Schlussbericht (Kurzfassung) des Forschungsvorhabens:

Förderkennzeichen: 50WB2033

Vorhabenbezeichnung: „Mikrobielle Vielfalt im SIRIUS-Habitat: Molekulare Analysen von Überlebenskünstlern auf neuen antimikrobiellen Zweikomponenten-Oberflächen“

Zuwendungsempfängerin:

Prof. Dr. Elisabeth Grohmann
Berliner Hochschule für Technik (BHT)
Luxemburger Straße 10
13353 Berlin

Laufzeit des Vorhabens: 01.06.2020 bis 31.12.2023

Autoren:

Prof. Dr. Elisabeth Grohmann (orcid iD: 0000-0003-3061-6490)
Dr. Daniela Wischer (orcid iD: 0009-0009-2920-7885)

1. Aufgabenstellung

Das primäre Ziel des Projekts war die Evaluierung neuartiger kontaktkatalytischer antimikrobieller Oberflächen zur Eliminierung bzw. Minimierung mikrobieller Kontaminationen in Raumfahrt-Habitaten.

Ursprüngliche Zielsetzung

Aufgabe des Forschungsvorhabens war es, innovative Oberflächenbeschichtungen mit bereits bekannter antimikrobieller Wirkung im Rahmen der SIRIUS-21 Studie eingehender auf ihre dekontaminierende Wirkeffizienz gegen Bakterien, Pilze und Endosporen zu testen – mit dem übergeordneten Ziel, Kontaminationen von Oberflächen in Raumfahrthabitaten zu verhindern bzw. zu minimieren. Das Projekt baute auf den Ergebnissen der Vorgängerstudie SIRIUS-19 auf und zielte darauf ab, die Besiedlung von Oberflächen durch potenziell humanpathogene und materialschädigende Luftkeime über einen längeren Zeitraum von 8 Monaten zu unterbinden, wobei neben Bakterien auch Pilze in die neue Untersuchung einbezogen werden sollten. Neue Wirkstoffe, wurden auf verschiedenen Trägermaterialien im künstlichen Raummodul exponiert.

Wissenschaftliche Ziele: Spezifische Ziele umfassten **(i)** die Erfassung der mikrobiellen Vielfalt auf den neuen Oberflächen im Vergleich zu unbeschichteten Referenzoberflächen sowie **(ii)** die Untersuchung der Überlebensfähigkeit von *Bacillus subtilis* Endosporen auf den Oberflächen. Ebenfalls wurde **(iii)** der Vergleich der mikrobiellen Vielfalt zwischen den Ergebnissen der SIRIUS-Studien 2019 (0 - 4 Monate) und 2021 (0 - 8 Monate) angestrebt.

Technische Ziele: Es sollte die Eignung der Materialien zur **(i)** Elimination / Keimreduktion von Bakterien und Pilzen und **(ii)** Reduktion der Keimfähigkeit von *Bacillus subtilis* Endosporen beurteilt werden

Neue Zielsetzungen:

Da aufgrund des Ukraine Krieges die ursprünglich geplanten Versuche nicht stattfinden konnten, wurde die Zielsetzung angepasst. Statt der geplanten Expositionsstudien im SIRIUS-Modul –die Proben wurden exponiert, aber nicht aus Moskau zurückerhalten - wurden alternative Laborversuche entwickelt mit dem **Ziel, die antimikrobielle Wirksamkeit etablierter und neuer kontaktkatalytischer antimikrobieller Oberflächen unter standardisierten Bedingungen quantitativ zu bewerten.**

Hierfür wurde auf industrielle Standardvorschriften (ISO 22196, JIS Z 2801) aufgebaut, vor dem Hintergrund, dass in der verfügbaren Zeit keine Langzeit-Studien stattfinden konnten und Raumfahrtbedingungen nicht repliziert werden konnten.

Fortbestehendes Ziel war, das keimreduzierende Potenzial der antimikrobiellen Oberflächen trotz Ausfall der SIRIUS-21 Proben umfassend zu evaluieren und die Anwendbarkeit der untersuchten kontaktkatalytischen Oberflächen-Technologien als Dekontaminationsstrategie in der Raumfahrt und anderen Bereichen aussagekräftig zu beurteilen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Hintergrund:

Die Problematik mikrobieller Kontaminationen und Biofilmbildung auf Oberflächen innerhalb von Raumschiffen sind bekannt. Studien haben gezeigt, dass Mikroorganismen unter den speziellen Bedingungen der Raumfahrt verstärkt Antibiotika-Resistenzen ausbilden, eine erhöhte Virulenz und eine verstärkte Biofilmbildung aufweisen. Da zudem das menschliche Immunsystem unter Raumfahrtbedingungen geschwächt wird, besteht für die Besatzung ein erhöhtes Infektionsrisiko. (Sonnenfeld *et al.*, 2005, Pierson *et al.*, 2005, Novikowa *et al.*, 2006, Mauclaire *et al.*, 2010, Rosenzweig *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2013, Schiwon *et al.*, 2013, Taylor *et al.*, 2015, Zea *et al.*, 2017, Aunins *et al.*, 2018, Crucian *et al.*, 2018, Fajardo-Cavazos *et al.*, 2018, Perrin *et al.*, 2018, Singh *et al.*, 2018, Urbaniak *et al.*, 2018, Bai *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2019). Diese Bedingungen machen antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen zu vielversprechenden Dekontaminationsstrategien in der Raumfahrt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Alternativ-Versuchsplanung anstelle der entfallenen SIRIUS-21 Studie:

Da der Probenversand aus Moskau nicht erfolgen konnte, war eine flexible Anpassung des Projektplans erforderlich. Nachdem die ursprünglich geplanten Expositionsstudien im SIRIUS-Modul nicht fortgesetzt werden konnten, wurden Alternativ-Versuche entwickelt und durchgeführt, um die Wirksamkeit der kontaktkatalytischen antimikrobiellen-Materialien unter Laborbedingungen zu bewerten. Die Ersatzversuche fanden im Biosafety Level-2-Labor der Zuwendungsempfängerin statt.

