

WASSERDIFFUSION  
IN BIOFILMEN VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
UND POLYSACCHARID/WASSER-SYSTEMEN:

Eine PFG-NMR Untersuchung

Vom Fachbereich 6 (Chemie / Geographie)

der

Gerhard-Mercator-Universität Duisburg

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Michael Vogt

aus

Oberhausen

Referent : Prof. Dr. Ir. W. S. Veeman

Korreferent : Prof. Dr. H.-C. Flemming

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2001

Auch mit Steinen, die Dir in den Weg gelegt werden, kannst Du etwas Schönes bauen.

*Erich Kästner*

## Danksagung

### Prof. Veeman

Ihnen möchte ich für die Überlassung des fachübergreifenden Themas und für die fortwährende Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit danken. Die vielen Diskussionen, die wir führten, halfen mir insbesondere bei den Tiefpunkten im Verlauf der experimentellen Arbeiten weiter.

### Prof. Flemming

Dir möchte ich dafür danken, daß Du mich mit der Faszination für den Themenbereich Biofilme infiziert hast. Ohne Deinen unermüdlichen Einsatz für eine fachübergreifende Kooperation zwischen der Mikrobiologie und der Chemie wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen.

### Academic Press

Die Abbildungen 2-3, 2-4, 2-5, 2-7 und 2-11 aus dem Kapitel „Polysaccharide“ sind mit freundlicher Genehmigung des Verlages Academic Press aus dem Buch POLYSACCHARIDES, Volume 1, edited by G. O. Aspinall, Copyright © 1982 by Academic Press, entnommen.

### Inga

Die Korrektur meiner vielen Rechtschreibfehler hast Du trotz eines vollen Terminplans durchgeführt. Ganz besonders möchte ich mich aber bei Dir für die häufig nötigen Aufmunterungen bei den „Hängern“, die ich im Verlauf des Zusammenschreibens hatte, danken. Ohne deine Unterstützung hätte das Ganze vermutlich noch einige Zeit länger gedauert.

### Dr. Wingender

Dir gilt mein Dank für die Vermittlung von fundiertem mikrobiologischen Wissen und insbesondere für die Versorgung mit den Biofilmen.

### Manfred Zähres alias Zorro

Dir möchte ich für die große Geduld bei der Einweisung in die hohe Kunst der „praktischen“ NMR-Spektroskopie danken. Weiterhin gilt Dir mein Dank für die häufigen Fehlersuchen bei dem Diffusionszubehör, insbesondere bei der Software.

### Friedhelm

Meine ersten Gehversuche in der PFG-NMR wurden von Dir mit Deiner Erfahrung auf diesem Gebiet wesentlich beschleunigt. Auch die Diskussionen im Verlauf der Arbeit waren sehr hilfreich.

### Natascha

Du hast mir mit den von Dir aufgearbeiteten Alginatproben vom *Pseudomonas aeruginosa* sowie den hydrolysierten Alginaten sehr geholfen.

### Christian

Ich möchte mich bei Dir insbesondere für die „dummen“ Fragen zu Beginn Deiner Arbeit und die vielen Diskussionen bedanken, die mir häufig weitergeholfen haben. Nicht zu vergessen Deine Glycerinmessungen, die mir wertvolle Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Polysacchariden und Glycerin geliefert haben.

### DFG

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung eines wesentlichen Teils dieser Arbeit im Rahmen der Forschergruppe „Physikalische Chemie von Biofilmen“.

### Last but not least.....

Allen Mitarbeitern der PC, der APC, der Mikrobiologie und der Forschergruppe „Biofilme“, die nicht namentlich erwähnt wurden, möchte ich für die hilfreichen Diskussionen und die freundliche Atmosphäre danken.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung .....	1
2 Überblick.....	6
2.1 Biofilme.....	6
2.1.1 Definition und Vorkommen .....	6
2.1.2 Bedeutung.....	6
2.1.3 Die Entwicklung von Biofilmen.....	8
2.1.4 Struktur von Biofilmen.....	11
2.1.5 Diffusionskoeffizienten.....	13
2.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS).....	15
2.3 Polysaccharide .....	17
2.3.1 Aufbau der Polysaccharide .....	17
2.3.2 Alginate .....	20
2.3.2.1 Homopolymere Bereiche .....	21
2.3.2.2 Calciumalginate .....	23
2.3.2.3 Struktur der Alginate in wäßriger Lösung.....	24
2.3.2.4 Einfluß von Substituenten am Monosaccharidring.....	26
2.3.3 Agarose .....	27
2.4 Proteine .....	29
2.4.1 Gelatine.....	29
2.5 „Gebundenes“ Wasser in Polymersystemen .....	31
2.5.1 Definitionen für „gebundenes“ Wasser.....	31
2.5.2 Proteine .....	33
2.5.3 Hydrogele .....	34
2.5.4 Alternative Modelle zur Wasserbindung .....	36
3 Theoretische Grundlagen .....	40
3.1 Grundlagen der Diffusion.....	40
3.2 NMR-Spektroskopie.....	41
3.3 Pulsed Field Gradient (PFG)-NMR-Spektroskopie.....	41
3.3.1 Pulsprogramme .....	41

3.3.2 Funktionsweise der PFG-NMR.....	42
3.3.3 Mathematische Herleitung der Auswertgleichung.....	46
3.3.4 Zeitabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten.....	49
3.3.4.1 Gehinderte Diffusion .....	49
3.3.4.2 Kreuzrelaxation bei PFG-Experimenten .....	51
3.3.4.3 Experimente mit konstantem b-Faktor .....	56
3.3.5 Diffusion als Wasserunterdrückung .....	57
4 Verwendete Materialien und Geräte .....	59
4.1 NMR .....	59
4.1.1 Instrumente .....	59
4.1.2 Diffusionsmessungen.....	59
4.2 Biofilm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 81.....	62
4.3 Polysaccharide .....	65
4.3.1 Manugel DJX.....	65
4.3.2 Calciumalginate.....	65
4.3.3 Manucol LHF.....	66
4.3.4 Manucol LB.....	66
4.3.5 Hydrolysiertes Manucol LB.....	67
4.3.6 Alginat von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG81 .....	67
4.3.7 Agarose .....	68
4.4 Proteine .....	69
4.4.1 Gelatine.....	69
4.5 Polymere.....	70
4.5.1 Polyvinylalkohol (PVA).....	70
4.5.2 Polyethylenglykol (PEG) .....	70
4.5.3 Natrium-Polyacrylat (PAS).....	70
5 Ergebnisse .....	71
5.1 Wasserdiffusion .....	71
5.1.1 Biofilme von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG81 .....	71
5.1.2 Polysaccharide .....	74
5.1.2.1 Manugel DJX.....	75

5.1.2.2 Manucol LHF.....	76
5.1.2.3 Agarose.....	76
5.2 Diffusion des „verlangsamten“ Wasser .....	77
5.2.1 Biofilm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	77
5.2.2 Polysaccharide .....	79
5.2.2.1 Manugel DJX.....	80
5.2.2.2 Manucol LHF.....	85
5.2.2.3 Manucol LB .....	88
5.2.2.4 Agarose.....	90
5.2.2.5 Alginat PA SG81.....	91
5.2.3 „Künstliche“ Polymere .....	92
5.2.4 Gelatine.....	94
5.3 Vergleich verschiedener Polymer/Wasser-Systeme .....	96
5.4 Signalzuweisung .....	97
5.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG81 .....	97
5.4.2 Polysaccharide .....	101
5.4.3 Gelatine.....	103
5.5 Diffusion der Polymere .....	104
5.5.1 Manugel DJX.....	104
5.5.2 Manucol LHF.....	105
5.5.3 Agarose .....	105
5.5.4 Polysaccharid PA SG81.....	106
5.5.5 Gelatine.....	106
5.6 Biofilm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	107
5.6.1 Diffusion in Biofilmen .....	107
6 Diskussion .....	111
6.1 Allgemeine Bemerkungen.....	111
6.2 Wasserdiffusion .....	111
6.3 „Verlangsamtes“ Wasser .....	113
6.3.1 Beweis für Existenz eines Restwassersignals.....	113
6.3.2 Literaturvergleich.....	114

6.3.3 Vergleich der Methoden PFG-NMR, DSC und Neutronenbeugung.....	115
6.4 Modelle für die „verlangsamte“ Wasserfraktion .....	118
6.4.1 Modell 1: Direkte Wasserstoffbrückenbindungen.....	119
6.4.2 Modell 2: Knäuel als Diffusionsbarrieren .....	121
6.4.3 Modell 3: Diffusion innerhalb der Knäuel.....	122
6.4.4 Modell 4: Diffusion entlang der Polymerkette.....	123
6.4.5 Modell 5: Die Kreuzrelaxation.....	126
6.5 Detektierbarkeit der Polymere.....	135
6.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG81.....	137
6.6.1 „Verlangsamtes“ Wasser im Biofilm .....	137
6.6.2 Diffusion von Glycerin, Proteinen und Polysacchariden im Biofilm .....	138
6.7 Wasserbindung der Biofilme und Gele.....	140
7 Zusammenfassung.....	142
8 Anhang.....	143
8.1 Diffusionskoeffizienten der Wasserfraktionen.....	143
8.1.1 Gesamtwassersignal .....	143
8.1.1.1 Biofilm .....	143
8.1.1.2 Polysaccharide.....	144
8.1.2 „Verlangsamtes“ Wasser .....	146
8.1.2.1 Manugel DJX.....	146
8.1.2.2 Calciumalginate .....	147
8.1.2.3 Manucol LHF.....	149
8.2 Kalibration des Gradientensystems .....	150
8.3 Signalzuweisung von Proteinsignalen .....	151
9 Literaturverzeichnis .....	152



# 1 Einleitung

Biofilme sind in Natur und Technik allgegenwärtig. Eine ihrer herausragenden Eigenschaften ist neben der enormen Stabilität (z. B. Plaque) ihr hohes Wasserbindungsvermögen (Flemming, 1994). Diese Eigenschaften bergen Vor- und Nachteile bei der Nutzung von gewünschten bzw. bei der Entfernung von unerwünschten Biofilmen. So ist die hohe Stabilität der Biofilme in Bioreaktoren von großem Vorteil, da die Bakterien dadurch im Reaktor verbleiben und nicht ausgespült werden. Haben sich jedoch unerwünschte Biofilme auf technischen Einrichtungen gebildet (z. B.: Wärmetauscher), sind sie aufgrund ihrer großen Stabilität nur schwer zu entfernen (Flemming, 1994).

Ein weiteres Beispiel für diese Problematik stellt die Klärschlammwässerung dar. Die Mikroorganismen erzielen in den Schlammflocken eine deutlich höhere Abbauleistung als suspendierte Zellen (Flemming, 1994). Da diese Schlämme aus den biologischen Klärstufen bis zu 98 Gewichts-% Wasser enthalten (Benítez et al., 1994), kommt es bei der Entsorgung zu Problemen. Durch eine Entwässerung könnte das Volumen dieser Schlämme reduziert werden, was jedoch ebenfalls sehr teuer ist, da nur ein geringer Teil des Wassers mit einfachen Verfahren wie z. B. Filterpressen entfernt werden kann (Bowen et al., 1989; Denkert, 1994; Melsa, 1993; Rasmussen et al., 1994).

Untersuchungen zur Entwässerung werden häufig mit Hilfe der Kapillar-Saug-Methode nach Vesilind (1988) durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Beurteilung der Effekte verschiedener Schlammbehandlungen (Denkert, 1994) auf die Entwässerbarkeit.

Sowohl in Klärschlämmen als auch in Biofilmen bilden die Mikroorganismen extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), innerhalb derer sie in immobilisierter Form vorliegen (Flemming et al., 2000a; Flemming und Wingender, 2000a; Wingender et al., 1999). Die EPS haben einen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität und die Eigenschaften des Biofilms, weshalb die für den Zusammenhalt der Moleküle verantwortlichen physikochemischen Wechselwirkungen innerhalb der EPS intensiv studiert werden (Flemming und Wingender, 2000b; Flemming et al., 1999, 2000a,b; Körstgens et al., 2001; Mayer et al., 1999).

Es ist bekannt, daß die Wasserbindung in Biofilmen und anderen mikrobiellen Aggregaten hauptsächlich von den EPS hervorgerufen werden (Bowen u. Keinath, 1987; Bruus et al., 1992; Christensen, 1989), die sich im wesentlichen aus Polysacchariden, Proteinen und Nucleinsäuren zusammensetzen.

Die Polysaccharide, die oft einen großen Anteil der EPS ausmachen, sind, wie einige andere Polymere auch, in der Lage, ein Vielfaches ihres Eigengewichtes an Wasser in Form von Gelen zu binden. Wegen dieser Eigenschaft werden Polysaccharide in vielen Bereichen wie z. B. der Lebensmittelindustrie (Aspinall, 1982) und der Medizin eingesetzt (Abatangelo et al., 1997; Lloyd et al., 1998).

Unabhängig davon, ob Biofilme oder Polysaccharidgele betrachtet werden, tritt in allen Anwendungsbereichen das Problem auf, daß die genauen Bindungsmechanismen des Wassers trotz intensiver Forschung zur Zeit noch nicht abschließend geklärt sind und kontrovers diskutiert werden (z. B. Belton, 1997; Fringant et al., 1996; Hatakeyama et al., 1995, 1998; Keiding et al., 2001; Wiggins, 1990). Hierdurch wird eine gezielte und somit kostengünstige Optimierung der Wasserbindung in technischen Verfahren erschwert.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung besteht darin, wie Biofilme in der Lage sind, so große Mengen Wasser (> 98 Gew.-%) zu binden und wie sich dies auf die Stabilität der Biofilme auswirkt. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang häufig von gebundenem Wasser gesprochen, obwohl hierfür keine einheitliche Definition existiert.

Von chemisch oder physikalisch gebundenem Wasser kann man sprechen, wenn individuelle Wassermoleküle durch anziehende Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen, so gebunden werden, daß von einer Ortsfestigkeit gesprochen werden kann. Als Konsequenz dieser Bindungen müßten bestimmte molekulare Eigenschaften des gebundenen von denen des „freien“ Wassers abweichen, wie z. B. die Elektronenverteilung, die rotatorische und die translatorische Bewegung (Belton, 1997).

Alternativ zu den oben beschriebenen Bindungen können Wassermoleküle auch aus rein thermodynamischen Gründen in einem System festgehalten werden. Als Beispiele hierfür können die Osmose oder die Quellung eines Polymernetzwerkes betrachtet werden. Ein Polymernetzwerk nimmt in wäßriger Umgebung solange Wassermoleküle auf, bis das chemische Potential der

Wassermoleküle innerhalb des Netzwerkes genauso groß ist wie das des reinen Wassers außerhalb des Netzwerkes. Diese Zunahme des chemischen Potentials beruht auf einer Druckzunahme im inneren des Netzwerkes durch die Quellung.

Die Wassermoleküle werden in diesem Fall durch das Polymernetzwerk festgehalten, ohne daß es notwendigerweise zu anziehenden Wechselwirkungen zwischen einzelnen Wassermolekülen und den Polymeren kommen muß. Es ist hierbei durchaus möglich, daß die translatorische und rotatorische Beweglichkeit der Moleküle nicht stark von der in reinem Wasser abweicht.

Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Begriff „gebundenes“ Wasser verwendet, um deutlich hervorzuheben, daß Wasser auch ohne konkrete Bindungen in einem System festgehalten werden kann.

Wenn man die für die Wasseraufnahme verantwortliche Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  betrachtet ( $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ ) stellt man fest, daß anziehende Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen und dem Polymer durch die Enthalpie  $\Delta H$  bestimmt werden, während  $\Delta S$  den entropischen Effekt bei der Mischung beschreibt. Allein dieser entropische Effekt kann das Festhalten von Wasser in Biofilmen bzw. Polymernetzwerken erklären. In der Abbildung 1-1 sind diese Möglichkeiten noch einmal dargestellt.

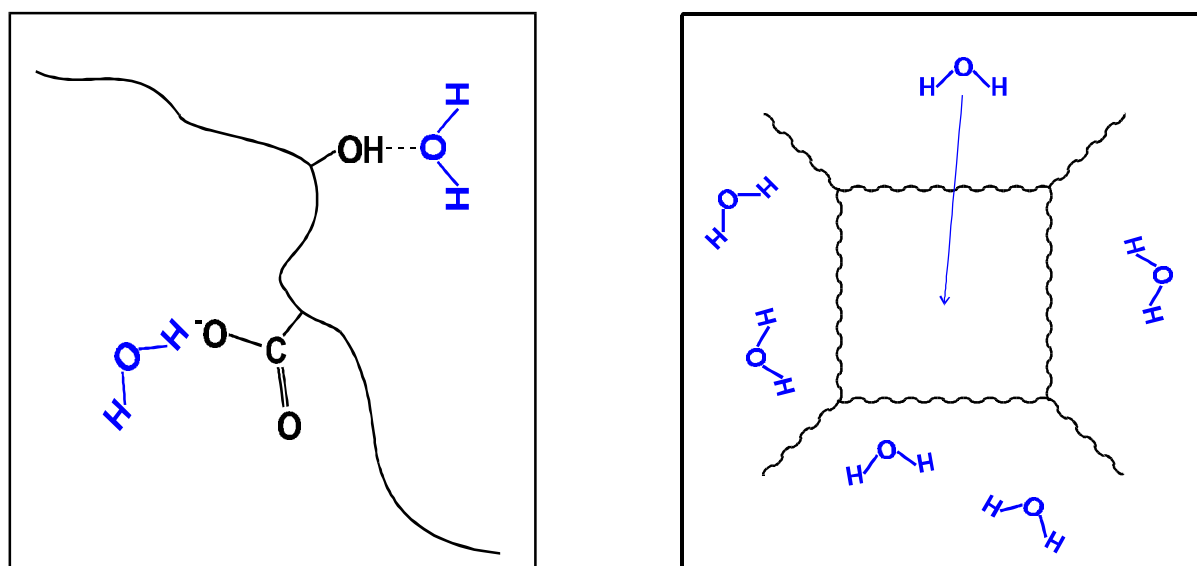


Abb. 1-1: Linke Abbildung: physikalische Bindungen (enthalpische Wechselwirkungen); rechte Abbildung: Quellung als Ursache für „Wasserbindung“ (entropischer Effekt)

In einem realen System ist eine Überlagerung beider Effekte zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob es möglich ist, enthalpische Wechselwirkungen mit Hilfe der NMR zu detektieren. Die wesentliche Idee hierbei ist, daß energetische Wechselwirkungen einen beobachtbaren Effekt auf den Selbstdiffusionskoeffizienten von Wasser haben können.

Eine Methode, mit deren Hilfe die translatorische Beweglichkeit von Wassermolekülen in wäßrigen Systemen detektierbar ist, haben Stejskal und Tanner (1968) entwickelt. Die Pulsed Field Gradient-NMR (PFG-NMR) eignet sich als zerstörungsfreie Methode in biologischen Systemen, da sie mit dem Proton als eine mögliche Sonde zusätzlich zum Wasser nahezu alle biologisch relevanten Moleküle erfassen kann (Beuling et al., 1998; Lens et al., 1997; van Zijl et al., 1991; Volke et al., 1994, Vogt et al., 2000). Sie bietet zusätzlich die Möglichkeit, nach Beweglichkeit gefilterte Experimente durchzuführen. Der Vorteil liegt bei Systemen mit hohem Wassergehalten auf der Hand:

Die Resonanz des Wassers, die bei Wasserkonzentrationen von bis zu 98 Gew.-% alle anderen Signale überlagert, kann herausgefiltert werden (Stilbs, 1987; van Zijl et al., 1991; Vogt et al., 2000). Da dieser Filter selektiv aufgrund der Beweglichkeit arbeitet, wird immobiles Wasser, sofern es im System vorhanden ist, nicht unterdrückt, wie es bei anderen NMR-Techniken der Fall ist.

Zur Untersuchung der Wasserdiffusion bieten sich neben den nativen Biofilmen auch die gereinigten EPS sowie verschiedene Polysaccharid/Wasser-Systeme als Modellsysteme an, da letztere sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit in der Zusammensetzung auszeichnen, was bei den Biofilmen nicht gegeben ist. Einen weiteren Grund, der diese Modellsysteme rechtfertigt, stellen die vorläufigen Ergebnisse von Broekmann et al. (unveröffentlicht) dar. In den EPS von dem hier genutzten Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* sind nur Proteine der molekularen Masse von maximal  $150.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  vorhanden. Diese sind vermutlich nicht oder nur im geringen Umfang an der Bildung der Matrix beteiligt.

Wie bereits erwähnt sollen physikalische bzw. chemische Bindungen von Wasser mit Hilfe der translatorischen Beweglichkeit des Wassers in den Systemen untersucht werden, wozu sich die PFG-NMR anbietet. Hierbei soll zunächst gezielt nach gebundenem Wasser gesucht werden. Wenn solches nachgewiesen wird, ergibt sich als weiterer Aspekt die Quantifizierung und

Charakterisierung dieser Wasserfraktion. Von besonderem Interesse sind hierbei Faktoren, die die Stabilität der Bindungen beeinflussen, da hierdurch möglicherweise Aussagen über die Stabilität des gesamten Systems und z. B. dessen Entwässerung getroffen werden können.

Weiterhin soll versucht werden, die in der Literatur bekannten Modelle und Bindungsmechanismen mit Hilfe der PFG-NMR zu überprüfen und gegebenenfalls zu modifizieren.

Da die verwendete Methode zusätzlich die Möglichkeit bietet, die translatorische Beweglichkeit der Polymere zu bestimmen, könnte ein Zusammenhang zwischen der Polymerbeweglichkeit und der Wasserbeweglichkeit gefunden werden (Yamada-Nosaka und Tanzawa, 1991). Ein solcher Zusammenhang erlaubt dann möglicherweise Aussagen über den Einfluß des Wassers auf die Stabilität des Systems. Hier bietet sich insbesondere eine Untersuchung des Einflusses von Calciumionen an, da bekannt ist, daß sie die Beweglichkeit von einigen Polysacchariden durch physikalische Vernetzung (Aspinall, 1982; Körstgens, 2001; Yalpani, 1988) erheblich einschränken.

## 2 Überblick

### 2.1 Biofilme

#### 2.1.1 Definition und Vorkommen

Der größte Teil der Mikroorganismen auf der Erde (99 %) lebt in Biofilmen (Costerton et al., 1987). Diese stellen mit einem Alter von 3,5 Milliarden Jahren die älteste bislang bekannte Form von Lebensgemeinschaften dar (Schopf et al., 1983).

Der Begriff „Biofilm“ wird häufig etwas ungenau für verschiedene Aggregate wie Flocken, Schleime, Filme und Schlämme verwandt. In allen diesen Formen sind die Bakterien in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet. Da die EPS diese Aggregate überhaupt erst ermöglichen und auch eine Fixierung an Oberflächen auslösen können, spielen sie eine zentrale Rolle in dieser Form organisierten Lebens (Wingender und Flemming, 1999). Obwohl die Bakterien in Biofilmen meist dominieren, können je nach Standort auch beträchtliche Anteile an anderen Mikroorganismen (z. B. Algen, Pilze und Protozoen) vorhanden sein (Flemming und Wingender, 2000c).

Biofilme können an allen Grenzflächen entstehen, wenn bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllt sind. Sobald genügend Wasser und Nährstoffe vorhanden sind, können Bakterien Biofilme ausbilden. Hierbei gibt es Mikroorganismen, die selbst unter extremen Bedingungen überleben können. Als Beispiele seien UV-Lampen, Heißwassersysteme und bidestilliertes Wasser genannt (Flemming, 1996).

#### 2.1.2 Bedeutung

In technischen Systemen zeichnen sich erwünschte Biofilme gegenüber suspendierten Mikroorganismen durch eine Reihe von Vorteilen aus. In Bioreaktoren werden die Bakterien, die

sich innerhalb eines Biofilms befinden, während des Betriebs des Reaktors nicht so leicht ausgespült. Es lassen sich mit Hilfe von Biofilmen auch deutlich höhere Zelldichten und Reaktionsraten erreichen (Flemming, 1994; Beuling 1998). Ein weiterer Vorteil liegt in dem besseren Schutz der Bakterien gegen Stoßbelastungen durch toxische Substanzen. Durch die Ausbildung von Mikrokonsortien werden höhere Abbauraten erzielt, was in der Wasseraufbereitung und Abwasserreinigung von Bedeutung ist (Bishop, 1997). Auf Langsamsandfiltern und Aktivkohlefiltern bilden sich Biofilme, die einen Großteil der organischen Substanzen im Wasser abbauen. Auch in der biologischen Klärstufe von Kläranlagen spielen Biofilme (z. T. als Flocken) eine große Rolle. Sie bringen jedoch Probleme mit, wenn der Klärschlamm entsorgt werden muß. Aufgrund des sehr hohen Wassergehaltes (90 - 98 %) müssen sie mit hohem Kostenaufwand entwässert werden. Die Kosten für die Schlammbehandlung kanadischer Kläranlagen belaufen sich auf etwa 50 % der gesamten Kosten (Bowen et al. 1989). Gerade aus diesem Grund wird in der Abwassertechnik sehr intensiv über „gebundenes Wasser“ geforscht (Denkert, 1994; Rasmussen et al., 1994; La Heij et al., 1996a, b; Smith und Vesilind, 1995; Vesilind, 1988).

Neben den oben genannten gewünschten Biofilmen gibt es gerade in der Technik auch eine Vielzahl von unerwünschten Biofilmen, die zu enormen Problemen und Kosten führen können. Beispiele hierfür sind Biofilme auf Wärmeaustauschern, die wie Isolatoren den Wärmefluß behindern. Auch Membranfilter sind sehr anfällig gegenüber Biofilmen, da sie durch diese verstopft werden können (Flemming, 1994, 1995). Bei Reinstwasseranlagen kommt zusätzlich noch das Problem hinzu, daß immer wieder Mikroorganismen, die auf der Membran sitzen, durchbrechen können und so das Reinstwasser verunreinigen. Aufgrund ihrer rauhen, viskoelastischen Oberfläche führen Biofilme auch zu großen Reibungsverlusten in der Schifffahrt (Besiedlung des Schiffsrumpfes) sowie in Rohrleitungssystemen (Flemming und Wingender, 2000c).

Ein anderer Aspekt der Biofilme stellt die Materialzerstörung durch Biokorrosion dar. Diese tritt nicht nur bei Metalloberflächen, sondern auch auf mineralischen Oberflächen wie Beton auf (Herb et al., 1997; Flemming, 1994, 1998). Eine umfangreiche Zusammenfassung der Problematik Biofouling bzw. Biokorrosion hat Flemming (1994) veröffentlicht.

Biofilme haben auch eine medizinische bzw. hygienische Konsequenz. Sie sind z. B. als Plaque an der Zerstörung des Zahnschmelzes beteiligt. Sie können als Infektionsquelle auftreten, da sie Krankheitserregern einen Lebensraum zur Verfügung stellen können, der gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln oder der Immunabwehr des Wirtes relativ geschützt ist (Flemming und Wingender, 2000c). Die Schutzwirkung der EPS kann dabei soweit gehen, daß Biofilme sich in Desinfektionsmittel-Leitungen bilden können (Exner et al., 1983).

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien der Art *Pseudomonas aeruginosa* (kurz PA) sind von medizinischer Relevanz (Costerton et al., 1999; Grobe, 1996). Es handelt sich um Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die eine Länge von 2 - 4 µm erreichen. Sie sind beweglich und zum Teil mucoid. Bei PA ist dieser Begriff exakt definiert. Innerhalb von 24 Stunden muß ein Schleim gebildet werden, damit ein PA-Stamm als mucoid gilt. Der Schleim entsteht durch eine Überproduktion von Alginat (Grobe, 1996), einem Polysaccharid, daß in einem späterem Abschnitt noch genauer vorgestellt wird (siehe Kapitel „Alginat“, Seite 20). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *Pseudomonas aeruginosa* SG 81 ist nach dieser Definition mucoid und produziert innerhalb von 24 Stunden genügend große Mengen an Schleim. Da der Stamm auch gut charakterisiert ist (Grobe, 1996) wird PA SG 81 in der Forschergruppe „Physikalische Chemie von Biofilmen“ als Modellsystem für natürliche Biofilme genutzt.

### 2.1.3 Die Entwicklung von Biofilmen

Die vielen Faktoren, die die Entstehung und die Entwicklung eines Biofilmes beeinflussen (wie z. B. die Beschaffenheit der Oberfläche, die Eigenschaften des Wassers und der Bakterien, die im System vorhanden sind), machen deutlich, daß man kaum einen universellen Adhäsionsmechanismus erwarten kann. Es ist z. B. bekannt, daß ein und derselbe Organismus auf unterschiedliche Eigenschaften der Oberfläche (hydrophil bzw. hydrophob) reagieren kann (Flemming und Wingender, 2000c).

Trotz der großen Komplexität und Vielfalt der Parameter kann die Entwicklung eines Biofilms grundsätzlich in verschiedene Stadien unterteilt werden (siehe Abb. 2-1).



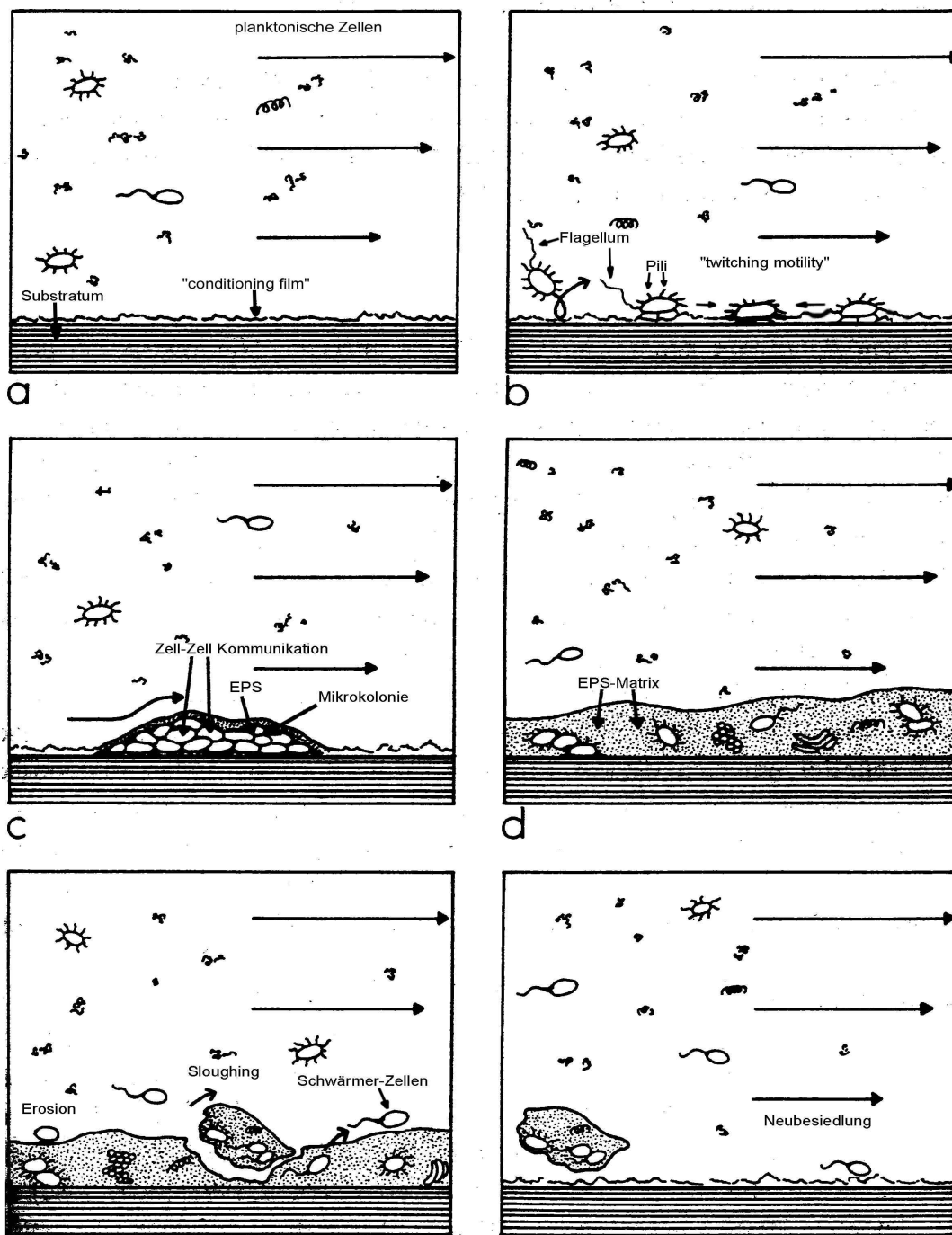


Abb. 2-1: Entwicklung und Ausbreitung eines Biofilms in einem Wassersystem. a) conditioning film, b) reversible und irreversible Adhäsion, c) EPS-Produktion und Bildung von Mikrokolonien, d) reifer, konfluent Biofilm, e) Ablösung einzelner Bestandteile (1) Biofilm-Fetzen, „sloughing“, (2) aktive Ablösung von Einzelorganismen („Schwärmerzellen“) durch Abbau von Matrixpolymeren, f) weitere Ausbreitung (aus Flemming und Wingender, 2000c)

Bedingung für eine bakterielle Besiedlung von Oberflächen ist, daß die Mikroorganismen zu dieser Fläche gelangen. Der Transport von Bakterienzellen zu einer Oberfläche erfolgt überwiegend durch Konvektion bis zu einer laminaren Grenzschicht, in der die Fließgeschwindigkeit bis zur Oberfläche vollständig abnimmt. Da diese Schicht deutlich größer als ein Bakterium ist, müssen die Bakterien diese Grenzschicht durchdringen. Im allgemeinen wird nicht die blanke Oberfläche, sondern ein sogenannter „conditioning film“ besiedelt. Dieser besteht aus organischen Makromolekülen und ist auf fast allen Oberflächen zu finden.

Die Besiedlung ist zunächst noch reversibel, kann aber durch zunehmende Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und den Zellen bzw. deren EPS irreversibel werden. Im Laufe der Zeit bilden sich dann Mikrokolonien aus, was auch durch eine aktive Bewegung der Zellen auf der Oberfläche geschehen kann. Wenn sich erst einmal Bakterien auf der Oberfläche angesiedelt haben, besteht die Möglichkeit, daß sich Bakterien anderer Arten an die Primärbesiedler anheften. Haften die Zellen erst einmal an der Oberfläche, kommt es insbesondere durch eine Vermehrung der Bakterien zu einer Bildung und dem Wachstum der Mikrokolonien (Bishop, 1997). In dieser Phase wird die EPS-Produktion stark gefördert. Der Mechanismus, wie die Bakterien den Kontakt zu einer Oberfläche „wahrnehmen“ ist noch unbekannt (Flemming und Wingender, 2000c). Auch beim *Pseudomonas aeruginosa* wird die Bildung von Alginat durch den Kontakt mit der Oberfläche induziert.

Die Biofilme wachsen solange, bis die Ablösung von Biofilmtteilen genauso groß ist wie die Neubildung (Plateau-Phase). Die Ablösung kann durch Scherkräfte erfolgen. Hierbei können sowohl einzelne Organismen (Erosion) als auch ganze Biofilmtteile (Sloughing) abgetrennt werden. Auch ein aktives Verlassen von Bakterien scheint möglich (Flemming und Wingender, 2000c).

## 2.1.4 Struktur von Biofilmen

Wie bereits im Abschnitt über die Entwicklung von Biofilmen erwähnt, spielen beim Wachstum sehr viele Faktoren eine Rolle. Dies führt auch zu einer enormen Vielfalt und Komplexität bei den Strukturen der Biofilme. Ein gängiges Modell für Biofilme ist in Abbildung 2-2 dargestellt (Costerton et al., 1994).

Die EPS bilden pilzähnliche Strukturen aus, in denen sich die Mikrokolonien befinden. Im Bild sind auch Kanäle und Poren zu erkennen. Diese Poren bzw. Kanäle können Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  erreichen. Dabei bilden sie ein regelrechtes Transportsystem, das bis auf das Substrat (die vom Biofilm besiedelte Oberfläche) reichen kann (de Beer et al., 1994a; de Beer und Stoodley, 1995; Okabe et al., 1997). Der mittlere Durchmesser dieser Poren nimmt dabei von der Oberfläche des Biofilms (Grenzfläche Biofilm/Wasser) zum Substrat hin ab (Bishop, 1997). Innerhalb dieser Kanäle findet man selbst in den unteren Biofilmbereichen noch Sauerstoff (de Beer et al., 1994a; de Beer und Stoodley, 1995). De Beer et al. (1994b) und Lewandowski et al. (1995) konnten in den Kanälen auch Konvektion nachweisen (in der Abbildung durch Pfeile angedeutet), wenn sich der Biofilm in einem durchströmten System befindet (z. B. Rohrleitungen).

Innerhalb der Pilzstrukturen selber dominiert der diffusive Stofftransport (de Beer et al., 1994a,b; de Beer und Stoodley, 1995).

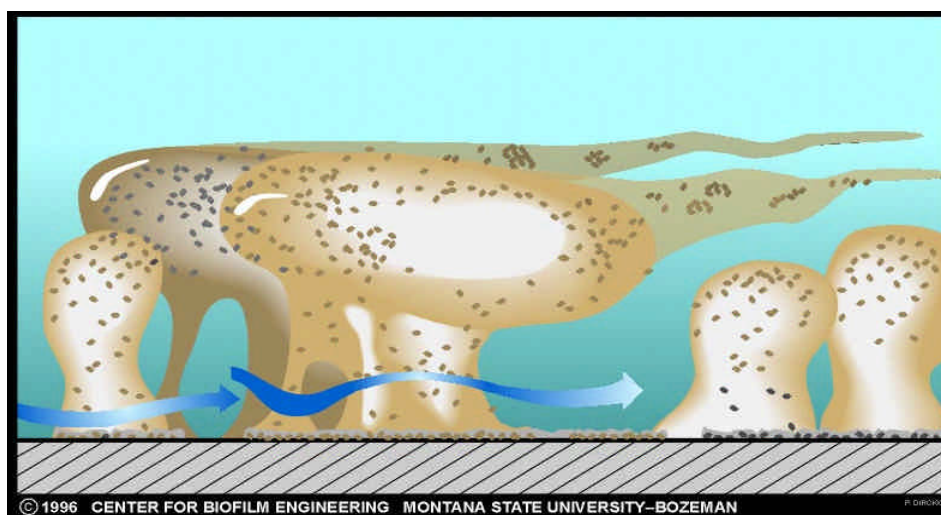


Abb. 2-2: Schematische Darstellung einer Biofilmstruktur (nach Costerton et al., 1994). Die Pfeile symbolisieren mögliche Wege des konvektiven Stofftransports.

Diese in Bezug auf die Verteilung der Materie und der enthaltenen Mikroorganismen sehr heterogene Struktur hat einen wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaften der Biofilme. Da die Mikroorganismen innerhalb der EPS-Matrix relativ immobil sind, stellt sich die Frage, worin der Vorteil dieser Lebensform liegt, zumal ein Nachteil offensichtlich scheint: Die ortsfesten Organismen müssen darauf warten, daß die Nährstoffe „zu ihnen kommen“. Es kommt hinzu, daß innerhalb der gel-ähnlichen Matrix der EPS der konvektive Transport stark eingeschränkt ist und im wesentlichen nur innerhalb der Poren und Kanäle stattfinden kann. Innerhalb der Cluster läuft der Stofftransport über im Vergleich zur Konvektion sehr langsame Diffusionsprozesse ab (de Beer et al., 1994a; de Beer und Stoodley, 1995). Diese Tatsache hat im Fall vom Sauerstoff eine wichtige Konsequenz. Wenn aerobe Mikroorganismen an der Clusteroberfläche den Sauerstoff schneller abbauen, als er nachdiffundieren kann, entstehen im Inneren der Cluster anaerobe Bereiche, in denen sich dann anaerobe Organismen ansiedeln können (de Beer et al., 1994a; de Beer und Stoodley, 1995; Bishop, 1997).

Diese Heterogenität tritt nicht nur beim Sauerstoff, sondern auch bei allen anderen wichtigen Faktoren wie z. B. Substraten, Stoffwechselprodukten und pH-Werten auf und ist ein wesentliches Kennzeichen von Biofilmen (Flemming und Wingender, 2000c).

Gerade diese Heterogenität offenbart bei genauerer Betrachtung viele, nicht zu unterschätzende Vorteile für die Bakterien in einer solchen EPS-Matrix. Ein Aspekt ist hierbei die längerfristige Nachbarschaft verschiedener Mikroorganismen, die die Entwicklung von synergistischen Mikrokonsortien ermöglicht. Dies ist unter anderem bei der Selbstreinigung von Gewässern, Sedimenten und Böden von Bedeutung (Bishop, 1997; Flemming und Wingender, 2000c, 2000b).

Durch die entsprechend langen Verweilzeiten verschiedener Mikroorganismen auf engstem Raum erreichen Biofilme z. B. höhere Aktivitäten bei der Nitrifikation und schnelleren Abbau von Xenobiotika im Vergleich zu suspendierten Zellen (Bishop, 1997; Flemming und Wingender, 2000c). An Grenzflächen, die mit Luft in Kontakt stehen, schützt die EPS-Matrix die Organismen vor der Austrocknung bzw. vor zuviel Wasser (Hart et al., 1999). Auch bei Nährstofflimitierung sind Biofilme gegenüber suspendierten Organismen im Vorteil, da die Matrix die wenigen Nährstoffe effektiv daran hindert, fortgeschwemmt zu werden (Flemming und Wingender, 2000c; Costerton et al., 1987).

### 2.1.5 Diffusionskoeffizienten

Diffusionskoeffizienten werden in Biofilmen und Schlämmen im wesentlichen mit vier Methoden bestimmt. Es handelt sich hierbei um die Scanning Confocal Laser Microscopy (SCLM), die Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), die Mikroelektroden und die PFG-NMR.

Die beiden ersten Methoden können mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops dreidimensionale Abbildungen von Biofilmen erzeugen. Die Bewegung (Translation und Diffusion) von fluoreszierenden Molekülen oder Partikeln läßt sich ebenfalls sehr gut beobachten (de Beer et al. 1997; Lawrence et al., 1994; Okabe et al., 1997; Roe, 1994). So konnten de Beer et al. (1994b) zeigen, daß innerhalb der Kanäle eines Biofilms konvektive Flüsse auftreten können. Alle nicht fluoreszierenden Moleküle und Partikel sind diesen Methoden unzugänglich.

Die Mikroelektroden werden speziell für eine bestimmte Molekülart entwickelt (z. B. Sauerstoff). Es handelt sich hierbei um Elektroden mit extrem dünnen Spitzen, mit denen über das elektrische Potential die Menge der vorhandenen Moleküle quantifiziert werden kann (de Beer et al., 1994a, 1995; Lewandowski et al., 1994). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß zur Messung des Diffusionskoeffizienten die Elektrode in den Biofilm gestochen werden muß. Diese Methode ist daher destruktiv und nicht beliebig einsetzbar.

Die NMR bietet neben der in dieser Arbeit genutzten eindimensionalen Diffusionsmessung (Beuling et al., 1998; Beuling 1998; Knauss et al., 1999; Lens et al., 1997; 1999; Vogt et al., 2000) auch die Möglichkeit, Abbilder von dem zu untersuchenden System zu erstellen (van As und van Dusschoten, 1997; La Heij, 1996a; Lewandowski et al., 1992, 1993 1994, 1995). Hierbei kann z. B. die räumliche Verteilung der Beweglichkeit von Molekülen gemessen werden. Die Auflösung wird bei diesen Verfahren durch die relativ niedrige Empfindlichkeit der NMR begrenzt.

Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in Biofilmen liefert zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse (Christensen und Characklis, 1989; Stewart, 1998). Die wichtigste Ursache hierfür stellen die Randbedingungen dar, die einen Einfluß auf die Struktur und die Zusammensetzung

des Biofilms haben können (siehe oben). Im allgemeinen sind die Diffusionskoeffizienten kleiner Moleküle wie z. B. Wasser, Sauerstoff und Fluorescein nur geringfügig niedriger als in reinem Wasser (siehe Tabelle 2-1). Die Tatsache, daß Mikroorganismen im Biofilm besser gegen Biozide geschützt sind, kann daher nicht durch eine Hinderung der Diffusion dieser Moleküle erklärt werden (de Beer et al., 1997). Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Biozide mit den Polymermolekülen der EPS reagieren und so unwirksam gemacht werden. Eine sichere Erklärung gibt es derzeit allerdings nicht (Flemming und Wingender, 2000c).

Tab. 2-1: Diffusivität in Biofilmen (nach Flemming, 1994)

Molekül	MW	$D_{\text{Biofilm}}/D_{\text{Wasser}}$
O <sub>2</sub>	32	0,98
Fluorescein	332	0,91
Dextran	4.000	0,76
Dextran	38.000	0,85
Dextran	580.000	0,26
BSA	68.000	0,86
IgG	146.000	-
HK	102.000	0,69
Catalase	225.000	0,67

In der Literatur finden sich einige Studien zur Diffusion bzw. Konvektion von Wasser in Biofilmen (Beuling et al., 1998; Beuling 1998; de Beer et al., 1994b; Lens et al., 1997, 1999; Schmitt und Flemming, 1999; Vogt et al., 2000). Während de Beer et al. (1994b) die Konvektion in Biofilmen studiert haben (siehe Kapitel „Struktur von Biofilmen“, Seite 11) konnten Lens et al. (1997, 1999) mit Hilfe von T<sub>2</sub>-Relaxations- und Diffusionsmessungen verschiedene Wasserfraktionen in Schlammflocken nachweisen. Bei der Untersuchung des H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O-Austausches in einem aktiven Biofilm wiesen Schmitt und Flemming (1999) eine mehrstufige Kinetik nach, die nach einer Behandlung des Biofilms mit Chlor nicht mehr auftrat. Es könnte sich auch in diesem Fall um verschiedene Pools von Wasser handeln, was aber noch nicht abschließend geklärt ist. Beuling (1998) fand in Biofilmen nur einen Diffusionskoeffizienten, der maßgeblich vom Biofilmtyp abhängt, im allgemeinen aber nur geringfügig niedriger als bei freier Diffusion ist.

## 2.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)

Die Matrix und damit die Biofilme selber werden durch die EPS gebildet. Um den Aufbau eines Biofilms, seine Stabilität und auch die Transportmechanismen im Inneren eines Filmes zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge innerhalb der EPS erforderlich, da diese maßgeblich an den genannten Eigenschaften beteiligt sind (Sutherland, 2000). Dies gilt im besonderen für die Frage, was die Biofilme respektive EPS zusammenhält. Eine Klärung dieser Zusammenhänge ermöglicht dann die gezielte Nutzung oder aber Bekämpfung von Biofilmen.

Die EPS stellen eine sehr heterogene Matrix mit stark variierenden Bestandteilen dar. Ihr Hauptbestandteil ist Wasser, welches bis zu 98 Gew.-% ausmachen kann (Wingender et al., 1999). Der Anteil der extrazellulären Makromoleküle im Biofilm schwankt zwischen 50 % und 90 % der gesamten organischen Substanz im Biofilm (Flemming und Wingender, 2000c).

Bei den Polymeren der EPS handelt es sich im wesentlichen um Polysaccharide und Proteine. Es sind aber auch Anteile von Nucleinsäuren und Lipiden nachweisbar. Die Polysaccharide können sowohl als Polyelektrolyte (meist anionisch) als auch als neutrale Moleküle vorkommen. Die Carboxylgruppen der Uronsäuren sowie andere ionische Substituenten beeinflussen wie auch die Acetylgruppen in den Polysacchariden deren physikochemischen Eigenschaften (Sutherland, 1994, 2000). Neben den Polysacchariden können in der EPS sehr große Anteile an Proteinen vorkommen. Ein Beispiel hierfür ist der *Pseudomonas aeruginosa* SG81, dessen EPS-Zusammensetzung in Tabelle 2-2 dargestellt ist (Rode et al., 2000).

Tab. 2-2: Zusammensetzung der EPS von *Pseudomonas aeruginosa*, auf Agar angezüchtet, bezogen auf  $10^9$  Zellen (Rode et al., 2000)

Komponente	Biofilm ( $\mu\text{g}/10^9$ Zellen)	EPS ( $\mu\text{g}/10^9$ Zellen)	Anteil in den EPS
Polysaccharide	1005.8	766.6	76.2 %
Uronsäuren (Alginat)	473.8	402.8	85.0 %
Proteine	585.0	266.4	45.5 %

Die Polysaccharide der EPS bilden durch ihre großen Kettenlängen hochviskose Flüssigkeiten oder Gele (Körstgens et al., 2001; Sutherland, 2000). In einigen Fällen entstehen die Gele erst durch Wechselwirkungen mit di- und trivalenten Kationen, da diese die Carboxylgruppen der Zuckersäuren in Polysacchariden verbrücken können (Sutherland, 2000; Yalpani, 1988).

Interessanterweise sind die Polysaccharide in den EPS nur langsam biologisch abbaubar (Sutherland, 1999; Flemming und Wingender, 2000b), wohingegen die extrazellulären Proteine wohl einem rascheren turnover unterliegen. Möglicherweise schützen Acetylgruppen an den Polysaccharidketten diese vor einem enzymatischen Abbau (Sutherland, 1994).

Die zwischen den Makromolekülen der EPS vorherrschenden Wechselwirkungen sind sogenannte schwache Wechselwirkungen (Sutherland, 2000, Flemming et al., 2000a). Hierbei handelt es sich um (Flemming und Wingender, 2000c):

- Dispersions-Wechselwirkungen (Bindungsenergie:  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- elektrostatische Wechselwirkungen (Bindungsenergie:  $12\text{-}29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- Wasserstoffbrückenbindungen (Bindungsenergie:  $10\text{-}30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

Da die einzelnen Bindungen recht schwach sind, können diese durch äußere Einflüsse leicht wieder aufgebrochen werden, wodurch es bei der Netzbildung zu fluktuierenden Haftpunkten kommen kann. Dies bedeutet, daß im Gegensatz zu chemischer Vernetzung über kovalente Bindungen die Haftpunkte durch äußere Einflüsse wie z. B. Scherung beeinflusst werden können. Die mechanische Stabilität solcher Systeme kann mit Hilfe eines Film-Rheometers bestimmt werden. Körstgens et al. (2001) konnten zeigen, daß Calcium-, Kupfer- und Eisenionen die mechanische Stabilität eines *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms erhöhen, während dies bei Magnesiumionen nicht der Fall ist.



## 2.3 Polysaccharide

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, sind die Polysaccharide sowohl am Aufbau der EPS als auch an der „Wasserbindung“ der Biofilme beteiligt. Aus diesem Grund sollen an dieser Stelle einige Aspekte von Polysacchariden näher betrachtet werden.

Polysaccharide sind in Natur und Technik weit verbreitet. Neben dem Vorkommen in Biofilmen bilden sie die Gerüste von Pflanzen (z. B.: Cellulose) sowie von Tieren (Chitin bei Krebsen und Insekten). Sie dienen auch als Energiespeicher (z. B.: Glykogen, Dextran, Stärke). Selbst in der Nahrungsmittelindustrie sind sie nicht mehr wegzudenken (Verdickungsmittel z. B. Alginate, Stärke).

