



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG

Institut für Bioverfahrenstechnik
Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Diplom-Biotechnologin

Einfluss von Stofftransportphänomenen auf zelldichteabhängige Kommunikationsmechanismen (Quorum Sensing) in mikrobiellen Biofilmen

vorgelegt von
Katrin Bierkandt

Studiengang:	Biotechnologie
Matrikelnr.:	2655727
Referent:	apl. Prof. Dr. Rainer Krull
Koreferent:	Prof. Dr. Dieter Jahn
Betreuer:	Dipl.-Ing. Roland B. Möhle
Beginn der Arbeit:	15.01.2006
Abgabe der Arbeit:	14.07.2006

Braunschweig, den 14.07.2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel für die Themenstellung bedanken.

Ich danke apl. Prof. Dr. Rainer Krull und Prof. Dr. Dieter Jahn für die Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. Roland Möhle für die Betreuung der Arbeit. Er stand mir immer mit zahlreichen Ratschlägen und tatkräftiger Unterstützung zur Seite.

Ebenfalls möchte ich mich bei Marian Haesner für die Hilfe bei den CLSM-Aufnahmen, bei Michael Dreger für die stets konstruktiven Diskussionen und bei Katrin Zapf für die unterhaltsamen Stunden im Labor bedanken.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Diese Arbeit möchte ich meinem Mann Jens und meinem Sohn Linus widmen, die mit ihrer Lebensfreude das Leben einfach schöner machen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Grundlagen	7
2.1 Natürliche Biofilme.....	7
2.1.1 Vorkommen und Wachstum von Biofilmen.....	7
2.1.2 Zusammensetzung von Biofilmen und der EPS.....	10
2.2 Quorum Sensing.....	11
2.2.1 Quorum Sensing Systeme in Bakterien.....	11
2.2.2 Einfluss von Quorum Sensing auf Biofilme.....	17
2.2.3 Das Quorum Sensing System von <i>Vibrio fischeri</i>	20
2.2.3.1 Lichtproduktion und ihre genetische Regulierung über Quorum Sensing.....	20
2.3 Stofftransport von Quorum Sensing-Molekülen in Biofilmen.....	23
2.3.1 Verteilung der Signalmoleküle im Biofilm.....	23
2.3.2 Hydrodynamischer Einfluss auf den Stofftransport.....	25
2.4 Modellierung von Biofilmen.....	27
2.4.1 Modellvorstellungen biologischer Filme.....	27
2.4.2 Mathematische Biofilmmodelle.....	29
2.4.3 Mathematische Modellierung mit AQUASIM.....	32
2.4.3.1 Grundlagen des Biofilmmodells von AQUASIM.....	32
2.5 Künstliche Biofilme.....	35

2.5.1	Polymernetzwerke und Gele.....	36
2.5.2	Die Auswahl der Gele.....	36
2.5.2.1	Alginate.....	37
2.5.2.2	Chitosan.....	38
2.5.2.3	Agarose.....	38
3.	Material und Methoden.....	40
3.1	Ausgangsmaterialien.....	40
3.1.1	Chemikalien.....	40
3.1.2	Lösungen und Puffer.....	41
3.1.3	Farbstoffe.....	41
3.1.4	Geräte.....	42
3.1.5	weitere Materialien.....	43
3.1.6	Bakterienstamm.....	43
3.1.7	<i>Vibrio fischeri</i> -Medien.....	43
3.2	Angewandte Methoden.....	44
3.2.1	Kultivierungsbedingungen für <i>Vibrio fischeri</i>	44
3.2.2	Validierung der Modellparameter mit Versuchen im Erlenmeyerkolben.....	44
3.2.2.1	Messung der Leuchtaktivität.....	44
3.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	46
3.2.2.3	Ermittlung des Substratverbrauchs.....	46
3.2.2.4	Einfluss von Signal-Molekülen auf die Lichtemission.....	47
3.2.3	Herstellung einer Alginatelösung.....	48
3.2.4	Herstellung einer Chitosanlösung.....	49

3.2.5 Herstellung einer Agaroselösung.....	49
3.2.6 Ermittlung des Einflusses von Hitze auf die Lichtemission.....	50
3.2.7 Mikroskopische Untersuchung des künstlichen Biofilms.....	50
3.2.7.1 Anfertigung von Kryoschnitten für die Durchlichtmikroskopie.....	51
3.2.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	51
3.2.8 Gravimetrische Zelltrockenmassebestimmung.....	52
3.2.9 Mikroelektrodenmessung.....	53
3.2.10 Modellparameter.....	53
3.2.11 Lichtemissionsmessungen des künstlichen Biofilms im Rohrreaktor.....	58
4. Ergebnisse und Diskussion.....	60
4.1 Kultivierung der Leuchtbakterien im Batchverfahren zur Validierung der Parameter.....	60
4.1.1 Batchkultivierung und Leuchtaktivitätsmessung.....	60
4.1.1.1 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate.....	69
4.1.1.2 Bestimmung der Signalmolekül-Schwellkonzentration.....	70
4.2 Simulation der Signalmolekülproduktion im Schüttelkolben.....	72
4.3 Entwicklung einer Methodik zur Herstellung eines künstlichen Biofilms.....	77
4.3.1 Herstellung eines künstlichen Biofilms aus Alginate und Chitosan.....	77
4.3.2 Herstellung des künstlichen Biofilms aus Agarose.....	80
4.3.2.1 Charakterisierung des künstlichen Biofilms.....	84
4.3.2.2 Verlust an Leuchtaktivität durch Hitzeschock bei der Immobilisierung.....	87
4.3.2.3 Herstellung eines künstlichen Biofilms mit heterogener Oberflächenstruktur..	88
4.4 Mikroelektrodenmessung.....	94
4.4.1 Bestimmung von Sauerstoffprofilen und Grenzschichtdicken.....	94

4.4.1.1 Validierung der Grenzschichtdicken für das mathematische Biofilmmodell.....	96
4.4.2 Sauerstoffprofile im heterogenen Biofilm.....	98
4.5 Simulation des Stofftransports im künstlichen Biofilm.....	100
4.6 Lichtemissionsmessung am Rohrreaktor.....	103
5. Zusammenfassung.....	107
6. Symbolverzeichnis.....	110
7. Literaturverzeichnis.....	112
8. Erklärung.....	120

1. Einleitung

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass Biofilme Lebensgemeinschaften verschiedenster Arten von Mikroorganismen sind, die sich an nahezu allen Oberflächen ansiedeln können. Eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) schützt sie dabei vor vielen widrigen Umwelteinflüssen. Erst seit wenigen Jahren wird jedoch deutlich, dass auch Kommunikationsprozesse zwischen Bakterien, das sogenannte Quorum Sensing, eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Biofilmen spielen können. Dabei werden hochdiffusible Signalmoleküle zur Bestimmung der Zelldichte genutzt, woraufhin verschiedenste Prozesse wie Biofilmwachstum und -ausbreitung oder Pathogenität genetisch reguliert werden können.

Der Stofftransport der Signalmoleküle innerhalb des Biofilms hängt häufig von vielen Faktoren wie EPS-Zusammensetzung, Struktur des Biofilms und hydrodynamischen Bedingungen ab. Aufgrund dieser unterschiedlichen Einflüsse ist es an natürlich gewachsenen Biofilmen schwierig herauszufinden, welche Wirkung allein die Strömungsbedingungen auf den Transport der Quorum Sensing-Moleküle und damit auf die Entwicklung der Biofilme hat. Zudem sind Laborversuche mit natürlichen Biofilmen häufig zeitintensiv, da die Biofilme erst über einen mehr oder weniger langen Zeitraum wachsen müssen, bevor sie untersucht werden können.

Eine alternative Untersuchungsmöglichkeit des Sachverhaltes bieten Modelle. Darin werden reale Systeme vereinfacht dargestellt, wobei versucht wird, nur die für die Untersuchung wesentlichen Charakteristika zu berücksichtigen. Bestimmte Eigenschaften eines realen Systems können dabei herausgegriffen und separat untersucht werden.

In dieser Arbeit soll ein mathematisches Modell entwickelt werden, das das Verhalten der Konzentration der Quorum Sensing-Moleküle bei veränderlichen Strömungsbedingungen vorhersagt. Für die Überprüfung der Vorhersagen soll zusätzlich ein künstlicher Biofilm geschaffen werden, der definierte und gut reproduzierbare Eigenschaften besitzt. Als Polymermatrix wird hierfür ein Gel verwendet, in welches die Zellen des marinen Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* eingebettet

1. Einleitung

werden sollen. Dieses Bakterium ist zwar kein natürlicher Biofilmbildner an fest-flüssig-Phasengrenzen, besitzt jedoch ein gut untersuchtes Quorum Sensing-reguliertes Lichtproduktionssystem. Die Emission des Lichts kann als Maß für die Aktivität des Quorum Sensing Systems genutzt werden. Eine Validierung der für das mathematische Modell notwendigen Parameter, wie die Produktionsrate der Signalmoleküle, erfolgt zunächst aus Batchversuchen mit *Vibrio fischeri*-Kulturen. In einem Rohrreaktorsystem soll anschließend der Einfluss der Strömungsbedingungen auf den Stofftransport der Signalmoleküle im künstlichen Biofilm untersucht werden.

2. Grundlagen

2.1 Natürliche Biofilme

Alle Oberflächen, biotische sowie abiotische, können durch Mikroorganismen besiedelt werden, sobald ausreichend Feuchtigkeit vorhanden ist. Dabei neigen Mikroorganismen dazu, sich in Gemeinschaften zusammen zu finden, um ihre Überlebenschance zu erhöhen. Meist betten sie sich hierbei in eine Matrix aus selbstproduzierten, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ein. Gemeinschaften dieser Art werden als Biofilme bezeichnet. Sie können Bakterien, Algen, Pilze und Protozoen enthalten, wobei zwischen den verschiedenen Mikroorganismen häufig enge Beziehungen symbiotischer oder parasitärer Natur bestehen.

2.1.1 Vorkommen und Wachstum von Biofilmen

Das Auftreten von Biofilmen betrifft den Menschen meist direkt oder indirekt, wobei es zu seinem Nutzen oder auch zu seinem Schaden sein kann. In der Umwelt kommen Biofilme vor allem in Gewässern als Belag auf Steinen, im Sediment oder als mikrobielle Flocken vor und tragen aufgrund ihrer vielfältigen Stoffwechselaktivitäten meist wesentlich zum gesunden Stoffhaushalt der Gewässer und des Bodens bei. In der Technik und Industrie können Biofilme sowohl vorteilhaft wie auch nachteilig sein. Hier helfen sie dem Menschen zum Beispiel bei der Abwasserreinigung als Belebtschlamm in Klärbecken, in Biofilmreaktoren zum Abbau giftiger und persistenter Substanzen und bei der Produktion von Essig und Sherry. Dagegen können sie zu erheblichen Schäden durch Korrosion von Materialien wie Rohrleitungen oder Schiffsrümpfen führen und diese durch starkes Wachstum verstopfen bzw. den Reibungswiderstand vergrößern. Auch Kontaminationen von Lebensmitteln und Flüssigkeiten zählen zu den negativen Auswirkungen des Biofilmwachstums. Vor allem im medizinischen Bereich bringen Biofilme Probleme mit

sich. Hier können sie durch ihr Vorhandensein auf künstlichen Implantaten wie Kathetern, Gelenken oder Linsen zu schweren Infektionen führen. Auch Karies oder chronische Wundinfektionen sind auf Biofilme zurückzuführen.

Die Mikroorganismen eines Biofilms ziehen meist viele Vorteile aus der gemeinschaftlichen Lebensweise gegenüber einer planktonischen. So können durch die Ausbildung symbiotischer Gemeinschaften schwer abbaubare oder schwer zugängliche Substrate durch die Zusammenarbeit der verschiedenen Spezies genutzt und ökologische Nischen geschaffen werden. Im Film selbst liegen häufig optimale räumliche und physiologische Bedingungen für einen horizontalen Gentransfer vor. Außerdem bietet der Biofilm den Mikroorganismen Schutz vor äußeren Einflüssen wie Salzbelastungen, pH-Extremen, hydrodynamischen Belastungen oder Bioziden. Vor allem diese Schutzmechanismen stellen bei der Behandlung von unerwünschten Biofilmen eine große Herausforderung dar. So sind in Biofilmen lebende Bakterien wesentlich resistenter gegen Antibiotika und andere antibakteriell wirkende Stoffe als planktonisch lebende Bakterien derselben Spezies, was gerade im medizinischen Bereich sehr kritisch ist.

Die Ausbildung von Biofilmen kann aufgrund komplexer Wechselwirkungen während der Entstehung bei den verschiedenen Mikroorganismen recht unterschiedlich verlaufen. Trotzdem kann der Entwicklungsprozess in verschiedene Stadien eingeteilt werden:

1. Es wird angenommen, dass der erste Schritt bei der Entstehung eines Biofilms meist die Adsorption von Makromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden und Huminstoffen, sowie hydrophoben Molekülen aus der wässrigen Phase an eine Oberfläche ist. Diese Moleküle werden zum Teil von den Mikroorganismen selbst produziert und bilden einen „conditioning film“, der teilweise die Ladung der Oberfläche ändert.
2. Die sich noch frei in der flüssigen Phase befindenden Mikroorganismen überwinden die Grenzschicht zwischen der flüssigen Phase und der Oberfläche und können über ihre Zelloberfläche mit den Molekülen des „conditioning film“ zunächst reversibel in Wechselwirkung treten. Dort bewegen sie sich teilweise noch aktiv oder über Brown'sche Molekularbewegung über die Oberfläche.

3. Kurze Zeit später heften sich die Zellen irreversibel über spezielle Zelloberflächenbestandteile an die Oberfläche an und bilden eine Schicht, an welche sich immer mehr Zellen aus der flüssigen Phase anlagern.
4. Durch Zellteilung, Bindung weiterer Zellen aus der flüssigen Phase und/oder durch aktive Bewegung mit Pili oder Flagellen entlang der Oberfläche bilden die Mikroorganismen Mikrokolonien, die bereits aus Symbiosen verschiedener Spezies bestehen können. Die Anheftung der Zellen erfolgt nun über Zell-Zell-Kontakte. Die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen beginnt.
5. Der Biofilm wächst in die Höhe und bildet seine spezifische Oberflächenbeschaffenheit aus.
6. Ab einem bestimmten Zeitpunkt erreicht der Biofilm eine stationäre Phase. In diesem Stadium herrscht ein Gleichgewichtszustand zwischen Zuwachsvorgängen durch Zellteilung und Zellanlagerung sowie Ablösevorgängen der Biomasse. Die Ablösung der Biomasse erfolgt dabei stoßweise in Biofilmfetzen („sloughing“), als kontinuierlicher Abtrag von Zellen durch die umspülende Flüssigkeitsphase („erosion“) oder aktiv durch Ausbildung von Schwärmerzellen, die die Polymere der Matrix teilweise auflösen und so zurück in die flüssige Phase gelangen können.

Die Höhe, Dichte und Struktur eines reifen Biofilms ist sehr variabel und von vielen Faktoren abhängig. Ob ein Biofilm flach und homogen oder stark strukturiert mit vielen Kanälen und Zelltürmen ist, wird vor allem durch Umgebungsfaktoren wie Strömungsbedingungen oder Nährstoffangebot bedingt. Die Zusammensetzung der extrazellulären polymeren Substanzen ist wiederum für die Sensitivität für diese Faktoren verantwortlich. Auch das Bewegungsvermögen der Mikroorganismen beeinflusst die Architektur eines Biofilms. Neueste Beobachtungen lassen vermuten, dass extrazelluläre DNA maßgeblich am strukturellen Aufbau einiger Biofilme beteiligt ist [1][2]. Weiterhin können Protozoen durch Abweiden des Biofilms diesen in seiner Höhe begrenzen und in seiner Oberflächenbeschaffenheit beeinflussen. Aber auch Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen spielen eine entscheidende Rolle. Allen voran liegt bei der derzeitigen Erforschung von Biofilmen ein Hauptaugenmerk auf dem sogenannten Quorum Sensing. Wie in Kapitel 2.2.2 noch ausführlich beschrieben, ist es neben der Beeinflussung der

Entwicklung eines Biofilms auch für die Ausbildung verschiedenster seiner Eigenschaften, wie zum Beispiel Pathogenität, verantwortlich.

2.1.2 Zusammensetzung von Biofilmen und der EPS

Biofilme setzen sich im Allgemeinen aus folgenden Bestandteilen zusammen: Wasser, extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), Mikroorganismen, sorbierte Substanzen und eingelagerte Partikel. Mit 50% bis 98% besteht der weitaus größte Teil eines Biofilms aus Wasser. Die extrazellulären polymeren Substanzen wiederum bilden mit 50 bis 90% der gesamten Biotrockenmasse den größten Anteil an organischen Bestandteilen [3][4]. Die Mikroorganismen, Partikel und sorbierten Substanzen sind in die EPS-Matrix eingebettet.

Die EPS werden von den Mikroorganismen produziert und ausgeschieden, bleiben jedoch im Unterschied zu den Bestandteilen mikrobieller Kapseln nicht an der Zelloberfläche haften. EPS sind organische Polymere und bestehen vor allem aus Polysacchariden, die sich aus sich wiederholenden Einheiten verschiedener Zucker wie Glukose, Galactose oder Mannose sowie aus Galacturon- und Glucuronsäuren zusammensetzen [5]. Neben diesen Polysacchariden kommen auch Proteine, Glycoproteine, Nukleinsäuren, Phospholipide und Lipide in der EPS vor [6]. Die genaue Zusammensetzung der EPS ist dabei speziesspezifisch. Es können jedoch teilweise auch unspezifische EPS produziert werden. Diese bestehen häufig aus einfachen Homopolysacchariden wie Dextran und Zellulose, oder Heteropolysacchariden wie Alginat und Xanthan [7].

All diese unterschiedlichen Makromoleküle werden über schwache nicht-kovalente Bindungen, zum Beispiel van-der-Waals-Kräfte oder elektrostatische Kräfte, zusammengehalten. Durch eine hohe Vernetzungsdichte können dabei in der Summe jedoch beachtlich hohe Bindungsstärken erreicht werden [8].

Die extrazellulären polymeren Substanzen sind entscheidend an der Ausprägung bestimmter Eigenschaften von Biofilmen beteiligt und tragen auf vielfältige Weise zum Schutz und zur Stabilisierung der Filme bei. Im Folgenden sind die Prozesse und Eigenschaften eines Biofilms, die durch die EPS beeinflusst werden, kurz zusammengefasst:

- Bildung einer Gel-Matrix zur Fixierung der Mikroorganismen, Anheftung des Biofilms an Grenzflächen und Bildung einer Diffusionsbarriere

- Bindung von Wasser unter anderem durch eine hydrophile Oberfläche und ein ausgedehntes Porensystem, damit Schutz vor Austrocknung der Mikroorganismen
- Schutz vor widrigen äußeren Einflüssen
- Anheftung und Einbindung von Partikeln und Substanzen aus der flüssigen Phase, damit Ermöglichung einer Nährstoffanreicherung im Film
- Bildung eines mechanisch stabilen Netzwerkes mit viskoelastischen Eigenschaften
- Bindung und Einlagerung von Ionen durch geladene Gruppen an den Polymeren, was zu einer Stabilitätserhöhung der Matrix durch Quervernetzung der Polymere führen kann

2.2 Quorum Sensing

Erst seit einigen Jahren weiß man, dass das sogenannte Quorum Sensing einen Einfluss auf Biofilme hat. Was Quorum Sensing genau ist, welche Rolle es in der Biofilmentwicklung spielt und wie es bei dem Bakterium *Vibrio fischeri* funktioniert, soll in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden.

2.2.1 Quorum Sensing Systeme in Bakterien

Die ersten Untersuchungen zu bakteriellem Quorum Sensing begannen in Studien zur Zelldichte-abhängigen Produktion von Licht bei den Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi*. Man fand heraus, dass beide Bakterienspezies bestimmte Moleküle, die wie Pheromone wirken, produzieren, sekretieren und detektieren können. Ab einer bestimmten Zelldichte und damit Konzentration dieser extrazellulären Moleküle beginnen die Bakterien mit der Expression der für die Lichtemission notwendigen Gene. Diese Beobachtungen konnten erstmals erklären, wie Genexpression mit der Zelldichte einer Bakterienkultur zusammenhängen kann.

Allgemein wird als Quorum Sensing die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, über die Konzentration von kleinen Signalmolekülen die Zelldichte ihrer Population zu messen [9]. Diese Signalmoleküle, die als Autoinduktoren wirken, werden von den zu Quorum Sensing befähigten Bakterien kontinuierlich produziert und in ihre Umgebung sekretiert. Überschreitet die Kon-

2. Grundlagen

zentration der extrazellulären Signalmoleküle einen bestimmten Schwellenwert, so binden diese an spezifische Rezeptoren, die die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Auf diese Weise ist es den Bakterien möglich, in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte die Expression bestimmter Gene zu kontrollieren und somit ihr Verhalten entsprechend ihrer Populationsdichte zu koordinieren [10].

Quorum Sensing Systeme können prinzipiell in drei Klassen eingeteilt werden: Systeme vom LuxI/LuxR-Typus Gram-negativer Bakterien, Systeme vom Oligopeptid-Typus, wie er bei Gram-positiven Bakterien vorkommt und ein unter Bakterien jeglicher Art weit verbreitetes LuxS/AI-2-System (Abb. 1) [11].

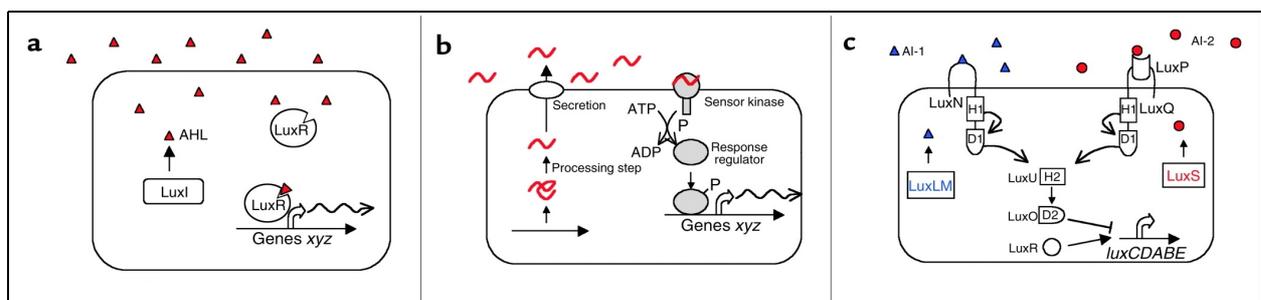


Abb. 1: Schematische Darstellung der drei Klassen von Quorum Sensing Systemen nach Federle und Bassler [11]. (a) System des LuxI/LuxR-Typus bei Gram-negativen Bakterien. (b) System des Oligopeptid-Typus bei Gram-positiven Bakterien. (c) LuxS/AI-2-System am Beispiel von *Vibrio harveyi*.

In Gram-negativen Bakterien sind LuxI-homologe Proteine für die Synthese von acyl-Homoserinlactonen (AHLs) als Autoinduktoren zuständig [12]. Moleküle dieser Art werden LuxI-homolog genannt, weil sie eine große Ähnlichkeit zu den erstmals in *Vibrio fischeri* gefundenen und als LuxI bezeichneten Signalmolekülen aufweisen. In der Struktur weisen diese Signalmoleküle stets einen identischen Homoserinlacton-Teil auf, können jedoch in Länge und Struktur ihrer Acylgruppe variieren (Abb. 2a, nach [9]). Einige Bakterienspezies verfügen über mehrere LuxI-homologe Proteine, so dass sie in der Lage sind, eine Kombination aus verschiedenen AHLs zu produzieren. Die Signalmoleküle können dabei frei durch die Zellmembran hindurch diffundieren [9]. Ist die Schwellkonzentration der AHLs erreicht, akkumulieren sie und können durch LuxR-ähnliche Rezeptoren detektiert werden. Der Komplex aus Rezeptor und AHL bindet

2. Grundlagen

anschließend die DNA an spezifische Promotorsequenzen und leitet so die Transkription der Zielgene ein (Abb. 1a) [9].

Mittlerweile hat man mehr als 70 verschiedene Gram-negative Bakterienarten identifizieren können, die einen LuxI/LuxR-ähnlichen Quorum Sensing Mechanismus zur genetischen Regulation verschiedenster Prozesse wie Virulenz, Biofilmbildung, Antibiotikaproduktion und Konjugation nutzen [10].

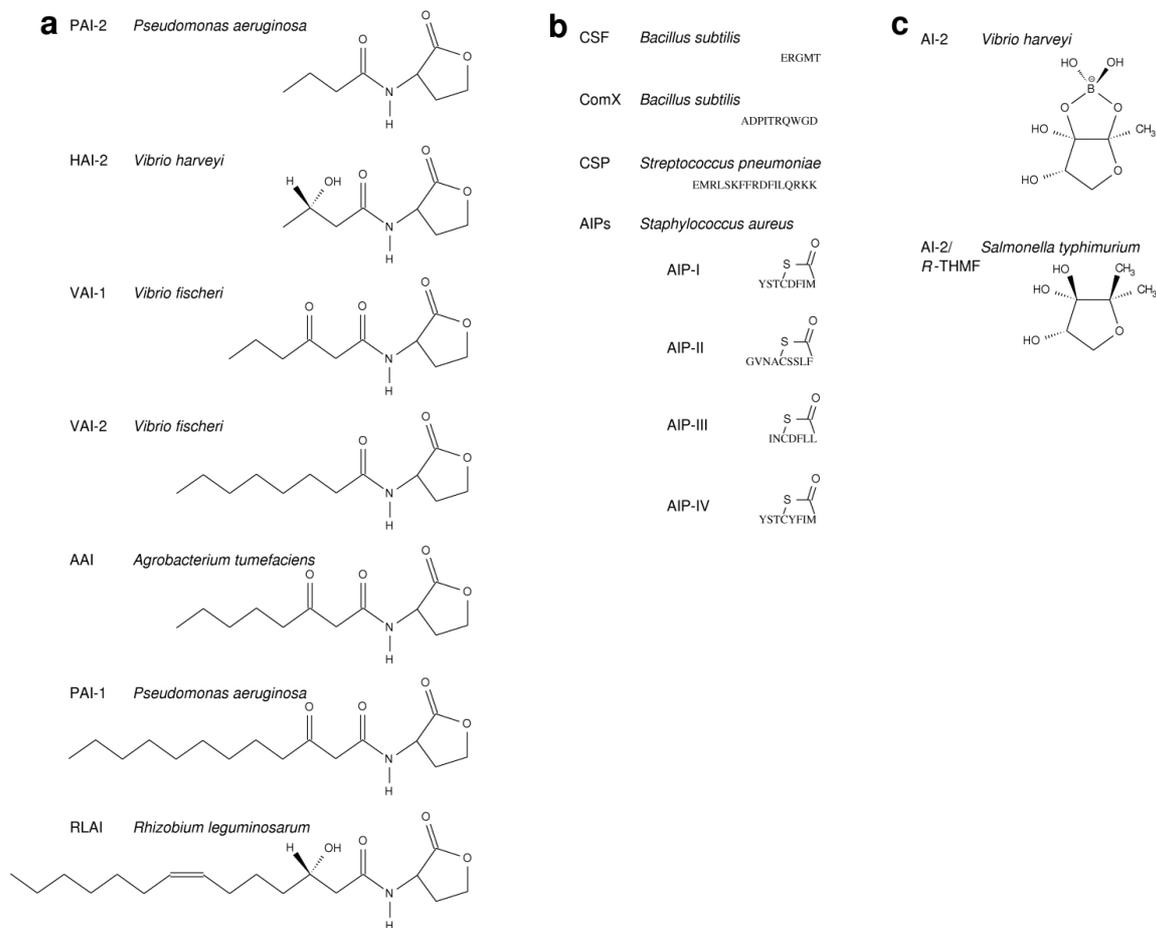


Abb. 2: Beispiele für Strukturen verschiedener Signalmoleküle. (a) AHL-Moleküle, (b) AIP-Moleküle und (c) AI-2-Moleküle

Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien nutzen Gram-positive Bakterien keine AHLs sondern kleine Oligopeptide, sogenannte Autoinduktor-Peptide (AIPs), als Signalmoleküle. Diese AIPs bestehen meist aus 5-17 Aminosäuren, die teilweise mit speziellen Seitenketten versehen

sind [13] (siehe Abb. 2b, nach [11]). Sie werden von den Gram-positiven Bakterien zunächst als Vorläufermoleküle synthetisiert, kurz darauf modifiziert um dann aktiv als reife Signalmoleküle über zelloberflächengebundene AIP-Transporter in die extrazelluläre Umgebung sekretiert zu werden. Die Detektion der AIPs erfolgt über einen aus zwei Komponenten bestehenden Signaltransduktionsweg: Die Signalmoleküle werden durch eine Kinase gebunden und über eine Phosphorylierungskaskade wird ein spezifisches Regulatorprotein phosphoryliert. Dieses kann anschließend an die Promotor-DNA binden und somit die Transkription der Zielgene auslösen (Abb. 1b) [14].

