

## 6. Diskussion

### 6.1 Charakterisierung des Biofilms

Die Charakterisierung der Biofilmmatrix, d.h. ihrer EPS und insbesondere ihres Alginats, stellt die grundlegende Voraussetzung zur eingehenderen Erforschung intra- bzw. intermolekularer Wechselwirkungen im Biofilm dar. Die Grundlagen hierfür basieren im Wesentlichen auf den intensiven Vorarbeiten zur Bestimmung der Zusammensetzung von Alginatpolymeren [94, 95, 96], sowie der Adaption bestehender nasschemischer Verfahren in der Kernresonanzspektroskopie durch *Grasdalen et al.* [94]. Die Einführung dieser spektroskopischen Methode eröffnete den Weg zur detaillierten Erfassung der Monomierzusammensetzung und Sequenzierung von Alginaten.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Hochauflösungsspektren des partiell hydrolysierten, bakteriellen Alginats (Abb. 5.4) eine gute Korrelation mit den Verschiebungswerten, welche für die Resonanzsignale der Alginatmonomere gefunden wurden (s. Tab. 6.1), aufweisen. Im Bereich der Hydroxylgruppenresonanzen (68 – 83 ppm) (Abb. 5.1.6) ließ sich eine eindeutige Zuweisung der Resonanzlinien zu den jeweiligen Ringkohlenstoffatomen der Mannuronat- bzw. Guluronatmonomerbausteine treffen. Die Abweichung der chemischen Verschiebung einzelner Linien zu den von *Grasdalen* tabellierten Verschiebungswerten ist über den gesamten Frequenzbereich konstant (ca. 1,5 ppm), so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie auf die Referenzierung mit unterschiedlichen internen Standards (THF / Natrium-3-trimethylsilylpropionat-d<sub>4</sub>) bzw. des unterschiedlichen Dielektrikums des wässrigen Solvens (Addition von EDTA [94]) zurückzuführen ist. Darüber hinaus sollten die Signallagen wegen des weitgehend analogen Aufbaus von Alginaten mariner und bakterieller Herkunft nur minimal divergieren. Lediglich die Signalintensitäten einzelner Resonanzen differieren erwartungsgemäß mitunter stark, aufgrund der unterschiedlichen relativen Häufigkeit der Monomerbausteine im Polysaccharid (s. Tab. 6.2).

Die Sequenzierung der Alginatmatrix von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 sowie dreier weiterer *Pseudomonas* Stämme wurde eingehend von *Schürks* [67] beschrieben und erfolgte vorwiegend über die Zuordnung der Resonanzlinien der C-1 Kohlenstoffe. Im Rahmen dieser

Arbeit stehen hingegen nicht die Kohlenstoffe der glykosidischen Bindung, sondern vielmehr die Ringkohlenstoffe im Vordergrund. Aufgrund der hohen Anzahl von sich teilweise überlappenden Signalen innerhalb dieses Resonanzbereichs (70 - 83 ppm), ist eine vollständige Charakterisierung aller Triadensignale nicht möglich. Dennoch ließen sich durch Korrelation mit den Verschiebungswerten aus der Literatur und den aus der C-1 Sequenzierung bekannten Intensitätsverhältnissen einige Triadensequenzen der M-3, M-2 und G-3 Kohlenstoffe eindeutig zuordnen (s. Abb. 5.7).

**Tab. 6.1:** Verschiebungswerte der Resonanzsignale [ppm] für *P. aeruginosa* SG81 (Referenz: THF) und *L. digitata* (Referenz: Natrium-3-trimethylsilylpropionat-d<sub>4</sub>) in der Gegenüberstellung

Resonanzsignale	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG81	<i>Laminaria Digitata</i>
<b>C – 1 (M &amp; G)</b>		
<b>MMG</b>	104,62	103,9
<b>GMG</b>	104,49	103,8
<b>MGG</b>	-	103,4
<b>MMM</b>	103,55	102,8
<b>GMM</b>	103,42	102,7
<b>GGM</b>	103,22	102,3
<b>MGM</b>	103,13	102,2
<b>C – 1 (red. Endgr.)<sup>1</sup></b>	96,93	96,2 (M), 95,5 (G)
<b>G – 4</b>	83,33	82,6
<b>M – 4</b>	81,42	80,7
	80,73	80,3
<b>M – 5</b>	79,67	79,2
<b>M – nichtred. Endgr.<sup>2</sup></b>	76,06	-
<b>M – 3</b>	74,95	74,3
	74,76	74,1
<b>M – 2</b>	74,10	73,3
	73,33	72,7
<b>G – 3</b>	72,75	72,1
<b>G – 5</b>	71,09	70,2
<b>G – 2</b>	68,28	67,8

<sup>1</sup> red. Endgr.: reduzierte Endgruppen

<sup>2</sup> nichtred. Endgr: nicht reduzierte Endgruppen

Der direkte Vergleich der Spektren des abgebauten Bakterienalginats (Abb. 5.4) mit dem Kreuzpolarisationsspektrum des nativen Biofilms (Abb. 5.2), zeigt in weiten Bereichen große Übereinstimmungen. Insbesondere im Bereich der Hydroxylgruppenresonanzen werden die Parallelen deutlich. Dies bedeutet, dass das Festkörperspektrum eines natürlichen Biofilms vom Alginat als makromolekularem Bestandteil dominiert wird. Andere Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine erscheinen nicht im NMR- Spektrum oder werden von den intensiveren Resonanzsignalen des Heteropolysaccharids überlagert.

Die direkte Zuordnung der Resonanzlinien im Festkörperspektrum (s. Abb. 5.3) der Biofilm-matrix ist durch die starke Linienverbreiterung im Festkörper, sowie wegen der starken Überlappung benachbarter Resonanzlinien erschwert. Außer der intensiven C-2 Resonanzlinie des Glycerins (73,0 ppm) können lediglich das G-2 (65,6 und 64,6 ppm), das M-5 (77,3 ppm) sowie das G-5 Signal (68,1 ppm) mit hinreichender Gewissheit zugewiesen werden.

**Tab. 6.2:** Sequenzanalyse und Bestimmung des M/G - Verhältnisses für *P. aeruginosa* SG81 und *L. digitata* [94]

Probe	F <sub>M</sub>	F <sub>G</sub>	F <sub>MMM</sub>	F <sub>MMG</sub>	F <sub>MGM</sub>	F <sub>GGM</sub>	F <sub>GMG</sub>	F <sub>M</sub> /F <sub>G</sub>
<i>P.a. SG81</i>	0,76	0,24	0,11	0,51	0,09	0,09	0,16	3,17
<i>L. digitata</i>	0,60	0,40	0,38	0,08	0,10	0,04	0,06	1,50

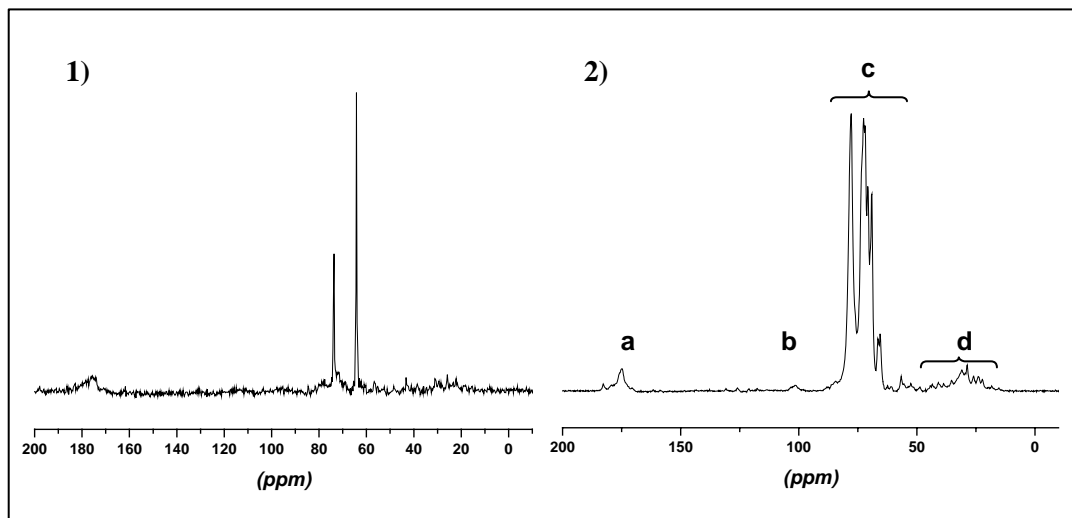
## 6.2 Effektivität und Spezifität der $^{13}\text{C}$ -Anreicherung

Die Untersuchungen von Wechselwirkungskräften innerhalb der EPS eines Biofilms stellen Anforderungen an das Probenmaterial, welche von einem natürlichen Biofilm nicht erfüllt werden können. Wie aus dem vorangegangenen Kapitel 6.1 ersichtlich wurde, sind die Signalintensitäten im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum sehr schwach, so dass z.B. Einflüsse ionischer Additive nicht mit zufriedenstellender Sicherheit untersucht werden können. Darüber hinaus stellt die Biofilmmatrix selbst ein sehr komplexes und ein vergleichsweise schwer reproduzierbares Modellsystem dar. Daraus erwächst die Problemstellung, ein Probensystem zu finden, welches folgende Kriterien erfüllt:

- Vergleichbarkeit zu den Eigenschaften im nativen Biofilm
- Reduktion auf wesentliche Komponenten
  - ermöglicht die eindeutige Zuordnung von Effekten
- Homogenität
- Langzeitstabilität des Probenmaterials
- einfache Isolierung in quantitativen Mengen