Bei den bakteriellen Polysacchariden handelt es sich in fast allen Fällen entweder um Homopolysaccharide (nur ein Monosaccharidtyp) oder regelmäßige Copolymere aus zwei bis acht verschiedenen Monosacchariden (Aspinall, 1982; Sutherland, 2000). Eine Ausnahme stellen hierbei die bakteriellen Alginate dar, die statistische Copolymere aus den Monosacchariden Mannuronat und Guluronat sind (Sutherland, 1994).

Bevor auf die Strukturen und Eigenschaften einzelner Polysaccharide eingegangen wird, soll zum besseren Verständnis ein kurzer Überblick über die Monomere und deren Bindung zu Polymeren gegeben werden.

### 2.3.1 Aufbau der Polysaccharide

In der Natur findet man zahlreiche verschiedene Monosaccharide. In der Abb. 2-3 sind einige dieser Monomere dargestellt. Wie im weiteren Verlauf dieses Kapitels deutlich werden wird, spielen nur wenige dieser Monosaccharide im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle.

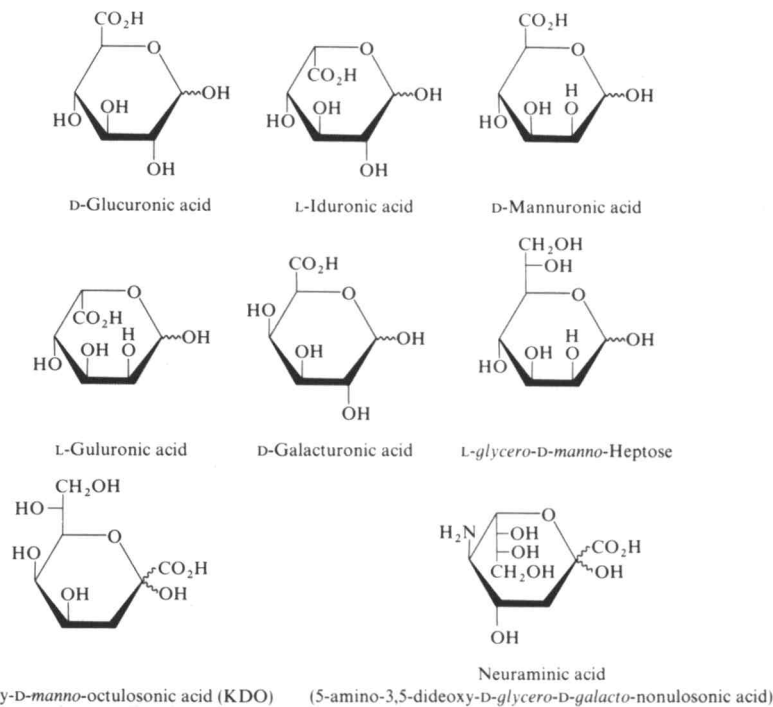


Abb. 2-3: Einige Beispiele für Monosaccharide, die in Polysacchariden gefunden werden (Aspinall, 1982)

In der Realität liegen diese Monomere nicht in der planaren Form wie in der obigen Abbildung vor. Vielmehr können sie verschiedene Konformationen annehmen, von denen die Sesselkonformation die energetisch günstigste ist (siehe Abb. 2-4).

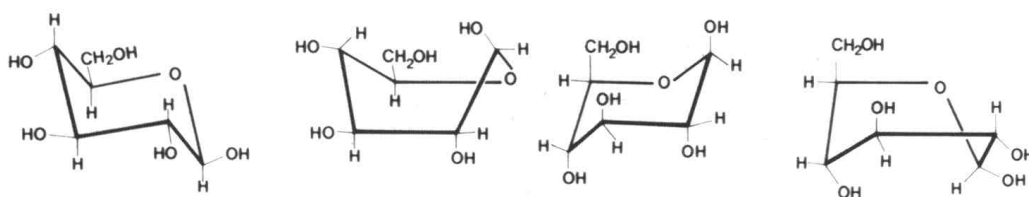


Abb. 2-4: Ausgewählte Ringkonformationen am Beispiel der ***b***-D-Glucose (Aspinall, 1982)

In Polysacchariden liegt hauptsächlich die Sesselkonformation vor, gelegentlich gibt es in „Random Coil“-Strukturen wohl auch fluktuierend die Wannenform (Aspinall, 1982).

Für die Interpretation der Ergebnisse von Untersuchungen zur „Wasserbindung“ durch Polysaccharide ist die Struktur und insbesondere die Steifheit der Makromoleküle von Bedeutung (siehe Kapitel „Modell 4: Diffusion entlang der Polymerkette“, Seite 123). Diese Polyeigenschaften hängen im Fall der Polysaccharide maßgeblich von der glykosidischen Bindung ab, was am Beispiel der in Abb. 2-5 dargestellten Bindungen erläutert wird.

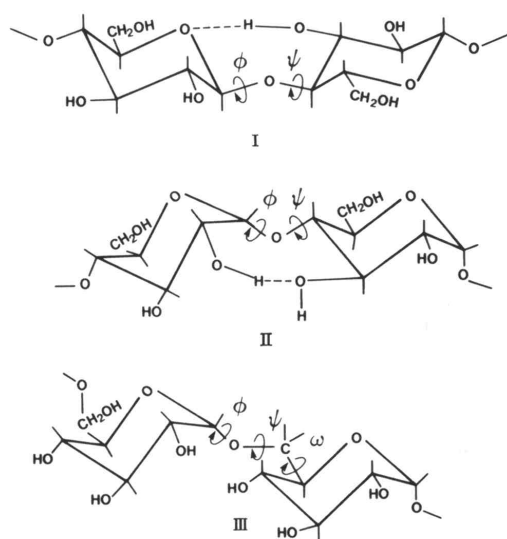


Abb. 2-5: Die glykosidische Bindung und ihre Beweglichkeit an drei Beispielen (die für die Bindung wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linie eingezeichnet): I) Cellulose, II) Amylose, III) Dextran (Aspinall, 1982)

Die glykosidischen Bindungen werden nach den beteiligten Kohlenstoffatomen bezeichnet. In der Cellulose und der Amylose liegen demnach 1,4-glykosidische Bindungen vor, während im Dextran eine 1,6-glykosidische Bindung zu finden ist. Zur Beschreibung der Beweglichkeit der 1,4-glykosidischen Bindung reichen die zwei Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  aus, während man bei der 1,6-glykosidischen Bindung einen weiteren Winkel  $\omega$  benötigt. Die Beweglichkeit der 1,6-glykosidischen Bindung ist deutlich größer als die der recht starren 1,4-glykosidischen Bindung, da letztere nicht nur einen Torsionswinkel weniger besitzt, sondern auch durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ringsauerstoffatom und der Hydroxylgruppe am C-3 Atom (siehe Abb. 2-5: Cellulose) bzw. zwischen den Hydroxylgruppen an den Ringatomen C-2 und C-3 (siehe Abb. 2-5: Amylose) in ihrer Rotationsfreiheit gehindert wird.

### 2.3.2 Alginat

Alginat bestehen aus linearen, statistischen Copolymeren der Monosaccharide Mannuronat (kurz: M) und Guluronat (kurz: G), wobei auch homopolymere Bereiche innerhalb der Ketten möglich sind. Der Unterschied zwischen den bakteriellen Alginaten (z. B. *Pseudomonas aeruginosa*) und den Algalginaten (z. B. Manucol und Manugel) besteht in der Anwesenheit von Acetylgruppen an den Mannuronatresten der Bakterialginaten sowie in den Mannuronat- und Guluronat-Sequenzen (Sutherland, 1990, 1994). Diese Acetylierung schützt die Polysaccharide vor einem enzymatischen Abbau (Sutherland, 1994) und beeinflusst die physikalischen Eigenschaften dieser Polymere (Sutherland, 1997). Darauf wird in einem späteren Abschnitt noch genauer eingegangen (siehe Kapitel „Einfluß von Substituenten am Monosaccharidring“, Seite 26).

Das Alginat von PA SG81 ist ein Polyelektrolyt, dessen Mannuronateinheiten an C<sub>2</sub> und/oder C<sub>3</sub> teilweise acetyliert sind (siehe Abbildung 2-6).

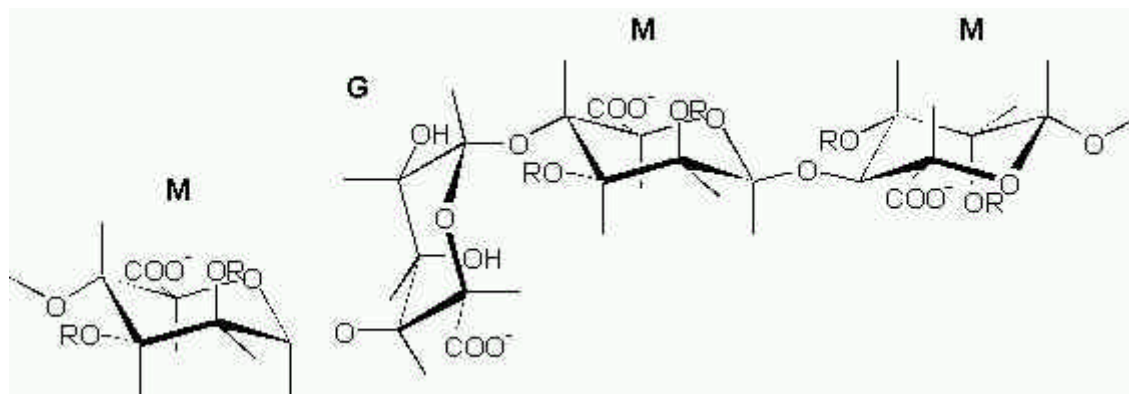


Abb. 2-6: 1,4 glykosidisch verknüpfte **b-D-Mannuronat (M)**  $R = -H$  bzw.  $-COCH_3$  mit einer  **$\alpha$ -L-Guluronat (G)** Einheit in der Polymerkette (Moritz, 1997)

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Protonen, die direkt an den C<sub>5</sub>-Ring des Zuckers gebunden sind, als aliphatische Ringprotonen bezeichnet, die Protonen der CH<sub>3</sub>-Gruppe des Acetylrestes als Acetylprotonen.

Im Alginat des PA SG81 findet man Bereiche, in denen mehrere Mannuronateinheiten zu sogenannten M-Blöcken verknüpft sind. Diese Blöcke werden durch Bereiche getrennt, in denen die Verteilung der Monomere statistisch ist. Bereiche, in denen mehrere Guluronateinheiten hintereinander vorliegen (G-Blöcke) treten im Alginat des PA SG81 nicht auf (Christensen und Characklis, 1989; Schürks, 2000). Dies hat insbesondere im Hinblick auf die Gelbildung durch  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe weitreichende Konsequenzen, da nach dem „Egg-Box“-Modell für die Gelierung der Alginat G-Blöcke erforderlich sind (siehe Abschnitt „Calciumalginat“, Seite 23).

Mit Ausnahme der Agarose sind alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Polysaccharide Alginat (Manugel DJX, Manucol LHF / LB, Alginat des *Pseudomonas aeruginosa* SG81).

#### 2.3.2.1 Homopolymere Bereiche

Obwohl in dieser Arbeit keine Homopolysaccharide zum Einsatz kommen, soll hier kurz auf die Struktur dieser Polymere eingegangen werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da in den untersuchten statistischen Polysacchariden (Manugel DJX, Manucol LHF / LB, Alginat des *Pseudomonas aeruginosa* SG81), wie schon erwähnt, homopolymere Bereiche vorkommen, die sich strukturell analog zu den „reinen“ Homopolysacchariden verhalten.

Die Primärstrukturen einiger Homopolysaccharide sind in der folgenden Abbildung 2-7 dargestellt.

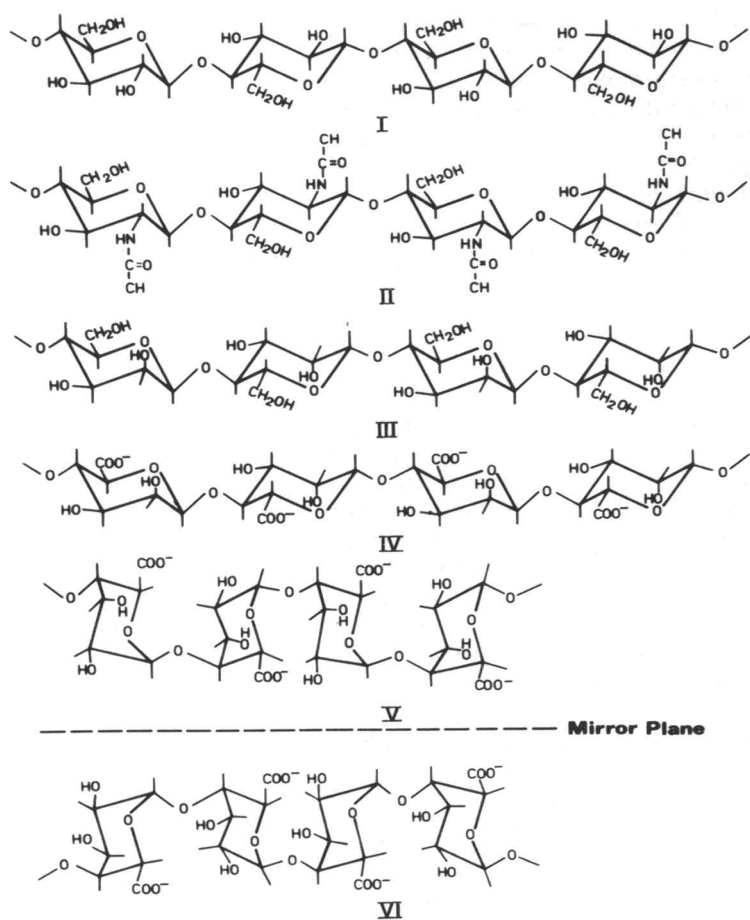


Abb. 2-7: Vergleich der Primärstruktur einiger Homopolysaccharide; I) Cellulose, II) Chitin, III) Mannan, IV) Poly(D-Mannuronat), V) Poly(L-Guluronat), VI) Poly (D-Galacturonat) (Aspinall, 1982)

Die hier behandelten Polymere bilden lange, in sich verdrillte Ketten (Aspinall, 1982). Die Anzahl der Monomere pro helicaler Umdrehung liegt zwischen zwei und vier, wobei die Ausdehnung der Monomere parallel zur Kettenachse fast exakt der maximalen Monomerausdehnung entspricht (siehe Abb. 2-8). Diese Ausrichtung stellt den wesentlichen Unterschied zu den helicalen Ketten dar (Aspinall, 1982).

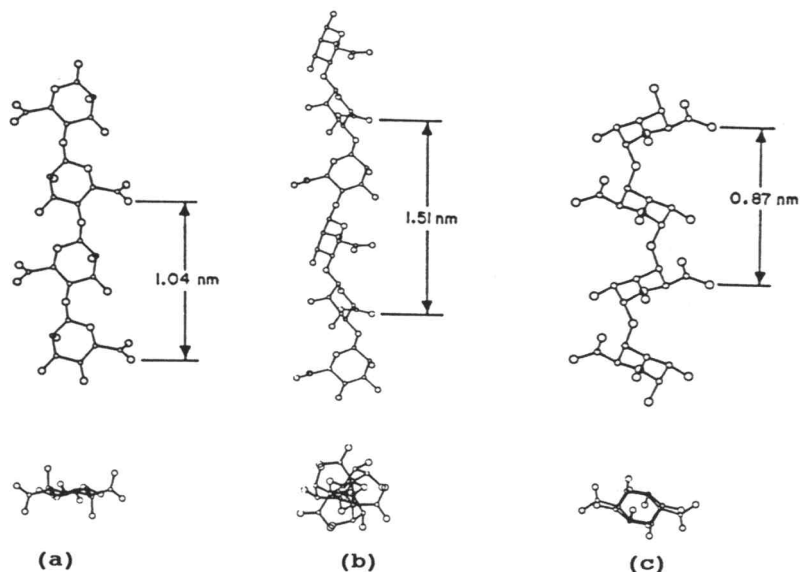


Abb. 2-8: Helicale Strukturen senkrecht (oben) und parallel (unten) zur Helixachse: a) Polymannuronsäure, b) Natrium-Polymannuronat, c) Polyguluronsäure (Yalpani, 1988)

### 2.3.2.2 Calciumalginate

Eine wichtige Eigenschaft zweier Homopolysaccharide ist das ausgezeichnete Bindungsvermögen für Kationen. Es handelt sich hierbei um Poly( $\alpha$ -L-Guluronat) sowie um dessen Spiegelbild Poly( $\alpha$ -D-Galactopyranosylat). Ersteres kommt in Verbindung mit Poly( $\beta$ -D-Mannuronat) in Alginaten, den Polysacchariden der marinen Braunalge (Phaeopyceae), vor. In diesen Alginaten findet man fast immer homopolymere Bereiche von Mannuronat und Guluronat, wobei der Anteil sehr unterschiedlich sein kann (Aspinall, 1982).

Die Ursache für das hohe Calcium-Bindungsvermögen des Poly-Guluronates liegt in der Struktur der Polymerkette. Während im Fall von Poly-Mannuronat (Lithium, Kalium, Natrium und Calcium) ein ausgedehntes Band mit einer Dreifach-Symmetrie vorliegt, unterscheidet sich die Struktur des Poly-Guluronates wesentlich davon. Die glykosidischen Bindungen sind hier axial-axial angeordnet, was zu einer „gefalteten“ Kettenstruktur führt (siehe Abb. 2-8).

In Lösung führt diese Struktur zur Ausbildung von sehr stabilen Calciumkomplexen. Werden Calciumalginate in Austauschexperimenten mit einwertigen Kationen versetzt, kann man feststellen, daß ein Austausch kaum noch stattfindet, sobald eine Konzentration von einem

Calciumion auf zwei Guluronatmonomere erreicht ist. Dies läßt den Schluß zu, daß vornehmlich dimere Einheiten entstehen. Die Bindung ist kooperativ und erfordert eine Mindestanzahl an Monomeren, die in der Größenordnung von 20 Guluronatresten liegt (Moritz, 1997). Die Struktur der Calciumalginat ist sowohl im festen Zustand als auch in wäßriger Lösung identisch. Die eigentliche Bindung kann mit dem „Egg-Box“-Modell beschrieben werden (siehe Abb. 2-9).

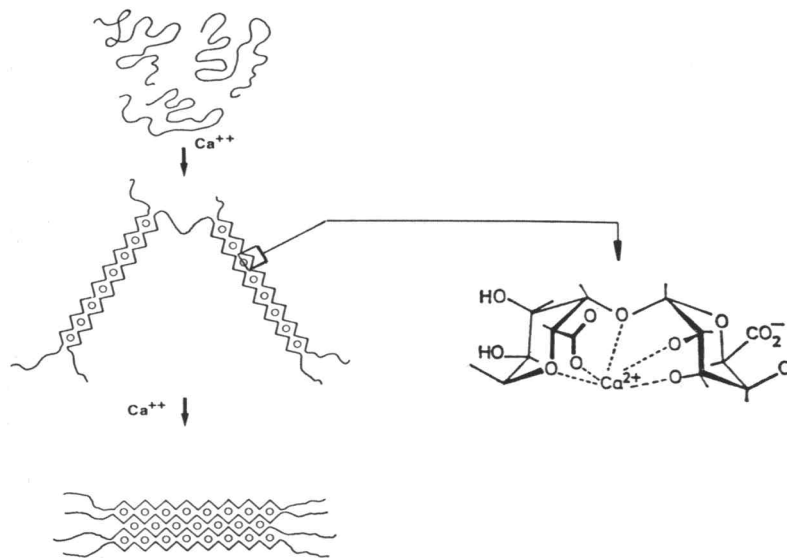


Abb. 2-9: Das „Egg-Box“-Modell für Calcium-Polyguluronate (Yalpani, 1988)

In dieser Anordnung kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Kation und dem Carboxylat-Sauerstoff und dem O-5 vom einem Monomer sowie dem glykosidischen Sauerstoff und den O-2 und O-3 des darauffolgenden Monomers (der gleichen Kette), wodurch sehr stabile Komplexe entstehen. Diese bilden dann Vernetzungspunkte, was zu einer Gelbildung führen kann (Aspinall, 1982; Christensen und Characklis, 1989; Yalpani, 1988). Die Stabilität dieser Gele wird sowohl durch die Anzahl als auch der Anordnung der G-Blöcke bestimmt (Gacesa und Russell, 1990).

### 2.3.2.3 Struktur der Alginat in wäßriger Lösung

Im Gegensatz zu den regelmäßigen Polysacchariden (Homopolysaccharide und regelmäßige Copolysaccharide) zeigen statistische copolymere Polysaccharide keine geordnete, sondern Knäuelstrukturen, die mit einem Radius von etwa 150 nm recht groß sein können (Moritz, 1997;



Hatakeyama und Hatakeyama, 1998). Der Grund für die Knäuelbildung ist in den statistischen Mischbereichen der Mannuronsäure- und Guluronsäurereste zu sehen. Eine Berechnung der Polymerstruktur mit Hilfe von Hyperchem zeigt (Strathmann, Ridgway), daß die homopolymeren Bereiche, wie oben erwähnt, eine lineare Struktur aufweisen, während diese Struktur im Mischbereich der Uronate verloren geht (siehe Abb. 2-10).

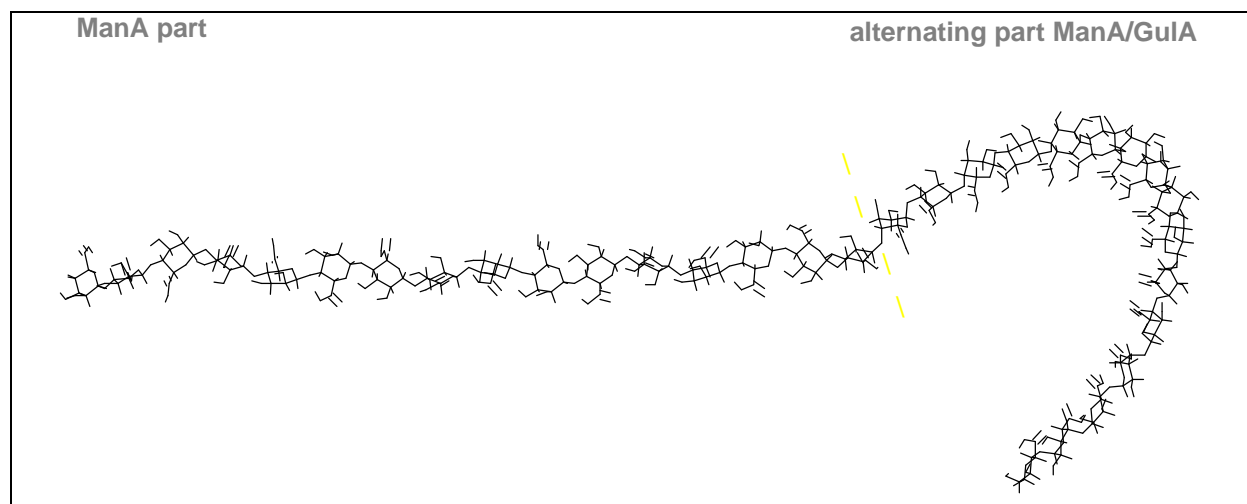


Abb. 2-10: Struktur von Homopolymannuronat (linke Seite) und dem Mischbereich von Mannuronat und Guluronat (rechter Teil); Berechnung mit Hyperchem (Strathmann, unveröffentlicht)

Zur Beschreibung von Knäuelstrukturen muß auf statistische Methoden zurückgegriffen werden. Hierbei bietet sich die „random flight“-Theorie an. Der End-zu-End-Abstand ( $L$ ) eines frei beweglichen Polymers wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$L^2 = n \cdot l^2 \quad (2-1)$$

Hierbei steht  $l$  für die Länge der einzelnen Monomere, und  $n$  gibt deren Anzahl an. Wenn eine Kette nur eine eingeschränkte Beweglichkeit hat, kann man dies dadurch berücksichtigen, daß man eine Segmentlänge  $b$  definiert, die größer als die Länge eines Monomers ist. Das Verhältnis der statistischen Segmentlänge  $b$  zur Monomerlänge  $l$  stellt dann ein Maß für die konformativen Behinderungen dar:

$$C_{\infty} = \frac{b}{l} \quad (2-2)$$

Diese Beschreibung funktioniert allerdings nur, wenn die Zahl der statistischen Segmente  $n$  einer Polymerkette mindestens zehn beträgt.

Die Werte für  $C_{\infty}$  sind abhängig von der Struktur des Polysaccharides. Bei Polysacchariden, die als ausgedehnte Bänder vorliegen, kann  $C_{\infty}$  Werte von 24 bis 358 annehmen. Typische Werte liegen bei etwa 100. Im Fall des Poly-Mannuronats wurde der Wert zu 40 - 96, für Poly-Guluronat zu 141 - 354 bestimmt (Yalpani, 1988). Diese Homopolysaccharide gelten daher als steif. Liegen die Polysaccharide als Helices mit einem Hohlraum in der Mitte vor, liegt  $C_{\infty}$  üblicherweise unter 10. Innerhalb einer Klasse beruhen die Unterschiede auf der lokalen Primärstruktur. Eine axiale glykosidische Bindung ist im allgemeinen steifer als eine äquatoriale Bindung. Sterisch anspruchsvollere Gruppen (Hydroxylgruppe oder größer) in äquatorialer Position in Nachbarschaft zur glykosidischen Bindung verringern ebenfalls die Beweglichkeit an dieser Bindung.

#### 2.3.2.4 Einfluß von Substituenten am Monosaccharidring

Substituenten am Monosaccharidring haben einen großen Einfluß auf die Konformation von Polysacchariden. Bei helixbildenden Polysacchariden wird die Ausbildung der Helix häufig mit zunehmender Substitution gestört, was zu einer abnehmenden Gelstärke führt (Aspinall, 1982). Es ist jedoch auch der gegenteilige Effekt bekannt, in dem Acetylgruppen die geordnete Struktur von Xanthan stabilisieren (Sutherland, 1994).

Eine besondere Rolle spielt im Rahmen dieser Arbeit die Acetylgruppe, die am Polysaccharid des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 häufig vertreten ist. Diese Acetylgruppen vermindern die Bildung von Calciumalginaten (Geddie, 1992). Da in Calciumalginaten die Gelstärke ausschließlich durch die Anzahl und die mittlere Länge der Mono-G-Blöcke bestimmt wird, sind die Bakterien über die Acetylierung in der Lage, die Gelstärke des produzierten Polysaccharides zu beeinflussen (Evans und Linker, 1973; Skjåk-Bræk et al., 1986; Yalpani, 1988). Dies ergibt sich daraus, daß Bakterien zunächst nur Mannuronat produzieren (Christensen und Characklis, 1989) und die Epimerisierung

des Mannuronats zum Guluronat durch die Acetylierung beeinflusst wird (Grobe, 1996). Die Bakterien können also möglicherweise das M/G-Verhältnis steuern.

Auch die Wasserbindung der Polysaccharide wird durch anionische Gruppen (Figuerora u. Silverstein, 1989) sowie Acetyl-Substituenten (Atkins et al., 1987) beeinflusst.

### 2.3.3 Agarose

Um einen möglichen Einfluß geladener Gruppen auf die „Wasserbindung“ zu untersuchen wird neben den anionischen Alginaten auch die neutrale Agarose untersucht. Diese gehört zu den regelmäßigen copolymeren Polysacchariden im A-B-Typ und stellt die wichtigste gelbildende Komponente von Agar dar. Die Polymerkette der Agarose wird aus (1,3)-verknüpfter  $\beta$ -D-Galactose und (1,4)-verknüpfter 3,6-Anhydro- $\alpha$ -L-Galactose gebildet. Je nach Herkunft können unterschiedliche Gehalte an Sulfatgruppen vorhanden sein (siehe Abb. 2-11).

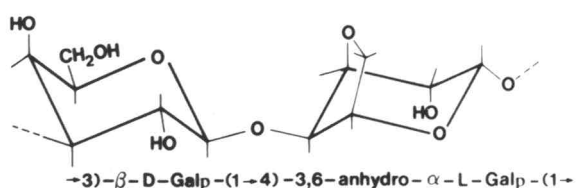
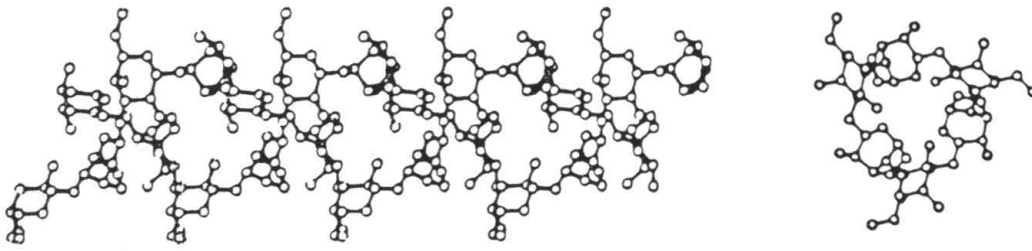


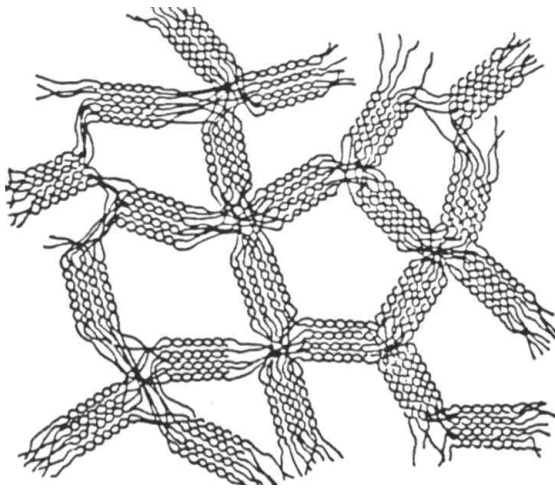
Abb. 2-11: Primärstruktur der Agarose (Aspinall, 1982)

Die Agarose liegt sowohl im Festkörper als auch im Gelzustand als Doppelhelix mit einer Dreifach-Symmetrie und einer Pitch von nur 1,9 nm vor. Die dreidimensionale Struktur von Agarose ist in Abb. 2-12 wiedergegeben.

Bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (etwa 0,1 Gew.-%) bildet die Agarose thermo-reversible Gele. Die Struktur wird im Gelzustand aus Doppelhelices gebildet, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden (Gamini, 1997). Die Aggregation dieser Doppelhelices bildet dann das dreidimensionale Netzwerk (siehe Abb. 2-13). Die Ausbildung der Helices kann allerdings durch Sulfatgruppen am Ring stark gestört werden, was zur Folge hat, daß Agarose mit einem hohen Sulfatgruppenanteil erst bei Konzentrationen im Bereich von 2 - 3 Gewichts-% ein Gel bildet.



*Abb. 2-12: Doppelhelix von Agarose; links: parallel zur Helixachse, rechts: senkrecht zur Helixachse (Yalpani, 1988)*



*Abb. 2-13: Agarose-Netzwerk im Gelzustand (Yalpani, 1988)*

## 2.4 Proteine

Proteine sind sehr wichtige Moleküle des Lebens, da sie einen wesentlichen Anteil an den verschiedensten biologischen Prozessen haben. Sie sind in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren zu finden. Sie katalysieren fast alle biochemischen Reaktionen, transportieren und speichern Moleküle und Ionen, ermöglichen Bewegung (Muskeln und Geißeln), haben mechanische Stützfunktionen, bilden die Antikörper des Immunsystems, erzeugen und übertragen Nervenimpulse und kontrollieren Wachstum sowie Differenzierung von Zellen (Roempp Online, 2000). Die genauen Strukturen der Proteine, die Polymere der 20 „natürlichen“ Aminosäuren darstellen, sind nur in wenigen Fällen bekannt. Es gibt neben der Primärstruktur (Reihenfolge der Aminosäuren) auch noch z. T. sehr komplexe dreidimensionale Strukturen (Sekundärstruktur, z. B.  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt). Die Proteine bestehen aus Polypeptidketten mit 50 bis 2000 Aminosäureresten. Da das mittlere Molekulargewicht der Aminosäuren 110 a.u. beträgt, liegt die molare Masse der Proteine zwischen 5500 und 220000 a.u. Interessant ist, daß Proteine auch bei hohen Molekulargewichten recht kleine Strukturen bilden können. Als Beispiel sei hier das Myoglobin erwähnt, dessen Struktur als erste bis auf atomare Details aufgeklärt worden ist. Es handelt sich um ein Polypeptid mit 153 Aminosäureeinheiten und einer molaren Masse von etwa 18000 a.u. Trotz der recht hohen Aminosäureanzahl und der daraus resultierenden großen Masse ist das Molekül in seinen Abmessungen sehr klein ( $4,5 \cdot 3,5 \cdot 2,5 \text{ nm}^3$ ) (Stryer, 1990). Hier läßt sich erkennen, daß der „Radius“ des Protein nur etwa 20mal größer als ein Wassermolekül ist (0,1 nm), obwohl die Masse des Proteins um den Faktor 1000 größer ist. Diese Tatsache wird bei der Diskussion des Diffusionsverhaltens noch einmal aufgegriffen.

### 2.4.1 Gelatine

Als Modell für Proteine wird in dieser Arbeit die Gelatine verwendet. Gelatine ist ein natürliches Protein, das aber zunächst aus dem direkt vorkommenden Kollagen gewonnen werden muß. Es gibt hierbei zwei unterschiedliche Verfahren, das alkalische und das saure. Bei beiden Verfahren werden zunächst die intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens gespalten und anschließend die Peptidbrücken aufgebrochen. Nach der Neutralisation erhält man in mehreren

Schritten eine kolloidale Lösung, aus der die Gelatine extrahiert wird. Da die Spaltung der Peptidbrücken unspezifisch ist, erhält man sehr viele Gelatinefraktionen, die sich unter anderem in der molaren Masse unterscheiden (Cölfen, 1993).

Die Primärstruktur der Gelatine beschreibt man ausgehend von der Kollagenstruktur. Die Aminosäurezusammensetzung ist bei beiden Proteinen identisch. Insgesamt kommen 19 Aminosäuren vor, wobei das Glycin mit einem Anteil von etwa 30 % dominiert (Cölfen, 1993).

Die Struktur der Gelatine im Gelzustand ähnelt der des Kollagens. Sie wird aus Helices gebildet, die über Haftstellenbereiche vernetzt werden. Bei weitergehender Vernetzung ist eine Stapelung dieser Bereiche möglich, was einer Vernetzung über mikrokristalline Bereiche entspricht (Cölfen, 1993).

## 2.5 „Gebundenes“ Wasser in Polymersystemen

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über den Stand der Forschung bezüglich gebundenen Wassers in Polymersystemen geben. Hierbei werden nicht nur die Polysaccharide betrachtet, sondern auch die Proteine und einige „künstliche“ Polymere, da alle diese Substanzklassen im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen.

In der Literatur sind verschiedene Definitionen von gebundenem Wasser zu finden. Es ist daher erforderlich, vor einer eingehenden Beschäftigung mit diesem Thema den Begriff „gebundenes Wasser“ klar zu definieren.

### 2.5.1 Definitionen für „gebundenes“ Wasser

Eine eindeutige Definition für den Ausdruck „gebunden“ setzt physikalische Bindungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, voraus. In den meisten Fällen wird der Begriff „gebundenes Wasser“ aber gemäß der eigenen fachlichen Ausrichtung oder der benutzten Methode (Barbieri et al., 1998) definiert. So gilt z. B. in der Klärschlammwässerung das Wasser als gebunden, wenn es sich nicht durch mechanische Verfahren aus dem Schlamm entfernen läßt (Vesilind, 1994). Diese Definition ist aus technischer Anwendung heraus nachvollziehbar, unterscheidet aber nicht zwischen der physikalischen Bindung und dem Einschluß von nicht gebundenen Wassermolekülen in Hohlräumen innerhalb der Matrix (Lee, 1996; Vesilind und Hsu, 1997).

In seinem Übersichtsartikel weist auch McBrierty (1999) auf diese Problematik hin. Es besteht z. B. die Möglichkeit, gebundenes Wasser sehr allgemein zu definieren, sodaß es in irgendeiner Weise eine Wechselwirkung mit dem vorhandenen Polymer zeigen muß.

Die Aufenthaltszeit des Wassermoleküls am Polymer kann ebenfalls betrachtet werden. Ist diese größer als eine Millisekunde, gilt das Molekül als gebunden. Auch eine eingeschränkte Beweglichkeit des Moleküls kann als Definition herangezogen werden. Gebundenes Wasser führt demnach nur noch Flip-Bewegungen um die Molekülachse durch.

In der DSC werden die unterschiedlichen Bindungstypen von Wasser nach McBrierty (1999) über die Erstarrungstemperatur definiert. Hierbei gilt Wasser als fest gebunden, wenn sein Gefrierpunkt

im Bereich von 170 - 190 K liegt, während schwach gebundenes Wasser schon bei Temperaturen zwischen 230 K und 260 K erstarrt. Hierbei können zwei unterschiedliche Typen von schwach gebundenem Wasser definiert werden (McBrierty, 1999).

Eine ähnliche Einteilung wählen auch Fringant et al. (1996) und Hatakeyama und Hatakeyama. (1998) bei ihren DSC-Messungen. Diese Autoren definieren drei Typen von Wasser. Neben dem „freien“ Wasser, das in seinen Eigenschaften nur geringfügig von reinem Wasser abweichen darf, gibt es eine Fraktion, die bei Temperaturen unterhalb von 273 K gefriert. Die dritte Art zeigt dann gar keinen Phasenübergang erster Ordnung mehr. Diese enthält Wassermoleküle, die direkte Bindungen zu den hydrophilen Gruppen der Polymere aufweisen (Hatakeyama et al., 1995, 1998).

Ein wesentliches Problem bei der Definition stellen die Eigenschaften der Meßmethode dar. Eine Methode mit einem sehr kurzen Zeitfenster detektiert physikalisch gebundene Wassermoleküle (z. B. Neutronenbeugung Bieze, 1994), während eine Methode mit längerem Zeitfenster (wie z. B. die PFG-NMR) keine physikalische Bindung, aber eine verringerte mittlere Beweglichkeit dieser Moleküle feststellt (Kriwacki et al., 1993).

Ein Studium der Literatur zeigt, daß sehr intensiv nach gebundenem Wasser geforscht wird (z. B.: Otting und Wüthrich, 1989; Yamada-Nosaka und Tanzawa, 1991; Moonen et al., 1992; Kriwacki et al., 1993; Ganapathy et al., 1994; Dötsch und Wider, 1995; Andrec et al., 1997; Lüsse et al., 1996, 1998; Rajagopal et al., 1998; Barbieri et al., 1998; Ray et al., 1998; Gomi et al., 1998; McBrierty et al., 1999). Hierbei werden die unterschiedlichsten Systeme und Meßmethoden verwendet. Die häufigsten Methoden sind die DSC und die NMR, wobei letztere wiederum verschiedene Varianten umfaßt. Es handelt sich um die Bestimmung von Relaxationszeiten, von Nuclear-Overhauser-Effekten (NOE) und die Diffusionsmessungen. Im folgenden werden die wesentlichen Aspekte kurz vorgestellt. Hierbei konzentrieren sich die Angaben auf Proteine und Polysaccharide, da diese den größten Anteil an den EPS ausmachen und diese wiederum für die Wasserbindung verantwortlich gemacht wird (Christensen, 1989).



## 2.5.2 Proteine

Zunächst soll das Augenmerk auf die Proteine gerichtet werden, da diese im allgemeinen gebundenes Wasser im hydrophoben Kern enthalten (Denisov und Halle, 1994; Dötsch und Wider, 1995). Diese Wassermoleküle zeichnen sich durch langsamere Austauschraten mit dem Wasser der Umgebung aus. Die Angaben für den Austausch schwanken jedoch erheblich. Nach Dötsch und Wider (1995) liegt die Aufenthaltsdauer der Moleküle im Inneren des Proteins im Bereich von  $10^{-9}$  s bis  $10^{-3}$  s, während Otting und Wüthrich (1989) diese Zeit in der Größenordnung von Sekunden angeben. Auch bei dem an der Proteinoberfläche gebundenen Wasser sind die Schwankungen bezüglich der Aufenthaltszeiten enorm. Sie reichen von  $10^{-11}$  bis  $10^{-10}$  s (Dötsch und Wider, 1995) über  $10^{-9}$  s (Otting und Wüthrich, 1989) bis zur Angabe von  $10^{-8}$  bis  $10^{-2}$  s (Kriwacki et al., 1993). Nach Kriwacki et al. muß es sich nicht um „permanente“ Bindungen handeln, sondern auch um Wassermoleküle, die nur für sehr kurze Zeit wirklich gebunden sind und sich anschließend frei bewegen, dabei aber die unmittelbare Umgebung des Proteins nicht verlassen können. Durch den im Vergleich zur NMR-Zeitskala ( $10^{-6}$  s) schnellen Austausch kommt es zu einer identischen chemischen Verschiebung für Wasser innerhalb und außerhalb des Proteins.

Otting und Wüthrich (1989) konnten mit Hilfe von Nuclear-Overhauser-Experimenten beweisen, daß es zwischen den Proteinen und Wassermolekülen an deren Oberfläche zu Kreuzrelaxationseffekten kommen kann. Zwischen dieser „gebundenen“ Wasserphase an der Oberfläche des Proteins und dem „freien“ Wasser findet ein schneller Austausch statt (in der Größenordnung von Nanosekunden). Dies gilt insbesondere für Wassermoleküle, die in Wechselwirkung mit Hydroxyl- oder Carboxylgruppen des Proteins stehen. Dies konnten auch Kriwacki et al. (1993) nachweisen. Sie nutzen den Magnetisierungstransfer von gebundenen Wassermolekülen auf  $^{15}\text{N}$ -Kerne in Proteinen. Es ist zu erwarten, daß der Diffusionskoeffizient von „gebundenem Wasser“ um ein bis zwei 10er-Potenzen unterhalb dem der freien Diffusion liegt. Dies ist aber nicht detektierbar, wenn ein schneller Austausch vorliegt. Kriwacki detektierte mit Hilfe des Magnetisierungstransfers gebundene Wassermoleküle mit sehr hohen Diffusionskoeffizienten, was für einen schnellen Austausch spricht.

### 2.5.3 Hydrogele

Die Lebensdauer von Wasserstoffbrückenbindungen in Hydrogelen wird im Gegensatz zu den Proteinen einheitlich als sehr kurz angegeben (McBrierty, 1999; Lüsse und Arnold, 1998; Bieze, 1994). Sie liegt in der Größenordnung von Picosekunden, was Lüsse und Arnold (1998) für Polysaccharid/Wasser-Systeme und Bieze (1994) an PEO/Wasser-Systemen gefunden haben. Der Grund für diese kurzen Lebenszeiten liegt nach McBrierty (1999) in der im Vergleich zur thermischen Energie (etwa  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bei 298 K) sehr niedrigen Bindungsenergie von Wasserstoffbrückenbindungen (in Torf etwa  $4,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Diese niedrige Energie stimmt jedoch nicht mit den von Fringant et al. (1996) und Flemming und Wingender (2000c) angegebenen Bindungsenthalpien von Wassermolekülen bei ionischen Polysacchariden überein (10 bis  $75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Diese kurzen Lebenszeiten führen bei einer Methode mit einem langen Zeitfenster (NMR) zu einem Problem. Dies konnte Bieze (1994) mit vergleichenden Messungen des Diffusionskoeffizienten von Wasser in PEO/Wasser-Systemen mit Hilfe von Neutronenbeugung und der PFG-NMR zeigen. Während die NMR nur einen Diffusionskoeffizienten in der Nähe von freier Diffusion findet, detektiert die Neutronenbeugung noch zwei weitere, deutlich verlangsamte Wasserfraktionen.

Ähnliche Beobachtungen machten Bastow et al. (1997) in PVA/Wasser-Systemen mit Hilfe der NMR und der DSC. Liegt der Wassergehalt unter 16 Gewichts-%, finden beide Methoden immobiles Wasser, während bei Wassergehalten oberhalb von etwa 30 Gewichts-% mit der NMR nur noch eine Wasserfraktion nachweisbar ist. Die DSC detektiert unter diesen Bedingungen drei Fraktionen.

Eine ähnliche Beobachtung machten auch Ray et al. (1998) bei einer PFG-NMR-Studie an Poly(N-isopropylacrylamid). Bei beiden Wassergehalten (50 Gewichts-% und 88 Gewichts-%) wird nur ein Diffusionskoeffizient gefunden, was mit einem schnellen Austausch zwischen den freien und den gebundenen Wasserfraktionen erklärt wird. Im Gegensatz dazu können im kollabierten Gel zwei Diffusionskoeffizienten in den Größenordnungen  $10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  und  $10^{-10} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  gefunden werden.

Für die Quantifizierung des „gebundenen“ Wassers ist es wichtig, die Anzahl der pro Monomer gebundenen Wassermoleküle zu kennen. Lüsse und Arnold (1996) haben in der Literatur für PEG Angaben über die Anzahl der pro Monomer gebundenen Wassermoleküle zwischen einem und zwei bis vier gefunden. Bei Polysacchariden geben dieselben Autoren (1998) einen Richtwert von etwa zwei Wassermolekülen pro Monomer an.

Bei neutralen Polysacchariden (Amylose, Amylopektin und Cellulose) sind nach Fringant et al. (1996) zwei Wassermoleküle pro Monomer gebunden. Tragen die Polysaccharide jedoch geladene Gruppen, so nimmt die Wasserbindung zu. Die Anzahl der pro Monomer gebundenen Wassermoleküle liegt bei fünf für Glucuronat sowie neun bis zehn für Hyaluronat und Carboxymethylcellulose. Für das höhere Wasserbindungsvermögen der Polyelektrolyte sind nach Fringant die ionischen Gruppen  $-\text{COONa}$  und  $-\text{OCH}_2\text{COONa}$  verantwortlich, die jeweils vier Wassermoleküle binden können. Im Vergleich dazu bindet eine  $-\text{OH}$ -Gruppe nur ein Wassermolekül (Hatakeyama et al., 1995).

Im allgemeinen ist bei Hydrogelen jedoch zu beachten, daß es nicht immer zulässig ist, von der Anzahl der funktionellen Gruppen auf die Anzahl der gebundenen Wassermoleküle zu schließen. Dies gilt insbesondere für Polysaccharide (McBrierty, 1999).

Neben den direkten Bindungen von Wassermolekülen an den hydrophilen Gruppen der Polymere können die Wassermoleküle auch integrale Strukturbestandteile werden. Lüsse und Arnold (1996) konnten dies an PEG-Lösungen niedriger Wasserkonzentration (11 Gew.-%) mit Hilfe der NMR nachweisen (Quadrupolaufspaltung). Durch eine Verknüpfung von zwei PEG-Molekülen an der Etherfunktion ist das Wasser direkt am Aufbau von geordneten Strukturen beteiligt.

Einen weiteren Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung von Wasser und Polymermolekülen fanden Yamada-Nosaka und Tanzawa (1991) mit Hilfe der NMR (Relaxationszeiten). Sie konnten zeigen, daß Wasser, welches an die hydrophilen Gruppen des Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA) gebunden ist, stärker in seiner Bewegung gehindert ist, als das beim Polymethylmethacrylat (PMMA) der Fall ist, was auf die Immobilität der PHEMA-Moleküle zurückgeführt wird.

Insbesondere in Fällen, in denen das Wasser fest in die Struktur eingebaut ist, kann es bei Untersuchungen von Polymer/Wasser-Systemen mit Hilfe der NMR dazu kommen, daß ein Teil

des im System vorhandenen Wassers nicht gefunden wird (Lüsse und Arnold, 1996; Yamada-Nosaka und Tanzawa 1991), wenn es eine extrem geringe Beweglichkeit aufweist und somit durch Linienverbreiterung nicht mehr detektierbar ist (siehe Abschnitt „Dipolare Kopplung“, Seite 52).

#### 2.5.4 Alternative Modelle zur Wasserbindung

In diesem Abschnitt werden Publikationen vorgestellt, in denen die Phänomene, die als Beweis für die Existenz von gebundenen Wasser herangezogen werden, ohne Wasserbindungen erklärt werden.

Wiggins (1990) zitiert viele Studien, aus denen folgt, daß das einfache Modell „freies“ Wasser / „gebundenes“ Wasser in vielen Fällen nicht ausreicht. So ist zum Beispiel die Löslichkeit einiger Stoffe in der Nähe von Proteinen völlig anders als im „freien“ Wasser. Dies deutet unter Berücksichtigung der experimentellen Methoden auf Schichten größerer Dicke hin. Wiggins gibt diese Schichtdicke, in der die Lösungsmittleigenschaften des Wassers deutlich unterschiedlich vom „freien“ Wasser sind, mit etwa 2 - 3 nm an.

Für die Betrachtung von Polyanionen in Wasser stellt Wiggins drei Modelle vor (siehe Abbildung 2-14).

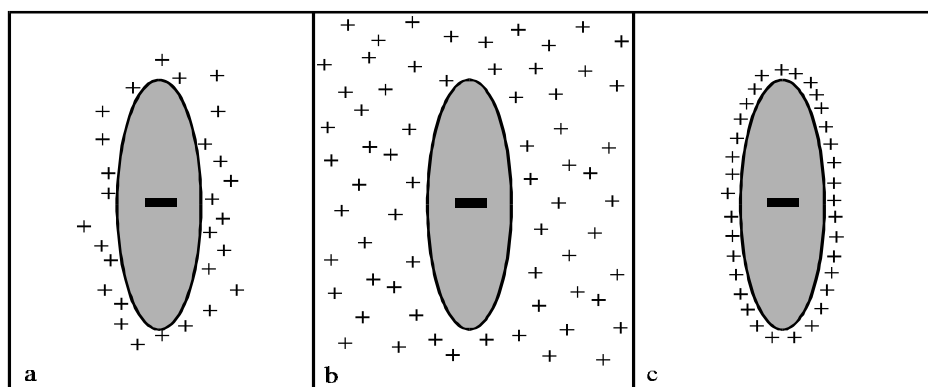


Abb. 2-14: Drei mögliche Polyelektrolyt-Konfigurationen nach Wiggins (1990); Das Polymer wird vereinfacht als graues Oval dargestellt

Nach Wiggins ist die Konfiguration (a) die wahrscheinlichste, obwohl diese im Widerspruch zu den osmotischen Gesetzen steht, da hier in einem System Wasser mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kationen existiert. Nach dem gängigen Bild liegt in einem solchen Fall kein Gleichgewicht vor, und das System ist bemüht, dieses herzustellen. Eine Möglichkeit hierfür ist die in Bild (b) gezeigte Konfiguration. Die hierbei erzeugte Ladungstrennung erfordert aber so große Energiemengen, daß diese Konfiguration aus energetischen Gründen ausgeschlossen werden kann. Als letzte Alternative bleibt die Konfiguration (c), in der alle Kationen an den entsprechenden Ladungen des Polyanions gebunden sind. Diese Konfiguration stellt aber ein sehr geordnetes System dar und ist daher aus entropischer Sicht unwahrscheinlich. Da sich das gesamte System energetisch im Minimum befinden muß, können die Konfiguration (b) und (c) ausgeschlossen werden. Die Konfiguration (a) stellt den besten Kompromiß dar. Eine experimentelle Bestätigung, daß sich einige Kationen vom Polyanion entfernen können, liefern Bedzyk et al. (1990). Sie fanden, daß die Grenzschicht eine Dicke von etwa 6 nm hat.