Quantitative Evaluierung der antimikrobiellen Wirksamkeit verschiedener kontaktkatalytischer Oberflächen unter Laborbedingungen (Beimpfungsansatz) in Anlehnung an den ISO 22196 / JIS Z 2801 Standard

Für die quantitativen Wirksamkeitsanalysen wurde auf industriellen Standardvorschriften (ISO 22196, JIS Z 2801) aufgebaut, welche im Verlauf signifikant modifiziert wurden, um die Wirkeffizienz unserer Materialien optimal beurteilen zu können und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Hierfür wurde eine Vielzahl von aktuellen Veröffentlichungen zu verwandten Studien und Review Papern zu den gängigen Methoden und ISO-Vorschriften, Anpassungen, Besonderheiten und Problemen konsultiert (Noyce *et al.*, 2006, Michels *et al.*, 2009, Espirito Santo *et al.*, 2011, Ojeil *et al.*, 2013, Knobloch *et al.*, 2014, Pan *et al.*, 2014, Campos *et al.* 2016, Cashera *et al.*, 2016,Van de Lagemaat, 2017, Redfern *et al.*, 2018, Wiegand *et al.*, 2018, Pietsch *et al.*, 2020, Cunliffe *et al.*, 2021, Perez-Gavilan *et al.*, 2021). Hieraus ergaben sich wertvolle Hinweise für die Optimierung und kritische Evaluierung der Standardprotokolle.

- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

  Fachliteratur:

Ahmed, R., Vaishampayan, A., Cuellar-Camacho, J. L., Wight, D. J., Donskyi, I., Unger, W., *et al.* (2020). Multivalent Bacteria Binding by Flexible Polycationic Microsheets Matching Their Surface Charge Density. Adv Materials Inter 7, 1902066. doi: 10.1002/admi.201902066

Aunins, T. R., Erickson, K. E., Prasad, N., Levy, S. E., Jones, A., Shrestha, S., *et al.* (2018). Spaceflight Modifies Escherichia coli Gene Expression in Response to Antibiotic Exposure and Reveals Role of Oxidative Stress Response. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00310.

Bai, P., Zhang, B., Zhao, X., Li, D., Yu, Y., Zhang, X., *et al.* (2019). Decreased metabolism and increased tolerance to extreme environments in *Staphylococcus warneri* during long-term spaceflight. *MicrobiologyOpen* 8. doi:10.1002/mbo3.917.

Campos, M. D., Zucchi, P. C., Phung, A., Leonard, S. N., and Hirsch, E. B. (2016). The Activity of Antimicrobial Surfaces Varies by Testing Protocol Utilized. PLOS ONE 11, e0160728. doi: 10.1371/journal.pone.0160728

Caschera, A., Ronan, E., Yusuf, F., Tehrani, A., Porosa, L., Kroukamp, O., *et al.* (2021). Antimicrobial Testing of Dry Surfaces through Large Droplet Inoculation.

Clauss-Lendzian, E., Vaishampayan, A., de Jong, A., Landau, U., Meyer, C., Kok. J, *et al.* (2018). Stress response of a clinical *Enterococcus faecalis* isolate subjected to a novel antimicrobial surface coating. *Microbiol. Res.* 207:53-64. DOI: 10.1016/j.micres.2017.11.006.

Cunliffe, A. J., Askew, P. D., Stephan, I., Iredale, G., Cosemans, P., Simmons, L. M., *et al.* (2021). How Do We Determine the Efficacy of an Antibacterial Surface? A Review of Standardised Antibacterial Material Testing Methods. Antibiotics 10, 1069. doi: 10.3390/antibiotics10091069

Espírito Santo, C., Lam, E. W., Elowsky, C. G., Quaranta, D., Domaille, D. W., Chang, C. J., *et al.* (2011). Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. Appl Environ Microbiol 77, 794–802. doi: 10.1128/AEM.01599-10

Fajardo-Cavazos, P., Leehan, J. D., and Nicholson, W. L. (2018). Alterations in the Spectrum of Spontaneous Rifampicin-Resistance Mutations in the *Bacillus subtilis rpoB* Gene after Cultivation in the Human Spaceflight Environment. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00192.

Grohmann, E., Meyer, C., Landau, U. Der Kontakt Katalysator AGXX tötet multiresistente klinische Staphylokokken und Enterokokken. (2015). *M·O·T - Medizinisch-Orthopädische Technik, Sonderheft MRSA,* pp. 62-64.

Guridi, A., Diederich, A.-K., Aguila-Arcos, S., Garcia-Moreno, M., Blasi, R., Broszat, M., *et al.* (2015). New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens. *Materials Science and Engineering: C* 50, 1–11. doi:10.1016/j.msec.2015.01.080.

International Organization for Standardization. ISO 22196:2011. Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. *Plastics—Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces: International Standard; 2011*

Kim, W., Tengra, F. K., Young, Z., Shong, J., Marchand, N., Chan, H. K., *et al.* (2013). Spaceflight Promotes Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 8, e62437. doi:10.1371/journal.pone.0062437.

