

4. Methoden

4.1 Anzucht von Biofilmen

Ausgehend von einer Stammpatte mit Zellkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 wurden Einzelkolonieausstriche auf Pseudomonas Isolierungs Agar (PIA) angelegt und 24 h bei 36°C bebrütet.

Mit der Bakterienmasse der Einzelkolonien wurden 10 mL einer sterilen $0,14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-Lösung angeimpft so, dass eine schwach getrübe Suspension entsteht. Die Trübung der Suspensionen entsprach dabei *McFarland*- Standard 2 ($\approx 6 \cdot 10^8$ Zellen pro mL). Je 100 μL der Suspension wurde auf PIA- Platten ausplattiert und anschließend im Brutschrank über 24 h bei 36°C bebrütet.

Die Anzucht von selektiv markierten Biofilmen erfolgte auf speziellen PIA- Platten, wobei der PIA mit an der C-2 Position isotopenmarkiertem ^{13}C - Glycerin ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) angesetzt wurde.

4.2 Isolierung der EPS

Mit Hilfe eines Metallspatels wurde der konfluente Bakterienrasen von ca. 20 Platten vorsichtig abgerntet und in einem Gewichtsverhältnis von 1:16 in deionisiertem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin 30 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer homogenisiert. Die Bakteriensuspensionen wurden im Anschluss 2h bei 10°C und 40000 g_n zentrifugiert, der Überstand dekantiert und durch einen Membranfilter aus Celluloseacetat (0,2 μm Porenweite, Fa. Sartorius, Minisart) steril filtriert.

Zur Abtrennung niedermolekularer Verbindungen wurde die EPS- Lösung über Nacht bei 4°C zweimal gegen 5 L entionisiertes Wasser dialysiert (Dialyseschlauch: regenerierte Cellulose, Porenweite: 25 Å, Ausschlussvolumen: 12000 - 14000 $g \cdot \text{mol}^{-1}$, Fa. Serva, Visking dialysis

tubing 20/32, Art.Nr. 44110.02). Die dialysierte EPS wurde im Anschluss daran für den späteren Gebrauch lyophilisiert.

4.3 Isolierung von bakteriellem Alginat

Der bakterielle Bewuchs von ca. 20 Agarplatten wurde vorsichtig geerntet und in 100 mL einer sterilen $0,14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Kochsalzlösung suspendiert [91]. Die homogenisierte Suspension wurde anschließend in 2 Stufen zentrifugiert: zunächst für 1h bei 10°C und 20000 g_n , dann wurde der Überstand erneut für 2h bei 40000 g_n zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden unter rühren langsam mit der dreifachen Menge eiskaltem, vergällten Ethanol (Rotisol, Fa. Roth) versetzt und 30 min in einem Eisbad gerührt. Der Niederschlag wurde über eine Nutsche (Nutsche Nr. 3, Fa. Schott) filtriert und auf der Nutsche je zweimal mit kaltem Rotisol und eiskaltem absoluten Ethanol (Fa. Merck) gewaschen. Die Trocknung der Präzipitate erfolgte in einem Vakuum- Exsikkator über P_2O_5 . Das getrocknete Rohpräzipitat wurde in sterilem $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl- Puffer, pH 7,2 in einer Konzentration von $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ resolvatisiert. Nach Zusatz von MgCl_2 (Endkonzentration: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), Desoxyribonuklease I (Endkonzentration: $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) und Ribonuklease A (Endkonzentration: $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurden die Ansätze 4h bei 36°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Lösung Pronase E (Endkonzentration: $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) zugegeben und über Nacht bei 36°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze 30 min bei 40000 g_n (4°C) zentrifugiert und die Überstände über Nacht zweimal gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde wie zuvor beschrieben mit eiskaltem Ethanol gefällt, das resultierende Präzipitat in wenig deionisiertem Wasser gelöst und lyophilisiert.

4.4 Isolierung der Alginat- Lyase

Als Vorkultur wurden 50 mL NBA- Medium in einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit *Klebsiella aerogenes* type 25 angeimpft und für 22h bei 37°C auf dem Rundschüttler bei 180 Upm

bebrütet [92]. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauer- Zählkammer bestimmt. Die Hauptkultur, bestehend aus 5 1 L Erlenmeyerkolben mit jeweils 400 mL NBA, wurde mit je 0,2 mL der Vorkultur angeimpft und gleichermaßen für 22h bei 37°C und 180 Upm kultiviert. Zur Kontrolle wurde die Zellzahl bestimmt und per Einzelkolonieausstrich auf Kontaminationen überprüft.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 16000 g_n sedimentiert und in 1/8 Volumen 50 mmol Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 1 mmol EDTA resuspendiert. Nach Bestimmung des Basiswertes der Extinktion bei 580 nm wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Die Beschallungsdauer betrug $6 \cdot 30$ sec bei 90 W, wobei der Extinktionswert auf weniger als 10% des Ursprungswertes abgesunken war. Verbliebene intakte Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 6000 g_n entfernt. Schließlich wurde der Überstand 1h bei 40000 g_n zentrifugiert, um die Zellhüllen zu entfernen.

