltet. Diese beiden Substanzen sind niedermolekular, wirken gegen grampositive Keime und zeigen ferner eine konzentrationsabhängige Wirkung (Barbour et al. 2016). In Hinblick auf die Beobachtungen dieser Arbeit liegt es also nahe, dass es sich bei den vermittelnden Substanzen um eben diese beiden Bakteriozine handeln könnte. Dennoch muss unbedingt berücksichtigt werden, dass die meisten der bisherigen Studien den Effekt auf das planktonische-, nicht aber auf das Biofilmwachstum untersuchten (Tagg et al. 1976; Cotter et al. 2013; Drider et al. 2016). Der hier beobachtete Effekt zeichnete sich jedoch gerade bei der Biofilmbildung und -reifung ab. Zudem produziert *S. salivarius* weiterhin BLIS, also den Bakteriozinen ähnliche inhibitorische Substanzen, die noch nicht näher beschrieben sind.

Darunter können auch Substanzen mit Antibiofilm-Eigenschaften subsummiert sein (Heng et al. 2007).

An dieser Stelle sei auf eine weitere Gruppe antimikrobieller Peptide verwiesen, den Antibiofilm-Peptiden (Batoni et al. 2011; Taylor et al. 2014; Di Luca et al. 2014). Diese Peptide zeigen eine eher schwache Wirkung auf planktonische Bakterien, jedoch eine ausgesprochen starke Wirkung auf deren Biofilmwachstum. In diesem Zusammenhang ist nicht nur die Hemmung der Biofilmbildung beschrieben, sondern auch die Reduktion von bereits präformiertem Biofilm. Das Wirkspektrum ist ebenfalls breit und umfasst grampositive Keime. Die Peptide sind zudem niedermolekular (Reffuveille et al. 2014; La Fuente-Nunez et al. 2012; Pletzer und Hancock 2016). Antibiofilm-Peptide werden wie alle antimikrobiellen Peptide von den meisten Lebewesen produziert, jedoch beschränkt sich die Beschreibung in der Literatur vorrangig auf das von *Lactococcus lactis* produzierte Nisin, sowie auf humane Antibiofilm-Peptide (Shin et al. 2016; Reffuveille et al. 2014; Overhage et al. 2008). In diesem Sinne wären die weiterführende Charakterisierung antimikrobieller Substanzen, z.B. der von *S. salivarius* sezernierten BLIS, sowie die Untersuchung von deren Biofilmwirkung äußerst interessant.

## 5.5 Versuche zur Wirkung probiotischer Kulturüberstände

Angelehnt an etablierte Versuche zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber Antibiotika wurden Versuche zur minimalen Hemmkonzentration probiotischer Kulturüberstände durchgeführt. Von besonderem Interesse waren bei diesen Versuchen nicht nur der Nachweis einer inhibitorischen Wirkung der Kulturüberstände per se sondern auch die dafür nötige Konzentration und der optimale Zugabezeitpunkt. Weiterhin sollte im Gegensatz zur konventionellen Antibiotikatestung hierbei nicht nur der Effekt auf das planktonische Bakterienwachstum untersucht werden, sondern ein besonderes Augenmerk auf dem Biofilmwachstum liegen.

Die Ergebnisse des Einflusses von Kulturüberstand auf die planktonischen Formen beider Staphylokokkenarten ergaben wahrscheinlich gattungsweit gültige Effekte. Der *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand erhöhte die optische Dichte der Staphylokokkenkulturen, während der *S. salivarius* K12 Kulturüberstand deren optische Dichte reduzierte. Unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand ergab sich grundsätzlich für *S. aureus* ein leichter und für *S. epidermidis* ein eindeutig wachstumsfördernder Effekt. Hingegen vermochte der *S. salivarius* K12 Kulturüberstand bei früher Zugabe beide Staphylokokkenkulturen gleichermaßen

zu inhibieren. Nach 24-stündiger Latenz der Zugabe konnte noch ein leichter inhibitorischer Effekt verzeichnet werden.

Im Gegensatz zur planktonischen Form von *S. aureus* und *S. epidermidis* konnte hinsichtlich des Einflusses auf die Biofilmbildung in den MHK-Versuchen ein speziesspezifischer, jedoch ebenfalls konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden. Insgesamt ergab sich unter Zugabe von *L. rhamnosus* GG- als auch *S. salivarius* K12 Kulturüberstand ein deutlich reduziertes *S. epidermidis* Biofilmwachstum. Die beiden höchsten Konzentrationen von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand unterdrückten die Biofilmbildung weitestgehend.

Dagegen war dieser reduzierende bzw. unterdrückende Effekt auf *S. aureus* Biofilm nur bei Verwendung von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand zu beobachten. *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand zeigte keinen eindeutigen Effekt auf den von *S. aureus* gebildeten Biofilm. Hinsichtlich eines zeitabhängigen Einflusses auf die Biofilmbildung wurde bei Verwendung von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand ein ab dem Zeitpunkt der Zugabe zunehmend wachstumsfördernder Effekt auf *S. aureus* Biofilm sichtbar – im Vergleich zu allerdings geringen Biofilmmassen in den Positivkontrollen. Eine mögliche Erklärung für die geringen Biofilmmassen in den Positivkontrollen kann in der Ablösung des Biofilms im Rahmen der Waschschrifte für die Färbung mit Safranin liegen (Gomez-Suarez et al. 2001). Es gibt keine generelle Empfehlung zur Anzahl der durchzuführenden Waschschrifte, jedoch werden zwei häufig als absolute Mindestanzahl angesehen, und wurden daher in dieser Arbeit angewendet (Stepanovic et al. 2007; Merritt et al. 2011; Christensen et al. 1985).