Solche Zwei-Komponenten-Signaltransduktionswege mit Phosphorylierungskaskade werden bei einer großen Vielzahl von Gram-positiven, aber auch von Gram-negativen Bakterien gefunden [14].

Das dritte Quorum Sensing System arbeitet mit dem extrazellulären Signalmolekül AI-2 [15]. AI-2 ist ein furanosyl-Borat-Diester und ist das erste Biomolekül, in dem das Element Bor gefunden wurde [11]. Von diesem Molekül gibt es jedoch auch Varianten, die kein Bor enthalten (Abb. 2c, nach [11][16]). Die Synthese des AI-2-Signalmoleküls wird durch das Protein LuxS gesteuert. In Abb. 1c ist beispielhaft das AI-2 System von *Vibrio harveyi* gezeigt: dieses Bakterium nutzt zwei parallele Zwei-Komponenten-Signaltransduktionswege für das Signalmolekül AI-1, einem AHL, und das Signalmolekül AI-2.

Über Sequenzhomologie-Screening wurden in vielen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterienspezies *luxS*-homologe Gene gefunden, sowie bei weiteren Bakterienarten eine AI-2-Produktion nachgewiesen. Der genaue Wirkungsmechanismus der AI-2 Moleküle ist jedoch in den meisten Fällen noch nicht geklärt [11]. Es wird allerdings angenommen, dass es den Bakterien mit dem AI-2 System möglich ist, nicht nur ihre eigene Zelldichte zu kontrollieren, sondern auch Informationen über das Verhältnis der eigenen zu anderen Zelldichten in gemischten Populationen zu bekommen. Das AI-2 Signalmolekül scheint aufgrund seiner weiten Verbreitung unter den Bakterien weniger speziesspezifisch zu sein als die AHLs und AIPs. Es kann somit auch von anderen Bakterien detektiert werden und daher zur interspezifischen Kommunikation dienen. Bakterien, die über mehrere AHL- oder AIP-Quorum Sensing Systeme verfügen, könnten durch Kombination dieser Systeme ebenfalls in der Lage sein, zwischenartliche Signalmoleküle zu detektieren und zu verarbeiten [11]. Von einigen AHLs parasitärer Bakterien ist bekannt,

2. Grundlagen

dass sie Virulenzfaktoren darstellen und eine recht spezifische Immunantwort ihrer Wirte hervorrufen können [17][18]. Erweitert man diesen Gedanken, wäre es sogar möglich, dass Autoinduktoren auch als Signalmoleküle zwischen parasitären oder symbiotischen Bakterien und ihren Wirten dienen könnten [9].

Große Homologien in den einzelnen Quorum Sensing Systemen der verschiedenen Bakterien sowie die Tatsache, dass viele dieser Bakterien als Symbionten oder Parasiten in Pflanzen- oder Tierwirten leben können, deuten darauf hin, dass sich Quorum Sensing im evolutionären Prozess als wichtig und erfolgreich erwiesen hat [19]. Durch die Möglichkeit der eigenen Zelldichtebestimmung und der Detektion der Anwesenheit anderer Spezies, können sich die Bakterien somit auf schwankende Umweltbedingungen besser einstellen und eine Vielzahl nischenspezifischer Verhaltensweisen regulieren [11]. In Tab. sind einige Beispiele für Quorum Sensing-regulierte Prozesse in Bakterien zusammengestellt [9][11][20][<http://www.nottingham.ac.uk/quorum/table.htm>].

Tab. 1: Beispiele für Quorum Sensing regulierte Prozesse in Bakterien

Bakterienspezies	Signalmoleküle	Regulatorische Proteine	Funktionen
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AI-2	LuxS	Beschaffung von Eisen; Virulenz
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL (AHA1)	AhyR, AhyI	Synthese extrazellulärer Protease; Biofilmentwicklung
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL	AsaR, AsaI	Synthese extrazellulärer Protease
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C8-HSL (AAI)	TraR, TraI	Konjugation, Typ 4 Sekretion
<i>Bacillus subtilis</i>	CSF, ComX	PhrC, ComQ, ComX	genetische Kompetenz, Aufnahme von DNA, Sporulation
<i>Borrelia burgdorferi</i>	AI-2	LuxS	pleiotropische Proteinexpression für Virulenz
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-HSL, C6-HSL	CepR, CepI	Synthese von Protease, Siderophoren; Biofilmentwicklung
<i>Campylobacter jejuni</i>	AI-2	LuxS	Beweglichkeit
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	CviR, CviI	Synthese von Antibiotica, Violacein, Exoenzymen, Cyanid
<i>Clostridium perfringens</i>	AI-2	LuxS	Toxinproduktion
<i>Enterobacter agglomerans</i>	C6-HSL	EagR, EagI	unbekannt
<i>Enterococcus faecalis</i>	GeIE, SprE	FsrA, FsrB, FsrC	Synthese von Virulenzfaktoren
<i>Erwinia carotovora Subsp. carotovora</i>	C6-HSL (VAI-1)	CarR, CarI, ExpR, Expl, HsII	Synthese von Carbapenem-Antibiotikum, Exoenzymen
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	C6-HSL	ExpR, Expl (EchR, EchI)	Synthese von Pektinasen
<i>Erwinia stewartii</i>	VAI-1	Esal, EsaR	Synthese von Exopolysacchariden, Virulenzfaktoren
<i>Escherichia coli</i>	AI-2	LuxS	Zellteilung; Beweglichkeit; Metabolismus; Virulenz; Typ 3 Sekretion; Biofilmbildung
<i>Helicobacter pylori</i>	AI-2	LuxS	Biofilmbildung
<i>Neisseria meningitidis</i>	AI-2	LuxS	Infektion
<i>Nitrosomas europaea</i>	C6-HSL	unbekannt	Austrreten aus der lag- in die log-Phase
<i>Obesumbacterium proteus</i>	C6-HSL	OprR, OprI	unbekannt

2. Grundlagen

Bakterienspezies	Signalmoleküle	Regulatorische Proteine	Funktionen
<i>Pantoea stewartii</i>	C6-HSL	EsaR, EsaI	Synthese von Exopolysacchariden
<i>Photorhabdus luminescens</i>	A1-2	LuxS	Synthese von Carbapenem-Antibiotikum
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	A1-2	LuxS	Synthese von Protease; Beschaffung von Häm; Biofilmbildung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C12-HSL (PAI-1), C4-HSL (PAI-2), PQS, A1-2, C6-HSL	LasR, LasI, RhlR, RhlI, VsmR, VsmI, LuxS	Synthese von Exoenzymen, Xcp, RhlR, Cyanid, RpoS, Lektinen, Pyocyanin, Rhamnolipiden, Virulenzfaktoren; Typ 4 Pili; Biofilmbildung, Zell-Zell-Abstand; Ausschwärmfähigkeit
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL (PRAI)	PhzR, PhzI	Synthese von Phenazin-Antibiotikum
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	C6-HSL	PhzR, PhzI	Synthese von Phenazin-Antibiotikum
<i>Pseudomonas putida</i>	C12-HSL, C10-HSL, C8-HSL, C6-HSL	PpuI, PpuR	Biofilmbildung
<i>Ralstonia solanacearum</i>	C8-HSL	SolR, SolI	unbekannt
<i>Rhizobium etli</i>	unbekannt	RaiR, RaiI	Begrenzung der Anzahl der Knöllchen
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	C14-HSL (RLAI)	RhIR	Synthese von Bakteriocin; Knöllchenbildung; Überleben in der stationären Phase
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	C14-HSL	CerR, CerI	„Community escape“
<i>Salmonella typhi</i>	A1-2	LuxS	Biofilmbildung
<i>Salmonella typhimurium</i>	A1-2	LuxS	Expression von ABC-Transportern; Biofilmbildung
<i>Serratia liquefaciens</i>	C4-HSL (SAI-1), C6-HSL (SAI-2)	SwrR, SwrI, BsmA, BsmB	Synthese von Protease; Ausschwärmfähigkeit, Biofilmentwicklung
<i>Shigella flexneri</i>	A1-2	LuxS	Expression von Transkriptionsfaktoren, die für Virulenz nötig sind
<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-I, AIP-II, AIP-III, AIP-IV	AgrA, AgrB, AgrC, AgrD	Synthese von Virulenzfaktoren; Biofilmbildung
<i>Streptococcus mutans</i>	CSP, A1-2	ComX, LuxS	Kompetenz für DNA-Aufnahme; Biofilmentwicklung
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CSP, A1-2	ComX, LuxS	Kompetenz für DNA-Aufnahme; Virulenz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A1-2	LuxS	Synthese von Virulenzfaktoren
<i>Vibrio anguillarum</i>	C10-HSL	VanR, VanI, VanT	Synthese von Serin, Metalloprotease, Exopolysacchariden, Pigment; Biofilmbildung
<i>Vibrio cholerae</i>	A1-2	LuxS	Synthese von Virulenzfaktoren
<i>Vibrio fischeri</i>	C6-HSL (VAI-1), C8-HSL (VAI-2)	LuxR, LuxI, AinS, AinR	Biolumineszenz
<i>Vibrio harveyi</i>	C4-HSL (HAI-1), HAI-2, A1-2, CAI-1	LuxM, LuxN, LuxO, LuxR, LuxP, LuxQ, LuxS, CqsS,	Synthese von Polyhydroxybutyrat, Protease, Siderophoren; Biolumineszenz; Typ 3 Sekretion; Kolonie-Morphologie
<i>Vibrio vulnificus</i>	A1-2	LuxS	Virulenz
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL (VAI-1)	YenR, YenI	Ausschwärmfähigkeit; Schwärmfähigkeit
<i>Yersinia pestis</i>	C8-HSL, C6-HSL	YpeR, YpeI	unbekannt
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C6-HSL, C8-HSL	YpsR, YpsI, YtbR, Ytbl	Beweglichkeit; Gruppierung
<i>Xanthomonas campestris</i>	CSF	RpfF, RpfC, RpfG	Virulenz; Biofilmausbreitung

2.2.2 Einfluss von Quorum Sensing auf Biofilme

Für gewöhnlich sind in Biofilmen lokal wesentlich höhere Zelldichten zu finden als bei planktonisch lebenden Zellpopulationen. Als Konsequenz der Lebensweise in Biofilmen sind an diesen Stellen auch höhere Konzentrationen von Stoffwechselprodukten, Sekundärmetaboliten und anderen von den Zellen ausgeschiedenen Substanzen anzutreffen. Hierbei spielt auch die Diffusionslimitierung in der EPS-Matrix eine Rolle bei der örtlichen Aufkonzentrierung der Stoffe. Das Zusammenleben auf engstem Raum schafft also ideale Voraussetzungen für eine Kommunikation zwischen den Bakterien mittels Signalmolekülen. Tatsächlich wurde in mehre-

ren Biofilmen Quorum Sensing nachgewiesen. In einigen Fällen scheint es jedoch keinerlei Einfluss auf die Biofilmentwicklung zu haben, während bei anderen Spezies Quorum Sensing recht stark involviert ist. Eine Zusammenfassung über bekannte Einflüsse von Quorum Sensing auf die phänotypische Bildung, Entwicklung und Struktur von Biofilmen wurde 2005 von Parsek und Greenberg [20] erstellt.

Die Anheftung von Bakterien an eine Oberfläche zählt zu den ersten Schritten bei der Entstehung eines Biofilms. Bereits hier spielt Quorum Sensing bei einigen Bakterienspezies eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass das AIP-anhängige Agr-Protein von *Staphylococcus aureus* die Expression verschiedener Oberflächenproteine, die für einen Kontakt mit der Aufwuchsoberfläche zuständig sind, reprimiert. Auch das LuxS-homologe Protein *Helicobacter pylori*, der für Magenschleimhautentzündungen verantwortlich ist, reguliert die Anheftung negativ. Mutationen in den jeweiligen Genen der beiden Bakterienspezies führen im Vergleich zu den Wildtypen zu einer verstärkten Anheftung der Zellen an Oberflächen. Im Gegensatz dazu wird das LuxS-Homologon von *Salmonella typhimurium* für die Entstehung von Biofilmen auf menschlichen Gallensteinen benötigt und auch die AHL-Synthasen BsmA und BsmB von *Serratia marcescens* scheinen für eine Anheftung auf abiotischen Flächen notwendig zu sein [21].

Quorum Sensing kann auch einen Einfluss auf die weitere Entwicklung des entstehenden Biofilms haben. Mutationen in *cepI/R*-Genen des AHL-Systems von *Burkholderia cepacia* führen dazu, dass der Biofilm nicht über das Mikrokolonie-Stadium hinaus wächst. Das *ahyR/I*-AHL-System von *Aeromonas hydrophila* wird ebenfalls für die Ausbildung strukturell differenzierter Biofilme benötigt. Auch die beiden AHL-Systeme *las* und *rhl* von *Pseudomonas aeruginosa* sind in die Biofilmentwicklung involviert. Unter anderem sind diese Systeme für die Produktion von Rhamnolipiden zuständig, die als Verursacher von Kanälen und Poren einen wesentlichen Anteil zur Morphologie des Biofilms beitragen. Die *las*- und *rhl*-Systeme von *P. aeruginosa* wiederum sind eng mit einem Quinolon-Signal (PQS) gekoppelt, das sowohl die Biofilmentwicklung wie auch die Quorum Sensing-abhängige Produktion von Virulenzfaktoren fördert.

In einigen Bakterienspezies wirkt sich Quorum Sensing auch auf die Bewegungsfähigkeit der Zellen auf Oberflächen aus. Mutationen in *swr*-Genen des AHL-Systems von *Serratia liquefaciens* und *Serratia marcescens* verhindern durch ein verringertes Bewegungsvermögen eine Aggregation zu heterogenen Strukturen mit Zellfilamenten und -haufen. Die in beiden Stämmen

vorkommenden BsmA/B-Proteine sind ebenfalls an der Entwicklung eines reifen Biofilms beteiligt [21]. Ebenso ist es möglich, dass die Unfähigkeit von *P. aeruginosa* *las*- und *rhl*-Mutanten strukturierte Biofilme auszubilden, durch die entstandene Bewegungsunfähigkeit gefördert wird. Für *Escherichia coli* wurde nachgewiesen, dass das AI-2 System das Biofilmwachstum fördert und seine Struktur durch verstärkte Fortbewegung der Zellen mit Flagellen beeinflusst [22]. In *Yersinia pseudotuberculosis* wird dagegen die Beweglichkeit der Bakterien durch Quorum Sensing negativ reguliert.

Bei den Gram-positiven Bakterien konnte für *Streptococcus mutans* gezeigt werden, dass das LuxS-Quorum Sensing System für die Ausbildung gleichmäßiger und konfluenter Biofilme notwendig ist, da Mutationen im *luxS*-Gen zu rauen und lockeren Filmen mit weniger Biomasse führen. Möglicherweise sind bei diesem Bakterium auch die von einem AI-2 Quorum Sensing System regulierten Gene *smu486/487* an einer Biofilmentwicklung beteiligt. Desweiteren nimmt man an, dass LuxS bei *Klebsiella pneumoniae* für die Ausbildung von Mikrokolonien zuständig ist [23].

Das Ablösen von Biomasse aus einem reifen Biofilm hängt zum einen mit der Aggregationsfähigkeit der Bakterien, zum anderen mit dem aktiven Abgang von Zellen für eine Neubesiedlung zusammen. *SwrI*-Mutationen im AHL-System von *Serratia marcescens* führen zum Beispiel zu einem verstärkten „sloughing“ [21]. Dagegen neigen *Yersinia pseudotuberculosis* und *Rhodobacter sphaeroides* mit Mutationen in den Genen ihrer AHL-Systeme zu Hyperaggregation.

Das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* und das humanpathogene Bakterium *Vibrio cholerae* tragen aktiv zum Ablösen der Zellen aus der Biofilmgemeinschaft bei. In beiden Bakterienspezies wird über Quorum Sensing die Produktion und Exkretion spezifischer Polysaccharide negativ reguliert. Die Repression der Produktion dieser Exopolysaccharide führt zu einem schwächeren Zusammenhalt des Biofilms und schließlich zum Abgang von Zellaggregaten.

Eine interessante Form der aktiven Ausbreitung von Zellen wurde bei *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen beobachtet. Ähnlich dem multizellulären Lebenszyklus von Myxobakterien können bei *P. aeruginosa* verschiedene Phänotypen in einer Biofilmmikrokolonie auftreten. Im Inneren der Mikrokolonie differenzieren sich die Zellen zu einem beweglichen Phänotyp, während die

äußeren Zellen unbeweglich bleiben und eine Art Umwandlung der Kolonie darstellen. Nach einer gewissen Zeit wird an bestimmten Stellen diese Wand von den inneren Zellen durchbrochen, die nun beginnen, auszuschwärmen. Diese als „seeding dispersal“ bezeichnete aktive Ausbreitung von *P. aeruginosa* wird durch das *las/rhl*-Quorum Sensing reguliert [24].

Wie bei dieser kurzen Zusammenstellung von Untersuchungsergebnissen zu erkennen ist, basieren sämtliche Daten auf Beobachtungen zur phänotypischen Biofilmentwicklung von Bakterien, in deren Quorum Sensing-regulierende Gene zuvor Mutationen eingebracht wurden. Diese Methode birgt jedoch Nachteile. Zum einen wird aus immer mehr Untersuchungen deutlich, dass Quorum Sensing bei vielen Spezies eine globale Rolle bei der Regulation von Genen spielt. Allein bei *P. aeruginosa* wird angenommen, dass die Expression von bis zu 400 verschiedenen Genen über Quorum Sensing kontrolliert wird. Es ist daher recht wahrscheinlich, dass sich Mutationen in Quorum Sensing-regulierenden Genen auch auf die Entwicklung von Biofilmen auswirken. Die Wichtigkeit der Gene für die Biofilmentwicklung kann dabei aber oft nicht eingeschätzt werden. Die Stärke der Auswirkung wird zudem häufig noch von weiteren Faktoren wie den Versuchsbedingungen beeinflusst. Bei *S. marcescens* konnte gezeigt werden, dass der Effekt von Quorum Sensing auf die Biofilmstruktur vollständig von der Substratzufuhr überlagert werden kann [21] und auch bei *P. aeruginosa* wird angenommen, dass die Nährstoffzufuhr oder die hydrodynamischen Bedingungen gleichbedeutend oder gar wichtiger für die Biofilmbildung sind, als der Einfluss des Quorum Sensings [25]. Dies macht auch die Notwendigkeit von einheitlichen Untersuchungsbedingungen deutlich, was jedoch noch von zu wenigen Laboratorien eingehalten wird. Ein weiteres wichtiges Problem ist, dass die Auswirkungen von Mutationen auf die Entwicklung von Biofilmen nur über das optische Erscheinungsbild des Biofilms analysiert und mit anderen Ergebnissen verglichen werden kann. Mögliche, nicht visuell sichtbare aber trotzdem für ein Biofilmsystem wichtige Faktoren können dabei nicht erfasst werden.

2.2.3 Das Quorum Sensing System von *Vibrio fischeri*

Das Bakterium *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum (fischeri)*) ist ein marines Bakterium, das sowohl freilebend im Wasser als auch in Symbiose mit einigen Meeresfischen, wie dem australischen Zapfenfisch *Cleidopus gloriamaris*, und Tintenfischen, wie dem kleinen hawaiianischen Tintenfisch *Euprymna scolopes*, vorkommt. Als Symbiont lebt *V. fischeri* in speziellen

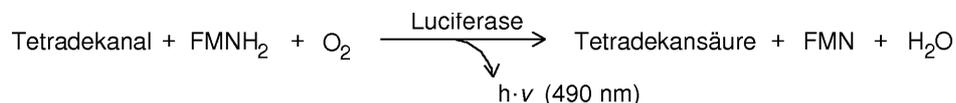
Leuchtorganen der Tiere, in denen es sehr hohe Zelldichten (über 10^{11} Zellen pro ml) erreicht und Licht produziert. Frei im Meerwasser lebend hat das Bakterium jedoch meist nur eine Zelldichte von weniger als 100 Zellen pro Milliliter und zeigt keine Lichtemission.

Schon in den frühen 70er Jahren fand man heraus, dass es sich beim Mechanismus der bakteriellen Lumineszenz um eine Autoinduktion handelt, da es den Bakterien erst ab einer bestimmten Zelldichte möglich ist, Licht zu produzieren [26][27]. 1981 entdeckten Eberhard et al., dass es sich bei dem regulatorischen Mechanismus zur Induktion der Biolumineszenz bei *V. fischeri* um Quorum Sensing mit AHLs als Signalmolekülen handelt [28].

In *V. fischeri* spielen bei der Regulation der Biolumineszenz zwei miteinander gekoppelte Quorum Sensing Systeme eine Rolle [29].

2.2.3.1 Lichtproduktion und ihre genetische Regulierung über Quorum Sensing

V. fischeri besitzt unter bestimmten Bedingungen die Möglichkeit, zu lumineszieren. Die Emission des Lichts ist dabei an die Gegenwart eines langkettigen Aldehyds als Substrat, eines reduzierten Flavin-Adenin-Mononucleotids und an molekularen Sauerstoff gebunden [30][31]:



Die Lichtreaktion wird durch das Enzym Bakterielle Luciferase katalysiert, wobei ein stabiles Luciferase-Flavin-Aldehyd-Intermediat entsteht, welches in mehreren Schritten langsam oxidiert wird und dabei blau-grünes Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm abgibt.

Die für die Lichtproduktion verantwortlichen Gene liegen bei *V. fischeri* auf dem *lux*-Operon, das zwei verschiedene transkriptionelle Einheiten enthält, deren Startcodons etwa 150 bp voneinander entfernt liegen: Das *luxICDABEG*-Operon und das *luxR*-Gen [28].

Die meisten Gene des *luxICDABEG*-Operons spielen für die Produktion des Lichts eine mechanistische Rolle: *luxA* und *luxB* kodieren für die α - und β -Untereinheiten des Luciferase-Enzyms, *luxC*, *luxD* und *luxE* kodieren für Proteine, die für die Biosynthese des Aldehyd-Substrats

benötigt werden und *luxG* produziert wahrscheinlich eine Reduktase, die das für die Lichtreaktion benötigte FMNH_2 neu generiert. [32][33].

Die Expression dieser Gene wird durch die Proteine LuxI und LuxR, die von *luxI* und *luxR* kodiert werden, reguliert. LuxI ist für die zelldichteabhängige Synthese von N-3-oxohexanoyl Homoserinlacton, dem Autoinduktor mit dem Trivialnamen VAI-1, zuständig. Die Bindung dieses C6-HSLs an das Rezeptorprotein LuxR führt zu einem Komplex, der an eine 20 bp lange DNA-Sequenz (die sog. *lux box*) des *lux*-Promotors bindet, und so die Transkription der *luxICDABEG*-Gene induziert [9].

Die Transkription von *luxR* wird durch das Transaktivatorprotein LitR ermöglicht [34], dessen Expression wiederum von einem weiteren Quorum Sensing Mechanismus abhängt.

Neben dem LuxI/LuxR Quorum Sensing System gibt es noch das AinS/AinR-System. Das Protein AinS ist für die Synthese von N-octanoyl-L-Homoserinlacton (C8-HSL), dem zweiten Autoinduktor VAI-2, verantwortlich, während AinR das spezifische Rezeptormolekül für VAI-2 darstellt [35][36][37][38].

Das Zusammenspiel der beiden Quorum Sensing Systeme ist stark von der Zelldichte abhängig. Lupp et al. stellten 2003 folgendes Modell zur Regulation der Biolumineszenz in *Vibrio fischeri* auf [29]:

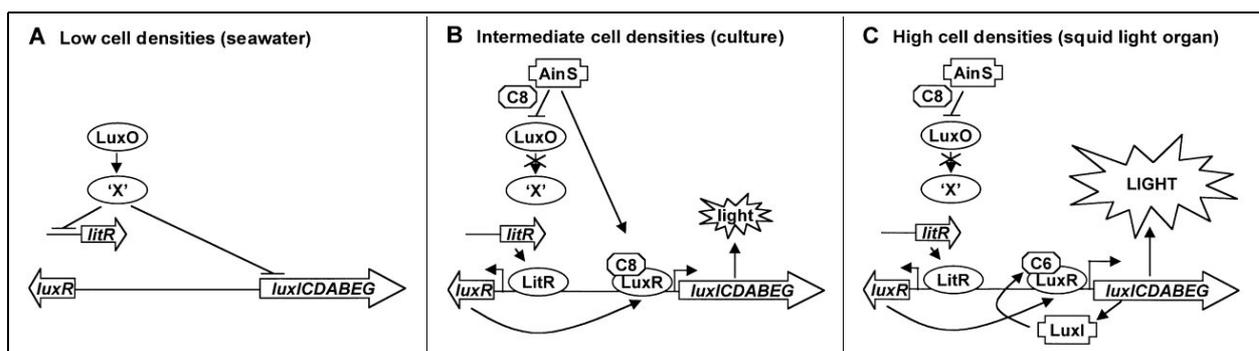


Abb. 3: Modell zur Regulation der Lumineszenz in *Vibrio fischeri* nach Lupp et al. [29] (A) bei geringen Zelldichten ($<10^8$ Zellen/ml), (B) bei mittleren Zelldichten (10^8 - 10^9 Zellen/ml) und (C) bei hohen Zelldichten ($>10^{11}$ Zellen/ml). C6 entspricht C6-HSL, C8 entspricht C8-HSL.

2. Grundlagen

Bei einer geringen Zellzahl, wie sie z.B. bei frei im Meerwasser lebenden *Vibrio fischeri* vorkommt, ist die Konzentration sowohl von VAI-1 als auch VAI-2 so gering, dass die Signalmoleküle nicht akkumulieren und somit nicht an ihre Rezeptoren binden können. Zusätzlich wird die Transkription des *lux*-Operons wahrscheinlich durch ein weiteres Protein LuxO, welches eine noch unbekannt Komponente ‚X‘ aktiviert, reprimiert. Es kann somit kein Licht produziert werden. (Abb. 3A)

Bei höheren Zelldichten wird angenommen, dass zunächst VAI-2 (C8-HSL) akkumuliert, an den AinR-Rezeptor bindet und über eine mögliche Phosphorylierungskaskade LuxO inaktiviert. Die Repression der Lumineszenz wird damit aufgehoben. Zusätzlich kann VAI-2 an LuxR binden, da VAI-1 noch nicht in ausreichendem Maße akkumuliert ist, um selbst an LuxR binden zu können. Die Bindung von VAI-2 an LuxR erfolgt jedoch mit geringerer Effizienz als mit VAI-1 (C6-HSL) und führt somit nur zu einer schwachen Transkription des *luxICDABEG*-Operons. Daraus ergibt sich für Zelldichten zwischen 10^8 und 10^9 Zellen/ml eine mäßige Lichtproduktion. (Abb. 3B)

Ist die Konzentration an VAI-1 bei sehr hohen Zelldichten, wie sie z.B. in den Leuchtorganen von Symbionten von *Vibrio fischeri* vorkommen, ausreichend hoch, so führt die Akkumulation dieses Signalmoleküls zu einer verstärkten Transkription des *luxICDABEG*-Operons mit positiver Rückkopplung und damit zu einer starken Lichtproduktion. (Abb. 3C) [29].