Der erhaltene Zellextrakt wurde einer zweistufigen Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Zunächst wurde eine Fällung mit 50% Ammoniumsulfat (29,5 g Ammoniumsulfat auf 100 mL Zellextrakt) durchgeführt. Nach Aufbewahrung des Zellextrakts für 3h bei 4°C wurden die mit dem Ammoniumsulfat gefällten Proteine durch 20 min Zentrifugation bei 15000 g_n entfernt. Im Überstand wurde die Ammoniumsulfat- Konzentration auf 90% erhöht (29,5 g / 100 mL hinzufügen) und der Ansatz wurde wiederum bei 4°C über Nacht gelagert. Das resultierende Präzipitat wurde für 20 min bei 15000 g_n abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1/10 Volumen (ca. 25 mL) 50 mmol Phosphatpuffer (pH = 7,0) aufgenommen. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen Deionat dialysiert und bis zur späteren Verwendung in Eppendorf- Tubes eingefroren.

4.5 Bestimmung des Einflusses von pH- Wert und Temperatur

4.5.1 Einfluss des pH- Wertes

Es wurden jeweils 30 mg lyophilisierter EPS in je 4 mL deionisierten Wassers resuspendiert, so dass die Endkonzentration der Lösung $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ betrug. Im Falle der Messung im sauren

Milieu wurde der pH- Wert des wässrigen Lösemittels zuvor durch Zugabe von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl auf einen pH- Wert von 4,0 eingestellt. Bei den Messungen im alkalischen Bereich wurde analog verfahren. Durch tropfenweisen Zusatz von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_3 - Lösung konnte der pH- Wert auf 11,0 reguliert werden.

4.5.2 Einfluss der Temperatur

Die temperaturabhängigen NMR- Messungen wurden an einer EPS- Lösung der Konzentration $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ durchgeführt. Die Temperatur der Probe wurde mittels direkt im Messkopf reguliert. Die Kalibration der Temperatur erfolgte nach *Amman et al.* [93] über die Bestimmung der Frequenzverschiebung zwischen dem $-\text{CH}_3$ und dem $-\text{OH}^1\text{H}$ - Signal von Methanol.

4.6 Bestimmung des Einflusses mono- und bivalenter Ionen

Zur Bestimmung der Alginat-Gegenion Wechselwirkungen mit mono- und bivalenten Ionen wurde eine EPS- Konzentration $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ zugrundegelegt. Die gefriergetrocknete EPS wurde dabei vorgelegt und in den Lösungen der jeweiligen Chloride (NaCl , MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2) resuspendiert. Um insbesondere bei den bivalenten Ionen die Homogenität der Sol/Gel- Systeme zu gewährleisten, wurden die EPS-Me^+ - bzw. EPS-Me^{2+} - Lösungen 24h auf einem Magnetrührer gerührt.

4.7 Bestimmung des Einflusses trivalenter Ionen

Der Einfluss von Aluminiumionen wurde bei zwei unterschiedlichen pH- Werten bestimmt. Hierzu wurde $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ Salz der jeweiligen Konzentration entsprechend in einem Volumen von 500 mL gelöst, der pH-Wert mittels $0,1$ molarer HCl bzw. NaOH eingestellt und mit

einem pH- Meter kontrolliert. Anschließend wurde die EPS in 4 mL der entsprechenden Al^{3+} -Lösungen gelöst.

4.8 Stressreaktionen von Biofilmen

^{13}C - markierter Biofilm wurde in ein 10mm- Probenröhrchen überführt und hermetisch verlossen. Der so von Nährstoffen und Sauerstoff abgeschlossene Biofilm wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach 1, 2, 14, 20, 25, 27, 30 und 150 Tagen spektroskopisch vermessen. Nach der letzten Messung wurde zur Kontrolle ein Einzelkolonieausstrich vorgenommen, um den Zustand der Bakterien zu verifizieren. Anschließend wurde die Biofilmprobe mit 100 μL Alginatlyase von *Klebsiella aerogenes* versetzt und 2h bei 36°C gelagert und vermessen.