*L. rhamnosus* GG Kulturüberstand förderte die Biofilmbildung von *S. epidermidis* nur nach 24-stündigem Zeitversatz gegenüber der Einsaat der Bakterien in den Versuch. Dagegen demonstrierte *S. salivarius* K12 Kulturüberstand einen deutlich inhibierenden Effekt. Bei früher Zugabe konnte das Biofilmwachstum sowohl von *S. aureus* als auch von *S. epidermidis* unterdrückt werden. Für *S. aureus* war der Reduktionseffekt bei Zugabe mit 24-stündiger Latenz nicht mehr erkennbar, für *S. epidermidis* dagegen schon. Diese offenkundig nachträgliche Reduktion der Biofilmmasse kann z.B. bei einer durch den Kulturüberstand hervorgerufenen Destabilisierung und konsekutiv durch die Waschschrifte begünstigten Ablösung des gelockerten Biofilms auftreten (Klinger-Strobel et al. 2017). In Zusammenschau aller Ergebnisse der Versuche zur zeitversetzten Zugabe der Kulturüberstände kann man von gattungsweiten Effekten sowohl auf planktonische als auch auf biofilmgebundene Staphylokokken ausgehen.

Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Biofilmbildung erlaubte die direkte Visualisierung des gewachsenen Biofilms und stützte so die zuvor ermittelten quantitativen Ergebnisse. Bei Zugabe von *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten Biofilm durch *S. aureus* und *S. epidermidis* gebildet. Hingegen war Biofilm beim Verwenden der beiden höchsten Konzentrationen und bei zur Einsaat simultaner Zugabe von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand weder bei *S. aureus* noch bei *S. epidermidis* rasterelektronenmikroskopisch nachweisbar.

Die zentralen Aussagen, nämlich der Nachweis eines konzentrations- sowie zeitabhängigen Effekts probiotischer Kulturüberstände, entsprechen insbesondere für *S. salivarius* K12 den Ergebnissen der Literatur. Es ist möglich, eine gesteigerte Wirkung durch Aufkonzentrierung der Kulturüberstände zu erreichen (Harb et al. 2013; Silva et al. 1987; Varma et al. 2011). Ferner ist der inhibitorische Effekt abhängig vom Status des Biofilms: Es ist offenbar deutlich einfacher, eine Wirkung auf sich neu konstituierenden als auf bereits gewachsenen und gereiften Biofilm zu erzielen (Beloin et al. 2014). Da eine Therapie in der medizinischen Realität meist auf einen bereits existenten Biofilm trifft, ist die Wirkung einer Substanz bzw. eines Substanzgemisches, die die vorhandene Biofilmmasse reduziert, eine wertvolle Eigenschaft. Jedoch stellt die inhibitorische Wirkung auf das Wachstum frischer Biofilme einen umso wichtigeren präventiven Ansatz dar, und könnte z.B. bei entsprechend imprägnierten Implantatmaterialien Verwendung finden (Zhou et al. 2015; Macia et al. 2014; Bhattacharya et al. 2015; Patenge et al. 2012). Aus diesem Grund könnten probiotische Bakterien, bzw. von diesen in den Kulturüberstand sezernierte, antimikrobielle Substanzen, sowohl in präventiver als auch in therapeutischer Absicht eingesetzt werden (Hoiby et al. 2015).

## 6 Zusammenfassung

Probiotische Bakterien wie *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 werden eingesetzt, um die Gesundheit von Menschen zu fördern bzw. wiederherzustellen. Die bisherige Forschung beschäftigt sich vorrangig mit deren Wirkung im Gastrointestinaltrakt bzw. im Oropharyngealraum. Im Zusammenspiel mit Probiotika sind *S. aureus* und insbesondere *S. epidermidis* als opportunistisch pathogene Keime, die vorzugsweise Haut und Schleimhäute besiedeln und insbesondere für biofilmassoziierte Infektionen verantwortlich sind, vergleichsweise wenig erforscht. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf den zellfreien Kulturüberständen als vermittelndes Agens statt auf lebenden Bakterien, den ‚Probiotika‘.

Die von den Kulturüberständen vermittelte Wirkung konnte durch deren Aufkonzentrierung verstärkt werden. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich daher eine konzentrationsabhängige Wirkung. Der Zugabezeitpunkt zu den wachsenden bzw. in Biofilmen organisierenden Staphylokokkenkulturen beeinflusste das konsekutive Wachstum ebenfalls deutlich – je früher die Zugabe erfolgte, desto deutlicher war der antimikrobielle Effekt auf die Staphylokokken. Besonders ausgeprägt war der Effekt bei Verwendung von *S. salivarius* K12 Kulturüberstand. Mit diesem probiotischen Bakterium konnte nicht nur die Bildung und Reifung frischer Biofilme reduziert oder verhindert, sondern sogar eine Reduktion von über 24 Stunden präformierten *S. epidermidis* Biofilmen erzielt werden. Der *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand zeigte dahingegen in den meisten Fällen unabhängig von Konzentration bzw. Zugabezeitpunkt der Kulturüberstände keine deutliche inhibitorische Wirkung, sondern in einigen Konstellationen sogar eine fördernde Wirkung hinsichtlich des planktonischen- und Biofilmwachstums von *S. aureus* und *S. epidermidis*.

Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der ausgeprägten Neigung der allermeisten Bakterien zur Biofilmbildung relevant. Im medizinischen Kontext bedarf es hinsichtlich biofilmassozierter Krankheiten einer dringlichen Entwicklung sowohl effektiver therapeutischer- als auch insbesondere präventiver Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte probiotischen Kulturüberstände, vornehmlich von *S. salivarius* K12, können perspektivisch beispielsweise in *in-vivo* Modellen von Implantatinfektionen auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften geprüft werden.

# 7 Anhang

## 7.1 Thesen

1. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind opportunistisch pathogene Bakterien, die Haut und Schleimhäute des Menschen besiedeln und insbesondere für biofilmassoziierte Infektionen verantwortlich sind.
2. Das bakterielle Wachstum in Biofilmen stellt eine Anpassungsform an diverse Lebensräume dar. Kennzeichnend ist u.a. die hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen sowie im medizinischen Kontext eine ausgeprägte Resistenz biofilmgebundener Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen.
3. Biofilme verantworten ätiologisch überdurchschnittlich häufig nosokomiale Infektionen. Die Prävention und adäquate Therapie ist daher von großer Bedeutung. Bisher gibt es keine breit wirkende antimikrobielle Substanz mit wirkungsvollen Anti-Biofilm Eigenschaften.
4. *Lactobacillus rhamnosus* GG und *Streptococcus salivarius* K12 sind Bakterien, die als sogenannte ‚Probiotika‘ in medizinischer Absicht mit dem Ziel die Gesundheit von Menschen zu fördern bzw. wiederherzustellen, erfolgreich eingesetzt werden.
5. Probiotische Bakterien entfalten ihre Wirkung u.a. über die Sekretion antimikrobieller Substanzen. Diese Substanzen sowie deren Wirkmechanismen sind insgesamt vielfältig und können das Wachstum anderer Mikroorganismen beeinflussen.
6. *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 sezernieren antimikrobielle Substanzen, welche *in-vitro* mit dem Kulturüberstand gewonnen werden können. Im Gegensatz zu Probiotika würde bei Verwendung von zellfreien Kulturüberständen das Infektionsrisiko als unerwünschte Nebenwirkung keine Rolle spielen.
7. Eine Wirkungssteigerung kann durch Aufkonzentrierung der Kulturüberstände erreicht werden. Die gewählte Methode der Aufkonzentrierung beeinflusst außerdem die Wirksamkeit.
8. *L. rhamnosus* GG und *S. salivarius* K12 Kulturüberstände beeinflussen sowohl das planktonische- als auch das Biofilmwachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis*.
9. *L. rhamnosus* GG Kulturüberstand zeigt keine deutliche inhibitorische Aktivität gegenüber den hier verwendeten Staphylokokken, sondern in einigen Konstellationen sogar einen wachstumsfördernden Einfluss.

10. *S. salivarius* K12 Kulturüberstand inhibiert in Abhängigkeit von der Konzentrationsstufe und des Zugabezeitpunktes das Biofilmwachstum der Staphylokokken. Einerseits kann die Bildung und Heranreifung von Biofilm unterdrückt werden, andererseits kann bereits präformierter Biofilm wieder in seiner Masse reduziert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte *S. salivarius* K12 Kulturüberstand die Grundlage für die Entwicklung einer antimikrobiellen Substanz mit wirkungsvollen präventiven und therapeutischen Anti-Biofilm Eigenschaften darstellen.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ad	lat. „auf“, „zu“
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLIS	<i>bacteriocin like inhibitory substance</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	Caso Bouillon
CFCS	<i>Cell free culture supernatants</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
EMZ	Elektronenmikroskopisches Zentrum
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
et al.	<i>et alii</i> - lat. „und andere“
g	Gramm
g	Schwerebeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
griech.	griechisch
h	Steighöhe
h	<i>hour</i>
i.d.R.	in der Regel
k	Kilo
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	kilo Dalton
l	Liter
lat.	lateinisch
LGG	<i>L. rhamnosus</i> GG
LKZ	Lebendkeimzahl
log	Logarithmus
lyo	Lyophilisation

M	molar
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin resistenter bzw. multi-resistenter <i>S. aureus</i>
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NMWL	<i>nominal molecular weight limit</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	potentia hydrogenium (lat.)
PK	Positivkontrolle
<i>r</i>	Radius
REM	Rasterelektronenmikroskop/-ie
s	Sekunde
SK 12	<i>S. salivarius</i> K12
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
u.a.	unter anderem
UF	Ultrafiltrat
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VBNC	<i>viable but not culturable</i>
z.B.	zum Beispiel
$\rho$	Dichte
$\sigma$	Oberflächenspannung

### 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Bakterienstämme .....	13
<b>Tabelle 2:</b> Flüssigmedien .....	13
<b>Tabelle 3:</b> Chemikalien und Reagenzien .....	15
<b>Tabelle 4:</b> Geräte und Hilfsmittel .....	16
<b>Tabelle 5:</b> Verbrauchsgüter .....	17
<b>Tabelle 6:</b> Software .....	19