Obwohl VAI-2 in der Lage ist, die Expression der *lux*-Gene ineffizient zu aktivieren, scheint es auch ein kompetitiver Inhibitor von VAI-1 zu sein: in *V. fischeri*-Stämmen mit einer Nullmutation im *ainS*-Gen werden die *lux*-Gene schon bei geringeren Zelldichten exprimiert als in Wildtyp-Stämmen [37].

Einen weiteren Einfluss auf die Lumineszenz von *Vibrio fischeri* hat der Sigmafaktor $\sigma 54$. Obwohl die Hauptfunktion dieses unter Bakterien weit verbreiteten Proteins, welches durch *rpoN* kodiert wird, bei der Regulation des Stickstoffmetabolismus liegt [39][40] scheint $\sigma 54$ einen negativen Effekt auf Quorum Sensing Gene auszuüben. Untersuchungen von *rpoN*-Mutanten ergaben, dass $\sigma 54$ die Lumineszenz in *V. fischeri* ähnlich stark reprimiert, wie LuxO. Auf welche Weise dies geschieht, ist bisher jedoch noch unbekannt [41].

2.3 Stofftransport von Quorum Sensing-Molekülen in Biofilmen

2.3.1 Verteilung der Signalmoleküle im Biofilm

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, können Quorum Sensing-Moleküle von verschiedener Gestalt sein. AHL-Moleküle variieren beispielsweise in der Länge ihrer Acyl-Seitenkette und haben abhängig davon eher hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften. Die jeweilige Hydrophobizität der Signalmoleküle wiederum beeinflusst ihre Diffusionsgeschwindigkeit bei der freien Diffusion durch die Biofilmmatrix. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Matrix können sich daher an bestimmten Stellen im Biofilm Signalmoleküle anhäufen. Gerade in Biofilmsystemen mit Bakterien, die mehrere unterschiedliche Signalmoleküle sekretieren, können sich aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der Moleküle spezifische Gradienten innerhalb des Biofilms bilden [20]. Diese Konzentrationsgradienten werden durch eine positive Autoregulation, wie sie in vielen zu Quorum Sensing befähigten Bakterienspezies vorkommt, noch verstärkt.

Der physiologische Zustand der Bakterien hat ebenfalls einen Einfluss auf die Verteilung der Signalmoleküle im Film. Die Substrate, die zur Synthese von Signalmolekülen jeglicher Art notwendig sind, stammen von Metaboliten. Entsprechend abhängig ist die Signalproduktion von der metabolischen Aktivität der Bakterien, die das Angebot und die Zusammensetzung der Substrate bestimmt [20]. Die Bakterien eines Biofilms haben nicht alle den gleichen physiologischen Zustand, weswegen sie an Stellen, wo sie metabolisch weniger aktiv sind (zum Beispiel im Innern des Biofilms) möglicherweise auch weniger oder andere Signalmoleküle produzieren als an Orten mit höherer metabolischer Aktivität (zum Beispiel den äußeren Randbereichen des Biofilms).

In Biofilmen, die sich aus verschiedenen Spezies zusammensetzen, ist außerdem zu bedenken, dass einige Mikroorganismen in der Lage sind, die von anderen produzierten Signalmoleküle zu zersetzen und als Energiequelle zu nutzen. Die Fähigkeit, Signalmoleküle zu konsumieren und dadurch möglicherweise den Konzentrationsgradienten der Signalstoffe im Biofilm zu beeinflussen, konnte bereits bei *Bacillus* spp. und *Variovorax paradoxicus* nachgewiesen werden [20].

Einen wesentlichen Aspekt stellt die Morphologie eines Biofilms dar. Es ist anzunehmen, dass die Gradienten der Signalmoleküle in homogenen flachen Biofilmen verschieden von denen in stark strukturierten Biofilmen sind. Hypothetische Signalgradienten für einen flachen und einen stark strukturierten Biofilm sind in Abb. 4 dargestellt.

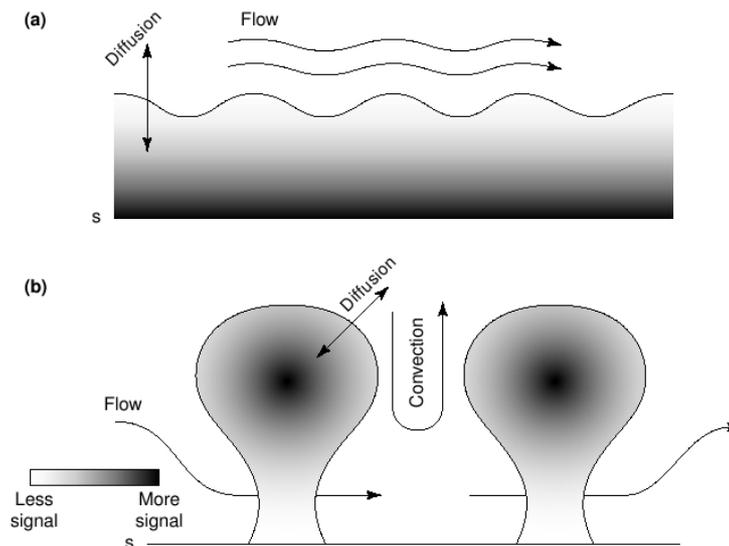


Abb. 4: Schematische Darstellung hypothetischer Signalgradienten in morphologisch unterschiedlichen Biofilmen: a) flacher und homogener Biofilm, b) stark strukturierter Biofilm. Das Substratum ist mit s gekennzeichnet, die Signalkonzentrationen sind über die Grauskala dargestellt. Aus Parsek und Greenberg 2005 [20].

2.3.2 Hydrodynamischer Einfluss auf den Stofftransport

Wie in Abb. 4 angedeutet, wird die Signalstoffkonzentration im Biofilm zusätzlich wesentlich von den hydrodynamischen Gegebenheiten des Systems bestimmt. Die Signalmoleküle diffundieren dabei durch den Biofilm bis an die Biofilmoberfläche. Von dort aus gelangen sie durch eine Konzentrationsgrenzschicht in die Flüssigkeitsphase (Bulkphase). Dieser Vorgang kann nach der klassischen Filmtheorie durch folgende Gleichung beschrieben:

$$j_i = \beta \cdot (c_{Bulk,i} - c_{Filmoberfläche,i}) \quad (2.1)$$

2. Grundlagen

Die Massenstromdichte j_i beschreibt dabei den Stoffstrom, der durch die Konzentrationsgrenzschicht fließt. Er ist von der Differenz der Molekülkonzentration in der Bulkphase und an der Biofilmoberfläche sowie vom Stoffübergangskoeffizienten β abhängig.

Die theoretische Dicke der Konzentrationsgrenzschicht, wenn sie nach der klassischen Filmtheorie mit reiner Diffusion als Stofftransportprozess betrachtet wird, lässt sich wie folgt berechnen:

$$L_{c, theor} \simeq \frac{D_i}{\beta} \quad (2.2)$$

Die tatsächliche Dicke der Konzentrationsgrenzschicht ist jedoch größer als die theoretische [42] und wird von der Stärke der Strömung in der Bulkphase beeinflusst, was von Horn 1992 [43] über Mikroelektrodenmessungen von Sauerstoffprofilen in Biofilmsystemen gezeigt werden konnte.

Die Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit lässt sich über die Sherwood-Zahl erklären. Sie gibt das Verhältnis des Stoffübergangs zum Diffusionsstrom wieder und ist dabei eine Funktion der Reynolds-Zahl Re und Schmidt-Zahl Sc .

$$Sh = \frac{\beta \cdot d}{D_i}, \quad Sh = f(Re, Sc) \quad \text{mit} \quad Re = \frac{w \cdot d}{\nu} \quad \text{und} \quad Sc = \frac{\nu}{D_i} \quad (2.3)$$

In Rohren mit glatten Wänden gilt [44]:

$$\text{für laminare Rohrströmung:} \quad Sh_{theor} = 2 \cdot Re^{0,5} \cdot Sc^{0,5} \cdot \left(\frac{d}{L}\right)^{0,5} \quad (2.4)$$

$$\text{für turbulente Rohrströmung:} \quad Sh_{theor} = 0,037 \cdot Re^{0,75} \cdot Sc^{0,5} \quad (2.5)$$

Für die Berechnung der Sherwood-Zahl in Biofilmsystemen werden eine Vielzahl von Gleichungen verwendet, die meist um Anpassungsparameter erweitert wurden. In Tab. 2 wird eine kleine Auswahl dieser Gleichungen dargestellt [45][46][47].

Tab. 2: Gleichungen für die Sherwood-Zahl in Biofilmreaktoren [45][46][47]

Sherwood-Zahl	Reaktortyp	Quelle
laminar: $Sh = 1,65 \cdot \left(Re \cdot \frac{d}{L} \right)^{0,33} \cdot Sc^{0,27}$	Reaktor mit membrangebundenem Biofilm	Debus (1993)
turbulent: $Sh = 0,037 \cdot (Re^{0,75} - 180) \cdot Sc^{0,27} \cdot \left(1 + \frac{d}{L} \right)$		
laminar: $Sh = 2 \cdot Re^{0,5} \cdot Sc^{0,5} \cdot \left(\frac{d}{L} \right)^{0,5} \cdot (1 + 0,0021 \cdot Re)$	Biofilm-Rohrreaktor	Horn und Hempel (1995)
laminar: $Sh = 2 \cdot Re^{0,5} \cdot Sc^{0,5} \cdot \left(\frac{d}{L} \right)^{0,5} \cdot (0,24 \cdot \Omega)^{-1}$	Biofilm-Rohrreaktor	Wäsche (2002)
turbulent: $Sh = 0,037 \cdot Re^{0,75} \cdot Sc^{0,5} \cdot (0,24 \cdot \Omega)^{-1}$		

Durch die Abhängigkeit von der Reynolds-Zahl ist also anzunehmen, dass die Quorum Sensing-Moleküle mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit schneller aus dem Biofilm heraus diffundieren und somit der Gradient innerhalb des Biofilms verstärkt wird. Der Stofftransport in der Konzentrationsgrenzschicht erfolgt dabei neben der Diffusion auch durch konvektive Vorgänge und nimmt mit steigender Strömungsgeschwindigkeit zu.

Wäsche (2002) [47] berücksichtigt in seinen Gleichungen durch den Strukturfaktor Ω zusätzlich den Einfluss der Struktur des Biofilms auf den Stoffübergang. Der Strukturfaktor selbst wird dabei über die Reynolds-Zahl während des Wachstums und eine relative Wachstumsgeschwindigkeit beschrieben. Wie Wäsche mit Hilfe von Mikroelektrodenmessungen von Sauerstoffkonzentrationen zeigen konnte, sinkt mit zunehmender Strukturierung der Biofilmoberfläche die Sherwood-Zahl und die Konzentrationsgrenzschicht wird dicker.

2.4 Modellierung von Biofilmen

Ein Biofilm ist ein sehr komplexes System, das aus vielen miteinander wechselwirkenden Teilen (Subsystemen) aufgebaut ist. Erst das Zusammenspiel all dieser Teile ergibt das funktionierende System. Um ein System erfassen und analysieren zu können, ist es hilfreich, Modelle zu erstellen. Ein solches Modell bietet ein Konzept, mit dem ein komplexes System vereinfacht dargestellt wird. In Abhängigkeit von Betrachtungsweise und Fragestellung werden bei der Modellbildung gewisse Systemeigenschaften berücksichtigt und andere vernachlässigt. Dadurch sind nur die für den Betrachter wichtigen Eigenschaften dargestellt, während nebensächliche außer Acht gelassen werden [48].

Komplexe Systeme (wie Biofilme) haben häufig Eigenschaften, die sich nicht aus der Summe der einzelnen Teile erklären lassen. Solche emergenten Eigenschaften treten erst durch das Zusammenwirken der verschiedenen Subsysteme auf und sind nicht voraussagbar [49]. Gerade aber die Vorhersehbarkeit bestimmter Verhaltensweisen eines Biofilms ist für das Verständnis von Biofilmsystemen von Bedeutung und kann helfen, geeignete und wirkungsvolle Maßnahmen im Umgang mit erwünschten bzw. unerwünschten Biofilmen zu ergreifen.

2.4.1 Modellvorstellungen biologischer Filme

Die ersten Modelle von Biofilmen wurden 1976 zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen entwickelt, wobei sie versuchten, Vorgänge in Biofilmen in Festbettreaktoren zur Abwasserbehandlung zu beschreiben. Den Modellvorstellungen von Williamson und McCarty [50], La Motta [51] und Harris und Hansford [52] ist gemeinsam, dass sie von einem homogenen Biofilm, in dem die Bakterien gleichmäßig verteilt sind, ausgehen. Dieser Film mit nahezu glatter Oberfläche sitzt auf einer Aufwuchsfläche, dem Substratum, und wird von einem Flüssigkeitsfilm (Bulkphase) überspült. Der Stofftransport im Biofilm wird durch Diffusionslimitierung beeinflusst.

Diese Vorstellung eines Biofilms wurde über ein Jahrzehnt kaum weiterentwickelt. Erst 1989 erweiterten Characklis und Wilderer das bestehende Modell um einen Oberflächenfilm, der auf dem Basisbiofilm aufsitzt [53]. Der Biofilm wird in Volumenelemente aus fester und flüssiger

2. Grundlagen

Phase eingeteilt, denen bestimmte Prozesse zugeordnet sind. Dabei enthält der Oberflächenfilm einen wesentlich größeren Anteil an flüssiger Phase als der Basisfilm und wird als Grenzfläche zur voll durchmischten Bulkphase hin betrachtet.

Durch die Einführung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) Anfang der 90er Jahre gab es eine wesentliche Änderung am Bild über Biofilme. Mit der CLSM war es möglich, Biofilme bis in eine Tiefe von mehreren hundert Mikrometern zu betrachten, wodurch neuartige Erkenntnisse über Aufbau, Zusammensetzung und Struktur von Biofilmsystemen gewonnen wurden. Biofilme konnten nun nicht mehr als stets homogene Systeme mit glatten Oberflächen gesehen werden, da sie durchaus auch sehr heterogene Strukturen mit Poren und Kanälen aufweisen können. Es wurde gezeigt, dass ein Großteil der Bakterien in Zellhaufen angesiedelt ist und der Stofftransport neben Diffusion auch durch Konvektion erfolgen kann. Costerton et al. entwickelten 1994 aufgrund dieser Beobachtungen das „Mushroom“-Modell, in dem die Zellhaufen der Bakterien als pilzartige Strukturen dargestellt sind [54]. Eine etwas abweichende Vorstellung wird von Keevil et al. 1995 veröffentlicht, in der gestapelte Bakterienhaufen auf einem Basisfilm aufwachsen [55].

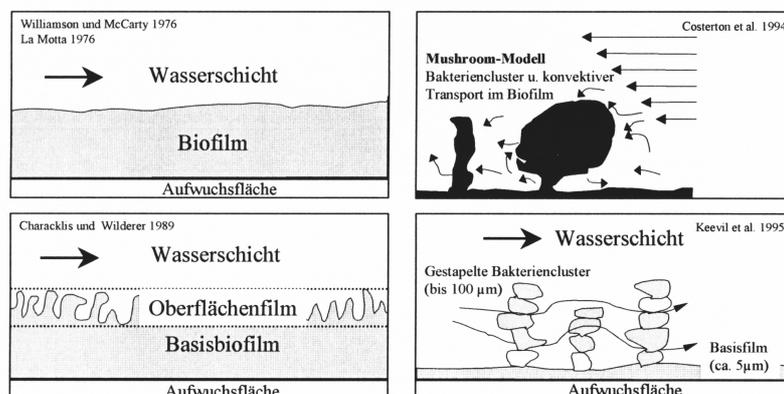


Abb. 5: Modellvorstellungen von Biofilmsystemen. Aus Wäsche 2002 [47].

Die Morphologie von Biofilmen ist teilweise speziesspezifisch und stark von physikalischen Faktoren wie Hydrodynamik, Substratversorgung oder Beschaffenheit des Substrats abhängig. Neue Beobachtungen wie der Einfluss von Quorum Sensing, extrazellulärer DNA oder aktive Ausbreitungsmechanismen der Bakterien erweitern immer mehr das gesammelte Wissen

über das Wachstum und Verhalten von Biofilmen. Es ist jedoch schwierig, die einzelnen Erkenntnisse im Gesamtsystem einzuordnen und die Ursachen emergenter Eigenschaften durch die Komplexität hindurch zu erkennen.

Eine Möglichkeit, um essentielle Elemente oder Wirkzusammenhänge für die Ausbildung der emergenten Eigenschaften von Biofilmsystemen zu begreifen, bieten mathematische Modelle.

2.4.2 Mathematische Biofilmmodelle

Bei einem mathematischen Modell eines Systems werden die Wechselwirkungen zwischen den Systemvariablen mathematisch formuliert [48]. Der Vorteil der mathematischen Modellierung von Biofilmen besteht in der Möglichkeit zur variablen Verknüpfung verschiedenster Parameter und physikalischer Eigenschaften von Biofilmen. Dadurch können Hypothesen zu Biofilmen mit zum Teil sehr komplexen Strukturen und Prozessen relativ schnell auf numerischem Wege getestet werden, während eine solche Untersuchung an realen Biofilmen im Labor häufig mehrere Monate dauern kann. Mit mathematischen Modellen können zusätzlich einzelne wechselwirkende Prozesse individuell berechnet und untersucht, sowie neue Annahmen und Strategien entwickelt werden [56]. Die gewonnenen Erkenntnisse können im Idealfall zu Voraussagen über das Verhalten von Biofilmsystemen führen und damit zur Aufklärung wichtiger Faktoren für die Ausbildung von emergenten Eigenschaften beitragen.

Zur Beschreibung von Biofilmsystemen wurden in den letzten Jahrzehnten diverse mathematische Modelle entwickelt, die sich bezüglich der Beschreibung von Biomassewachstum, -ausbreitung und -zerfall in die Kategorien *individuumbasierte* Modelle (IbM) und *biomassebasierte* Modelle einteilen lassen. IbMs beschreiben mikrobielle Gemeinschaften über einzelne Zellen als kleinste räumliche Einheiten, die eigenständig wachsen und sich zum Beispiel bei einer Teilung in Richtung der geringsten Überlappung mit anderen Einheiten bewegen [57]. Diese sehr detaillierte Beschreibung von Biofilmen, welche die Individualität und Variabilität der bakteriellen Zellen (wie seltene Mutationen) berücksichtigt, hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr lange Rechenzeiten selbst mit leistungsstarken Rechnern benötigt. Eine Weiterentwicklung dieser auf einzelnen Zellen basierenden Modellierung erfolgte mit dem partikelbasierten Modell [58]. Hierbei werden Biomassepartikel mit einer Größe zwischen 10µm und 20 µm als kleinste Einheiten de-

finiert. Diese Partikel repräsentieren den Charakter der Biomasseausbreitung noch mit ausreichend hoher Auflösung, die Modellierungen benötigen aber weniger Rechenaufwand. Mit IbMs lassen sich die Formierung komplexer Strukturen sowie die Produktion und Verteilung von EPS [59] und das Verhalten von koexistierenden Bakterienspezies [58] zwei- und dreidimensional darstellen. Allerdings können hier aufgrund der stochastischen Biomasseausbreitung die ablaufenden Prozesse nicht mit klassischen (Differential-)Gleichungen beschrieben werden.

Die *biomassebasierten* Modellierungen nutzen für die Beschreibung von makroskopischen Biomassebewegungen die Dichte oder Konzentration der Biomasse, also eine auf eine Volumeneinheit bezogene Masse der Zellen, als Zustandsgröße. Diese Modelle können in Bezug auf die Art und Weise der Biomasseausbreitung weiter in *diskrete* und *kontinuierliche* Modelle eingeteilt werden. In *diskreten* Modellen, wie den zellulären Automaten (CA), steht der wachsenden Biomasse nur eine begrenzte Zahl von Ausbreitungsrichtungen in zuvor in einem Gitter festgelegte Plätze, sogenannte Elementarzellen, zur Verfügung [60][61][62]. Mit diesen Modellen sind Struktur und Porösität von Biofilmen mehrdimensional darstellbar, jedoch lassen sich unter anderem aufgrund einer Vielzahl möglicher diskreter Regeln und der stochastischen Bewegung der Biomasse in die zur Verfügung stehenden Elementarzellen qualitativ sehr unterschiedliche und teilweise mehr willkürliche als reale Biofilmstrukturen schaffen [58]. Wie auch bei den IbMs können hier keine Differentialgleichungen für die Beschreibung der Prozesse aufgestellt werden.

Kontinuierliche Modelle dagegen betrachten die Biomasse nicht als diskrete Elemente, sondern als ein Kontinuum. Die Grundidee ist hierbei, dass durch das Wachstum der Bakterien ein Druckfeld im Inneren des Biofilms aufgebaut wird. Der ansteigende Druck ist die treibende Kraft für ein langsames und viskoses Fließen des Biofilms – es erfolgt eine Volumenvergrößerung mit einer bestimmten Geschwindigkeit. Das erste kontinuierliche Biofilmmodell war eindimensional und wurde 1986 von Wanner und Gujer [63] entwickelt. Trotz seiner räumlichen Eindimensionalität konnten mit diesem Modell grundlegende Erkenntnisse über komplexe Interaktionen verschiedener miteinander wechselwirkender Bakterienspezies in Biofilmen gewonnen werden. Durch die Einführung der kommerziellen Software AQUASIM entwickelte sich das Wanner- und Gujer-Modell im Laufe der Jahre zu einer Art Lehrwerkzeug für Ingenieure [64]. Neben vielen Ergänzungen und Abwandlungen wurden mehrdimensionale kontinuierliche

Modelle, wie das Diffusionsmodell, das den Ausbreitungsmechanismus der Biomasse über nicht-lineare Diffusion beschreibt [65], oder das Fluid-Modell, welches die Biomasse als ein homogenes, viskoses und inkompressibles Fluid mit konstanter Dichte annimmt [66], erst über ein Jahrzehnt später entwickelt. Der große Vorteil der kontinuierlichen Biofilmmodelle liegt darin, dass die ablaufenden Prozesse auf bekannten physikalischen Gesetzen basieren und mit Differentialgleichungen beschrieben werden können. Sobald also die Anfangsbedingungen feststehen, sind die Modellgleichungen vollständig lösbar, wodurch die Modellierung sehr genau definiert wird. Durch die relative mathematische Einfachheit ist der Rechenaufwand geringer als bei anderen Modellierungsarten. Außerdem kann die Abhängigkeit des entwickelten Modells von bestimmten Parametern relativ leicht untersucht werden. Aufgrund des Kontinuums ist es möglich, die Prozesse auch im großvolumigen Maßstab zu simulieren [56].

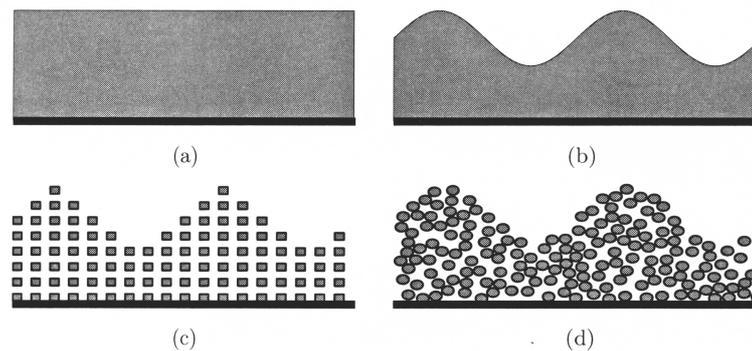


Abb. 6: Schematische Darstellung verschiedener mathematischer Biofilmmodelle. (a) eindimensionales kontinuierliches Modell; (b) kontinuierliches Modell (z. B. Fluidmodell); (c) zellulärer Automat; (d) individuumbasiertes Modell. Aus Alpkvist 2005 [64].

2.4.3 Mathematische Modellierung mit AQUASIM

Das Programm AQUASIM wurde für die Identifizierung und Simulation aquatischer Systeme, wie Seen, Reaktoren oder Biofilme entwickelt. Es bietet mehrere Möglichkeiten für die Erstellung komplexer Modelle mit Parameteranpassungen und Sensitivitätsanalysen. Für die Beschreibung von Biofilmsystemen liegt der Software das kontinuierliche Modell von Wanner und Gujer aus dem Jahre 1986 zugrunde [63], welches 1996 von Wanner und Reichert erweitert wurde [67]. Da dieses Modell eindimensional ist, finden Wachstums- und Transportprozesse nur

senkrecht zum Substratum statt. Trotz dieser Einschränkung lassen sich Biofilme im Reaktormaßstab meist ausreichend genau beschreiben, da zum Beispiel für die Darstellung von Stofftransportvorgängen oder -umsatzraten die exakte räumliche Verteilung der Mikroorganismen nicht bekannt sein muss [58]. Neben den im vorhergehenden Kapitel genannten allgemeinen Vorteilen kontinuierlicher Modelle erlaubt dieses Programm eine einfache Einbindung experimentell ermittelter Daten für die Validierung des zu erstellenden Modells.

2.4.3.1 Grundlagen des Biofilmmodells von AQUASIM

Um einen Biofilm in einem Rohrreaktor mit AQUASIM darstellen zu können, bietet die Software das „biofilm reactor compartment“ auf Basis des Biofilmmodells von Wanner und Reichert als Grundlage. Ein „biofilm reactor compartment“ ist dabei in vier Zonen eingeteilt, die schematisch in Abb. 7 zusammen mit den in ihnen ablaufenden Transportprozessen dargestellt sind [68]:

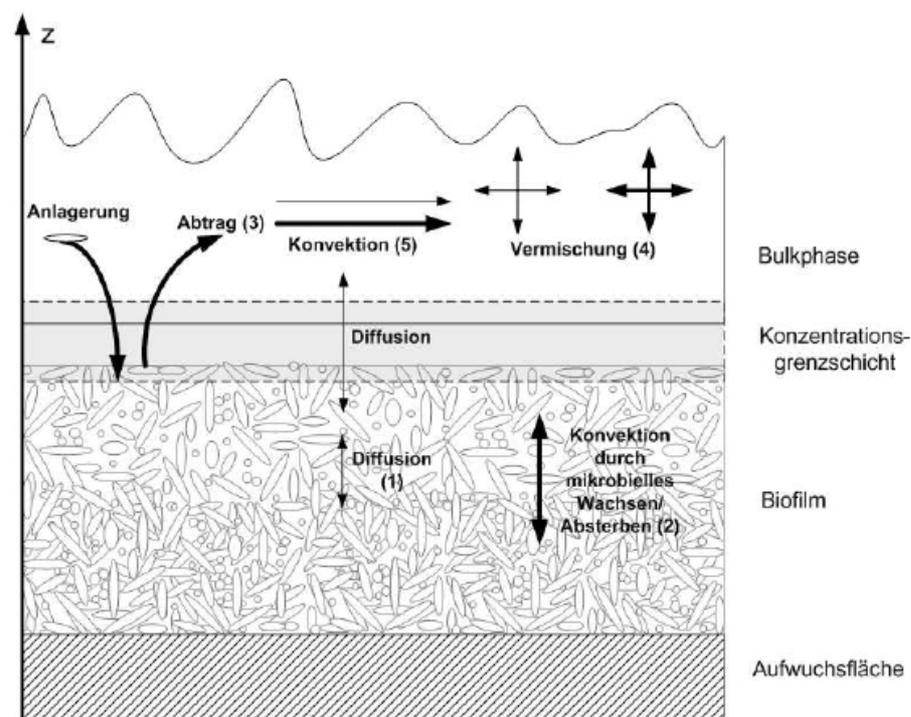


Abb. 7: Schematische Darstellung der Zonen und Transportprozesse im „biofilm reactor compartment“ von AQUASIM. Dicke Pfeile repräsentieren den Transport partikulärer Substanzen, dünne Pfeile stehen für den Transport gelöster Substanzen. Aus Möhle 2004 [68].

