
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls Universität zu Heidelberg

vorgelegt von
Dipl. Biophys. Svenja Mareike Vater
geboren am 07.03.1985 in Zweibrücken

Tag der mündlichen Prüfung:
24.01.2014

Holographische Motilitätsanalyse des Schwimm- und Besiedlungsverhaltens flagellierter Mikroorganismen

Gutachter: Prof. Dr. Michael Grunze
apl. Prof. Dr. Hans-Robert Volpp

Kurzfassung

Die unerwünschte Besiedlung von künstlichen Oberflächen mit Mikroorganismen, das sogenannte Biofouling, stellt sowohl in der Biomedizin als auch in der marinen Industrie ein großes Problem mit gesundheitlichen und finanziellen Folgen dar. Daher besteht ein großes Interesse den Bewuchs von Oberflächen zu verhindern. Da viele der Organismen, auch als Biofouler bezeichnet, motil sind, d.h. in der Lage sind sich aktiv fortzubewegen, leisten Studien hinsichtlich ihrer Motilität einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Besiedlungsverhaltens und damit zur Entwicklung von Strategien zur Biofouling Bekämpfung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schwimm- und Besiedlungsverhalten von zwei verschiedenen flagellierten Modellorganismen, nämlich des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* und der Sporen der Grünalge *Ulva linza*, mittels digitaler in-line Holographie analysiert. Dabei konnten für die planktonische Schwimmbewegung von *P. aeruginosa* verschiedene Schwimmmuster klassifiziert werden, was nach unserem Wissen zum ersten Mal überhaupt zum experimentellen Nachweis helikalen Schwimmverhaltens für ein kleines Bakterium wie *P. aeruginosa* führte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* Übergänge zwischen den verschiedenen Schwimmmustern aufweist. Bei den Sporen der Grünalge *Ulva linza* wurde neben dem Schwimmverhalten auch das Besiedlungsverhalten auf positiv geladenen Arginin und Tyrosin enthaltenden Oligopeptid Oberflächen untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Besiedlung dieser Oberflächen sehr hoch ist und die Anlagerung der Sporen äußerst schnell, innerhalb von wenigen Sekunden stattfindet. Durch das 3-dimensionale Tracken der Sporen konnte gezeigt werden, dass diese in Anwesenheit der ArgininTyrosin (ArgTyr) Oberflächen das sogenannte „Hit and stick“ Schwimmmuster aufweisen, bei dem sie direkt beim ersten Kontakt an der Oberfläche kleben bleiben, wonach einige der Sporen sporadische Zappelbewegungen auf der Oberfläche zeigten. Kontrolluntersuchungen mit einer reinen Glycin (Gly) Oligopeptid Oberfläche zeigten hingegen ein komplett anderes Schwimmverhalten der Sporen. Neben den Laborexperimenten mit den Modelorganismen *P. aeruginosa* und *Ulva linza* wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Feldexperimente mit Organismen in ihrer natürlichen Umgebung durchgeführt. Diese Untersuchungen führten zur erstmaligen Beschreibung und Klassifizierung des planktonischen Schwimmverhaltens motiler mariner Mikroorganismen.

Abstract

The undesired colonization of microorganisms on artificial surfaces, termed as Biofouling, is a major problem in the biomedical field as well as in marine industries and has sanitary and financial impact. Hence there is a major interest to prevent the attachment of organisms to surfaces. Because many of these organisms are motile, i.e. able to swim actively, studies concerning their motility are of great importance to understand the settlement behavior and to develop new strategies for Biofouling prevention. Therefore the swimming and settlement behavior of the two flagellated model organisms *Pseudomonas aeruginosa* and the spores of the green algae *Ulva linza* were analysed within this work, by use of digital in-line Holography. For *P. aeruginosa* different swimming patterns for the planktonic free movement of this bacterium could be classified which, to our knowledge, led to the first experimental detection of helical movement of a small bacterium such as *P. aeruginosa*. Furthermore it could be shown that *P. aeruginosa* is able to make transitions between the different classified swimming patterns. Beside the swimming behavior also the settlement behavior of spores of the green algae *Ulva linza* on positively charged oligopeptide surfaces with Arginine and Tyrosine content was analyzed. This investigation showed that settlement was very high on these surfaces and the attachment of the spores took place very rapidly within a few seconds. By using 3-dimensional tracking it could be shown that spores showed the so called “Hit and stick” swimming pattern in presence of the ArginineTyrosine (ArgTyr) surfaces. With this pattern they stuck to the surface immediately during the first surface contact and shortly after that some of the spores exhibited twitching movement on the surface. In contrast, analysis of a pure Glycine (Gly) reference surface showed a completely different swimming behavior of the spores. Additionally to the lab experiments with the model organisms *P. aeruginosa* and *Ulva linza*, field experiments with organisms under natural environmental conditions were performed. This investigation led to the first description and classification of the planktonic swimming behavior of flagellated marine organism.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Biofouling.....	5
2.1.1	Modellorganismen.....	6
2.1.1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.1.1.2	<i>Ulva linza</i>	8
2.1.2	Marines Biofouling.....	10
2.1.3	Mikrobielle Biofilm-Bildung, -Reifung und -Verbreitung am Beispiel <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	12
2.2	Einfluss verschiedener Oberflächeneigenschaften auf das marine Biofouling	14
2.2.1	Benetzbarkeit.....	15
2.2.2	Hydratation.....	17
2.2.3	Topographie.....	17
2.2.4	Ladung	19
2.2.5	Antimikrobielle Peptide	20
2.3	Feld-Testverfahren	23
2.4	Motilität flagellierter Mikroorganismen	25
2.4.1	Die Flagellen von Prokaryoten und Eukaryoten	25
2.4.2	Bewegung bei kleinen Reynoldszahlen – hydrodynamische Grundlagen	27
2.4.3	Schwimmmechanismen bei Bakterien	30
2.4.4	Schwimmmechanismen bei Phytoplankton	33
2.4.5	Schwimmuster von <i>Ulva linza</i> Zoosporen	36
2.5	Physikalische Grundlagen der Holographie.....	38
2.6	Digitale in-line Holographie.....	40
2.6.1	Auflösung der digitalen in-line Holographie.....	42
2.6.2	Numerische Rekonstruktion	44
3	Experimenteller Teil	45
3.1	Aufbau der verwendeten holographischen Mikroskope	45
3.2	Experimente mit <i>P. aeruginosa</i>	47
3.2.1	Zellkultur von <i>P. aeruginosa</i>	47
3.2.2	Durchführung der holographischen Messungen mit <i>P. aeruginosa</i>	50

3.3	Experimente mit <i>Ulva Linza</i> Zoosporen.....	52
3.3.1	Freisetzung von <i>Ulva Linza</i> Zoosporen	52
3.3.2	Untersuchte Oberflächen	54
3.3.2.1	Oligopeptid SAMs.....	54
3.3.2.2	FOTS SAMs	56
3.3.3	Biologische Standard Besiedlungs-Assays	57
3.3.4	Durchführung der holographischen Messungen mit <i>Ulva Linza</i> Sporen	57
3.4	In situ Holographie im Feldexperiment	59
3.5	3-dimensionales Tracking und Datenanalyse.....	61
3.5.1	Rekonstruktion der Hologramme	61
3.5.2	Bestimmung der Trajektorien	62
3.5.3	Analyse der Trajektorien.....	63
4	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Schwimmverhalten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	65
4.1.1	Untersuchung der Schwimmaktivität verschiedener <i>P. aeruginosa</i> -Stämme mittels Motilitäts-Assays auf semisoliden Agar-Platten	65
4.1.2	Integrale Analyse der Motilität von <i>P. aeruginosa</i> mittels 3D-Tracking	67
4.1.3	Klassifikation verschiedener Schwimmmuster	72
4.1.3.1	Das Muster „Oszillation“	76
4.1.3.2	Das Muster „Helix“	80
4.1.4	Übergänge zwischen verschiedenen Schwimmmustern	83
4.1.5	Diskussion und Fazit.....	87
4.2	Besiedlungsdynamik und Schwimmverhalten von <i>Ulva linza</i> Zoosporen in Anwesenheit positiv geladener Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichem Arginin-Tyrosin Oberflächenanteil.	90
4.2.1	Auswirkungen des Arginin-Tyrosin Oberflächenanteils auf die integrale Besiedlung durch <i>Ulva linza</i> Zoosporen in Standard Besiedlungs-Assays.....	90
4.2.2	Integrale Analyse des Schwimm- und Besiedlungsverhaltens auf der Grundlage holographischer Daten	94
4.2.3	Analyse des Schwimm- und Besiedlungsverhaltens der <i>Ulva linza</i> Sporen mittels 3D-Tracking...	96
4.2.3.1	Das „Hit and stick“ Muster	98
4.2.3.2	Das „Wobbling“ Muster	101
4.2.3.3	Das „Twitching“ Muster	103
4.2.3.4	Vergleich des „Hit und stick“ Schwimmmusters auf geladenen ArgTyr Oligopeptid SAMs und auf perfluorierten Silan SAMs (FOTS).....	107
4.2.4	Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Spore und Oberfläche	109
4.2.5	Diskussion und Fazit.....	112

4.3	Holographische in-situ Feldexperimente	116
4.3.1	Motilitätsanalyse mariner Mikroorganismen mit einer Größe $\leq 30 \mu\text{m}$	118
4.3.2	Klassifikation verschiedener Schwimmmuster	123
4.3.3	Diskussion und Fazit	130
5	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>.....	135
6	<i>Anhang</i>.....	138
6.1	Publikationen	138
6.2	Abkürzungsverzeichnis	139
6.3	Abbildungsverzeichnis	141
6.4	Literaturverzeichnis	152

1 Einleitung

Viele Mikroorganismen sind in der Lage sich an feste Substrate anzulagern und einige können durch die Ausscheidung von extrapolymeren Substanzen ganze Biofilme auszubilden. Bakterien beispielsweise bietet die Bildung eines Biofilms entscheidende Vorteile, da sie dadurch resistenter gegen äußere Einflüsse, wie Scherkräfte oder Antibiotika, sind. Für andere Organismen wie die Sporen verschiedener Algenarten, beispielsweise der Grünalge *Ulva linza*, ist die Besiedlung von festen Substraten ein notwendiger Schritt in ihrem Lebenszyklus, um zu einer adulten Pflanze heranwachsen zu können. Sowohl für viele Bakterienarten als auch für Zoosporen von Algen spielt die Motilität, das heißt die Fähigkeit zur selbstangetriebenen, aktiven Fortbewegung, vor allem im Zusammenhang mit der Besiedlung von Oberflächen, eine sehr wichtige Rolle.

Viele Bakterien werden durch einen flagellaren Motor angetrieben, welcher es ihnen erlaubt, sich schwimmend in wässriger Umgebung fortzubewegen. Für sie ist die Motilität beispielsweise zur Bildung und Reifung des Biofilms, sowie zur Auflösung und Verbreitung des Selbigen unerlässlich [1-3]. Für pathogene Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa* gilt die Motilität als wichtiger Virulenzfaktor, da sie die erfolgreiche Verbreitung des Pathogens im Wirt gewährleistet und die Besiedlung von Lungengewebe hauptsächlich von Mukoviszidose Patienten fördert [4]. Auch für andere Pathogene, wie beispielsweise *Trypanosoma brucei*, konnten Weiße et al. zeigen, dass die Motilität entscheidend für die Virulenz des Organismus ist [5]. Die durch die Motilität ermöglichte Antwort auf externe Reize, wie chemische Substanzen, Licht und Temperatur (sogenannte Taxien), erlaubt es flagellierten Bakterien sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen und führt zur Besiedlung günstiger Lebensräume.

Zum umfassenden Verständnis von Besiedlung, Virulenz und Taxien motiler Mikroorganismen ist es daher unerlässlich die Fortbewegungsmechanismen der Organismen zu untersuchen. Chemotaxis beispielsweise, bei der Organismen entweder in Richtung günstiger oder entgegen ungünstiger Bedingungen migrieren, ist Gegenstand einer Vielzahl an Studien [6-8]. Dabei liegt der Fokus bei einigen dieser Untersuchungen speziell auf der Einzelbewegung der Bakterien [9-11]. Bis auf die Studie von Berg et al., in der die Bewegung des peritrich begeißelten Bakteriums *Escherichia coli* mittels 3-dimensionaler Mikroskopie

untersucht wurde und zur Entdeckung des „Run und Tumbling“ Mechanismus führte [9], beruhen die meisten bakteriellen Motilitätsstudien allerdings auf 2-dimensionalen Mikroskopie Daten [12-19]. Dabei konnten bereits verschiedene Schwimmmechanismen hauptsächlich in unmittelbarer Umgebung von festen Oberflächen identifiziert werden [14, 20, 21]. Mit konventionellen 2-dimensionalem Mikroskopietechniken wird allerdings eine vollständige quantitative Analyse der Motilität durch das Fehlen der dritten Dimension erschwert.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels digitaler in-line Holographie eine vollständige 3-dimensionale Analyse der freien Schwimmbewegung des monotrich begeißelten Bakteriums *P. aeruginosa* durchgeführt. Die linsenlose, 3-dimensionale Abbildungsmethode wurde in dieser Arbeit erstmals für das Tracking kleinster Bakterien in einem großen Beobachtungsvolumen angewendet. Die ermittelten Trajektorien von *P. aeruginosa* wurden qualitativ untersucht und in verschiedene Schwimmuster klassifiziert. Die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Muster und deren quantitative Analyse sind weitere Bestandteile der vorliegenden Motilitätsstudie von *P. aeruginosa*. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des planktonischen Schwimmverhaltens dieses Bakteriums und liefern eine Plattform für weitere Studien bezüglich Motilität, Virulenz und Biofilmbildung.

Die Untersuchung der Biofilmbildung spielt hauptsächlich im Zusammenhang mit der unerwünschten Besiedlung von künstlichen Oberflächen, die unter dem Begriff Biofouling zusammengefasst wird, eine wichtige Rolle. Bakterien lagern sich an künstliche Oberflächen wie beispielsweise Implantate oder Katheter an und führen so im biomedizinischen Bereich zur Problematik des Biofouling. Aber nicht nur in der Biomedizin, sondern auch in der marinen Industrie existiert die Problematik des Biofouling durch verschiedenste Organismen, die sich zum Beispiel an Schiffsrümpfe oder Propeller anlagern und so einen enormen ökonomischen Schaden verursachen [22]. Daher besteht in beiden Bereichen ein großes Forschungsinteresse an umweltfreundlichen, Bewuchs-resistenten Oberflächen [23, 24].

Ein bedeutender Vertreter der Biofouler in der marinen Umgebung ist die Grünalge *Ulva linza*. Die Sporen dieser Grünalge sind durch ihre vier Flagellen in der Lage sich schwimmend fortzubewegen. Sie müssen zum Auskeimen fest an ein Substrat adhären, weshalb das Auffinden einer geeigneten Oberfläche unerlässlich ist. Daher zeigen diese

Sporen ein ausgeprägtes Such- bzw. Erkundungsverhalten [25]. Durch Untersuchungen der Sporen zusammen mit verschiedenen Oberflächen konnte gezeigt werden, dass sie sensitiv auf Oberflächeneigenschaften wie Benetzbarkeit, Topographie und auch Ladung reagieren [26-28]. Das Schwimm- und Besiedlungsverhalten der *Ulva* Sporen in Anwesenheit einer Protein-resistenten Polyethylenglykol (PEG) Oberfläche und einer hydrophoben perfluorierten Oberfläche wurde bereits mittels digitaler in-line Holographie auf Einzelzellebene untersucht [29-31]. Dabei wurde gezeigt, dass die Sporen verschiedene Schwimmuster aufweisen, deren Auftreten sehr stark von den Eigenschaften der vorhandenen Oberfläche abhängt [29].

In der vorliegenden Arbeit ist das Schwimm- und Besiedlungsverhalten der *Ulva* Sporen in Anwesenheit positiv geladener Oligopeptid Oberflächen, bestehend aus Arginin und Tyrosin Einheiten, thematisiert. Vorherige Studien haben gezeigt, dass diese Art Peptid Oberfläche sehr attraktiv auf die Sporen wirkt und daher eine sehr starke Besiedlung hervorruft [32]. Der Grund für die starke Besiedlung konnte noch nicht gänzlich geklärt werden. Es wird allerdings vermutet, dass eine Wechselwirkung zwischen dem Arginin und den Sporen dafür verantwortlich ist [33]. Die in dieser Arbeit durchgeführte holographische Analyse der Sporenbewegung in Anwesenheit der Oligopeptid Oberflächen mit unterschiedlichem Arginin und Tyrosin Oberflächengehalt soll neue Erkenntnisse zum Besiedlungsprozess und zum Anlagerungsmechanismus der Sporen erbringen und nähere Informationen über die Wechselwirkung der Sporen mit dem Peptid liefern. Dafür wurde die initiale Besiedlungskinetik der verschiedenen Oligopeptid Oberflächen mittels holographischer Aufnahmen verfolgt und das Schwimmverhalten in einzelnen Trajektorien analysiert.

Die Sporen der Grünalge *Ulva linza* sind bekannte Modelorganismen, die in Laborexperimenten rasch wichtige Erkenntnisse zur initialen Besiedlung potentieller antifouling Beschichtungen liefern. Neben den Laborexperimenten werden zusätzlich sogenannte Feld-Testverfahren angewandt, bei denen die Oberflächen für längere Zeit unter natürlichen Bedingungen ins Meerwasser eingetaucht und dort belassen werden [34, 35]. Dabei wird die antifouling Leistung der Beschichtungen unter realistischen Bedingungen mit einer ganzen Biofouler Populationen und wechselnden Umweltbedingungen untersucht.

Es lag daher nahe die Besiedlungskinetik verschiedener Biofouler unter natürlichen Voraussetzungen mittels digitaler in-line Holographie direkt im Feld zu analysieren. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit der holographische Messaufbau auf die experimentellen

Bedingungen an dem an der Ost-Küste von Florida befindlichen Standort abgestimmt und Experimente im Feld konzipiert. Über zwei Wochen wurden holographische Aufnahmen von im Meerwasser enthaltenen Mikroorganismen angefertigt. Die Ergebnisse dieser Studie sind Gegenstand des dritten und letzten Teils der vorliegenden Arbeit.

2 Theoretische Grundlagen

Das folgende Kapitel fasst die theoretischen Grundlagen der für diese Arbeit relevanten Themengebiete zusammen und gibt anhand der aktuellen Literatur einen Überblick über den Stand der Technik. Dabei handelt es sich um die Themengebiete Biofouling, Motilität von Mikroorganismen und digitale in-line Holographie als 3-dimensional abbildende Methode zur Untersuchung der Motilität.

2.1 Biofouling

Fouling ist ein englischer Begriff der sich mittlerweile auch im deutschen Sprachgebrauch durchgesetzt hat. Übersetzt bedeutet er Beschmutzung, Bewuchs oder Ablagerung. Allgemein bezeichnet Fouling den Prozess der Anreicherung unerwünschten Materials an Grenzflächen [36]. Bei diesem handelt es sich sowohl um nicht lebendiges Material wie organische oder anorganische Moleküle als auch um lebende Organismen. Im Zusammenhang mit lebenden Organismen spricht man auch von Biofouling worauf der Fokus dieser Arbeit liegt. Prinzipiell findet Biofouling an allen fest-flüssig Grenzflächen statt. Sehr häufig aber begegnet man dem Begriff im Zusammenhang mit der marinen Schiffsindustrie und der Aquakultur [22, 37]. Dort verursacht die Anlagerung von Organismen, die als Biofouler bezeichnet werden, an starren Oberflächen wie beispielsweise Schiffsrümpfen, Propellern oder Wärmeaustauschern einen hohen ökonomischen Schaden. Sowohl der höhere Treibstoffverbrauch durch die erhöhte Reibung an Schiffsrümpfen [38], als auch die sehr aufwendige Reinigung der befallenen Oberflächen führt zu immensen Kosten [39, 40]. Daher besteht ein großes wirtschaftliches Interesse daran, die Forschung an bewuchsresistenten Oberflächen und Beschichtungen voranzutreiben. Doch die Anlagerung von Organismen verursacht nicht nur wirtschaftliche Schäden in der Industrie. Auch im biomedizinischen Bereich existiert die Problematik des Biofouling. Hier handelt es sich meist um Biofilm-bildende Mikroben, die sich sowohl an Implantate wie beispielsweise Gefäßprothesen (Stents) oder Katheter, als auch an das Gewebe von Patienten anlagern und schwere Infektionen hervorrufen können [41-43]. Die sogenannten Krankenhauskeime sind dafür verantwortlich, dass geschätzte 30.000 Patienten jährlich in Deutschland an den Folgen einer Infektion versterben [44]. Aus diesem

Grund besteht auch im biomedizinischen Bereich ein enormer Bedarf an Biofouling-resistenten Oberflächen.

2.1.1 Modellorganismen

Um biologische Vorgänge wie beispielsweise den Biofouling Prozess und die Biofilmbildung zu untersuchen werden meist bestimmte Modelorganismen genutzt. *Pseudomonas aeruginosa* gilt als populärer Testkeim mit hoher medizinischer und umwelttechnologischer Relevanz, da er ubiquitär vorkommt, leicht zu kultivieren ist und das komplette Genom des Stammes PAO1 sequenziert wurde [45]. Durch seine verschiedenen Fortbewegungsarten stellt *P. aeruginosa* auch einen geeigneten Modelorganismus zur Untersuchung der Motilität von Bakterien dar.

Im Forschungsbereich des marinen Biofoulings gibt es ebenfalls verschiedene Modelorganismen, die die Gruppen der „Mikrofouler“, „soft Makrofouler“ und „hard Makrofouler“ repräsentieren (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Modelorganismus der „soft Makrofouler“ eignen sich die motilen Zoosporen der Grünalge *Ulva linza*, welche als häufigster „Makrofouler“ in der Gezeitenzone der Meeresküste gilt [46]. Durch ihre Motilität zeigen die Sporen ein ausgeprägtes oberflächenselektives Verhalten [29]. Durch Untersuchungen der Besiedlungsdynamik dieser Sporen können damit neue Einblicke in die Wahrnehmung von und Reaktion auf verschiedene Oberflächen gewonnen werden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Modelorganismen *P. aeruginosa* und *Ulva linza* näher vorgestellt.

2.1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa gehört zur fluoreszierenden Untergruppe der Gattung der Pseudomonaden, die wasserlösliche, gelbgrün fluoreszierende Pigmente produzieren [47]. Es handelt sich um ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium mit einer Länge von 2-4 µm und einer Breite von ca. 0,5 µm. Es ist fakultativ-aerob und kann somit auch unter anaeroben Bedingungen fortbestehen. Das Bakterium besitzt ein einzelnes Flagellum, das am Pol des Zellkörpers sitzt. Mit diesem ist es in der Lage sich schwimmend im Medium fortzubewegen. Wie in Kapitel 2.1.3 bereits erwähnt besitzt *P. aeruginosa* zusätzlich Typ IV Pili, ähnlich kleiner Enterhaken, mit denen es sich ruckartig kriechend über feuchte Oberflächen fortbewegen kann [48]. Neben Schwimm- und Kriechbewegungen lässt sich auf semisoliden Oberflächen auch

Schwärmverhalten beobachten, was sich durch charakteristische dendriten-förmige Kolonienmuster auf Agarplatten zeigt (siehe auch Abbildung 2.1B) [49, 50]. Diese kollektive Gruppenbewegung der Bakterien kann durch Aminosäuren wie Glutamat oder Aspartat als alleinige Stickstoffquelle und Glucose als Kohlenstoffquelle induziert werden. Dabei zeigen die sogenannten Schwärmerzellen, die an den Kolonierändern zu finden sind, einen veränderten Phänotyp mit lang gestrecktem Zellkörper und zwei Flagellen.

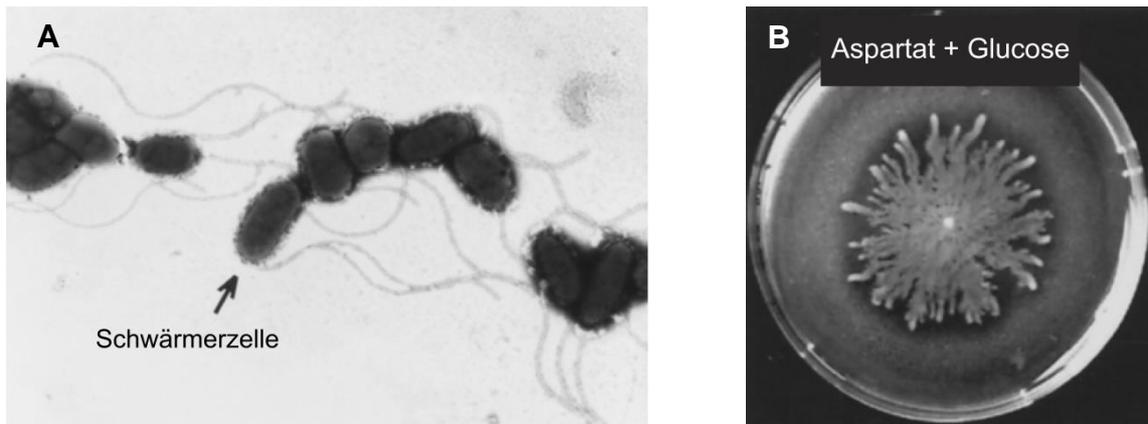


Abbildung 2.1: (A) Elektronen-Mikroskopische Aufnahme schwärmender *P. aeruginosa* Zellen des normalen Phänotyps mit einem Flagellum und einer Länge von 2 µm und Schwärmerzellen mit lang gestrecktem Zellkörper (3-4 µm) und zwei Flagellen (siehe Pfeil). (B) Dendriten-förmiges Kolonienmuster schwärmender *P. aeruginosa* auf semisolidem Agar mit Zusatz von Aspartat und Glucose [49].

Als opportunistisch pathogenes Bakterium, das in allen feuchten Milieus vorkommt, ist *P. aeruginosa* ein bekannter Krankenhauskeim, der verschiedene Infektionen hervorrufen kann [41]. Besonders betroffen sind Personen mit einer Vorerkrankung oder vorhandenen Verletzungen und Wunden wie sie bei Verbrennungen vorkommen. Sehr häufig verursacht *P. aeruginosa* Lungenentzündungen bei Mukoviszidose Patienten [42]. Der zähflüssige Schleim in den Bronchien bietet einen guten Angriffspunkt für das Bakterium, das durch die Bildung eines Biofilms chronische Infektionen auslöst. Eine Eigenschaft, die *P. aeruginosa* gerade in der Lunge so infektiös macht ist die Fähigkeit von einer nicht mucoiden in eine mucoiden Form überzugehen [51]. Letztere zeichnen sich durch eine Überproduktion an Alginate aus, wodurch die Bekämpfung des Biofilms mit Antibiotika zusätzlich erschwert wird.

2.1.1.2 *Ulva linza*

Grünalgen der Art *Ulva linza* gehören zur Gattung *Ulva* oder auch *Enteromorpha* (Darmtange) und sind weltweit in den Gezeitenzonen der Küsten bevorzugt im Brackwasser zu finden. Es handelt sich um sessil lebende Pflanzen, die sich an Felsen und Steine aber auch an künstliche Objekte anlagern. Der Lebenszyklus einer *Ulva linza* Pflanze beinhaltet wie bei vielen anderen Algenarten einen Generationswechsel [52]. Das bedeutet es existieren zwei verschiedene Lebensstadien, ein geschlechtliches Stadium als Gametophyt und ein ungeschlechtliches Stadium als Sporophyt. Gametophyten besitzen einen haploiden Chromosomensatz und produzieren geschlechtliche Gameten, die zwei Flagellen besitzen und positiv phototaktisch sind. Die Verschmelzung von männlichen und weiblichen Gameten ergibt diploide Zygoten, die sich an feste Substrate adhären und die diploiden Sporophyten ausbilden. Sporophyten nutzen zu ihrer Verbreitung und Reproduktion haploide Zoosporen. Diese besitzen genau wie die Zygoten vier Flagellen und sind negativ phototaktisch. Anders als bei Pflanzen üblich weisen sowohl Zygoten als auch Zoosporen keine Zellwand auf. Aus den Zoosporen, die ebenfalls an feste Substrate siedeln, geht wiederum die Gametophyten-Generation hervor, so dass sich der Lebenszyklus schließt (siehe Abbildung 2.3) [53].



Abbildung 2.2: Grünalgen der Art *Ulva linza* fest adhärert an Steine in der Gezeitenzone der Nordsee (Süd Wales).

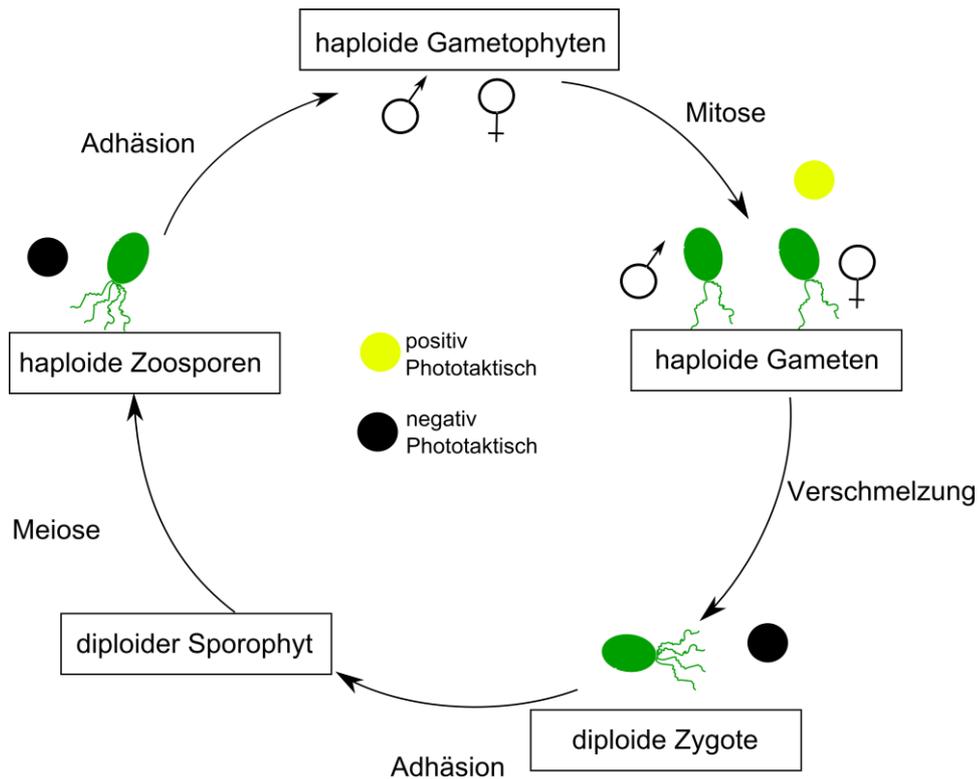


Abbildung 2.3: Lebenszyklus von *Ulva linza*.

Der entscheidende Schritt im Lebenszyklus der Pflanze ist die Verbreitung von Zoosporen, die an ein Substrat adhären müssen um keimen und zu einer adulten Pflanze heranwachsen zu können. Der Siedlungsprozess der Zoosporen wurde deshalb detailliert untersucht [25, 29, 31, 54, 55]. Dabei konnten verschiedene Stadien beobachtet werden [25, 55] (siehe auch Abbildung 2.4B). Zunächst ändert sich das Schwimmverhalten der Sporen von einer ziellosen zu einer gerichteten, oberflächenprüfenden Bewegung. Dabei kommt es zu gelegentlichen Kontakten zwischen der Oberfläche und der apikalen Papille der Spore, einer Verdickung der Zellmembran. Während der Oberflächenkontakte dreht sich die Spore meist sehr schnell im Uhrzeigersinn (Spinning), verlässt die Oberfläche wieder oder scheidet eine kleine Menge an elastischem Material aus. Bei dieser initialen Adhäsionsphase ist die Spore allerdings noch in der Lage die Oberfläche wieder zu verlassen. Entscheidet sich die Spore permanent zu siedeln, beendet sie das Spinning und scheidet ein Haftmittel aus. Dafür besitzt sie Membran-gebundene Vesikel deren Inhalt durch Exocytose im Bereich der apikalen Papille ausgeschieden wird [54]. Das Haftmittel bildet ein Kissen (engl. „Pad“) für die Spore, über das sie fest mit dem Substrat verbunden wird. Danach durchläuft die Spore morphologische Veränderungen. Ihre Form ändert sich von birnenartig zu rund, die Flagellen werden in den Zellkörper zurückgezogen und es bildet sich eine Zellwand aus. Dieser Prozess, vom

Ausscheiden des Haftmittels bis zur Ausbildung der Zellwand, dauert typischerweise 2 Minuten [25].

Das Haftmittel spielt eine große Rolle im Anlagerungsprozess der Sporen, denn dieses gewährleistet eine feste, sichere Anhaftung an ein Substrat. Es besteht aus Polysacchariden und polydispersen, selbst-aggregierenden, hydrophilen Glykoproteinen. Solche Glykoproteine sind auch Bestandteil der Zellwand, weshalb angenommen wird, dass die Ausscheidung des Haftmittels auch an der Ausbildung der Zellwand beteiligt ist [54].

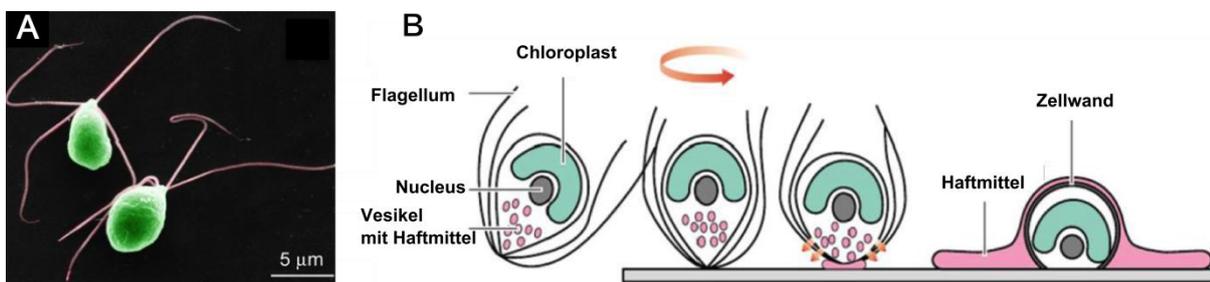


Abbildung 2.4: A) SEM- Aufnahme von *Ulva linza* Zoosporen [22]. B) Illustration der verschiedenen Stadien des Besiedlungsprozesses von *Ulva linza* Zoosporen [54].

2.1.2 Marines Biofouling

Im klassischen Model wird das marine Biofouling als mehrstufiger Prozess beschrieben, bei dem die Anlagerung von Molekülen und Organismen unterschiedlichster Größe an ein Substrat in aufeinanderfolgenden Schritten abläuft [56]. Dies ist allerdings ein überholtes Model, denn tatsächlich handelt es sich um einen hoch dynamischen Prozess [23]. Der Bewuchs hängt stark davon ab welche Organismen verfügbar sind und welche von diesen auf die Oberfläche treffen und adhären. Dabei spielen wiederum verschiedene Faktoren, wie die geographische Lage, die Jahreszeit und auch die Konkurrenz zwischen den Organismen eine große Rolle. Bekannt ist, dass die sogenannte Konditionierung der Oberfläche zu den ersten Schritten des Biofouling-Prozesses zählt. Darunter versteht man die Anlagerung von Proteinen, Polysacchariden und anderen organischen Molekülen an eine Oberfläche, vermittelt durch elektrostatische- und Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und einer elektrostatisch geladenen Doppelschicht, die sich von im Wasser gelösten Ionen an der Oberfläche gebildet hat [57-59]. Daraufhin lagern sich die Biofouler an (vgl. Abbildung 2.5), die in drei Gruppen unterteilt werden können: „Mikrofouler“ (Bakterien,

Diatomeen (Kieselalgen) und Protozoen), „soft Makrofouler“ (Algen und Invertebraten wie Schwämme, Korallen und Anemonen) und „hard Makrofouler“ (Schalentierchen wie Seepocken, Muscheln und Kalkröhrenwürmer). Die „Mikrofouler“ bilden einen mikrobiellen Biofilm, in dem die Organismen in eine gelartige Polymer-Matrix eingelagert sind [56]. Deshalb wird diese Biofouling Schicht auch oft als Schleim bezeichnet [24]. Durch die Bewegungen des Wassers und mit Hilfe der Brown'schen Bewegung ist es diesen Organismen möglich an das Substrat zu gelangen. Die „soft Makrofouler“, bei denen es sich hauptsächlich um Sporen oder Larven im Entwicklungs-Stadium handelt, sind oft darauf angewiesen einen Ort zur Besiedlung zu finden um in eine sessile adulte Lebensform überzugehen. Deshalb sind sie auch meist in der Lage sich durch Begeißelung aktiv fortzubewegen und somit die Suche nach einem passenden Substrat aktiv zu steuern. Bei den „hard Makrofoulern“ handelt es sich ebenfalls sehr häufig um Larven-Stadien wie beispielsweise die Cyprislarve von Seepocken, die aktiv das Substrat erkunden um einen geeigneten Platz zur Siedlung zu finden [60].

Obwohl es keinen ursächlichen Zusammenhang zwischen aufeinanderfolgenden Besiedlungsschritten gibt [23], ist bekannt, dass beispielsweise mikrobielle Biofilme die Anlagerung anderer Biofouler sowohl im positiven als auch im negativen Maße beeinflussen können [46, 61, 62]. So konnte gezeigt werden, dass Zoosporen der Alge *Ulva linza* bevorzugt auf einem bereits vorhandenen bakteriellen Biofilm siedeln [63]. Die große Dynamik des Biofouling-Prozesses und auch die sehr große Diversität der Organismen mit mehr als 4000 identifizierten Arten [56], die wiederum unterschiedliche Adhäsions-mechanismen besitzen, erschweren die Entwicklung von Oberflächenbeschichtungen, die die Anlagerung sämtlicher Biofouler verhindern.

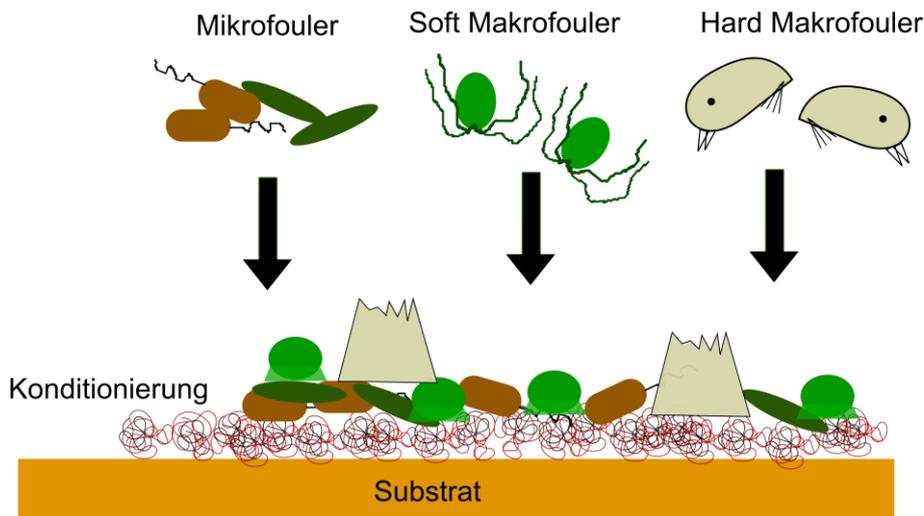


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Biofouling Prozesses. Organische Moleküle bilden zunächst den Konditionierungs-Film aus. Danach lagern sich die Biofouler an das Substrat an. Diese werden unterteilt in „Mikrofouler“ (hier stellvertretend dargestellt durch Bakterien und Diatomeen), „soft Makrofouler“ (hier dargestellt durch Algensporen) und „hard Makrofouler“ (hier dargestellt durch Seepockenlarven und adulte Seepocken). Es muss beachtet werden, dass die Größen der Organismen in der Darstellung nicht den wahren Größenverhältnissen entsprechen.

2.1.3 Mikrobielle Biofilm-Bildung, -Reifung und -Verbreitung am Beispiel

Pseudomonas aeruginosa

Bakterien kommen in zwei unterschiedlichen Lebensformen vor. Entweder sie leben als frei schwimmende Einzelspezies (planktonische Lebensform) oder sie bilden einen Biofilm und leben in Gemeinschaft (sessile Lebensform). Die Bildung eines Biofilms hat für die Bakterien entscheidende Vorteile. Im Verbund sind sie resistenter gegen äußere Einflüsse wie beispielsweise Scherkräfte oder Antibiotika und werden im Falle pathogener Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* vom Immunsystem nicht so schnell erkannt und bekämpft [41]. Daher stellt ein Biofilm, der beispielsweise mit Hilfe von Kathetern oder Implantaten Zugang in den Organismus eines Patienten findet und dort meist chronische Infektionen verursacht, einen wichtigen Virulenzfaktor dar [43].

Im Folgenden wird die Bildung, die Reifung und die Verbreitung eines bakteriellen Biofilms am Beispiel von *P. aeruginosa* näher erläutert [64].

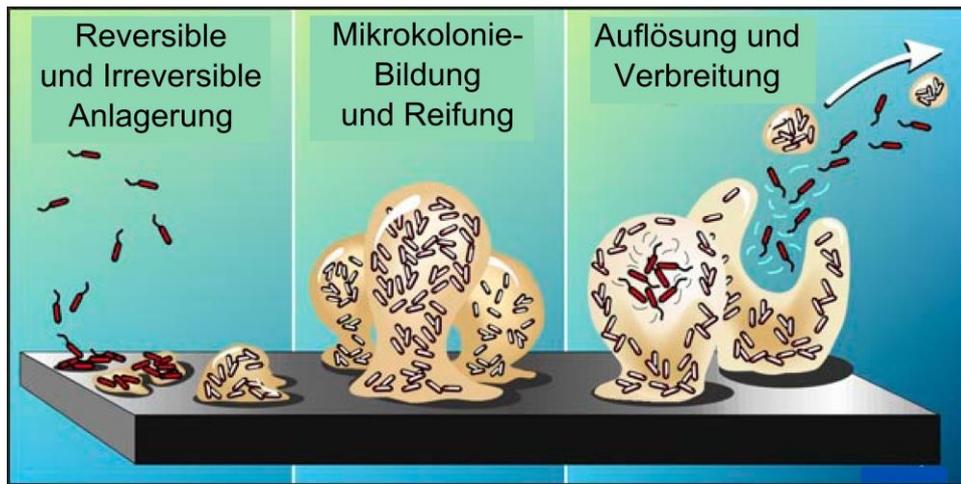


Abbildung 2.6: Illustration der Biofilm-Bildung, -Reifung und -Verbreitung am Beispiel von *P.aeruginosa*. Verändert nach [64].

In der beginnenden Phase der Biofilmbildung lagern sich vereinzelt Bakterien an der Oberfläche an. Diese sind reversibel adhäriert und können sich mittels kleiner Zellfortsätze den Typ IV-Pili in ruckartigen Bewegungen über die Oberfläche bewegen oder wieder in die planktonische Lebensform übergehen [65]. Diejenigen Bakterien, die an der Oberfläche angelagert bleiben, bilden Aggregate aus. In der zweiten Phase beginnen die bereits aggregierten Bakterien eine schleimartige Matrix aus extrazellulären Polymersubstanzen (EPS) zu produzieren, die als Stützmaterial für die Struktur des Biofilms fungiert [64]. Diese EPS-Matrix besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren [66]. Bei *P. aeruginosa* wird der Hauptbestandteil der EPS-Matrix aus Alginate einem Polysaccharid gebildet. In diesem zweiten Biofilmstadium sind die Zellen irreversibel an die Oberfläche gebunden und gehen somit von der planktonischen zur sessilen Lebensform über. Dieser Übergang wird von Änderungen in der Genexpression begleitet. So wird die Expression der Gene, die für die Alginate-Produktion verantwortlich sind, innerhalb der ersten Minuten nach Kontakt mit der Oberfläche hochreguliert. In den folgenden beiden Stadien findet die Reifung des Biofilms statt. Dabei bildet sich eine typische Struktur aus, die aus Matrix-umgebenen Mikrokolonien besteht und mit einem Netzwerk aus offenen Wasserkanälen durchzogen ist. Durch diese Kanäle ist der Austausch von Nährstoffen bis ins Innere des Films gewährleistet. Die fünfte Stufe im Lebenszyklus eines Biofilms ist die Verbreitung der Bakterien auf noch nicht besiedelte Oberflächenbereiche. Hierbei werden entweder einzelne motile Bakterien freigesetzt, die vorübergehend wieder in die planktonische Lebensform übergehen, oder aber ganze Bakterien-Aggregate lösen sich vom Biofilm, wodurch neue Bereiche der Oberfläche

besiedelt werden können [67]. Eine weitere Möglichkeit zur Verbreitung des Biofilms ist die Wanderung des Biofilms selbst, vermittelt durch Scherkräfte [41]. Die Ablösung oder Freisetzung kann beispielsweise durch mechanische Einwirkungen auf den Biofilm oder durch die Abgabe EPS-abbauender Enzyme erfolgen. Bei *P. aeruginosa* findet bevorzugt eine Freisetzung einzelner motiler Bakterien statt. Während der Differenzierung der Zellen innerhalb der Mikrokolonien bildet sich eine äußere Wand aus Bakterien, die den Phänotyp sessiler Bakterien zeigen. Aus dem inneren der Mikrokolonie werden währenddessen motile Zellen des planktonischen Phänotyps ausgelöst und schwimmen heraus. Dabei entsteht ein Hohlraum innerhalb der Mikrokolonie [68].

Bei der Entwicklung eines Biofilms spielt das *Quorum sensing* eine entscheidende Rolle. Hierbei sondern die Bakterien Signalmoleküle (Autoinducer) ab und erhalten so eine Rückkopplung über die vorhandene Zelldichte. Ein Beispiel ist das Signalmolekül *N-Acyl-Homoserin-Lacton* (AHL) [62]. Überschreitet die Konzentration des Autoinducers eine bestimmte Schwelle so wird in den Bakterien die Expression bestimmter Gene hochreguliert. Es wird angenommen, dass *Quorum sensing* auch für die Expression des Gens, welches die Produktion des Alginats codiert, eine entscheidende Rolle einnimmt [64].

2.2 Einfluss verschiedener Oberflächeneigenschaften auf das marine Biofouling

Schon sehr früh entdeckten die Menschen, dass die Anlagerung von marinem Material an ihre Schiffe ein Problem darstellte, das es zu bekämpfen galt. Deshalb haben schon die frühen Hochkulturen wie die Phönizier und Karthager ihre Schiffe mit Kupfer oder Blei ummantelt [56]. Probleme machten die ursprünglichen Kupfer beinhaltenden Beschichtungen als die hölzernen Schiffe im 18. Jahrhundert durch Schiffe aus Eisen ersetzt wurden, da das Kupfer die Korrosion des Eisens begünstigte. Von diesem Zeitpunkt an war das Interesse an Antifouling Beschichtungen neu geweckt [56]. Kupferverbindungen wie Kupferoxid (Cu_2O) blieben allerdings bis in die heutige Zeit ein wichtiger Bestandteil von Antifouling Anstrichen [24]. Ab 1974 erwiesen sich zinnorganische Verbindungen wie Tributylzinn (TBT) zusammen mit Kupferoxid in sogenannten selbst-reinigenden (engl. „self-polishing“) Copolymer Anstrichen als sehr erfolgreiches System [69]. Das Biozid TBT hat eine äußerst toxische Wirkung auf die Biofouler, was es so erfolgreich macht. Allerdings konnten auch schwere toxische Effekte auf andere Lebewesen wie beispielsweise die nordische

Purpurschnecke *Nucella lapillus* nachgewiesen werden [70, 71]. Die negativen Auswirkungen des TBTs auf das ganze Ökosystem führten schließlich 2008 zum globalen Verbot dieses Biozids. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Fokus der Entwicklung auf umweltverträgliche Lösungen wie zum Beispiel „Fouling-release“ Beschichtungen (FRC) verstärkt [72]. Diese FRC verhindern, anders als „Antifouling“ Beschichtungen, nicht die Anlagerung der Organismen, sondern setzen durch Faktoren wie eine geringe Oberflächenenergie die Anhaftungsstärke der Organismen stark herab. Dadurch können die Biofouler entweder durch die Bewegung der Schiffe und Propeller selbst oder durch einfachere Reinigung beseitigt werden. Allerdings sind solche Beschichtungen auf der Basis von Silikon Elastomeren sehr teuer und nicht langzeit-stabil, weshalb sie nur in speziellen Bereichen, wie beispielsweise an Schnellbooten, Anwendung finden [24]. Das Interesse an umweltfreundlichen „Antifouling“ Anstrichen ist daher sehr groß [22].

Die Grundlagenforschung, die sich mit den Einflüssen verschiedener Oberflächeneigenschaften auf deren Besiedlung beschäftigt, nimmt einen großen Teil der Biofouling Forschung ein. Dabei werden sowohl physiko-chemische Ansätze auf der Grundlage der Oberflächenchemie als auch physikalische Ansätze basierend auf der Oberflächenstruktur verfolgt. Im Folgenden werden einige dieser Oberflächeneigenschaften und ihr Einfluss auf die Anhaftung von Organismen, insbesondere auf die Zoosporen von *Ulva Linza*, näher erläutert.

2.2.1 Benetzbarkeit

Durch die systematische Variation einzelner physiko-chemischer Oberflächeneigenschaften wie der Benetzbarkeit konnte gezeigt werden, dass diese einen großen Einfluss auf die Adhäsion von Organismen besitzt. Als erfolgreiches Instrument für solche Untersuchungen erwiesen sich reproduzierbare Modeloberflächen wie Selbst-assemblierende Monolagen (SAM) [73, 74]. Dabei handelt es sich häufig um unterschiedlich terminierte Alkanthiole, die sich auf Gold assemblieren [75, 76]. Baier et al. konnten zeigen dass die Menge an Biomasse auf einer Oberfläche stark mit der freien Oberflächenenergie und somit mit der Benetzbarkeit korreliert [77, 78]. Diese Korrelation ist nicht linear, es gibt einen Bereich der Oberflächenenergie (20-30 mJ/m²), bei der die Adhäsion von Biomasse minimal wird (vgl. Abbildung 2.7). Bei höherer und niedrigerer Oberflächenenergie nimmt die Menge an adhärenter Biomasse zu. Eine Erklärung dafür findet sich in der Betrachtung der Dispersionskräfte [79]. Eine Oberflächenenergie von ca. 20 mJ/m² entspricht ungefähr der

Dispersionskomponente von Wasser, wodurch der Energieaufwand für das Wasser die Oberfläche zu benetzen minimiert wird [57]. Um sich irreversibel an ein Substrat anzuheften benutzen viele Organismen ein Haftmittel. Bei der Adhäsion muss zunächst das Wasser verdrängt werden, damit das Haftmittel die Oberfläche benetzen kann. Das bedeutet, dass das Haftmittel der Organismen und das Wasser an der Oberfläche in Konkurrenz stehen. Hydrophobe Wechselwirkungen unterstützen die Verlagerung von Wassermolekülen an der Oberfläche und ermöglichen somit den Substrat-Haftmittel Bindungsprozess [26].

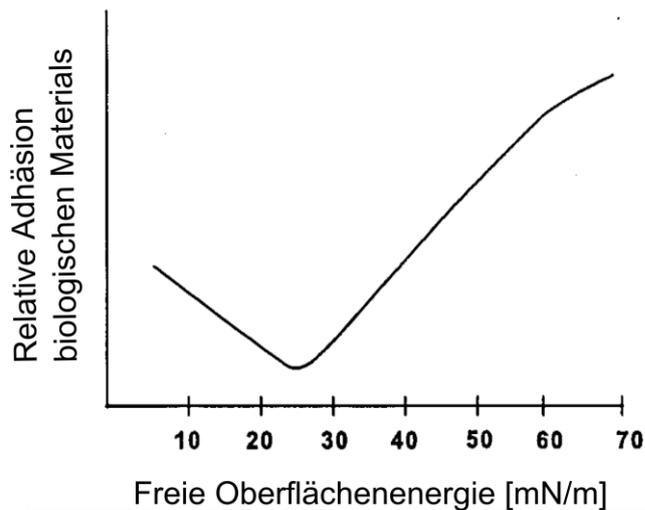


Abbildung 2.7: Von Baier et al. beobachteter Zusammenhang zwischen freier Oberflächenenergie und der Menge an biologischem Material adhärirt auf der Oberfläche („Baier-Kurve“) [80].

Untersuchungen mit Sporen der Grünalge *Ulva linza* zeigten, dass die Adhäsionsrate auf hydrophoben $-CH_3$ terminierten SAMs höher ist als auf hydrophilen $-OH$ terminierten SAMs [26]. Die Haftstärke ist allerdings auf hydrophoben Oberflächen geringer [81]. Bei Untersuchungen mit dem Diatom *Amphora* zeigte sich das Gegenteil. Diese adhärirten wesentlich stärker an hydrophoben als an hydrophilen SAMs [81]. Daher ist zu beachten, dass die meisten Oberflächen, unabhängig davon ob sie hydrophob oder hydrophil sind, eine Spezies spezifische Besiedlungs-Reaktion hervorrufen [28].

2.2.2 Hydratation

Dicht gepackte Polymerfilme auf der Basis von Polyethylenglykol (PEG) besitzen eine hohe Hydratationsenergie, wodurch sie nur schwer dehydrierbar sind. PEG-Oberflächen erwiesen sich in zahlreichen Studien als äußerst inert gegen die Anlagerung von Proteinen [82, 83]. Oligoethylenglykol SAMs (OEGs) mit weniger Ethylenglykol (EG) Einheiten als PEG bieten die Möglichkeit den Einfluss von Eigenschaften wie der Anzahl an EG-Einheiten und somit der Menge des im Film gebundenen Wassers auf die Adhäsion von Organismen zu untersuchen [84]. Schilp et al. testeten eine EG_x-OH ($x = 1-6$) Serie gleicher Benetzbarkeit aber unterschiedlicher EG-Kettenlänge auf ihre Resistenz gegenüber Proteinen und Zoosporen von *Ulva linza* [84]. Die Menge an Wasser, die den Film hydriert, ist dabei umso geringer je kürzer die EG-Kettenlänge ist [85]. Zunächst wurde auf allen Oberflächen (EG_{1-6}) eine große Anzahl gesiedelter Sporen beobachtet. Leichtes Abspülen der besiedelten Oberflächen führte jedoch dazu, dass fast alle Sporen von den $EG_{2-6}OH$ SAMs abgewaschen wurden. Nur auf dem EG_1OH SAM waren die Sporen in der Lage eine irreversible Bindung mit der Oberfläche einzugehen. Der Grund dafür liegt in der geringeren Bindungsenergie des Wassers in dem EG_1OH SAM. Dadurch lassen sich die Wassermoleküle leichter durch das Haftmittel der Algensporen verdrängen. Die starke Hydratisierung der $EG_{2-6}OH$ SAMs verhindert effektiv die Wechselwirkung zwischen dem Haftmittel und der Oberfläche was eine reversible Besiedlung dieser Oberflächen zur Folge hat.

2.2.3 Topographie

Ein neuer Trend in der Antifouling Technologie sind biomimetische Oberflächen, die durch die Antifouling-Eigenschaften im Meer lebender Tiere inspiriert sind [23]. Viele dieser Tiere wie beispielsweise Haie, Wale, Delphine oder Muscheln werden nicht oder nur in sehr geringem Maße von Biofoulern befallen. Die Haut oder Schalen dieser Tiere weisen eine besondere Mikro- oder Nanostruktur auf, die neben anderen chemischen und physikalischen Faktoren für die geringe Besiedlung verantwortlich gemacht wird [28]. Untersuchungen mit unterschiedlichen Oberflächentopographien mit beispielweise Säulen oder Kämmen, wie in Abbildung 2.8C-D dargestellt, haben gezeigt, dass die Größe der Strukturen einen großen Einfluss auf die Besiedlung durch Biofouler hat. *Ulva linza* Zoosporen beispielsweise siedeln präferiert in Kanälen zwischen zwei Kämmen oder Löchern strukturierter Oberflächen mit einer Strukturgröße von 5 μm , was der Größe ihres Zellkörpers entspricht [86, 87]. Ist die

Strukturgröße jedoch kleiner ($2\ \mu\text{m}$) so ist die Anlagerung der Sporen an dieser Oberfläche inhibiert. Weitere Studien haben gezeigt, dass solche Strukturen am effektivsten in der Biofouling Bekämpfung sind, deren Strukturgröße im Bereich von 50-90% des Organismus-Durchmessers liegt [88]. Aber nicht nur die Größe der Struktur, sondern auch ihre Geometrie spielt eine große Rolle. Vergleiche von Säulen- oder Kammstrukturen mit der sogenannten Sharklet AFTM Topographie (vgl. Abbildung 2.8) haben gezeigt, dass wesentlich weniger Sporen auf der Sharklet Struktur siedelten als auf den anderen Strukturen, obwohl die Strukturgrößen ($2\ \mu\text{m}$) und die Abstände zwischen den Strukturen ($2\ \mu\text{m}$) gleich waren [87]. Die Sharklet AFTM Struktur, die sich an die Topographie der Hai-Haut anlehnt, besteht aus periodisch angeordneten Rippen gleicher Breite ($2\ \mu\text{m}$) aber unterschiedlicher Länge (4, 8, 12 und $16\ \mu\text{m}$) die zusammen eine diamantförmige Struktur ergeben [89] (vgl. Abbildung 2.8A). Diese komplexe Strukturgeometrie ist für die geringere Besiedlung der Sharklet Topographie verantwortlich.

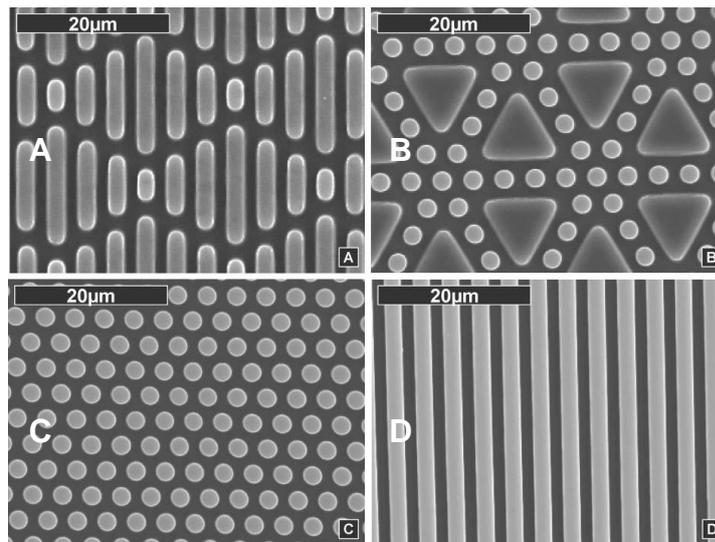


Abbildung 2.8: SEM Abbildungen unterschiedlicher Oberflächentopographien auf Polydimethylsiloxan (PDMS) zur Untersuchung des Besiedlungsverhaltens von *Ulva linza* Sporen auf strukturierten Oberflächen. A) Sharklet AFTM, B) Säulen und Dreiecke, C) Säulen und D) Kämmen [87].

Generell gilt für den Antifouling Erfolg einer Topographie, dass die mögliche Anzahl an Anlagerungspunkten zwischen dem Organismus und dem Substrat minimiert sein muss („Attachment point theory“) [90]. Daher gibt es verschiedene Kriterien für eine Strukturen um zum Beispiel wirksam gegen die Besiedlung mit *Ulva linza* Zoosporen zu sein [87]. Die

Abstände zwischen den Struktureinheiten müssen so gewählt sein, dass die Sporen nicht zwischen den Strukturen, sondern nur auf ihnen (z. B. auf einer Säule) siedeln können. Die Größe der Struktureinheiten muss dabei kleiner als der Sporen-Körper sein. Da die Sporen den Abstand zweier Struktureinheiten überbrücken und auf zwei Strukturen gleichzeitig siedeln können muss die Höhe der Struktur so gewählt sein, dass die Spore nicht mit dem Boden in Berührung kommen kann.