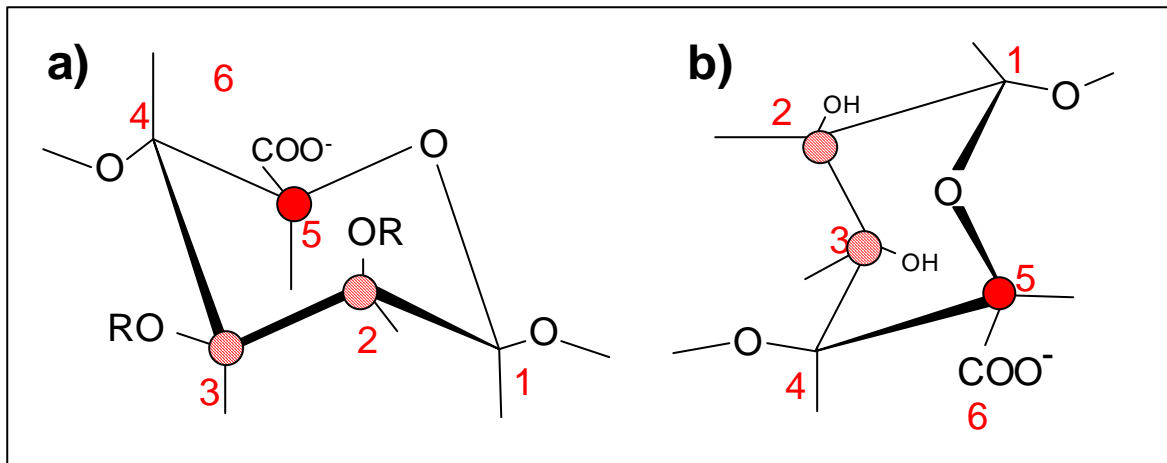
Der erste Schritt zur Lösung des Problems stellt eine Anreicherung des Probenmaterials durch Isotopenmarkierung - in diesem Falle mit 2- $^{13}\text{C}$ -Glycerin - dar. In Vorversuchen wurde die optimale Glycerinkonzentration bestimmt, bei der ein vollständiger Bakterienrasen unter minimalem Einsatz an isotopenmarkiertem Glycerin ausgebildet wird. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass keine Revertierung der Bakterienkulturen zu nicht bzw. schwach mucoiden Stämmen auftritt, zum anderen sollte der störende Einfluss des Glycerins im Festkörperspektrum reduziert werden. Das Ergebnis ist äußerst zufriedenstellend und weist eine deutliche Verbesserung der Spektrenqualität auf (Abb. 5.8). Ein besonders augenfälliger Punkt ist die Abwesenheit des Glycerinsignals im Spektrum des isotopenmarkierten Biofilms. Dies kann als sicheres Anzeichen dafür gewertet werden, dass das 2- $^{13}\text{C}$ -Glycerin im Nährmedium nahezu vollständig vom Bakterium verstoffwechselt wurde und lediglich nicht-detectierbare Spuren davon in die EPS diffundiert sind.

Weitere Aussagen über die Effizienz und Spezifität der Anreicherung liefert insbesondere der direkte Vergleich zwischen den Spektren des markierten und nichtisotopenmarkierten Biofilms (Abb. 6.1). In beiden Spektren weisen die Resonanzbereiche der Carboxyl-, der Methylen-, der Methin- sowie der anomeren Kohlenstoffe nahezu identische Intensitätsverhältnisse auf, wohingegen die Resonanzlinien der Hydroxylkohlenstoffe deutlich an Intensität gewonnen haben. Dies bedeutet, dass das Glycerin in Analogie zur Fructose ausschließlich über den *Entner-Doudoroff-Zyklus* [75] zu Alginat verstoffwechselt wird. Die Signalle der Resonanzlinien geben weiterhin Aufschluss darüber, wie das Glycerin zum Aufbau



**Abb. 6.1:**  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren eines unmarkierten (1) und eines  $^{13}\text{C}$ -markierten Biofilms (2);  
 a) Carboxylkohlenstoffe, b) anomerer Kohlenstoff, c) Hydroxylgruppenkohlenstoffe,  
 d) Methin- und Methylenkohlenstoffe

des Polysaccharids genutzt wird. Die intensivsten Resonanzlinien des Spektrums stellen die des M-5 (77,3 ppm) und des G-5 Kohlenstoffatoms (69,0 ppm) dar. Darüber hinaus sind zusätzlich noch die Resonanzen der C-2 bzw. C-3 Kohlenstoffatome der jeweiligen Monomerbausteine im Spektrum vertreten. Das bedeutet, dass der C6- Ringkörper sowohl aus C3- als auch C2- Einheiten zusammengesetzt wird. Der C-5 Kohlenstoff ist somit in beiden Monomeren zu je 100 % isotopenmarkiert, die C-2 bzw. C-3 Kohlenstoffe hingegen nur zu jeweils 50 % (Abb. 6.2).



**Abb. 6.2:** Darstellung der Monomereinheiten innerhalb bakteriellen Alginats und ihrer Isotopenmarkierung (volle Kreise: 100% markiert; schraffierte Kreise 50% markiert); a) Mannuronatrest; R = H, COCH<sub>3</sub>; b) Guluronatrest

Die verschiedenen Spin - Gitter Relaxationszeiten  $T_1$ , welche für die C5- Kohlenstoffe der Mannuronat- bzw. Guluronatreste gefunden wurden, deuten weiterhin auf Differenzen hinsichtlich der chemischen Verschiebungsanisotropie und der lokalen Beweglichkeit wie z.B. Librationen einzelner HCOH- Gruppen hin. Eine Ursache hierfür kann in der partiellen Acetylierung der C-2 und C-3 Kohlenstoffe der Mannuronatbausteine gesehen werden, da diese sowohl die Acidität der Carboxylgruppe als auch die allgemeine Hydrophobizität, also die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen mit dem wässrigen Milieu, mit beeinflussen. Es ist daher zu erwarten, dass die Wechselwirkungen der Hydroxylgruppen der Guluronatbausteine mit dem Wasserkörper (engl.: bulk water) ausgeprägter sind.

Die <sup>13</sup>C-NMR Spektren einer wässrigen EPS- Lösung (Abb. 5.10) zeigen naturgemäß starke Parallelen zu dem Spektrum des Biofilmmasens. Linienformen und -intensitäten sind vergleichbar, wenn auch die Linienbreiten aufgrund der geringeren Viskosität des Mediums im Allgemeinen wesentlich schmaler sind (164,5 Hz gegenüber 191,9 Hz bzgl. der C-5 Man Resonanz). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist der linienarme Resonanzbereich der Methylen- und Methinresonanzen, mit nur einem einzigen Resonanzsignal der Acetylgruppen des Alginats (22,1 ppm). Es wird angenommen, dass dies auf die Abwesenheit von Bakterien sowie auf den Verlust vergleichsweise niedermolekularen Materials (< 12 kDa) im Zuge der Probenaufarbeitung zurückzuführen ist.

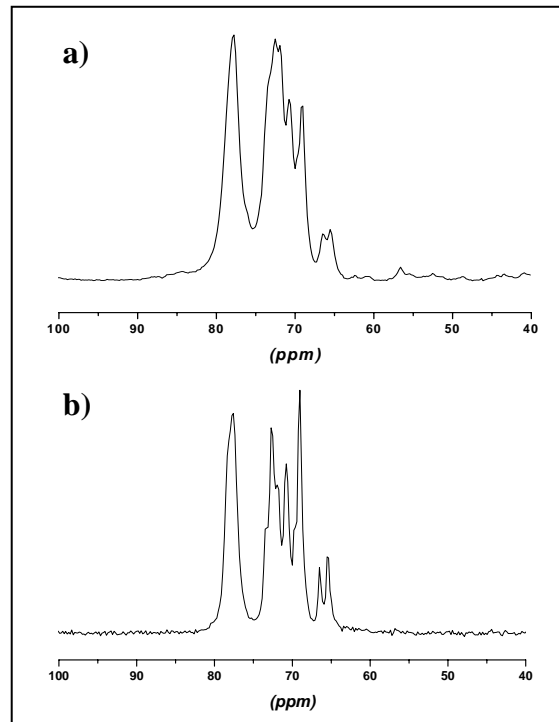
Ähnliche Aussagen lassen sich auch zum Spektrum der reinen Alginatlösung (Abb. 5.12) treffen. Als Besonderheit der Alginatspektren ist hier auf die Anwesenheit zweier nicht näher zugeordneter Resonanzsignale bei 63,2 und 61,3 ppm hinzuweisen. Da es sich hierbei um Linien vergleichsweise schwacher Intensität handelt, wird davon ausgegangen, dass es sich um Abbauprodukte durch Pilzbefall während der Aufarbeitung des Probenmaterials handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die schrittweise spektroskopische Untersuchung des Biofilms und seiner Komponenten (EPS, Alginat) die Metabolisierung von 2-<sup>13</sup>C-Glycerin zu Alginat nachvollzogen werden konnte. Die Effektivität der Umsetzung isotonenmarkierten Materials zum Polysaccharid beträgt annähernd 100 % und erfolgt selektiv an den C-2, C-3 und C-5 Kohlenstoffen der Mannuronat- bzw. Guluronatbausteine.

Hinsichtlich der Handhabbarkeit des Probenmaterials erweist sich die EPS- Lösung als das geeignete Probensystem für nachfolgende Messreihen. Die EPS als solche ist leicht in verhältnismäßig großen Mengen zu isolieren und zeigt sowohl als Lyophilisat als auch in wässriger Lösung eine gute Langzeitbeständigkeit. Da die EPS sämtliche makromolekularen Komponenten des Biofilms beinhaltet, bietet sie eine bessere Ausgangsbasis für Rückschlüsse auf Wechselwirkungen innerhalb von Biofilmen als dies bei reinem Bakterienalginat der Fall wäre.

### 6.3 Spektroskopische Charakteristika von Biofilmspektren

Die NMR - Spektren von Laborkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* besitzen einige Charakteristika, die sie von herkömmlichen Festkörperspektren unterscheiden. Dies ist an vorderster Stelle die ungewöhnlich niedrige Halbwertsbreite der Resonanzsignale im Spektrum. Stellt man das Resonanzspektrum eines Bakterienrasens dem einer Lösung resuspen-



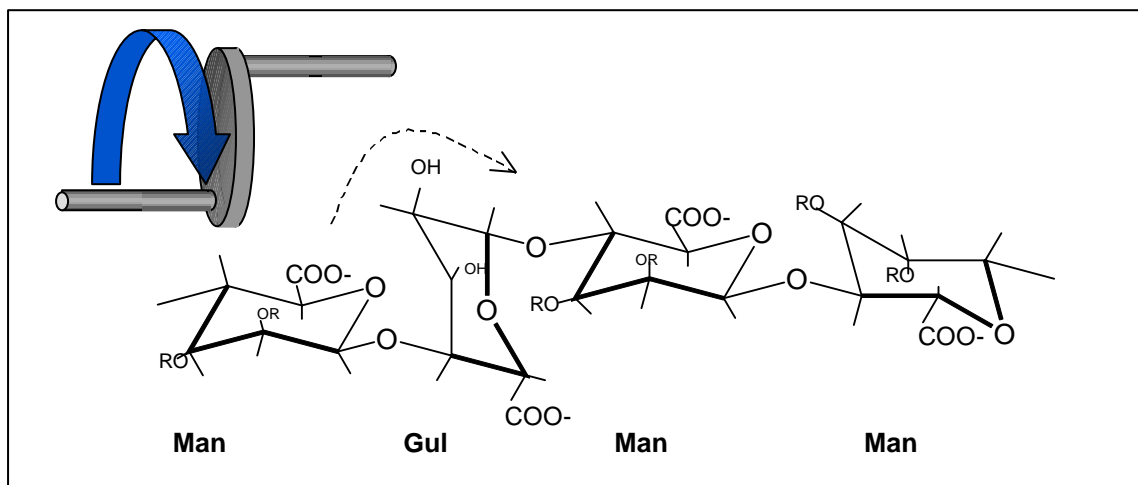
**Abb. 6.3:** Gegenüberstellung der Hydroxylkohlenstoffresonanzlinien von a) nativem Biofilm und b) einer EPS- Lösung ( $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

dierter EPS gegenüber, so zeigt sich, dass die Auflösung im gelartigen Festkörper nur geringfügig von der der EPS- Lösung differiert. Die allgemeine Linienverbreiterung im Biofilm beträgt gemessen an der C-5 Mannuronatresonanzlinie 16,7 %, was angesichts des unterschiedlichen viskoelastischen Verhaltens beider Proben zunächst als ungewöhnlich erscheinen mag. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen den Spektren ist die Verlagerung von Intensitätsverhältnissen einzelner Resonanzlinien. So hat die C-5 Guluronatlinie (69,0 ppm) im Biofilm gegenüber der EPS deutlich an Intensität verloren. Die Ursache für die Verlagerung von Signalintensitäten ist im Wesentlichen in der Gegenwart von bivalenten Kationen, insbe-



sondere dem Calciumion im Agarnährmedium zu suchen, welche eine selektive Linienverbreiterung hervorruft (vergl. Kapitel 6.6.2).

