

5. Ergebnisse

5.1 Messungen am unmarkierten Biofilm und seinen Komponenten

Die organische Matrix von Biofilmen stellt ein komplexes Gemisch unterschiedlichster Komponenten dar, zu deren makromolekularen Bestandteilen man im Allgemeinen Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren zählt. Von der vorliegenden Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* SG81 ist bekannt, dass sie unter den vorgegebenen Anzuchtbedingungen Alginat, Proteine und andere extrazelluläre Polymere an ihre Umgebung - die resultierende Biofilmmatrix - abgibt.

5.1.1 Nativer Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* SG81

Charakteristisch für die ^{13}C -NMR Spektren des unter den gegebenen Bedingungen erhaltenen nativen Biofilms sind die scharfen Resonanzlinien von Glycerin (C1, C3: 64,2 ppm; C2: 73,6 ppm), welches als Kohlenstoffquelle für die Alginsynthese dient und durch Diffusion aus dem Nähragar in den Biofilmrasen gelangt. Die Abb. 5.1 zeigt das statische ^{13}C -Linien-

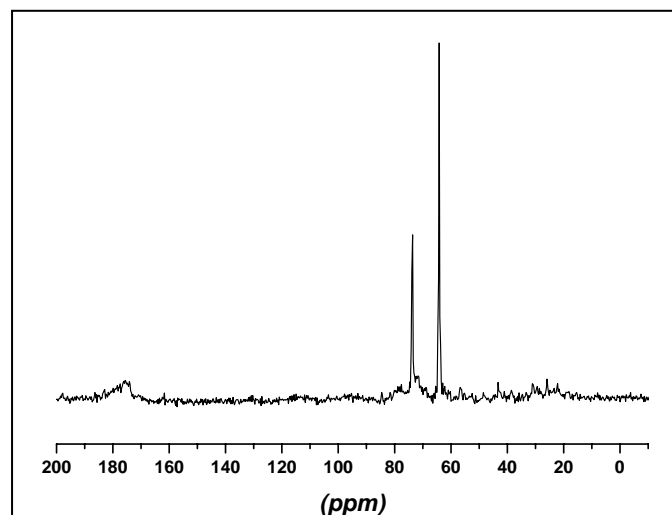


Abb. 5.1: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum (statisch) eines nativen Biofilms von *P. aeruginosa* SG81

spektrum, welches bei Direktanregung unter Protonenentkopplung aufgezeichnet wurde. Abgesehen von den Resonanzen des Glycerins weisen alle übrigen Signale ein ausgesprochen schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis auf. Das breite Signal bei 175,4 ppm deutet auf die Gegenwart von Carbonylkohlenstoffen hin und wurde den C6- Carboxylkohlenstoffen der Polyuronate zugeordnet. Darüber hinaus erscheinen im Frequenzbereich von 15 - 50 ppm einige schwache Resonanzlinien, die von Methylen- (-CH₂-) und Methin- (-CH-) Kohlenstoffen herrühren. Eine nähere Zuordnung dieser Resonanzlinien ist jedoch aufgrund der geringen Signalintensitäten nicht möglich.

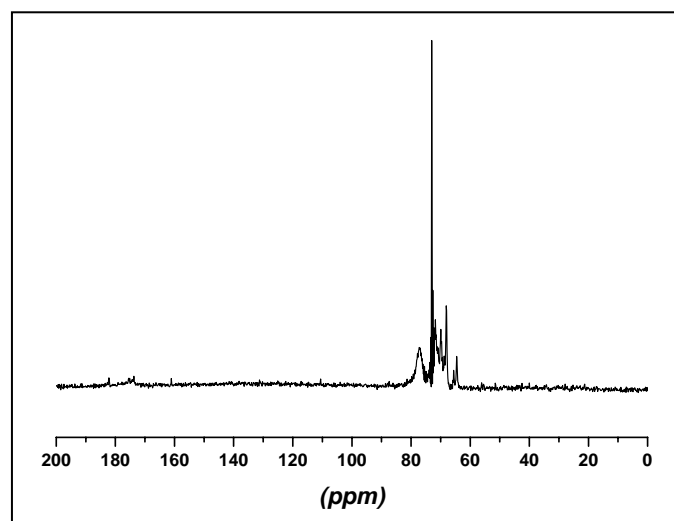


Abb. 5.2: ¹³C-CP - NMR Spektrum (statisch) eines nativen Biofilms von *P. aeruginosa* SG81

Unter Kreuzpolarisation (Abb. 5.2) erhält man ein Resonanzspektrum, bei dem ein Ensemble von Hydroxylkohlenstoffresonanzen (-HCOH-) im Bereich zwischen 60 - 80 ppm neben dem Glycerinsignal zu beobachten ist. Die Resonanzen in diesem Spektralbereich unterscheiden sich z.T. signifikant in ihrer spektralen Breite: überwiegend beträgt die Halbwertsbreite zwischen 45 und 60 Hz, bei dem einzelnen Signal bei 77,3 ppm hingegen sind es 200 Hz.

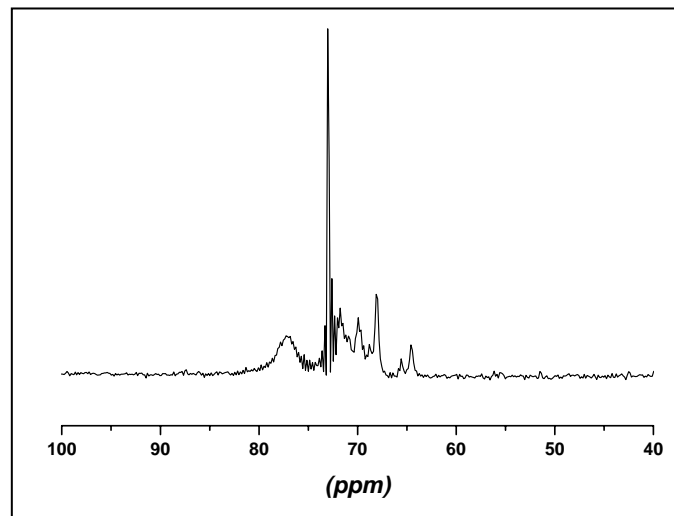


Abb. 5.3: ^{13}C - CP- NMR Spektrum eines nativen Biofilms von *P. aeruginosa* SG81; Ausschnittsvergrößerung der Hydroxylkohlenstoffresonanzen; "wiggles" im Spektrum deuten darauf hin, dass die Akquisitionszeit zu kurz gewählt worden ist, um den freien Induktionszerfall des Glycerinanteils vollständig aufzuzeichnen.

In der Ausschnittsvergrößerung des Hydroxylgruppenbereichs (Abb. 5.3) wird deutlich, dass sich die Signale stark von dem Flüssigkeitsspektrum des Glycerins unterscheiden, jedoch wiederum nicht die typischen Charakteristika eines Festkörperspektrums aufweisen. Die Linienbreiten erscheinen wesentlich geringer, als man es von statischen NMR- Messungen eines Festkörpers erwarten würde.

5.1.2 Bakteriellles Alginat

Die Charakterisierung des Alginats als eine der Hauptkomponenten des Biofilms, ist von essenzieller Bedeutung für das Verständnis des Aufbaus der Biofilmmatrix. Die Isolierung bakteriellen Alginats aus der EPS von Laborkulturen ist bereits in Kapitel 4 (s. 4.3) beschrieben worden. Das so gewonnene Polysaccharid weist eine relativ geringe Löslichkeit (ca. 1,5 Gew.-%) im wässrigen Lösemittel bei Raumtemperatur auf, so dass eine NMR- spektroskopische Untersuchung direkt am unmarkierten Isolat aufgrund experimenteller Rahmenbedingungen nicht durchführbar ist.

Dennoch ist es möglich, eine eingehende Struktur- und Sequenzbestimmung am Alginat vorzunehmen. Anfang der 80er Jahre wurde von *Grasdalen et al.* [94] ein Verfahren vorgestellt, bei dem die Löslichkeit von Alginaten durch partielle saure Hydrolyse [95, 96, 97] zu Polymerketten niedrigen Polymerisationsgrades erhöht wird. Die so abgebauten Kettenfragmente können leicht spektroskopisch untersucht werden und erlauben nicht nur eine Zuordnung der Resonanzen zu einzelnen Ringkohlenstoffen, sondern sogar eine Sequenzierung aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebung durch Nachbargruppeneffekte. Diese Methodik wurde von *Schürks* [67] aufgegriffen und für die bakteriellen Alginat entsprechend modifiziert.

Das Flüssigkeits- ^{13}C NMR Spektrum des hydrolysierten Alginats (Abb. 5.4) weist erwartungsgemäß dieselben typischen Resonanzlinien auf, wie sie zuvor in den Biofilmspektren beobachtet werden konnten. Die hohe Auflösung der einzelnen Resonanzlinien erlaubt jedoch in diesem Falle nicht nur die Zuordnung der C6- Ringkohlenstoffatome zu den jeweiligen Mannuronat- (M bzw. Man) oder Guluronatmonomerbausteinen (G bzw. Gul), sondern darüber

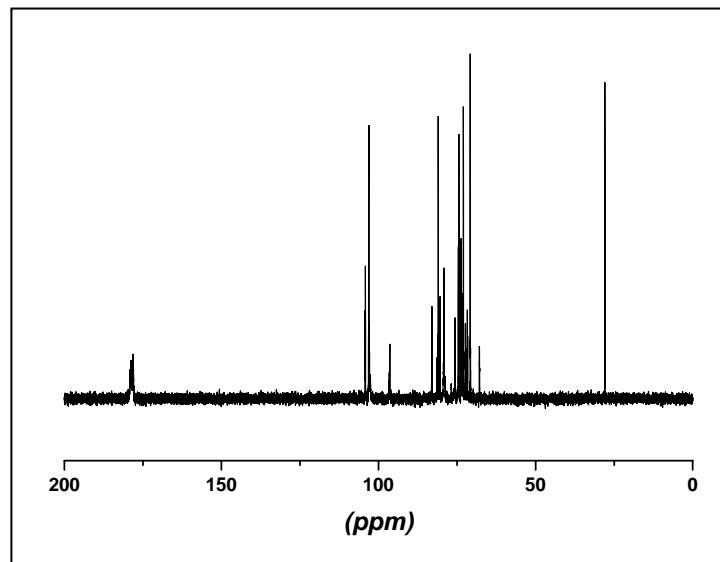


Abb. 5.4: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum von partiell abgebautem und deacetyliertem Alginat von *P. aeruginosa* SG81 bei $T = 333\text{ K}$; Carbonylkohlenstoffe: 178,1 ppm; anomerer Kohlenstoff: 104,3 - 102,6 ppm; Hydroxylgruppenkohlenstoffe: 83,0 - 67,9 ppm; THF (interner Standard): 27,9 ppm

hinaus auch aufgrund der von Nachbargruppeneffekten leicht unterschiedlichen chemischen Verschiebungen eine eingehende Sequenzierung (Abb. 5.6). Einzelne Resonanzlinien können bestimmten Triadensequenzen zugewiesen und somit Aussagen über den statistischen Aufbau des Alginats getroffen werden.

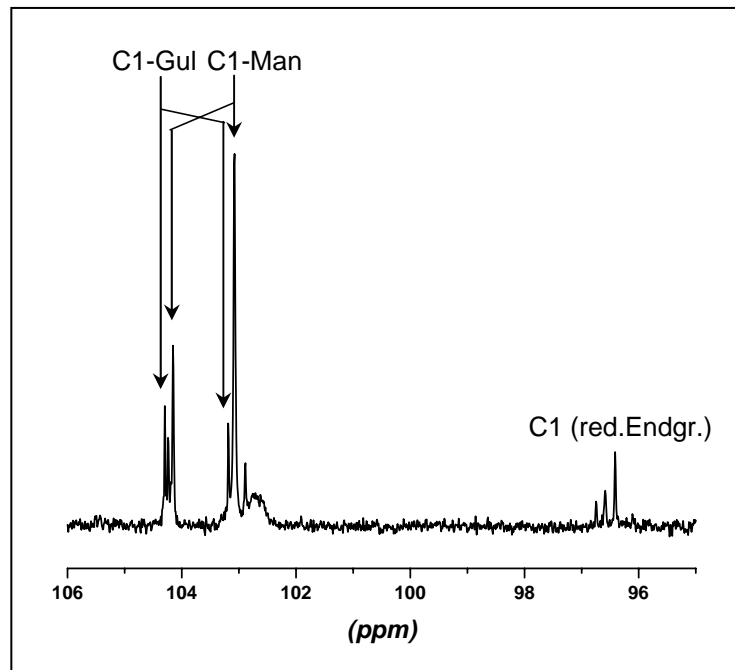


Abb. 5.5: Ausschnittsvergrößerung des Bereichs der anomeren Kohlenstoffatome

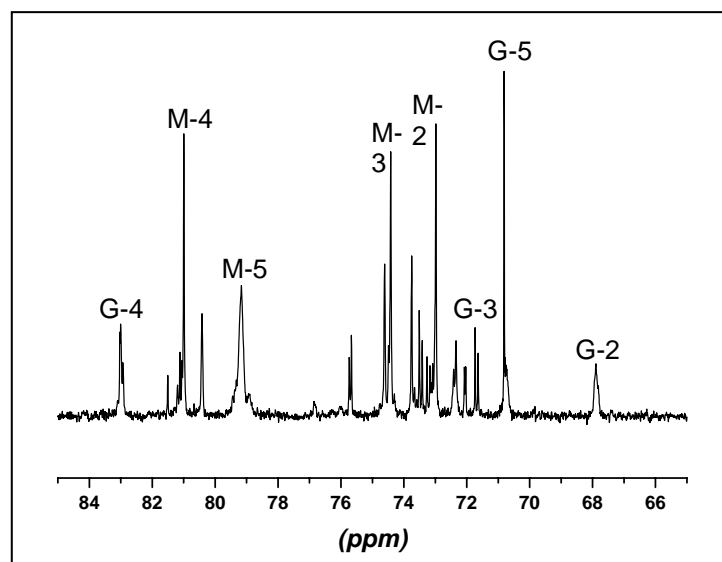


Abb. 5.6: Ausschnittsvergrößerung des Resonanzbereichs der Hydroxylgruppenkohlenstoffe

Die Abbildung 5.5 zeigt den Verschiebungsbereich der anomeren Kohlenstoffe. In dem Spektrum lassen sich deutlich die Resonanzlinien der C1- Kohlenstoffe der Mannuronatbausteine (103,1 ppm u. 104,1 ppm) von denen der Guluronatreste (103,2 ppm u. 104,3 ppm) unterscheiden. Aus den Signalintensitäten beider Resonanzen lässt sich die relative Häufigkeit der Monomerbausteine im Polysaccharid (M/G- Verhältnis) bestimmen. Das M/G- Verhältnis, welches anhand des vorliegenden Spektrums bestimmt wurde, beläuft sich auf einen Mannuronatanteil von 76% bzw. einem Guluronatanteil von 24%. Weiterhin geben die Resonanzlinien der reduzierten Endgruppen bei 67,5 ppm Aufschluss über den Grad des Abbaus, wobei angemerkt werden muss, dass diesbezüglich nur grobe Abschätzungen möglich sind. Bei der von *Schürks* [67] durchgeführten milden, sauren Hydrolyse weisen die resultierenden Alginatfragmente einen Polymerisationsgrad von 30 - 40 auf.