Oberflächen mit nur einer Strukturgröße besitzen einen Spezies-spezifischen Antifouling Effekt [28]. Da die Biofouler aber einen weiten Größenordnungsbereich aufspannen (Bakterien mit ca. 0,25-1 μm , Algensporen mit ca. 5-7 μm und Seepockenlarven mit ca. 500 μm [91]) sind solche Topographien in der realen Meeresumgebung nicht gegen sämtliche Arten von Biofoulern wirksam. Daher liegt der Fokus von topographischen antifouling Beschichtungen auf der Entwicklung von hierarchischen Strukturen unterschiedlicher Strukturgröße, die eine bessere Effektivität gegen die Anlagerung verschiedener Spezies bieten [91, 92].

2.2.4 Ladung

Ein weiterer wichtiger Faktor der die Anlagerung von Organismen an ein Substrat beeinflusst ist die Ladung der Oberfläche. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Substratoberfläche und der Oberfläche des Organismus bewirken attraktive bzw. repulsive Kräfte zwischen diesen. Viele Organismen, wie Bakterien oder Sporen von Grünalgen, besitzen ein negatives Zeta-Potential [27, 93]. Daher bewirkt eine negativ geladene Substratoberfläche repulsive Kräfte zwischen Substrat und Organismus. Es ist allerdings zu beachten, dass in einem Elektrolyt, wie beispielsweise auch Meerwasser, die Ladung von Ladungsträgern durch frei bewegliche Ionen abgeschirmt wird. Die dabei charakteristische Debye-Länge, d.h. die Abschirmlänge bei der die Ladung der Oberfläche durch die Ionen im Elektrolyt auf das $1/e$ fache (e : Eulersche Zahl) abfällt, liegt in Meerwasser durch die hohe Salinität bei ca. 0,4 nm [27]. Daher sind elektrostatische Wechselwirkungseffekte nur innerhalb von Nanometer über der Oberfläche zu erwarten. Ista et al. konnten zeigen, dass die Besiedlung von SAMs mit Carboxylat-Endgruppen durch *Ulva linza* Zoosporen geringer ist als auf Hydroxyl-terminierten SAMs, was entweder auf eine selektive Reaktion auf die Carboxyl-Gruppen oder aber auf die elektrostatische Repulsion zurückgeführt werden kann [94]. Dass tatsächlich Ladungseffekte für eine geringere Besiedlung von negativ geladenen Substratoberflächen verantwortlich sind konnten Rosenhahn et al. zeigen [27]. Messungen des

Zeta-Potentials von *Ulva linza* Zoosporen ergaben ein negatives Potential von $-19,3 \pm 1,1$ mV. Der Vergleich der Besiedlung von Polytetrafluoroethylen (PTFE) Filmen mit negativer und positiver Volumen-Ladung zeigte, dass statistisch signifikant weniger Sporen auf der negativen Oberfläche siedelten.

2.2.5 Antimikrobielle Peptide

Tiere und Pflanzen besitzen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Peptiden, die effektiv Mikroben wie Bakterien, Pilze oder Viren abtöten und somit Infektionen verhindern. Dabei ist die Vielfalt an solchen Peptiden sehr groß und von Spezies zu Spezies unterschiedlich (ca. 880 identifizierte verschiedene Peptide [95]). Ein bekanntes Beispiel ist *Magainin*, ein von der Haut des Krallenfrosches *Xenopus laevis* isoliertes antimikrobielles Peptid [96]. Obwohl die verschiedenen Peptide eine Vielfalt unterschiedlicher Aminosäure-Sequenzen aufweisen, konnte eine Gemeinsamkeit identifiziert werden. Die linearen Peptidmoleküle nehmen eine Sekundär-Struktur ein, in der Cluster von hydrophoben und kationischen Aminosäuren räumlich in diskreten Bereichen des Moleküls organisiert sind [97]. Allgemein gilt, dass solche Peptide antimikrobiell aktiv sind, die aus hydrophilen (Serin, Cystein oder Glutamin), hydrophoben (Alanin, Leucin oder Tryptophan) und kationischen (Lysin oder Arginin) Aminosäuren bestehen, die so im Molekül angeordnet sind, dass sich eine amphipathische Struktur ausbilden kann.

Die Wirksamkeit solcher Peptide beruht auf der Tatsache, dass die äußeren Phospholipid-Kopfgruppen der Lipid-Zellmembran von Bakterien, im Gegensatz zur Zellmembran von Eukaryoten, negativ geladen sind (siehe Abbildung 2.9). Durch die Nettoladung der Bakterienmembran werden die positiv geladenen Peptide angezogen und interagieren mit der Lipid-Doppelschicht. Die Peptide adsorbieren an die äußere Lipid-Schicht und betten sich in die Lipid-Kopfgruppen Region ein. Dadurch wird diese äußere Schicht gedehnt. Bei höheren Peptidkonzentrationen bilden sich Transmembranporen wobei verschiedene Modelle die Entstehung dieser Poren erklären [95]. Dies kann eine komplette Zell-Lyse oder aber ein Eindringen der Peptidmoleküle in das Innere der Zelle zur Folge haben. Im letzteren Fall werden für den Zelltod verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht, wie beispielsweise auch Eingriffe der Peptide in den Transkriptions- oder Translationsprozess der bakteriellen DNA [95, 98].

Durch die zelltötende Wirkung ist das Interesse an antimikrobiellen Peptiden auch in der biomedizinischen Forschung sehr groß, da viele Bakterien Resistenzen gegen die üblichen

Antibiotika aufgebaut haben. Von der Funktion der Peptide inspiriert wird beispielsweise auch der Einfluss immobilisierter Peptoid-Polymere auf adhärenente Bakterien untersucht [99]. Solche Oberflächenmodifikationen können in Zukunft von großer Bedeutung in der Implantat-Technologie sein.

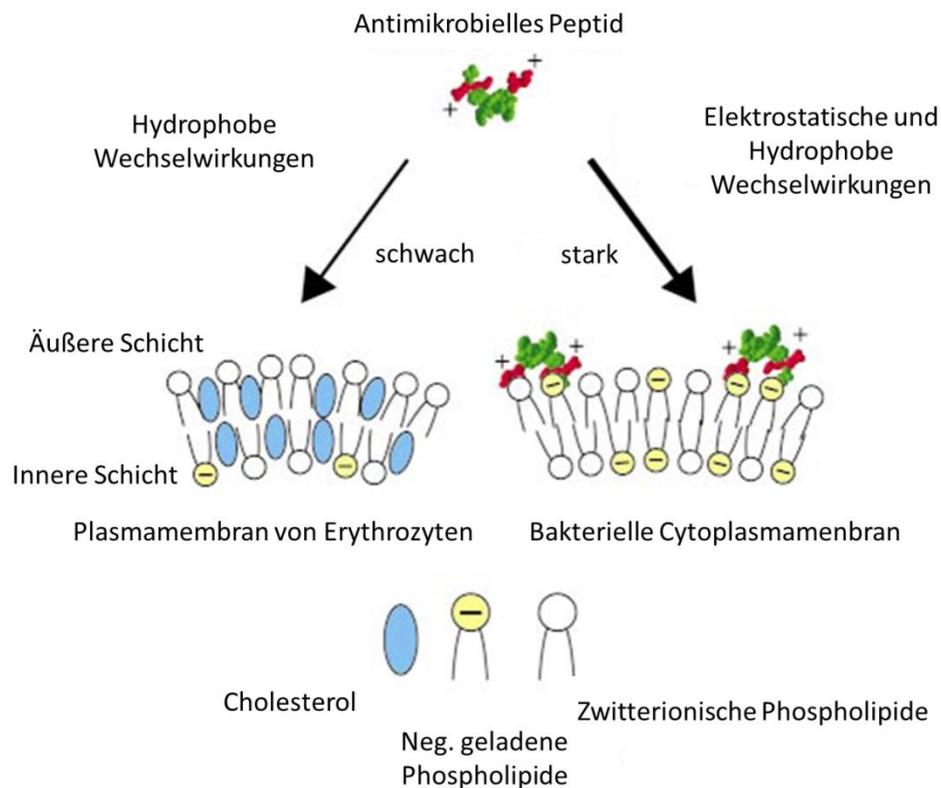


Abbildung 2.9: Angriffsziele der antimikrobiellen Peptide in der bakteriellen Zellmembran, deren äußere Membran-Schicht im Gegensatz zu der von Eukaryoten negativ geladen ist. Verändert nach [97].

Ebenfalls angeregt durch die antimikrobiellen Eigenschaften kationischer Peptide haben Ederth et al. den Einfluss verschiedener positiv geladener Oligopeptid SAMs auf die Anlagerung von *Ulva linza* Sporen untersucht [32]. Vier Oligopeptide mit unterschiedlicher Aminosäure-Zusammensetzung wurden untersucht: LysGly¹; LysTyrGly², ArgTyr³ und Gly⁴. Dabei waren alle Peptide, bis auf Gly, das in allen Oligopeptid SAMs als Abstandshalter

¹ Lysin und Glycin

² Lysin, Tyrosin und Glycin

³ Arginin und Tyrosin

⁴ Glycin

dient, positiv geladen. Es konnte eine erheblich höhere Besiedlung der positiv geladenen SAMs als auf Glas beobachtet werden, was durch die elektrostatische Wechselwirkung der Oberfläche mit der negativ geladenen Sporen Membran erklärt wurde. Die höchste Besiedlung aber wurde auf ArgTyr SAMs festgestellt. Bei näherer Betrachtung der gesiedelten *Ulva linza* Sporen zeigte sich aber, dass eine Vielzahl der Sporen nicht auf normalem Wege gesiedelt waren (siehe Abschnitt 2.1.1.2). Es fanden sich Sporen, die hauptsächlich seitlich mit ihrem Zellkörper an der Oberfläche klebten und ihre Flagellen sowie ihre birnenartige Form beibehielten (siehe Abbildung 2.10). Ederth et al. nannten diese Sporen „pseudo“-gesiedelt. Weitere Untersuchungen mit ArgTyr beinhaltenden SAMs ergaben, dass das Arginin für die starke Interaktion des SAMs mit den Sporen verantwortlich war und eine Erhöhung der Arginin Konzentration im SAM auch eine Zunahme der „pseudo“-Besiedlung und des Zelltodes zur Folge hatte [32]. Der Vergleich der Besiedlung von Arginin-terminierten SAMs mit *Ulva* Sporen und mit *Navicula perminuta* bestätigte, dass spezifische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Arginin und der negativ geladenen Phospholipid-Membran der Sporen für die „pseudo-Besiedlung“ verantwortlich waren. Denn die Zellen von *N. perminuta*, welche von einer negativ geladenen Kieselsäurehaltigen Zellwand umgeben sind, waren im Gegensatz zu den *Ulva* Sporen völlig unbeeinflusst durch die Anwesenheit des Arginins [33].

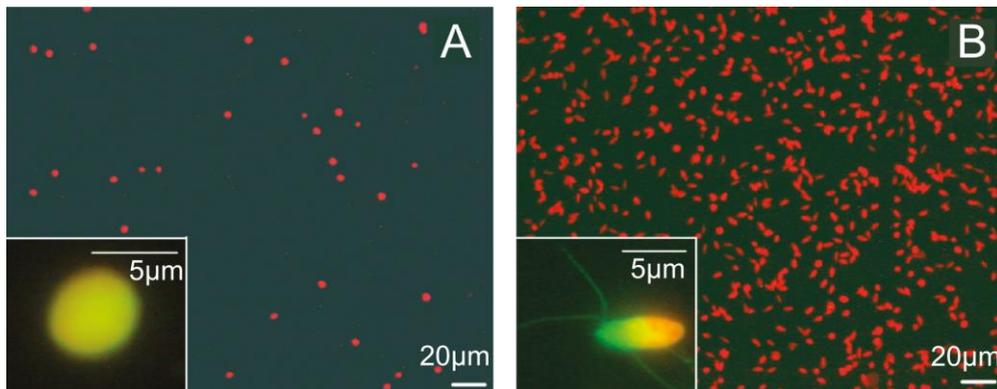


Abbildung 2.10: Fluoreszenz-Mikroskopische Aufnahmen gesiedelter *Ulva linza* Zoosporen auf (a) Glas und (b) Arginin-Tyrosin Oligopeptid SAM. Die kleinen Abbildungen im linken unteren Rand zeigen Aufnahmen (a) einer normal gesiedelten Spore auf Glas und (b) einer „pseudo-gesiedelten“ Spore auf dem ArgTyr SAM [33].

Untersuchungen zur Besiedlungskinetik einer Oberfläche mit 100% ArgTyr Oberflächenanteil und *Ulva* Sporen mit Besiedlungsdauern zwischen 5 min und 60 min zeigten, dass die

Besiedlung der ArgTyr Oberfläche mit Sporen extrem schnell vonstatten geht (vgl. Abbildung 2.11) [33]. 65% der finalen Sporendichte waren schon nach 5 min erreicht. Die meisten dieser Sporen (78%) waren dabei „pseudo“-gesiedelt. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, der mit dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, war, dass der prozentuale Anteil an „pseudo“-gesiedelten Sporen in der Sporenpopulation auf der Oberfläche mit der Zeit abnahm (vgl. Abbildung 2.11 rote Kurve). Dies wurde hauptsächlich auf die Möglichkeit zurückgeführt, dass sich die abnormal angehafteten Sporen reorientierten und so den normalen Besiedlungsprozess durchliefen.

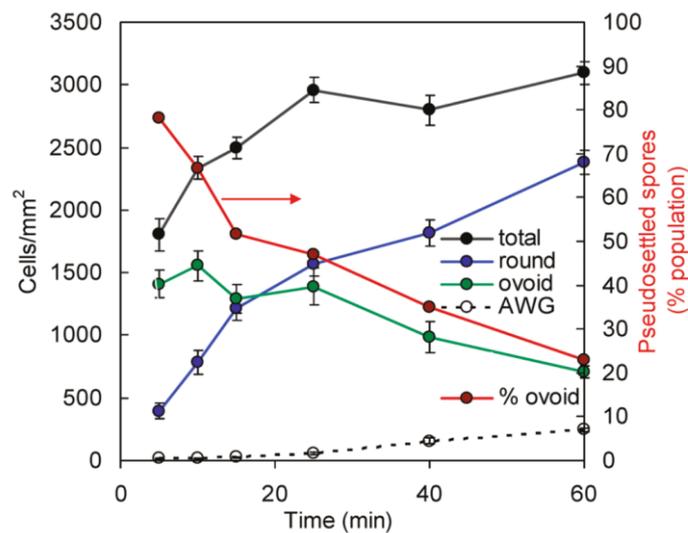


Abbildung 2.11: Zeitliche Entwicklung der Sporendichte auf einer 100% ArgTyr Probe. Aufgetragen sind die Gesamtanzahl an Sporen (total, schwarz), die Anzahl an normalen runden Sporen (round, blau) und die Anzahl an „pseudo-gesiedelten“ Sporen (ovoid, grün) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die rote Kurve zeigt den Anteil an „pseudo-gesiedelten“ Sporen an der Gesamtpopulation gesiedelter Sporen in Abhängigkeit von der Zeit. Als Kontrolle ist die Besiedlung einer Glasprobe (AWG) als gestrichelte Kurve gezeigt [33].

2.3 Feld-Testverfahren

Um die Antifouling Eigenschaften einer Oberfläche zu untersuchen, werden im Labor Testverfahren angewandt, die einem bestimmten Modelorganismus erlauben über einen kürzeren Zeitraum (z.B. 45 Minuten bei *Ulva Linza* Zoosporen oder 48 Stunden bei Larven

der Seepockenart *Balanus amphitrite*) auf verschiedenen Oberflächen zu siedeln. Dadurch können wichtige Erkenntnisse zur initialen Besiedlung spezifisch für die verwendete Spezies gewonnen werden.

Die Laborexperimente geben einen ersten Eindruck über das Potential einer Antifouling Oberfläche und sind damit wichtiger Bestandteil der Forschung nach bewuchsresistenten Beschichtungen. Der tatsächliche Erfolg einer Beschichtung muss allerdings erst noch in Feld-Tests gezeigt werden. Dabei wird beispielsweise auch untersucht, ob sie ihre Antifouling Eigenschaften auch über einen längeren Zeitraum beibehalten. Denn in der realen Meeresumgebung gibt es eine ganze Biofouler Gemeinschaft, die sich aus sehr vielen verschiedenen Spezies zusammensetzt. Diese können nicht nur ein unterschiedliches Besiedlungsverhalten auf verschiedenen Oberflächen aufweisen, wie Untersuchungen mit den Modelorganismen *Ulva Linza* und dem Diatom *Amphora* auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen gezeigt haben (siehe Abschnitt 2.2.1), sondern können sich auch gegenseitig beeinflussen und regulieren. Zudem hängt das Verhalten der Organismen maßgeblich von äußeren Faktoren wie Wasser-Temperatur, -Salinität, pH-Wert und Bewegungen durch Wind und Strömungen ab.

Um Antifouling Beschichtungen zu testen, werden zunächst statische lang-Zeit Feld-Tests durchgeführt, in denen die beschichteten Oberflächen an bestimmten Test-Standorten mit bekannter Population an Organismen über einen längeren Zeitraum (sehr häufig über 60 Tage) im Meer belassen werden [34, 35]. Dabei ist es wichtig, Faktoren wie saisonale Veränderungen in der Population und Wetterabhängigkeiten zu beachten. Swain et al. konnte zudem zeigen, dass die Art und die Menge an Biofoulern maßgeblich von der geographischen Lage des Test-Standortes abhängen [100]. Daher ist es von großer Wichtigkeit Beschichtungen an mehr als nur einem Standort zu testen. Nach erfolgreicher statischer Testphase (engl. Panel testing) werden die Beschichtungen auch unter realen Bedingungen, beispielsweise an Schiffsrümpfen, getestet (engl. Ship patch testing) [101].

Neben solchen Langzeitstudien besteht auch ein wachsendes Interesse daran die initialen Besiedlungsprozesse und frühen Biofouling-Stadien analog zu konventionellen Labor-Testverfahren unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen. Dabei sollen die natürliche Umgebung der Organismen gewahrt und mögliche Zusammenhänge zwischen Besiedlungsschritten beachtet werden. Im Gegensatz zu Laborexperimenten, bei denen kontrollierte Bedingungen herrschen, müssen allerdings gerade bei kurz-Zeit Feldexperimenten viele Faktoren wie Wetter, Tageszeit, Temperatur etc. berücksichtigt werden.

2.4 Motilität flagellierter Mikroorganismen

Die Anlagerung von Biofoulern an Oberflächen in der marinen Umgebung kann, wie bereits erwähnt, passiv stattfinden, indem die Organismen, wie beispielsweise Kieselalgen, durch die Bewegungen des Meerwassers oder durch Gravitation an die Oberflächen gelangen (vgl. Kapitel 2.1.2). Die Zoosporen der *Ulva linza* hingegen sind durch die Fähigkeit zur aktiven Bewegung in der Lage selbst nach einem geeigneten Platz zur Besiedlung zu suchen und dort zu siedeln. Dies bietet entscheidende Vorteile, da die Sporen selektiv ihren Besiedlungsort wählen können [29]. Auch bei Bakterien wie *P. aeruginosa* ist bekannt, dass die Motilität maßgeblich an der Biofilm-Bildung, -Reifung und -Verbreitung beteiligt ist [1, 3, 68]. Bei Pathogenen wie *P. aeruginosa* und auch *Trypanosoma brucei* stellt die Motilität auch einen wichtigen Virulenzfaktor dar, da die Organismen sich aktiv im Wirt ausbreiten können [4, 5]. Motilität bietet den Mikroorganismen des Weiteren den Vorteil auf Reize zu reagieren (z.B. durch Phototaxis oder Chemotaxis) und erleichtert die Reproduktion durch Verschmelzen zweier Keimzellen wie beispielsweise Gameten und Zoosporen oder Eizellen und Spermien. Es gibt verschiedene Formen von Motilität wie sich am Beispiel *P. aeruginosa* zeigen lässt. Dieses Bakterium ist durch das Flagellum in der Lage zu schwimmen und kann sich zusätzlich durch Pili kriechend auf Oberflächen fortbewegen (vgl. Kapitel 2.1.1.1). Da der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Schwimmbewegungen von *P. aeruginosa* und *Ulva linza* Zoosporen liegt, wird im folgenden Kapitel hauptsächlich auf allgemein-gültige Aspekte der Flagellen-vermittelten Fortbewegung von Mikroorganismen eingegangen.

2.4.1 Die Flagellen von Prokaryoten und Eukaryoten

Es gibt zwei grundlegend verschiedene Arten von Flagellen, die der Prokaryoten und die der Eukaryoten.

Das Flagellum prokaryotischer Zellen besteht aus einem langen dünnen helikalen Filament mit einer Länge von 5-10 µm und einem Durchmesser von ca. 30 nm, das von einem in der Zellhülle eingebetteten Motor angetrieben wird (siehe Abbildung 2.12A). Strukturell wird es in die drei Einheiten Filament, Haken und Basal-Körper unterteilt [102]. Das rigide Filament, bestehend aus Flagellin-Protofilamenten, ist über den flexiblen Haken mit dem Basal-Körper verbunden. Der Basal-Körper erstreckt sich über die innere Membran, die Peptidoglycan-Schicht und die äußere Membran und kann in einen Stab und verschiedene Ringe gegliedert

werden, den L-Ring, den P-Ring, den MS-Ring und den C-Ring. Funktionell bilden der MS- und der C-Ring den Rotor, der die Drehbewegung des Motors ausführt. Der sogenannte Stator besteht aus den beiden Proteinen MotA und MotB, die zusammen einen Transmembran Komplex mit mehreren Protonen-Kanälen bilden. Durch das Einströmen von Protonen durch diese Kanäle ins Innere der Zelle werden Konformationsänderungen in MotA hervorgerufen, die das Drehmoment generieren und so den Rotor zum Drehen veranlassen. Der Rotor kann sowohl im Uhrzeigersinn als auch gegen den Uhrzeigersinn drehen, womit das helikale Filament ähnlich einem Propeller entweder Zug- oder Schubkräfte auf die Zelle ausübt.

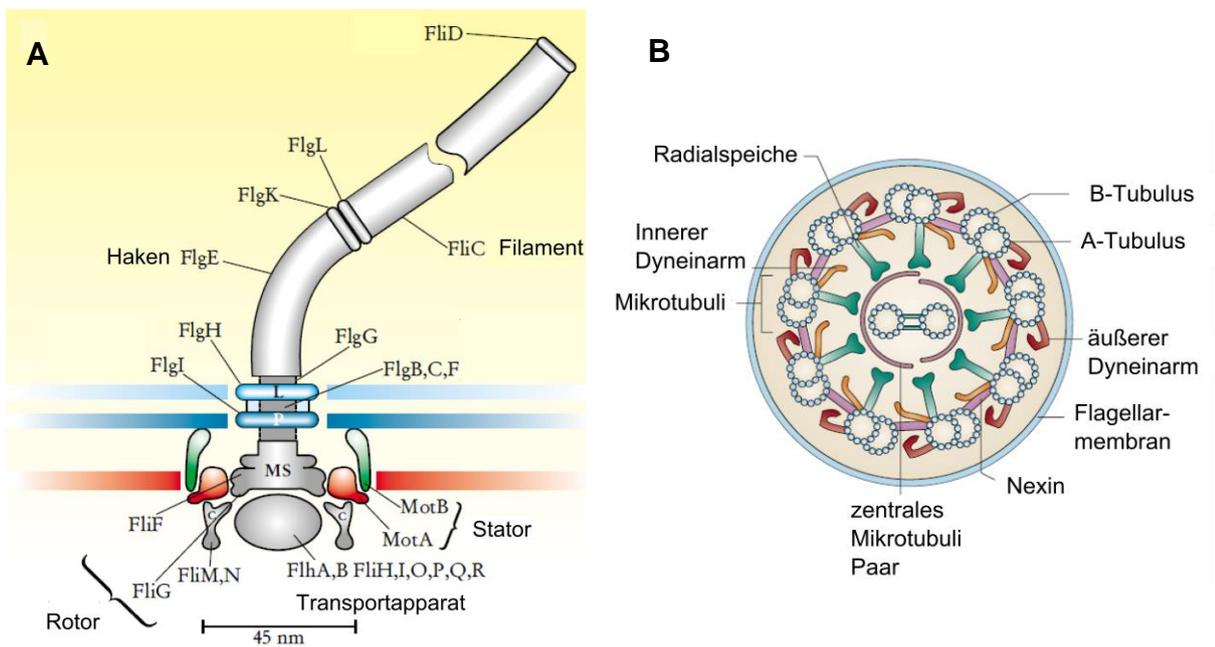


Abbildung 2.12: A) Schematische Darstellung des Flagellen Motors von Prokaryoten. Die einzelnen Proteine sind nach ihren codierenden Genen benannt [103]. B) Schematischer Querschnitt eines Eukaryoten Flagellums mit 9+2 Axonem [104].

Im Gegensatz zu den Flagellen prokaryotischer Zellen können sich die Geißeln eukaryotischer Zellen aktiv verformen und dadurch Bewegungen erzeugen. Die Geißeln werden je nach Länge und Anzahl als Flagellen (lange, einzeln oder paarweise vorkommende Strukturen) oder als Cilien (kurze, in großer Anzahl vorkommende Strukturen) bezeichnet. Die Grundstruktur des Flagellums, das 9+2 Axonem, besteht aus 9 Mikrotubulidupletts (A- und B-Tubuli), die ringförmig um ein zentrales Mikrotubulipaar angeordnet sind (vgl. Abbildung 2.12B) [104]. Das Axonem ist von der Cytoplasmamembran der Zelle umgeben und über den Basal-Körper mit der Zelle verankert. Dieser Basal-Körper mit zylindrischer Struktur, bestehend aus neun Triplet Mikrotubuli, hat keine Motor Funktion wie bei

Bakterien, sondern fungiert nur als Verankerungsstelle [105]. Verknüpfungen zwischen den äußeren Mikrotubulipaares untereinander und mit dem inneren Mikrotubulipaar bestehen durch das Protein Nexin und die sogenannten Radialspeichen. Die molekularen Motoren, die die Bewegung des Flagellums induzieren, sind die Dyneine. Im Axonem gibt es äußere und innere Dyneinarme, die permanent an den A-Tubuli der Mikrotubulidupletts befestigt sind und eine Brücke zwischen dem A-Tubulus des einen und dem B-Tubulus des benachbarten Mikrotubulipaares herstellen. Durch die mit den Dyneinarmen verknüpfte ATPase Aktivität wird die Energie bereitgestellt um benachbarte Mikrotubulipaares ähnlich dem Mechanismus der Muskelkontraktion gegeneinander zu verschieben. Dadurch wird das Axonem gekrümmt. Der komplette Flagellarschlag ist gekennzeichnet durch die wellenförmige Ausbreitung der Axonem-Krümmungen von der Basis bis zur Spitze des Axonems („Base-to-Tip“ Flagellarwellen). Dies ist bei den meisten begeißelten eukaryotischen Einzellern, wie beispielsweise auch Chlamydomonas, der Fall. Bei Trypanosomen wurde neben „Base-to-Tip“ Flagellarwellen auch „Tip-to-Base“ Flagellarwellen mit umgekehrter Ausbreitungsrichtung beobachtet, wodurch sich diese in zwei unterschiedlichen Schwimmmodi bewegen können [5, 106]. Für die „Tip-to-Base“ Ausbreitungsrichtung werden die äußeren Dyneinarme verantwortlich gemacht wohingegen die inneren Dyneinarme für die gegengesetzte Wellenbewegung ausschlaggebend sind.

2.4.2 Bewegung bei kleinen Reynoldszahlen – hydrodynamische Grundlagen

Die Physik, welche der Fortbewegung in der mikroskopischen Welt zugrunde liegt unterscheidet sich grundsätzlich von der Physik in der makroskopischen Welt. Denn Mikroorganismen bewegen sich in einem anderen Reynoldszahlen-Regime als Makroorganismen [107]. Die Reynoldszahl beschreibt das Verhältnis von Trägheits- zu viskosen Reibungskräften und ist somit ein Maß für das Turbulenzverhalten eines Körpers in einem Fluid. Sie ist gegeben durch

$$Re := \frac{\text{Trägheitskräfte}}{\text{Viskose Kräfte}} = \frac{\rho \vartheta d}{\eta} = \frac{\vartheta d}{\nu} \quad (1)$$

mit ρ als charakteristische Dichte des Fluids, ϑ als charakteristische Strömungsgeschwindigkeit des Fluids gegenüber dem Körper, d als Länge des Körpers, η als dynamische Viskosität und ν als kinematische Viskosität des Fluids.

Da Re umgekehrt proportional zur Viskosität des Mediums und proportional zur Größe des Objektes im Fluss ist, besitzen sehr kleine Objekte wie Mikroorganismen eine sehr kleine Reynoldszahl. Zum Vergleich weist ein Mensch, der im Wasser schwimmt, eine Reynoldszahl von 10^4 , ein Goldfisch im Wasser von 10^2 und ein Mikroorganismus von 10^{-4} - 10^{-5} auf [108]. Das bedeutet für den Mikroorganismus, dass die viskosen Kräfte überwiegen und Trägheit für ihn völlig irrelevant ist. Infolgedessen muss ein Mikroorganismus ständig aktiv sein um sich im Medium fortzubewegen. Schwimmt der Mikroschwimmer (in der Größenordnung von wenigen μm) mit einer Geschwindigkeit von $30 \mu\text{m/s}$ durch Wasser und stoppt seine aktive Bewegung so kommt er innerhalb von $0,6 \mu\text{s}$ bzw. nach einer Strecke von $0,1 \text{ \AA}$ zum Stillstand [108]. Dies beschreibt sehr deutlich unter welchen Bedingungen sich ein Mikroschwimmer im Regime kleiner Reynoldszahlen fortbewegt.

Damit sich ein Mikroschwimmer überhaupt aktiv fortbewegen kann muss er nicht-reziproke Bewegungen ausführen, die zeitlich variant sind. Eine zeitlich invariante Bewegung wäre beispielsweise die reziproke Klappbewegung von Muscheln, bei der die Schalen langsam geöffnet und schnell wieder geschlossen werden. Dieser Mechanismus funktioniert bei größeren Reynoldszahlen sehr gut, im Regime kleiner Reynoldszahlen jedoch würde dies zu keiner netto Bewegung der Muschel führen („scallop theorem“ nach Purcell [108]).

Bakterien treiben sich selbst an, indem sie sich durch die nicht reziproke Bewegung des korkenzieherförmigen Flagellums viskose Kräfte zunutze machen [109]. Durch die Rotation des helikalen Filaments gegen den Uhrzeigersinn entsteht, wie in Abbildung 2.13 dargestellt, ein Vorschub der Zelle. Das Drehmoment, das durch die Rotation des Filaments erzeugt wird, wird durch eine langsamere, entgegengesetzte Rotation des Zellkörpers ausgeglichen.

Die komplexe Hydrodynamik des rotierenden Flagellums und des Zellkörpers wird durch verschiedene Modelle und Theorien beschrieben [110-112], die in dieser Arbeit allerdings nicht weiter ausgeführt werden.

Die Schwimmuster von Mikroorganismen werden allerdings nicht nur durch ihren Selbstantrieb bestimmt. Faktoren wie Diffusion und Brown'sche Molekularbewegung sind genauso in die Bewegung involviert wie hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen einzelnen Zellen oder einer Zelle und einer festen Grenzflächen [113-115]. Aufgrund von Rotationsdiffusion und Brown'scher Molekularbewegung ist ein Bakterium nicht in der Lage über eine Längere Strecke geradeaus zu schwimmen, da es durch thermische Bewegungen fortwährend in neue Richtungen gelenkt wird [109].

Hervorgerufen durch hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen den Flagellen, dem Zellkörper und einer festen Grenzfläche werden beispielsweise bei *E. coli* Kreisbewegung im

Uhrzeigersinn beobachtet (bei Aufsicht auf die Grenzfläche), wenn es in einer Entfernung von ca. 30-40 nm von der Grenzfläche schwimmt [21]. Ähnliche Effekte konnten auch für *Vibrio alginolyticus* gezeigt werden, dessen Schwimmmuster sich in Lösung und in der Nähe von festen Grenzflächen deutlich unterscheiden [14]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zelldichte von *E. coli* in der Nähe von Oberflächen wesentlich größer ist als in Lösung was mit hydrodynamischer Anziehung der Bakterien zur Oberfläche erklärt wird [114]. Dadurch erklärt sich auch die Beobachtung, dass Bakterien längere Zeit (> 1 min) schwimmend in naher Umgebung einer Oberfläche verbringen.

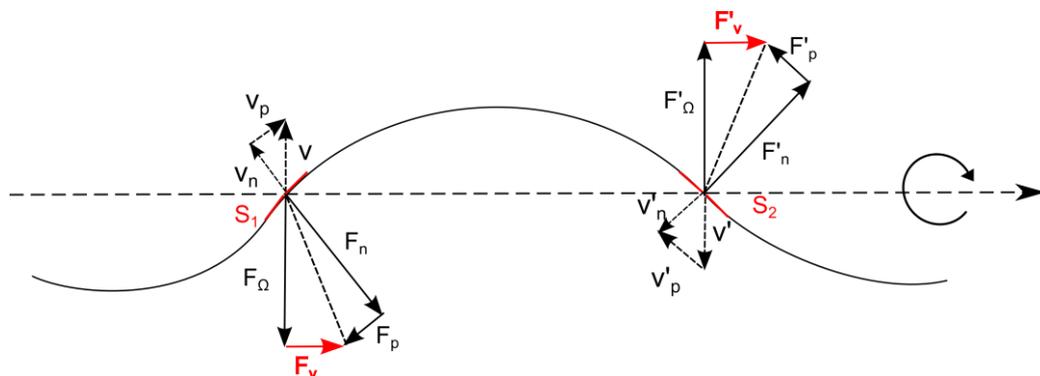


Abbildung 2.13: Skizze zur Veranschaulichung der Vorschub-Erzeugung eines Bakteriums durch schnelle Rotation des helicalen Filaments gegen den Uhrzeigersinn. Betrachtet werden zwei Segmente des Filaments S_1 und S_2 , die genau eine halbe Phasenumdrehung entfernt sind. Die Geschwindigkeiten der beiden Segmente v und v' können in eine parallele Komponente v_p bzw. v'_p und eine senkrechte Komponente v_n bzw. v'_n zerlegt werden. Genau entgegengesetzt zu v_p und v_n wirken die Reibungswiderstände F_n und F_p . Dabei ist deren Betrag gegeben durch das Verhältnis $F_n/F_p \cong 2v_n/v_p$. Die Reibungswiderstände haben eine zur helicalen Achse parallele F_v bzw. F'_v und eine senkrechte F_Ω bzw. F'_Ω Komponente. Während F_Ω und F'_Ω entgegengesetzt wirken und so zum Drehmoment beitragen wirken F_v und F'_v in die gleiche Richtung und steuern zum Vorschub der Zelle bei [109].

2.4.3 Schwimmmechanismen bei Bakterien

Für Bakterien gibt es verschiedene Begeißelungstypen, bei denen sich die Anzahl der Flagellen und ihre Anordnung um den Zellkörper unterscheiden. *E. coli* beispielsweise besitzt mehrere Flagellen, die gleichmäßig um den Zellkörper verteilt sind. Diesen Begeißelungstyp nennt man auch peritrich. Liegen mehrere Flagellen an den gegenüberliegenden Zell-Polen vor spricht man von polytrich-bipolar oder amphitrich, wenn sie nur an einem Zell-Pol liegen, von polytrich-monopolar oder lophotrich. *P. aeruginosa* besitzt nur ein einzelnes Flagellum das sich am Zell-Pol befindet und ist somit monotrich-polar begeißelt. Je nach Begeißelungstyp unterscheiden sich auch die Schwimmmechanismen der Bakterien (vgl. Abbildung 2.15). Drehen sich bei *E. coli* alle Flagellen gegen den Uhrzeigersinn (GUS), so bündeln sie sich am polaren Ende der Zelle und schieben diese in einer gerichteten Bewegung vorwärts. Das Bakterium befindet sich dann in einer „Run“-Phase. Das Umschalten der Rotationsrichtung der Flagellen in eine Drehung im Uhrzeigersinn (US) bewirkt ein Entbündeln der Flagellen, woraus eine ungleichmäßige, taumelnde Bewegung resultiert. Diese taumelnde Bewegung, in der das Bakterium netto keine Entfernung zurücklegt, wird daher auch als „Tumbling“ bezeichnet. Das Bewegungsmuster von *E. coli* setzt sich aus aufeinanderfolgenden „Run“- und „Tumbling“-Phasen zusammen. Berg et al. führten für dieses Bewegungsmuster die Bezeichnung „Run and Tumble“ bzw. „Random walk“ ein [116]. Das Zeitintervall der „Tumbling“-Phase ist mit ca. 0,1 s wesentlich geringer als das Zeitintervall der „Run“-Phase mit ca. 1 s. Das „Tumbling“ bewirkt nach jeder „Run“-Phase eine Richtungsänderung, die im Mittel weniger als 90° beträgt [116]. Durch die Regulation der „Tumbling“-Frequenz, also der Frequenz der Rotationsänderungen der Flagellen, kann *E. coli* die Länge der Vorwärtsbewegung steuern und so beispielsweise auf einen vorhandenen chemischen Gradienten reagieren und netto in die Richtung eines Lockstoffes schwimmen [7]. Diese Regulation geschieht durch zeitliches Abtasten der Lockstoffkonzentrationen mit Hilfe spezifischer Rezeptoren auf der Bakterienmembran [117].

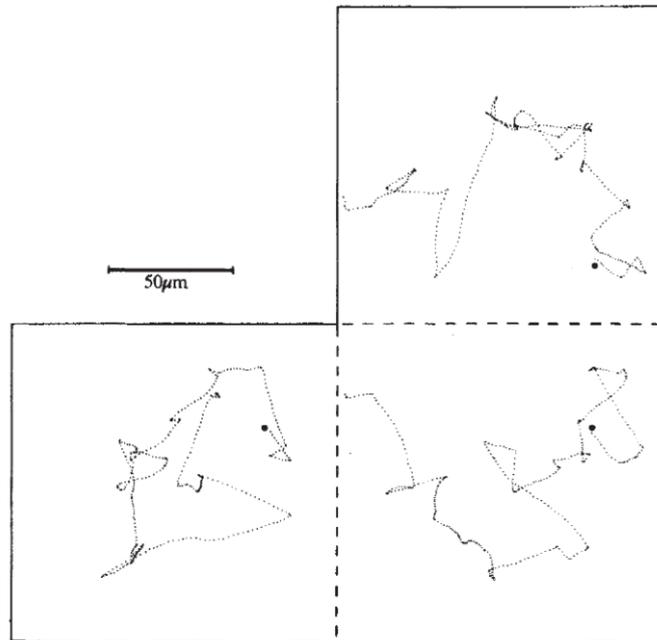


Abbildung 2.14: Ebenen-Projektionen eines 3-dimensionalen „Random walk“ von *E. coli* aufgenommen mit einem von Berg entwickelten Mikroskopie-System [118]. Gezeigt sind Ebenenprojektionen. Der Start der Trajektorie ist mit einem schwarzen Punkt markiert. Eine Faltung entlang der gestrichelten Linie aus der Ebene heraus ergibt die exakte Orientierung dreier Kubusflächen und somit die 3-dimensionale Lage der Trajektorie [116].

Monotrich begeißelte Bakterien so wie *P. aeruginosa* zeigen einen völlig anderen Schwimmmechanismus als den „Run and Tumble“- Mechanismus von *E. coli*, da sie nur ein einzelnes Flagellum besitzen. Durch Drehen des Flagellums gegen den Uhrzeigersinn resultiert wie bei *E. coli* ein „Run“ in Vorwärts Richtung. Die Änderung der Rotationsrichtung des Flagellums bewirkt allerdings, dass die Zelle in die entgegengesetzte Richtung gezogen wird und somit rückwärts schwimmt. Der Schwimmmechanismus monotrich begeißelter Bakterien wird daher auch als „Run and Reverse“ bezeichnet.

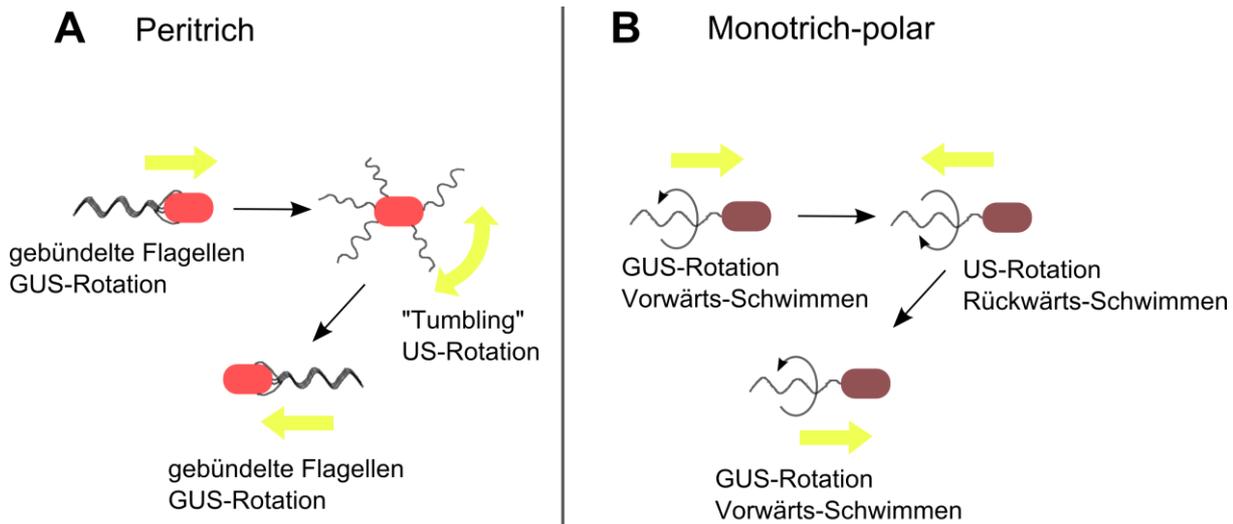


Abbildung 2.15: Schwimmmechanismus zweier unterschiedlich begeißelter Bakterien. A) Peritrich begeißeltes Bakterium (vgl. *E. coli*), dessen Flagellen sich bündeln, wenn sich diese gegen den Uhrzeigersinn (GUS) drehen und entbündeln, wenn sie sich im Uhrzeigersinn (US) drehen. Letzteres bewirkt ein ungerichtetes Tauseln der Zelle. B) Monotrich-polar begeißeltes Bakterium (vgl. *P. aeruginosa*). Eine Umkehr der Rotationsrichtung der Flagellen resultiert in einer Umkehr der Schwimmrichtung. Verändert nach [47].

Die Bewegungsmuster der monotrich begeißelten Bakterien *Pseudomonas citronellolis* und *Vibrio alginolyticus* wurden in 2-dimensionalen Studien mit Hilfe von Videomikroskopie näher untersucht [14, 15, 119]. Diese bestehen aus der konsekutiven Abfolge von „Run“-Phasen in Vorwärts-Richtung und kurzen Richtungsumkehrungen in Rückwärts-Richtung („Reversals“). Der Einfluss Brown’scher Rotationbewegung führt dazu, dass das Bakterium bei einem „Reversal“ nicht einfach in entgegengesetzte, sondern in eine leicht veränderte Richtung schwimmt [120]. Dies hat bei jedem „Reversal“ eine Neuorientierung des Bakteriums zur Folge, was ebenfalls in einer Art „Random walk“ resultiert. Dennoch sind diese Richtungsänderungen klein wodurch sehr scharfe Umkehrwinkel von fast 180° zu beobachten sind. Um signifikant die Richtung zu ändern muss das Bakterium daher mehrere „Reversals“ durchführen. Taylor et al. konnten außerdem zeigen, dass *P. citronellolis* bei Anwesenheit von Gradienten eines Lockstoffes wie Serin Richtungsänderungen durch „Reversal“ unterdrücken und somit über längere Strecken geradeaus schwimmen kann [15]. Im Falle eines Schreckstoffes (Repellent) führt das Bakterium hingegen oszillierende Bewegungen aus, in dem es schnell zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Schwimmen schaltet. Interessante Beobachtungen machten Xie et al. für *V. alginolyticus* [13]. Dieses Bakterium

zeigt einen weiteren Mechanismus um größere, zufällige Richtungsänderungen während des „Reversals“ herbeizuführen. Beim sogenannten „Flick“ ist das Flagellum während des Umschaltens von Rückwärts- nach Vorwärts-Schwimmen leicht von der Zellkörper-Achse weggeknickt. Dadurch wird der Zellkörper wie durch ein Ruder in einem bestimmten Winkel weggedrückt und das Bakterium erfährt effektiv eine Richtungsänderung von ca. 90°. Dieser Mechanismus erweist sich als erfolgreiche Chemotaxis Strategie, da *V. alginolyticus* bei der Bewegungseffizienz entlang eines Lockstoffgradienten wesentlich effektiver ist als *E. coli* [121].

2.4.4 Schwimmechanismen bei Phytoplankton

Der Begriff Phytoplankton fasst alle im Meer oder auch im Süßwasser lebenden mikroskopisch kleinen, einzelligen Algen zusammen, die entweder passiv im Wasser treiben oder sich mit Flagellen aktiv fortbewegen [122]. Dazu zählen auch die Entwicklungsstadien mehrzelliger Algen wie beispielsweise die Zoosporen von *Ulva linza*. Diese werden jedoch durch den Begriff Meroplankton von dem „typischen“ Phytoplankton abgegrenzt. Zum „typischen“ Phytoplankton zählen die nicht-begeißelten Kieselalgen (*Diatomophyceae*) und die Flagellaten wie Dinoflagellaten (*Dinophyceae*), Kalkflagellaten (*Chrysophyceae*, *Coccolithophorida*) und einige Klassen von Grünalgen (*Chlorophyceae*, *Ulvophyceae* und *Prasionophyceae*).

Anders als Bakterien, die sich durch die Rotation helicaler Filamente fortbewegen, beruht der Fortbewegungsmechanismus der Flagellaten auf der aktiven Verformung der Flagellen (siehe Abschnitt 2.4.1). Ein vielfach studierter Modelorganismus zur Untersuchung der Struktur und Funktionsweise von Flagellen und des Fortbewegungsmechanismus von Flagellaten ist *Chlamydomonas Reinhardtii*, welcher zur Klasse der *Chlorophyceae* zählt [123-125]. Dieser 10-20 µm große Einzeller besitzt zwei Flagellen mit einer Länge von ca. 12 µm, mit denen er in der Lage ist sich phototaktisch nach dem Licht zu orientieren. Wie in Abbildung 2.16A dargestellt, zeigt *Chlamydomonas* zwei verschiedene Schwimmmodi. Vorzugsweise schwimmen sie in Vorwärtsrichtung im sogenannten Brustschwimm-Modus („*breast-stroke*“). Dabei sind die zwei Flagellen dem Zellkörper in Schwimmrichtung vorangestellt und schlagen beim sogenannten Effektiv-Schlag nach hinten, wodurch die Zelle einen starken Vorwärtsantrieb erfährt (dargestellt in Abbildung 2.16B unter den Nummern 1-7). Nach dem Effektiv-Schlag folgt der Erholungs-Schlag bei dem die Flagellen über eine Wellenbewegung von der Basis bis zur Spitze in ihre ursprüngliche Position übergehen (dargestellt in

Abbildung 2.16B unter den Nummern 8-11). Diese Art des Flagellen-Schlags wird in der Literatur auch häufig als „Cilien-Schlag“ bezeichnet. Die Frequenz mit der die Flagellen in diesem Modus schlagen liegt im Mittel bei 60 Hz und die erreichten Geschwindigkeiten der Zelle liegen zwischen 100-200 $\mu\text{m/s}$ [125]. Beim seltener zu beobachtenden Rückwärtsschwimmen wird die Zelle durch die Ausbreitung von Wellen von der Flagellen-Basis bis zur Spitze angetrieben, wobei die Flagellen in diesem Fall die Zelle rückwärts schieben. Dieser Bewegungsmechanismus wird als typischer „Flagellen-Schlag“ bezeichnet. Das Schwimmmuster im Brustschwimm-Modus beschreibt meist eine Helix wobei der Augenfleck (Stigma), welcher als Photorezeptor fungiert, von der helikalen Achse abgewendet ist, um besser die Lichtmenge in der Umgebung messen zu können [126, 127]. Richtungsänderungen werden entweder durch asynchrones Schlagen oder durch unterschiedliche Schlagfrequenzen des „cis“- (nahe dem Augenfleck) und des „trans“-Flagellums (gegenüberliegend) herbeigeführt. Asynchrones Schlagen der Flagellen führt zu einer Rotation der Zelle um ihre Längsachse und damit zur helikalen Bewegung.

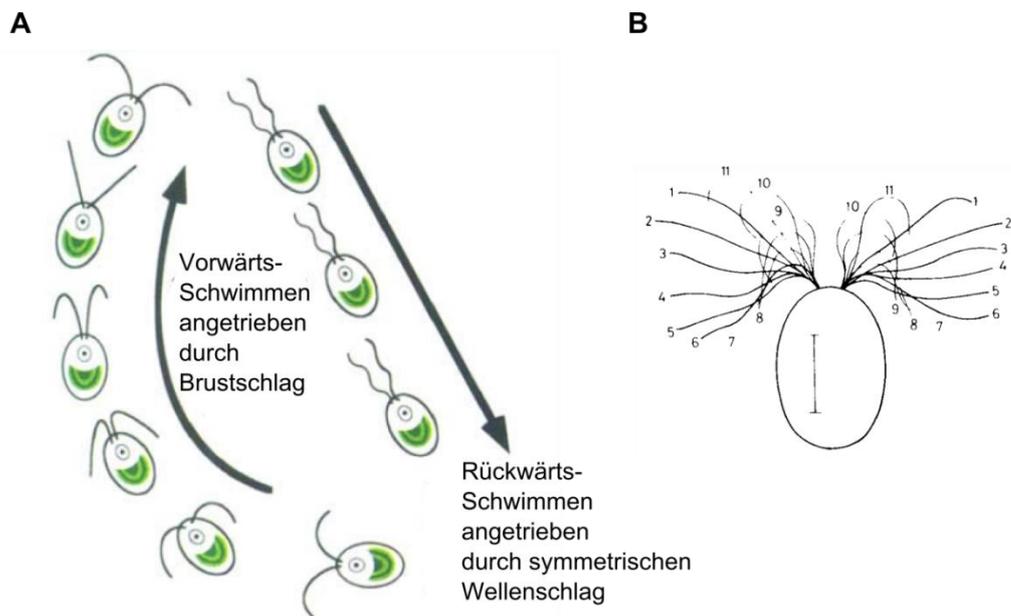


Abbildung 2.16: A) Illustration der zwei Schwimmmodi von *Chlamydomonas*. In Vorwärtsrichtung schwimmt die Zelle im Brustschwimm-Modus. Rückwärts wird die Zelle durch symmetrischen Wellenschlag angetrieben [128]. B) Darstellung des effektiv- Schlags unter den Nummern 1-7 und des Erholungs-Schlags unter den Nummern 8-11 von *Chlamydomonas* im Brustschwimm-Modus [125].

Eine Studie von Inouye et al. bezüglich der Schwimmmechanismen verschiedener einzelliger Algen zeigt, dass die Art des Flagellen-Schlags und die Schwimmmuster der untersuchten Organismen in sechs verschiedene Gruppen unterteilt werden können [129]. Die einzelnen Gruppen und einige ihrer Vertreter sind in Abbildung 2.17 dargestellt. Gruppe I beschreibt das bereits oben erläuterte Bewegungsmuster des Vorwärts-gerichteten Brustschwimmens mit zwei Flagellen, wie es *Chlamydomonas* zeigt („Zilien-Schlag“). Vertreter der Klasse *Prasinophyceae* wie beispielsweise *Pyramimonas parkeae* schwimmen ebenfalls im Brustschwimm-Stil besitzen allerdings vier Flagellen und werden in die Gruppe II klassifiziert. In diesem Fall bilden die jeweils entgegengesetzten Flagellen ein Flagellen-Paar. Die beiden Flagellen pro Flagellen-Paar schlagen synchron wohingegen eine Phasendifferenz zwischen den beiden Flagellen-Paaren besteht. Im Gegensatz zu Gruppe I und Gruppe II erfolgt die Bewegung in den Gruppen IV-VI nicht durch „Zilien-Schläge“, sondern durch typische, wellenförmige „Flagellen-Schläge“. Die vier Flagellen von *Pterosperma cristatum* beispielsweise, welches zur Gruppe VI zählt, bilden durch die Anordnung in einer Reihe ein zusammengesetztes Flagellum, das durch synchrone „Flagellen-Schläge“ die Zelle rückwärts antreibt. Vertreter der Gruppe IV, zu denen auch reproduktive Zellen von *Ulvophyceae* zählen, zeigen einen eher unüblichen Schwimmmechanismus. Dieser wird ebenfalls als Brustschwimm-Stil bezeichnet, ist allerdings verschieden zu dem für *Chlamydomonas* beschriebenen Mechanismus. Die vier Flagellen werden entlang des Zellkörpers zurück gestreckt, so dass die Flagellen-Spitzen nach hinten zeigen. Der Vorschub entsteht dann durch synchrone „Flagellen-Schläge“ der einzelnen Flagellen, bei denen typischerweise die Ausbreitung der flagellaren Wellen von der Basis bis zur Spitze läuft. Obwohl der Mechanismus der Zoosporen von *Ulva linza* nicht im Detail untersucht wurde kann man anhand von Videomikroskopie erkennen, dass sie den gleichen Vorwärts-gerichteten Brustschwimm-Stil zeigen wie für Gruppe IV beschrieben. Allerdings sind die Zoosporen nicht in der Lage wie andere Vertreter dieser und auch anderer Gruppen durch Anordnung der Flagellen vor dem Zellkörper die Schwimmrichtung umzukehren und rückwärts zu schwimmen.

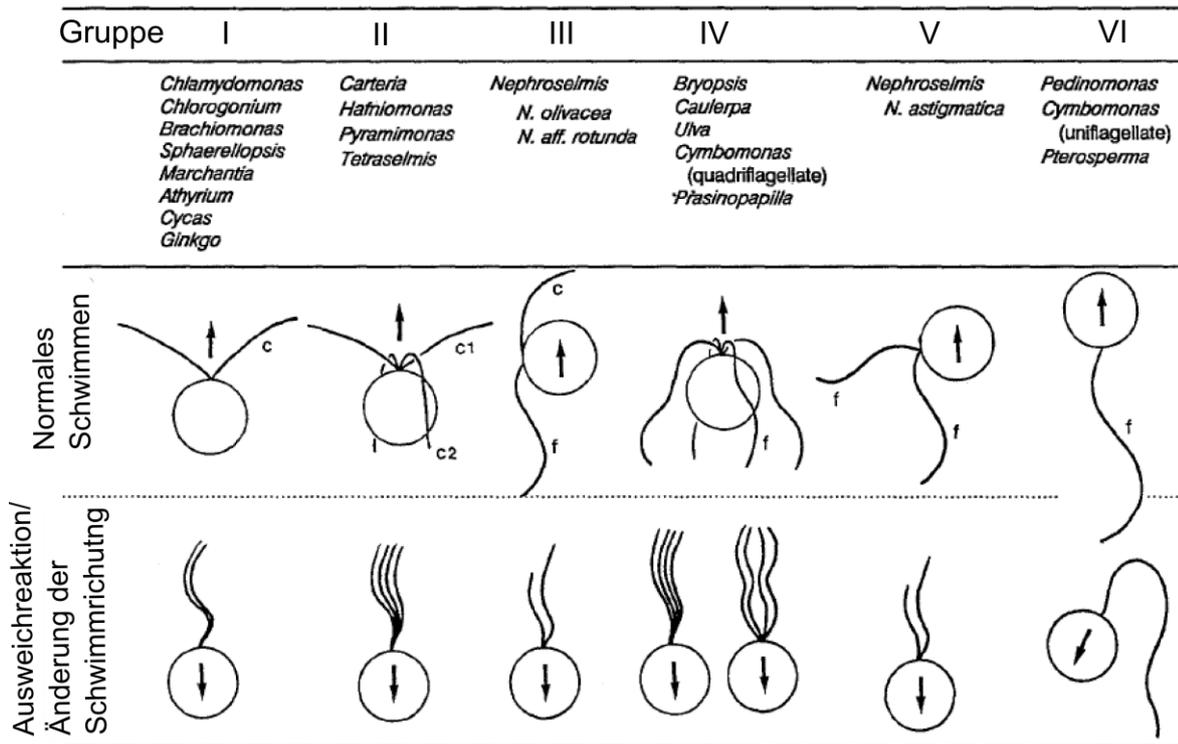


Abbildung 2.17: Klassifikation verschiedener einzelliger Algen hinsichtlich ihrer Flagellen- und Schwimmmechanismen in sechs verschiedene Gruppen. Die Pfeile kennzeichnen die Schwimmrichtung. Die Buchstaben c und f stehen jeweils für „Cilien-Schlag“ bzw. „Flagellen-Schlag“ wobei die Unterscheidung c1 und c2 eine Phasendifferenz zwischen diesen „Cilien-Schlägen“ kennzeichnet [129].

2.4.5 Schwimmmuster von *Ulva linza* Zoosporen

Im Rahmen seiner Dissertation hat Matthias Heydt mit Hilfe digitaler in-line Holographie verschiedene Schwimmmuster von *Ulva linza* Zoosporen identifiziert [130]. Diese wurden in Anlehnung an die Arbeit von Iken et al. in 6 Muster klassifiziert [29, 131]: „Orientation“, „Wobbling“, „Gyration“, „Hit and run“, „Hit and stick“ und „Spinning“ (vgl. Abbildung 2.18). Das Verhalten der Sporen kann in zwei grundlegende Verhaltensmuster eingeteilt werden, das freie Schwimmen, zu dem das „Orientation“ und das „Wobbling“-Muster zählen, die nur in Lösung beobachtet werden, und das Suchverhalten, was durch das Muster „Gyration“ zum Ausdruck kommt. „Hit and run“ und „Hit and stick“ sind Extremfälle des „Gyration“-Schwimmusters. Die Sporen, die das „Orientation“-Muster zeigen haben im Mittel eine Geschwindigkeit von 150 µm/s und schwimmen geradlinig mit gelegentlichen Richtungsänderungen. Das „Wobbling“ beschreibt eine langsamere Bewegung mit ca. 50 µm/s und sehr häufigen Richtungsänderungen. Iken et al. vermuten, dass es sich bei den

Sporen, die dieses Muster zeigen um beschädigte oder irritierte Sporen handelt. [131]. Bei dem „Gyration“-Schwimmmuster, welches das Explorations-Muster der Sporen darstellt, schwimmt die Spore sehr nah an der Oberfläche und kommt in gelegentlichen Kontakt mit dieser um sie somit auf ihre Eignung zur Besiedlung zu prüfen. Bei diesen Oberflächenkontakten kann es auch zum „Spinning“ der Spore kommen, bei dem sie sich sehr schnell (ca. 240 rpm [25]) um einen Verankerungspunkt auf der Oberfläche dreht. Dies kann nur sehr kurz über Sekunden oder aber auch über mehrere Minuten andauern. Danach siedelt die Spore entweder an dieser Stelle oder sie schwimmt weiter und erkundet die Oberfläche nach einem anderen Platz zum Siedeln. Das „Hit and run“-Schwimmmuster beschreibt den Extremfall des „Gyration“, bei dem die Spore die Oberfläche kontaktiert, diese dann aber wieder verlässt wonach kein weiterer Oberflächenkontakt beobachtet werden kann. Beim „Hit and stick“-Muster dagegen bleibt die Spore beim ersten Oberflächenkontakt an der Oberfläche kleben und bewegt sich zunächst nicht. Nach einer gewissen Zeit (ca. 10-20 s) geht die Spore zum „Spinning“ über, verlässt entweder die Oberfläche danach wieder oder siedelt an dieser Stelle.