Knobloch, J. K.-M., Tofern, S., Kunz, W., Schütze, S., Riecke, M., Solbach, W., *et al.* (2017). "Life-like" assessment of antimicrobial surfaces by a new touch transfer assay displays strong superiority of a copper alloy compared to silver containing surfaces. PLoS ONE 12, e0187442. doi: 10.1371/journal.pone.0187442

Landau, U., Meyer, C., Grohmann, E. (2017a). AGXX – Beitrag der Oberflächentechnik zur Vermeidung von Biofilmen (Teil 1). *Galvanotechnik.* 108:885-890

Landau, U., Meyer, C., Grohmann, E. (2017b). AGXX – Beitrag der Oberflächentechnik zur Vermeidung von Biofilmen (Teil 2). *Galvanotechnik.* 108:1110-1121.

Liu, Z., Luo, G., Du, R., Sun, W., Li, J., Lan, H., *et al.* (2019). Effects of spaceflight on the composition and function of the human gut microbiota. *Gut Microbes*, 1–13. doi:10.1080/19490976.2019.1710091.

Loi, V. V., Busche, T., Preuß, T., Kalinowski, J., Bernhardt, J., and Antelmann, H. (2018). The AGXX® Antimicrobial Coating Causes a Thiol-Specific Oxidative Stress Response and Protein S-bacillithiolation in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03037.

Mauclaire, L., and Egli, M. (2010). Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolymeric substances of *Micrococcus luteus* space and earth isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59, 350–356. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00683.x.

Michels, H. T., Noyce, J. O., and Keevil, C. W. (2009). Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant Staphylococcus aureus challenged antimicrobial materials containing silver and copper. Letters in Applied Microbiology 49, 191–195. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02637.x

Novikova, N., De Boever, P., Poddubko, S., Deshevaya, E., Polikarpov, N., Rakova, N., et. al. (2006). Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res. Microbiol.* 157:5-12. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.07.010.

Noyce, J. O., Michels, H., and Keevil, C. W. (2006). Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant Staphylococcus aureus in the healthcare environment. Journal of Hospital Infection 63, 289–297. doi: 10.1016/j.jhin.2005.12.008

Ojeil, M., Jermann, C., Holah, J., Denyer, S. P., and Maillard, J.-Y. (2013). Evaluation of new in vitro efficacy test for antimicrobial surface activity reflecting UK hospital conditions. Journal of Hospital Infection 85, 274–281. doi: 10.1016/j.jhin.2013.08.007

Pan, H., Zhang, Y., He, G.-X., Katagori, N., and Chen, H. (2014). A comparison of conventional methods for the quantification of bacterial cells after exposure to metal oxide nanoparticles. BMC Microbiology 14, 222. doi: 10.1186/s12866-014-0222-6

Perez-Gavilan, A., Castro, J. V. de, Arana, A., Merino, S., Retolaza, A., Alves, S. A., *et al.* (2021). Antibacterial activity testing methods for hydrophobic patterned surfaces. Sci Rep 11, 6675. doi: 10.1038/s41598-021-85995-9

Perrin, E., Bacci, G., Garrelly, L., Canganella, F., Bianconi, G., Fani, R., & Mengoni, A. (2018). Furnishing spaceship environment: evaluation of bacterial biofilms on different materials used inside International Space Station. *Research in Microbiology, 169*(6), 289–295. doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.001

Pietsch, F., O'Neill, A. J., Ivask, A., Jenssen, H., Inkinen, J., Kahru, A., *et al.* (2020). Selection of resistance by antimicrobial coatings in the healthcare setting. Journal of Hospital Infection 106, 115–125. doi: 10.1016/j.jhin.2020.06.006

Probst, I., Vaishampayan, A., Küchler, V., Grohmann, E. Selbst regenerierende antimikrobielle Oberflächenbeschichtung tötet multiresistente Krankheitserreger. (2016). Eingeladener Artikel für Flugmedizin Tropenmedizin Reisemedizin 23(5):14–17.

Redfern, J., Tucker, J., Simmons, L. M., Askew, P., Stephan, I., and Verran, J. (2018). Environmental and Experimental Factors Affecting Efficacy Testing of Nonporous Plastic Antimicrobial Surfaces. Methods Protoc 1. doi: 10.3390/mps1040036

Rosenzweig, J. A., Abogunde, O., Thomas, K., Lawal, A., Nguyen, Y. U., Sodipe, A., *et al.* (2010). Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:885–891 DOI 10.1007/s00253-009-2237-8.

Schiwon, K., Arends, K., Rogowski, K. M., Fürch, S., Prescha, K., Sakinc, T., *et al.* (2013). Comparison of Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and Conjugative Transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* Isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. *Microbial. Ecol.* 65:638-651. DOI 10.1007/s00248-013-0193-

Singh, N. K., Wood, J. M., Karouia, F., and Venkateswaran, K. (2018). Succession and persistence of microbial communities and antimicrobial resistance genes associated with International Space Station environmental surfaces. *Microbiome* 6. doi:10.1186/s40168-018-0585-2.

Sobisch, L.-Y., Rogowski, K. M., Fuchs, J., Schmieder, W., Vaishampayan, A., Oles, P., *et al.* (2019). Biofilm Forming Antibiotic Resistant Gram-Positive Pathogens Isolated From Surfaces on the International Space Station. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00543.

Sonnenfeld, G. (2005). The immune system in space, including earth-based benefits of space-based research. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6:343–349. DOI: 10.2174/1389201054553699.