### 7.4 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Phasen der Biofilmbildung an einer Oberfläche, schematische und rasterelektronenmikroskopische Darstellung am Beispiel eines <i>P. aeruginosa</i> Biofilms .....	5
<b>Abb. 2:</b> Hauptwirkmechanismen probiotischer Bakterien, beispielhafte Darstellung für den Gastrointestinaltrakt .....	8
<b>Abb. 3:</b> Entwicklung der optischen Dichte (OD <sub>600nm</sub> ) von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden .....	33
<b>Abb. 4:</b> Entwicklung der Lebendkeimzahlen (LKZ) von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden .....	34
<b>Abb. 5 A-B:</b> Korrelation zwischen optischer Dichte und Lebendkeimzahl anhand einer Regressionsgerade .....	35
<b>Abb. 6:</b> <i>S. aureus</i> (S.a.) bzw. <i>S. epidermidis</i> (S.e.) in Ko-Kultur mit <i>L. rhamnosus</i> GG (L) und <i>S. salivarius</i> K12 (S) .....	37
<b>Abb. 7:</b> <i>S. epidermidis</i> (S.e.) bzw. <i>S. aureus</i> (S.a.) in Ko-Kultur mit <i>S. salivarius</i> K12 (S) bzw. <i>L. rhamnosus</i> GG (L) .....	38
<b>Abb. 8:</b> Agardiffusionstest .....	39
<b>Abb. 9:</b> Effekt aufkonzentrierter probiotischer Kulturüberstände auf das Staphylokokkenwachstum .....	41
<b>Abb. 10:</b> Steighöhen ausgewählter Testflüssigkeiten in einer Kapillare .....	43
<b>Abb. 11:</b> Dichte in g/cm <sup>3</sup> ausgewählter Testflüssigkeiten .....	44
<b>Abb. 12:</b> Steighöhe, Dichte und Oberflächenspannung ausgewählter Testflüssigkeiten .....	45
<b>Abb. 13:</b> Quantifizierung der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> unter Verwendung von CB- und TSB-Nährmedium .....	46
<b>Abb. 14:</b> Einfluss der Beschichtung der Versuchsoberfläche mit humanen Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen auf die Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> .....	47

<b>Abb. 15:</b> Nährmedien-abhängige Biofilmbildung in mit Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatten .....	48
<b>Abb. 16 A-D:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. ....	49
<b>Abb. 17 A-B:</b> Einfluss von x-fach aufkonzentrierten <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand (CFCS) auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> . ....	50
<b>Abb. 18 A-F:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstandes. ....	52
<b>Abb. 19 A-B:</b> Einfluss von x-fach aufkonzentrierten <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> . ....	53
<b>Abb. 20 A-F:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstandes.....	54
<b>Abb. 21 A-B:</b> Einfluss von x-fach aufkonzentrierten <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand auf das Wachstum von <i>S. epidermidis</i> .....	55
<b>Abb. 22 A-F:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstandes. ....	57
<b>Abb. 23 A-B:</b> Einfluss von x-fach aufkonzentrierten <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand auf das Wachstum von <i>S. epidermidis</i> .....	58
<b>Abb. 24 A-F:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit der Konzentrationstufe des <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstandes.60	60
<b>Abb. 25:</b> Effekt aufkonzentrierter probiotischer Kulturüberstände auf die optische Dichte (OD <sub>600nm</sub> ) von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen. ....	61
<b>Abb. 26 A-B:</b> Planktonisches Wachstum von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen in Abhängigkeit des probiotischen Kulturüberstandes und der jeweiligen Konzentrationsstufe....	62
<b>Abb. 27:</b> Quantitativer Biofilmnachweis in <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen in Abhängigkeit des zugesetzten probiotischen Kulturüberstandes. ....	63
<b>Abb. 28 A-B:</b> Quantitativer Nachweis der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit des verwendeten Kulturüberstandes (CFCS) sowie dessen Konzentrationsstufe.64	64
<b>Abb. 29 A-F:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Kontrollen in 500-, 2.000- und 5.000-facher Vergrößerung. ....	67
<b>Abb. 30 A-B:</b> Einfluss des Zugabezeitpunktes von <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> Kulturen.....	68

<b>Abb. 31 A-B:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes mit <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand.....	68
<b>Abb. 32 A-B:</b> Einfluss des Zugabezeitpunktes von <i>S. salivarius</i> K12 (SK12) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> Kulturen.....	69
<b>Abb. 33 A-B:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand.....	70
<b>Abb. 34 A-B:</b> Einfluss des Zugabezeitpunktes von <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG) Kulturüberstand auf das Wachstum von <i>S. epidermidis</i> Kulturen.....	71
<b>Abb. 35 A-B:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von <i>L. rhamnosus</i> GG Kulturüberstand..	72
<b>Abb. 36 A-B:</b> Einfluss des Zugabezeitpunktes von <i>S. salivarius</i> K12 (SK12) Kulturüberstand in Höchstkonzentration auf das Wachstum von <i>S. epidermidis</i> Kulturen.....	73
<b>Abb. 37 A-B:</b> Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von <i>S. salivarius</i> K12 Kulturüberstand..	74
<b>Abb. 38 A-B:</b> Planktonisches Wachstum von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> Kulturen in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG) und <i>S. salivarius</i> K12 (SK12) Kulturüberstand.....	75
<b>Abb. 39 A-B:</b> Biofilmwachstum von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> in Abhängigkeit des Zugabezeitpunktes von <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG) und <i>S. salivarius</i> K12 (SK12) Kulturüberständen.....	76