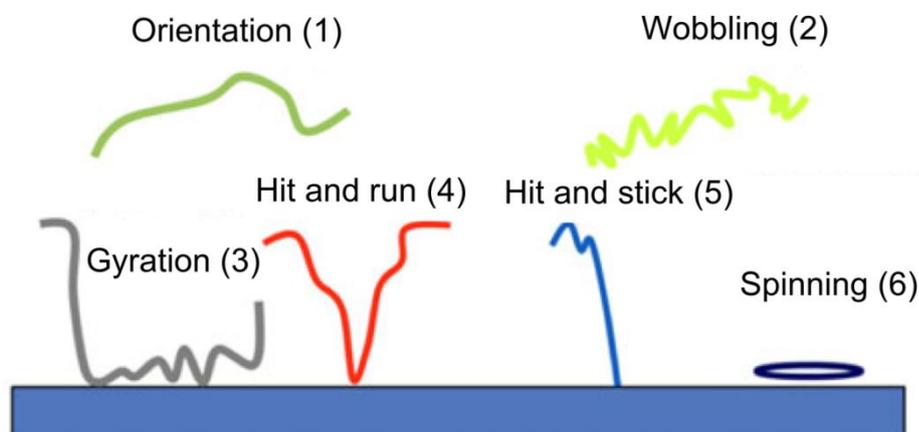


Abbildung 2.18: Skizze der verschiedenen Schwimmmuster von *Ulva linza* Zoosporen. Diese wurden klassifiziert in (1) „Orientation“, (2) „Wobbling“, (3) „Gyration“, (4) „Hit and run“, (5) „Hit and stick“ und (6) „Spinning“ [29].

Durch die Untersuchung des Schwimmverhaltens der Sporen in der Nähe von PEG-, AWG- (engl. „Acid-washed-glas“) und FOTS- (Tridecafluorooctyltriethoxysilan) Oberflächen konnte eine Abhängigkeit des Auftretens bestimmter Schwimmmuster von der angebotenen Oberfläche festgestellt werden [29] (vgl. Abbildung 2.19). Während das „Gyration“-Muster

bei allen Oberflächen beobachtet wird tritt das „Hit and stick“-Muster nur bei der FOTS-Oberfläche auf. Dies und das starke Auftreten des „Spinning“ zeigen, dass die FOTS-Oberfläche sehr attraktiv für die Sporen ist. Die Häufigkeit des „Hit and run“-Musters und das gänzliche Fehlen des „Spinning“-Musters bei der PEG-Oberfläche spiegelt dagegen die abstoßende Wirkung des PEG auf die Anlagerung der Sporen wieder. So können anhand von Änderungen im Schwimmverhalten Informationen über die Antwort der Organismen auf verschiedene Oberflächeneigenschaften gewonnen werden.

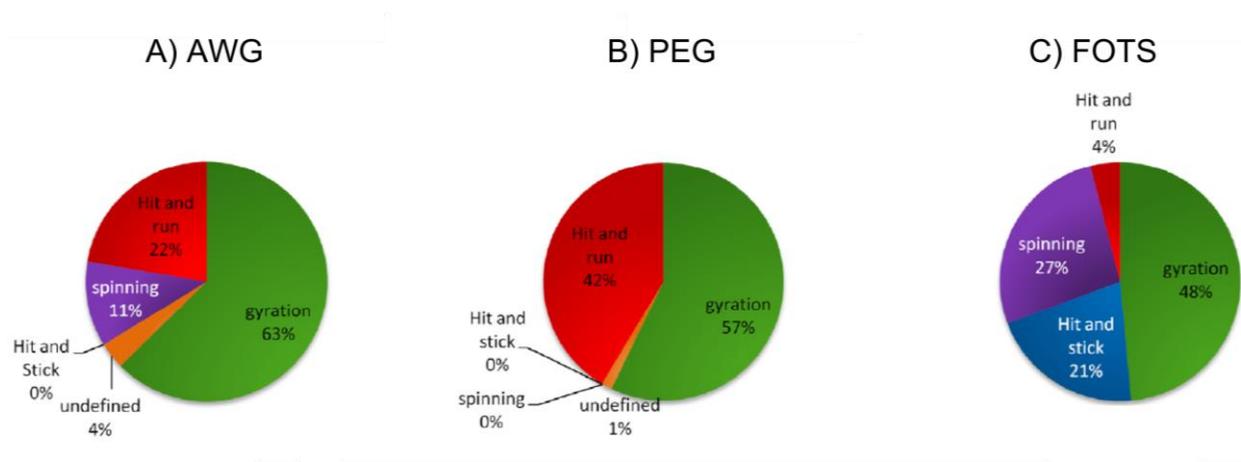


Abbildung 2.19: Prozentuales Auftreten der Schwimmmuster „Gyration“, „Hit and run“, „Hit and stick“ und (6) „Spinning“ in Abhängigkeit der angebotenen Oberfläche A) AWG, B) PEG und C) FOTS [130].

2.5 Physikalische Grundlagen der Holographie

Im folgenden Abschnitt werden kurz der physikalische Hintergrund der Holographie sowie grundlegende Begriffe im Bereich elektromagnetischer Wellen dargestellt. Eine detaillierte Darlegung des holographischen Prinzips findet sich in den Doktorarbeiten von Dr. R. Barth und Dr. M. Schürmann sowie in Fachbüchern zum Thema Holographie [132-135].

Die Holographie ist eine 3-dimensionale Abbildungsmethode, die auf der Interferenz monochromatischer Strahlung beruht. Elektromagnetische Strahlung lässt sich gemäß des Welle-Teilchen-Dualismus sowohl als Teilchen als auch als Welle beschreiben. Für die Erörterung der holographischen Methode wird allerdings nur der Wellencharakter des Lichtes betrachtet. Eine Lichtwelle wird durch folgende Wellenfunktion beschrieben:

$$\Psi(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp\{i\phi(\vec{r})\} \quad (2).$$

Hierbei sind $A(\vec{r})$ die Amplitude und $\phi(\vec{r})$ die Phase der Welle. Das Betragsquadrat der Amplitude ergibt die Intensität

$$I(\vec{r}) = |\Psi(\vec{r})|^2 \quad (3),$$

welche angibt wieviel Energie pro Zeiteinheit durch eine zum Wellenvektor senkrechte Fläche transportiert wird [136]. Das Prinzip der Holographie beruht auf der Superposition zweier monochromatischer Wellen, der Referenzwelle und der Objektwelle [135, 137, 138]. Die Objektwelle entsteht dabei durch Beugung der Referenzwelle an einem Objekt, welches sich im Strahlengang befindet (siehe auch Abschnitt 2.6). Der resultierende Interferenzterm ist eine Linearkombination der Wellenfunktionen beider sich überlagernder Wellen [135]. Die Intensität für Wellen gleicher Polarisation und den Phasen ϕ_a und ϕ_b ist gegeben durch folgenden Term

$$I(\vec{r}) = |\psi_a(\vec{r}) + \psi_b(\vec{r})|^2 = I_a + I_b + 2\sqrt{I_a I_b} \cos(\phi_a - \phi_b) \quad (4).$$

Der Interferenzterm $2\sqrt{I_a I_b} \cos(\phi_a - \phi_b)$ kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen was zur konstruktiven bzw. zur destruktiven Interferenz führt. Durch Modulation der Intensität entstehen die bekannten Interferenzmuster mit abwechselnden Intensitätsmaxima und –minima [136].

Um überhaupt Interferenzen beobachten zu können müssen die sich überlagernden Wellen kohärent sein. Das bedeutet es muss eine feste Phasen-Korrelation zwischen den Wellen bestehen [136]. In der Holographie ist die auf dem Detektor registrierte Intensität des Interferenzmusters durch die Überlagerung der Referenzwelle ψ_{ref} und der Objektwelle ψ_{obj} gemäß Gleichung 4 gegeben durch [138]

$$\begin{aligned}
I(x, y) &= |\psi_{ref}(\vec{r}) + \psi_{obj}(\vec{r})|^2 & (5) \\
&= \psi_{ref}^* \psi_{ref} + \psi_{ref}^* \psi_{obj} + \psi_{ref} \psi_{obj}^* + \psi_{obj}^* \psi_{obj} \\
&= A_{ref}^2 + A_{obj}^2 + 2A_{ref}A_{obj} \cos(\phi_{ref} - \phi_{obj}) \\
&= I_{ref} + I_{obj} + 2\sqrt{I_{ref}I_{obj}} \cos(\phi_{ref} - \phi_{obj})
\end{aligned}$$

Der erste Term $\psi_{ref}^* \psi_{ref}$ entspricht dem direkt transmittierten Anteil der Strahlung und wird daher auch als Quelle bezeichnet. Der zweite Term $\psi_{ref}^* \psi_{obj}$ ergibt das sogenannte Twin-image während der dritte Term $\psi_{ref} \psi_{obj}^*$ das tatsächliche Hologramm darstellt. Beim Twin-image handelt es sich um das reelle, konjugierte Bild, das vor der Detektorebene rekonstruiert. Das Hologramm ist das virtuelle Bild hinter der Detektorebene. Der Abstand von Twin-image und Hologramm zur Detektorebene ist dabei gleich. Die Überlagerung der beiden kann allerdings dazu führen, dass die Bildqualität beeinträchtigt wird. Der Beitrag des letzten Terms $\psi_{obj}^* \psi_{obj}$, welcher der Selbstinterferenz der Objektwelle entspricht, ist in der Regel klein und kann daher vernachlässigt werden.

Eine wichtige physikalische Eigenschaft von Wellen ist deren Beugung an Grenzflächen oder Objekten deren Größe ungefähr der Wellenlänge entspricht [139]. Dabei werden die Wellen von ihrer geradlinigen Ausbreitung abgelenkt wobei sich Amplitude oder Phase ändern. Nach dem Huygen'schen Prinzip ist jeder Punkt der Wellenfront Ausgangspunkt einer Sekundärwelle und die Wellenfront kann an jedem Punkt als kohärente Superposition der Sekundärwellen beschrieben werden. Bei der optischen Holographie macht man sich die Beugung auch insofern zunutze, als dass eine ebene Wellenfront durch eine Lochblende mit einer Größe im Bereich der Wellenlänge in eine divergente, sphärische Wellenfront gebeugt wird. Dadurch ist es möglich, wie im nächsten Kapitel 2.6 näher erläutert wird, die Holographie auch als mikroskopische Abbildungsmethode zu nutzen [140, 141].

2.6 Digitale in-line Holographie

Das Grundprinzip der Holographie wurde um 1940 von dem Physiknobelpreisträger Dennis Gábor entwickelt. Dieser versuchte die damals schlechte Qualität magnetischer Linsen in Elektronenmikroskopen durch Verwendung einer linsenfren Methode zu umgehen [142]. Sein neues mikroskopisches Prinzip brachte den Vorteil, dass sowohl Amplituden- als auch Phaseninformation erhalten blieben und somit die komplette dreidimensionale Rauminformation zwischen Punktquelle und Detektor erfasst wurden [143]. Im Gegensatz zu

konventionellen Photographietechniken, bei denen nur die Amplitude zugänglich ist, bietet eine holographische Aufnahme zusätzlich Phaseninformation, weil diese im Beugungsbild der Holographie amplitudenkodiert vorliegt. Ein zusätzlicher Vorteil der Holographie gegenüber anderen 3-dimensionalen Abbildungsmethoden wie beispielsweise der konfokalen Mikroskopie ist, dass die komplette räumliche Information aus einem einzigen Hologramm gewonnen wird, ohne die Probe abzutasten. Dadurch eignet sich die Holographie sehr gut für Trackinganwendungen, sowohl in der Strömungsmechanik als auch im biologischen Bereich, da sich durch die Verwendung von Detektoren mit geeigneter zeitlicher Auflösung Hologrammserien mit hohen Akquisitionsraten aufnehmen lassen [5, 30, 144-148].

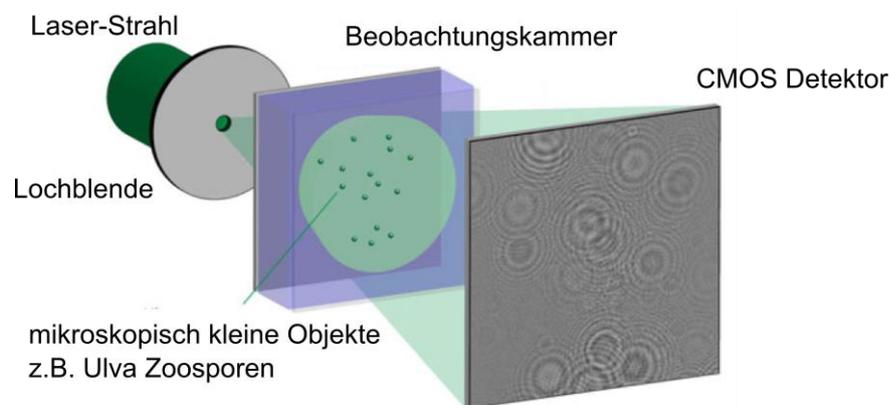


Abbildung 2.20: Illustration des grundlegenden Aufbaus der digitalen Holographie in der in-line Geometrie unter Verwendung sichtbarer Laserstrahlung als Lichtquelle [29].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Abbildungs-Technik ist die optische in-line Holographie [143, 149]. Bei dieser Methode wird eine Probe, wie in Abbildung 2.20 dargestellt, mit einer divergenten, kohärenten elektromagnetischen Welle bestrahlt. Seit den 1960er Jahren dienen Laser als Quelle kohärenter Strahlung [150]. Es können allerdings auch andere Lichtquellen wie beispielsweise Freie-Elektronen-Laser und Synchrotronstrahlung in der Holographie verwendet werden [151, 152]. Das Laserlicht, hier im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, wird an einer Lochblende mit einem Durchmesser in der Größenordnung der Wellenlänge gebeugt, so dass hinter der Lochblende ein divergenter Strahl entsteht. Durch diese Divergenz werden mikroskopisch kleine Objekte im Probenvolumen aufgrund von Projektionsvergrößerung vergrößert abgebildet. Durch Beugung von Wellen an Objekten im Strahlengang entstehen die Objektwellen oder

Sekundärwellen, die durch Überlagerung mit den Referenzwellen oder Primärwellen das Interferenzmuster (Hologramm) erzeugen. Das Hologramm wurde früher mittels Photoplaten aufgezeichnet [142]. Heute, in der Zeit der digitalen Holographie, werden Kameras mit CCD- (charge coupled device) oder CMOS-Modulen (complementary metal oxide semiconductor) verwendet [153, 154]. Ein Nachteil der Holographie in der in-line Geometrie, bei der alle optischen Elemente (Strahlungsquelle, Lochblende, Probe und Detektor) auf einer Achse liegen, ist die Überlagerung des Hologramms mit seinem Twin-image. Die daraus resultierende Verschlechterung der Bildqualität kann jedoch wesentlich reduziert werden, indem der Abstand zwischen Lochblende und Probe so gewählt wird, dass dieser wesentlich größer ist als die Wellenlänge der verwendeten Strahlung [153]. Durch Anordnung der optischen Komponenten in der komplizierteren off-axis Geometrie, bei der Objekt- und Referenzstrahl räumlich voneinander getrennt sind, lässt sich das Problem des twin-image ebenfalls umgehen [155].

2.6.1 Auflösung der digitalen in-line Holographie

Analog zu konventionellen Mikroskopietechniken hängt die Auflösung eines holographischen Mikroskops von der numerischen Apertur NA des Systems und der Wellenlänge λ der verwendeten Strahlung ab. NA ist dabei gegeben durch [137]

$$NA = n \sin \beta \tag{6}$$

Dabei ist n der Brechungsindex des Mediums und β der halbe Öffnungswinkel des Lichtkegels. Für das holographische Mikroskop erhält man aus der geometrischen Betrachtung des Aufbaus folgenden Ausdruck für NA

$$NA = \frac{D/2}{\sqrt{\left(\frac{D}{2}\right)^2 + L^2}} \approx \frac{D}{2L} \tag{7}$$

mit D als Detektorseitenlänge und L als Abstand zwischen Lochblende und Detektor (vgl. Abbildung 2.21). Der vordere Term vereinfacht sich zu $D/2L$ unter der Annahme, dass $L \gg D$.

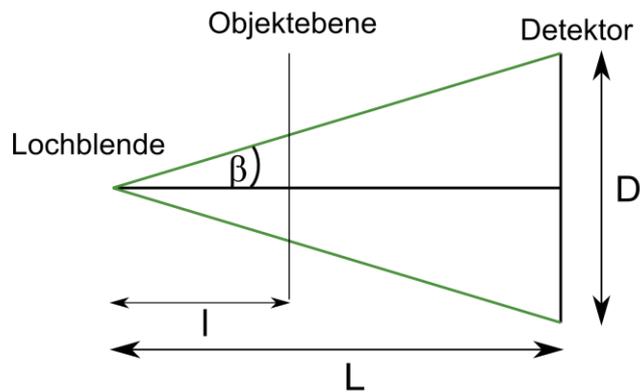


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung des geometrischen Aufbaus der in-line Holographie mit Kennzeichnung der relevanten geometrischen Komponenten zur Bestimmung der Auflösung.

Analog zum Abbe'schen Auflösungskriterium ergeben sich die Auflösungsgrenzen zu [143, 156]

$$\delta_{lateral} = \frac{\lambda}{NA} \quad (8)$$

und

$$\delta_{axial} = \frac{\lambda}{2(NA)^2} \quad (9).$$

Die Vergrößerung, die ein Objekt im divergenten Strahlengang erfährt, ist gegeben durch

$$V = \frac{L}{l} \quad (10)$$

und hängt somit vom Lichtquelle-Probe Abstand l ab [135]. Durch Verringerung des Abstands l kann also eine stärkere Vergrößerung erzielt werden. Zu beachten ist allerdings, dass auch das Bildfeld mit kleiner werdendem l schrumpft. Gemäß Gleichung 10 führt eine Vergrößerung des Lochblende-Detektor Abstandes ebenfalls zu einer stärkeren Vergrößerung. Dabei muss allerdings gewährleistet sein, dass bei größer werdendem Lichtkegel eine ausreichende Anzahl an Photonen den Detektor erreicht [132]. Daher muss ein Kompromiss

zwischen Vergrößerung, Größe des Bildfeldes und ausreichender Photonenzahl auf dem Detektor gesucht werden.

2.6.2 Numerische Rekonstruktion

Um aus einem Hologramm die Realrauminformation zurückzugewinnen muss dieses rekonstruiert werden. Klassisch geschieht dies durch optische Rekonstruktion indem man das Hologramm, welches mit einer Photoplatte aufgenommen wurde, mit Licht derselben Wellenlänge beleuchtet. Bei der digitalen Holographie erhält man die Phaseninformation durch numerische Rekonstruktionsalgorithmen, die die Wellenfront in beliebigen Ebenen rekonstruiert [157-159]. Kreuzer konnte mit der Implementierung der Kirchhoff-Helmholtz'schen Rekonstruktionsformel frühere Rekonstruktionsalgorithmen [160-162], die durch Näherungen zu schlechten Ergebnissen führten, übertreffen. Dessen Algorithmus beruht auf der Berechnung des Fresnel-Kirchhoff-Integrals zur Bestimmung der Wellenfront $K(\vec{r})$ [153, 163, 164]. Aufgrund der Nichtlinearität des Phasenfaktors wird dieser durch eine Koordinatentransformation linearisiert. Die daraus resultierende Verzerrung des Koordinatensystems wird durch die Interpolation auf ein überlagertes äquidistantes Gitter kompensiert. Die Kirchhoff-Helmholtz'schen Rekonstruktionsformel lautet

$$K(\vec{r}) = \int_S I(\vec{\xi}) e^{\frac{ik\vec{\xi}\vec{r}}{\xi}} d^2\xi \quad (11).$$

Dabei ist $\vec{r} = (x, y, z)$ der Ortsvektor, S die Detektorfläche, $\vec{\xi} = (x, y, L)$ die Detektor-Koordinaten, $k = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl und $I(\vec{\xi})$ das vom Detektor registrierte Kontrastbild. Gleichung 11 ist nur gültig für sphärische Wellen unter der Annahme des Fraunhofer Kriteriums $\alpha^2 \ll l/\lambda$ mit α als laterale Dimension des abzubildenden Objekts. Der Betrag $|K(\vec{r})|$ entspricht der Intensitätsverteilung in der xy-Rekonstruktionsebene. Durch Rekonstruktion vieler Ebenen entlang der optischen Achse erhält man eine Abbildung des Volumens und der darin enthaltenen Objekte zwischen der Lochblende und dem Detektor. Nähere Details zur Kreuzer-Implementation können dem Patent entnommen werden [158].

3 Experimenteller Teil

3.1 Aufbau der verwendeten holographischen Mikroskope

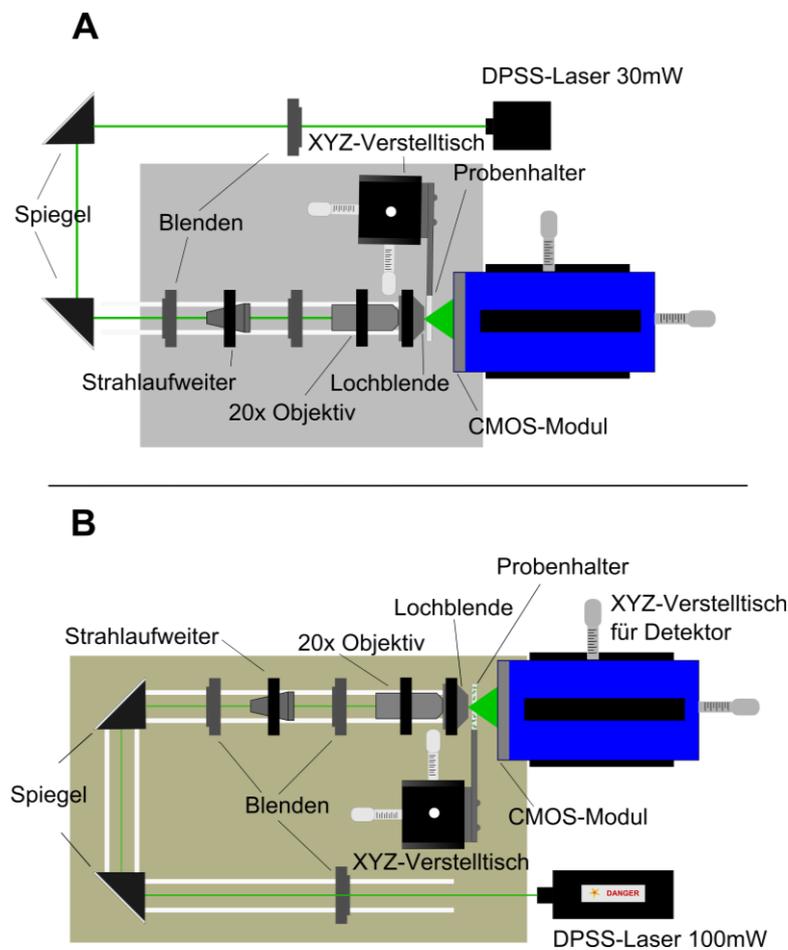


Abbildung 3.1: A) Schematische Darstellung des holographischen Mikroskops, das für die Messungen mit *P. aeruginosa* verwendet wurde. B) Schematische Darstellung des transportablen holographischen Mikroskops, das für die Messungen mit *Ulva linza* Sporen und für die Feldexperimente verwendet wurde.

Für die durchgeführten Experimente mit *P. aeruginosa* und mit *Ulva linza* Zoosporen, sowie für die Experimente im Feld wurden zwei verschiedene Aufbauten des holographischen Mikroskops verwendet. In beiden Fällen folgt der Strahlengang der Implementierung von Kreuzer et al. [165].

Die Experimente mit *P. aeruginosa* wurden in dem bereits von S. Weiße beschriebenen holographischen Mikroskop durchgeführt [166], dessen Aufbau in Abbildung 3.1A schematisch dargestellt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ursprüngliche Aufbau von S. Weiße optimiert, indem alle optischen Komponenten in ein 30 mm Cage-System (Thorlabs, USA) eingebaut wurden, wodurch ein stabilerer Aufbau und eine einfachere Justage gewährleistet sind. Die optischen Komponenten des Aufbaus, d.h. Laser, Strahlaufweiter, Objektiv, Lochblende und Detektor, liegen auf einer optischen Achse (in-line Geometrie). Bis auf die beiden Umlenkspiegel und den Laser befinden sich alle Bauteile in einem aus Aluminium gefertigten Inkubator. Dieser ist temperierbar und erlaubt es somit Messungen bei definierten Temperaturen durchzuführen.

Als kohärente Lichtquelle wird ein diodengepumpter Festkörperlaser (IMM Messtechnologie, Deutschland) mit einer emittierten Wellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 30 mW im Dauerstrichbetrieb benutzt. Zur Justierung des Laserstrahls und zur Strahlreinigung dienen drei Irisblenden und ein Strahlaufweiter (Thorlabs, USA). Danach wird der Strahl durch ein 20x Objektiv (NA = 0,4; Euromex Microscopes, Niederlande) auf eine Lochblende mit einem Durchmesser von 500 nm (National Apertures Inc., USA) fokussiert. Dies führt durch die Bündelung des Strahls dazu, dass Intensitätsverluste an der Lochblende minimiert werden.

Als Detektor dient eine pco.1200hs CMOS-Kamera (pco. imaging, Deutschland; 1280 x 1024 Pixel, 12,3 x 15,4 mm² Detektorfläche, 10 bit Dynamik, max. Bildwiederholfrequenz 636 Hz). Optische Bauteile vor dem Detektorchip wurden für die Anwendung in der Holographie vom Hersteller entfernt. Vor dem Chip wurde ein Infrarot-Kantenfilter mit einer Dicke von 5 mm installiert, um zu verhindern, dass Abwärme vom Chip die Probe erwärmt und zu Konvektionen in der Probenkammer führen würde. Die Kamera ist auf Mikrometer Verstelltischen platziert um sie für die Messung in eine optimale Position zu bringen und den Lochblende-Kamera Abstand zu variieren.

Die Probenkammern wurden zur Messung in einen Probenarm aus Aluminium eingespannt, der über einen XYZ-Verstelltisch bewegt werden kann.

Für die Experimente mit *Ulva linza* Sporen und für die Feldexperimente wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Aufbau des holographischen Mikroskops konstruiert. Als Grundlage dafür dienten andere Aufbauten, die zuvor in unserer Gruppe verwendet wurden [133, 166, 167]. Da die Experimente mit *Ulva linza* an der University of Birmingham und die Feld-Experimente an einem Teststandort in Florida durchgeführt wurden, musste das holographische Mikroskop für jede Messzeit dorthin transportiert werden. Daher wurde auf eine kompakte und zugleich stabile Bauweise geachtet. Alle Komponenten bis auf Laser und

Detektor wurden daher in ein 30 mm Cage-System (Thorlabs, USA) eingebaut, welches sich in einer aus ca. 5 mm dicken Holzplatten gefertigten Box befindet. Dadurch ist der gesamte optische Aufbau im Dunkeln. Dies minimiert eine Beeinflussung durch äußere Lichtquellen wie beispielsweise Tageslicht und verbessert die Qualität der Messungen. Zusätzlich wurde während der Messungen ein Laservorhang über den gesamten Aufbau platziert um Einstrahlungen durch Öffnungen und Spalte bestmöglich zu reduzieren. Der in diesem Aufbau verwendete Laser ist ein diodengepumpter Festkörperlaser (IMM, Messtechnologie, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 100 mW im Dauerstrichbetrieb. Alle anderen optischen Bauteile und der Detektor, entsprechen den zuvor für den *P. aeruginosa* Aufbau beschriebenen Komponenten.

3.2 Experimente mit *P. aeruginosa*

3.2.1 Zellkultur von *P. aeruginosa*

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. aeruginosa* Isolate wurden von der Gruppe von Prof. Ursula Obst (Institut für funktionelle Grenzflächen, Mikrobiologie an nat. und techn. Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie) zur Verfügung gestellt und kultiviert.

Zur Untersuchung der Schwimmaktivität von *P. aeruginosa* in Motilitäts-Assays auf semisoliden Schwimmgagar-Platten wurden 8 verschiedene Isolate ausgewählt. Diese sind zusammen mit ihrer Abstammung in Tabelle 3.1 aufgeführt. Für die holographischen Experimente wurde nur der Stamm PA154 untersucht.

Zur Kultivierung der einzelnen Isolate wurden aus den gefrorenen Stammkulturen Einzelkolonien durch fraktionierten Verdünnungsausstrich auf Ceftrimid-Agar (Merck, Deutschland) in Petrischalen angelegt. Diese wurden für 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für das Motilitäts-Assay zur Bestimmung der Schwimmaktivität der verschiedenen Isolate und für die Tracking-Experimente mit dem holographischen Mikroskop wurden flüssige Übernachtskulturen verwendet. Dafür wurden am Vortag der Experimente ca. 30 ml Luria-Bertani Medium (LB-Medium; Merck, Deutschland) mit einer Einzelkolonie inokuliert und auf einem Schüttelinkubator (Unimax 2010, Heidolph) bei 37°C und 140 Upm für ca. 18 h inkubiert.

Tabelle 3.1: Verschiedene Isolate von *P. aeruginosa*, die zur Untersuchung der Schwimmaktivität auf semisoliden Agar-Platten verwendet wurden. In den holographischen Experimenten wurde nur das Isolat PA154 untersucht.

<i>P. aeruginosa</i>-Isolat	Isolationsort	Herkunft
PA34	Klinikabwasser	Mainz
PA253	Klinikabwasser	Mainz
PA154	Klinikabwasser	Mainz
VR143/97	Mensch	Verona
SG81	Biofilm in technischem Wassersystem (Fleischzerlegebetrieb)	Universität Duisburg
SG81R1	Spontane Mutation von SG81	Universität Duisburg
ATCC27853	Blutkultur	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
PAO1	Mensch (infizierte Wunde)	DSMZ

Motilitäts-Assay auf semisoliden Schwimmagar-Platten

Die semisoliden Agar-Platten wurden gemäß dem Protokoll von Tremblay et al. hergestellt [50]. Dazu wurde M9-Lösung mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Salzen in aqua dest. angefertigt. Daneben wurden Zusatzlösungen gemäß Tabelle 3.3 hergestellt, die zusammen mit der M9-Lösung zu 0,3%-igem BactoTM Agar (BM, Becton) pipettiert wurden. Für die 0,3%-ige BactoTM Agar Lösung wurden zuvor 0,75 g BactoTM Agar in 70 ml aqua dest. gelöst. Die einzelnen Mengenangaben der M9-Lösung und der Zusätze, die zur Herstellung des finalen Schwimmagars zur BactoTM Agar Lösung hinzugefügt wurden, sind in Tabelle 3.4 angegeben.

Jeweils 13 ml der Schwimmagar-Lösung wurden daraufhin in Petrischalen gefüllt und unter der Sterilbank getrocknet. Die semisoliden Schwimmagar-Platten wurden gleich am Tag der Herstellung für die Versuche verwendet.

Tabelle 3.2: Salze zur Herstellung von 250 ml M9-Lösung nach Tremblay et al. [50]. Die angegebenen Salzmengen wurden unter Rühren zusammen in 250 ml aqua dest. gelöst.

Salz	Einwaage [g]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10,75
KH_2PO_4	3,75
NaCl	0,63
NH_4Cl	1,25

Tabelle 3.3: Zusatzlösungen zur Herstellung semisolider Agar-Platten. Die eingewogenen Zusätze wurden einzeln bis zum angegebenen Endvolumen mit aqua dest. aufgefüllt.

Zusatz	Einwaage [g]	Endvolumen [L]
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,00	0,25
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,18	0,25
Glucose-Monohydrat (0,2%)	3,30	0,15

Tabelle 3.4: Mengenangaben der zu 70 ml Bacto™ Agar pipettierten Lösungen zur Herstellung von 125 ml semisolidem Schwimagar.

Lösung	Hinzugefügte Menge [ml]
M9-Lösung	25
Glucose-Lösung	25
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,5

Für das Motilitäts-Assay wurden die flüssigen Übernachtskulturen der verschiedenen Isolate in frischem LB-Medium zu einer 10%-igen (v/v) Vorkultur verdünnt und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. 10 µl dieser Vorkultur (Konzentration photometrisch bestimmt mit $OD_{590} = 0,3$) wurden dann in die Mitte der semisoliden Schwimmgagar-Platten inokuliert und anschließend bei 37°C im Brutschrank für 48 h inkubiert.

Für die holographischen Tracking-Experimente wurde die flüssige Übernachtskultur des Stammes PA154 mit frischem LB-Medium verdünnt ($OD_{590} = 0,04$) und für 2 h bei 37°C inkubiert. Diese Bakteriensuspension ($OD_{590} = 0,2$) wurde direkt vor der Messung im holographischen Mikroskop nochmals mit frischem LB-Medium auf eine $OD_{590} = 0,04$ verdünnt.

3.2.2 Durchführung der holographischen Messungen mit *P. aeruginosa*

Um die etwa 2 µm großen Bakterien mit ausreichender Auflösung, Vergrößerung und starkem Kontrast aufzunehmen wurde die experimentelle Geometrie des holographischen Aufbaus angepasst. Für die Messungen mit *P. aeruginosa* wurde ein Lochblenden-Probe Abstand zwischen 900-1700 µm und ein Lochblenden-Kamera Abstand von 22 mm gewählt. Dadurch ergab sich eine numerische Apertur von $NA = 0,28$ und damit eine laterale Auflösung von $\delta_{lat} = 0,95$ µm (vgl. Kapitel 2.6.1), die ausreichte um Beugungsmuster der kleinen Bakterien zu erhalten. Das Bildfeld (FoV, engl. für Field of view), das ebenfalls durch die Abstände zwischen Lochblende und Probe und Lochblende und Detektor gegeben ist, besitzt durch die Divergenz der Wellenfront hinter der Lochblende und den rechteckigen Detektor-Chip die Form eines geraden quadratischen Pyramidenstumpfes. Dieses hat an der Apexfläche zur Lochblende hin orientiert die Maße 0,48 mm x 0,48 mm und an der Basisfläche zum Detektor orientiert die Maße 0,83 mm x 0,83 mm.

Als Probenkammern für die Experimente mit *P. aeruginosa* wurden kommerziell erhältliche biokompatible Flusskanäle des Typs Standard µSlide I-Luer 0,8 der Firma ibidi (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) verwendet. Zum Material der Kanäle macht der Hersteller keine genauen Angaben, nur dass es auf Polyethylen basiert. Der Kanal besitzt eine Länge von 50 mm, eine Breite von 5 mm und eine Höhe von 800 µm was ein nominales Volumen von 200 µl ergibt. Die Größe des Kanals erlaubt somit die Bakterien in der Suspension in einem großen Volumen zu beobachten und frei schwimmende Bakterien unabhängig von

Wandeffekten zu tracken. Abbildung 3.2A zeigt einen ibidi Slide, der zur Veranschaulichung des eigentlichen Kanals mit blauer Tinte befüllt wurde. Die Öffnungen des Kanals wurden mit roten Gummistopfen und Parafilm® abgedichtet.

Für die holographischen Messungen wurden 200 μl der vorbereiteten *P. aeruginosa* Suspension (siehe 3.2.1) mit Hilfe einer Mikropipette in den ibidi Kanal eingefüllt und die Öffnungen mit Stopfen und Parafilm verschlossen (siehe Abbildung 3.2B). Der ibidi Slide wurde daraufhin umgehend in den Probenhalter des holographischen Mikroskops zwischen Lochblende und Kamera eingespannt und die Messung wurde gestartet. Typischerweise wurden holographische Bildserien bzw. Videos bestehend aus 3000 aufeinanderfolgenden Hologrammen aufgenommen. Dies entspricht mit der gewählten Bildwiederholungsfrequenz von 5 Hz (engl. für frames per second) einer Messdauer von 10 min.

Alle Messungen mit *P. aeruginosa* fanden unter Raumtemperatur (22°C) in einem abgedunkelten, klimatisierten S2 Labor in der Gruppe von Prof. Ursula Obst am Institut für funktionelle Grenzflächen (KIT) statt.

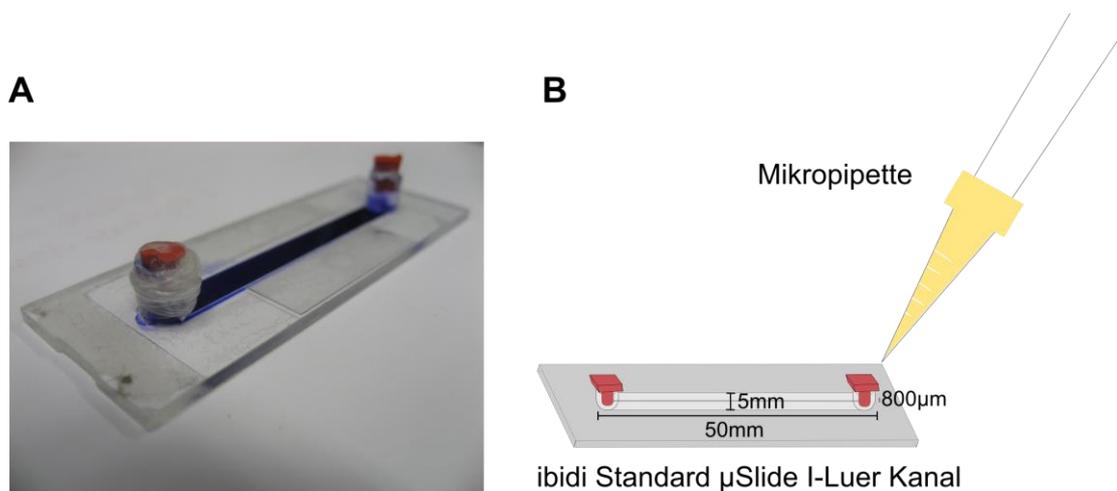


Abbildung 3.2: A) Photographie eines ibidi Standard μSlide I-Luer Kanals, der mit blauer Tinte befüllt wurde. Die Öffnungen des Kanals sind mit roten Gummistopfen und Parafilm® verschlossen. B) Schematische Darstellung des ibidi Standard μSlide I-Luer Kanals mit den Abmessungen $L = 50 \text{ mm}$, $B = 5 \text{ mm}$ und $H = 800 \mu\text{m}$, der für die holographischen Messungen mit Hilfe einer Mikropipette mit 200 μl Bakteriensuspension befüllt wurde.

3.3 Experimente mit *Ulva Linza* Zoosporen

Die Experimente mit *Ulva linza* Zoosporen wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. James Callow an der School of Bioscience der University of Birmingham durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zum Besiedlungs- und Schwimmverhalten der *Ulva* Sporen in Anwesenheit positiv geladener Oligopeptid SAMs wurden im Juli 2012 im Labor der Arbeitsgruppe Callow in Birmingham aufgenommen. Das holographische Mikroskop wurde zu diesem Zweck nach Birmingham verschickt, weshalb im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein leichter, transportabler und dennoch stabiler Aufbau des Mikroskops entwickelt wurde (siehe Abschnitt 3.1).

3.3.1 Freisetzung von *Ulva Linza* Zoosporen

Die Sporen der *Ulva linza* können nicht kultiviert werden, daher wurden vor jeder Messzeit adulte Pflanzen der Grünalge an der Küste von Llantwit Major, South Wales, U.K. (51°40'N; 3°48'W) geerntet. Die natürliche Freisetzung einer riesigen Anzahl an Sporen aus den *Ulva* Pflanzen geschieht in Abhängigkeit des Mondzyklus bei Vollmond und bei Neumond, weshalb die Ernte der Pflanzen ca. 2-3 Tage zuvor stattfand, um eine ausreichende Menge an Sporen zu erhalten. Das Einsammeln der *Ulva linza* Pflanzen und die Freisetzung der Sporen unter Laborbedingungen erfolgen nach einem bewährten Protokoll [25] und sind in Abbildung 3.3 in Bildern dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte in Anlehnung an Abbildung 3.3 detailliert erläutert:

(A) Die adulten Pflanzen wurden Büschelweise bei Ebbe 2-3 Tage vor Vollmond im Brackwasserbereich an der Küste geerntet. Dabei ist zu beachten, dass hauptsächlich Pflanzen mit dunkelgrünen oder cremeweißen Spitzen geerntet werden (Sporophyten). Bei Pflanzen mit orange-bräunlichen Spitzen handelt es sich um Gametophyten, die haploide Gameten freisetzen.

(B) Direkt vor Ort wurden die Pflanzen durch Auswringen von überschüssigem Wasser befreit, in trockene Zellstofftücher eingerollt, um sie vorm Austrocknen zu bewahren, und in Plastikbeuteln in gekühlten Boxen verstaut. Im Labor angekommen, wurden sie direkt in den Kühlschrank verlagert.

(C)-(E) Zur Freisetzung der Sporen wurden die Büschel (C) in die einzelnen Pflanzen getrennt (D). Diese können verschiedene Formen aufweisen. Die Sporen befinden sich

in den Spitzen der Pflanzen. Das andere Ende der Pflanze, nämlich der Verankerungsteil mit dem sie mit einem festen Substrat verbunden waren, ist sehr dünn und läuft am Ende Spitz zu. Die eigentliche Spitze mit den enthaltenen Sporen befindet sich am breiteren Ende der Pflanze. Pflanzen mit gelblich-bräunlichen Spitzen müssen aussortiert werden, da es sich dabei um Gametophyten handelt (vgl. (D3-4)). Weiße Stellen an den Spitzen der Sporophyt Pflanzen sind auf bereits freigesetzte Sporen zurückzuführen. Da nur die Spitzen benötigt wurden, wurden diese von der übrigen Pflanze abgeschnitten (E).

(F) Die Spitzen wurden in ein Becherglas mit ausreichend (ca. 5-10 ml) künstlichem Meerwasser (ASW, Tropic Marine®, doppelt mit 20 µm gefiltert) gebracht und hell am Fenster platziert.

(G) Nach wenigen Minuten wurden die Sporen aus den Spitzen frei gesetzt. Leichte Bewegungen des Becherglases und die dadurch verbundene Wellenbewegung des Wassers begünstigten die Freisetzung.

(H) Das grün verfärbte ASW mit den Sporen wurde durch übereinandergelegte 20 µm, 50 µm und 100 µm Nylon Netzfilter in ein frisches Becherglas gefiltert. Dadurch wurden Sand und Kieselalgen in den Filtern zurückbehalten.

(I) Zur Aufreinigung der Sporensuspension wurde das Becherglas in einem Behälter mit crushed Eis platziert. Das Eis verhindert, dass sich die Sporen an der Oberfläche des Becherglases anlagern.

(J) Da gesunde Sporen negativ phototaktisch sind, schwammen diese zum Becherboden und konzentrierten sich dort, während freigesetzte Gameten zum Licht hin schwammen.

(K) Die Sporenwolken am Becherboden konnten leicht mit einer Pipette aufgesaugt und in ein Becherglas auf Eis mit frischem ASW gebracht werde. Dieser Vorgang des Aufreinigens der Sporen [I-K] wurde zweimal wiederholt.

(L) Zum Schluss wurde die konzentrierte Sporensuspension in ein frisches Becherglas mit ASW pipettiert und ständig auf dem Magnetrührer gerührt, um die Anlagerung der Sporen zu verhindern. Die für die Experimente gewünschte Sporenkonzentration wurde photometrisch bei einer Absorption bei 660 nm eingestellt.

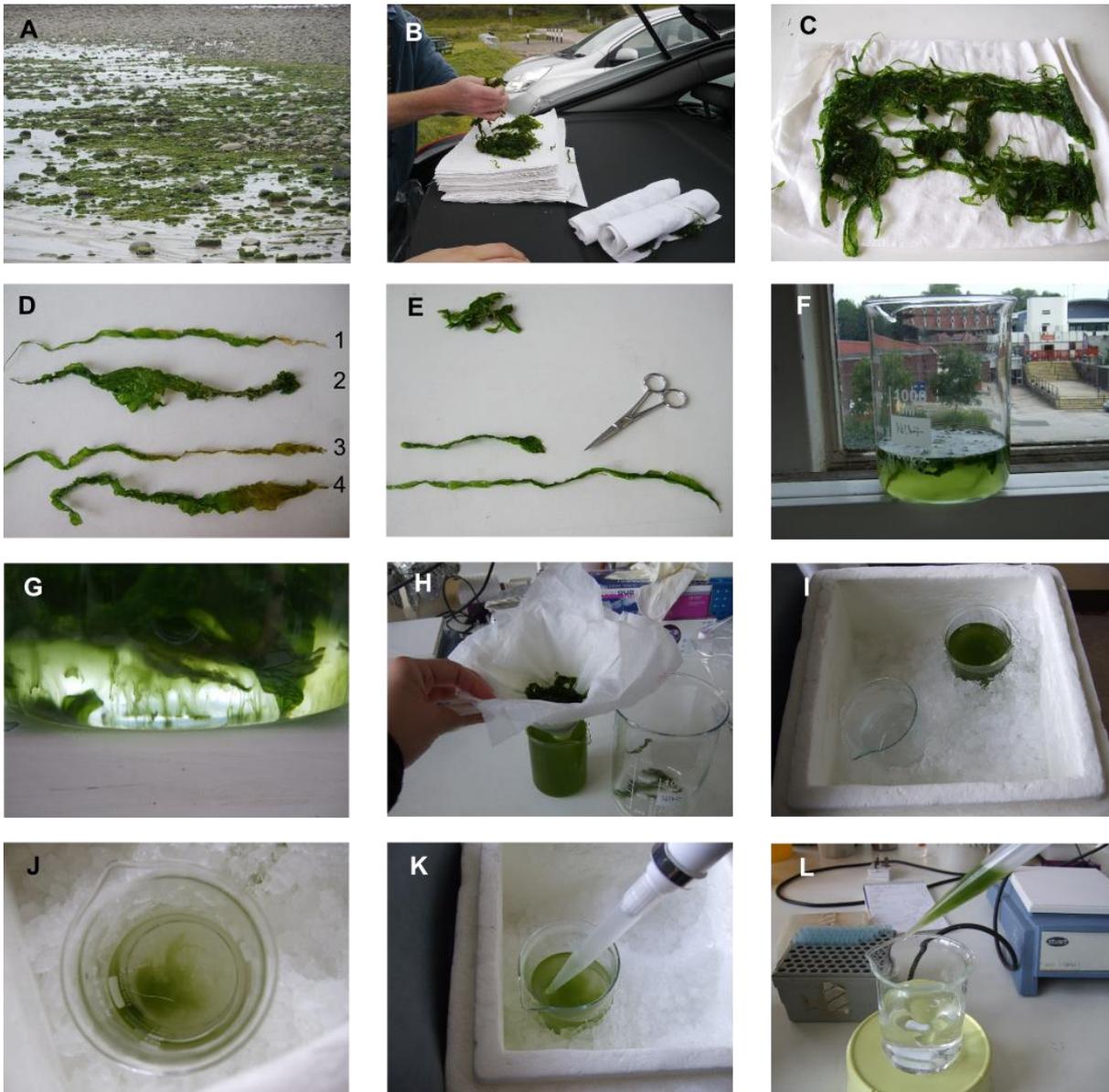


Abbildung 3.3: Bildliche Darstellung der *Ulva linza* Ernte und Sporen Freisetzung unter Laborbedingungen an der University of Birmingham.

3.3.2 Untersuchte Oberflächen

3.3.2.1 Oligopeptid SAMs

Die untersuchten Oligopeptid Oberflächen wurden von der Gruppe von Dr. Thomas Ederth (Molecular Physics, Linköping University, Schweden) präpariert und zur Verfügung gestellt. Das untersuchte positiv geladene Oligopeptid ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Es besteht aus einem Cystein (Cys), durch das das Peptid über die Thiol Gruppe an ein Goldsubstrat

angelagert werden kann, zwei Glycin (Gly) Einheiten, die als Abstandhalter fungieren und abwechselnd angeordneten Arginin (Arg) und Tyrosin (Tyr) Einheiten. Die Beschreibung der Synthese des Peptids befindet sich in Ederth et al. [32, 33]. Für die vorliegende Arbeit wurden SAMs mit unterschiedlichem ArgTyr Oberflächenanteil präpariert. Dafür wurden Lösungen mit verschiedenen Mischverhältnissen des ArgTyr Peptids aus Abbildung 3.4 und eines reinen Gly Peptids mit drei Gly Einheiten (vgl. Abbildung 3.4 rot eingerahmter Bereich) angesetzt. Die Mischungsverhältnisse sind wie folgt:

Tabelle 3.5: Nachfolgend verwendete Bezeichnungen und Mischungsverhältnisse der in dieser Arbeit untersuchten Oligopeptid SAMs

Bezeichnung	Mischungsverhältnis
100% ArgTyr	100% ArgTyr / 0% Gly
50% ArgTyr	50% ArgTyr / 50% Gly
0% ArgTyr	0% ArgTyr / 100% Gly

Der reine Gly SAM (0% ArgTyr) fungierte als „Dummy“ Peptid und wurde als Kontrolloberfläche in der Untersuchung mitgeführt. Als Substrat für die SAMs wurden Nexterion® Glas B Objektträger (Schott, Deutschland) mit 10 Å Titan und 100 Å Gold beschichtet (Präparation siehe [33]). Diese Goldschicht war etwas dünner als die in vorherigen Studien normalerweise verwendete Goldschicht (200 Å), da die Oberflächen für die Untersuchung im holographischen Mikroskop so durchsichtig wie möglich sein mussten. Die so beschichteten Objektträger wurden für 24 h in einer 0,4 mM wässrigen Peptidlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die SAMs abgespült, getrocknet und unter Stickstoff verpackt. Zur Charakterisierung der SAMs auf der dünneren Goldbeschichtung wurden Ellipsometrie und IRAS (Infrared reflection absorption spectroscopy) Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse den erwarteten Messwerten entsprachen [32, 33].

Für die Messungen im holographischen Mikroskop wurden Kanäle des Typs sticky-Slide I-Luer 0,8 der Firma ibidi (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) mit den oben beschriebenen Peptid SAMs beschichtet. Dieser Slide besitzt keinen geschlossenen Kanal, sondern kann selbstklebend auf einem Substrat, wie dem hier verwendeten mit Peptid beschichteten Nexterion® Objektträger, befestigt werden, um dann mit dem Substrat zusammen einen geschlossenen Kanal zu bilden. Die Abmessungen des Kanals entsprechen denen des

Standard μ Slides der Firma ibidi. Für die Präparation der Peptid SAMs in dem ibidi Kanal wurde dieser zunächst mit 25 Å Titan und 200 Å Gold bedampft. Diese Goldschicht wurde dicker gewählt da durch die Geometrie des Bedampfungsaufbaus mit festem Bedampfungswinkel Schatteneffekte auftraten, wodurch die Goldschicht an den Rändern des Kanals dünner wurde. Für die Peptidbeschichtung der Kanäle wurden die verschiedenen Peptidlösungen in die einzelnen Kanäle eingefüllt und analog zu den Goldobjektträgern für 24 h inkubiert. Die Kanäle wurden abgespült, getrocknet und für den Versandt unter Stickstoffatmosphäre verpackt.

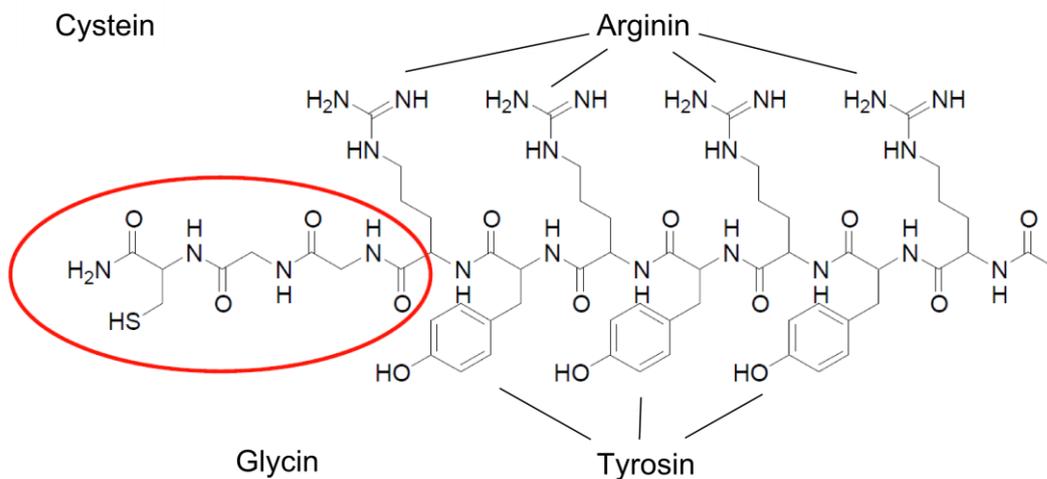


Abbildung 3.4: Chemische Struktur des in dieser Arbeit untersuchten positiv geladenen Oligopeptids mit Arginin und Tyrosin Einheiten. Es besteht aus einem Cystein zur Verankerung mit dem Goldsubstrat, zwei Glycin Einheiten als Abstandhalter und vier bzw. drei abwechselnd angeordneten Arginin und Tyrosin Einheiten. Zur Präparation der gemischten SAMs mit unterschiedlichem Arginin Tyrosin Oberflächenanteil wurde neben dem abgebildeten Peptid das rot eingerahmte Glycin Peptid verwendet. Die 0% ArgTyr Oberfläche besteht zu 100% aus diesem Glycin Peptid und wird als Kontrolloberfläche in der Analyse mitgeführt.

3.3.2.2 FOTS SAMs

Tridecafluorooctyl-triethoxysilane (Degussa, Deutschland) (FOTS) SAMs wurden von M. Arpa Sancet mittels chemischer Gasphasenabscheidung (CVD, engl. für chemical vapor

deposition) nach dem Protokoll von X. Cao auf Nexterion® Glas B Objektträgern angefertigt. Das ausführliche Protokoll ist der Dissertation von X. Cao zu entnehmen [168].

3.3.3 Biologische Standard Besiedlungs-Assays

Die biologischen Besiedlungs-Assays wurden nach den Protokollen von Callow et al. [25] und Finlay et al. [81] durchgeführt. Für das Standard Besiedlungs-Assay wurden die verschiedenen Oligopeptid Oberflächen (3 Replicate pro Peptid SAM) in Quadriperm Schalen (Greiner Bio-one; Ltd.) gelegt und jeweils 10 ml Sporensuspension ($OD_{660} = 0,15$, dies entspricht 10^6 Sporen/ml) hinzugefügt. Die Oberflächen wurden, anstatt einer Standard Assay-Dauer von 45 min, für 30 min mit der Sporensuspension im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Sporensuspension entfernt und die Peptid Oberflächen vorsichtig abgespült, um nur leicht angehaftete Sporen zu entfernen. Die Oberflächen wurden daraufhin in 2,5%-iger (v/v) Glutaraldehyd Lösung fixiert, danach gewaschen und an der Luft getrocknet. Um die Ergebnisse des Besiedlungs-Assays besser mit den Resultaten der holographischen Messungen vergleichen zu können wurde zusätzlich zu dem Standard Besiedlungs-Assay mit der Standard Sporenkonzentration (10^6 Sporen/ml) ein Assay mit einer verringerten Sporenkonzentration ($OD_{660} = 0,03$ bzw. 2×10^5 Sporen/ml) durchgeführt. Bis auf die geringere Sporenkonzentration wurden die Proben analog zu dem Standard Assay behandelt. Die Auswertung der Besiedlungs-Assay Proben erfolgte am Karlsruher Institut für Technologie. Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Proben mit einem Nikon Eclipse 90i im Transmissionsmodus gemacht. Dabei wurden auf jedem der drei Replikate pro Probe 10 verschiedene Bilder in unterschiedlichen Bereichen der Probe mit einem 40x Objektiv aufgenommen. Die Anzahl der gesiedelten Sporen in den Aufnahmen wurde manuell gezählt, wobei zwischen normal gesiedelten und „pseudo“-gesiedelten Sporen unterschieden wurde. Die angegebenen Werte ergeben sich aus der Mittelwertbildung der Anzahl in den einzelnen Bildfeldern ($n = 30$) und der Fehler resultiert aus dem Standardfehler der Mittelwertbildung.

3.3.4 Durchführung der holographischen Messungen mit *Ulva Linza* Sporen

Kurz vor jeder Messung mit *Ulva linza* Sporen wurde der verwendete Probenkanal mit den mit Peptid beschichteten Oberflächen vorbereitet. Dafür wurden die mit 10 nm Gold und Peptid beschichteten Nexterion® Objektträger (siehe Abschnitt 3.3.2.1) und die mit 25 nm

Gold und Peptid beschichteten sticky-Slide I-Luer 0,8 Kanäle der Firma ibidi zunächst mit Stickstoff abgeblasen, um kleine Partikel und abgelagerten Staub zu entfernen. Die Kanäle wurden dann auf die jeweils gleich beschichteten Peptid Oberflächen geklebt, sodass ein 800 μm hoher Kanal mit beidseitig beschichteten Seiten entstand. Über Luer-Konnektoren (ibidi, Deutschland) wurden ca. 25 cm lange Silikonschläuche an beiden Enden des Kanals befestigt (vgl. Abbildung 3.5), die wiederum am anderen Ende mit 3-Wegehähnen (Neolabs, Germany) versehen wurden. Dadurch konnte der Kanal im eingebauten Zustand befüllt werden.

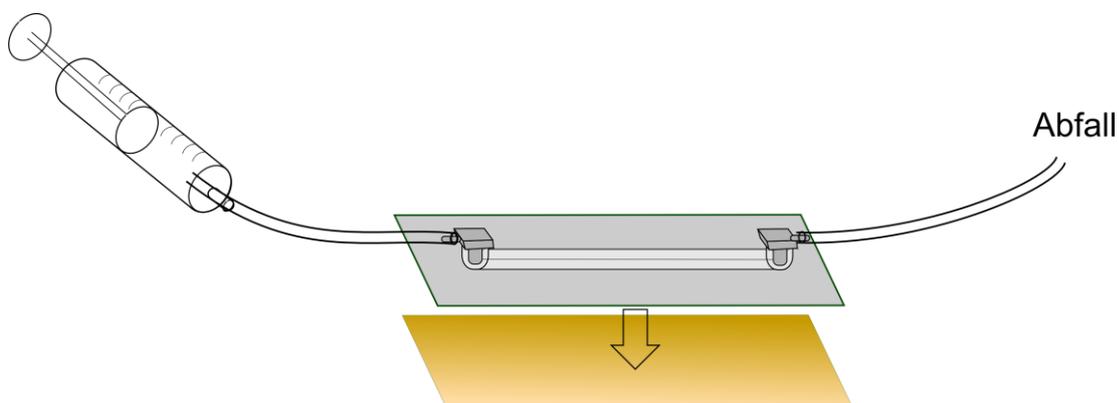


Abbildung 3.5: Schematische Abbildung des mit Peptid beschichteten sticky-Slide I-Luer 0,8 der Firma ibidi, der auf den mit dem gleichen Peptid beschichteten Goldobjektträger geklebt wurde, um einen Kanal mit einer Höhe von 800 μm zu bilden. Die Sporensuspension wurde über Silikonschläuche, die über Konnektoren mit dem Kanal verbunden waren, mittels Spritze in den Kanal gefüllt.

Die Messungen in dem holographischen Mikroskop wurden in einem Tageslichtlabor bei Raumtemperatur (22-23°C) durchgeführt. Durch die 35 nm dicke Goldschicht des Probenkanals folgte während der Messungen im holographischen Mikroskop eine Abschwächung der Laserintensität nach Durchgang durch die Probenkammer. Daher wurde für die Messungen mit den Oligopeptid Oberflächen ein diodengepumpter Festkörperlaser mit einer höheren Leistung von 100 mW verwendet. Dies gewährleistete, dass genügend Intensität für die Aufnahme der Hologramme am Detektor ankam.

Der Abstand zwischen der Lochblende und der Kamera wurde in dem Aufbau auf ca. 20 mm eingestellt, woraus eine numerische Apertur von $NA = 0,3$ und damit eine laterale Auflösung von $\delta_{\text{lat}} = 0,85 \mu\text{m}$ und eine Tiefenauflösung von $\delta_{\text{tief}} = 2,7 \mu\text{m}$ resultierte. Die Ausmaße des konischen Bildfeldes bei diesem Abstand und einem Lochblenden-Probe Abstand zwischen

1500-1900 μm betragen 0,34 mm^2 in der Ebene zur Lochblende hin orientiert und 0,97 mm^2 in der Ebene zum Detektor hin orientiert.