Das Problem der Konfiguration (a) ist die Gleichgewichtsbedingung für das Wasser. Das chemische Potential des Wassers hängt von seiner Aktivität, der Temperatur, dem Druck und dem molaren Volumen ab. Wenn nun die ersten drei Größen im System festgelegt sind, bleibt als einzige Variable das molare Volumen. Wenn sich dieses ändert, resultiert daraus zwangsläufig eine Dichteänderung des Wassers. Das Wasser, welches weiter von der Oberfläche des Polyelektrolyten entfernt ist, enthält weniger Kationen und hat daher ein höheres chemisches Potential als das an der Oberfläche. Um diesen Unterschied auszugleichen, verringert das „freie“ Wasser sein chemisches Potential durch Ausdehnung, während das Wasser an der Oberfläche der Polyanionen komprimiert wird. Dies führt zu unterschiedlichen Dichten der Wasserfraktionen.

Da in Lösungen aufgrund experimenteller Problemen immer nur Mittelwerte gemessen werden, schlägt Wiggins die Betrachtung von Gelen vor, um die Theorie zu überprüfen.

Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, warum sehr geringe Mengen an Polymeren (z. B. 0,1 Gew.-% bei Agarose) ein Gel bilden, aus dem das Wasser nicht einfach herausläuft. Diese Frage ist berechtigt, da die Freiräume zwischen den Polymeren so groß sind, daß sie die Beweglichkeit des Wassers kaum beeinträchtigen. Die Antwort zu diesem Problem liegt in dem Bestre-

ben von mischbaren Systemen sich so weit wie möglich zu vermischen (Wiggins, 1990; Keiding, 2001). In einem Gel sind die Polymere aufgrund ihrer Vernetzung selber nicht in der Lage, sich entsprechend zu bewegen, was dazu führt, daß Wasser bis zu einem gewissen Grad in das (trockene) Polymer eindringt (Quellung). Die bei diesem Mischungsprozeß freigesetzte Energie ist der Grund für das große Wasserbindungsvermögen von Hydrogelen.

Im Polyelektrolyt-Gel besteht natürlich das gleiche Problem wie bei einer entsprechenden Lösung. Die Kationen bleiben in der unmittelbaren Umgebung der Polyanionen, und das chemische Potential des Wassers ist daher unterschiedlich, wenn es nicht zu einer Änderung der Dichte des Wassers kommt. In der Mitte der Hohlräume innerhalb eines Gels ist eine niedrigere Dichte als an der Polyelektrolytoberfläche zu erwarten. Diesen Dichteunterschied hat Wiggins am Beispiel eines PEG-20000 Gels nachweisen können. Die Dichte war hier mit einem relativen Wert von nur 0,96 niedriger als in reinem Wasser unter gleichen Bedingungen (1,00). Diese Dichteunterschiede sind letztlich auch für die unterschiedlichen Lösungsmitelegenschaften der beiden „Wasserphasen“ verantwortlich.

Es bleibt anzumerken, daß laut Wiggins die Theorie der Dichteänderung von Wasser nicht allgemein akzeptiert wird.

Belton (1997) diskutiert in seiner Publikation alle gängigen „Beweise“ für die Existenz von gebundenem Wasser. Zunächst stellt er dazu ein Modell mit drei verschiedenen Wasserfraktionen in einem Polysaccharidgel auf. Die erste und häufigste Fraktion stellt das Wasser dar, welches sich wie reines Wasser verhält. Die beiden anderen Fraktionen stehen mehr oder weniger stark im Kontakt mit den Polysacchariden. Eine davon zeichnet sich durch eine Anisotropie der Rotation aus, während die dritte Wasserfraktion eingeschlossenes Wasser darstellt, was bei Proteinen bereits detektiert werden konnte (siehe dort). In Polysacchariden gibt es hierbei zwei Möglichkeiten. Das Wasser kann entweder innerhalb einer Helix eingebettet oder im Bereich mehrerer Helices eingeschlossen sein. Für die letztgenannte Möglichkeit werden jedoch Diffusionskoeffizienten im Bereich von freier Diffusion gefunden, was darauf hindeutet, daß diese Hinderung nicht sehr stark sein kann. In Polysaccharidgelen kann also nur das Wasser stärker vom Polymer beeinflusst werden, das sich innerhalb der Sekundärstruktur befindet.

Unter diesem Aspekt stellt sich allerdings erneut die Frage, wie solche Gele überhaupt in der Lage sind, so große Mengen an Wasser zu „binden“. Bei seiner Erklärung für diese Beobachtung wählt Belton einen anderen Weg als Wiggins. Er betrachtet das Gel dabei als porösen Festkörper. Wasser, das sich innerhalb der Hohlräume eines solchen Festkörpers aufhält, wird auf zwei Arten beeinflusst. Zunächst wird die Aktivität des Wassers verringert. Weiterhin treten Kapillareffekte auf, die je nach Porengröße sehr stark werden können. Wie stark der Kapillareffekt ist, kann man an folgenden Werten abschätzen. Eine Kapillare mit einem Radius von  $10\mu\text{m}$  kann eine Wassersäule von 1,5 m halten. Die Aktivität des Wassers wird bei dieser Größe jedoch kaum beeinflusst ( $a = 0,9999$ ). Sind Kapillaren mit einem Radius von  $0,01\mu\text{m}$  vorhanden, nimmt die Aktivität auf etwa 0,90 ab, und die Kapillare kann eine Wassersäule von 1500 m halten (Belton, 1997).

Die Abnahme der Wasseraktivität hat nach Belton eine wichtige Konsequenz für das Phänomen des Wassers, das bei  $-30\text{ °C}$  noch flüssig ist (siehe DSC-Studien). Das Auftreten solcher Wasserfraktionen wird, wie in einem vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, als Beweis für die Existenz von gebundenem Wasser angesehen. Es gibt aber auch eine alternative Erklärung für das Auftreten solcher stark unterkühlten Wasserphasen (Belton, 1997; Keiding et al., 2001):

Beim Abkühlen eines Systems mit einem eutektischen Punkt aus Wasser und einem Polysaccharid kristallisiert zunächst reines Wasser, während sich die Konzentration des Polysaccharides in der flüssigen Phase anreichert. Am eutektischen Punkt kann das Polysaccharid jedoch nicht auskristallisieren, da es durch die Verknüpfungen zum Netzwerk daran gehindert wird. Ein weiteres Abkühlen resultiert in einer Dampfdruckabnahme des Eises. Das relative Verhältnis zwischen dem Dampfdruck von Eis und unterkühltem Wasser nimmt im Temperaturbereich von  $0\text{ °C}$  bis  $-30\text{ °C}$  von 1,0 auf 0,8 ab. Wenn also bei  $-30\text{ °C}$  noch flüssiges Wasser auftreten soll, muß dessen relativer Dampfdruck auf 0,8 oder kleinere Werte abgesunken sein. Fringant et al. (1996) konnten für verschiedene Polysaccharid/Wasser-Systeme zeigen, daß die Wasseraktivität bei Konzentrationen im Bereich von 0,2 bis 0,6 g Wasser pro Gramm Polymer unterhalb von 0,8 liegt. Dadurch wird der Dampfdruck des unterkühlten Wassers gleich groß wie der vom Eis und es bilden sich auch bei dieser niedrigen Temperatur zwei koexistierende Phasen von flüssigem Wasser und Eis.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Grundlagen der Diffusion

Bei der Diffusion unterscheidet man zwei verschiedene Arten. Die Transportdiffusion tritt auf, wenn es innerhalb eines Systems Konzentrationsgradienten (genauer: Gradienten im chemischen Potential) gibt. Dieser Gradient wird durch einen Stofftransport ausgeglichen.

Die Selbstdiffusion, die durch die Brownsche Teilchenbewegung entsteht, tritt im Gegensatz dazu auch in reinen Komponenten und anderen Systemen ohne Konzentrationsgradienten auf.

Da Diffusion in allen Lehrbüchern der Physikalischen Chemie ausführlich behandelt wird, soll dieses Thema an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden. Die Bedeutung der Diffusion für biologische Prozesse wird unter anderem von Koch (1990) behandelt.

Zwei für diese Arbeit wichtige Gleichungen werden jedoch kurz vorgestellt:

Eine wichtige Beziehung stellt der Zusammenhang zwischen der mittleren quadratischen Wegstrecke  $\langle r^2 \rangle$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D$  sowie der Zeit  $\Delta$ , während der die Diffusion stattfindet bzw. beobachtet wird, dar (Atkins, 1990):

$$\langle r^2 \rangle = 6D\Delta \quad (3-1)$$

Der Diffusionskoeffizient kann auch in Abhängigkeit von der Viskosität  $\eta$  des Mediums und dem hydrodynamischen Radius  $r_h$  des diffundierenden Moleküls berechnet werden. Diese Gleichung wird als Stokes-Einstein-Gleichung bezeichnet (Atkins, 1990):

$$D = \frac{RT}{6\pi r_h \eta} \quad (3-2)$$



## 3.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (engl.: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) stellt ein etabliertes Verfahren zur Aufklärung von Molekülstrukturen und dynamischen Prozessen dar. Die Funktionsweise der Puls-NMR wird daher in der Literatur ausführlich behandelt (Friebolin, 1999; Günther, 1992) und an dieser Stelle somit nicht komplett erläutert. Nur die in dieser Arbeit wesentliche Pulsed Field Gradient-NMR (PFG-NMR) wird in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

## 3.3 Pulsed Field Gradient (PFG)-NMR-Spektroskopie

### 3.3.1 Pulsprogramme

Es gibt zur Zeit eine sehr große Anzahl an verschiedenen, zum Teil sehr komplizierten, Pulssequenzen für PFG-NMR (z. B. Otting, 1997). Das Grundprinzip basiert aber in allen Fällen auf den beiden ältesten Pulsprogrammen der PFG-NMR, nämlich den Spin-Echo-Pulsfolgen *Hahn-Spin-Echo (HE)* und *Stimulated-Echo (STE)*. Diese Pulssequenzen werden so abgewandelt, daß durch zusätzliche Magnetfeldgradienten  $g$  eine Ortskodierung erfolgt. Diese Gradienten werden während zweier kurzer Zeitintervalle  $\delta$  durch ein inhomogenes ortsabhängiges Magnetfeld ( $g \cdot z$ ) bei dem zur Verfügung stehenden Spektrometer in  $z$ -Richtung erzeugt. Die Positionen der beiden Feldgradientenpulse innerhalb der Pulssequenzen sind in den Abbildungen 3-1 und 3-2 grau unterlegt dargestellt.

Die benötigte Ortskodierung wird erzeugt, indem man die Magnetfeldabhängigkeit der Präzessionsfrequenzen des transversalen Magnetisierungsvektors  $M \perp (z)$  ausnutzt. Da beim Einsatz von Feldgradienten kein homogenes Magnetfeld mehr existiert, wird die Larmor-Frequenz der Spins ortsabhängig.

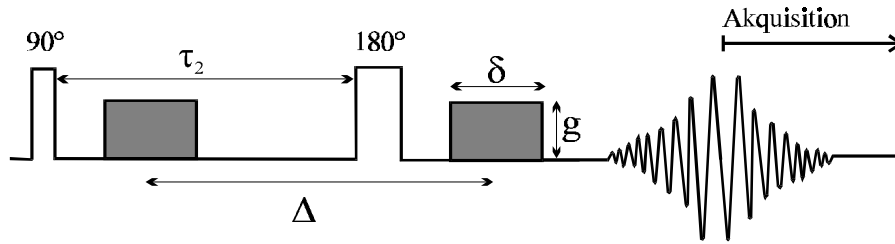


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Pulssequenz des Hahn-Spin-Echo-Experiments (PFG-HE)

In der Abbildung 3-2 ist das in dieser Arbeit ausschließlich genutzte PFG-Experiment mit einer Stimulated-Echo-Pulssequenz dargestellt. Diese Sequenz ist dann von Vorteil, wenn lange Diffusionszeiten  $\Delta$  bestimmt werden sollen. Da beim Hahn-Echo-Experiment während der gesamten Diffusionszeit  $T_2$ -Relaxation auftritt, ist die obere Grenze für die Diffusionszeit sehr kurz ( $\Delta_{\max} \approx T_2$ ). In diesen Fällen hilft die PFG-STE-Technik weiter, da nur während eines sehr kleinen Anteils  $\tau_2$  der Diffusionszeit  $T_2$ -Relaxation auftritt und in der restlichen Zeit  $\tau_1$  nur die  $T_1$ -Relaxation eine Rolle spielt ( $\Delta_{\max} \approx T_1$ ). Da diese meistens deutlich langsamer abläuft als die Spin-Spin-Relaxation ( $T_2 \approx \text{ms}$ ;  $T_1 \approx \text{s}$ ), kann die obere Grenze der Diffusionszeit deutlich ausgedehnt werden.

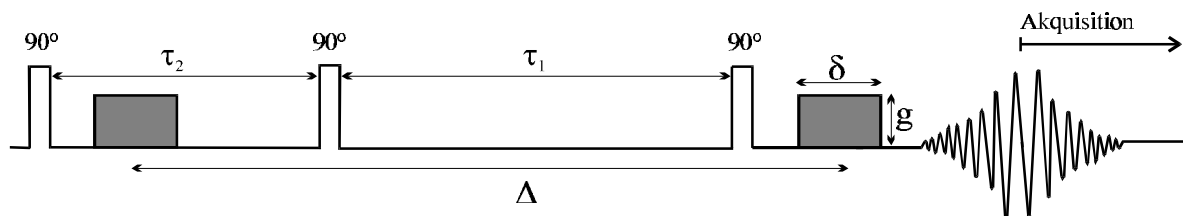


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Pulssequenz des Stimulated-Echo-Experiments (PFG-STE)

### 3.3.2 Funktionsweise der PFG-NMR

In diesem Unterkapitel wird die Funktionsweise der PFG-NMR auf eine anschauliche Weise erklärt, die trotzdem sehr nah an der mathematischen Betrachtung bleibt. Im folgenden Unterkapitel wird dann die mathematische Herleitung der Auswertgleichung vorgestellt.

Vor der Erläuterung der Funktionsweise wird mit Hilfe der Abbildung 3-3 ein wesentlicher Aspekt der hier durchgeführten eindimensionalen PFG-NMR erläutert. In der Abbildung ist die Brownsche Molekularbewegung eines Moleküls in zwei Dimensionen dargestellt. Die PFG-NMR markiert den Ausgangs- und den Endpunkt dieser Bewegung und ermittelt so die während der Beobachtungszeit  $\Delta$  zurückgelegte Wegstrecke. Wenn eindimensionale PFG-NMR betrieben wird, ist nur die Komponente der Bewegung interessant, die parallel zur Gradientenrichtung stattfindet (in der Abbildung ist dies die Strecke  $\Delta z$ ). Bei der folgenden detaillierten Beschreibung der PFG-NMR kann daher auf eine eindimensionale Darstellung zurückgegriffen werden. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, daß die Gradientenpfeile in den Abbildungen 3-3 bis 3-5 physikalisch nicht korrekt eingezeichnet sind. Sie stellen einen Beitrag zum Gesamtmagnetfeld dar ( $\Delta B_0$ ), der parallel zur z-Achse wirkt, was sich in einer zweidimensionalen Darstellung allerdings nicht übersichtlich einzeichnen läßt. Die gewählte Darstellungsform erleichtert das Verständnis für die Wirkungsweise der PFG-NMR, so daß diese Ungenauigkeit gerechtfertigt ist.

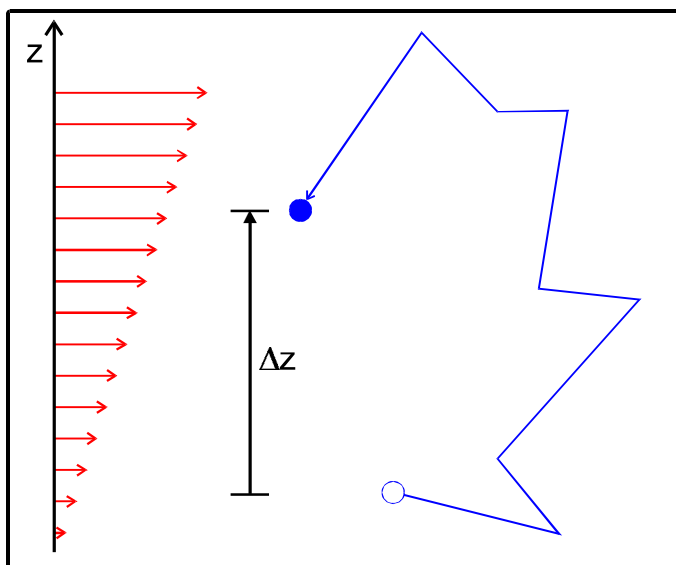


Abb. 3-3: Schematische Darstellung von Bewegung und Gradienten (rote Pfeile)

Im nächsten Abschnitt wird die PFG-NMR an einem einfachen Beispiel erklärt. Hierzu werden zwei Spins (in dieser Arbeit handelt es sich dabei ausschließlich um Protonen) betrachtet, von denen einer (schwarz markiert) ortsfest ist, während sich der andere (blaue Farbe) im Verlauf des Experimentes bewegt. Um die Beschreibung zu vereinfachen, wird nur das PFG-STE-Experiment betrachtet.

Die beiden Spins haben je einen Zeiger, der mit dem ersten RF-Puls ( $90^\circ$ ) auf den Startwert 0 gesetzt wird (siehe Abb. 3-4). Nachdem nun die Spins „vorbereitet“ sind, beginnt mit dem ersten Gradientpuls die eigentliche Bewegungsmessung. Die Wirkung des Gradienten kann man sich dabei so vorstellen, daß durch den Gradienten eine Kraft ausgeübt wird, die die Zeiger der Spins ver- stellt. Da die Gradienten ortsabhängig sind, wirkt im betrachteten Fall auf beide Spins (schwarz und blau) die gleiche Kraft (siehe Abb. 3-4).

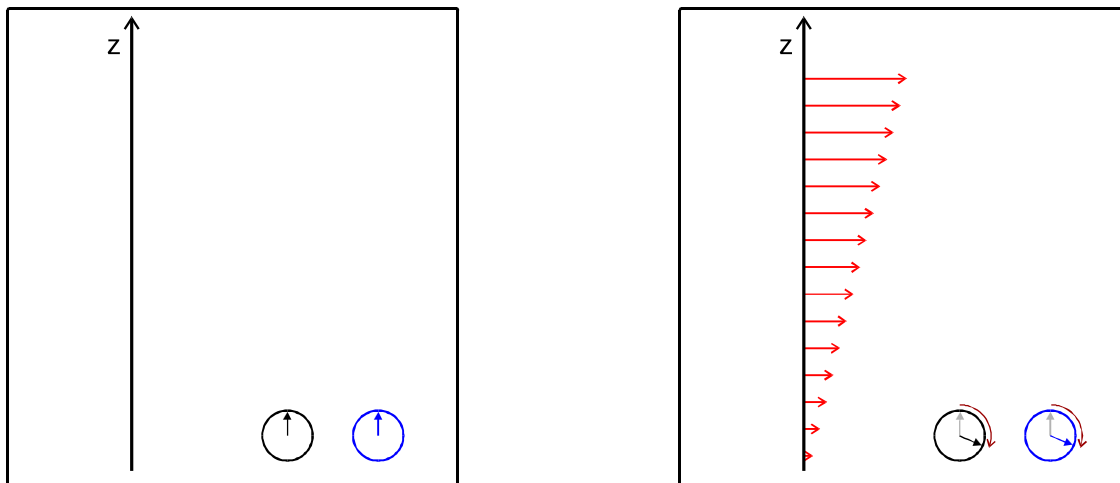


Abb. 3-4: Schematische Darstellung des PFG-Experimentes; links: Wirkung des ersten RF-Pulses; rechts: Einfluß des ersten Gradientenpulses (rote Pfeile) auf die Spins

Bei der anschließenden Bewegung eines Spins bleibt seine Zeigerposition unverändert, da während dieser Zeit keine Gradienten wirken (siehe Abb. 3-5). Die zwei weiteren RF-Pulse drehen anschaulich betrachtet die Wirkung der Gradienten um. Dadurch wirkt die vom zweiten Gradientenpuls ausgeübte Kraft genau in die andere Richtung. Im Fall des ortsfesten (schwarzen) Spins ist die Kraft vom Betrag her exakt gleich groß und der Zeiger wird wieder auf den Startwert zurückgedreht. Durch seine Bewegung erfährt der blau dargestellte Spin nun eine vom Betrag her größere Kraft als beim ersten Gradientenpuls. Sein Zeiger wird daher über den Startwert hinaus gedreht (siehe Abb. 3-5).

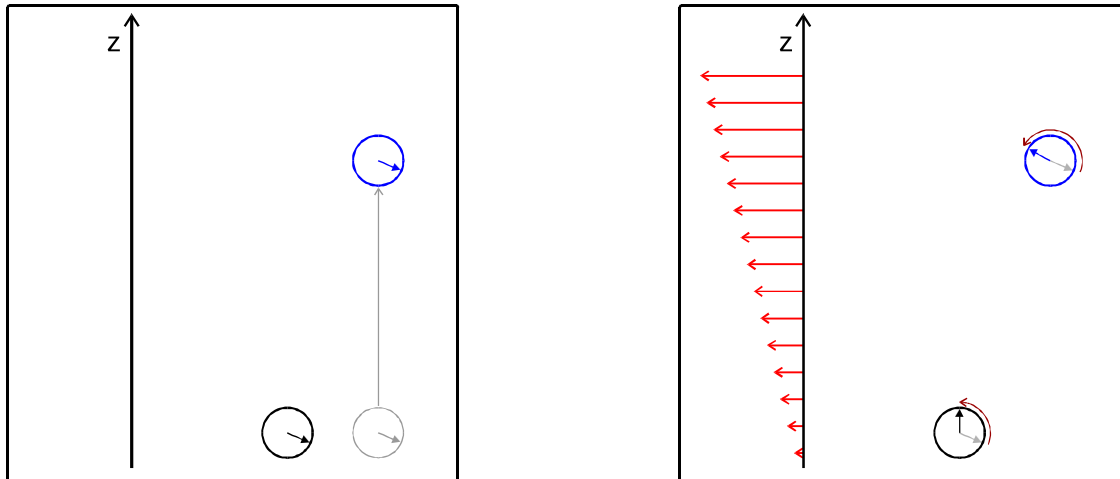


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des PFG-Experimentes; links: eine Bewegung ändert nichts an der Zeigerposition; rechts: Einfluß des zweiten Gradientpulses (rote Pfeile) auf die Spins

Bei der Akquisition wird nun die Zeigerposition überprüft (siehe Abb. 3-6). Im Fall des Spins, der seine Position verändert hat, kommt es durch die beiden Gradientpulse zu einem Winkel  $\phi$  zwischen der Zeigerposition am Anfang und am Ende der Messung.

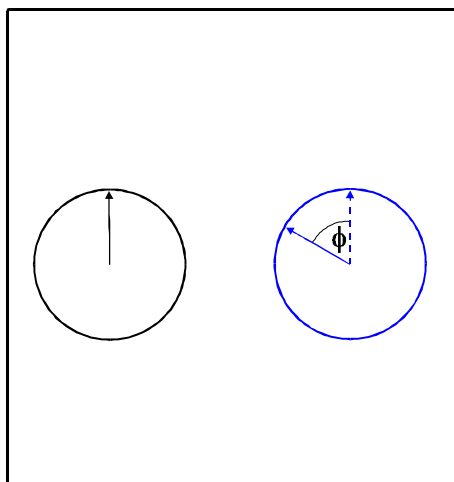


Abb. 3-6: Schematische Darstellung des PFG-Experimentes; Die Akquisition

Da die detektierte Signalintensität mit zunehmenden Winkel kleiner wird, kann aus der Abnahme des NMR-Signals die in der Zeit zwischen den beiden Gradientpulsen zurückgelegte Wegstrecke bestimmt werden. Dies ist deshalb möglich, weil der Winkel  $\phi$  proportional zur zurückgelegten Wegstrecke ist:

$$f(\Delta z) = \mathbf{g} \cdot \mathbf{d} \cdot g \cdot \Delta z \quad (3-3)$$

Mit diesem Modell und der Gleichung 3-3 können auch die Einflüsse der NMR-Parameter  $\delta$  und  $g$  erklärt werden. Die Gradientenpulslänge  $\delta$  gibt an, wie lange die Kraft wirkt, während das Feld  $g \cdot z$  ein Maß für den Betrag der Kraft ist, die zum Drehen des Zeigers vorhanden ist. Beide Größen haben einen Einfluß auf die Drehung des Zeigers.

Ein weiterer NMR-Parameter kann indirekt aus der obigen Gleichung entnommen werden, da die zurückgelegte Wegstrecke im Fall von freier Diffusion gemäß  $\langle \Delta z^2 \rangle = 6D\Delta$  von der Diffusionszeit  $\Delta$  abhängt.

Da es für die Messung erforderlich ist, daß die Signalabnahme (entspricht dem Winkel  $\phi$  im Modell) nicht zu schwach, aber auch nicht zu stark ist, müssen die NMR-Parameter entsprechend angepaßt werden. Aus dem Modell und der Gleichung 3-3 wird sofort offensichtlich, daß bei langsamerer Diffusion mit größeren Diffusionszeiten, längeren Gradientenpulsen oder stärkeren Gradienten gearbeitet werden muß. Für alle drei Größen gibt es natürliche oder experimentelle Obergrenzen, so daß keine beliebig kleine Bewegungen detektiert werden können.

### 3.3.3 Mathematische Herleitung der Auswertgleichung

Um die Herleitung der Gleichung zu vereinfachen, wird nur die in der Praxis vorliegende, eindimensionale Lösung betrachtet. Hierbei wird der Feldgradient in  $z$ -Richtung erzeugt.

Unter der Voraussetzung, daß die Wahrscheinlichkeit für eine Bewegung der Spins keine bevorzugte Richtung hat (freie Selbstdiffusion), kann man die Anzahl der Spins, die nach einer Zeit  $t$  ihre Position bezüglich der  $z$ -Achse um  $\Delta z$  verändert haben, durch folgende Gleichung ausdrücken, wobei  $N_0$  die Gesamtzahl der Spins und  $D$  den Selbstdiffusionskoeffizienten darstellt:

$$N(t, \Delta z) = \frac{N_0}{\sqrt{4pDt}} e^{-\frac{\Delta z^2}{4Dt}} \quad (3-4)$$

Die Feldgradientenpulse erzeugen für die transversale Magnetisierung der Spins in Abhängigkeit von der Strecke  $\Delta z$  einen Phasensprung, der sich wie folgt berechnen läßt:

$$f(\Delta z) = \mathbf{g} \cdot \mathbf{d} \cdot g \cdot \Delta z \quad (3-5)$$

Diese Phasendifferenz hat einen Einfluß auf die Intensität des Echosignals, den man wie folgt beschreiben kann:

$$E(t, \Delta z) = N(t, \Delta z) \cdot \cos(\mathbf{g} \cdot \mathbf{d} \cdot g \cdot \Delta z) \quad (3-6)$$

Die Anzahl der Spins  $N(t, \Delta z)$  ist aus Gleichung 3-4 bekannt und kann somit in den obigen Ausdruck eingesetzt werden. Um das gesamte Echosignal zu bestimmen, muß die resultierende Gleichung nur noch über alle möglichen Werte von  $\Delta z$  integriert werden:

$$E(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \left( \frac{N_0}{\sqrt{4pDt}} \cdot e^{-\frac{\Delta z^2}{4Dt}} \cdot \cos(\mathbf{g} \cdot \mathbf{d} \cdot g \cdot \Delta z) \right) d(\Delta z) \quad (3-7)$$

Die Lösung des obigen Integrals lautet:

$$E(t) = c \cdot N_0 \cdot e^{-g^2 d^2 g^2 Dt} \quad (3-8)$$

Bei der Größe  $c$  handelt es sich um eine Gerätekonstante. Die Gleichung 3-8 gilt jedoch nur, wenn die Diffusionszeit  $t$  sehr viel größer ist als die Gradientenpulslänge  $\delta$ . Ist dies nicht der Fall, muß die obige Gleichung wie folgt modifiziert werden:

$$E(g) = c \cdot N_0 \cdot e^{-g^2 d^2 g^2 D(t - \frac{1}{3}d)} \quad (3-9)$$

Mit

$$E(0) = c \cdot N_0 \quad (3-10)$$

erhält man:

$$\frac{E(g)}{E(0)} = e^{-g^2 d^2 g^2 D (\Delta - \frac{1}{3}d)} \quad (3-11)$$

Die Gleichung 3-11 wird hierbei schon in der für die PFG-NMR üblichen Schreibweise wiedergegeben. Die Diffusionszeit  $t$  wird durch das Symbol  $\Delta$  dargestellt. Während der Herleitung wird auf die Verwendung von  $\Delta$  verzichtet, da es sonst leicht zu Verwechslungen mit dem Ausdruck  $\Delta z$  kommen könnte.  $E(0)$  entspricht dem Echosignal, daß die  $N_0$  Spins ohne Feldgradientenpulse erzeugen.

Mit Hilfe dieser Gleichung kann der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Hierzu wird die Abhängigkeit des Echosignals vom Gradienten genutzt. Trägt man den natürlichen Logarithmus des Quotienten  $E(g)/E(0)$  gegen  $g^2$  auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung zu  $D$  proportional ist (siehe Abb. 3-7).

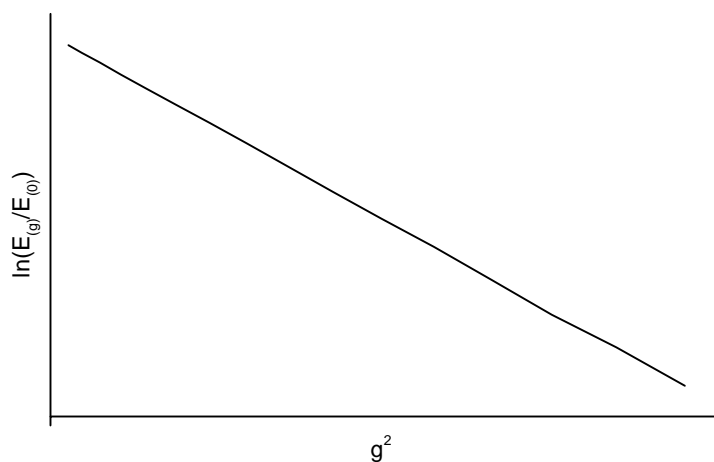


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Echointensität  $E(g)$  vom Gradienten  $g$ .



### 3.3.4 Zeitabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten

Liegt in einem System freie Selbstdiffusion vor, ist der nach Gl. 3-11 bestimmte Diffusionskoeffizient unabhängig von der gewählten Diffusionszeit. Tritt in einem Experiment eine Zeitabhängigkeit auf, so handelt es sich demnach nicht mehr um freie Selbstdiffusion. Zwei Möglichkeiten für eine Abweichung von diesem Verhalten sollen hier näher erläutert werden. Zunächst wird dabei die gehinderte Diffusion betrachtet und im Anschluß daran die Kreuzrelaxation.

#### 3.3.4.1 Gehinderte Diffusion

Sobald die Diffusion in einem System durch Hindernisse wie z. B. Partikel, (Zell)-Wände oder Polymere beeinflusst wird, kann man mit der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ableitung keine Selbstdiffusionskoeffizienten mehr bestimmen. Um dennoch Aussagen über die Beweglichkeit von Molekülen machen zu können, kann man entweder einen effektiven Selbstdiffusionskoeffizienten einführen oder alternativ eine dem vorliegenden System angepaßte Variante der Auswertgleichung ableiten. Diese zweite Methode ist allerdings nur in wenigen Fällen mathematisch exakt lösbar (Zientara und Freed, 1980), z. B. für die Diffusion von Molekülen zwischen parallelen Schichten, in Kugeln oder Zylindern (Tanner und Stejskal, 1968; Mitra et al., 1992; Tanner, 1978). Diese Modelle setzen zum Teil voraus, daß die Wände undurchdringlich sind und schließen auch Adsorptionsprozesse aus. Bei komplizierteren Systemen können Näherungen aufgestellt werden, die dann aber häufig zu viele unbekannte Parameter enthalten, die nicht aus der Messung bestimmbar sind. Aus diesem Grund ist es insbesondere bei sehr heterogenen Systemen günstiger, mit effektiven Selbstdiffusionskoeffizienten zu arbeiten. In diesem Fall ist es allerdings sehr wichtig, bei der Interpretation der Daten äußerste Vorsicht walten zu lassen.

Im folgenden werden die wesentlichen Konzepte der gehinderten Diffusion kurz erläutert. Hierbei steht die Betrachtung des effektiven Selbstdiffusionskoeffizienten im Vordergrund. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird nur noch von Diffusionskoeffizienten gesprochen, auch wenn effektive Selbstdiffusionskoeffizienten gemeint sind.

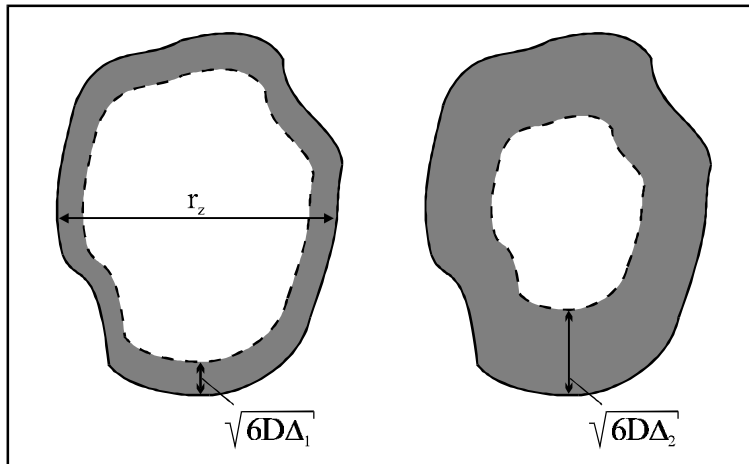


Abb. 3-8: Schematische Darstellung der Menge Wassermoleküle, die innerhalb der Diffusionszeit  $D_1$  bzw.  $D_2$  die Porenwand erreichen ( $D_1 < D_2$ )

Um den Effekt von Hindernissen auf die Diffusion von Molekülen zu verstehen, wird eine Pore in einem porösen System mit einem Porenradius  $r_z$  angenommen (siehe Abb. 3-8). Es werden nun die Moleküle betrachtet, die sich innerhalb dieser Pore befinden. Für sehr kurze Diffusionszeiten entfernen sich die Moleküle gemäß Gleichung 3-1 (siehe Seite 40) nur wenig von ihrem Ausgangsort. Wenn die Pore entsprechend groß ist ( $\sqrt{6D_0\Delta} \ll r_z$ ), bedeutet dies, daß die meisten Moleküle keinen Kontakt zu der Begrenzung haben und der gemessene Diffusionskoeffizient in der Nähe von freier Diffusion liegt (Mitra et al., 1992). Mit zunehmender Diffusionszeit  $\Delta$  gelangen immer mehr Moleküle an die Porenwand, und der gemessene Diffusionskoeffizient nimmt dadurch ab. Die Anzahl  $N$  der Moleküle, die von der Hinderung betroffen sind, läßt sich wie folgt berechnen:

$$N = \frac{O \cdot \sqrt{6D\Delta}}{V} \quad (3-12)$$

Hierbei entspricht  $O$  der Oberfläche und  $V$  dem gesamten Volumen innerhalb der Pore. Falls ein abgeschlossenes Porensystem vorliegt, gibt es für die Strecke, welche die Moleküle zurücklegen können, eine obere Grenze. Wenn diese erreicht ist ( $\sqrt{6D_0\Delta} \approx r_z$ ), geht der effektive Diffusionskoeffizient mit weiter zunehmender Beobachtungszeit  $\Delta$  gegen Null. Ansonsten erreicht er einen Grenzwert (siehe Abb. 3-9), der Aussagen über die Porenkonnektivität erlaubt.

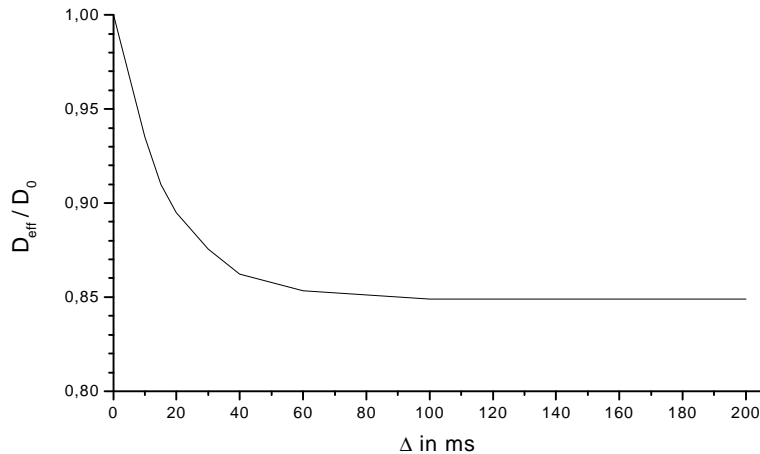


Abb. 3-9: Beispiel für einen zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten in einem porösen System mit untereinander verbundenen Poren. Dargestellt ist der relative effektive Diffusionskoeffizient ( $D/D_0$ )

#### 3.3.4.2 Kreuzrelaxation bei PFG-Experimenten

Peschier et al. entwickelten 1996 eine Auswertgleichung für PFG-NMR-Experimente, die Kreuzrelaxationseffekte während der  $T_1$ -Phase (Zeit  $\tau_1$  in der Abb. 3-2, siehe Seite 42) berücksichtigt. Diese können auftreten, wenn sich ein Spinsystem aus gekoppelten Spins nicht im Boltzmann-Gleichgewicht befindet. Zur Ausbildung dieser Störung ist es erforderlich, daß die Magnetisierung mit Hilfe des zweiten  $90^\circ$ -Pulses im Stimulated-Echo-Experiment auf die z-Achse übertragen wird. Kreuzrelaxation tritt daher bei der Verwendung des Hahn- Echo-Experimentes nicht auf. Durch die Kreuzrelaxation wird dann Magnetisierung via dipolarer Wechselwirkungen über den Raum von einem Molekül auf ein anderes übertragen (siehe Abb. 3-10). Hierzu sind bestimmte Bedingungen erforderlich, die in der Abbildung angedeutet sind. Von den drei Wassermolekülen ist eines zu weit entfernt, um eine Kreuzrelaxation zu zeigen ( $d > 5 \text{ \AA}$ ; oben rechts in der Abbildung). Im zweiten Fall wird durch die Rotation der  $\text{CH}_3$ -Gruppe die Übertragung der Magnetisierung stark verlangsamt, so daß auch hier keine Kreuzrelaxation zu beobachten ist. Nur beim dritten dargestellten Wassermolekül kann es zu einer erfolgreichen Kreuzrelaxation kommen (rot dargestellt), wenn sich das Wassermolekül genügend lange an dieser Position aufhält (Größenordnung  $100 \mu\text{s}$ ).

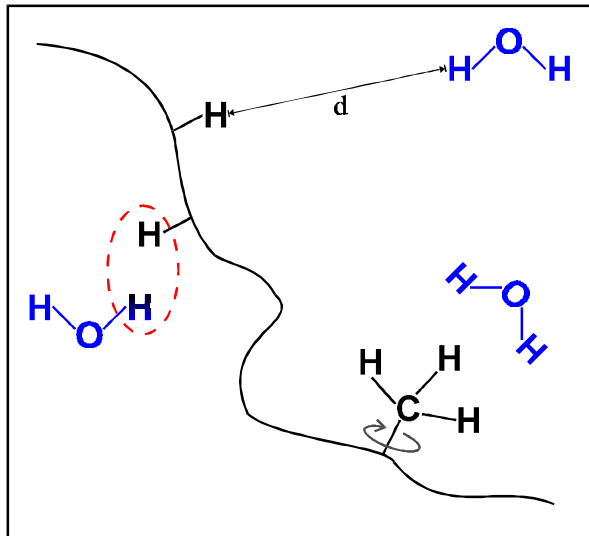


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der Kreuzrelaxation: Nur im rot markierten Fall kommt es zu einem schnellen Magnetisierungstransfer durch die Kreuzrelaxation. Die Farben symbolisieren die Magnetisierung der Moleküle (schwarz  $\circ$ Polymer; blau  $\circ$ Wasser)

Da durch die Übertragung der Magnetisierung bei einem PFG-Experiment nicht nur die Intensitätsverhältnisse geändert werden, sondern auch die Ortskodierung übertragen wird, muß die Kreuzrelaxation in Experimenten mit dem Stimulated Echo berücksichtigt werden.

Bevor die Wirkung der Kreuzrelaxation im Detail beschrieben wird, ist ein kurzer Einschub über dipolare Kopplungen erforderlich.

Es handelt sich hierbei um eine Wechselwirkung über den Raum, d. h. es ist keine direkte Bindung zwischen den beteiligten Spins erforderlich. Die dipolare Kopplung ist eine Konsequenz daraus, daß jeder NMR-aktive Spin einen kleinen Magneten darstellt (siehe Abb. 3-11). Das Magnetfeld ist zwar im Vergleich zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  sehr klein, hat aber trotzdem unter bestimmten Voraussetzungen einen Einfluß auf die Spins in der Umgebung und somit auch auf die NMR-Experimente.

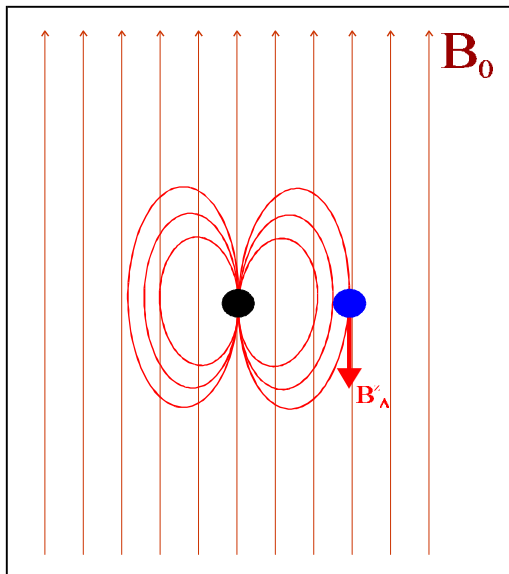


Abb. 3-11: Schematische Darstellung Magnetfelder bei der dipolaren Kopplung: Das vom schwarzen Spin A erzeugte Magnetfeld beeinflusst die Gesamtmagnetisierung des blauen Spins B

Betrachtet man die in der Abb. 3-11 dargestellten Spins, so erkennt man, daß das durch den schwarz dargestellten Spin A erzeugte Magnetfeld am Ort des blau gekennzeichneten Spins B ein zusätzliches Magnetfeld  $\vec{B}_A$  erzeugt. Die für die NMR entscheidende Gesamtmagnetfeldstärke beträgt für den Spin B nun nicht mehr  $\vec{B}_0$ , sondern  $\vec{B}_0 + \vec{B}_A$ . Dieses lokale Magnetfeld  $\vec{B}_{\text{lokal}}$  kann je nach Entfernung und Position der Spins unterschiedlich stark und sowohl größer oder kleiner als das Magnetfeld  $\vec{B}_0$  sein. Die Resonanzfrequenz eines Spins hängt ausschließlich von  $\vec{B}_{\text{lokal}}$  ab und wird somit von der Anwesenheit benachbarter Spins beeinflusst. Sind wie in der Realität sehr viele Nachbarspins vorhanden, wird aus der einzigen Resonanzfrequenz eine breite Verteilung von Resonanzfrequenzen. Dies hat zur Folge, daß das NMR-Signal sehr breit werden kann und seine Amplitude entsprechend sinkt (die Fläche des Signals bleibt konstant).

In der Flüssig-NMR hat man mit dieser Verbreiterung im allgemeinen keine Probleme, da die dipolaren Wechselwirkungen in Flüssigkeiten durch die schnellen Bewegungen der Moleküle (und damit der Spins) ausgemittelt werden. Treten in einer Flüssigkeit jedoch Bereiche auf, in denen die Beweglichkeit stark vermindert ist, kann es auch in der Flüssig-NMR zu einer Linienverbreiterung kommen. Dies kann soweit gehen, daß kein NMR-Signal mehr detektierbar ist.

Eine weitere wichtige Konsequenz dieser dipolaren Kopplung ist die Übertragung von Magnetisierung (Kreuzrelaxation). Diese wird durch die dipolaren Wechselwirkungen erst möglich. Die genaue Wirkungsweise der Kreuzrelaxation wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Dazu werden zwei Fälle betrachtet. Wenn zwei Spins weit genug voneinander entfernt sind, können ihre Spinzustände als voneinander unabhängigen angesehen und in zwei Diagrammen dargestellt werden (siehe Abb. 3-12, links). Hierbei können die beiden Spins (blau bzw. schwarz dargestellt) nur mit Hilfe der Relaxation nach  $T_1$  vom angeregten Zustand  $\beta$  in den Grundzustand  $\alpha$  zurückkehren. In der Abbildung sind die Wahrscheinlichkeiten für diesen Prozeß mit  $W_{1A}$  bzw.  $W_{1B}$  gekennzeichnet.

Kommt es jedoch zu einer Annäherung der Spins, ist unter bestimmten Randbedingungen ein gekoppeltes Spinsystem zu erwarten (siehe Abb. 3-12, rechts).

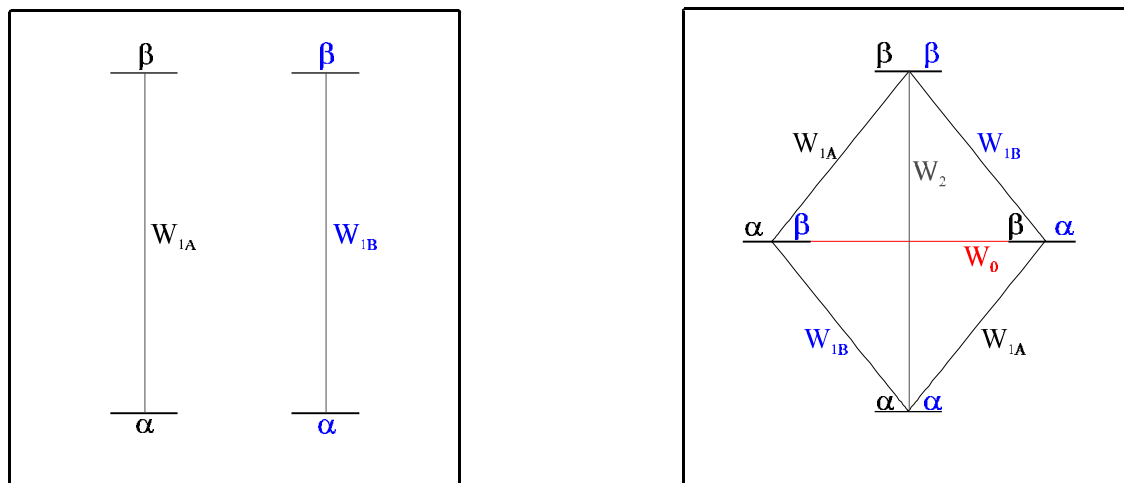


Abb. 3-12: Energieniveaus zweier Spins und die möglichen Übergänge; links: ungekoppelte Spins; rechts: über dipolare Wechselwirkungen gekoppeltes Spinsystem

Wenn nun das Boltzmann-Gleichgewicht in diesem gekoppelten System gestört wird, kann es zusätzlich zu den „normalen“ Relaxationswegen  $W_1$  ( $\beta\beta \leftrightarrow \alpha\beta$ ;  $\beta\beta \leftrightarrow \beta\alpha$ ;  $\beta\alpha \leftrightarrow \alpha\alpha$ ;  $\alpha\beta \leftrightarrow \alpha\alpha$ ) zu neuen Wegen  $\beta\alpha \leftrightarrow \alpha\beta$  (Kreuzrelaxation,  $W_0$ ) und  $\beta\beta \leftrightarrow \alpha\alpha$  ( $W_2$ ) kommen. Die Abkürzungen  $W_0$  bis  $W_2$  geben hierbei die Wahrscheinlichkeiten für die entsprechenden Relaxationswege an. Der für die Übertragung der Magnetisierung entscheidende Mechanismus ist in der Abbildung

rot dargestellt. Hierbei geht der Spin A (schwarz gekennzeichnet) in den Grundzustand  $\alpha$  über, während Spin B (blaue Farbe) angeregt wird ( $\beta$ ). Auch der umgekehrte Vorgang ist möglich.

Die Magnetisierung des Spins A wird also auf den vorher im Grundzustand befindlichen Spin B übertragen. Der Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit der Spins (Korrelationszeit  $\tau_c$ ) und der Kreuzrelaxation wird in der Abb. 3-13 deutlich. Bei hoher Beweglichkeit (entspricht kurzen Korrelationszeiten) dominieren die Relaxationsmechanismen nach  $T_1$  und der Übergang  $W_2$  (Ernst et al., 1987). Die Wahrscheinlichkeiten dieser beiden Mechanismen durchlaufen bei langsamer werdender Bewegung ein Maximum, während die Wahrscheinlichkeit  $W_0$  für einen Magnetisierungstransfer immer weiter zunimmt. Um so langsamer also die Bewegung ist (längere Korrelationszeit  $\tau_c$ ), um so stärker wird in einem gekoppelten Spinsystem die Kreuzrelaxation bevorzugt.

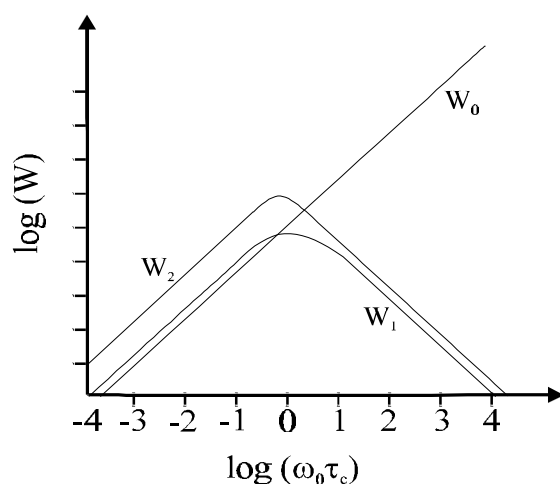


Abb. 3-13: Schematische Darstellung Relaxationsraten in Abhängigkeit von der Korrelationszeit  $t_c$  (nach Ernst et al., 1987)

Nachdem das Auftreten und der Mechanismus der Kreuzrelaxation geklärt sind, wird nun der Effekt auf die Diffusionsmessungen mit der PFG-NMR erläutert. Dazu wird wieder das im Kapitel über PFG-NMR eingeführte Bild mit den Zeigerpositionen verwendet.

Bei der Kreuzrelaxation wird der Zeiger vom schwarzen auf den blauen Spin übertragen (siehe Abb. 3-14). Hierdurch wird die Markierung, die durch den ersten Feldgradientenpuls für den schwarzen Spin erzeugt wurde, auf den blauen übertragen. Dieser erhält somit eine „neue“ Start-

position. Die gesamte Vorgeschichte des blauen Spins bis zu dem Zeitpunkt der Übertragung spielt hierbei keine Rolle da sie von der Messung nicht detektiert wird. Die Konsequenzen dieser Übertragung werden im Kapitel „Diskussion“ detailliert besprochen (siehe Seite 126).