## 7.5 Literaturverzeichnis

- Agarwal, S; Sharma, G; Dang, S; Gupta, S; Gabrani, R (2016) Antimicrobial Peptides as Anti-Infectives against *Staphylococcus epidermidis*. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 25: 301–308.
- Araujo, PA; Mergulhao, F; Melo, L; Simoes, M (2014) The ability of an antimicrobial agent to penetrate a biofilm is not correlated with its killing or removal efficiency. *Biofouling* 30: 675–683.
- Archer, GL (1998) *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1179–1181.
- Asensio, C; Perez-Dias, JC (1976) A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 69: 7–14.
- Bär, W (2012) Physiologische Bakterienflora: Regulation und Wirkungen, Iatrogene Störungen und Probiotika. In: Suerbaum, S; Hahn, H; Burchard, G-D; Kaufmann, SHE; Schulz, TF (Hg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 7. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 26–32.
- Barbour, A; Tagg, J; Abou-Zied, OK; Philip, K (2016) New insights into the mode of action of the lantibiotic salivaricin B. *Scientific Reports* 6: 31749.
- Barrow, GI (1963) Microbial Antagonism by *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 31: 471–481.
- Batoni, G; Maisetta, G; Lisa Brancatisano, F; Esin, S; Campa, M (2011) Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms. *Current Medicinal Chemistry* 18: 256–279.
- Bauer, AW; Kirby, WMM; Sherris, JC; Turck, M (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493–496.
- Becker, K; Heilmann, C; Peters, G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 27: 870–926.
- Becker, K; Schaumburg, F; Fegeler, C; Friedrich, AW; Kock, R (2017) *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *International Journal of Medical Microbiology* 307: 21–27.
- Beer, D de; Stoodley, P; Roe, F; Lewandowski, Z (1994) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering* 43: 1131–1138.

- Beloin, C; Renard, S; Ghigo, J-M; Lebeaux, D (2014) Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Current Opinion in Pharmacology* 18: 61–68.
- Beristain-Bauza, SC; Mani-López, E; Palou, E; López-Malo, A (2016) Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control* 62: 44–51.
- Bermudez-Brito, M; Munoz-Quezada, S; Gomez-Llorente, C; Romero, F; Gil, A (2014) *Lactobacillus rhamnosus* and its cell-free culture supernatant differentially modulate inflammatory biomarkers in *Escherichia coli*-challenged human dendritic cells. *The British Journal of Nutrition* 111: 1727–1737.
- Bermudez-Brito, M; Plaza-Diaz, J; Munoz-Quezada, S; Gomez-Llorente, C; Gil, A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism* 61: 160–174.
- Bhattacharya, M; Wozniak, DJ; Stoodley, P; Hall-Stoodley, L (2015) Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 13: 1499–1516.
- Bryers, JD (2008) Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 1–18.
- Burton, JP; Wescombe, PA; Moore, CJ; Chilcott, CN; Tagg, JR (2006) Safety Assessment of the Oral Cavity Probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3050–3053.
- Busscher, HJ; Van Hoogmoed, CG; Geertsema-Doornbusch, GI; van der Kuijl-Booik, M; van der Mei, HC (1997) *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3810–3817.
- Büttner, H; Mack, D; Rohde, H (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5: 14.
- Carlsson, J; Grahnen, H; Jonsson, G; Wikner, S (1970) Early Establishment of *Streptococcus salivarius* in the Mouths of Infants. *Journal of Dental Research* 49: 414–418.
- Ceri, H; Olson, ME; Stremick, C; Read, RR; Morck, D; Buret, A (1999) The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1771–1776.

- Champagne, CP; Ross, RP; Saarela, M; Hansen, KF; Charalampopoulos, D (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149: 185–193.
- Chen, M; Yu, Q; Sun, H (2013) Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 18488–18501.
- Chessa, D; Ganau, G; Mazzarello, V (2015) An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries* 9: 547–550.
- Christensen, GD; Simpson, WA; Bisno, AL; Beachey, EH (1982) Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318–326.
- Christensen, GD; Simpson, WA; Younger, JJ; Baddour, LM; Barrett, FF; Melton, DM; Beachey, EH (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22: 996–1006.
- Costerton, J (1987) Bacterial Biofilms In Nature And Disease. *Annual Review of Microbiology* 41: 435–464.
- Costerton, JW (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711–745.
- Cotter, PD; Ross, RP; Hill, C (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology* 11: 95–105.
- Cremonini, F; Di Caro, S; Nista, EC; Bartolozzi, F; Capelli, G; Gasbarrini, G; Gasbarrini, A (2002) Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16: 1461–1467.
- Czaplewski, L; Bax, R; Clokie, M; Dawson, M; Fairhead, H; Fischetti, VA; Foster, S; Gilmore, BF; Hancock, REW; Harper, D; Henderson, IR; Hilpert, K; Jones, BV; Kadioglu, A; Knowles, D; Ólafsdóttir, S; Payne, D; Projan, S; Shaunak, S; Silverman, J; Thomas, CM; Trust, TJ; Warn, P; Rex, JH (2016) Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases* 16: 239–251.
- Dar, OA; Hasan, R; Schlundt, J; Harbarth, S; Caleo, G; Dar, FK; Littmann, J; Rweyemamu, M; Buckley, EJ; Shahid, M; Kock, R; Li, HL; Giha, H; Khan, M; So, AD; Bindayna, KM; Kessel, A; Pedersen, HB; Permanand, G; Zumla, A; Röttingen, J-A; Heymann, DL (2016)

Exploring the evidence base for national and regional policy interventions to combat resistance. *The Lancet* 387: 285–295.

Di Luca, M; Maccari, G; Nifosi, R (2014) Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathogens and Disease* 70: 257–270.

Di Pierro, F; Colombo, M; Zanvit, A; Rottoli, AS (2016) Positive clinical outcomes derived from using *Streptococcus salivarius* K12 to prevent streptococcal pharyngotonsillitis in children: a pilot investigation. *Drug, Healthcare and Patient Safety* 8: 77–81.

Donlan, RM; Costerton, JW (2002) Biofilms. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 167–193.

Drider, D; Bendali, F; Naghmouchi, K; Chikindas, ML (2016) Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 8: 177–182.

Dunne Jr., WM (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 155-166.

Estrela, S; Whiteley, M; Brown, SP (2015) The demographic determinants of human microbiome health. *Trends in Microbiology* 23: 134–141.