Vor Beginn der Messung wurde der vorbereitete Probenkanal in die Probenhalterung des holographischen Mikroskops eingebaut und in die richtige Position gebracht. Im Live-Bildmodus der Kamera wurde dabei ein geeigneter Bildbereich in der Mitte des Probenkanals ausgewählt. Damit die Sporen unmittelbar nach ihrer Injektion in den Probenkanal verfolgt werden konnten, wurde die Messung bereits mit dem leeren Probenkanal gestartet. Direkt nach dem Start wurden ca. 2 ml der Sporensuspension ($\text{OD}_{660} = 0,03$; Konzentration: 2×10^5 Sporen/ml) mit einer Spritze über die Silikonschläuche in den Kanal gefüllt. Die 3-Wegehähne an den Enden der Schläuche wurden daraufhin direkt verschlossen, um Konvektionen innerhalb des Probenkanals zu vermeiden. Es wurden für jede Probe Hologrammserien mit einer Gesamtdauer von 11 min mit typischerweise 10.000 Hologrammen und einer Bildwiederholungsfrequenz von 15 Hz aufgenommen.

3.4 In situ Holographie im Feldexperiment

Die Feldexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Geoffrey Swain (Florida Institute of Technology; Florida USA) an einem Teststandort des FIT in der Indian River Lagoon an der Ostküste Floridas in der Nähe von Sebastian ($27^\circ 53' 59''\text{N}$, $80^\circ 28' 28''\text{W}$) durchgeführt (siehe Abbildung 3.6A). An diesem Teststandort befand sich ein Wassertank, durch den ständig frisches Meerwasser aus der Indian River Lagoon durchgepumpt wurde. Zuvor wurde das Meerwasser jedoch in ein vorgeschaltetes Wasserbecken geleitet, in dem sich Sedimente wie Sand zunächst absetzen konnten. Das für die Experimente verwendete Meerwasser wurde direkt aus dem Wassertank bezogen. Um die Experimente in unmittelbarer Nähe der Probenquelle durchzuführen wurde ein Van als „mobiles“ Labor angemietet, in dem das transportable holographische Mikroskop aufgebaut und justiert wurde (siehe Abbildung 3.6B). Dieses Labor wurde direkt neben dem Wassertank platziert.

In dem Zeitraum vom 22.11.2010 bis 5.12.2010 wurden an 12 Tagen insgesamt 64 Messungen mit einer Messdauer von 10 min durchgeführt. Dies entspricht einer Datenmenge von 576.000 Hologrammen oder einem Datenvolumen von ca. 1,1 Terabyte. Die Abtastrate wurde analog zu den Experimenten mit *Ulva linza* Zoosporen zu 15 Hz gewählt. Die Aufbaugeometrie, d.h. die Abstände zwischen Probe, Lochblende und Kamera, entsprach ebenfalls der Messanordnung für die Experimente mit den *Ulva* Sporen (vgl. Abschnitt 3.3.4). Als Oberflächen wurden Nexterion® GlasB, FOTS-SAMs (vgl. 3.3.2.2) und Ethylene glykol

(EG) SAMs (EG_x, HS-(CH₂)₁₁-(OC₂H₄)_xOH, x=1, 3 und 6) (Prochimia Surfaces Sp z.o.o., Polen) vermessen. Um die Unversehrtheit der Proben zu gewährleisten, wurden die SAMs direkt vor Ort am FIT präpariert. Für das Präparationsprotokoll siehe [169, 170]. Zusätzlich fanden Messungen in Standard μ Slides I-Luer 0,8 der Firma ibidi statt.

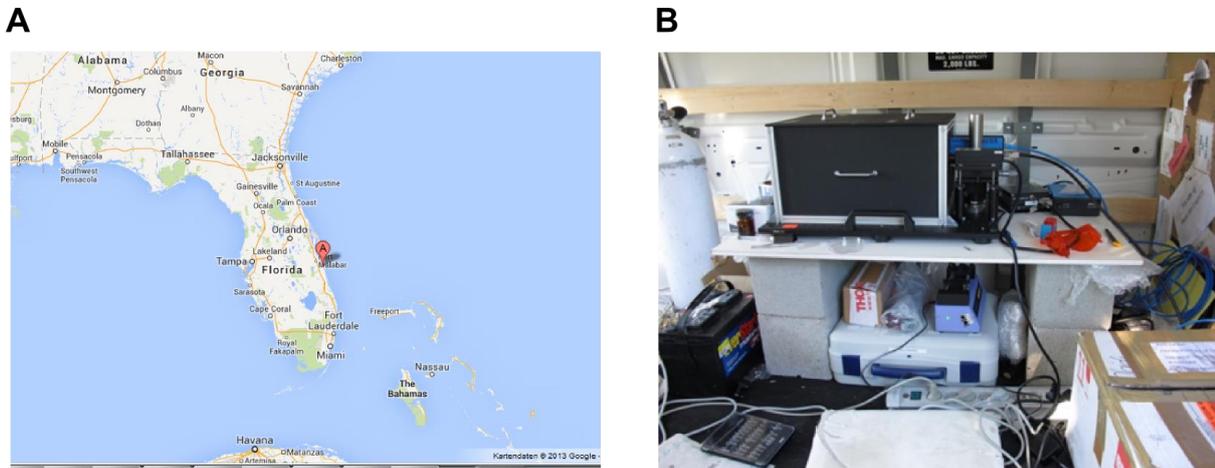


Abbildung 3.6: A) Lage des Teststandortes des Florida Institute of Technolgy an der Indian River Lagoon nahe Melbourne, Florida [171]. B) Aufbau des holographischen Mikroskops im „mobilen“ Labor direkt am Teststandort.

Die Durchführung der Messungen sah wie folgt aus. Zunächst wurden die Probenkammern vorbereitet. Zur Untersuchung der SAMs wurden dafür sticky-Slides I-Luer 0,8 auf die zu untersuchenden Oberflächen geklebt und, wie in 3.3.4 beschrieben, mit Silikonschläuchen versehen. Das gleiche wurde auch mit den Standard ibidi Kanälen durchgeführt. Die Probenkammern wurden dann in das holographische Mikroskop montiert. Das Meerwasser wurde mit Hilfe einer Schüssel sowohl aus tieferen Schichten (ca. 50 cm von der Wasseroberfläche) als auch von oberflächlichen Schichten des Wassertanks entnommen. Dieses wurde zunächst mit Bagpage® Filtern (Interscience, Frankreich) mit einer Porengröße von 100 μ m vorgefiltert. Danach wurde das vorgefilterte Wasser mit einem 30 μ m Nylon Netzfilter (NY30, Millipore, Darmstadt, Deutschland), eingelegt in einen Spritzen-Filteraufsatz (Schleicher und Schüll; Dassel, Deutschland), erneut gefiltert. 2 ml dieses gefilterten Meerwassers wurden, wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, mit einer Spritze über die Silikonschläuche in die Probenkammern eingefüllt. Vor der Injektion des Wassers in die Probenkammern wurden die Messungen gestartet.

3.5 3-dimensionales Tracking und Datenanalyse

3.5.1 Rekonstruktion der Hologramme

Bevor die Koordinaten der schwimmenden Mikroorganismen zur Trajektorienbestimmung extrahiert werden konnten, mussten zur Rückgewinnung der Realrauminformation die aufgenommenen Hologramme zunächst rekonstruiert werden. Dies erfolgte mit einer in Matlab (The Mathworks, R2007b) erstellten Software, die auf dem Rekonstruktionsalgorithmus von Kreuzer basiert [31, 163, 172]. Da durch die Verwendung von Fouriertransformationen nur quadratische Bilder verarbeitet werden können, mussten die Hologramme vor der Rekonstruktion vorbereitet werden [31]. Die von der pco.1200hs Kamera erzeugten 16 bit Tiff- Dateien mit einer Bildgröße von 1280 x 1024 Pixeln wurden daher auf 1024 x 1024 Pixel zugeschnitten. Um neben den Raumkoordinaten auch zeitliche Informationen für das Tracking zu erhalten, beinhalten die aufgenommenen Hologramme einen Zeitstempel, der graustufencodiert in den ersten 14 Pixeln des Bildes gespeichert ist. Dieser wurde ebenfalls bei der Hologramm Vorbereitung ausgelesen. Um nur die zu untersuchenden Organismen ohne störende Hintergrundbeleuchtung zu rekonstruieren und während der Aufnahme auftretende Ausleuchtungsschwankungen zu kompensieren, wurde durch Abzug eines Quellbildes ein sogenanntes Differenzhologramm erzeugt. Dafür wurden Hologramme aus dem Datensatz in bestimmten Inkrementen (z.B. alle 100 Hologramme) entnommen und aus diesen durch Medianfilterung künstliche Quellbilder erzeugt. Die so erhaltenen Differenzhologramme konnten daraufhin rekonstruiert werden (vgl. Kapitel 2.6.2). Das verwendete Rekonstruktionsprogramm liest dafür einmal eine Textdatei ein, die die Parameter des holographischen Aufbaus, wie Lochblenden-Kameraabstand, Größe des Detektorchips, und Wellenlänge der Lichtquelle enthält. Dabei ist zu beachten, dass das Licht in seinem Strahlengang hinter der Lochblende auf Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes trifft (Luft, ibidi Kanal, wässriges Medium, Glas), was dazu führt, dass sich sowohl die effektive Wellenlänge als auch die Form der Wellenfront ändert [172, 173]. Daher wurde von Dr. Hernan Sendra ein Model zur Brechungsindexkorrektur (RIC, engl. für refractive index correction) mit verschiedenen Korrekturtermen für die Detektorposition und die Detektorfläche eingeführt [166, 172]. Bei der Angabe der Aufbauparameter muss daher diese Korrektur beachtet werden. Zusätzlich wird eine zweite Textdatei mit den Rekonstruktionsparametern, wie Rekonstruktionsebenenabstand, oberste und unterste Rekonstruktionsebene, den Speicherort des Quellbildes und die Anzahl der zu

rekonstruierenden Hologramme eingelesen. Der Rekonstruktionsebenenabstand betrug für die Auswertung der *Ulva linza* Messungen und der Feld Messungen 5 μm , was für die akkurate Bestimmung der Positionen ausreichte. Für die Auswertung der kleineren *P. aeruginosa* wurde der Abstand auf 2 μm verringert. Für eine bessere Handhabung der Daten und eine Reduzierung der Datenmenge wurden aus den einzelnen rekonstruierten Ebenen (typischerweise zwischen 250 und 300 Ebenen) drei Projektionsebenen (Maximalwertprojektionen in XY, XZ und YZ) erzeugt, die die Information aus dem kompletten rekonstruierten Volumen enthalten [167].

Bei der Rekonstruktion der Daten der *Ulva linza* Sporen und den Oligopeptid Oberflächen trat folgendes Problem auf. Durch die Goldbeschichtung der verwendeten Oberflächen im Probenkanal traten Reflexionsartefakte durch den Laser auf, wodurch in der Mitte der rekonstruierten Hologramme ein großer weißer Spot mit hoher Intensität erzeugt wurde. Dieser führte dazu, dass der Kontrast der eigentlichen Objekte, nämlich der Sporen, in den Rekonstruktionen reduziert wurde und diese kaum zu erkennen waren. Daher wurde aus einem rekonstruierten Hologramm eine Maske erzeugt, die die Region mit hoher Intensität während der Rekonstruktion maskierte. Durch Bestimmung des maximalen Intensitätswertes außerhalb dieser Maske und Skalierung der Intensitätswerte innerhalb der Maske auf diesen maximalen Wert konnte der Kontrast der Sporen erheblich verbessert werden.

3.5.2 Bestimmung der Trajektorien

Um die 3D-Positionen der Objekte in dem rekonstruierten Volumen und damit die Trajektorien zu bestimmen wurde ein semiautomatisches Programm mit einem graphischen Interface (Matlab) verwendet, das auf dem von Heydt beschriebenen Prinzip basiert [167].

Als erstes müssen Startpunkte vom Benutzer in der XY-Ebenenprojektion vorgegeben werden, woraufhin das Programm nach korrespondierenden Koordinaten in den XZ- und YZ-Ebenenprojektionen sucht. Als Signalschwerpunkt wird der Punkt maximaler Intensität angenommen. Die Suche nach den Positionen in den darauffolgenden rekonstruierten Hologrammen werden daraufhin anhand von gegebenen Parametern, wie beispielsweise der maximalen Schwimmdistanz in X, Y und Z zwischen zwei aufeinanderfolgenden Hologrammen, solange automatisch bestimmt, bis eine Fehlbestimmung auftritt und das Programm abbricht. Dies passiert wenn bestimmte Kriterien nicht erfüllt werden. Bei diesen Kriterien handelt es sich um Ober-und Untergrenzen der Objektgröße in den Projektionen, Schwellenwerte für die Grauwerte der Objekte oder maximale Abweichungen in der

Bestimmung der Z-Koordinate in der XZ- und YZ-Projektion [166]. Der Fehler muss dann vom Benutzer korrigiert werden. Danach führt das Programm die Bestimmung fort, bis die Trajektorie vervollständigt ist. Danach erhält man für jede Spore eine vierdimensionale Matrix, die die X,Y,Z-Koordinaten zu jedem aufgenommenen Zeitpunkt enthält

3.5.3 Analyse der Trajektorien

Die Analyse der bestimmten Trajektorien erfolgte mit Hilfe eines von Hernan Sendra entwickelten Auswerteprogramms in Matlab, welches Parameter wie Abstandsvektoren, Schwimgeschwindigkeit und Schwimmwinkel berechnet und es gleichzeitig erlaubt die Parameter zu plotten. Dieses Auswerteprogramm basiert auf dem von Matthias Heydt entwickelten Prinzip der Trajektorien Interpretation [167].

Da die Z-Auflösung in der Tiefe durch die relativ kleine numerische Apertur schlechter ist als die laterale Auflösung in der XY-Ebene, wurden die Z-Koordinaten gemäß der Methode von Matthias Heydt vor der Berechnung der Parameter angepasst. Dafür wurden die Z-Koordinaten über eine Spanne von 11 Datenpunkten mittels lokaler Regression über ein Polynom zweiten Grades geglättet (vgl. *rls*-Routine in Matlab). Alle in dieser Arbeit dargestellten Trajektorien und Daten wurden zuvor in der Z-Koordinate geglättet. Für die Glättung der Z-Koordinate in den Trajektorien von *P. aeruginosa* wurde eine größere Spanne von 21 Datenpunkten gewählt, da das Rauschen der Bakteriendaten etwas größer war als bei den Daten mit *Ulva linza*. Zusätzlich wurden diese Trajektorien auch in der X- und Y-Koordinate mit einer Spanne von 11 Datenpunkten geglättet (vgl. Kapitel 4.1.2).

Die Geschwindigkeit kann aus der Länge des dreidimensionalen Abstandsvektors zwischen zwei aufeinanderfolgenden Positionen der Spore, geteilt durch die Zeit zwischen zwei aufgenommenen Einzelhologrammen berechnet werden. In dieser Arbeit wurden die Geschwindigkeiten meist in Geschwindigkeitsverteilungshistogrammen dargestellt, wobei die wahrscheinlichste Geschwindigkeit durch eine Anpassungsfunktion in Form einer Maxwell-Boltzmann Verteilung bestimmt wurde.

Für die Analyse des Schwimmverhaltens wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Winkel berechnet, α_v und α_z . Der Winkel α_v ist als Schwimmwinkel definiert, und wird unter Berücksichtigung möglicher Überabtastung von Datenpunkten anhand von drei aufeinanderfolgenden Abstandsvektoren bestimmt. Beträgt der Wert dieses Winkels 0° so schwimmt der Organismus auf einer geraden Linie. Liegt der Winkel bei 180° so schwimmt der Organismus rückwärts. Der Winkel α_z ist definiert als Winkel zwischen dem

Abstandsvektor zweier Datenpunkte und der Oberflächennormalen. Dieser gibt Auskunft über die Orientierung der Schwimmrichtung hinsichtlich der Oberfläche. Schwimmt der Organismus parallel zur Oberfläche so ergibt sich ein α_z von 90° . Bei Winkeln $>90^\circ$ schwimmt der Organismus zur Oberfläche hin, bei Winkeln $<90^\circ$ von dieser weg.

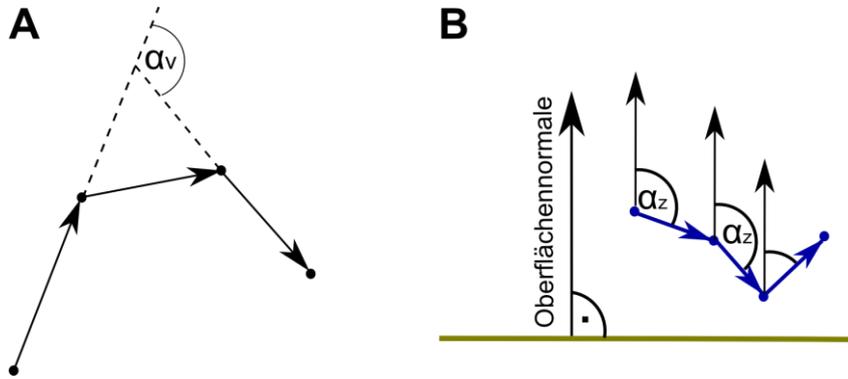


Abbildung 3.7: Schematische Darstellungen zur Definition der Winkel A) α_v und B) α_z .

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin mittels dreidimensionaler Mikroskopie Daten mit hoher räumlicher Auflösung neue Erkenntnisse zum Motilitätsmechanismus von *P. aeruginosa* zu gewinnen und Verhaltensmuster von *Ulva linza* Zoosporen auf oberflächenspezifische Reize zu identifizieren. Außerdem soll anhand von Feldexperiment-Daten die Motilität mariner Mikroschwimmer unter natürlichen Bedingungen untersucht und mit bereits erzielten Ergebnissen aus Laborexperimenten mit *Ulva linza* verglichen werden.

Gegenstand der folgenden Kapitel ist die qualitative Beschreibung des Schwimmverhaltens und die quantitative Analyse der Motilitätsdaten der untersuchten Organsimen basierend auf dreidimensionalen Trajektorien. Die erzielten Ergebnisse sind in den einzelnen Abschnitten aufgezeigt und werden anschließend interpretiert und diskutiert.

4.1 Schwimmverhalten von *Pseudomonas aeruginosa*

In diesem ersten Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das planktonische, Flagellen-vermittelte Schwimmen als Fortbewegungsart von *P. aeruginosa* deskriptiv dargestellt und einzelne Bewegungsmuster charakterisiert. Hydrodynamische Wandeffekte auf die Bewegung in der Nähe von Oberflächen werden aufgrund des ausgedehnten Beobachtungsvolumens und dem damit verbundenen großen Abstand der Bakterien zur Oberfläche ausgeschlossen.

4.1.1 Untersuchung der Schwimmaktivität verschiedener *P. aeruginosa*- Stämme mittels Motilitäts-Assays auf semisoliden Agar-Platten

Neben den häufig untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 und ATCC 27853 [45, 174] existiert eine Vielzahl weiterer Stämme, die unterschiedlichen Isolationsorten entstammen. Zur Ermittlung der Fähigkeit und Aktivität der verschiedenen Stämme, sich mittels Flagellen schwimmend fortzubewegen, wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Carmen Lotz in der Arbeitsgruppe von Prof. Axel Rosenhahn Motilitäts-Assays auf semisoliden Schwimmagar-Platten durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Kapitel kurz zusammengefasst werden [175]. Es wurden 8 Stämme von *P. aeruginosa* ausgewählt: PA34, PA154, PA253,

VR143/97, SG81, SG81R1, ATCC 27853 und PAO1. Dabei handelt es sich, bis auf den Stamm SG81R1, der eine nicht-mucoide Mutante des SG81 darstellt, bei allen anderen Stämmen um Wildtypformen. Die Abstammung der Isolate kann der Tabelle 3.1 in Kapitel 3.2.1 entnommen werden. Die semisoliden Schwimmagar-Platten wurden jeweils punktförmig in der Mitte beimpft (siehe Kapitel 3.2.1). Anschließend wurden sie für 48 Std bei 37°C inkubiert. Motile Stämme breiteten sich, wie in Abbildung 4.1 beispielhaft für die Stämme PA253 und PA154 gezeigt, im Agar aus was durch eine radialsymmetrische Trübung um den Inokulationspunkt augenscheinlich wurde [176]. Der Grad der Ausbreitung wurde dabei als Maß für die Schwimmaktivität der Bakterien herangezogen.

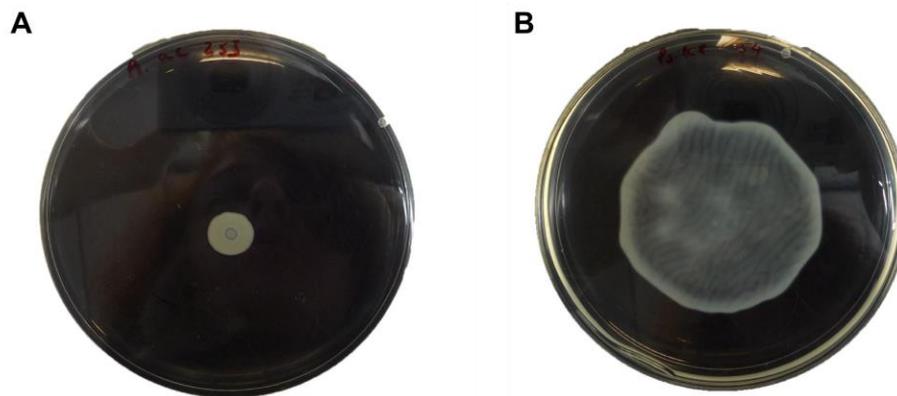


Abbildung 4.1: Digitale Photographien der mit den Stämmen A) PA253 und B) PA154 inokulierten Schwimmagar-Platten. Der Grad der Ausbreitung der Kolonien, gekennzeichnet durch die kreisförmige Trübung um den Inokulationspunkt, ist ein Maß für die Motilität des jeweiligen Bakterienstammes [175].

Zur Quantifizierung der Motilität wurden Photographien der einzelnen Platten mit einer Digitalkamera (DiMAGE A200, Konica Minolta) erstellt. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Image J (W. Rasband, National Institutes of Health, USA) wurde der prozentuale Flächenanteil der Trübung und damit der Ausbreitungsgrad der Bakterien bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Dabei wurde ein relativer Abweichungsfehler von 5% angenommen. Die einzelnen Stämme wurden anhand ihres Ausbreitungsgrades in drei Kategorien klassifiziert. Zur ersten Kategorie, der Kategorie der starken Schwimmer mit einem Ausbreitungsgrad von mehr als 50%, zählen die Stämme PA154 und ATCC 27853. Die Kategorie der moderaten Schwimmer beinhaltet die Stämme PA34, VR143/97, SG81, SG81R1, ATCC 27853 und PAO1, welche

einen Ausbreitungsgrad zwischen 20% und 50% aufweisen. Einzig der Stamm PA253 wird mit einem Ausbreitungsgrad von weniger als 20% in die Kategorie der schwachen Schwimmer eingeordnet.

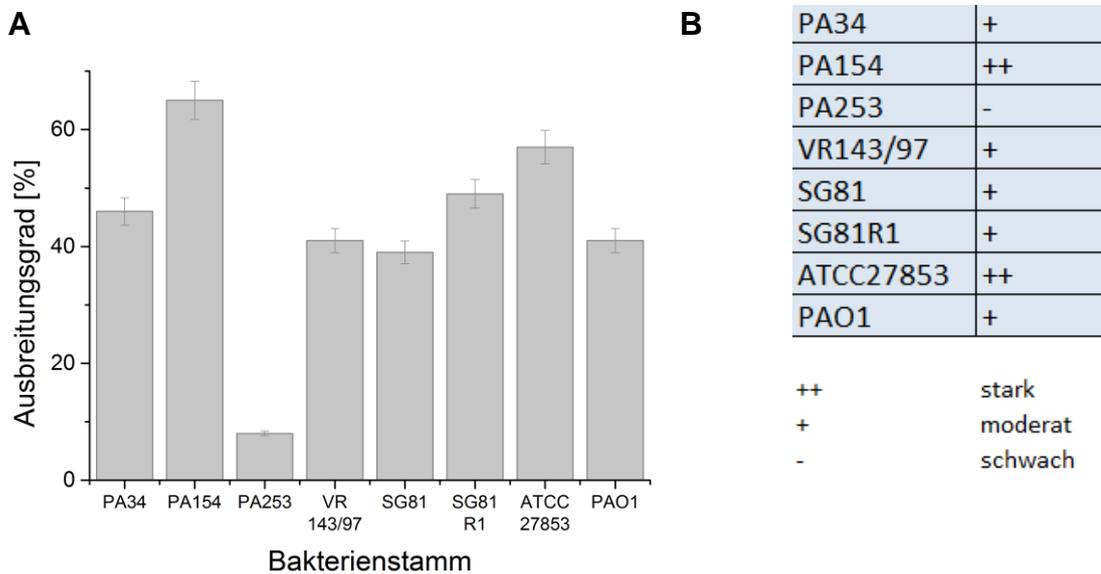


Abbildung 4.2: A) Ausbreitungsgrad der 8 untersuchten Stämme von *P. aeruginosa* in semisolidem Weichagar nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C. B) Klassifikation der Stämme in die Kategorien ++ starke Schwimmer, + moderate Schwimmer und - schwache Schwimmer.

Das Ziel dieser Untersuchung war unter anderem, einen stark motilen *P. aeruginosa* Stamm für Experimente mit dem holographischen Mikroskop zu identifizieren, um erfolgreich schwimmende Bakterien beobachten und aufnehmen zu können. Aufgrund seiner starken Schwimmaktivität mit einem Ausbreitungsgrad von 65% wurde daher der Stamm PA154 ausgewählt. Dieser hat aufgrund seiner Herkunft aus dem Abwasser des Mainzer Universitäts-Klinikums zudem große medizinische Relevanz. Alle folgenden Ergebnisse beruhen auf Messungen des Stammes PA154.

4.1.2 Integrale Analyse der Motilität von *P. aeruginosa* mittels 3D-Tracking

Die folgenden Daten basieren auf zwei Messungen, die an unterschiedlichen Tagen mit jeweils einer frischen Übernachtskultur von *P. aeruginosa* durchgeführt wurden. Bei beiden Messungen herrschten analoge experimentelle Bedingungen (vgl. Abschnitt 0), weshalb die Ergebnisse in den folgenden Darstellungen zusammengefasst betrachtet werden. Die gesamte

Messdauer pro Messung betrug 10 min, wobei jeweils die ersten 3 min der Holographie-Serien rekonstruiert und ausgewertet wurden. Es konnten insgesamt 35 Trajektorien mit einer Länge zwischen 50 s und 3 min bestimmt werden, abhängig von der Dauer in der sich das Bakterium im Bildfeld aufhielt. In einigen Fällen musste die Trajektorien-Bestimmung allerdings abgebrochen werden, obwohl sich das Bakterium im Bildfeld befand, da es durch einen schlechten Kontrast in Bereichen mit geringerer Ausleuchtung wie den Randbereichen des Detektors im Rauschen verschwand. Das Bildfeld (FoV), welches durch die Divergenz der Wellenfront hinter der Lochblende und dem rechteckigen Detektor-Chip die Form eines geraden quadratischen Pyramidenstumpfes besitzt, hat an der Apexfläche zur Lochblende hin orientiert die Maße $0,48 \times 0,48 \text{ mm}^2$ und an der Basisfläche zum Detektor orientiert die Maße $0,83 \times 0,83 \text{ mm}^2$. Daraus ergibt sich ein Beobachtungsvolumen von $0,35 \text{ mm}^3$. Abbildung 4.3 zeigt eine Übersicht über alle bestimmten Trajektorien in diesem Beobachtungsvolumen während eines Beobachtungszeitraumes von 3 min. Zur Veranschaulichung der Geometrie des Messaufbaus ist die Lage der optischen Achse in der 3D-Ansicht gekennzeichnet. Die Schwerkraft wirkt in Richtung negativer Y-Achse. Diese bewirkt die Sedimentation der Bakterien entlang der Vertikalachse was in Abbildung 4.3B durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Nettoausrichtung zur Y-Achse zu beobachten ist. Dennoch lassen sich übergeordnete Schwimmmuster deutlich erkennen. Auffällig ist eine Aufeinanderfolge von Schlaufen in einigen Trajektorien, die ein Indiz dafür sind, dass *P. aeruginosa* helikales Schwimmverhalten zeigt. Die nähere Betrachtung der einzelnen Trajektorien erfolgt in Abschnitt 4.1.3.

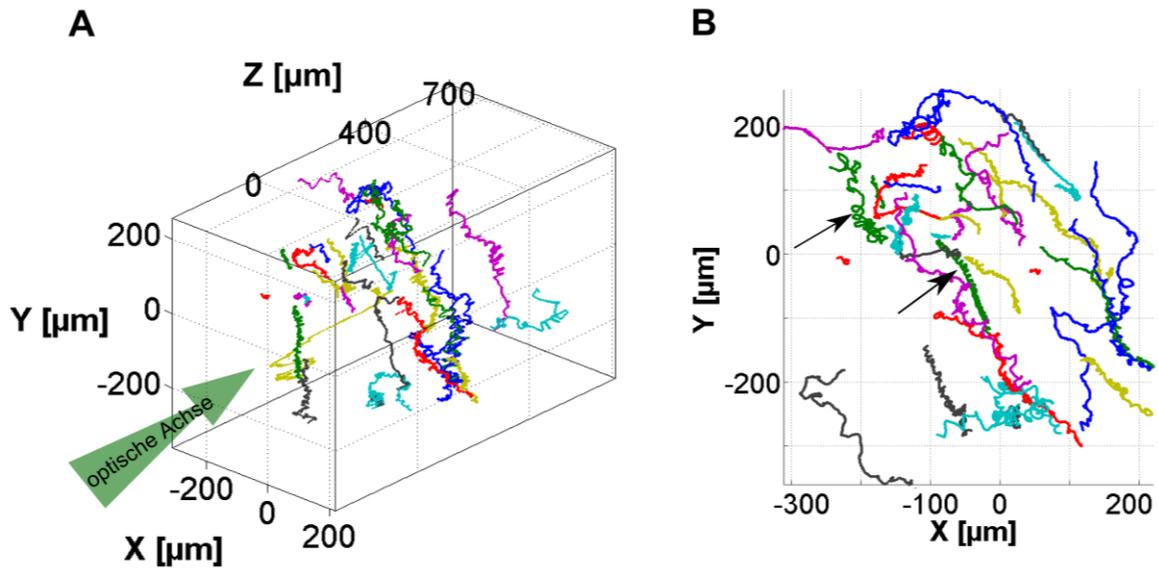


Abbildung 4.3: Trajektorien von *P. aeruginosa* (PA154) in zwei verschiedenen Ansichtsperspektiven. A) als 3D- Ansicht mit Kennzeichnung der Lage der optischen Achse und B) als XY-Ebenenprojektion. Die einzelnen Trajektorien können durch die Farbkodierung unterschieden werden. Die schwarzen Pfeile in B) kennzeichnen Trajektorien, bei denen eine Aufeinanderfolge von Schleifen zu beobachten ist.

Die Geschwindigkeiten der Bakterien aus Abbildung 4.3 sind in Abbildung 4.4 in einem Geschwindigkeitsverteilungs-Histogramm dargestellt. Die Geschwindigkeitsklassen wurden in Intervalle von 1 µm/s eingeteilt und über einen Bereich von 0-50 µm/s aufgetragen. Zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit, die nicht mit der mittleren Geschwindigkeit verwechselt werden darf, wurde das Histogramm mit einer Fitfunktion der Form einer maxwell'schen Geschwindigkeitsverteilung gefittet. Diese hat im Allgemeinen die Form

$$g(x) = ax^2 e^{-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2} \quad (12).$$

Die Maxwell-Boltzmann Verteilung besitzt ihre Gültigkeit für ideale Gase, bei dem die Teilchen, abgesehen von Stößen, nicht miteinander wechselwirken [177]. Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, bewegen sich die Bakterien auch in diesem Fall unabhängig voneinander, weshalb die Verwendung der maxwell'schen Verteilung, wie auch in vorherigen

Doktorarbeiten von Matthias Heydt [167] und Sebastian Weiße [166] angewandt, zu einer guten Beschreibung der bakteriellen Geschwindigkeitsverteilung führt. Für *P. aeruginosa* ergibt sich in diesem Experiment gemäß Abbildung 4.4 eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von $5,7 \mu\text{m/s}$ mit einer Halbwertsbreite von $9,2 \mu\text{m/s}$. Die höchsten detektierten Geschwindigkeiten liegen um die $30 \mu\text{m/s}$. Betrachtet man die Länge des Bakteriums von ca. $2 \mu\text{m}$ so legt das Bakterium bei seiner wahrscheinlichsten Geschwindigkeit in einer Sekunde mehr als das doppelte seiner Körperlänge als Strecke zurück. Bei Höchstgeschwindigkeiten um $30 \mu\text{m/s}$ sogar das 15-fache.

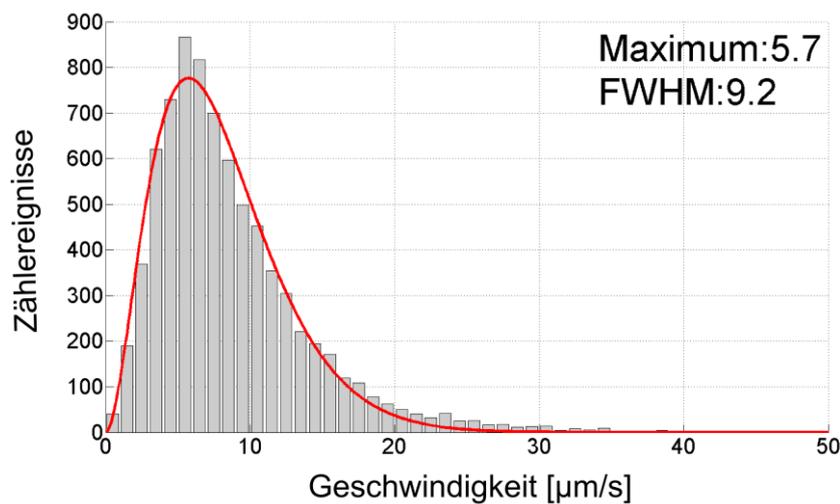


Abbildung 4.4: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle bestimmten Trajektorien von *P. aeruginosa* mit angelegter Fitfunktion der Form einer Maxwell-Boltzmann Geschwindigkeitsverteilung. Das Maximum mit $5,7 \mu\text{m/s}$ gibt die wahrscheinlichste Geschwindigkeit an. Die Halbwertsbreite (FWHM für Full Width at Half Maximum) des Fits beträgt $9,2 \mu\text{m/s}$.

Die ermittelten Werte für die Geschwindigkeit liegen allerdings weit unter den Werten, die sich in der Literatur finden. Dort werden typische Geschwindigkeiten von $41 \pm 3 \mu\text{m/s}$ für den *P. aeruginosa* Wildtypstamm PAK und $\sim 60 \mu\text{m/s}$ für den Stamm ATCC 15692 [20, 178] angegeben. Die Diskrepanz dieser Werte kann allerdings durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen teilweise erklärt werden. Die Literaturwerte resultieren aus 2-dimensionalen mikroskopischen Messungen, deren experimentelle Bedingungen von den in dieser Arbeit präsentierten Messungen in einigen Punkten abweichen. Es ist zu beachten, dass die Schwimmgeschwindigkeiten von Bakterien von der Umgebungstemperatur abhängen [179, 180]. Mit steigender Temperatur steigt auch die Schwimmgeschwindigkeit. In dieser

Arbeit wurde die Bakteriensuspension, die zuvor bei 37°C inkubiert wurde kurz vor der Messung mit frischem Medium verdünnt, welches eine Raumtemperatur (RT) von ca. 22°C aufwies. Die gesamte Messung fand ebenfalls bei RT statt. Bei den Experimenten in der Literatur wurde direkt die zuvor bei 30°C inkubierte Bakteriensuspension auf einen Objektträger aufgebracht und vermessen [178]. Hinzu kommt, dass durch die Verwendung von Objektträgern unter dem Mikroskop Wechselwirkungen zwischen den Bakterien und der Oberfläche nicht vernachlässigbar sind, die gegebenenfalls Auswirkungen auf das Schwimmverhalten und somit auch auf die Geschwindigkeit haben können. Im Falle dieser Arbeit handelt es sich um die Geschwindigkeiten vollständig frei schwimmender Bakterien. Auch der Faktor Viskosität, der sich durch die Verwendung verschiedenen Mediums unterscheiden kann, darf nicht vernachlässigt werden, da dieser ebenfalls einen Einfluss auf die Geschwindigkeit ausübt [181].

Aufgrund thermischer Energie unterliegen auch sich selbst antreibende Bakterien, genau wie nicht motile Bakterien und alle anderen mikroskopisch kleinen Partikel, dem ständigen Einfluss der Brown'schen Bewegung auf der die Diffusion von Partikeln beruht [182]. Translations-Diffusion und Rotations-Diffusion führen dazu, dass Bakterien immer wieder von ihrem eingeschlagenen Weg abgebracht werden, was zu dem bereits erwähnten „Random walk“ führt. Die mittlere quadratische Entfernung $\langle x^2 \rangle$, die ein Bakterium aufgrund von translativer Diffusion zurücklegt ist gegeben durch

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \tag{13}$$

mit D als Diffusionskoeffizienten und t als Zeit. Dieser kann über die Stokes Einstein Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\mu R} \tag{14}$$

abgeschätzt werden [183]. k_B ist dabei die Boltzmann Konstante, f der Reibungs-Koeffizient, T die Temperatur, μ die Viskosität des Mediums und R der Radius der Bakterienzelle. Für die Berechnung der mittleren quadratischen Entfernung durch Diffusion der Bakterien in dieser Arbeit wird im Folgenden der Diffusions-Koeffizient eines nicht motilen *E. coli* Stammes verwendet. Dieser wurde von Nossal et al. auf $5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei einer Temperatur von 25°C bestimmt [184]. Die Bestimmung von Diffusions-Koeffizienten für motile Bakterien

beinhaltet zusätzlich deren aktive Bewegung [183]. Da hier allerdings die reine Diffusions-Komponente aufgrund Brown'scher Bewegung betrachtet werden soll wurde der angegebene Wert von $5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ gewählt. Mit diesem ergibt sich, dass das Bakterium innerhalb einer Sekunde über eine Distanz von $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ diffundiert was bei einer Geschwindigkeit von $5,7 \text{ }\mu\text{m/s}$ nicht vernachlässigt werden kann. Das bedeutet, die in dieser Arbeit bestimmten Trajektorien sind nicht alleine auf die Eigenbewegung der Bakterien zurückzuführen, sondern werden auch von äußeren Einflüssen wie Diffusion und Gravitation beeinflusst. Gravitation führt, wie in Abbildung 4.3B zu erkennen, zu einer übergeordneten Sedimentation, die die eigentliche Schwimmbewegung nicht beeinflusst. Wie in Kapitel 3.5.2 erläutert wurden die X-, Y- und die Z-Koordinaten aller Datenpunkte durch eine lokale Polynom-Regression geglättet. Dadurch werden größere Sprünge zwischen Datenpunkten angeglichen und somit auch der Beitrag von Brown'scher Bewegung minimiert, was zu einer verbesserten Wahrnehmung der tatsächlichen Schwimmbewegung führt. Alle in diesem und in den folgenden Kapiteln aufgeführten Analysen beruhen, soweit nicht anders beschrieben, auf geglätteten Daten.

4.1.3 Klassifikation verschiedener Schwimmmuster

Die nähere Betrachtung der einzelnen Trajektorien aus Abbildung 4.3 lässt verschiedene Schwimmmuster erkennen, die in diesem Kapitel in fünf Kategorien klassifiziert werden. Diese Kategorien werden anhand der Form der Schwimmmuster als „Meander“, „Oszillation“, „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“ (engl. für Verwindung) bezeichnet. Zur Veranschaulichung sind diese in Abbildung 4.5A schematisch dargestellt. Das Muster „Meander“ ist gekennzeichnet durch eine gleichförmige beständige Bewegung mit leichten Biegungen und mäandrierenden Windungen. Scharfe Richtungsänderungen werden bei diesem Muster nicht beobachtet. Anders ist dies bei dem Muster „Oszillation“. Dieses zeigt regelmäßige Richtungsänderungen mit plötzlichen scharfen Umkehrbewegungen woraus bei zweidimensionaler Betrachtung ein Zick-Zack-artiges oszillierendes Muster entsteht. Diese beiden Schwimmmuster wurden bereits in früheren Studien beobachtet und beschrieben [15]. Allerdings resultieren diese Beschreibungen aus 2-dimensionalen Mikroskopie Daten. In der vorliegenden Arbeit ermöglicht die 3-dimensionale holographische Abbildungsmethode die Identifikation drei weiterer in dieser Form für *P. aeruginosa* noch nicht beobachteten Schwimmmustern „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“. Die Schwimmmuster „Helix“ und „Pseudohelix“ ähneln sich sehr stark. Bei beiden handelt es sich um eine Abfolge von

Windungen, die sich um eine Achse schrauben. Das Muster „Pseudohelix“ wird insofern von dem Muster „Helix“ abgegrenzt, da die Achse in „Pseudohelix“ gekrümmt ist, was für die typische Form einer Helix nicht der Fall ist. Das letzte Muster erhält durch die Sequenz von regellos verwobenen Windungen unterschiedlicher Formen und Abmessungen die Bezeichnung „Twist“. Auch hier werden keine abrupten scharfen Richtungsänderungen beobachtet. Vielmehr scheint dieses Muster eine Art Kombination aus den Mustern „Meander“ und „Pseudohelix“ zu sein. Repräsentative Trajektorien von *P. aeruginosa* für jedes einzelne dieser Schwimmmuster sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Dabei handelt es sich um Segmente, die aus längeren Trajektorien extrahiert wurden.

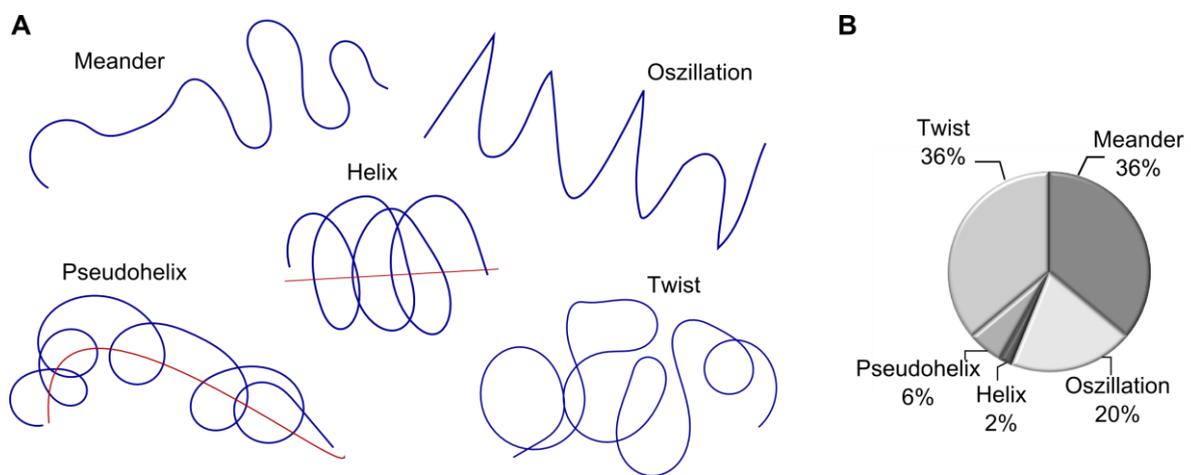
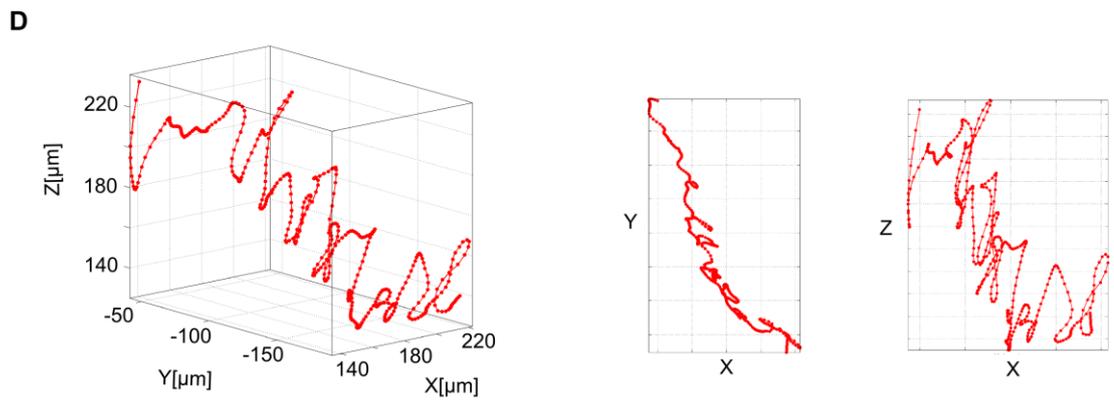
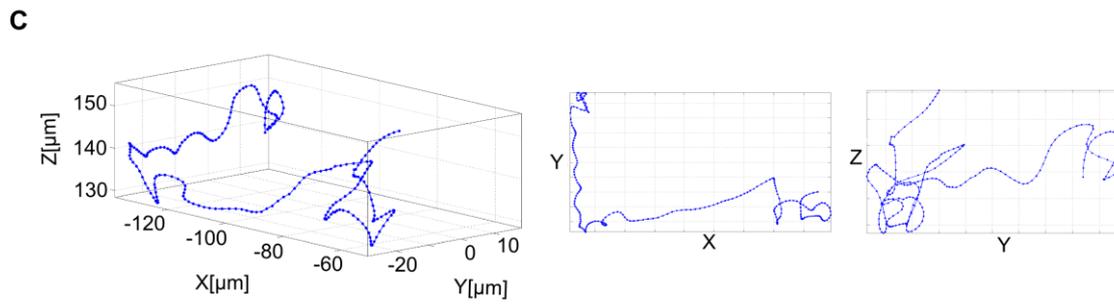
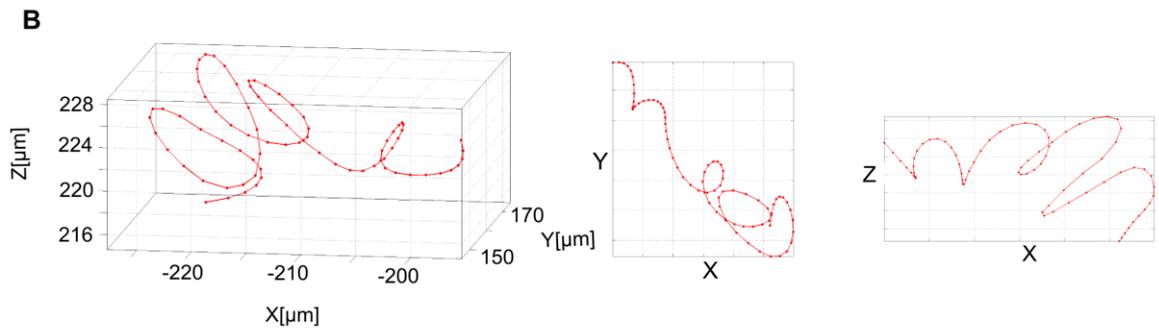
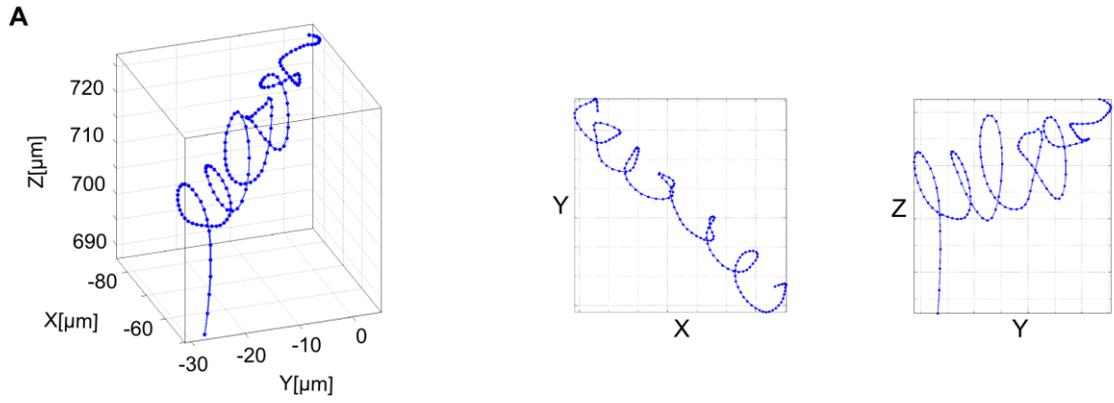


Abbildung 4.5: A) Schematische Darstellung der 5 verschiedenen klassifizierten Schwimmmuster beobachtet für *P. aeruginosa* nach der Bestimmung von 35 individuellen Trajektorien. B) Prozentuales Auftreten der klassifizierten Schwimmmuster innerhalb der 35 bestimmten Trajektorien.

Zur Analyse der Wahrscheinlichkeit, mit welcher ein Bakterium eines der beschriebenen Schwimmmuster in dem vorliegenden Experiment aufweist, wurde das prozentuale Auftreten der einzelnen Muster in den Trajektorien bestimmt. Dafür wurden die Muster innerhalb der Trajektorien anhand der oben beschriebenen, sichtbaren Merkmale manuell identifiziert und Segmente eines bestimmten Musters extrahiert. Zur Bestimmung der Häufigkeiten wurde die Anzahl der Datenpunkte jedes Segmentes berücksichtigt um die Länge und damit die Dauer, in der das Bakterium mit diesem Muster schwimmt, mit einzubeziehen. Dies gibt Auskunft über die Präferenz von *P. aeruginosa* sich in einem bestimmten Schwimmmuster fortzubewegen. Die Häufigkeiten der einzelnen Muster sind in Abbildung 4.5B illustriert. Es

zeigt sich, dass *P. aerruginosa* in mehr als 70% der Zeit entweder mit dem Muster „Meander“ oder mit dem Muster „Twist“ schwimmt. Das Muster „Oszillation“ nimmt 20% der Zeit ein. „Helix“ und „Pseudohelix“ werden nur sehr selten beobachtet und machen nur 2% bzw. 6% der gesamten Trajektorien aus.



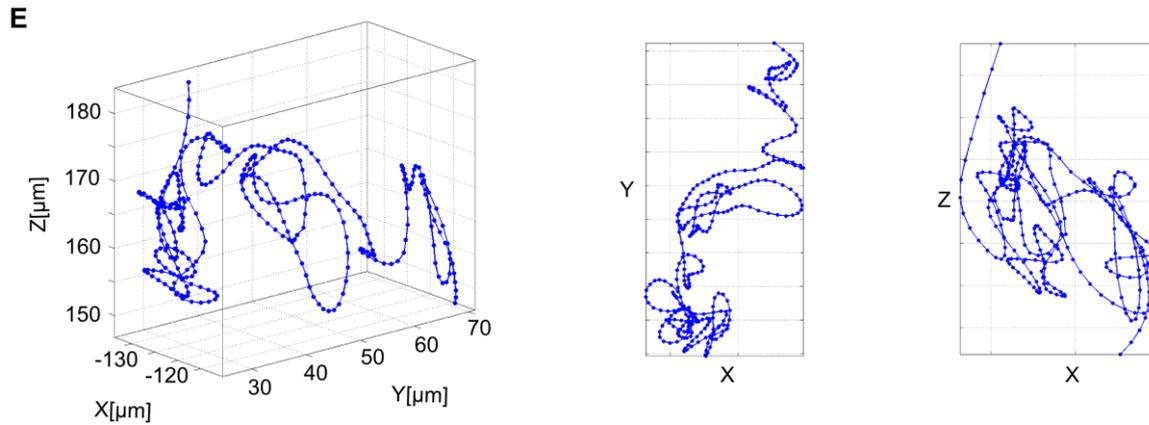


Abbildung 4.6: 3-dimensionale Darstellungen und 2-dimensionale Ebenenprojektionen repräsentativer Trajektorien, die die einzelnen klassifizierten Schwimmuster von *P. aeruginosa* aufweisen. Gezeigt sind einzelne Segmente extrahiert aus längeren Trajektorien. A) „Helix“, B) „Pseudohelix“, C) „Meander“, D) „Oszillation“ und E) „Twist“.

In den folgenden Abschnitten werden einzelne kleinere Segmente der Muster „Oszillation“ und „Helix“ näher betrachtet um spezielle Eigenschaften wie Umkehrwinkel und Händigkeit von Windungen zu untersuchen.

4.1.3.1 Das Muster „Oszillation“

Das Muster „Oszillation“ resultiert aus der Abfolge von kurzen „run“-Phasen und scharfen Richtungsänderungen, welche durch die Umkehr der Drehrichtung des flagellaren Motors hervorgerufen werden. Die mittlere Frequenz der Richtungswechsel, in der Literatur auch häufig als „tumbling“ Frequenz bezeichnet, wurde aus verschiedenen Segmenten, die dieses Muster aufweisen, durch Ermittlung der Anzahl an Datenpunkten in einer „run“-Phase zwischen zwei Richtungsänderungen bestimmt und beträgt $0,5 \pm 0,15$ Hz. In mehreren Studien zur Motilität monotrich begeißelter Bakterien wurden sehr scharfe Richtungswechsel mit Umkehrwinkeln von fast 180° beschrieben. Dieser Umkehrwinkel ist als Abweichung zum linearen Schwimmverlauf definiert, wie es in Abbildung 4.7C skizziert ist. Die Schwimmrichtung der Bakterien scheint sich demnach nahezu umzukehren [14, 15]. Allerdings beruhen diese Beobachtungen auf 2-dimensionalen Mikroskopie-Daten, bei denen die dritte Dimension nicht zugänglich ist. Daher ist aus diesen Daten nicht eindeutig zu schließen, dass der Winkel der Richtungsänderung tatsächlich so groß ist, wie er in der 2-

dimensionalen Darstellung zu sein scheint. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse bestätigen allerdings die Beobachtung vorheriger Studien. Aus dem Muster „Oszillation“ können kurze Segmente mit Haarnadel-förmigem Muster extrahiert werden, deren Umkehrwinkel zwischen 110° und 170° betragen. Solch ein Haarnadel-förmiges Segment mit den Umkehrwinkeln α_1 , α_2 , und α_3 ist in Abbildung 4.7A-B dargestellt. Die rote Kurve repräsentiert die in der X-, Y- und Z-Koordinate geglättete Trajektorie, wohingegen die blauen Punkte die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie darstellen. Die Werte der Umkehrwinkel wurden, wie in Abbildung 4.7C schematisch gezeigt, unter Berücksichtigung möglicher Überabtastung von Datenpunkten anhand von drei aufeinanderfolgenden Abstandsvektoren bestimmt. Diese ergeben sich gemäß Abbildung 4.7D zu $\alpha_1 = 120^\circ$, $\alpha_2 = 166^\circ$ und $\alpha_3 = 112^\circ$. Die Tatsache, dass α_1 und α_3 einen geringeren Wert aufweisen als α_2 korreliert mit der Beobachtung von Xie et al., bei der die Umkehrwinkel des Bakteriums *Vibrio alginolyticus* größere Werte zeigen wenn der Richtungswechsel durch einen Übergang von vorwärts nach rückwärts Schwimmen hervorgerufen wird [13]. Übergänge von rückwärts nach vorwärts Schwimmen sind mit kleineren, variableren Winkeln verbunden. In Anlehnung daran zeigt *P. aeruginosa* im Beispiel von Abbildung 4.7A-B zunächst einen Wechsel von rückwärts zu vorwärts Schwimmen (α_1), dann einen Übergang in den rückwärts Modus (α_2), um dann bei α_3 wieder zum vorwärts Schwimmen überzugehen.

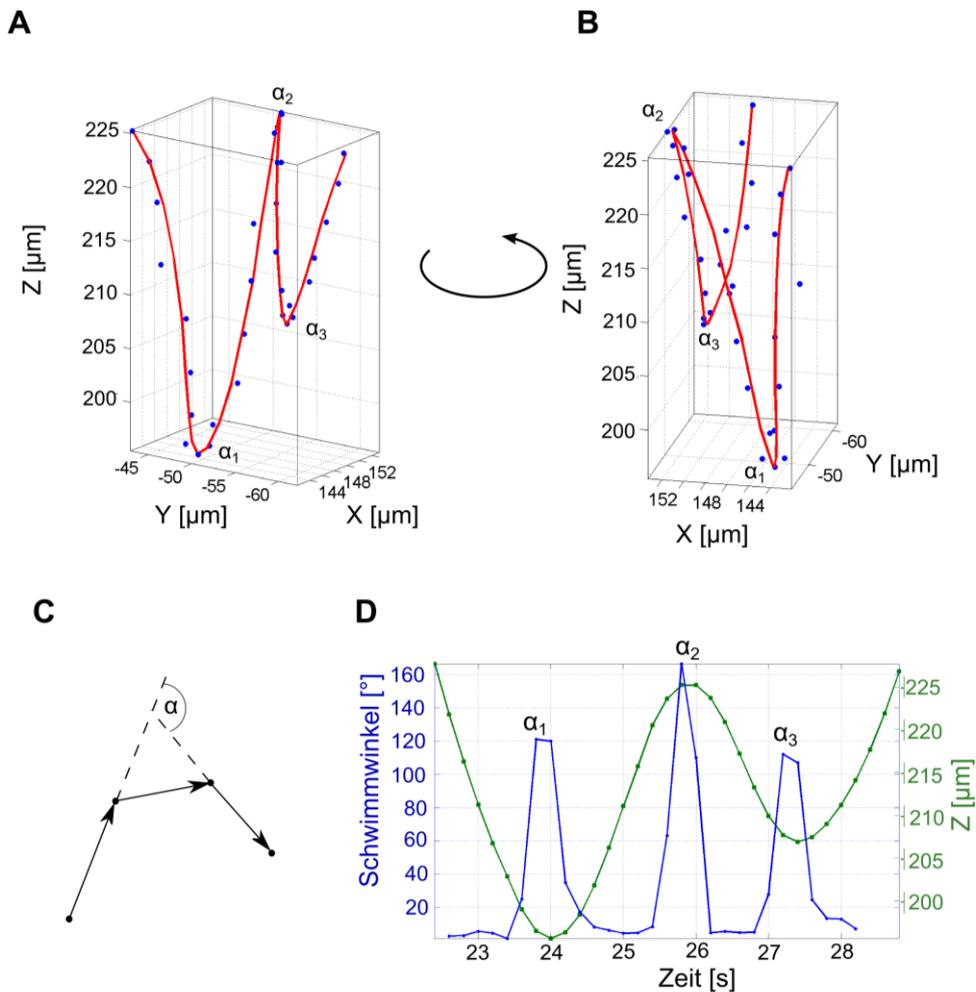


Abbildung 4.7: A) und B) Zwei verschiedene Ansichtsperspektiven eines Haarnadel-förmigen Segments mit scharfen Umkehrwinkeln α_1 , α_2 , und α_3 extrahiert aus einer Trajektorie, die das Muster „Oszillation“ aufweist. Die Rote Kurve repräsentiert die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar. C) Schematische Darstellung der Bestimmung der Schwimmwinkel α . Diese werden aus drei aufeinanderfolgenden Abstandsvektoren bestimmt um eine Überabtastung der Daten an den Umkehrpunkten zu berücksichtigen. D) Diagramm der bestimmten Schwimmwinkel und der Z-Koordinate des Segmentes in A-B mit den extremen Umkehrwinkeln α_1 , α_2 , und α_3 .