Taylor, P. (2015). Impact of space flight on bacterial virulence and antibiotic susceptibility. *IDR*, 249. doi:10.2147/IDR.S67275.

Urbaniak, C., Sielaff, A. C., Frey, K. G., Allen, J. E., Singh, N., Jaing, C., *et al.* (2018). Detection of antimicrobial resistance genes associated with the International Space Station environmental surfaces. *Sci Rep* 8. doi:10.1038/s41598-017-18506-4.

Vaishampayan, A., de Jong, A., Wight, D. J., Kok, J., Grohmann, E. (2018). A Novel Antimicrobial Coating Represses Biofilm and Virulence-Related Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol*. 9:221. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00221.

van de Lagemaat, M., Grotenhuis, A., van de Belt-Gritter, B., Roest, S., Loontjens, T. J. A., Busscher, H. J., *et al.* (2017). Comparison of methods to evaluate bacterial contact-killing materials. Acta Biomater 59, 139–147. doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.042

Wiegand, C., Völpel, A., Ewald, A., Remesch, M., Kuever, J., Bauer, J., *et al.* (2018). Critical physiological factors influencing the outcome of antimicrobial testing according to ISO 22196 / JIS Z 2801. PLoS ONE 13, e0194339. doi: 10.1371/journal.pone.0194339

Zea, L., Larsen, M., Estante, F., Qvortrup, K., Moeller, R., Dias de Oliveira, S., *et al.* (2017). Phenotypic Changes Exhibited by *E. coli* Cultured in Space. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01598.

Zhang, B., Bai, P., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, X., Li, D., *et al.* (2019). Increased growth rate and amikacin resistance of *Salmonella enteritidis* after one-month spaceflight on China's Shenzhou-11 spacecraft. *MicrobiologyOpen* 8. doi:10.1002/mbo3.833.

1. Antibakterielle (keimreduzierende) Aktivität verschiedener kontaktkatalytischer-Oberflächen gegen *E. coli*, MRSA und *B. subtilis* nach modifiziertem ISO 22196 Assay

Die bakterizide Wirksamkeit verschiedener kontaktkatalytischer Oberflächen wurde mit einem modifizierten ISO 22196 / JIS Z 2801-Test unter standardisierten Bedingungen quantitativ bewertet. Die Lebendzellzahl vor und nach Inkubation auf den Oberflächen wurde mittels KBE-Auszählung und Fluoreszenzfärbung (Live / Dead Staining) bestimmt.

Bakterielle Referenzstämme:
E. coli DSM 682 (gram-, humanpathogen)
S. aureus 04-02981 (MRSA) (gram+, humanpathogen)
B. subtilis 168 (gram+, endosporenbildend)

1.1. Antibakterielle (keimtötende) Aktivität der Kontaktkatalytischen Antimikrobiellen Oberfläche X im Vergleich zu Silberoberflächen

1.1.1. Ermittlung der keimtötenden Wirkung durch Überlebendzellzahl-Bestimmung (KBE-Auszählung)

- Sowohl die Kontaktkatalytische Antimikrobielle Oberfläche X als auch herkömmliche Silber (Ag)-Oberflächen eliminierten lebensfähige Bakterien vollständig innerhalb von 24 Stunden (Abb. 1a-c)
- **Die zeitaufgelöste Aktivitätsanalyse zeigte jedoch eine deutlich schnellere Abtötung durch Antimikrobielle Oberfläche X und eine wesentlich langsamere antibakterielle Wirkung von Silber-Oberflächen**
    - Antimikrobielle Oberfläche X **:**
        - > 3 log Reduktion der lebensfähigen Bakterien innerhalb von 3 Stunden
        - KEINE Zellen nach < 4h **bei *E. coli* und MRSA**
        - Geringere Wirkung gegen ***B. subtilis*** (~4 log Reduktion nach 6h, vergleichbar mit Ag-Blech
    - **Silberoberfläche:**
        - < 1 log Reduktion der lebensfähigen Bakterien innerhalb von 3 Stunden

➔ **Antimikrobielle Oberfläche X übertrifft Silber in Bezug auf die antibakterielle Wirksamkeit (Wirkgeschwindigkeit) deutlich** (mit Ausnahme von *B. subtilis*)

- Die Lebend-/Totfärbung mittels SYTO9 und Propidium Iodid bestätigte die schnelle Schädigung der Zellmembran und den Zelltod nach Kontakt der Bakterien mit der Antimikrobiellen Oberfläche X
- Bei den Silberoberflächen zeigte die Lebend-/Totfärbung ebenfalls ein schnelles Einsetzen der bakteriziden Aktivität - allerdings mit einer höheren Anzahl lebender Zellen (sichtbar als grüne Zellen), die über die ersten Zeitpunkte hinweg verblieben.

1.2. Unterschiede in der Empfindlichkeit von *E. coli*, MRSA und *B. subtilis* gegen Kontaktkatalytische Antimikrobielle Oberfläche X und Silber

- **Im Rahmen der Wirksamkeitsversuche mit Kontaktkatalytischer Antimikrobieller Oberfläche X und Silberoberflächen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den Bakterienspezies**
    - ***E. coli*** zeigte eine beträchtliche Variabilität in der Empfindlichkeit gegen kontaktkatalytische antimikrobielle Oberflächen X
    - **MRSA** zeigte eine konsistente und schnelle Eliminierung durch kontaktkatalytische antimikrobielle Oberflächen X
    - ***B. subtilis*** zeigte eine vergleichsweise hohe Empfindlichkeit gegenüber Silber

Fazit:

- Starke Abweichungen in der Empfindlichkeit von *E. coli* DSM 682 gegenüberkontaktkatalytischer antimikrobieller Oberfläche X
- deutlich höhere maximale Abtötungsraten von AGXX® im Vergleich zu reinem Silber (Ag).