Fariq, A; Saeed, A (2016) Production and Biomedical Applications of Probiotic Biosurfactants. *Current Microbiology* 72: 489–495.

Fjell, CD; Hiss, JA; Hancock, REW; Schneider, G (2011) Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews. Drug Discovery* 11: 37–51.

Foster, TJ; Geoghegan, JA; Ganesh, VK; Hook, M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews. Microbiology* 12: 49–62.

Gasbarrini, G; Bonvicini, F; Gramenzi, A (2016) Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology* 50: 116-119.

Gatermann, S (2012) Staphylokokken. In: Suerbaum, S; Hahn, H; Burchard, G-D; Kaufmann, SHE; Schulz, TF (Hg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 7. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 187–197.

Gibson, GR; Roberfroid, MB (1995) Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125: 1401–1412.

- Gilbert, P; Brown, MRW (1995) Mechanisms of the Protection of Bacterial Biofilms from Antimicrobial Agents. In: Lappin-Scott, H; Costerton, J(Hg.). *Microbial Biofilms*, Cambridge University Press, S. 118–130.
- Goldin, BR; Gorbach, SL; Saxelin, M; Barakat, S; Gualtieri, L; Salminen, S (1992) Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences* 37: 121–128.
- Gomez-Suarez, C; Busscher, HJ; van der Mei, HC (2001) Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2531–2537.
- Gorbach, SL (1996) The Discovery of Lactobacillus GG. *Nutrition Today Supplement* 31: 2S–4S.
- Gupta, V; Garg, R (2009) Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27: 202–209.
- Hall-Stoodley, L; Costerton, JW; Stoodley, P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology* 2: 95–108.
- Hall-Stoodley, L; Stoodley, P (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 228–233.
- Hannig, C; Follo, M; Hellwig, E; Al-Ahmad, A (2010) Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology* 59: 1–7.
- Harb, H; van Tol, EAF; Heine, H; Braaksma, M; Gross, G; Overkamp, K; Hennen, M; Alrifai, M; Conrad, ML; Renz, H; Garn, H (2013) Neonatal supplementation of processed supernatant from Lactobacillus rhamnosus GG improves allergic airway inflammation in mice later in life. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43: 353–364.
- Hegarty, JW; Guinane, CM; Ross, RP; Hill, C; Cotter, PD (2016) Bacteriocin production: a relatively unharvested probiotic trait? *F1000Research* 5: 2587.
- Heng, NCK; Wescombe, PA; Burton, JP; Jack, RW; Tagg, JR (2007) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, MA; Chavan, MA (Hg.). *Bacteriocins*, 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 45–92.
- Hibberd, PL; Kleimola, L; Fiorino, A-M; Botelho, C; Haverkamp, M; Andreyeva, I; Poutsika, D; Fraser, C; Solano-Aguilar, G; Snydman, DR (2014) No evidence of harms of

probiotic Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103 in healthy elderly-a phase I open label study to assess safety, tolerability and cytokine responses. *PLoS ONE* 9: e113456.

Hoiby, N; Bjarnsholt, T; Moser, C; Bassi, GL; Coenye, T; Donelli, G; Hall-Stoodley, L; Hola, V; Imbert, C; Kirketerp-Moller, K; Lebeaux, D; Oliver, A; Ullmann, AJ; Williams, C (2015) ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection* 21: 1-25.

Holder, IA; Boyce, ST (1994) Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns* 20: 426–429.

Holmes, AH; Moore, LSP; Sundsfjord, A; Steinbakk, M; Regmi, S; Karkey, A; Guerin, PJ; Piddock, LJV (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387: 176–187.

Hyink, O; Wescombe, PA; Upton, M; Ragland, N; Burton, JP; Tagg, JR (2007) Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain Streptococcus salivarius K12. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1107–1113.

Imperial, ICVJ; Ibana, JA (2016) Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Frontiers in Microbiology* 7: 1983.

Ishijima, SA; Hayama, K; Burton, JP; Reid, G; Okada, M; Matsushita, Y; Abe, S (2012) Effect of Streptococcus salivarius K12 on the in vitro growth of Candida albicans and its protective effect in an oral candidiasis model. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2190–2199.

Jiang, Q; Stamatova, I; Kainulainen, V; Korpela, R; Meurman, JH (2016) Interactions between Lactobacillus rhamnosus GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. *BMC Microbiology* 16: 149.

Joint FAO/WHO Working Group (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada.

Karska-Wysocki, B; Bazo, M; Smoragiewicz, W (2010) Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Microbiological Research* 165: 674–686.

- Kazor, CE; Mitchell, PM; Lee, AM; Stokes, LN; Loesche, WJ; Dewhirst, FE; Paster, BJ (2003) Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients with Halitosis and Healthy Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 558–563.
- Klein, E; Smith, DL; Laxminarayan, R (2007) Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases* 13: 1840–1846.
- Klinger-Strobel, M; Stein, C; Forstner, C; Makarewicz, O; Pletz, MW (2017) Effects of colistin on biofilm matrices of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49: 472–479.
- Kloss, WE; Musselwhite, MS (1975) Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Applied Microbiology* 30: 381–395.
- Korpela, K; Salonen, A; Virta, LJ; Kumpu, M; Kekkonen, RA; Vos, WM de (2016) *Lactobacillus rhamnosus* GG Intake Modifies Preschool Children's Intestinal Microbiota, Alleviates Penicillin-Associated Changes, and Reduces Antibiotic Use. *PLoS ONE* 11: e0154012.
- La Fuente-Nunez, C de; Korolik, V; Bains, M; Nguyen, U; Breidenstein, EBM; Horsman, S; Lewenza, S; Burrows, L; Hancock, REW (2012) Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 2696–2704.
- Lau, CSM; Ward, A; Chamberlain, RS (2016) Probiotics improve the efficacy of standard triple therapy in the eradication of *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Infection and Drug Resistance* 9: 275–289.
- Lazarev, VN; Govorun, VM (2010) Antimicrobial peptides and their use in medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46: 803–814.
- Li, L; Mendis, N; Trigui, H; Oliver, JD; Faucher, SP (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5: 258.
- Lievin-Le Moal, V; Servin, AL (2014) Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infective biotherapeutic agents. *Clinical Microbiology Reviews* 27: 167–199.