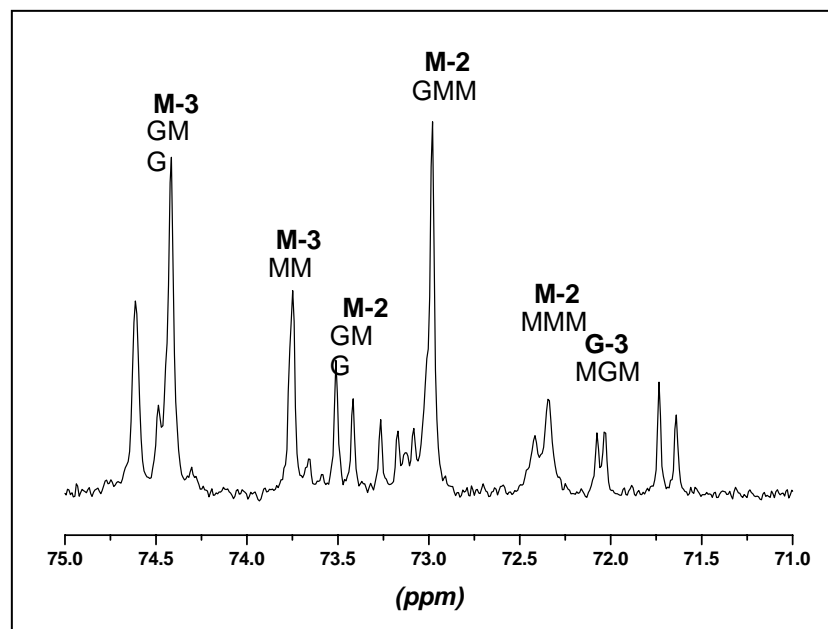


Abb. 5.7: Zuordnung der ^{13}C - Signale der M-2, M-3 und G-3 Ringkohlenstoffe zu einzelnen Triadensequenzen

Wie dem obigen Spektrenausschnitt (Abb. 5.6) zu entnehmen ist, stellt der Resonanzbereich der Hydroxylgruppenkohlenstoffe den linienreichsten Teil des NMR- Spektrums eines Algins dar. Im Spektrum des intakten Biofilms (Abb. 5.3) können diese Signale nicht aufgelöst werden und lediglich die intensivsten Resonanzlinien (M-5 u. G-5) lassen sich mit Gewissheit zuordnen. Im Falle des hydrolysierten Algins hingegen ist eine detaillierte Charakterisierung der Signale möglich (Abb. 5.7). Die Mehrzahl der Resonanzen in dem Spektrum ist stark

aufgespalten, insbesondere tritt dies im spektralen Bereich der M-2, M-3 und G-3 Signale (75 - 71 ppm) auf, was darauf hindeutet, dass sich Nachbargruppeneffekte am stärksten auf die C-2 und C-3 Ringkohlenstoffe (Abb. 5.7) auswirken. Die Zuweisung bestimmter Triadensequenzen zu den jeweiligen Resonanzsignalen erfolgte entsprechend der von *Grasdalen et al.* [94] vorgenommenen Einteilung.

In Analogie zu dem zuvor untersuchten Biofilmspektrum weist auch im Flüssigspektrum das Signal des C-5 Kohlenstoffs der Mannuronatbausteine im partiell abgebauten Alginat eine ungewöhnlich hohe Halbwertsbreite von 21 Hz auf, wodurch es sich grundsätzlich von den anderen Resonanzsignalen (5 - 8 Hz) des Spektrums unterscheidet.

5.2 Messungen an ^{13}C - angereichertem Biofilm und seinen Komponenten

5.2.1 Natürlicher Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* SG81

Die ^{13}C - Anreicherung nativen Biofilms mittels Zusatz von an der C2- Position markierten

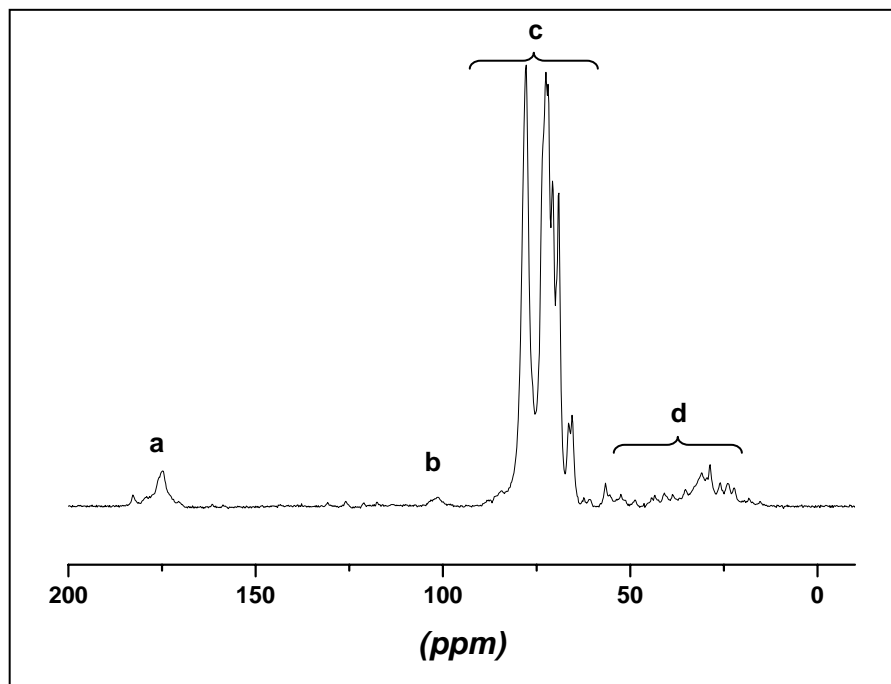


Abb. 5.8: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektrum (statisch) eines ^{13}C - angereicherten Biofilms von *P. aeruginosa* SG81; a) Carbonylkohlenstoffe b) anomere Kohlenstoffe c) Hydroxylgruppenkohlenstoffe d) Methylen- u. Methinkohlenstoffresonanzen

Glycerins führt zu einer deutlichen Verbesserung des S/N- Verhältnisses des Spektrums. Wie in Abb. 5.8 zu sehen ist, wirkt sich die Markierung ausschließlich auf die Signalamplituden der Hydroxylkohlenstoffresonanzen (c) aus, die Resonanzlinien der übrigen Kohlenstoffe (a, b, d) weisen hingegen vergleichbare Signalintensitäten auf, wie im unmarkierten Biofilm (Abb. 5.1).

In der Ausschnittsvergrößerung des Spektralbereichs zeigt sich die hohe Linienbreite der Resonanzsignale im Festkörperspektrum des Biofilms. So lässt sich der spektrale Bereich der Hydroxylgruppenresonanzen grob in drei Teilabschnitte unterteilen: das verbreiterte, isolierte Signal des C-5 Ringkohlenstoffs der Mannuronatbausteine bei 77,3 ppm (M-5), einen

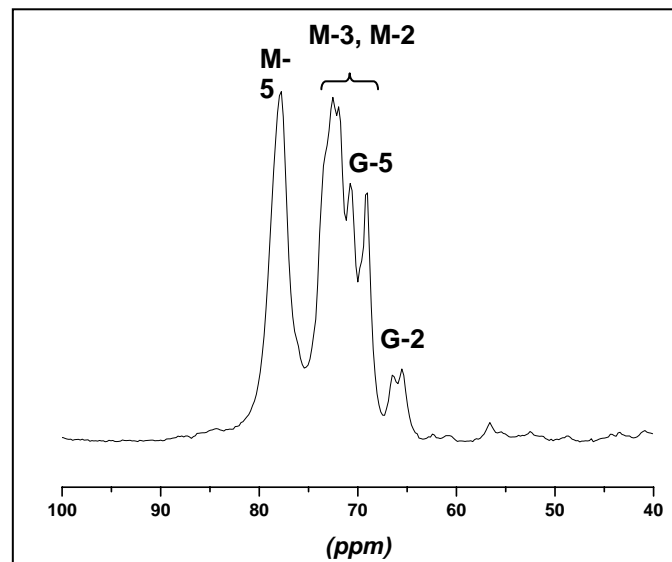


Abb. 5.9: Ausschnittsvergrößerung des Resonanzbereichs der Hydroxylgruppenkohlenstoffe eines ^{13}C -angereicherten Biofilms von *P. aeruginosa*

Bereich von sich eng überschneidenden Resonanzlinien zwischen 73,5 - 69,0 ppm (M-3, M-2, G-5) und zwei isolierte, aber einander überlappende Signale (G-2) bei 66,3 bzw. 65,3 ppm. Die Übereinstimmungen zu dem Kreuzpolarisationsspektrum des natürlichen Biofilms (Abb. 5.3) sind am deutlichsten bei den separierten Resonanzlinien (77,3 ppm, 66,3 ppm) zu erkennen (Abb. 5.9). Bei den anderen Kohlenstoffresonanzen im Frequenzbereich von 73,5 - 69,0 ppm hingegen kommt es zu einer Verlagerung der Intensitätsverhältnisse aufgrund der spezifischen ^{13}C -Markierung. Darüber hinaus erweist sich hier die Auflösung einzelner Resonanzsignale als unzureichend, was eine zufriedenstellende Dekonvolution dieses Spektralbereichs erschwert.

Untersuchungen zur Spin - Gitter Relaxation des Alginats im Biofilm können aufgrund der oben beschriebenen Probleme bei der Dekonvolution lediglich an den C-5 Resonanzlinien beider Monomerbausteine durchgeführt werden. Die T_1 -Zeiten beider Monomere unter-

scheiden sich merklich voneinander und liegen bei 0,313 s für die Mannuronat- und bei 0,262 s für die Guluronatreste.

5.2.2 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Wenn man sich ausgehend von den naturbelassen Biofilmen den Isolaten zuwendet, dann stellt die bakterienfreie, dialysierte EPS die erste Aufarbeitungsstufe dar (s. Kapitel 4.2). Die aus dem Überstand gewonnenen extrazellulären polymeren Substanzen beinhalten sämtliche makromolekularen Bestandteile der Biofilmmatrix bis zu einer Ausschlussgröße von 12 kDa. Um die Langzeitbeständigkeit des Probenmaterials zu gewährleisten, wird die EPS lyophilisiert und trocken gelagert. Für die jeweiligen Messungen wird das gefriergetrocknete Material in deionisiertem Wasser resuspendiert und auf eine EPS - Konzentration von 7,5 g/L eingestellt.

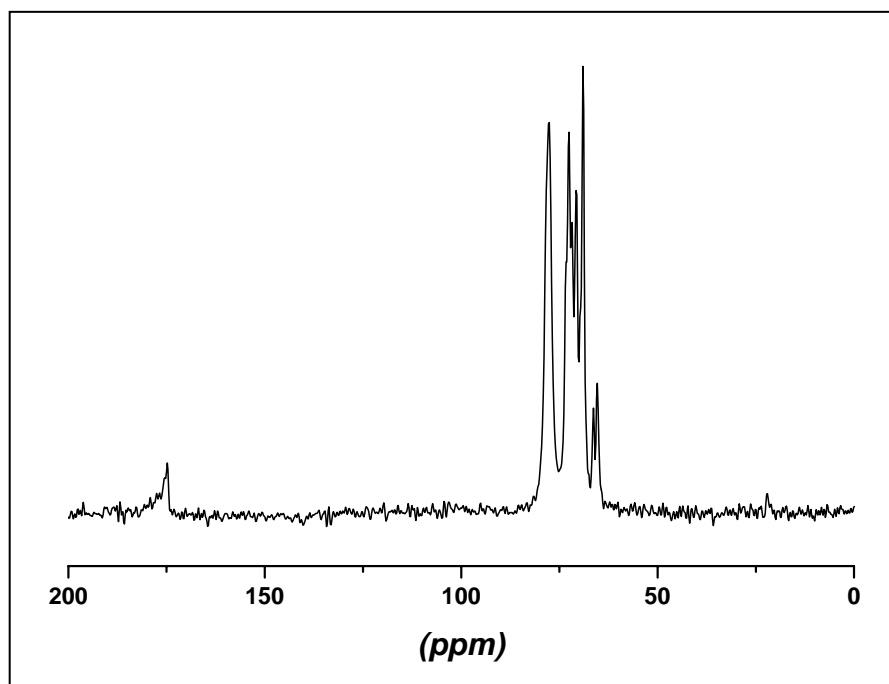


Abb. 5.10: ^{13}C { ^1H }-NMR Spektrum (statisch) einer wässrigen, ^{13}C -angereicherten Lösung (7,5 g/L) von EPS

Das Linienspektrum der EPS- Lösung (Abb. 5.10) gleicht im Wesentlichen dem des markierten Biofilms. Dennoch lassen sich einige markante Unterschiede zum vorangegangenen Spektrum feststellen. Insbesondere im Bereich der Methylen- und Methinresonanzen (15 - 25 ppm) zeigt das ^{13}C - Spektrum der EPS lediglich ein einziges, schwaches Resonanzsignal bei 22,1 ppm, welches dem CH_3 - Kohlenstoff der Acetylgruppen des Alginats zugeordnet wurde.

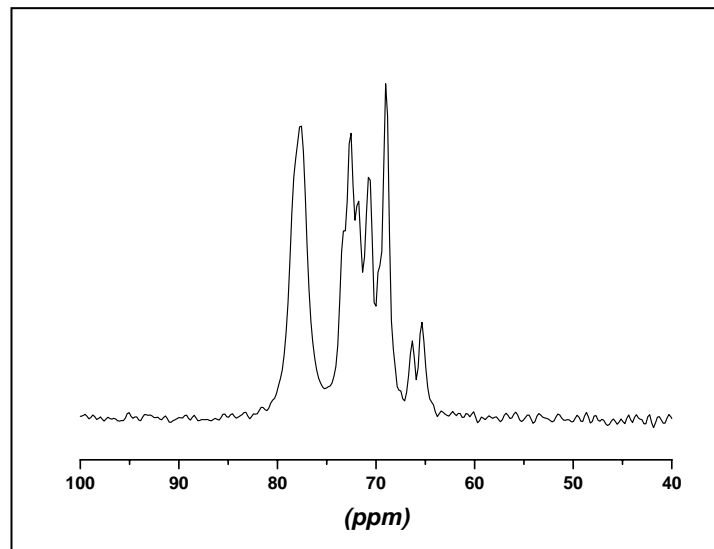


Abb. 5.11: Resonanzbereich der Hydroxylgruppenkohlenstoffe einer wässrigen EPS - Lösung (7,5 g/L)

Die Resonanzsignale der Hydroxylgruppen sind in den Spektren von Biofilm und EPS nahezu identisch. Sie differieren lediglich geringfügig in ihrer Auflösung bzw. in der Halbwertsbreite der Signale. So beträgt die Halbwertsbreite der C-5 Man Resonanz in der EPS- Lösung lediglich 164,5 Hz gegenüber 191,9 Hz im nativen Biofilm. Es ist hierbei anzumerken, dass der Biofilmrasen von Natur aus eine höhere Viskosität aufweist als die EPS- Lösung und Viskositätsunterschiede der Proben merklich die spektrale Linienbreite beeinflussen.

5.2.3 Bakteriellles Alginat

Die letzte Aufarbeitungsstufe des Biofilms stellt die Separation des Alginats von Proteinen und Nukleinsäuren dar. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wird die Alginatkonzentration der zu untersuchenden Lösungen so eingestellt, dass sie in etwa der Viskosität der EPS- Lösung entspricht (10 g/L).

Differenzen zwischen dem NMR- Spektrum des Alginats (Abb. 5.12) und den Spektren des Biofilms bzw. der EPS zeigen sich lediglich im Bereich der Hydroxylgruppenresonanzen. In der Ausschnittsvergrößerung sind zwei schwache Resonanzsignale bei 63,2 und 61,3 ppm erkennbar, welche zuvor nicht beobachtet wurden. Eine Charakterisierung dieser neuen Resonanzlinien war nicht möglich. Es ist unklar, ob die Signale allein ein Phänomen der Aufkonzentration der Probe sind oder auf sekundäre Reaktionen während des Proteinabbaus zurückgeführt werden können. Wie sich im Verlauf der Arbeit herausgestellt hat, ist bei der Isolierung des Alginats z.T. eine Kontamination durch Fungi- Sporen aufgetreten, welche über die Pronase E in die Probe gelangen konnten. In der weiteren Probenaufarbeitung kann dies zu einem partiellen Abbau des Alginats und zur Bildung von Sekundärprodukten seitens der Pilzkulturen geführt haben.

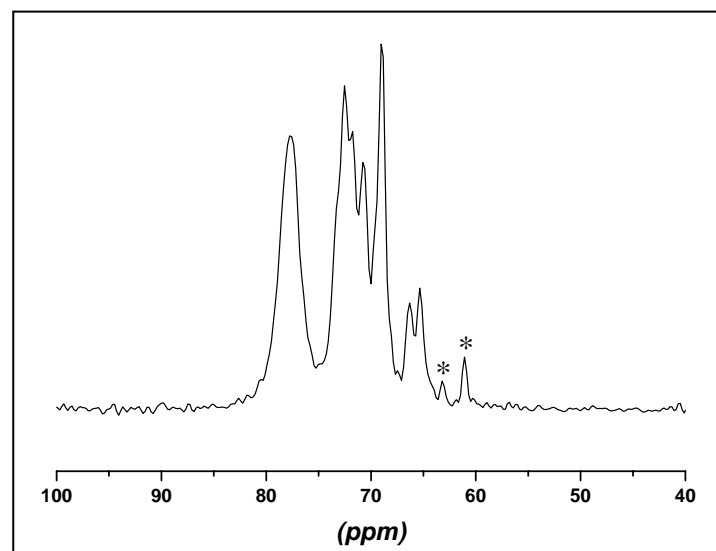


Abb. 5.12: Resonanzbereich der Hydroxylgruppenkohlenstoffe einer wässrigen Alginat- Lösung (10,0 g/L); *: nicht identifizierte Kohlenstoffresonanzen

In den weiterführenden Untersuchungen wurde weitestgehend auf die Verwendung von isoliertem Bakterienalginat verzichtet, da der präparative Aufwand zur Gewinnung dieses Isolats groß ist und es nur bedingt die Wechselwirkungen innerhalb eines realen Biofilms widerzuspiegeln vermag.