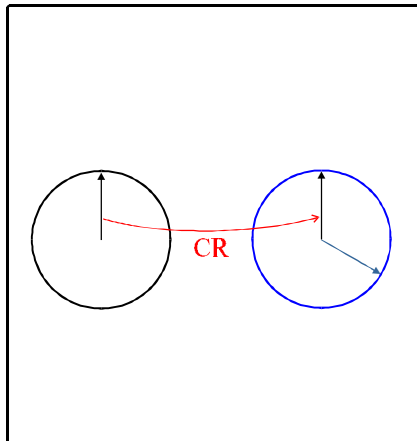


Abb. 3-14: Schematische Darstellung des Einflusses der Kreuzrelaxation (CR) auf das Ergebnis der PFG-NMR

### 3.3.4.3 Experimente mit konstantem b-Faktor

Untersuchungen der Zeitabhängigkeit von Diffusionskoeffizienten werden leichter vergleichbar, wenn sie bei konstantem b-Faktor durchgeführt werden. Dieser b-Faktor ist nach folgender Gleichung definiert:

$$b = g^2 d^2 \left( \Delta - \frac{1}{3} d \right) \quad (3-13)$$

Damit vereinfacht sich die Auswertgleichung für die PFG-NMR zu:

$$I = I_0 \cdot e^{-b \cdot g^2 \cdot D} \quad (3-14)$$

Man kann sofort erkennen, daß bei konstantem b die Signalintensität I nur noch vom Diffusionskoeffizienten D, der Gradientstärke g und der Ausgangsintensität  $I_0$  abhängt. Hält man also bei



einer zeitabhängigen Diffusionsmessung den Faktor  $b$  konstant, indem  $\Delta$  vergrößert und gleichzeitig  $\delta$  entsprechend verringert wird, kann unabhängig von der Diffusionszeit immer mit den gleichen Gradientenfeldstärken gearbeitet werden (vergleiche S. 46).

Von besonderer Bedeutung ist diese Art der Messung, wenn man bei Nutzung von Gradienten die  $T_1$ -Relaxation beobachten will. Sind sowohl der  $b$ -Faktor, die Gradientenstärke als auch der Diffusionskoeffizient konstant, bleibt die  $T_1$ -Relaxation der einzige wirksame Einfluß auf das NMR-Signal. Dies kann man erkennen, wenn der Relaxationsterm zur Gleichung 3-11 zugefügt wird:

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{\Delta}{T_1}} \cdot e^{-b \cdot g^2 \cdot D} \quad (3-15)$$

Mit zunehmender Diffusionszeit wird unter den genannten Bedingungen die Signalintensität gemäß dem ersten Exponenten zeitabhängig. Die Methode eignet sich daher auch zur Bestimmung von  $T_1$ -Zeiten in Gegenwart eines dominierenden Wassersignals, da dieses mit genügend starken Gradienten unterdrückt werden kann (siehe nächstes Unterkapitel).

### 3.3.5 Diffusion als Wasserunterdrückung

Die PFG-NMR bietet zusätzlich zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten auch noch die Möglichkeit, den Beitrag mobiler Moleküle aus einem Spektrum herauszufiltern. Dies ist insbesondere dann interessant, wenn die einzelnen Komponenten eines Systems deutlich unterschiedliche Diffusionskoeffizienten zeigen. In den Polymer/Wasser-Systemen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ist diese Voraussetzung erfüllt. Das Wasser hat in allen Fällen den höchsten Diffusionskoeffizienten und läßt sich so mittels der PFG-NMR gut filtern (Hinton and Johnson, 1993; van Zijl et al., 1991).

Das Prinzip ist in der Abb. 3-15 dargestellt. In dieser Abbildung ist der Verlauf der Signalintensität von drei hypothetischen Molekülen mit Diffusionskoeffizienten von  $D = 1,8 \cdot 10^{-9}$ ,

$D = 1,0 \cdot 10^{-10}$  und  $D = 1,0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  in Abhängigkeit von der Gradientstärke  $g$  dargestellt ( $\Delta = 10 \text{ ms}$  und  $\delta = 1 \text{ ms}$ ).

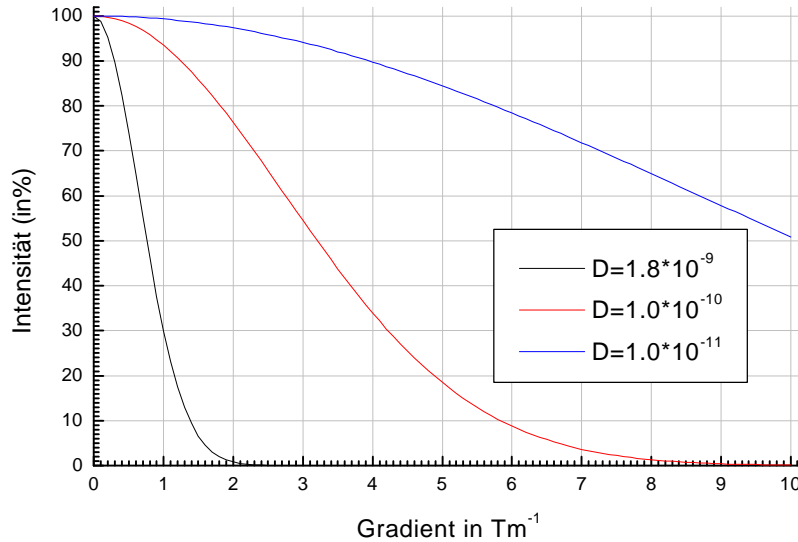


Abb. 3-15: Berechnete Signalintensität von Molekülen mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Gradientstärke  $g$

Es wird sofort deutlich, daß Signale mit hohen Diffusionskoeffizienten bereits bei relativ kleinen Gradienten völlig unterdrückt werden, wohingegen Signale mit niedrigen Diffusionskoeffizienten nur in geringem Maß abgeschwächt werden. Allerdings werden alle Moleküle mit hohen Diffusionskoeffizienten gleichermaßen unterdrückt, so daß in einem System neben dem Wasser-signal auch andere Signale von hochbeweglichen Molekülen unterdrückt werden.

## 4 Verwendete Materialien und Geräte

### 4.1 NMR

#### 4.1.1 Instrumente

Die NMR-Experimente werden an einem hochauflösenden Flüssigkeitsspektrometer Avance DRX 500 der Firma Bruker durchgeführt. Dieses ist mit einem BAFPA-40-Gradientverstärker und einem Diff30-Probenkopf ausgestattet. Dieser enthält eine 5 mm  $^1\text{H}$ -NMR-Spule. Die maximale Gradientstärke dieses Systems beträgt  $12 \text{ Tm}^{-1}$  bei einer Gradientpulslänge von bis zu 5 ms. Die Gradientenspule wird durch eine externe Kühlwasserversorgung gekühlt.

Die Preemphasis ist so eingestellt, daß bei Gradientstabilisierungszeiten  $\tau_{stab}$  von einer Millisekunde keine Eddy-Currents festzustellen sind. Diese Gradientstabilisierungszeit ist der Abstand zwischen der abfallenden Gradientenpulsflanke vom zweiten  $90^\circ$ -Puls bzw. vom Beginn der Akquisition (siehe Abb. 4-1).

#### 4.1.2 Diffusionsmessungen

Die Messungen werden mit dem für PFG-Experimente modifizierten Stimulated-Echo Pulsprogramm der Firma Bruker durchgeführt (siehe Abb. 4-1). Hierbei wird eine Echozeit von 4,5 ms ( $\tau_2$ ) und eine Gradientstabilisierungszeit  $\tau_{stab}$  von 3 ms gewählt. Zur Verbesserung der Spektrenqualität werden nach dem zweiten RF-Puls Spoilergradienten (spoil) mit einer Stärke von  $0,5 \text{ Tm}^{-1}$  und einer Länge von 0,1 ms genutzt. Die Temperatur wird auf  $(25 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$  eingestellt.

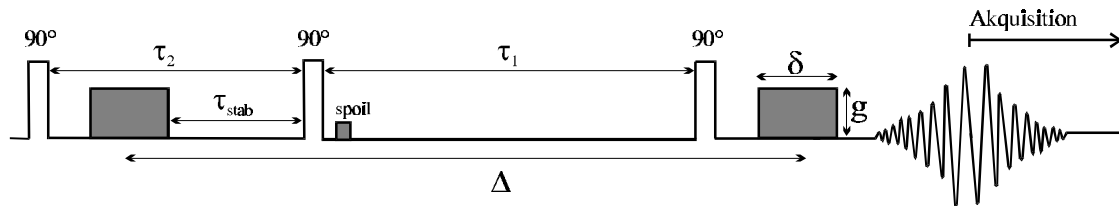


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Pulssequenz des Hahn-Spin-Echo-Experiments

Zur Bestimmung der Diffusion des „freien“ Wassers werden Gradienten von  $0,5 - 3,0 \text{ Tm}^{-1}$  verwendet. Die Diffusionszeit  $\Delta$  und die Gradientenpulslänge  $\delta$  werden so variiert, daß bei allen gemessenen Diffusionszeiten das Produkt  $\mathbf{g}^2 \cdot \mathbf{d}^2 \cdot (\Delta - 1/3\mathbf{d})$  konstant bleibt (konstanter b-Faktor). Hieraus resultieren die in der folgenden Tabelle dargestellten Meßbedingungen (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Wertepaare für die zeitabhängigen Diffusionsmessungen

$\Delta$ (ms)	10,0	30,0	50,0	70,0	100,0	300,0	500,0	800,0
$\delta$ (ms)	1,000	0,577	0,447	0,378	0,316	0,183	0,141	0,112

Bei jedem Wertepaar werden 16 Gradientenschritte mit jeweils 16 Scans durchgeführt. Die Recycle-Delay beträgt 12 Sekunden.

Die von Bruker voreingestellte Kalibration des Gradientensystems wird mit Messungen an reinem Wasser ( $D_{\text{Lit.}} = 2,30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) überprüft. Hierzu wird die komplette Meßreihe nach Tabelle 4-1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind im Anhang aufgelistet (siehe Tab. 8-16, Seite 150). Als Mittelwert aller Experimente erhält man  $D^{25^\circ\text{C}} = (2,30 \pm 0,02) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ .

Die Experimente mit stärkeren Gradienten werden ebenfalls in 16 Schritten allerdings mit Gradientenstärken von  $3,0 - 8,0 \text{ Tm}^{-1}$  durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Signalintensität wird die Empfindlichkeit des Empfängers (Receiver Gain) auf einen Wert  $\text{RG} = 2048$  eingestellt und die Anzahl der Scans auf 32 gesetzt. Die Recycle-Delay von 12 Sekunden bleibt unverändert. Bei den zeitabhängigen Messungen werden ebenfalls die Parameter aus Tabelle 4-1 verwendet.

Die Intensitäten der NMR-Signale werden entweder durch Integration oder, falls sich die Signale überlappen, mit Hilfe einer Dekonvolution ermittelt. Für die Dekonvolution kommt das Programm Win-Fit der Firma Bruker zum Einsatz.

Die Diffusionskoeffizienten werden, je nach Bedarf, mono-, bi- oder triexponentiell mit Hilfe des Programms Microcal Origin 5.0 nach Gleichung 3-11 (siehe Seite 48) ausgewertet. Die Intensitätsverhältnisse Restwassersignal zum Gesamtwassersignal werden grundsätzlich nur bei der Messung mit einer Diffusionszeit von 100 ms berechnet.

Die Auswertung der Polysaccharidsignale erfolgt in einer separaten Messung, die mit stärkeren Gradienten durchgeführt wird. Da diese Gradienten an das jeweilige System angepaßt sind, werden die entsprechenden Parameter im Ergebnisteil aufgeführt. Die Diffusionskoeffizienten werden durch eine Auswertung der Signalintensität aller aliphatischen Ringprotonen ermittelt. Beim Polysaccharid des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 wird zusätzlich das Signal der Acetylgruppe genutzt.

Die Experimente mit Wasserunterdrückung werden mit einer Gradientstärke von  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  und konstantem b-Faktor durchgeführt. Kontrollexperimente zeigen, daß reines Wasser unter diesen Bedingungen kein detektierbares NMR-Signal mehr zeigt.

## 4.2 Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* SG 81

Da natürliche Biofilme sehr komplex sind und zudem sehr empfindlich auf äußere Einflüsse (wie z.B. Scherung) reagieren, sind sie für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ungeeignet. Weiterhin sind bei natürlichen Biofilmen selten genügend große Mengen verfügbar, um damit NMR-Experimente durchzuführen. Daher werden in dieser Arbeit Reinkulturbiofilme des Bakterienstammes *Pseudomonas aeruginosa* SG81 verwendet, da dieses Bakterium gut charakterisiert ist (Grobe et al., 1995) und genügend große Mengen EPS produziert.

PA gehört zur Risikogruppe 2, d. h. es besteht ein geringes Risiko für die Experimentatoren. PA kann sowohl chronische als auch akute Infektionen auslösen. Dies gilt insbesondere bei Personen mit geschwächten Immunsystemen (Operationen) und für Patienten mit der Erbkrankheit Cystische Fibrose (Grobe, 1996).

Die organische Matrix des Schleims von PA SG81, die hauptsächlich aus den extrazellulären polymeren Substanzen besteht, setzt sich im wesentlichen aus Polysacchariden und Proteinen zusammen (Mayer et al., 1999; Rode 2000). Der Wassergehalt dieser Matrix kann bis zu 95 % betragen.

Die Isolation und Anzucht des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 wurde von Grobe et al. (1995) beschrieben. Für die NMR-Experimente wird der auf den Agar-Platten (*Pseudomonas* Isolierungs Agar) angezüchtete Biofilm vorsichtig abgeschabt und mit einer Spritze in die NMR-Röhrchen überführt. Im Anschluß daran werden sofort die Experimente durchgeführt. In dieser Arbeit kommen Biofilme mit zwei verschiedenen Bebrütungsdauern zum Einsatz (24 Stunden bzw. 96 Stunden). Darauf wird im Ergebnisteil noch einmal eingegangen.

Der Wassergehalt des auf dem Agar-Nährmedium PIA für 24 Stunden angezüchteten *Pseudomonas aeruginosa* SG 81 Biofilms wurde zu 91,7 - 94,2 Gew.-% bestimmt (Mayer et al., 1999). Für die folgende Berechnung wird von einem Wassergehalt von 93 Gew.-% ausgegangen. Die Dichte des Biofilms ist noch nicht bekannt, kann aber aus der Literatur für aerobe Biofilme zu

1,016 g·cm<sup>-3</sup> angenommen werden (Beuling, 1998). Aus diesen Daten ergibt sich, daß 1 cm<sup>3</sup> Biofilm 0,945 g Wasser und 0,071 g Trockenmasse enthält.

Die Zellzahl im Biofilm wurde von Mayer et al. (1999) zu  $6,9 \cdot 10^{11}$  Zellen pro Gramm Trockengewicht bestimmt. Unter Berücksichtigung der Trockenmasse ergibt sich eine Zellzahl von  $4,9 \cdot 10^{10}$  Zellen pro cm<sup>3</sup> Biofilm.

Um das von den Bakterien eingenommene Volumen zu berechnen, bedient man sich einer Näherung. Die Zellen werden hierbei als Zylinder mit einem Volumen von  $1 \cdot 10^{-12}$  cm<sup>3</sup> betrachtet (Flemming, 2000d). Das bedeutet, daß die Zellen ein Gesamtvolumen von  $4,9 \cdot 10^{-2}$  cm<sup>3</sup> in einem Kubikzentimeter Biofilm einnehmen. Das entspricht ca. 5 Vol.-% des Biofilms. Dieser Wert ist allerdings nur als grobe Näherung geeignet, da bereits geringe Abweichungen der Zelldimensionen oder der Zellzahl pro Kubikzentimeter einen großen Einfluß auf die Berechnung haben.

Die Anteile der Proteine, Kohlenhydrate und Uronsäuren wurden sowohl intra- als auch extrazellulär bestimmt (Mayer et al., 1999; Rode et al., 2000). Mit den Uronsäuren sind die Polysaccharide des Alginates erfaßt. Folgende Werte wurden hierbei gefunden:

Tab. 4-2: Zusammensetzung eines Biofilms (Hauptbestandteile) nach Rode et al., 2000

	gesamt (µg pro 10 <sup>9</sup> Zellen)	extrazell. (µg pro 10 <sup>9</sup> Zellen)
Kohlenhydrate	1005,8	766,6
Uronsäuren	473,8	402,8
Proteine	585,0	266,4

Mit diesen Werten erhält man unter Berücksichtigung der Zellzahl pro Milliliter Biofilm die folgenden Anteile:

Tab. 4-3: Zusammensetzung der EPS pro  $\text{cm}^3$  Biofilm

	( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
Kohlenhydrate	37,6
Uronsäuren	19,7
Proteine	13,1

Hieraus ergeben sich näherungsweise Gewichtskonzentrationen für Polysaccharide und Proteine im Biofilm:

Uronsäuren : 2,0 Gew.-%

Proteine : 1,3 Gew.-%

Aufgrund dieser Konzentrationen werden bei den Vergleichsmessungen mit Polysacchariden Konzentrationen von 1,0 - 4,0 Gew.-% verwendet.

Den Ergebnissen aus der Tabelle 4-3 kann man entnehmen, daß die EPS von PA SG81 hauptsächlich Alginat enthält. Es gibt allerdings auch einen nicht zu vernachlässigenden Anteil von Exoproteinen.

Eine Analyse des gereinigten Alginates von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 hat gezeigt, daß in diesem keine GGG-Triaden nachgewiesen werden können (Schürks, 2000). Hieraus kann man schließen, daß in diesem Polysaccharid entweder gar keine oder nur sehr wenige G-Blöcke vorhanden sind. Die molare Masse des Polysaccharides wird mit unterschiedlichen Werten angegeben. Grobe et al. (1995) bestimmten diese viskosimetrisch zu  $2.400.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , während Lichtstreuungsexperimente von Borchard et al. (unveröffentlichte Ergebnisse) Werte im Bereich von  $1.000.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ergaben.

Im Alginat ist statistisch gesehen jedes vierte Monomer acetyliert (Grobe, 1996). Hierbei ist jedoch anzumerken, daß tatsächlich nur die Mannuronatreste acetyliert sind.



## 4.3 Polysaccharide

### 4.3.1 Manugel DJX

Beim Manugel DJX handelt es sich um das Natriumsalz eines Algenalginates, das von der Firma Kelco zur Verfügung gestellt wurde. Die molare Masse des Polymers beträgt  $120.000 \text{ g mol}^{-1}$  bis  $130.000 \text{ g mol}^{-1}$ . Da es sich um das Natriumsalz des Alginates handelt, entspricht dies etwa 630 Monomeren ( $M_{\text{Monomer}} = 198 \text{ g mol}^{-1}$ ). Unter der Annahme, daß das Molekül in gestreckter Form vorliegt, ergibt sich eine Kettenlänge in der Größenordnung von  $0,3 \mu\text{m}$ . Die relativen Anteile von Mannuronsäure (M) und Guluronsäure (G) sind wie folgt:

M: 30 - 35 %

G: 65 - 70 %

Die in dieser Arbeit untersuchten Manugel-DJX-Lösungen werden wie folgt hergestellt:

Zu einer Menge von ungefähr 5 ml destilliertem Wasser wird das Manugel-DJX-Pulver gegeben. Dieser Ansatz bleibt über Nacht ohne Rühren stehen. Nach etwa 12 Stunden bildet sich eine leicht gelbliche, je nach Konzentration hochviskose Flüssigkeit. Diese wird mit einer Spritze in ein NMR-Röhrchen überführt. Da sich bei diesem Transfer leicht störende Luftblasen bilden, bleibt das Röhrchen ebenfalls einige Stunden stehen, bis die Lösung blasenfrei ist.

### 4.3.2 Calciumalginat

Für die Calciumalginat wird Calciumchlorid der Firma Merck verwendet. Es handelt sich hierbei um das  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (p.a.) mit einer molaren Masse von  $147,02 \text{ g mol}^{-1}$ . Die in der Arbeit angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Einwaage an Calciumchlorid inklusive dem Hydratwasser. Eine  $8 \text{ g l}^{-1}$  Lösung enthält also etwa 15 mmol Calciumionen pro Liter.

Alle Calciumalginat werden aus einer Manugel-DJX-Lösung und einer Calciumchlorid-Lösung hergestellt. Dazu sind zwei Lösungen erforderlich, die jeweils die doppelte Konzentration der

gewünschten Endkonzentration enthalten. Zur Herstellung der Probe legt man die Calciumchlorid-Lösung im NMR-Röhrchen vor und gibt die Manugel-DJX-Lösung anschließend hinzu. Es bildet sich spontan ein recht festes Gel, das direkt im Röhrchen hergestellt werden muß, da es nicht mehr löslich ist und somit nicht mit einer Spritze umgefüllt werden kann.

#### 4.3.3 Manucol LHF

Das Manucol LHF wurde ebenfalls von der Firma Kelco geliefert. Dieses Natriumalginat hat eine molare Masse von  $88.000 \text{ g mol}^{-1}$  und besteht somit aus ungefähr 440 Monomeren. Im gestreckten Zustand ergibt sich daraus eine Kettenlänge von ungefähr  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ . Das Verhältnis von Mannuronsäure zu Glururonsäure ist genau umgekehrt wie beim Manugel DJX:

M: 65 - 70 %

G: 30 - 35 %

Die Handhabung ist exakt identisch zu den Angaben im Abschnitt über das Manugel DJX. Die Proben sind aufgrund der niedrigeren molaren Masse etwas weniger zähflüssig und dadurch leichter handhabbar.

#### 4.3.4 Manucol LB

Das Natriumalginat Manucol LB ist das kurzkettigste in dieser Arbeit untersuchte Polysaccharid. Das von der Firma Kelco stammende Natriumalginat hat eine molare Masse von  $18.000 \text{ g mol}^{-1}$ , was einer Monomerzahl von ungefähr 90 entspricht. Daraus ergibt sich eine Kettenlänge im gestreckten Zustand von ungefähr  $50 \text{ nm}$ . Das M/G-Verhältnis entspricht exakt dem des Manucol LHF.

Auch das Manucol LB wird genauso angesetzt wie das Manugel DJX. Wegen der sehr geringen molaren Masse ist die Viskosität der Lösungen jedoch so gering, daß Wartezeiten im Bereich von 1 bis 2 Stunden völlig ausreichen.

#### 4.3.5 Hydrolysiertes Manucol LB

Das Manucol LB wird mit Salzsäure für zwei Stunden hydrolysiert. Die resultierende Lösung wird neutralisiert und anschließend dialysiert. Das salzfreie Saccharid erhält man durch eine anschließende Gefriertrocknung.

Die restliche Handhabung entspricht der des unbehandelten Manucol LB.

#### 4.3.6 Alginate von *Pseudomonas aeruginosa* SG81

Dieses Polysaccharid wird durch einen aufwendigen Reinigungsprozeß aus dem Biofilm des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 gewonnen.

Hierzu wird der Biofilm im Verhältnis 1 zu 16 in 0,14 molarer Natriumchloridlösung suspendiert. Diese Suspension wird bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten gerührt und im Anschluß daran zwei Stunden bei 10 °C und 40000 g zentrifugiert. Um alle Bakterien zu entfernen, wird der Überstand durch Celluloseacetatfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Die sterile Lösung wird zweimal gegen 5 l deionisiertes Wasser dialysiert (Visking® Dialyseschläuche aus Cellulose, Fa. Serva). Die Ausschlußgrenze dieser Dialyseschläuche liegt bei 12000 - 14000 g·mol<sup>-1</sup>.

Diese EPS-Lösung wird in kaltes Ethanol gegeben und etwa 30 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert und zweimal mit Ethanol (95 %) und einmal mit absoluten Ethanol gewaschen. Nach einer Vakuumtrocknung über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> wird die erhaltene Substanz in einem 50 mMol Tris/HCl Puffer (pH = 7,2) mit 10 mMol Magnesiumchlorid gelöst. Dabei wird eine Konzentration von 5 gl<sup>-1</sup> eingestellt. Diese Lösung wird mit DNase I (10 mg·l<sup>-1</sup>;

Sigma, D-4527) und RNase (10 mg·l<sup>-1</sup>; Sigma, R-4875) versetzt und bei 36°C für vier Stunden inkubiert. Im Anschluß daran wird Pronase E (12,5 mg·l<sup>-1</sup>; Sigma R-6911) zugefügt und über Nacht bei 36°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 40000 g (etwa 30 Minuten) wird erneut zweimal gegen 5 l deionisierten Wasser dialysiert und das Polysaccharid mit Ethanol (siehe oben) ausgefällt. Im letzten Schritt wird das Polymer in deionisierten Wasser gelöst und anschließend gefriergetrocknet.

Das so erhaltene Polysaccharid bildet noch zähflüssigere Lösungen als das Manugel DJX. Daher ist es unumgänglich, das Wasser/Polysaccharid-Gemisch zu rühren. Anschließend kann die Lösung mit einer Spritze umgefüllt werden.

#### 4.3.7 Agarose

Die verwendete Agarose wurde von Merck (Deutschland, Best.-Nr. 116801) zur Verfügung gestellt. Der Sulfatgehalt liegt unter 0,2 %. Die molare Masse wird von Merck mit einer Größenordnung von 100.000 bis 200.000 gmol<sup>-1</sup> angegeben.

Die Probe mit einer Konzentration von 20 gl<sup>-1</sup> wird durch Lösen einer entsprechenden Menge der Agarose in 85 °C warmen Wasser hergestellt. Die klare Lösung wird anschließend im NMR-Röhrchen langsam abgekühlt und geliert bei Raumtemperatur.

## 4.4 Proteine

### 4.4.1 Gelatine

Für das Gelatinegel wird eine entsprechende Menge an Gelatine mit Wasser versetzt und einige Stunden zum Quellen stehengelassen. Im Anschluß wird die Probe unter Rühren auf etwa 40°C erwärmt, bis eine klare Lösung entsteht. Diese kann problemlos in ein NMR-Röhrchen überführt werden. In diesem geliert die Probe dann innerhalb von etwa ein bis zwei Stunden.

Die niedriger konzentrierte Gelatine-Lösung ( $c = 5 \text{ g l}^{-1}$ ) wird analog behandelt. Die Probe geliert beim Abkühlen jedoch nicht, da die kritische Konzentration nicht erreicht wird.

## 4.5 Polymere

### 4.5.1 Polyvinylalkohol (PVA)

Es wird Polyvinylalkohol der Firma Fluka genutzt. Dieser hat eine molare Masse von etwa  $22.000 \text{ g mol}^{-1}$ , was einem Polymerisationsgrad von 500 entspricht. Der Hydrolysegrad der Substanz beträgt 95,5 - 99,5 mol-%.

### 4.5.2 Polyethylenglykol (PEG)

Das verwendete Polyethylenglykol wird von der Firma Fluka bezogen. Die molare Masse liegt im Bereich von etwa  $5.000 - 7.000 \text{ g mol}^{-1}$ , was einem Polymerisationsgrad von etwa 130 entspricht.

### 4.5.3 Natrium-Polyacrylat (PAS)

Das Natriumsalz der Polyacrylsäure wird als Lösung von 40 Gew.-% von der Firma Aldrich vertrieben. Es hat eine molare Masse von  $30.000 \text{ g mol}^{-1}$ , was einem Polymerisationsgrad von etwa 270 entspricht.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Wasserdiffusion

Um die „Wasserbindung“ in Biofilmen und einigen Modellsystemen zu untersuchen, wird der Selbstdiffusionskoeffizient von Wasser mittels der PFG-NMR bestimmt. Wenn größere Mengen „gebundenen“ Wassers, oder genauer, Wasser, dessen translatorische Beweglichkeit eingeschränkt ist, existieren sollten, läßt sich dieses mit Hilfe dieser Methode nachweisen. Entweder ist ein deutlich niedrigerer Diffusionskoeffizient als in reinem Wasser zu erwarten (schneller Austausch zwischen freiem und gebundenem Wasser oder nur eine einheitliche Wasserphase) oder aber, es existieren mindestens zwei verschiedene Diffusionskoeffizienten, von denen einer sehr niedrig sein muß (langsamer Austausch). Zusätzliche Informationen über die Existenz von Strukturen, die die translatorische Bewegung von Wasser behindern, können zeitabhängige Experimente ergeben (siehe Kapitel „Gehinderte Diffusion“, Seite 49).

Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Experimente, bei denen mit schwachen Gradienten ( $0,5 - 3,0 \text{ Tm}^{-1}$ ) die Diffusion des gesamten (mobilen) Wassers in den Proben untersucht wird. Das Wassersignal hat in allen gezeigten Spektren eine chemische Verschiebung von 4,8 ppm. Die Zuordnung der übrigen sichtbaren Signale folgt in einem späteren Kapitel.

#### 5.1.1 Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* SG81

Das in der Abbildung 5-1 dargestellte  $^1\text{H}$ -Spektrum eines Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 zeigt, daß das Wassersignal die mit Abstand größte Intensität besitzt. Bei einer sehr starken Vergrößerung des Spektrums (Faktor 150) erkennt man, daß noch zusätzliche Resonanzen detektierbar sind. Auf diese wird an späterer Stelle noch eingegangen.

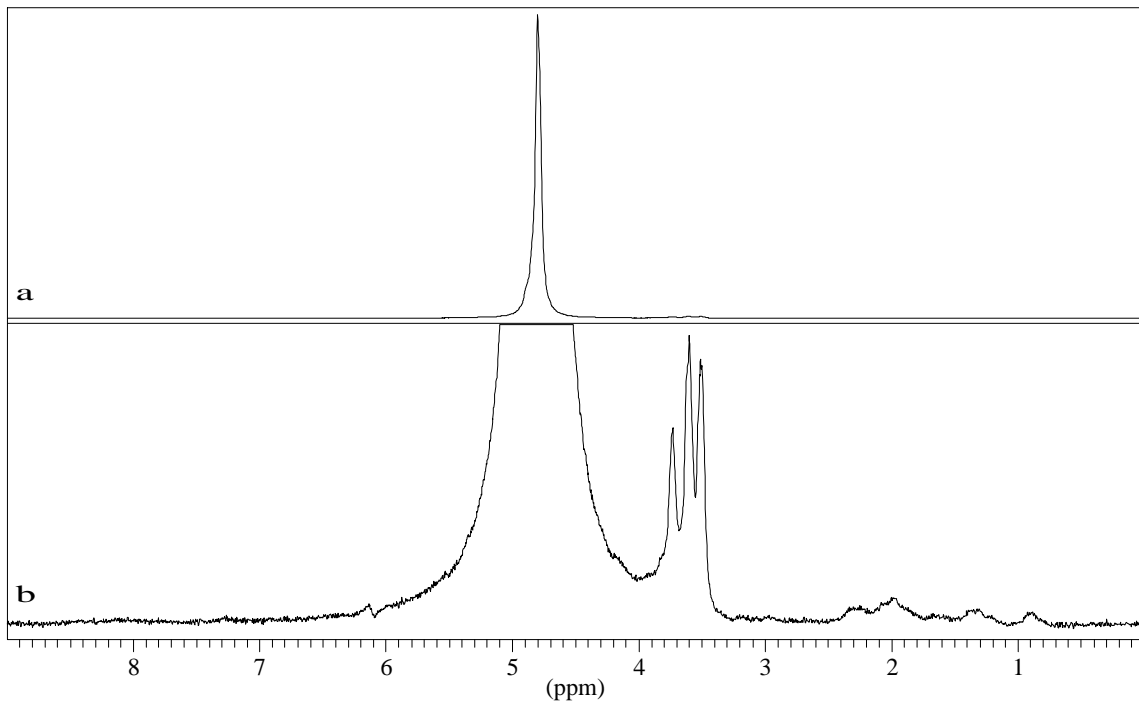


Abb. 5-1:  $^1\text{H}$ -Spektrum eines *Pseudomonas aeruginosa* SG81 Biofilms ohne Gradienten. Das Spektrum b ist das um den Faktor 150 vergrößerte Spektrum a

Im Gegensatz zu den übrigen in dieser Arbeit dargestellten Diffusionsexperimente sind die Biofilmreihe und die Vergleichsmessung an reinem Wasser bei einer tieferen Temperatur (295 K) durchgeführt worden, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Temperierung des Probenkopfes möglich war.

In der Abbildung 5-2 ist ein typisches Diffusionsexperiment an einem Biofilm dargestellt. Man erkennt deutlich, daß die Intensität des Wassersignals mit zunehmender Gradientstärke rasch abnimmt. Aus dieser Abnahme läßt sich mit Hilfe der Gleichung 3-11 (siehe Seite 48) der Diffusionskoeffizient von Wasser in diesem Biofilm berechnen (siehe Kapitel „Diffusionsmessungen“, Seite 59). Die Experimente ergeben, daß der Diffusionskoeffizient nur geringfügig von dem Wert in reinem Wasser abweicht ( $D_{\text{Bio}} = (1,80 \pm 0,03) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  bzw.  $D_{\text{frei}} = (2,09 \pm 0,02) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ;  $T = 295 \text{ K}$ ). Hierbei ist festzustellen, daß bei der Diffusion keine Zeitabhängigkeit auftritt und die Dauer der Bebrütung (24 h bzw. 96 h) keinen signifikanten Einfluß auf die Beweglichkeit des Wassers hat (siehe Tabelle 8-1, Seite 143). Daher können zur Bestimmung des Diffusions-



koeffizienten von Wasser im Biofilms alle sechs Meßdaten zu einem Mittelwert (siehe oben) zusammengefaßt werden.

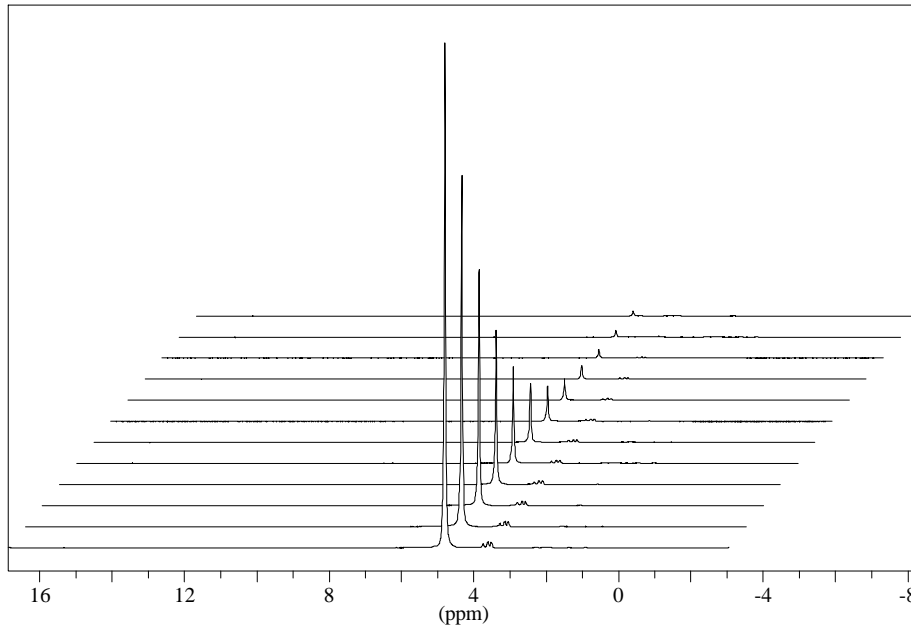


Abb. 5-2: Intensitätsabnahme des Wassersignals (4,8 ppm) in einem Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 in Abhängigkeit von der Gradientenstärke (von vorne nach hinten von  $g=1,0 - 3,0 \text{ Tm}^{-1}$ ;  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

Bei der Betrachtung der Spektren fällt auf, daß auch bei einem Gradienten von  $3,0 \text{ Tm}^{-1}$  noch ein Signal bei 4,8 ppm zu erkennen ist. Da bei Gradienten dieser Stärke kein Signal von Wasser mit einem Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung  $2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  zu erwarten ist, handelt es sich möglicherweise um ein Signal von einer zweiten Wasserfraktion, die in ihrer Bewegung deutlich verlangsamt ist (siehe Abb. 5-3). Auf dieses Signal wird in einem späteren Unterkapitel noch detailliert eingegangen (siehe 'Diffusion des „verlangsamten“ Wasser', Seite 77).

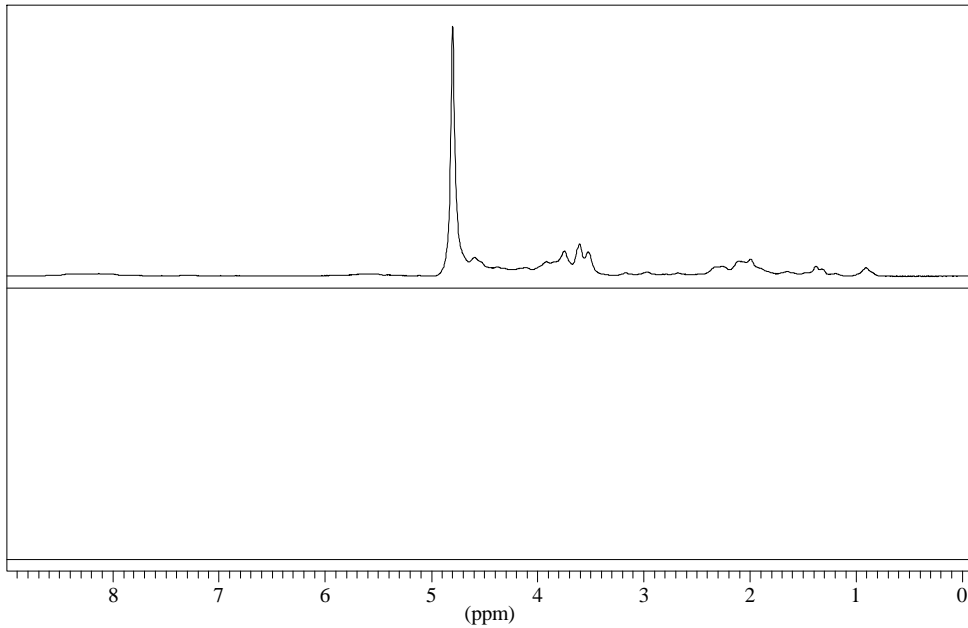


Abb. 5-3: Vergleich der <sup>1</sup>H-Spektren von einem *Pseudomonas-aeruginosa*-SG81-Biofilms (oben) und einer reinen Wasserprobe (unten) mit Wasserunterdrückung. ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

### 5.1.2 Polysaccharide

Um die Ergebnisse aus den Biofilmmessungen zu untermauern beziehungsweise zu ergänzen, werden analoge Experimente an verschiedenen Polysaccharid/Wasser-Systemen durchgeführt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in der Tatsache, daß diese Systeme deutlich einfacher aufgebaut sind und vor allem reproduzierbar sind. Zusätzlich ermöglicht dieses Verfahren konzentrationsabhängige Experimente, was mit Biofilmen nicht durchführbar ist.

Auf eine Darstellung der Intensitätsabnahme des Wassersignals in Abhängigkeit von den Gradienten (analog Abb. 5-2) wird in den folgenden Abschnitten verzichtet, da keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu den Biofilmspektren zu erkennen sind.

## 5.1.2.1 Manugel DJX

Für die Diffusion des „freien“ Wassers findet man die in Tabelle 5-1 wiedergegebenen Mittelwerte, die aus den Diffusionskoeffizienten der zeitabhängigen Meßreihe berechnet werden (siehe Tabelle 8-2, Seite 144). Diese Mittelung ist möglich, da die Diffusion des Wassers in Manugel nicht zeitabhängig ist. Die Diffusionskoeffizienten liegen abhängig von der Konzentration zwischen 4 % und 10 % niedriger als in reinem Wasser ( $D^{25\text{ °C}} = (2,30 \pm 0,02) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ). Ähnlich wie bei den Biofilmen zeigt sich auch bei den Manugel-DJX-Lösungen ein Restsignal bei 4,8 ppm, das von einer zweiten Wasserfraktion stammen könnte.

Tab. 5-1: Diffusionskoeffizienten des „freien“ Wassers in Manugel-DJX-Lösungen

Konzentration	10 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	20 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	40 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
D ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	2,21 ± 0,02	2,17 ± 0,02	2,08 ± 0,02

Wenn die Stabilität eines Polysaccharid/Wasser-Systems mit „gebundenem“ Wasser zusammenhängt, sollte die Diffusion des Wassers durch eine Calciumchloridzugabe stark beeinflusst werden, da bereits geringe Calciumchloridkonzentrationen in Manugel/Wasser-Systemen zu einem Übergang von einer hochviskosen Lösung zu einem Gel führen. Die Ergebnisse der Messungen zeigen jedoch, daß das CaCl<sub>2</sub> innerhalb der Meßgenauigkeit keinen Effekt auf die Wasserdiffusion hat (siehe Tabelle 5-2). Auch hier handelt es sich wieder um die Mittelwerte aus allen Einzeldiffusionskoeffizienten der zeitabhängigen Meßreihen (siehe Tabelle 8-3, Seite 144).

Tab. 5-2: Diffusionskoeffizienten des „freien“ Wassers in Calciumalginaten

Konzentration PS/CaCl <sub>2</sub> in g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	20 / 0,5	20 / 2,0	20 / 8,0	40 / 8,0
D ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	2,16 ± 0,01	2,14 ± 0,01	2,19 ± 0,04	2,16 ± 0,04

### 5.1.2.2 Manucol LHF

Auch beim Manucol, das dem Manugel sehr ähnlich ist, werden analoge Experimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser Meßreihen soll ein möglicher Einfluß des M/G-Verhältnisses auf die Wasserbindung überprüft werden, der beim Manucol genau entgegengesetzt zum Manugel ist (siehe Seite 64). Die Wasserdiffusion weist jedoch ein nahezu identisches Verhalten wie beim Manugel DJX auf (siehe Tabelle 5-3 sowie Tabelle 8-4, Seite 145), was den Schluß zuläßt, daß das M/G-Verhältnis keinen Effekt auf die Wasserdiffusion hat.

Weil auch das Manucol keine zeitabhängige Wasserdiffusion aufweist, können wiederum alle „einzelnen“ Diffusionskoeffizienten aus der Tabelle 8-4 für die Mittelwertbildung herangezogen werden.

Tab. 5-3: Diffusionskoeffizienten des „freien“ Wasser in Manucol-LHF-Lösungen

Konzentration	10 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	20 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	40 g <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
D ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	2,21 ± 0,01	2,14 ± 0,01	2,09 ± 0,02

### 5.1.2.3 Agarose

Um den Einfluß von geladenen Gruppen (Carboxylgruppen) auf die Wasserdiffusion zu überprüfen, wird neben den polyelektrolytischen Polysacchariden auch das neutrale Polysaccharid Agarose verwendet. Bei der Agarose wird nur eine Konzentration gemessen ( $c = 20 \text{ g}^{\text{l}^{-1}}$ ). Die freie Diffusion von Wasser liegt mit  $(2,22 \pm 0,02) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  etwas höher als dies bei den anderen Polysacchariden gleicher Konzentration der Fall ist (siehe Tabelle 8-5, Seite 145). Eine Zeitabhängigkeit der Diffusion, wie Pavesi (1996) sie gefunden hat, kann nicht reproduziert werden. Wie bei den vorher besprochenen Polysacchariden weist auch die Agarose ein, wenn auch schwaches, Wassersignal bei höheren Gradienten ( $3 \text{ Tm}^{-1}$ ) auf.

## 5.2 Diffusion des „verlangsamten“ Wasser

Wie bereits im vorherigen Abschnitt mehrfach erwähnt, fällt bei genauer Betrachtung der NMR-Spektren aller bisher besprochenen Proben auf, daß auch bei Gradienten von  $3 \text{ Tm}^{-1}$  noch ein Wassersignal detektierbar ist. Dieses ist unter der Annahme eines einzigen Diffusionskoeffizienten in der gemessenen Größe (etwa  $2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) nicht zu erwarten (siehe Abb. 3-15, Seite 58 bzw. Abb. 5-3, Seite 74). Dieses Signal stammt von mindestens einer zweiten Wasserfraktion, die einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten ( $< 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) aufweist. Diese Fraktion wird im folgenden als „verlangsamtes“ Wasser bezeichnet, das dazugehörige NMR-Signal „Restwassersignal“ genannt. Die Begründung, daß dieses Signal tatsächlich vom Wasser stammt wird in der Diskussion dargelegt.

Das Restwassersignal, dessen Resonanz auch bei 4,8 ppm auftritt, wird mit stärkeren Gradienten ( $3,0 - 8,0 \text{ Tm}^{-1}$ ) untersucht, um die entsprechend langsamere Diffusion dieser Moleküle bestimmen zu können (siehe Kapitel „Diffusionsmessungen“, Seite 59).

Durch die Verwendung höherer Gradienten tritt ein Filtereffekt der PFG-NMR auf (Stilbs, 1987; van Zijl et al., 1991; Hinton und Johnson, 1993). Die im vorherigen Kapitel besprochene Wasserphase bzw. die dazugehörigen Moleküle sind wegen ihrer hohen Beweglichkeit in den folgenden Experimenten nicht mehr detektierbar („Wasserunterdrückung“). Nur das „verlangsamte“ Wasser erzeugt noch ein NMR-Signal. Bei der Darstellung der Intensitätsverläufe in Abhängigkeit von den Gradienten werden jedoch auch die Werte aus den Untersuchungen mit schwachen Gradienten dargestellt ( $0,5 - 3,0 \text{ Tm}^{-1}$ ), um so den Unterschied zwischen den beiden „Fraktionen“ deutlicher zu machen.

### 5.2.1 Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa*

Das Restwassersignal ist im Biofilm stark ausgeprägt (siehe Abb. 5-4). Betrachtet man den gesamten (logarithmierten) Intensitätsverlauf des Wassersignals in Abhängigkeit von der

Gradientstärke, so erkennt man sofort, daß neben der bereits oben beschriebenen Diffusion des „freien“ Wassers (große, negative Steigung) noch mindestens eine Wasserfraktion mit deutlich niedrigerem Diffusionskoeffizienten vorhanden ist (kleine negative Steigung in Abb. 5-5). Eine detaillierte Berechnung mit Hilfe von Gleichung 3-11 (siehe Kapitel „Diffusionsmessungen“, Seite 59) ergibt für beide Biofilme (24 h bzw. 96 h Inkubationszeit) zwei Diffusionskoeffizienten mit Werten von  $(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $(9,4 \pm 0,5) \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Die angegebenen Fehler beziehen sich in diesem Fall auf die bei der biexponentiellen Regression auftretenden Abweichungen.

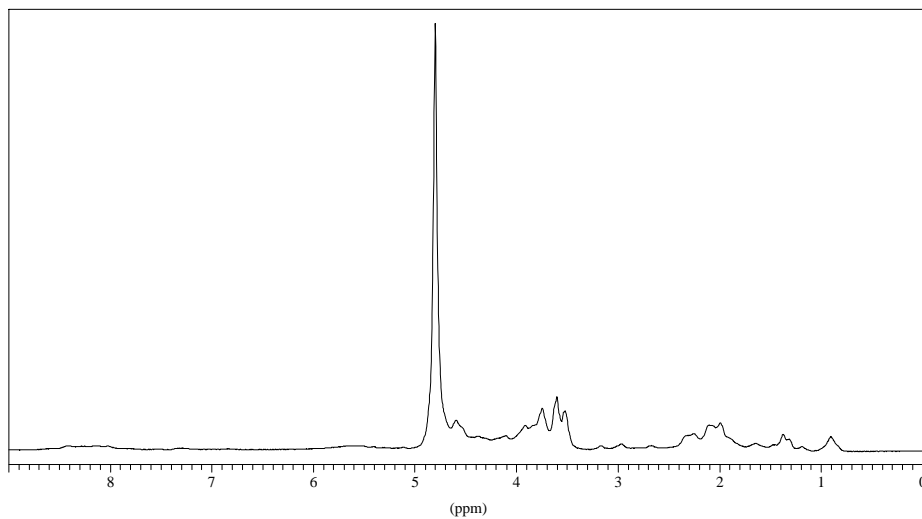


Abb. 5-4:  $^1\text{H}$ -Spektrum eines Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 mit Wasserunterdrückung. ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

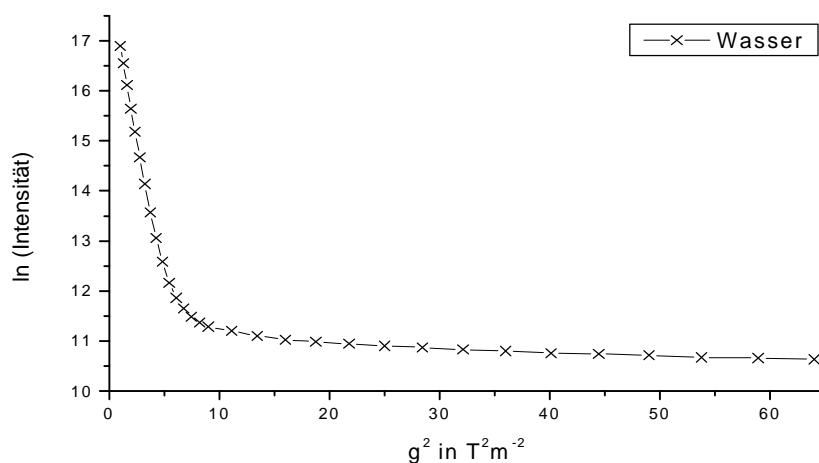


Abb. 5-5: Signalintensität des Wassersignals (logarithmiert) in einem Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* in Abhängigkeit von der Gradientenstärke (quadriert)

Eine zeitabhängige Messung ergibt, daß das Restwassersignal (bei 4,8 ppm) beim Biofilm bereits nach wenigen Millisekunden verschwindet (siehe Abb. 5-6). Auf diese Tatsache wird im Kapitel „Diskussion“ genauer eingegangen.

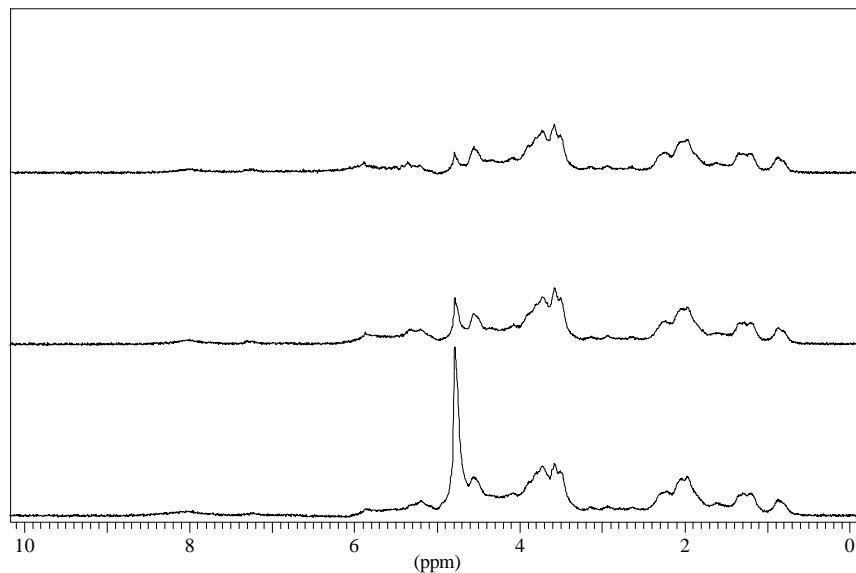


Abb. 5-6: Die Intensität des Restwassersignals bei 4,8 ppm nimmt in Biofilmspektren in Abhängigkeit von der Diffusionszeit rasch ab (von unten nach oben: 10 ms, 20 ms, 30 ms bei  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  und konstantem  $b$ -Faktor)

### 5.2.2 Polysaccharide

Auch bezüglich des Restwassersignals werden Experimente an Polysacchariden durchgeführt. Hierdurch können die möglichen Einflüsse auf das Entstehen dieser Wasserfraktion stark reduziert und somit systematischer untersucht werden, da nur noch das Polysaccharid sowie das Wasser im System vorhanden sind.