- **Obwohl die Ergebnisse die Notwendigkeit zur Optimierung des Testprotokolls nahelegen, bestätigen sie dennoch das ausgeprägte antibakterielle Potenzial der der kontaktkatalytischen antimikrobiellen Oberfläche X**

2. Effekt Kontaktkatalytischer Antimikrobieller Oberflächen auf die Auskeimfähigkeit von *B. subtilis* Endosporen

Ursprünglich sollte die Überlebensfähigkeit von *Bacillus subtilis* Sporen auf den Oberflächen innerhalb des SIRIUS-Moduls getestet werden. Aufgrund der Nichtverfügbarkeit der SIRIUS-Proben wurden ausschließlich Versuche unter Laborbedingungen durchgeführt: Die 2021 begonnenen Vorversuche zum Effekt zweier Kontaktkatalytischer Antimikrobieller Oberflächen (X und Y) auf die Auskeimfähigkeit und das Wachstumsverhalten von *B. subtilis* Endosporen führten zu folgenden Ergebnissen:

- Antimikrobielle Oberfläche Y zeigte keinen Effekt auf die Auskeimfähigkeit ruhender Endosporen von *B. subtilis* nach 6-stündiger Inkubation auf dem Material **(Abbildung 1a)**
- Minimaler Effekt auf ausgekeimte Endosporen des Wildtyps *B. subtilis* 168 nach 6-stündiger Inkubation **(Abbildung 1b)**
- Stärkerer Effekt auf ausgekeimte Endosporen der Mutantenstämme *B. subtilis* KN19, *B. subtilis* KN20, *B. subtilis* KN23 mit defektem Sporenmantel **(Abbildung 1c)**
    - Abnahme der Anzahl auskeimfähiger Zellen (CFU / mL) um 1 Zehnerpotenz

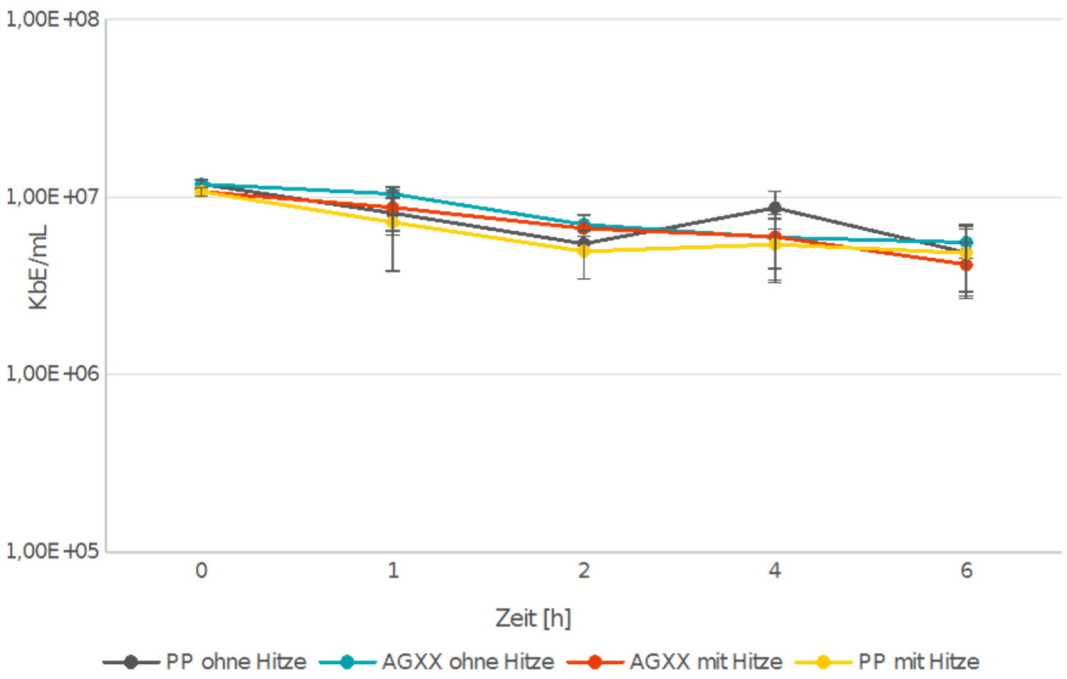

Abbildung 1a. Wirkung der kontaktkatalytischen Antimikrobiellen Oberfläche Y ruhende *Bacillus subtilis Sporen:* Keine Abnahme der auskeimfähigen Sporen nach 6h (nur *B. subtilis* 168 ist abgebildet).