Die ungewöhnlich geringe Linienbreite in den Biofilmen beruht in erster Linie auf der hohen molekularen Beweglichkeit des Alginats innerhalb der Probe. Dies deutet darauf hin, dass die Vernetzungsdichte innerhalb des Gelnetzwerkes niedrig ist bzw. die Vernetzungspunkte stark fluktuieren und somit in weiten Bereichen des Polysaccharidmoleküls eine nahezu

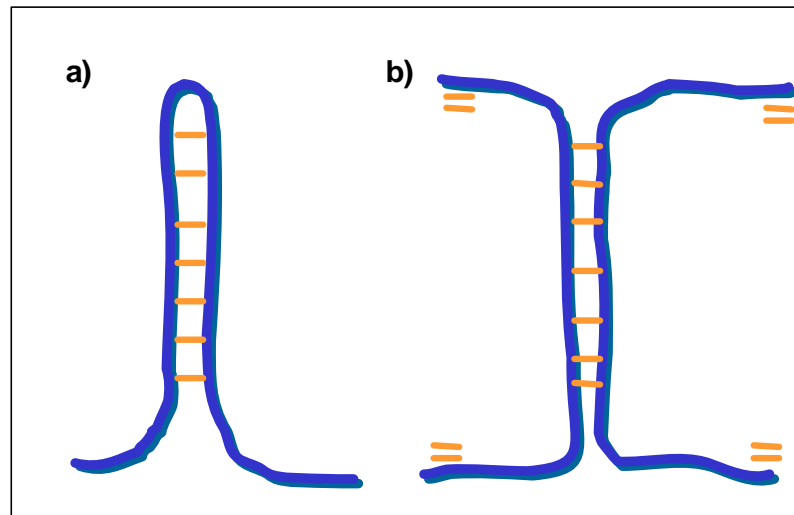


**Abb. 6.4:** Schematische Darstellung der „crankshaft motion“ anhand eines Ausschnitts aus einem Alginatmolekül

ungehinderte Reorientierung der Monomerbausteine zulassen. Eine besondere Form der Moleküldynamik stellt die sogenannte „crankshaft motion“ dar. Wie in Abb. 6.4 dargestellt handelt es sich dabei um eine kreisförmige Translationsbewegung zweier Nachbargruppen (in diesem Falle seien es Mannuronatgruppen) um den zentralen Monomerbaustein (hier: die Guluronatgruppe), welcher dadurch eine Drehbewegung ausführt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist mangels moleküldynamischer Simulationen unklar, ob im Falle des Alginats im Gelnetzwerk eine komplette Drehbewegung um  $360^\circ$  vorliegt. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass bereits eingeschränkte Rotationsbewegungen (kleine Rotationswinkel) ausreichen, um eine effektive Mittelung der chemischen Anisotropie der Uronsäurekohlenstoffe zu bewirken.

In Zusammenhang mit den Untersuchungen zum Einfluss mono-, bi- und trivalenter auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen innerhalb von Biofilmen kommt der Änderung der

molekularen Beweglichkeit eine besondere Bedeutung zu. Dies ist insbesondere bei der Interpretation der Wechselwirkungen zwischen bakteriellem Alginat und bivalenten Ionen der Fall. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die spektroskopischen Befunde in erster Linie Aufschluss darüber geben, ob und inwieweit das jeweilige Ion an bestimmten



**Abb. 6.5:** Gegenüberstellung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen in Polymeren; a) intra-molekulare Verknüpfungen in einem Polymer ("Hairpin" – Modell) b) intermolekulare Verknüpfungen, Ausbildung eines Netzwerkes; blau: Polymer ; orange: Verknüpfungsstellen

Sequenzen des Polysaccharidmoleküls assoziiert ist und somit deren Beweglichkeit beeinflusst. Die experimentellen NMR- Daten allein lassen keine direkte Aussagen hinsichtlich der intra- oder intermolekularen Natur der Wechselwirkungen zu (s. Abb. 6.5). Erst in der Zusammenschau mit makroskopischen Beobachtungen (wie z.B. der Rheologie der Probe) lassen sich solche Zusammenhänge verlässlich zuordnen.

## 6.4 Einfluss von pH- Wert und Temperatur

### 6.4.1 Einfluss des pH- Wertes

Die Struktur von Alginatmolekülen wird wesentlich durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen bestimmt. Hierbei fällt dem Milieu des Lösemittels eine besondere Rolle zu, da es die Protonierung- bzw. Deprotonierung der funktionellen Gruppen bei Polyelektrolyten, wie dem Alginat beeinflusst.

Der Einfluss des pH- Wertes auf die räumliche Struktur von bakteriellem Alginat wurde sowohl mit kernresonanzspektroskopischen, als auch mit rasterkraftmikroskopischen Methoden untersucht. Die NMR Untersuchungen an EPS- Lösungen (Abb. 5.13) unterschiedlichen pH- Wertes (pH = 4 – 11) zeigen einen deutlichen Trend hinsichtlich der Änderung der molekularen Beweglichkeit im Polysaccharid. Im sauren und neutralen Milieu weisen die Spektren nur minimale Unterschiede (4,1 Hz) hinsichtlich der Linienbreite der C-5 Mannuronat-Referenzlinie auf. In diesem pH- Bereich ändert sich der Dissoziationsgrad  $\alpha$  nur geringfügig. Wird jedoch die Hydroniumionenkonzentration verringert, so steigt der Dissoziationsgrad stark an und ionische Abstoßungskräfte zwischen benachbarten Carboxylgruppen nehmen zu. Die Wirkungsweise dieser Kräfte ist vorwiegend intramolekular und wirkt einer Verknäuelung des Makromoleküls entgegen, d.h. jedes Alginatmolekül nimmt eine vergleichsweise „gestreckte“ Konformation ein und ist somit in seiner allgemeinen Beweglichkeit gehindert. Im  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - Spektrum drückt sich dieses durch einen starken Anstieg der Linienbreite der Referenzlinie auf 155,9 Hz aus.

Die Ergebnisse der NMR- Spektroskopie erhalten zusätzliche Bestätigung durch die AFM- Messungen an EPS- Proben. Wie die AFM- Ausschnitte wässriger EPS- Lösungen (Abb. 5.14), jeweils aufgenommen bei einem pH- Wert von 4,0 bzw. 11,0 , zeigen, findet man in Abhängigkeit vom Milieu des Lösungsmittels unterschiedliche Kettenstrukturen vor. Unter sauren Bedingungen sind flache, scheibenförmige Gebilde zu erkennen. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um dichte Knäuel von Alginatmolekülen handelt, welche im Verlauf des Trocknungsprozesses auf dem Mica- Objektträger kollabieren und abflachen. Im Gegensatz dazu liegen im basischen Milieu deutlich entknäuelte Kettenstrukturen vor. Die genaue Natur dieser Knäuel konnte leider nicht eindeutig aufgeklärt werden, es wird aller-

dings aufgrund der Dimensionen der abgebildeten Objekte davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Aggregate zweier oder dreier Alginatmoleküle handelt [106]. Die „Auflockerung“ der Polysaccharidknäuel steht also im Einklang mit der Theorie der verstärkten intramolekularen Abstoßung zwischen den benachbarten Carboxylgruppen im Polymeren, welche zu einer „Streckung“ des Makromoleküls führt.

#### 6.4.2 Einfluss der Temperatur

Der Einfluss der Proben­temperatur auf das Kernresonanzspektrum von EPS- Lösungen (Abb. 5.15) beruht im Wesentlichen auf der Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit  $\tau_c$  des Moleküls. Ist die Korrelationszeit  $\tau_c$  lang, wie es in Festkörpern, hochviskosen Lösungen oder aber auch bei niedrigen Temperaturen der Fall ist, so ist die Verweilzeit der Kerne in ihrer jeweiligen relativen Orientierung zu ihrer Umgebung lang. Aufgrund der Wechselwirkungen mit lokalen Magnetfeldern benachbarter Dipole kommt es somit zu einer breiteren Verteilung von Larmorfrequenzen und einem schnelleren Verlust der Phasenkohärenz. Dies ist gleichbedeutend mit einer kürzeren  $T_2$  Relaxationszeit und einer damit einhergehenden Linienverbreiterung [85].

Umgekehrt verkürzt sich die Korrelationszeit  $\tau_c$ , wenn die Viskosität des Lösemittels erniedrigt oder die Temperatur der Probe erhöht wird: Die Viskositätserniedrigung reduziert Restriktionen hinsichtlich der Reorientierung des Moleküls, eine höhere Temperatur führt zu einer höheren kinetischen Energie der Moleküle; die Besetzungsverteilung der translatorischen und rotatorischen Energieniveaus ändert sich.

Dementsprechend zeigen die temperaturabhängigen Messungen an einer EPS- Lösung deutlich eine Abnahme der Linienbreite aller Resonanzlinien mit zunehmender Proben­temperatur. Referenziert man die Änderung der Linienbreite hinsichtlich des C-5 Mannuronat- bzw. C-5 Guluronatsignals, so ist bei beiden Resonanzen eine exponentielle Abnahme der Linienbreite auf halber Höhe zu beobachten (s. Abb. 5.16 u. Abb. 5.17).

Die Spin - Gitter Relaxationszeiten  $T_1$  zeigen hingegen keinerlei Temperaturabhängigkeit im untersuchten Temperaturbereich. Die  $T_1$  - Zeit ist gegenüber Molekülbewegungen im Mega-

hertzbereich wie z.B. Librationen der HCOH- Gruppen empfindlich. Die Aktivierungsenergie derartiger Bewegungsabläufe ist sehr niedrig. Daraus resultiert, dass die relative Änderung dieser Bewegungen bei höheren Temperaturen ( $> 273$  K) gering ist und somit die longitudinale Relaxationszeit nur insignifikant beeinflusst wird.