5.3 Einfluss von pH- Wert und Temperatur

5.3.1 Einfluss des pH- Wertes

Das Milieu der wässrigen Umgebung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur der Makromoleküle. Bei Polyelektrolyten wie dem Alginat wird die räumliche Struktur der

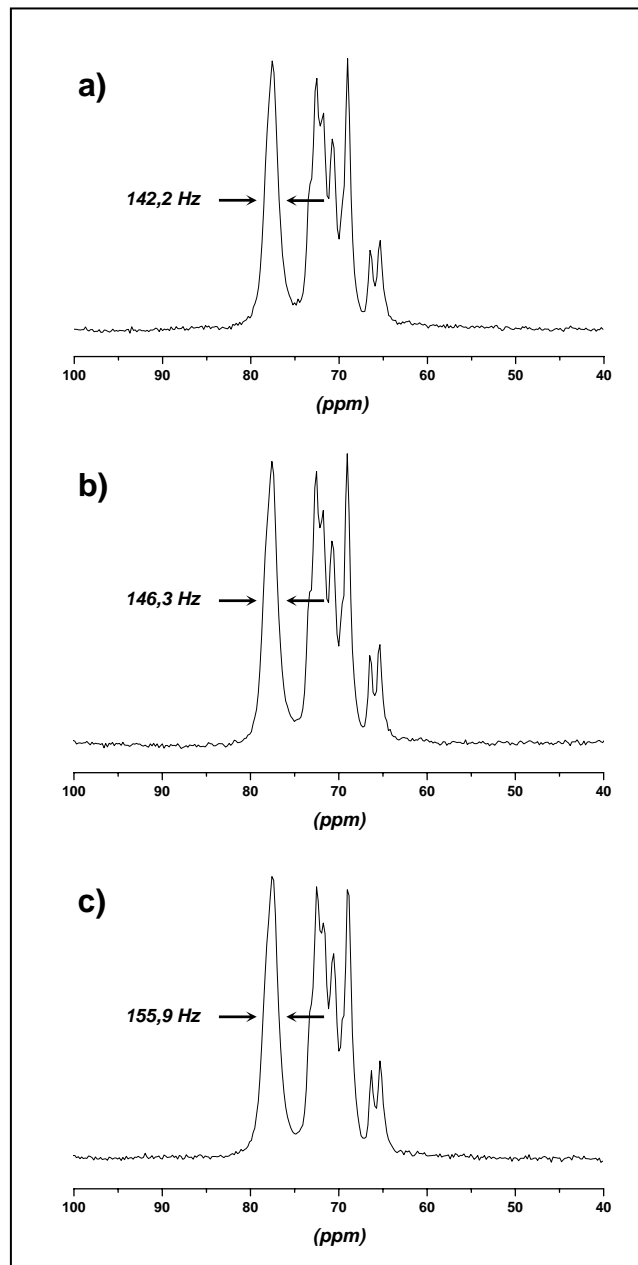


Abb. 5.13: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren (statisch) einer EPS- Lösung bei unterschiedlichen pH- Werten:
a) pH = 4,0; b) pH = 7,0; c) pH = 11,0

Moleküle u.a. von den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen funktionellen Gruppen bestimmt. Der Dissoziationsgrad der Carboxylgruppen nimmt damit einen wesentlichen Einfluss darauf, inwieweit die elektrostatischen Abstoßungskräfte der Verknäuelung des Makromoleküls entgegenwirken oder sie begünstigen.

Die NMR- Spektren der EPS- Lösungen (Abb. 5.13) spiegeln den Einfluss des pH- Wertes wider. Differieren die ersten beiden Spektren (a, b) nur unmerklich in der Linienbreite des C-5 Mannuronatsignals, so wird der Unterschied zu dem Spektrum bei hohem pH- Wert deutlicher. Die Halbwertsbreite nimmt dabei von 146,2 Hz im Neutralbereich auf 155,9 Hz im basischen Milieu zu.

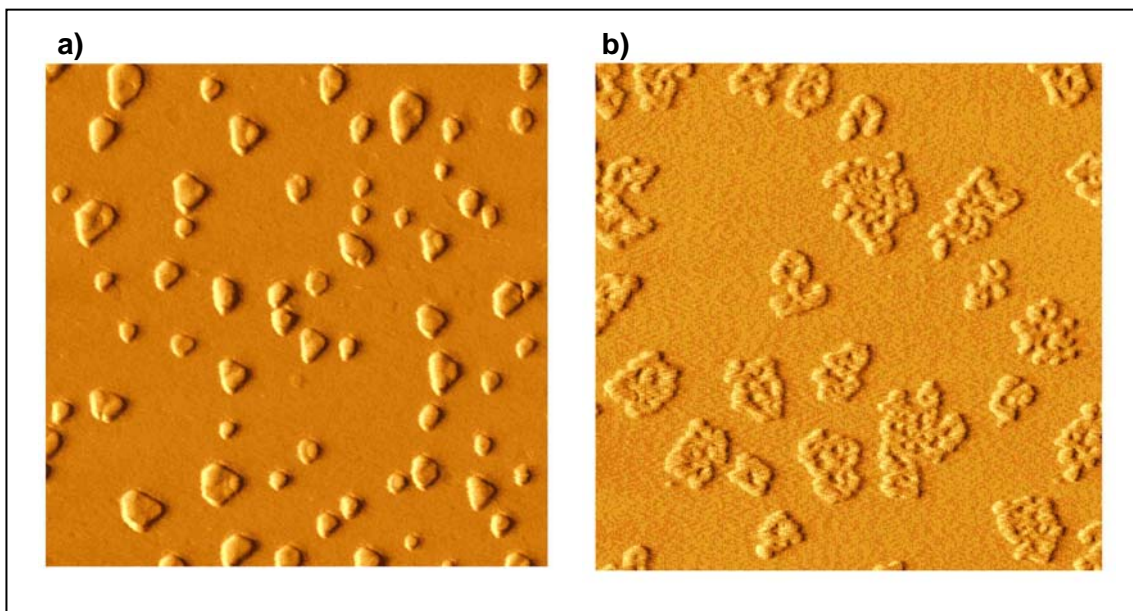


Abb. 5.14: 5×5 µm Ausschnitte einer AFM- Aufnahme von einer getrockneten EPS- Lösung auf Mica (Aufsicht); a) pH = 4,0;b) pH = 11,0; University of Portsmouth

Noch eindrucksvoller lässt sich der Effekt des pH- Wertes anhand von AFM- Messungen veranschaulichen. Bei den obigen Aufnahmen handelt es sich jeweils um stark verdünnte EPS- Lösungen, deren pH- Wert vor der Trocknung mit HCl bzw. NH₃ eingestellt wurde.

Wie leicht zu erkennen ist, weisen die EPS - Proben vollkommen unterschiedliche Charakteristika in den AFM- Aufnahmen auf. Probe a), welche bei niedrigem pH eingedampft wurde, zeigt flache, in erster Näherung kreisförmige Strukturen. Die Größenordnung dieser Objekte

(\varnothing : 0,58 μm Höhe: 50 nm) legt nahe, dass es sich hierbei z.T. um Aggregate zweier oder dreier Alginatmoleküle handeln könnte.

Erhöht man den pH- Wert der EPS- Lösung, so ändert sich das Erscheinungsbild der Probe merklich. Anstelle der scheibenförmigen Aggregate sind verknäuelte Kettenstrukturen getreten (Höhe: 13 nm), bei denen deutlich einzelne Molekülstränge erkennbar sind. Dies entspräche somit einer Abnahme der Dichte der Alginatknäuel in Abhängigkeit von der Anzahl der deprotonierten Carboxylatgruppen.

5.3.2 Einfluss der Temperatur

Der Temperaturbereich, welcher im Rahmen der Messungen zur Verfügung stand, ist sowohl durch die physikalischen Eigenschaften des Lösemittels als auch durch die Temperatur-

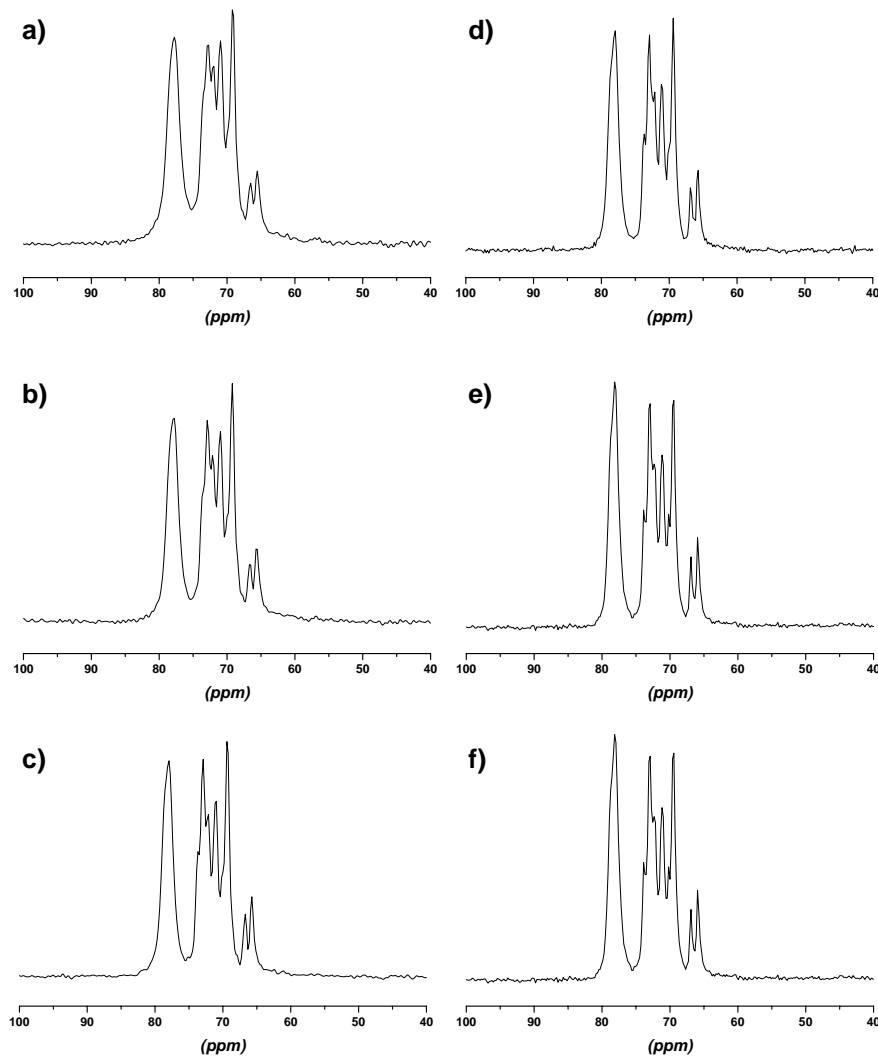


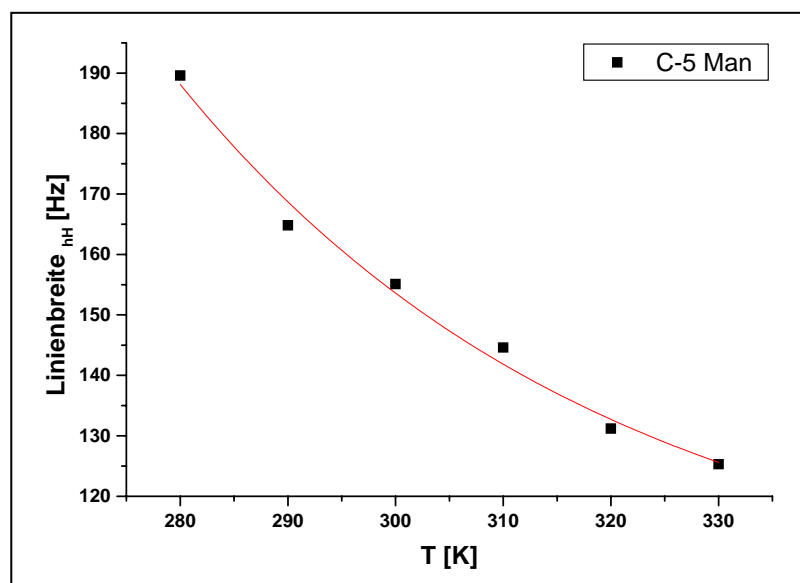
Abb. 5.15: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren einer wässrigen EPS - Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Temperatur: a) 280 K b) 290 K c) 300 K d) 310 K e) 320 K f) 330 K

beständigkeit einzelner Komponenten der EPS begrenzt. Die untersuchte Maximaltemperatur beträgt daher 330 K. Von einer weiteren Temperaturerhöhung über diesen Wert hinaus wurde abgesehen, da oberhalb von 330 K eine Denaturierung der in der Probe enthaltenen Proteine nicht ausgeschlossen werden kann.

Tab. 5.1: Temperaturabhängige Änderung der Halbwertsbreite [Hz] der C-5 Man u. Gul Resonanzlinien

T [K]	280	290	300	310	320	330
<i>C-5 Man</i>	189,6	164,8	155,1	144,6	131,2	125,3
<i>C-5 Gul</i>	90,0	80,4	75,5	74,7	72,5	67,0

Die ^{13}C - NMR Spektren der EPS- Temperaturreihe weisen deutlich erkennbar eine Verringerung der Halbwertsbreite aller Resonanzsignale mit steigender Temperatur (s. Tab.5.1) auf. Um diesen Effekt quantitativ erfassen zu können, wurden die C-5 Kohlenstoffsignale der

**Abb. 5.16:** Darstellung der Veränderung der Linienbreite des C-5 Man Resonanzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur

Mannuronat- bzw. Guluronateinheiten als Bezugspunkte gewählt. Die Abnahme der Linienbreite folgt in erster Näherung einer Exponentialfunktion der allgemeinen Form $L = A \cdot e^{-b(T)}$ (s. Abb. 5.16 u. Abb. 5.17) und steht somit in direktem Zusammenhang mit der Viskositätsabnahme, welche ebenfalls einer Exponentialfunktion folgt [98].

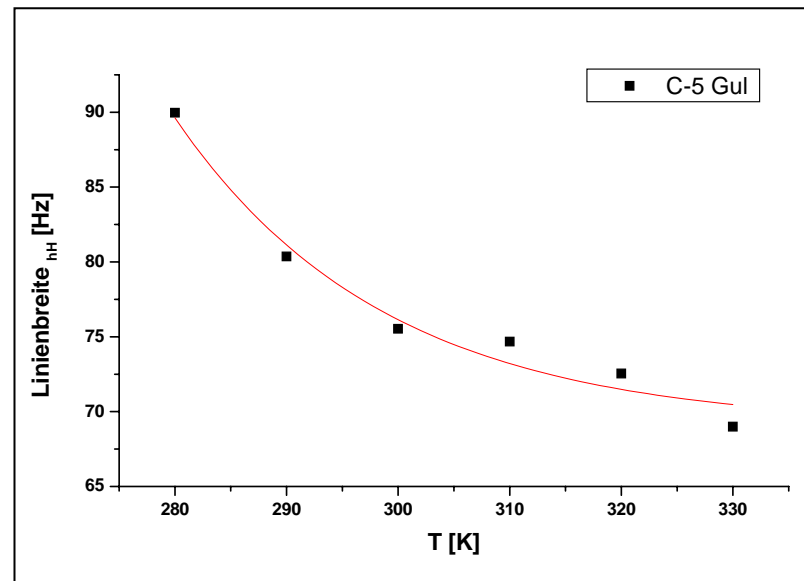


Abb. 5.17: Darstellung der Veränderung der Linienbreite des C-5 Gul Resonanzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der longitudinalen Relaxation T_1 zeigen lediglich schwache Tendenzen auf.