Überraschenderweise sind solche stark ausgeprägten Haarnadel-förmigen Muster nur selten zu beobachten. Die meisten der aus dem Muster „Oszillation“ extrahierten Segmente, wie beispielhaft in Abbildung 4.8A-B gezeigt, zeigen weniger scharfe Umkehrwinkel wodurch die Haarnadel Form dieser Segmente weniger ausgeprägt ist. Wie an den Umkehrpunkten P_1 , P_2

und P_3 in Abbildung 4.8A-B zu erkennen ist, ist die Dichte an Datenpunkten an diesen Punkten höher, da die Schwimmgeschwindigkeit dort geringer ist. Eine geringere Geschwindigkeit an den Umkehrpunkten führt zu einem verstärkten Beitrag Brown'scher Bewegung, die das Bakterium in willkürliche Richtungen lenkt und so zu einer breiteren Haarnadel führt. Besonders scharfe Winkel von annähernd 180° kommen demnach nur zustande, wenn das Bakterium seine Schwimmrichtungswechsel mit einer hohen Geschwindigkeit ausführt, ohne diese an den Umkehrpunkten zu drosseln. Für das Bakterium *V. alginolyticus* konnte gezeigt werden, dass die vorwärts-rückwärts Übergänge schneller erfolgen als die rückwärts-vorwärts Übergänge. Berücksichtigt man diese Beobachtung auch für *P. aeruginosa* so könnte der Umkehrpunkt P_2 in Abbildung 4.8A-B zu einem vorwärts-rückwärts Übergang zugeordnet werden und die Umkehrpunkte P_1 und P_3 zu einem rückwärts-vorwärts Übergang.

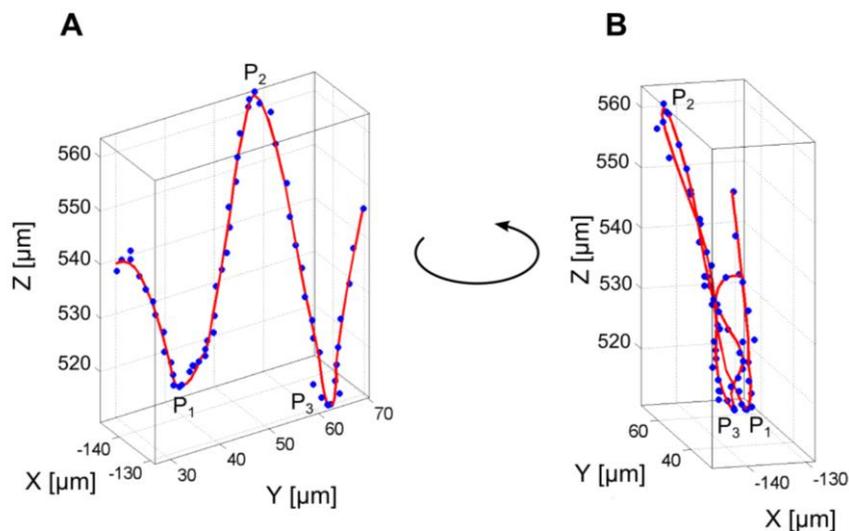


Abbildung 4.8: A) und B) Zwei Ansichtsperspektiven eines Segments ebenfalls aus dem Muster „Oszillation“ extrahiert, dessen Winkel an den Umkehrpunkten P_1 , P_2 und P_3 geringer sind, weshalb eine weniger stark ausgeprägte Haarnadel Form zu beobachten ist. Die Rote Kurve repräsentiert in allen Darstellungen die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen dagegen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar.

4.1.3.2 Das Muster „Helix“

Die Wahrscheinlichkeit ein Bakterium zu beobachten, das eine helikale Bewegung ausführt, ist nach der Analyse der Trajektorien in dieser Arbeit sehr gering (vgl. Abbildung 4.5B). Dennoch können insgesamt vier Segmente des Musters „Helix“ aus Trajektorien verschiedener Bakterien extrahiert werden. Die Häufigkeit dieses Musters von nur 2% ist teilweise auch auf die geringe Länge der Segmente und damit auf die Schwimmdauer zurückzuführen. Im Mittel besteht das Muster aus vier aufeinanderfolgenden sich genau entlang einer geraden Achse schlingenden Windungen, mit einer mittleren Schwimmdauer von 20 ± 8 s. Abbildung 4.9 zeigt zwei repräsentative Segmente des Schwimmusters „Helix“ extrahiert aus zwei verschiedenen Trajektorien. Der Start und das Ende der Segmente sind jeweils mit einem Dreieck bzw. mit einem Rechteck gekennzeichnet um die Händigkeit der Windungen zu verdeutlichen. Diese wird bei Betrachtung der Helix entlang der helikalen Achse vom Start zum Endpunkt bestimmt. Die beiden Segmente in Abbildung 4.9A-B und Abbildung 4.9C-D unterscheiden sich sowohl in der Händigkeit, als auch in Größe und Form der Windungen. Betrachtet man das Segment in Abbildung 4.9A-B entlang der helikalen Achse vom Startpunkt zum Endpunkt so lässt sich eine Linkshändigkeit feststellen. Die Windungen dieses Segments schrauben sich gleichförmig mit einem Radius von $15 \pm 2 \mu\text{m}$ um die helikale Achse. Das Segment in Abbildung 4.9C-D hingegen weist eine Rechtshändigkeit auf und die Windungen haben unterschiedliche Formen und Größen ($3,7 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$), was sich in Abbildung 4.9D deutlich erkennen lässt. Auch die Ganghöhe ist nicht konsistent. Dennoch gibt das Vorhandensein einer Sequenz von Windungen um eine gerade Achse Anlass dazu dieses Segment in die Kategorie „Helix“ zu klassifizieren.

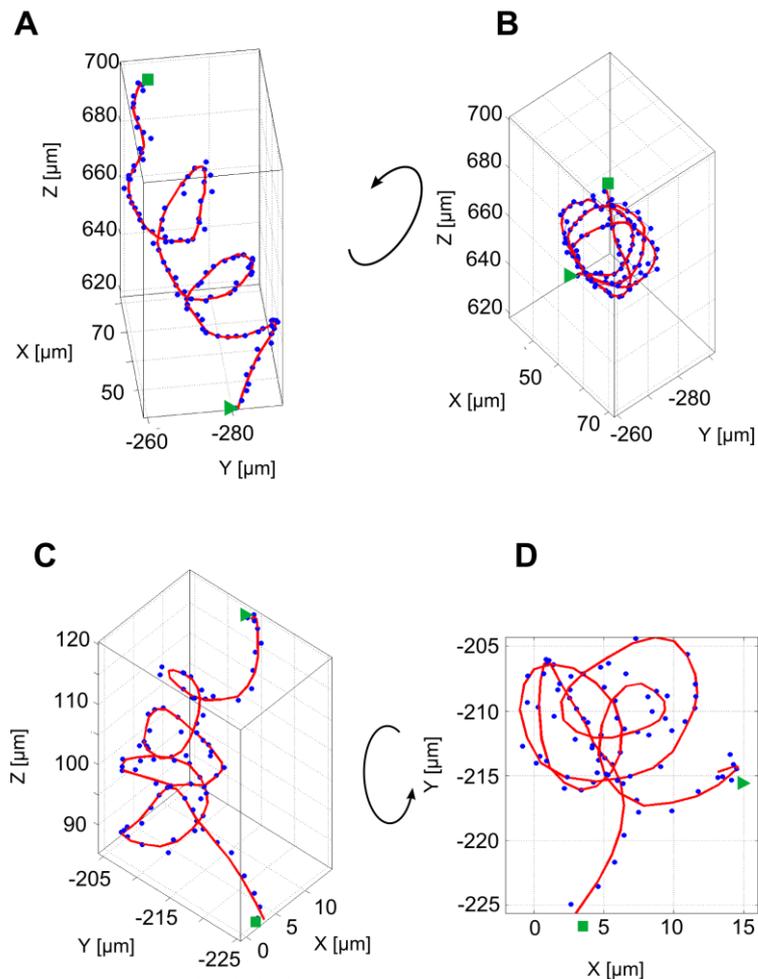


Abbildung 4.9: Segmente des Schwimmusters „Helix“. A) 3D-Ansicht und B) Ansicht entlang der helikalen Achse eines linkshändigen Segments mit 3 Windungen. C) 3D-Ansicht und D) Ansicht entlang der helikalen Achse eines rechtshändigen Segments mit 4 Windungen. Die Start- und die Endpunkte der Segmente sind jeweils mit Dreiecken bzw. mit Rechtecken gekennzeichnet. Die Rote Kurve repräsentiert in allen Darstellungen die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen dagegen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar.

Dass *P. aeruginosa* in der Lage ist, sowohl in rechtshändigen als auch in linkshändigen Helices zu schwimmen, konnte anhand verschiedener Segmente, extrahiert aus unterschiedlichen Trajektorien, gezeigt werden. Zur Untersuchung, ob *P. aeruginosa* eine Präferenz bezüglich der Händigkeit der Helices besitzt, wurden 55 Windungen sowohl in den Segmenten des Musters „Helix“ als auch des Musters „Pseudohelix“ analysiert. Das Ergebnis, gezeigt in Abbildung 4.10A, weist mit 71% auf eine klare Präferenz für linkshändige

4.1.4 Übergänge zwischen verschiedenen Schwimmmustern

Die meisten in dieser Arbeit für *P. aeruginosa* bestimmten Trajektorien in Abbildung 4.3 zeigen nicht nur ein einzelnes bestimmtes Schwimmmuster, sondern setzen sich aus verschiedenen Mustern zusammen. Das bedeutet, dass ein einzelnes Bakterium in der Lage ist sich mit unterschiedlichen Schwimmmustern fortzubewegen und gegebenenfalls zwischen den Mustern hin und her zu wechseln. Das Bakterium, dessen Trajektorie mit einer Länge von 110 s in Abbildung 4.11A dargestellt ist, zeigt einen Übergang von dem Muster „Meander“ (blau dargestelltes Segment) mit eher sanften Kurven zu dem Muster „Oszillation“ (grün dargestelltes Segment) mit hochfrequenten Richtungsänderungen. Die einzelnen Segmente der beiden Muster sind noch einmal gesondert als 3D-Darstellung in zwei verschiedenen Ansichtsperspektiven gezeigt. Bei Betrachtung des Segmentes „Oszillation“ zeigt sich, dass die Oszillation in der ZY-Ebene erfolgt mit Z als Haupt-Oszillationsrichtung und Y als Haupt-Ausbreitungsrichtung. Interessanterweise lässt sich dieses Phänomen auch in anderen Segmenten des Musters „Oszillation“ beobachten, wie beispielsweise in Abbildung 4.6D. Dass die Ausbreitungsrichtung in Y liegt lässt sich durch die Gravitation erklären. Die Oszillation in Z-Richtung erfolgt senkrecht zur Gravitation und parallel zum einfallenden Licht des holographischen Mikroskops. Ob die Oszillationsrichtung in Zusammenhang mit dem einfallenden Licht steht kann allerdings nicht geklärt werden. Das Bakterium, dessen Trajektorie mit einer Länge von 130 s in Abbildung 4.11B dargestellt ist, zeigt ein helikales Schwimmverhalten. Es wechselt von einem pseudohelikalen Verhalten (grün dargestellt) zu einer kurzen helikalen Sequenz (blau dargestellt) und geht daraufhin zu dem eher ungeordneten Muster „Twist“ über (rot dargestellt). Bei diesen beiden in Abbildung 4.11 gezeigten Trajektorien handelt es sich nur um repräsentative Beispiele. Eine bestimmte Abfolge der Muster in den Trajektorien von *P. aeruginosa* lässt sich nicht beobachten.

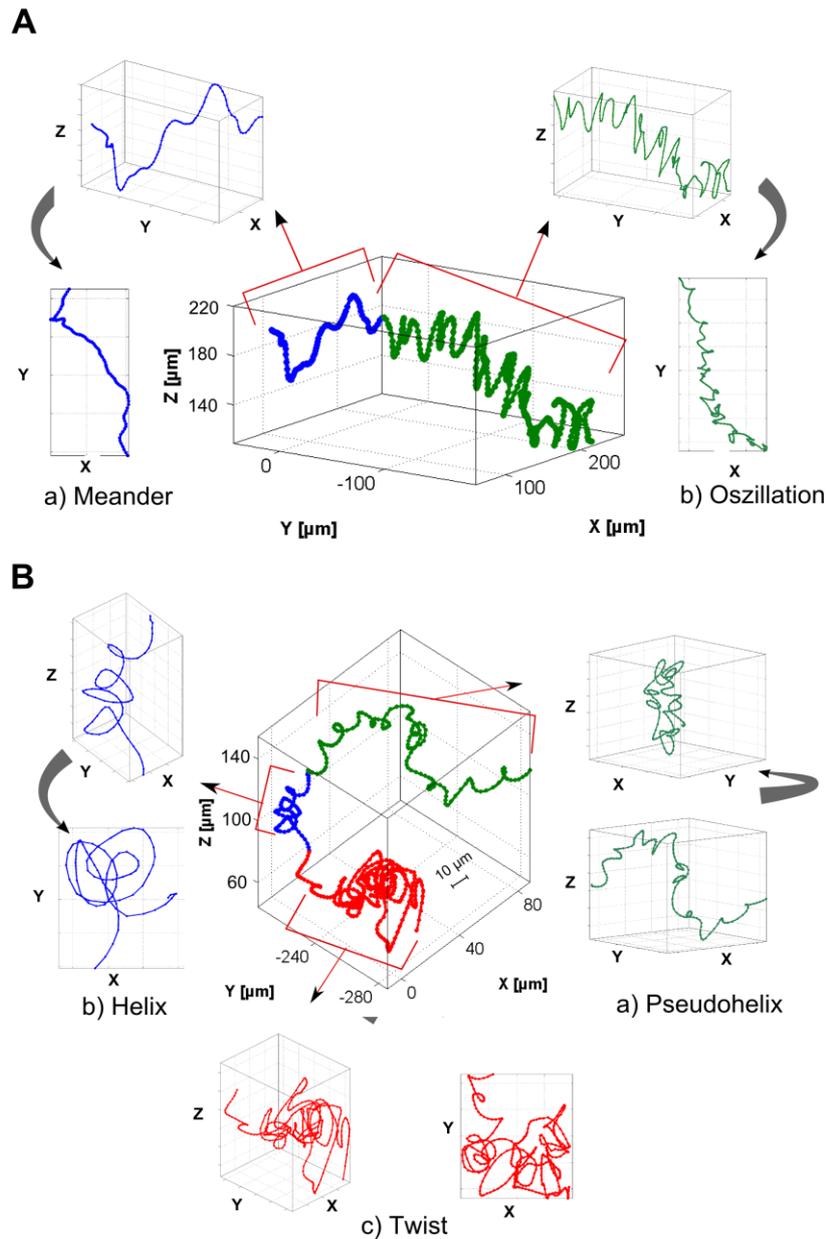


Abbildung 4.11: 3D-Darstellungen zweier repräsentativer Trajektorien von *P. aeruginosa* mit Übergängen zwischen verschiedenen Schwimmustern. A) Trajektorie mit einer Dauer von 110 s und einem Übergang zwischen dem Muster „Meander“ und „Oszillation“. a) und b) repräsentieren die einzelnen Segmente der beiden Schwimmuster in zwei verschiedenen Ansichtsperspektiven B) Trajektorie mit einer Dauer von 130 s und zwei Übergängen von dem Muster „Pseudohelix“ zu „Helix“ und von „Helix“ zu „Twist“. Die einzelnen Segmente mit dem jeweiligen Schwimmuster sind in a), b) und c) in zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt.

Bezüglich ihrer mittleren Geschwindigkeit unterscheiden sich die 5 verschiedenen Schwimmmuster nicht maßgeblich voneinander. Die über alle Segmente eines Musters gemittelten Geschwindigkeiten sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Allerdings ist in Abbildung 4.11B deutlich zu erkennen, dass die Bewegung des Bakteriums bei den Mustern „Pseudohelix“ und „Helix“ wesentlich gerichteter ist als bei dem Muster „Twist“, welches eher einem verwobenen Knäuel ohne maßgebliche Schwerpunktsänderung ähnelt. Die Netto-Ausbreitung des Bakteriums hängt von der Direktionalität der einzelnen Muster ab. Für jedes Segment eines bestimmten Musters lässt sich dessen Linearität berechnen. Dafür wird das Verhältnis zwischen der effektiven Geschwindigkeit (SLV für engl. straight-line velocity) und der mittleren tatsächlichen Geschwindigkeit (CLV für engl. curvilinear velocity) gebildet. Die effektive Geschwindigkeit ergibt sich aus der effektiv zurückgelegten Entfernung, während sich die tatsächliche Geschwindigkeit aus der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke berechnet (vgl. Abbildung 4.12), beide Geschwindigkeiten werden als Quotient der jeweiligen Strecke mit der Dauer des Segments bestimmt.

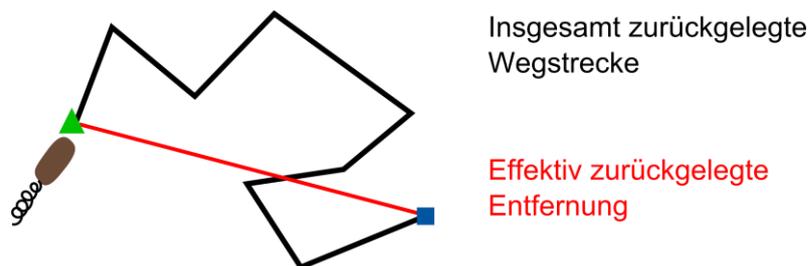


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung zur Berechnung der Linearität eines gegebenen Segments. Start und Endpunkt des hier gezeigten Segments sind grün bzw. blau gekennzeichnet. Die Linearität ergibt sich aus dem Quotienten von effektiver Geschwindigkeit, bestimmt mit der effektiv zurückgelegten Entfernung (rot dargestellt), und der tatsächlichen Geschwindigkeit, bestimmt mit der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke (schwarz dargestellt).

Tabelle 4.1: Mittlere Geschwindigkeit der verschiedenen Schwimmuster gemittelt über alle Segmente eines bestimmten Musters

Muster	Meander	Oszillation	Pseudohelix	Helix	Twist
Geschw.[$\mu\text{m/s}$]	$8,2 \pm 2,8$	$7,8 \pm 2,5$	$7,7 \pm 1,8$	$8,9 \pm 2$	$7,4 \pm 1,8$

Die ermittelten Linearitäten für vier verschiedene Segmente eines bestimmten Schwimmusters sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Dabei sind nur Segmente mit einer Mindestsegmentdauer von 30 s gezeigt, mit Ausnahme des Musters „Helix“ dessen Segmente im Mittel nur eine Dauer von 20 s aufweisen. Ein Wert von 1 kennzeichnet eine vollkommen geradlinige Bewegung.

Tabelle 4.2: Linearitäten für vier verschiedene Segmente der jeweiligen Schwimmuster „Meander“, „Oszillation“, „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“, berechnet aus dem Quotienten der effektiven Geschwindigkeit (SLV) und der tatsächlichen Geschwindigkeit (CLV). Die in fetter Schriftart aufgeführten Werte entsprechen den in Abbildung 4.11 gezeigten Segmenten.

Muster	Meander	Oszillation	Helix	Pseudohelix	Twist
SLV/CLV	0,44	0,18	0,32	0,28	0,08
Segment 1					
SLV/CLV	0,45	0,14	0,23	0,25	0,1
Segment 2					
SLV/CLV	0,36	0,18	0,25	0,28	0,14
Segment 3					
SLV/CLV	0,41	0,26	0,31	0,28	0,09
Segment 4					

Alle analysierten Segmente zeigen einen Wert kleiner als 0,5 was auf eine geringe Linearität aller Schwimmuster hinweist. Das Muster „Verwindung“ besitzt mit einem mittleren Wert von $0,1 \pm 0,02$ die geringste Linearität. Das Muster „Oszillation“ folgt gleich darauf mit einem mittleren Wert von $0,19 \pm 0,02$. Die größte Linearität mit einem mittleren Wert von $0,42 \pm 0,3$ zeigt das Muster „Meander“. Die Muster „Pseudohelix“ und „Helix“ weisen annähernd gleiche Werte auf ($0,28 \pm 0,1$ für „Pseudohelix“ und $0,28 \pm 0,3$ für „Helix“) und zeigen verglichen mit „Oszillation“ und „Verwindung“ eine stärkere Netto-Ausbreitung.

4.1.5 Diskussion und Fazit

Aus einer Auswahl an verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen wurde der motilste Stamm P154 für eine quantitative Motilitätsanalyse, basierend auf der 3-dimensionalen holographischen Mikroskopie, ausgewählt. Es werden fünf verschiedene Schwimmuster klassifiziert: „Meander“, „Oszillation“, „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“. Während ein ähnliches Verhalten, wie in Kapitel 4.1.3 für die Muster „Meander“ und „Oszillation“ beschrieben, in früheren 2-dimensionalen Tracking Studien bereits beobachtet wurde, können die Muster „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“ in dieser Arbeit neu identifiziert werden. Des Weiteren wird gezeigt, dass *P. aeruginosa* in der Lage ist zwischen den verschiedenen Mustern umherzuschalten, wobei keine bestimmte Präferenz der Abfolge der Muster zu beobachten ist.

In dieser Arbeit kann nach dem aktuellen Kenntnisstand zum ersten Mal helikales Schwimmverhalten für kleine Bakterien wie *P. aeruginosa* experimentell nachgewiesen werden. Die helikalen Schwimmsequenzen sind allerdings nur selten zu beobachten und die Schwimmdauer in helikalen Mustern ist nur gering. Für viele größere Mikroorganismen, die sich im Bereich kleiner Reynolds Zahlen bewegen, werden Helices als Standard-Trajektorien beschrieben, wie es beispielsweise auch bei Spermatozoen der Fall ist [126, 185-187]. Für kleine, monotrich begeißelte, stäbchenförmige Bakterien wie *P. aeruginosa* existieren theoretische Simulationen, die ebenfalls annähernd lineare, helicale Trajektorien, sowohl im Vorwärtsschwimm- als auch im Rückwärtsschwimm-Modus, vorausberechnen [188]. Durch die 3-dimensionale holographische Abbildungsmethode ist es in dieser Arbeit gelungen auch experimentell Helices im Schwimmverlauf von *P. aeruginosa* zu detektieren. Warum Organismen, im Falle dieser Arbeit Bakterien, in Helices schwimmen ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass Rotations-Diffusion, die den Zellkörper um eine Achse rotieren lässt, die nicht parallel oder senkrecht zur Translations-Achse steht, eine wichtige Rolle spielt [126]. Beim translativen Antrieb der Zelle durch das Flagellum und die gleichzeitige Rotation des Zellkörpers entsteht ein helikaler Schwimmverlauf. Für *P. aeruginosa* können sowohl rechtshändige als auch linkshändige Windungen bzw. Helices beobachtet werden, wobei auch Übergänge der Händigkeiten zwischen aufeinanderfolgenden Windungen auftreten. Dennoch zeigt *P. aeruginosa* eine leichte Tendenz zu linkshändigen Windungen (71%). Ob diese Tendenz mit einer präferierten Schwimmrichtung der Bakterien zusammenhängt kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Die holographischen Aufnahmen lassen keinen Rückschluss auf die Schwimmrichtung (ob vorwärts oder

rückwärts) innerhalb der Helices zu, da die Auflösung nicht ausreicht um das Flagellum zu detektieren.

Die Berechnung der Linearitäten der verschiedenen Schwimmmuster gibt Aufschluss darüber mit welcher Effizienz ein Bakterium mit einem bestimmten Schwimmmuster in eine Netto-Richtung propagiert und damit auch mit welchen Mustern es sich effizient zu einem Stimulus hin oder von einem Reiz weg bewegen kann. Für alle Muster liegt der Wert für die Linearität unter 0,5, was bedeutet, dass die bakterielle Bewegung weit weg von einem idealen, linearen Verlauf liegt. Dies ist zu einem großen Teil der Brown'schen Bewegung geschuldet, die die Orientierung der Bakterien willkürlich ändert. Doch trotz dieser Herausforderung haben Bakterien Wege gefunden sich Netto in eine bestimmte Richtung zu bewegen, wie es bei Taxien zu beobachten ist (z.B. Chemotaxis). Anders als der „Run und Tumbling“ Modus von *E. coli*, bei dem das „Tumbling“ eine willkürliche Orientierungsänderung herbeiführt und die Netto-Ausbreitung durch die „Tumbling“-Frequenz gesteuert wird, regelt *P. aeruginosa* seine Orientierung durch das Umschalten zwischen Vorwärts- und Rückwärtsschwimmen [15]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann weisen die Muster „Meander“, „Helix“ und „Pseudohelix“ eine verstärkte Linearität auf (0,42; 0,28 und 0,28) im Vergleich zu den beiden Mustern „Oszillation“ und „Twist“ (0,19 und 0,1). Helikales Schwimmverhalten wurde auch schon in früheren Studien als hocheffizienten Weg für Mikroorganismen beschrieben, um sich direktional in eine Richtung zu bewegen [126]. Durch die Fähigkeit des Umerschaltens zwischen verschiedenen Schwimmmodi kann das Bakterium mit Mustern geringerer Linearität und häufigen Richtungsänderungen, wie „Oszillation“ und „Twist“, seine Orientierung anpassen und dann, bei einer günstigen Orientierung, beispielsweise in Richtung eines Stimulus, in ein Muster wie „Meander“ mit einer verbesserten direktionalen Stabilität wechseln. Dieses Modell wird auch durch die Studie von Taylor et al. unterstützt, die gezeigt haben, dass für *Pseudomonas citronellolis* die Frequenz der Orientierungsänderungen von der Anwesenheit eines Lockstoffes (Attractant) oder eines Schreckstoffes (Repellent) abhängt [15]. Eine Erhöhung der Lockstoffkonzentration resultiert in einem direktionalen gerichteten Schwimmen, bei dem größere Richtungsänderungen unterdrückt sind, während eine Erhöhung der Schreckstoffkonzentration oder eine Erniedrigung der Lockstoffkonzentration zur Beobachtung einer oszillierenden Bewegung mit häufigen Richtungsänderungen führt. Im Falle der vorliegenden Arbeit treten sowohl direktional gerichtete Schwimmmuster wie „Meander“ als auch Muster mit häufigen Richtungswechseln wie „Oszillation“ auf, wobei keine Lock- oder Schreckstoffe eingesetzt wurden und die Verteilung der im Medium enthaltenen Nährstoffe und Chemikalien in der Probenkammer als isotrop angenommen

werden kann. Die Muster „Oszillation“ und „Twist“ werden im Folgenden als sogenannte „Abtastmuster“ zusammengefasst. Denn ähnlich dem Muster „Oszillation“ ändert sich bei dem Muster „Twist“ häufig die Orientierung des Bakteriums. Während bei der „Oszillation“ die Orientierungsänderungen mit scharfen Richtungsumkehrungen verbunden sind, werden beim „Twist“ die Richtungsänderungen durch Schleifen-ähnliche Bewegungen hervorgerufen. Dennoch kann angenommen werden, dass diese beiden Muster die gleiche Absicht verfolgen, nämlich das Abtasten bzw. die Erkundung der Umgebung und das Aufsuchen günstiger Lebensräume. Gemäß Abbildung 4.5B ergibt sich durch Aufsummieren der Muster „Oszillation“ und „Twist“ eine prozentuale Häufigkeit dieser Abtastmuster von 56% und damit ein höheres Vorkommen als die direktionalen Muster, zu denen „Meander“, „Helix“ und „Pseudohelix“ zählen.

Die hier präsentierte Arbeit ist ein erster Schritt zum Verständnis des freien Schwimmverhaltens von *P. aeruginosa* und liefert eine Plattform für weitere Studien zur Korrelation von Motilität, Pathogenität und umgebungsbedingtem Verhalten. Beispielsweise bietet die Motilitätsanalyse verschiedener *P. aeruginosa* Stämme die Möglichkeit zu untersuchen, ob verschiedene Phäno-Gruppen, abhängig von dem natürlichen Ursprung der einzelnen Stämme, existieren und ob deren phänotypische Bewegungsverhalten mit den Virulenz Eigenschaften oder bestimmten transskriptiven Aktivitäten der Stämme korreliert werden kann. Dies wäre ein vielversprechender Ansatz, die Vielseitigkeit von *P. aeruginosa* aufzuzeigen. Des Weiteren kann die Motilitätsstudie des freien Schwimmverhaltens auf oberflächennahes Schwimmen und Oberflächen Besiedlung ausgeweitet werden um die Biofilmbildung auf Einzelzellebene zu studieren. In jedem Fall liefert die Motilitätsstudie auf Einzelzellebene neben den heutigen, üblichen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren zusätzliche Informationen über das Verhalten von *P. aeruginosa*.

4.2 Besiedlungsdynamik und Schwimmverhalten von *Ulva linza*

Zoosporen in Anwesenheit positiv geladener Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichem Arginin-Tyrosin Oberflächenanteil

Während für *P. aeruginosa* im vorherigen Kapitel ausschließlich das freie, planktonische Schwimmverhalten beschrieben wurde, wird nun im folgenden Ergebnisteil sowohl das Schwimmverhalten als auch das Besiedlungsverhalten von *Ulva linza* Zoosporen in Anwesenheit positiv geladener Oligopeptid SAMs analysiert. Zunächst werden die Ergebnisse aus Standard Besiedlungs-Assays mit *Ulva linza* Sporen auf Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichen Arginin-Tyrosin (ArgTyr) und Glycin (Gly) Oberflächenanteilen präsentiert. Wie in Kapitel 3.3.2.1 näher erläutert, handelt es sich dabei um SAMs mit unterschiedlichen Mischverhältnissen von ArgTyr Peptid und Gly Peptid, nämlich 100% / 0% ArgTyr/Gly, 50% / 50% ArgTyr/Gly und 0% / 100% ArgTyr/Gly. Die holographischen Mikroskopiedaten der *Ulva linza* Sporen in beidseitig mit Peptid (100%, 50% und 0% ArgTyr) beschichteten Kanälen werden vor der Analyse vollständiger Trajektorien zunächst integral hinsichtlich der Besiedlungsdynamik analysiert. Daraufhin werden das Schwimmverhalten und der Anlagerungsprozess der Sporen auf den verschiedenen Oligopeptid SAMs anhand von Trajektorien untersucht und in Kontext zu den Ergebnissen der Besiedlungs-Assays und der integralen Analyse gesetzt. Die grundlegenden Erkenntnisse vorangegangener Studien mit verschiedenen Oligopeptid SAMs und Sporen der *Ulva linza* sind in Kapitel 2.2.5 zusammengefasst.

4.2.1 Auswirkungen des Arginin-Tyrosin Oberflächenanteils auf die integrale Besiedlung durch *Ulva linza* Zoosporen in Standard Besiedlungs-Assays

Die positiv geladenen Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichen ArgTyr/Gly Oberflächenverhältnissen mit 100% / 0% ArgTyr/Gly, 50% / 50% ArgTyr/Gly und 0% / 100% ArgTyr/Gly (im Folgenden gemäß dem ArgTyr Oberflächenanteil lediglich als 100%, 50% und 0% ArgTyr bezeichnet) wurden hinsichtlich der Besiedlung durch *Ulva linza* Sporen in Standard Besiedlungs-Assays [25] getestet. Die Standardinkubationszeit der Oberflächen in Sporensuspension von 45 min wurde allerdings auf 30 min verringert, da die Besiedlungsrate in vorangegangenen Studien sehr hoch war [32]. Die verkürzte Assay Dauer gewährleistet eine präzisere und einfachere Analyse der Sporen durch Zählen der gesiedelten Sporen und

Unterscheidung zwischen „pseudo“-gesiedelten und normal gesiedelten Sporen. Die detaillierte Durchführung ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Neben dem Assay mit der Standard Sporenkonzentration von 10^6 Sporen/ml [86] wurde zusätzlich ein Assay mit einer um Faktor fünf verringerten Sporenkonzentration (2×10^5 Sporen/ml) durchgeführt. Diese Sporenkonzentration entspricht der in den holographischen Experimenten verwendeten Konzentration. Die Ergebnisse dieser beiden Besiedlungs-Assays sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Als Kontrolle wurden im Standard Besiedlungs-Assay mit der Standard Sporenkonzentration Nexterion[®] Glasobjekträger mitgeführt. Die Besiedlung auf diesen Glasobjekträgern beträgt 340 Sporen/mm².

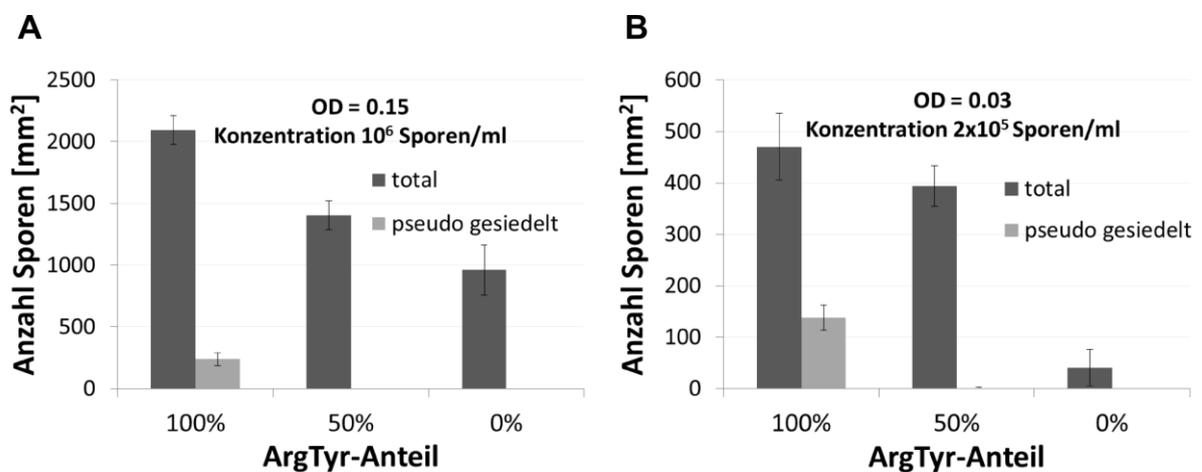


Abbildung 4.13: Besiedlungs-Assays mit *Ulva linza* Sporen auf geladenen Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichen ArgTyr/Gly Oberflächenverhältnissen von 100%, 50% und 0% ArgTyr. Für jede Probe wurden 3 Replikate verwendet auf denen jeweils 10 verschiedene Bildfelder ausgezählt wurden. Aufgetragen ist die Gesamtanzahl an Sporen auf der jeweiligen Oberfläche und die Anzahl an „pseudo“-gesiedelten Sporen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus dem Standardfehler des Mittelwertes ($n = 30$). A) Assay mit der Standard Sporenkonzentration von 10^6 Sporen/ml (entspricht einer optischen Dichte (OD) von 0,15). B) Assay mit einer geringeren Sporenkonzentration von 2×10^5 Sporen/ml (OD = 0.03), entsprechend der Konzentration, die für die holographischen Experimente verwendet wird.

Wie Abbildung 4.13 zeigt, nimmt die Besiedlung der Oberflächen mit steigendem ArgTyr Oberflächenanteil in beiden Besiedlungs-Assays zu. Im Fall von Abbildung 4.13A sind mehr als doppelt so viele Sporen auf der 100% ArgTyr Oberfläche gesiedelt als auf der reinen Gly Oberfläche (0% ArgTyr). Auf der 50% ArgTyr Oberfläche kann eine 1,5-fache Zunahme an

Sporen gegenüber der Gly Oberfläche verzeichnet werden. In Abbildung 4.13B des Assays mit geringerer Sporenkonzentration ist die Besiedlung der 100% ArgTyr Oberfläche sogar 10-fach höher als auf der Gly Oberfläche. Die Besiedlung der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche unterscheidet sich im Rahmen der Fehlergrenzen allerdings kaum. Ein großer Unterschied zwischen der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche liegt in der Beobachtung „pseudo“-gesiedelter Sporen auf der 100% ArgTyr Oberfläche. Auf der 50% ArgTyr Oberfläche können nach 30 min Inkubationszeit ausschließlich normal gesiedelte Sporen beobachtet werden. Auch auf der reinen Gly Oberfläche wird keine „pseudo“-Besiedlung festgestellt.

Ederth et al. konnten in vorherigen Studien bereits zeigen, dass die Besiedlung der ArgTyr Oberflächen mit Sporen extrem schnell vonstatten geht (siehe Kapitel 2.2.5, Abbildung 2.11) [33]. Die meisten der gesiedelten Sporen (78%) sind dabei zunächst „pseudo“-gesiedelt. Gleichzeitig wurde eine Abnahme des prozentualen Anteils an „pseudo“-gesiedelten Sporen in der Sporenpopulation auf der Oberfläche mit der Zeit beobachtet, was hauptsächlich auf die Möglichkeit zurückgeführt wurde, dass sich die abnormal angehafteten Sporen reorientieren und den normalen Besiedlungsprozess durchlaufen.

Da in den Besiedlungs-Assays in Abbildung 4.13 nach 30 min keine „pseudo“-gesiedelten Sporen auf der 50% ArgTyr Oberfläche auftreten, konnten demnach alle Sporen den normalen Besiedlungsprozess durchlaufen. Auf der 100% ArgTyr Oberfläche in Abbildung 4.13A befinden sich noch 11% der Sporen in einem „pseudo“-gesiedelten Zustand. Das bedeutet auch auf der reinen ArgTyr Oberfläche konnten sich die meisten Sporen (89%) reorientieren und normal siedeln. In Abbildung 4.13B des Assays mit verringerter Sporenkonzentration sind es 29% „pseudo“-gesiedelte Sporen. Allgemein führt der geringere ArgTyr Oberflächenanteil der 50% Oberfläche zu einer geringeren Gesamtbesiedlung mit Sporen und scheint den normalen Besiedlungsprozess der Sporen zu erleichtern.

Abbildung 4.14 zeigt drei Beispiele der Lichtmikroskopischen Aufnahmen der 100%, 50% und 0% ArgTyr Proben, die zur Auswertung des Besiedlungs-Assays in Abbildung 4.13A ausgezählt wurden. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Oberflächen zu erkennen.

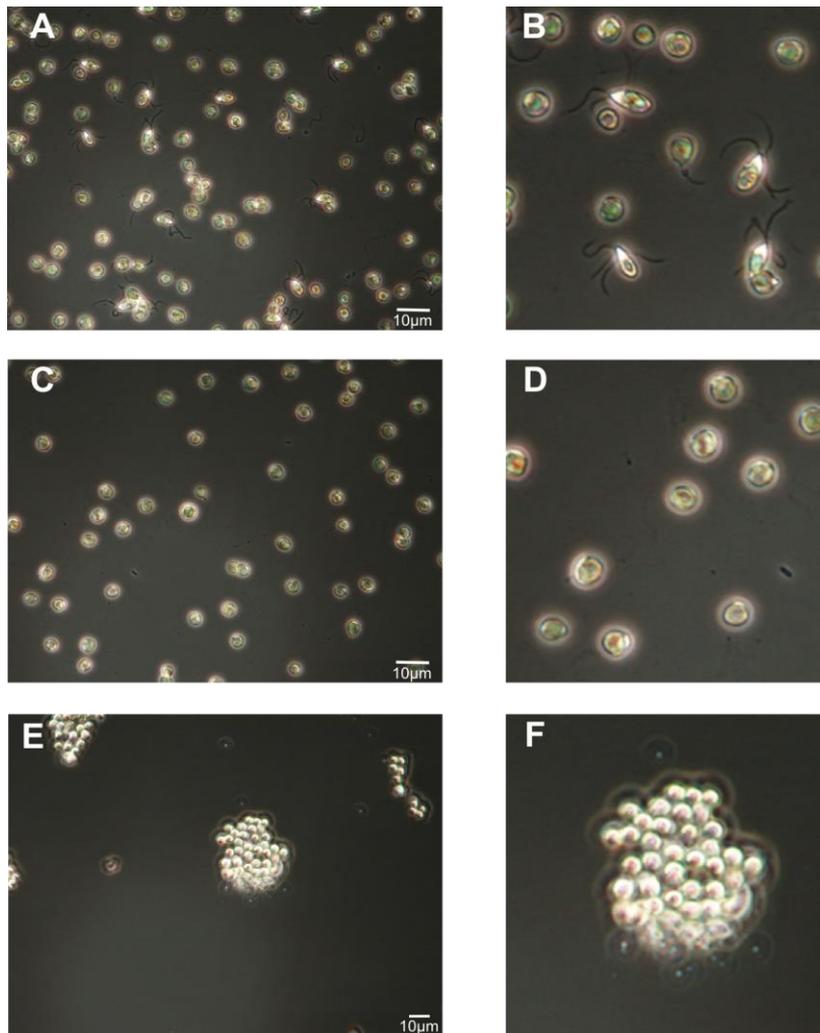


Abbildung 4.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen gesiedelter *Ulva linza* Sporen auf einer A-B) 100% ArgTyr Oberfläche, C-D) 50% ArgTyr Oberfläche und E-F) 0% ArgTyr Oberfläche. Zur besseren Veranschaulichung der Form der gesiedelten Sporen sind in B), D) und F) Ausschnitte der jeweiligen Aufnahmen A), C) und E) vergrößert dargestellt.

Auf der 100% ArgTyr Oberfläche sind neben den normal runden Sporen deutlich birnenförmige Sporen mit Flagellen zu erkennen („pseudo“-gesiedelte Sporen), die seitlich an der Oberfläche anhaften (siehe Abbildung 4.14B), während auf der 50% ArgTyr Oberfläche alle Sporen normal rund sind. Auf beiden ArgTyr enthaltenden Oberflächen sind die Sporen einzeln homogen auf der Oberfläche verteilt. Auf der reinen Gly Oberfläche (= 0% ArgTyr; Kontaktwinkel: $41^\circ \pm 1^\circ$ [33]) siedeln die Sporen hingegen meist in Gruppen und bilden ein sogenanntes „raft“, wie es beispielsweise bei hydrophoben Oberflächen oft zu beobachten ist [26, 81]. Die „raft“ Bildung bietet den Sporen auf glatten Oberflächen insofern einen Vorteil, da sie dadurch besser gegen Scherbelastungen geschützt sind. Auch bei Ethylenglykol-OH

(EG₂₋₆-OH) SAMs auf denen die Sporen eine geringe Haftstärke aufweisen, kann eine „raft“ Bildung beobachtet werden [84]. Ob bereits gesiedelte Sporen die Anlagerung weiterer Sporen fördert ist noch nicht geklärt. Dennoch können bei den Sporen kooperative Effekte nachgewiesen werden, die zur Besiedlung in Gruppen führt [81].

4.2.2 Integrale Analyse des Schwimm- und Besiedlungsverhaltens auf der Grundlage holographischer Daten

Anders als bei biologischen Standard Besiedlungs-Assays, bei denen nur bestimmte Besiedlungszeitpunkte abgebildet werden, können mit Hilfe der holographischen Mikroskopie Videoaufnahmen angefertigt werden, mit denen die Besiedlungsdynamik der Sporen vom Zeitpunkt ihrer Injektion in die Probenkammer bis mehrere Minuten nach der Injektion verfolgt werden kann. Daher wurde in dieser Arbeit die holographische Mikroskopie angewendet, um die Besiedlung der Oligopeptid Oberflächen direkt nach der Sporen Injektion zu verfolgen und den Anlagerungsprozess der Sporen an die Oberflächen anhand von Trajektorien zu untersuchen. Für alle drei Oligopeptid Oberflächen mit 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächenanteil wurden holographische Sequenzen mit einer Gesamtdauer von 10 min und einer Bildwiederholungsfrequenz von 15 Hz aufgenommen. Bevor die Sporen hinsichtlich ihrer Trajektorien untersucht wurden, wurde die Schwimmaktivität der Sporen während der ersten 4 min nach Injektion in die Probenkammer analysiert. Diese Aktivitätsanalyse beruht prinzipiell auf der Bestimmung von Fluktuationen zwischen aufeinanderfolgenden Hologrammen. Im Detail wurden zur Bestimmung der Aktivitätswerte durch Subtraktion zweier aufeinanderfolgender Hologramme Differenzhologramme gebildet. Statische Sporen wurden somit aus dem Differenzhologramm entfernt und nur diejenigen Sporen, die sich bewegten blieben in dem Interferenzmuster enthalten. Daraufhin wurden Abweichungen der einzelnen Pixelgrauwerte in einem Differenzhologramm von einem mittleren Pixelwert bestimmt. Die Aufsummierung dieser Pixelwertabweichungen über 75 Differenzhologramme ergibt einen Wert für die Sporenaktivität innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 5 s.

Die zeitliche Änderung der Schwimmaktivität der Sporen ist in Abbildung 4.15A gezeigt. Für die Darstellung wurden die Aktivitätswerte von drei individuellen Datensätzen für die jeweilige Oberfläche (100%, 50% und 0% ArgTyr) bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die einzelnen bestimmten Aktivitätswerte wurden auf die Anfangsaktivität des jeweiligen Datensatzes normiert.

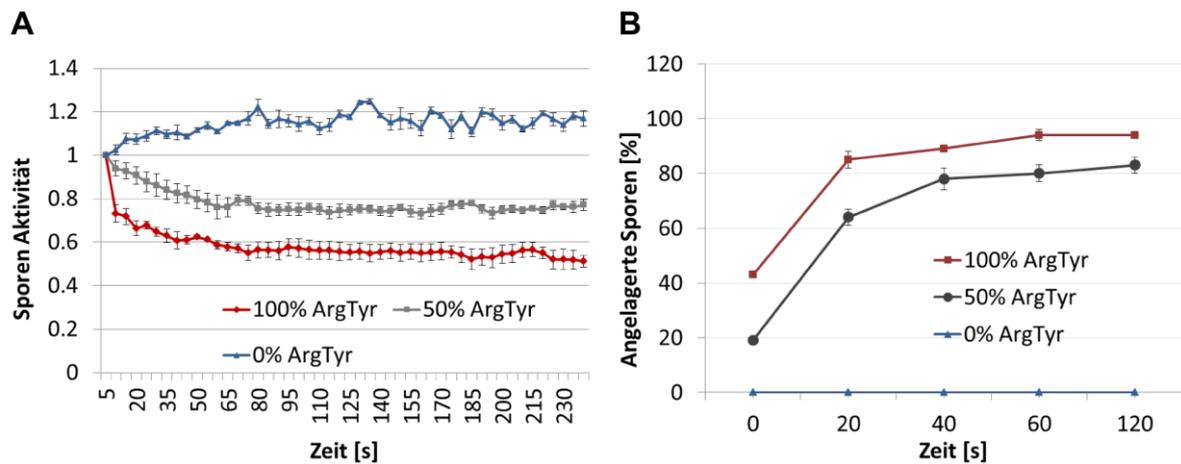


Abbildung 4.15: A) Zeitliche Entwicklung der Sporenaktivität in Probenkanälen mit Oligopeptid Oberflächen mit 100% (rote Kurve), 50% (graue Kurve) und 0% (blaue Kurve) ArgTyr Oberflächenanteil. Die angegebenen Aktivitäten repräsentieren den Mittelwert dreier individueller Datensätze der jeweiligen Oberfläche. Die Fehlerindikatoren ergeben sich aus dem Standardfehler der Mittelwertbildung. B) Anteil der an die verschiedenen Oberflächen angelagerten Sporen für die Gesamtpopulation an Sporen im Bildfeld in Abhängigkeit von der Zeit. Der Anteil zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ repräsentiert die Anzahl an Sporen die sich während der Injektion angeheftet sind. Der Fehler resultiert aus der Standardabweichung der Berechnung der mittleren Anzahl an Sporen im Bildfeld.

Für die 100% ArgTyr Oberfläche kann eine rapide Abnahme der Schwimmaktivität innerhalb der ersten 10-15 s nach Sporeinjektion beobachtet werden. Danach verringert sich die Aktivität stetig weiter bis zu einem minimalen Wert bei 75 s. Anschließend kleine Fluktuationen um diesen minimalen Wert sind auf kleine Bewegungen angehefteter Sporen oder auf langsame Bewegungen einzelner Sporen zurückzuführen. Die Sporenaktivität bei der 50% ArgTyr Oberfläche verringert sich ebenfalls mit der Zeit. Allerdings zeigt sich eine langsamere stetige Abnahme als bei der 100% ArgTyr Oberfläche, bis auch hier nach 80 s ein minimaler Aktivitätswert erreicht wird. Danach verbleiben die Aktivitätswerte auf diesem Level. Die Schwimmaktivitäten der Sporen bei der 0% ArgTyr Oberfläche zeigen einen komplett anderen Trend. In diesem Fall erhöht sich die Sporenaktivität insgesamt und auch die Fluktuationen der Aktivitätswerte nehmen mit der Zeit zu.

Abbildung 4.15B zeigt wie sich der Anteil der Sporen, die sich an die verschiedenen Oligopeptid Oberflächen angelagert haben, mit der Zeit ändert. Für diese Analyse wurden die Hologramme für die ersten 2 min nach Sporeinjektion rekonstruiert. Die Anzahl an

anhaftenden Sporen an den Kanalwänden und die mittlere Gesamtanzahl an Sporen im Bildfeld wurden separat in verschiedenen Zeitintervallen von 20 s in den XZ- bzw. XY-Projektionen der rekonstruierten Hologramme bestimmt. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Anteil an anhaftenden Sporen in Bezug auf die mittlere Gesamtpopulation an Sporen im Bildfeld. Der Prozentsatz bei $t_0 = 0$ entspricht dem Anteil der während der Injektion angehafteten Sporen. Bei der 100% ArgTyr Oberfläche sind bereits 43%, d.h. fast die Hälfte aller Sporen im Bildfeld, während der Injektion angehaftet. Weitere 42% lagern sich innerhalb der ersten 20 s nach der Injektion an. Das heißt zu einem Zeitpunkt 20 s nach Sporeninjektion befinden sich bereits 85% der Sporen im Bildfeld auf der 100% ArgTyr Oberfläche. Im Laufe des Beobachtungszeitraums von 2 min vergrößert sich dieser Anteil bis auf 94%. Im Falle der 50% ArgTyr Oberfläche sind es nur 19% der Sporen im Bildfeld, die schon während der Injektion an die Oberfläche angehaftet sind. Dieser Anteil vergrößert sich nach den ersten 20 s nach der Injektion auf 64% und nach dem Gesamtbeobachtungszeitraum von 2 min auf 83%. Insgesamt ist der Anteil an Sporen auf der 50% ArgTyr Oberfläche zu jedem Zeitpunkt geringer bzw. der Anteil an schwimmenden Sporen größer als auf der 100% ArgTyr Oberfläche. Aber bei beiden ArgTyr enthaltenden Oberflächen (50% und 100%) erfolgt der größte Anstieg der Sporenanlagerung innerhalb der ersten 20 s nach der Sporeninjektion. Auf der reinen Gly Oberfläche können keine angehafteten Sporen detektiert werden. Der abrupte Abfall der Sporenaktivität für die 100% ArgTyr und die stetige Abnahme der Aktivität für die 50% ArgTyr Oberfläche, dargestellt in Abbildung 4.15A, ist somit auf die schnelle, zahlreiche Anlagerung der Sporen an diese Oberflächen und die damit verbundene Verarmung an schwimmenden Sporen in Lösung zurückzuführen.

4.2.3 Analyse des Schwimm- und Besiedlungsverhaltens der *Ulva linza*

Sporen mittels 3D-Tracking

Zur Untersuchung des Anlagerungsprozesses der Sporen an die ArgTyr enthaltenden Oligopeptid Oberflächen wurden für die jeweiligen Datensätze die Trajektorien schwimmender Sporen im Bildfeld für die ersten 2 min nach Sporeninjektion bestimmt. Die Ausmaße des Bildfeldes bei diesen Messungen betragen $0,34 \text{ mm}^2$ in der Ebene zur Lochblende hin orientiert und $0,97 \text{ mm}^2$ in der Ebene zum Detektor hin orientiert. Abbildung 4.16 zeigt die bestimmten Trajektorien jeweils eines Datensatzes für die verschiedenen Oberflächen mit 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächenanteil. Obwohl bei jeder Messung die gleiche Sporendichte verwendet wurde (2×10^5 Sporen/ml), unterscheidet sich die Anzahl

an schwimmenden Sporen, die zur Trajektorien Bestimmung vorhanden sind, erheblich zwischen der 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberfläche. Für die 100% ArgTyr Oberfläche konnten in dem gezeigten Datensatz in Abbildung 4.16A-C 32 Trajektorien bestimmt werden, da sich schon sehr viele Sporen während der Injektion an die Oberfläche angelagert haben. Für die 50% ArgTyr Oberfläche wurden 84 Trajektorien (Abbildung 4.16D-F) und für die 0% ArgTyr Oberfläche 141 Trajektorien (Abbildung 4.16G-I) bestimmt.

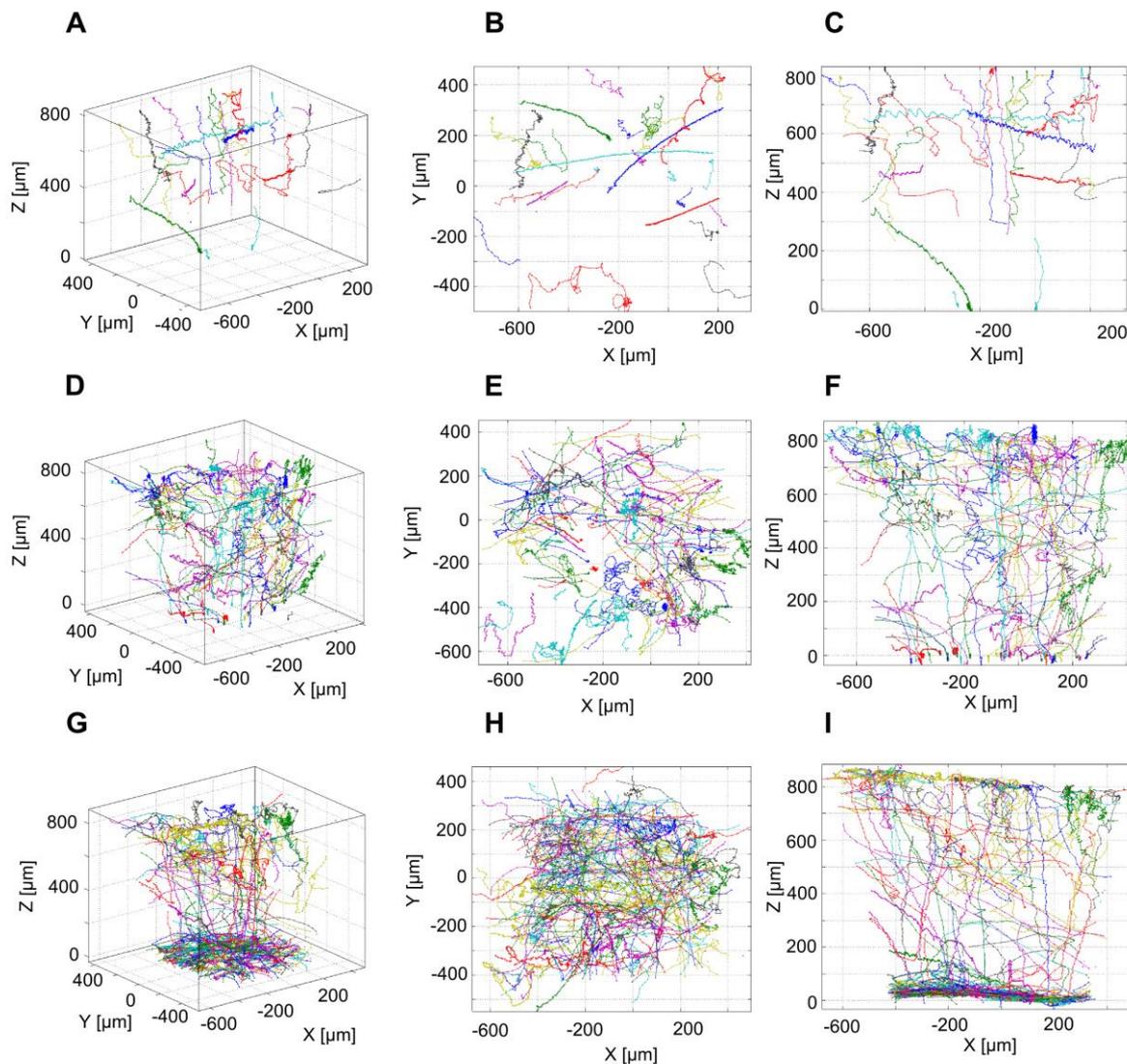


Abbildung 4.16: Trajektorien von *Ulva linza* Sporen in Probenkanälen mit A-C) 100% ArgTyr Oberflächen, D-F) 50% ArgTyr Oberflächen und G-I) 0% ArgTyr (=100% Gly) Oberflächen. Gezeigt sind 3D-Ansichten und XY- bzw. XZ-Ebenenprojektionen aller Trajektorien eines Datensatzes. Die einzelnen Trajektorien besitzen zur Unterscheidung verschiedene Farben.

4.2.3.1 Das „Hit and stick“ Muster

Bei Betrachtung der Trajektorien für die verschiedenen Oberflächen in Abbildung 4.16 lassen sich deutlich Verhaltensunterschiede der Sporen zwischen den ArgTyr enthaltenden Oberflächen und der reinen Gly Oberfläche (0% ArgTyr) erkennen. Bei der Gly Oberfläche in Abbildung 4.16G-I akkumulieren die Sporen nahe der Oberfläche, bleiben dort allerdings in

Bewegung. Die Sporen zeigen das „Gyration“ Schwimmmuster, welches durch eine Schwimmbewegung parallel zur Oberfläche mit gelegentlichen Oberflächenkontakten gekennzeichnet ist (siehe Kapitel 2.4.5). Längere oder permanente Oberflächenkontakte können für diese Oberfläche während des Beobachtungszeitraums nicht verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit des ArgTyr auf den 100% und 50% ArgTyr Oberflächen zu einem „Hit and stick“ Verhalten der Sporen. Das bedeutet, dass die Sporen direkt beim ersten Kontakt mit der ArgTyr Oberfläche von dieser „eingefangen“ werden und gewissermaßen kleben bleiben. Die Tatsache, dass auf der 100% ArgTyr Oberfläche wesentlich mehr Sporen schon während der Injektion kleben bleiben als auf der 50% ArgTyr Oberfläche zeigt, dass die „Klebrigkeit“ mit steigendem ArgTyr Gehalt zunimmt, was auch die stärkere Besiedlung der 100% ArgTyr Oberfläche in dem Standard Besiedlungs-Assay zur Folge hat (vgl. Abbildung 4.13).

Einige repräsentative Trajektorien, die das „Hit and stick“ Muster zeigen sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

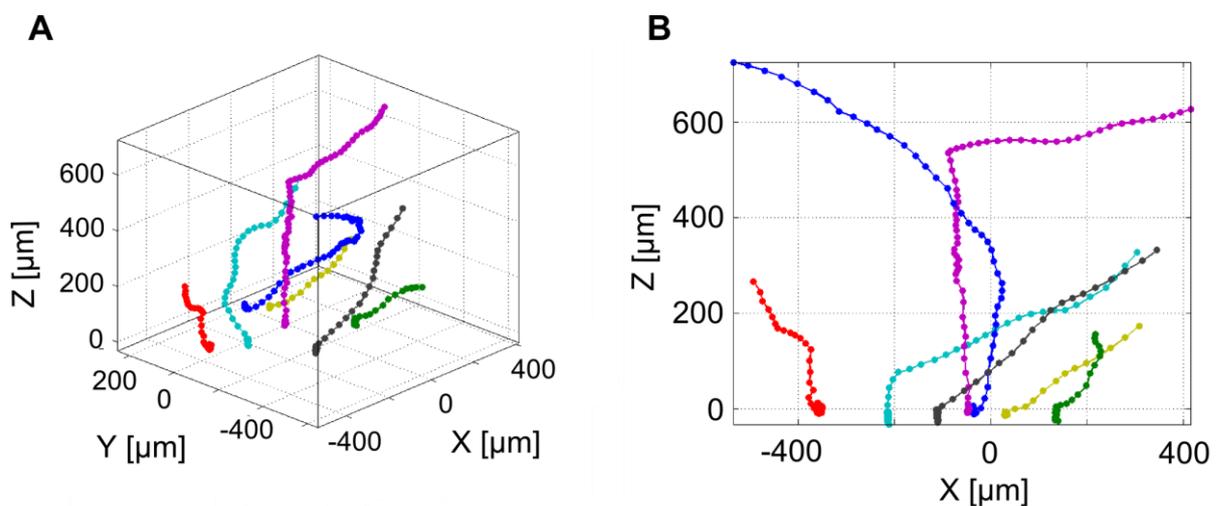


Abbildung 4.17: A) 3-dimensionale Darstellung repräsentativer Trajektorien des „Hit and stick“ Schwimmusters auf der 50% ArgTyr Oberfläche. B) XZ-Ebenenprojektion der „Hit and stick“ Trajektorien zur Veranschaulichung der gezielten Annäherung der Sporen an die Oberfläche.