- Liu, J (2006) Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharmaceutical Development and Technology* 11: 3–28.
- Ma, N; Cameron, A; Tivey, D; Grae, N; Roberts, S; Morris, A (2017) Systematic review of a patient care bundle in reducing staphylococcal infections in cardiac and orthopaedic surgery. *ANZ Journal of Surgery* 87: 239–246.
- Macia, MD; Rojo-Molinero, E; Oliver, A (2014) Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 981–990.
- Mack, D; Bartscht, K; Fischer, C; Rohde, H; de Grahl, C; Dobinsky, S; Horstkotte, MA; Kiel, K; Knobloch, JK-M (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods in Enzymology* 336: 215–238.
- Madigan, MT; Martinko, JM (2009) Brock Mikrobiologie. Pearson Studium, München.
- Mariam, SH; Zegeye, N; Tariku, T; Andargie, E; Endalafer, N; Aseffa, A (2014) Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes* 7: 606.
- Merritt, JH; Kadouri, DE; O'Toole, GA (2011) Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology* 22: 1B.1.1–1B.1.18.
- Monroe, D (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biology* 5: 2458–2461.
- Moormeier, DE; Bayles, KW (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology* 104: 365–376.
- Näse, L; Hatakka, K; Savilahti, E; Saxelin, M; Pönkä, A; Poussa, T; Korpel, R; Meurman, J (2001) Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Research* 35: 412–420.
- Navarre, WW; Schneewind, O (1999) Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Review* 63: 174–229.
- Noskin, GA; Rubin, RJ; Schentag, JJ; Kluytmans, J; Hedblom, EC; Jacobson, C; Smulders, M; Gemmen, E; Bharmal, M (2007) National trends in *Staphylococcus aureus* infection rates:

- impact on economic burden and mortality over a 6-year period (1998–2003). *Clinical Infectious Diseases* 45: 1132–1140.
- Noth, J; Kositzki, R; Klein, K; Winkler, M; Haumann, M; Happe, T (2015) Lyophilization protects FeFe-hydrogenases against O<sub>2</sub>-induced H-cluster degradation. *Scientific Reports* 5: 13978.
- O'Connor, A; Fischbach, W; Gisbert, JP; O'Morain, C (2016) Treatment of Helicobacter pylori infection 2016. *Helicobacter* 21: 55–61.
- Ogston, A (1882) Micrococcus Poisoning. *Journal of Anatomy and Physiology* 17: 24–58.
- Oliver, JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 415–425.
- Ottman, N; Smidt, H; Vos, WM de; Belzer, C (2012) The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 104.
- Otto, M (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology* 34: 201–214.
- Overhage, J; Campisano, A; Bains, M; Torfs, ECW; Rehm, BHA; Hancock, REW (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity* 76: 4176–4182.
- Paharik, AE; Horswill, AR (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiology Spectrum* 4: 1–48.
- Parsek, MR; Singh, PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* 57: 677–701.
- Patenge, N; Arndt, K; Eggert, T; Zietz, C; Kreikemeyer, B; Bader, R; Nebe, B; Stranak, V; Hippler, R; Podbielski, A (2012) Evaluation of antimicrobial effects of novel implant materials by testing the prevention of biofilm formation using a simple small scale medium-throughput growth inhibition assay. *Biofouling* 28: 267–277.
- Petrof, E (2009) Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 8: 260–269.
- Pletzer, D; Hancock, REW (2016) Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. *Journal of Bacteriology* 198: 2572–2578.

- Prax, M; Bertram, R (2014) Metabolic aspects of bacterial persisters. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4: 148.
- Reffuveille, F; La Fuente-Nunez, C de; Mansour, S; Hancock, REW (2014) A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 5363–5371.
- Riley, MA; Wertz, JE (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* 56: 117–137.
- Romling, U; Balsalobre, C (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* 272: 541–561.
- Ross, KF; Ronson, CW; Tagg, JR (1993) Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2014–2021.
- Rowland, I; Capurso, L; Collins, K; Cummings, J; Delzenne, N; Goulet, O; Guarner, F; Marteau, P; Meier, R (2010) Current level of consensus on probiotic science. *Gut Microbes* 1: 436–439.
- Roy, I; Gupta, MN (2004) Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39: 165–177.
- Sams, ER; Whiteley, M; Turner, KH (2014) 'The battle for life': Pasteur, anthrax, and the first probiotics. *Journal of Medical Microbiology* 63: 1573–1574.
- Sanders, ME; Akkermans, LMA; Haller, D; Hammerman, C; Heimbach, J; Hormannsperger, G; Huys, G; Levy, DD; Lutgendorff, F; Mack, D; Phothirath, P; Solano-Aguilar, G; Vaughan, E (2010) Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1: 164–185.
- Sauer, K; Camper, AK; Ehrlich, GD; Costerton, JW; Davies, DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184: 1140–1154.
- Saxelin, M; Tynkkynen, S; Mattila-Sandholm, T; Vos, WM de (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 204–211.
- Scherr, TD; Heim, CE; Morrison, JM; Kielian, T (2014) Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Frontiers in Immunology* 5: 37.