## 6.5 Einfluss monovalenter Kationen

Die Wechselwirkungen monovalenter Kationen mit Alginaten oder EPS sind vergleichsweise schwach untersucht. Frühe Studien von *Podlas* und *Ander* [107] deuteten darauf hin, dass die Bindung von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - Ionen rein statistischer Natur ist. Umfassendere Untersuchungen, durch *Seale et al.* [108] mittels CD- Spektroskopie an kommerziellen Algalginaten durchgeführt, ergaben, dass die Bindungskapazität innerhalb der homologen Reihe ansteigt. Darüber hinaus wurden für die Wechselwirkungen monovalenter Ionen unterschiedliche Bindungsarten postuliert:  $\text{Li}^+$  bindet rein statistisch an Alginate,  $\text{Na}^+$  ist in begrenztem Umfang zu kooperativen Bindungen fähig und  $\text{K}^+$  geht in Gegenwart von Polyguluronatblöcken spezifische Bindungen zu benachbarten Guluronatresten ein. Die Wechselwirkungen mit bakteriellen Alginaten von *Acetobacter vinelandii* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden insbesondere in Hinblick auf den Einfluss der Acetylgruppen erforscht [69]. Dabei wurden die Ergebnisse von *Seale et al.* weitgehend bestätigt und es zeigte sich, dass acetylierte Alginate geringere Bindungskapazitäten haben, als ihre deacetylierten Gegenstücke.

### 6.5.1 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Monovalente ionische Additive wie  $\text{Li}^+$  haben einen merklichen Einfluss auf die makroskopischen Probeneigenschaften wässriger EPS- Lösungen (Abb. 5.18). Schon geringe Mengen von  $\text{LiCl}$  ( $> 0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) rufen eine starke Verringerung der apparenten Viskosität  $\eta_{app}$  hervor bis zu einem Punkt, an dem ein Sättigungsniveau erreicht ist und eine weitere Addition

von Elektrolyt keine weiteren Auswirkungen zeigt. In den von *Moritz* [99] durchgeführten Messungen liegt dieser Grenzwert bereits bei einer Ionenkonzentration von  $0,75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Kernresonanzspektroskopische Methoden bieten den Vorteil direkte Einblicke in Bewegungsabläufe auf der molekularen Ebene zu gewähren. Somit stellen die  $^{13}\text{C}$ -NMR Untersuchungen einen praktikablen Indikator hinsichtlich inter- bzw. intramolekularer Wechselwirkungen zwischen Polysaccharidketten in der EPS dar.

Betrachtet man die Resonanzsignale der Hydroxylkohlenstoffe (Abb. 5.18), so ist mit zunehmender Ionenstärke eine Verringerung der Halbwertsbreite und einhergehend eine Verbesserung der Auflösung des Spektrums zu beobachten. Durch die Referenzierung über das C-5 Mannuronatsignal lässt sich dieser Effekt quantitativ erfassen (Abb. 5.20). Im unteren Konzentrationsbereich ( $0,01 - 1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) fällt die relative Halbwertsbreite rapide ab und nimmt im oberen Bereich ( $1,5 - 2,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) wieder zu. Das deutet darauf hin, dass der Mechanismus, welcher für die Änderung der Linienbreite verantwortlich ist, auf isotroper Rotationsdiffusion der Alginatknäuel beruht. Zur eingehenderen Diskussion der Simulation der isotropen Rotationsdiffusion von Alginatmolekülen wird auf das nächste Unterkapitel (Kapitel 6.5.2) verwiesen.

Ferner zeigen die Messungen keine signifikante Abhängigkeit der Spin - Gitter Relaxationszeit  $T_1$  von der Ionenstärke der Lösung. Die longitudinale Relaxation wird maßgeblich bestimmt durch Molekülbewegungen im MHz - Regime, wie z.B. Librationen einzelner Hydroxylgruppen. Diese werden im Allgemeinen nicht bzw. nur unwesentlich durch die Anwesenheit von Anionen oder Kationen beeinflusst. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von *Kirschner* [99] an Modellsystemen wie Polyacrylsäure (PAS).

### 6.5.2. Bakteriellles Alginat

Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen bakteriellem Alginat und dem 1,1- Elektrolyten LiCl weisen deutliche Analogien zu den Ergebnissen bezüglich der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) auf. Nichts desto trotz erscheint der Grad der Wechselwir-

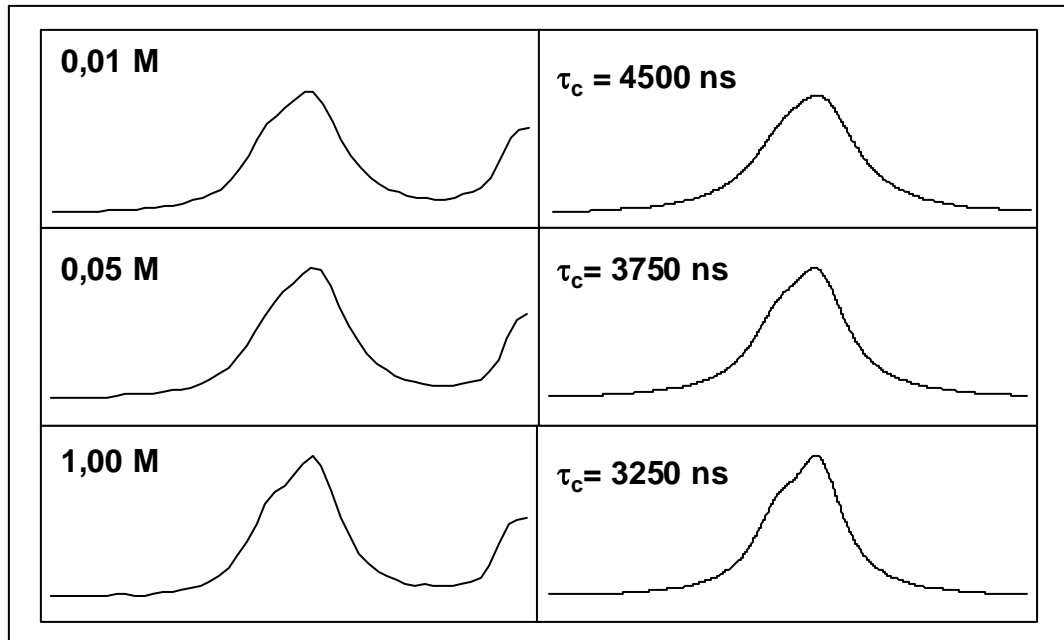
kungen bei dem reinen Isolat wesentlich ausgeprägter zu sein als es bei dem Mehrkomponentensystem, wie es die EPS darstellen, der Fall ist. Dies wird zum einen auf die wesentlich höhere Alginatkonzentration der Probelösungen, zum anderen auf Störeinflüsse durch Sekundärkomponenten (Proteine, LPS) zurückgeführt, wobei dem letzteren Faktor lediglich eine untergeordnete Rolle eingeräumt wird.

In Übereinstimmung mit den EPS- Proben ist auch bei den Alginatlösungen eine rasche Abnahme der Halbwertsbreite der Referenzresonanzlinie (Abb. 5.23) bei niedrigen Ionenstärken ( $c(\text{LiCl}) \leq 1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) zu verzeichnen. Beim Alginat ist der Effekt hingegen erheblich markanter: Die Linienbreite des C-5 Man Referenzsignals reduziert sich auf 81% (im Gegensatz zu 94% bei der EPS) der Breite der Lösung ohne Elektrolytzusatz. Bei weiterer Erhöhung der Ionenkonzentration nimmt dieser Wert leicht zu.

Um den oben beschriebenen Effekt näher zu charakterisieren wurde eine Linienformanalyse, unter Zuhilfenahme numerischer Simulationsmethoden [109, 110], vorgenommen. Es wurde dabei zugrunde gelegt, dass die Linienverbreiterung in protonenkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektren ausschließlich auf der Anisotropie der chemischen Verschiebung beruht [111]. Aus den Hochauflösungsspektren partiell abgebauten Alginats ist bekannt, dass sich das C-5 Mannuronatsignal aus zwei Resonanzlinien ( $\sigma_{\text{iso}(1)} = 79,1 \text{ ppm}$ ;  $\sigma_{\text{iso}(2)} = 79,8 \text{ ppm}$ ) zusammensetzt, welche entsprechend dem Verhältnis ihrer Flächenintegrale mit 70% und 30% gewichtet werden. Die Anisotropie des Tensors der chemischen Verschiebung wird durch die charakteristischen Verschiebungsparameter  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  und  $\sigma_{33}$  beschrieben. Da die Parameter für Mannuronat bzw. Guluronat nicht bestimmt sind, wurde für die Simulation auf die bekannten Literaturwerte für die inneren Kohlenstoffatome von Diammoniumtartrat  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  ( $\sigma_{11} = \sigma_{\text{iso}} + 13 \text{ ppm}$ ,  $\sigma_{22} = \sigma_{\text{iso}} + 7 \text{ ppm}$ ,  $\sigma_{33} = \sigma_{\text{iso}} - 20 \text{ ppm}$ ) [112] zurückgegriffen, welches von der Struktur und seinen funktionellen Gruppen dem C-5 Kohlenstoff des Mannuronats im Alginat gleicht. Der Gesamtwechselwirkungstensor  $\sigma_{(\text{total})}$  ergibt sich in Übereinstimmung mit den Festkörperspektren aus der gewichteten Summe der einzelnen Tensoren:  $\sigma_{(\text{total})} = 0,7 \sigma_{(1)} + 0,3 \sigma_{(2)}$ .

