

## **2. Überblick**

### **2.1 Biofilme**

#### **2.1.1 Definition**

Der Terminus „Biofilm“ stellt einen nicht scharf definierten Oberbegriff dar. Im Allgemeinen versteht man unter Biofilmen Konsortien von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Hefen, Protozoen etc.), welche in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert sind und miteinander und/oder an Grenzflächen verhaftet sind [5]. In die organische Polymermatrix können gleichermaßen weitere gelöste oder partikuläre Stoffe eingelagert sein. Im Rahmen dieser Definition können somit auch mikrobielle Aggregate wie Flocken (sogenannte "planktonische Biofilme") oder Mikrokolonien innerhalb von Porenräumen poröser Materialien [6] als Biofilme angesehen werden.

#### **2.1.2 Vorkommen**

Biofilme stellen eine ubiquitäre Lebensform dar. Es existiert keine Oberfläche, welche nicht von Mikroorganismen besiedelt wird. Trotz intensiver Bemühungen im Bereich der Material- und Grenzflächenforschung ist derzeit kein Werkstoff bekannt, der dauerhaft einer Besiedlung widersteht [7, 8]. Dies beruht unter anderem darauf, dass die Grundvoraussetzungen für Biofilmwachstum sehr gering sind: Mikroorganismen, Grenz- bzw. Oberflächen, Feuchtigkeit und Nährstoffe. Dementsprechend ist die Spannweite der Lebensbedingungen unter denen Biofilme existieren können, weit gefasst (Tabelle 2.1).

Aufgrund dieser außerordentlichen Anpassungsfähigkeit stellen Biofilme in natürlichen Ökosystemen die dominante Daseinsform mikrobiellen Lebens dar [5]. Offensichtlich bietet das Leben im Biofilm als Mikrokonsortien den Bakterien entscheidende Vorteile gegenüber der Existenz als suspendierte Einzelorganismen. Der Biofilm gewährleistet in erster Hinsicht einen Schutz vor pH- Schwankungen, osmotischem oder hydraulischem Stress und Bioziden. Gleichzeitig können durch Sorption in der Biofilmmatrix Nährstoffe angereichert werden. Die

Matrix reduziert aufgrund der gehinderten Diffusion den Verlust extrazellulärer Enzyme an die Wasserphase und unterstützt somit zusätzlich die Effektivität der Nährstoffverwertung. In einigen Fällen wurde sogar eine Fixierung und Stabilisierung extrazellulärer Enzyme durch die EPS- Matrix festgestellt [9].

**Tab. 2.1:** Spannweite mikrobieller Existenz in Biofilmen nach *Flemming* [2]

<i>Milieu</i> faktor	Spannweite
<b>Temperatur</b>	von – 12°C (kalte salzhaltige Lösungen) bis > 110°C (heiße maritime Schwefelquellen)
<b>pH- Bereich</b>	von 0 ( <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ) bis > 13 ( <i>Plectonema nostrocoum</i> )
<b>hydrostatischer Druck</b>	von 0 bis > 140 bar ("barophile Bakterien")
<b>Redoxpotential</b>	von – 450 mV (methanogene Bakterien) bis + 850 mV (Eisenbakterien)
<b>Salinität</b>	von 0 (aqua bidest.) bis zu gesättigten Salzlösungen (obligat halophile Bakterien in Salzseen)
<b>Nährstoffangebot</b>	von < 10 µg · L <sup>-1</sup> C <sub>org.</sub> (Systeme mit hochreinem Wasser) bis Leben direkt auf Nährstoffquellen
<b>Oberflächenmaterialien</b>	Metalle, Beton, Kunststoffe, Glas, Mineralien, Öle, pflanzliche und tierische Gewebe
<b>Strahlenbelastung</b>	Biofilme auf Quarzhüllen von UV-Lampen Biofilme auf radioaktivem Material (> 500 krad)
<b>Biozidkonzentration</b>	> 2 mg · L <sup>-1</sup> freies Chlor Biofilme in Desinfektionsmittelleitungen

Neuere Erkenntnisse deuten ferner darauf hin, dass sich die Mikroorganismen im Biofilm über Autoinduktoren, wie Homoserin-Lactone, verständigen und dadurch das An- bzw. Abschalten bestimmter Gene bewirken [10].

### 2.1.3 Bedeutung von Biofilmen

#### 2.1.3.1 Biofilme aus ökologischer Sicht

Die frühesten morphologischen Beweise für Leben auf der Erde weisen einen engen Zusammenhang zwischen hydrothermalen Aktivitäten und dem Auftreten von mikrobiellen Rasen (engl.: microbial mats) bzw. Biofilmen auf. Die ältesten bekannten Funde datieren zw. 3,3 - 3,5 Mrd. Jahre zurück und zeigen versteinerte Biofilme in stromatolitischen Gesteinsformationen [11, 12, 13]. Im Verlauf der Erdgeschichte konnten sich innerhalb dieses mikrobiellen Bewuchses einfache Mikroorganismen entwickeln, welche dazu in der



**Abb. 2.1:** „Microbial mats“ im Yellowstone Nationalpark (USA)

Lage waren, Photosynthese zu betreiben. Dadurch sind sie maßgeblich an der Umstellung der Erdatmosphäre von anaeroben zu aeroben Bedingungen beteiligt [14]. Als bakterieller Bewuchs auf zerfallendem organischem Material und durch dessen partiellen Abbau haben Biofilme einen wesentlichen Beitrag zur Bildung fossiler Brennstoffe geleistet [15]. Heutzutage spielen die sogenannten "microbial mats" eine wesentliche Rolle bei der Fixierung von atmosphärischem CO<sub>2</sub> [16], aber auch bei der Verwitterung von Gesteinen [17, 18].

#### 2.1.3.2 Biofilme in Industrie und Technik

Im Bereich von Industrie und Technik muss zwischen den positiven Nutzungsmöglichkeiten der Biofilme und ihrem unerwünschten Auftreten als Störfaktor in industriellen Prozessen unterschieden werden. Der größte Anwendungsbereich von Biofilmen liegt in der Abwasserreinigung. Die Immobilisation der Mikroorganismen als Biofilm innerhalb eines Reaktors birgt entscheidende Vorteile für die biologische Reinigung von Abwässern. So ist der Umsatz von Substrat aufgrund der höheren Zelldichten wesentlich größer und die Reaktorführung ist vergleichsweise unkompliziert, da physiologische Beschränkungen hinsichtlich der Wachs-

tumsrate der Mikroorganismen (Auswaschen) nicht gegeben sind. Darüber hinaus bietet die EPS- Matrix des Biofilms den Bakterien einen effektiveren Schutz gegenüber plötzlichen Stoßbelastungen, wie pH- Schwankungen oder erhöhten Salzkonzentrationen.

In der biologischen Abluftreinigung finden Biofilme unterschiedlichster Form ihren Einsatz. Man unterscheidet dabei drei Hauptverfahren: Biofilter [19], Biowäscher und Biotricklingfilter. Biofilter sind Festbettfilter, die mit organischen Trägermaterialien (z.B. Reisig, Fasern, Rindenmulch) gefüllt sind. Biowäscher sind Wäschersysteme, welche mit einer hohen Kreislaufwassermenge und einem separaten Reaktionsbehälter arbeiten. Der Nachteil dieses Systems ist, dass es nur für wasserlösliche Schadstoffe geeignet ist. Der Biotricklingfilter [20, 21, 22] macht sich die positiven Eigenschaften beider Reinigungssysteme zu eigen.

Häufig stellen Biofilme aber auch erhebliche Störfaktoren dar. In der Wasseraufbereitung kommt es durch mikrobiellen Aufwuchs auf Umkehrosmosemembranen, Aktivkohle-adsorbern o.ä. zur Kontamination des Wassers. Man spricht in diesem Falle auch von einem sogenannten "Biofouling".

In der Schifffahrt führt die Biofilmbildung an Schiffsrümpfen zur Verschlechterung der hydrodynamischen Eigenschaften des Schiffskörpers und somit zu einem erhöhten Treibstoffverbrauch. In Verbindung mit den resultierenden Folgekosten (Rumpfreinigung, Neuanstrich etc.) entsteht ein erheblicher wirtschaftlicher Schaden aufgrund von marinem Biofouling, der sich allein für die US Navy auf ca. 1 Mrd. Dollar pro Jahr beziffert [23].