### 5.2.2.1 Manugel DJX

Zunächst stellt sich die Frage, ob die Intensität (entspricht der Menge des Wassers) des Restwassersignals von der Polysaccharidkonzentration abhängt. Mit einer konzentrationsabhängigen Meßreihe kann gezeigt werden, daß dies der Fall ist (siehe Abb. 5-7).

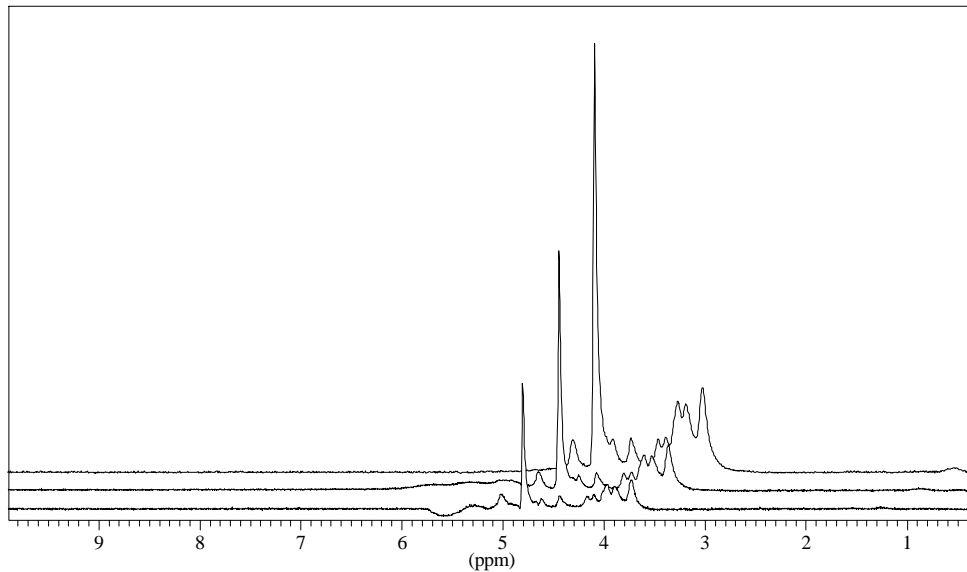


Abb. 5-7:  $^1\text{H}$ -Spektren mit Wasserunterdrückung ( $D = 10 \text{ ms}$ ;  $d = 1 \text{ ms}$ ;  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$ ) von Manugel-DJX-Lösungen mit aufsteigender Konzentration ( $c = 10 \text{ g l}^{-1}$ ;  $20 \text{ g l}^{-1}$ ;  $40 \text{ g l}^{-1}$ )

Bei der Betrachtung des gesamten Intensitätsverlaufs des Wassersignals ( $0,5 - 8,0 \text{ Tm}^{-1}$ ) erkennt man, daß für kleine Gradienten kein großer Unterschied zu einer reinen Wasserprobe besteht. Bei stärkeren Gradienten ( $> 2,0 \text{ Tm}^{-1}$ ) weichen die Kurvenverläufe jedoch wesentlich voneinander ab (siehe Abb. 5-8). Dies beweist, daß in den Manugel-DJX-Lösungen mindestens zwei Diffusionskoeffizienten von Wasser bestimmbar sind. Auch hier sieht man deutlich, daß die Signalintensität der zweiten Komponente konzentrationsabhängig ist.

Der relative Anteil des Signals ist in Tabelle 5-4 wiedergegeben. Er wird, wie in allen anderen Experimenten auch, durch Extrapolation der beiden Steigungsbereiche in den Intensitätskurven (siehe Abb. 5-8) auf den Wert  $g = 0 \text{ Tm}^{-1}$  ermittelt. Auf die Problematik, die die Bestimmung dieser relativen Anteile mit sich bringt, wird in der Diskussion näher eingegangen. Man kann an



Hand des Intensitätsverlaufes erkennen, daß die Diffusionskoeffizienten nur geringfügig von der Konzentration abhängen, da die Kurven annähernd parallel zueinander verlaufen.

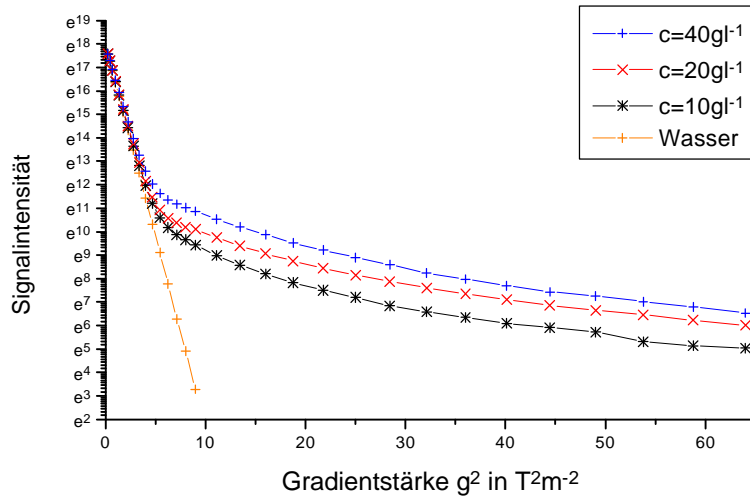


Abb. 5-8: Abhängigkeit der Intensität des Wassersignals in Manugel-DJX-Lösungen und in reinem Wasser von der Gradientstärke ( $D = 100\text{ ms}$ ,  $d = 0,316\text{ ms}$ )

Tab. 5-4: Anteil des Restwassersignals am gesamten Wassersignals in Manugel-DJX-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

Konzentration in $\text{gl}^{-1}$	10	20	40
Anteil des Restwassers in ‰	0,4	0,8	1,5

Wird eine zeitabhängige Meßreihe mit konstanten b-Faktor und einer Gradientstärke von  $g = 3\text{ Tm}^{-1}$  durchgeführt (siehe Kapitel „Experimente mit konstantem b-Faktor“, Seite 56), sieht man, daß die Intensität des Restwassersignals mit zunehmender Diffusionszeit zunächst ansteigt (siehe Abb. 5-9) und erst bei weiter steigender Diffusionszeit durch  $T_1$ -Effekte wieder abnimmt. Dieses Verhalten ist ungewöhnlich, da eine kontinuierliche Intensitätsabnahme durch  $T_1$ -Relaxation zu erwarten ist. Eine Erklärung für die Intensitätszunahme wird im Kapitel „Diskussion“ gegeben (siehe Seite 111). Bei den Polysaccharidsignalen (3,5 - 4,5 ppm) tritt kein vergleichbarer Effekt auf. Hier wird die Signalintensität ausschließlich durch die  $T_1$ -Relaxation bestimmt.

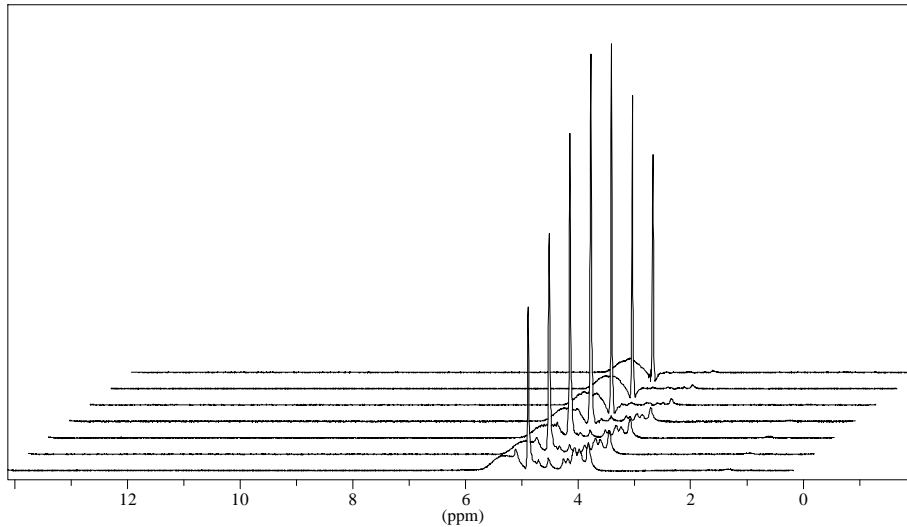


Abb. 5-9: Manugel-DJX-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit zunehmenden Diffusionszeiten (10 ms, 30 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 500 ms, 800 ms) und konstantem  $b$ -Faktor bei  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$

Eine Untersuchung des Intensitätsverlaufs für Gradienten größer als  $3 \text{ Tm}^{-1}$  zeigt (Abb. 5-8), daß neben den im Kapitel „Wasserdiffusion“ (siehe Seite 71) erwähnten Diffusionskoeffizienten noch zwei weitere Diffusionskoeffizienten zu finden sind. Diese sind deutlich zeitabhängig, wie man auch am Intensitätsverlauf erkennen kann (siehe Abb. 5-10).

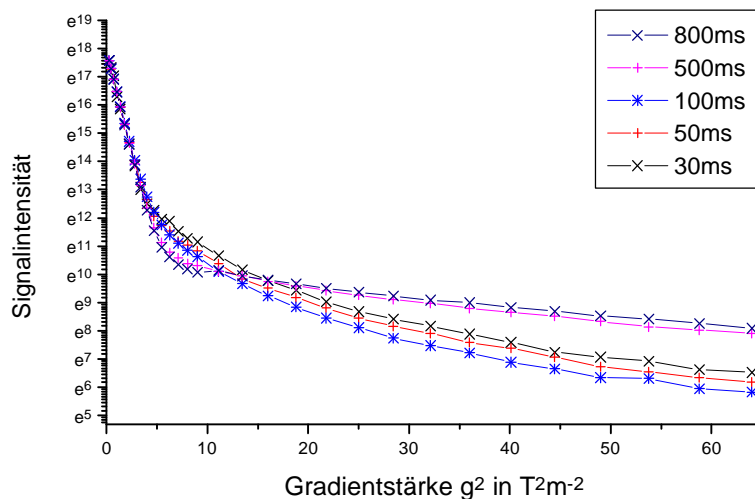


Abb. 5-10: Zeitabhängigkeit der Intensität des Wassersignals in einer Manugel-DJX-Lösung ( $40 \text{ g l}^{-1}$ )

Die Zeitabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten wird noch offensichtlicher, wenn man die Abbildung 5-11 sowie die Tabellen 8-6 bis 8-8 (siehe Seite 146) hinzuzieht.

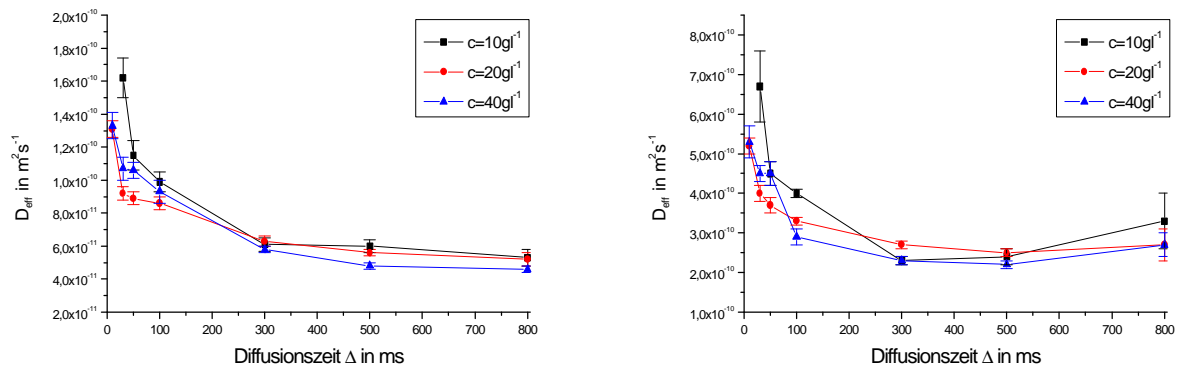


Abb. 5-11: Zeitabhängigkeit der beiden Wasserdiffusionskoeffizienten in Manugel-DJX-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen ( $g = 3 - 8 \text{ Tm}^{-1}$ )

Auffällig ist, daß die Konzentration des Polysaccharides keinen meßbaren Einfluß auf die Wasserdiffusionskoeffizienten der „verlangsamten“ Fraktion hat.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Signalintensität legt die Vermutung nahe, daß die detektierten Wassermoleküle direkt mit dem Polysaccharid in Verbindung stehen. Um dies zu überprüfen, wird eine Meßreihe mit einer Manugel-DJX-Lösung der Konzentration  $20 \text{ g l}^{-1}$  und verschiedenen Calciumchloridkonzentrationen erstellt. Bereits bei der niedrigsten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration von  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  ändert sich die Konsistenz der Lösung drastisch. Bei Konzentrationen ab  $2 \text{ g l}^{-1}$  liegt ein Gel vor. Die Ergebnisse dieser Meßreihe sind in der folgenden Abbildung 5-12 sowie in den Tabellen 8-9 bis 8-12 (siehe Seite 147) dargestellt.

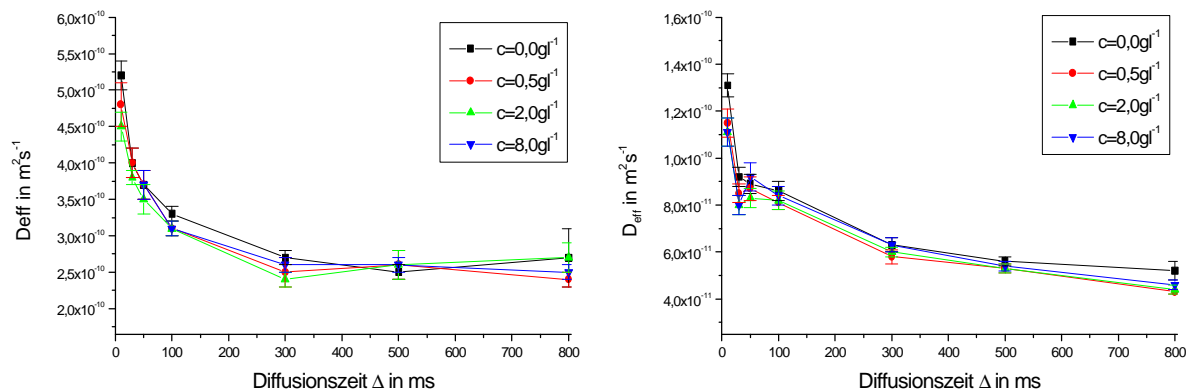


Abb. 5-12: Zeitabhängigkeit der beiden Wasserdiffusionskoeffizienten in Manugel-DJX-Lösungen ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen ( $g = 3 - 8 \text{ Tm}^{-1}$ )

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß das  $\text{CaCl}_2$  innerhalb der Meßgenauigkeit keinen Einfluß auf die Wasserdiffusion hat.

Die Intensität der Polysaccharidsignale nimmt mit steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration ab. Bei einer Konzentration von  $8 \text{ g l}^{-1}$  ist nur noch das Wasser- und kein Polysaccharidsignal mehr detektierbar (siehe Abb. 5-13), was auf eine Immobilisierung der Polymerelemente hindeutet (siehe Diskussion).

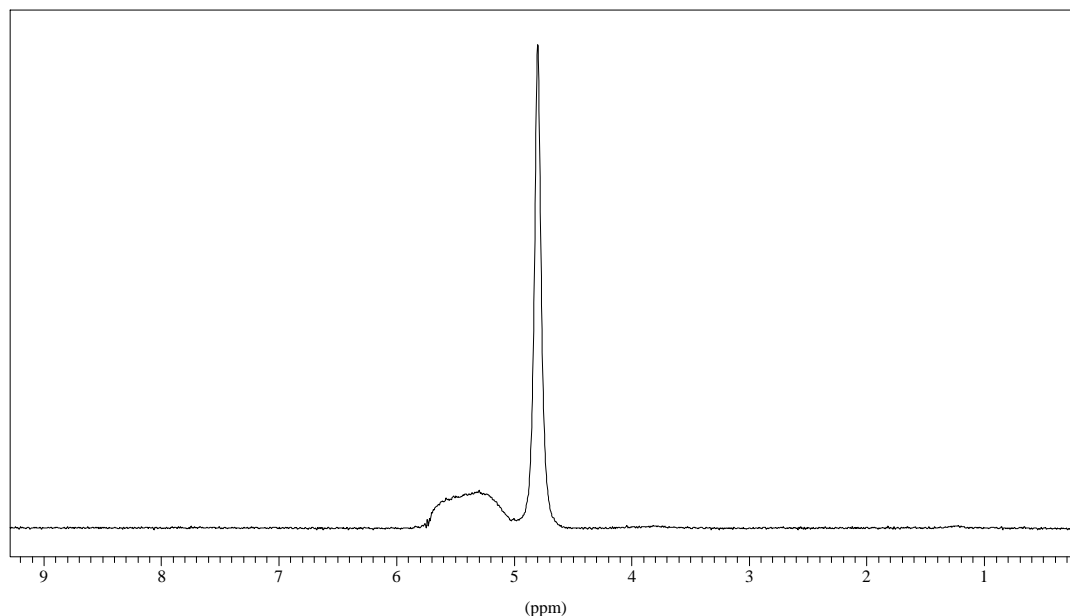


Abb. 5-13:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Manugel DJX ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit einer Calciumchloridkonzentration von  $8 \text{ g l}^{-1}$  ( $D = 100 \text{ ms}$ ,  $d = 0,316 \text{ ms}$ ,  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$ )

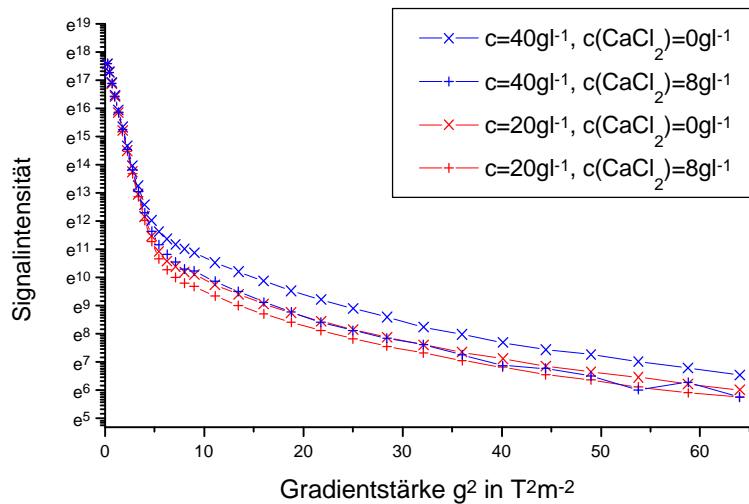


Abb. 5-14: Abhängigkeit der Intensität des Wassersignals in Manugel-DJX-Lösungen bzw. Manugel-DJX-Gelen (mit  $CaCl_2$ -Lösung) von der Gradientstärke ( $D = 100$  ms,  $d = 0,316$  ms,  $g = 3$   $Tm^{-1}$ )

Bei der Betrachtung der Signalintensitäten fällt auf, daß die Calcium-Zugabe den Anteil des Restwassersignals leicht verringert (siehe Abb. 5-14 sowie Tab. 5-5). Dieser Effekt ist bei der höheren Polysaccharidkonzentration ( $40$   $gl^{-1}$ ) deutlicher ausgeprägt. Hierauf wird in der Diskussion noch näher eingegangen.

Tab. 5-5: Anteil des Restwassersignals am gesamten Wassersignals in Manugel-DJX-Gelen unterschiedlicher Konzentration (Calciumgehalt  $8$   $gl^{-1}$ )

Konzentration in $gl^{-1}$	20	40
Anteil des Restwassers in ‰	0,6	1,0

### 5.2.2.2 Manucol LHF

Wie bereits erwähnt ist das Polysaccharid Manucol LHF strukturell dem Manucol DJX sehr ähnlich. Auch das Diffusionsverhalten des „verlangsamten“ Wassers weist gewisse Analogien auf, wie am Verlauf der Signalintensitäten des Wassersignals zu beobachten ist (siehe Abb. 5-15).

Die Kurven für die Konzentrationen  $20 \text{ g l}^{-1}$  und  $40 \text{ g l}^{-1}$  sind nahezu identisch, während die für  $10 \text{ g l}^{-1}$  einen Unterschied zum Manugel deutlich werden läßt. Diese Kurve liegt insgesamt etwas niedriger als beim Manugel und hat auch eine größere Steigung als die übrigen Kurven (sowohl im Bezug auf Manugel als auch auf Manucol). Hieraus resultiert ein signifikant höherer Diffusionskoeffizient des „Restwassers“ in der  $10 \text{ g l}^{-1}$ -Lösung des Manucols im Vergleich zu den höher konzentrierten Lösungen des Manucols.

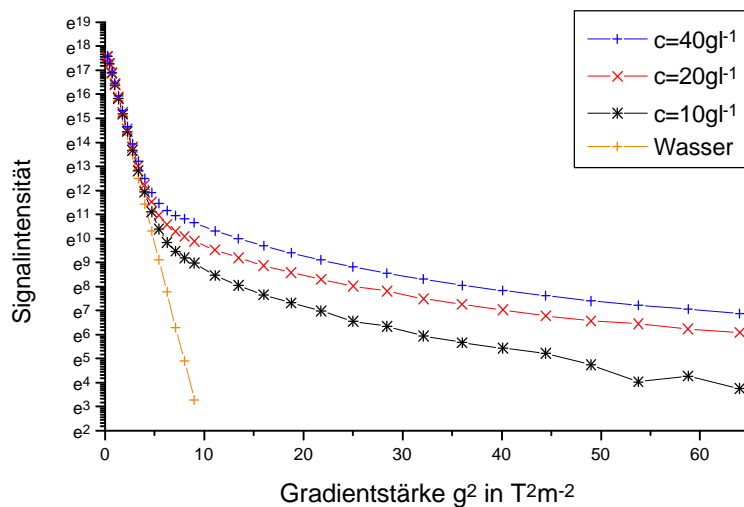


Abb. 5-15: Abhängigkeit der Intensität des Wassersignals in Manucol-LHF-Lösungen und in reinem Wasser von der Gradientstärke ( $D = 100 \text{ ms}$ ,  $d = 0,316 \text{ ms}$ )

Eine genaue Untersuchung der Intensitätsverläufe zeigt, daß auch beim Manucol zwei Wasserfraktionen detektierbar sind, die verringerte Diffusionskoeffizienten aufweisen. Die Diffusion ist ebenfalls zeitabhängig, wird aber zusätzlich durch die Konzentration beeinflusst (siehe Abb. 5-16 und Tab. 8-13 bis 8-15, Seite 149).

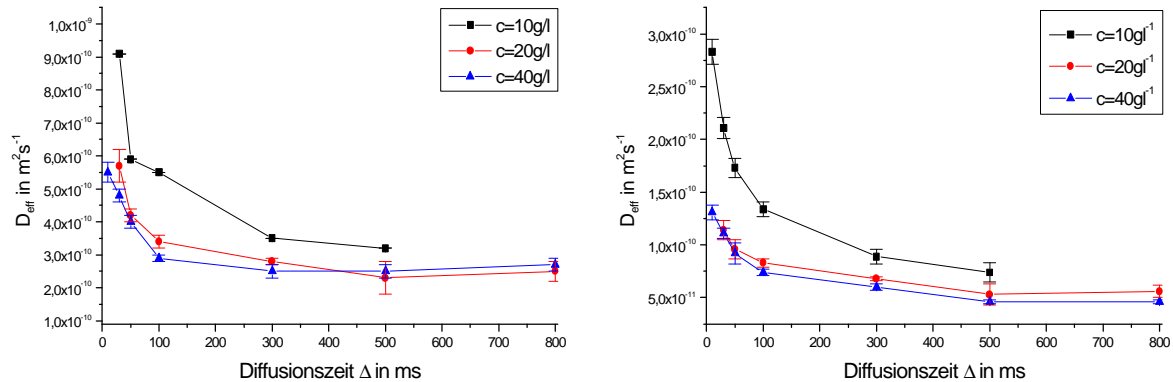


Abb. 5-16: Zeitabhängigkeit der beiden Wasserdiffusionskoeffizienten in Manucol-LHF-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen ( $g = 3 - 8 \text{ Tm}^{-1}$ )

Während die Manucol-LHF-Lösungen mit Konzentrationen von  $20 \text{ g l}^{-1}$  und  $40 \text{ g l}^{-1}$ , wie bereits erwähnt, im Rahmen der Meßgenauigkeit identische Diffusionskoeffizienten haben, liegen sie bei der Lösung mit  $10 \text{ g l}^{-1}$  signifikant höher. Der Grund hierfür ist jedoch noch nicht klar.

Der Wert für 10 ms kann bei den Konzentrationen  $10 \text{ g l}^{-1}$  und  $20 \text{ g l}^{-1}$  nicht exakt bestimmt werden, da nur 8 der 16 Datenpunkte auswertbar sind. Die verbleibenden Datenpunkte zeigten einen monoexponentiellen Verlauf (ohne Abbildung).

Die relativen Anteile des Restwassersignals sind etwas niedriger als beim Manugel DJX (siehe Tab. 5-6).

Tab. 5-6: Anteil des Restwassersignals am gesamten Wassersignals in Manucol-LHF-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

Konzentration in $\text{g l}^{-1}$	10	20	40
Anteil des Restwassers in ‰	0,2	0,5	1,3

### 5.2.2.3 Manucol LB

Das Manucol LB unterscheidet sich vom Manucol LHF im wesentlichen nur durch seine deutlich geringere Molmasse. Die Meßreihen an diesem Polysaccharid ermöglichen daher eine Aussage über den Einfluß der Kettenlänge des Polymers auf die verlangsamte Wasserfraktion. Noch einen Schritt weiter geht die Meßreihe mit hydrolysiertem Manucol LB, indem nur noch Oligomere vorhanden sind (Schürks, unveröffentlichte Ergebnisse).

Das Manucol LB ( $c = 20 \text{ gl}^{-1}$ ) weist wie das Manucol LHF ein ausgeprägtes Restwassersignal bei starken Gradienten auf. Die Intensität dieses Signals nimmt mit länger werdender Zeit  $\Delta$  bei konstantem b-Faktor und  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  zu (siehe Abb. 5-17). Die Diffusionskoeffizienten für das „verlangsamte“ Wasser im nativen Manucol LB liegen in der gleichen Größenordnung wie beim Manucol LHF (siehe Tab. 5-7). Ein Effekt der kürzeren Polymerkette ist nicht nachweisbar.

Tab. 5-7: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer nativen Manucol-LB-Lösung ( $20 \text{ gl}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
50	$3,7 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,5$
100	$3,3 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,4$
300	$2,9 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,3$
500	$2,5 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,8$
800	$2,5 \pm 0,4$	$4,8 \pm 1,2$

Im Gegensatz zum nativen Manucol LB zeigt das hydrolysierte Manucol LB kein signifikantes Restwassersignal mehr (siehe Abb. 5-18). Im Spektrum ist bei 4,8 ppm nur noch ein sehr kleines Signal zu erkennen, das ebenfalls mit zunehmender Diffusionszeit an Intensität gewinnt. Die Intensität ist jedoch bei allen Diffusionszeiten so extrem gering, daß keine Auswertung analog zu den vorangegangenen Polysacchariden möglich ist.

Durch die geringe Intensität des Restwassersignals sind die Polysaccharidsignale im Bereich zwischen 4,5 ppm und 4,75 ppm besser zu erkennen.



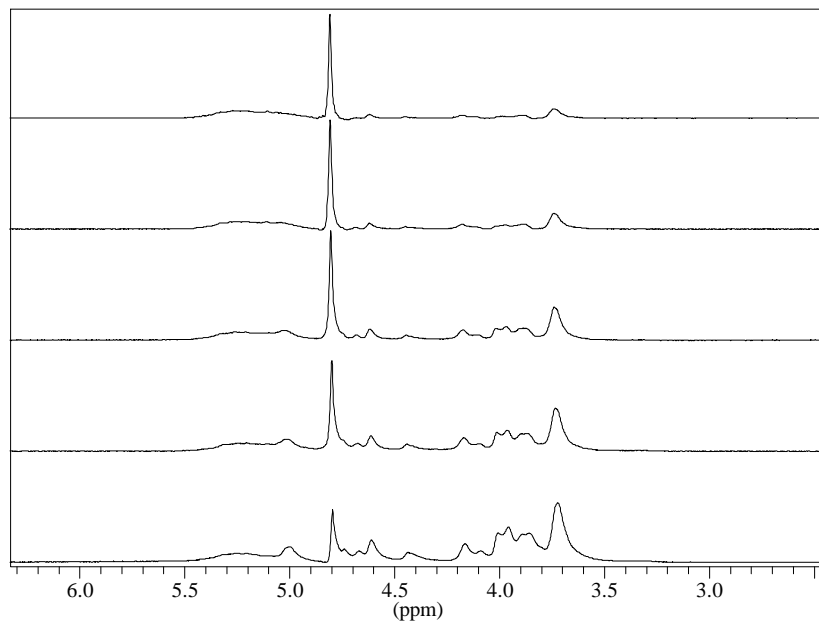


Abb. 5-17: Zeitabhängigkeit der Signalintensitäten bei konstantem  $b$ -Faktor ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$ ) in nativer Manucol-LB-Lösung ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ); von unten nach oben:  $D = 10 \text{ ms}$ ,  $50 \text{ ms}$ ,  $100 \text{ ms}$ ,  $300 \text{ ms}$ ,  $500 \text{ ms}$

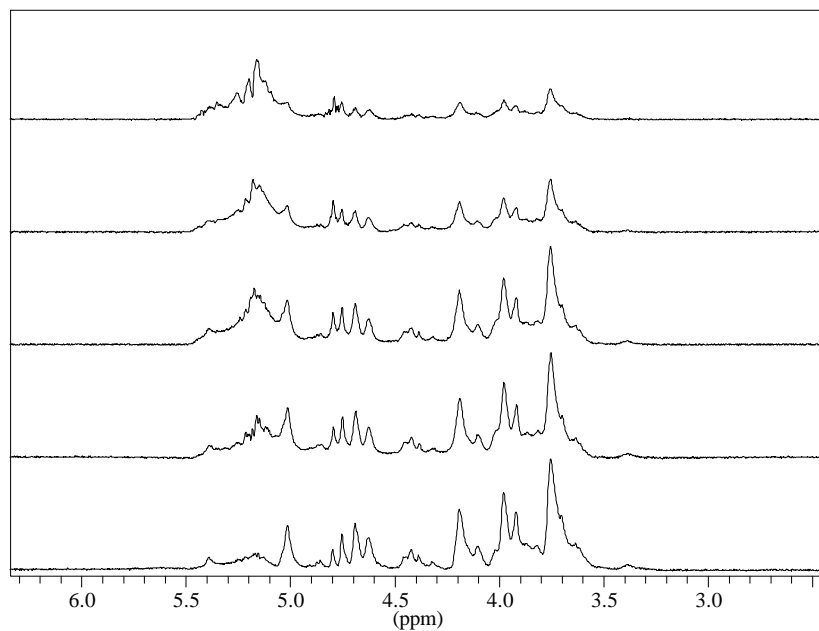


Abb. 5-18: Zeitabhängigkeit der Signalintensitäten bei konstantem  $b$ -Faktor ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$ ) in hydrolysierter Manucol-LB-Lösung ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ); von unten nach oben:  $D = 10 \text{ ms}$ ,  $50 \text{ ms}$ ,  $100 \text{ ms}$ ,  $300 \text{ ms}$ ,  $500 \text{ ms}$

#### 5.2.2.4 Agarose

Auch bei der Untersuchung des „verlangsamten“ Wassers wird die neutrale Agarose herangezogen, um eine Aussage über den Einfluß geladener Gruppen machen zu können. Das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis der Agarosespektren erschwert leider eine exakte Auswertung der Daten (siehe Abb. 5-31, Seite 102).

Das Restsignal des Wassers ist sehr schwach und wird erst bei längeren Diffusionszeiten und konstantem b-Faktor genügend intensiv, um eine Auswertung zu ermöglichen. In der Agarose sind nur etwa 0,01 % der Wassermoleküle in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt.

Auf eine Darstellung des Intensitätsverlaufes des Wassersignals in Abhängigkeit von der Feldgradientenstärke wird an dieser Stelle verzichtet. In einem späteren Abschnitt wird dieser im Vergleich mit anderen Polymer/Wasser-Systemen identischer Konzentration gezeigt (siehe Seite 95).

Bei der Agarose kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob ein oder zwei verlangsamte Wasserfraktionen existieren. In jedem Fall liegen die Diffusionskoeffizienten dieser Fraktionen signifikant über denen der anderen Polysaccharide gleicher Konzentration. Für Diffusionszeiten unter 300 ms ist keine Auswertung mehr durchführbar, da hier, wie oben schon erwähnt, das Signal/Rausch-Verhältnis zu schlecht wird und das Signal zusätzlich durch hohe Diffusionskoeffizienten ( $> 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) sehr schnell abnimmt. Dadurch stehen für die Auswertung maximal 8 der 16 Datenpunkte zur Verfügung. Die so erhaltenen Diffusionskoeffizienten sind folglich mit einem extrem großen Fehler behaftet

Tab. 5-8: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einem Agarose-Gel ( $20 \text{ g l}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
300	$6,1 \pm 0,8$	$10,0 \pm 0,4$
500	$5,1 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,6$
800	$4,4 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,5$

### 5.2.2.5 Alginat PA SG81

Neben den verschiedenen Modellpolysacchariden wird auch das isolierte und gereinigte Polysaccharid des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) untersucht. Dies erleichtert möglicherweise eine Zuordnung des Wassersignals im nativen Biofilm (siehe Diskussion).

Der Intensitätsverlauf des Restwassersignals weist bei der zeitabhängigen Messung ein anderes Verhalten als die anderen untersuchten Polysaccharide auf. Während bei den Algenalginaten bereits ab 10 ms ein deutliches Wassersignal erkennbar ist, zeigt das Alginat PA SG81 zu Beginn kaum Signalintensität. Daher ist eine Auswertung der Diffusionskoeffizienten im Bereich unter 100 ms nicht möglich. Im weiteren Verlauf der Meßreihe nimmt das Wassersignal im Alginat ständig zu, während es bei den anderen Polysacchariden nach einer unterschiedlich langen Diffusionszeit wieder abnimmt (siehe Abb. 5-19 bzw. Abb. 5-9, Seite 82). Dieser Effekt wird in der Diskussion näher erläutert. Im Alginat sind ungefähr 1,5 ‰ der Wassermoleküle verlangsamt.

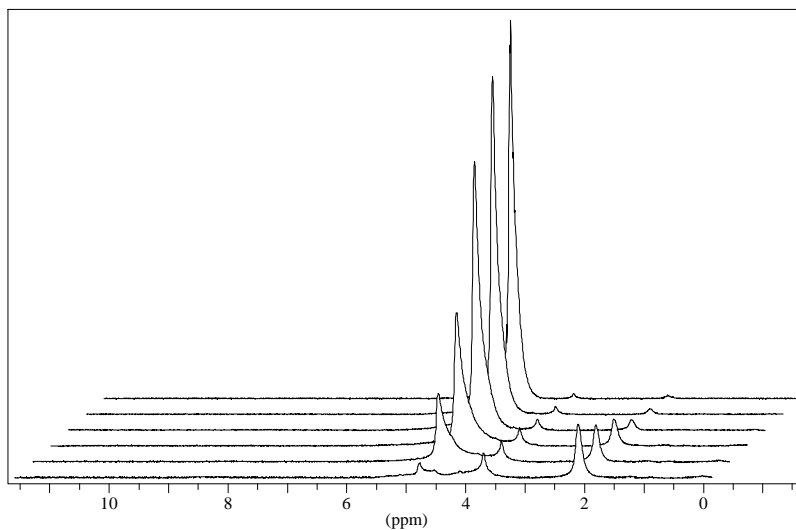


Abb. 5-19: Zeitabhängigkeit der Signalintensitäten bei konstantem  $b$ -Faktor im Alginat von PA SG81 ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ); von vorne nach hinten:  $D = 10 \text{ ms}$ ,  $50 \text{ ms}$ ,  $100 \text{ ms}$ ,  $300 \text{ ms}$ ,  $500 \text{ ms}$ ,  $800 \text{ ms}$ ;  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$

Auf eine Darstellung des Intensitätsverlaufes des Wassersignals in Abhängigkeit von der Gradientenstärke wird hier verzichtet. Diese Kurve wird im Vergleich mit anderen Polymer/Wassersystemen dargestellt (siehe Seite 95).

Wie der Tabelle 5-9 zu entnehmen ist, liegen die Diffusionskoeffizienten des „verlangsamten“ Wassers insgesamt etwas höher als bei den anderen geladenen Polysacchariden.

Tab. 5-9: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einem PA-SG81-Alginat (20  $\text{g l}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
100	$4,9 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,9$
300	$4,5 \pm 0,3$	$10,7 \pm 0,8$
500	$3,4 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,3$
800	$4,0 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,6$

### 5.2.3 „Künstliche“ Polymere

In diesem Abschnitt werden die Meßergebnisse von drei Polymer/Wasser-Systemen dargestellt. Hierbei werden die Polymere Polyethylenglykol 6000 (PEG), Natrium-Polyacrylat 30000 (NaPAC) sowie Polyvinylalkohol 22000 (PVA) mit einer Konzentration von je 2 Gew.-% untersucht. Ziel der Messungen ist es, den Ursprung des bei den Polysacchariden zu beobachtenden Restwassersignals zu ermitteln. Hierbei bieten sich die oben genannten Polymere an, da sie jeweils eine der drei bei den Polysacchariden vorkommenden funktionellen Gruppen tragen. Dies ermöglicht es, gezielt nach der funktionellen Gruppe zu suchen, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnte. Es handelt sich hierbei um Etherbrücken (PEG), Carboxygruppen (NaPAC) und Hydroxylgruppen (PVA).

Auf eine Zuordnung der Signale in den Spektren wird verzichtet, da nur das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit des Wassersignals bei 4,8 ppm von Interesse ist.

Wie in den Abbildungen 5-20 bis 5-22 zu erkennen ist, zeigt keines der drei Systeme ein Wassersignal, das auf eine verlangsamte Wasserfraktion schließen läßt. Dies legt die Vermutung nahe, daß das „verlangsamte Wasser“ nicht mit direkten Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängt.

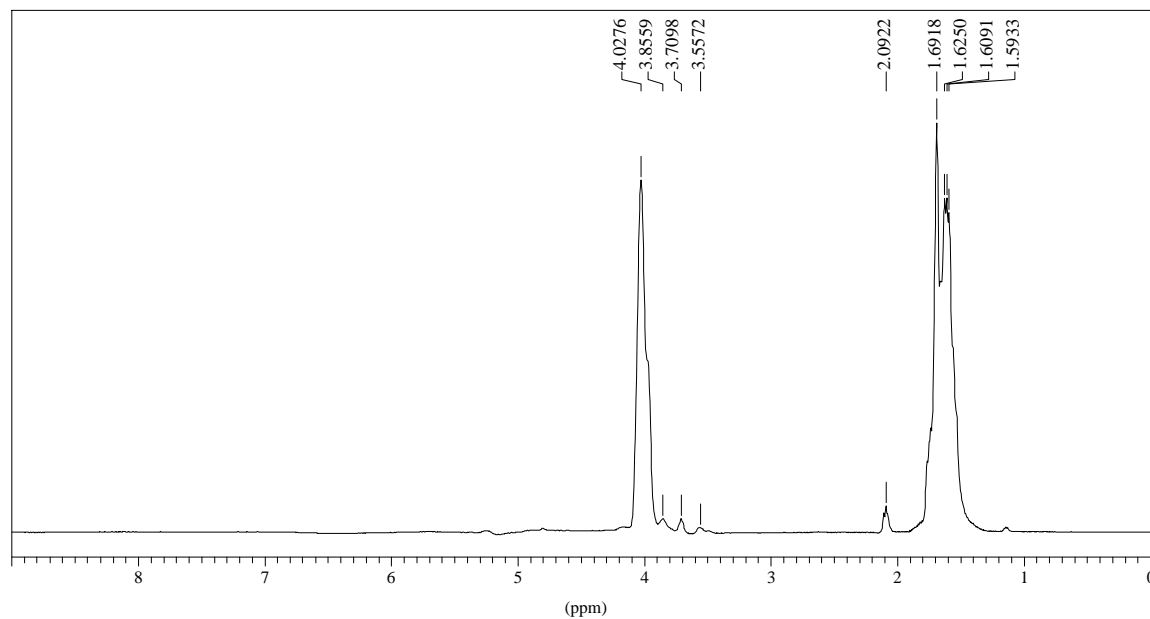


Abb. 5-20:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Polyvinylalkohol-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

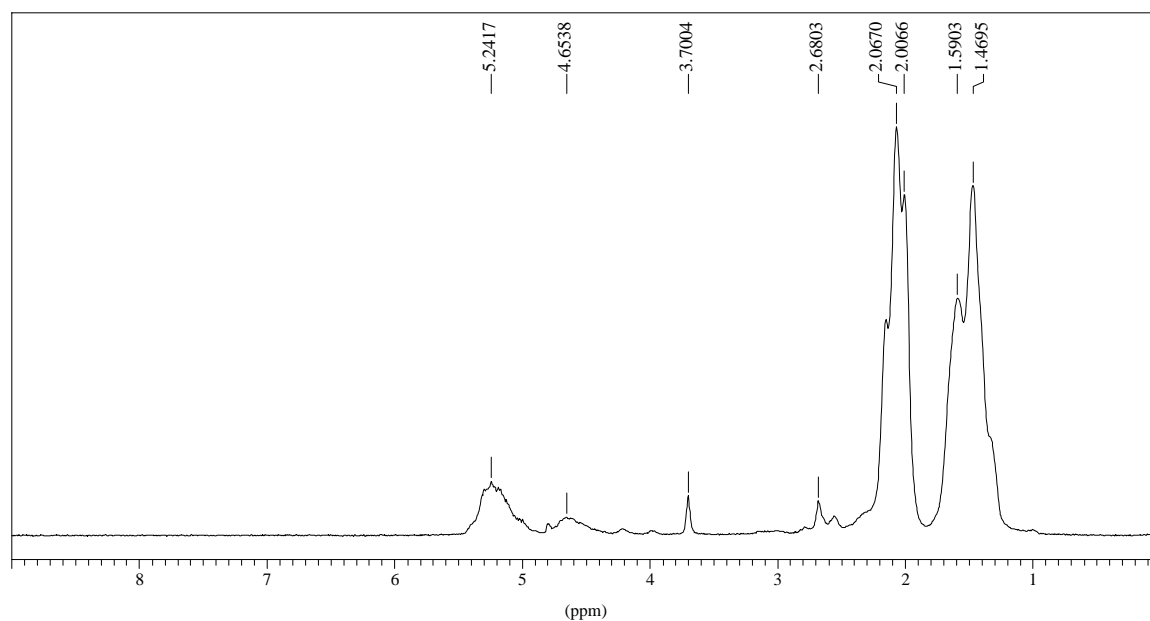


Abb. 5-21:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Natrium-Polyacrylat-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

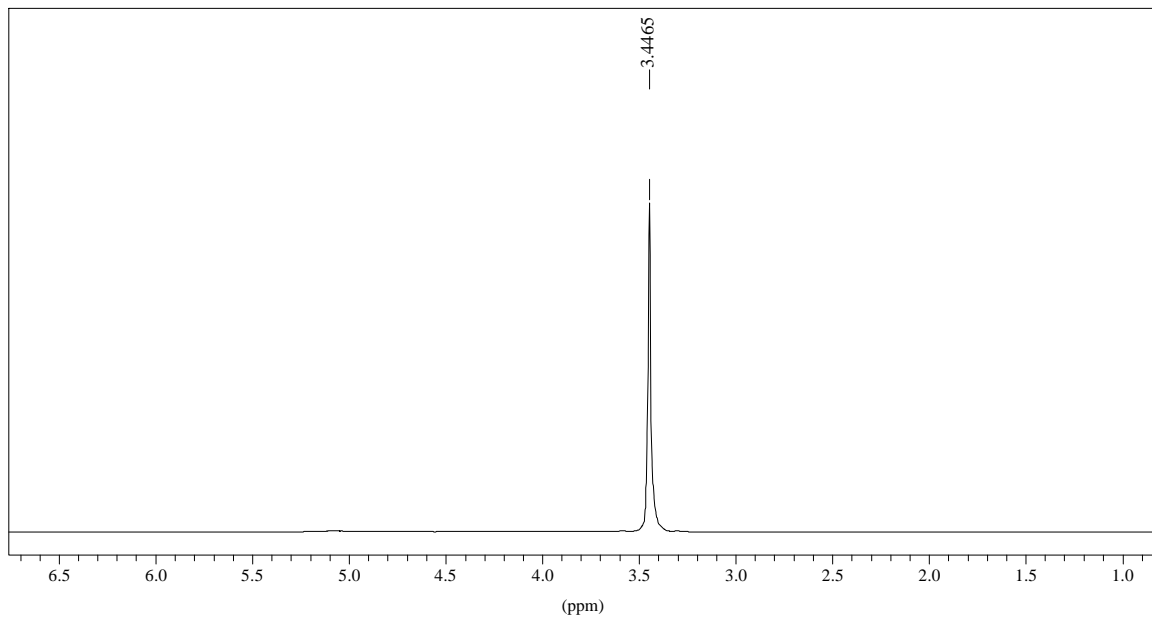


Abb. 5-22:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Polyethylenglykol-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

#### 5.2.4 Gelatine

Da die EPS wie in einem früheren Abschnitt erwähnt (siehe Kapitel „Verwendete Materialien und Geräte“, Seite 61) auch einen größeren Anteil Proteine enthalten, wird mit Hilfe des Modellproteins Gelatine der Einfluß von Proteinen auf die Wassermoleküle untersucht. Hierbei bietet sich die Gelatine insbesondere deshalb an, weil diese sowohl als Gel wie auch als Lösung eingesetzt werden kann.

Im Gegensatz zu den Polysacchariden zeigt die Gelatine weder im Gel- noch im Sol-Zustand ein Restwassersignal bei stärkeren Gradienten ( $\geq 3 \text{ Tm}^{-1}$ ). Das bedeutet, daß die Gelatine offensichtlich keinen (detektierbaren) Einfluß auf die Wassermoleküle in ihrer Umgebung hat (siehe Abb. 5-23).

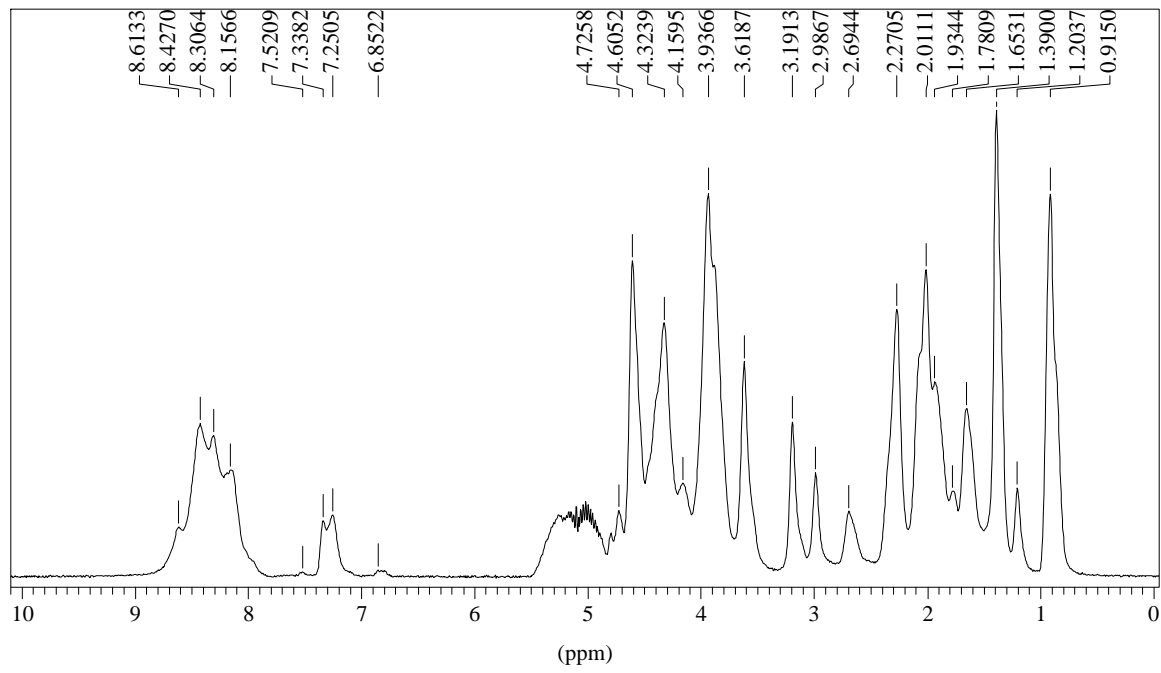


Abb. 5-23:  $^1\text{H}$ -Spektrum ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ ) von Gelatine ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ )

### 5.3 Vergleich verschiedener Polymer/Wasser-Systeme

Betrachtet man die Intensitätsverläufe der untersuchten Polymer/Wasser-Systeme gleicher Konzentration ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ), so kann man einige interessante Unterschiede feststellen (siehe Abb. 5-24). Die polyelektrolytischen Polysaccharide Manucol, Manugel und Alginat PA SG81 zeigen sehr ähnliche Kurvenverläufe. Bei der neutralen Agarose hingegen stellt die verlangsamte Wasserfraktion eine deutlich kleinere Fraktion als bei den anderen Polysacchariden dar.

Die Polymere Gelatine, PVA, PAS und PEG zeigen gar keine verlangsamte Wasserfraktion (PAS und PEG ohne Abbildung).

Diese Beobachtung wird in der Diskussion ausführlich behandelt.