Aufgrund der symmetrischen Signalformen der experimentellen Spektren wird davon ausgegangen, dass innerhalb des Moleküls eine Bewegung vorliegt, die zu einer effizienten Mittelung des Anisotropietensors am C-5 Man Kohlenstoff führt. Folglich kann man in einfacher

Näherung davon ausgehen, dass die isotrope Rotationsdiffusion ein geeignetes Modell zur Beschreibung der Moleküldynamik darstellt. Im Rahmen der Untersuchungen wurden die

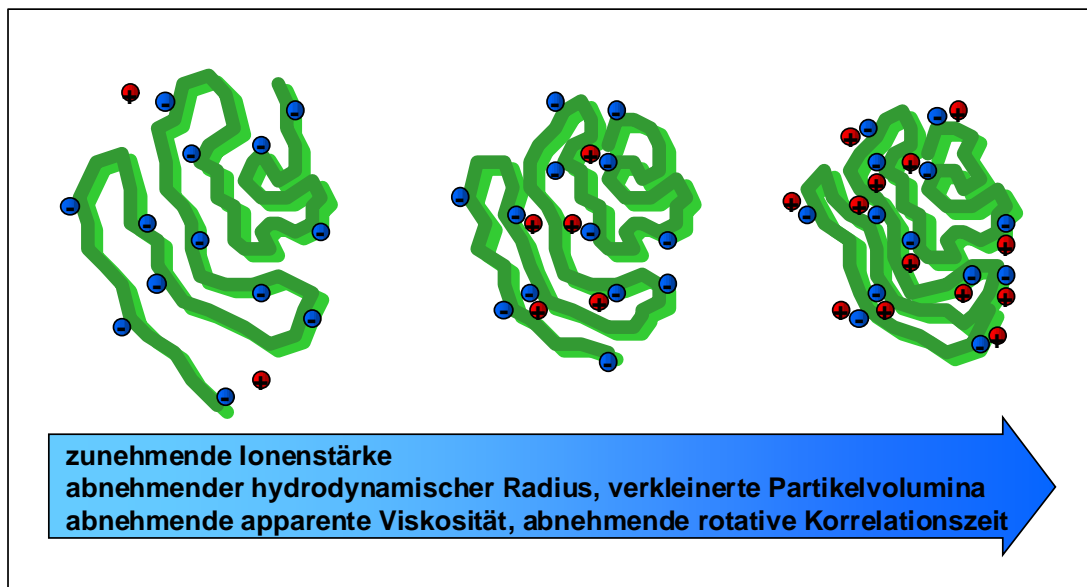


**Abb. 6.6:** Gegenüberstellung experimenteller Alginspektren ( $\text{Li}^+$  - Konzentrationsreihe, links) mit simulierten Spektren (isotrope Rotationsdiffusion, rechts) der C-5 Mannuronatresonanzlinie; Anisotropietensor der inneren Kohlenstoffe von Ammoniumtartrat:  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  ( $\sigma_{11} = \sigma_{\text{iso}} + 13\text{ppm}$ ,  $\sigma_{22} = \sigma_{\text{iso}} + 7\text{ppm}$ ,  $\sigma_{33} = \sigma_{\text{iso}} - 20\text{ppm}$ ); komplette Konzentrationsreihe ist dem Anhang zu entnehmen

Korrelationszeiten  $\tau_c$  in einem Zeitintervall von 4,5 - 3,25  $\mu\text{s}$  variiert und mit den entsprechenden experimentellen Spektren der Elektrolytkonzentrationsreihe verglichen. Wie aus der Gegenüberstellung der Spektren deutlich hervorgeht, steht die konzentrationsabhängige Änderung der Linienform im Zusammenhang mit der Modulation der rotativen Korrelation unter gleichzeitiger Abnahme der apparenten Viskosität. Die Erhöhung der rotativen Beweglichkeit des Alginatmoleküls in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung kann nur durch eine strukturelle Konformationsänderung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen erklärt werden. Wie in der Abbildung 6.7 dargestellt ist, überwiegen bei Lösungen mit niedrigen Elektrolytkonzentrationen die intramolekularen, elektrostatischen Abstoßungskräfte benachbarter Carboxylgruppen der Mannuronat- bzw. Guluronatreste. Die Wechselwirkungskräfte zwischen diesen negativ geladenen funktionellen Gruppen bewirken eine Streckung des



Makromoleküls und dadurch eine Erhöhung der apparenten Viskosität sowie eine Linienverbreiterung im NMR- Spektrum. Durch Addition eines Überschusses an Elektrolyt werden die wechselwirkenden Kräfte der negativ geladenen Carboxylgruppen partiell abgeschirmt, so dass die Alginatkette in zunehmendem Maße eine verknäuelte Struktur annehmen kann, was zur Folge hat, dass Viskosität und Linienbreite abnehmen. Weitere Elektrolytaddition kann zudem zu einer Agglomeration solcher Alginatknäuel und somit zu einem Viskositätsanstieg der gelösten Probe führen. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei den EPS- Lösungen beobachtet werden.



**Abb. 6.7:** Schematische Darstellung der Konformationsänderung eines Alginatmoleküls in Abhängigkeit von der  $\text{Li}^+$ -Ionenstärke; blau: Carboxylgruppen, rot:  $\text{Li}^+$ -Ionen

In Analogie zu den Beobachtungen bezüglich der  $T_1$ -Relaxation von EPS- Lösungen konnte auch für bakterielles Alginat keine Auswirkungen der Kation - Polyanion Wechselwirkungen auf die Librationen von Hydroxylkohlenstoffen des Polysaccharidgerüsts festgestellt werden.

## 6.6 Einfluss bi- und trivalenter Kationen

### 6.6.1 Einfluss von Magnesiumionen

Der Vergleich der Linienformen der Hydroxylgruppenresonanzen innerhalb der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationsreihe korrespondiert weitgehend mit den rheologischen Befunden. Bei niedrigen Ionenstärken bis zu  $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  sind keine wesentlichen Veränderungen im Verschiebungsbereich zwischen 85 - 65 ppm festzustellen (Abb. 5.25). Die relativen Signalintensitäten der Hydroxylkohlenstoffe werden als konstant angesehen, die Linienverbreiterung bezogen auf die C-5 Man Referenzresonanzlinie ist minimal ( $< 10 \text{ Hz}$ ).

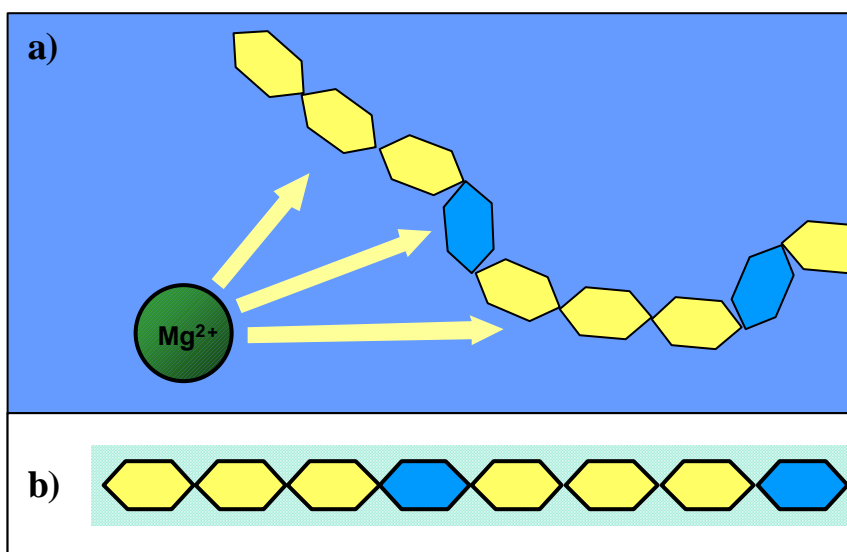
Wird die Elektrolytkonzentration hingegen weiter erhöht, so lässt sich hinsichtlich der makroskopischen Probeneigenschaften eine leichte Zunahme der Viskosität feststellen. Dies führt im  $^{13}\text{C}$ -NMR- Spektrum zu einer drastischen Linienverbreiterung der Referenzlinie um 36,2 Hz im Konzentrationsbereich zwischen  $2,0 - 3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Abb. 5.26). Bezogen auf die Alginatkonzentration der EPS- Lösung entspricht diese Ionenkonzentration nominell einem Verhältnis von 7 - 12 Monomereinheiten pro  $\text{Mg}^{2+}$ - Ion. Dieser Wert relativiert sich, wenn man berücksichtigt, dass sich hiervon nur eine bestimmte Anzahl in der unmittelbaren Nachbarschaft von den Carboxylgruppen der Mannuronat- bzw. Guluronatresten aufhalten und der übrige Anteil hydratisiert im Wasserkörper vorliegt. Eine exakte Beschreibung der Konzentrationsverhältnisse zwischen den Reaktanden und dem Komplex in Lösung kann nur auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes erfolgen. Für ein Komplexgleichgewicht zwischen bakteriellem Alginat, bivalenten Metallionen und dem Alginatkomplex gilt allgemein:

$$K = \frac{c(\text{Me}^{2+} - \text{Alginat})}{c(\text{Me}^{2+}) \cdot c(\text{Alginat})} \quad (6.1)$$

In Übereinstimmung mit literaturbekannten Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Alginat und  $\text{Mg}^{2+}$ - Ionen [103, 103, 113] wurde für die bakteriellen Alginat eine geringe Bindungstendenz festgestellt. Desweiteren ermöglichten kernresonanzspektroskopische Messungen Aussagen hinsichtlich der Selektivität bezüglich bestimmter Monomerbausteine. Im Falle des Magnesiumions gilt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als gesichert, dass dieses Ion keinerlei Präferenz hinsichtlich der Anbindung an bestimmte Monomerbausteine hat, d.h.

Magnesium bindet nicht-selektiv an die Carboxylatgruppen von Mannuronat- und Guluronatresten (s.Abb. 6.8).

Das bivalente Ion kann dabei als potentieller Verknüpfungspunkt zwischen benachbarten Polymerketten dienen, so dass die Polymerlösung bei Erreichen einer kritischen Ionenkonzentration in die Gelphase übergeht. Innerhalb dieses Gelnetzwerkes ist die Mobilität der Polysaccharidketten in der unmittelbaren Umgebung der Netzwerkpunkte stark eingeschränkt. Dies führt zur Abnahme der rotativen Korrelationszeit  $\tau_c$  und zu einer maßgeblichen Linienverbreiterung im Kohlenstoffspektrum.



**Abb. 6.8:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen  $Mg^{2+}$ -Ionen und bakteriellem Alginat: a)  $Mg^{2+}$  assoziiert nicht-selektiv mit den Carboxylgruppen der Mannuronat- (gelb) und Guluronatbausteine (blau) b)  $Mg^{2+}$ -Ionen bewirken eine schwache Hemmung der molekularen Beweglichkeit des gesamten Alginatmoleküls

Die  $T_1$ -Relaxation des C-5 Ringkohlenstoffs (Abb. 5.27) zeigt keinerlei Abhängigkeit von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration der Lösung und kann im Rahmen des experimentellen Fehlers als konstant angesehen werden. Schnelle dynamische Prozesse (im MHz-Bereich) innerhalb des Polysaccharids sind folglich nicht von der Wechselwirkung mit  $Mg^{2+}$ -Ionen betroffen.

## 6.6.2 Einfluss von Calciumionen

Im Rahmen der Polysaccharidchemie stellen die Wechselwirkungen zwischen Calciumionen und Alginatmolekülen einen intensiv untersuchten Bereich der Forschung dar. Eine Vielzahl von Publikationen befasst sich mit der Bindungskapazität und der Rheologie von Alginaten [113 - 118] gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen.

Kernresonanzspektroskopische Messungen und moleküldynamische Simulationen [119, 120] bestätigen die Präferenz von Calciumionen gegenüber GG- Monomerblöcken im Vergleich zu MM- Blöcken, wie es im Falle der Dimer- Komplexe nachgewiesen werden konnte.