Andere Formen der mikrobiellen Schädigung von Materialien werden unter dem Oberbegriff "Biodeterioration" zusammengefasst. Je nach betroffenen Materialien unterscheidet man zwischen mikrobiell induzierter Korrosion im Falle von Metallen oder Legierungen und mikrobieller Verwitterung [2, 24] bei mineralischen Werkstoffen.

Ein Beispiel für mikrobiell induzierte Korrosion ist der Lochfraß in Flugzeugtreibstofftanks aus Aluminium. Pilze wie *H. resinae*, welche über den Treibstoff mit eingebracht werden, kolonisieren die dünne Wasserschicht am Tankboden und setzen organische Säuren als Stoffwechselprodukte frei. Durch die Erniedrigung des pH- Wertes wird die Passivierung des Aluminiums aufgehoben und das Metall angegriffen [25].

### 2.1.3.3 Biofilme in der Medizin

Biofilme sind aus medizinischer Sicht unerwünscht und stellen eine ernste Problematik dar, da sie potentiell pathogene Keime beheimaten können. So werden nach neuesten Erkenntnissen wenigstens 60% aller nosokomialen Infektionen in der Implantationschirurgie auf bakterielle Biofilme zurückgeführt [26]. Als besonders ernst werden dabei Biofilminfektionen von Fremdkörperimplantaten wie z.B. Herzklappen- oder Gelenkprothesen [27] eingestuft, welche eine erhöhte Sterblichkeit bei den betroffenen Patienten zur Folge haben.

Die Problematik der Biofilme erstreckt sich aber auch auf eine Vielzahl anderer klinischer Bereiche. Im Rahmen des stationären Intensivpflegebetriebes treten häufig sogenannte Katheter-assoziierte Infektionen [28] auf. Dabei können entweder physiologische Hautkeime von der Katheteraustrittsstelle über die Katheteraußenfläche in das subcutane Gewebe eindringen und von dort in die Blutbahn gelangen oder aber Bakterien, welche anderen Infektionsherden innerhalb des Körpers entstammen, siedeln sich aufgrund der lokalen hämodynamischen Verhältnisse am Katheter an und führen hier zu einer Infektion.

**Tab. 2.2:** Beispiele für bakterielle Infektionen, die in Zusammenhang mit Biofilmen stehen [29]

<i>Infektionskrankheit</i>	<i>Bakterienspezies</i>
Karies	Acidogene Gram-positive Kokken (z.B. <i>Streptococci</i> )
Parodontitis	Gram-negative, anaerobe Bakterien
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Musculoskeletale Infektionen	Gram-positive Kokken (z.B. <i>Staphylococci</i> )
nekrotische Fasciitis	Gruppe A <i>Streptococci</i>
bakterielle Prostatitis	<i>E. coli</i> und andere Gram-negative Bakterien
zystische Fibrose	<i>P. aeruginosa</i> und <i>Burkholderia cepacia</i>
Melioidose	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Endokarditis	Viridans Gruppe <i>Streptococci</i>

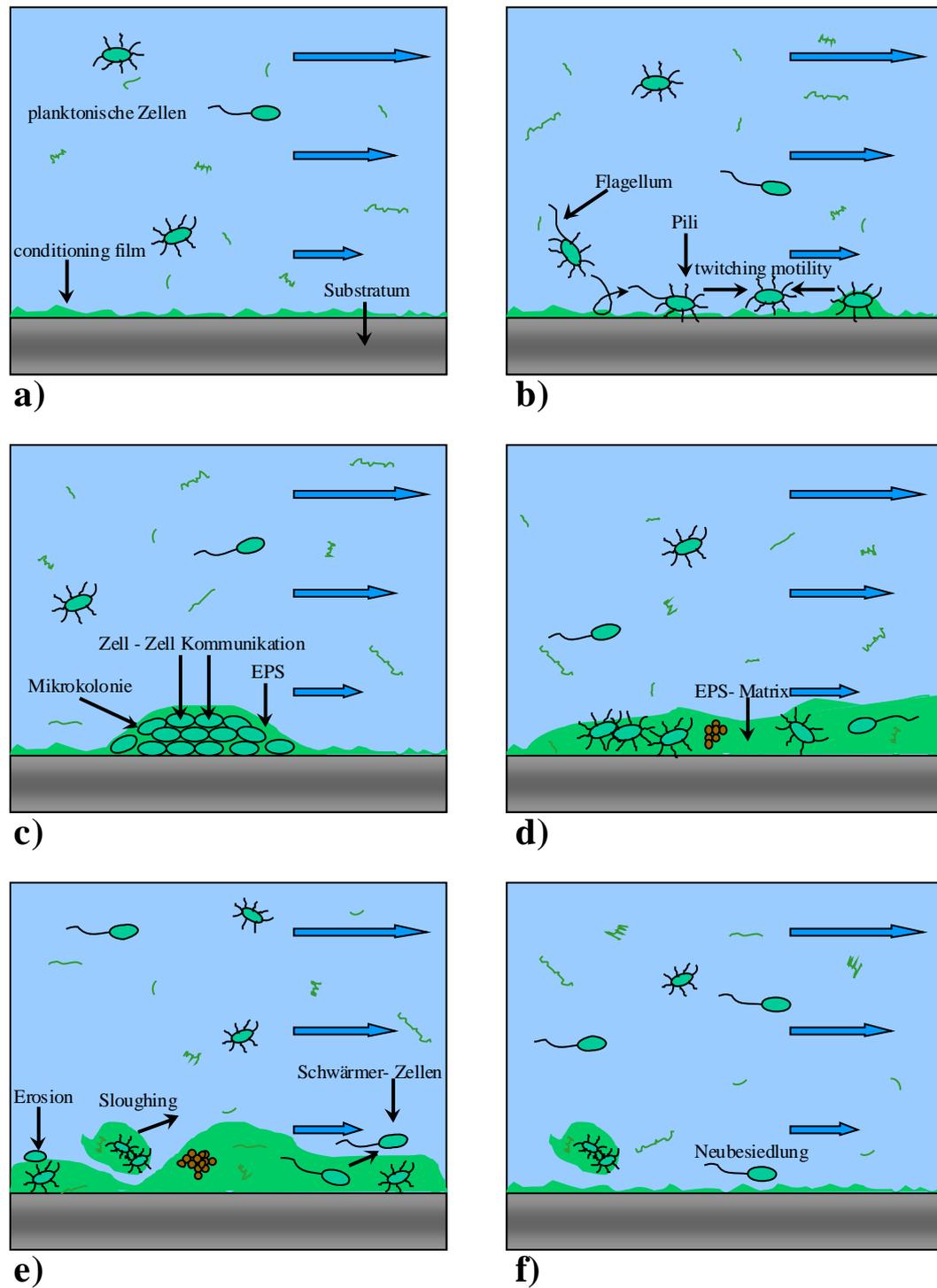
In der Zahnmedizin wurde recht früh die Bedeutung von Biofilmen in Zusammenhang mit dem Auftreten dentaler Plaque erkannt, wo sie zu Parodontitis und Gingivitis führen können. In diesem Bereich der Medizin existiert daher eine Reihe von Forschungsarbeiten [30, 31, 32, 33] zur Besiedlung von Zahnoberflächen, welche maßgeblich zum allgemeinen Verständnis der Biofilmentstehung beigetragen haben.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden Biofilme eines Stammes von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht, welcher aufgrund seiner potentiell pathogenen Eigenschaften eine medizinische Relevanz besitzt und eine Schlüsselfunktion in der Bekämpfung der Mukoviszidose einnimmt [34, 35]. Bei Mukoviszidose (engl.: cystic fibrosis) handelt es sich um eine erbliche, chronische Stoffwechselerkrankung [36], die vorwiegend innerhalb der kaukasischen Bevölkerung auftritt. Erhebungen der Cystic Fibrosis Foundation zufolge sind weltweit ca. 53.000 Fälle registriert, wobei jeder zwanzigste Amerikaner Träger des defekten „CF Gens“ ist. Bei Mukoviszidose-Patienten kommt es zu einer verstärkten Schleimbildung insbesondere innerhalb der Atemwege, die somit ein ideales Habitat für pathogene Bakterien wie *P. aeruginosa* darstellen. Infolge der Besiedlung durch pathogene Keime treten Entzündungen der Bronchien auf, die im weiteren Verlauf chronische Atemwegserkrankungen zur Folge haben.