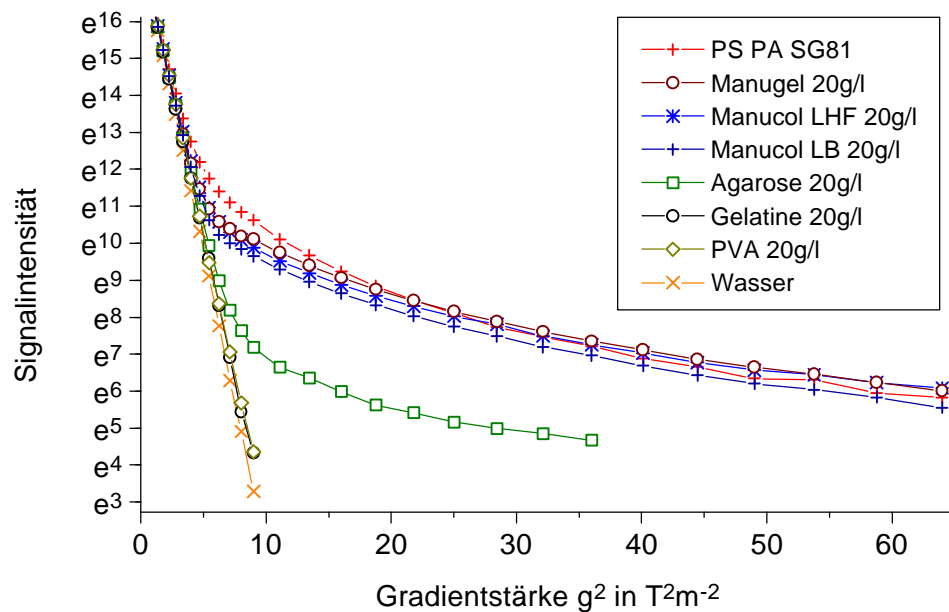


Abb. 5-24: Abhängigkeit der Intensität des Wassersignals unterschiedlicher Polymer/Wasser-Systeme gleicher Konzentration von der Gradientstärke ( $D = 100 \text{ ms}$ ,  $d = 0,316 \text{ ms}$ )



## 5.4 Signalzuweisung

Bevor im nächsten Abschnitt auf die Diffusion der Polymere eingegangen wird, sollen in diesem Abschnitt die NMR-Signale der einzelnen Polymere zugewiesen werden. Die Resonanzen des Biofilms werden, soweit möglich, zugeordnet, da die Komponenten des Biofilms Thema eines späteren Abschnittes sein werden.

### 5.4.1 *Pseudomonas aeruginosa* SG81

Wie in Abb. 5-25 zu erkennen ist, zeigt ein *Pseudomonas-aeruginosa*-Biofilm ein sehr komplexes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Vier der insgesamt 29 Signale lassen sich sehr einfach zuweisen. Die Signale bei 3,52 ppm, 3,60 ppm sowie 3,74 ppm stammen von dem als Nährstoff zugegebenen Glycerin. Das Signal bei 4,80 ppm wird von weniger mobilen Wassermolekülen hervorgerufen (siehe Seite 107).

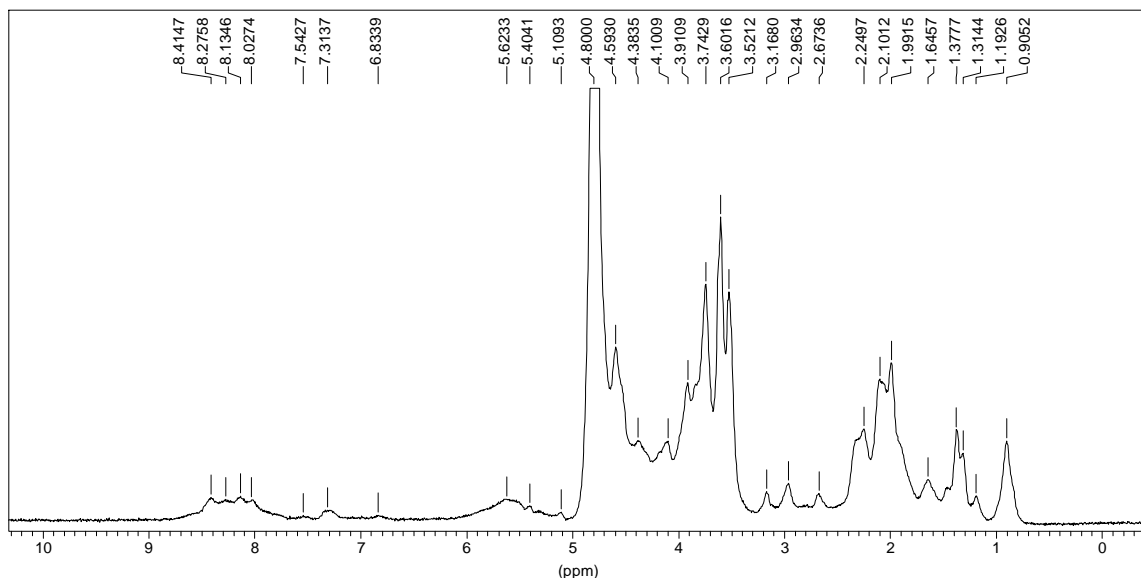


Abb. 5-25:  $^1\text{H}$ -Spektrum eines nativen PA-Biofilms (24 h bei 36 °C) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

Um die anderen Signale sicher zuordnen zu können, wird ein Biofilm in mehreren Schritten aufgearbeitet. Zunächst werden nur die Bakterien abgetrennt. Das so erhaltene Spektrum ist in Abbildung 5-26 dargestellt. Es unterscheidet sich nur in wenigen Punkten von dem eines nativen Biofilms. Zum einen ist aufgrund der starken Verdünnung während der Aufarbeitung die Intensität der Filmsignale stark zurückgegangen, was sich an dem deutlich intensiveren Störsignal bei ca. 5,5 ppm bemerkbar macht. Bei den Filmsignalen fällt auf, daß die Glycerinsignale nicht mehr detektierbar sind. Hier sind jetzt die in Abbildung 5-25 vom Glycerin verdeckten Signale zu erkennen. Der deutlichste Unterschied zeigt sich jedoch beim Wassersignal. Während das Biofilmspektrum trotz Wasserunterdrückung vom Wassersignal dominiert wird, ist dieses im „bakterienfreien“ Biofilm deutlich schwächer ausgeprägt.

Ein weiterer Aufarbeitungsschritt entfernt alle kleinen Moleküle mittels Dialyse. Hierdurch werden die Spektren der EPS-Lösung mit Wasserunterdrückung nicht beeinflusst. Nur die klassischen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren unterscheiden sich dadurch, daß in der dialysierten Lösung die Glycerinsignale fehlen, die in der EPS-Lösung ohne Wasserunterdrückung gerade noch sichtbar sind (ohne Abbildung). Durch weitere Aufarbeitungsschritte kann das reine Polysaccharid (Alginate) des *Pseudomonas aeruginosa* gewonnen werden.

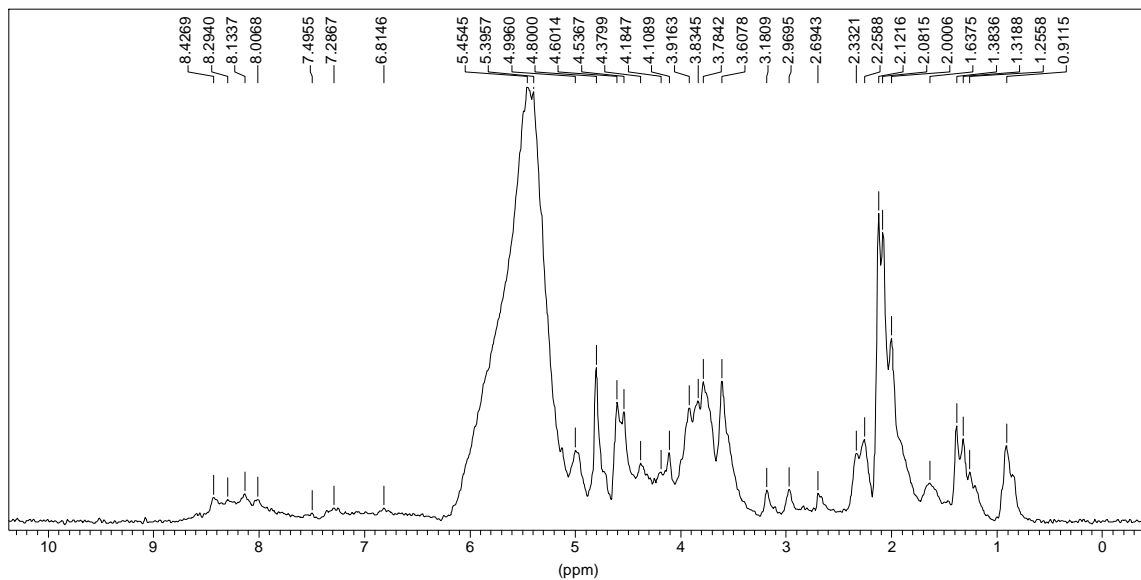


Abb. 5-26:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines bakterienfreien „*Pseudomonas-aeruginosa*-Biofilms“ mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $D = 10 \text{ ms}$  und  $d = 1 \text{ ms}$ )

Obwohl das Alginat-Spektrum strenggenommen in den Abschnitt Polysaccharide gehört, wird es bereits hier besprochen.

Im Vergleich zu den anderen Polysacchariden (siehe dort) zeigt das Alginat nur sehr wenige Resonanzen (siehe Abb. 5-27).

Von seinem grundsätzlichen Aufbau ähnelt das Alginat PA SG81 den Polysacchariden Manucol LHF und Manugel DJX bis auf einen wesentlichen Unterschied: Beim Alginat sind einige Mannuronatmonomere acetyliert, die das Verhalten des Polysaccharides beeinflussen können. Die Kettenlänge des Alginats ist deutlich größer als dies beim Manugel und beim Manucol der Fall ist. Dies führt dazu, daß eine Lösung von  $20 \text{ g l}^{-1}$  deutlich zähflüssiger als die entsprechenden Lösungen von Manugel und Manucol ist. Dies spiegelt sich auch im Spektrum wieder (siehe Abb. 5-27). Die Signale der C-H-Protonen der Zuckerringe (3,3 - 4,5 ppm) weisen deutlich verbreiterte Linienformen auf, was auf eine größere Rigidität hinweist (vergleiche z. B. mit Abb. 5-29, Seite 101).

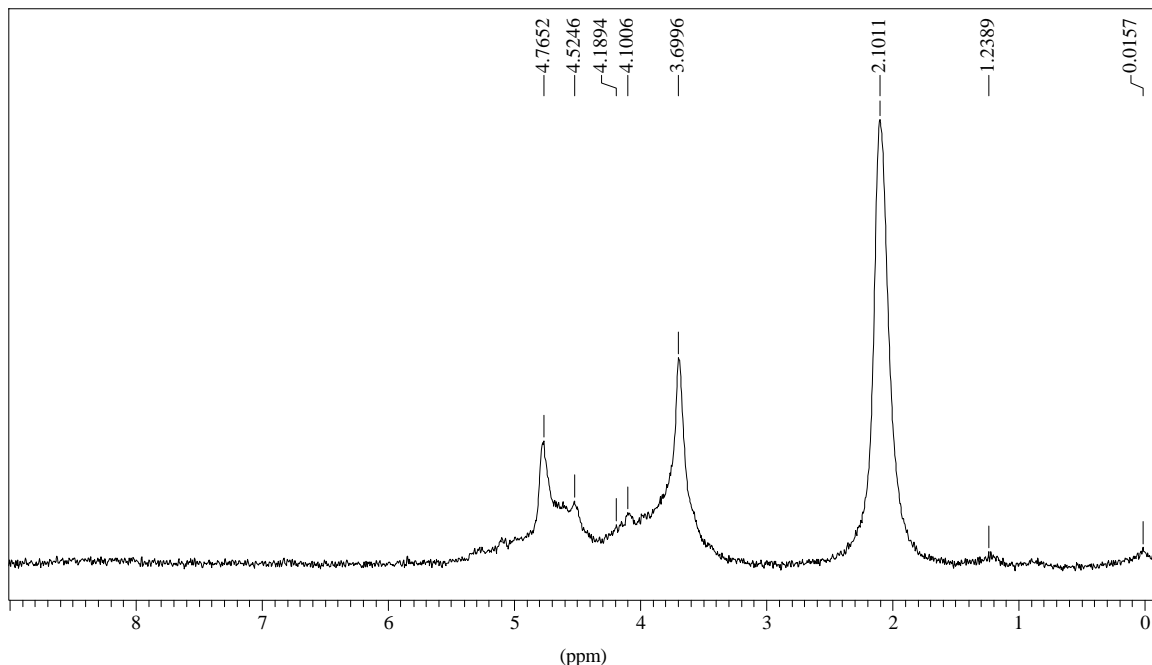


Abb. 5-27:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Polysaccharid-Lösung des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

Besonders auffällig ist das sehr starke Signal der Acetylgruppe (2,10 ppm). Es ist im Vergleich zu den anderen Protonensignalen viel zu intensiv. Eine Erklärung hierfür wird im Kapitel „Diskussion“ gegeben.

Da die EPS eines *Pseudomonas-aeruginosa*-Biofilms fast ausschließlich aus Polysacchariden und Proteinen bestehen, liegt die Vermutung nahe, daß die meisten der noch nicht identifizierten Resonanzen von Proteinen stammen. In der Tabelle 8-17 (siehe Seite 151) sind alle Biofilmresonanzen und die möglichen Aminosäure-Protonenresonanzen aufgelistet.

Besonders deutlich wird diese Vermutung bestätigt, wenn ein Biofilmspektrum mit einem Gelatinespektrum verglichen wird (siehe Abb. 5-28). Die beiden Spektren sind im wesentlichen identisch, was zeigt, daß qualitativ betrachtet fast alle Signale in einem Biofilm Proteinsignale sind.

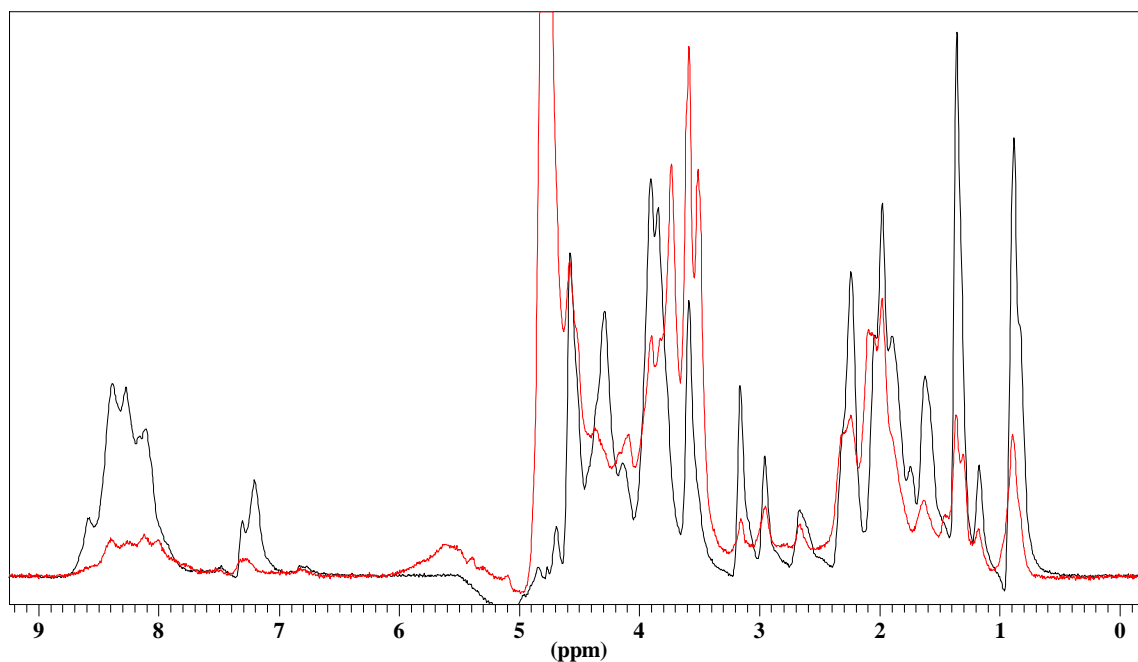


Abb. 5-28: Vergleich des  $^1\text{H}$ -Spektrums eines *Pseudomonas-aeruginosa*-Biofilms (rot) mit dem eines Gelatine-Gels (beide mit Wasserunterdrückung  $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

## 5.4.2 Polysaccharide

In dieser Arbeit werden fünf Polysaccharide Manugel DJX, Manucol LHX, Manucol LB, Agarose sowie das aus den verwendeten Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 isolierte Alginat benutzt. In der Abbildung 5-29 ist das  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Manugel-DJX-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) dargestellt.

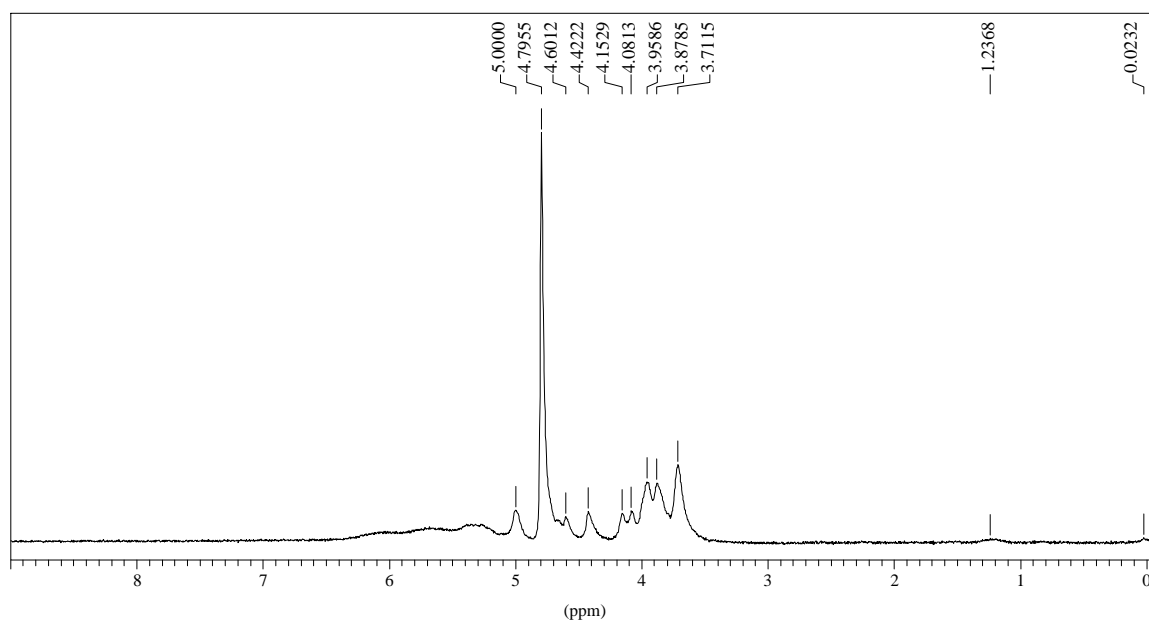


Abb. 5-29:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Manugel-DJX-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

Die Signale in diesem Spektrum können wie folgt zugeordnet werden: Im Bereich von 3,7 ppm bis 4,6 ppm findet man die Signale der aliphatischen Ringprotonen der Monomereinheiten. Das Signal bei 4,8 ppm ist das Restsignal des Wassers, das trotz Wasserunterdrückung noch deutlich erkennbar ist.

Das Signal bei 5,00 ppm ist nicht exakt zuzuordnen. Es könnte sich um Hydroxylprotonen der Zuckermonomere handeln. Es besteht aber das Problem, daß ein nicht reproduzierbares Störsignal im Bereich von 5 - 6 ppm eine sichere Interpretation von Signalen in diesem Bereich unmöglich

macht. Die Signale bei 0,03 ppm und 1,24 ppm sind derzeit nicht zuweisbar. Das Spektrum von Manucol LHF (siehe Abb. 5-30) unterscheidet sich nicht wesentlich von dem des Manugels, da es aus den gleichen Monomeren zusammengesetzt ist. Da die Spektren von Manucol LB und Manucol LHF identisch sind, wird auf eine zusätzliche Darstellung des Spektrums von Manucol LB an dieser Stelle verzichtet.

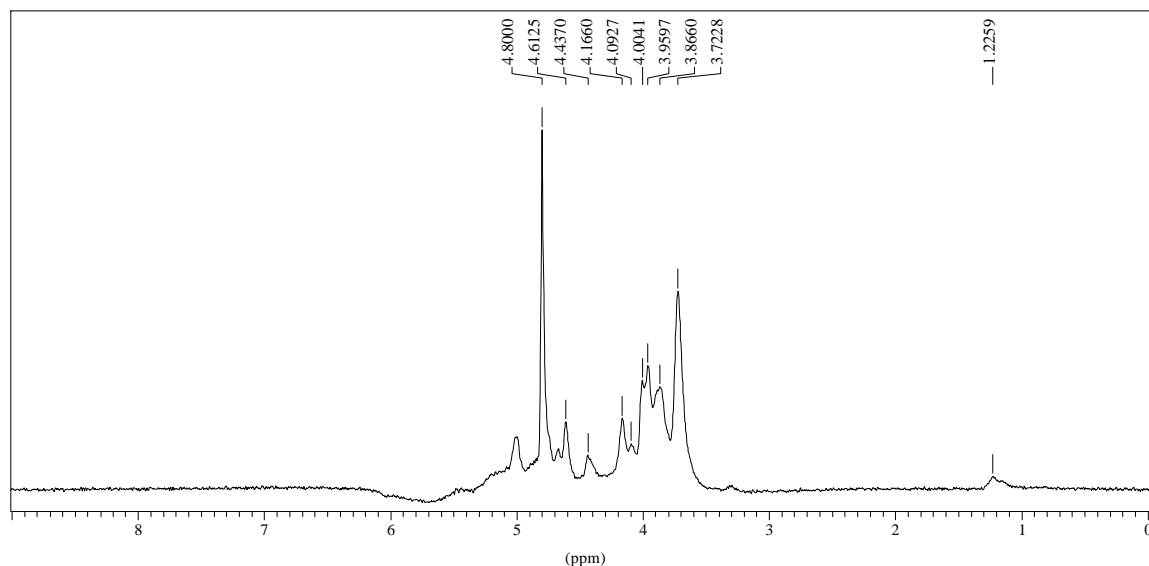


Abb. 5-30:  $^1\text{H}$ -Spektrum einer Manucol-LHF-Lösung ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

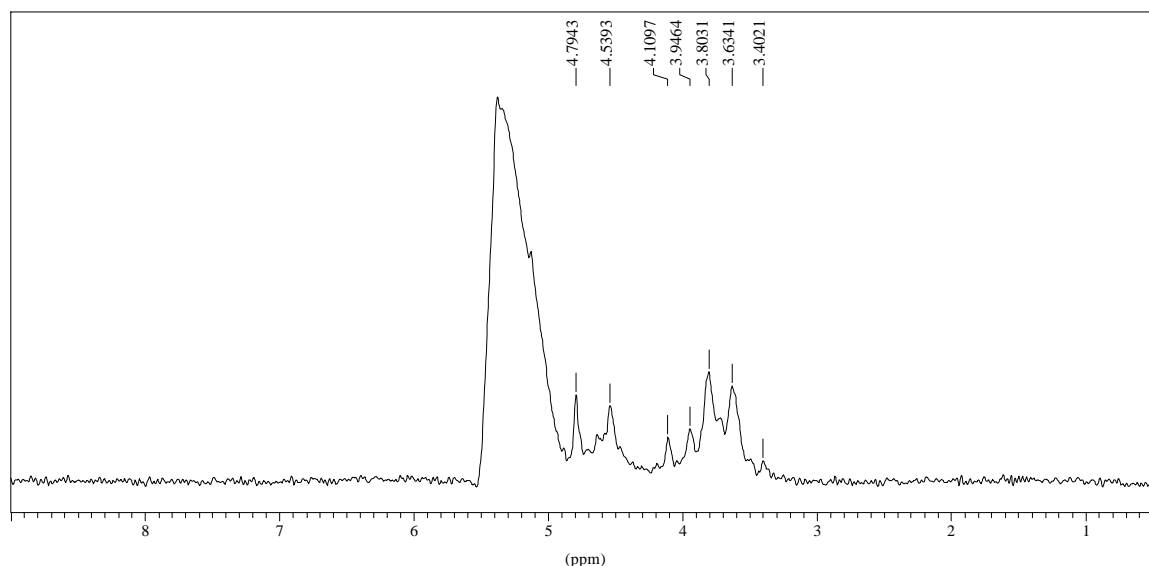


Abb. 5-31:  $^1\text{H}$ -Spektrum eines Agarose-Gels ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $\mathbf{D} = 10 \text{ ms}$  und  $\mathbf{d} = 1 \text{ ms}$ )

Die Agarose zeigt unter vergleichbaren Bedingungen ein Spektrum mit einem sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis. Das Störsignal bei etwa 5 - 6 ppm dominiert (siehe Abb. 5-31). Die chemischen Verschiebungen im Agarosespektrum ähneln denen der Manugel- bzw. Manucolspektren, sind aber wegen der anderen Monomere (2,3-Anhydro-Galactose und Galactose) nicht identisch.

### 5.4.3 Gelatine

In dieser Arbeit wird Gelatine als einziges Reinprotein verwendet. Das  $^1\text{H}$ -Spektrum der Gelatine ist in Abbildung 5-32 dargestellt. Eine genaue Zuweisung der einzelnen Linien ist schwierig, da die verschiedenen Aminosäuren zum Teil sehr ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen. Hinzukommt, daß die chemische Verschiebung der einzelnen Protonensignale abhängig vom untersuchten Protein unterschiedliche Werte annehmen kann. Eine Tabelle mit den entsprechenden mittleren chemischen Verschiebungen der Aminosäurereste befindet sich im Anhang (Tab. 8-17; siehe Seite 151).

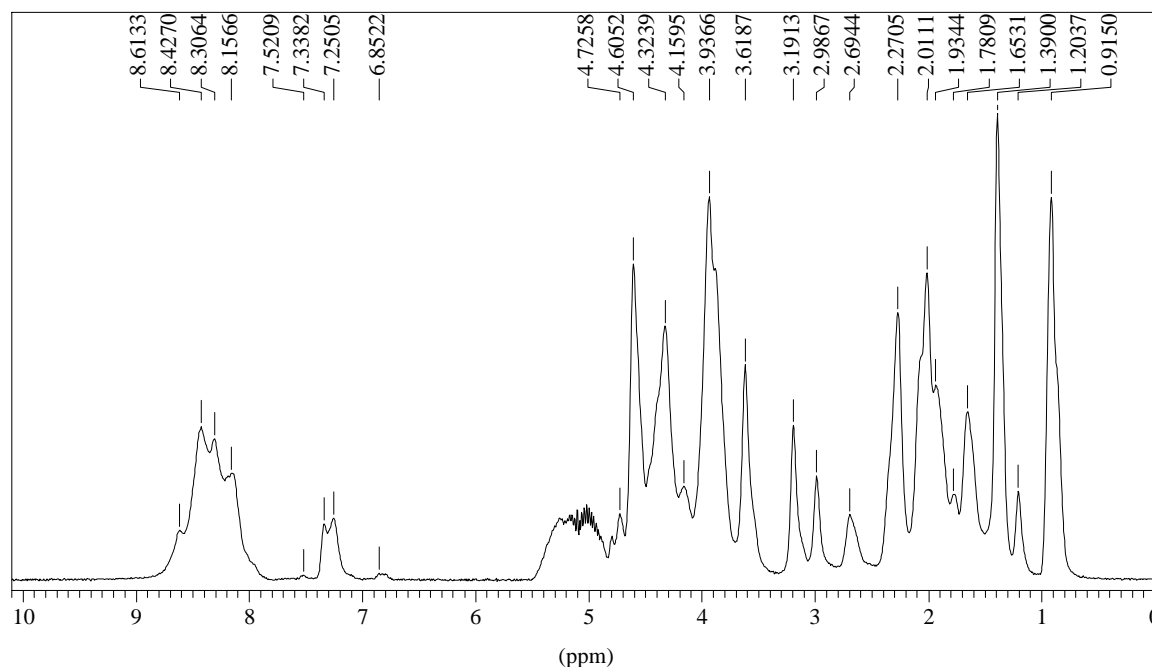


Abb. 5-32:  $^1\text{H}$ -Spektrum von Gelatine ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit Wasserunterdrückung ( $g = 3 \text{ Tm}^{-1}$  bei  $D = 10 \text{ ms}$  und  $d = 1 \text{ ms}$ )

## 5.5 Diffusion der Polymere

Die Diffusion der Polymere wird bestimmt, um zu überprüfen, ob eine Korrelation der Polymerbeweglichkeit mit der Wasserdiffusion möglich ist (Yamada-Nosaka und Tanzawa, 1991).

### 5.5.1 Manugel DJX

Die Diffusionskoeffizienten der Polysaccharidsignale werden bei einer Diffusionszeit von 100 ms und einer Gradientenpulslänge von 1,0 ms ( $c = 20 \text{ gl}^{-1}$  und  $40 \text{ gl}^{-1}$ ) bzw. 0,6 ms ( $c = 10 \text{ gl}^{-1}$ ) ermittelt. Hierbei wird nicht jedes einzelne Polysaccharidsignal betrachtet, sondern die Intensitäten aller Signale von 3,3 - 4,5 ppm summiert. Die angegebene Standardabweichung bezieht sich hierbei nicht auf Wiederholungsmessungen, sondern auf die durch die Regression entstandene Standardabweichung. Das Ergebnis ist in der Tabelle 5-10 dargestellt. Es sind bei allen Konzentrationen zwei deutlich unterschiedliche Diffusionskoeffizienten zu bestimmen.

Tab. 5-10: Polysaccharid-Diffusionskoeffizienten der Manugel-DJX-Lösungen

Konzentration	10 $\text{gl}^{-1}$	20 $\text{gl}^{-1}$	40 $\text{gl}^{-1}$
$D_1$ ( $\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	$3,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$
$D_2$ ( $\cdot 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	$3,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$

Durch die Konzentrationsabnahme von  $20 \text{ gl}^{-1}$  auf  $10 \text{ gl}^{-1}$  nimmt der Diffusionskoeffizient um etwa 23 % zu, wohingegen die Werte für Konzentrationen von  $20 \text{ gl}^{-1}$  und  $40 \text{ gl}^{-1}$  im Rahmen der Fehler identisch sind.

Da eine Calciumchloridzugabe bei Manugel-DJX-Lösungen zu einer Gelbildung führt, ist eine Verringerung der Polysaccharid-Diffusionskoeffizienten zu erwarten. Die Diffusion der detektierbaren Polysaccharidmoleküle bleibt jedoch unbeeinflusst (siehe Tabelle 5-11). Die Ursache hierfür wird in der Diskussion dargelegt. Die Werte für die höchste eingesetzte Calciumchlorid-



konzentration von  $8 \text{ g l}^{-1}$  fehlen, da, wie bereits erwähnt, bei dieser Konzentration kein Polysaccharidsignal mehr detektierbar ist.

Tab. 5-11: Polysaccharid-Diffusionskoeffizienten der Calciumalginat

Konzentration $\text{CaCl}_2$	$0 \text{ g l}^{-1}$	$0,5 \text{ g l}^{-1}$	$2,0 \text{ g l}^{-1}$
$D_1 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$1,3 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$
$D_2 (\cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$

### 5.5.2 Manucol LHF

Die Diffusionskoeffizienten des Manucols sind in der folgenden Tabelle 5-12 dargestellt. Hierbei fällt auf, daß kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Diffusion des Polysaccharides besteht. Die Messungen werden mit einer Diffusionszeit von 100 ms sowie einer Gradientpulslänge von 1,0 ms durchgeführt.

Tab. 5-12: Diffusionskoeffizienten des Polysaccharides Manucol LHF in verschiedenen konzentrierten Lösungen

Konzentration	$10 \text{ g l}^{-1}$	$20 \text{ g l}^{-1}$	$40 \text{ g l}^{-1}$
$D_1 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$1,9 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
$D_2 (\cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$3,4 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$

### 5.5.3 Agarose

Die Diffusion des Polymers selber ist mit  $7,6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $4,7 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  die schnellste aller untersuchten Polysaccharide. Dies ist überraschend, da die Agarose bei einer Konzentration von  $20 \text{ g l}^{-1}$  ein festes Gel bildet und somit nahezu ortsfeste Polymerketten vorliegen sollten (siehe Gelatine). Die Ursache für diese Beobachtung wird in der Diskussion erläutert.

#### 5.5.4 Polysaccharid PA SG81

Beim Polysaccharid sind insgesamt drei Diffusionskoeffizienten nachweisbar, wobei einer der drei sehr niedrig ist ( $6 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Dieser kann nur mit Hilfe der Acetylgruppe nachgewiesen werden. Die Diffusionskoeffizienten, die an den Ringprotonen der Monomeren bestimmt werden, liegen in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen Polysacchariden ( $1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Die Besonderheit der Acetylgruppen wird in der Diskussion betrachtet.

#### 5.5.5 Gelatine

Im Fall der Gelatine werden zwei verschiedenen Polymerkonzentrationen untersucht. Diese sind so gewählt, daß die eine Probe ein Gel bildet ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ), während die andere als Lösung vorliegt ( $c = 5 \text{ g l}^{-1}$ ).

Im Gelzustand ist die Diffusion der Gelatinemoleküle mit der technischen Ausrüstung des zur Verfügung stehenden Spektrometers nicht bestimmbar. Die Signalabnahme, die unter Ausnutzung der maximalen Gradientenleistung erreichbar ist, beträgt nur 8 %. Hieraus ergibt sich ein Diffusionskoeffizient in der Größenordnung von  $10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , was einer mittleren Verschiebung von etwa 50 nm innerhalb von 100 ms entspricht. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Gelatinemoleküle ortsfest sind.

Im Fall der Gelatine-Lösung erhält man für die Gelatinemoleküle einen einheitlichen Diffusionskoeffizienten von etwa  $(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

## 5.6 Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa*

In Biofilmen sind nicht nur Wasser und Polysaccharide vorhanden. Es bietet sich daher an, die Diffusionskoeffizienten aller detektierbaren Verbindungen innerhalb dieser Biofilme zu bestimmen.

### 5.6.1 Diffusion in Biofilmen

Um einen Einblick in die Transportprozesse in Biofilmen zu bekommen, werden im Rahmen dieser Arbeit die Diffusionskoeffizienten aller über  $^1\text{H}$ -PFG-NMR detektierbaren Moleküle bestimmt. Hierbei sind insgesamt zwei verschiedene Stadien des Biofilms untersucht worden. Der Film 1 ist nach 24 h Bebrütungsdauer bei 36 °C vermessen worden, während der Film 2 bei gleicher Temperatur 96 h lang bebrütet wurde. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5-13 aufgeführt.

Die Beweglichkeit der verschiedenen Biofilmkomponenten ist unabhängig von der Bebrütungsdauer, da die gefunden Diffusionskoeffizienten innerhalb der Fehlergrenzen identisch sind.

Tab. 5-13 : Diffusionskoeffizienten der beiden Biofilme in  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ 

ppm	Film 2, $D_1$	Film 2, $D_2$	Film 1, $D_1$	Film 1, $D_2$
0,77	$(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$	-	-	-
0,87	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
1,18	$(7,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	-	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
1,33	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
1,61	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$
1,96	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	-	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
2,06	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-12}$	-	$< 1 \cdot 10^{-12}$	-
2,23	$(1,9 \pm 0,02) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
3,49	$(5,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	$(8,8 \pm 0,9) \cdot 10^{-12}$	$(4,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$
3,58	$(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$	$(4,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$
3,71	$(5,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	$(4,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$
3,80	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-
3,86	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	*
4,09	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-11}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	*
4,34	$(2,5 \pm 2,3) \cdot 10^{-11}$	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	*
4,55	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	*
4,77	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	$(9,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-12}$	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$	$(9,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-12}$
8,04	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	-

\* zweiter Diffusionskoeffizient nicht bestimmbar, aber vermutlich vorhanden

Die Resultate des Films 2 werden im folgenden eingehender betrachtet. Die Diffusionskoeffizienten der verschiedenen Moleküle (Resonanzen) lassen sich in fünf Gruppen einteilen (siehe Tabelle 5-14).

Tab. 5-14: Gruppierung der NMR-Signale in Abhängigkeit ihrer Diffusionskoeffizienten

Gruppe	$D (\text{m}^2\text{s}^{-1})$	Signale (ppm)
1	$1,8 \cdot 10^{-9}$	4,77
2	$5,2 \cdot 10^{-10} - 5,7 \cdot 10^{-10}$	3,49 - 3,58 - 3,71
3	$0,5 \cdot 10^{-10} - 2,5 \cdot 10^{-10}$	0,77 - 0,87 - 1,18 - 1,33 - 1,61 - 1,96 - 2,23 - 3,80 - 3,86 - 4,09 - 4,34 - 4,55 - 4,77 - 8,04
4	$0,8 \cdot 10^{-11} - 2,5 \cdot 10^{-11}$	2,06 - 3,49 - 3,58 - 3,71 - 4,09 - 4,34 - 4,77
5	$1 - 5 \cdot 10^{-13}$	2,06 - 3,49 - 3,58 - 3,71

Der Gruppe eins kann der größte Anteil des im Biofilm vorhandenen Wassers (99,9 %) zugeordnet werden. Die Diffusion dieser Fraktion wurde bereits in einem früheren Kapitel besprochen (siehe Seite 71).

Zur zweiten Gruppe gehören die drei Resonanzen des Glycerins, das dem Agar als Nährstoff zugegeben wird (3,49 ppm; 3,58 ppm; 3,71 ppm). Der Mittelwert der drei effektiven Diffusionskoeffizienten liegt bei  $5,4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Damit liegt die Abnahme des Diffusionskoeffizienten etwas höher als beim Wasser (verdünntes Glycerin in Wasser bei 20 °C:  $D = 8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Es ist nicht klar, ob dies ein Artefakt aufgrund der Berechnung ist oder ob bei Glycerin tatsächlich ein stärkere Hinderung vorliegt, als das beim Wasser der Fall ist.

Die meisten Resonanzen lassen sich zu den Gruppen drei und vier zusammenfassen ( $0,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} < D < 2,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $0,6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} < D < 2,5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Die Signale können größtenteils den Exoproteinen zugeordnet werden, da die Resonanzen sowohl im Spektrum des nativen Biofilms als auch in dem der bakterienfreien EPS zu detektieren sind. Eine genaue Zuweisung der Signale zu bestimmten Exoproteinen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Das Glycerin zeigt eine weitere Fraktion in der Gruppe vier, die eine deutlich niedrigere Beweglichkeit als das freie Glycerin (Gruppe zwei) besitzt. Die verlangsamte Fraktion enthält etwa 10 % der Glycerinmoleküle.

Betrachtet man die Ergebnisse, so fällt auf, daß sehr niedrige Diffusionskoeffizienten ( $\ll 1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) in den Biofilmen nur in wenigen Ausnahmen gefunden werden. Es handelt sich hierbei um Signale von Molekülen, die auch in der Gruppe vier zu finden sind. Einige Signale dieser Gruppe zeigen einen zweiten bzw. dritten Diffusionskoeffizienten im Bereich von  $1 - 5 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Gruppe fünf). In der Abbildung 5-33 ist ein Spektrum dargestellt, in dem nur die Signale dieser nahezu immobilen Moleküle zu erkennen sind. Die Signale stammen vom Glycerin sowie von den Acetylgruppen des Polysaccharides.

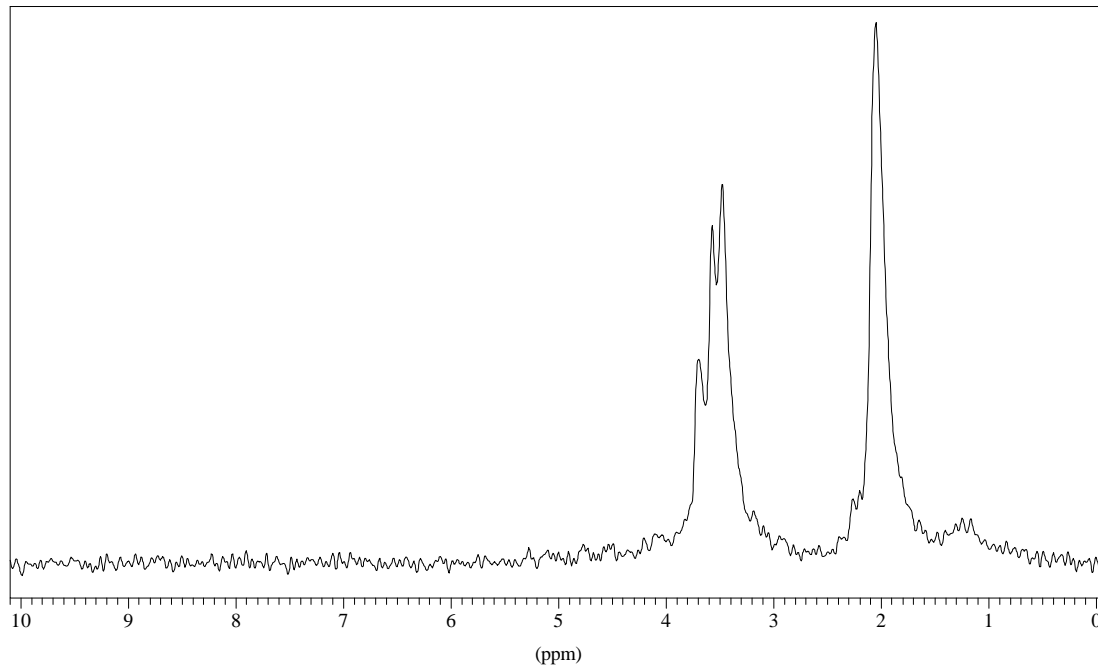


Abb. 5-33:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der immobilen Signale in einem Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* ( $g = 8 \text{ Tm}^{-1}$ ;  $\mathbf{d} = 1,0 \text{ ms}$ ;  $\mathbf{D} = 100 \text{ ms}$ )

## 6 Diskussion

### 6.1 Allgemeine Bemerkungen

Obwohl in der Literatur viele Erweiterungen der PFG-Theorie für Systeme, in denen keine freie Selbstdiffusion vorliegt, existieren (siehe Kapitel „Gehinderte Diffusion“; Seite 49) wird in dieser Arbeit die ursprüngliche Ableitung von Stejskal und Tanner (1965) verwendet (Gleichung 3-11, siehe Seite 48). Die Abweichungen von der freien Selbstdiffusion werden hierbei mit Hilfe eines effektiven Selbstdiffusionskoeffizienten ausgedrückt. Diese Vorgehensweise ist von Vorteil, wenn im untersuchten System keine definierten Strukturen vorliegen.

### 6.2 Wasserdiffusion

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Bestimmung der translatorischen Beweglichkeit von Wasser in einem Biofilm sowie in verschiedenen Biopolymer/Wasser-Systemen. Die Ergebnisse aller Messungen zeigen, daß mit der PFG-NMR keine größeren Mengen an „gebundenem“ Wasser nachweisbar sind. Dies bedeutet, daß das „gebundene“ Wasser nicht die Ursache für die Stabilität solcher Systeme sein kann. Dieses Resultat stimmt gut mit den Überlegungen von Belton (1997), Wiggins (1990) und Keiding et al. (2001) sowie den Ergebnissen von Bastov et al. (1997) überein.

Die Wasserdiffusionsmessungen ergeben, daß bei Betrachtung der gesamten Wassermenge in Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* bzw. Polymer/Wassersystemen keine große Beeinträchtigung der Wassermoleküle nachweisbar ist. Den stärksten Effekt detektiert man bei den Biofilmen, bei denen die Wasserdiffusion um etwa 15 % geringer ist als bei reinem Wasser. Der Diffusionskoeffizient des Wassers stimmt in der Größenordnung gut mit Literaturdaten für die Diffusion kleiner Moleküle (Flemming, 2000c; Stewart, 1998) sowie den Ergebnissen von Beuling (1998) überein. Hier ist jedoch anzumerken, daß die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in biologischen Systemen nicht immer reproduzierbar ist und die Zahlenwerte stark von dem verwendeten Biofilm sowie dessen Wachstumsbedingungen abhängen (Beuling, 1998; Stewart, 1998).

Die beim Biofilm im Vergleich zu den Polysacchariden stärkere Abnahme des Diffusionskoeffizienten läßt sich problemlos deuten, da der Biofilm mit 92 - 94 Gew.-% einen niedrigeren Wassergehalt aufweist als die untersuchten Polysaccharid/Wasser-Systeme. Die konzentrationsabhängigen Untersuchungen an den Polysacchariden Manugel DJX und Manucol LHF belegen, daß der Wassergehalt einen deutlichen Einfluß auf den Diffusionskoeffizienten hat. Ähnliche Experimente sind u. a. auch von Knauss et al. (1999), Lüsse et al. (1998) und Beuling (1998) durchgeführt worden.

Mit diesen Ergebnissen kann bestätigt werden, daß das hohe Wasserbindungsvermögen in den untersuchten Systemen nicht durch immobilisiertes Wasser verursacht wird, da das Wasser noch viel zu beweglich ist, um es als „gebunden“ anzusehen.

Eine weitere wichtige Beobachtung ist, daß die Diffusionskoeffizienten in keinem der hier diskutierten Fälle zeitabhängig sind. Dies läßt darauf schließen, daß es sich nicht um ein poröses System wie in der Beschreibung von Mitra handelt (siehe Seite 49) oder daß die Dimensionen der Strukturen sehr klein sind. Ersteres bedeutet, daß eine Diffusionshinderung durch die Zellen bzw. Polymerknäuel nicht gegeben ist. Eine Erklärung hierfür ist vermutlich die große „Durchlässigkeit“ der Polymerknäuel bzw. die relativ geringe Zellanzahl im Biofilm.

In den Biofilmen und den Polysaccharid/Wasser-Systemen existiert jedoch ein Signal bei 4,8 ppm, das auch bei hohen Gradienten ( $3 \text{ Tm}^{-1}$ ) detektierbar bleibt (siehe z. B. Abb. 5-3, Seite 74). Wenn dieses Signal vom Wasser stammt, was noch zu beweisen ist, dann muß es mindestens eine zweite Wasserfraktion mit einem deutlich niedrigeren Diffusionskoeffizienten geben. Mit Hilfe der PFG-NMR kann diese Wasserfraktion selektiv beobachtet werden, indem man das Signal des „freien“ Wassers über seine hohe Beweglichkeit mit Hilfe der „Wasserunterdrückung“ herausfiltert (siehe Abb. 3-15, Seite 58). Im folgenden Kapitel wird dieses „verlangsamte“ Wasser näher diskutiert.



## 6.3 „Verlangsamtes“ Wasser

Bevor im Verlauf dieses Kapitels das „verlangsamte“ Wasser besprochen wird, soll bewiesen werden, daß es sich bei dem Signal bei 4,8 ppm auch tatsächlich um ein Wassersignal handelt und nicht um ein Polysaccharid- bzw. Biofilmsignal.

An dieser Stelle muß noch eine zweite Anmerkung gemacht werden. Im Gegensatz zur bisher üblichen Reihenfolge wird in diesem Kapitel der Biofilm erst als letztes diskutiert. Dies ergibt sich daraus, daß im Biofilm sehr verschiedene Moleküle auftreten, die alle einen Einfluß auf das Auftreten von „verlangsamten“ Wasserfraktionen haben können. Es werden daher zunächst die einfacheren Polymer/Wasser-Systeme behandelt und die dadurch erhaltenen Erkenntnisse anschließend auf den Biofilm übertragen.

### 6.3.1 Beweis für Existenz eines Restwassersignals

Interessanterweise gibt es mit den Polysacchariden eine Polymerklasse, in der alle fünf untersuchten Vertreter mindestens eine mit der PFG-NMR detektierbare, langsamere Wasserfraktion zeigen. Da die Möglichkeit besteht, daß der bi- bzw. triexponentielle Abfall der Signalintensität der Resonanz bei 4,8 ppm auch durch eine Überlagerung der Signale von Wasser und Polymerprotonen stammen kann (Knauss et al., 1999), muß zunächst sichergestellt werden, daß das Signal tatsächlich vom Wasser stammt. Es gibt mehrere Indizien, daß in den Polysaccharidsystemen tatsächlich verschiedene Wasserfraktionen auftreten. Diesen Schluß kann man aus dem zeitabhängigen Verlauf der Signalintensitäten bei konstantem b-Faktor ziehen. Die Intensität aller beobachteten Linien sollte gemäß der  $T_1$ -Relaxation mit zunehmender Diffusionszeit abnehmen, was bei den Polysaccharidsignalen auch der Fall ist. Die Zunahme des Signals bei 4,8 ppm läuft dem entgegen (siehe Abb. 5-9, Seite 82 und Abb. 5-19, Seite 91). Als weiteres Indiz ist die Zeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten zu nennen, die nur bei dem Signal bei 4,8 ppm auftritt, wobei erwähnt werden muß, daß diese beiden Punkte einander bedingen können. Wenn der Diffusionskoeffizient einer Fraktion kleiner wird, ist gemäß Gleichung 3-11 die detektierbare

Intensität bei gleichem b-Faktor zwangsläufig größer (siehe Seite 48 bzw. Seite 129). Einen weiteren Hinweis darauf, daß es sich nicht um Polysaccharidprotonen handelt, ist die Tatsache, daß selbst in den Spektren, in denen keine Polysaccharidsignale mehr detektierbar sind, das Signal bei 4,8 ppm erhalten bleibt (siehe Abb. 5-13, Seite 84).

### 6.3.2 Literaturvergleich

Ein Literaturvergleich zeigt, daß es nur sehr wenige relevante Informationen zu dem beobachteten Phänomen gibt.

Knaus et al. (1999) interpretieren das Restsignal in ihren Experimenten als Polysaccharidsignal. Barbieri et al. (1998) finden in Hydrogelen (Poly-HEMA) ebenfalls eine zweite Wasserfraktion, die mit einer Kombination aus Relaxations- und Diffusionsmessung bestimmt wird. Die gefundenen Ergebnisse stimmen für eine Diffusionszeit von 190 ms gut mit den Ergebnissen der Polysaccharidmessungen überein ( $D_{\text{eff}} = 8,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ; Anteil etwa 2 ‰). Bei der kürzeren Diffusionszeit kommt es zu einer erheblichen Abweichung bei der Größe der verlangsamten Wasserfraktion, die dann ungefähr ein Drittel der gesamten Wassermenge ausmacht. Die Erklärung für die zweite Wasserfraktion liegt nach Barbieri in Wassermolekülen, die innerhalb der Poly-HEMA-Knäuel bleiben. Aufgrund des sehr niedrigen Wassergehaltes der von Barbieri untersuchten Proben (38 - 55 Gew.-%) ist ein direkter Vergleich mit den hochverdünnten Systemen in dieser Arbeit nicht möglich.

Bieze (1994) fand in Polyethylenglykol ebenfalls Wasser mit niedrigeren Diffusionskoeffizienten, die im Bereich der hier gefundenen Werte liegen ( $3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $8 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Es handelt sich hierbei allerdings um Neutronenbeugungsexperimente und die Ergebnisse sind wegen des deutlich kürzeren Zeitfensters (etwa 500 ps bei einer Auflösung von 13 ps) der Methode ebenfalls nicht vergleichbar. Dies zeigt sich deutlich bei den Messungen an Polyethylenglykol, das bei den PFG-NMR-Experimenten keine verlangsamte Wasserfraktion zeigt. Dieses Ergebnis entspricht dem von Bastov et al. (1997), die bei Wassergehalten oberhalb von 30 Gewichts-% mit Hilfe der NMR keine verlangsamte Wasserfraktion mehr nachweisen konnten. In der DSC ist jedoch unter gleichen Bedingungen noch „nicht gefrierendes“ Wasser zu detektieren.