Das „Hit and stick“ Schwimmmuster ist neben dem Festkleben der Sporen beim ersten Oberflächenkontakt gekennzeichnet durch eine gezielte, fast vertikale Annäherung der Sporen an die Oberfläche (siehe Abbildung 4.17B). Der Annäherungswinkel α_z zur

Oberflächennormalen beträgt im Mittel für alle „Hit and stick“ Trajektorien $146^\circ \pm 21^\circ$ (Definition von α_z siehe Kapitel 3.5.3). Ein Winkel von $\alpha_z = 180^\circ$ würde bedeuten, dass die Sporen senkrecht auf die Oberfläche zu schwimmen. Bei einem Winkel von $\alpha_z = 90^\circ$ würden die Sporen parallel zur Oberfläche schwimmen.

In Abbildung 4.18 sind alle detektierten Sporen in den ersten 2 min der jeweiligen holographischen Videos für die 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächen in drei Gruppen eingeteilt: (1) Sporen, die während der Injektion an die Oberflächen festkleben, (2) Sporen, die während der 2 min Beobachtungszeit das „Hit and stick“ Muster zeigen und (3) Sporen, die in anderen Mustern („Orientation“, „Gyration“ oder „Wobbling“) schwimmen ohne sich permanent an eine Oberfläche anzulagern oder festzukleben. Gezeigt ist die Verteilung dieser drei Gruppen in den jeweiligen Experimenten mit 100%, 50% und 0% ArgTyr. Auch in dieser Verteilungsanalyse zeigt sich die sehr attraktive und klebrige Eigenschaft der ArgTyr enthaltenden Oligopeptid Oberflächen. Auf der reinen 100% ArgTyr Oberfläche kleben bereits ein Drittel der während der 2 min Messdauer vorhandenen Sporen (34%) während der Injektion an der Oberfläche (1). Für die gemischte 50% ArgTyr Oberfläche liegt dieser Wert bei nur 8% und für die reine Gly Oberfläche bei 0%. Der Anteil des „Hit and stick“ Schwimmmusters (2) liegt für beide ArgTyr Oberflächen, 100% und 50% ArgTyr, mit jeweils 40% und 38% in einem ähnlichen Bereich. Für die reine Gly Oberfläche kann nur für eine einzelne Spore (<1%) „Hit and stick“ Verhalten beobachtet werden. Deutliche Unterschiede zwischen allen Oberflächen zeigen sich wiederum in der Anzahl an schwimmenden Sporen (3), die ein anderes Schwimmmuster als das „Hit and stick“ Muster aufweisen. Bei der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche handelt es sich dabei meist um Sporen in Lösung, die während des Beobachtungszeitraumes aus dem Bildfeld schwimmen. Was außerhalb des Bildfeldes mit diesen Sporen geschieht, bzw. ob sie außerhalb des Bildfeldes an die Oberfläche kleben kann nicht detektiert werden. Daher werden diese Sporen der Gruppe (3) zugeordnet. Für die 50% ArgTyr Oberfläche lassen sich mehr als doppelt so viele schwimmende Sporen der Gruppe (3) beobachten als für die 100% ArgTyr Oberfläche. Dies korreliert wiederum mit der Beobachtung in Abbildung 4.15, dass durch die rapide Anlagerung der Sporen auf der 100% ArgTyr Oberfläche die Anzahl der schwimmenden Sporen in Lösung erschöpft wird. Bei der reinen Gly Oberfläche zeigen 99% der detektierten Sporen ein anderes Schwimmmuster als das „Hit and stick“. Hierbei handelt es sich wie bereits erwähnt hauptsächlich um das „Gyration“ Muster.

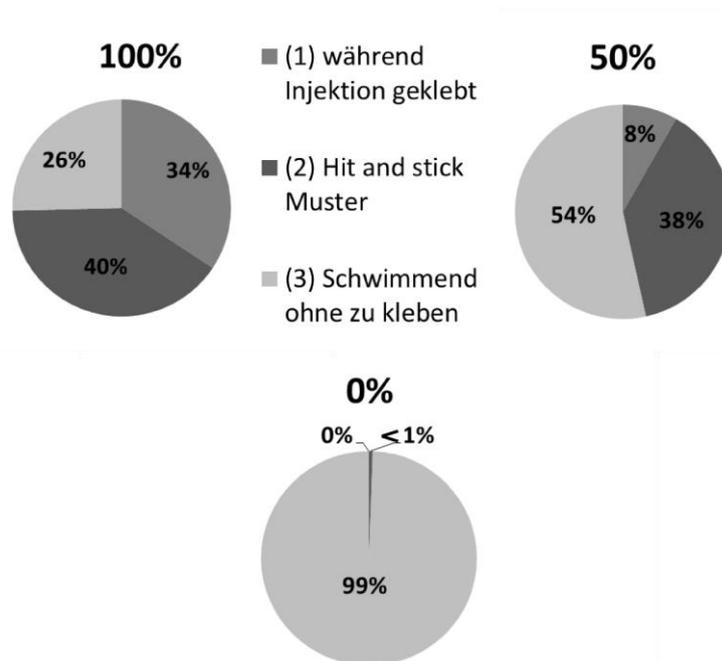


Abbildung 4.18: Einteilung der in den jeweiligen holographischen Videos für die 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächen detektierten Sporen in drei Gruppen und prozentuale Verteilung dieser Gruppen in den jeweiligen Experimenten. (1) Sporen, die während der Injektion an der Oberflächen festklebten, (2) Sporen, die während der 2 min Beobachtungszeit das „Hit and stick“ Muster zeigen und (3) Sporen, die mit verschiedenen Mustern schwimmen ohne an eine Oberfläche festzukleben.

4.2.3.2 Das „Wobbling“ Muster

Neben dem „Hit and stick“ gibt es ein weiteres Schwimmmuster, das für die ArgTyr enthaltenden Oligopeptid Oberflächen beobachtet wird, und zwar das „Wobbling“ Muster. Dieses Muster tritt bei 35% der Sporen auf, die in Abbildung 4.18 der 100% ArgTyr Oberfläche zur Gruppe (3) der schwimmenden Sporen zugeordnet wurden. Repräsentative Trajektorien dieses Musters sind in Abbildung 4.19 gezeigt. Das „Wobbling“ Muster ist für oberflächenferne Sporen in Lösung zu beobachten und unterscheidet sich von den üblichen Trajektorien des „Orientation“ Musters durch ein eher zick-zack ähnliches Verhalten mit häufigen Richtungsänderungen [130]. Die wahrscheinlichste Geschwindigkeit der Sporen beim „Wobbling“ Schwimmmuster liegt bei ca. 52 $\mu\text{m/s}$ (siehe Abbildung 4.19C) und ist damit typischerweise langsamer als bei Sporen mit „Orientation“ Muster ($> 100 \mu\text{m/s}$) [29].

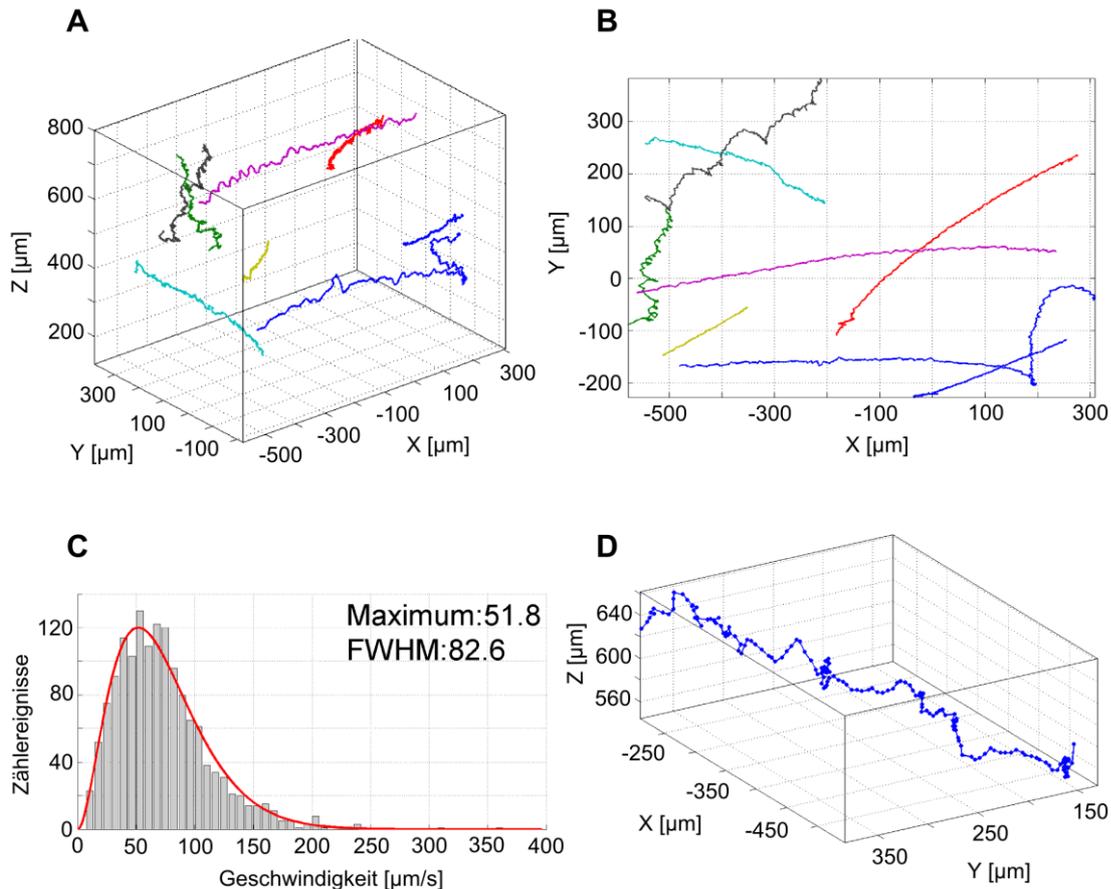


Abbildung 4.19: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien des „Wobbling“ Schwimmmusters für die 100% ArgTyr Oberfläche. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über die Trajektorien gezeigt in A) bzw. B) mit der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits. D) Detaillierte 3D-Ansicht einer einzelnen Trajektorie des „Wobbling“ Musters.

Das Auftreten des „Wobbling“ Musters wurde von Iken et al. in einer früheren Studie auf beschädigte oder irritierte Algensporen zurückgeführt [131]. Da dieses Muster in der vorliegenden Studie nur bei den ArgTyr enthaltenden Oberflächen beobachtet wird, wäre eine mögliche Erklärung, dass die Sporen während eines Oberflächenkontaktes durch die starke Wechselwirkung mit dem kationischen Peptid beschädigt wurden. Wahrscheinlich handelt es sich um Sporen, die während der Einspülphase in den Probenkanal mit der ArgTyr Oberfläche in Kontakt kamen und durch die hohen Scherkräfte während der Sporeninjektion wieder von der Oberfläche weggerissen wurden. Dabei können beispielsweise Beschädigungen der

Flagellen auftreten, die dazu führen, dass Sporen das beschriebene „Wobbling“ Muster zeigen.

4.2.3.3 Das „Twitching“ Muster

Die Sporen, die auf der 100% und 50% ArgTyr Oberfläche entweder während der Injektion oder innerhalb des Beobachtungszeitraumes in Folge des „Hit and stick“ Musters, festkleben, verbleiben während des Aufnahmezeitraumes von 10 min in den meisten Fällen regungslos auf der Oberfläche. Auf der 100% ArgTyr Oberfläche kann allerdings für 20% der festklebenden Sporen eine zuckende Bewegung beobachtet werden, die im Folgenden als „Twitching“ Muster bezeichnet wird. Auf der 50% ArgTyr Oberfläche zeigen 28% der festklebenden Sporen das „Twitching“ Muster. In Abbildung 4.20a-b sind zwei repräsentative Beispiele von Sporen gezeigt, die die typischen zuckenden Bewegungen des „Twitching“ Musters ausführen. Zum Vergleich ist eine regungslose statische Spore in Abbildung 4.20c dargestellt. Beim „Twitching“ sind die Sporen in Kontakt mit der Oberfläche und zeigen eine Art Zappelbewegung wie sie in Abbildung 4.20a mit einem Pfeil angedeutet ist. Dabei lassen sich deutliche Änderungen der Sporenkörperposition für die zappelnden Sporen im Gegensatz zu statischen Sporen erkennen, wie in Abbildung 4.20 beispielhaft gezeigt ist. Die Änderung der Sporenposition erfolgt dabei immer in eine bestimmte Richtung. Die Spore in Abbildung 4.20a (grün) zeigt etwas größere Auslenkungen des Sporenkörpers als die Spore in Abbildung 4.20b (blau), was zeigt, dass die Dynamik der „Twitching“ Bewegung sich zwischen verschiedenen Sporen unterscheidet und am wahrscheinlichsten von der Anlagerungsgeometrie der Sporen auf der Oberfläche abhängt. In Abbildung 4.21 ist exemplarisch die Bewegungsdynamik der in Abbildung 4.20 gezeigten Sporen durch Auftragung der Auslenkung bzw. Verrückung des Sporenkörpers in XY-Richtung in Abhängigkeit von der Zeit illustriert. Die Schwerpunktsänderung des Sporenkörpers entspricht der Länge des Vektors zwischen zwei aufeinanderfolgenden Sporenpositionen in der XY-Ebene.

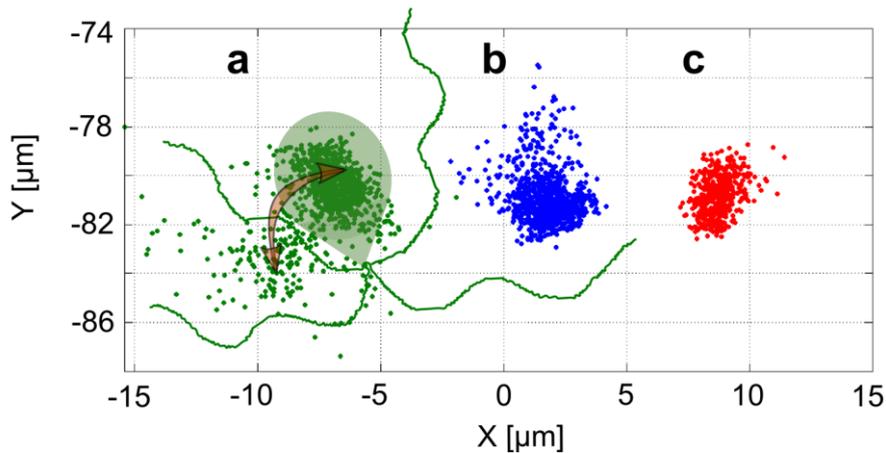


Abbildung 4.20: Vergleich der Bewegungsdynamik zweier repräsentativer Sporen mit dem „Twitching“ Muster auf der 50% ArgTyr Oberfläche im Vergleich zu einer statischen Spore. a) und b) XY-Ebenenprojektion der Sporen mit dem „Twitching“ Muster, c) XY-Ebenenprojektion der statischen Spore. Zur besseren Veranschaulichung der Größenverhältnisse wurde der Sporenkörper schematisch in die Darstellung eingefügt. Der Pfeil deutet die Zappelbewegung der Spore an.

Das „Twitching“ Muster ist generell gekennzeichnet durch unbewegliche Abschnitte, die plötzlich von kurzen Zappelbewegungen unterbrochen werden, wie es in Abbildung 4.21A-B beispielhaft dargestellt ist. Die Sporen scheinen statisch auf der 50% ArgTyr Oberfläche festzukleben aber zwischen den statischen Phasen der Spore erfolgen kurze „Twitching“ Phasen erkennbar durch Auslenkungen der Spore in XY-Richtung. Bei der Spore in Abbildung 4.20a erreichen diese Auslenkungen Dimensionen von bis zu 4-5 μm in XY-Richtung (siehe Abbildung 4.21A). Diese Auslenkungen sind allgemein sehr kurz (1-2 s), das heißt die Sporen zucken nur kurz zu einer Seite und gehen dann wieder in ihre Ausgangsposition zurück. Die Spore in Abbildung 4.20b zeigt weniger ausgeprägte, doch trotzdem erkennbare Auslenkungen von max. 3 μm in XY-Richtung (siehe Abbildung 4.21B). Bei der statischen Spore in Abbildung 4.21C können keine XY-Auslenkungen außerhalb des üblichen Rauschens detektiert werden. Bei keiner der Sporen, die das „Twitching“ Muster zeigt kann eine bestimmte Frequenz der „Twitching“ Phasen beobachtet werden.

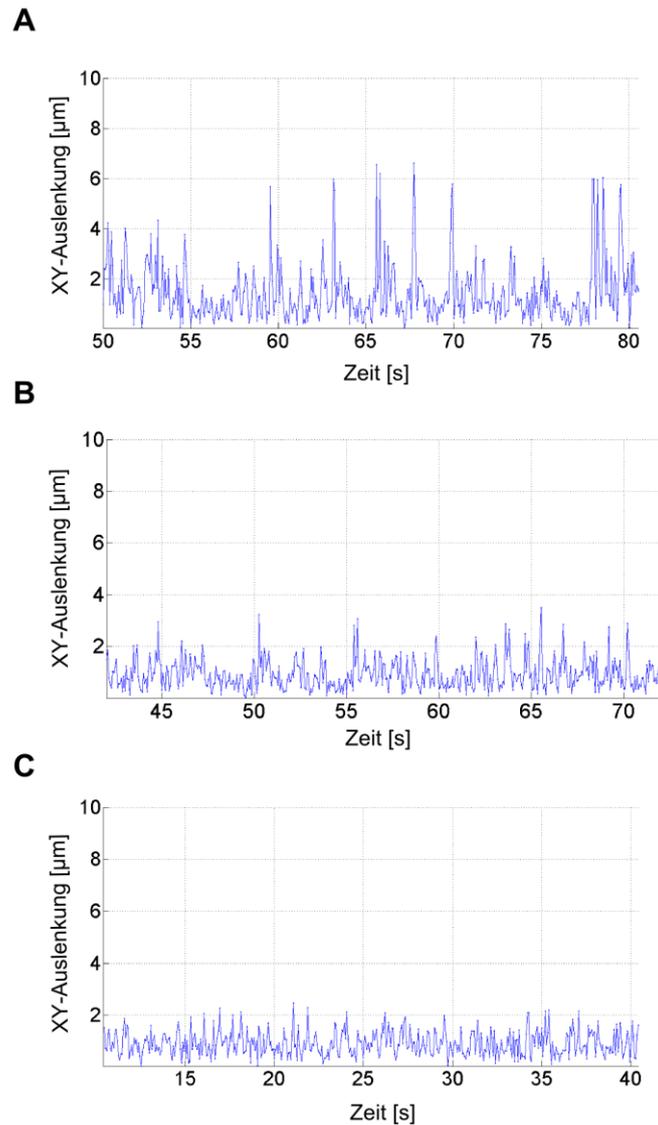


Abbildung 4.21: Zeitliche Entwicklung der XY-Auslenkung bzw. -Verrückung des Sporenkörpers der auf der 50% ArgTyr Oberfläche festklebenden Sporen aus Abbildung 4.20. A) zappelnde Spore aus Abbildung 4.20a (grün), B) zappelnde Spore aus Abbildung 4.20b (blau) und C) statische Spore aus Abbildung 4.20c (rot). Die Zeitpunkte in den jeweiligen Auftragungen beziehen sich auf den Beginn der Messung.

Neben diesem zuvor beschriebenen typischen „Twitching“ Muster mit kurzen zappelnden Bewegungen zeigen 12% dieser Sporen zusätzlich temporäre oder permanente Verrückungen des Sporenkörpers mit teilweise größeren Auslenkungen. Zwei repräsentative Beispiele dafür sind in Abbildung 4.22 gezeigt. In den Teilabbildungen B und D sind, anders als in Abbildung

4.21, die absoluten X- und Y-Koordinaten des Sporenkörpers gegen die Zeit aufgetragen um die temporären und permanenten Verrückungen zu visualisieren.

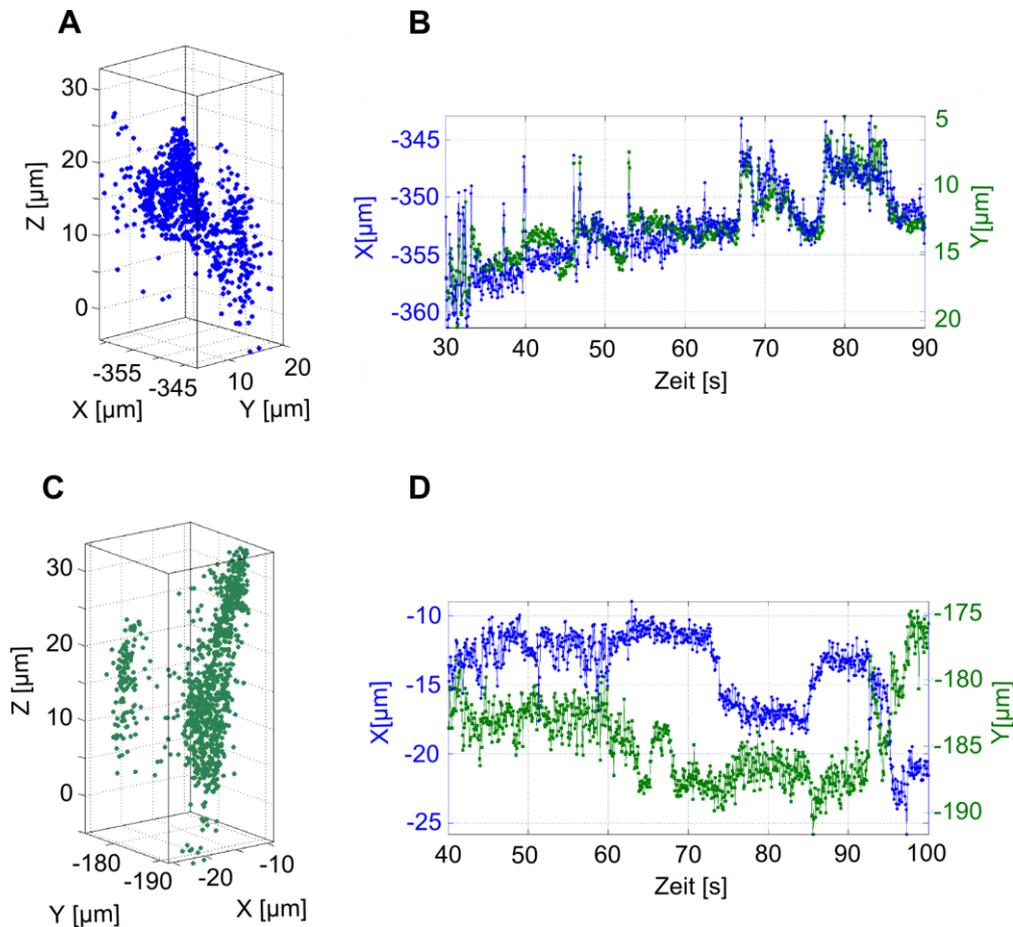


Abbildung 4.22: Repräsentative Sporen mit dem „Twitching“ Muster auf der 50% ArgTyr Oberfläche mit länger anhaltenden Verrückungen des Sporenkörpers. A) und C) 3D-Ansicht der zappelnden Sporen, B) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aus A) aufgetragen gegen die Zeit. D) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aus C) aufgetragen gegen die Zeit.

Im Beispiel aus Abbildung 4.22A beginnt die Spore direkt nach dem ersten Oberflächenkontakt für ca. 5 s mit einer hohen Frequenz zu zappeln. Danach bleibt sie statisch und zeigt etwa alle 5-10 s nur noch einzelne Zappelbewegungen. Etwa 46 s nachdem diese Spore an die 50% ArgTyr Oberfläche festgeklebt ist zeigt sie Verrückungen um ca. 5 μm die etwa 10 s andauern. Schließlich kehrt die Spore wieder in ihre Anfangsposition zurück. Ein ähnliches Verhalten zeigt die Spore in Abbildung 4.22C. Auch bei dieser lässt sich 33 s nach dem ersten Festkleben eine länger anhaltende Verrückung des Sporenkörpers

beobachten. Diese Spore kehrt allerdings nach der letzten Auslenkung 55 s nach dem ersten Oberflächenkontakt nicht mehr in ihre anfängliche Position zurück.

4.2.3.4 Vergleich des „Hit und stick“ Schwimmusters auf geladenen ArgTyr Oligopeptid SAMs und auf perfluorierten Silan SAMs (FOTS)

Das „Hit and stick“ Schwimmuster wurde bereits in der Arbeit von M. Heydt als charakteristisches Muster, das auf hydrophoben perfluorierten Silan SAMs (FOTS) zu beobachten ist, beschrieben [29, 167]. Bei dieser Oberfläche tritt das „Hit and stick“ Muster in den ersten 3 min nach Sporeinjektion auf. Danach verringert sich die Wahrscheinlichkeit dieses Musters, was hauptsächlich auf die Konditionierung der Oberfläche zurückgeführt wird. Das „Hit and stick“ Muster auf FOTS beinhaltet immer vier Phasen: (1) Die Oberflächenannäherung, (2) die „Sticking“ Phase, (3) die „Spinning“ Phase und (4) das „Settlement“ oder „Detachment“ [167]. Wie bei dem zuvor beschriebenen „Hit and stick“ Muster auf ArgTyr enthaltenden Oligopeptid Oberflächen werden die Sporen von der FOTS Oberfläche eingefangen und bleiben an dieser haften. Die Annäherung der Sporen an die FOTS Oberfläche geschieht analog zur ArgTyr Oberfläche mit einem großen Annäherungswinkel $\alpha_z = 140^\circ \pm 26^\circ$ und wird aufgrund der hohen Geschwindigkeit in der Nähe der Oberfläche von M. Heydt als „crash into the surface“ bezeichnet [167]. Nach einer kurzen „Sticking“ Phase auf der FOTS Oberfläche beginnen alle Sporen mit der „Spinning“ Bewegung. Diese kann wenige Sekunden bis mehrere Minuten andauern. In den meisten Fällen verlassen die Sporen nach dem „Spinning“ die Oberfläche wieder („Detachment“). Nur in wenigen Fällen, wenn die „Spinning“ Phase lange genug andauert, wird der Siedlungsprozess initiiert. Die komplette statistische Auswertung des Schwimmverhaltens der *Ulva* Sporen in Anwesenheit der FOTS Oberfläche findet sich in der Dissertation von M. Heydt [167]. Zur Veranschaulichung des „Hit and stick“ Verhaltens auf der FOTS Oberfläche wurde in dieser Arbeit beispielhaft eine Spore auf dieser Oberfläche getrackt. Abbildung 4.23 zeigt die Spore direkt nach Auftreffen auf die Oberfläche.

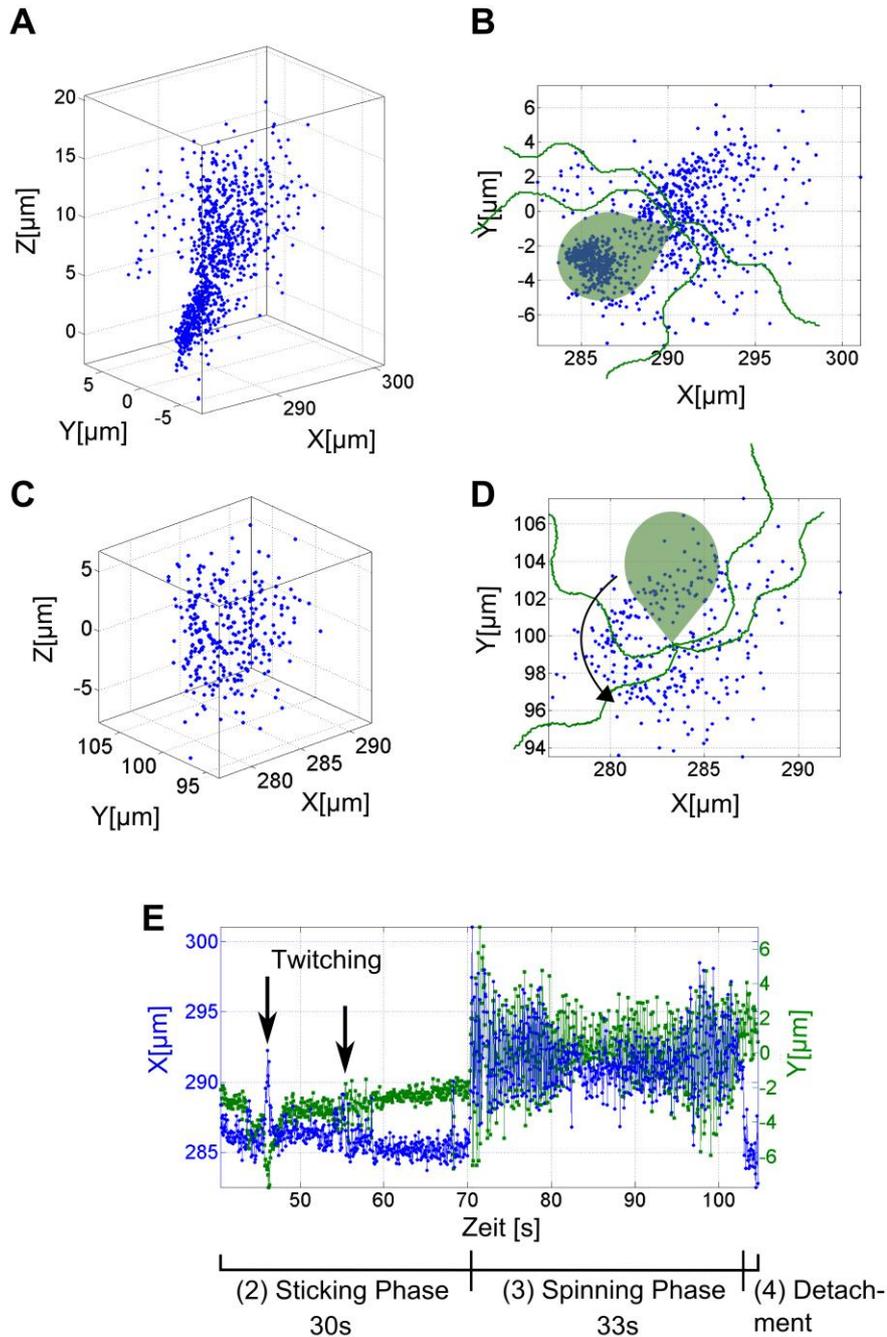


Abbildung 4.23: Ausschnitt des „Hit and stick“ Musters einer repräsentativen Spore direkt nach Auftreffen auf der FOTS Oberfläche. A) und B) 3D-Ansicht und XY-Ebenenprojektion des gesamten Oberflächen Aufenthalts der Spore vom Auftreffen auf die Oberfläche bis zum „Detachment“. C) und D) 3D-Ansicht und XY-Ebenenprojektion eines Teilssegments der Trajektorie, das die „Spinning“ Bewegung gegen den Uhrzeigersinn beinhaltet. E) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aufgetragen gegen die Zeit mit Kennzeichnung der einzelnen Phasen (2) „Sticking“, (3) „Spinning“ und (4) „Detachment“.

Die „Sticking“ Phase dieser Spore auf der FOTS Oberfläche dauert 30 s. Während dieser Phase sind zwei kurze Zappelbewegungen („Twitching“) zu beobachten. Danach geht die Spore für 33 s in eine „Spinning“ Phase über und verlässt daraufhin die Oberfläche wieder. Die „Spinning“ Bewegung ist im Gegensatz zur „Twitching“ Bewegung gekennzeichnet durch eine periodische Rotationsbewegung um den Verankerungspunkt der Spore mit der Oberfläche im Bereich der apikalen Papille. Im Falle der Spore in Abbildung 4.23 ist die Rotationsrichtung gegen den Uhrzeigersinn.

Das „Hit and stick“ Muster auf der ArgTyr Oberfläche unterscheidet sich von dem „Hit and stick“ Muster auf der FOTS Oberfläche zunächst nicht. Die Annäherung der Sporen an die Oberfläche erfolgt in beiden Fällen fast vertikal mit einer hohen Geschwindigkeit (vgl. Abbildung 4.17). In beiden Fällen werden die Sporen von der Oberfläche eingefangen und bleiben daran kleben, d.h. für beide „Hit and stick“ Muster wird eine „Sticking“ Phase beobachtet, während der in manchen Fällen sporadische Zappelbewegungen detektiert werden können. Der große Unterschied zwischen dem „Hit and stick“ auf der ArgTyr Oberfläche und dem „Hit and stick“ auf der FOTS Oberfläche liegt darin, dass keine der Sporen auf der ArgTyr Oberfläche innerhalb des Aufnahmezeitraums von 10 min in eine „Spinning“ Phase übergeht. Alle detektierten Sporen auf der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche verbleiben während des gesamten Beobachtungszeitraumes in der „Sticking“ Phase, meist als statische Spore. Die einzige Bewegung während der „Sticking“ Phase auf den ArgTyr Oberflächen ist die „Twitching“ Bewegung, die aber nur für einige Sporen verzeichnet werden kann (vgl. Abbildung 4.20 und Abbildung 4.22). Keine der auf der ArgTyr Oberflächen festklebenden Sporen hat während des Aufnahmezeitraumes von 10 min die Oberfläche wieder verlassen.

4.2.4 Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Spore und Oberfläche

Die *Ulva* Sporen sind aufgrund einer Phosphatkopfgruppe in ihrer Phospholipidmembran negativ geladen [27], daher wurde vermutet, dass die positive Ladung der ArgTyr Peptid Oberflächen die Anlagerung der Sporen induziert [33]. Allerdings sind aufgrund der sehr kurzen Debye Länge in Meerwasser von ca. 0,4 nm [27] elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Sporen und der geladenen Oberfläche nur in sehr kleinem Abstand im Bereich von Nanometern zu erwarten. Im Folgenden wird nun die elektrostatische Wechselwirkungskraft zwischen einer negativ geladenen Spore und der positiv geladenen 100% ArgTyr Oberfläche diskutiert. Es handelt sich lediglich um eine Abschätzung, bei der bestimmte Annahmen und Näherungen getroffen wurden. Da die genaue Packungsdichte und

die Konformation des ArgTyr SAMs und damit die tatsächliche Flächenladungsdichte nicht genau bekannt sind, wurde zur Berechnung der Ladungsdichte die Packungsdichte von EG₆OH SAMs auf Gold (3,46 Moleküle/nm² [189]) verwendet. Das ArgTyr Molekül besitzt an jedem Arginin eine positive Elementarladung, d.h. insgesamt vier. Für die Berechnung allerdings wurde angenommen, dass nur zwei dieser Elementarladungen zur Flächenladung beitragen, da die beiden anderen Ladungen aufgrund der Konformation wahrscheinlich nicht an der Oberfläche liegen. Die Flächenladungsdichte wurde damit zu ca. $\sigma_1 = 0,96 \text{ C/m}^2$ als obere Abschätzung approximiert. Da die langen ArgTyr Moleküle eher geknickt im SAM vorliegen [33], wird die Packungsdichte und damit auch die Flächenladung bei diesen etwas geringer sein. Die Flächenladungsdichte der *Ulva* Spore lässt sich aus deren Zetapotential bestimmen, das von Rosenhahn et al. bereits zu -19,3 mV ermittelt wurde [27]. Die Annäherung der Ladungsdichte erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel von Ohshima et al. [190, 191]:

$$\sigma = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \chi k T}{e} \left[e^{\frac{e\xi}{2kT}} - e^{-\frac{e\xi}{2kT}} + \frac{4}{\kappa a} \cdot \frac{e^{\frac{e\xi}{2kT}} - 1}{e^{\frac{e\xi}{2kT}} + 1} \right] \quad (15)$$

Dabei ist ε_r die relative Permittivität von Meerwasser (72,5 F/m) [27], ε_0 die Permittivität in Vakuum, k die Boltzmann Konstante, T die absolute Temperatur, e die Elementarladung, a der Radius der Spore (2,5 μm) und ξ das Zetapotential der Spore (-19,3 mV). Bei χ handelt es sich um den Debye-Hückel Parameter der folgendermaßen berechnet wurde:

$$\chi = \sqrt{\frac{2N_A e^2 I}{\varepsilon_r \varepsilon_0 k T}} \quad (16)$$

mit N_A als Avogadro Konstante und I als Ionenstärke des Meerwassers (ca. 70 mM). Damit ergibt sich eine Flächenladungsdichte der Spore von ca. $\sigma_2 = -4,8 \times 10^{-6} \text{ C/m}^2$. Die Wechselwirkungskräfte zwischen zwei geladenen Körpern in einem Elektrolyt können mit Hilfe der Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) Theorie beschrieben werden, die die elektrostatischen und die van-der-Waals Wechselwirkungen berücksichtigt [192]. Die elektrostatischen Wechselwirkungskräfte zwischen der Spore und der Peptidoberfläche

wurden mit der folgenden Formel abgeschätzt [192] und in Abbildung 4.24 in Abhängigkeit vom Abstand aufgetragen:

$$F_{el} = \frac{4\pi r \sigma_1 \sigma_2}{\epsilon_r \epsilon_0 \kappa} e^{-\kappa D} \quad (17)$$

Dabei wird die Spore als Sphäre mit dem Radius r angenommen. σ_1 ist die Flächenladungsdichte der Oberfläche, σ_2 die der Spore, $1/\kappa$ ist die Debye Länge in Meerwasser und D ist der Abstand zwischen der Spore und der Oberfläche.

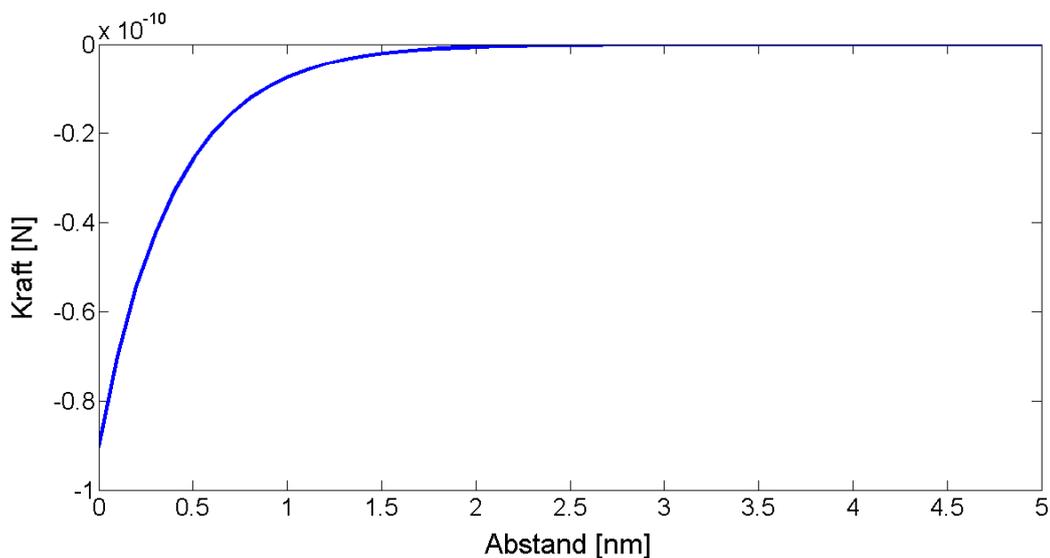


Abbildung 4.24: Abschätzung der elektrostatischen Wechselwirkungskraft der negativ geladenen Spore und der positiv geladenen ArgTyr Oberfläche in Abhängigkeit vom Abstand.

Die elektrostatische Wechselwirkungskraft bei einem Abstand von 0, d.h. wenn die Spore in Kontakt mit der Oberfläche ist, liegt in dieser Abschätzung bei ca. 0,09 nN. Die Kraft nimmt exponentiell ab und geht schon bei einem Abstand von ca. 2 nm gegen Null. Da die Packungsdichte der ArgTyr SAMs und damit die Ladungsdichte geringer ist als angenommen, wird auch die Wechselwirkungskraft geringfügig kleiner sein. Die daraus resultierende Adhäsionsenergie liegt dabei in einer Größenordnung von ca. 10^{-20} Nm. Betrachtet man eine analoge elektrostatische Wechselwirkung in MiliQ Wasser, so würde sich die Debye Länge von 0,4 nm auf ca. 1 μ m erhöhen [192]. Das Meerwasser reduziert also die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkungen um vier Größenordnungen. Im Vergleich hierzu liegt die

Reichweite von typischen hydrophoben Wechselwirkungen bei 6 nm in PBS Puffer und 11 nm in purem Wasser und von Dispersionskräften bei 0,2-0,4 nm [192]. Die elektrostatischen Wechselwirkungen leisten im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen somit einen geringeren Beitrag zur Gesamtwechselwirkung der Spore mit der ArgTyr Oberfläche.

4.2.5 Diskussion und Fazit

Mit Hilfe der holographischen Mikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit die Besiedlungsdynamik positiv geladener Oligopeptid Oberflächen mit unterschiedlichem ArgTyr Oberflächenanteil (100%, 50% und 0% ArgTyr) mit *Ulva linza* Sporen untersucht. Die Ergebnisse der zusätzlich durchgeführten Standard Besiedlungs-Assays mit *Ulva* Sporen in Kapitel 4.2.1 zeigen bereits deutliche Unterschiede zwischen der 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberfläche. Die absolute Anzahl gesiedelter Sporen steigt mit größer werdendem ArgTyr Oberflächen Anteil und auch die Beobachtung „pseudo“-gesiedelter Sporen beschränkt sich auf die 100% ArgTyr Oberfläche (11% „pseudo“-gesiedelte Sporen). Wie Ederth et al. zeigen konnten, ist die starke Besiedlung der ArgTyr Oberflächen auf die rapide Anlagerung „pseudo“-gesiedelter Sporen zurückzuführen. Die Anzahl an „pseudo“-gesiedelten Sporen nimmt mit der Zeit ab, weshalb angenommen wird, dass die Sporen mit der Zeit in der Lage sind sich zu reorientieren und einen normalen Besiedlungsprozess zu durchlaufen [33]. Auf der 50% ArgTyr Oberfläche können im Vergleich zur 100% ArgTyr Oberfläche insgesamt 33% weniger gesiedelte Sporen beobachtet werden und jede dieser Sporen ist normal gesiedelt. Das deutet darauf hin, dass durch den höheren ArgTyr Gehalt die 100% Oberfläche eine erhöhte „Klebrigkeit“ aufweist, wodurch es zum einen zu einer vermehrten Anlagerung der Sporen kommt und es zum anderen den Sporen erschwert wird eine normale Besiedlung zu vollziehen. Die „Klebrigkeit“ der ArgTyr Oberflächen kann nicht nur auf rein elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Spore und der positiv geladenen ArgTyr Oberfläche zurückgeführt werden, wie die Abschätzung der elektrostatischen Wechselwirkungskräfte in Abschnitt 4.2.4 zeigt. Vielmehr wird vermutet, dass spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Arginin und der Zellmembran der Spore für die „Klebrigkeit“ verantwortlich sind [27, 32, 33]. Dies wird durch die wesentlich geringere Besiedlung einer ebenfalls positiv geladenen LysTyr Peptid Oberfläche bestätigt [32]. Bei der 0% ArgTyr Oberfläche mit einem reinen Gly SAM tritt diese Art der Wechselwirkung nicht auf, weshalb auf dieser Oberfläche auch eine wesentlich geringere

Besiedlung zu beobachten ist. Ein weiterer Unterschied zwischen den ArgTyr enthaltenden Oberflächen und der reinen Gly Oberfläche ist die Verteilung der gesiedelten Sporen auf der Oberfläche. Bei den ArgTyr Oberflächen sind die Sporen einzeln auf der Oberfläche verteilt. Auf der Gly Oberfläche siedeln die Sporen hauptsächlich in Gruppen direkt nebeneinander.

Die integrale Auswertung der holographischen Videos liefert weitere Informationen zur Anlagerung der Sporen an die Oligopeptid Oberflächen, die die Beobachtungen in den Standard Besiedlungs-Assays stützen. Die Analyse der Schwimmaktivitäten der Sporen in den Probenkanälen mit den untersuchten Oberflächen haben gezeigt, dass die Aktivität der Sporen bei der 100% ArgTyr Oberfläche rapide abfällt, während die Abnahme bei der 50% ArgTyr Oberfläche weniger drastisch vonstatten geht (vgl. Abbildung 4.15A). Dies ist zum einen auf die höhere Anzahl an Sporen auf der 100% ArgTyr Oberfläche zurückzuführen, die bereits während der Sporeninjektion anhaften. Bei der Injektion wird die Sporensuspension sehr schnell mit einer Spritze in den Probenkanal eingefüllt, wodurch die Sporen an die Oberflächen des Kanals gespült werden und im Falle der ArgTyr Oberflächen daran anhaften können. Auf der 100% ArgTyr Oberfläche sind dies bereits 42% der Gesamtpopulation an Sporen im Bildfeld, die nach der Injektion an den Oberflächen detektiert werden, während auf der 50% Oberfläche nur 19% der Sporen während der Injektion angehaftet sind. Dadurch wird die Anzahl an frei schwimmenden Sporen in Lösung, die zu den Aktivitätswerten beitragen, bei der 100% Oberfläche in stärkerem Maße dezimiert als bei der 50% Oberfläche. Zum anderen lagern sich die meisten der verbleibenden Sporen in Lösung innerhalb von 15 s an die 100% ArgTyr Oberfläche an, so dass 20 s nach der Injektion nur noch 15% der Sporen im Bildfeld frei schwimmend vorzufinden sind. Bei der 50% ArgTyr Oberfläche sind es noch 36% frei schwimmende Sporen im Bildfeld (vgl. Abbildung 4.15B). Damit deuten auch die Ergebnisse dieser integralen Analyse auf der Basis holographischer Daten auf eine verstärkte Wechselwirkung zwischen den Sporen und der Oberfläche mit größerem ArgTyr Oberflächenanteil hin. Des Weiteren konnte durch die Untersuchung der Sporenaktivität und der Besiedlung der Oberflächen in den holographischen Experimenten gezeigt werden, dass die höchste Besiedlungsrate bei beiden ArgTyr Oberflächen während der ersten 20 s nach der Injektion zu finden ist. Daher befinden sich auch bei der Studie von Ederth et al. nach einer Besiedlungszeit von 5 min bereits 65% der finalen Sporendichte auf der Oberfläche [33]. Im Gegensatz dazu kann auf der Gly Oberfläche während des gesamten Beobachtungszeitraumes nur eine einzige angelagerte Spore detektiert werden. Daher nimmt die Aktivität der Sporen bei dieser Oberfläche auch nicht ab, sondern erhöht sich sogar.

Nach der Bestimmung der Trajektorien in den verschiedenen Datensätzen für die jeweiligen 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächen zur Untersuchung des Anlagerungsprozesses an die jeweilige Oberfläche hat sich gezeigt, dass die Sporen in Anwesenheit der Gly Oberfläche in der Nähe dieser akkumulieren und hauptsächlich mit dem „Gyration“ Muster schwimmen, was die erhöhte Schwimmaktivität erklärt. Im Gegensatz dazu kann bei der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche kein „Gyration“ beobachtet werden. Das vorherrschende Schwimmmuster bei den ArgTyr Oberflächen ist das „Hit and stick“ Muster. Die Sporen bleiben dabei beim ersten Kontakt mit der ArgTyr Oberfläche an dieser kleben. Daher sind die Sporen in den lichtmikroskopischen Aufnahmen des Standard Besiedlungs-Assays auch statistisch als einzelne Sporen auf den ArgTyr Oberflächen verteilt (vgl. Abbildung 4.14). Bei der Gly Oberfläche hingegen sind die Sporen mit dem „Gyration“ Muster in der Lage die Oberfläche zu erkunden und bereits gesiedelte Sporen auf der Oberfläche zu finden und sich direkt neben diesen anzulagern. Daher wird auf der Gly Oberfläche auch eine Gruppenbesiedlung beobachtet. Solche Gruppenbesiedlungen werden meist bei hydrophoben Oberflächen, wie beispielsweise auch bei FOTS Oberflächen, beobachtet [26, 81, 167]. Dass die Sporen auch bei dem eher hydrophilen Gly SAM (Kontaktwinkel: $41^\circ \pm 1^\circ$) in Gruppen siedeln ist vermutlich auf eine geringe Haftstärke der Sporen auf dieser Oberfläche zurückzuführen, wie es auch für EG₂₋₆-OH SAMs beobachtet wird [84]. Denn durch die Gruppenbesiedlung sind die Sporen besser gegenüber äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Scherkräften geschützt.

Während des normalen Besiedlungsprozesses der Sporen findet häufig eine „Spinning“ Bewegung der Sporen statt, bei der sie einen temporären Oberflächenkontakt herstellen und sehr schnell um diesen Kontakt rotieren (240rpm) [25]. In den meisten Fällen verlassen die Sporen die Oberfläche nach dem „Spinning“ wieder, weshalb dieses Muster auch als Erkundungsmuster angesehen wird [167]. Nur in wenigen Fällen, wenn die „Spinning“ Bewegung lange genug andauert wird anschließend der Besiedlungsprozess mit der Ausscheidung des Klebstoffes initiiert. Eine „Spinning“ Bewegung kann auch für diejenigen Sporen beobachtet werden, die mit dem „Hit and stick“ Schwimmmuster auf einer hydrophoben FOTS Oberfläche kleben bleiben. Nach einer kurzen „Sticking“ Phase wird auf dieser Oberfläche das „Spinning“ eingeleitet. Während der „Sticking“ Phase zeigen die Sporen sporadische Zappelbewegungen. Es wird angenommen, dass die Sporen zunächst in einer ungeeigneten Position auf der Oberfläche kleben bleiben und durch das Zappeln in eine

geeignete Position für das „Spinning“ gelangen [167]. Bei den ArgTyr Oligopeptid Oberflächen führt das „Hit and stick“ Muster allerdings dazu, dass die Sporen in den meisten Fällen regungslos auf der Oberfläche kleben bleiben. Nur einige der Sporen (20% für die 100% ArgTyr und 28% für die 50% ArgTyr Oberfläche) zeigen Zappelbewegungen („Twitching“). „Spinning“ Bewegungen können während des gesamten Aufnahmezeitraumes von 10 min auf den ArgTyr Oberflächen nicht beobachtet werden. Diese Bewegung wird vermutlich durch das starke Festhalten der Sporen in einer ungeeigneten Position auf der ArgTyr Oberfläche verhindert. Das zeigt, dass die Wechselwirkungen der Sporen mit den ArgTyr Oligopeptid Oberflächen, die für die „Klebrigkeit“ der Oberfläche verantwortlich sind, wesentlich stärker sind als die Wechselwirkungen mit der hydrophoben FOTS Oberfläche.

Diejenigen Sporen, die auf der ArgTyr Oberfläche „Twitching“ Bewegungen zeigen, scheinen zunächst auch statisch auf der Oberfläche festzukleben. Nur plötzliche, sehr kurze Zappelbewegungen zu einer bestimmten Seite unterbrechen die statischen Phasen der Spore. Weniger häufig werden auch länger anhaltende oder dauerhafte Verrückungen des Sporenkörpers während der „Sticking“ Phase beobachtet. Da auch die Flagellen der Sporen von der Zellmembran umhüllt sind, ist es auch möglich, dass die Sporen mit einer oder mehreren Flagellen an der Oberfläche kleben bleiben. Dadurch würden die Sporen mehr Freiheiten in ihrer „Twitching“ Bewegung besitzen was die größeren, länger anhaltenden Verrückungen des Sporenkörpers erklären würde. Das „Twitching“ führt allerdings in keinem Fall dazu, dass die Spore die Oberfläche wieder verlässt, denn keine der zuvor auf der ArgTyr Oberfläche festgeklebten Sporen hat die Oberfläche während des Aufnahmezeitraumes verlassen. Am wahrscheinlichsten führen die Kräfte, die bei dem „Twitching“ ausgeübt werden, dazu, dass sich die Kontaktpunkte der Spore mit der Oberfläche ändern. Daher kann vermutet werden, dass durch das „Twitching“ hervorgerufenen Sporenkörper Verrückungen die Reorientierung der Sporen und damit den normalen Besiedlungsprozess ermöglichen. Das würde auch die Beobachtungen in den Standard Besiedlungs-Assays erklären, in denen die Anzahl an „pseudo“-gesiedelten Sporen mit der Zeit abnimmt, während sich der Anteil an normal gesiedelten Sporen erhöht. Wie die Ergebnisse des Standard Besiedlungs-Assays in Abbildung 4.13 zeigen waren auf der 50% ArgTyr Oberfläche nach 30 minütiger Besiedlungsdauer alle Sporen in der Lage normal zu siedeln. Es kann diskutiert werden ob eine Konditionierung der Peptidoberflächen mit Makromolekülen aus dem verwendeten künstlichen Meerwasser oder von den *Ulva* Sporen ausgeschiedenen Substanzen [193] dazu führt, dass es den Sporen mit der Zeit erleichtert wird sich zu reorientieren und normal zu

siedeln. Auch bei der Untersuchung des Sporen Verhaltens auf der FOTS Oberfläche wird vermutet, dass eine Konditionierung der Oberfläche zum Verschwinden des „Hit and stick“ Musters mit der Zeit führt [167]. Denn das „Hit and stick“ Muster kann nur während der ersten 3 min nach Sporen Injektion für die FOTS Oberfläche beobachtet werden. Danach ändert sich das Verhalten der Sporen hin zu den üblichen Erkundungsmustern wie beispielsweise das „Gyration“ Muster. Daher kann auch bei den ArgTyr Oberflächen vermutet werden, dass die Konditionierung der Oberfläche zusammen mit dem „Twitching“ der Sporen mit voranschreitender Besiedlungszeit zu einer Reorientierung und normalen Besiedlung führt.

4.3 Holographische in-situ Feldexperimente

In standardisierten Laborexperimenten mit einzelnen Modelorganismen, wie beispielsweise *Ulva linza* [23, 86, 194], *Semibalanus amphitrite* [23, 60] aber auch Bakterien wie *Cobetia marina* [94, 195] und im Falle biomedizinisch relevanter Fragestellungen *Pseudomonas aeruginosa* [169], können potentielle „Antifouling“ Oberflächen schnell auf ihre Eignung als solche überprüft werden. Allerdings nur in Bezug auf die verwendeten Spezies. Um die tatsächliche Leistung bei einem Einsatz als „Antifouling“-Beschichtung im natürlichen Umfeld unter Einwirkung einer ganzen Population unterschiedlicher Spezies zu untersuchen werden Feld-Testverfahren angewandt.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erläutert, werden in Laborexperimenten sehr häufig Modeloberflächen wie SAMs untersucht, um gezielt einzelne physiko-chemische Oberflächeneigenschaften zu variieren und deren Einfluss auf die Besiedlung zu testen. Mit dem grundlegenden Ziel die unter Laborbedingungen durchgeführten Untersuchungen mit Beobachtungen im Feld zu korrelieren, wurden im Zeitraum von November bis Dezember 2010 in Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Geoffrey Swain (Florida Institute of Technology, Melbourne, Florida) an unterschiedlichen Teststandorten an der Ostküste Floridas Feldtests mit SAMs mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften durchgeführt. Zum einen wurde die Besiedlungskinetik der unterschiedlichen SAMs in statischen Kurzzeit-Immersionstests untersucht (siehe Abbildung 4.25, Dissertation M. Arpa Sancet [170]) und zum anderen die Bildung und die Auswirkung eines Konditionierungsfilms auf die Besiedlung mit im Meer lebenden Organismen, wie beispielsweise Kieselalgen, verfolgt (siehe Dissertation I. Thome [169]).

Parallel dazu wurden in situ Experimente mit dem holographischen Mikroskop durchgeführt, mit dem Ziel, Biofouler und deren oberflächenspezifisches Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung zu verfolgen und Oberflächenereignisse mit unterschiedlichen Oberflächen holographisch zu detektieren. Die Ergebnisse dieser holographischen Untersuchung sind Gegenstand der nachfolgenden Abschnitte und Kapitel. Die detaillierte Durchführung der Experimente ist in Kapitel 3.4 erläutert.

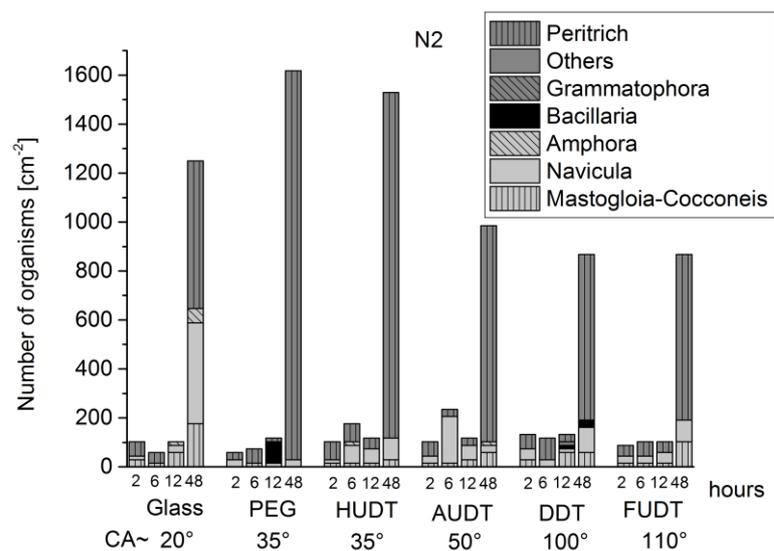


Abbildung 4.25: Besiedlungsdichte verschiedener mariner Spezies auf Glasobjektträgern und verschiedenen SAMs nach Inkubationszeiten von 2 h, 6 h, 12 h und 48 h in Meerwasser. CA (= contact angle) gibt den Kontaktwinkel der jeweiligen Oberfläche an und ist ein Maß für die Benetzbarkeit der Oberfläche [170].

Da im Feld eine geringere Anzahl an Biofouler zu erwarten ist als in den Laborexperimenten mit *Ulva linza*, bei denen die Konzentration an Sporen durch die gezielte Freisetzung sehr konzentriert vorliegt (vgl. Kapitel 3.3.1), wurden alle holographischen Videos zunächst gezielt nach möglichen Oberflächenereignissen durchsucht. In jedem Experiment konnten aktiv schwimmende Organismen beobachtet werden, aber interessanterweise konnte auf keiner der untersuchten Oberflächen zu Wechselwirkungen zwischen einem Organismus und der Oberfläche detektiert werden. Selbst auf der für *Ulva linza* Sporen attraktiven FOTS-Oberfläche [29] konnten keinerlei Oberflächenkontakte beobachtet werden. Bei Betrachtung der statischen Immersionstests ergab sich ebenfalls eine wesentlich geringere Besiedlung der

unterschiedlichen Oberflächen im Vergleich zu den im Labor durchgeführten Besiedlungs-Assays [170]. In Abbildung 4.25 sind die Ergebnisse eines statischen Immersionstests für verschiedene SAMs zu unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt (aus der Dissertation von M. Arpa Sancet [170]). Die Anzahl und Art der Organismen wurde mittels Lichtmikroskopie ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h zeigte der hydrophobe 1-dodecanthiol-SAM (DDT) die höchste Besiedlungsdichte ($176 \text{ Organismen} / \text{cm}^2$). In einem Bildfeld von 1 mm^2 konnten demnach im Mittel ein bis zwei adhärenente Organismen detektiert werden. Zum Vergleich, bei einem Laborexperiment mit *Ulva linza* Sporen sind auf einem DDT SAM nach 45 min Inkubation ca. 700 gesiedelte Sporen pro mm^2 zu finden [169]. Bei den detektierten Organismen im Feld handelt es sich hauptsächlich um Gattungen der Kieselalgen, wie beispielsweise *Navicula*, oder um Gattungen der *Peritrichia* (Wimperntierchen), die sich nicht frei schwimmend fortbewegen können. Die Wahrscheinlichkeit mittels holographischer Mikroskopie in einem Bildfeld von ca. $0,36 \text{ mm}^2$ und einem Beobachtungszeitraum von 10 min einen siedelnden Biofouler, wie beispielsweise eine Algenspore von Grünalgen oder Braunalgen, zu beobachten, liegt im Bereich von 1% und ist damit äußerst gering. Das eigentliche Ziel der Feldexperimente, nämlich die holographische Untersuchung des oberflächenspezifischen Verhaltens mariner Biofouler, konnte demnach nicht erreicht werden. Dennoch wurde eine Vielzahl an aktiv schwimmenden Organismen unterschiedlicher Größe und Form in holographischen Videos aufgezeichnet, was erstmals eine Motilitätsanalyse frei schwimmender, mariner Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung erlaubt.