#### **2.1.4 Aufbau und Entstehung von Biofilmen**

Obwohl Biofilme sehr heterogene Systeme darstellen [37] und die Variationsbreite hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Struktur groß ist, verläuft die Entwicklung eines Biofilms nach einem charakteristischen Schema. *Flemming* [2] unterscheidet bei der Besiedlung einer Oberfläche sechs typische Stadien (siehe Abb. 2.2).

Die Voraussetzung für eine mikrobielle Besiedlung ist der Transport der Organismen zur Oberfläche hin. Durch Konvektion gelangen die Bakterien bis zu einer hydrodynamischen Grenzschicht, bei der die laminare Fließgeschwindigkeit des wässrigen Mediums vollständig zum Erliegen kommt. Innerhalb der diffusiven Grenzschicht, welche zwischen 10 - 100 µm groß ist und somit deutlich die Größenordnung der Bakterien überschreitet, erfolgt der Transport über Diffusion oder aktive Fortbewegung mittels Flagellen oder Fimbrien.



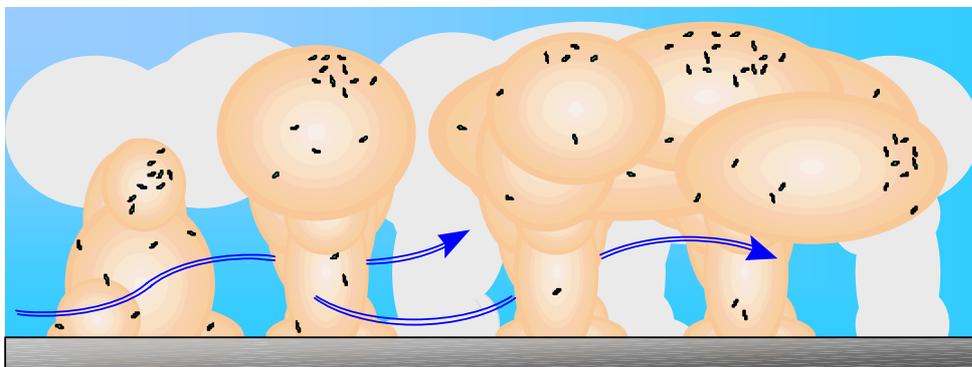
**Abb. 2.2:** Entstehung und Evolution eines Biofilms in einem Wassersystem; a) conditioning film, b) reversible und irreversible Adhäsion, c) EPS- Produktion und Bildung von Mikrokolonien, d) reifer, konfluenter Biofilm, e) Ablösung einzelner Bestandteile durch "sloughing" oder aktive Ablösung von Einzelorganismen ("Schwärmer- Zellen") durch Abbau von Matrixpolymeren, f) Neubesiedlung; Abbildungen nach *Flemming* [2]

Dem Transport der Mikroorganismen zur Oberfläche des Substrats hin folgt die initiale Adhäsion. Selten erfolgt diese direkt auf dem "inerten" Substrat, sondern auf einem sogenannten "conditioning film", einer unregelmäßigen Belegung aus organischen Makromolekülen. Die Adhäsion ist zunächst reversibler Natur, kann aber durch zunehmende physikochemische Wechselwirkungen zwischen Substrat und Mikroorganismen bzw. deren EPS irreversibel werden [38].

Die Wachstumsphase des Biofilms ist gekennzeichnet durch die Bildung von Mikrokolonien und der verstärkten Produktion von EPS. Die Entstehung der Mikrokolonien erfolgt sowohl durch Vermehrung der Bakterien, als auch durch aktive Bewegung der Zellen ("twitching motility") [39] auf der Oberfläche des Substrats. Gleichzeitig ist ein Anstieg der EPS-Produktion während dieser Phase zu beobachten; ein "reifer Biofilm" wird ausgebildet.

Das Biofilmwachstum erreicht einen stationären Zustand, die sogenannte Plateauphase, sobald das Biofilmwachstum und die Abtrennung von Biofilmbestandteilen einander die Waage halten. Von der Ablösung können sowohl einzelne Bakterienzellen (Erosion) oder periphere Teile des Biofilms ("Sloughing") betroffen sein. Zusätzlich zu diesen beiden Mechanismen wird auch ein aktives Absetzen von Bakterien in Form von sogenannten "Schwärmerzellen" erwogen [2].

Hat sich ein Biofilm auf einer Oberfläche etabliert, so wird seine Morphologie im Wesentlichen durch sein Wachstum, sowie durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren (Scherkräfte [40, 41], Nährstoffangebot, Zelldichte etc.) bestimmt. Ein weitläufig anerkanntes Biofilm-Modell ist unten (Abb. 2.3) dargestellt.

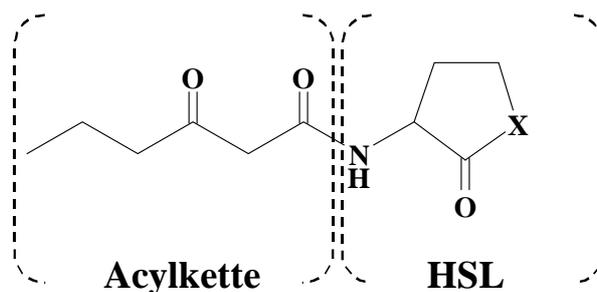


**Abb. 2.3:** Darstellung der Biofilmstruktur in einem Fließwassersystem; blaue Pfeile symbolisieren den konvektiven Stofftransport durch Poren bzw. Kanäle; nach *Costerton et al.* [42]

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, besitzt der Biofilm eine pilzartige Morphologie, in der die Bakterien als Mikrokolonien eingebettet sind. Ein System von Kanälen und Poren durchzieht die Biofilmatrix und gewährleistet den konvektiven Transport [43, 44, 45] von Nährstoffen und Sauerstoff bis hin zu den tiefergelegenen, älteren Schichten des Biofilms. Untersuchungen von *Bishop* [46] zeigen, dass die Porengrößenverteilung über den gesamten Biofilm betrachtet nicht einheitlich ist, sondern eine lokale Gewichtung vorliegt. So nimmt der mittlere Durchmesser der Poren von der äußeren Grenzschicht (Biofilm / wässriges Medium) zum Substrat hin ab. Innerhalb der EPS- Matrix selbst hingegen erfolgt der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion.[43, 47]

Die Struktur des Biofilms kann jedoch darüber hinaus von den Mikroorganismen selbst beeinflusst werden. Gram-negative Bakterien sind in der Lage über Signalmoleküle, sogenannte Autoinduktoren, Informationen hinsichtlich der Zelldichte in ihrer Umgebung ("Quorum Sensing") auszutauschen.

Für *Pseudomonas aeruginosa* sind bislang zwei Wege des "Quorum Sensing" bekannt. Das System *lasR-lasI* reguliert die Virulenz sowie die Expression von *rhlR-rhlI*, welches an der Produktion einiger sekundärer Katabolite beteiligt ist. Beide Systeme regulieren die Ausschüttung bestimmter Autoinduktoren: *rhlI* die von Butyrylhomoserinlacton und *lasI* die von 3-Oxododecanoylhomoserinlacton [48].



**Abb. 2.4:** Aufbau eines N-acyl- L-Homoserinlacton Autoinduktors. Das Molekül besteht aus einem L-Homoserinlacton Grundgerüst (HSL) und einer Acylkette, welche in Länge und Struktur variabel sein kann; X = O, S, N.

Weiterhin konnten *O'Toole et al.* [49] nachweisen, dass *crc* Mutanten von *P. aeruginosa* lediglich eine Monolayerschicht auf Oberflächen ausbilden und keinen dichten, mucoiden Biofilm, wie es beim Wildtyp der Fall ist. Da *crc* mit der Unterdrückung von Kataboliten assoziiert ist, müssen diese an der Biofilmentstehung beteiligt sein.