5.4 Einfluss monovalenter Kationen

5.4.1 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Variiert man die Ionenstärke einer EPS - Lösung durch Zugabe monovalenter Ionen wie Li^+ , so hat dies erkennbare Auswirkungen auf die Probeneigenschaften. Bereits geringfügige Zugaben von LiCl führen zu einer erheblichen Reduzierung der apparenten Viskosität der jeweiligen Lösung, was in Einklang mit den von *Moritz* [99] durchgeführten Messungen an EPS und Modellsystemen (PVA, PAS) steht. Anhand der Grafik (Abb. 5.4.1) wird deutlich,

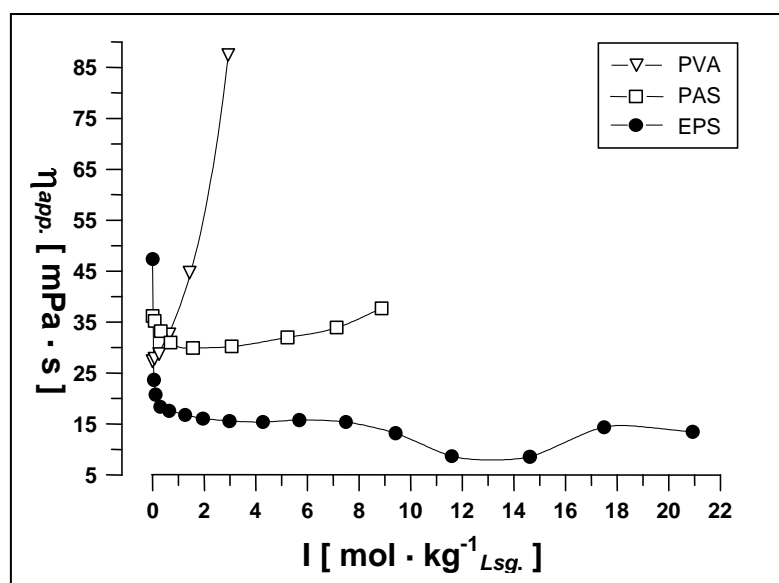


Abb. 5.18: Abhängigkeit der apparenten Viskosität η_{app} einer 3,6%igen PVA, einer 20,2%igen PAS und einer EPS- Lösung von der LiCl - Ionenstärke [99]

dass der wesentliche Abfall der Viskosität im Konzentrationsbereich zwischen $0,01$ und $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl auftritt. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke über diese Konzentration hinaus hat bis $6,0 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ keine merklichen Auswirkungen auf die apparente Viskosität der EPS- Lösung.

Spektroskopische Untersuchungen der Linienbreite (Abb. 5.19) weisen Parallelen zu den von *Moritz* [99] gemachten Beobachtungen auf. Die hier angegebenen Halbwertsbreiten beziehen sich auf die C-5 Mannuronatresonanzlinie, deren Linienbreite als Referenz dient. Es ist eine deutliche Tendenz bei den Ionenkonzentrationen zwischen 0 und $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu verzeichnen.

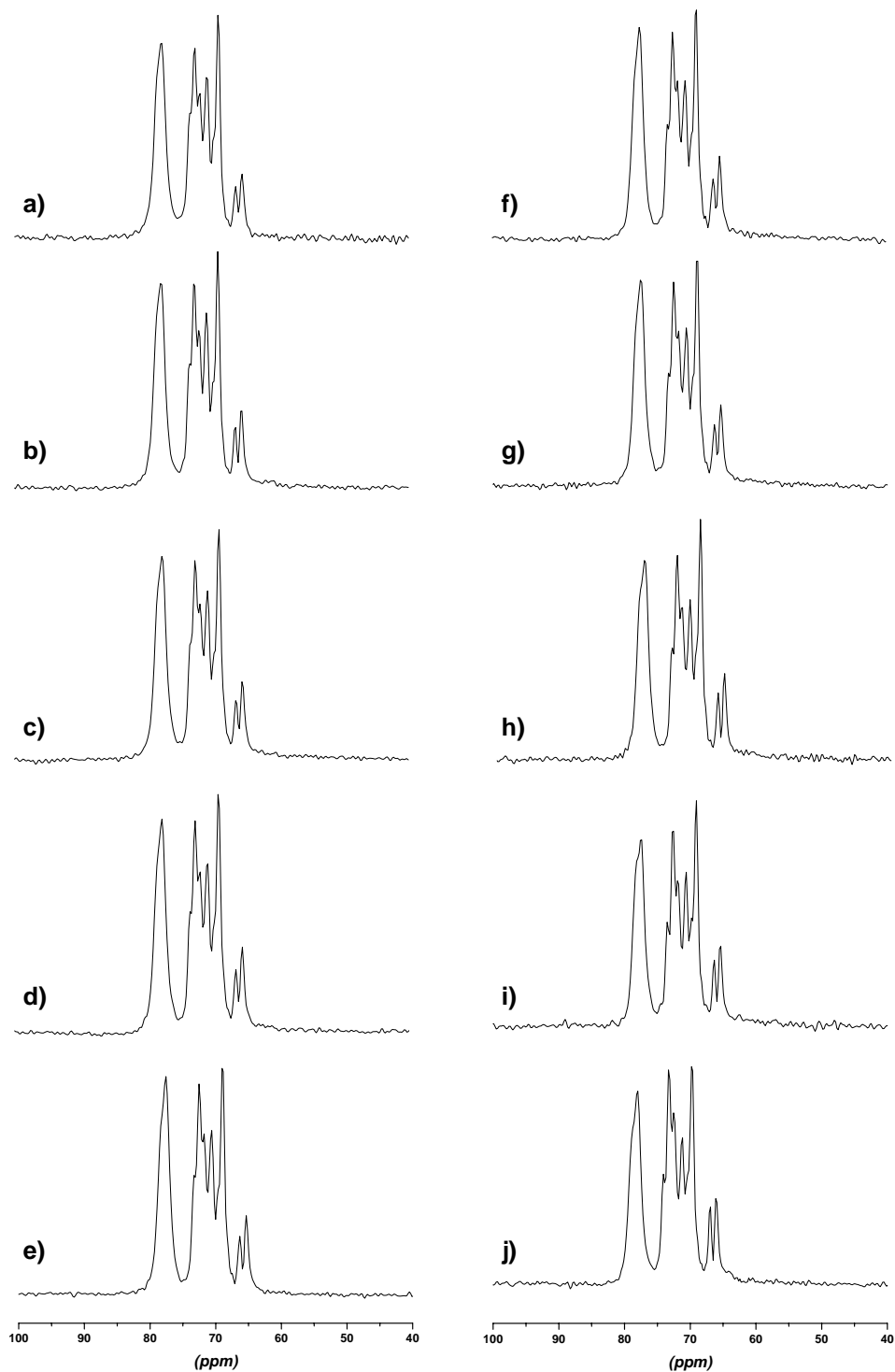


Abb. 5.19: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren der Hydroxylgruppen in einer wässrigen EPS - Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Li^+ -Konzentration: a) ohne Zusatz von Li^+ -Ionen b) 0,01 mol/L Li^+ c) 0,02 mol/L Li^+ d) 0,05 mol/L Li^+ e) 0,1 mol/L Li^+ f) 0,5 mol/L Li^+ g) 1,0 mol/L Li^+ h) 1,5 mol/L Li^+ i) 2,0 mol/L Li^+ j) 2,5 mol/L Li^+

Die normalisierte Linienbreite, d.h. der Quotient aus beobachteter Linienbreite und der Linienbreite der EPS- Lösung ohne Zusatz von ionischen Additiven, fällt mit zunehmender Ionenstärke der Lösung bis auf ein Minimum von 0,94 ab (s. Abb. 5.20). Bei Li^+ - Konzentrationen jenseits von $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ist ein Anstieg der Halbwertsbreite des C-5 Mannuronat

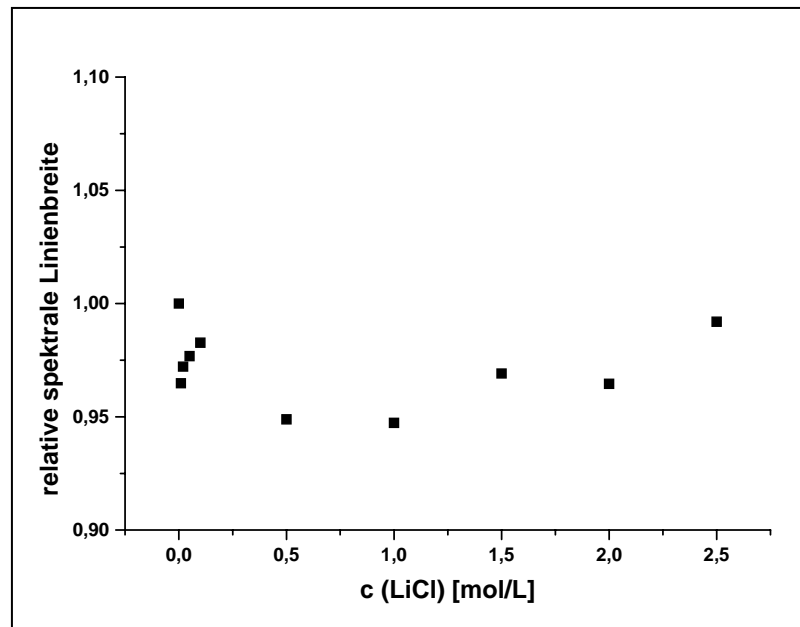


Abb. 5.20: Einfluss der Li^+ - Ionenkonzentration auf die relative spektrale Linienbreite des C-5 Man Signals einer EPS- Lösung (7,5 g/L)

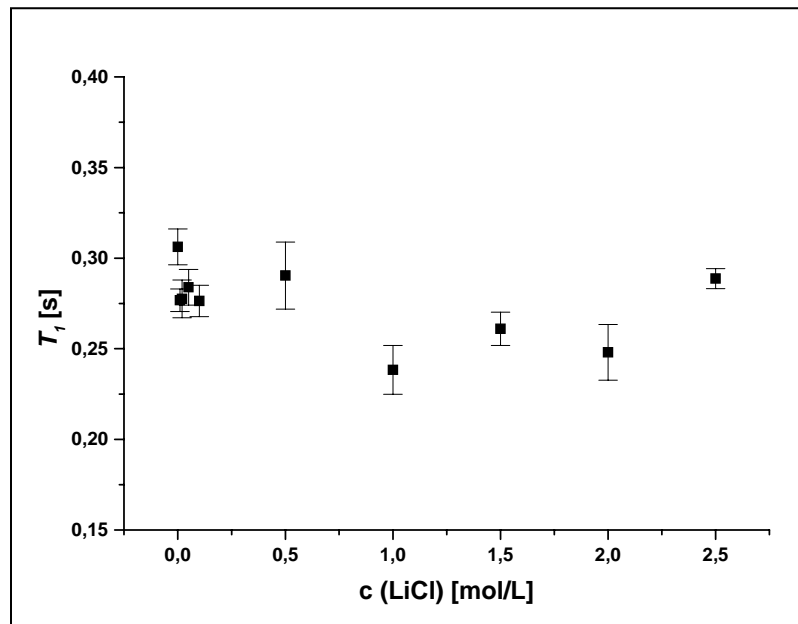


Abb. 5.21: Einfluss der Li^+ - Ionenkonzentration auf die Spin - Gitter Relaxationszeit T_1 des C-5 Man Signals einer EPS- Lösung (7,5 g/L)

signals bis auf 0,99 zu verzeichnen. Es ist anzumerken, dass die Variation der Linienbreite im Falle der EPS- Lösungen weitaus schwächer ausgeprägt ist, als es bei reinen Alginatlösungen der Fall ist. Dennoch werden leichte Trends, d.h. das Durchlaufen eines Minimums und der graduelle Anstieg der relativen Linienbreite des Referenzsignals bei höheren LiCl- Konzentrationen ($1,5 - 2,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), erkennbar.

Im Gegensatz hierzu ist bzgl. der Spin - Gitter Relaxation T_1 keine konkrete Tendenz der Messwerte mit zunehmender Konzentration an Lithiumionen feststellbar (Abb. 5.21). Die Schwankungen der einzelnen Messpunkte liegen im Rahmen der experimentellen Streuung.

5.4.2. Bakteriellles Alginat

Bakterielles Alginat zeigt in NMR- Messungen unter dem Einfluss von LiCl ein ähnliches

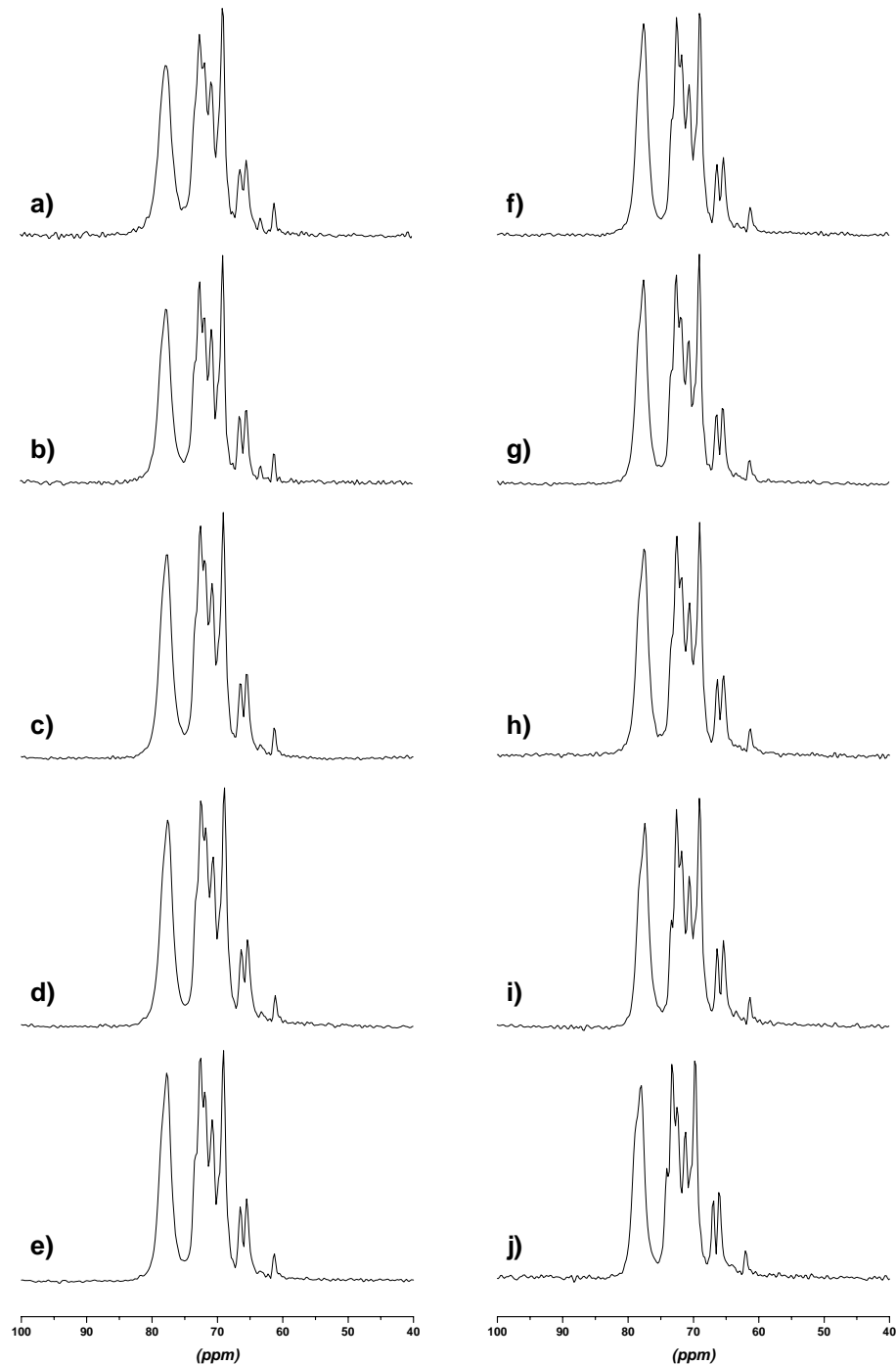


Abb. 5.22: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren der Hydroxylgruppen in einer wässrigen Alginatlösung (10 g/L) in Abhängigkeit von der Li^+ - Konzentration: a) ohne Zusatz von Li^+ - Ionen b) 0,01 mol/L Li^+ c) 0,02 mol/L Li^+ d) 0,05 mol/L Li^+ e) 0,1 mol/L Li^+ f) 0,5 mol/L Li^+ g) 1,0 mol/L Li^+ h) 1,5 mol/L Li^+ i) 2,0 mol/L Li^+ j) 2,5 mol/L Li^+