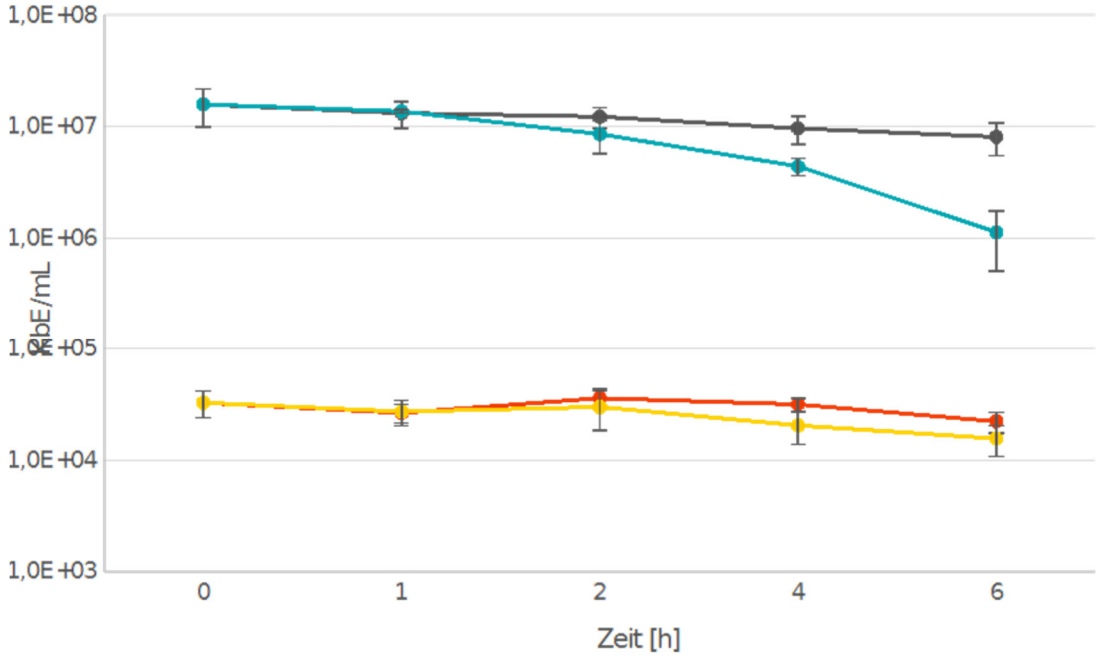

Abbildung 1b. Wirkung der kontaktkatalytischen Antimikrobiellen Oberfläche Y auf ausgekeimte *B. subtilis* 168 Sporen: Nur eine geringfügige Abnahme der auskeimfähigen Zellen.

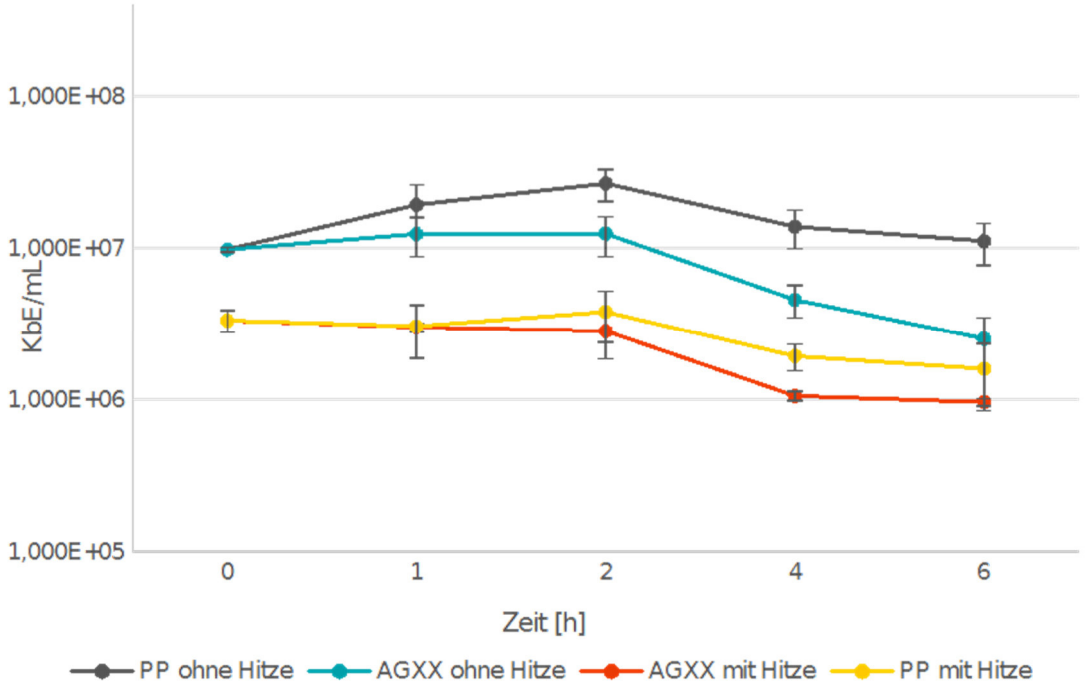

Abbildung 1c. Wirkung der kontaktkatalytischen Antimikrobiellen Oberfläche Y auf ausgekeimte *B. subtilis* KN23 Sporen: Abnahme der auskeimfähigen Zellen von 10^7 auf 10^6 CFU / mL.

3. <u>das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen:</u>

Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens:

Die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens sind:

- **Hohe Wirksamkeit der kontaktkatalytischen Oberflächen**: Das Hauptergebnis dieses Projekts war die erfolgreiche Wirksamkeits-Validierung der Antimikrobiellen Oberflächen X und Y, die eine signifikant schnellere Reduzierung mikrobieller Belastung im Vergleich zu herkömmlichen Silberoberflächen erreichten.
- Insbesondere die schnelle und effektive Beseitigung pathogener MRSA und *E. coli* unter standardisierten Laborbedingungen demonstrierte die überlegene dekontaminierende Wirksamkeit der neuen Oberflächen und bestätigt die Eignung der Materialien für den Einsatz in kritischen hygienesensitiven Anwendungen – eingeschlossen medizinischer und raumfahrttechnischer Umgebungen, wo schnelle und zuverlässige Desinfektionslösungen erforderlich sind.