## 2.2 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

### 2.2.1 Definition

Unter extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) versteht man im Allgemeinen Biopolymere mikrobieller Herkunft. Sie sind maßgeblich beteiligt am Aufbau der polymeren Gelmatrix, welche das „Grundgerüst“ des Biofilms darstellt. So definieren Characklis und Wilderer [3] EPS als „... organische Polymere mikrobiellen Ursprungs. In Biofilmsystemen sind sie oft verantwortlich für den Zusammenhalt von Zellen (Kohäsion) [...] und die Anhaftung an ein Substrat (Adhäsion).“, d.h. der Funktionalität der Polymere fällt somit eine entscheidende Rolle zu.

**Tab. 2.3:** Übersicht über die Funktionalität der EPS innerhalb von Biofilmen (Teil I) [1]

<i>Funktion</i>	<i>Bedeutung</i>
Adhäsion an Oberflächen	Erster Schritt bei der Kolonisierung inerte Oberflächen und Gewebe, Akkumulation von Bakterien auf nährstoffreichen Oberflächen in oligotropher Umgebung
Aggregation von Bakterienzellen, Bildung von Flocken und Biofilmen	Verbindung zwischen Zellen und anorganischen Trägermaterialien, Immobilisierung heterogener Bakterienpopulationen, Grundlage für die Ausbildung hoher Zelldichten, Medium für <i>quorum sensing</i> , Ursache für Biofouling und Biokorrosion
Zell – Zell Erkennung	Symbiose mit Pflanzen oder Tieren, Initiierung pathogener Prozesse
Strukturelle Elemente des Biofilms	Mechanische Stabilität von Biofilmen (oft in Zusammenhang mit bivalenten Kationen), bestimmt die Form der EPS (kapsuläres Material, Schleim, Hülsen)
Schutzfunktionen	Resistenz gegenüber spezifischen oder unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirts (Phagozytose, Antikörperausschüttung, Bildung freier Radikale), Resistenz gegenüber Bioziden wie Desinfektionsmitteln und Antibiotika
Wasserrückhaltung	Verhindert die Austrocknung unter wasserarmen Bedingungen

**Tab. 2.3:** Übersicht über die Funktionalität der EPS innerhalb von Biofilmen (Teil II) [1]

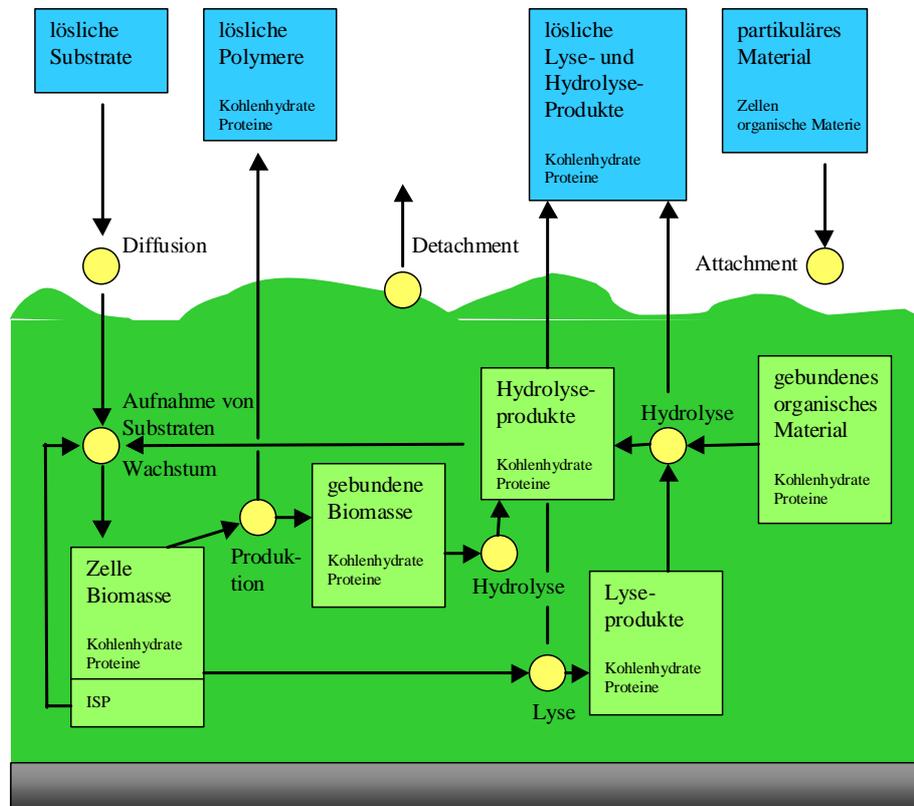
<i>Funktion</i>	<i>Bedeutung</i>
Sorption exogener organischer Verbindungen	Akkumulation von Nährstoffen aus der Umgebung, Sorption von Xenobiotika (Detoxifikation)
Sorption anorganischer Ionen	Akkumulation toxischer Metallionen (Detoxifikation), Ausbildung von Polysaccharidgelen
Enzymatische Aktivität	Verwertung exogener Makromoleküle als Nährstoffquelle, Freisetzung von Biofilmzellen durch den Abbau strukturbildender EPS des Biofilms
Wechselwirkungen zwischen den Polysacchariden und Enzymen	Akkumulation/Retention und Stabilisierung von Enzymen

### 2.2.2 Zusammensetzung der EPS

Biofilme setzen sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen: Bakterienzellen, extrazelluläre Polymere mikrobiellen Ursprungs, diverse Lyse- und Hydrolyseprodukte [50] sowie gebundene organische und anorganische Substanzen. Die makroskopisch beobachteten physikalischen Eigenschaften (viscoelastisches Verhalten, Adhäsions- und Kohäsionsvermögen, Komplexbildungsverhalten gegenüber Ionen etc.) der Biofilmmatrix sind durch das Mischungsverhalten aller makro- und niedermolekularen Komponenten im wässrigen Lösemittel, sowie bestimmten Sekundärfaktoren (pH, Ionenstärke der Lösung, etc.) gegeben. Sollen qualitative Aussagen über das Verhalten eines solch komplexen Systems gemacht werden, so ist eine Charakterisierung der Hauptkomponenten der EPS unerlässlich.

Aus chemischer Sicht stellen bakterielle EPS eine hochgradig heterogene Mischung unterschiedlichster Matrixpolymere dar. Die Polymere können durch verschiedenartige Mechanismen in die Biofilmmatrix gelangen. Mögliche Wege hierfür sind aktive Sekretion, Ablösen von Bestandteilen der äußeren Zellmembran, Lysis oder Sorption aus der wässrigen Phase [51]. Ein schematisches Modell, welches all diese Prozesse berücksichtigt, wurde von *Nielsen et al.* [52] vorgestellt (Abb. 2.5). Mit ihm lässt sich nicht nur der Nährstoffkreislauf und die

Zusammensetzung beschreiben, sondern es erlaubt darüber hinaus eine Korrelation zwischen Komposition, Aktivität und den physikochemischen Eigenschaften des Biofilms.



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der physikalischen und chemischen Prozesse innerhalb eines Biofilms [52]; ISP = intracellular storage products

Die größte Fraktion der polymeren Komponenten der EPS stellen Polysaccharide und Proteine dar. In geringeren Konzentrationen liegen daneben auch noch Nukleinsäuren, Lipide und Lipopolysaccharide vor. Manche Autoren zählen auch Huminstoffe zu den EPS [52, 53, 54], diese gelangen jedoch ausschließlich durch Sorption aus der Umgebung in die Biofilmmatrix und können daher nicht als EPS im engeren Sinne angesehen werden.