1. Die Aufwuchsfläche (das Substratum). Sie bildet eine nichtpermeable Barriere, auf der der Biofilm aufliegt. In ihr finden keinerlei Transportprozesse statt.
2. Der Biofilm. Er ist aus einem flüssigen Anteil mit dem Volumenelement ε_l und einem festen Anteil mit dem Volumenelement ε_s zusammengesetzt.

Der flüssige Anteil enthält gelöste Stoffe, wie zum Beispiel Substrat. Der feste Anteil setzt sich aus den Komponenten der partikulären Bestandteile wie aktive Biomasse, inerte Biomasse und EPS zusammen. Die Summe der Anteile entspricht Eins:

$$\varepsilon_l + \sum_{i=1}^n \varepsilon_{s,i} = 1 \quad (2.6)$$

wobei sich eine Komponente des festen Anteils aus der Biomassekonzentration X_i des partikulären Bestandteils und seiner jeweiligen Trockendichte $\rho_{X,i}$ ergibt:

$$\varepsilon_{s,i} = \frac{X_i}{\rho_{X,i}} \quad (2.7)$$

Die Massenbilanz der gelösten Stoffe im Biofilm ist durch folgende Differentialgleichung gegeben:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\frac{\partial j_i}{\partial z} + r_i \quad (2.8)$$

Hierbei wird die zeitliche Änderung der Stoffkonzentration über die örtliche Änderung der Massenstromdichte j_i und der Prozessrate r_i für die gelöste Komponente i beschrieben. Über r_i können weitere Prozesse in das Modell eingebunden werden, andernfalls nimmt sie den Wert 0 an.

Die Massenstromdichte j_i des gelösten Stoffes i wird über den diffusiven Stofftransport (Abb. 7(1)), wie er in der klassischen Filmtheorie stattfindet, mit dem ersten Fick'schen Gesetz beschrieben:

$$j_i = -D \cdot \frac{\partial c_i}{\partial z} \quad (2.9)$$

An der Substratum/Biofilm-Grenzfläche ($z=0$) erhält der Konzentrationsgradient aufgrund der angenommenen Nichtpermeabilität des Substratums als Randbedingung den Wert 0. Der Übergang vom Biofilm zur Bulkphase wird durch die Konzentrationsgrenzschicht dargestellt.

3. Die Konzentrationsgrenzschicht. In ihr wird die Massenstromdichte über den Stoffübergangskoeffizienten β beschrieben:

$$j_i = \beta \cdot (c_{Bulk,i} - c_{Filmoberfläche,i}) \quad (2.10)$$

wodurch der Konzentrationsgradient der gelösten Stoffe an der Biofilmoberfläche ($z=L_F$, mit L_F als Biofilmdicke) ebenfalls von β abhängig wird.

4. Die Massenbilanz der partikulären Stoffe im Film berechnet sich analog zu den gelösten Substanzen. Der sich ergebende Massenfluss resultiert aus einer konvektiven Geschwindigkeit (Abb. 7(2)), die sich aus der Volumenänderung des Biofilms in z -Richtung aufgrund von Wachstums- oder Absterbeprozessen ergibt. Die Wachstumsgeschwindigkeit kann zusätzlich durch An- und Abtrag von Biomasse (Abb. 7(3)) aus bzw. in die Bulkphase beeinflusst werden.
5. Die Bulkphase. Sie ist komplett durchmischt (Abb. 7(4)). Sie stellt den Flüssigkeitsfilm über dem Biofilm dar, in dem zusätzlich auch konvektive Stofftransportprozesse gelöster und partikulärer Stoffe (Abb. 7(5)) stattfinden können.

In diesem Kapitel wurden nur die zum Verständnis dieser Arbeit nötigen Grundlagengleichungen von AQUASIM beschrieben. Eine ausführliche Schilderung der Annahmen des Biofilmmodells wurde von Wanner und Gujer (1989) [69] gegeben.

2.5 Künstliche Biofilme

Für die Untersuchung von Stofftransportvorgängen in Biofilmen - speziell der Transport von Quorum Sensing Signalen - in Abhängigkeit der Hydrodynamik im Rohrreaktor, soll das Bakterium *Vibrio fischeri* verwendet werden. Es eignet sich aufgrund seiner Lichtproduktion als direkte Folge seiner Quorum Sensing Aktivität, wodurch sich ein messbarer Parameter für Einflüsse auf die Signalmoleküle ergibt.

Vibrio fischeri ist jedoch kein natürlicher Biofilmbildner an fest/flüssig-Grenzflächen. Um dieses Bakterium trotzdem für die Untersuchung verwenden zu können, soll es in eine Matrix eingebettet und als künstlicher Biofilm in einen Rohrreaktor eingebracht werden.

Ein künstlicher Biofilm hat gegenüber einem natürlichen Biofilm den Vorteil, dass seine Eigenschaften ziemlich genau definiert werden können. Seine Beschaffenheit ist dabei gut reproduzierbar und kaum Schwankungen unterlegen.

2.5.1 Polymernetzwerke und Gele

Um einen künstlichen Biofilm herstellen zu können, müssen zunächst einige Überlegungen zur Beschaffenheit der Matrix, in welche die Bakterien eingebettet werden sollen, gemacht werden.

Eine Einbettung von Bakterien erfolgt im allgemeinen in Gele. Gele besitzen viskoelastische Eigenschaften und bestehen aus einem Netzwerk von makromolekularen Ketten, die untereinander verknüpft sind. Die Vernetzung der Polymere kann dabei auf chemischem oder physikalischem Wege erfolgen.

Gele aus chemisch vernetzten Polymeren, wie Polyacrylamid, entstehen durch Ausbildung von kovalenten Bindungen bei chemischen Reaktionen. Diese Gele weisen eine hohe Stabilität auf, jedoch ist der Reaktionsprozess häufig exotherm oder läuft unter Radikalbildung ab, was oft toxisch auf die eingebetten Bakterien wirkt [70].

Bei den Netzwerken aus physikalisch vernetzten Polymeren wird meist ein Gel-Sol-Übergang gefunden. In Abhängigkeit von der Temperatur oder der Menge an zugeführtem Lösemittel bilden diese Polymere ein Gel, können aber ohne Zerstörung der einzelnen Polymerketten in den

Sol-Zustand, d.h. in den flüssig-Zustand, überführt werden [70]. Zu diesen Polymeren zählen die natürlichen gelbildenden Polysaccharide wie Alginat, Carrageenan, Chitosan, Agarose oder Gelatine. Alginat, Carrageenan und Chitosan sind ionotrope Gele, da sie erst durch eine Quervernetzung mit mehrwertigen Kationen oder Anionen in den Gel-Zustand überführt werden können. Agarose und Gelatine bilden dagegen bei Raumtemperatur feste Gele und sind nur oberhalb bestimmter Temperaturen flüssig.

Bei den genannten natürlichen Polymeren handelt es sich um Hydrogele, da ihre Netzwerke in Wasser dispergiert sind.

2.5.2 Die Auswahl der Gele

Die Auswahl der verwendeten Gele für die Herstellung der künstlichen Biofilme erfolgt nach denjenigen Gel-Charakteristika, die die Eigenschaften einer natürlichen EPS-Matrix möglichst gut wiedergeben.

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, besteht die EPS in natürlichen Biofilmen zu einem großen Teil aus Polysacchariden und anderen Polymeren und kann bis zu 98% Wasser enthalten. Für die Netzbildung in der EPS sind physikalische Bindungen verantwortlich. Diese bestehen aus den Wechselwirkungen zwischen den makromolekularen Ketten, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräften und Coulomb-Wechselwirkungen. Kovalente Bindungen sind hingegen nicht am Zusammenhalt der EPS-Matrix beteiligt [8]. Weiterhin werden folgende Anforderungen an die Gelsubstanzen gestellt:

- geringe Löslichkeit in Wasser
- geringe Abbaubarkeit durch Bakterien oder chemische Substanzen
- hohe mechanische Stabilität
- hohe Diffusionsmöglichkeit niedermolekularer Substanzen wie Nährstoffe
- keine Toxizität

Außerdem sollte das Immobilisierungsverfahren einfach und im Labor durchführbar sowie die Kosten gering sein. Diese Anforderungen werden am ehesten durch natürliche Polymer-Hydrogele erfüllt.

2.5.2.1 Alginat

Alginat ist ein lineares, unverzweigtes Polysaccharid, das vorwiegend aus der Intrazellulärmatrix von Braunalgen, zum Teil aber auch aus einigen Bakterien wie *Pseudomonas*-Spezies, gewonnen wird [71]. Alginate bestehen aus sich meist abwechselnd wiederholenden Blöcken von 1,4 verknüpfter β -D-Mannuronsäure und 1,4 verknüpfter α -L-Guluronsäure. Der genaue Anteil der jeweiligen Säuren ist vom Organismus und der Art des Gewebes, aus dem das Alginat isoliert wurde, abhängig [72].

Feste wasserunlösliche Alginatgele erhält man durch Zugabe von zweiwertigen Ionen (außer Mg^{2+}) zu einer Natrium-Alginatlösung. Die Quervernetzung erfolgt dabei durch den Austausch der Na^+ -Ionen im Alginatsalz durch die zweiwertigen Ionen. Eine Zugabe von EDTA, Phosphaten oder ähnlichen Komplexbildnern führt zu einer Herauslösung der zweiwertigen Ionen aus dem vernetzten Alginat. Die so behandelten Alginatgele sind wieder wasserlöslich.

2.5.2.2 Chitosan

Chitosan ist ein natürliches Polyaminosaccharid, welches chemisch durch Deacetylierung von Chitin hergestellt wird. Chitin ist Hauptbestandteil des Exoskeletts vieler Arthropoden wie Insekten oder Krebstieren, kommt aber auch bei Zooplankton und in den Zellwänden verschiedener niederer und höherer Pilze vor. Zygomyceten sind als einzige Pilze in der Lage, neben Chitin auch Chitosan zu synthetisieren [73].

Chemisch gesehen ist Chitosan ein lineares Polymer aus β -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten. Durch die bei der Deacetylierung entstandenen freien Aminogruppen verhält sich Chitosan in Lösung mit Säure wie ein Polykation. Eine Vernetzung des Polymers zur Überführung in den Gelzustand wird durch Zugabe von Phosphationen erreicht [74].

2.5.2.3 Agarose

Agarose ist ein Polysaccharid, welches vor allem aus marinen Rotalgen der Gattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen wird. Agarose ist Hauptbestandteil von Agar. Seine chemische Struktur besteht aus alternierend auftretenden Einheiten von β -1,3-verknüpfter D-Galaktopyranose und α -1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro-L-Galaktopyranose [75] (Abb. 8). Durch die Aneinanderreihung dieser Einheiten bildet Agarose lange Polymerketten mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 120 kDa. Diese Polymerketten können in Abhängigkeit von der Herkunft der Agarose noch einen unterschiedlich hohen Anteil an Methyl-, Sulfat-, Pyruvat- und anderen geladenen oder ungeladenen Gruppen enthalten.

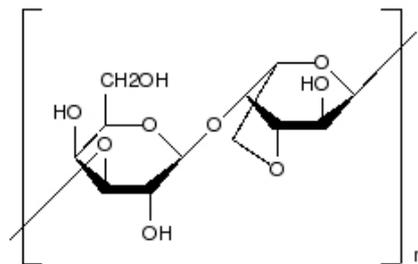


Abb. 8: Agarose-Einheit

Im Gegensatz zu Alginat und Chitosan benötigt Agarose für die Gelbildung keine Anwesenheit von Kationen oder Anionen. Stattdessen ist die Gelierung der Agarose temperaturabhängig. Für eine flüssige Agaroselösung muss die Agarose zunächst aufgeschmolzen werden. Die Verfestigung zum Gel erfolgt durch die Abkühlung der Lösung, wobei die Geltemperatur stark vom Methylierungsgrad der Agarose beeinflusst wird.

3. Material und Methoden

3.1 Ausgangsmaterialien

3.1.1 Chemikalien

CaCl ₂	Merck
Chitosan (MMW)	Fluka
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Merck
Einbettmedium Neg-50	Richard-Allan Scientific
Eisessig CH ₃ COOH	Roth
Glycerin	gespendet von Solvay Alkali Dtl., Hannover
Hefeextrakt	Difco
Na ₂ CO ₃	gespendet von Solvay Alkali Dtl., Hannover
NaCl	gespendet von Solvay Alkali Dtl., Hannover
NaH ₂ PO ₄	gespendet von BK Giulini Chemie, Ludwigshafen
NaHCO ₃	gespendet von Solvay Alkali Dtl., Hannover
Na ₄ P ₂ O ₄	Riedel-de Haën
NaOH	gespendet von Solvay Alkali Dtl., Hannover
Na ₂ SO ₃	Riedel-de Haën
K ₂ HPO ₄	gespendet von Chem. Fabrik Budenheim
MgSO ₄	gespendet von Hoechst AG
Standard-I-Nährbouillon	Merck
Xanthan	Fluka

3.1.2 Lösungen und Puffer

3 %ige NaCl-Lösung:	30,0 g	NaCl	auf 1 l milli-Q Wasser
CaCl-Lösung:	5,0 g	CaCl ₂	auf 100 ml milli-Q Wasser
Polyphosphatlösung:	1,5 g	Na ₄ P ₂ O ₄	auf 100 ml milli-Q Wasser
Carbonatpuffer pH 10:	2,64 g	NaCO ₃	
	2,09 g	NaHCO ₃	auf 1 l milli-Q Wasser

3.1.3 Farbstoffe

Fuchsin	Kraemer & Martin
SYTO 60	Invitrogen
FITC-gebundenes Concanavalin A (ConA) aus der Schwertbohne	Sigma
FITC-gebundenes Peanut Agglutinin (PNA) aus der Erdnuss	Sigma

3.1.4 Geräte

Digitalkamera	Zeiss AxioCam MRc
Fotosonde	TAOS TSLB257
Heizung	Lauda E100
Kryotom	Microm HM 550
Magnetrühr-/ Heizplatte	IKA RCT basic
Membranpumpe	Schego optimal
Mikroelektrode	Unisense Ox/O
Mikromanipulator	Unisense MM83-14
	Mikrometerschraube: Oriol Encoder Mike 18269
	Steuereinheit: Oriol Encoder Mike Controller 18011

Mikroskope	Zeiss Axioskop 33274 für CLSM: Leica TCS SP
Photometer	Unicam Helios alpha WTW PhotoLab S12
Picoampermeter	Unisense PA2000
Pipetten	Eppendorf
Sauerstoffelektrode	WTW OxiCal-SL Steuereinheit: WTW Oxi 597-S
Schreiber	NGI Servogor 122 DC
Schüttelschrank-Inkubator	Sartorius Certomat BS-1
Thermoreaktor	WTW CR 3000
Trockenschrank	Heraeus B 6060 F
Waagen	Sartorius BP 3100 P Sartorius BP 210 D
Wasserbad-Schüttler	GFL 1086
Zahnradpumpen	IWAKI MDG-R15P Meredos
Zentrifugen	Heraeus Biofuge pico Heraeus Biofuge stratos

3.1.5 weitere Materialien

- CSB 1500 (C2/25)-Kit von WTW
- Schleifpapier von Meister
- Silberstahl, Aluminium und Polycarbonat für den Bau einer Immobilisierungsapparatur

3.1.6 Bakterienstamm

Für diese Arbeit wird das marine Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* DSM 7151 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) Braunschweig verwendet.

3.1.7 *Vibrio fischeri*-Medien

Medium 1	30,0 g/l	NaCl
	5,3 g/l	NaH ₂ PO ₄
	1,9 g/l	K ₂ HPO ₄
	0,1 g/l	MgSO ₄
	0,5 g/l	(NH ₄) ₂ HPO ₄
	3,0 ml/l	Glycerin (99%)
	5,0 g/l	Bacto Pepton
	0,5 g/l	Hefeextrakt
Medium 2	25,0 g/l	Standard I Nährboullion
	24,0 g/l	NaCl

Die Medien werden mit milli-Q Wasser angesetzt, auf pH 7,5 korrigiert und für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Für sämtliche Versuche wurde Medium 1 verwendet. Medium 2 wurde nur bei den Immobilisierungsversuchen von *V. fischeri* in Alginat eingesetzt.

3.2 Angewandte Methoden

3.2.1 Kultivierungsbedingungen für *Vibrio fischeri*

Die Anzucht und Kultivierung von *Vibrio fischeri* wird in Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Die Inkubation erfolgt dabei je nach Versuchsbedingungen in 100 oder 500 ml Erlenmeyerkolben bei 27 °C und 100 U/ min im Schüttelschrank-Inkubator.

3.2.2 Validierung der Modellparameter mit Versuchen im Erlenmeyerkolben

3.2.2.1 Messung der Leuchtaktivität

Zunächst wird die Leuchtaktivität der Bakterien während einer normalen Batch-Kultivierung im 500 ml Erlenmeyerkolben untersucht. Hierfür werden 200 ml Medium mit 1 ml einer *Vibrio fischeri*-Kultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, angeimpft und über 2 Tage inkubiert. Während dieser Zeit wird die Lichtemission der Bakterien kontinuierlich detektiert.

Die Lichtintensitätsmessungen erfolgen mit einer Fotosonde TSLB257 von TAOS (Abb. 9). Sie enthält einen Sensor, der speziell für die Detektion von Licht im blauen Spektralbereich geeignet ist. Sie ist hoch sensitiv und gibt das detektierte Signal als Spannung aus, welche mit einem Schreiber (NGI Servogor 122 DC) aufgezeichnet wird (Abb. 10).

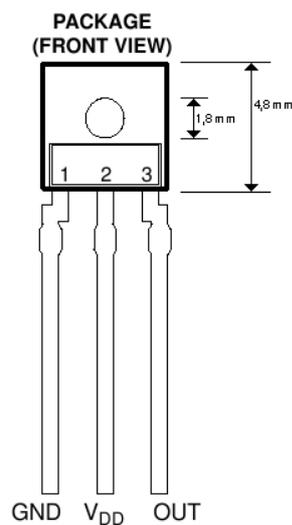


Abb. 9: Fotosonde TSLB257 von TAOS [<http://taosinc.com/images/product/document/TSLx257-E13.PDF>].

Die Fotosonde wird mittels Unterlegscheiben in einem Abstand von 4 mm zum Glasboden an der Unterseite des Erlenmeyerkolbens fixiert. Dieser Abstand wird auch bei den Lichtintensitätsmessungen am Rohrreaktor eingehalten.

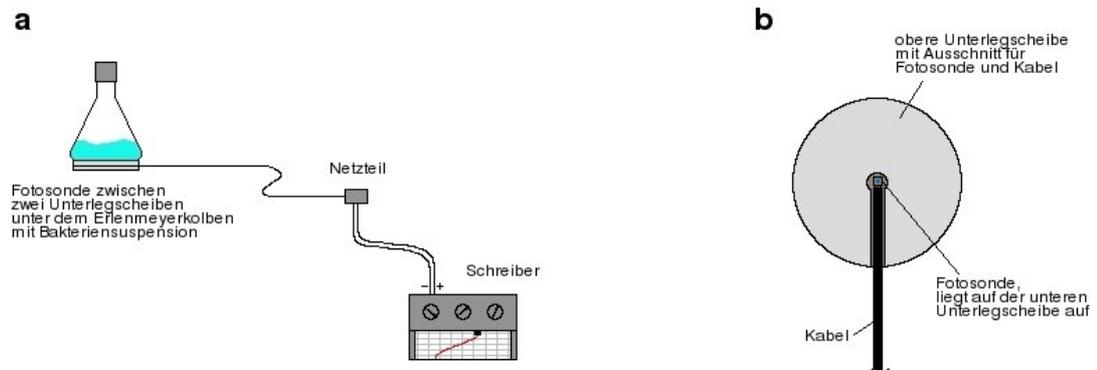


Abb. 10: a) Versuchsaufbau für Lichtemissionsmessungen am Erlenmeyerkolben. b) Fixierung der Fotosonde zwischen den Unterlegscheiben

Um eine Störung der Lichtemissionsmessungen durch Tageslicht zu vermeiden, werden über die Erlenmeyerkolben im Schüttelschrank mit Alufolie umwickelte Messbecher gestülpt. Der Schüttelschrank selbst muss ebenfalls komplett abgedunkelt sein.

Im Verlauf der Kultivierung wird parallel zur Lichtemissionsmessung in bestimmten Zeitabständen je 1 ml Bakteriensuspension aus der Kultur entnommen und für die Bestimmung der Zellzahl sowie des Substratverbrauchs vorbereitet.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der Leuchtbakterien wird über die optische Dichte (OD) der Suspensionskultur bestimmt. Die entnommenen Proben werden dafür mit einem Photometer bei 600 nm vermessen. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht dabei etwa $1,61 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml. Die Zellzahl pro Volumeneinheit wurde durch Auszählung der Bakterien mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer ermittelt. Da die Bakterien beweglich sind, wurden zur Auswertung die sich in den Auszählquadraten befindenden Bakterien mit einer Kamera fotografisch festgehalten.

Als Nullabgleich wird eine 3 %ige NaCl-Lösung eingesetzt, welche auch zur Verdünnung der Proben verwendet wird, falls deren OD-Wert über 0,4 liegt. Höhere OD-Werte korrelieren nicht mehr linear mit der Zellzahl.

3.2.2.3 Ermittlung des Substratverbrauchs

Der Substratverbrauch der Bakterien wird über den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) der im Suspensionsüberstand enthaltenen Komponenten ermittelt. Hierfür wird das CSB 1500 (C2/25)-Kit von WTW verwendet. Zunächst werden die Proben für 15 min bei 13000 U/ min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wird dieser 15-fach verdünnt, um eine Messstörung aufgrund des hohen Chlorid-Ionen-Gehalts des Mediums zu vermeiden. Je 2 ml der verdünnten Proben werden nun entsprechend der Gebrauchsanleitung in die Reaktionsküvetten pipettiert, für zwei Stunden bei 148 °C im Thermoreaktor gekocht und nach dem Abkühlen mit dem PhotoLab-Photometer vermessen. Bei der Oxidationsreaktion entsteht je nach Gehalt an oxidierbaren Bestandteilen der Probe eine Farbänderung in den Reaktionsküvetten, die spezifisch für die Menge der oxidierten Substanzen ist. Als Referenz werden zusätzlich milli-Q Wasser sowie unbeimpftes, frisches Medium vermessen.

3.2.2.4 Einfluss von Signal-Molekülen auf die Lichtemission

C6-HSL-Zugaben während einer Batchkultivierung

Zu *V. fischeri*-Kulturen, die auf eine optische Dichte von 0,3 gewachsen sind, werden zum selben Zeitpunkt verschiedene Konzentrationen von C6-HSL gegeben. Diese Bakterienkulturen sind noch nicht lumineszent, sollten jedoch den gleichen physiologischen Zustand besitzen. Hierfür werden sie aus einer gemeinsamen Vorkultur entnommen und zu je 25 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Nach Zugabe der C6-HSL werden die Ansätze unter normalen Bedingungen im Schüttelschrank weiterkultiviert und ihre Lichtemission über die Fotosonde detektiert. Da nur eine Sonde zur Verfügung steht, werden die Kolben etwa jede Viertelstunde wechselnd vermessen, so dass der Verlauf der vom Schreiber aufgezeichneten Kurven nachkonstruiert werden kann.

In einem weiteren Versuch, analog zum oben beschriebenen, werden zu Bakterienkulturen mit einer OD von 0,5 verschiedene C6-HSL-Mengen hinzugefügt. In Tab. 3 sind die zugegebenen Mengen an C6-HSL aufgelistet.

Tab. 3: Zugabe unterschiedlicher C6-HSL-Mengen zur Batch-Kultur

Optische Dichte, bei der die C6-HSL-Zugaben erfolgten	Menge C6-HSL [$\mu\text{mol/l}$]	entspricht Menge C6-HSL [ng/ml]
OD = 0,3	0,500	0,107
	1,000	0,213
	25,000	5,325
	100,000	21,300
	500,000	106,500
OD = 0,5	0,050	0,011
	0,075	0,016
	0,100	0,021
	0,250	0,053
	0,500	0,107
	1,000	0,213
	25,000	5,325
	100,000	21,300
	1173,000	250,000

Einfluss eines Mediumwechsels auf die Lichtproduktion während einer Batchkultivierung

Bei einer OD von 1,5 wird eine stark lumineszierende 200 ml *V. fischeri*-Kultur für 5 min bei 6000 U/min abzentrifugiert, anschließend das Zellpellet mit 3 %iger 27 °C warmer NaCl-Lösung gewaschen und wiederum für 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes werden die Zellen in 200 ml frischem 27 °C warmen *V. fischeri*-Medium resuspendiert und unter normalen Bedingungen weiterkultiviert. Die Lichtemission wird während der Kultivierung sowohl vor als auch nach dem Mediumwechsel über die Fotosonde aufgenommen.

3.2.3 Herstellung einer Alginatlösung

Eine 2 %ige Alginatlösung wird durch Einrühren von 2 g Natrium-Alginatpulver in 100 ml milli-Q Wasser angefertigt, bis dieses sich vollständig gelöst hat. Die Quervernetzung des Natrium-Alginats zum festen Gel erfolgt augenblicklich bei Kontakt der Natrium-Alginatlösung mit CaCl_2 -Lösung.

Für eine Einbettung von *Vibrio fischeri* wird das Natrium-Alginatpulver in 3 %iger NaCl-Lösung anstelle von milli-Q Wasser gelöst. Der pH-Wert wird anschließend mit NaOH auf

pH = 7,5 eingestellt. Die Bakterien werden 5 min bei 6000 U/min aus der Suspensionkultur abzentrifugiert und können nach Entfernung des Überstandes direkt mit wenig Alginatlösung resuspendiert werden. Die resuspendierten Zellen werden anschließend in die Alginatlösung eingerührt. Blasenbildung ist zu vermeiden.

3.2.4 Herstellung einer Chitosanlösung

Zur Herstellung von 100 ml einer 2 %igen Chitosanlösung werden 2 g Chitosanpulver in 100 ml milli-Q Wasser gegeben. Unter Rühren auf einem beheizten Magnetrührer fügt man 750 µl Eisessig hinzu, so dass sich das Chitosan auflöst. Der Auflösevorgang wird durch Kochen der Lösung für eine halbe Stunde unter stetem Rühren beschleunigt. Zum Entfernen von Verunreinigungen und nicht löslichen Bestandteilen wird die Chitosanlösung nach dem Abkühlen für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert.

Für eine Einbettung von *Vibrio fischeri* sollte die gebrauchsfertige Chitosanlösung einen pH-Wert von 7,3 bis 7,5 aufweisen, um ein Absterben der Bakterien durch ein zu saures Gel zu vermeiden. Eine Regulation des pH-Wertes der Chitosanlösung ist durch Lösen des Chitosanpulvers in 100 ml Carbonatpuffer pH 10 anstelle von Wasser möglich.