- **Identifikation von Faktoren, die die Wirksamkeit beeinflussen:**
    - **Einfluss der Umgebungsbedingungen:** Die Unterschiede in der Wirksamkeit der Antimikrobiellen Oberflächen X und Y unter spezifischen Bedingungen verdeutlichen, wie entscheidend eine sorgfältige Anpassung der Umgebungsbedingungen für die optimale Nutzung antimikrobieller Materialien ist. Diese Erkenntnisse sind besonders relevant für Studien, die die Effektivität antimikrobieller Technologien in unterschiedlichen Umgebungen untersuchen.
    - **Stabilität der kontaktkatalytischen Oberflächen:** Die konstante Leistung der Antimikrobiellen Oberflächen X und Y unter verschiedenen Testbedingungen zeigt ihre Robustheit und zuverlässige Wirksamkeit. Diese Eigenschaft macht sie zu einem vielseitigen Werkzeug für Dekontaminationsaufgaben in variablen Einsatzumgebungen und bietet wertvolle Einsichten für die Entwicklung weiterer antimikrobieller Technologien.

Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur die hohe Wirksamkeit der antimikrobiellen Materialien, sondern auch die Bedeutung einer präzisen Anwendung, um eine maximale Effektivität zu gewährleisten. Sie betonen das Potenzial der Antimikrobiellen Oberflächen X und Y als vielseitige Lösungen für Dekontaminationsherausforderungen, wobei der richtige Einsatzkontext entscheidend ist. Sie bieten wichtige Erkenntnisse für die Weiterentwicklung der Applikationen und können als Grundlage für die Entwicklung neuer antimikrobieller Ansätze dienen, die spezifisch für bestimmte Umweltbedingungen oder Anforderungen maßgeschneidert sind.

- **Nebenergebnisse**:
    - Ein bedeutendes Nebenergebnis des Vorhabens war die Optimierung der standardisierten Testmethoden zur Bewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit. Die Anpassung und Verfeinerung der Testprotokolle gemäß ISO 22196 und JIS Z 2801 ermöglichten eine genauere, reproduzierbare Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität. Diese Verbesserungen sind ein wertvoller Beitrag zur Standardisierung der Bewertungsverfahren in der antimikrobiellen Forschung und

könnten weitreichende Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, von der Raumfahrt bis zur Medizintechnik.

- Die Erkenntnis, dass dieselben antimikrobiellen Materialien unterschiedlich effektiv gegen verschiedene grampositive Bakterien wirken können, zeigt, dass die Effektivität antimikrobieller Materialien gegen *Staphylococcus aureus* nicht unbedingt auf andere grampositive Arten übertragbar ist. Diese Beobachtung hat wichtige Implikationen für die Standardisierung von antimikrobiellen Tests und unterstreicht die Notwendigkeit, die Liste der Modellbakterien in den ISO-Standards zu erweitern, um eine umfassendere Bewertung der antimikrobiellen Eigenschaften zu gewährleisten.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3a. Titel des Berichts „Mikrobielle Vielfalt im SIRIUS-Habitat: Molekulare Analysen von Überlebenskünstlern auf neuen antimikrobiellen Zweikomponenten-Oberflächen“	
3b. Titel der Publikation „Unveiling the Potent Antibacterial Activity of AGXX® Surfaces: A quantitative evaluation using a modified ISO22196 assay”	
4a. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] des Berichts Elisabeth Grohmann (orcid iD: 0000-0003-3061-6490) Daniela Wischer (orcid iD: 0009-0009-2920-7885) Rainer Haag (orcid iD: 0000-0003-3840-162X)	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2023
4b. Wischer D, Hadersbeck R, Morad L, Haag R, Grohmann E.	6. Veröffentlichungsdatum *Prepared for submission* 7. Form der Publikation Original Research paper
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Berliner Hochschule für Technik (ehemals Beuth) Prof. Elisabeth Grohmann Luxemburger Straße 10 13353 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution 10. Förderkennzeichen 50WB2033 11a. Seitenzahl Bericht 40 11b. Seitenzahl Publikation 12 (tbc)
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Deutsche Raumfahrtagentur im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	13. Literaturangaben 18 (tbc) 14.Tabellen 10 (tbc) 15.Abbildungen 9 (tbc)
16. Zusätzliche Angaben	
17.Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) (Wird vorgelegt): Biomaterials Advances (Formerly: Materials Science and Engineering C)	

18. Kurzfassung

Die zunehmende Bedrohung durch Antibiotikaresistenzen macht die Erforschung alternativer antimikrobieller Strategien erforderlich. Antimikrobielle Oberflächen haben sich als vielversprechendes Mittel zur Infektionskontrolle im Gesundheitswesen erwiesen, da sie die Besiedlung von Oberflächen mit Bakterien und die Übertragung von Keimen verhindern. AGXX®, das eine kontaktkatalytische antimikrobielle Technologie nutzt, eliminiert durch die Freisetzung von ROS effizient pathogene Bakterien, einschließlich multiresistenter Organismen, filamentöser Pilze, Hefen und Viren. Während das breit gefächerte antimikrobielle Potenzial von AGXX® gut belegt ist, fehlen quantitative Daten über seine antibakterielle (bakterizide) Wirksamkeit.