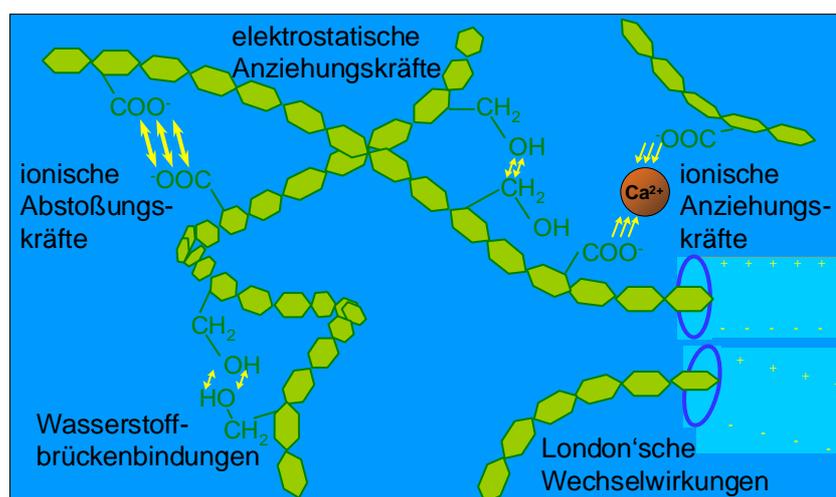
Die relativen Anteile aller Komponenten an den EPS sowie die Zusammensetzung und Molmassenverteilung der bakteriellen Polysaccharide [55] können stark in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen des Biofilms variieren. Eingehendere Untersuchungen an Laborkulturen von *P. aeruginosa* SG81 durch Rhode zeigen, dass das Nährstoffangebot eine entscheidende Rolle in der Alginatsynthese spielt [56]. Bei Bakterien der Spezies *Pseudomonas sp.* konnte sogar die Biosynthese zweier gänzlich verschiedener Polysaccharide [57] in Abhängigkeit von dem Wachstumsstadium der Mikrokolonien nachgewiesen werden.

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung der EPS einer Laborkultur von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 bezogen auf  $10^9$  Zellen, Anzucht auf PIA- Platten [58]

<i>Komponente</i>	<i>Biofilm</i> ( $\mu\text{g} \cdot 10^9$ Zellen)	<i>EPS</i> ( $\mu\text{g} \cdot 10^9$ Zellen)	<i>Anteil in den</i> <i>EPS</i>
Polysaccharide	1005,8	766,6	76,2 %
Uronsäuren	473,8	402,8	85,0 %
Proteine	585,0	226,4	45,5 %

### 2.2.3 Wechselwirkungen innerhalb der EPS

Die Bedeutung der EPS als strukturgebendes Element der Biofilmmatrix wurde bereits an anderer Stelle (Kapitel 2.1.4) erwähnt. Die Kräfte, welche für die kohäsiven und adhäsiven Eigenschaften des EPS- Netzwerks verantwortlich sind, sind nicht von der Natur kovalenter Bindungen. Es handelt sich vielmehr um die Summe unterschiedlicher schwacher Wechselwirkungskräfte, wobei man im Wesentlichen zwischen drei Typen von Wechselwirkungen unterscheidet [59]:



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wechselwirkungskräfte innerhalb der EPS-Matrix

**London'sche Wechselwirkungskräfte:**

Hierunter versteht man im Allgemeinen anziehende Kräfte zwischen Molekülen bzw. Molekülgruppen. Sie können leicht durch oberflächenaktive Substanzen wie Detergenzien aufgehoben werden und besitzen eine Bindungsenergie von ca. 2,5 kJ/mol.

**Elektrostatische Wechselwirkungen:**

Diese Form der Wechselwirkung tritt zwischen Ionen und permanenten sowie induzierten Dipolen auf. Die Wechselwirkungen zwischen ionischen funktionellen Gruppen und bivalenten Ionen sind sehr stark. Eine besondere Rolle fällt den Wechselwirkungen zwischen den Carboxylatgruppen extrazellulärer Polysaccharide mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu.

Elektrostatische Wechselwirkungen können ebenfalls als Abstoßungskräfte auftreten und somit die makromolekulare Struktur beeinflussen, wie z.B. zwischen benachbarten Carboxylatgruppen der Polyuronsäuren. Die Bindungsenergie nicht-ionischer elektrostatischer Bindungen beträgt zwischen 12 und 29 kJ/mol. Die Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen innerhalb einer Lösung ist abhängig vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Anwesenheit von Komplexbildnern.

**Wasserstoffbrückenbindungen:**

Wasserstoffbrückenbindungen treten hauptsächlich zwischen Hydroxylgruppen auf. Bei Proteinen sind Wasserstoffbrückenbindungen maßgeblich an deren Tertiärstruktur beteiligt. "Chaotrope" Reagenzien wie Harnstoff, Trimethylharnstoff o.ä. verändern die Wasserstruktur. Die freiwerdende Bindungsenergie von Wasserstoffbrückenbindungen liegt bei 10 - 30 kJ/mol.

Neben diesen Wechselwirkungskräften findet man bei Makromolekülen auch das sogenannte "Entanglement" vor, d.h. die Verschlaufung und Verknotung fadenförmiger Polymere [60]. Damit "Entanglements" auftreten können, muss die Molekülmasse der Matrixpolymere höher sein als  $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  und in einer kritischen Konzentration zwischen 3 - 5% im Lösungsmittel vorliegen. Die mittlere Molmasse des im Rahmen der Forschungsarbeit untersuchten Alginats von *P. aeruginosa* SG81, liegt zwischen  $1,2 - 0,9 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$  [61, 62], wobei die Konzentration des Polymeren in wässriger Lösung 1% nicht übersteigt. Aufgrund dieser

Rahmenbedingungen muss man davon ausgehen, dass "Entanglements" in Form von Agglomeraten vorliegen, jedoch kommt es ohne Zusatz bivalenter Ionen nicht zur Ausbildung eines unendlich ausgedehnten Gelnetzwerkes.

## 2.3 Polysaccharide

### 2.3.1 Allgemein

Polysaccharide sind hochmolekulare Kohlenhydrate natürlichen Ursprungs, welche sich aus einfachen Monosaccharideinheiten zusammensetzen. Ihre Monomereinheiten bestehen überwiegend aus Pentosen oder Hexosen und deren Derivaten. Eine Darstellung der häufigsten Zucker, welche zum Aufbau der Polysaccharide beitragen, sind in Abb. 2.7 und Abb. 2.8 festgehalten.