Ein direkter Vergleich der NMR-Ergebnisse mit denen der DSC scheint nicht möglich. Wie bereits erwähnt wird in der DSC das Wasser, das unterhalb von 0 °C gefriert als gebunden bezeichnet. Ob diese Annahme gerechtfertigt ist, bleibt zweifelhaft (Belton, 1997, Keiding et al., 2001). Sicher ist, daß mit der DSC deutlich größere, von der Polymermatrix beeinflusste Mengen Wasser detektierbar sind als in den NMR-Studien (Bastov et al., 1997). So finden Fringant et al. (1996) zwischen fünf und zehn Wassermoleküle pro ionischem Zuckermonomer. Dies entspricht bei einer Manugel-Lösung mit einer Konzentration von 20 g l<sup>-1</sup> einem relativen Anteil des gebundenen Wasser in der Größenordnung von 0,9 % bis 1,8 %. Dieser Wert ist etwa um den Faktor 10 - 20 höher als der in dieser Arbeit mit Hilfe der PFG-NMR experimentell bestimmte.

Bieze fand für die Anzahl der pro Monomer Polyethylenglykol „gebundenen“ Wassermoleküle in der Literatur Werte von 0,9 - 6. Bezieht man diese Angaben auf eine Polymerkonzentration von 20 g l<sup>-1</sup>, so erhält man für das „gebundene Wasser“ einen Anteil im Bereich von 0,8 % bis 5,1 % des gesamten Wassers, während die NMR-Ergebnisse kein „verlangsamtes“ Wasser detektieren.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Beobachtung von Lüsse und Arnold (1996), die zeigen konnten, daß nicht das gesamte Wasser mit der NMR detektiert werden kann. Dieses Phänomen könnte auch die beobachtete Verringerung der Signalintensität des Restwassersignals in den Calciumalginaten erklären. Analog zu den Polysacchariden werden einige Wassermoleküle so immobil, daß sie in der Flüssig-NMR nicht mehr detektierbar sind. Die wahrscheinlichere Erklärung beruht jedoch in dem Meßprinzip der beiden Methoden. Darauf wird im nächsten Unterkapitel noch genauer eingegangen.

### 6.3.3 Vergleich der Methoden PFG-NMR, DSC und Neutronenbeugung

Die mit Hilfe der PFG-NMR detektierte „verlangsamte“ Wasserfraktion ist mit einem Anteil in der Größenordnung von 1 % sehr viel kleiner als die Mengen, die in der Literatur mit Hilfe der DSC bestimmt werden (Fringant et al., 1996; Hatakeyama et al., 1995, 1998; Ray et al. 1998). Hier stellt sich die Frage, warum die PFG-NMR diese Resultate nicht bestätigt. Dabei tritt das allgemeine Problem auf, daß die Ergebnisse von verschiedenen Methoden nur dann miteinander verglichen werden können, wenn die Rahmenbedingungen ähnlich sind (Bieze, 1994; Barbieri, 1998).

Im Fall von PFG-NMR und DSC liegt der große Unterschied in der Definition von „gebundenem“ Wasser. Während die PFG-NMR die translatorische Beweglichkeit detektiert und somit nur dann „gebundenes“ Wasser findet, wenn sich einige Wassermoleküle für eine bestimmte Zeit (im Bereich von mehreren Millisekunden) nicht oder zumindest nur langsam bewegen, wird die Bindung in der DSC über eine thermodynamische Größe charakterisiert. Die Problematik bei dieser Betrachtung kann an einem Beispiel verdeutlicht werden. Die Wasserbindung wird in der DSC über den Gefrierpunkt des Wassers definiert. Es ist unstrittig, daß Wasser, welches bei einer Temperatur unter 0 °C friert, in irgendeiner Form von seiner Umgebung beeinflusst wird. Es ist allerdings äußerste Vorsicht bei der Verwendung des Begriffes „gebundenes“ Wasser geboten, da z. B. ein Kochsalz/Wasser-Gemisch einen Gefrierpunkt von deutlich unter 0 °C haben kann, dieses Wasser makroskopisch aber sicherlich nicht „gebunden“ ist! Wassermoleküle, die in der Hydrathülle „gebunden“ sind, haben eine Aufenthaltszeit innerhalb der Hydrathülle in der Größenordnung von ns, sodaß auch hier der Begriff „Bindung“ genau definiert werden muß.

Mit der PFG-NMR findet man bei einer Kochsalzkonzentration von 5 Gew.-% einen Wasserdiffusionskoeffizienten von  $2,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Galle, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieser Wert liegt zwar niedriger als bei reinem Wasser ( $2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), was aber durch die niedrigere Viskosität der Lösung zu erklären ist (siehe Gleichung 3-2, Seite 40). Die Viskosität fällt von 0,982 cp auf 0,889 cp ab (Beilstein), was einen Diffusionskoeffizienten von  $2,08 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  erwarten läßt.

Die nicht frierende Wasserfraktion in Polymer/Wasser-Systemen beruht auf kolligativen Eigenschaften wie das auch beim Kochsalz der Fall ist (Keiding et al., 2001). Hier tritt jedoch eine Besonderheit auf. Wenn die Temperatur des Polysaccharid/Wasser-Systems verringert wird, friert zunächst reines Eis aus. Die verbleibende flüssige Phase reichert sich so an Polymer an, und der Gefrierpunkt des Wassers in dieser Phase sinkt ab. Dies geht solange, bis der eutektische Punkt erreicht ist, an dem die flüssige Phase ohne Veränderung ihrer Zusammensetzung erstarrt (Keiding et al., 2001; Belton, 1997). Dieses Phänomen hat aber nichts mit physikalisch gebundenem Wasser zu tun!

An dieser Stelle soll klar gesagt werden, daß sich die oben geäußerte Kritik ausschließlich gegen die Definition von „gebunden Wasser“ und nicht gegen die Methode DSC und der damit erzielten Ergebnisse richtet.

Ein Vergleich der PFG-NMR und der Neutronenbeugung kann diese Problematik ebenfalls verdeutlichen. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen Methoden ist das Zeitfenster, das bei der Neutronenbeugung im Bereich von Picosekunden liegt. Bieze (1994) hat die Aufenthaltszeit von Wassermolekülen in der Hydrathülle von Polyethylenglykol im Bereich von Picosekunden bis Nanosekunden bestimmt. Da zur Beobachtung von zwei diskreten Zuständen das Zeitfenster der Methode kürzer als die Lebensdauer der beobachteten Zustände sein muß, sind diese Bindungen für die PFG-NMR nicht zugänglich. Hier detektiert man nur einen Mittelwert, der nahe an dem Wert für freie Diffusion liegt.

## 6.4 Modelle für die „verlangsamte“ Wasserfraktion

Da in der Literatur keine zufriedenstellenden Erklärungen für das Auftreten der verlangsamten Wasserfraktionen und der Zeitabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten dieser Fraktionen bei Polysacchariden gefunden wurden, werden im folgenden verschiedene Modelle entwickelt und deren Pro und Kontra diskutiert.

Grundsätzlich sind hier fünf verschiedene Modellansätze denkbar:

- 1) Direkte Bindung zwischen Wassermolekülen und den funktionellen Gruppen der Polysaccharide
- 2) Polysaccharid-Knäuel als Diffusionsbarrieren
- 3) Wasser, das innerhalb von Polysaccharidknäueln festgehalten wird
- 4) Diffusion von Wassermolekülen entlang der Polymerketten
- 5) Kreuzrelaxation zwischen Polysaccharid- und Wassermolekülen

Zur Beurteilung der einzelnen Modelle sind folgende Kriterien zu überprüfen:

Das Modell muß das Auftreten von mindestens einer verlangsamten Wasserfraktion erklären. Die Zeitabhängigkeit des effektiven Selbstdiffusionskoeffizienten ist dabei genauso zu berücksichtigen wie die vom Wasser innerhalb des Experimentes zurückgelegte Wegstrecke. Daneben soll das Modell auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Polymeren sowie den Einfluß des Calciumchlorids auf das Verhalten des verlangsamten Wasser erklären.

Bei allen Modellen wird auf eine Betrachtung der experimentell ermittelten Polysaccharid-Diffusionskoeffizienten verzichtet, da diese mit Ausnahme des Alginats PA SG81 nur von einer kleinen Fraktion des Polymers (5 - 6 %) bestimmbar sind (siehe Kapitel „Detektierbarkeit der Polymere“, Seite 135). Die Polysaccharide werden, soweit erforderlich, als ortsfest ( $D = 0$ ) angenommen. Diese Annahme ist durch den großen Unterschied zwischen der

Wasserdiffusion und der Polymerdiffusion gerechtfertigt ( $D_{PS} = 1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bis  $1 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , entspricht den experimentell bestimmten Werten des Polysaccharides PA SG81).

#### 6.4.1 Modell 1: Direkte Wasserstoffbrückenbindungen

Das Modell 1) ist naheliegend, da in Polysacchariden genügend funktionelle Gruppen vorhanden sind, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein können. Hierbei handelt es sich um die Hydroxyl-, die Ether- sowie die Carboxygruppen. Problematisch an diesem Modell ist allerdings die extrem kurze Lebensdauer solcher Bindungen. In der Literatur findet man Angaben, die in der Größenordnung von Pico- bis Nanosekunden liegen und damit kann ausgeschlossen werden, daß durch diesen Effekt in der PFG-NMR zwei oder mehrere diskrete Wasserfraktionen detektierbar sind. Es muß nach diesem Modell vielmehr zu einem einzelnen Diffusionskoeffizienten kommen, der sehr nahe an dem von „freiem“ Wasser liegt.

Dieses Problem wird besonders deutlich, wenn man die Aufenthaltszeit der verlangsamteten Wassermoleküle bestimmt. Unter der Annahme eines Austausches zwischen einer immobilen Wasserphase und einer Phase mit freier Diffusion läßt sich die Aufenthaltsdauer näherungsweise berechnen (Zweiphasen-Modell). Die zurückgelegte Wegstrecke der Wassermoleküle kann auf zwei verschiedene Weisen ausgedrückt werden (Gl. 6-1 und 6-2):

$$\langle r_{ges}^2 \rangle = 6 \cdot D_{eff} \cdot \Delta \quad (6-1)$$

oder

$$\langle r_{ges}^2 \rangle = \langle r_{frei}^2 \rangle + \langle r_{immobil}^2 \rangle \quad (6-2)$$

Unter der oben genannten Bedingung, daß das Wasser in der einen Phase völlig immobil ist, fällt der zweite Summand in der Gleichung 6-2 weg. Man kann dann durch Umformen aus den Gleichungen 6-1 und 6-2 einen Ausdruck für die Aufenthaltszeit  $\tau_{frei}$  des Wassers in der freien

Phase ( $D_{\text{frei}} = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) herleiten.  $\tau_{\text{frei}}$  entspricht hierbei der Diffusionszeit  $\Delta$ , innerhalb der freie Diffusion auftritt:

$$t_{\text{frei}} = \frac{D_{\text{eff}} \cdot \Delta}{D_{\text{frei}}} \quad (6-3)$$

Setzt man die für das Manugel DJX ( $c = 40 \text{ g l}^{-1}$ ) gefundenen Werte in die Gleichung 6-3 ein ( $D = 3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta = 100 \text{ ms}$ ), so erhält man für die schnellere Wasserfraktion einen Wert für  $\tau_{\text{frei}}$  von etwa 15 ms. Das bedeutet, daß diese Wassermoleküle für insgesamt 85 ms am Polymer gebunden sein müssen, um einen entsprechend niedrigen Diffusionskoeffizienten zu zeigen. Eine Berechnung für die Diffusionszeit von 800 ms ergibt, daß die Moleküle für etwa 700 ms am Polymer verbleiben müssen. Die Aufenthaltszeiten werden noch größer, wenn man die Berechnung für die langsamere der beiden Wasserfraktionen durchführt (95 ms bzw. 780 ms). Solche Aufenthaltszeiten sind wegen der sehr kurzen Lebenszeit von Wasserstoffbrückenbindungen sehr unwahrscheinlich.

Daß der beobachtete Effekt nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen wird, kann auch experimentell bestätigt werden. Wenn Wasserstoffbrückenbindungen einen nennenswerten Einfluß auf das Diffusionsverhalten hätten, dürfte die Hydrolyse des Manucol LB keinen Effekt auf das Ergebnis haben, da die Anzahl der funktionellen Gruppen konstant bleibt. Auch die Kontrollmessungen an den Polymeren Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol und Natrium-Polyacrylat sprechen gegen diese Theorie. Sie zeigen bei vergleichbarer Konzentration an funktionellen Gruppen kein Wassersignal bei höheren Gradienten. Dieses wäre allerdings zu erwarten, wenn die Wasserstoffbrückenbindungen mit den funktionellen Gruppen für dieses Phänomen verantwortlich wären. Ähnliches gilt auch für die Gelatine, die wie die Polysaccharide verschiedene Wasserstoffbrückenbildner enthält.

Das Auftreten von verlangsamten Wasserfraktionen kann demnach nicht direkt mit Wasserstoffbrückenbindungen an den OH- bzw. Säuregruppen erklärt werden.

Unter diesem Aspekt ist es jedoch erstaunlich, daß die Ladung des Polysaccharides einen deutlichen Einfluß auf die Menge des beeinflussten Wassers hat, wie der Vergleich von Agarose



mit den übrigen Polysacchariden zeigt. Diese Beobachtung spricht für eine Beteiligung von solchen Bindungen (Fringant et al., 1996).

#### 6.4.2 Modell 2: Knäuel als Diffusionsbarrieren

Wenn man annimmt, daß die Polysaccharidknäuel für Wassermoleküle undurchdringliche Hindernisse darstellen (Modell 2, siehe Abb. 6-1), was recht unwahrscheinlich ist, ist eine zeitabhängige Diffusion zu erklären, da mit zunehmender Diffusionszeit immer mehr Wassermoleküle mit den Knäueln in Wechselwirkung treten und somit verlangsamt werden (Pavesi, 1996; Mitra et al., 1992). Dies müßte aber insbesondere eine Zeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von „freien“ Wasser ergeben, wobei die Werte für kurze Diffusionszeiten in der Nähe von freier Diffusion lägen. Die Ergebnisse von Pavesi und Balzarini (1996), die ein solches Verhalten auch bei Agarose-Gelen gezeigt haben, können experimentell nicht bestätigt werden.

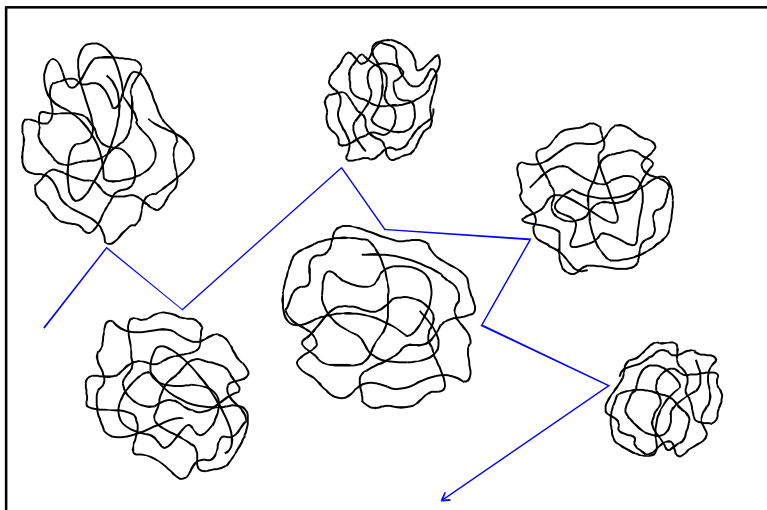


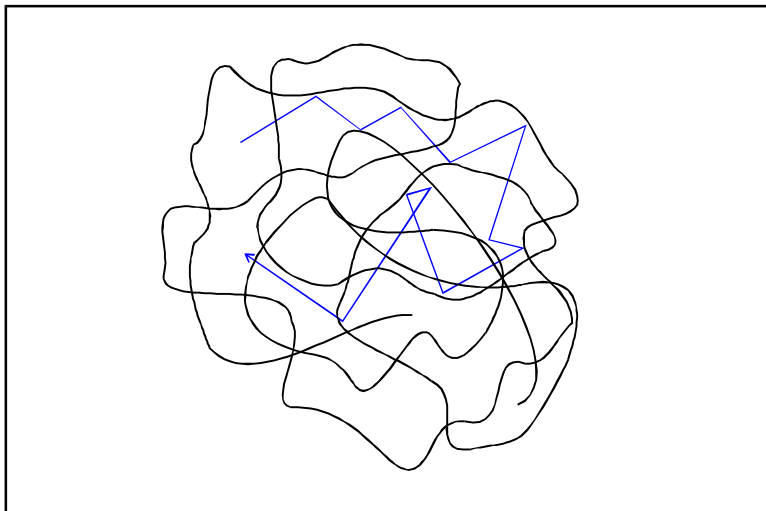
Abb. 6-1: Modell 2 - Die Polysaccharidknäuel behindern die Diffusion der Wassermoleküle wie undurchdringliche Partikel

Schließlich ist eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit zu erwarten, da die Wahrscheinlichkeit einer Polymer/Wasser-Wechselwirkung mit zunehmender Polysaccharidkonzentration zuneh-

men muß, was eine stärkere Abnahme des Diffusionskoeffizienten zur Folge hat. Diese Konzentrationsabhängigkeit tritt jedoch nur bei der Diffusion des „freien“ Wasser auf.

### 6.4.3 Modell 3: Diffusion innerhalb der Knäuel

Bei diesem Ansatz befinden sich die Wassermoleküle innerhalb der Polymerknäuel, und es wird angenommen, daß die Wassermoleküle diese nur schwer bzw. gar nicht verlassen können (siehe Abb. 6-2). Aus diesem Grund tritt das Problem der Aufenthaltszeit (s. o.) weniger stark auf. Innerhalb des räumlich stark begrenzten Raumes können sehr viele, wenn auch kurze Polymer/Wasser-Bindungen auftreten, die dazu führen, daß das Wassermolekül sehr lange am Polymer verbleibt.



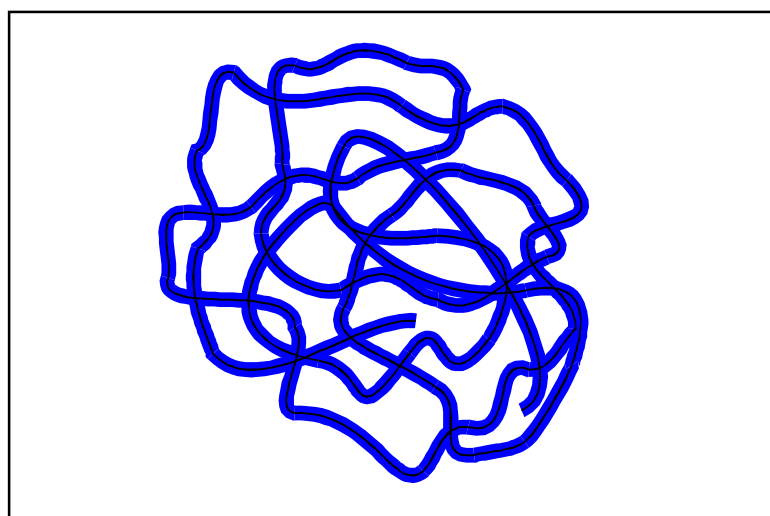
*Abb. 6-2: Modell 3 - Die Wasserdiffusion der verlangsamten Wassermoleküle tritt innerhalb der Polysaccharidknäuel auf*

Das Auftreten eines niedrigen Diffusionskoeffizienten und dessen Zeitabhängigkeit läßt sich erklären (siehe Kapitel „Gehinderte Diffusion“, Seite 49), wohingegen die zurückgelegte Wegstrecke der Wassermoleküle Probleme birgt. Selbst die Wassermoleküle, welche die niedrigere Beweglichkeit aufweisen, legen innerhalb von 800 ms immer noch Strecken von etwa 15  $\mu\text{m}$  zurück, die schnelleren Wassermoleküle bewegen sich innerhalb des gleichen Zeitraums etwa 30  $\mu\text{m}$ . Daraus resultiert, daß die Polymerknäuel einen Durchmesser in ähnlicher Größenordnung

haben müßten, was unrealistisch ist. Hatakeyama und Hatakeyama (1998) geben zum Beispiel den Radius eines Knäuels von Hyaluronsäure ( $M = 2 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit 150 nm an. Wenn man berücksichtigt, daß die Wassermoleküle das Knäuel verlassen können und einen Teil der Beobachtungszeit in der freien Phase verbringen, kann man die größeren Wegstrecken auch bei sehr kleinen Knäueln erklären. Hierbei tritt aber das Problem auf, daß die Wassermoleküle sich für noch längere Zeiten als beim Modell 1 berechnet innerhalb des Knäuels aufhalten müssen, da sie innerhalb der Struktur nicht völlig immobil sind. Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht darin, daß ein Wassermolekül, kurz nachdem es ein Knäuel verlassen hat, in ein unmittelbar benachbartes Knäuel gelangt. Hierbei sollte es jedoch zu einer Konzentrationsabhängigkeit kommen.

#### 6.4.4 Modell 4: Diffusion entlang der Polymerkette

Das Modell 4) basiert auf einer Wasserdiffusion entlang der Polymerketten (siehe Abb. 6-3).



*Abb. 6-3: Modell 4 - Die verlangsamten Wassermoleküle bewegen sich entlang der Polysaccharidketten*

Dadurch wird die Bewegungswahrscheinlichkeit richtungsabhängig und die ursprüngliche Ableitung der Auswertgleichung für Diffusionsmessungen mit der PFG-NMR ungültig. Callaghan (1991) hat eine Gleichung entwickelt, mit der die Diffusion entlang einer statistischen

Polymerkette berechnet werden kann (siehe Gl. 6-4). Auf eine mathematische Herleitung der Gleichung wird hier verzichtet, da sie in dieser Arbeit nur von geringer Bedeutung ist.

$$D_{obs} = \frac{1}{3} \cdot \frac{b \cdot \sqrt{D}}{\sqrt{p} \cdot \sqrt{\Delta}} \quad (6-4)$$

In dieser Gleichung repräsentiert  $D_{obs}$  den gemessenen Diffusionskoeffizienten,  $D$  gibt den tatsächlichen Diffusionskoeffizienten an, und  $\Delta$  stellt die Diffusionszeit dar. Die genaue Bedeutung des Parameters  $b$  wird in einem früheren Kapitel erläutert (siehe Gl. 2-2, Seite 26). Qualitativ ist er ein Maß für die „Steifheit“ eines Polymers.

Berechnet man die nach Gleichung 6-4 zu erwartenden Diffusionskoeffizienten, erhält man Werte, die nicht mit den experimentell bestimmten Größen in Einklang zu bringen sind. Für Polysaccharide mit einer verdrillten Kettenstruktur sind Segmentlängen von 24 bis 358 Monomereinheiten zu finden (Yalpani, 1988). Nimmt man eine Monomerlänge von 5 Å an und setzt die damit berechneten Segmentlängen in die Gleichung ein, ist bei einem Diffusionskoeffizienten  $D = 2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und einer Diffusionszeit von 100 ms ein experimenteller Diffusionskoeffizient von  $3,4 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $C_{\infty} = 24$ ) bzw.  $5,1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $C_{\infty} = 358$ ) zu erwarten. Beide Werte liegen deutlich niedriger als die experimentell bestimmten Größen. Hinzukommt, daß die obere Grenze der Segmentlängen bereits in die Größenordnung der gesamten Kettenlänge bei den untersuchten Polysacchariden kommt (Manugel DJX: 630; Manucol LHF: 440; Manucol LB: 90).

Dieses Modell zeigt, daß die beobachtete Beweglichkeit der Wassermoleküle von der Steifheit der Polymerkette abhängt. Die experimentellen Ergebnisse sprechen jedoch nur zum Teil für dieses Modell. Im Fall der Agarose, die sehr steif ist, kann hierüber der höhere Diffusionskoeffizient der Wasserfraktion im Vergleich zu den übrigen Polysacchariden erklärt werden. Bei den Polymeren Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure sowie Polyethylenglykol mißlingt eine Deutung nach diesem Modell. Da diese Polymere im Vergleich zu den Polysacchariden flexiblere Ketten haben, wären niedrigere Diffusionskoeffizienten als bei den Polysacchariden zu erwarten.

Ein weiterer Schwachpunkt ist die sehr lange Aufenthaltsdauer der Wassermoleküle in unmittelbarer Umgebung der Kette. Auch dieses Phänomen läßt sich nicht sicher erklären. Da Wasserstoffbrückenbindungen, wie bereits oben diskutiert, als mögliche Ursache ausfallen, bleibt die Betrachtung eines Potentialfeldes um das Polysaccharid herum. Dieses Potentialfeld wird durch die negativen Ladungen der Carboxylgruppen sowie die Dipolkräfte der Hydroxylgruppen erzeugt. Eine Berechnung des Potentials ist als Näherung möglich, wenn man das Monomer eines Polysaccharides als punktförmige „Ladung“ ansieht. Die kinetische Energie der Wassermoleküle wird über  $k_b T$  angenähert.

Die potentielle Energie für eine Wechselwirkung zwischen einem Ion und einem Dipol wird nach Gleichung (6-5 mit 6-6) berechnet (Holleman und Wiberg, 1995; Atkins, 1990):

$$W_{pot} = \int_{\infty}^r F \cdot dr \quad (6-5)$$

mit

$$F = \frac{e \cdot \mathbf{m}}{4\mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{e}_r} \cdot \frac{1}{r^3} \quad (6-6)$$

- $e$  = Elementarladung ( $1,6 \cdot 10^{-19}$  C)
- $\mathbf{m}$  = elektrisches Dipolmoment ( $H_2O$ :  $6,17 \cdot 10^{-30}$  C·m)
- $\mathbf{e}_0$  = Dielektrizitätskonstante im Vakuum ( $8,857 \cdot 10^{-12}$  J<sup>-1</sup>C<sup>2</sup>m<sup>-1</sup>)
- $\mathbf{e}_r$  = relative Dielektrizitätskonstante von Wasser bei 25 °C (78,54)

Die potentielle Energie eines Wasserteilchens, das sich aus einem Abstand von etwa 1 Å vom Polymer von diesem entfernt, liegt bei ungefähr  $5,7 \cdot 10^{-21}$  J. Für die kinetische Energie erhält man nach  $W_{kin} = k \cdot T$  einen Wert von  $4,1 \cdot 10^{-21}$  J. Der Vergleich der beiden Energien ergibt, daß die potentielle Energie nur etwa 50 % größer als die kinetische ist. Diese Differenz ist zu klein, um Aufenthaltszeiten der Wassermoleküle in der beobachteten Größenordnung (> 100 ms) zu erklären.

#### 6.4.5 Modell 5: Die Kreuzrelaxation

Die beste Theorie zur Erklärung der beobachteten Phänomene stellt die Kreuzrelaxation dar (Peschier et al., 1996). Der Vorteil dieser Betrachtung liegt in der Tatsache, daß das Modell mit sehr kurzen Lebenszeiten von Polymer/Wasser-Komplexen auskommt, die in der Größenordnung von 100 Mikrosekunden liegen können. Dabei werden keine direkten Bindungen zwischen den Wassermolekülen und den betroffenen Polymerprotonen benötigt. Es genügt, wenn sich das Wassermolekül während des Transfers innerhalb eines Abstandes von maximal 3 bis 5 Å vom Polymer befindet. In dieser Zeit wird Magnetisierung (inklusive der Ortskodierung) über dipolare Wechselwirkungen vom Polymer auf die Wassermoleküle übertragen (Kreuzrelaxation).

Das von Peschier entwickelte Modell kann nicht direkt auf die hier untersuchten Systeme übertragen werden, da es die Existenz einer zweiten Wasserfraktion mit einer Lebensdauer in der Größenordnung von  $\Delta$  voraussetzt. Dies ist, wie oben diskutiert, in den untersuchten Systemen recht unwahrscheinlich. Die experimentellen Beobachtungen lassen sich jedoch auch dann deuten, wenn man von einer Kontaktzeit in der Größenordnung von maximal 1 ms ausgeht. Der Kontakt muß nur lang genug sein, um eine Übertragung der Magnetisierung zu gewährleisten. Entscheidend ist in diesem Fall der Zeitpunkt, zu dem dieser Kontakt auftritt.

Bei der Kreuzrelaxation wird die Magnetisierung vom ortsfesten Polymerproton auf ein Wasserproton übertragen. Um die Konsequenzen zu erläutern, werden zwei Extremfälle betrachtet. Im ersten Fall geschieht die Übertragung erst kurz vor dem Ende der  $\tau_1$ -Phase (siehe Abb. 3-2, Seite 42), während dies im zweiten Fall unmittelbar nach dem Beginn der  $\tau_1$ -Phase auftritt.

Die Verhältnisse, die bei einer Übertragung der Magnetisierung kurz vor dem Ablauf der  $\tau_1$ -Phase vorliegen, werden nun etwas detaillierter betrachtet. In den Abbildungen stellt der schwarze Kreis ein ortsfestes Polymerproton dar, während der blaue Kreis für ein mobiles Wasserproton steht.

Analog zum PFG-NMR-Experiment werden im ersten Schritt die Zeiger der Moleküle durch einen RF-Puls auf den Startwert gesetzt. Durch den ersten Gradientpuls wird eine ortsabhängige Zeigerposition bei den Spins eingestellt (siehe Abb. 6-4).

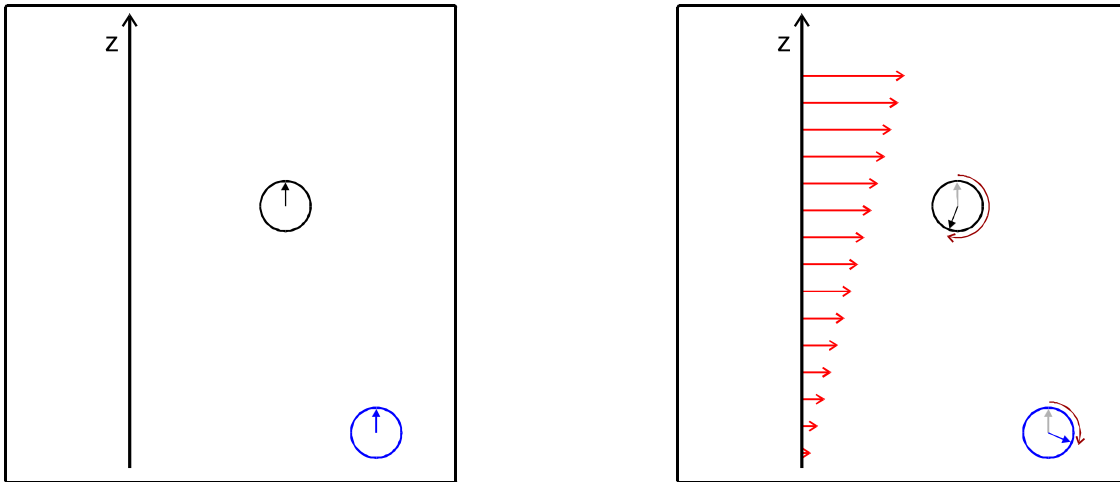


Abb. 6-4: Schematische Darstellung der Kreuzrelaxation im PFG-Experiment; links: Wirkung des ersten RF-Pulses; rechts: Einfluß des ersten Gradientpulses (rote Pfeile) auf die Spins

Die anschließende Bewegungsphase stellt den ersten Unterschied zu einem „gewöhnlichen“ PFG-NMR-Experiment dar. In dem hier betrachteten Fall bewegt sich das Wassermolekül zunächst nur bis zum Polymer und bleibt dort lange genug, um eine Kreuzrelaxation zu gewährleisten. In dem Modell entspricht dieser Prozeß der Übertragung des Polymerzeigers auf das Wassermolekül (roter Pfeil in der Abb. 6-5). Der Zeitpunkt dieser Übertragung wird im folgenden mit  $\tau_{\text{kontakt}}$  bezeichnet. Das mobile Molekül erhält damit die Positionsmarkierung des ortsfesten Polymers.

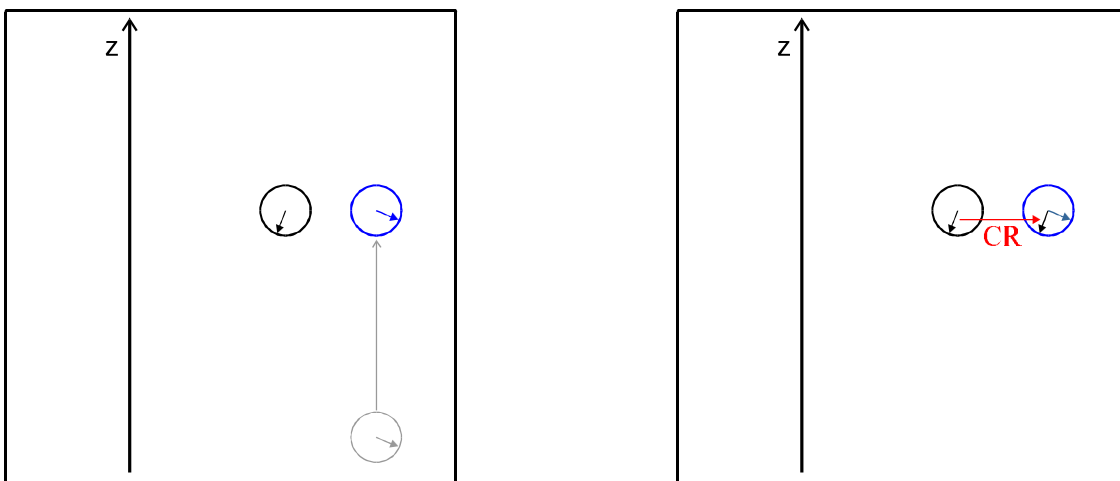


Abb. 6-5: Schematische Darstellung der Kreuzrelaxation im PFG-Experiment; links: Bewegung des blauen Spins bis zum schwarzen Spin; rechts: Übertragung des Zeigers vom schwarzen auf den blauen Spin

Nach einer weiteren Bewegung des Wassermoleküls während der verbleibenden kurzen Zeit ( $\Delta - \tau_{\text{kontakt}}$ ) erhält man die in Abb. 6-6 dargestellte Situation. Der zweite Gradientpuls dreht nun die Zeiger zurück und die Zeigerpositionen können während der Akquisition ausgelesen werden.

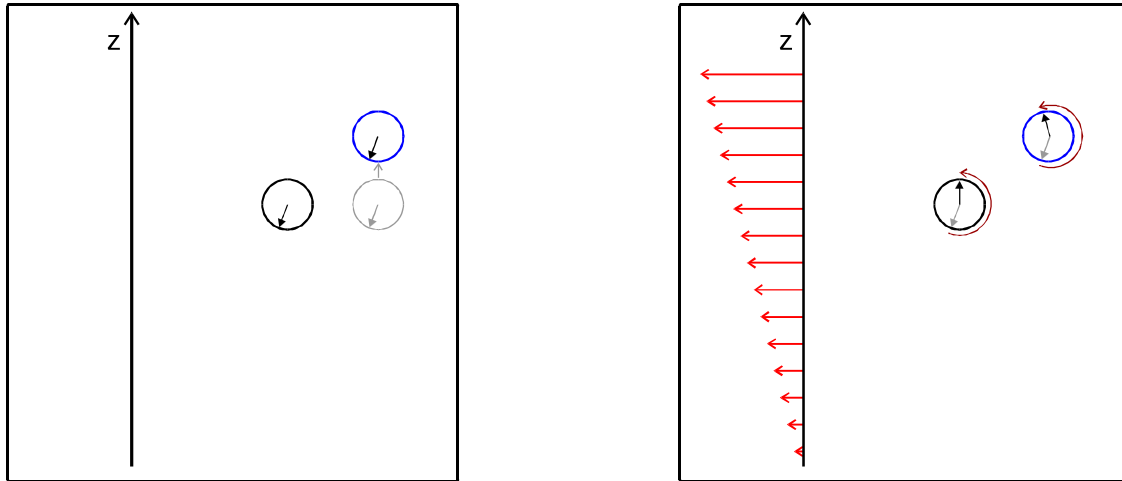


Abb. 6-6: Schematische Darstellung der Kreuzrelaxation im PFG-Experiment; links: zweiter Teil der Bewegungsphase; rechts: Einfluß des zweiten Gradientpulses auf die Spins

Da die Akquisition bezüglich des Polymers in diesem Fall uninteressant ist, werden in der Abbildung 6-7 die beiden möglichen Situationen des Wassermoleküls (mit und ohne Kreuzrelaxation) verglichen, um den Effekt der Kreuzrelaxation deutlich hervorzuheben. Man kann der Abbildung sofort entnehmen, daß der Winkel  $\phi_1$  deutlich größer ist als der Winkel  $\phi_2$ . Die in der rechten Hälfte der Abbildung 6-7 dargestellte Situation mit Kreuzrelaxation führt also durch die Übertragung einer anderen Anfangs-Ortskodierung (nämlich der des Polymers) zu einer scheinbar kleineren zurückgelegten Wegstrecke des Wassermoleküls. Im Grunde kann man sich die in diesem Abschnitt dargestellte Situation auch wie einen neuen „ersten“ Gradientpuls für das Wasser mit entsprechend kürzerer Diffusionszeit ( $\Delta - \tau_{\text{kontakt}}$ ) vorstellen. Da diese kürzere Zeit bei der Berechnung nicht berücksichtigt wird, kommt es zwangsläufig zu einem niedrigeren Diffusionskoeffizienten.



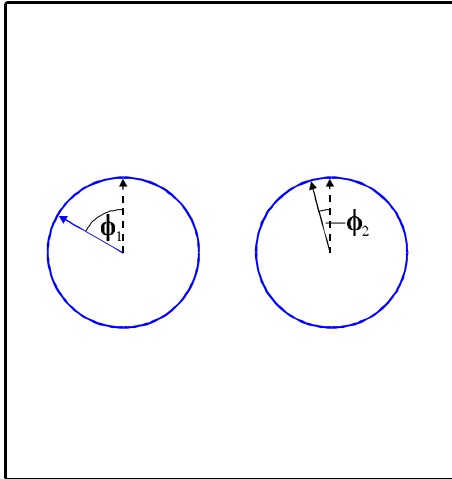


Abb. 6-7: Schematische Darstellung der Kreuzrelaxation im PFG-Experiment; Vergleich der Zeigerpositionen des mobilen Spins ohne (links) und mit Kreuzrelaxation (rechts)

Der wesentliche Unterschied zu den anderen Modellen ist, daß die Vorgeschichte des Wassermoleküls (alles vor  $\tau_{\text{kontakt}}$ ) keine Rolle spielt, da nur die Bewegung, die nach dem Kontakt stattfindet, detektiert wird. Hierdurch entfällt das Problem mit den extrem langen Aufenthaltszeiten völlig und reduziert sich auf die Frage, wie Aufenthaltszeiten im Bereich von 100 Mikrosekunden möglich sind.

Bleibt noch zu klären, ob die Zeitabhängigkeit der Diffusion und der Signalintensität mit Hilfe dieses Modells zu erklären ist. Die Zeitabhängigkeit der Diffusion ist eine Konsequenz aus der Methode. Wenn man den Zusammenhang zwischen der tatsächlich gemessenen Größe  $\langle r^2 \rangle$  und dem daraus berechneten Diffusionskoeffizienten betrachtet, wird sofort klar, woraus die Zeitabhängigkeit resultiert:

$$D_{\text{eff}} = \frac{\langle r^2 \rangle}{6\Delta} \quad (6-7)$$

Bei der Erklärung wird zur Vereinfachung von freier Diffusion vor und nach dem Polymer/Wasser-Kontakt ausgegangen. Das Wassermolekül legt nach diesem Kontakt eine Strecke  $\langle r^2 \rangle$  zurück, die von der Methode gemessen wird. Diese Strecke wird aber in einer sehr viel kürzeren Zeitspanne zurückgelegt ( $\Delta - \tau_{\text{Kontakt}}$ ), als in der Berechnung von  $D_{\text{eff}}$  angenommen

( $\Delta$ ). Aufgrund des Filters, den die PFG-NMR zwangsläufig durchführt, sind nur die Moleküle detektierbar, deren zurückgelegte Wegstrecke unterhalb einem gewissen Grenzwert bleibt. Hieraus resultiert für  $\tau_{\text{Kontakt}}$  ein scheinbarer Grenzwert. Wird nun die Diffusionszeit  $\Delta$  erhöht, bleibt dieser Grenzwert von  $\tau_{\text{Kontakt}}$  natürlich unverändert und die zurückgelegte Wegstrecke wird durch einen zu großen Wert dividiert. Dies führt zu einem niedrigerem Diffusionskoeffizienten, der zusätzlich noch zeitabhängig wird. Wenn der Zeitpunkt der Übertragung  $\tau_{\text{Kontakt}}$  bekannt wäre, könnte man den tatsächlichen Diffusionskoeffizienten der Wassermoleküle nach:

$$D_{\text{eff}} = \frac{\langle r^2 \rangle}{6(\Delta - \tau_{\text{Kontakt}})} \quad (6-8)$$

berechnen.

Die Zunahme der Signalintensität ist ebenfalls eine Folge dieser „falschen“ Diffusionszeit. Da alle Experimente mit konstantem b-Faktor durchgeführt werden und die Anzahl der detektierten Spins  $I_0$  ebenfalls konstant ist, muß die Signalintensität  $I$  gemäß:

$$I = I_0 \cdot e^{-b \cdot g^2 \cdot D} \quad (6-9)$$

mit abnehmenden Diffusionskoeffizienten  $D$  zunehmen. Hieraus ergibt sich unmittelbar ein Problem bei der Auswertung der relativen Signalintensitäten. Da die Intensität des Restwassersignals mit zunehmender Diffusionszeit größer wird, die des Gesamtwassersignals jedoch durch  $T_1$ -Relaxation gleichzeitig abnimmt, ist der exakte Anteil dieser „Fraktion“ ebenfalls abhängig von der Diffusionszeit. Aus diesem Grunde wurde für die Angabe eine einheitliche Diffusionszeit von 100 ms gewählt. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß man trotzdem eine gewisse Vorsicht walten lassen.

Wie im Kapitel über PFG-NMR bereits erwähnt ist für das Experiment nur die Start- und die Endposition des „Zeigers“ interessant. Wird nun unmittelbar nach Beginn der  $\tau_1$ -Phase die Magnetisierung vom Polymer auf das Wasser übertragen, ändert sich an dem Ergebnis des

Experimentes nur sehr wenig. Das Wassermolekül hatte sich zum Zeitpunkt  $\tau_{\text{Kontakt}}$ , zu dem die Zeigerposition übertragen wird, noch nicht sehr weit bewegt. Im Anschluß daran verändert es seine Position über einen relativ langen Zeitraum mit hoher Geschwindigkeit und wird daher am Ende genau wie die Moleküle, die überhaupt keinen Polymerkontakt hatten, herausgefiltert. Mathematisch betrachtet ist  $\Delta - \tau_{\text{Kontakt}}$  in gleicher Größenordnung wie  $\Delta$  und somit der Unterschied zwischen den Gleichungen 6-7 und 6-8 vernachlässigbar klein.

In diesem Modell kommt es daher zu einer zeitlich fluktuierenden zweiten Wasserfraktion. Der Begriff „Fraktion“ muß in diesem Zusammenhang jedoch sehr vorsichtig verwendet werden, da es durchaus möglich ist, daß alle Wassermoleküle in den untersuchten Systemen eine einheitliche Phase bilden. Die Kontakte zwischen den Polymerketten und den Wassermolekülen können auch rein statistisch betrachtet werden. Es gibt einfach eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß ein beliebiges Wassermolekül innerhalb der Beobachtungszeit  $\Delta$  in die Nähe eines Polymerprotons gelangt. Tritt dann eine Kreuzrelaxation auf, heben die Filtereigenschaften der PFG-NMR diese kleine Anzahl von Wassermolekülen deutlich hervor.

Es ist aber sicher, daß trotz der vielen „scheinbaren“ Einflüsse, die experimenteller Natur sind, die Wassermoleküle zumindest für eine Zeitspanne in der Größenordnung von 100 Mikrosekunden in der Umgebung des Polymers verbleiben müssen. Möglicherweise befinden sie sich auch noch länger in der Nähe, was aber nicht mit Hilfe der hier genutzten Methode bewiesen werden kann.

Das nicht vorhandene Restwassersignal bei den Polymeren PVA, PEG und PAS beruht wohl ebenfalls auf der Kreuzrelaxation, was am PVA exemplarisch erläutert wird.

Die Polymere sind insgesamt sehr beweglich ( $D \approx 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) und vollständig detektierbar (siehe Kapitel „Detektierbarkeit der Polymere“). Eine „verlangsamte“ Wasserfraktion kann nicht nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, daß beim PVA keine Kreuzrelaxation auftritt und die Diffusionsergebnisse problemlos mit der Stejskal-Tanner-Methode ausgewertet werden können. Der Grund für das Fehlen der Kreuzrelaxation liegt in der hohen Beweglichkeit der Polymermoleküle, da der Magnetisierungstransfer über dipolare Wechselwirkungen läuft und bei hoher Beweglichkeit sehr langsam wird (siehe Abb. 3-13, Seite 55). Dies gilt auch für die Aminosäurereste der Gelatine, die durch rotatorische Bewegung die dipolaren Kopplungen reduzieren.

Dies kann auch an hand der Messung von Manucol LB bewiesen werden. Die native Form zeigt trotz der schon recht kurzen Ketten ( $\approx 90$  Monomere) noch ein Restwassersignal. Dieses ist möglich, da noch etwa 85 % der Moleküle so immobil sind, daß ihre Signale durch dipolare Kopplungen nicht detektierbar sind (siehe Kapitel „Detektierbarkeit der Polymere“). Im Gegensatz dazu sind beim hydrolysierten Manucol LB nur noch etwa 10 % der Moleküle sehr immobil. Daher sind erheblich weniger dipolare Wechselwirkungen vorhanden, die nicht ausgemittelt werden. Die Kreuzrelaxation tritt daher in so geringem Umfang auf, daß der Effekt kaum noch detektierbar ist (siehe Abb. 5-18, Seite 89).

Bei der Gelatine liegt die Ursache in der Anzahl der immobilen Protonen. Die Messungen ergeben, daß Gelatinemoleküle detektierbar sind, obwohl sie nahezu völlig immobil ist. Die freie Drehbarkeit der Aminosäurereste, die die dipolaren Wechselwirkungen verringert, verhindert auch eine Kreuzrelaxation an diesen Protonen. Es bleiben also nur noch die Protonen für eine Kreuzrelaxation übrig, die im Gerüst des Proteins sitzen. Davon sind aber zu wenige vorhanden, um eine deutlich detektierbare Wasserfraktion hervorzurufen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die experimentellen Ergebnisse am ehesten mit einer Kombination der Kreuzrelaxation und den Modellen 2 bzw. 4 interpretiert werden können. Die Unzulänglichkeiten der Modelle, die zunächst gegen diese sprechen, können mit Hilfe der Kreuzrelaxation reduziert werden.

Am Beispiel der Kombination des Modells 4 mit der Kreuzrelaxation wird dies näher erläutert. Der niedrige Wert des Diffusionskoeffizienten und seine Zeitabhängigkeit kann ausschließlich über die Kreuzrelaxation erklärt werden (s.o.). Aber auch ein weiteres Problem läßt sich durch den Magnetisierungstransfer vom Polymer auf das Wassermolekül lösen. Die relativ großen zurückgelegten Wegstrecken sind nun sehr einfach so zu erklären, daß das Wassermolekül gegen Ende der Diffusionszeit die Magnetisierung und somit auch die Startposition des Polymers übernimmt und sich im Anschluß daran noch einige Zeit frei durch das System bewegen kann. Wenn keine Kreuzpolarisation auftreten würde, wäre dieser Fall nur dann möglich, wenn das Wassermolekül vom Beginn der Messung bis kurz vor dem Ende der Diffusionszeit am Polymer ortsfest gebunden wäre. Dies ist sehr unwahrscheinlich, wie bereits weiter oben diskutiert wurde.

Weiterhin läßt das Modell vier in Kombination mit der Kreuzpolarisation auch eine Erklärung für das stärkere Wassersignal bei den ionischen Polysacchariden zu. Wenn ein Polyelektrolyt vorliegt, ist es aufgrund des stärkeren Potentialfeldes einfach wahrscheinlicher, daß ein Wassermolekül für einen Zeitraum von etwa 100 Mikrosekunden in der unmittelbaren Nähe des Polymers verbleibt. Eine ähnliche Situation liegt auch bei einer Kombination des Modells zwei mit der Kreuzrelaxation vor. Es wird daher auf eine detaillierte Diskussion dieser Kombination verzichtet.

Der fehlende Einfluß der Calciumionen kann ebenfalls mit Hilfe der Kreuzrelaxation verstanden werden. Wenn sich die Relaxationsparameter nicht deutlich ändern, ist bezüglich des Magnetisierungstransfers kein Unterschied zwischen den Messungen mit und ohne Calcium zu erwarten. Der einzige denkbare Effekt wäre eine Signalzunahme, weil bei der hohen Calciumchloridkonzentration ( $8 \text{ gl}^{-1}$ ) auch die letzten mobilen Polymerketten unbeweglich werden. Dadurch ständen mehr Polymermoleküle für dipolare Wechselwirkungen zur Verfügung. Da im untersuchten Fall (Manugel DJX) aber nur ein sehr geringer Anteil der Polymermoleküle so beweglich ist, daß keine Kreuzrelaxation von diesen Molekülen zu erwarten ist, dominiert ein anderer Effekt die Messung.

In der Praxis kann festgestellt werden, daß das Wassersignal im Gegensatz zur oben angestellten Überlegung bei Calcium-Zugabe abnimmt (siehe Abb. 5-14, Seite 85). Dies ist mit Hilfe des „Egg-Box“-Modells einsichtig (siehe 2-9, Seite 24). Durch die Komplexierung der Guluronat-einheiten wird ein Teil der potentiell für die Kreuzrelaxation zur Verfügung stehenden Polymerprotonen durch das Calcium blockiert. Da, wie bereits erwähnt, nur ein sehr kleiner Anteil der Polymere ohne Calcium-Zugabe so beweglich ist, daß er nicht zur Kreuzrelaxation beiträgt, überwiegt der Effekt der geringeren Protonenzahl den Effekt der zusätzlichen Immobilisierung. Das durch Kreuzrelaxation entstehende Wassersignal nimmt daher geringfügig ab.

Der fehlende Einfluß des M/G-Verhältnisses auf die „verlangsamte“ Wasserfraktion, der beim Vergleich von Manucol und Manugel festgestellt wird, ist naheliegend. Wenn sich die Kreuzrelaxationsparameter (Peschier et al., 1996) von Mannuronat und Guluronat nicht stark unterscheiden, was zu erwarten ist, ist der Effekt dieser unterschiedlichen Monomere auf das Wasser gleich groß.

Worin der Grund für das deutlich abweichende Verhalten des Alginates PA SG81 im Vergleich zu den anderen ionischen Polysacchariden liegt, läßt sich mit Hilfe der durchgeführten Experimente nicht eindeutig klären. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten. Entweder ist die  $T_1$ -Relaxation in diesem System deutlich langsamer als in den anderen Systemen oder aber die Kreuzrelaxation verläuft schneller. Obwohl der Beweis nicht geführt werden kann, ist es wahrscheinlicher, daß der Effekt auf der  $T_1$ -Relaxation beruht. Wenn die Kreuzrelaxation schneller sein sollte, müßte auch bei kurzen Diffusionszeiten ( $\Delta = 10$  ms) ein sichtbares Wassersignal existieren, was jedoch nicht der Fall ist.