- Shin, JM; Gwak, JW; Kamarajan, P; Fenno, JC; Rickard, AH; Kapila, YL (2016) Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology* 120: 1449–1465.
- Silva, M; Jacobus, NV; Deneke, C; Gorbach, SL (1987) Antimicrobial Substance from a Human Lactobacillus Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 1231–1233.
- Simoes, M; Pereira, MO; Vieira, MJ (2005) Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides. *Biofouling* 21: 9–17.
- Singh, R; Ray, P; Das, A; Sharma, M (2010) Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 1955–1958.
- Snydman, DR (2008) The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 46: 104–111.
- Sollid, JUE; Furberg, AS; Hanssen, AM; Johannessen, M (2014) *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 21: 531–541.
- Speziale, P; Pietrocola, G; Foster, TJ; Geoghegan, JA (2014) Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4: 171.
- Standar, K; Kreikemeyer, B; Redanz, S; Münter, WL; Laue, M; Podbielski, A; Herrera-Estrella, A (2010) Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *PLoS ONE* 5: e13135.
- Stepanovic, S; Vukovic, D; Hola, V; Di Bonaventura, G; Djukic, S; Cirkovic, I; Ruzicka, F (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 115: 891–899.
- Stiefel, P; Rosenberg, U; Schneider, J; Mauerhofer, S; Maniura-Weber, K; Ren, Q (2016) Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 4135–4145.
- Stoodley, P; Dodds, I; Boyle, JD; Lappin-Scott, HM (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology* 85: 19–28.
- Stoodley, P; Sauer, K; Davies, DG; Costerton, JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56: 187–209.

- Suerbaum, S; Hahn, H (2012) Die medizinische Mikrobiologie im 21. Jahrhundert. In: Suerbaum, S; Hahn, H; Burchard, G-D; Kaufmann, SHE; Schulz, TF(Hg.). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 7. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 3–6.
- Switalski, LM; Ryden, C; Rubin, K; Ljungh, A; Höök, M; Wadström, T (1983) Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infection and Immunity* 42: 628-633.
- Szajewska, H; Wanke, M; Patro, B (2011) Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34: 1079–1087.
- Tagg, JR; Dajani, AS; Wannamaker, LW (1976) Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews* 40: 722–756.
- Taylor, PK; Yeung, ATY; Hancock, REW (2014) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology* 191: 121–130.
- Tejero-Sariñena, S; Barlow, J; Costabile, A; Gibson, GR; Rowland, I (2012) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* 18: 530–538.
- Tsai, C-C; Lin, P-P; Hsieh, Y-M (2008) Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe* 14: 61–67.
- Uematsu, H; Yamashita, K; Kunisawa, S; Fushimi, K; Imanaka, Y (2016) The economic burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-onset pneumonia inpatients. *American Journal of Infection Control* 44: 1628–1633.
- Van Hoogmoed, CG; van der Kuijl-Booij, M; van Der Mei, HC; Busscher, HJ (2000) Inhibition of *Streptococcus mutans* NS Adhesion to Glass with andwithout a Salivary Conditioning Film by Biosurfactant Releasing *Streptococcus mitis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 659–663.
- Varma, P; Nisha, N; Dinesh, KR; Kumar, AV; Biswas, R (2011) Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 20: 137–143.
- Vergara-Irigaray, M; Valle, J; Merino, N; Latasa, C; Garcia, B; Ruiz de Los Mozos, I; Solano, C; Toledo-Arana, A; Penades, JR; Lasa, I (2009) Relevant role of fibronectin-binding proteins

- in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infection and Immunity* 77: 3978–3991.
- Wagman, GH; Bailey, JV; Weinstein, MJ (1975) Binding of Aminoglycoside Antibiotics to Filtration Materials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7: 316–319.
- Walters, MC; Roe, F; Bugnicourt, A; Franklin, MJ; Stewart, PS (2003) Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 317–323.
- Waters, VL; Crosa, JH (1991) Colicin V virulence plasmids. *Microbiological Reviews* 55: 437–450.
- Wertheim, HFL; Melles, DC; Vos, MC; van Leeuwen, W; van Belkum, A; Verbrugh, HA; Nouwen, JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases* 5: 751–762.
- Wertheim, HFL; Vos, MC; Boelens, HAM; Voss, A; Vandebroucke-Grauls, CMJE; Meester, MHM; Kluytmans, JA JW; van Keulen, PHJ; Verbrugh, HA (2004) Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *The Journal of Hospital Infection* 56: 321–325.
- Wescombe, PA; Hale, JDF; Heng, NCK; Tagg, JR (2012) Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiology* 7: 1355–1371.
- WHO- World Health Organization (2015) Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.
- WHO- World Health Organization (2017) Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.
- Wiegand, I; Hilpert, K; Hancock, Robert E W (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3: 163–175.
- Zhou, Y-F; Shi, W; Yu, Y; Tao, M-T; Xiong, YQ; Sun, J; Liu, Y-H (2015) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Correlation of Cefquinome Against Experimental Catheter-Associated Biofilm Infection Due to *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* 6: 1513.

Zobell, CE (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology* 46: 39–56.

Zobell, CE; Allen, EC (1935) The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *Journal of Bacteriology* 29: 239–251.

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine unerlaubten oder ungenannten Hilfsmittel verwendet. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Rendsburg, den 15.06.2017

Caroline Klenk