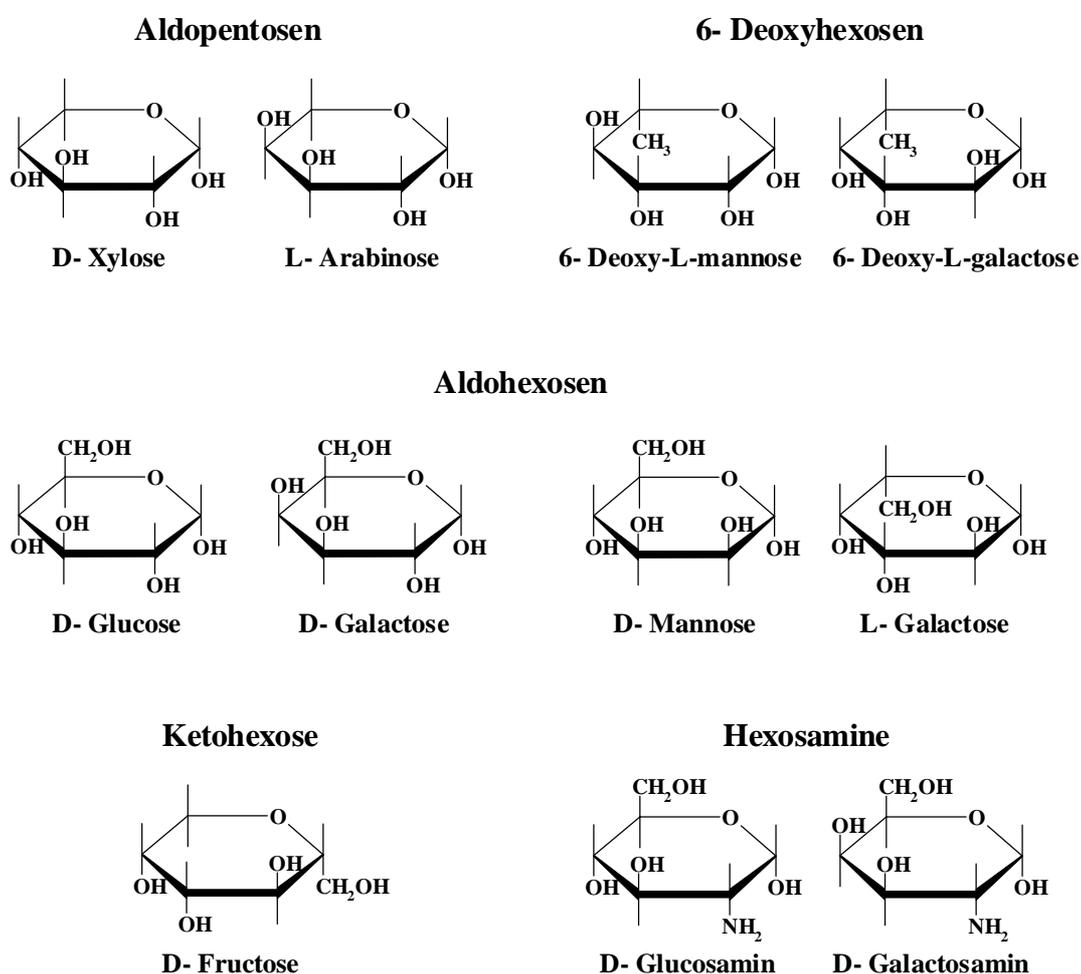
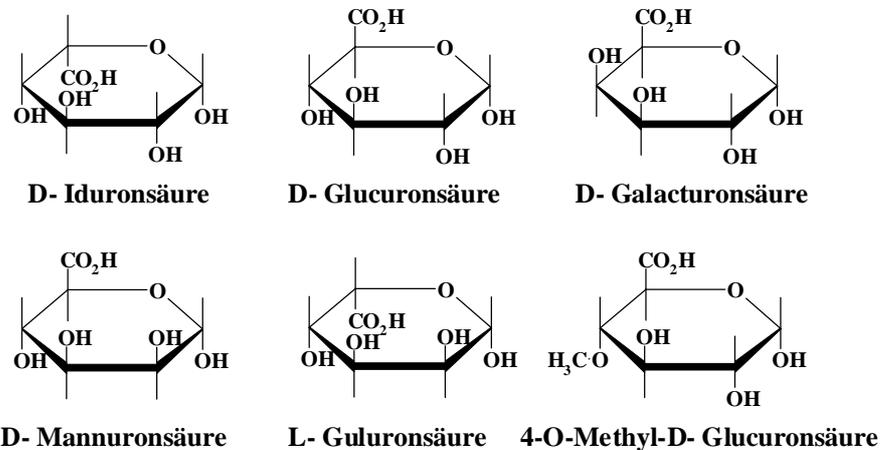


Abb. 2.7: Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden (Teil I) [63]

### Uronsäuren

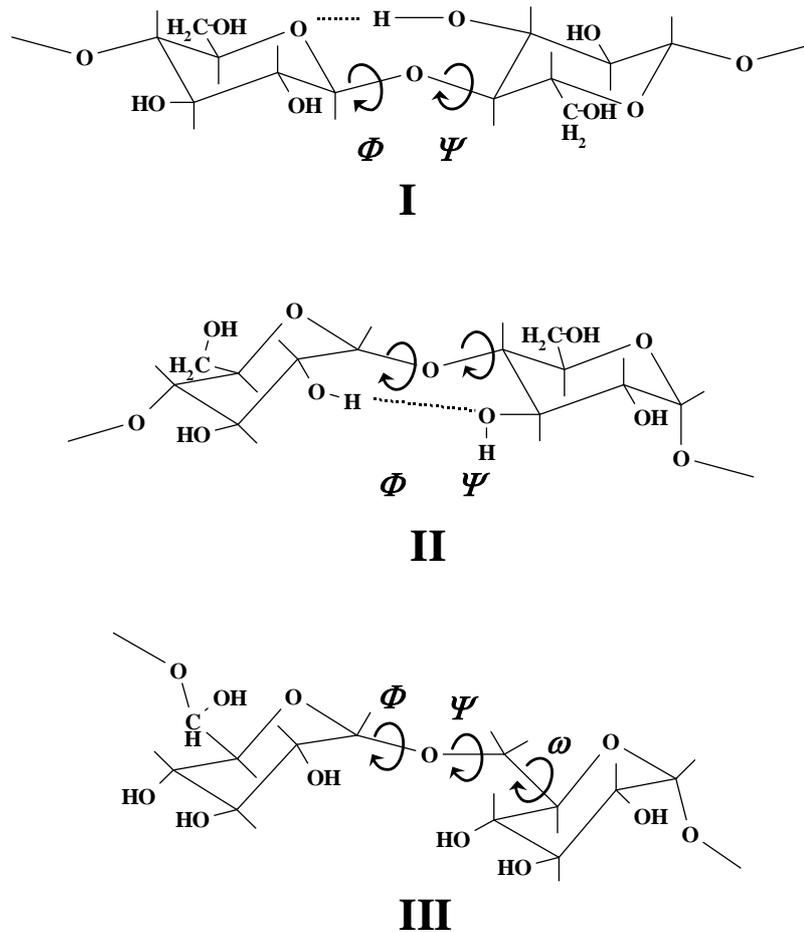


**Abb. 2.8:** Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden, Uronsäuren (Teil II) [63]

Die Erscheinungsformen der Polysaccharide sind trotz ihrer einfachen Grundstruktur sehr vielschichtig. Die Spanne der Molekulargewichte variiert von einigen Oligomeren bis zu Molekülen mit Molmassen von mehreren Millionen g/mol und die Makromoleküle können linear, verzweigt oder als Netzwerkstrukturen vorliegen. Man unterscheidet ferner zwischen homopolymeren und heteropolymeren Polysacchariden. Letztere treten als regelmäßige Copolymere, bestehend aus zwei bis acht unterschiedlichen Saccharidmonomeren, auf [63].

Polysaccharide sind vorwiegend polymolekular, d.h. sie setzen sich aus einer Vielzahl von Molekülen mit einer breiten Molmassenverteilung, aber identischem Grundgerüst zusammen. Darüber hinaus weisen sie in vielen Fällen auch einen hohen Grad an Polydispersität auf.

Die physikalischen Eigenschaften der Polysaccharide werden zudem durch die Natur der glykosidischen Bindung mitbestimmt. Die Nomenklatur der Bindung erfolgt gemäß der beteiligten monomeren Zuckermoleküle. So liegt, wie in den Beispielen von Amylose und Cellulose, eine 1,4- glykosidische Bindung vor, wohingegen bei Dextran eine 1,6- glykosidische Bindung vorgefunden wird. Die Konformation der 1,4- glykosidischen Bindung lässt sich durch zwei Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  beschreiben. Die 1,6- glykosidische Bindung hingegen ist komplexer und man benötigt einen weiteren Winkel  $\omega$  um die lokale Struktur exakt wieder-

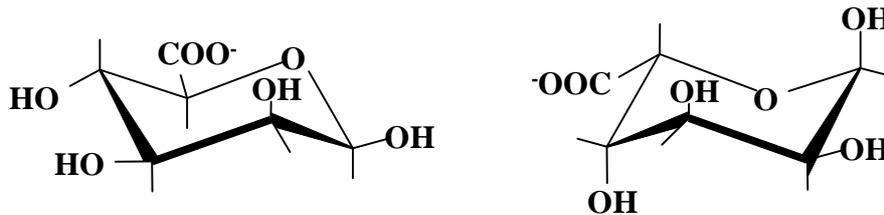


**Abb. 2.9:** Darstellung der Beweglichkeit der glykosidischen Bindung anhand dreier Beispiele: I) Cellulose, II) Amylose, III) Dextran; gepunktete Linien symbolisieren die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen; nach [64]

zugeben. Wie bereits aus der graphischen Darstellung (Abb. 2.9) ersichtlich ist, verfügt die 1,6- glykosidische Bindung eine wesentlich höhere Flexibilität als die vergleichsweise rigide 1,4- glykosidische Bindung. Dies beruht sowohl auf der Abwesenheit des zusätzlichen Torsionswinkels, als auch auf den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ringsauerstoffatom und der Hydroxylgruppe am C-3 Atom (**I**) bzw. zwischen den Hydroxylgruppen an den C-2 und C-3 Kohlenstoffatomen (**II**), welche die Rotationsfreiheit stark einschränken.