In dieser Studie haben wir einen modifizierten ISO 22196-Test verwendet, um die antibakterielle Wirksamkeit von AGXX®-Oberflächen quantitativ zu überprüfen. Bei Tests mit pathogenen *Escherichia coli*- und *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen zeigten AGXX®-Oberflächen (Ru-beschichtetes Silber) eine bemerkenswerte Reduktion der lebensfähigen Bakterien um mehr als 3 Log-Stufen innerhalb von 3 Stunden und übertrafen damit unbeschichtete Silberoberflächen, die im gleichen Zeitraum eine Reduktion um 1 Logstufe erreichten.
Standardisierte ISO-Tests bieten eine wichtige erste Wirksamkeitsbewertung, die eine quantitative, objektive Bewertung und einen Vergleich der antimikrobiellen Leistungen von Materialien ermöglicht. Die antimikrobielle Leistung der Oberflächen muss dann unter anwendungsspezifischen Bedingungen validiert werden. Unsere quantitativen Daten unterstreichen die beträchtliche erregerabtötende Wirkung von AGXX® unter Standardbedingungen und positionieren es vorteilhaft gegenüber reinen Silberoberflächen. Künftige Studien werden die Untersuchungen auf reale Bedingungen ausweiten, um die effektivsten Anwendungen von AGXX® im Gesundheitswesen zu definieren. AGXX® ist eine vielversprechende antimikrobielle Technologie, die es verdient, bei der Suche nach robusten Lösungen zur Infektionskontrolle weiter erforscht zu werden.

19. Schlagwörter
Antimikrobielle Oberflächen, AGXX®, ISO 22196, JIS Z 2801, Quantitative Evaluation, Antibakterielle Aktivität

20. Verlag	21. Preis
Elsevier Science B.V.	USD 3910

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3a. Titel des Berichts „Mikrobielle Vielfalt im SIRIUS-Habitat: Molekulare Analysen von Überlebenskünstlern auf neuen antimikrobiellen Zweikomponenten-Oberflächen“	
3b. Titel der Publikation “Quantifying the Pathogen-killing Potential of AGXX® surfaces”	
4a. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] des Berichts Elisabeth Grohmann (orcid iD: 0000-0003-3061-6490) Daniela Wischer (orcid iD: 0009-0009-2920-7885)	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2023
4b. Wischer D, Hadersbeck R, Morad L, Haag R, Grohmann E.	6. Veröffentlichungsdatum 02.06.2024
	7. Form der Publikation Wissenschaftliches Poster
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Berliner Hochschule für Technik (ehemals Beuth) Prof. Elisabeth Grohmann Luxemburger Straße 10 13353 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 50WB2033
	11a. Seitenzahl Bericht 40
	11b. Seitenzahl Publikation 1
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Deutsche Raumfahrtagentur im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	13. Literaturangaben **11**
	14.Tabellen 0
	15.Abbildungen 6
16. Zusätzliche Angaben	
17.Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Joint Microbiology & Infection Conference 2024" of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and theAssociation for General and Applied Microbiology (VAAM)	

Die zunehmende Bedrohung durch Antibiotikaresistenzen erfordert die Erforschung alternativer, antimikrobieller Strategien. Antimikrobielle Oberflächen haben sich als vielversprechendes Mittel zur Infektionskontrolle im Gesundheitswesen erwiesen, da sie die bakterielle Besiedlung von Oberflächen und die Übertragung von Keimen verhindern. AGXX®, eine kontaktkatalytische antimikrobielle Technologie, eliminiert durch die Freisetzung von ROS effizient pathogene Bakterien, einschließlich multiresistenter Organismen, filamentöser Pilze, Hefen und Viren. Während das breit angelegte antimikrobielle Potenzial von AGXX® vielfach nachgewiesen wurde, fehlen quantitative Daten zu seiner keimtötenden Wirksamkeit.
In unserer Studie wurde ein modifizierter ISO 22196-Test verwendet, um die bakterizide Wirksamkeit von AGXX®-Oberflächen quantitativ zu bewerten. Bei Tests mit pathogenen Escherichia coli- und Staphylococcus aureus (MRSA)-Stämmen zeigten AGXX®-Oberflächen (Ru-beschichtetes Silber) eine

bemerkenswerte Reduktion der lebensfähigen Bakterien um mehr als 3 log Stufen innerhalb von 3 Stunden und übertrafen damit unbeschichtete Silberoberflächen, die im gleichen Zeitraum eine Reduktion um 1 log Stufe erreichten. Zu den laufenden Bewertungen gehören Lebend-/Totfärbungen und mikroskopische Auswertungen sowie die Prüfung weiterer pathogener Bakterien und Pilze nach demselben Testprotokoll.

Standardisierte ISO-Tests bieten eine erste Einschätzung für den Vergleich und die Erzeugung reproduzierbarer Daten zur Bewertung antimikrobieller Materialien. Die antimikrobielle Leistung muss anschließend unter anwendungsspezifischen Bedingungen validiert werden. Unsere vorläufigen Daten unterstreichen die überlegene keimtötende Aktivität von AGXX® im Vergleich zu reinen Silberoberflächen. Künftige Studien werden spezifische Anwendungen im Gesundheitswesen untersuchen und sich mit den Herausforderungen und Einschränkungen bei der Umsetzung befassen. Die Ausweitung der Bewertungen auf reale Bedingungen wird es ermöglichen, die effektivsten Anwendungen von AGXX® im Gesundheitswesen zu definieren. AGXX® erweist sich als vielversprechende antimikrobielle Technologie, die bei der Suche nach robusten Lösungen für die Infektionskontrolle weiter erforscht werden sollte.

19. Schlagwörter
Antimikrobielle Oberflächen, AGXX®, ISO 22196, JIS Z 2801, Quantitative Evaluation, Antibakterielle Aktivität

20. Verlag	21. Preis