Verhalten wie zuvor die EPS- Proben. Allerdings ist im Falle der Alginat- Lösungen der Einfluss der Lithiumionenkonzentration auf die spektroskopischen Eigenschaften wesentlich ausgeprägter. Die relative Halbwertsbreite der Referenzresonanzlinie nimmt im unteren Konzentrationsbereich bis 1,0 mol/L LiCl rapide bis auf einen Wert von 0,81 ab. Wird die

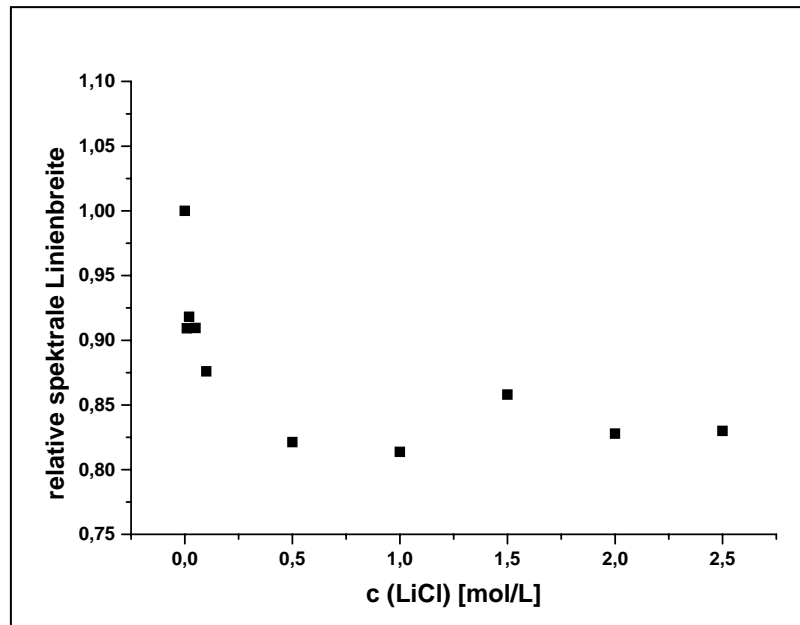


Abb. 5.23: Einfluss der Li^+ - Ionenkonzentration auf die relative spektrale Linienbreite des C-5 Man Signals einer Alginatlösung (10 g/L)

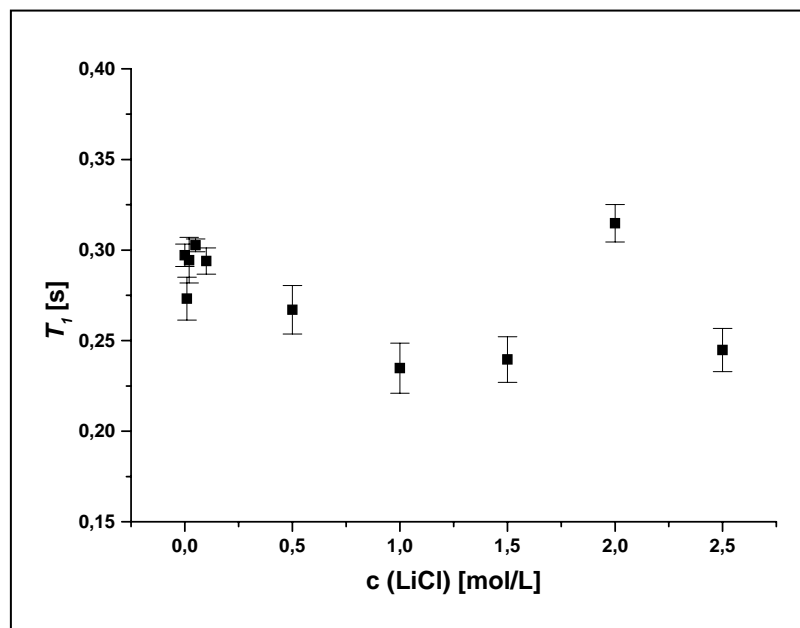


Abb. 5.24: Einfluss der Li^+ - Ionenkonzentration auf die Spin - Gitter Relaxationszeit T_1 des C-5 Man Signals einer Alginatlösung (10 g/L)

Ionenstärke weiter erhöht, so tritt eine Art Sättigungseffekt ein und die relative Linienbreite bleibt auf einem annähernd konstanten Niveau von 0,83 (s. Abb. 5.23).

Die T_1 - Zeiten der vermessenen Alginatlösungen (Abb. 5.24) streuen im Rahmen des experimentellen Fehlers, sind aber ansonsten konstant. Dies weist darauf hin, dass keine signifikante Tendenz innerhalb der Konzentrationsreihe auftritt. Die Spin - Gitter Relaxation der Polysaccharidkohlenstoffe ist somit unabhängig von der Ionenstärke des umgebenden Lösemittels ist.

5.5 Einfluss bi- und trivalenter Kationen

Rheologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bivalente Gegenionen eine entscheidende Rolle bezüglich der mechanischen Festigkeit von Biofilmen spielen [100]. Sie sind wesentlich beteiligt an der Ausbildung von Netzwerkstrukturen innerhalb polyanionischer Gele.

Im Vordergrund dieser Untersuchungen stehen daher die Rahmenbedingungen, unter denen Polysaccharide in den EPS Gele bilden [101, 102, 103, 104] und inwieweit potentielle Vernetzungspunkte innerhalb des Makromoleküls lokalisiert werden können.

5.5.1 Einfluss von Magnesiumionen

Es gilt als erwiesen, dass Magnesiumionen von allen Erdalkalimetallionen die geringste Tendenz zur Gelbildung mit Alginaten haben. Innerhalb des in diesem Rahmen untersuchten Konzentrationsbereichs tritt eine Gelierung der EPS- Lösung erst bei der Maximalkonzentration von $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ein, womit dieses Ergebnis auch für Alginate bakterieller Herkunft bestätigt wird.

Im Allgemeinen kann festgestellt werden, dass die geringe Gelierungstendenz bei der Dotierung mit Mg^{2+} sich auch in den Ergebnissen der kernmagnetischen Resonanz widerspiegelt. Dies zeigt sich u.a. sehr eindrucksvoll, wenn man die vorherrschende Einheitlichkeit der Spektren der Hydroxylkohlenstoffresonanzen (Abb. 5.25) berücksichtigt. Merkliche Änderungen der Linienformen sind erst bei höheren Ionenkonzentrationen zwischen $2,0 - 2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu beobachten. Die Dotierung mit Mg^{2+} - Ionen über diese Schwellenkonzentration hinaus ruft eine Linienverbreiterung des gesamten Spektrums hervor, von der sämtliche Resonanzsignale gleichermaßen betroffen sind. Aufgrund ihrer besonderen und vergleichsweise isolierten Lage innerhalb der Hydroxylgruppenkohlenstoffresonanzen wird die Verbreiterung vorwiegend anhand der Linienformen des C-5 Man Referenzsignals als auch der G-2 Resonanzlinien (66,3 und 65,3 ppm) wahrgenommen. Dennoch ist der durch die Dotierung hervorgerufene Effekt vergleichsweise schwach ausgeprägt: so beträgt die Linienverbreiterung der C-5 Mannuronatresonanzlinie selbst bei den Lösungen im mittleren Konzentrations-

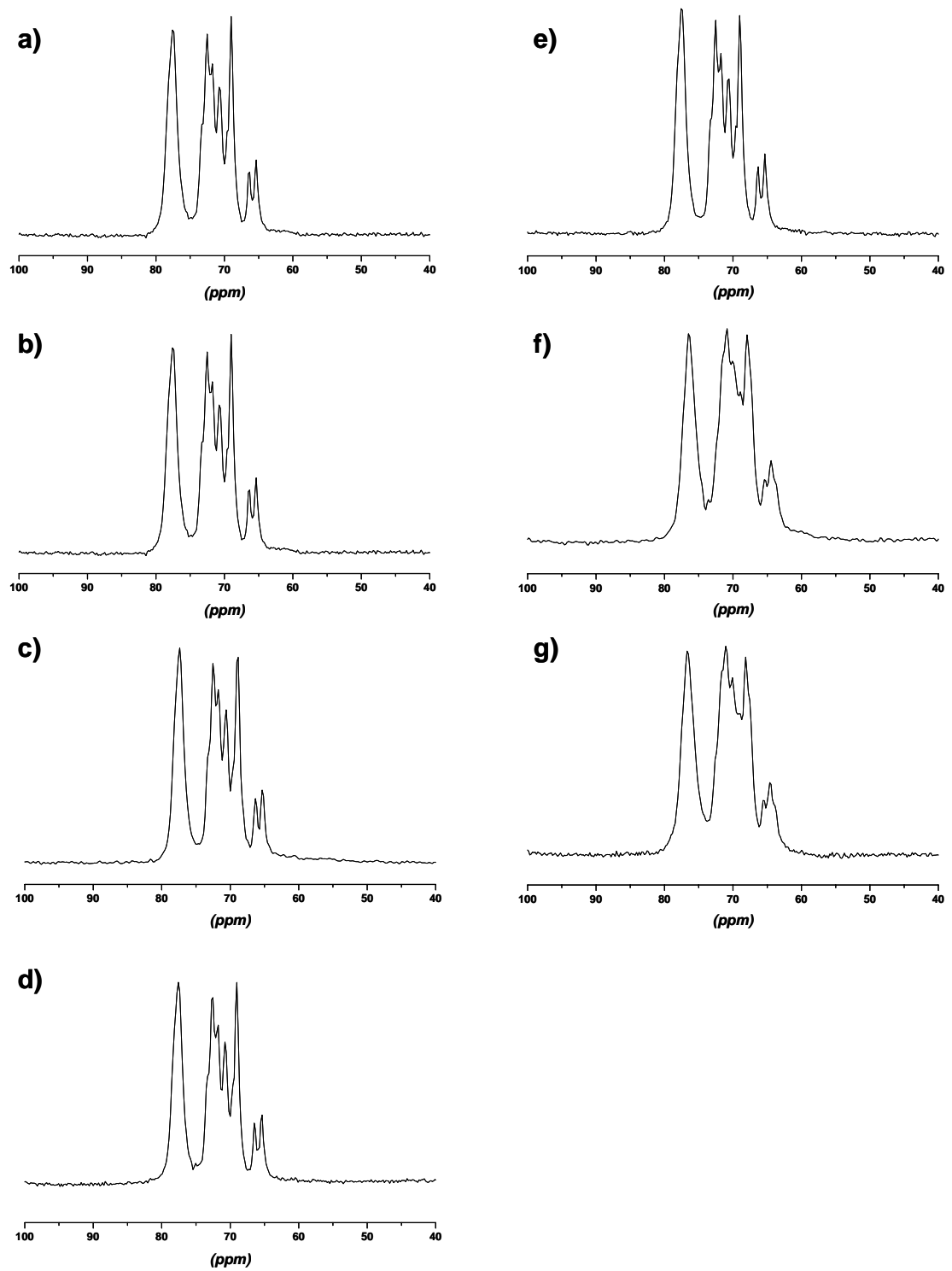


Abb. 5.25: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren der Hydroxylgruppenresonanzlinien in einer wässrigen EPS- Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Mg^{2+} - Konzentration: a) ohne Zusatz von Mg^{2+} - Ionen b) 0,7 mmol/L Mg^{2+} c) 1,2 mmol/L Mg^{2+} d) 1,6 mmol/L Mg^{2+} e) 2,0 mmol/L Mg^{2+} f) 2,7 mmol/L Mg^{2+} g) 3,6 mmol/L Mg^{2+}

bereich ($\leq 2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) nur bis zu 6,5 % in Relation zur undotierten EPS- Probe. Ab einer Ionenkonzentration von $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ steigt die Linienbreite sprunghaft um 31,6 % des Ausgangswertes an.

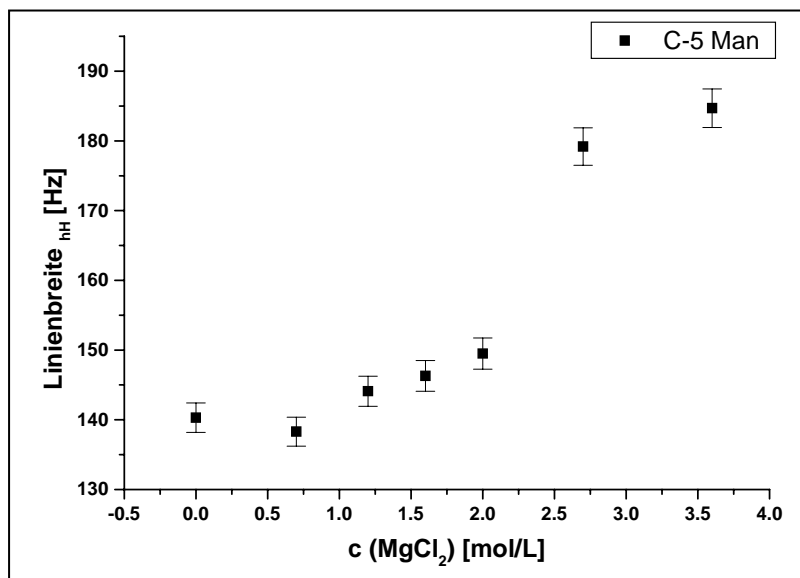


Abb. 5.26: Darstellung der Veränderung der Linienbreite des C-5 Man Resonanzsignals in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration in einer EPS- Lösung (7,5 g/L)

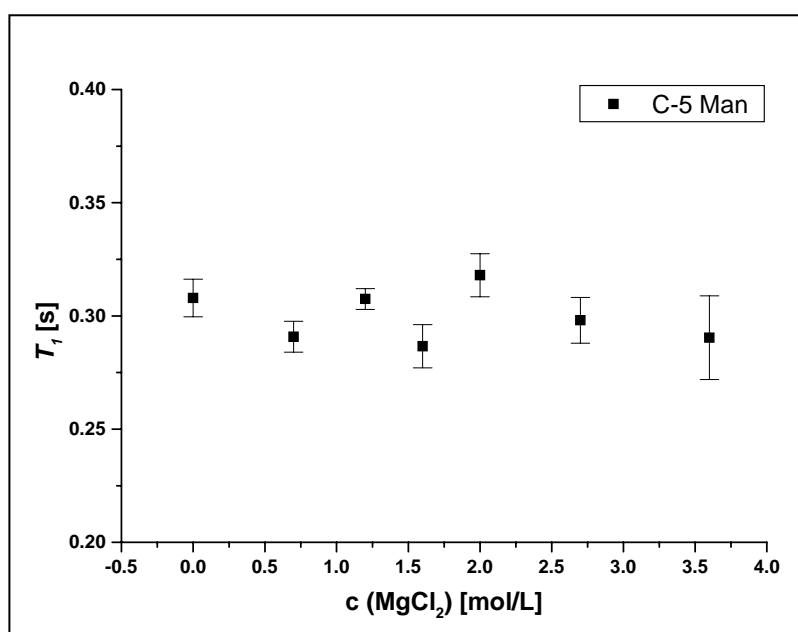


Abb. 5.27: Einfluss der Mg^{2+} -Ionenkonzentration auf die Spin - Gitter Relaxationszeit T_1 des C-5 Man Signals einer EPS- Lösung (7,5 g/L)

In Abbildung 5.27 werden die Spin - Gitter Relaxationszeiten T_1 der Referenzresonanzlinie (C-5 Man) gegen die Ionenkonzentrationen der jeweiligen MgCl_2 - Lösungen aufgetragen. Hieraus wird ersichtlich, dass T_1 im Rahmen der Fehlerschwankungen über den untersuchten Konzentrationsbereich hinweg konstant bei einen Wert von ca. 0,3 s bleibt.