Die Addition von  $\text{CaCl}_2$  führt bereits in Spurenkonzentrationen ( $\leq 0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) zu einem raschen Anstieg der Viskosität  $\eta_{app}$  der resuspendierten EPS- Proben. Bei weiterer Erhöhung der Calciumionenkonzentration kommt es schließlich zum Phasenübergang in den Gelzustand, d.h. es liegen genügend  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen in der Lösung vor, um in Verbindung mit dem bakteriellen Alginat ein Gelnetzwerk auszubilden. Diese Schwellenkonzentration ist bei einer Ionenkonzentration von  $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  erreicht.

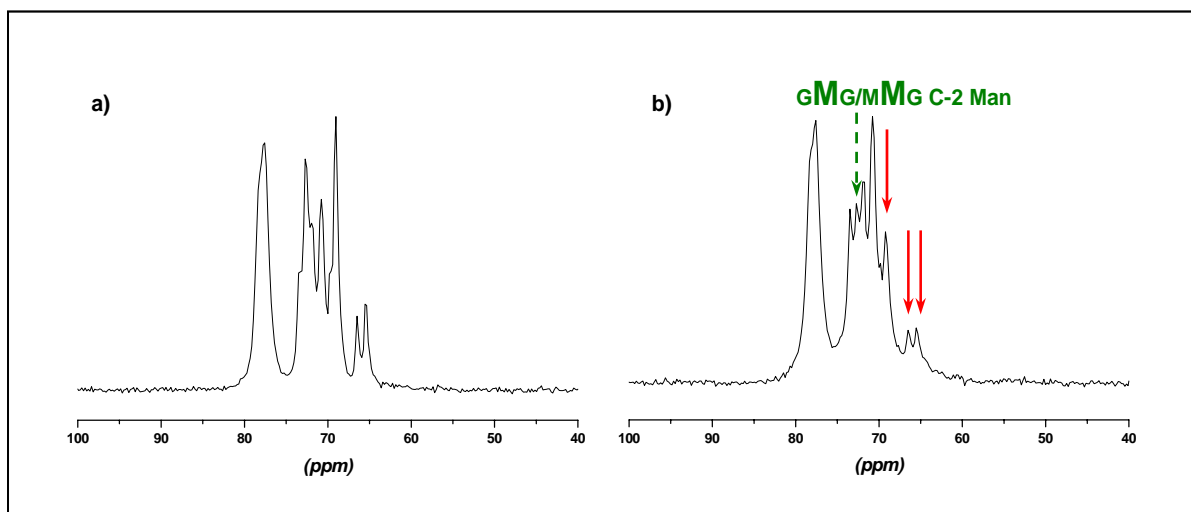
Der Anstieg und die Gelierung der Probe spiegeln sich in den Linienbreiten der C-5 Man Referenzlinie (s. Abb. 5.28) wider. Im Gegensatz zur  $\text{Mg}^{2+}$ - Konzentrationsreihe ist die Zunahme der Halbwertsbreite im Bereich bis  $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  wesentlich stärker ausgeprägt und beträgt 13,9 % bezogen auf die undotierte EPS- Probe gegenüber nur 6,6% bei Magnesium. Dies verdeutlicht, dass  $\text{Ca}^{2+}$  als Gegenion zu den Carboxylatgruppen des Alginats stärkere ionische Wechselwirkungen eingeht und daraus resultierend die Moleküldynamik merklich herabsetzt.

Im Bereich des Phasenübergangs zur Gelphase ( $\approx 2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ ) tritt ein abrupter Anstieg der Halbwertsbreite der C-5 Mannuronatlinie auf. Die Ausbildung eines Gelnetzwerkes stellt somit eine besonders starke Restriktion in der Beweglichkeit des Polysaccharids dar. Die Ursachen hierfür liegen sowohl in einer direkten Hinderung der Reorientierung von Monomerbausteinen durch die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes in der unmittelbaren Nachbarschaft zu Verknüpfungsstellen, als auch in der selektiven Anbindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an MG- Sequenzen des Makromoleküls.

Die scheinbare Abnahme der C-5 Man Halbwertsbreite bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration von  $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  beruht auf einem Artefakt der Dekonvolution des C-5 Mannuronatsignals. Letz-

teres setzt sich wie in 6.5.1 besprochen aus zwei Resonanzlinien (79,1 u. 79,8 ppm) der **MM**- und **MG**- Diadensequenzen zusammen, welche nicht voneinander separiert werden können. Bei der Dotierung mit Calciumionen erfährt dabei das Signal der **MG**- Diade eine stärkere Linienverbreiterung als das der **MM**- Diade, was zur Folge hat, dass die Amplitude der **MG**- Resonanzlinie stark abnimmt, wohingegen die **MM**- Signalamplitude nahezu unverändert bleibt. Mit zunehmender Linienverbreiterung wird ein Punkt erreicht, bei dem sich nun die **MG**- Signalamplitude so weit verringert hat, dass sie nunmehr unterhalb der halben Signalthöhe der **MM**- Resonanzlinie liegt. Somit leistet das C-5 **MG**- Signal keinen Beitrag mehr zur experimentell bestimmten Halbwertsbreite.

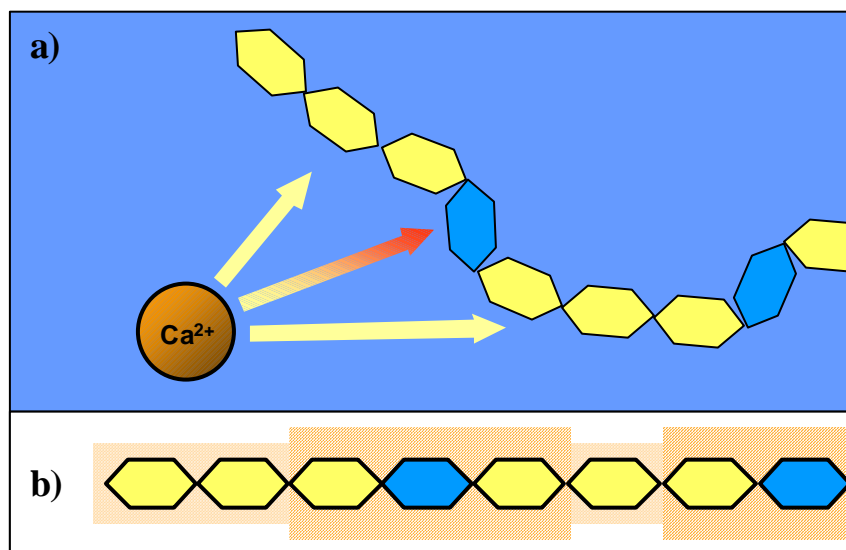
Desweiteren erlauben die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der EPS- Lösungen Rückschlüsse hinsichtlich der Selektivität der Wechselwirkung zwischen den Carboxylgruppen des Alginats und Calcium als bivalentes Gegenion. Zum besseren Verständnis wurden die NMR- Spektren einer undotierten EPS- Lösung und einer  $\text{Ca}^{2+}$ - dotierten Probe gegenübergestellt (Abb. 6.9). Ginge



**Abb. 6.9:** Vergleich der Hydroxylgruppenresonanzen einer a) undotierten EPS- Lösung ( $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und b) EPS- Lösung mit  $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ ; rote Pfeile: verbreiterte Guluronatlinien; grüner Pfeil: verbreiterte Resonanzlinie des C-2 Man Kohlenstoffs der GMG/MMG- Triade

man, wie im Falle des Magnesiumions, davon aus, dass eine rein statistische Anbindung des Gegenions an das Polyanion vorläge, so sollten alle Resonanzlinien gleichermaßen von der Linienverbreiterung betroffen sein und das Verhältnis der Signalintensitäten zueinander bliebe konstant. Dies ist jedoch, wie der Gegenüberstellung der Spektren zu entnehmen ist,

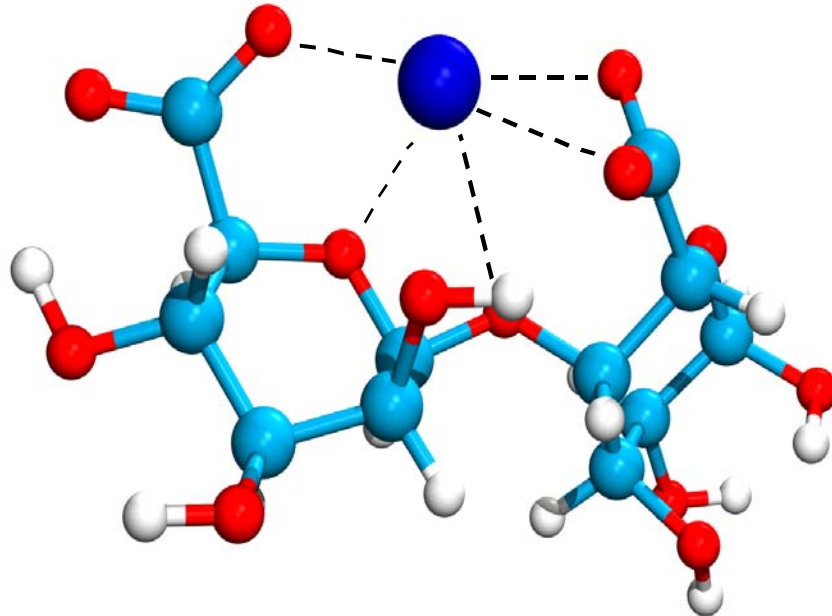
nicht der Fall. Die Addition von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirkt eine verstärkte Verbreiterung der Guluronatresonanzlinien. So erscheinen die Signalintensitäten der Linien der C-5, C-3 und C-2 Guluronatkohlenstoffe gegenüber denen der anderen Resonanzlinien stark herabgesetzt. Ein ähnlich starker Abfall der Intensität ist auch bei der C-2 Resonanzlinie der GMG/MMG-Triadensequenz zu beobachten. Andere Mannuronatsignale hingegen werden in einem wesentlich geringeren Maße verbreitert und deren Intensitätsverhältnisse bleiben innerhalb der Konzentrationsreihe konstant. Diese Indizien legen den Schluss nahe, dass Calciumionen



**Abb. 6.10:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und bakteriellem Alginat: a)  $\text{Ca}^{2+}$  assoziiert bevorzugt mit den Carboxylgruppen der Guluronatbausteine (blau) b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirken eine starke Hemmung der molekularen Beweglichkeit des gesamten Alginatmoleküls, insbesondere aber in der direkten Nachbarschaft von Guluronatmonomerbausteinen (breite Schraffur)

eine selektive Präferenz gegenüber der Anbindung an alternierende GMG- Kettensegmente haben. Die experimentellen Befunde deuten darauf hin, dass es in diesen Abschnitten innerhalb der Alginatkette zu einer verstärkten Hinderung der Molekülbewegung kommt, was zu einer erheblichen Verbreiterung der betroffenen Resonanzlinien führt (s. Abb. 6.10). Die Auswirkungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dotierung sind bereits bei geringfügigen Ionenstärken ( $\leq 0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) weit unterhalb des Gelierungspunktes sichtbar. Die Moleküldynamik wird demzufolge in zwei Stufen gehindert: Unterhalb des Gelpunktes sind im Polysaccharid die MG-Gruppen mit gebundenen Calciumionen in ihrer die Konformation "eingefroren", d.h. die "crankshaft motion" ist stark gehindert. Oberhalb dieses Punktes wird die molekulare Beweglichkeit zusätzlich durch die dynamischen Restriktionen eines Gelnetzwerks gehemmt.