Durch Kontakt der Chitosanlösung mit Polyphosphatlösung erfolgt eine Vernetzung des Chitosans, die jedoch im Vergleich zu Alginat relativ langsam von statten geht.

Im Falle einer Einbettung von *Vibrio fischeri* in Chitosan wird sowohl die Chitosanlösung wie auch die Vernetzungslösung mit 3 %iger NaCl-Lösung anstelle von milli-Q Wasser angefertigt. Die Bakterienzellen werden für 5 min bei 6000 U/min abzentrifugiert. Aufgrund der hohen Viskosität der Chitosanlösung wird das Zellpellet zunächst in einem geringen Volumen 3 %iger NaCl-Lösung resuspendiert, bevor die Zellen mit der Chitosanlösung gründlich, jedoch unter Vermeidung von Blasenentstehung, vermischt werden.

3.2.5 Herstellung einer Agaroselösung

Eine 2 %ige Agaroselösung wird hergestellt, indem 2 g Agarose in 100 ml milli-Q Wasser (für eine Einbettung von *V. fischeri* in 100 ml 3 %iger NaCl-Lösung) aufgeköcht werden, bis sich die

Agarose vollständig gelöst hat. Bevor die bei 6000 U/min für 5 min abzentrifugierten und in wenig 3 %iger NaCl resuspendierten Bakterienzellen in die Agaroselösung gegeben werden können, muss diese auf mindestens 42 °C abgekühlt werden. Eine Absenkung der Temperatur auf unter 36 °C führt jedoch bei der verwendeten Agarose bereits zu einer Verfestigung. Das Dispergieren der Bakterien erfolgt anschließend auf einem Magnetprüher. Blasenbildung ist zu vermeiden.

3.2.6 Ermittlung des Einflusses von Hitze auf die Lichtemission

50 ml Bakteriensuspension werden bis zu einer OD von 2,0 kultiviert. Die Suspension wird auf zwei Zentrifugenröhrchen zu je 25 ml aufgeteilt, anschließend für 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert und der Überstand in je einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Zellpellets werden in je 1 ml 3 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und in die folgendermaßen vorbereiteten Erlenmeyerkolben gegeben:

Ein Erlenmeyerkolben enthält frisches Medium mit einer Temperatur von 27 °C. Nach Zugabe der resuspendierten Zellen eines Röhrchens werden diese gründlich mit dem Medium vermischt und ihre Leuchtaktivität als Referenz im Schüttelschrank bei 100 U/min vermessen.

Das frische Medium im zweiten Erlenmeyerkolben wird im Wasserbad auf eine Temperatur von 42 °C gebracht. Hierhinein werden die resuspendierten Zellen des zweiten Röhrchens gegeben und für zehn Sekunden bei 42 °C geschüttelt. Anschließend wird die Suspension in einem Eisbad schnellstmöglich auf 27 °C abgekühlt und die Leuchtaktivität der Bakterien unter den gleichen Bedingungen wie bei der Referenz detektiert.

Bei dieser Versuchsdurchführung haben in beiden Erlenmeyerkolben die Bakterien den gleichen physiologischen Zustand als Ausgangslage und die Reaktion auf Hitze kann gut beobachtet werden.

3.2.7 Mikroskopische Untersuchung des künstlichen Biofilms

Zur Untersuchung der Zellverteilung und Struktur der produzierten künstlichen Biofilme werden zwei verschiedene mikroskopische Verfahren angewandt. Für eine Untersuchung mit dem

Durchlichtmikroskop werden gefärbte Gefrier-Dünnschnitte angefertigt, für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) können die Biofilmproben ohne weitere Vorbehandlung mit Lektinen oder Nukleinsäurefarbstoffen markiert werden.

3.2.7.1 Anfertigung von Kryoschnitten für die Durchlichtmikroskopie

Für eine Untersuchung im Durchlichtmikroskop wird eine Probe des Biofilms zunächst für 2 min mit einer Fuchsinlösung (1,2 % in 96 % Ethanol) gefärbt und anschließend etwa 5 min mit reichlich Wasser zur Entfernung des Alkohols und des überschüssigen Farbstoffs gewaschen. Die gefärbte Probe wird nun für etwa eine Stunde mit Einbettmedium vollständig bedeckt, um ein späteres Einreißen des Films bei der Herstellung der Dünnschnitte zu verhindern.

Für die Anfertigung der Schnitte wird auf dem Objektischlein des Kryotoms zunächst eine dünne Schicht Einbettmedium aufgebracht und leicht angefroren, so dass das Einbettmedium nur noch auf der Oberfläche flüssig ist. Auf dieser wird dann das gefärbte Präparat mit zusätzlichem Einbettmedium so ausgerichtet und eingefroren, dass die Filmprobe senkrecht auf dem Objektischlein steht. Nachdem das Präparat vollständig durchgefroren ist, wird es mit bei -20 °C in 20 µm dicke Scheiben geschnitten. Die mikroskopische Untersuchung mit dem Durchlichtmikroskop sollte möglichst bald nach Anfertigung der Schnitte erfolgen, um ein Verblässen der Fuchsinfärbung zu vermeiden.

3.2.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Für die CLSM-Aufnahmen wird der künstliche Biofilm in den von R. Möhle entwickelten Rohrsegmenten mit herausnehmbaren Halbschalen hergestellt. Die Markierung und Mikroskopie des Biofilms erfolgt dabei direkt in den herausgenommenen Halbschalen, wobei die Proben vor Licht geschützt werden müssen, um eine Zerstörung der Farbstoffe zu vermeiden. An die Lektine sind FITC-Fluorochrome gebunden, die mit einem Argon Laser bei 488 nm angeregt werden und grünes Licht emittieren. Der Nukleinsäurefarbstoff wird mit einem Helium/-Neon Laser bei 633 nm angeregt und emittiert rotes Licht. Da die Lichtemissionsspektren somit weit genug auseinander liegen, kann eine parallele Mikroskopie der Lektin- und Nukleinsäuremarkierungen durchgeführt werden.

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgt mit den Programmen JImageAnalyzer und ConAn. Eine detaillierte Beschreibung zur Auswertung von CLSM-Bilddaten wurde von Staudt 2005 [76] gegeben.

Lektinmarkierung

Für eine Anfärbung der Agarose des künstlichen Biofilms werden 100 µl einer 1:10 in deionisiertem Wasser verdünnten Lektin-Lösung auf den Biofilm gegeben und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Proben dreimal mit Leitungswasser gespült. Anschließend kann eine Nukleinsäuremarkierung erfolgen.

Nukleinsäuremarkierung

Zur Anfärbung der Bakterien wird der Farbstoff SYTO 60 verwendet, der spezifisch an DNA- und RNA-Moleküle bindet. Eine 1:1000 in deionisiertem Wasser verdünnte SYTO 60-Lösung wird dabei auf den Biofilm gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Probe mit Leitungswasser bedeckt und mikroskopiert.

3.2.8 Gravimetrische Zelltrockenmassebestimmung

Zur Ermittlung der Trockenmasse der Leuchtbakterien wird zunächst das Leergewicht von Zentrifugenröhrchen, welche für 12 h bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend für 1 Stunde im Exikator abgekühlt werden, bestimmt. Danach werden 10 ml einer *V. fischeri*-Kultur mit einer optischen Dichte von 1,0 in diese Zentrifugenröhrchen gefüllt und für 15 min bei 13000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbliebene Zellpellet für 24 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen der Röhrchen für zwei Stunden im Exikator werden diese erneut gewogen. Die Differenz aus dem Gewicht der Röhrchen mit getrockneten Zellen und dem Leergewicht ergibt die Trockenmasse der Zellen bezogen auf das Volumen. Wird diese Trockenmasse durch die Anzahl der Zellen geteilt, erhält man die Trockenmasse $m_{i, Zelle}$ einer einzelnen Zelle.

3.2.9 Mikroelektrodenmessung

Für die Validierung der Grenzschichtdicke im Modell sollen die Sauerstoffprofile im Biofilm mit einer Clark-Sauerstoffmikroelektrode bestimmt werden. Der Rohrreaktor mit 55 cm Länge wird hierfür in eine waagerechte Position gebracht. Das Vorgehen bei einer Mikroelektrodenmessung wurde bereits von Wäsche 2002 [47] ausführlich beschrieben. Nach Durchführung einer Zweipunkt-Kalibrierung wird die Mikroelektrode in 15-40 μm -Schritten, gesteuert über die Mess- und Regelungssoftware Profix 2.1 (Unisense), in den Biofilm hineingefahren. Nach jedem Schritt erfolgt eine Pause von fünf Sekunden, an deren Ende die Sauerstoffkonzentration gemessen wird. Die Messungen werden bei verschiedenen Reynolds-Zahlen durchgeführt.

Die Bestimmung der Grenzschichtdicke aus den aufgenommenen Sauerstoffprofilen erfolgt, ebenfalls wie von Wäsche beschrieben [47], über den quasilinearen Bereich der Profile.

3.2.10 Modellparameter

Für die mathematische Modellierung wurden die in Tabelle 4 angegebenen Parameter eingesetzt.

Die Parameter initiale Biomasse- und Substratkonzentration, maximale Wachstumsrate und Schwellkonzentration und Produktionsrate der Signalmoleküle wurden aus verschiedenen Batchversuchen (siehe Kapitel 4.1.1) bestimmt. Der Diffusionskoeffizient vom Signalmolekül C6-HSL wurde aus Diffusionskoeffizienten von C4- und C12-HSLs, die über die Wilke-Chang-Korrelation berechnet wurden [http://www.erc.montana.edu/biofilmbook/MODULE_04/Mod04_S02_Blue.htm], abgeschätzt. Der Ertragskoeffizient von Sauerstoff für das Batchmodell und der Diffusionskoeffizient von Wasser sind aus [68] entnommen worden.

Ein für die Modellierung des Biofilms grundlegender Parameter ist die Biomassekonzentration X . Sie beschreibt die Aktivität der im Biofilm vorhandenen Bakterien und wird über den Feststoffanteil ε_s und die Biofilmdichte ρ_X berechnet:

$$X = \varepsilon_s \cdot \rho_X \quad (3.1)$$

Tab. 4: Modellparameter

Parameter		eingesetzter Wert	Messwert
Sauerstoffsättigungskonzentration	$C_{O_2, sat}$	8 g/m ³	
initiale Signalmolekülkonzentration	$C_{AI, ini}$	0 g/m ³	
Signalmolekül-Schwellkonzentration	$C_{AI, schwell}$	100 µmol/l	
initiale Substratkonzentration	$C_{S, ini}$	11000 g/m ³	11000 g/m ³
initiale Konzentration der Enzyme für Lichtproduktion	$C_{LuxEnz, ini}$	0 g/m ³	
maximale spezifische Wachstumsrate	μ_{max}	0,35 h ⁻¹	0,31 h ⁻¹
Ertragskoeffizienten:			
Sauerstoff (Batchmodell)	Y_{X/O_2}	0,5 g/g	
Sauerstoff (Biofilmmodell)	Y_{X/O_2}	0,47 g/g	
Substrat	$Y_{X/S}$	1.4 g/g	
Halbwertskonstanten für das Wachstum:			
Substrat	K_S	5 g/m ³	
Sauerstoff	K_{O_2}	5 g/m ³	
Produktionsraten:			
Signalmoleküle Batchmodell	k_{AI}	0,01 µmol/(g·h·l)	0,011 µmol/(g·h·l)
Signalmoleküle Biofilmmodell	k_{AI}	10 µmol/(g·h·l)	
Enzyme für Lichtproduktion	k_{LuxEnz}	9,5·10 ⁵	
Korrekturfaktor für Leuchtaktivität	k_{LI}	9,5·10 ⁵	
Diffusionskoeffizienten:			
Sauerstoff	D_{O_2}	1,458·10 ⁻⁷ m ² /min	
C6-HSL-Signalmolekül	D_{AI}	3,958·10 ⁻⁸ m ² /min	
Dichte der festen Phasen im Biofilm:			
inaktive Agarose-Biomasse	$\rho_{X, Agarose}$	100000 g/m ³	100000 g/m ³
aktive Zell-Biomasse	$\rho_{X, Zellen}$	245161 g/m ³	245161 g/m ³
Feststoffanteile des Biofilms:			
Agarose	$\epsilon_{s, Agarose}$	0,2	0,2
Zellen	$\epsilon_{s, Zellen}$	0,0248	0,0248
initiale Biomassekonzentration im Batchmodell	X_{ini}	456 g/m ³	456 g/m ³
initiale Verdünnung	Q_{mi}	100	
stationäre Biofilmdicke	LF_{stat}	5·10 ⁻⁴ m	

Im Gegensatz zu natürlichen Biofilmsystemen kann im künstlichen Biofilm die Zellzahl unabhängig von der restlichen Biofilmmatrix variiert werden, da keine Korrelation der Zellzahl mit der Agarosematrix besteht. In natürlichen Biofilmen hingegen bedingt die Zellzahl auch gleichzeitig Anteil und Zusammensetzung der EPS-Matrix.

Für dieses Modell ist es daher von Vorteil, zwei verschiedene Biomassekonzentrationen zu definieren:

$$1. \quad X_{\text{Agarose}} = \varepsilon_{\text{Agarose}} \cdot \rho_{X, \text{Agarose}} \quad (3.2)$$

$$2. \quad X_{\text{Zellen}} = \varepsilon_{\text{Zellen}} \cdot \rho_{X, \text{Zellen}} \quad (3.3)$$

Im Folgenden wird die Berechnung dieser Gleichungen genauer beschrieben. Zur Veranschaulichung wird hierfür ein Beispiel für einen künstlichen Biofilm mit immobilisierten Zellen von einer OD = 1, also $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³, durchgerechnet.

Berechnung der Biomassekonzentration X_{agarose} und des Feststoffanteils der Agarose $\varepsilon_{\text{Agarose}}$

Die **Biomassekonzentration** X_{Agarose} aus Gleichung 3.2 gibt das eingesetzte Trockengewicht der Agarose pro Volumeneinheit des Biofilms an:

$$X_{\text{Agarose}} = \frac{m_{t, \text{Agarose}}}{V} \quad (3.4)$$

Für ein 2 %iges Agarosegel werden 2 g Agarose in 100 ml milli-Q Wasser gelöst. Daraus ergibt sich für $X_{\text{Agarose}} = 20000$ g/m³.

Der **Feststoffanteil der Agarose** $\varepsilon_{\text{Agarose}}$ beschreibt den Anteil des Trockenvolumens der Agarose zum Gesamtvolumen des Biofilms. Da die Biofilmmatrix aus Agarosegel besteht, kann man den Feststoffanteil $\varepsilon_{\text{Agarose}}$ der Agarose auch als Trockenvolumen der Agarose pro Volumeneinheit des Agarosegels beschreiben. Das Trockenvolumen kann jedoch nicht über die Trockendichte berechnet werden, da diese für das Polymer nicht bekannt ist. Hier hilft eine von Rochas et al. [77] verfasste Arbeit zum Quellverhalten von Agarosegelen als Anhaltspunkt. Rochas et al. fanden heraus, dass Agarosegele um das 5-fache ihres Volumens reversibel eingetrocknet werden können und bei Flüssigkeitszufuhr wieder auf ihr Ausgangsvolumen aufquellen. Aus dieser Information kann man annehmen, dass ein trockenes Agarosegel etwa 20 % des Volumens von einem nicht getrocknetem, also normal feuchten Agarosegel einnimmt. Daraus ergibt sich für den Feststoffanteil der Agarose $\varepsilon_{\text{Agarose}} = 0.2$

Aus den Werten von Biomassekonzentration $X_{Agarose}$ und Feststoffanteil $\varepsilon_{Agarose}$ ergibt sich nun für die Biofilmdichte $\rho_{X, Agarose}$:

$$\rho_{X, Agarose} = \frac{X_{Agarose}}{\varepsilon_{Agarose}} = \frac{20000 \text{ g/m}^3}{0,2} = 100000 \text{ g/m}^3 \quad (3.5)$$

Berechnung der Biomassekonzentration X_{Zellen} und des Feststoffanteils der Zellen ε_{Zellen}

Die **Biomassekonzentration** X_{Zellen} aus Gleichung 3.3 berechnet sich über die Trockenmasse der Zellen pro Biofilmvolumeneinheit beziehungsweise über das Trockengewicht $m_{t,Zelle}$ einer einzelnen Zelle multipliziert mit der Zahl der Zellen pro Volumeneinheit des Biofilms.

$$X_{Zellen} = \frac{m_{t,Zelle} \cdot \text{Zellzahl}}{V} \quad (3.6)$$

Die Zelltrockenmasse $m_{t,Zelle}$ ist mit $0,38 \cdot 10^{-12}$ g pro Zelle gravimetrisch bestimmt worden (siehe Kapitel 4.1.1.2)

Für einen Biofilm mit $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³ ergibt sich daher:

$$X_{Zellen} = 0,38 \cdot 10^{-12} \text{ g} \cdot 1,6 \cdot 10^{10} \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = 6080 \text{ g/m}^3 \quad (3.7)$$

Der für Gleichung 3.3 ebenfalls benötigte **Feststoffanteil der Zellen** ε_{Zellen} im künstlichen Biofilm beschreibt den Anteil des Volumens, das die Zellen einnehmen, zum Gesamtvolumen des Biofilms. Der Volumenanteil der Zellen ergibt sich dabei aus dem Volumen einer einzelnen Zelle zusammen mit der pro Volumeneinheit des Biofilms immobilisierten Zellzahl:

$$\varepsilon_{Zellen} = \frac{V_{Zelle} \cdot \text{Zellzahl}}{V} \quad (3.8)$$

Das Volumen einer *Vibrio fischeri*-Zelle wird in der Literatur mit $1,0\text{-}1,2 \text{ }\mu\text{m} \times 1,5\text{-}1,7 \text{ }\mu\text{m}$ angegeben [78]. Der Mittelwert des Volumens einer einzelnen lebenden Zelle ergibt sich zu $V_{Zelle} = 1,55 \text{ }\mu\text{m}^3$.

3. Material und Methoden

Der Feststoffanteil in einen Biofilm mit $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³ liegt demnach bei:

$$\varepsilon_{Zellen} = 1,55 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \cdot 1,6 \cdot 10^{10} \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = 0,0248 \quad (3.9)$$

Aus den für einen Biofilm mit $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³ berechneten Werten von Biomassekonzentration X_{Zellen} und Feststoffanteil ε_{Zellen} ergibt sich für die Biofilmdichte $\rho_{X,Zellen}$:

$$\rho_{X,Zellen} = \frac{X_{Zellen}}{\varepsilon_{Zellen}} = \frac{6080 \text{ g/m}^3}{0,0248} = 245161 \text{ g/m}^3 \quad (3.10)$$

Alle weiteren Parameter wurden während der Modellierung angepasst.

Die in den Modellen verwendeten Prozesse sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 5: Prozessmatrix

Modell		Prozess	gelöste Komponenten				partikuläre Komponenten		Prozessrate r_i
Biofilmmodell	Batchmodell		c_{O_2}	c_S	c_{AI}	c_{LuxEnz}	X_{Zellen}	$X_{Agarose}$	
	x	Wachstum		$\frac{-1}{Y_{X/S}}$		k_{LuxEnz}	1		$\mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot X$
x		Atmung	$\frac{-1}{Y_{X/O_2}}$		k_{AI}		0		$\mu_{max} \cdot \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \cdot X$
x	x	Produktion der Signalmoleküle			1				$k_{AI} \cdot X_{Zellen}$
	x	Abbau der Enzyme für Lichtreaktion					-1; -1,6		$k_{LuxEnz, decay} \cdot c_{LuxEnz}$
x		Verdünnung der Signalmoleküle			1				$100000 \cdot (0,01 - c_{AI})$
x		Belüftung Bulkphase	1						$1000 \cdot (c_{O_2, soll} - c_{O_2})$

3.2.11 Lichtemissionsmessungen des künstlichen Biofilms im Rohrreaktor

Für die Versuche in einem Rohrreaktor wird der künstliche Biofilm nach der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode in einem Rohrsegment mit Sichtfenster angebracht. Die Bakterien werden dabei in einer mit 3 %iger NaCl-Lösung angesetzten 2 %ige Agaroselösung immobilisiert. Nach

3. Material und Methoden

der Immobilisierung wird das Rohrsegment mit Folie verschlossen und für eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Während dieser Zeit können sich die Bakterien vom Hitzeschock erholen.

Anschließend wird das den künstlichen Biofilm enthaltende Rohrsegment in einen senkrechten Rohrreaktor mit einem 25 cm langem Einlaufstück eingebaut. Die Fixierung der Fotosonde, welche mit Netzteil und Schreiber verbunden ist, erfolgt im Abstand von 4 mm über dem Sichtfenster. Für die Messung der Lichtemission muss der Reaktor komplett abgedunkelt werden, um Störungen der Messung durch von außen einfallendes Licht zu verhindern.

Das Medium wird aus einem 10 l Vorrat bezogen, voll belüftet und im direktem Kreislauf geführt. Dies ist möglich, da ein Versuch zur Lichtintensitätsmessung nicht länger als eine halbe Stunde dauert. Zudem ist die Verdünnung der von den Bakterien produzierten Signalmoleküle in 10 l Medium groß genug, um deren Anreicherung im Medium vernachlässigen zu können.

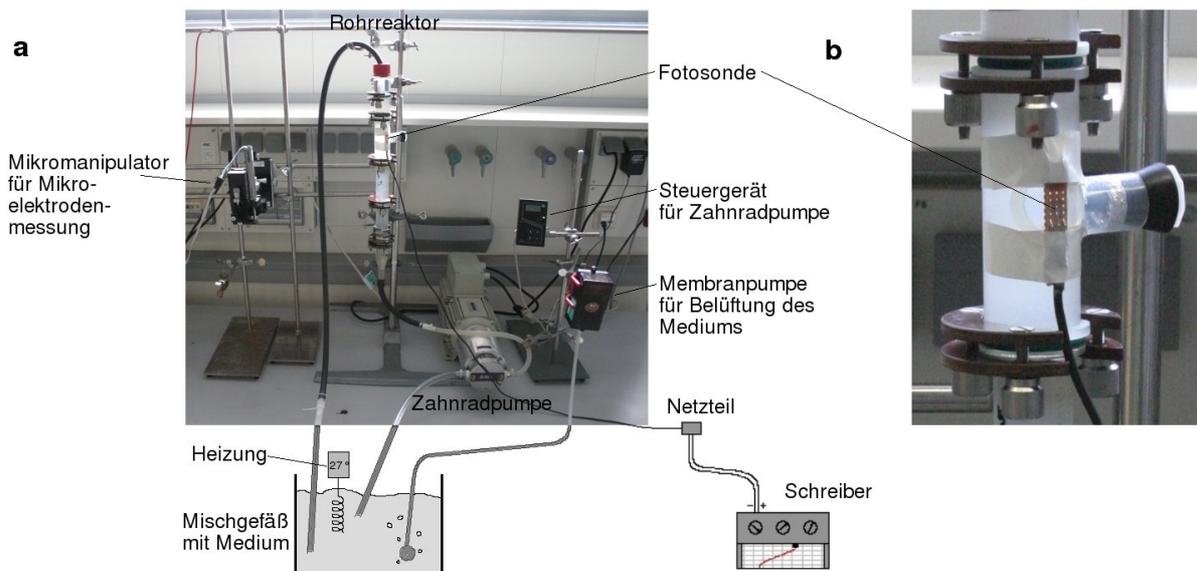


Abb. 11: a) Aufbau des Rohrreaktors. Für die Lichtemissionsmessung muss der Reaktor zusätzlich vollständig abgedunkelt werden. b) Rohrsegment mit angebrachter Fotosonde über dem Sichtfenster. Zu sehen ist außerdem der Überlaufstutzen für die Mikroelektrodenmessung.

Die Strömungsgeschwindigkeit des *V. fischeri*-Mediums durch den Reaktorreaktor wird über eine Zahnradpumpe gesteuert. Die Lichtemissionsmessung erfolgt kontinuierlich unter schrittweiser Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit.

3. Material und Methoden

Dieser Versuch wird bei verschiedenen Zellzahlen der im künstlichen Biofilm immobilisierten Bakterien durchgeführt.

In einem weiteren Versuch werden *V. fischeri*-Zellen mit einer optischen Dichte von 0.3 immobilisiert. Aus einem nur 1 l Medium enthaltenden Vorratsbehälter wird das Medium mit $Re = 1550$ im Kreislauf durch den Rohrreaktor geführt. Dem Medium werden $1,8 \mu\text{g/ml}$ C6-HSL zugesetzt und die Entwicklung der Lichtemission wird über die Fotosonde detektiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung der Leuchtbakterien im Batchverfahren zur Validierung der Parameter

4.1.1 Batchkultivierung und Leuchtaktivitätsmessung

Zunächst wurden die Leuchtbakterien in einem normalen Batchversuch im Erlenmeyerkolben kultiviert, um einen Eindruck über den Wachstumsverlauf der Bakterien, den Verlauf der Lichtemission und den Substratverbrauch zu bekommen.



Abb. 12: Kolben mit einer *V. fischeri*-Suspension bei voller Leuchtleistung der Bakterien

Die Messung der Lichtemission ergab dabei einen charakteristischen Verlauf der Lichtintensität mit Beginn der Lichtproduktion bei einer optischen Dichte von etwa 0,5 (Abb. 14). Das erste Intensitätsmaximum liegt etwa bei $OD = 1,7$, kurz gefolgt von einem zweiten, fast gleich großem Maximum. Danach, ab einer $OD \sim 2,0$ nimmt die Leuchtintensität rapide ab. Markant am Leuchtintensitätsabfall ist ein weiteres kleines Maximum bei einer $OD \sim 2,3$, dass bei allen

4. Ergebnisse und Diskussion

Messungen aufgetreten ist (siehe Abb. 13, Abb. 14). Ab einer optischen Dichte von etwa 2,5 leuchten die Bakterien nur noch schwach bis sie bei einer OD $\sim 3,0$ fast ganz aufhören, zu leuchten.