5.5.2 Einfluss von Calciumionen

Versetzt man eine EPS- Lösung mit Calciumionen, so beobachtet man schon bei relativ nie-

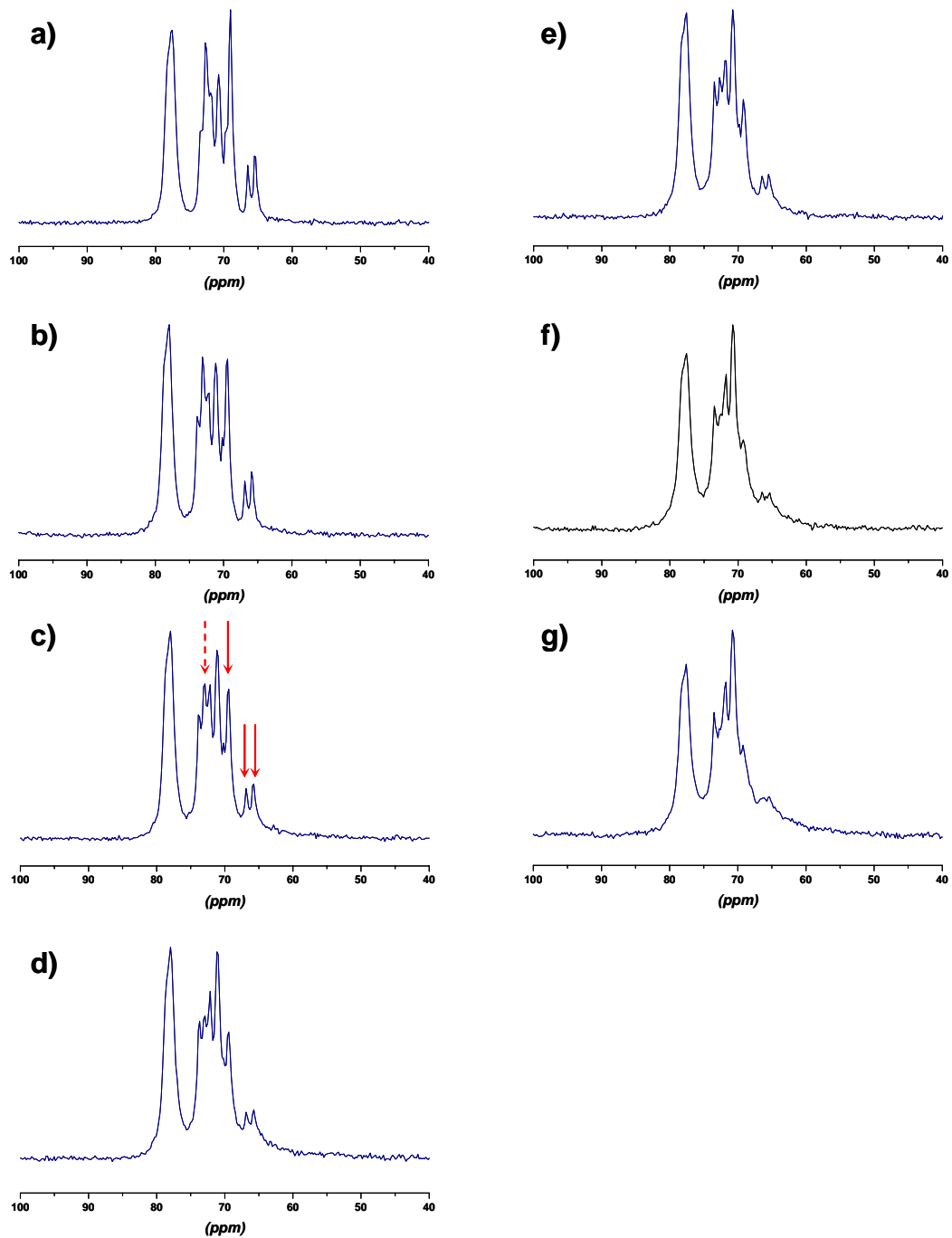


Abb. 5.28: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren der Hydroxylgruppen in einer wässrigen EPS- Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Ca^{2+} - Konzentration: a) ohne Zusatz von Ca^{2+} - Ionen b) 0,7 mmol/L Ca^{2+} c) 1,2 mmol/L Ca^{2+} d) 1,6 mmol/L Ca^{2+} e) 2,0 mmol/L Ca^{2+} f) 2,7 mmol/L Ca^{2+} g) 3,6 mmol/L Ca^{2+}

drigen Konzentrationen eine rapide Änderung der physikalischen Eigenschaften der Probe. Makroskopisch betrachtet äußert sich dies in einem abrupten Anstieg der Viskosität bis hin zur Gelbildung bei Ionenkonzentrationen zwischen $2,7 - 3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Untersuchungen bei höheren Calciumkonzentrationen konnten nicht durchgeführt werden, da aufgrund der Gelbildung keine gleichmäßige Ionenverteilung gewährleistet werden konnte.

Die Dotierung von EPS- Lösungen mit Ca^{2+} - Ionen hat signifikante Auswirkungen auf das gesamte Spektrum des Alginats. So kann man einhergehend mit dem Viskositätsanstieg eine grundsätzliche Linienverbreiterung im NMR- Spektrum beobachten (s. Abb. 5.29).

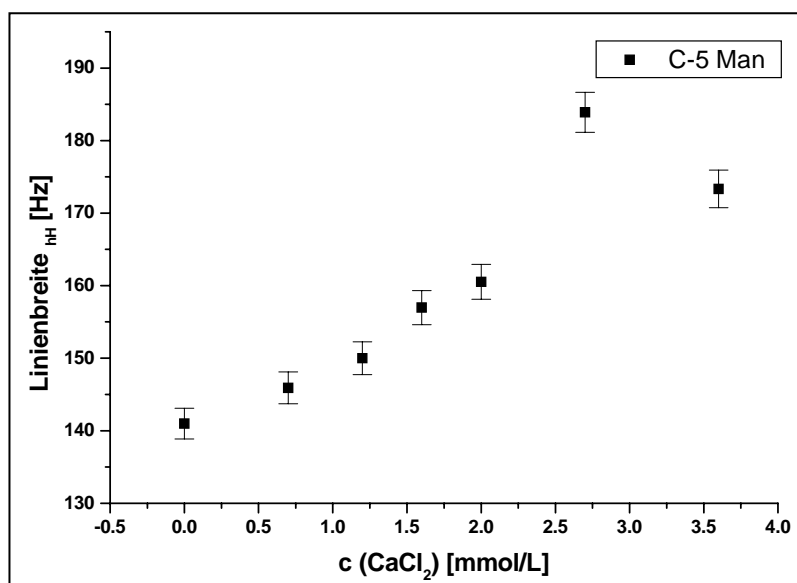


Abb. 5.29: Darstellung der Veränderung der Linienbreite des C-5 Man Resonanzsignals in Abhängigkeit von der Ca^{2+} - Konzentration in einer EPS- Lösung ($7,5 \text{ g/L}$)

Trägt man nun die Linienbreite dieses Signals gegen die Ca^{2+} - Ionenkonzentration der EPS- Lösungen auf, so ergibt sich ein charakteristischer Verlauf, welcher gut mit den makroskopischen Beobachtungen zum Sol-Gel Übergang korreliert (Abb. 5.29). So ist im Konzentrationsbereich von $0 - 2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ ein nahezu linearer Anstieg der Halbwertsbreite der C-5 Man Resonanzlinie zu beobachten. Die Zunahme in dem linearen Bereich erscheint wesentlich stärker als die Verbreiterung bei Dotierung mit Magnesiumionen. Bei höheren Ionenkonzentrationen steigt die Linienbreite sprunghaft von $160,5 \text{ Hz}$ ($2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) auf $183,9 \text{ Hz}$ ($2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) an, um dann auf $173,3 \text{ Hz}$ abzufallen. Die scheinbar gegenläufige Tendenz des letzten Messpunktes beruht auf der Dekonvolution des C-5 Mannuro-

natsignals. Dieses setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Den Resonanzlinien der MM- und der MG- Diade, welche nicht separiert werden können. Ist nun eines der beiden Diadensignale (in diesem Fall das der MG- Diade) stärker von der Linienverbreiterung betroffen als das andere, so bleibt die Amplitude des einen Signals nahezu unverändert, während die des anderen rapide abnimmt. Dies kann dazu führen, dass die Amplitude der verbreiterten Resonanzlinie unter die halbe Amplitude des unbeeinflussten Resonanzsignals absinkt und somit bei der Dekonvolution nicht mehr berücksichtigt wird.

Neben der allgemeinen Linienverbreiterung ist zusätzlich eine charakteristische Verbreiterung einzelner Resonanzlinien zu beobachten, wie in Abb. 5.28 anhand von Pfeilen dargestellt ist. Hiervon sind sowohl alle Gulonatresonanzen (G-5, G-2, G-3, durchgezogene Pfeile) als auch diejenigen Mannuronatsignale betroffen, welche der GMG- und MMG- Triadensequenz (M-2, gestrichelter Pfeil) zugeordnet werden konnten. Die Spezifität der Wechselwirkungen zwischen Gulonatbausteinen (sowie deren unmittelbare Nachbarn) und Ca^{2+} - Ionen wird insbesondere dadurch hervorgehoben, dass sie schon bei niedrigen Ionenkonzentrationen zum Tragen kommen. So ist bereits bei einer Ca^{2+} - Konzentration von $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ein deutlicher Verlust an Signalintensität bei den M-2 (GMG/MMG- Triaden) und Gulonatresonanzlinien zu erkennen.

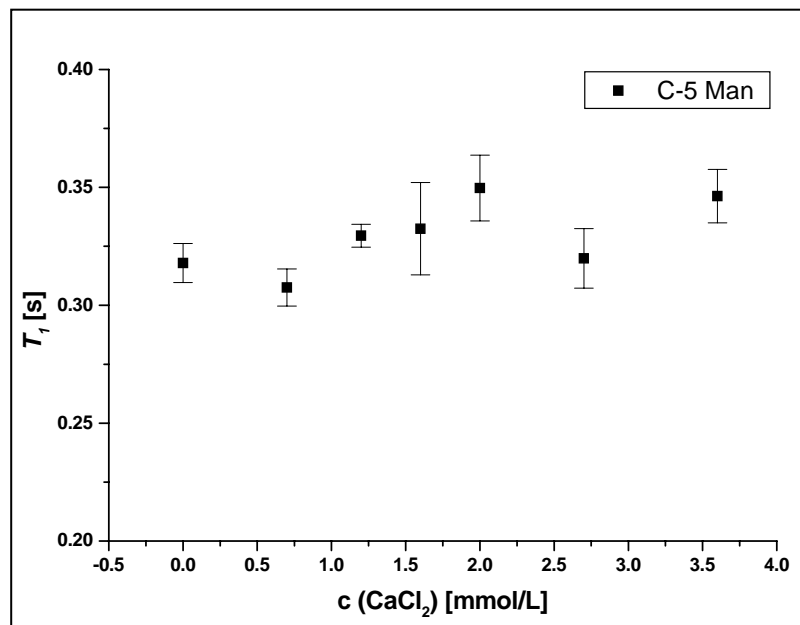


Abb. 5.30: Einfluss der Ca^{2+} - Ionenkonzentration auf die Spin - Gitter Relaxationszeit T_1 des C-5 Man Signals einer EPS- Lösung (7,5 g/L)

Innerhalb der Konzentrationsreihe bleiben die Spin - Gitter Relaxationszeiten T_1 innerhalb des experimentellen Fehlers (s. Abb. 5.30) konstant bei einem Mittel von 0,33 s. Das deutet darauf hin, dass schnelle lokale Bewegungen im MHz Regime (z.B. Librationen einer CHOH-Gruppe) nicht durch die Anbindung der Ca^{2+} - Ionen oder die Gelierung eingeschränkt werden.

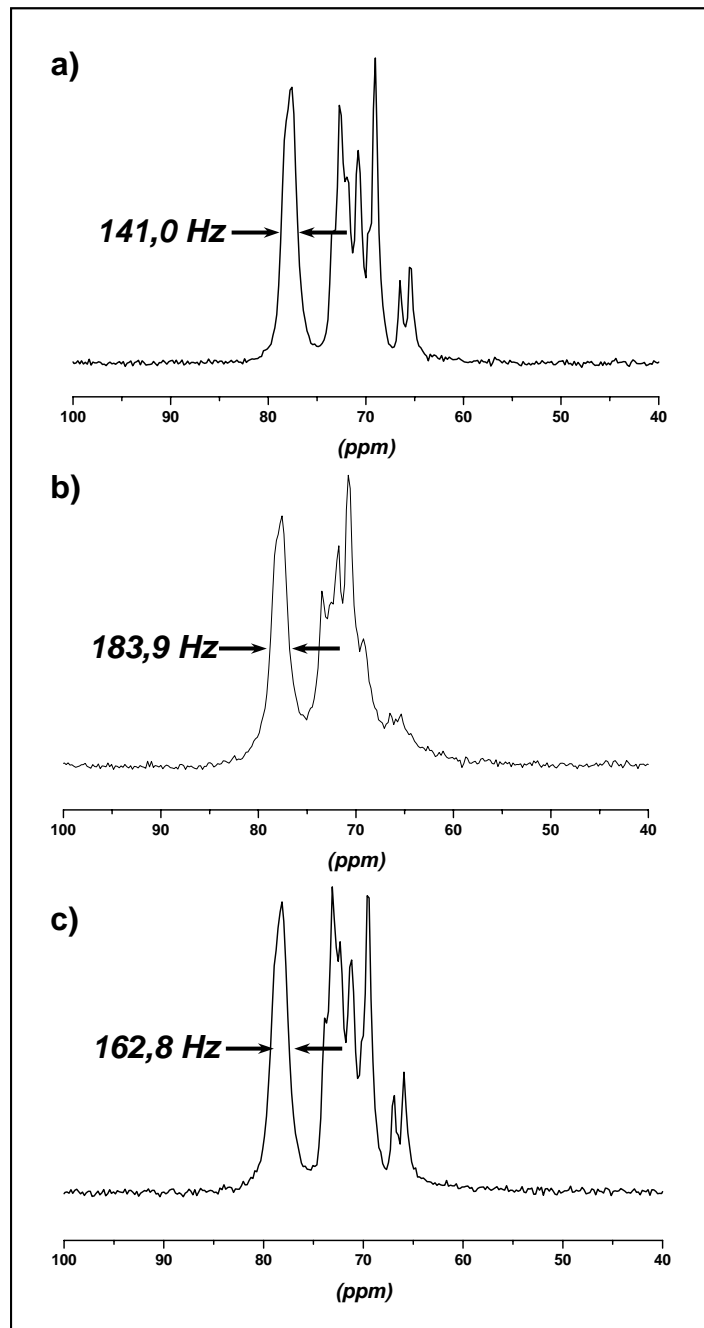


Abb. 5.31: Änderung der Linienbreite auf halber Signalhöhe (Hz) nach Regenerierung der EPS mittels Kationenaustauscher DOWEX; a) EPS- Lösung (7,5 g/L); b) EPS- Lösung (7,5 g/L) dotiert mit 2,7 mmol/L Ca^{2+} , c) regenerierte EPS- Lösung (7,5 g/L)

Des Weiteren wurde die Gelierung von bakteriellem Alginat durch Calciumionen hinsichtlich ihrer Reversibilität untersucht. Der Solzustand ist dabei leicht durch Verdünnen der Probe wiederherzustellen. Darüber hinaus wurde ein EPS- Gel mit einer Calciumkonzentration von 2,7 mmol/L über einen Zeitraum von 24 h mit einem Kationenaustauscher behandelt. Während der Behandlungsdauer war das Gel durch eine semipermeable Membran vom Austauscherharz räumlich separiert, so dass das Gel keinen mechanischen Scherkräften ausgesetzt war. Nach anschließender Dialyse gegen deionisiertes Wasser wurde die Probe lyophilisiert und resuspendiert. Das ^{13}C - NMR Spektrum der so wiederaufbereiteten EPS- Lösung unterscheidet sich in ihrer Linienform nicht merklich von dem Kontrollspektrum, welches vor der Dotierung mit Ca^{2+} aufgezeichnet wurde. So sind die Linien der Guluronatresonanzen (G-2, G-5) im direkten Vergleich mit der Kontrollprobe hinsichtlich ihrer Amplitude nahezu identisch. Allerdings konnte festgestellt werden, dass Spektren a) und c) trotz scheinbar gleicher Linienform der Hydroxylgruppenresonanzen in der Linienbreite differieren. Demzufolge ist die Halbwertsbreite der Referenzresonanzlinie (M-5) der regenerierten EPS gegenüber der reinen EPS- Lösung um 15 % verbreitert. Eine Linienverbreiterung ohne gleichzeitige Beeinflussung der Linienform deutet darauf hin, dass es bei wiederholter Dialyse zu einer Aufkonzentration des makromolekularen Bestandteils der EPS und einer Ausschwemmung niedermolekularer (Spalt-) Produkte gekommen sein könnte.

5.5.3 Einfluss von Aluminiumionen

Neben den bivalenten Erdalkalimetallkationen wurden darüber hinaus die Wechselwirkungen zwischen bakteriellem Alginat und trivalenten Aluminiumionen untersucht. Um das amphotere Verhalten des Aluminiumions zu berücksichtigen wurden zwei Untersuchungsreihen bei unterschiedlichen pH- Werten (pH = 4 u. pH = 7) durchgeführt.