Auf Basis dieser Ergebnisse sowie der Erkenntnisse aus den Untersuchungen zu den Effekten paramagnetischer Ionen wurden *ab initio* Rechnungen an einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Man - Gul - Dimerkomplex durchgeführt [121]. Die Berechnungen liefern ein Abbild einer der möglichen Konformationen eines solchen Komplexes, wie er auch lokal innerhalb des Makromoleküls auf-



**Abb. 6.11:** Darstellung einer möglichen Konformation eines Ca - Man - Gul Dimerkomplexes (nach Kolster [118]); das  $\text{Ca}^{2+}$ - Ion ist fünffach koordiniert

tritt. In der Simulation ist das  $\text{Ca}^{2+}$ - Ion fünffach von Sauerstoffatomen des Man - Gul-Dimers koordiniert, d.h. man kann von einer chelat-ähnlichen Komplexierung des Kations ausgehen. Überträgt man dies auf die Gesamtheit des Alginatmoleküls so bedeutet das, dass sich die alternierenden MG- Sequenzen innerhalb des Makromoleküls besonders für eine koordinative Bindung mit bivalenten Ionen eignen. In Analogie zu den GG- "Taschen" beim "Egg-box"- Modell könnte man demzufolge von MG- "Taschen" sprechen, in die Kationen eingelagert werden. Ist ein Calciumion in einer dieser "Taschen" koordinativ gebunden, so kann diese als ein potentieller Verknüpfungspunkt für intra- oder intermolekulare Verbrückungen mit anderen MG- Sequenzen in ihrer unmittelbaren Umgebung fungieren.

Für ein besseres Verständnis der exakten Konformation des Komplexes wären moleküldynamische Berechnungen der Komplexstruktur des Dimerkomplexes oder größerer Oligomere in

wässrigem Medium erforderlich. Diese liegen jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Das gelierte Bakterienalginat unterscheidet sich hinsichtlich seiner Stabilität wesentlich von den kommerziellen Alginatgelen. Im Gegensatz zu Manugel ist das Gel aus dem Isolat von *P. aeruginosa* nicht stabil hinsichtlich der Verdünnung mit Wasser; das Gel löst sich nach kurzer Zeit wieder auf, auch ohne äußere mechanische Einflüsse (z.B. Scherkräfte durch das Rühren).

Eine vollständige Regenerierung der EPS- Lösungen von  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen wurde mit Hilfe eines Kationenaustauschers (DOWEX) durchgeführt. Den korrespondierenden  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren kann man entnehmen, dass das in GMG/MMG- Sequenzen gebundene Calciumion nahezu vollständig vom Austauscherharz komplexiert wird. Die Intensitätsverhältnisse der Resonanzsignale von undotierter und regenerierter EPS sind identisch, d.h. Calcium liegt lediglich in nicht nachweisbaren Konzentrationen im Alginat vor. Dennoch ist eine leichte Verbreiterung der Resonanzlinien der zurückgewonnenen EPS zu beobachten. Es wird angenommen, dass die Linienverbreiterung auf einer Aufkonzentration während der Dialyse beruht. Niedermolekulare Bestandteile der EPS passieren die Dialysemembran, so dass der Massenanteil an hochmolekularen Polymeren im Dialysat steigt. Demzufolge ist bei der Resolvatisierung der regenerierten EPS der Anteil hochmolekularer Matrix- Komponenten größer als bei der ursprünglichen EPS.

Die Reversibilität der Gelbildung durch Verdünnung oder konkurrierende Komplexierung von Calciumionen mittels eines Kationenaustauschers belegt ferner, dass es sich bei den Alginatgelen um Gelnetzwerke mit fluktuierenden Netzwerkpunkten handelt.

### 6.6.3 Einfluss von Aluminiumionen

Die Wechselwirkungen zwischen Alginat und Aluminiumionen wurden aufgrund der amphoteren Eigenschaften dieses Ions bei unterschiedlichen pH- Werten untersucht. Dabei wurden zwei Messreihen im schwach sauren (pH = 4,0) und im Neutralbereich (pH = 7,0) durchgeführt. Von Messungen unter alkalischen Bedingungen wurde abgesehen, da Alu-



minium hier als  $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$  vorliegt und somit als Gegenion zu den Carboxylatgruppen ausscheidet.

Die  $^{13}\text{C}$ - NMR Spektren beider Messreihen weisen im untersuchten Konzentrationsbereich keine Anhaltspunkte für Wechselwirkungen zwischen Aluminiumionen und bakteriellem Alginat auf. Die Linienformen der Hydroxylgruppenresonanzen sind sowohl bei pH 4,0 als auch bei pH 7,0 unverändert und die Halbwertsbreiten des C-5 Man Referenzresonanzsignals sind im Rahmen der Messtoleranzen ebenfalls als identisch zu betrachten.

Aufgrund der experimentellen Befunde ist davon auszugehen, dass Aluminiumionen keinerlei Einfluss auf die Struktur des Alginats ausüben. Es wurden weder Hinweise hinsichtlich einer koordinativen Bindung an Carboxylat- und Hydroxylgruppen der MG- Sequenzen ähnlich der von bivalenten Ionen (insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen) an Alginat gefunden, noch konnte eine Reduktion intramolekularer ionischer Abstoßungskräfte wie im Falle der monovalenten Ionen beobachtet werden.

Eine mögliche Ursache für das Fehlen von Wechselwirkungen zwischen bakteriellem Alginat und Aluminiumionen in dem untersuchten Konzentrations- und pH- Bereich ist in deren spezifischen Eigenschaften zu suchen. Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte muss das Aluminiumion als ein "hartes" Ion, eingestuft werden. Als solches besitzt es eine wesentlich größere Hydrathülle als die Alkali- bzw. Erdalkalimetallionen der 3. Periode. Es liegt daher nahe, dass aufgrund der Abschirmung durch die Hydrathülle, welche elektostatischer und sterischer Natur ist, eine direkte Wechselwirkung mit den Carboxylatgruppen verhindert wird. Es ist ferner anzumerken, dass bei niedrigen pH- Werten, bei denen eine Wechselwirkung aus Sicht des Kations günstig wäre, der geringere Deprotonierungsgrad des Alginats dieser positiven Tendenz entgegensteht.

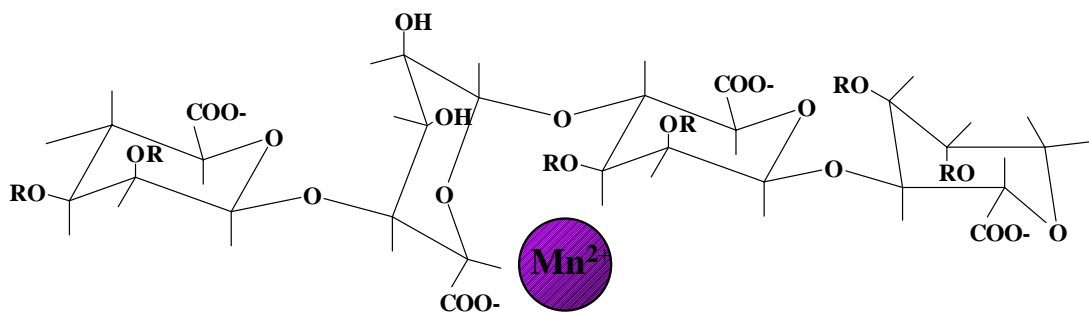
Dieses Ergebnis steht scheinbar im Gegensatz zu den experimentellen Befunden von *Gregor et al.* [115], welche für Aluminiumionen ähnlich starke Wechselwirkungen mit Alginat feststellten wie bei Calciumionen. Die Untersuchungen von *Gregor et al.* beziehen sich auf die Interaktion der Ionen mit Algalginat. Bakteriell Alginat von *Pseudomonas aeruginosa* hingegen unterscheidet sich sowohl in der Sequenz der Monomerbausteine, als auch durch die Acetylierung der C-2 bzw. C-3 Kohlenstoffe der Mannuronatgruppen. Es kann daher davon

ausgegangen werden, dass die strukturellen Besonderheiten des Bakterienalginats das Bindungsverhalten von Aluminiumionen negativ beeinflusst.

## 6.7 Effekt paramagnetischer Ionen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Einfluss von ionischen Additiven hinsichtlich inter- bzw. intramolekularen Wechselwirkungen mit bakteriellem Alginat und deren Auswirkungen auf dessen molekulare Beweglichkeit diskutiert. Die lokale Konformation der MG- Verknüpfungstellen hingegen ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Mit Hilfe des paramagnetischen Mangan-II-Ions soll die unmittelbare lokale Geometrie der Wechselwirkungen zwischen Gegenion und Polysaccharid aufgeklärt werden.

Der Zusatz von paramagnetischen  $Mn^{2+}$ - Ionen zeigt bereits bei sehr geringen Konzentrationen ( $\leq 0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) einen sichtlichen Einfluss auf die Linienform der Hydroxylgruppenresonanzen der  $^{13}\text{C}$ - NMR Spektren. Von der Verbreiterung ist, analog zu den Ergebnissen der  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationsreihe, die Linie der C-5 Guluronatkohlenstoffe am stärksten betroffen. Ebenso weist der C-5 Kohlenstoff des Mannuronatmonomerbausteins eine rapide Linienverbreiterung mit zunehmender  $Mn^{2+}$ - Konzentration auf. Dies spricht dafür, dass die Kation - Polyanion Wechselwirkungen primär mit den Sauerstoffatomen der C-6 Carboxylatkohlenstoffe auftreten. Dadurch stehen die isotopenmarkierten C-5 Kohlenstoffe in nächster Nachbarschaft zum Manganion und sind vom paramagnetischen Effekt am stärksten betroffen. Des weiteren weisen die C-2 und C-3 Guluronatlinien ebenfalls eine Linienverbreiterung



**Abb. 6.12:** Schematische Darstellung der Lokalisierung des  $Mn^{2+}$ - Ions innerhalb der Alginatkette

mit steigender  $Mn^{2+}$ -Konzentration auf, wobei der Effekt nicht so stark ausgeprägt ist, wie bei den C-5 Kohlenstoffen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Hydroxylsauerstoffe an der C-2 bzw. C-3 Position zumindest partiell über elektrostatische Anziehungskräfte mit dem  $Mn^{2+}$ -Ion in Wechselwirkung treten.