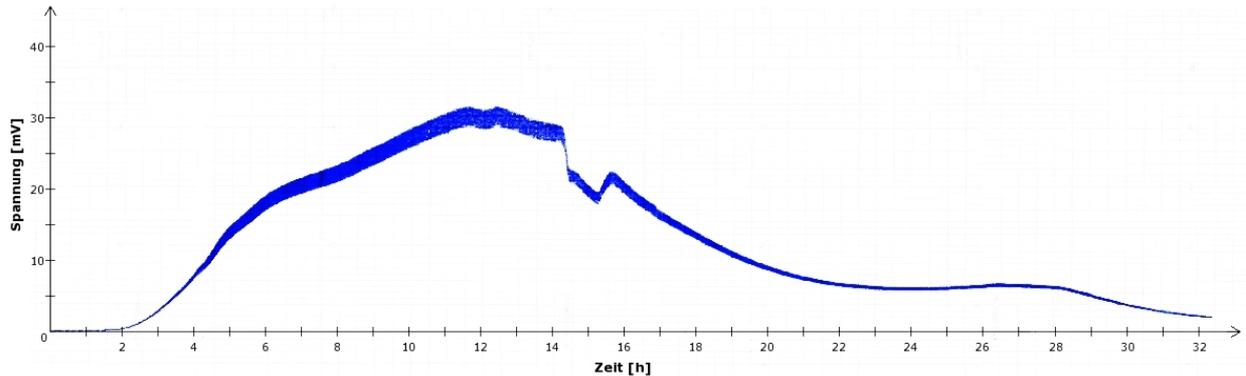


Abb. 13: Vom Schreiber aufgenommene Spannungskurve als Maß für die Leuchtaktivität von *V. fischeri*-Zellen in einer 200 ml Batchkultur

Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich zu Arbeiten von Nealson (1977) [79], Boettcher und Ruby (1990) [80] und Lupp et al. (2003) [29] einige Abweichungen im Verlauf der Lichtintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl. Zum einen wurde - über Auszählung von Plattenausstrichen mit Verdünnungen der Zellkultur - einer $OD_{600} = 1.0$ eine Zellzahl von etwa $3 \cdot 10^8$ Zellen/ml zugeordnet [80], während in dieser Arbeit die Zelldichte bei einer $OD_{600} = 1.0$ mit etwa $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml wesentlich höher ist. Der Beginn der exponentiellen Lichtproduktion liegt jedoch sowohl in dieser Arbeit als auch bei den erwähnten Arbeitsgruppen [79][80][29] bei einer OD um 0,8 (Vgl. Abb. 15 und Abb. 16). Zum anderen konnte mit der Fotosonde keine Lumineszenz bei einer $OD < 0,3$ beobachtet werden, die erst abfällt, bevor sie ab einer $OD \sim 0,5$ wieder ansteigt, wie bei [79][80][29] (Abb. 16). Der Abfall der Leuchtintensität bei niedrigen Zelldichten wird von Boettcher und Ruby [80] mit einem in komplexen Medien vorkommenden, nicht identifizierten Inhibitor erklärt, der im Verlauf des Wachstums der Bakterienkultur seine Wirkung verliert. In dieser Arbeit wurden die Kulturen ebenfalls mit 1 ml exponentiell gewachsener Zellen angeimpft, jedoch wurde ein anderes Medium und ein anderer *V. fischeri*-Stamm verwendet. Möglicherweise sind dies die Gründe, weshalb kein Leuchten bei sehr geringen Zelldichten zu beobachten war.

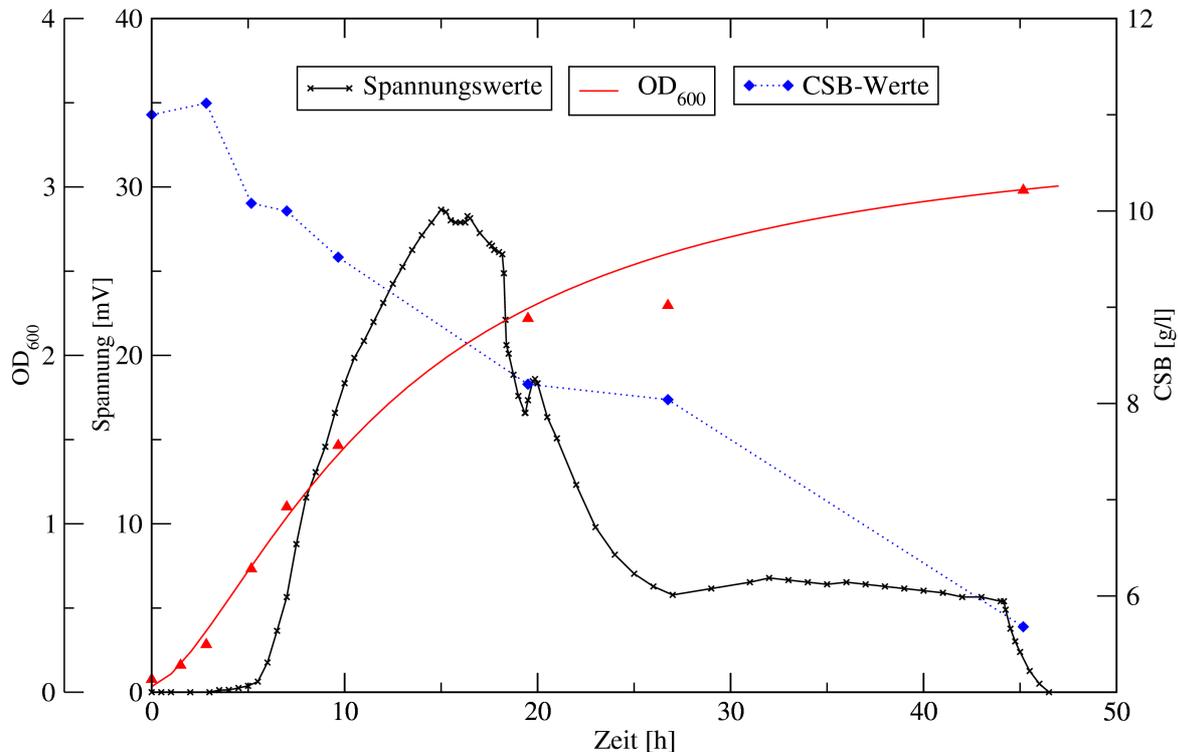


Abb. 14: Übertragene Werte der über die Zeit aufgenommenen Spannung zusammen dargestellt mit dem zeitlichen Verlauf der optischen Dichte (ermittelt über Regression mit einer sigmoidalen Kurve für logistisches Wachstum) und den gemessenen CSB-Werten

Die genannten Arbeitsgruppen führten außerdem keine kontinuierliche Lichtintensitätsmessungen während der Kultivierung durch, sondern entnahmen Proben aus den Bakterienkulturen, deren Lumineszenzstärke sie mit einem Photometer als Quanta/Sekunde detektierten.

Ein weiterer Unterschied ist, dass die in den von Neelson, Boettcher und Ruby und Lupp et al. verwendeten *V. fischeri*-Stämme auch bei einer $OD > 2,0$ noch stark leuchten.

Eine nahe liegende Erklärung für die Abnahme der Leuchtaktivität in dieser Arbeit würde eine Substratlimitierung bieten. Wie die Ergebnisse des Substratverbrauchstests jedoch zeigen, findet die Abnahme der Leuchtaktivität bereits statt, obwohl noch genügend oxidierbare Substanzen im

4. Ergebnisse und Diskussion

Kulturmedium vorhanden sind. Da das verwendete Medium jedoch aus komplexen Stoffen wie Pepton und Hefeextrakt zusammengesetzt ist, lässt sich allein aus den Ergebnissen des CSB-Tests nicht schließen, welcher Medienbestandteil für die Limitation der Lichtproduktion verantwortlich sein könnte.

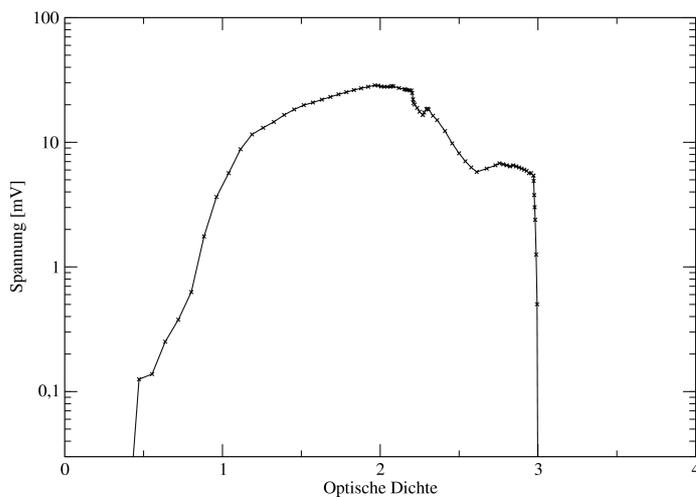


Abb. 15: Logarithmische Auftragung der Leuchtintensität als gemessene Spannung über der optischen Dichte

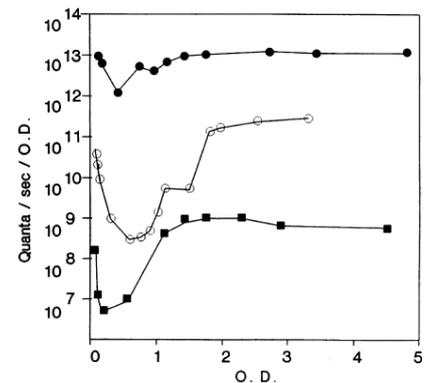


Abb. 16: Vergleich der Leuchtintensitäten unterschiedlicher *V. fischeri*-Stämme von Boettcher und Ruby (1990) [80]: MJ1 (gefüllte Kreise), B61 (leere Kreise) und ES114 (Quadrat).

Ein wesentlicher Hinweis auf die limitierende Substanz wird jedoch durch die Untersuchung des Einflusses zusätzlicher C6-HSL-Gaben zur Leuchtbakterienkultur geliefert. Wie in Abb. 17 zu sehen, bleibt bei Zugabe von größeren Mengen C6-HSL die maximale Leuchtintensität über einen größeren Zeitraum stabil, bevor sie langsam abnimmt. Auch erreicht die Lichtemission eine höhere Intensität, was bedeutet, dass die Zellen im Vergleich zu einem normalen Batchversuch bei der gleichen Zellzahl mehr Licht produzieren. Es lässt sich daraus schließen, dass der limitierende Faktor für die Lichtproduktion kein Bestandteil der ursprünglichen Medienzusammensetzung ist. Eher kann angenommen werden, dass die Lichtproduktion durch einen am Quorum Sensing beteiligten Stoff reprimiert wird. Ein möglicher solcher Stoff könnte das von

4. Ergebnisse und Diskussion

V. fischeri produzierte und ebenfalls am Lichtproduktionssystem beteiligte VAI-2 sein. Kuo et al. [37] nahmen bereits an, dass VAI-2 bei der Induktion der Lichtproduktion eine Rolle als kompetitiver Inhibitor spielt. Gegen eine inhibitorische Funktion von VAI-2 bei hohen Zelldichten spricht jedoch, dass ein derartiger Leuchtaktivitätsabfall ab einer OD ~ 2 von anderen Arbeitsgruppen nicht beobachtet wurde (siehe Abb. 16). Der Zusammenhang zwischen VAI-1, VAI-2 und der Leuchtaktivität ließe sich am besten durch Vergleich der über die Zeit produzierten Konzentrationen der beiden Signalmoleküle herstellen.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des Leuchtaktivitätsabfalls könnten Stoffwechselprodukte darstellen, die aus der metabolischen Aktivität der Bakterien und der Substratzusammensetzung des Mediums entstehen. Diese Stoffwechselprodukte könnten die Expression des LuxI-Operons über mehrere Wege negativ regulieren. Eine kompetitive Hemmung des LuxR-Rezeptors, also eine Verhinderung der Expression der Gene des LuxI-Operons durch Bindung des unbekannten Stoffes am aktiven Zentrum des LuxR-Rezeptors, ist aufgrund von einer wahrscheinlich recht geringen Strukturähnlichkeit zwischen dem VAI-1-Molekül und dem inhibierenden Stoff nicht anzunehmen. Kann der unbekannte Stoff jedoch an einer anderen Stelle am Rezeptor binden, könnte er durch leichte Konformationsänderung des aktiven Zentrums von LuxR zu einer verminderten Bindefähigkeit von VAI-1 an den Rezeptor führen (nicht-kompetitive Hemmung).

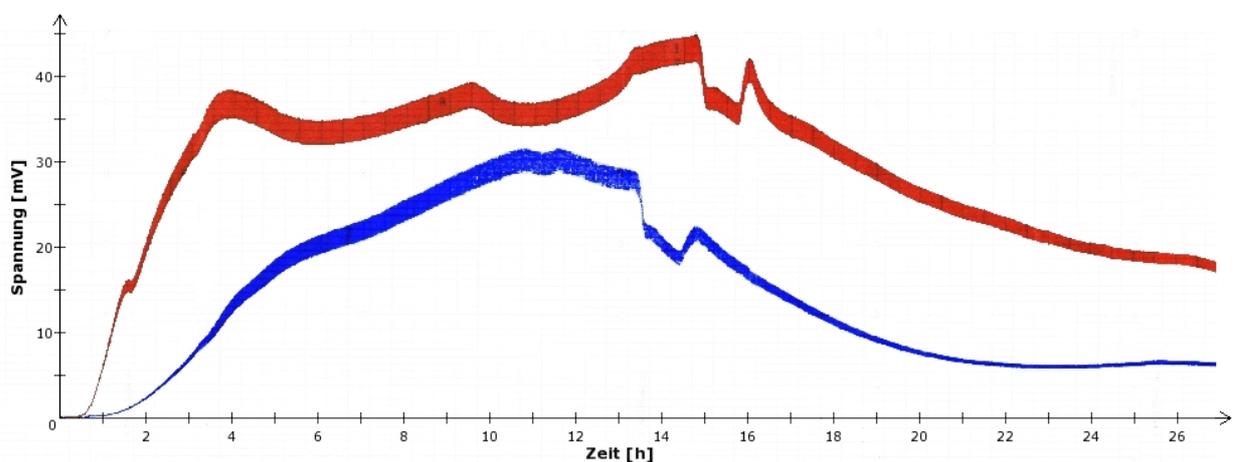


Abb. 17: Vergleich von einer Batchkultur mit (rot) und ohne (blau) Zugabe von 250 ng/ml C6-HSL zum Medium

4. Ergebnisse und Diskussion

Je konzentrierter der inhibierende Stoff aufgrund seiner kontinuierlichen Produktion im Kulturmedium vorkommt, umso stärker wird der Wettbewerb zwischen VAI-1 und Inhibitor und die Lichtproduktion nimmt ab. Die Zugabe größerer Mengen C6-HSL zum Kulturmedium würde diesem Effekt, wie in Abb. 17 zu sehen, entgegenwirken und zu einer verlängerten Leuchtaktivität führen.

Neben diesem direkten Einfluss auf die Lichtproduktion könnte der Stoff jedoch auch indirekt durch Aktivierung anderer Proteine in den Zellen (zum Beispiel durch Veranlassung ihrer Expression), die die Lichtproduktion reprimieren, wirken. Ähnlich dem unbekanntem Faktor „X“ nach dem Modell von Lupp et al. [29] (siehe Abb. 3) könnte ein solches aktiviertes Protein die Ableitung der Gene des LuxI-Operons negativ regulieren.

Inwieweit die im Medium enthaltenen Substanzen einen Einfluss auf die Lichtproduktion haben, wurde in einem Versuch mit Mediumwechsel bei voller Lichtproduktionsleistung untersucht. Aufgrund der freien Diffusion der Signalmoleküle durch die Zellmembran hindurch, konnten trotz eines Waschschrilles mit 3 %iger NaCl-Lösung vor Zugabe des frischen Mediums wahrscheinlich nicht alle Signalmoleküle entfernt werden. Die Zellen fangen im frischen Medium sofort mit der Lichtproduktion an. Mit dem Mediumwechsel sollten außerdem alle inhibierenden Stoffe im Medium entfernt worden sein. Trotzdem fällt die Leuchtaktivität nach Erreichen des Maximums ähnlich schnell ab, wie bei einer ununterbrochenen Batchkultivierung (Abb. 18).

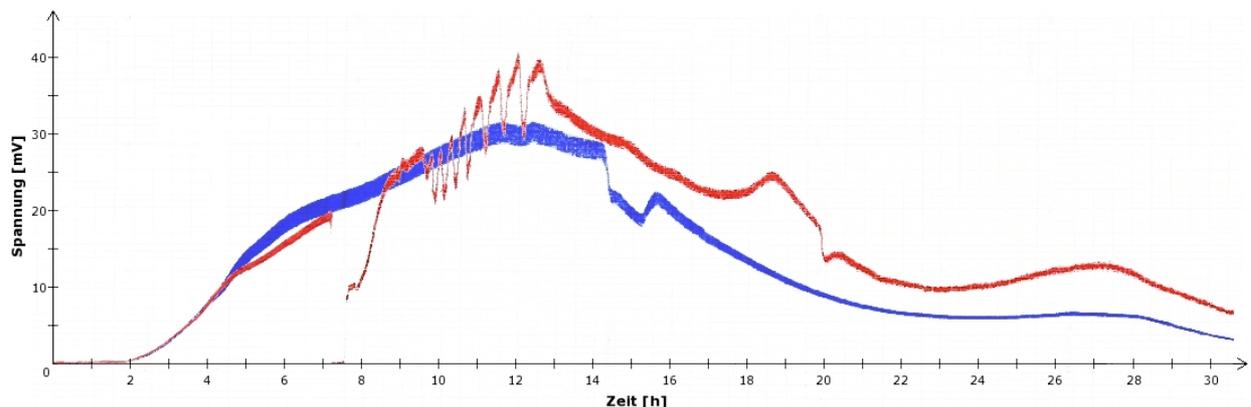


Abb. 18: Vergleich von einer Batchkultur mit Mediumwechsel nach sieben Stunden bei einer OD = 1,5 (rot) und ohne Mediumwechsel (blau)

4. Ergebnisse und Diskussion

Auffällig sind die Rückkopplungserscheinungen, die sich durch starkes Schwanken der Leuchtaktivität bei der Wiederaufnahme der vollen Leuchtleistung auszeichnen. Geht man davon aus, dass die leuchtaktivitätsinhibierende Substanz ein mediumspezifisches Stoffwechselprodukt ist, das ab einer bestimmten Phase während der Lichtproduktion entsteht und eine nicht-kompetitive Inhibierung auslöst, ließen sich diese Schwankungen erklären: Zum Zeitpunkt des Mediumwechsels befanden sich die Bakterien noch in der exponentiellen Wachstumsphase mit voller Stoffwechsel- und Lichtproduktionsleistung. Nach dem Mediumwechsel produzieren die Bakterien aufgrund der gleichgebliebenen Zelldichte das Licht zunächst mit maximaler Leistung weiter. Während der Lichtproduktion wird über einen von der Lichtproduktion abhängigen Stoffwechselweg aus einer Mediumkomponente eine Substanz gebildet, deren Konzentration durch die hohe Stoffwechselaktivität schnell zunimmt. Ab einem bestimmten Zeitpunkt ist diese Konzentration so groß, dass die Substanz mit den VAI-1 Molekülen um den LuxR-Rezeptor konkurrieren kann. Bindet der Inhibitor, so nimmt die Lichtproduktion ab, die Leuchtaktivität sinkt. Durch die Kopplung der Produktion des unbekanntes Inhibitors an die Lichtproduktion sinkt auch die Produktionsrate des Inhibitors und noch vorhandene Inhibitormoleküle diffundieren aus der Zelle. Im Medium und in der Zelle befinden sich allerdings noch so viele VAI-1-Moleküle, dass diese alsbald die Lichtproduktion wieder aktivieren können und durch den Mechanismus der positiven Rückkopplung [29] die Leuchtleistung steigern. Damit wird zwangsläufig auch die Produktion des Inhibitors gefördert, bis dieser erneut zur Abnahme der Lichtproduktion führt. Dieses Wechselspiel zwischen den VAI-1 und Inhibitormolekülen geht so lange, bis die Konzentration des stets aus der Zelle diffundierenden Inhibitors im Medium groß genug ist, um eine dauerhafte Repression der Lichtproduktion herbeizuführen. Die Konzentration des Inhibitors kann nicht mehr durch die Konzentration der VAI-1-Moleküle übertroffen werden, was zur stetigen Abnahme der Leuchtintensität führt. Bei dieser Hypothese wird zusätzlich angenommen, dass der inhibierende Stoff schneller durch die Zellmembranen aus der Zelle ins Medium, als wieder in die Zelle hinein diffundieren kann. Dies könnte das anfänglich ungehinderte Steigen der Leuchtaktivität sowie den schnellen Wiederanstieg der Lichtproduktionsleistung während der Schwankungen erklären.

Der Inhibitor hat jedoch keinen Einfluss auf das Modell des künstlich geschaffenen Biofilms mit immobilisierten *Vibrio fischeri*, da für die vorgesehenen Messungen die Messdauer relativ kurz

ist. Zudem wird sehr viel Medium verwendet, so dass die Verdünnung des Inhibitors zu groß ist, um sich auf die Lichtproduktion der Bakterien auszuwirken.

4.1.1.1 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate

Die Zunahme der Zellzahl mit der Zeit ist von der spezifischen Wachstumsrate μ und der Zahl der Zellen abhängig:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4.1)$$

Wird die Wachstumsrate μ aus dem exponentiellen Bereich der Wachstumskurve der Bakterien bestimmt, so entspricht die spezifische Wachstumsrate μ gleich der maximalen Wachstumsrate μ_{max} .

In der Wachstumskurve der *V. fischeri* (Abb. 14), die über eine Regression mit einer sigmoidalen Kurve für logistisches Wachstum ermittelt wurde, verdoppelt sich die optische Dichte im exponentiellen Bereich in 1,6 Stunden von OD = 0,25 auf OD = 0,5. Dies entspricht einer Erhöhung der Zellzahl von $0,4 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml auf $0,8 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml.

Die maximale Wachstumsrate μ_{max} berechnet sich daher zu

$$\mu = \mu_{max} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \frac{0,8 \cdot 10^{10} - 0,4 \cdot 10^{10}}{1,6 \text{ h}} \cdot \frac{1}{0,8 \cdot 10^{10}} = 0,31 \frac{1}{\text{h}} \quad (4.2)$$

4.1.1.2 Bestimmung der Signalmolekül-Schwellkonzentration

Über die Zugabe von unterschiedlichen Mengen an C6-HSL zu Batchkulturen verschiedener Zelldichten sollte die Schwellkonzentration der Signalmoleküle, ab welcher die Bakterien mit der Lichtproduktion beginnen, abgeschätzt werden. Die C6-HSL-Zugaben erfolgten bei optischen Dichten von OD = 0,3 und OD = 0,5. In Abb. 21 ist der Verlauf der Leuchtaktivitäten der Bakterien zu sehen.

Für die Vergleichbarkeit der aufgezeichneten Spannungswerte der Lichtemissionen wurden die Leuchtaktivitätswerte der Batchkulturen ohne C6-HSL-Zugabe bei Erreichen des Zellwachstums auf eine OD = 1,0 auf 100 % gesetzt. Die anderen Kurven sind im jeweiligen Verhältnis dazu

4. Ergebnisse und Diskussion

dargestellt. Dass ein Vergleich der Kurven auf diese Art möglich ist, zeigt die annähernde Deckungsgleichheit der roten und blauen Kurve ohne C6-HSL-Zugabe bei den verschiedenen optischen Dichten.

Aus Abb. 21 ist gut zu erkennen, dass bei einer optischen Dichte von 0,3 eine höhere Menge an C6-HSL zugegeben werden musste, um sich auf die Leuchtaktivität auszuwirken, als dies bei OD = 0,5 nötig war. Ohne Zugabe von AHL befinden sich die Bakterien bei einer OD = 0,3 im nicht lumineszenten Zustand.

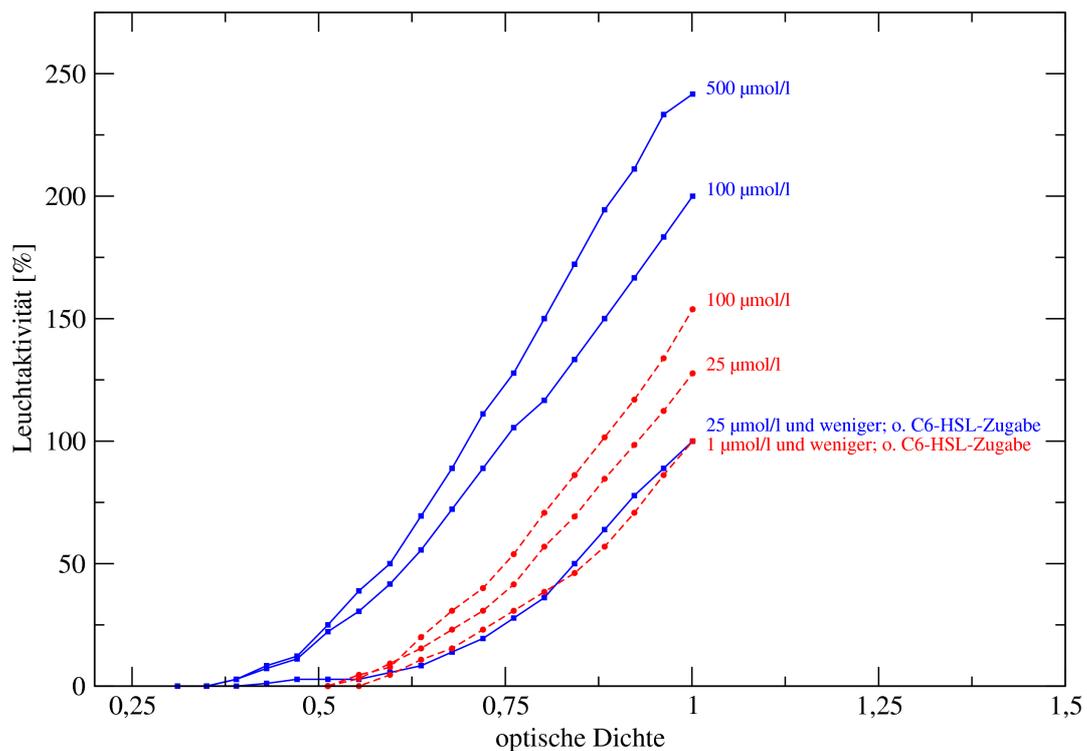


Abb. 19: Verlauf der Leuchtaktivität nach Zugabe von C6-HSL bei einer OD = 0,3 (blau) und bei einer OD = 0,5 (rot). Die den Kurvenverläufen zugehörigen Mengen an C6-HSL-Zugaben sind rechts neben den Kurven angegeben.

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei OD = 0,5 beginnt auch ohne Zugabe externer C6-HSL die Lichtproduktion. Das heißt, ab dieser Zelldichte ist natürlicherweise die Schwellkonzentration für eine verstärkte Produktion von Signalmolekülen erreicht. Bei OD = 0,3 reichten 100 µmol/l, nicht jedoch 25 µmol/l C6-HSL aus, um die Lichtproduktion zu starten. Die Schwellkonzentration an AHL für den Beginn der Lichtproduktion liegt demnach über 25 µmol/l. Zusätzlich ist die basale Produktion der Signalmoleküle so hoch, dass die Zugabe von einer Menge von 25 µmol/l zur OD = 0,3 bei Erreichen der Schwellkonzentration bei OD = 0,5 nicht mehr ins Gewicht fällt. Trotz der Zugabe der 25 µmol/l bei OD = 0,3 ist daher keine Vorverlegung des Beginns der Lichtproduktion erkennbar. Eine Zugabe von 100 µmol/l und 25 µmol/l zu OD = 0,5 rief eine verstärkte Leuchtaktivität hervor, was aber nicht mit 1 µmol/l möglich war.

Nach Luedeking-Piret kann die Biomasse-abhängige spezifische Produktionsrate k über

$$\frac{dP}{dt} = k \cdot X \quad (4.3)$$

bestimmt werden.