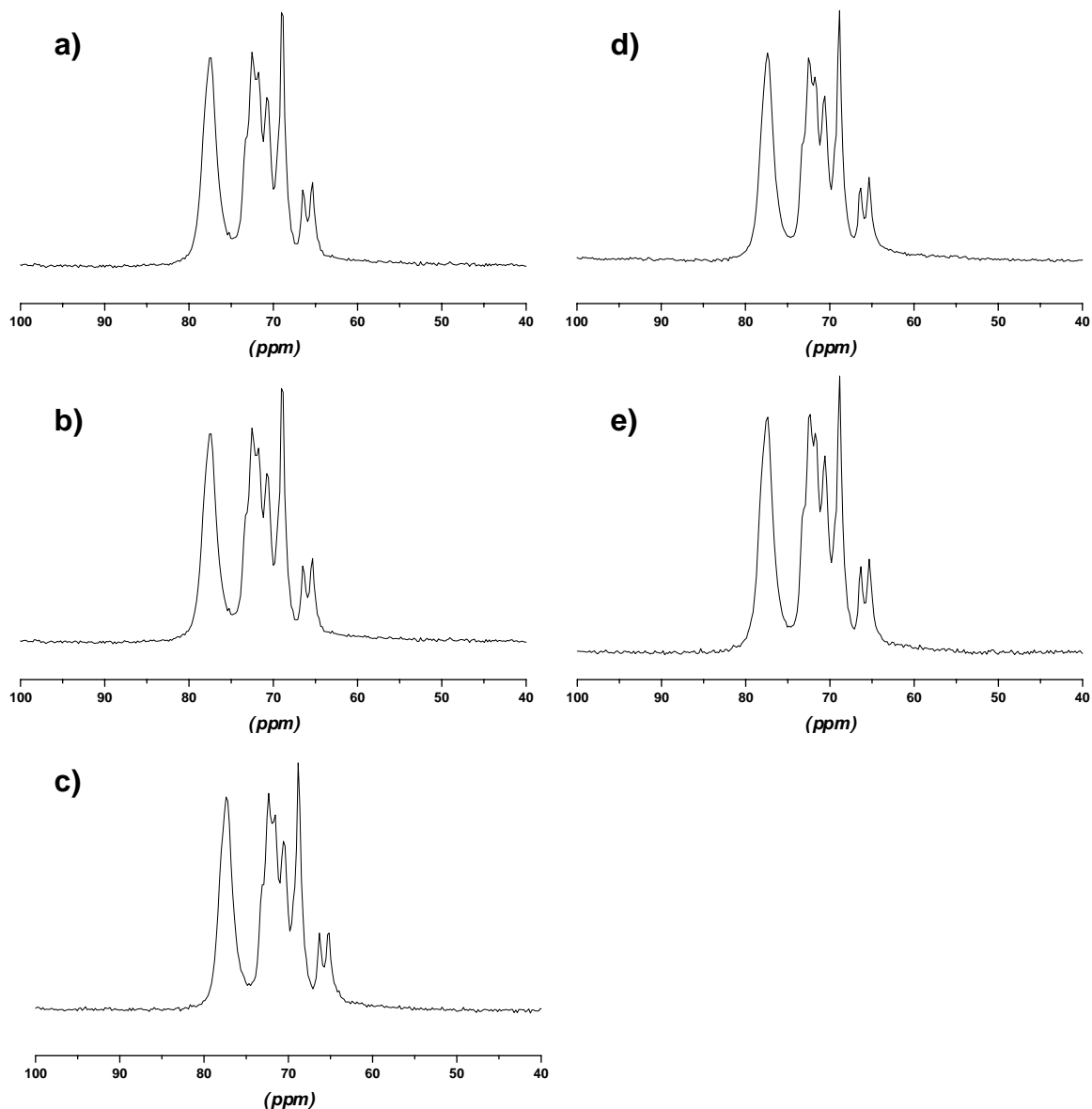


Abb. 5.32: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren der Hydroxylgruppenresonanzlinien in einer wässrigen EPS- Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Al^{3+} - Konzentration: a) ohne Zusatz von Al^{3+} - Ionen b) 0,1 mmol/L Al^{3+} c) 0,5 mmol/L Al^{3+} d) 1,0 mmol/L Al^{3+} e) 2,0 mmol/L Al^{3+} , pH = 4,0

Die Kernresonanzspektren, welche im sauren Milieu ($\text{pH} = 4$) durchgeführt wurden, weisen im untersuchten Konzentrationsbereich von $0,1 - 2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ eine völlige Übereinstimmung der Resonanzlinien der Hydroxylgruppen auf. Sowohl die Linienform im Allgemeinen als auch insbesondere die Halbwertsbreite der C-5 Mannuronat Referenzlinie ist im Rahmen

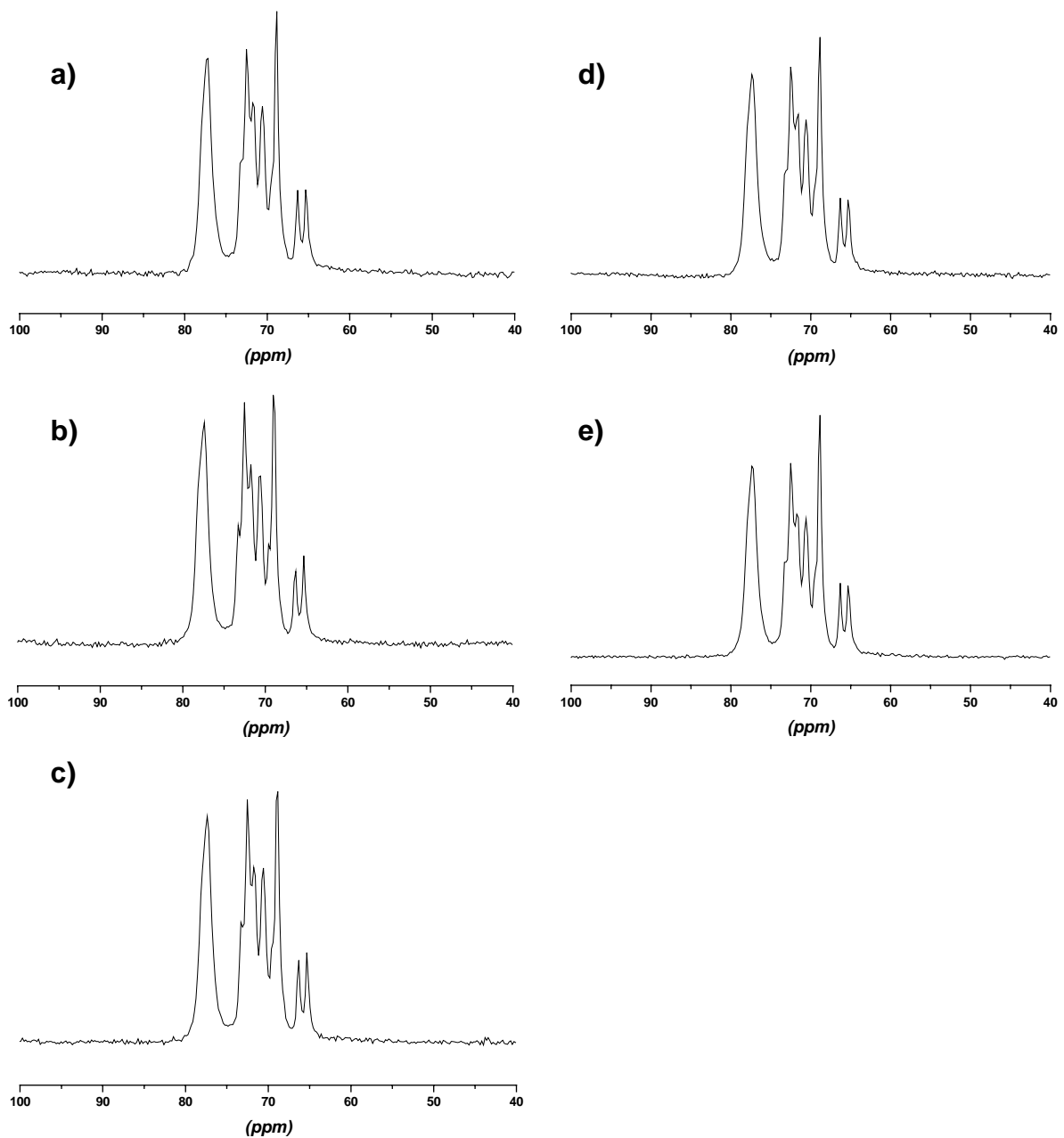


Abb. 5.33: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren der Hydroxylgruppenresonanzlinien in einer wässrigen EPS- Lösung ($7,5 \text{ g/L}$) in Abhängigkeit von der Al^{3+} - Konzentration: a) ohne Zusatz von Al^{3+} - Ionen b) $0,1 \text{ mmol/L Al}^{3+}$ c) $0,5 \text{ mmol/L Al}^{3+}$ d) $1,0 \text{ mmol/L Al}^{3+}$ e) $2,0 \text{ mmol/L Al}^{3+}$, $\text{pH} = 7,0$

der Messtoleranzen als konstant und somit unabhängig von der Aluminiumionenkonzentration in der EPS- Lösung anzusehen.

Im Neutralbereich ($\text{pH} = 7$) beobachtet man ähnliche Tendenzen wie zuvor bei den Messungen bei niedrigen pH- Werten (Abb. 5.33). So sind auch hier keinerlei Veränderungen in Abhängigkeit von der Aluminiumionenkonzentration zu erkennen. Die relativen Linienbreiten der Hydroxylgruppenresonanzen sind innerhalb des Messfehlers als konstant zu erachten.

5.6 Effekte paramagnetischer Ionen

Für diese Messreihe wurde das paramagnetische Mangan-II-Ion (Elektronenkonfig.: [Ar] 3d⁵)

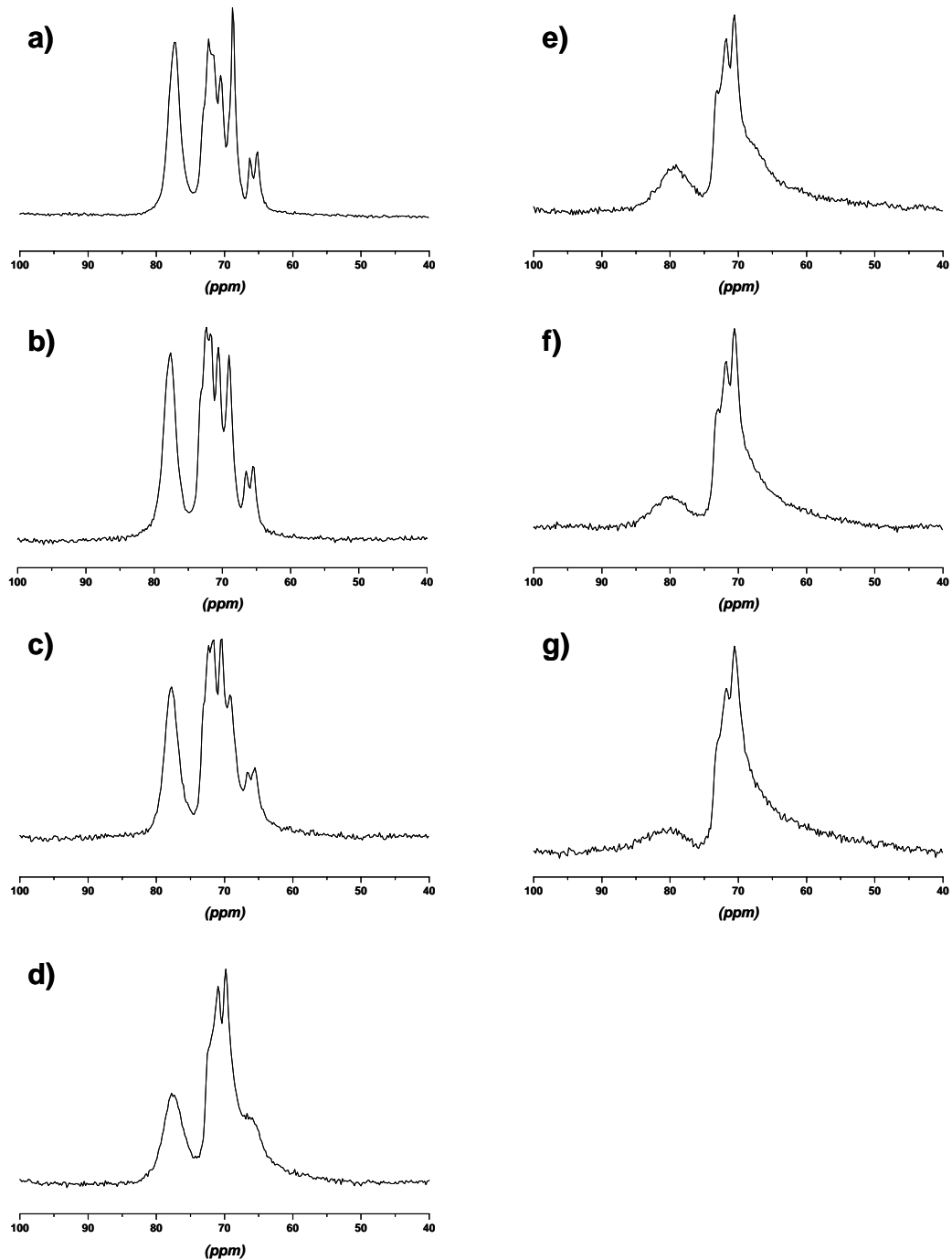


Abb. 5.34: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren der Hydroxylgruppenresonanzlinien in einer wässrigen EPS- Lösung (7,5 g/L) in Abhängigkeit von der Mn^{2+} - Konzentration: a) ohne Zusatz von Mn^{2+} - Ionen b) 0,05 mmol/L Mn^{2+} c) 0,10 mmol/L Mn^{2+} d) 0,25 mmol/L Mn^{2+} e) 0,50 mmol/L Mn^{2+} f) 0,75 mmol/L Mn^{2+} g) 1,00 mmol/L Mn^{2+}

zur Dotierung der EPS- Proben (7,5 g/L) aufgrund seines hydrodynamischen Radius ausgewählt, welche dem des Ca^{2+} - Ions sehr ähnlich ist. Hierbei wurde ein Konzentrationsbereich von $0,05 - 1,00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ untersucht, in dem der paramagnetische Effekt insbesondere hinsichtlich der Linienform der Hydroxylgruppenresonanzen beobachtet wird. Wie erwartet kommt es schon bei geringfügiger Dotierung mit Mn^{2+} zu einer starken Verbreiterung der Resonanzlinien des gesamten Spektrums. Ähnlich wie bei den Festkörperspektren der Ca^{2+} - Konzentrationsreihe (5.28) zeigen sich im unteren Konzentrationsbereich bis zu $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ spezifische Linienverbreiterungen der Guluronatlinien (G-2, G-3 und G-5) sowie der GMG/MMG- Triadensequenzen des C-2 Kohlenstoffs der Mannuronatreste. Erhöht man die Konzentration an paramagnetischen Ionen in der EPS- Lösung über diesen Schwellenwert hinaus, so wird auch das C-5 Mannuronatsignal merklich verbreitert.

Die einzigen Resonanzlinien, welche kaum von dem paramagnetischen Effekt betroffen sind, sind die C-2 und C-3 Kohlenstoffatome derjenigen Mannuronatreste, die an der C-1 Position nicht mit Guluronatresten glykosidisch verbrückt sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie sich sterisch außerhalb des Wirkungsbereichs der paramagnetischen Mn^{2+} - Ionen befinden. Nur die Kohlenstoffresonanzen (G-5, G-2, M-2 GMG/MMG), welche in direkter Nachbarschaft zum gebundenen Mn^{2+} - Ion stehen, werden durch den Feldeffekt des assoziierten Mn^{2+} - Ions verbreitert.

Auf die Untersuchung der segmentellen Molekülbeweglichkeit wurde verzichtet, da die T_1 - Zeiten durch den Zusatz von paramagnetischen Ionen stark verkürzt werden und somit relevante Informationen verloren gehen.

5.7 Stressreaktionen von Biofilmen

Biofilme als mikrobielle Lebensform durchlaufen wie in Kapitel 2 vorgestellt unterschiedliche Entwicklungsstadien. Insbesondere bei den späteren Stadien oder unter Stressbedingungen beobachtet man makroskopisch deutliche Veränderungen der organischen Matrix (Pigmentierung, Dichte, Porosität). Im Rahmen der Versuchsreihe sollen die Prozesse innerhalb eines intakten Biofilms auf molekularer Ebene näher beleuchtet werden, welche unter Stressbedingungen [105] (Nährstoff-/Sauerstoffarmut) (s. Kapitel 4.6) ausgelöst werden.