Im Gegensatz dazu kann festgestellt werden, dass die experimentellen Ergebnisse der NMR-Spektroskopie keinerlei Anzeichen für elektrostatische Wechselwirkungen zwischen  $Mn^{2+}$  und den Hydroxylgruppen der C-2 und C-3 Kohlenstoffe der Mannuronatbausteine aufweisen. Dieser Umstand wird auf die Anwesenheit von Acetylgruppen an den O-2 und/oder O-3 Sauerstoffen der Mannuronatreste zurückgeführt.

Es ist bekannt, dass der Acetylierungsgrad der Polyuronsäuren einen entscheidenden Parameter für die Bindungskapazität und -selektivität gegenüber mono- und bivalenten Kationen darstellt [69 - 71, 122, 123]. Darüber hinaus führt die Acetylierung zu einer Erhöhung der Hydrophobizität der Alginat, was sich in einem reduzierten Quellungsverhalten der Polymere äußert [69]. In Bezug auf die Assoziation von  $Mn^{2+}$ -Ionen bedeutet dies, dass aufgrund der sterischen Hinderung durch die Acetylgruppen der paramagnetische Effekt sich nicht oder nur in geringem Maße auf die C-2 und C-3 Mannuronatkohlenstoffe auswirkt und diese kaum von der Linienverbreiterung betroffen sind.

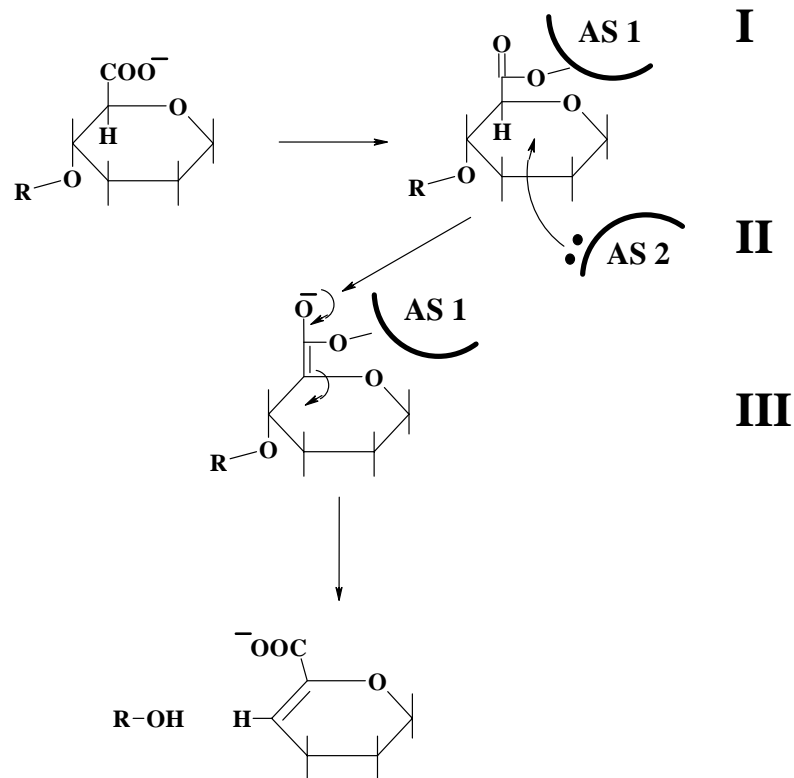
Zusammenfassend kann man sagen, dass die Dotierung mit paramagnetischen  $Mn^{2+}$ -Ionen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis und zur Lokalisierung von  $Me^{2+}$ -Alginat Wechselwirkungen geleistet hat. Inwieweit diese Erkenntnisse auch auf die Wechselwirkungen mit  $Ca^{2+}$ -Ionen übertragbar sind ist noch unklar, allerdings lassen die Ergebnisse hinsichtlich der Änderung der molekularen Beweglichkeit bei  $Ca^{2+}$ -Dotierung deutliche Parallelen erkennen.

## 6.8 Stressreaktionen in Biofilmen

Die physikalischen Eigenschaften von Biofilmen werden, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, maßgeblich von den Wechselwirkungen der organischen Polymermatrix des Biofilms mit ionischen Additiven beeinflusst. Diese Einflüsse können in der Regel als externe Einflüsse betrachtet werden (Wasserhärte, Salzgehalt von Gewässern etc.). Beschäftigt man sich jedoch näher mit der Rheologie von Biofilmen, so dürfen auch die internen Faktoren nicht vernachlässigt werden (z.B. enzymatischer Abbau durch Alginatlyase). Diese Effekte, die hier unter dem Stichwort "Stressphänomene" zusammengefasst werden sollen, spielen gerade in den unterschiedlichen Wachstumsphasen des Biofilms eine bedeutende Rolle.

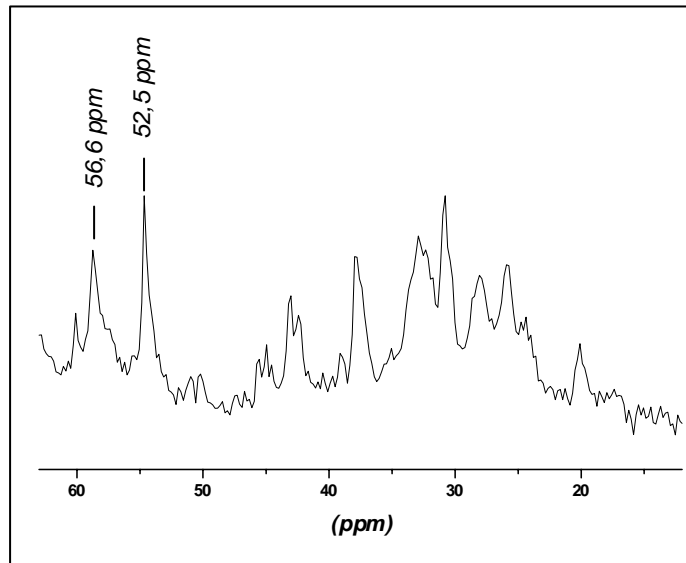
Im Rahmen der Messungen an hermetisch eingeschlossenen Proben (Nährstoff- und Sauerstoffarmut) konnte die Änderung zweier wesentlicher Merkmale innerhalb der NMR-Spektren des Biofilms festgestellt werden: Zum Einen eine deutliche Abnahme der Linienbreiten der Resonanzsignale über den Verlauf der Messungen, zum Anderen das Auftreten neuer Resonanzlinien im Spektrum.

Die verbesserte Auflösung des Spektrums aufgrund der allgemeinen Abnahme der Linienbreite deutet auf eine Herabsetzung der Probenviskosität hin. Wie aus der Abbildung 5.35 deutlich hervorgeht, nimmt die Linienbreite der C-5 Referenzresonanzlinie des Biofilms innerhalb der ersten 30 Tage stetig ab. Bezogen auf die Halbwertsbreite zu Versuchsbeginn beträgt die Linienbreitenabnahme nach 48 h bereits 5,3% und bei Versuchsende sogar 17,8%. Der Abfall scheint in erster Näherung exponentieller Natur zu sein und einem Grenzwert zuzustreben. Dies kann als Anzeichen dafür gewertet werden, dass es innerhalb des Biofilms vermehrt zu einem partiellen Abbau des polymeren Materials, d.h. vorwiegend des Alginats, durch Lyase-induzierte Abbaureaktionen (s. Abb. 6.13) kommt. Derartige Zersetzungsreaktionen treten anscheinend verstärkt direkt nach der Umstellung von nähr- bzw. sauerstoffreichen zu entsprechend „ungünstigen“ Lebensbedingungen auf und können daher als „Stressreaktion“ des Bakteriums auf die veränderten äußeren Bedingungen gewertet werden [105].



**Abb. 6.13:** Enzymatischer Abbau von Alginat nach *Gacesa* [124]; I: Kompensation der negativen Ladung des Carboxylatanions, II: basen-katalysierte Abstraktion des Protons am C-5 Kohlenstoffatom, III:  $\beta$ -Eliminierung der 4-O- glycosidischen Bindung; AS 1 bzw. AS 2 = Aminosäuregruppen der Lyase, R = Uronsäurerest, aus Gründen der besseren Übersicht wurden die Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 sowie die glycosidische Bindung an C-1 nicht mit abgebildet

Wie den Übersichtsspektren (Abb. 5.36) zu entnehmen ist, finden die markantesten Veränderungen der EPS- Matrix innerhalb der ersten 48 h nach der Probenahme statt. Man erkennt deutlich die neu hinzugekommenen Resonanzlinien im Bereich der Methylen- und Methin- gruppen sowie die Resonanzlinien bei 84,2 und 88,4 ppm. Vergleichsweise schwach in ihrer Signalintensität sind die Linien der C=C – Resonanzen im Bereich zwischen 115 - 135 ppm. Letztere erfahren auch in den späteren Phasen des Versuchs keinen merklichen Zuwachs. Im Resonanzbereich zwischen 35 - 57 ppm hingegen ist sogar 25 Tage nach der Entnahme des Biofilms noch eine geringe Signalzunahme zu beobachten (s. Abb. 6.14).



**Abb. 6.14:** Ausschnitt der Methin- u. Methylenkohlenstoffresonanzen eines 25 d alten Biofilms

Eine Charakterisierung dieser Signale konnte aufgrund der geringen Signalintensitäten und der schlechten Auflösung der Signale im Methylengruppenbereich (Abb. 6.14) nicht vorgenommen werden. Es wird jedoch angenommen, dass es sich hierbei um Spaltprodukte aus dem Alginatabbau oder um andere Metaboliten von *P. aeruginosa* handelt. Der Vergleich mit dem mit *Klebsiella aerogenes* Lyase vollständig abgebauten Biofilm (Abb. 5.40) unterstreicht diese These, da es sich bei beiden Lyasen um nichtselektive Alginatlyasen handelt und keine neuen Abbauprodukte neben den bereits vorhandenen Resonanzsignalen nachgewiesen werden konnten.

Der Einzelkolonieausstrich des  $^{13}\text{C}$ -markierten Biofilms nach Abschluss der Versuchsreihe hat das selbe Wachstum und Färbung wie der Phänotyp. Dies kann als ein Anzeichen gewertet werden, dass keine Revertierung der Bakterien in größerem Maßstab stattgefunden hat. Es ist anzumerken, dass der Einzelkolonieausstrich lediglich qualitative Informationen widerspiegelt, da keine vergleichende Zelldichteprüfung vor und nach dem Dauerversuch vorliegt.

Die eindeutige Differenzierung zwischen Stress-induzierten Reaktionen und normalen Wachstums- oder Alterungsprozessen des Biofilms allein auf der Basis der vorliegenden NMR- spektroskopischen Untersuchungen erweist sich als schwierig. Aufgrund des Versuchsaufbaus kommt es zwangsläufig zu einer Überlagerung beider Effekte. Weiterführende Messungen, bei denen Biofilme von *P. aeruginosa* SG81 über einen ausgedehnten Zeitraum

bebrütet und dann direkt nach Entnahme vermessen werden, könnten hier als Referenz dienen.