Aus der gravimetrischen Biotrockenmassebestimmung ergab sich ein Trockengewicht von 0,38 pg/Zelle. Dieser Wert stimmt relativ gut mit den von Bakken und Olsen (1982) [81] bestimmten durchschnittlichen Trockengewichten von 0,5 pg/Zelle für Bakterien ähnlicher Größen und Volumina, wie *V. fischeri* sie hat, überein. Zum Zeitpunkt des Erreichens der Schwellkonzentration bei OD = 0,5 ist die *V. fischeri*-Kultur in 3,7 Stunden auf eine Zellzahl von $0,8 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml gewachsen, woraus sich eine Biotrockenmasse von $X_{OD=0,5} = 3040 \text{ g/m}^3$ ergibt. Nimmt man nun eine Schwellkonzentration von 125 µmol/l (das entspricht etwa $0,026 \text{ g/m}^3$ C6-HSL) an, so ergibt sich für die Produktionsrate k_{AI} der Signalmoleküle:

$$k_{AI} = \frac{0,026 \text{ g}_{AI}/\text{m}^3}{3,7 \text{ h}} \cdot \frac{1}{3040 \text{ g}_{BTM}/\text{m}^3} = 2,33 \cdot 10^{-6} \frac{\text{g}_{AI}}{\text{g}_{BTM} \cdot \text{h}} = 0,011 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{g}_{BTM} \cdot \text{h}} \quad (4.4)$$

Eine Überprüfung des geschätzten Wertes der Schwellkonzentration durch Integration von Gleichung 4.3 ergibt, dass die Bakterienzellen in 2,4 Stunden, die sie zum Wachstum auf OD = 0,3 ($X_{OD=0,3} = 1824 \text{ g/m}^3$) benötigen, etwa 50 µmol/l Signalmolekül produziert haben. Dies stimmt mit den Kurven aus Abb. 21 gut überein: Mit Zugabe von 25 µmol/l C6-HSL zu den schon vorhandenen 50 µmol/l selbstproduzierten Signalmolekülen bei OD = 0,3 wird die Schwellkon-

zentration noch nicht erreicht. Gibt man hier 100 $\mu\text{mol/l}$ C6-HSL dazu, wird die Schwellkonzentration von 125 $\mu\text{mol/l}$ um etwa 25 $\mu\text{mol/l}$ überschritten und die Lichtproduktion beginnt. Ebenfalls um 25 $\mu\text{mol/l}$ wird die Schwellkonzentration bei Zugabe von 25 $\mu\text{mol/l}$ zur OD = 0,5 überschritten. Diese Überschreitung der Schwellkonzentration um jeweils den gleichen Wert ist in Abb. 21 sehr schön am gleichen Anstieg der im linearen Teil parallel verlaufenden blauen Kurve mit Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ bei OD = 0,3 und der roten Kurve mit Zugabe von 25 $\mu\text{mol/l}$ bei OD = 0,5 zu sehen.

4.2 Simulation der Signalmolekülproduktion im Schüttelkolben

Um den Zusammenhang zwischen der Produktion der Signalmoleküle und der Leuchtaktivität der Bakterien herzustellen, wurde eine Batchkultivierung der Leuchtbakterien modelliert. Die Anpassung der Parameter der Simulation erfolgte dabei auf Grundlage der experimentell gemessenen Werte für Leuchtaktivität, Biomassewachstum, Substratverbrauch, maximale spezifische Wachstumsrate und Schwellkonzentration der Signalmoleküle (siehe Tabelle 4)

Nach der Monod-Gleichung für ein durch Substratverbrauch limitiertes Zellwachstum steigt zunächst die Biomassekonzentration exponentiell an, bis sie bei Verbrauch des Substrates konstant bleibt (Abb. 20).

Im Gegensatz zu den gemessenen Werten erfolgt im Modell, bedingt durch die große spezifische Wachstumsrate, ein extrem hoher Substratverbrauch. Dadurch steigt die Biomassekonzentration, ähnlich den gemessenen Werten, rasant an. Sie kommt jedoch schon nach etwa 10 Stunden zu einem plötzlichen Stillstand, da hier das Substrat schon vollständig verbraucht ist. Die experimentell ermittelten CSB-Werte liegen zu diesem Zeitpunkt jedoch noch weit über 8000 g/m^3 . Wie schon in Kapitel 4.1.1 angesprochen, kann allein durch eine Bestimmung des CSB-Gehaltes im Medium das limitierende Substrat nicht ermittelt werden, was in diesem Modell nochmals deutlich wird.

Die Produktion der Signalmoleküle wurde im Modell Biomasse-gekoppelt implementiert. Dadurch steigt die Konzentration der Signalmoleküle zunächst exponentiell mit der Zunahme der Biomasse an. Ab dem Zeitpunkt, ab dem die Biomasse aufgrund des Substratmangels konstant

bleibt, also nach etwa 10 Stunden, steigt die Konzentration der Signalmoleküle bis zum Ende der Kultivierung nur noch linear an.

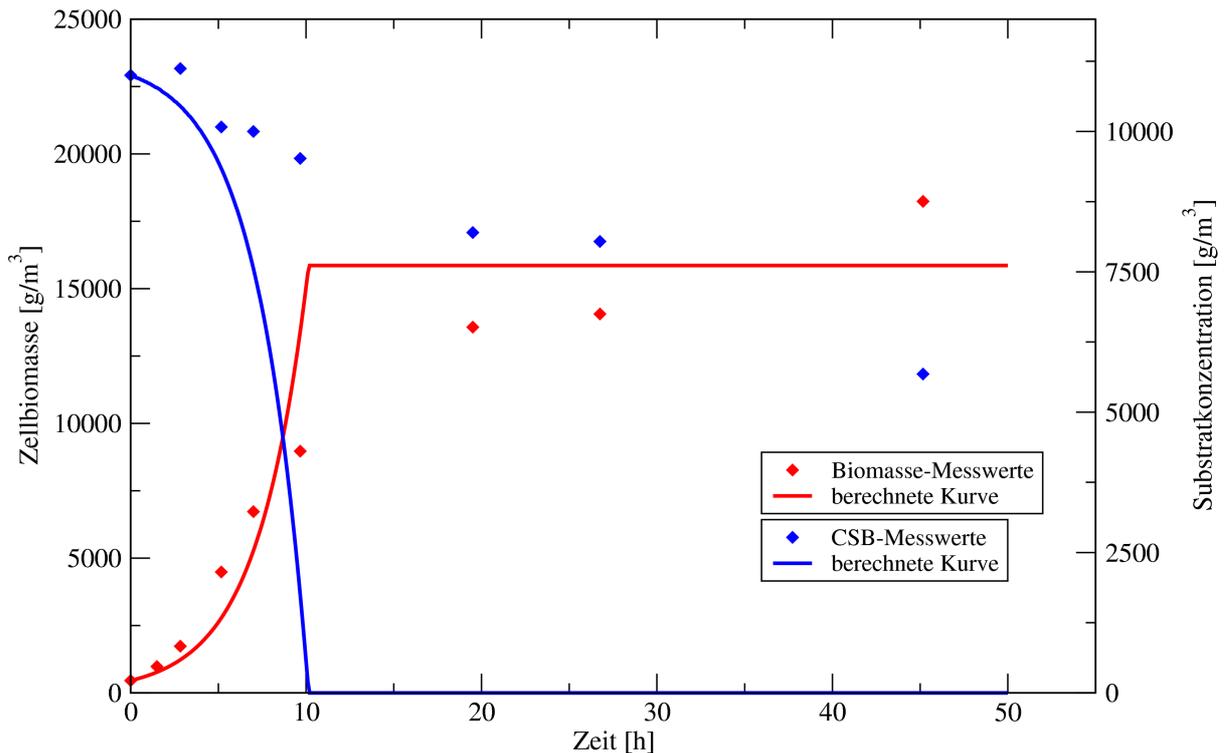


Abb. 20: Vergleich der gemessenen und simulierten Biomasse- und Substratkonzentrationen

Zur besseren Übersicht über die Änderung des Anstiegs der Signalmolekülkonzentration wurde in der Simulationsabbildung (Abb. 21) die Konzentration des Signalmoleküle nur bis zum Erreichen von $2000 \mu\text{mol/l}$ dargestellt. Nach 50 Stunden Kultivierungsdauer ist ihre Konzentration auf etwa $6800 \mu\text{mol/l}$ angestiegen.

Um den Verlauf der gemessenen Leuchtaktivität simulieren zu können, wird in das Modell zusätzlich ein Parameter für die Konzentration von Enzymen, die für die Lichtproduktion notwendig sind, integriert. Durch Definition eines Abbauprozesses dieser Enzyme während der Licht-

4. Ergebnisse und Diskussion

produktion kann der Abfall der Leuchtaktivität, wie er nach etwa 15 Stunden Batchkultivierung eingetreten ist, beschrieben werden. Dieses Vorgehen war nötig, da für eine Beschreibung einer nicht-kompetitiven Inhibierung durch Stoffwechselprodukte, wie sie in Kapitel 4.1.1 angenommen wird, zu viele nicht experimentell ermittelte Parameter für die Simulation des Leuchtaktivitätsabfalls angepasst werden müssten.

Die für die Lichtproduktion notwendigen Enzyme werden mit Beginn der Leuchtaktivität Zellwachstums-gekoppelt produziert. Ab Erreichen der Schwellkonzentration der Signalmoleküle von $100 \mu\text{mol/l}$ also steigt die Konzentration der Enzyme exponentiell mit dem Biomassewachstum (Abb. 21).

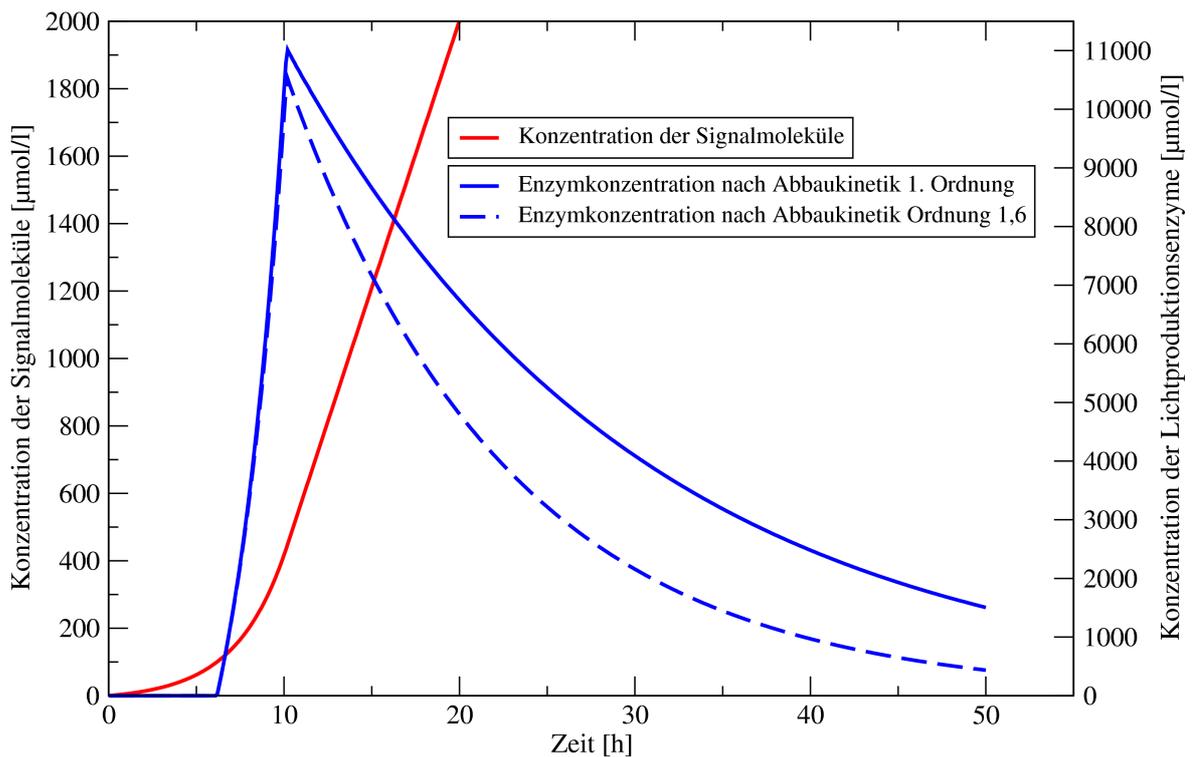


Abb. 21: Modellierte Konzentrationen der Signalmoleküle und der für die Lichtproduktion notwendigen Enzyme

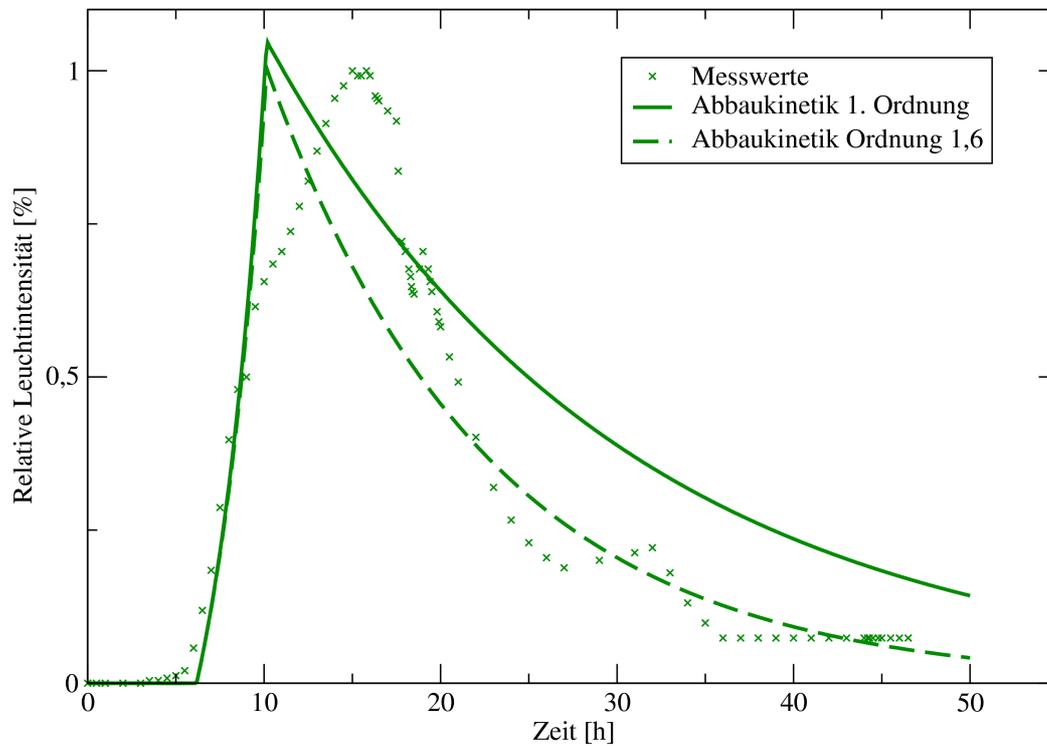


Abb. 22: Vergleich der gemessenen mit der simulierten Leuchtaktivität

Für die Darstellung der relativen Leuchtaktivität wird angenommen, dass die Lichtproduktion über einen Proportionalitätsfaktor direkt an die Konzentration der Lichtproduktionsenzyme gekoppelt ist. Durch Anpassung dieses Faktors kann die modellierte Leuchtaktivität mit der gemessenen Leuchtaktivität verglichen werden (Abb.22). Die Zellen fangen also mit dem Anstieg der Enzymkonzentration an, zu leuchten. Gleichzeitig jedoch findet auch ein Abbauprozess der Enzyme während der Lichtproduktion statt. Dieser macht sich allerdings erst bemerkbar, wenn die Biomasse aufgrund des Substratmangels aufgehört hat, zu wachsen. Die Beendigung des Zellwachstums bedeutet in diesem Fall auch eine Einstellung des Stoffwechsels und damit eine Einstellung der Produktion der Enzyme. Die Enzyme selbst werden jedoch weiterhin abgebaut.

4. Ergebnisse und Diskussion

Es folgt ein Sinken der Enzymkonzentration, was in einem Abfall der Leuchtaktivität resultiert (Abb. 21 und Abb. 22).

Die Stärke des Abfalls der Leuchtaktivität ist dabei unter anderem von der Reaktionsordnung der Abbaukinetik der Enzyme abhängig. Diese Reaktionsordnung gibt an, in welcher Potenz die Konzentration der Enzyme die Geschwindigkeit des Abbaus beeinflusst. An der Lichtproduktion sind zum Beispiel die Enzyme bakterielle Luciferase und reduziertes Flavin FMNH₂ beteiligt (siehe Kapitel 2.2.3.1). Der Abbau der Luciferase während der Lichtproduktion wird von Meighen (1991) mit einer Reaktion 1. Ordnung angegeben, die chemische Oxidation des Flavins dagegen erfolgt schneller [33]. Für den Abbau der Lichtproduktionsenzyme im Modell wurde daher beispielhaft eine Reaktionskinetik 1. Ordnung und eine Kinetik der Ordnung 1,6 simuliert (Abb.21). Bei der Abbaukinetik 1. Ordnung fällt die Leuchtaktivität weniger stark ab, als in der realen Batchkultur (Abb. 22). Mit einer Reaktionsordnung von 1,6 dagegen findet der Abbau der Enzyme schneller statt und der simulierte Leuchtaktivitätsabfall folgt relativ nahe dem Verlauf der gemessenen Leuchtaktivität.

Zusammenfassend betrachtet, liefert das mathematische Modell der Batchkultivierung nur eine Annäherung an die experimentellen Befunde. Im Modell hört die Biomasse durch den sehr hohen Substratverbrauch sehr abrupt mit dem Wachstum auf. Dadurch kann zwar letztendlich ein exponentieller Anstieg der Leuchtaktivität simuliert werden, jedoch wird das Maximum früher als im realen Verlauf erreicht. Nichtsdestotrotz wird gezeigt, dass die gemessenen Parameter für die spezifische maximale Wachstumsrate, die Biomasse und die Schwellkonzentration der Signalmoleküle für das Modell nur leicht angepasst werden mussten, um den Verlauf der Leuchtaktivität annähernd beschreiben zu können. Sie stellen damit eine gute Grundlage für das mathematische Modell eines Biofilms dar.

4.3 Entwicklung einer Methodik zur Herstellung eines künstlichen Biofilms

4.3.1 Herstellung eines künstlichen Biofilms aus Alginat und Chitosan

Chitosan- und Alginatlösungen sind mehr (Chitosan) oder weniger (Alginat) viskose Flüssigkeiten, bevor sie durch Quervernetzung mit Ionen zu festen Gelen werden. Diese Polysaccharide lassen sich nach ihrer Vernetzung aufgrund ihrer hohen Elastizität nachträglich nur schwer in eine gewünschte Form bringen. Für einen künstlichen Biofilm müssen sie deshalb im noch flüssigen Zustand derart an die Rohrsegmentinnenwand angebracht werden, dass sie nach ihrer Vernetzung einen Film von nur wenigen 100 μm Dicke bilden. Es bietet sich daher eine Vorrichtung an, bei der das Rohrsegment in waagerechter Position so schnell gedreht wird, dass sich die Lösungen durch die aus der Drehung resultierenden Zentrifugalkräfte als gleichmäßige Schicht an der Rohrsegmentinnenwand verteilen. Eine solche Vorrichtung wurde, wie in Abb. 23 dargestellt, mit Hilfe von Schlauchpumpen als Motor, jedoch ohne Schlauchpumpenkopf, realisiert.

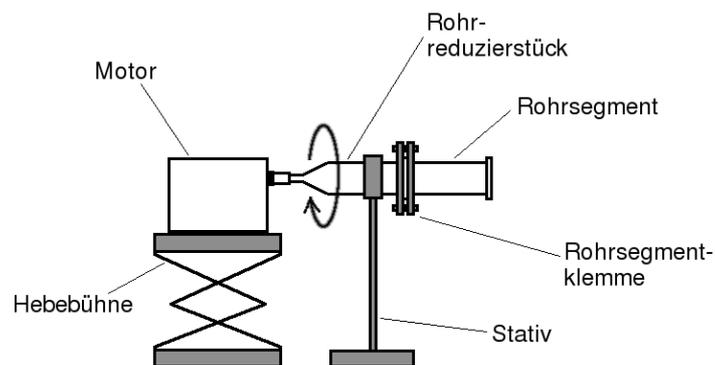


Abb. 23: Apparatur für die Herstellung von Alginat und Agarosefilmen in Rohrsegmenten

4. Ergebnisse und Diskussion

Der Motor bringt hierbei das daran über ein Rohrreduzierstück gekoppelte Rohrsegment zu einer gleichförmigen Drehung um die eigene Achse. In Abhängigkeit von der Viskosität des verwendeten Polysaccharids wird eine entsprechende Umdrehungszahl gewählt.

Alginat ist als Lösung recht flüssig und benötigt eine höhere Umdrehungszahl als die viskosere Chitosanlösung. Für die Anbringung einer dünnen Alginatschicht wird die Alginatlösung mit einer Spritze in das waagrecht angebrachte Rohrstück gefüllt und unter Drehen des Rohrsegments möglichst gleichmäßig an der Innenwand verteilt. Die Umdrehungszahl sollte hierbei mindestens bei 60 U/min liegen. Es ergibt sich jedoch eine Schwierigkeit bei der Vergelung des Alginats. Sobald der Drehvorgang unterbrochen wird, zum Beispiel zur Entnahme des Rohrstücks, um es in die Vernetzerlösung zu tauchen, zerfließt der zuvor gleichmäßig aufgebrauchte Alginatfilm wieder. Die Lösung muss also innerhalb des Rohrsegments vernetzt werden. Hierbei ist jedoch wiederum die augenblickliche Vernetzung des Alginats bei Kontakt mit der CaCl_2 -Lösung nachteilig. Wird die Vernetzerlösung nicht zum gleichen Zeitpunkt auf die gesamte Alginatschicht aufgebracht, bilden sich störende Unebenheiten im Alginatgel aus. Der Versuch einer Auftragung der Vernetzerlösung als feiner Nebel misslang ebenfalls, da es nicht möglich war, den Nebel im gesamten Rohrsegment zur gleichen Zeit zu verteilen. Eine merkliche Erhöhung der Viskosität der Alginatlösung ließ sich auch nicht durch eine höhere Prozentigkeit des Alginats oder durch Abkühlen der Lösung erreichen. Eine Copolymerisation mit Xanthan brachte zwar eine Viskositätserhöhung der Lösung, jedoch konnte das Gemisch nicht mehr zu einem festen Gel vernetzt werden.

Aufgrund der sich ergebenden Schwierigkeiten durch die relativ geringe Viskosität der Alginatlösung wurde deshalb untersucht, ob sich das viskosere Chitosan als künstlicher Biofilm eignet.

Die Herstellung eines dünnen Chitosanfilms erfolgt zunächst analog zum Verfahren mit Alginat. Wegen der höheren Viskosität des Chitosans reicht hier eine Umdrehungszahl von 15 U/min aus. Ist die Chitosanlösung gleichmäßig im Rohrsegment verteilt, wird das gleiche Volumen einer Polyphosphatlösung ohne Unterbrechung des Drehvorgangs ebenfalls in das Rohrstück gegeben. Je nach Dicke der aufgebrauchten Chitosanschicht hat sich nach einigen Minuten auf der Oberfläche der Chitosanlösung ein dünnes Häutchen gebildet und sie zerfließt nicht mehr bei Unterbrechung des Drehvorgangs. Nun kann das Rohrsegment aus der Apparatur entfernt und vollständig in ein Becherglas mit Polyphosphatlösung getaucht werden. Die benötigte Zeit für die in der

4. Ergebnisse und Diskussion

Polyphosphatlösung erfolgende Verfestigung des Chitosanfilms hängt von der Dicke der aufgetragenen Chitosanschicht ab. Zwei Beispiele für die Aufbringung von unterschiedlichen Mengen Chitosan in ein Rohrsegment sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Merkmale von Chitosanfilmen bei Aufbringung verschiedener Mengen an Chitosan im Rohrsegment

Menge an Chitosanlösung für ein Rohrsegment von 5 cm Länge und einem Innendurchmesser von 2,6 cm	Menge an Chitosanlösung pro Rohrsegmentinnenfläche	Zeit nach Zugabe von Polyphosphatlösung	Zustand des Chitosans im Rohrsegment	Dicke der vernetzten Chitosanschicht
2 ml	~ 50 µl/cm ²	4 min	ein dünnes Häutchen auf der Chitosanlösung hat sich gebildet, Lösung zerfließt nicht mehr	160-190 µm
		10 min	das Chitosan wird robuster, ist jedoch noch nicht fest	
		20 min	der Chitosanfilm ist fest	
3 ml	~ 75 µl/cm ²	5 min	ein dünnes Häutchen auf der Chitosanlösung hat sich gebildet, Lösung zerfließt nicht mehr	230-300 µm
		12 min	das Chitosan wird robuster, ist jedoch noch nicht fest	
		25 min	der Chitosanfilm ist fest	

Der Nachteil am Chitosan ist, dass das Gel im Laufe der Vernetzungszeit zusammenschrumpft. Um also einen künstlichen Biofilm mit einer Dicke von etwa 500 µm zu schaffen, muss relativ viel Chitosanlösung auf der Rohrsegmentinnenwand verteilt werden. Je mehr Chitosanlösung jedoch aufgetragen wird, desto schwieriger wird es, das Chitosan gleichmäßig an der Innenwand zu verteilen. Der mit viel Chitosanlösung hergestellte Chitosanfilm weist daher größere Schwankungen in seiner Dicke auf, als der mit weniger Chitosan hergestellte Film. Ein künstlicher Biofilm aus Chitosan ist deshalb aufgrund der großen Schwankungen in seiner Dicke für ein Biofilmmodell mit einer Solldicke von 500 µm ungeeignet.

Die Ergebnisse aus den Herstellungsversuchen von künstlichen Biofilmen mit Alginat und Chitosan führen zu dem Schluss, dass sich diese ionotropen Gele nicht für diese Aufgabe eignen. Zwar ließen sich die *V. fischeri*-Bakterien in den Filmen immobilisieren, so dass die Rohrsegmente im Dunkeln leuchteten, jedoch konnten die künstlichen Biofilme selbst nicht mit konstanter Reproduzierbarkeit und regelmäßiger Dicke von 500 µm hergestellt werden.

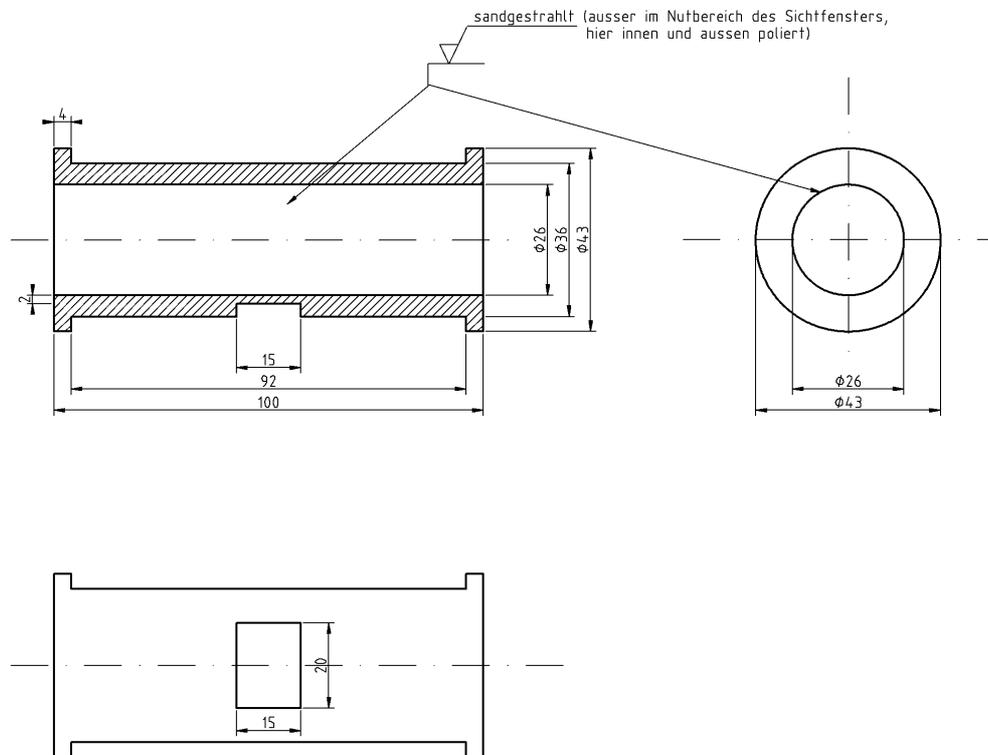
4.3.2 Herstellung des künstlichen Biofilms aus Agarose

Im Gegensatz zu Alginat und Chitosan ist die Gelbildung von Agarose temperaturabhängig. Flüssige Agaroselösung kann also in eine gewünschte Form gegossen werden und behält nach Abkühlung diese Gestalt bei. Die Zugabe von Ionen oder anderen Substanzen ist dabei nicht notwendig. Zudem lässt sich Agarose auch im Gel-Zustand gut mit scharfen Werkzeugen bearbeiten, eine nachträgliche Formkorrektur wäre demnach möglich. Die Füllung eines Rohrsegments mit Agaroselösung und einem Ausschneiden der Agarose nach ihrer Gelierung, so dass nur noch eine Agaroseschicht von einem halben Millimeter auf der Rohrsegmentinnenwand bestehen bliebe, ist jedoch aufgrund zu hoher Scherung während des Schneidevorgangs nicht möglich. Der nur 0,5 mm dicke Agarosefilm würde dabei einreißen. Die Agarose muss deshalb schon vor ihrer Verfestigung als dünner Film an der Innenwand des Rohrsegments angebracht sein. Hierfür wurde eine Apparatur entwickelt, die die Herstellung eines Films mit genau definierter Dicke erlaubt. Die Konstruktionspläne einer solchen Immobilisierungsapparatur sind in Abb. 24 dargestellt.