### 2.3.2 Alginate

Algenalginat sind unverzweigte Copolymere, die sich aus dem Monomerbaustein  $\beta$ -D- Mannuronat und dessen C5- Epimer  $\alpha$ -L- Guluronat zusammensetzen. Obwohl beide Uronsäuren sich nur geringfügig hinsichtlich ihrer Struktur unterscheiden, nehmen sie unterschiedliche Sesselkonformationen an, wodurch die Carboxylgruppe in der energetisch günstigen äquatorialen Orientierung vorliegt.

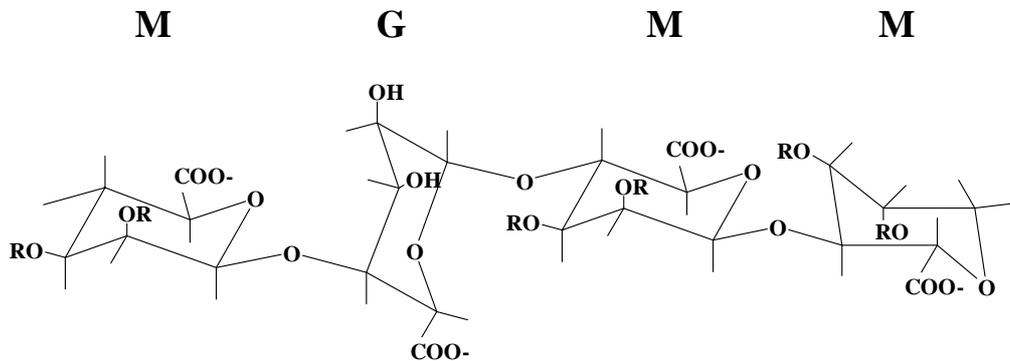


**Abb. 2.10:** Monosaccharidische Grundbausteine des Alginats: D- Mannuronat (links) und L- Guluronat (rechts)

Hieraus ergibt sich, dass die resultierenden glykosidischen Bindungen im Polysaccharid an den C1- und C4- Positionen im Falle des  $\beta$ -D- Mannuronats äquatoriale und für  $\alpha$ -L- Guluronat axiale Orientierung aufweisen. Innerhalb eines Alginatmoleküls sind die Monomere in einer Reihe von Blockstrukturen angeordnet, wobei sowohl homopolymere Blöcke [Poly-  $\beta$ -D- Mannuronat (M- Block) und Poly-  $\alpha$ -L- Guluronat (G- Block)], als auch alternierende Sequenzen (MG- Blöcke) nebeneinander vorliegen [65]. Die Sequenzverteilung der strukturgebenden Monomereinheiten folgt bei Algenalginaten rein statistischen Gesetzmäßigkeiten. Die physikalischen Eigenschaften des Makromoleküls werden maßgeblich durch die anteilige Zusammensetzung der Monomeren, dem sogenannten M/G- Verhältnis, bestimmt. Aufgrund der Natur der glycosidischen Bindung weisen mannuronatreichere Bereiche der Alginate eine flexible Bänderstruktur auf, wohingegen guluronatreiche Bereiche starre Kettensegmente ausbilden.

Bakterialginat sind im Allgemeinen spezifisch für die jeweilige Bakterienspezies [66] und besitzen eine ähnliche Grundstruktur wie die Algenalginat, unterscheiden sich jedoch in einigen Merkmalen. Hinsichtlich der Sequenz und der Häufigkeit bestimmter Blockstrukturen im Polymeren weisen Alginate von *Azotobacter vinelandii* die größte Ähnlichkeit zu Algenalginaten auf. Anders verhält es sich mit Alginaten unterschiedlicher *Pseudomonas*

Spezies. Die von den Pseudomonaden isolierten Polyuronsäuren besitzen im Gegensatz zu den Algalginaten keine Polyguluronatblöcke. Eingehendere Strukturanalysen von

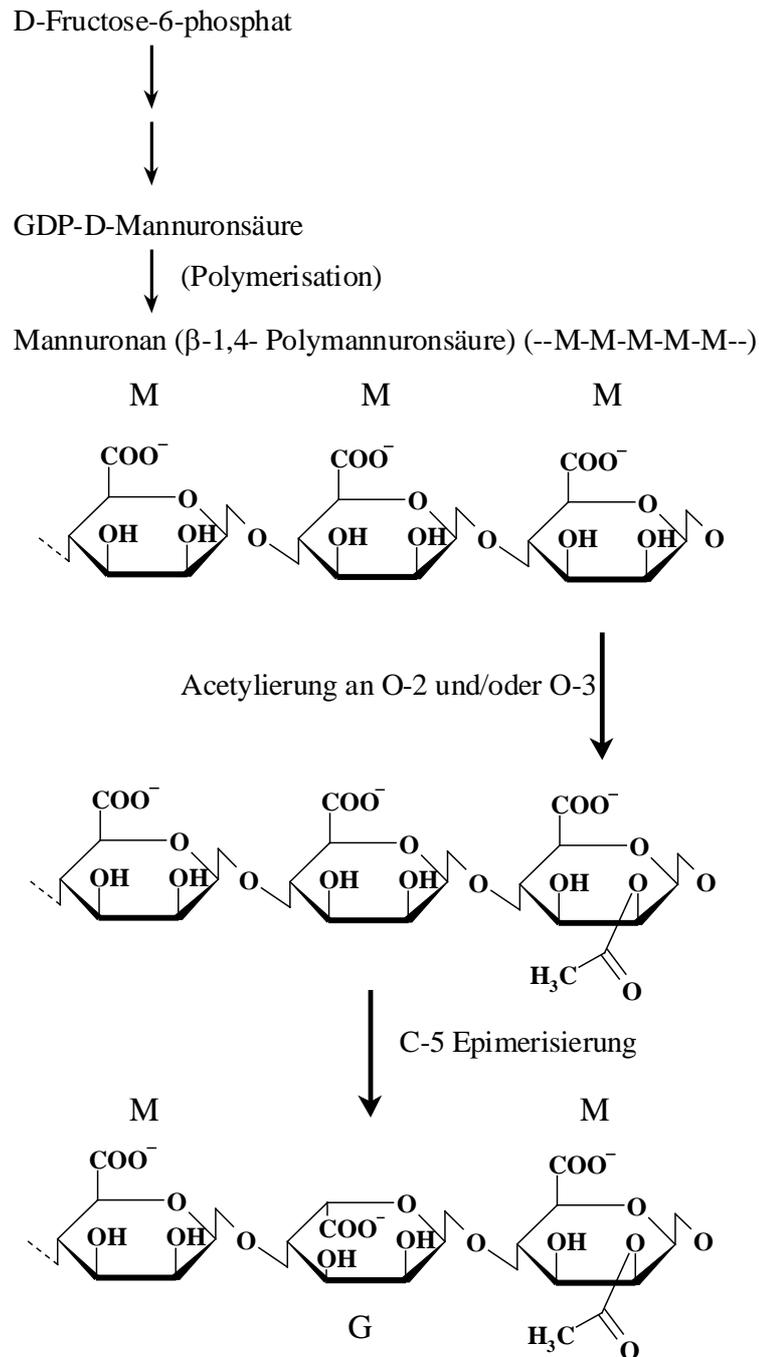


**Abb. 2.11:** Ausschnitt aus einem Alginatmolekül bakterieller Herkunft; R= -H, -COCH<sub>3</sub>

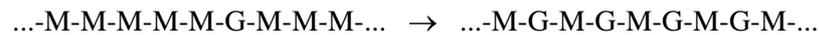
Alginatisolaten verschiedener *Pseudomonas aeruginosa* Stämme wiesen ferner darauf hin, dass die Sequenzverteilung im Polymeren nicht statistischer Natur sind [67].