4.3.1 Motilitätsanalyse mariner Mikroorganismen mit einer Größe $\leq 30 \mu\text{m}$

Da keine unmittelbare Wechselwirkung zwischen Organismen und der Oberfläche beobachtet werden konnte, spielt die Art der Oberfläche für die Motilitätsanalyse der marinen Mikroorganismen keine wesentliche Rolle. Die nachfolgende Analyse beruht daher auf einem Experiment vom 5.12.2010, bei dem insgesamt neun Messungen in einem Standard Polyethylen-Kanal der Firma ibidi durchgeführt wurden. Alle Messungen wurden im gleichen Kanal und mit dem gleichen Kanalinhalt über einen Zeitraum von 8 h durchgeführt, wobei jede Messung eine Dauer von 10 min besitzt. Von jeder dieser Messungen wurden jeweils die ersten 60 s rekonstruiert und analysiert, was die Datenmengen überschaubar hielt aber trotzdem eine gute Statistik lieferte.

Das Experiment vom 5.12.2010 ist im Vergleich zu Experimenten an anderen Tagen, gekennzeichnet durch eine höhere Anzahl an aktiven Schwimmern, weshalb die Wahl aufgrund einer guten Statistik auf dieses Experiment fiel. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 4.26 die Schwimmaktivitäten während dieses Experiments zu verschiedenen Messzeitpunkten und die Aktivitäten eines vergleichbaren Experiments vom 27.11.2010. Im Experiment vom 27.11.2010 wurden sieben Messungen analog zu dem Experiment vom 5.12.2010 durchgeführt. Allerdings wurde in diesem Experiment über einen Zeitraum von ca. 2 h gemessen, weshalb die Messabstände zwischen den einzelnen Messungen kürzer sind als in dem Experiment vom 5.12.2010. Für die Aktivitätsanalyse wurde die erste Messung des jeweiligen Experiments außer Acht gelassen, da in dieser, direkt nach der Injektion des gefilterten Meerwassers, sedimentierendes, unbewegliches Material zu beobachten ist, wodurch der tatsächliche Aktivitätswert beeinflusst wird. Bis zum Startzeitpunkt der zweiten Messung hatte sich dieses Material abgesetzt und nur noch die aktiven Schwimmer trugen zum Aktivitätswert bei. Um einen einzelnen Aktivitätswert für den jeweiligen Datensatz zu erhalten wurden von jedem Datensatz die Werte der ersten 2 min gemäß der Erklärung in Kapitel 3.5 ermittelt und der Mittelwert über diese gebildet. Die angegebenen Fehler in Abbildung 4.26 ergeben sich aus der Standardabweichung.

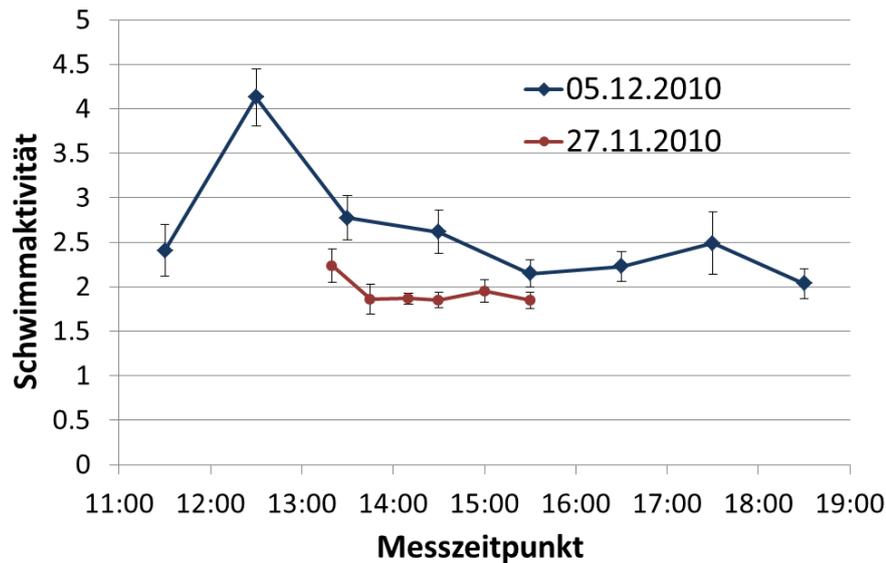


Abbildung 4.26: Schwimmaktivitäten während der einzelnen Messungen der beiden Experimente vom 5.12.2010 und vom 27.11.2010 mit unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Aktivitätswerte ergeben sich durch die Bestimmung von Fluktuationen aufeinanderfolgender Hologramme.

Die absoluten Werte der Schwimmaktivität in dem Experiment vom 5.12.2010 sind höher als die Werte des Experiments vom 27.11.2010. Dies kann sowohl daran liegen, dass insgesamt weniger motile Organismen in der Wasserprobe vom 27.11.2010 vorhanden sind, als auch daran, dass die vorhandenen Organismen eine geringere Schwimmaktivität aufweisen. In beiden Experimenten ist allerdings zu erkennen, dass die Aktivität über die gesamte Experimentdauer kaum abnimmt. Im Experiment vom 5.12.2010 ist ein Aktivitätshöhepunkt um 12:30 Uhr zu erkennen. Auch der erste Messwert des Experiments vom 27.11.2010 um 13:20 Uhr liegt um ca. 1/5 höher als die darauffolgenden Werte. Interessanterweise zeigen die Organismen selbst nach acht Stunden in der kleinen Probenkammer eine kaum verringerte Schwimmaktivität mit einem Wert von ca. 2-2,5. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei den beobachteten Organismen nicht um an Oberflächen anhaftende Spezies handelt, die in eine sessile Form übergehen, wie beispielsweise die Sporenstadien von Thallus-bildenden Algen. Vielmehr handelt es sich hier um planktonisch lebende Einzeller.

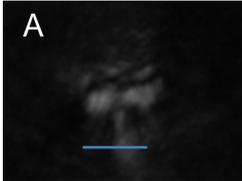
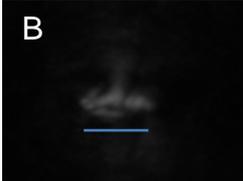
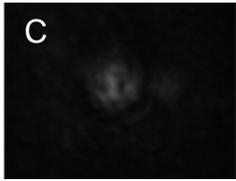
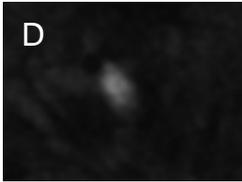
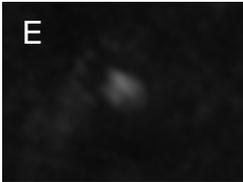
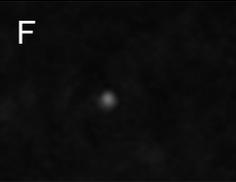
Bei Betrachtung der Organismen in den rekonstruierten Hologrammen wird deutlich, dass es sich bei den Schwimmern um eine Ansammlung verschiedenster Spezies handelt. Wie die Abbildungen in Tabelle 4.3 zeigen, lassen sich deutlich unterschiedliche Formen und Größen der Organismen in den Ebenenprojektionen der rekonstruierten Hologramme erkennen. In

dieser Tabelle sind sechs verschiedene beobachtete Organismen in Form und Größe dargestellt.

Die Organismen in Abbildung A und B unterscheiden sich von den übrigen Organismen hauptsächlich durch ihre längliche Form mit einer Länge von mehr als 20 μm . Im Gegensatz dazu liegen die runden Organismen in einem Größenbereich von 3,9 μm bis 11 μm . Am häufigsten (in ca. 91% der Fälle) sind Organismen mit rundlicher Form und einer Größe zwischen 3 μm und 6 μm zu beobachten. Größere Spezies, wie in den Abbildungen A-C gezeigt, können wesentlich seltener verfolgt werden.

Eine exakte Identifikation der beobachteten Organismen in den rekonstruierten Hologrammen ist auflösungsbedingt nicht möglich. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um Phytoflagellaten, die aufgrund ihrer Größe zum Nanoplankton gezählt werden (typische Größe für Nanoplankton: 2-40 μm). Zooplankton besitzt meist eine größere Zellgröße als 30 μm und wurde daher vor Experimentbeginn aus dem Meerwasser herausgefiltert. Mögliche Vertreter des Nanoplanktons, die zu den hier beobachteten Größen passen, sind Dinoflagellate wie beispielsweise *Peridinella*, einzellige Algen der Klassen *Cryptophyceae* (z.B. *Cryptomonas*), *Prasinophyceae* (z.B. *Pyramimonas* und *Pterosperma*) und *Chlorophyceae* (z.B. *Dunaliella*) und Gattungen der *Haptophyceae* zu denen die kalkschaligen *Coccolithophorida* gehören [129, 196, 197]. Die Vielfalt dieser kleinen Einzeller ist immens. Alleine unter den Dinoflagellaten werden mehr als 1000 verschiedene Arten unterschieden [198]. Die genaue Zuordnung alleine anhand der Größe und Form aus holographischen Aufnahmen daher nicht möglich. Zu den holographischen Experimenten simultan durchgeführte lichtmikroskopische Aufnahmen des verwendeten Meerwassers konnten keinen Beitrag zur Identifikation der Organismen leisten, da sich diese zu schnell aus der Fokusebene des Mikroskops bewegten und somit schwer erfasst werden konnten.

Tabelle 4.3: Ausschnitte aus XY-Ebenenprojektionen rekonstruierter Hologramme, die sechs verschiedene Organismen unterschiedlicher Form und Größe zeigen. Bei den Organismen A und B bezieht sich die Größe des Organismus auf die Länge (siehe blaue Markierung). Bei den übrigen Organismen C-F bezieht sich die Größe auf deren Durchmesser.

Form des Organismus in 2-dimensionaler Ebenenprojektion			
Größe [μm]	20,9	21,5	11
Form des Organismus in 2-dimensionaler Ebenenprojektion			
Größe [μm]	6,2	4,9	3,9

Für die Motilitätsanalyse der beobachteten Organismen wurden insgesamt 402 Trajektorien in den neun Messungen bzw. Datensätzen des Experiments bestimmt. Abbildung 4.27 zeigt 85 Trajektorien beispielhaft für einen Datensatz (Messzeitpunkt 14:30 Uhr) mit dem Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle Trajektorien dieser Messung. Die Geschwindigkeitsklassen wurden in Intervalle von $20 \mu\text{m/s}$ eingeteilt und über einen Bereich von $0\text{-}1000 \mu\text{m/s}$ aufgetragen.

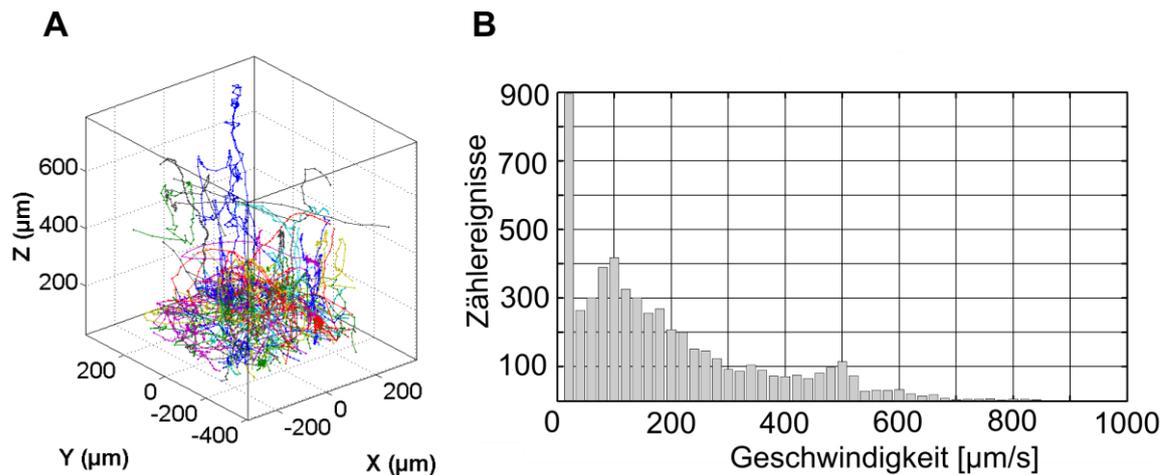


Abbildung 4.27: A) 3D-Ansicht der Trajektorien motiler mariner Mikroorganismen eines Datensatzes. B) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle Trajektorien gezeigt in Abbildung A.

Das Geschwindigkeitsverteilungshistogramm zeigt ein breites Geschwindigkeitsspektrum bis zu einer maximalen Geschwindigkeit von 840 µm/s. 98% der Organismen zeigen allerdings eine geringere Geschwindigkeit als 660 µm/s. Die größte relative Häufigkeit lässt sich bei einer Geschwindigkeit zwischen 0 µm/s und 20 µm/s erfassen. Daneben gibt es zwei weitere Maxima bei 100 µm/s und 500 µm/s. Bei 180 µm/s liegt der Median Wert, bei welchem 50% der Organismen eine geringere und 50% eine höhere Geschwindigkeit aufweisen. Der breite Geschwindigkeitsbereich und das Auftreten von mehreren Maxima in der Geschwindigkeitsverteilung deuten auf ein breites Spektrum an verschiedenen Schwimmmustern und damit auf unterschiedliches Schwimmverhalten hin. Die Analyse des Schwimmverhaltens einzelner Organismen und die Zusammensetzung der Geschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.27B ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

4.3.2 Klassifikation verschiedener Schwimmmuster

Bei der Einzelbetrachtung der Trajektorien zeigt sich eine große Vielfalt an unterschiedlichen Schwimmmustern. Die detaillierte Betrachtung der Trajektorien führt zur Einführung von fünf verschiedenen Kategorien an Schwimmmustern, die aufgrund ihrer augenscheinlichen Eigenschaften klassifiziert wurden. Da die Benennung dieser Kategorien bzw. Muster teilweise in Anlehnung an in der Literatur bereits beschriebene Muster von Algensporen [30, 131] und Bakterien [103] erfolgt, werden die englischen Bezeichnungen beibehalten. Diese

lauten wie folgt: „Orientation“, „Undulation“, „Tumble“, „Orientation and stop“ und „Straight path“. In Abbildung 4.28A ist jeweils eine repräsentative Trajektorie für jedes dieser Schwimmuster dargestellt. Das Muster „Orientation“ (Abbildung 4.28A/a) gleicht sehr stark dem auch für Sporen der Gattungen *Ulva linza* [30] und *Hincksia irregularis* [131] beobachteten, gleichnamigen Muster mit kurzen geradlinigen Schwimmphasen und häufigen Richtungsänderungen (siehe Kapitel 2.4.5). Das Muster „Undulation“ (siehe Abbildung 4.28A/b) beschreibt eine Bewegung, die durch eine wellenförmige Ausbreitung charakterisiert ist. Die Netto-Bewegungsrichtung ist dabei allerdings meist geradlinig. Ganz ähnlich wie peritrich begeißelte Bakterien verhalten sich die Organismen, die dem Schwimmmuster „Tumble“ zugeordnet werden können (siehe Abbildung 4.28A/d). Bei diesem können kurze „Tumbling“-Phasen folgend auf „Run“-Phasen beobachtet werden, in denen eine Richtungs-Neuorientierung stattfindet. Nach dem „Tumbling“ schwimmen sie in einer zum vorherigen „Run“ unterschiedlichen Richtung weiter. Es bestehen allerdings große Unterschiede zwischen dem „Run and Tumble“ Mechanismus der Bakterien (z.B. *E. coli*) und dem hier beobachteten Muster. Die „Run“-Phasen der marinen Organismen sind deutlich länger als die der Bakterien und des Weiteren lassen sich innerhalb des hier beschriebenen Musters auch Orientierungsänderungen ohne „Tumbling“ beobachtet. Das Muster „Orientation and stop“ (siehe Abbildung 4.28A/e) ist eine Sonderform des Musters „Orientation“. Bei diesem gibt es Phasen in denen sich der Organismus mit dem „Orientation“ Muster schwimmend fortbewegt und „Stop“-Phasen in denen er innerhalb der Schwimmbewegung abrupt anhält und sich nicht bewegt. Neben diesen komplexen Schwimmmustern, lässt sich das Muster „Straight path“ (Abbildung 4.28A/c) beobachten, bei dem die Organismen meist sehr schnell mit konstanter Geschwindigkeit geradlinig durch das Bildfeld schwimmen und nur sehr kleine Richtungsänderungen zeigen.

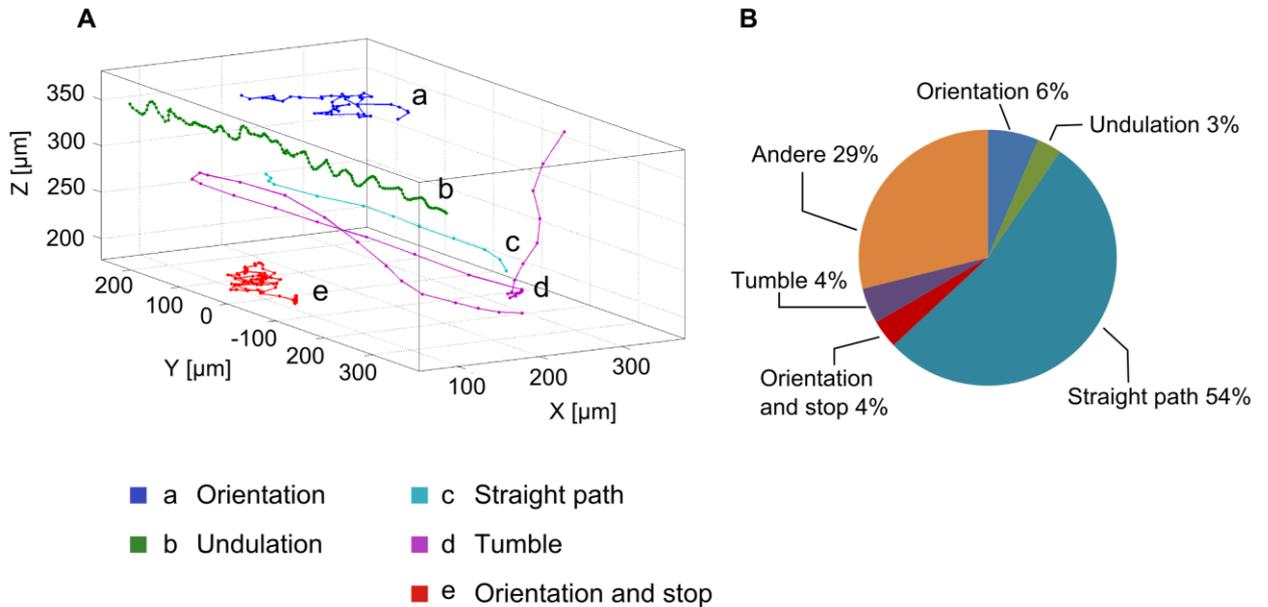


Abbildung 4.28: A) 3D-Ansicht von Trajektorien mariner Mikroorganismen, die die einzelnen klassifizierten Schwimmmuster a) „Orientation“, b) „Undulation“, c) „Straight path“, d) „Tumble“ und e) „Orientation and stop“ repräsentieren. B) Prozentuales Auftreten der klassifizierten Schwimmmuster innerhalb von 402 Trajektorien.

Abbildung 4.28B gibt das Prozentuale Vorkommen der beschriebenen Schwimmmuster innerhalb der 402 bestimmten Trajektorien an. Dabei wurde, anders als in Kapitel 4.1.3 für *P. aeruginosa* beschrieben, nicht die Anzahl der Datenpunkte in den einzelnen Trajektorien berücksichtigt. Da hier alle Trajektorien aus nur einem einzelnen Muster bestehen und die Organismen somit anders als *P. aeruginosa* nicht zwischen verschiedenen Mustern schalten, wurden die Trajektorien eines bestimmten Musters als Ganzes für die Häufigkeitsanalyse erfasst. Unter dem Begriff „Andere“ werden alle Trajektorien zusammengefasst, die keinem der klassifizierten Muster eindeutig zugeordnet werden können. Diese stellen mehr als ein Viertel aller bestimmten Trajektorien dar. Dennoch lassen sich 71% der Trajektorien eindeutig einem der beschriebenen Muster zuweisen. Der Anteil der komplexeren Muster „Orientation“, „Undulation“, „Tumble“ und „Orientation and stop“ ist annähernd gleich verteilt. Zusammen ergibt sich ein Vorkommen von 17% für diese Muster. Die meisten der beobachteten Organismen (54%), schwimmen mit dem „Straight path“, meist mit hoher Geschwindigkeit (siehe Abbildung 4.29C), einmal quer durch das Bildfeld.

Das am häufigsten zu beobachtende Schwimmuster „Straight path“ ist in Abbildung 4.29A-B durch mehrere repräsentative Trajektorien eines Datensatzes in 3D-Darstellung und einer XY-Ebenenprojektion gezeigt.

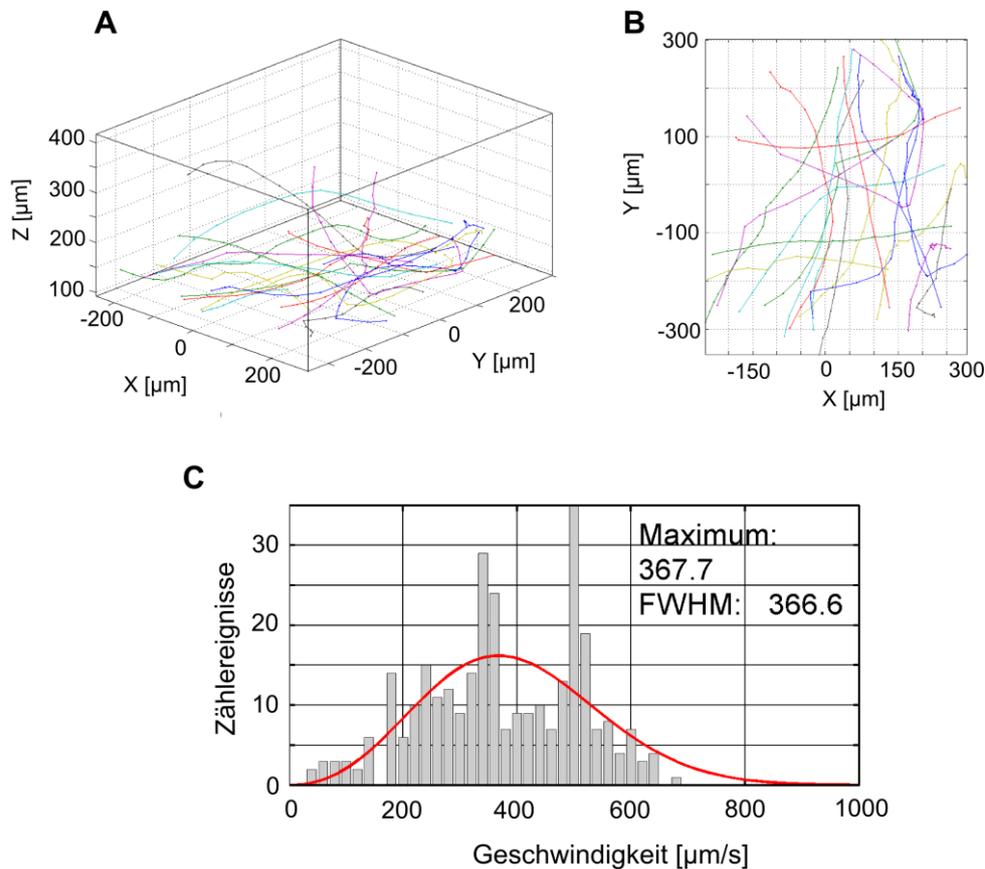


Abbildung 4.29: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien eines Datensatzes, die das Muster „Straight path“ zeigen. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm der Trajektorien gezeigt in A) bzw. B) mit der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits.

Die Geschwindigkeiten dieser Trajektorien, dargestellt in dem Geschwindigkeitsverteilungshistogramm in Abbildung 4.29C, spannen einen Geschwindigkeitsbereich von 40 μm/s bis 640 μm/s auf und haben nach dem Maxwell-Boltzmann Fit einen wahrscheinlichsten Wert von 368 μm/s. Das Maximum an Zählereignissen befindet sich bei einer Geschwindigkeit von 500 μm/s, was im Bereich des zweiten Maximums der Gesamtgeschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.27B liegt. Da die Organismen meist durch

ihre hohe Geschwindigkeit nur eine geringe Verweildauer im Bildfeld besitzen tragen diese nur mit wenigen Zählereignissen zur Gesamt-Geschwindigkeitsverteilung bei.

Repräsentative Trajektorien für das Muster „Orientation“ sind in Abbildung 4.30A-B dargestellt.

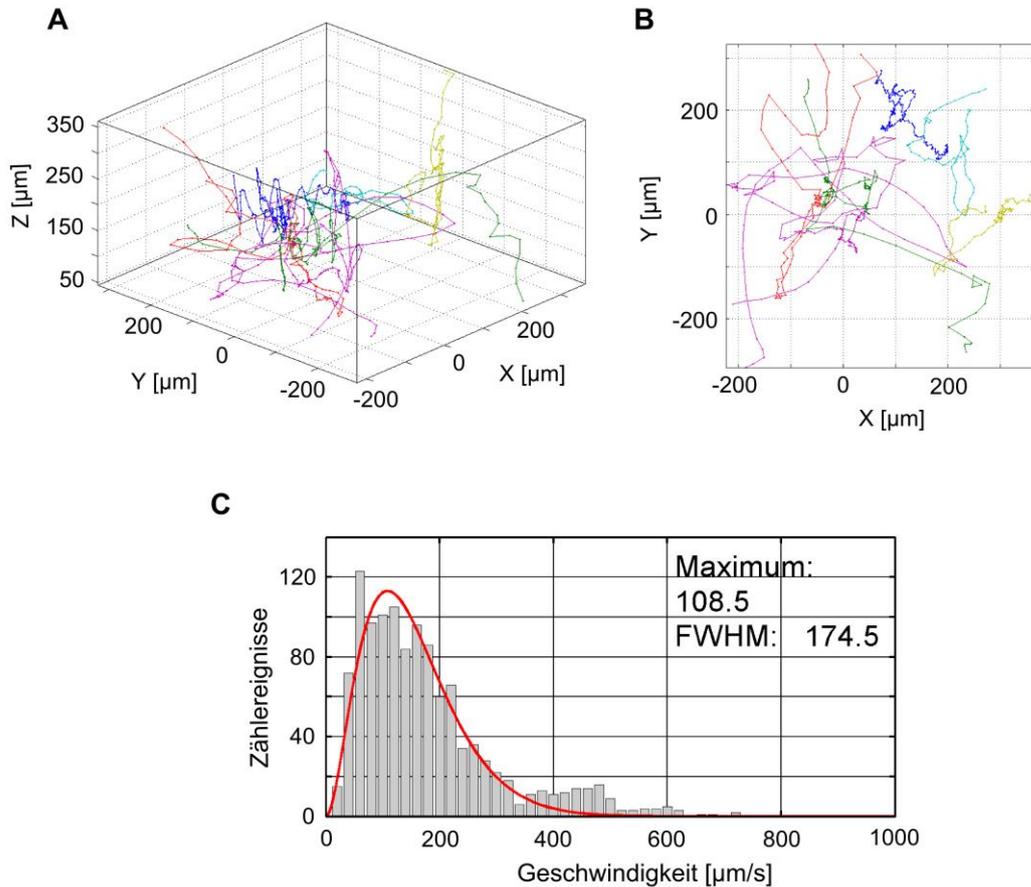


Abbildung 4.30: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien eines Datensatzes, die das Muster „Orientation“ zeigen. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm der Trajektorien zeigt in A) bzw. B) mit der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits.

Die Geschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.30C hat ihren wahrscheinlichsten Wert bei 108,5 μm/s und liegt damit genau im ersten großen Maximum der Gesamtgeschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.27B bei ca. 100 μm/s. Aber auch bei diesem Muster lassen sich Geschwindigkeiten mit mehr als 500 μm/s verzeichnen. Bei der Betrachtung der Geschwindigkeitsverteilung muss beachtet werden, dass Organismen mit einer geringeren Geschwindigkeit meist auch eine längere Verweildauer im Bildfeld haben

und somit wesentlich stärker zur Verteilung beitragen. Daher kann man aus der Geschwindigkeitsverteilung keine Rückschlüsse auf das Vorkommen der einzelnen Schwimmuster ziehen. Das wird auch bei der Betrachtung der sehr hohen Zählrate bei Geschwindigkeiten zwischen 0 $\mu\text{m/s}$ und 20 $\mu\text{m/s}$ in Abbildung 4.27B deutlich. Wie Abbildung 4.31 zeigt ist diese hauptsächlich auf die beiden Schwimmuster „Tumble“ und „Orientation and stop“ zurückzuführen. Die beiden Muster besitzen nur ein geringes prozentuales Vorkommen von 4% (vgl. Abbildung 4.28B), tragen aber durch ihre „Tumbling“ und „Stop“-Phasen erheblich zum großen Peak in der Geschwindigkeitsverteilung bei.

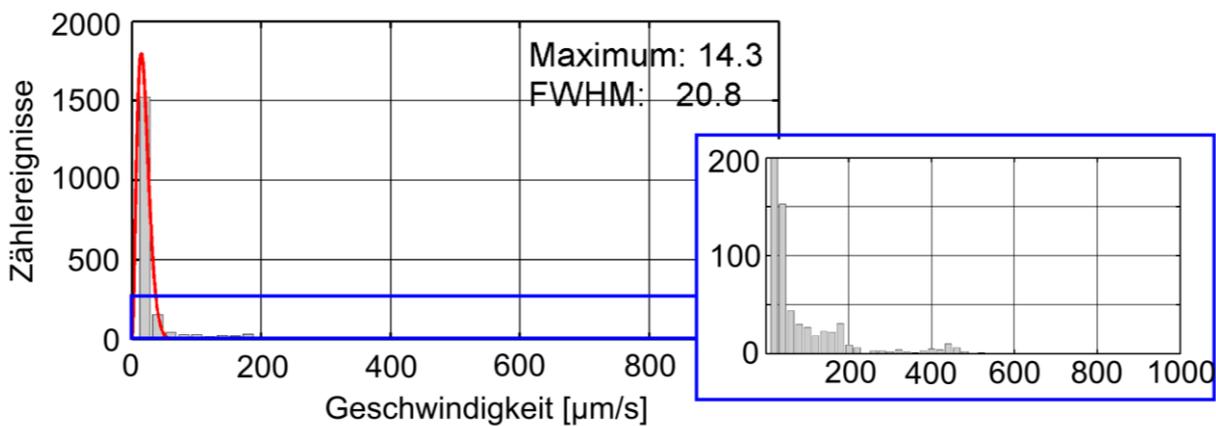


Abbildung 4.31: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm mit Maxwell-Boltzmann Fit über alle Trajektorien eines Datensatzes, die die Muster „Tumble“ und „Orientation and stop“ aufweisen. Der blau eingerahmte Bereich ist noch einmal als Inset für eine bessere Illustration der Zählereignisse größerer Geschwindigkeiten dargestellt.

In Abbildung 4.32 ist jeweils ein Beispiel für eine Trajektorie mit dem Muster „Tumble“ und „Orientation and stop“ dargestellt. Die Farbcodierung der Geschwindigkeit (rot: 0-20 $\mu\text{m/s}$, grün: 20-50 $\mu\text{m/s}$ und blau: 50-100 $\mu\text{m/s}$) in der „Tumble“ Trajektorie (siehe Abbildung 4.32A) zeigt deutlich zwei „Tumbling“ Phasen, bei denen die Geschwindigkeit über mehrere Sekunden sehr gering ist (0-10 $\mu\text{m/s}$). Dazwischen ist ein „Orientation“ Muster zu erkennen, mit häufigen Richtungsänderungen und sowohl schnellen als auch langsamen „Run“ Phasen. Während die Trajektorie mit dem Muster „Tumble“ in Abbildung 4.32A längere Schwimmbewegungen mit kurzen „Tumbling“ Phasen zeigt, ist es bei dem Muster „Orientation and stop“, wie in Abbildung 4.32C gezeigt, umgekehrt. Bei diesem Muster zeigen die Organismen längere „Stop“-Phasen ohne jegliche Eigenbewegung und gehen nur

für kurze Zeit (im Mittel für $4,3 \text{ s} \pm 2,9 \text{ s}$) in eine Schwimmbewegung über (vgl. Abbildung 4.32D).

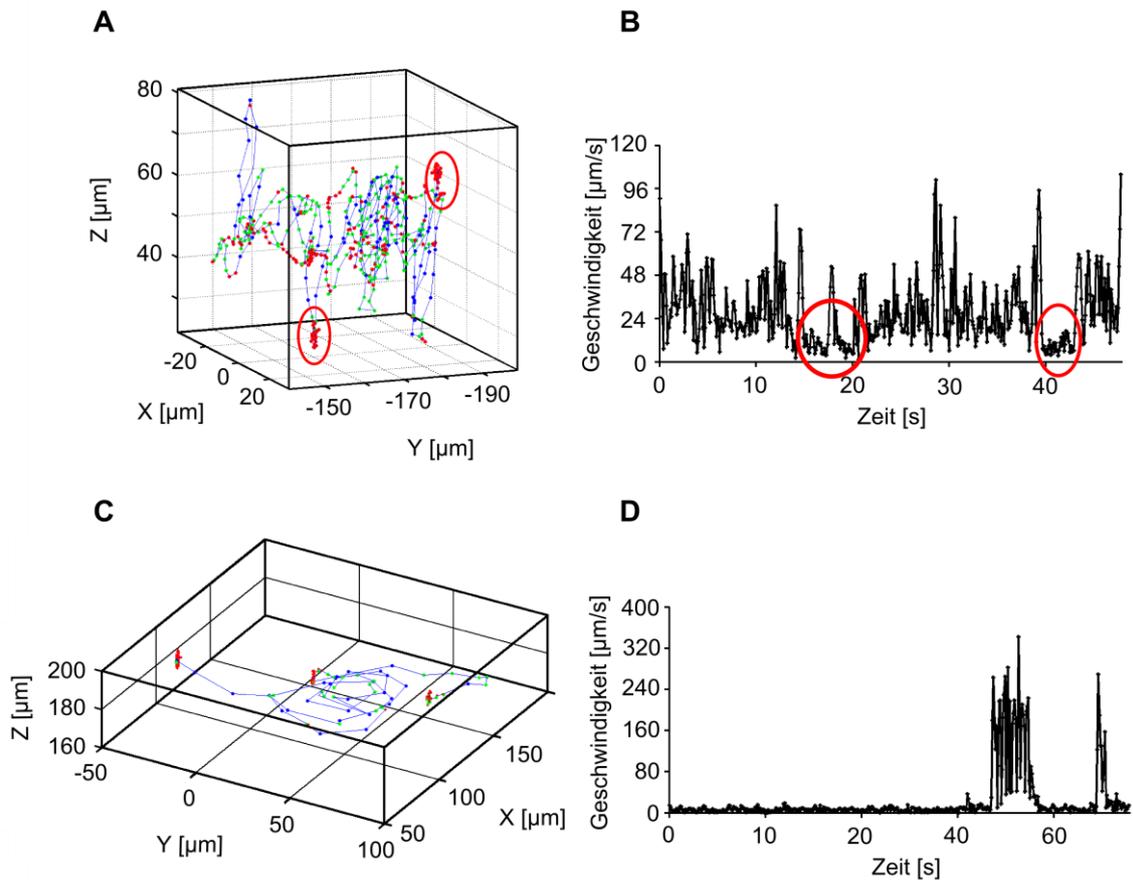


Abbildung 4.32: Repräsentative Trajektorien des Musters A) „Tumble“ und C) „Orientation and stop“. Die Geschwindigkeiten in den Trajektorien sind farbcodiert (rot: $0\text{-}20 \text{ }\mu\text{m/s}$; grün: $20\text{-}50 \text{ }\mu\text{m/s}$; blau $50\text{-}100 \text{ }\mu\text{m/s}$). B) zeigt den zeitlichen Verlauf der Geschwindigkeit der Trajektorie aus A). Innerhalb der Trajektorie und dem Geschwindigkeits-Diagramm sind zwei ausgeprägte „tumbling“ Phasen durch rote Kreisen gekennzeichnet. D) stellt den zeitlichen Verlauf der Geschwindigkeit der Trajektorie aus C) dar.

4.3.3 Diskussion und Fazit

Mit dem Hauptziel, den Besiedlungsprozess von motilen Biofouthern in Abhängigkeit von der verwendeten Oberfläche mittels holographischer Mikroskopie in situ zu verfolgen und mit Messungen von *Ulva linza* Sporen unter Laborbedingungen zu vergleichen, wurde das holographische Mikroskop an einem Teststandort direkt im Feld aufgebaut und Tracking Experimente mit Meerwasser durchgeführt. Dabei konnte eine Vielzahl unterschiedlicher motiler Organismen aufgenommen werden. Nach Analyse der holographischen Videos zeigten diese allerdings keinerlei Wechselwirkungen mit einer Oberfläche, was laut Statistik der statischen Immersionstests auch nicht zu erwarten war. Daher stellte sich die Frage ob es sich bei den beobachteten motilen Organismen überhaupt um Biofouler handelt, deren Ziel es ist sich an Oberflächen anzulagern. Die äußerst schlechte Statistik, bzw. das gänzliche Fehlen von Oberflächenereignissen in den Tracking Experimenten korreliert mit der Auswertung simultan am gleichen Teststandort durchgeführter statischer Immersionstests zur Untersuchung der integralen Besiedlung unterschiedlicher SAMs [170]. Auf diesen Oberflächen konnten selbst nach mehrstündiger Inkubation in Meerwasser nur wenige einzelne Organismen in einem Bildfeld von 1 mm^2 beobachtet werden, bei denen es sich hauptsächlich um nicht motile Organismen wie Kieselalgen handelt. Die Anzahl an motilen Biofouthern, wie beispielsweise Algensporen, in der verwendeten Meeresprobe scheint demnach sehr gering zu sein. Zu gering um mit der holographischen Mikroskopie in einem kurzen Beobachtungszeitraum und einem kleinen Bildfeld Oberflächenereignisse mit Biofouthern zu detektieren. Neben motilen Algensporen, die sich an feste Substrate anlagern müssen um ihren Lebenszyklus fortzusetzen, gibt es im Meer eine riesige Zahl an motilen, planktonisch lebenden Einzellern, den Phytoflagellaten. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei den in den holographischen Videos beobachteten Organismen um solche, dem Nanoplankton zugeordnete Spezies.

Die Analyse der Schwimmaktivität über einen Zeitraum von 8 h zeigte, dass die Aktivität kaum abnahm. Um die Mittagszeit (12:30 Uhr) stieg die Schwimmaktivität sogar an, was zur Hypothese veranlasst, dass die Schwimmaktivität von der Tageszeit abhängt. Tatsächlich ist bekannt, dass Phytoplankton photosynthetisch aktiv ist und innerhalb einer Wassersäule über mehrere Hundert Meter auf und ab migriert [122]. In den oberflächennahen Wasserschichten ist die Lichtintensität am größten um Photosynthese zu betreiben. In tieferen Schichten ist allerdings das Nahrungsangebot besser. Daher wandern die Organismen im Laufe eines Tages auf und ab [199]. Mittags, wenn das Sonnenlicht in tiefere Schichten eintaucht, schwimmen

sie abwärts, was den Anstieg der Aktivität um 12:30 Uhr erklären würde. Während der Dämmerung, Nachts und Morgens halten sie sich in oberflächennahen Schichten auf. Allerdings muss beachtet werden, dass die beobachteten Organismen in dem holographischen Experiment zu keiner Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, sondern sich bis auf den Zeitraum der Messung in der dunklen Probenkammer aufhielten. Während der Messungen wurden die Organismen mit grünem Laserlicht ($\lambda = 532 \text{ nm}$) bestrahlt, weshalb eine phototaktische Reaktion nicht ausgeschlossen werden kann. Für *Chlamydomonas reinhardtii* kann beispielsweise phototaktisches Verhalten auf die verwendete Wellenlänge nachgewiesen werden [200]. Auf das Verhalten der Sporen der *Ulva linza* hingegen hat der grüne Laser keine Auswirkungen [167]. Die Tageszeitabhängigkeit der Schwimmaktivität ist daher rein spekulativ. Leider konnten für weitere Experimente keine vergleichbaren Aktivitätsanalysen durchgeführt werden, die die Hypothese unterstützen könnten. Falls dieses Experiment einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Aktivität und Tageszeit geben sollte, wäre dies ein Indiz dafür, dass der tageszeitliche Migrationsprozess nicht durch das Sonnenlicht, sondern durch andere, unbekannte Faktoren gesteuert wird. Durch weitere holographische Experimente, die auf die tageszeitliche Aktivitätsanalyse abzielen, könnten somit neue Erkenntnisse über das Migrationsverhalten und Mechanismen von Phytoplankton gewonnen werden.

Neben den Aktivitätsschwankungen innerhalb eines Tagesexperiments gibt es auch erhebliche Schwankungen zwischen einzelnen Experimenten an verschiedenen Tagen, wie der Vergleich der beiden Experimente in Abbildung 4.26 andeutet. Wie die Literatur und auch die Ergebnisse der statischen Immersionstests zeigen, haben äußere Bedingungen wie die Luft- und Wassertemperatur großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Populationsgemeinschaft und deren Verhalten [170, 201]. Auch das Wetter mit unterschiedlichen Windbedingungen und Niederschlag kann das Verhalten der Organismen beeinflussen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Aktivitätsschwankungen auf unterschiedliche äußere Bedingungen zurückzuführen sind.

Durch das Tracken der aufgenommenen motilen Organismen konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedliche, teilweise komplexe Schwimmmuster aufweisen. Neben dem für *Ulva linza* Sporen ebenfalls zu beobachtenden „Orientation“ Muster und dem „Straight path“ kann vor allem für größere längliche Organismen das Muster „Undulation“ und für kleinere runde Organismen die Muster „Tumble“ und „Orientation and stop“ beobachtet werden. Allerdings

kommen diese komplexeren Schwimmuster mit einer wesentlich geringeren Häufigkeit vor als das Muster „Straight path“, das bei mehr als 50% der Organismen auftritt. Da die Organismen mit dem „Straight path“ wesentlich größere Strecken zurücklegen als mit den übrigen Schwimmustern kann nicht ausgeschlossen werden, dass das häufige Auftreten dadurch zustande kommt, dass ein einzelner Organismus mehrfach durch das Bildfeld schwimmt und damit wiederholt zur Verteilung beiträgt. Einige Trajektorien des Schwimmusters „Orientation“ ähneln sehr stark dem gleichnamigen Muster der *Ulva* Sporen, was auf einen ähnlichen Schwimmmechanismus hindeutet. Wie in Kapitel 2.4.4 erwähnt, konnten bereits verschiedene Schwimmmechanismen für einige Spezies des Phytoplanktons charakterisiert werden [129]. Vertreter der Gattung *Prasinophyceae*, wie beispielsweise *Prasinopapilla* oder *Pyramimonas*, zeigen, wie *Ulva* Sporen, den Brustschwimmstil als Fortbewegungsmechanismus und können damit ähnliche Muster wie die *Ulva* Sporen aufweisen. Wie die Geschwindigkeitsverteilung in Abbildung 4.27B zeigt werden für die Organismen im Feld auch höhere Geschwindigkeiten verzeichnet (vgl. zweites Maximum bei 500 $\mu\text{m/s}$) als für *Ulva* Sporen, die höchstens eine mittlere Geschwindigkeit von ca. 250 $\mu\text{m/s}$ aufweisen können [130]. Diese hohen Geschwindigkeiten sind hauptsächlich auf das Muster „Straight path“ zurückzuführen.

Allgemein dient die Fortbewegung den Phytoflagellaten nicht nur dazu sich innerhalb der Wassersäule auf und ab zu bewegen und günstigen Umgebungsbedingungen zu folgen, sondern auch innerhalb einer homogenen Umgebung ihre Nahrungsressourcen zu maximieren [199, 202]. Für den Phytoflagellat *Dunaliella tertiolecta* konnte in früheren Studien chemotaktisches Verhalten nachgewiesen werden [203]. Ähnlich dem Schwimmverhalten von Bakterien wie *E. coli*, die mit ihrem „Run and Tumble“ Mechanismus ebenfalls chemotaktisches Verhalten aufweisen [103], zeigen einige marine Flagellaten das in dieser Arbeit neu beschriebene „Tumble“ Muster. Dieses ist keineswegs in Analogie zu setzen mit dem „Run and Tumble“ Mechanismus von Bakterien, aber die „Tumbling“-Phasen scheinen diesen Organismen ebenfalls als Neuorientierungsphase zu dienen. Das Muster „Orientation and stop“ ist sehr interessant zu beobachten. Die Schwimmphasen in diesem Muster sind nur sehr kurz zwischen den einzelnen „Stop“-Phasen, daher wird vermutet, dass diese Organismen hauptsächlich unbeweglich im Wasser umhertreiben und nur sporadisch, bei Bedarf in eine Schwimmphase übergehen. Da die Dichte an Organismen in der Probe hoch ist kann vermutet werden, dass die in den Messungen beobachteten Schwimmphasen durch andere, in der Nähe vorbeischwimmende Organismen induziert werden. Dies gleicht einem Fluchtmechanismus gegenüber potentiellen Fressfeinden, wie beispielsweise dem

Zooplankton. Harvey et al. konnten erst kürzlich beobachten, dass Phytoplankton Fluchtreaktionen aufweist [204].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Feld-Experimente führten zur erstmaligen Beschreibung unterschiedlicher Schwimmuster motiler, mariner Mikroorganismen mit einer Größe zwischen 3 µm und 25 µm, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die dem Nanoplankton angehörenden Phytoflagellaten handelt. Die Vielfalt an Schwimmustern kann vermutlich auf unterschiedliche Begeißelung und damit verbundene Schwimmmechanismen zurückgeführt werden (vgl. Kapitel 2.4.4). Leider ist die Auflösung der Holographie nicht ausreichend um die Art der Begeißelung zu ermitteln und die Organismen exakt zu identifizieren. Dennoch ermöglicht die Holographie kleinste marine Lebewesen und ihr Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen und liefert eine Plattform für weitere Studien zur Ökologie von Phytoplankton. Besonders im Zusammenhang des Fisch Sterbens aufgrund von explosionsartiger Vermehrung toxischen Phytoplanktons können Untersuchungen zum Verhalten einzelner Phytoplankton Spezies wichtige Informationen liefern.

Die in situ Untersuchung von Biofoulern und deren Wechselwirkungen mit verschiedenen Oberflächen ist in den Feldexperimenten leider nicht geglückt. Daran sind viele Faktoren beteiligt, wie beispielsweise die Lage des Teststandortes sowie die Jahreszeit. Denn in früheren Feld-Studien konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Biofouler Population mit der Jahreszeit variiert [36, 205, 206]. Zum Beispiel unterliegen auch die Sporen der *Ulva linza* einer Saisonalität. Daher beschränken sich die Experimente mit *Ulva* Sporen nur auf den Zeitraum zwischen März und Oktober. Die in dieser Arbeit durchgeführten Feld-Experimente wurden im Zeitraum November bis Dezember also im Winter durchgeführt. Es besteht die Möglichkeit, dass erneute Messungen in den Sommermonaten zu einer erhöhten Statistik der Beobachtung von Biofoulern führen. Auch die Wahl des Teststandortes muss für die holographischen Experimente überdacht werden. Da es sich bei den motilen Biofoulern hauptsächlich um Sporen mehrzelliger Algen handelt, ist es sinnvoll einen Standort in der Nähe adulter Algenpflanzen zu wählen, die die Sporen zur Reproduktion abgeben, und gezielt Proben in umliegender Umgebung dieser Algen zu nehmen. Die erstmalig durchgeführten Feld-Experimente mit der Holographie waren ein erster Versuch, der neben den Ergebnissen über planktonische lebende Einzeller auch

kostbare Erkenntnisse für nachfolgende Feld-Experimente zur Untersuchung von Biofoulern geliefert hat.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene flagellierte Mikroorganismen, nämlich das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und die Zoosporen der Grünalge *Ulva linza*, hinsichtlich ihrer Motilität untersucht. Mit dem Hintergrund der Biofouling Problematik war es das Ziel, neue Erkenntnisse zum Fortbewegungsmechanismus von *P. aeruginosa* zu gewinnen und Verhaltensmuster von *Ulva linza* Zoosporen bei der Besiedlung von positiv geladenen Oligopeptid Oberflächen zu analysieren. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit, neben den Laborexperimenten mit *Ulva linza*, Feldexperimente durchgeführt, um das Verhalten von marinen Biofouthern in einer realistischeren Umgebung zu erforschen.

Zur Analyse der Motilität der Mikroorganismen wurde die digitale in-line Holographie angewandt, die bereits bei zahlreichen anderen biologischen Fragestellungen Anwendung fand [5, 29, 144, 145, 187, 207]. Die digitale in-line Holographie ist eine linsenlose Abbildungsmethode, die gegenüber konventionellen Mikroskopietechniken den Vorteil besitzt nicht anfällig gegen Abbildungsfehler zu sein und kein Rastern über die Probe zu benötigen, um die 3-dimensionale Rauminformation zu erhalten.

Im ersten Teil dieser Arbeit ermöglichte es die holographische Mikroskopietechnik durch die Aufnahme von Hologrammserien erstmals 3-dimensionale Trajektorien frei schwimmender Bakterien der Art *Pseudomonas aeruginosa* zu bestimmen. Die Aufnahme der kleinen Bakterien mit einer Länge von ca. 2 μm und einer Breite von ca. 0,5 μm war eine Herausforderung, da die Auflösung der meisten experimentellen Aufbauten limitiert und der Kontrast, erzeugt durch die kleinen Bakterien, sehr gering ist [149]. Durch geeignete Wahl der Aufbaugeometrie und die Verwendung eines großen Detektorchips in der Kamera konnten die Bakterien mit ausreichender Auflösung und Vergrößerung aufgenommen werden. Für den *P. aeruginosa* Stamm PA154, der aufgrund seiner herausragenden Schwimmaktivität in semisoliden Schwimmgagar Motilitäts-Assays für die holographischen Experimente ausgewählt wurde, konnten fünf verschiedene Schwimmmuster klassifiziert werden. Drei dieser Schwimmmuster, nämlich „Helix“, „Pseudohelix“ und „Twist“ wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Helikales Schwimmverhalten konnte nach unserem Wissen erstmals überhaupt für kleine Bakterien wie *P. aeruginosa* experimentell nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* zwischen den verschiedenen Mustern umhersalten kann. Durch die beobachteten unterschiedlichen Linearitäten der

Schwimmuster und der damit verbundenen Effizienz der Netto-Propagation können die Bakterien damit zwischen Schwimmmodi mit häufigen Richtungsänderungen und Modi mit verbesserter direktonaler Stabilität wechseln. Für weitere Untersuchungen in der Zukunft wäre es interessant die Motilitätsstudie des freien Schwimmverhaltens auf oberflächennahes Schwimmen und Oberflächen Besiedlung auszuweiten um die Biofilmbildung auf Einzelzellebene zu studieren.

Die Besiedlung von positiv geladenen Oligopeptid Oberflächen bestehend aus Arginin (Arg), Tyrosin (Tyr) und Glycin (Gly) Einheiten durch *Ulva linza* Zoosporen ist Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit. Dabei wurden Oberflächen mit unterschiedlichem ArgTyr Oberflächenanteil, nämlich 100% ArgTyr, 50% ArgTyr und 0% ArgTyr untersucht. Die ArgTyr enthaltenden Oberflächen zeigten in Standard Besiedlungs-Assays eine starke Besiedlung mit *Ulva* Sporen, die mit abnehmendem ArgTyr Oberflächenanteil geringer wurde. Allein auf der 100% ArgTyr Oberfläche konnte eine geringe Anzahl „pseudo“-gesiedelter Sporen detektiert werden, während auf der 50% und 0% ArgTyr Oberfläche alle Sporen normal gesiedelt waren. Anhand der holographischen Aufnahmen wurde die Besiedlungsdynamik der Sporen auf den verschiedenen Oligopeptid Oberflächen weitergehend untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anlagerung der Sporen an die ArgTyr enthaltenden Oberflächen extrem rapide erfolgt. Die meisten schwimmenden Sporen lagerten sich innerhalb der ersten Sekunden nach der Sporeninjektion in den Probenkanal an die ArgTyr Oberflächen an, was sich auch durch einen Abfall der Sporenaktivität mit der Zeit bemerkbar machte, da durch die rasche Anlagerung die Anzahl an schwimmenden Sporen in Lösung geringer wurde. Zwischen der 100% und der 50% ArgTyr Oberfläche ließen sich deutliche Unterschiede in der Abnahme der Sporenaktivität und der Anzahl an bereits während der Sporeninjektion an der Oberfläche anhafteten Sporen, erkennen, was auf eine verstärkte Wechselwirkung der Oberfläche mit den Sporen mit steigendem ArgTyr Oberflächengehalt hindeutete. Die Kontrolloberfläche mit 0% ArgTyr Oberflächenanteil zeigte wie zu erwarten einen komplett anderen Trend als die ArgTyr enthaltenden Oberflächen. Die Bestimmung der Trajektorien zeigte, dass die Sporen in Anwesenheit der 0% ArgTyr Oberfläche in der Nähe dieser akkumulieren und mit dem „Gyration“ Muster schwimmen. Bei den ArgTyr enthaltenden Oberflächen zeigen die Sporen das „Hit and stick“ Schwimmuster, mit dem sie beim ersten Oberflächenkontakt an dieser kleben blieben. Einige der auf der ArgTyr Oberfläche klebenden Sporen zeigten daraufhin das „Twitching“ Muster, d.h. sporadische Zappelbewegungen, bei denen vermutet wurde, dass sie

die Reorientierung der Sporen und damit die im Standard Besiedlungs-Assay hauptsächlich beobachtete, normale Besiedlung fördern.

Im dritten und letzten Teil dieser Arbeit wurden holographische Mikroskopie Experimente im Feld an der Ostküste Floridas durchgeführt mit dem Ziel, Biofouler und deren oberflächenspezifisches Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung zu verfolgen und Oberflächenereignisse mit unterschiedlichen Oberflächen holographisch zu detektieren. Dieses Ziel konnte aufgrund der mangelnden Statistik an Biofoulern leider nicht erreicht werden. Dennoch konnten Trajektorien verschiedenster mariner Mikroorganismen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um planktonisch lebende Phytoflagellaten handelte, bestimmt werden. Dies führte zur erstmaligen Beschreibung unterschiedlicher Schwimmmuster motiler, mariner Mikroorganismen mit einer Größe zwischen 3 μm und 25 μm , die aufgrund ihrer augenscheinlichen Eigenschaften in fünf verschiedene Schwimmmuster klassifiziert wurden. Für künftige holographische Experimente im Feld zur Untersuchung des Besiedlungsprozesses von Biofoulern muss die Statistik erheblich verbessert werden. Da das Auftreten von Biofoulern von einigen Faktoren wie beispielsweise auch der Jahreszeit und der Lage des Teststandortes abhängt, müssen diese sorgfältig gewählt werden.

6 Anhang

6.1 Publikationen

Eingereicht:

Svenja M. Vater, Sebastian Weiße, Stojan Maleschlijski, Carmen Lotz, Florian Koschitzki, Thomas Schwartz, Ursula Obst, Axel Rosenhahn

Swimming behavior of *Pseudomonas aeruginosa* studied by holographic 3D tracking.

In Vorbereitung:

Svenja M. Vater, Thomas Ederth, John Finlay, Maureen E. Callow, James A. Callow, Bo Liedberg, Michael Grunze, Axel Rosenhahn

Interaction of *Ulva* zoospores with positively charged peptides studied by holographic microscopy.