Wenn die in diesem Abschnitt diskutierte Theorie richtig ist, müssen bei den Diffusionskoeffizienten des „verlangsamten“ Wasser Verteilungen mit einer unteren Grenze auftreten. Bei der Auswertung der Meßdaten sieht es auch so aus, als wenn solche Verteilungen auftreten könnten. Aufgrund der relativ geringen Datenzahl (bedingt durch lange Meßzeiten) wird jedoch auf eine Auswertung von Verteilungen verzichtet und die Ergebnisse als diskrete Diffusionskoeffizienten angegeben. Es ist anzunehmen, daß die Verteilung zwischen den beiden diskreten Diffusionskoeffizienten liegt.

In diesem Zusammenhang muß noch abschließend erwähnt werden, daß ein Magnetisierungs-transfer prinzipiell nicht von einem chemischen Austausch der betroffenen Protonen unterschieden werden kann (Dvinskikh und Furó, 2000). Es ist also durchaus denkbar, daß der beobachtete Effekt auch durch einen solchen Austausch hervorgerufen werden kann. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Lebenszeiten von austauschbaren Protonen in wäßriger Lösung sehr kurz sein können. Dies führt dann wiederum zu den bereits oben diskutierten Problemen (siehe Modelle eins bis drei).

## 6.5 Detektierbarkeit der Polymere

Bei der Betrachtung der Spektren des acetylierten Polysaccharides PA SG81 erkennt man, daß das Signal der Acetylgruppen im Vergleich zu dem der aliphatischen Ringprotonen viel zu intensiv ist (siehe Abb. 5-27, Seite 99). Eine Untersuchung des Alginats von Grobe et al. (1995) ergab, daß statistisch gesehen jedes vierte Zuckermonomer eine Acetylgruppe trägt. Hieraus ergibt sich ein Intensitätsverhältnis zwischen aliphatischen und Acetylprotonen von ungefähr 6,7 zu 1. Bei der Auswertung der Spektren erhält man jedoch einen Wert von 0,6 zu 1 und damit eine starke Abweichung vom theoretischen Wert. Unter der Annahme, daß alle im Polysaccharid vorhandenen Acetylgruppen detektierbar sind, kann man berechnen, daß nur etwa 9 % der aliphatischen Protonen der Flüssig-NMR zugänglich sind. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die aliphatischen Protonen durch dipolare Kopplungen eine starke Linienverbreiterung erfahren, wenn die Beweglichkeit der Polysaccharidketten zu gering wird. Da das zur Verfügung stehende Spektrometer ein hochauflösendes Flüssigkeitsspektrometer ist (DRX 500), sind sehr breite Signale nicht detektierbar. Eine Ausnahme stellen Molekülgruppen da, die über eine Rotation die dipolare Kopplung reduzieren. Beispiele hierfür sind Acetylgruppen bei den Polysacchariden und Aminosäurereste bei den Proteinen. Diese Gruppen sind auch in der Flüssig-NMR gut detektierbar.

Fehlen solche Gruppen, wie das bei Manugel, Manucol und Agarose der Fall ist, können keine immobilen Polymermoleküle nachgewiesen werden, was die Experimente bestätigen. Die im Vergleich zum Wasser viel zu niedrige Signalintensität der Polysaccharidprotonen beruht auf diesem Effekt. Als Beispiele werden hier eine Manugel-DJX-Lösung mit einer Konzentration von  $40 \text{ g l}^{-1}$  sowie eine Manucol-LB-Lösung in nativer und in der hydrolysierten Form betrachtet ( $c = 20 \text{ g l}^{-1}$ ). Bei der Manugel-Lösung ist zwischen den aliphatischen Protonen und den Protonen des Wassers ein Signalverhältnis von 1 zu 110 zu erwarten. In der Praxis wird jedoch ein Verhältnis von etwa 1 zu 2000 gefunden. Das bedeutet, daß nur etwa 5 - 6 % der Polysaccharidmoleküle detektiert werden. Beim deutlich kurzkettigeren Manucol LB ist wegen der höheren Beweglichkeit der Moleküle ein größerer detektierbarer Anteil zu erwarten. Aufgrund der im Vergleich zum Manugel niedrigeren Konzentration liegt der theoretische Wert bei 1 zu 220. Die Experimente ergeben ein Verhältnis von 1 zu 1570. Dies entspricht einem detektierbaren Anteil der Manucol-LB-Moleküle von etwa 14 %. Die hydrolysierte Lösung sollte kaum noch immobile

Moleküle enthalten und somit müßte das Polysaccharidsignal dem theoretischen Wert sehr nahe kommen. Dies ist mit einem Verhältnis von 1 zu 240 auch der Fall. In der hydrolysierten Manuocol-LB-Lösung sind demnach etwa 91 % aller Polysaccharidmoleküle so beweglich, daß sie detektierbar sind.

Die Signalverbreiterung läßt sich auch sehr schön an den Calciumalginaten beobachten. Die durch das Calciumchlorid vernetzten Polymermoleküle sind so unbeweglich, daß sie mit einem hochauflösenden Flüssig-NMR-Spektrometer nicht mehr detektierbar sind. Dadurch nimmt die Intensität der Polysaccharidsignale mit zunehmender Calciumchloridkonzentration ab. Dies geht soweit, daß bei einer Konzentration von  $8 \text{ gl}^{-1}$  keine Polysaccharidsignale mehr zu erkennen sind (siehe Abb. 5-13, Seite 84).

Im Gegensatz hierzu können z. B. beim Polyvinylalkohol (PVA) alle Polymermoleküle detektiert werden. Eine Berechnung des Intensitätsverhältnisses Wasser- zu  $\text{CH}_2$ -Protonen ergibt bei  $20 \text{ gl}^{-1}$  einen Wert von 122 zu 1. In der Praxis wird ein Verhältnis von 115 zu 1 bestimmt. Die geringe Diskrepanz beruht auf Ungenauigkeiten bei der Integralauswertung.

Aufgrund der oben genannten Tatsache, daß nur ein geringer Teil der Polysaccharidmoleküle detektierbar ist, wird auf eine Diskussion der Diffusionskoeffizienten der Polymere verzichtet. Die detektierbaren Moleküle sind vermutlich kurzketzige „Verunreinigungen“, die keine repräsentativen Eigenschaften haben.

Besonders deutlich wird dies bei der Agarose, die selbst im Gelzustand einige hochmobile Polymermoleküle enthält. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Gelatine nicht gemacht werden.



## 6.6 *Pseudomonas aeruginosa* SG81

### 6.6.1 „Verlangsamtes“ Wasser im Biofilm

Mit diesen Ergebnissen können jetzt auch die Biofilmdaten besser interpretiert werden. Das Restwassersignal im Biofilmspektrum ist bei einer Diffusionszeit von 10 ms sehr ausgeprägt. Da im Polysaccharidspektrum sowie im EPS-Spektrum des *Pseudomonas aeruginosa* SG81 unter diesen Bedingungen kein nennenswertes Wassersignal detektierbar ist, muß das Wassersignal im Biofilm anderen Ursprungs sein (siehe Abb. 5-25 bis 5-27; Seite 97 ff). Auch der signifikant niedrigere Diffusionskoeffizient des Restwassersignals im Biofilm im Vergleich zu den Polysacchariden (etwa eine 10er-Potenz) spricht für einen anderen Ursprung. Da die EPS einen „Biofilm“ ohne Bakterien darstellen, besteht die Möglichkeit, daß das Wassersignal vom intrazellulären Wasser der Bakterien hervorgerufen wird. Van Zijl et al. (1991) haben bei PFG-Untersuchungen ebenfalls intrazelluläres Wasser mit einem vergleichbaren Diffusionskoeffizienten gefunden. Problematisch ist die geringe Intensität dieses Wassersignals, das nur etwa 1 ‰ der Gesamtwassermenge entspricht. Wie im Kapitel „Verwendete Materialien und Geräte“ bereits berechnet, liegt dieser Wert um mehr als eine Zehnerpotenz zu niedrig (siehe Seite 61).

Leider ist es nicht möglich, mit Hilfe von zeitabhängigen Messungen die Dimensionen der Zellen zu ermitteln. Wie im Kapitel „Ergebnis“ gezeigt (siehe Abb. 5-6, Seite 79) nimmt die Signalintensität des Restwassersignals im Biofilm, vermutlich durch eine sehr kurze  $T_1$ -Zeit, rasch ab, und bei Diffusionszeiten größer 30 ms ist kein auswertbares Wassersignal mehr detektierbar.

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das Wassersignal im Biofilm nicht von den Polysacchariden verursacht wird, da das Wassersignal des Polysaccharides mit zunehmender Diffusionszeit größer wird (siehe Abb. 5-19, Seite 91). Leider kann nicht gesagt werden, ob für große Diffusionszeiten (> 50 ms) im Biofilm ein durch das Polysaccharid hervorgerufenen Wassersignal detektiert werden kann, da zur Zeit keine Biofilmmessungen mehr möglich sind.

Eine grobe Abschätzung der Zellgröße läßt sich jedoch aus der Tatsache ableiten, daß die intrazelluläre Diffusion nicht sehr stark verlangsamt sein sollte, da die Zellen im wesentlichen aus Wasser bestehen. Ein niedriger Diffusionskoeffizient kann auch als „Artefakt“ der Messung

entstehen. Wenn sich ein Wassermolekül innerhalb fester Grenzen bewegt, die kleiner als die Strecke bei freier Diffusion sind (siehe Kapitel „Gehinderte Diffusion“, Seite 49), wird der nach Gleichung 3-11 (siehe Seite 48) bestimmte Diffusionskoeffizient zu klein. Im Fall einer zylindrischen Geometrie kann mit Hilfe der von Södermann und Jönsson (1995) abgeleiteten Gleichung 6-10 der scheinbare Diffusionskoeffizient  $D_{app}$  berechnet werden, wenn die Größen der Zylinder bekannt sind. In dieser Gleichung entspricht  $R$  dem Radius und  $L$  der Länge des Zylinders, während  $\Theta$  den Winkel zwischen der Zylinderachse und den Gradienten angibt.

$$D_{app} = \frac{(R \cdot \sin \Theta)^2 + \frac{1}{3}(L \cdot \cos \Theta)}{4\Delta} \quad (6-10)$$

Diese Gleichung ist nur gültig, wenn  $D \cdot \Delta \cdot L^{-2} \gg 1$  ist, was für die hier betrachteten Dimensionen bedingt erfüllt ist ( $D \cdot \Delta \cdot L^{-2} \approx 5$ ). Eine Berechnung nach dieser Formel ergibt eine winkelabhängige Verteilung von Diffusionskoeffizienten mit einer oberen und einer unteren Grenze ( $\Theta = 90^\circ$  bzw.  $\Theta = 0^\circ$ ). Setzt man für die Länge der Zellen  $2 \mu\text{m}$  und für den Radius  $0,5 \mu\text{m}$  ein, erhält man als obere bzw. untere Grenze Diffusionskoeffizienten von  $3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $6,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Diese Werte liegen deutlich niedriger als die experimentell bestimmten ( $2,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $9 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ).

Es läßt sich also nicht eindeutig beweisen, daß es sich bei den experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten um intrazelluläres Wasser handelt. Es besteht vielmehr auch die Möglichkeit, daß diese „verlangsamten“ Wasserfraktionen analog zu den Polysacchariden durch Kreuzrelaxation entstehen. In diesem Fall würde die Kreuzrelaxation jedoch nicht an den Polysacchariden, sondern an den Zellwänden stattfinden.

### 6.6.2 Diffusion von Glycerin, Proteinen und Polysacchariden im Biofilm

Auch das Glycerin verhält sich im Biofilm anders als in reinen Polysacchariden. In Polysaccharidgelen bzw. -lösungen findet man nur zwei Diffusionskoeffizienten (Galle,

unveröffentlichte Ergebnisse), die allerdings gut mit den entsprechenden im Biofilm übereinstimmen ( $\approx 5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\approx 1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Die dritte im Biofilm nachweisbare Fraktion mit einem Diffusionskoeffizienten von etwa  $1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Gruppe 5) ist in den reinen Polysacchariden nicht nachweisbar, was darauf schließen läßt, daß es sich hierbei um intrazelluläres Glycerin bzw. um an der Zelloberfläche gebundenes Glycerin handelt.

Auf den ersten Blick sind die Diffusionskoeffizienten der Exoproteine überraschend hoch (Gruppen 3 und 4). Die vorläufigen Ergebnisse von Broekmann et al. (unveröffentlicht), daß in den EPS von PA SG81 nur Proteine im Größenbereich von 5000 - 150000  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  gefunden werden, spricht für die Annahme, daß die Proteine sehr kleine Dimensionen haben können. Dies führt dann gemäß der Gleichung 3-2 (siehe Seite 40) zu relativ hohen Diffusionskoeffizienten. Einige Diffusionskoeffizienten von Proteinen unterschiedlicher molarer Masse sind in der Tabelle 6-1 dargestellt (Tanford, 1961). Es zeigt sich, daß auch Proteine mit einer großen molaren Masse sehr hohe Diffusionskoeffizienten aufweisen können.

Tab. 6-1: Physikochemische Daten einiger Proteine

	$M_r (\text{g mol}^{-1})$	$D^{293\text{K}} (\text{m}^2 \text{s}^{-1})$
Ribonuclease	13683	$1,19 \cdot 10^{-10}$
Lysozym	14100	$1,04 \cdot 10^{-10}$
Serumalbumin	65000	$5,94 \cdot 10^{-11}$
Hämoglobin	68000	$6,90 \cdot 10^{-11}$
Urease	480000	$3,46 \cdot 10^{-12}$
Collagen	345000	$6,90 \cdot 10^{-12}$
Myosin	493000	$1,16 \cdot 10^{-11}$

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, warum im Biofilm keine immobilen Proteine nachweisbar sind. Bei Messungen an Gelatine (siehe Seite 103) kann gezeigt werden, daß zumindest dieses Protein genügend Aminosäurereste enthält, die über Rotation die dipolare Kopplung so weit reduzieren, um detektierbar zu sein. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß in einem Biofilm ebenfalls immobile Proteine detektierbar sein sollten. Dies gilt insbesondere für diejenigen Proteine, die innerhalb der Zellwände bzw. innerhalb der Zellorganellen zu finden sind.

Es gibt hier zwei mögliche Erklärungen, warum dies nicht der Fall ist. Zum einen ist es denkbar, daß die Proteine in den Zellen auch an den „normalerweise“ detektierbaren Seitenketten eine deutlich geringere Bewegungsfreiheit haben oder, was wahrscheinlicher ist, in zu geringer Konzentration vorliegen, um genügend starke NMR-Signale zu liefern. Hierfür spricht der sehr niedrige Anteil der Bakterien an der gesamten Biomasse eines Biofilms, da die EPS bereits einen Anteil von 70 - 95 % der organischen Masse ausmachen (Flemming, 1994).

Die Biofilmmatrix wird nach den hier gezeigten Ergebnissen von der Polysaccharidmatrix gebildet bzw. stabilisiert (siehe auch Kapitel „Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)“, Seite 15). Dieser Schluß basiert auf den Polysaccharidmessungen des reinen Alginates im Vergleich mit den Biofilmmessungen. In beiden Systemen sind alle gefundenen Diffusionskoeffizienten mit Ausnahme der der Polysaccharide sehr hoch und können somit nicht an der Stabilisierung der Matrix beteiligt sein. Die Polysaccharidsignale zeigen jedoch, daß diese Polymere nahezu immobil sind und somit in der Lage sind, die gesamte Struktur zu stabilisieren. Hierbei muß allerdings bedacht werden, daß möglicherweise einige weitere immobile Moleküle (z. B. Proteine), die nicht detektierbar sind, die Matrix zusätzlich stabilisieren.

## 6.7 Wasserbindung der Biofilme und Gele

Obwohl die Kreuzrelaxation die Interpretation der experimentellen Beobachtungen ermöglicht, kann auch mit diesem Modell nicht erklärt werden, warum die Polysaccharidgele bzw. Biofilme in der Lage sind, so große Wassermengen zu fixieren. Nach dem jetzigen Stand der Forschung scheint eine thermodynamische Betrachtung (Wiggins, 1990; Belton, 1997; Keiding et al., 2001) plausibler als die über physikalische Bindungen. Das starke Wasserbindungsvermögen beruht sehr wahrscheinlich auf einem entropischen Effekt.

Als Beispiel hierfür kann ein System aus Wasser und Ethanol herangezogen werden. Gibt man die beiden Substanzen in ein Gefäß, kommt es spontan zu einer Vermischung der beiden Komponenten. Das Wasser wird aber sicherlich nicht vom Ethanol gebunden! Die treibende Kraft ist die Entropiezunahme bei diesem Prozeß. Möchte man diese Mischung wieder trennen, muß

über eine Destillation Energie aufgebracht werden. Diese Energie wird benötigt, um die Entropie im Ethanol/Wasser-Gemisch wieder zu verringern.

In einem Polymer/Wassersystem geschieht genau das gleiche. Im Fall eines Gels tritt nur ein zusätzlicher Effekt auf. Da das Polymernetzwerk durch seine Verknüpfungen nicht beliebig beweglich ist, wird das System scheinbar fest, was in einem Ethanol/Wasser-System nicht der Fall ist.

Beim Entwässern muß dann analog zur oben beschriebenen Destillation Energie aufgebracht werden, um die Entropie wieder zu verringern.

## 7 Zusammenfassung

Die Untersuchungen der Wasserdiffusion in Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* und verschiedenen Polysaccharid/Wasser-Systemen ergeben, daß die translatorische Bewegung von mehr als 99,8 % aller Wassermoleküle nur geringfügig von der Matrix beeinflußt wird. Das sehr große Wasserbindungsvermögen der Biofilme und Polysaccharide läßt sich also nicht mit physikalisch gebundenen Wassermolekülen deuten, sondern beruht vielmehr auf der Tendenz zur Bildung größtmöglicher Durchmischung innerhalb des Systems (entropischer Effekt).

Neben dem hochmobilen Wasser kann in den PA-Biofilmen und den Polysaccharid/Wasser-Systemen Wasser mit einem deutlich niedrigeren Diffusionskoeffizienten beobachtet werden. Bei den Biofilmexperimenten tritt dieses Phänomen nur in Anwesenheit von Bakterien auf, was vermuten läßt, daß es sich um intrazelluläres Wasser handelt.

In den Polysaccharid/Wasser-Systemen wird der niedrige Diffusionskoeffizient durch Wassermoleküle hervorgerufen, die für Zeiten in der Größenordnung von 100 Mikrosekunden in der Nähe ( $r < 5 \text{ \AA}$ ) der Polysaccharidprotonen bleiben. Eine wichtige Rolle scheint hierbei die Ladung des Polymers zu spielen (anziehende Wechselwirkungen), da der Effekt bei der neutralen Agarose sehr schwach ist. Tritt in dieser Zeit Kreuzrelaxation zwischen den Polymer- und den Wasserprotonen auf, detektiert die PFG-NMR eine scheinbar deutlich verlangsamte Wasserfraktion mit einem zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten. Eine direkte Bindung ist nicht erforderlich, da die Kreuzrelaxation durch dipolare Wechselwirkungen über den Raum wirkt. Es ist sogar denkbar, daß nur eine einheitliche Wasserphase existiert, und der beobachtete Effekt allein durch zufällige Polymer/Wasser-Kontakte entsteht. Bedingung für das Auftreten von Kreuzrelaxation ist jedoch eine genügend große Rigidität der Polysaccharidmoleküle.

Erwartungsgemäß zeigen die hochbeweglichen Polymere PVA, PEG und PAS keine detektierbare Kreuzrelaxation. Bei der Gelatine vermindert die freie Drehbarkeit der Aminosäurereste die dipolaren Wechselwirkungen und somit die Kreuzrelaxation sehr stark. Die wenigen völlig immobilisierten Protonen des Proteingerüsts verursachen keinen detektierbaren Effekt.

Das Ziel, die Beweglichkeit der Polymere mit der Wasserdiffusion zu korrelieren konnte nicht erreicht werden, da die Polysaccharide so immobil sind, daß sie mit der genutzten Methode nur zu einem sehr geringen Anteil ( $< 10 \%$ ) detektiert werden können. Auch der Einfluß der Wassermoleküle, die durch Kreuzrelaxation nachgewiesen werden können, auf die Stabilität der Systeme ist noch nicht geklärt.

Mit den hier gefundenen Ergebnissen können keine Angaben zur Beeinflussung der Stabilität und Entwässerbarkeit von Biofilmen und Schlämmen gemacht werden. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

## 8 Anhang

### 8.1 Diffusionskoeffizienten der Wasserfraktionen

Die in den Tabellen angegebenen Fehler beziehen sich nicht auf Wiederholungsexperimente, sondern auf die Standardabweichung bei der Regression der 16 Datenpunkte.

#### 8.1.1 Gesamtwassersignal

Bei der Auswertung des Diffusionskoeffizienten von Wasser mit Gradientenfeldstärken von  $0,5 - 3,0 \text{ Tm}^{-1}$  wird auf die automatische Berechnung der Spektrometersoftware von Bruker zurückgegriffen. Diese liefert jedoch keinen Fehler, der durch die Regression der Daten entsteht. Aus diesem Grund ist in einigen Fällen neben der automatischen Auswertung zusätzlich noch eine Auswertung mit dem Programm Microcal Origin durchgeführt worden. Die damit berechneten Diffusionskoeffizienten sind mit dem entsprechenden Fehler, der ausschließlich durch die Regression selber entsteht, versehen. Dieser liegt in der Größenordnung von maximal  $\pm 0,02$  (ca. 1 %).

##### 8.1.1.1 Biofilm

*Tab. 8-1: Diffusionskoeffizienten ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) von Wasser in zwei verschiedenen Biofilmen*

$\Delta$ (ms)	Biofilm 1	Biofilm 2
10	1,79	1,85
60	1,78	1,80
200	1,78	1,83

## 8.1.1.2 Polysaccharide

Tab. 8-2: Diffusionskoeffizienten ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) des Wassers in Manugel DJX

$\Delta$ (ms)	10 $\text{gl}^{-1}$	20 $\text{gl}^{-1}$	40 $\text{gl}^{-1}$
10	2,20	2,15	2,38
30	-	2,20	2,12
50	2,22	2,16	2,08
70	2,23	-	2,07
100	2,22 $\pm$ 0,01	2,17 $\pm$ 0,02	2,07 $\pm$ 0,02
200	2,24	2,19	2,07
300	2,25	2,19	2,07
500	2,21	2,15	2,08
800	2,18	2,17	2,08
1200	2,19	2,18	2,08
1500	2,19	2,20	2,08

Tab. 8-3: Diffusionskoeffizienten ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) des Wassers in Manugel +  $\text{CaCl}_2$ 

$\Delta$ (ms)	20 $\text{gl}^{-1}$ / 0,5	20 $\text{gl}^{-1}$ / 2,0	20 $\text{gl}^{-1}$ / 8,0	40 $\text{gl}^{-1}$ / 8,0
10	2,17	2,11	2,22	2,17
30	-	2,15	2,19	2,18
50	2,17	2,15	2,20	2,16
70	2,16	2,15	2,21	-
100	2,16	2,13	2,20 $\pm$ 0,01	2,16 $\pm$ 0,01
200	2,16	2,13	2,23	2,18
300	2,16	2,14	2,23	2,20
500	2,16	2,14	2,16	2,13
800	2,14	2,13	2,11	2,06
1200	2,17	2,14	2,11	-
1500	2,19	2,13	2,14	-



Tab. 8-4: Diffusionskoeffizienten ( $\times 10^9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) des Wassers in Manucol-LHF-Lösungen

$\Delta$ (ms)	10 $\text{gl}^{-1}$	20 $\text{gl}^{-1}$	40 $\text{gl}^{-1}$
10	2,23	2,20	2,12
30	2,21	2,15	2,10
50	2,21	-	-
70	2,20	2,05	2,11
100	2,21 $\pm$ 0,01	2,14 $\pm$ 0,02	2,08 $\pm$ 0,02
200	2,21	2,14	2,08
300	2,23	2,15	2,08
500	2,22	2,14	2,07
800	2,20	2,14	2,07
1200	2,22	-	2,08
1500	2,20	-	-

Tab. 8-5: Diffusionskoeffizienten ( $\times 10^9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) bei einer Konzentration von  $\text{gl}^{-1}$ 

$\Delta$ (ms)	Agarose	Gelatine
10	2,27	2,24
30	2,21	2,23
50	2,26	2,28
70	2,23	2,25
100	2,22 $\pm$ 0,01	2,21 $\pm$ 0,01
200	2,22	2,29
300	2,22	2,28
500	2,22	2,12
800	2,20	2,04
1200	2,21	2,05
1500	2,21	2,09

## 8.1.2 „Verlangsamtes“ Wasser

## 8.1.2.1 Manugel DJX

Tab. 8-6: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung ( $40 \text{ gl}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	$5,3 \pm 0,4$	$13,3 \pm 0,8$
30	$4,5 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,7$
50	$4,5 \pm 0,3$	$10,6 \pm 0,5$
100	$2,9 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,7$
300	$2,3 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$
500	$2,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
800	$2,7 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,2$

Tab. 8-7: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung ( $20 \text{ gl}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	$5,2 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,5$
30	$4,0 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,4$
50	$3,7 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,4$
100	$3,3 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,4$
300	$2,7 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,3$
500	$2,5 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$
800	$2,7 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,4$

Tab. 8-8: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung (10 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
30	6,7 ± 0,9	16,2 ± 1,2
50	4,5 ± 0,3	11,5 ± 0,9
100	4,0 ± 0,1	9,9 ± 0,6
300	2,3 ± 0,1	6,1 ± 0,4
500	2,4 ± 0,2	6,0 ± 0,4
800	3,3 ± 0,7	5,3 ± 0,5

## 8.1.2.2 Calciumalginat

Tab. 8-9: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung (20 g l<sup>-1</sup>) mit CaCl<sub>2</sub> (0,5 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
10	4,8 ± 0,3	11,5 ± 0,6
30	4,0 ± 0,2	8,5 ± 0,4
50	3,7 ± 0,2	8,7 ± 0,5
100	3,1 ± 0,1	8,1 ± 0,3
300	2,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3
500	2,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2
800	2,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1

Tab. 8-10: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung (20 g l<sup>-1</sup>) mit CaCl<sub>2</sub> (2,0 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$
10	4,5 ± 0,2	11,1 ± 0,6
30	3,8 ± 0,1	8,0 ± 0,4
50	3,5 ± 0,2	8,3 ± 0,4
100	3,1 ± 0,1	8,2 ± 0,4
300	2,4 ± 0,1	6,0 ± 0,2
500	2,5 ± 0,2	5,2 ± 0,2
800	2,7 ± 0,2	4,4 ± 0,2

Tab. 8-11: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) mit  $\text{CaCl}_2$  ( $8,0 \text{ g l}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1$ ( $\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	$D_2$ ( $\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )
50	$3,7 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,6$
100	$3,1 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,4$
300	$2,6 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,3$
500	$2,6 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,2$
800	$2,5 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$

Tab. 8-12: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manugel-DJX-Lösung ( $40 \text{ g l}^{-1}$ ) mit  $\text{CaCl}_2$  ( $8,0 \text{ g l}^{-1}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1$ ( $\cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	$D_2$ ( $\cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )
100	$2,8 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,4$
300	$2,6 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,3$
500	$2,5 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$
800	$2,3 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$

## 8.1.2.3 Manucol LHF

Tab. 8-13: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manucol-LHF-Lösung (10 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	n.a.	28,3 ± 1,2
30	9,1 ± 1,0	21,1 ± 1,0
50	5,9 ± 0,4	17,3 ± 0,9
100	5,5 ± 0,3	13,4 ± 0,7
300	3,5 ± 0,3	8,9 ± 0,7
500	3,2 ± 0,2	7,4 ± 0,9

Tab. 8-14: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manucol-LHF-Lösung (20 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	2,0 ± 0,1	-
30	5,7 ± 0,5	11,4 ± 0,9
50	4,2 ± 0,2	9,6 ± 0,9
100	3,4 ± 0,2	8,3 ± 0,4
500	2,3 ± 0,5	5,3 ± 1,0
800	2,5 ± 0,3	5,6 ± 0,6

Tab. 8-15: Diffusionskoeffizienten von Wasser in einer Manucol-LHF-Lösung (40 g l<sup>-1</sup>)

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$	$D_2 (\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	5,5 ± 0,3	13,1 ± 0,7
30	4,8 ± 0,2	11,1 ± 0,5
50	4,0 ± 0,2	9,2 ± 1,0
100	2,9 ± 0,1	7,4 ± 0,3
300	2,5 ± 0,2	6,0 ± 0,3
500	2,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2
800	2,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2

## 8.2 Kalibration des Gradientensystems

Tab. 8-16: Diffusionskoeffizienten von reinem Wasser ( $T = 298,1 \text{ K}$ )

$\Delta$ (ms)	$D_1 (\cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1})$
10	$2,27 \pm 0,01$
30	$2,32 \pm 0,02$
50	$2,29 \pm 0,01$
70	$2,33 \pm 0,03$
100	$2,28 \pm 0,01$
300	$2,27 \pm 0,01$
500	$2,33 \pm 0,02$
800	$2,31 \pm 0,01$

### 8.3 Signalzuweisung von Proteinsignalen

Tab. 8-17: Biofilmresonanzen und  $^1\text{H}$ -Resonanzen von Aminosäuren

Biofilm (ppm)	Aminosäure (ppm)	Aminosäure-Typ
0,91	0,90 / 0,94	$\delta$ -CH <sub>3</sub> , Leu
	0,89	$\delta$ -CH <sub>3</sub> , Ile
	0,95	$\gamma$ -CH <sub>3</sub> , Ile
	0,94 / 0,97	$\gamma$ -CH <sub>3</sub> , Val
1,19	1,19 / (1,48)	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> , Ile
	1,23	$\gamma$ -CH <sub>3</sub> , Thr
1,38	1,39	$\beta$ -H, Ala
1,65	1,65	$\beta$ -H, Leu
	1,70	$\delta$ -CH <sub>2</sub> , Lys
	1,70	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> , Arg
1,99	1,97 / (2,09)	$\beta$ -H, Glu
	2,01 / (2,13)	$\beta$ -H, Gln
	2,01 / (2,15)	$\beta$ -H, Met
	2,02 / (2,28)	$\beta$ -H, Pro
	2,03	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> , Pro
2,10	2,13	$\beta$ -H, Val
	2,13 / (2,01)	$\beta$ -H, Gln
	2,09 / (1,97)	$\beta$ -H, Glu
	2,15 / (2,01)	$\beta$ -H, Met
	2,13	$\epsilon$ -CH <sub>3</sub> , Met
2,25	2,28 / (2,02)	$\beta$ -H, Pro
	2,28 / (2,32)	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> , Glu
2,67	2,64	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> , Met
	2,75 / (2,83)	$\beta$ -H, Asn
2,96	2,96 / (3,28)	$\beta$ -H, Cys
	3,02	$\epsilon$ -CH <sub>2</sub> , Lys

Biofilm (ppm)	Aminosäure (ppm)	Aminosäure-Typ
3,17	3,13/ (2,92)	$\beta$ -H, Tyr
	3,22/ (2,99)	$\beta$ -H, Phe
6,83	6,86	3,5H, Tyr
	6,87/ (7,59)	$\delta$ -NH <sub>2</sub> , Gln
7,31	7,30	2,6H, Phe
	7,34	4H, Phe
7,54	7,50	7H, Trp
	7,59/ (6,91)	$\gamma$ -NH <sub>2</sub> , Asn
	7,59/ (6,87)	$\delta$ -NH <sub>2</sub> , Gln
8,03	8,09	NH, Trp
8,13	8,12	2H, His
	8,18	NH, Tyr
	8,19	NH, Ile
8,28	8,23	NH, Phe
	8,24	NH, Thr
	8,25	NH, Ala
	8,27	NH, Arg
	8,31	NH, Cys
8,41	8,38	NH, Ser
	8,39	NH, Gly
	8,41	NH, Asp
	8,41	NH, Lys
	8,41	NH, Gln
	8,41	NH, His
	8,42	NH, Met
	8,42	NH, Leu
	8,44	NH, Val

## 9 Literaturverzeichnis

Abatangelo G., Barbucci R., Brun P., Lamponi S. (1997) Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 18, 1141-1415

Almond A., Brass A., Sheehan J. K. (2000) Oligosaccharides as model systems for understanding water-biopolymer interaction: hydrated dynamics of hyaluronan decamer. *J. Phys. Chem. B*, 5634-5640

Andrec M., Prestegard J. H. (1997) Quantification of chemical exchange rates using pulsed-field-gradient diffusion measurements. *J. Biomol. NMR* 9, 136-150

Aspinall G. O. (Ed.) (1982) *The Polysaccharides Vol. I* aus: *Molecular Biology, An international Series of Monographs and Textbooks*. Academic Press, New York, London

Atkins E. D. T., Attwood P. T., Miles M. J., Morris V. J., O'Neill M. A., Sutherland I. W. (1987) Effect of acetylation on the molecular interactions and gelling properties of a bacterial polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 9, 115-117

Atkins P. W. (1990) *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mBH, Weinheim

Barbieri R., Quaglia M., Delfini M., Brosio E. (1998) Investigation of water dynamic behaviour in poly(HEMA) and poly(HEMA-co-DHPMA) hydrogels by proton  $T_2$  relaxation time and self-diffusion n.m.r. measurements. *Polymer* 39, 1059-1066

Bastow T. J., Hodge R. M. Hill A. J. (1997)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR studies of water and heavy water adsorption in poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J. Membr. Sci.* 131, 207-215

Bedzyk M. J., Bommarito G. M., Caffrey M., Penner T. L. (1990) Diffuse-double layer at a membrane-aqueous interface measured with x-ray standing waves. *Science* 248, 52-56



- Belton P. S. (1997) NMR and the mobility of water in polysaccharide gels. *Int. J. Biol. Macromol.* 21, 81-88
- Benítez J., Rodríguez A., Suárez A. (1994) Optimization technique for sewage sludge and sludge conditioning with polymer and skeleton builders. *Wat. Res.* 28, 2067-2073
- Beuling E. E., van Dusschoten D., Lens P., van den Heuvel J. C., van As H., Ottengraf S. P. P. (1998) Characterization of the diffusive properties of biofilms using pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance. *Biotechnol. Bioeng.* 60(3), 283-291
- Beuling E. E. (1998) Mass transfer properties of biofilms. Dissertation an der Universität Amsterdam, Erschienen im Verlag Eburon P&L, Delft
- Bieze T. W. N. (1994) Physical aspects of aqueous poly(ethylen oxide) solutions - An NMR and neutron diffraction study. Dissertation an der Universität Leiden
- Bishop P. L. (1997) Biofilm structure and kinetics. *Wat. Sci. Tech.* 36, 287-294
- Bowen P. T., Keinath T. M. (1987) Effects of sludge biochemical properties on dewaterability. In: Vesilind, P. A. (ed.) *Fundamental aspect of sludge characterization and dewatering.* Eng. Found. New York; 247-258
- Bowen P. T., Hendrick J. E., Woodward T. A., Mitchell L. S., Lahalou M. (1989) Sludge Treatment, Utilization, and Disposal. *J. WPCF* 61, 821-829
- Bruus J. H., Nielsen P. H., Keiding K. (1992) On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Wat. Res.* 26, 1597-1604
- Callaghan P. T. (1991) *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy.* Oxford University Press, Oxord

- Christensen B. E. (1989) The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J. Biotech.* 10, 181-196
- Christensen B. E. und Characklis W. G. (1989) Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis W. G. and Marshall K. C., *Biofilms*. Wiley Series, New York
- Cölfen (1993) Dissertation an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg
- Costerton J. W., Cheng K.-J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., Marrie T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 435-464
- Costerton J. W., Lewandowski Z., deBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994) Bacterial biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137-2142
- Costerton J. W., Stewart J. S., Greenberg E. P. (1999): Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322
- de Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowski Z. (1994a) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng* 43, 1131-1138
- de Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. (1994b) Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 636-641
- de Beer D., Srinivasan R., Stewart P. S. (1994c) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4339-4344
- de Beer D., Stoodley P. (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Wat. Sci. Tech.* 32, 11-18
- de Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 151-158

- Denkert R. (1994) Die Klärschlammbehandlung unter dem Gesichtspunkt einer optimierten Klärschlammmentwässerung. WAP 6/94, 47-55
- Dötsch V., Wider G. (1995) Exchange rates of internal water molecules in proteins measured using pulsed field gradients. J. Am. Chem. Soc. 117, 6064-6070
- Dvinskikh S. V., Furó I. (2000) Cross-relaxation effects in stimulated-echo-type PGSE NMR experiments by bipolar and monopolar gradient pulses. J. Magn. Res. 146, 283-289
- Ernst R. R., Bodenhausen G., Wokaun A. (1987) Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. Clarendon Press, Oxford
- Evans L. R., Linker A. (1973) Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 116, 915-924
- Exner M., Tuschewitzki G. -J., Thofern E. (1983) Untersuchungen zur Wandbesiedelung der Kupferrohrleitung einer zentralen Desinfektionsmitteldosieranlage. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 177, 170-181
- Figuerora L. A., Silverstein J. A. (1989) Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. Biotechnol. Bioengng. 33, 941-947
- Flemming H.-C. (1994) Biofilme, Biofouling und mikrobielle Materialschädigung. Stuttgarter Siedlungswasserwirtschaftliche Berichte, Oldenbourg Verlag München, Band 129
- Flemming, H.-C. (1995) Biofouling bei Membranprozessen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Flemming, H.-C. (1996) Biofouling and microbially influenced corrosion (MIC) - an economical and technical overview. In: Heitz E., Sand W., Flemming H.-C. (Hersg.) Microbially influenced corrosion of materials - scientific and technological aspects. Springer, Heidelberg, 5-14

Flemming, H.-C. (1998) Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer Degrad. Stabil.* 59, 309-315

Flemming H.-C., Wingender J., Moritz R., Mayer C. (1999) The forces that keep biofilms together. In: Keevil W., Godfree A. F. Holt D. M., Dow C. S. (eds.) *Biofilms in aquatic systems.* Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-12

Flemming H.-C., Wingender J., Griebe T., Mayer C. (2000a): Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans L. V. (ed) *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control.* Harwood Academic Publishers, The Netherlands, 19 - 34.

Flemming H.-C., Wingender J., Mayer C., Körstgens V., Borchard, W. (2000b) Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Lappin-Scott, H., Gilbert, P., Wilson, M. And Allison, D.: *Community structure and co-operation in biofilms.* SGM symposium 59. Cambridge University Press, 87-105

Flemming H.-C., Wingender J. (2000a): Extrazelluläre polymere Substanzen - der Baustoff für Biofilme. *Vom Wasser* 94, 245-266

Flemming H.-C., Wingender J. (2000b) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS) – part I: structural and ecological aspects. *Wat. Sci. Tech.* (in Press)

Flemming H.-C., Wingender J. (2000c) Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen, BIUZ (im Druck)

Flemming H.-C. (2000d) Persönliches Gespräch

Friebolin H. (1999) *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie : eine Einführung.* Wiley-VCH, Weinheim

Fringant C., Desbrières J., Milas M., Rinaudo M., Joly C., Escoubes M. (1996) Characterization of sorbed water molecules on neutral and ionic polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 281-286

Gacesa P., Russell N. J. (1990) The structure and properties of alginate. In: Gacesa P., Russell N. J. (eds.) *Pseudomonas infection and alginates. Biochemistry, genetics and pathology.* Chapman and Hall, 29-49

Gamini A., Toffanin R., Murano E., Rizzo R. (1997) Hydrogen-bonding and conformation of agarose in methyl sulfoxide and aqueous solutions investigated by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 304, 293-302

Ganapathy S., Rajamohanam P. R., Ray S. S., Mandhare A. B., Mashelkar R. A. (1994) Macromolecular hydration studied by two-dimensional heteronuclear  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  separation spectroscopy. *Macromol.* 27, 3432-3435

Gomi Y., Fukuoka M., Mihori T., Watanabe H. (1998) The rate of starch gelatinization as observed by PFG-NMR measurement of water diffusivity in rice starch/water mixtures. *J. Food Eng.* 36, 359-369

Grobe S., Wingender J., Trüper H.-G. (1995) Characterisation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated of technical water systems. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 94-102

Grobe S. (1996) Bedeutung des extrazellulären Polysaccharids Alginat für die Resistenz aquatischer Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Chlor. Dissertationen aus dem IWW; In: Berichte aus dem Rheinisch-Westfälischen Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie GmbH, Band 17; Mülheim a. d. Ruhr

Günther H. (1992) NMR-Spektroskopie : Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart

Hart T. D., Chamberlain A. H. L., Lynch J. M., Newling B., McDonald P. J. (1999) A stray field magnetic resonance study of water diffusion in bacterial exopolysaccharides. *Enz. Microbial Technol.* 24, 339-347

Hatakeyama T., Hatakeyama H., Nakamura K. (1995) Non-freezing water content of mono- and divalent cation salts of polyelectrolyte-water systems studied by DSC. *Thermochim. Acta* 253, 137-148

Hatakeyama H., Hatakeyama T. (1998) Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochim. Acta* 308, 3-22

Herb S., Merkl G., Flemming H.-C. (1997) Schäden an mineralischen Innenbeschichtungen von Trinkwasserbehältern. *Wasser, Abwasser gwf* 138, 157-164

Hinton D. P., Johnson C. S. Jr. (1993) Diffusion ordered 2D NMR spectroscopy of phospholipid vesicles: determination of vesicle size distributions. *J. Phys. Chem.* 97, 9064-9072

Holleman A. F. und Wiberg N. (1995) *Lehrbuch der anorganischen Chemie.* de Gruyter, Berlin

Keiding K., Wybrandt L., Nielsen P. H. (2001) Remember the water - a comment on EPS colligative properties. *Wat. Sci. Tech.*, im Druck

Knauss R., Schiller J., Fleischer G., Kärger J., Arnold K. (1999) Self-diffusion of water in cartilage and cartilage components as studied by pulsed field gradient NMR. *Magn. Res. Med.* 41, 285-292

Koch A. L. (1990) Diffusion - the crucial process in many aspects of the biology of bacteria. In: Marshal K. C. (Ed.) *Advances in microbial ecology.* Plenum Press, New York; Vol 11, 37-70

Körstgens V., Flemming H.-C., Wingender J., Borchard W. (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Wat. Sci. Tech.*, im Druck

Kriwacki R. W., Hill R. B., Flanagan J. M., Caradonna J. P., Prestegard J. H. (1993) New NMR Methods for the characterization of bound water in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 8907-8911

La Heij E. J., Kerkhoff P. J. A. M. (1996a) Determining porosity profiles during filtration and expression of sewage sludge by NMR imaging. *AIChE* 42, 959-959

La Heij E. J., Kerkhoff P. J. A. M., Herwijn A. J. M., Coumans W. J. (1996b) Fundamental aspects of sludge filtration and expression. *Wat. Res.* 30, 697-703

Lawrence J. R.; Wolfaardt G. M., Korber D. R. (1994) Determination of diffusion coefficients by confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1166-1173

Lee D. J. (1996) Interpretation of bound water data measured via dilatometric technique. *Wat. Res.* 30, 2230-2232

Lens P., Pol L. H., Lettinga G., Van As H. (1997) Use of  $^1\text{H}$  NMR to study transport processes in sulfidogenic granular sludge. *Wat. Sci. Tech.* 36, 157-163

Lens P., Vergeldt F., Lettinga G., Van As H. (1999)  $^1\text{H}$  NMR characterisation of the diffusional properties of methanogenic granular sludge. *Wat. Sci. Tech.* 39, 187-194

Lewandowski Z., Altobelli S. A., Majors P. D., Fukushima E. (1992) NMR imaging of hydrodynamics near microbially colonized surfaces. *Wat. Sci. Tech.* 43, 557-584

Lewandowski Z., Altobelli S. A., Fukushima E. (1993) NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnol. Progr.* 9, 40-45

Lewandowski Z., Stoodley P., Altobelli S., Fukushima E. (1994) Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems - recent advances and new problems. *Wat. Sci. Tech.* 29, 223-229

Lewandowski Z., Stoodley P., Altobelli S. A. (1995) Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 31, 153-162

Lloyd L. L., Kennedy J. F., Methacanon P., Paterson M., Knill C. J. (1998) Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydr. Polym.* 37, 315-322

Lüsse S., Arnold K. (1996) The interaction of Poly(ethylene glycol) with water studied by  $^1\text{H}$  and  $^2\text{H}$  NMR relaxation time measurements. *Macromol.* 29, 4251-4257

Lüsse S., Arnold K. (1998) Water binding of polysaccharides-NMR and ESR studies. *Macromol.* 31, 6891-6987

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H.-C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 3-16

Melsa A. K. (1993) Was ist beim Einsatz organischer Flockungshilfsmittel bei der Klärschlammwässerung zu beachten? *WAP 5/93*, 337-341

McBrierty V. J., Martin S. J., Karasz F. E. (1999) Understanding hydrated polymers: the perspective of NMR. *J. Molec. Liq.* 80, 179-205

Mitra P. P., Sen P. N., Schwartz L. M., Le Doussal P. (1992) Diffusion Propagator as a Probe of Structure of Porous Media. *Phys. Rev. Lett.* 68, 3555-3558

Moonen C. T. W., van Gelderen P., Vuister G. W., van Zijl P. C. M. (1992) Gradient-enhanced exchange spectroscopy. *J. Magn. Res.* 97, 419-425



Moritz R. (1997) Viskositätsmessungen an Biofilmen: Analyse von intermolekularen Wechselwirkungen. Diplomarbeit an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg

Okabe S., Yasuda T., Watanabe Y. (1997) Uptake and release of inert fluorescent particles by mixed population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 459-469

Otting G., Wüthrich K. (1989) Studies of protein hydration in aqueous solutions by direct NMR observation of individual protein-bound water molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1871-1875

Otting G. (1997) NMR studies of water bound to biological molecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 31, 259-285

Pavesi L., Balzarini M. (1996) NMR study of the diffusion processes in gels. *Magn. Res. Img.* 14, 985-987

Peschier L. J. C., Bouwstra J. a., de Bleyser J., Junginger H. E., Leyte J. C. (1996) Cross-Relaxation effects in pulsed-field-gradient stimulated-echo measurements on water in a macromolecular matrix. *J. Magn. Reson. B* 110, 150-157

Rajagopal P., Jones B. E., Klevit R. E. (1998) Solvent exchange rates of side-chain amide protons in proteins *J. Biomol. NMR* 11, 205-212

Rasmussen H., Bruus J. H., Keiding K., Nielsen P. H. (1994) Observation on dewaterability and physical, chemical and microbiological changes in anaerobically stored activated sludge from a nutrient removal plant. *Wat. Res.* 28, 417-425

Ray S. S., Rajamohanam P. R., Badiger M. V., Devotta I., Ganapathy S., Mashelkar R. A. (1998) Self-diffusion of water in thermoreversible gels near volume transition: model development and PFG NMR investigation. *Chem. Eng. Sci.* 53 (5), 869-877

- Rode A., Wingender J., Strathmann M., Leis A., Flemming H.-C. (2000) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *P. aeruginosa*. In: Methods in Enzymology. Biofilms (Hrsg. H.-C. Flemming), in press
- Roe A. (ed.) (1994) Biofilm heterogeneity. Center for Biofilm Engineering News Vol. 2, Bozeman, Montana
- Schmitt J. and Flemming H.-C. (1999) Water binding in biofilms. Wat. Sci. Technol. 39, 77-82
- Schopf, J.W., Hayes J.M., Walter M.R. (1983) Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: J.W. Schopf (ed.): Earth's earliest biosphere, Princeton Univ. Press, New Jersey, 361-384
- Schürks, N. (2000) <sup>13</sup>C-NMR Untersuchungen an Algen- und Bakterienalginaten. Diplomarbeit an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg
- Skjåk-Bræk G., Grasdalen H., Larsen B. (1986) Monomer sequences and acetylation patterns in some bacterial alginates. Carbohydr. Res. 154, 239-250
- Smith J. K., Vesilind P. A. (1995) Dilatometric measurement of bound water in waste water sludge. Wat. Res. 29, 2621-2626
- Södermann O., Jönsson B. (1995) Restricted diffusion in cylindrical geometry. J. Magn. Reson. A 117, 94-97
- Stejskal E. O., Tanner J. E. (1965) Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. J. Chem. Phys. 42, 288-292
- Stejskal E. O., Tanner J. E. (1968) Restricted self-diffusion of protons in colloidal systems by the pulsed-gradient spin-echo method. J. Chem. Phys. 49, 1768-1777

Stewart P. S. (1998) A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 261-272

Stilbs P. (1987) Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. *Progr. NMR Spectr.* 19, 1-45

Stryer L. (1990) *Biochemie. Spektrum der Wissenschaften* Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg

Sutherland I. W. (1990) *Biotechnology of exopolysaccharides*. Cambridge: C. U. P.

Sutherland I. W. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotech. Adv.* 12, 393-448

Sutherland I. W. (1997) Microbial exopolysaccharides - structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69, 1911-1917

Sutherland I. W. (1999) Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carb. Polymers* 38, 319-328

Sutherland I. W. (2000) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Wat. Sci. Tech.* (im Druck)

Tanford C. (1961) *Physiocal chemistry of macromolecules*. John Wiley & Sons, New York

Tanner J. E. (1978) Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers. Applications to NMR measurements with a pulsed field gradient. *J. Chem. Phys.* 69, 1748-1754

van As H., van Dusschoten D. (1997) NMR methods for imaging of transport processes in micro-porous systems. *Geoderma* 80, 389-403

van Zijl P. C. M., Moonen C. T. W., Faustino P., Pekar J., Kaplan O., Cohen J. S. (1991) Complete separation of intracellular and extracellular information in NMR spectra of perfused cells by diffusion-weighted spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3228-3232

Vesilind P. A. (1988) Capillary suction time as a fundamental measure of sludge dewaterability. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.* 60, 215-220

Vesilind P. A. (1994) The role of water in sludge dewatering. *Wat. Environ. Res.* 66, 4-11

Vesilind P. A., Hsu C.-C. (1997) Limits of sludge dewaterability. *Wat. Sci. Tech.* 36, 87-91

Vogt M., Flemming H.-C., Veeman W. S. (2000) Diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a pulsed field gradient NMR study. *J. Biotechnol.* 77, 137-146

Volke F., Eisenblätter S., Galle J., Klose G. (1994) Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipidbilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR. *Chem. Phys. Lipids* 70, 121-131

Wiggins P. M. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* 54 (4), 432-449

Wingender J., Flemming H.-C. (1999) Autoaggregation in flocs and biofilms. In: Winter, J. (ed.): *Biotechnologie* Vol. 8, 63-86

Wingender J., Neu T., Flemming, H.-C. (eds.) (1999): *Bacterial extracellular polymer substances*. Springer, Heidelberg, Berlin

Yalpani M. (1988) *Polysaccharides: synthesis, modifications and structure/property relations*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

Yamada-Nosaka A., Tanzawa H. (1991)  $^1\text{H}$ -NMR studies on water in methacrylate hydrogels. II  
J. Appl. Polym. Sci. 43, 1165-1170

Zientara G. P., Freed J. H. (1980) Spin-Echoes for diffusion in bounded, heterogenous media: a  
numerical study. J. Chem. Phys. 72, S. 1285-1292