Weiterhin verfügen Alginate bakterieller Herkunft über Acetylgruppen, welche ausschließlich an den O-2 oder O-3 Sauerstoffen der D-Mannuronatreste lokalisiert sind. Durch <sup>1</sup>H- NMR Messungen konnte nachgewiesen werden, dass partiell auch eine gleichzeitige Acetylierung an beiden Positionen auftreten kann [68]. Die Acetylierung der Mannuronatreste führt zu einer Erhöhung der Hydrophobizität dieser Monomerbausteine. Übertragen auf das gesamte Makromolekül verringern sich die Wechselwirkungen zwischen Polymer und Wasser und die Polymer - Polymer Wechselwirkungen nehmen zu. Dies hat zur Folge, dass ein vermindertes Quellungsvermögen der acetylierten Alginate zu beobachten ist [69]. Eine weitere Konsequenz der Acetylierung stellt die gehemmte Tendenz zur Gelierung in Anwesenheit bivalenter Kationen dar [70, 71].

Die Existenz bakterieller Alginate konnte erstmals durch *Linker* und *Jones* Mitte der 60er Jahre an Pseudomonaden nachgewiesen werden [72, 73]. Die Biosynthese von Alginat (siehe Abb. 2.11) in *P. aeruginosa* erfolgt ausgehend von Fructose-6- phosphat über den *Entner-Doudoroff* Zyklus [74]. Fructose-6- phosphat wird enzymatisch über Mannose-6- phosphat, Mannose-1- phosphat und GDP- Mannose in GDP- Mannuronsäure umgewandelt. Es folgt die Polymerisation des monomeren Materials zu GDP- Polymannuronsäure, welche bei *P. aeruginosa* durch die Gene *alg8*, *alg44* und *alg60* reguliert wird [75, 76]. Das Polymer



weitere Epimerisierung (nichtacetylierter M- Reste) führt zu unterschiedlichen Monomersequenzen:



↓



**Abb. 2.12:** Grundzüge der Biosynthese bakterieller Alginat nach *Christensen* [77]

wird im nächsten Schritt partiell an der O-2 bzw. O-3 Position acetyliert [78, 79]. Gegenwärtigen Erkenntnissen zufolge wird angenommen, dass die Acetylierung des Polymannuro-

nats den Grad der Epimerisierung [80] reguliert, bei der D-Mannuronsäure in L-Guluron-säure umgewandelt wird. Die naszierenden Alginatmoleküle werden mit Hilfe des *algE* Porenproteins über die äußere Zellmembran an die Umgebung abgegeben [81].

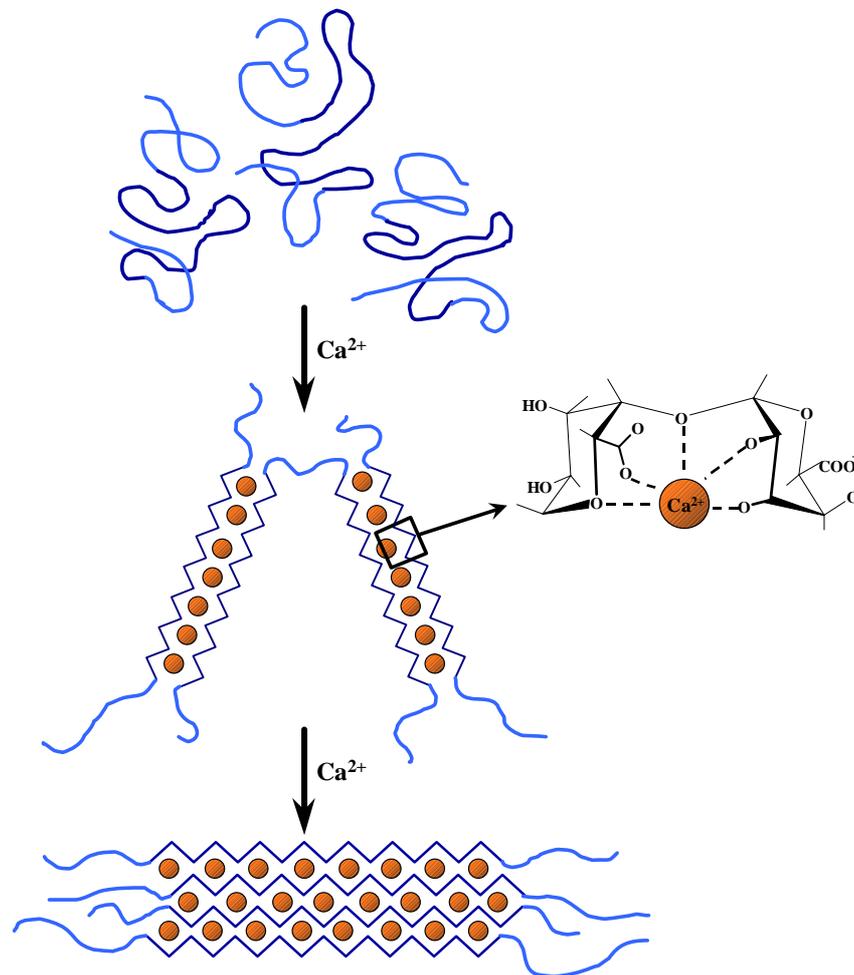
### 2.3.3 Wechselwirkungen bivalenter Kationen mit Alginat: Das "Egg-box" Modell

Alginat besitzen ein ausgezeichnetes Bindungsvermögen gegenüber Kationen und sind in der Lage, in Gegenwart bivalenter Kationen, insbesondere dem Calciumion, feste Gele zu bilden. Die Geleigenschaften der Alginat werden dabei maßgeblich von ihrer Molmasse, ihrer Konzentration und dem M/G- Anteil innerhalb der Polysaccharidkette geprägt: guluronatreiche Alginat bilden feste, aber brüchige Gele; mannuronatreiche Gele hingegen besitzen eine geringere Gelstärke, sind aber wesentlich flexibler.

*Grant et al.* [4] zeigten anhand von CD- spektroskopischen Untersuchungen zur Wechselwirkung von Alginaten mit  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen, dass in Alginatgelen eine Bindung chelat-ähnlicher Natur vorliegt, welche nahezu ausschließlich über die Guluronatblöcke des Alginats erfolgt. Aufgrund der axial - axialen Anordnung der glykosidischen Bindung im Polyguluronat besitzt die helicale Kettenstruktur eine günstige Zweifach- Symmetrie. Die so gefaltete Kettenstruktur bildet die sogenannte "Egg-box", in welcher das bivalente Kation gebunden ist. Diese Konformation (siehe Detailvergrößerung in Abb. 2.13) ermöglicht Wechselwirkungen zwischen dem Kation und dem Carboxylat- Sauerstoff und dem O-5 eines Monomers sowie dem glykosidischen Sauerstoff, dem O-2 und dem O-3 von dessen Nachbarn. Es besteht somit für jedes Calciumion eine fünffache, chelat-ähnliche Koordination durch die Sauerstoffatome des Polyguluronatblocks, wodurch eine stabile Komplexierung des Kations ermöglicht wird.

Die Ausbildung eines Gels ist ein vielschrittiger Prozess. In einer wässrigen Lösung von Alginat liegen die Polymerketten als ungeordnete Knäuel nebeneinander vor. Bei Dotierung der Lösung mit  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen bilden sich zunächst "Egg-box"- Dimere, d.h. Calciumionen werden zwischen zwei benachbarten Guluronatblöcken eingelagert. Mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ - Dotierung werden zunächst die Außenseiten der Dimere mit Kationen abgesättigt ("half egg-box"

binding [82]). Erst im nächsten Schritt erfolgt die Assoziation weiterer Polyguluronatblöcke an bereits vorhandene Dimere zu mehrschichtigen Netzwerkpunkten.



**Abb. 2.13:** Das "Egg-box" Modell für Calcium- Alginatgele nach *Yalpani* [83]; hellblaue Kettensegmente: Polymannuronatblöcke; dunkelblaue Kettensegmente: Polyguluronatblöcke, rechts: Detailsicht der Koordination eines Calciumions innerhalb einer "Egg-box"

Austauschexperimente mit monovalenten Kationen an Calciumalginatgelen bestätigen die hohe Stabilität der kooperativen Bindung: ist die für die Dimerbildung notwendige Äquivalentkonzentration zwischen Calciumionen und Guluronatblöcken erreicht, so findet kaum noch ein Austausch statt.