Ein ^{13}C -angereicherter Biofilm wird dazu hermetisch abgeschlossen und in größer werdenden Abständen über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht (Abb. 5.36), zusätzlich erfolgt eine Abschlussuntersuchung nach 150 Tagen. Unmittelbar nach der Entnahme des mikrobiellen Rasens von der PIA-Platte ist eine starke Veränderung in der Pigmentierung des Biofilms zu beobachten. Sie wechselt innerhalb von wenigen Minuten von einem Dunkelgrün zu einer gelbgrünlichen Färbung. In dem untersuchten Zeitrahmen sind keine weiteren makroskopischen Veränderungen des Biofilms hinsichtlich Färbung und chemischer Struktur eingetreten.

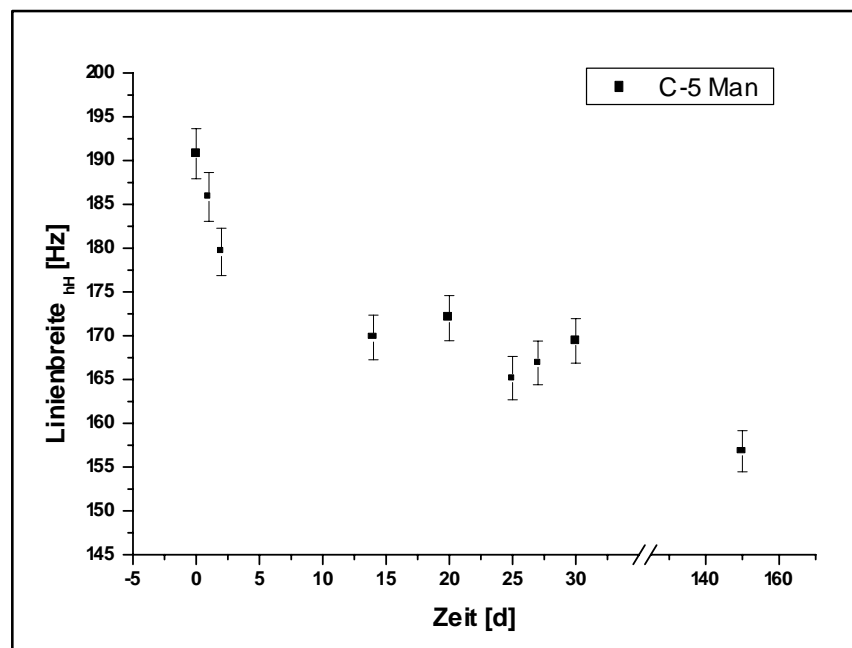


Abb. 5.35: Zeitabhängige Änderung der Linienbreite der C-5 Mannuronatlinie im Spektrum eines nativen Biofilms von *P. aeruginosa* SG81 unter Einfluss von Stressfaktoren (Nährstoff- und Sauerstoffknappheit)

Die NMR- Spektren des Biofilms weisen im zeitlichen Verlauf mehrere Veränderungen hinsichtlich ihrer Linienform auf. Eine der vordergründigen Veränderungen stellt die fort-

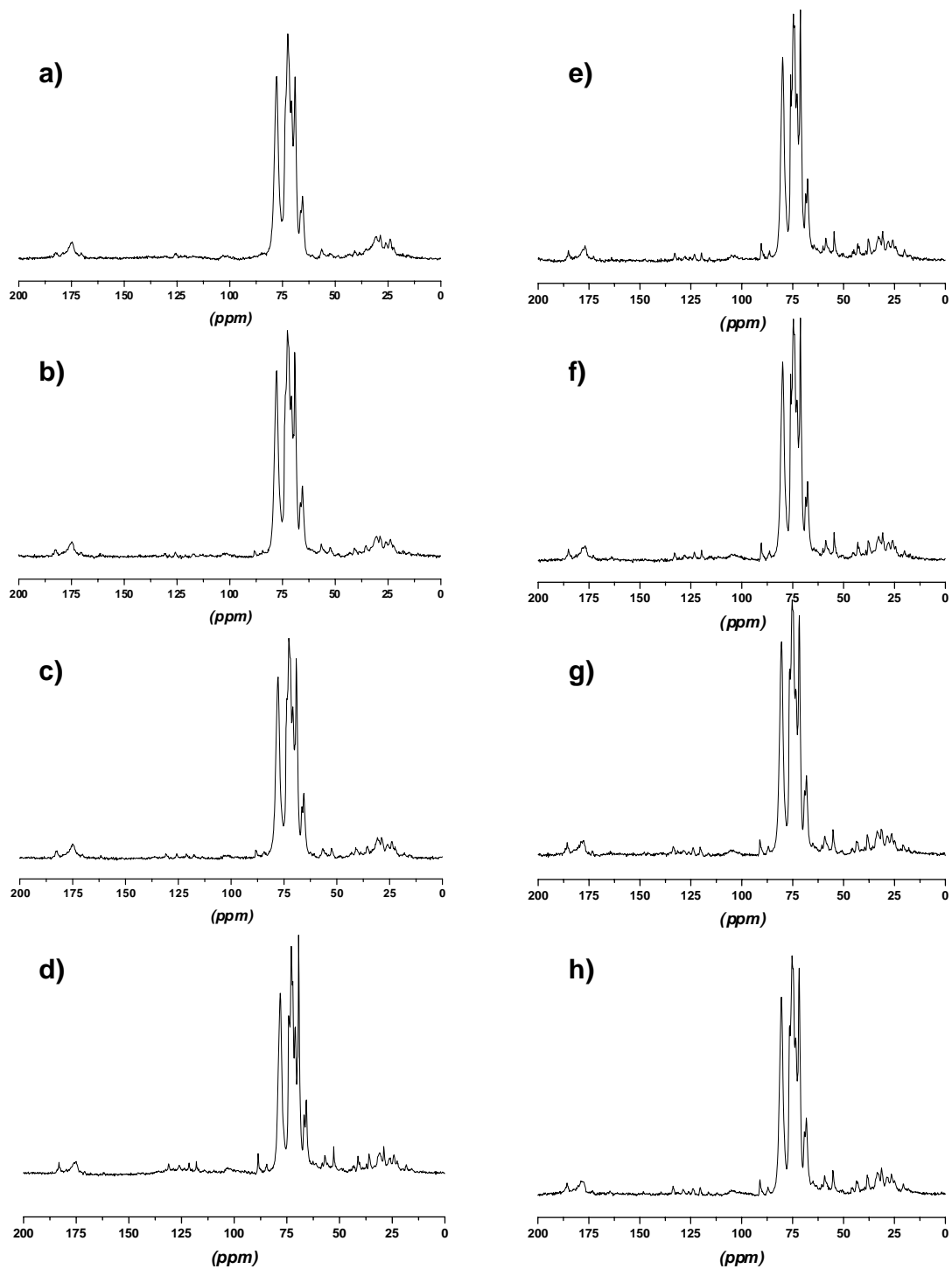


Abb. 5.36: ^{13}C { ^1H }- NMR Spektren eines ^{13}C - angereicherten nativen Biofilms von *P. aeruginosa* SG81; a) t = 0 d; b) t = 1 d; c) t = 2 d, d) t = 14 d, e) t = 20 d, f) t = 25 d, g) t = 27 d, h) t = 30 d

schreitende Abnahme der Linienbreite mit der Zeit dar, wodurch es zu einer Verbesserung der Auflösung des gesamten Biofilmspektrums kommt. Trägt man die Linienbreite auf halber Peakhöhe der C-5 Mannuronatreferenzlinie gegen die Zeit auf, so ergibt sich näherungsweise ein exponentieller Verlauf, welcher einem unteren Grenzwert entgegenstrebt (Abb. 5.35). Der Endwert, welcher nach einer Versuchsdauer von 150 Tagen bestimmt wurde betrug dabei 157 Hz, zum Zeitpunkt unmittelbar nach der Probenahme wurde hingegen eine Halbwertsbreite von 191 Hz gemessen.

Neben der deutlichen Verbesserung der Auflösung innerhalb der Spektrenreihe konnte beobachtet werden, dass neue Resonanzlinien im Biofilmspektrum erscheinen. Erste Veränderungen im ^{13}C - NMR Spektrum des nativen Biofilms sind bereits nach 24 h zu erkennen. Im Verschiebungsbereich der Methylen- und Methinkohlenstoffe erscheinen schwache Banden bei 35,4 ppm, 41,0 ppm, 52,5 ppm und 56,6 ppm, welche zuvor nicht bzw. nicht so ausge-

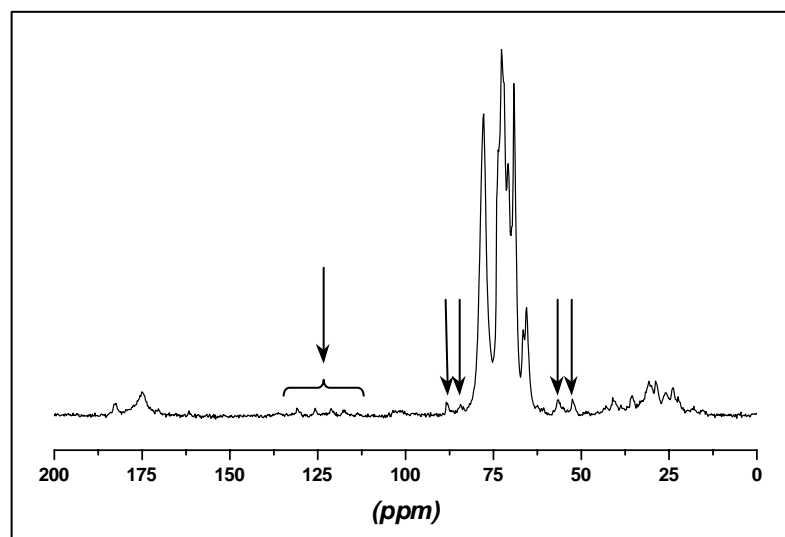


Abb. 5.37: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren eines Biofilms von *P. aeruginosa* 48 h nach der Entnahme, Pfeile kennzeichnen die Resonanzlinien, die im Zuge der Stressreaktionen erscheinen

Prägt vorhanden waren. Leicht tieffeldverschoben zu den Hydroxylgruppenresonanzen tauchen bei 84,2 und 88,4 ppm zwei weitere Resonanzlinien auf. Im Verlauf der nächsten 24 h nehmen diese Resonanzsignale an Intensität zu und im Verschiebungsbereich der $-\text{C}=\text{C}-$ Doppelbindungen zwischen 115 - 135 ppm erscheinen vier neue Linien im ^{13}C - Spektrum

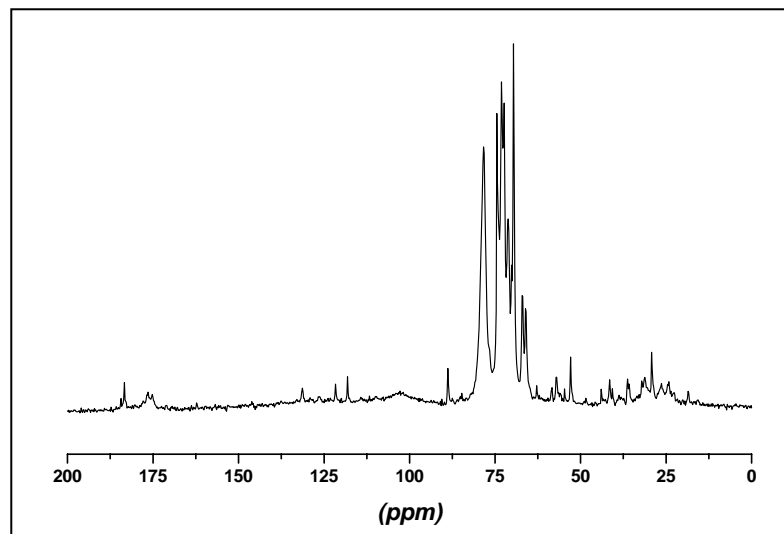


Abb. 5.38: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren eines Biofilms von *P. aeruginosa* nach 150 Tagen Lagerung unter Sauerstoff- und Nährstoffarmut

(Abb. 5.37). Über die gesamte Versuchsdauer von 30 Tagen betrachtet ändern sich die Signalamplituden der Abbauprodukte nach den ersten 14 Tagen nur unwesentlich, d.h. der native Biofilm hat schnell sein statisches Gleichgewicht hinsichtlich der Ausschüttung von Lyse- und Hydrolyseprodukten erreicht. Eine weitere Kontrollmessung nach 150 Tagen (Abb. 5.38) zeigt, dass auch über diesen ausgedehnten Zeitraum eine fortschreitende Metabolisierung von Alginat stattgefunden hat. Im Resonanzbereich der Methingruppen treten einige Linien deutlich hervor. Andere Signale, welche bereits Metaboliten zugeordnet worden waren, erscheinen noch deutlicher im Spektrum des Biofilms, als dies zuvor der Fall war.



Abb. 5.39: Einzelkolonieausstrich des Biofilms nach Abschluss des Dauerversuchs; Färbung und Wachstum des Biofilms entsprechen dem üblichen Phänotyp

Darüber hinaus wurde ein Teil der Bakterien hinsichtlich seines biologischen Zustands untersucht. Eine Probe des Biofilms wurde entnommen und ein Einzelkolonieausstrich auf einer PIA- Platte angelegt. Die Platte wurde 24 h bei 36°C bebrütet. Der Ausstrich der Probe (Abb. 5.39) zeigte ein Wachstumsverhalten entsprechend des üblichen Phänotyps von *P. aeruginosa*.

Der verbliebene Rest der Probe wurde zur Kontrolle mit Alginatlyase, welche zuvor von *Klebsiella aerogenes* isoliert worden war [92], versetzt, und für 2 h bei 36°C bebrütet. Nach Ablauf dieses Zeitraums ist der Biofilm komplett abgebaut. Statt einer Gelmatrix liegt nun eine klare, dünnflüssige Lösung vor, in welcher die Bakterien als Bodensatz sedimentiert sind. Das NMR- Spektrum des gelösten Überstandes wurde aufgenommen und mit dem

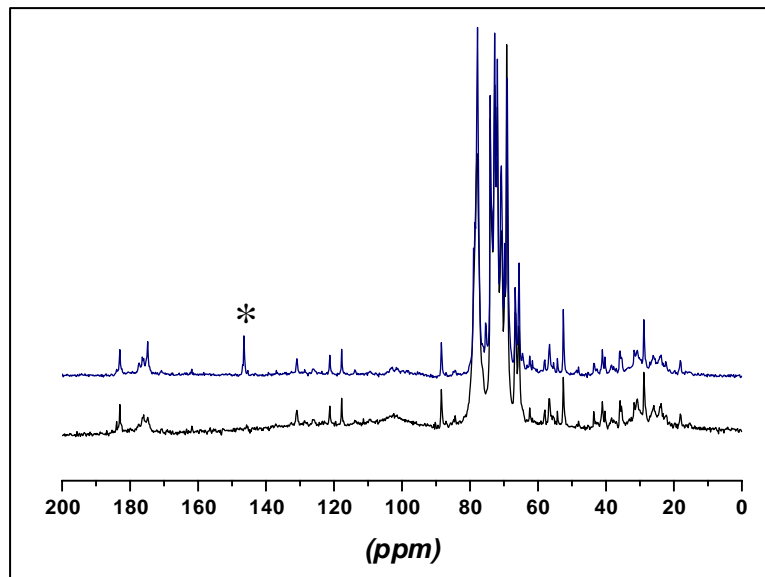


Abb. 5.40: $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ - NMR Spektren abgebauter Biofilme; schwarz: ein hermetisch abgeschlossener Biofilm nach 150 Tagen, Abbau erfolgte vermutlich durch *Pseudomonas* - Alginatlyase; blau: derselbe Biofilm nach Zusatz von *Klebsiella*- Alginatlyase; *: Resonanzsignal des Tris-Puffers

Spektrum des 150 Tage hermetisch abgeschlossenen Biofilms verglichen. Beide Spektren hinsichtlich der Lagen ihrer Resonanzsignale identisch, wobei jedoch die Resonanzsignale des vollständig abgebauten Biofilms wesentlich besser aufgelöst sind und wegen ihrer größeren Signalamplitude scheinbar an Intensität zugenommen haben. Die Linienbreite des C-5 Mannuronat- Referenzsignals beträgt im abgebauten Biofilm lediglich 92 Hz.