I. Thome, S. Bauer, S. M. Vater, K. Zargiel, M. Alles, M.P. Arpa-Sancet, G. Swain, M. Grunze, A. Rosenhahn.

Conditioning of self assembled monolayers and its implication for fouling in the field.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PEG	Polyethylenglykol
EG	Ethylenglykol
OEG	Oligoethylenglykol
SEM	Sekundärelektronenmikroskopie
EPS	Extrapolymerer Substanzen
AHL	Acetyl Homoserin-Lacton
TBT	Tributylzinn
FRC	Engl. Fouling Release Coating
SAM	Selbstassemblierende Monolagen
PTFE	Polytetrafluoroethylen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Lys	Aminosäure Lysin
Tyr	Aminosäure Tyrosin
Arg	Aminosäure Arginin
Gly	Aminosäure Glycin
Cys	Aminosäure Cystein
E. coli	Escherichia coli
OD	Optische Dichte
NA	Numerische Apertur
δ_{lat}	Laterale Auflösungsgrenze
δ_{tief}	Tiefenauflösungsgrenze
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
aqua dest.	Destilliertes Wasser
PA154	Umweltisolat von P. aeruginosa
PA34	Umweltisolat von P. aeruginosa
PA253	Umweltisolat von P. aeruginosa
VR143/97	Umweltisolat von P. aeruginosa
SG81	Umweltisolat von P. aeruginosa
SG81R1	Umweltisolat von P. aeruginosa
ATCC27853	Umweltisolat von P. aeruginosa
PAO1	Umweltisolat von P. aeruginosa

LB-Medium	Luria Bertani-Kultivierungsmedium
rpm	Revolutions per minute
FoV	Bildfeld, engl. für Field of View
ibidi Kanal	Standard μ Slide I-Luer 0,8 der Firma ibidi
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
FIT	Florida Institute for Technology
ASW	Künstliches Meerwasser (engl. für artificial seawater)
IRAS	Infrared reflection absorption spectroscopy
(v/v)	Volumenanteil
SLV	Engl. für straight line velocity
CLV	Engl. für curvilinear velocity
GUS	Gegen den Uhrzeigersinn
US	Im Uhrzeigersinn
LH	Links-händig
RH	Rechts-händig
FOTS Oberflächen	Tridecafluorooctyl-triethoxysilan SAMs auf Glas
DLVO Theorie	Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek Theorie

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: (A) Elektronen-Mikroskopische Aufnahme schwärmender <i>P. aeruginosa</i> Zellen des normalen Phänotyps mit einem Flagellum und einer Länge von 2 µm und Schwärmerzellen mit lang gestrecktem Zellkörper (3-4 µm) und zwei Flagellen (siehe Pfeil). (B) Dentriten-förmiges Kolonienmuster schwärmender <i>P. aeruginosa</i> auf semisolidem Agar mit Zusatz von Aspartat und Glucose [49].	7
Abbildung 2.2: Grünalgen der Art <i>Ulva linza</i> fest adhäriert an Steine in der Gezeitenzone der Nordsee (Süd Wales).	8
Abbildung 2.3: Lebenszyklus von <i>Ulva linza</i> .	9
Abbildung 2.4: A) SEM- Aufnahme von <i>Ulva linza</i> Zoosporen [22]. B) Illustration der verschiedenen Stadien des Besiedlungsprozesses von <i>Ulva linza</i> Zoosporen [54].	10
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Biofouling Prozesses. Organische Moleküle bilden zunächst den Konditionierungs-Film aus. Danach lagern sich die Biofouler an das Substrat an. Diese werden unterteilt in „Mikrofouler“ (hier stellvertretend dargestellt durch Bakterien und Diatomeen), „soft Makrofouler“ (hier dargestellt durch Algensporen) und „hard Makrofouler“ (hier dargestellt durch Seepockenlarven und adulte Seepocken). Es muss beachtet werden, dass die Größen der Organismen in der Darstellung nicht den wahren Größenverhältnissen entsprechen.	12
Abbildung 2.6: Illustration der Biofilm-Bildung, -Reifung und -Verbreitung am Beispiel von <i>P.aeruginosa</i> . Verändert nach [64].	13
Abbildung 2.7: Von Baier et al. beobachteter Zusammenhang zwischen freier Oberflächenenergie und der Menge an biologischem Material adhäriert auf der Oberfläche („Baier-Kurve“) [80].	16
Abbildung 2.8: SEM Abbildungen unterschiedlicher Oberflächentopographien auf Polydimethylsiloxan (PDMS) zur Untersuchung des Besiedlungsverhaltens von <i>Ulva linza</i>	

Sporen auf strukturierten Oberflächen. A) Sharklet AFTM, B) Säulen und Dreiecke, C) Säulen und D) Kämmen [87]. 18

Abbildung 2.9: Angriffsziele der antimikrobiellen Peptide in der bakteriellen Zellmembran, deren äußere Membran-Schicht im Gegensatz zu der von Eukaryoten negativ geladen ist. Verändert nach [97]. 21

Abbildung 2.10: Fluoreszenz-Mikroskopische Aufnahmen gesiedelter *Ulva linza* Zoosporen auf (a) Glas und (b) Arginin-Tyrosin Oligopeptid SAM. Die kleinen Abbildungen im linken unteren Rand zeigen Aufnahmen (a) einer normal gesiedelten Spore auf Glas und (b) einer „pseudo-gesiedelten“ Spore auf dem ArgTyr SAM [33]. 22

Abbildung 2.11: Zeitliche Entwicklung der Sporendichte auf einer 100% ArgTyr Probe. Aufgetragen sind die Gesamtanzahl an Sporen (total, schwarz), die Anzahl an normalen runden Sporen (round, blau) und die Anzahl an „pseudo-gesiedelten“ Sporen (ovoid, grün) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die rote Kurve zeigt den Anteil an „pseudo-gesiedelten“ Sporen an der Gesamtpopulation gesiedelter Sporen in Abhängigkeit von der Zeit. Als Kontrolle ist die Besiedlung einer Glasprobe (AWG) als gestrichelte Kurve gezeigt [33]. 23

Abbildung 2.12: A) Schematische Darstellung des Flagellen Motors von Prokaryoten. Die einzelnen Proteine sind nach ihren codierenden Genen benannt [103]. B) Schematischer Querschnitt eines Eukaryoten Flagellums mit 9+2 Axonem [104]. 26

Abbildung 2.13: Skizze zur Veranschaulichung der Vorschub-Erzeugung eines Bakteriums durch schnelle Rotation des helicalen Filaments gegen den Uhrzeigersinn. Betrachtet werden zwei Segmente des Filaments S_1 und S_2 , die genau eine halbe Phasenumdrehung entfernt sind. Die Geschwindigkeiten der beiden Segmente v und v' können in eine parallele Komponente v_p bzw. v'_p und eine senkrechte Komponente v_n bzw. v'_n zerlegt werden. Genau entgegengesetzt zu v_p und v_n wirken die Reibungswiderstände F_n und F_p . Dabei ist deren Betrag gegeben durch das Verhältnis $F_n/F_p \cong 2v_n/v_p$. Die Reibungswiderstände haben eine zur helicalen Achse parallele F_v bzw. F'_v und eine senkrechte F_Ω bzw. F'_Ω Komponente. Während F_Ω und F'_Ω entgegengesetzt wirken und so zum Drehmoment beitragen wirken F_v und F'_v in die gleiche Richtung und steuern zum Vorschub der Zelle bei [109]. 29

Abbildung 2.14: Ebenen-Projektionen eines 3-dimensionalen „Random walk“ von <i>E. coli</i> aufgenommen mit einem von Berg entwickelten Mikroskopie-System [118]. Gezeigt sind Ebenenprojektionen. Der Start der Trajektorie ist mit einem schwarzen Punkt markiert. Eine Faltung entlang der gestrichelten Linie aus der Ebene heraus ergibt die exakte Orientierung dreier Kubusflächen und somit die 3-dimensionale Lage der Trajektorie [116].....	31
Abbildung 2.15: Schwimmmechanismus zweier unterschiedlich begeißelter Bakterien. A) Peritrich begeißeltes Bakterium (vgl. <i>E. coli</i>), dessen Flagellen sich bündeln, wenn sich diese gegen den Uhrzeigersinn (GUS) drehen und entbündeln, wenn sie sich im Uhrzeigersinn (US) drehen. Letzteres bewirkt ein ungerichtetes Taumeln der Zelle. B) Monotrich-polar begeißeltes Bakterium (vgl. <i>P. aeruginosa</i>). Eine Umkehr der Rotationsrichtung der Flagellen resultiert in einer Umkehr der Schwimmrichtung. Verändert nach [47]......	32
Abbildung 2.16: A) Illustration der zwei Schwimmmodi von <i>Chlamydomonas</i> . In Vorwärtsrichtung schwimmt die Zelle im Brustschwimm-Modus. Rückwärts wird die Zelle durch symmetrischen Wellenschlag angetrieben [128]. B) Darstellung des Effektiv- Schlags unter den Nummern 1-7 und des Erholungs-Schlags unter den Nummern 8-11 von <i>Chlamydomonas</i> im Brustschwimm-Modus [125].....	34
Abbildung 2.17: Klassifikation verschiedener einzelliger Algen hinsichtlich ihrer Flagellen- und Schwimmmechanismen in sechs verschiedene Gruppen. Die Pfeile kennzeichnen die Schwimmrichtung. Die Buchstaben c und f stehen jeweils für „Cilien-Schlag“ bzw. „Flagellen-Schlag“ wobei die Unterscheidung c1 und c2 eine Phasendifferenz zwischen diesen „Cilien-Schlägen“ kennzeichnet [129]......	36
Abbildung 2.18: Skizze der verschiedenen Schwimmmuster von <i>Ulva linza</i> Zoosporen. Diese wurden klassifiziert in (1) „Orientation“, (2) „Wobbling“, (3) „Gyration“, (4) „Hit and run“, (5) „Hit and stick“ und (6) „Spinning“ [29].	37
Abbildung 2.19: Prozentuales Auftreten der Schwimmmuster „Gyration“, „Hit and run“, „Hit and stick“ und (6) „Spinning“ in Abhängigkeit der angebotenen Oberfläche A) AWG, B) PEG und C) FOTS [130]......	38

- Abbildung 2.20: Illustration des grundlegenden Aufbaus der digitalen Holographie in der in-line Geometrie unter Verwendung sichtbarer Laserstrahlung als Lichtquelle [29]..... 41
- Abbildung 2.21: Schematische Darstellung des geometrischen Aufbaus der in-line Holographie mit Kennzeichnung der relevanten geometrischen Komponenten zur Bestimmung der Auflösung. 43
- Abbildung 3.1: A) Schematische Darstellung des holographischen Mikroskops, das für die Messungen mit *P. aeruginosa* verwendet wurde. B) Schematische Darstellung des transportablen holographischen Mikroskops, das für die Messungen mit *Ulva linza* Sporen und für die Feldexperimente verwendet wurde. 45
- Abbildung 3.2: A) Photographie eines ibidi Standard μ Slide I-Luer Kanals, der mit blauer Tinte befüllt wurde. Die Öffnungen des Kanals sind mit roten Gummistopfen und Parafilm® verschlossen. B) Schematische Darstellung des ibidi Standard μ Slide I-Luer Kanals mit den Abmessungen $L = 50$ mm, $B = 5$ mm und $H = 800$ μ m, der für die holographischen Messungen mit Hilfe einer Mikropipette mit 200 μ l Bakteriensuspension befüllt wurde..... 51
- Abbildung 3.3: Bildliche Darstellung der *Ulva linza* Ernte und Sporen Freisetzung unter Laborbedingungen an der University of Birmingham. 54
- Abbildung 3.4: Chemische Struktur des in dieser Arbeit untersuchten positiv geladenen Oligopeptids mit Arginin und Tyrosin Einheiten. Es besteht aus einem Cystein zur Verankerung mit dem Goldsubstrat, zwei Glycin Einheiten als Abstandhalter und vier bzw. drei abwechselnd angeordneten Arginin und Tyrosin Einheiten. Zur Präparation der gemischten SAMs mit unterschiedlichem Arginin Tyrosin Oberflächenanteil wurde neben dem abgebildeten Peptid das rot eingerahmte Glycin Peptid verwendet. Die 0% ArgTyr Oberfläche besteht zu 100% aus diesem Glycin Peptid und wird als Kontrolloberfläche in der Analyse mitgeführt..... 56
- Abbildung 3.5: Schematische Abbildung des mit Peptid beschichteten sticky-Slide I-Luer 0,8 der Firma ibidi, der auf den mit dem gleichen Peptid beschichteten Goldobjektträger geklebt wurde, um einen Kanal mit einer Höhe von 800 μ m zu bilden. Die Sporensuspension wurde

über Silikonschläuche, die über Konnektoren mit dem Kanal verbunden waren, mittels Spritze in den Kanal gefüllt.58

Abbildung 3.6: A) Lage des Teststandortes des Florida Institute of Technolgy an der Indian River Lagoon nahe Melbourne, Florida [171]. B) Aufbau des holographischen Mikroskops im „mobilen“ Labor direkt am Teststandort.60

Abbildung 3.7: Schematische Darstellungen zur Definition der Winkel A) α_v und B) α_z64

Abbildung 4.1: Digitale Photographien der mit den Stämmen A) PA253 und B) PA154 inokulierten Schwimmgagar-Platten. Der Grad der Ausbreitung der Kolonien, gekennzeichnet durch die kreisförmige Trübung um den Inokulationspunkt, ist ein Maß für die Motilität des jeweiligen Bakterienstammes [175].66

Abbildung 4.2: A) Ausbreitungsgrad der 8 untersuchten Stämme von *P. aeruginosa* in semisolidem Weichagar nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C. B) Klassifikation der Stämme in die Kategorien ++ starke Schwimmer, + moderate Schwimmer und - schwache Schwimmer.67

Abbildung 4.3: Trajektorien von *P. aeruginosa* (PA154) in zwei verschiedenen Ansichtsperspektiven. A) als 3D- Ansicht mit Kennzeichnung der Lage der optischen Achse und B) als XY-Ebenenprojektion. Die einzelnen Trajektorien können durch die Farbkodierung unterschieden werden. Die schwarzen Pfeile in B) kennzeichnen Trajektorien, bei denen eine Aufeinanderfolge von Schlaufen zu beobachten ist.69

Abbildung 4.4: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle bestimmten Trajektorien von *P. aeruginosa* mit angelegter Fitfunktion der Form einer Maxwell-Boltzmann Geschwindigkeitsverteilung. Das Maximum mit 5,7 $\mu\text{m/s}$ gibt die wahrscheinlichste Geschwindigkeit an. Die Halbwertsbreite (FWHM für Full Width at Half Maximum) des Fits beträgt 9,2 $\mu\text{m/s}$70

Abbildung 4.5: A) Schematische Darstellung der 5 verschiedenen klassifizierten Schwimmuster beobachtet für *P. aeruginosa* nach der Bestimmung von 35 individuellen

Trajektorien. B) Prozentuales Auftreten der klassifizierten Schwimmmuster innerhalb der 35 bestimmten Trajektorien. 73

Abbildung 4.6: 3-dimensionale Darstellungen und 2-dimensionale Ebenenprojektionen repräsentativer Trajektorien, die die einzelnen klassifizierten Schwimmmuster von *P. aeruginosa* aufweisen. Gezeigt sind einzelne Segmente extrahiert aus längeren Trajektorien. A) „Helix“, B) „Pseudohelix“, C) „Meander“, D) „Oszillation“ und E) „Twist“. 76

Abbildung 4.7: A) und B) Zwei verschiedene Ansichtsperspektiven eines Haarnadel-förmigen Segments mit scharfen Umkehrwinkeln α_1 , α_2 , und α_3 extrahiert aus einer Trajektorie, die das Muster „Oszillation“ aufweist. Die Rote Kurve repräsentiert die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar. C) Schematische Darstellung der Bestimmung der Schwimmwinkel α . Diese werden aus drei aufeinanderfolgenden Abstandsvektoren bestimmt um eine Überabtastung der Daten an den Umkehrpunkten zu berücksichtigen. D) Diagramm der bestimmten Schwimmwinkel und der Z-Koordinate des Segmentes in A-B mit den extremen Umkehrwinkeln α_1 , α_2 , und α_3 78

Abbildung 4.8: A) und B) Zwei Ansichtsperspektiven eines Segments ebenfalls aus dem Muster „Oszillation“ extrahiert, dessen Winkel an den Umkehrpunkten P_1 , P_2 und P_3 geringer sind, weshalb eine weniger stark ausgeprägte Haarnadel Form zu beobachten ist. Die Rote Kurve repräsentiert in allen Darstellungen die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen dagegen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar. 79

Abbildung 4.9: Segmente des Schwimmmusters „Helix“. A) 3D-Ansicht und B) Ansicht entlang der helikalen Achse eines linkshändigen Segments mit 3 Windungen. C) 3D-Ansicht und D) Ansicht entlang der helikalen Achse eines rechtshändigen Segments mit 4 Windungen. Die Start- und die Endpunkte der Segmente sind jeweils mit Dreiecken bzw. mit Rechtecken gekennzeichnet. Die Rote Kurve repräsentiert in allen Darstellungen die in X, Y und Z geglättete Trajektorie. Die blauen Punkte stellen dagegen die nur in der Z-Koordinate geglätteten Datenpunkte der Trajektorie dar. 81

Abbildung 4.10: A) Häufigkeiten von linkshändigen und rechtshändigen Windungen ermittelt aus der Analyse von 55 Windungen innerhalb der Muster „Helix“ und „Pseudohelix“. B) Zwei verschiedene Ansichtsperspektiven eines repräsentativen Segments des Musters „Pseudohelix“, in dem das Bakterium die Händigkeit der Windungen von linkshändig (LH) zu rechtshändig (RH) ändert..... 82

Abbildung 4.11: 3D-Darstellungen zweier repräsentativer Trajektorien von *P. aeruginosa* mit Übergängen zwischen verschiedenen Schwimmmustern. A) Trajektorie mit einer Dauer von 110 s und einem Übergang zwischen dem Muster „Meander“ und „Oszillation“. a) und b) repräsentieren die einzelnen Segmente der beiden Schwimmmuster in zwei verschiedenen Ansichtsperspektiven B) Trajektorie mit einer Dauer von 130 s und zwei Übergängen von dem Muster „Pseudohelix“ zu „Helix“ und von „Helix“ zu „Twist“. Die einzelnen Segmente mit dem jeweiligen Schwimmmuster sind in a), b) und c) in zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt..... 84

Abbildung 4.12: Schematische Darstellung zur Berechnung der Linearität eines gegebenen Segments. Start und Endpunkt des hier gezeigten Segments sind grün bzw. blau gekennzeichnet. Die Linearität ergibt sich aus dem Quotienten von effektiver Geschwindigkeit, bestimmt mit der effektiv zurückgelegten Entfernung (rot dargestellt), und der tatsächlichen Geschwindigkeit, bestimmt mit der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke (schwarz dargestellt)..... 85

Abbildung 4.13: Besiedlungs-Assays mit *Ulva linza* Sporen auf geladenen Oligopeptid SAMs mit unterschiedlichen ArgTyr/Gly Oberflächenverhältnissen von 100%, 50% und 0% ArgTyr. Für jede Probe wurden 3 Replikate verwendet auf denen jeweils 10 verschiedene Bildfelder ausgezählt wurden. Aufgetragen ist die Gesamtanzahl an Sporen auf der jeweiligen Oberfläche und die Anzahl an „pseudo“-gesiedelten Sporen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus dem Standardfehler des Mittelwertes ($n = 30$). A) Assay mit der Standard Sporenkonzentration von 10^6 Sporen/ml (entspricht einer optischen Dichte (OD) von 0,15). B) Assay mit einer geringeren Sporenkonzentration von 2×10^5 Sporen/ml (OD = 0.03), entsprechend der Konzentration, die für die holographischen Experimente verwendet wird.. 91

Abbildung 4.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen gesiedelter *Ulva linza* Sporen auf einer A- B) 100% ArgTyr Oberfläche, C-D) 50% ArgTyr Oberfläche und E-F) 0% ArgTyr Oberfläche.

Zur besseren Veranschaulichung der Form der gesiedelten Sporen sind in B), D) und F) Ausschnitte der jeweiligen Aufnahmen A), C) und E) vergrößert dargestellt..... 93

Abbildung 4.15: A) Zeitliche Entwicklung der Sporenaktivität in Probenkanälen mit Oligopeptid Oberflächen mit 100% (rote Kurve), 50% (graue Kurve) und 0% (blaue Kurve) ArgTyr Oberflächenanteil. Die angegebenen Aktivitäten repräsentieren den Mittelwert dreier individueller Datensätze der jeweiligen Oberfläche. Die Fehlerindikatoren ergeben sich aus dem Standardfehler der Mittelwertbildung. B) Anteil der an die verschiedenen Oberflächen angelagerten Sporen für die Gesamtpopulation an Sporen im Bildfeld in Abhängigkeit von der Zeit. Der Anteil zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ repräsentiert die Anzahl an Sporen die sich während der Injektion angeheftet sind. Der Fehler resultiert aus der Standardabweichung der Berechnung der mittleren Anzahl an Sporen im Bildfeld. 95

Abbildung 4.16: Trajektorien von *Ulva linza* Sporen in Probenkanälen mit A-C) 100% ArgTyr Oberflächen, D-F) 50% ArgTyr Oberflächen und G-I) 0% ArgTyr (=100% Gly) Oberflächen. Gezeigt sind 3D-Ansichten und XY- bzw. XZ-Ebenenprojektionen aller Trajektorien eines Datensatzes. Die einzelnen Trajektorien besitzen zur Unterscheidung verschiedene Farben..... 98

Abbildung 4.17: A) 3-dimensionale Darstellung repräsentativer Trajektorien des „Hit and stick“ Schwimmmusters auf der 50% ArgTyr Oberfläche. B) XZ-Ebenenprojektion der „Hit and stick“ Trajektorien zur Veranschaulichung der gezielten Annäherung der Sporen an die Oberfläche..... 99

Abbildung 4.18: Einteilung der in den jeweiligen holographischen Videos für die 100%, 50% und 0% ArgTyr Oberflächen detektierten Sporen in drei Gruppen und prozentuale Verteilung dieser Gruppen in den jeweiligen Experimenten. (1) Sporen, die während der Injektion an der Oberflächen festklebten, (2) Sporen, die während der 2 min Beobachtungszeit das „Hit and stick“ Muster zeigen und (3) Sporen, die mit verschiedenen Mustern schwimmen ohne an eine Oberfläche festzukleben..... 101

Abbildung 4.19: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien des „Wobbling“ Schwimmmusters für die 100% ArgTyr Oberfläche. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über die Trajektorien gezeigt in A) bzw. B) mit der

wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits. D) Detaillierte 3D-Ansicht einer einzelnen Trajektorie des „Wobbling“ Musters..... 102

Abbildung 4.20: Vergleich der Bewegungsdynamik zweier repräsentativer Sporen mit dem „Twitching“ Muster auf der 50% ArgTyr Oberfläche im Vergleich zu einer statischen Spore. a) und b) XY-Ebenenprojektion der Sporen mit dem „Twitching“ Muster, c) XY-Ebenenprojektion der statischen Spore. Zur besseren Veranschaulichung der Größenverhältnisse wurde der Sporenkörper schematisch in die Darstellung eingefügt. Der Pfeil deutet die Zappelbewegung der Spore an. 104

Abbildung 4.21: Zeitliche Entwicklung der XY-Auslenkung bzw. -Verrückung des Sporenkörpers der auf der 50% ArgTyr Oberfläche festklebenden Sporen aus Abbildung 4.20. A) zappelnde Spore aus Abbildung 4.20a (grün), B) zappelnde Spore aus Abbildung 4.20b (blau) und C) statische Spore aus Abbildung 4.20c (rot). Die Zeitpunkte in den jeweiligen Auftragsungen beziehen sich auf den Beginn der Messung. 105

Abbildung 4.22: Repräsentative Sporen mit dem „Twitching“ Muster auf der 50% ArgTyr Oberfläche mit länger anhaltenden Verrückungen des Sporenkörpers. A) und C) 3D-Ansicht der zappelnden Sporen, B) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aus A) aufgetragen gegen die Zeit. D) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aus C) aufgetragen gegen die Zeit..... 106

Abbildung 4.23: Ausschnitt des „Hit and stick“ Musters einer repräsentativen Spore direkt nach Auftreffen auf der FOTS Oberfläche. A) und B) 3D-Ansicht und XY-Ebenenprojektion des gesamten Oberflächen Aufenthalts der Spore vom Auftreffen auf die Oberfläche bis zum „Detachment“. C) und D) 3D-Ansicht und XY-Ebenenprojektion eines Teilssegments der Trajektorie, das die „Spinning“ Bewegung gegen den Uhrzeigersinn beinhaltet. E) X- und Y-Positionen des Sporenkörpers aufgetragen gegen die Zeit mit Kennzeichnung der einzelnen Phasen (2) „Sticking“, (3) „Spinning“ und (4) „Detachment“. 108

Abbildung 4.24: Abschätzung der elektrostatischen Wechselwirkungskraft der negativ geladenen Spore und der positiv geladenen ArgTyr Oberfläche in Abhängigkeit vom Abstand. 111

- Abbildung 4.25: Besiedlungsdichte verschiedener mariner Spezies auf Glasobjektträgern und verschiedenen SAMs nach Inkubationszeiten von 2 h, 6 h, 12 h und 48 h in Meerwasser. CA (= contact angle) gibt den Kontaktwinkel der jeweiligen Oberfläche an und ist ein Maß für die Benetzbarkeit der Oberfläche [170]. 117
- Abbildung 4.26: Schwimmaktivitäten während der einzelnen Messungen der beiden Experimente vom 5.12.2010 und vom 27.11.2010 mit unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Aktivitätswerte ergeben sich durch die Bestimmung von Fluktuationen aufeinanderfolgender Hologramme. 120
- Abbildung 4.27: A) 3D-Ansicht der Trajektorien motiler mariner Mikroorganismen eines Datensatzes. B) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle Trajektorien gezeigt in Abbildung A..... 123
- Abbildung 4.28: A) 3D-Ansicht von Trajektorien mariner Mikroorganismen, die die einzelnen klassifizierten Schwimmmuster a) „Orientation“, b) „Undulation“, c) „Straight path“, d) „Tumble“ und e) „Orientation and stop“ repräsentieren. B) Prozentuales Auftreten der klassifizierten Schwimmmuster innerhalb von 402 Trajektorien. 125
- Abbildung 4.29: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien eines Datensatzes, die das Muster „Straight path“ zeigen. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm der Trajektorien gezeigt in A) bzw. B) mit der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits..... 126
- Abbildung 4.30: A) 3D-Ansicht und B) XY-Ebenenprojektion repräsentativer Trajektorien eines Datensatzes, die das Muster „Orientation“ zeigen. C) Geschwindigkeitsverteilungshistogramm der Trajektorien gezeigt in A) bzw. B) mit der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit (Maximum) und der Halbwertsbreite (FWHM) des Maxwell-Boltzmann Fits. 127
- Abbildung 4.31: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm mit Maxwell-Boltzmann Fit über alle Trajektorien eines Datensatzes, die die Muster „Tumble“ und „Orientation and stop“

aufweisen. Der blau eingerahmte Bereich ist noch einmal als Inset für eine bessere Illustration der Zählereignisse größerer Geschwindigkeiten dargestellt..... 128

Abbildung 4.32: Repräsentative Trajektorien des Musters A) „Tumble“ und C) „Orientation and stop“. Die Geschwindigkeiten in den Trajektorien sind farbcodiert (rot: 0-20 $\mu\text{m/s}$; grün: 20-50 $\mu\text{m/s}$; blau 50-100 $\mu\text{m/s}$). B) zeigt den zeitlichen Verlauf der Geschwindigkeit der Trajektorie aus A). Innerhalb der Trajektorie und dem Geschwindigkeits-Diagramm sind zwei ausgeprägte „tumbling“ Phasen durch rote Kreise gekennzeichnet. D) stellt den zeitlichen Verlauf der Geschwindigkeit der Trajektorie aus C) dar. 129

6.4 Literaturverzeichnis

1. De Kerchove, A.J. and M. Elimelech, *Bacterial swimming motility enhances cell deposition and surface coverage*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(12): p. 4371-4377.
2. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(4): p. 1140-1154.
3. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Molecular Microbiology, 1998. **30**(2): p. 295-304.
4. Drake, D. and T.C. Montie, *Flagella Motility and invasive virulence of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Microbiology, 1988. **134**: p. 43-52.
5. Weisse, S., et al., *A Quantitative 3D Motility Analysis of Trypanosoma brucei by Use of Digital In-line Holographic Microscopy*. Plos One, 2012. **7**(5).
6. Adler, J., *Chemotaxis in Bacteria*. Science, 1966. **153**(3737): p. 708-&.
7. Berg, H.C., *Chemotaxis in Bacteria*. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1975. **4**: p. 119-136.
8. Berg, H.C. and L. Turner, *Chemotaxis of Bacteria in Glass-Capillary Arrays - Escherichia-coli, Motility, Microchannel Plate, and Light-scattering*. Biophysical Journal, 1990. **58**(4): p. 919-930.
9. Berg, H.C. and D.A. Brown, *Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking*. Nature, 1972. **239**: p. 500.
10. Homma, M., et al., *Chemotactic responses to an attractant and a repellent by the polar and lateral flagellar systems of Vibrio alginolyticus*. Microbiology-Uk, 1996. **142**: p. 2777-2783.
11. Macnab, R.M. and D.E. Koshland, *The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis*. The Proceedings of the National Academy of Sciences 1972. **69**: p. 2509.
12. Arora, S., V. Bhat, and A. Mittal, *Correlating single cell motility with population growth dynamics for flagellated bacteria*. Biotechnology and Bioengineering, 2007. **97**(6): p. 1644-1649.
13. Xie, L., et al., *Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(6): p. 2246-2251.
14. Kudo, S., et al., *Asymmetric swimming pattern of Vibrio alginolyticus cells with single polar flagella*. Fems Microbiology Letters, 2005. **242**(2): p. 221-225.
15. Taylor, B.L. and D.E. Koshland, *Reversal of Flagellar Rotation in Monotrichous and Peritrichous Bacteria - Generation of Changes in Direction*. Journal of Bacteriology, 1974. **119**(2): p. 640-642.
16. Magariyama, Y., et al., *Difference between forward and backward swimming speeds of the single polar-flagellated bacterium, Vibrio alginolyticus*. Fems Microbiology Letters, 2001. **205**(2): p. 343-347.

-
17. Shigematsu, M., et al., *The Measurement of Swimming Velocity of Vibrio-cholerae and Pseudomonas-aeruginosa using the Video Tracking Method*. Microbiology and Immunology, 1995. **39**(10): p. 741-744.
 18. Harwood, C.S., K. Fosnaugh, and M. Dispensa, *Flagellation of Pseudomonas-Putida and Analysis of its Motile Behaviour*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(7): p. 4063-4066.
 19. Karim, Q.N., et al., *Measurement of motility of Helicobacter pylori, Campylobacter jejuni and Escherichia coli by real time computer tracking using the Hobson BacTracker*, in *Journal of Clinical Pathology*. 1998. p. 623-628.
 20. Conrad, J.C., et al., *Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in P. aeruginosa*. Biophysical Journal, 2011. **100**(7): p. 1608-1616.
 21. Lauga, E., et al., *Swimming in circles: Motion of bacteria near solid boundaries*. Biophysical Journal, 2006. **90**(2): p. 400-412.
 22. Rosenhahn, A., T. Ederth, and M.E. Pettit, *Advanced Nanostructures for the control of biofouling: The FP6 EU Integrated Project AMBIO*. Biointerphases, 2008. **3**(1): p. IR1-IR5.
 23. Callow, J.A. and M.E. Callow, *Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings*. Nature Communications, 2011. **2**.
 24. Callow, M.E. and J.A. Callow, *Marine biofouling: A sticky problem*. Biologist 2002. **49**(1): p. 1-5.
 25. Callow, M.E., et al., *Primary adhesion of Enteromorpha (Chlorophyta, Ulvales) propagules: Quantitative settlement studies and video microscopy*. Journal of Phycology, 1997. **33**(6): p. 938-947.
 26. Callow, M.E., et al., *Use of self-assembled monolayers of different wettabilities to study surface selection and primary adhesion processes of green algal (Enteromorpha) zoospores*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3249-3254.
 27. Rosenhahn, A., et al., *Zeta potential of motile spores of the green alga Ulva linza and the influence of electrostatic interactions on spore settlement and adhesion strength*. Biointerphases, 2009. **4**(1): p. 7-11.
 28. Scardino, A.J. and R. de Nys, *Mini review: Biomimetic models and bioinspired surfaces for fouling control*. Biofouling, 2011. **27**(1): p. 73-86.
 29. Heydt, M., et al., *Settlement Behavior of Zoospores of Ulva linza During Surface Selection Studied by Digital Holographic Microscopy*. Biointerphases, 2012. **7**(1-4).
 30. Heydt, M., et al., *Digital in-line holography as a three-dimensional tool to study motile marine organisms during their exploration of surfaces*. Journal of Adhesion, 2007. **83**(5): p. 417-430.
 31. Heydt, M., et al., *Analysis of holographic microscopy data to quantitatively investigate three-dimensional settlement dynamics of algal zoospores in the vicinity of surfaces*. The European Physical Journal E, 2009. **30**: p. 141-148.
 32. Ederth, T., et al., *Anomalous settlement behavior of Ulva linza zoospores on cationic oligopeptide surfaces*. Biofouling, 2008. **24**(4): p. 303-312.
 33. Ederth, T., et al., *Interactions of Zoospores of Ulva linza with Arginine-Rich Oligopeptide Monolayers*. Langmuir, 2009. **25**(16): p. 9375-9383.

34. Zargiel, K.A., J.S. Coogan, and G.W. Swain, *Diatom community structure on commercially available ship hull coatings*. *Biofouling*, 2011. **27**(9): p. 955-965.
35. Swain, G.W. and M.P. Schultz, *The testing and evaluation of non-toxic antifouling coatings*. *Biofouling*, 1996. **10**(1-3): p. 187-197.
36. Simone Dürr, J.C.T., ed. *Biofouling*. 2010.
37. Fittridge, I., et al., *The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review*. *Biofouling*, 2012. **28**(7): p. 649-669.
38. Schultz, M.P. and G.W. Swain, *The influence of biofilms on skin friction drag*. *Biofouling*, 2000. **15**(1-3): p. 129-139.
39. Schultz, M.P., et al., *Economic impact of biofouling on a naval surface ship*. *Biofouling*, 2011. **27**(1): p. 87-98.
40. Schultz, M.P., *Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering*. *Biofouling*, 2007. **23**(5): p. 331-341.
41. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. **2**(2): p. 95-108.
42. Parsek, M.R. and P.K. Singh, *Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis*. *Annual Review of Microbiology*, 2003. **57**: p. 677-701.
43. Schierholz, J.M. and J. Beuth, *Implant infections: a haven for opportunistic bacteria*. *Journal of Hospital Infection*, 2001. **49**(2): p. 87-93.
44. Kim, K.-J., *X-ray Data Booklet, Characteristics of Synchrotron Radiation*, [\url{http://xdb.lbl.gov/Section2/Sec_2-1.html}](http://xdb.lbl.gov/Section2/Sec_2-1.html).
45. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. *Nature*, 2000. **406**(6799): p. 959-964.
46. Callow, J.A. and M.E. Callow, *Biofilms*. 1st ed. ed. Vol. 6. 2006: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
47. Madigan, M., Parker, *Brock Mikrobiologie*. 2001: Spektrum Akademischer Verlag.
48. Mattick, J.S., *Type IV pili and twitching motility*. *Annual Review of Microbiology*, 2002. **56**: p. 289-314.
49. Kohler, T., et al., *Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili*. *Journal of Bacteriology*, 2000. **182**(21): p. 5990-5996.
50. Tremblay, J., et al., *Self-produced extracellular stimuli modulate the Pseudomonas aeruginosa swarming motility behaviour*. *Environmental Microbiology*, 2007. **9**(10): p. 2622-2630.
51. Pedersen, S.S., *Lung Infection with Alginate-producing, Muroid Pseudomonas-Aeruginosa in Cystic-Fibrosis*. *Apmis*, 1992. **100**: p. 5-79.
52. P.H. Raven, R.F.E., S.E. Eichhorn, *Biologie der Pflanzen*. 2006: De Gruyter.
53. Christie, A.O. and L.V. Evans, *Periodicity in Liberation of Gametes and Zoospores of Enteromorpha Intestinales Link*. *Nature*, 1962. **193**(4811): p. 193-&.
54. Callow, J.A. and M.E. Callow, *The Ulva Spore Adhesive System*, in *Biological Adhesives*, A.M. Smith and J.A. Callow, Editors. 2006, Springer Berlin. p. 63-78.

-
55. Fletcher, R.L. and M.E. Callow, *The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. British Phycological Journal*. Brit. Phycol. J., 1992. **27**: p. 303-329.
 56. Yebra, D.M., S. Kiil, and K. Dam-Johansen, *Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. Progress in Organic Coatings, 2004. **50**(2): p. 75-104.
 57. Magin, C.M., S.P. Cooper, and A.B. Brennan, *Non-toxic antifouling strategies*. Materials Today, 2010. **13**(4): p. 36-44.
 58. Jain, A. and N. Bhosle, *Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion*. Biofouling, 2009. **25**(1): p. 13-19.
 59. Taylor, G.T., et al., *Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters*. Biofouling, 1997. **11**(1): p. 31-57.
 60. Aldred, N. and A.S. Clare, *The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings*. Biofouling, 2008. **24**(5): p. 351-363.
 61. Dobretsov, S., H.U. Dahms, and P.Y. Qian, *Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites*. Biofouling, 2006. **22**(1): p. 43-54.
 62. Dobretsov, S., M. Teplitski, and V. Paul, *Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling*. Biofouling, 2009. **25**(5): p. 413-427.
 63. Smith, A.M. and J.A. Callow, *Biological Adhesives*,. 2006: Springer, Berlin, Germany.
 64. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Review of Microbiology, 2002. **56**: p. 187-209.
 65. Burrows, L.L., *Pseudomonas aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action*. Annual Review of Microbiology, 2012. **66**: p. 493-520.
 66. Wingender, H.-C.F.J., *Was Biofilme zusammenhält*, in *Chemie in unserer Zeit*. 36. Jahrgang 2002.
 67. Stoodley, P., et al., *Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(12): p. 5608-5613.
 68. Purevdorj-Gage, B., W.J. Costerton, and P. Stoodley, *Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Microbiology-Sgm, 2005. **151**: p. 1569-1576.
 69. A. Milne, G.H. 1977, 1457 590: GB.
 70. Goldberg, E.D., *TBT - an environmental dilemma*. Environment, 1986. **28**(8): p. 17-&.
 71. Bryan, G.W., et al., *The Decline of the Gastropod Nucella-Lapillus around Southwest England - Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1986. **66**(3): p. 611-640.
 72. Chambers, L.D., et al., *Modern approaches to marine antifouling coatings*. Surface & Coatings Technology, 2006. **201**(6): p. 3642-3652.
 73. Ulman, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*. Chemical Reviews, 1996. **96**(4): p. 1533-1554.

74. Mrksich, M. and G.M. Whitesides, *Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1996. **25**: p. 55-78.
75. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
76. Love, J.C., et al., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1169.
77. Baier, R.E., et al., *Surface-Properties determine Bioadhesive Outcomes - Methods and Results*. Journal of Biomedical Materials Research, 1984. **18**(4): p. 337-355.
78. Baier, R.E., *Role of Surface-Energy in Thrombogenesis*. Bulletin of the New York Academy of Medicine, 1972. **48**(2): p. 257-&.
79. E., S.M., *On adhesion of biological substances to low energy solid surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 1982. **88**(1): p. 296-297.
80. Brady, R.F., *Properties which influence marine fouling resistance in polymers containing silicon and fluorine*. Progress in Organic Coatings, 1999. **35**(1-4): p. 31-35.
81. Finlay, J.A., et al., *The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga Enteromorpha and the diatom Amphora*. Integrative and Comparative Biology, 2002. **42**(6): p. 1116-1122.
82. Harris, J.H., *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. 1992, New York: Plenum Press.
83. Jeon, S.I., et al., *Protein--surface interactions in the presence of polyethylene oxide : I. Simplified theory*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. **142**(1): p. 149-158.
84. Schilp, S., et al., *Physicochemical Properties of (Ethylene Glycol)-Containing Self-Assembled Monolayers Relevant for Protein and Algal Cell Resistance*. Langmuir, 2009. **25**(17): p. 10077-10082.
85. Rosenhahn, A., et al., *The role of "inert" surface chemistry in marine biofouling prevention*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(17): p. 4275-4286.
86. Callow, M.E., et al., *Microtopographic cues for settlement of zoospores of the green fouling alga Enteromorpha*. Biofouling, 2002. **18**(3): p. 237-245.
87. Schumacher, J.F., et al., *Engineered antifouling microtopographies - effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga Ulva*. Biofouling, 2007. **23**(1): p. 55-62.
88. Scardino, A.J., et al., *Biomimetic characterisation of key surface parameters for the development of fouling resistant materials*. Biofouling, 2009. **25**(1): p. 83-93.
89. Carman, M.L., et al., *Engineered antifouling microtopographies - correlating wettability with cell attachment*. Biofouling, 2006. **22**(1): p. 11-21.
90. Scardino, A.J., E. Harvey, and R. De Nys, *Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics*. Biofouling, 2006. **22**(1): p. 55-60.
91. Schumacher, J.F., et al., *Species-specific engineered antifouling topographies: correlations between the settlement of algal zoospores and barnacle cyprids*. Biofouling, 2007. **23**(5): p. 307-317.
92. Efimenko, K., et al., *Development and Testing of Hierarchically Wrinkled Coatings for Marine Antifouling*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2009. **1**(5): p. 1031-1040.

-
93. Gross, M., et al., *Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces*. Infection and Immunity, 2001. **69**(5): p. 3423-3426.
 94. Ista, L.K., et al., *Effect of substratum surface chemistry and surface energy on attachment of marine bacteria and algal spores*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(7): p. 4151-4157.
 95. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(3): p. 238-250.
 96. Zasloff, M., *Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from Xenopus Skin - Isolation, Characterization of 2 Active Forms, and Partial CDNA Sequence of a Precursor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(15): p. 5449-5453.
 97. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
 98. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacological Reviews, 2003. **55**(1): p. 27-55.
 99. Statz, A.R., et al., *Surface-immobilised antimicrobial peptoids*. Biofouling, 2008. **24**(6): p. 439-448.
 100. Swain, G., et al., *Biofouling and barnacle adhesion data for fouling-release coatings subjected to static immersion at seven marine sites*. Biofouling, 2000. **16**(2-4): p. 331-344.
 101. NSTCenter. 2013; Available from:
<http://www.nstcenter.biz/writeup.aspx?title=Resistance%20Ship%20Patch%20Test&page=NavyCommunityRoadmapAFTTypeI-II-IVResistanceShipPatchTestShipFullTest.html>.
 102. Berg, H.C., *The rotary motor of bacterial flagella*. Annual Review of Biochemistry, 2003. **72**: p. 19-54.
 103. Berg, H.C., *Motile behavior of bacteria*. Physics Today, 2000. **53**(1): p. 24-29.
 104. Ginger, M.L., N. Portman, and P.G. McKean, *Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(11): p. 838-850.
 105. Lodish, B., Zipursky *Molecular Cell Biology*. Vol. 4. 2000: W.H. Freeman.
 106. Branche, C., et al., *Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(16): p. 3443-3455.
 107. Bonner, J.T., *Matters of Size*. Natural History, 2006. **115**(9): p. 6.
 108. Purcell, E.M., *Life at low Reynolds number*. American Journal of Physics, 1977. **45**(1): p. 9.
 109. Berg, H.C., *Random walks in biology*. Rev. Ed. ed. 1993: Princeton University Press.
 110. Ramia, M., D.L. Tullock, and N. Phanthien, *The Role of Hydrodynamic Interaction in the Locomotion of Microorganisms*. Biophysical Journal, 1993. **65**(2): p. 755-778.
 111. Lauga, E. and T.R. Powers, *The hydrodynamics of swimming microorganisms*. Reports on Progress in Physics, 2009. **72**(9).
 112. Brennen, C. and H. Winet, *Fluid mechanics of propulsion by cilia and flagella*. Annual Review of Fluid Mechanics, 1977. **9**: p. 61.

113. Ishikawa, T., et al., *Hydrodynamic interactions between two swimming bacteria*. Biophysical Journal, 2007. **93**(6): p. 2217-2225.
114. Berke, A.P., et al., *Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces*. Physical Review Letters, 2008. **101**(3).
115. Chattopadhyay, S. and X.L. Wu, *The Effect of Long-Range Hydrodynamic Interaction on the Swimming of a Single Bacterium*. Biophysical Journal, 2009. **96**(5): p. 2023-2028.
116. Berg, H.C. and D.A. Brown, *Chemotaxis in Escherichia-coli Analyzed by 3-Dimensional Tracking*. Nature, 1972. **239**(5374): p. 500-&.
117. Segal, J.E., S.M. Block, and H.C. Berg, *Temporal comparisons in bacterial chemotaxis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**: p. 8987-8991.
118. Berg, H.C., *How to track Bacteria*. Review of Scientific Instruments, 1971. **42**(6): p. 868-&.
119. Magariyama, Y., et al., *Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect*. Biophysical Journal, 2005. **88**(5): p. 3648-3658.
120. Ping, L.Y., *Cell orientation of swimming bacteria: From theoretical simulation to experimental evaluation*. Science China-Life Sciences, 2012. **55**(3): p. 202-209.
121. Stocker, R., *Reverse and flick: Hybrid locomotion in bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(7): p. 2635-2636.
122. Tardent, P., *Meeresbiologie*. Vol. 3. unveränderte Auflage. 2005: Thieme.
123. Silflow, C.D. and P.A. Lefebvre, *Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, 2001. **127**(4): p. 1500-1507.
124. Mitchell, D.R., *Chlamydomonas flagella*. Journal of Phycology, 2000. **36**(2): p. 261-273.
125. Ruffer, U. and W. Nultsch, *High-speed Cinematographic Analysis of the Movement of Chlamydomonas*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 1985. **5**(3): p. 251-263.
126. Crenshaw, H.C. *A new look at locomotion in microorganisms: Rotating and translating*. in *Symposium on Aquatic Locomotion - New Approaches to Invertebrate and Vertebrate Biomechanics at the Annual Meeting of the Society-for-Integrative-and-Comparative-Biology*. 1995. Washington, Dc.
127. Harris, E.H., *Chlamydomonas as a model organism*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001. **52**: p. 363-406.
128. Johnson, K.A., *Keeping the Beat - Form meets Function in the Chlamydomonas Flagellum*. Bioessays, 1995. **17**(10): p. 847-854.
129. Inouye, I. and T. Hori, *High-Speed Video Analysis of the Flagellar Beat and Swimming Patterns of Algae - Possible Evolutionary Trends in Green-Algae*. Protoplasma, 1991. **164**(1-3): p. 54-69.
130. Heydt, M., *How do spores select where to settle? A Holographic motility Analysis of Ulva Zoospores on different surfaces*. 2011: Springer Theses.

-
131. Iken, K., et al., *Qualitative and quantitative studies of the swimming behaviour of Hincksia irregularis (Phaeophyceae) spores: ecological implications and parameters for quantitative swimming assays*. Phycologia, 2001. **40**(4): p. 359-366.
 132. Barth, R., *Digital In-Line X-Ray Holographic Microscopy with Synchrotron Radiation*. Dissertation Universität Heidelberg, 2008: p. 162.
 133. Schürmann, M., *Digital in-Line Holographic Microscopy with Various Wavelengths and Point Sources Applied to Static and Fluidic Specimens*. Dissertation Universität Heidelberg, 2007: p. 164.
 134. Hariharan, P., *Basics of Holography*. 2002: Cambridge University Press.
 135. Schnars, U. and W. Jueptner, *Digital Holography*. 2005: Springer.
 136. Demtröder, W., *Experimentalphysik 2, Elektrizität und Optik*. Vol. 4. Auflage. 2006: Springer Berlin Heidelberg New York.
 137. Hecht, E., *Optik*. Addison-Wesley, 1994. 3. korr. Nachdruck.
 138. Hariharan, P., *Basics of holography*. Cambridge University Press, 2002. 1. Auflage.
 139. Tipler, P.A., *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2000. 1. Auflage.
 140. Fink, H.W., et al., *Electron holography of individual DNA molecules*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1997. **14**(9): p. 2168-2172.
 141. Golzhauser, A., et al., *Holographic imaging of macromolecules*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1998. **16**(5): p. 3025-3028.
 142. Gabor, D., *A New Microscopic Principle*. Nature, 1948. **161**(8): p. 777.
 143. Garcia-Sucerquia, J., et al., *Digital in-line holographic microscopy*. Applied Optics, 2006. **45**(5): p. 836-850.
 144. Lewis, N.I., et al., *Swimming speed of three species of Alexandrium (Dinophyceae) as determined by digital in-line holography*. Phycologia, 2006. **45**(1): p. 61-70.
 145. Sheng, J., et al., *Digital holographic microscopy reveals prey-induced changes in swimming behavior of predatory dinoflagellates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(44): p. 17512-17517.
 146. Xu, W., et al., *Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy*. Optics Letters, 2003. **28**(3): p. 164-166.
 147. Katz, J. and J. Sheng, *Applications of Holography in Fluid Mechanics and Particle Dynamics*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2010. **42**: p. 531-555.
 148. Garcia-Sucerquia, J., et al., *Digital in-line holography: 4-D imaging and tracking of microstructures and organisms in microfluidics and biology*. Proceedings of SPIE The International Society for Optical Engineering, 2006. **6026**: p. 602613/1--602613/9.
 149. Jericho, M.H., et al., *Quantitative phase and refractive index measurements with point-source digital in-line holographic microscopy*. Applied Optics, 2012. **51**(10): p. 1503-1515.
 150. Maiman, T., et al., *Stimulated Optical Emission in Fluorescent Solids. II. Spectroscopy and Stimulated Emission in Ruby*. Physical Review, 1961. **123**(4): p. 13.

151. Rosenhahn, A., et al., *Digital in-line soft x-ray holography with element contrast*. Journal of the Optical Society of America A - Optics Image Science and Vision, 2008. **25**(2): p. 416-422.
152. Rosenhahn, A., et al., *Vacuum-ultraviolet Gabor holography with synchrotron radiation*. Ultramicroscopy, 2007. **107**(12): p. 1171-1177.
153. Kreuzer, et al., *Digital in-line holography with photons and electrons*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2001. **13**: p. 10729-10741.
154. Schnars, U. and W. Juptner, *Direct Recording of Holograms by a CCD Target and Numerical Reconstruction*. Applied Optics, 1994. **33**(2): p. 179-181.
155. Leith, E.N. and J. Upatnieks, *Reconstructed Wavefronts and Communication Theory*. Journal of the Optical Society of America, 1962. **53**(81): p. 1377.
156. Jericho, S.K., et al., *Submersible digital in-line holographic microscope*. Review of Scientific Instruments, 2006. **77**(4).
157. Schnars, U., T.M. Kreis, and W.P.O. Juptner, *Digital recording and numerical reconstruction of holograms: Reduction of the spatial frequency spectrum*. Optical Engineering, 1996. **35**(4): p. 977-982.
158. Kreuzer, H.J., *Holographic microscope and method of hologram reconstruction*. United States Patent, 2002: p. 11.
159. Repetto, L., E. Piano, and C. Pontiggia, *Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination*. Optics letters, 2004. **29**(10): p. 1132-1134.
160. Aoki, Y., *Optical and Numerical Reconstructions of Images from Sound-Wave Holograms*. Ieee Transactions on Audio and Electroacoustics, 1970. **AU18**(3): p. 258-&.
161. Demetrak.Th and R. Mittra, *Digital and Optical Reconstruction of Images from Suboptical Diffraction Patterns*. Applied Optics, 1974. **13**(3): p. 665-670.
162. Onural, L. and P.D. Scott, *Digital Decoding of in-line Holograms*. Optical Engineering, 1987. **26**(11): p. 1124-1132.
163. Kreuzer, H.J., *Holographic Microscope and Method of Hologram Reconstruction*. US Patent, 2002. **6.411.406**.
164. Jericho, S.K., et al., *In-line digital holographic microscopy for terrestrial and exobiological research*. Planetary and Space Science, 2010. **58**(4): p. 701-705.
165. Kreuzer, H.J., et al., *Digital in-line holography with photons and electrons*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2001. **13**(47): p. 10729-10741.
166. Weiße, S.A., *Quantitative Untersuchung der Motilität des Blutparasiten Trypanosoma brucei brucei durch 4D-Tracking mittels digitaler In-line Holographie*, in *Angewandte Physikalische Chemie*. 2011, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
167. Heydt, M., *How do spores select where to settle? A holographic motility analysis of Ulva zoospores on different surfaces*, in *Angewandte Physikalische Chemie*. 2010, Ruprecht-Karls Universität: Heidelberg.
168. Cao, X., *Antifouling Properties of Smooth and Structured Polyelectrolyte Thin Films*, in *Applied Physical Chemistry*. 2008, University of Heidelberg: Heidelberg. p. 126.

-
169. Thome, I., *Influence of Surface Conditioning and Morphology on Biofouling*, in *Applied physical Chemistry*. 2013, Ruprecht-Karls University of Heidelberg: Heidelberg.
 170. Sancet, M.P.A., *Influence of surface properties on adhesion of *Cobetia marina* and accumulation of marine microfoulers in the ocean*, in *Applied physical chemistry*. 2013, University of Heidelberg: Heidelberg.
 171. Maps, G. 2013; Available from: <https://maps.google.de/>.
 172. Sendra, G.H., et al., *Hologram reconstruction corrected for measurements through layers with different refractive indices in digital in-line holographic microscopy*. *Applied Optics*, 2012. **51**(16): p. 3416-3423.
 173. Garcia-Sucerquia, J., et al., *Immersion digital in-line holographic microscopy*. *Optics Letters*, 2006. **31**(9): p. 1211-1213.
 174. Fass, R.J. and J. Barnishan, *Minimal Inhibitory Concentrations of 34 Anti-Microbial Agents for Control Strains *Escherichia-coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas-aeruginosa* ATCC 27853*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979. **16**(5): p. 622-624.
 175. Lotz, C., *Diplomarbeit: Studien zur Motilität von *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen*, in *Angewandte physikalische Chemie*. 2010, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg: Heidelberg.
 176. Thielen, P., *Dissertation: Einfluss extrazellulärer Enzyme auf die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa**, in *Chemie*. 2005, Universität Duisburg/Essen: Duisburg.
 177. Meschede, D., *Gehrtsen Physik*. Springer Verlag, 2004. 22. Auflage.
 178. Doyle, T.B., A.C. Hawkins, and L.L. McCarter, *The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa**. *Journal of Bacteriology*, 2004. **186**(19): p. 6341-6350.
 179. Maeda, K., et al., *Effect of Temperature on Motility and Chemotaxis of *Escherichia-coli**. *Journal of Bacteriology*, 1976. **127**(3): p. 1039-1046.
 180. Magariyama, Y., et al., *Simultaneous measurement of bacterial flagellar rotation rate and swimming speed*. *Biophysical Journal*, 1995. **69**(5): p. 2154-2162.
 181. Schneider, W.R., *Effect of viscosity on bacterial motility*. *Journal of Bacteriology*, 1974. **117**(2): p. 6.
 182. Berg, H.C., *Random Wals in Biology*. 1993: Princeton University Press.
 183. Kim, Y., *Diffusivity of Bacteria*. *Korean Journal of Chem. Eng.*, 1996. **13**(3): p. 282-287.
 184. Nossal R., C.S., *Light scattering from motile bacteria*. *Journal de Physique*, 1972. **33**: p. 171.
 185. Fenchel, T., *How dinoflagellates swim*. *Protist*, 2001. **152**(4): p. 329-338.
 186. Crenshaw, H.C., C.N. Ciampaglio, and M. McHenry, *Analysis of the three-dimensional trajectories of organisms: Estimates of velocity, curvature and torsion from positional information*. *Journal of Experimental Biology*, 2000. **203**(6): p. 961-982.

187. Su, T.W., L. Xue, and A. Ozcan, *High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(40): p. 16018-16022.
188. Hsu, C.Y. and R. Dillon, *A 3D Motile Rod-Shaped Monotrichous Bacterial Model*. Bulletin of Mathematical Biology, 2009. **71**(5): p. 1228-1263.
189. Herrwerth, S., et al., *Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers - Internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(31): p. 9359-9366.
190. Ohshima, H., T.W. Healy, and L.R. White, *Approximate Analytic Expressions for the Electrophoretic Mobility of Spherical Colloidal Particles and the Conductivity of their Dilute Suspensions*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II, 1983. **79**: p. 1613-1628.
191. Ohsawa, K., M. Murata, and H. Ohshima, *Zeta-Potential and Surface-Charge Density of Polystyrene-Latex - Comparison with Synaptic Vesicle and Brush-Border Membrane Vesicle*. Colloid and Polymer Science, 1986. **264**(12): p. 1005-1009.
192. Feldman, K., et al., *Probing resistance to protein adsorption of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers by scanning force microscopy*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(43): p. 10134-10141.
193. Thome, I., et al., *Conditioning of surfaces by macromolecules and its implication for the settlement of zoospores of the green alga *Ulva linza**. Biofouling, 2012. **28**(5): p. 501-510.
194. Callow, M.E. and J.A. Callow, *Enhanced adhesion and chemoattraction of zoospores of the fouling alga *Enteromorpha* to some foul-release silicone elastomers*. Biofouling, 1998. **13**(2): p. 157-172.
195. Arpa-Sancet, M.P., C. Christophis, and A. Rosenhahn, *Microfluidic Assay to Quantify the Adhesion of Marine Bacteria*. Biointerphases, 2012. **7**(1-4).
196. Bremen, U. *Coccolithophorida*. Available from: http://www.geo.uni-bremen.de/cocco/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=47.
197. *algaebase*. Available from: <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=4345>.
198. Hamburg, U. *Dinoflagellaten*. Available from: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e44/44f.htm>.
199. Jones, R., *Some size relationships in phytoflagellate motility*. Hydrobiologia, 1988. **161**: p. 125-131.
200. Wakabayashi, K., et al., *Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(27): p. 11280-11284.
201. Patrick, R., *The effect of increasing light and temperature on the structure of diatom communities*. Limnology and Oceanography, 1971. **16**(2): p. 405-421.
202. Purcell, E.M., *Life at low Reynolds number*. American Journal of Physics, 1977. **45**(1): p. 3-11.
203. Sjoblad, R., *Quantitative Assay for algal chemotaxis*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. **36**: p. 847-856.

-
204. Harvey, E.L., *Predator-Induced Fleeing Behaviors in Phytoplankton: A New Mechanism for Harmful Algal Bloom Formation?* PloS one, 2012. **7**(9): p. e46438.
 205. Mitbavkar, S. and A.C. Anil, *Seasonal variations in the fouling diatom community structure from a monsoon influenced tropical estuary.* Biofouling, 2008. **24**(6): p. 415-426.
 206. Swami, B.S. and M. Udhayakumar, *Seasonal influence on settlement, distribution and diversity of fouling organisms at Mumbai harbour.* Indian Journal of Marine Sciences, 2010. **39**(1): p. 57-67.
 207. Sohn, M.H., et al., *Determination of the swimming trajectory and speed of chain-forming dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* with digital holographic particle tracking velocimetry.* Marine Biology, 2011. **158**(3): p. 561-570.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Allen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Michael Grunze für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und die konstruktive Kritik bedanken. Außerdem bedanke ich mich für seine Großzügigkeit und die großartige Möglichkeit meine Arbeit in einem internationalen Umfeld durchführen zu dürfen.

Bei apl. Prof. Dr. Hans-Robert Volpp bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Axel Rosenhahn gilt mein großer Dank für die geduldige Betreuung dieser Arbeit, die vielen Diskussionen mit überaus konstruktiven Ideen und Anregungen und die Möglichkeit der Teilnahme an vielen internationalen Konferenzen. Vielen herzlichen Dank Axel, für die zahlreichen Korrekturen, und dass du dir trotz deines vollen Terminkalenders immer Zeit genommen hast.

Im Folgenden möchte ich meinen Kollaborationspartnern für die überaus angenehme Zusammenarbeit danken.

Thanks to Prof. Dr. James Callow and Dr. Maureen Callow from the University of Birmingham for providing their labs and their equipment for the investigations of the *Ulva linza* spores, the great discussions and their hospitality during my stays at the University of Birmingham.

Thanks to Prof. Dr. Geoffrey Swain and his whole group for their support during the research stay at the Florida Institute of Technology and the possibility to build up the holographic setup for field experiments in the wilderness of Florida.

Thanks to Dr. Thomas Ederth from the University of Linköping for the preparation and the providing of the Oligopeptide SAMs.

Herzlichen Dank gilt der Gruppe von Prof. Dr. Ursula Obst für die Bereitstellung ihrer Labore und im Besonderen an Dr. Thomas Schwartz und Silke Kirchen für die Kultivierung der Pseudomonaden.

Specials thanks goes to Dr. John Finlay, who was a great help during the research stays in Birmingham. Thank you very much John for carrying me to the hospital on a Sunday morning and for your support during this awful time.

Vielen Dank an Dr. Isabel Thome und Dr. Maria Pilar Arpa für die Präparation der in dieser Arbeit verwendeten SAMs.

Nun möchte ich mich ganz herzlich bei allen fleißigen Korrekturlesern bedanken, vor allem bei Axel Rosenhahn, Isabel Thome, Stella Bauer, Stojan Maleschlijski und Piluca Arpa.

Für die Einführung in die Welt der Holographie und die Weitergabe ihres kostbaren Wissens bedanke ich mich herzlich bei Dr. Sebastian Weiße und Dr. Matthias Heydt.

Bei Stojan Maleschlijski und Dr. Hernan Sendra bedanke ich mich für die tollen Neuentwicklungen der Auswertungssoftware und die Unterstützung im Bereich der Softwareentwicklung. Ihr ward mir eine riesige Hilfe, ohne euch würde es diese Arbeit so nicht geben.

Danke dem fleißigen Hiwi und Bachelorstudenten Florian Koschitzki für die unzähligen Stunden beim Klicken.

Danke Carmen Lotz für die gemeinsame Arbeit in der Mikrobiologie und die schöne Zeit am KIT.

Für die unvergesslichen Momente in Florida bedanke ich mich bei Maria Alles, Isabel Thome, Piluca Arpa und Prof. Michael Grunze. Es wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Meinen ehemaligen Kollegen Sebastian Weiße, Matthias Heydt, Christina Leinweber, Ruth Heine, Mike Beckers, Hernan Sendra und Christoph Christophis danke ich für die herzliche

Aufnahme in die Gruppe, die wundervolle Zeit und meinem ehemaligen Büro im EG für die äußerst lustigen Momente.

Natürlich danke ich auch meinen jetzigen Kollegen Thomas Gorniak, Tobias Senkbeil, Andreas Buck, Stella Bauer, Maria Alles, Piluca Arpa, Max Hanke, Isabel Thome, Stojan Maleschlijski, Tawheed und Linlin Xiao, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke, dass ihr nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde seid.

Dem übrigen Team des PCI, der Verwaltung, der Elektronik und der EDV danke ich für die Hilfe bei vielen notwendigen und manchmal auch lästigen Dingen.

Meinen Unimädels Johanna, Doro, Frauke und Anna danke ich ganz herzlich für die jahrelange Freundschaft. Danke für die vielen aufbauenden Gespräche. Danke auch Melanie, Katha, Jenny, Eva und allen anderen Freunden, die mich immer unterstützt und mir gezeigt haben, dass es auch andere Dinge als Wissenschaft gibt. Schön, dass es euch gibt!

Danke meiner Familie und meiner Schwiegerfamilie für die moralische Unterstützung.

Der größte Dank gilt meinem Mann Jochen und meiner Mama. Danke, dass ihr mich auf diesem Weg begleitet habt in guten wie auch in schlechten Phasen. Danke, dass ihr immer für mich da seid und unterstützt. Danke für Alles!

Danke Papa!