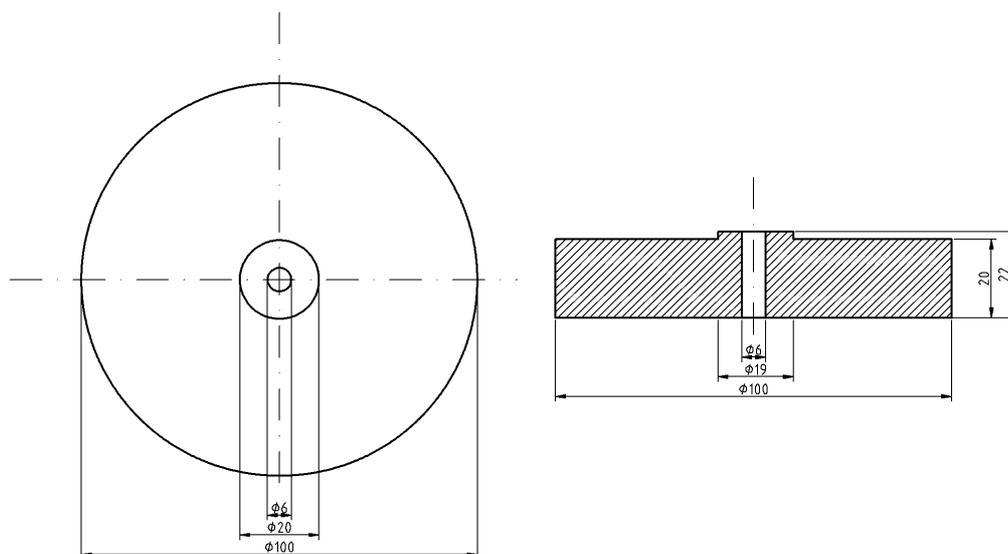
Zunächst wird die flüssige Agarose in ein Rohrsegment, welches auf dem Fuße der Apparatur (Abb. 24B) steht, eingefüllt. Ein Kolben (Abb. 24C), der anschließend in dieses Rohrsegment gefahren wird, verdrängt wieder einen Großteil der noch flüssigen Agarose aus dem Rohrsegment, so dass zwischen Kolben und Innenwandung ein Spalt von exakt 500 µm Dicke mit Agarose gefüllt bleibt (Abb. 24E). Die Agaroselösung fließt dabei aus den in den Verdrängungskolben eingebrachten Bohrungen. Nach Verfestigung der Agarose kann der Kolben wieder aus dem Rohrsegment entfernt werden und der Film bleibt an der Innenwand haften. Für eine exakte Ausführung dieser Methode ist es notwendig, dass das Rohrsegment sowie der Verdrängungskolben zentrisch um einen Führungsstab (Abb. 24D) liegen. Die zusammengesetzte Apparatur ist in Abb. 24E dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

A Rohrsegment mit Sichtfenster für die Fotosonde

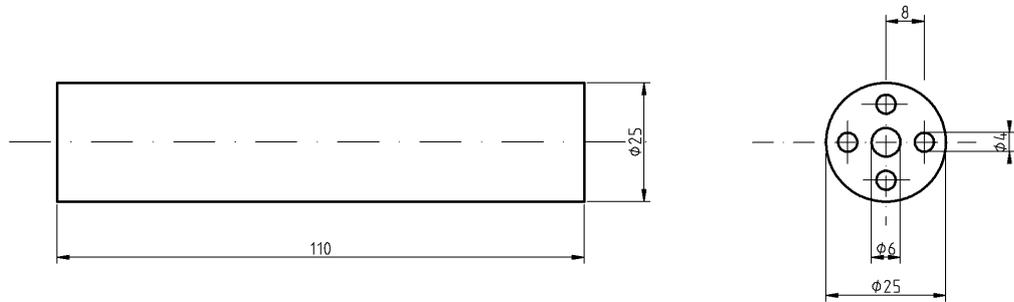


B Apparatfuß

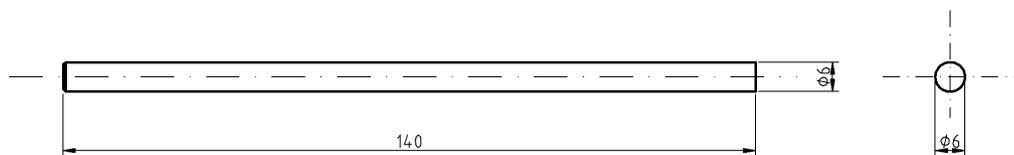


4. Ergebnisse und Diskussion

C Verdrängungskolben



D Führungsstab



E zusammengesetzte Immobilisierungsapparatur

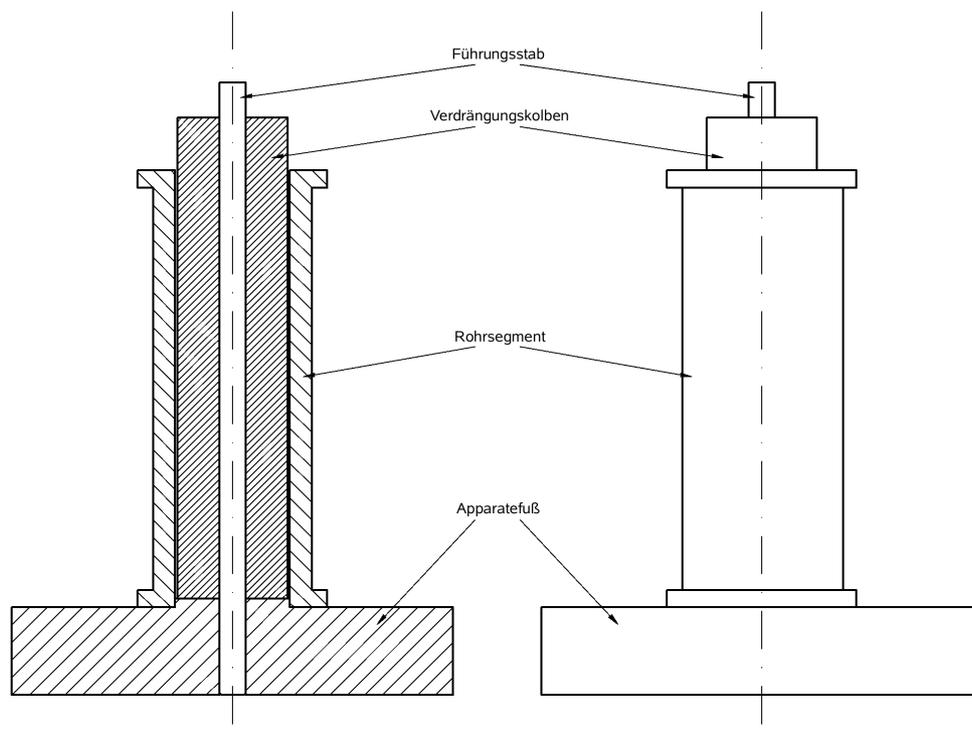


Abb. 24: Bauteile der Immobilisierungsapparatur

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Haftung des Agarosefilms an der Rohrwand wird durch eine durch Sandstrahlung angeraute Innenoberfläche ermöglicht. Für die problemlose Entfernung des Verdrängungskolbens aus dem Rohrstück, ohne dass der Film zerreißt, sorgt eine möglichst glatte Oberfläche des Kolbens. Dieser besteht deshalb, ebenso wie der Apparatefuß, aus Aluminium, welches sich gut polieren lässt. Der Führungsstab ist ebenfalls aus Metall (Stahl), da er sich für die Einhaltung der Zentrik der Apparatur nicht verbiegen lassen darf. Das Rohrsegment dagegen ist aus Polycarbonat gefertigt. Zum einen ist Polycarbonat recht stabil und Objekte wie Rohrsegmente lassen sich daraus an der Drehbank gut herstellen. Da in der Agarose zusätzlich noch *Vibrio fischeri*-Bakterien immobilisiert sind und der künstliche Biofilm daher leuchtet, ist zum anderen eine Lumineszenzmessung mit einer Fotosonde durch das durchsichtige Polycarbonat hindurch möglich. Das hierfür vorgesehene Rohrsegment besitzt ein eingearbeitetes Sichtfenster, welches für den ungehinderten Strahlengang beidseitig poliert ist (Abb. 24A).

Die in dieser Arbeit verwendeten Dichtungsringe für den Zusammenbau des Rohrreaktors besitzen beidseitig einen 2 mm breiten und genau 0,5 mm dicken Rand, der in die Rohrstücke hineinragt. Mit der Immobilisierungsapparatur ist es möglich, den Agarosefilm exakt an diese Dichtungsringe bei der Verbindung der Rohrsegmente anschließen zu lassen. Dafür muss direkt am Rand der Rohrsegmente ein Streifen von 2 mm vom Agarosefilm ausgespart werden. Am einen Rohrsegmentrand wird dies durch die 2 mm große Erhöhung am Apparatefuß, auf welche das Rohrsegment gesetzt wird, realisiert. Der Agarose-freie Streifen am anderen Rand kann hergestellt werden, indem über den Verdrängungskolben zusätzlich ein Dichtungsring gestreift wird. Wenn der Verdrängungskolben während des Immobilisierungsprozesses am Führungsstab in das Rohrsegment gedrückt wird, muss dabei gleichzeitig der Dichtungsring mit seinem Rand in den 0,5 mm breiten Spalt zwischen Rohrsegment und Verdrängungskolben gedrückt werden.

Die Immobilisierung der Leuchtbakterien erfolgt durch Zugabe der Zellen in die auf 42 °C abgekühlte Agaroselösung, bevor sie in das Rohrsegment eingefüllt wird. Ab diesem Zeitpunkt sollte der gesamte Immobilisierungsprozess, das heißt von der Dispergierung der Zellen in der Agarose bis zur Entstehung des Agarosefilms, nicht länger als zehn Sekunden dauern, um ein Absterben der Leuchtbakterien durch zu starke Hitzeeinwirkung zu verhindern (siehe Kapitel 4.3.2.2).

4. Ergebnisse und Diskussion

Ein Rohrstück mit einem fertigen künstlichen Biofilm, der immobilisierte Leuchtbakterien enthält, ist in Abb. 25 dargestellt. Bei normalem Tageslicht ist kaum zu sehen, dass sich an der Rohrsegmentinnenwand ein hauchdünner Film befindet (Abb. 25a). Im Dunkeln dagegen leuchtet das Rohrstück aufgrund der immobilisierten *V. fischeri*-Bakterien (Abb. 25b) und der Rand des künstlichen Biofilms ist als heller dünner Streifen an der Öffnung des Rohrsegments zu erkennen. Auf der Oberseite des Rohrsegments befindet sich das Sichtfenster für die Fotosonde. Das seitlich abgehende kurze Rohrstück mit Gummipfropfen wurde zusätzlich für eine spätere Mikroelektrodenmessung (siehe Kapitel 4.4) angebracht.

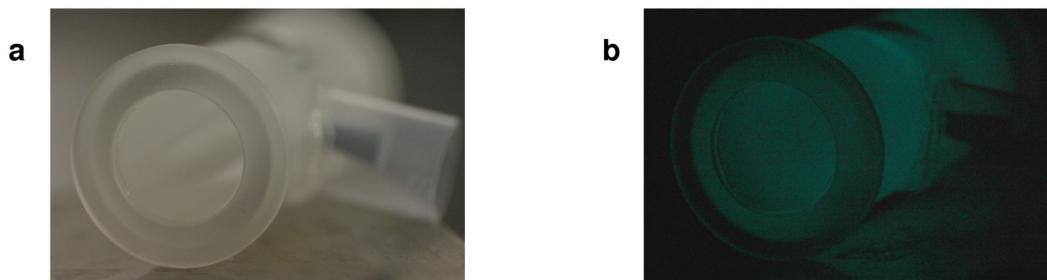


Abb. 25: Rohrsegment mit künstlichem Biofilm. a) bei Tageslicht; b) im Dunkeln leuchtendes Rohrsegment

4.3.2.1 Charakterisierung des künstlichen Biofilms

Mit der oben beschriebenen Immobilisierungsapparatur lassen sich gut reproduzierbare künstliche Biofilme mit Agarosematrix schaffen. Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die hergestellten Agarosefilme eine konstante Dicke, eine glatte Oberfläche und eine einheitliche Bakterienverteilung innerhalb des Films aufweisen.

Für die Mikroskopie mit Durchlicht wurden die Bakterien in der Agarose mit Fuchsin angefärbt. Sie sind als schwarze Punkte im Querschnitt durch einen Agarosefilm in Abb. 26a zu erkennen. Der Film selbst weist eine konstante Dicke von 500 μm und glatte Ränder auf. Die in Abb. 26a zu sehenden waagerechten weißen Strukturen im Film sind während des Herstellungsprozesses der Kryoschnitte entstanden und sind im ungefrorenen Biofilm weder als Poren noch als Risse vorhanden. In Abb. 26c und Abb. 26d wird die gleichmäßige Verteilung der Bakterien innerhalb des Biofilms sowie die glatte Oberfläche nochmals deutlich.

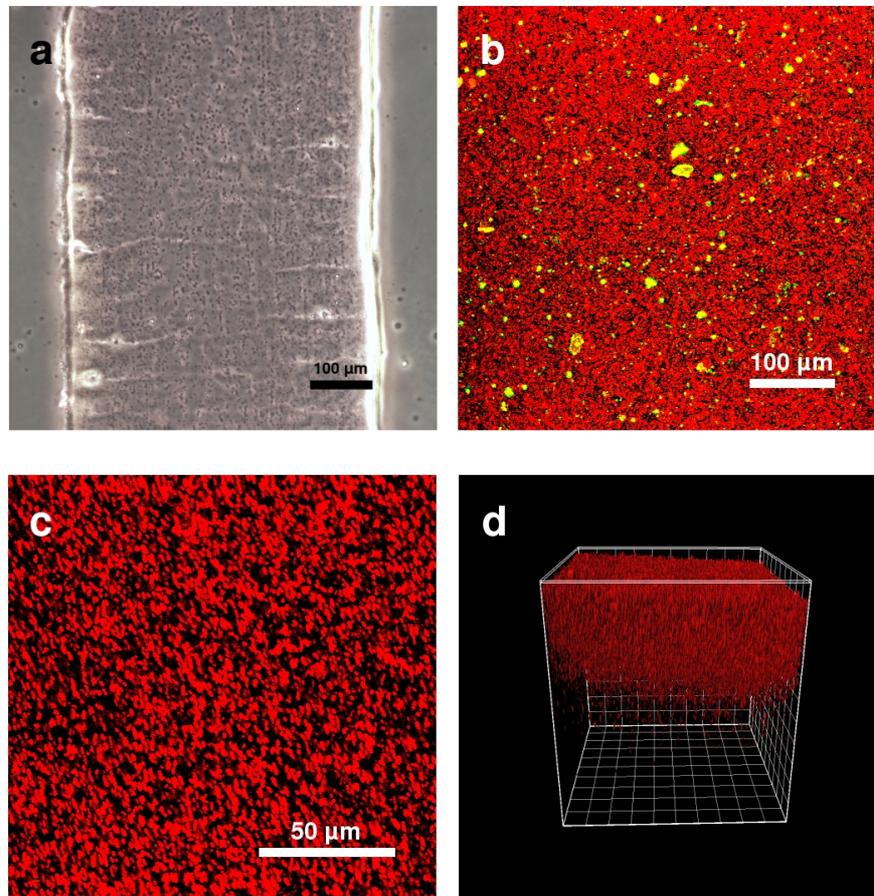


Abb. 26: Durchlichtmikroskopische (a) und CLSM-Aufnahmen (c-d) des künstlichen Biofilms, wobei die Bakterien rot markiert sind. Die Agarose ist grün markiert. In d) hat ein Gitterkasten eine Länge von 50 µm.

Die Verteilung der Bakterien eines Biofilms, in denen die Bakterien zu einer $OD = 2,0$ immobilisiert waren, wurde mit Hilfe der CLSM untersucht. Für die CLSM konnten jedoch nur die Bakterien gut markiert werden (Abb. 26b-d rote Markierung). Die verwendeten Lektine ConA und PNA für die Markierung der Agarose banden nur schwach, so dass nur an vereinzelten Stellen die Agarose detektiert wurde (Abb. 26b grüne Markierung). Die schlechte Markierung der Lektine liegt wahrscheinlich an der hohen Reinheit der Agarose, wodurch zu wenige Reste für die spezifisch bindenden Lektine vorhanden waren.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abb. 26d zu erkennen ist, sind die Bakterien nur bis in eine Tiefe von etwa 200 μm markiert. Da während der CLSM-Aufnahmen die Innenoberfläche des Rohrstücks über Reflexion mit dem Laser geortet werden konnte, resultiert die fehlende Markierung der tiefer als 200 μm liegenden Bakterien aus dem Unvermögen des Farbstoffes, aufgrund der Kompaktheit des Biofilms in größere Tiefen einzudringen, um dort zu binden. Die bis in die Tiefe von 200 μm dargestellten Bakterien weisen allerdings eine sehr homogene Verteilung auf (Abb. 26d).

Das vom JImageAnalyzer berechnete Gesamtvolumen der markierten Bakterien bei Aufnahmen mit dem 20fach Objektiv beträgt im Schnitt 5.287.533 μm^3 pro Bild, mit dem 63fach Objektiv 71.738 μm^3 pro Bild. Alle Bilder wurden mit einer Auflösung von 512x512 Pixeln aufgenommen, wobei ein Pixel bei Aufnahmen mit dem 20fach Objektiv 0,98 μm entspricht. Bei den Aufnahmen mit dem 63fach Objektiv entspricht ein Pixel 0,31 μm . Bezieht man nun das berechnete Volumen der markierten Bakterien auf die jeweils aufgenommene Fläche und eine Höhe von 200 μm (da die Bakterien nur bis in diese Tiefe markiert wurden), erhält man den Anteil des Gesamtvolumens der Zellen pro Volumenanteil Biofilm, also $\varepsilon_{\text{Zellen}}$.

Es ergibt sich daher für einen Biofilm mit $3,2 \cdot 10^{10}$ Zellen pro cm^3 Biofilm für das

63fach Objektiv: $\varepsilon_{\text{Zellen}} = 0,0142$

20fach Objektiv: $\varepsilon_{\text{Zellen}} = 0,1050$.

Normalerweise wird das Gesamtvolumen der markierten Objekte aus den Bilddaten mit Aufnahmen des 63fach Objektivs berechnet, da dieses in xz-Richtung eine höhere Auflösung besitzt. Dies schlägt sich in einem fast 10fach geringeren Wert nieder. Der theoretisch berechnete Volumenanteil der Zellen nach Gleichung 3.9 für die gleiche Zellzahl beträgt:

$$\varepsilon_{\text{Zellen, theor}} = 0,0496.$$

Der Wert des theoretischen Volumenanteils liegt demnach genau zwischen den beiden aus den Bilddaten berechneten Volumenanteilen und kann damit als guter Schätzwert für das mathematische Biofilmmodell eingesetzt werden.

4.3.2.2 Verlust an Leuchtaktivität durch Hitzeschock bei der Immobilisierung

Die relativ hohen Temperaturen, bei denen die Leuchtbakterien in die Agaroselösung eingeschlossen werden müssen, wirken sich nachteilig auf die Leuchtaktivität der Bakterien aus. Um eine zu große Absterberate zu verhindern, darf die Immobilisierung nicht bei über 42 °C stattfinden. Wird eine maximal leuchtende Bakteriensuspension für zehn Sekunden einer Hitze von 42 °C ausgesetzt, erleiden die Bakterien einen Hitzeschock und büßen im Schnitt 35 % ihrer Leuchtleistung ein. Anschließend dauert es ca. 2-3 Stunden, bis sie wieder so stark leuchten, wie sie es vor dem Hitzeschock getan haben.

Für die Lichtemissions- und Mikroelektrodenmessungen am künstlichen Biofilm bedeutet dies, dass die immobilisierten Zellen zunächst für mindestens 1 ½ Stunden optimal mit Substrat und Sauerstoff versorgt werden müssen, bevor sie ihre volle Leucht- und Stoffwechselleistung erbringen.

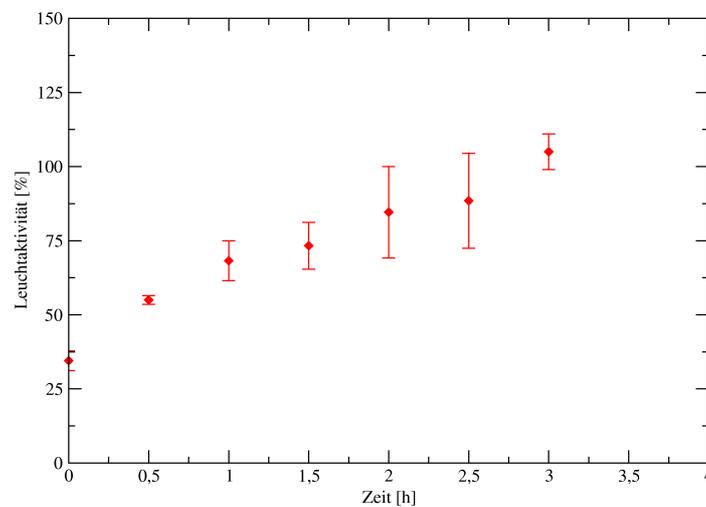


Abb. 27: Verlauf der Leuchtaktivität mit der Zeit nach einem zehn sekündigen Hitzeschock bei 42 °C

4.3.2.3 Herstellung eines künstlichen Biofilms mit heterogener Oberflächenstruktur

Die Herstellung eines heterogen strukturierten Biofilms mit Poren und Kanälen ist auf zwei verschiedenen Wegen denkbar. Zum einen kann die heterogene Struktur dadurch gewonnen werden, dass die wässrige Agaroselösung in einer nicht wässrigen Phase dispergiert wird [70]. Hierbei bilden sich Kanäle aus nicht-wässriger Phase innerhalb der Agarose aus. Nach Verfestigung der Agarose muss diese Phase wieder aus der Agarose entfernt werden. Für solche nicht-wässrigen Phasen werden häufig Öle (zum Beispiel Paraffinöl oder Siliconöl) verwendet, die jedoch den Nachteil haben, dass sie sich nur schwer wieder aus der Agarose entfernen lassen und die Haftung des Agarosefilms an einer Oberfläche erschweren. Sie sind deshalb für einen künstlichen Biofilm nicht geeignet. Eine andere Möglichkeit für eine nicht-wässrige Phase stellen organische Lösungsmittel, die einen hohen Dampfdruck besitzen, dar. Reste dieser Lösungsmittel, die nach dem Waschen des Gels noch in der Agarose vorhanden sind, dampfen von selbst aus. Eine heterogen strukturierte Agaroseschicht, bei der man Cyclohexan als organische Phase verwendete, wurde bereits von Strathmann 1999 [70] hergestellt. Auf diese Weise einen Biofilm von nur 500 µm Dicke an die Innenwand eines Rohrsegments anzubringen, misslang jedoch. Trotz eines intensiven Waschens zum Entfernen des Cyclohexans nach der Herstellung des Films führte das Verdampfen der noch in der Agarose enthaltenen Cyclohexanreste zur Ablösung des Agarosefilms von der Rohrsegmentwand. Zudem reagieren die *V. fischeri*-Bakterien sehr sensibel auf das organische Lösungsmittel und stellen bei seiner Anwesenheit sofort die Lichtproduktion ein.

Ein anderer Weg zur Herstellung von Poren und Kanälen liegt in der mechanischen Penetration des glatten Agarosefilms. Zwar hat ein Agarosegel viskoelastische Fließeigenschaften, jedoch soll der hier gefertigte Biofilm seine heterogene Struktur nur über eine relativ kurze Zeit – nämlich während der vorgenommenen Messungen - stabil beibehalten. Eine Kultivierung der Bakterien innerhalb des künstlichen Biofilms über mehrere Tage ist nicht vorgesehen und damit die Beibehaltung der Biofilmstruktur über einen längeren Zeitraum nicht notwendig. Für diese Arbeit ist eine mechanische Perforierung des künstlichen Biofilms deshalb ausreichend. Sie erfolgt, indem das Profil einer strukturierten Oberfläche in den Agarosefilm hinein gedrückt wird.

4. Ergebnisse und Diskussion

Um eine zufällige aber über den gesamten Biofilm gleichmäßig verteilte Strukturierung zu erschaffen, wurde Schleifpapier mit einer Körnung von 40 als „Stempel“ verwendet. Es ist dabei darauf zu achten, dass die auf dem Schleifpapier aufgetragenen Körner mit wasserunlöslichem Kleber befestigt sind, da sonst ausfallende Körner im Agarosefilm zurückbleiben könnten.

Für die Perforierung des Agarosefilms wurde daher ein für Lackarbeiten geeignetes Bandschleifer-Papier verwendet, an dem die Agarose nicht kleben bleibt. Dieses wurde um einen unbiegsamen Stab geklebt, wobei die Ränder des Schleifpapiers lückenlos und ohne Überlappung aneinander schlossen. Der dieserart bearbeitete Stab hat eine gleichmäßig raue Oberfläche und kann nun längs in das Rohrsegment mit Agarosefilm eingeführt werden. Mit einem Kraft von etwa 10 N (das entspricht etwa 1 kg Gewichtskraft) wird nun der Stab in die Agarose gedrückt und langsam mit gleichbleibendem Gewicht in eine Richtung über den Film gerollt. Das Rohrsegment rollt dabei in die entgegengesetzte Richtung ab (Abb. 28).

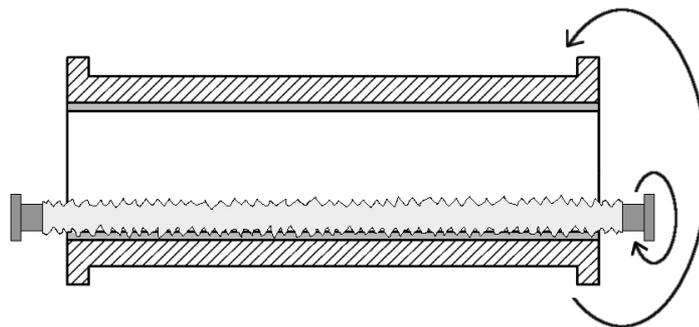


Abb. 28: Schema zur mechanischen Perforierung des künstlichen Biofilms

Durch die 40er Körnung des Schleifpapiers werden die am weitesten herausragenden Körner komplett durch den Film hindurch gedrückt und verhindern durch ihren Widerstand an der Rohrsegmentinnenwand das Zerquetschen des Agarosefilms. Je nach gewünschter Rauigkeit des Agarosefilms kann der „Stempel“ bis zu dreimal über den Agarosefilm gerollt werden, ohne dass dieser zerreißt.

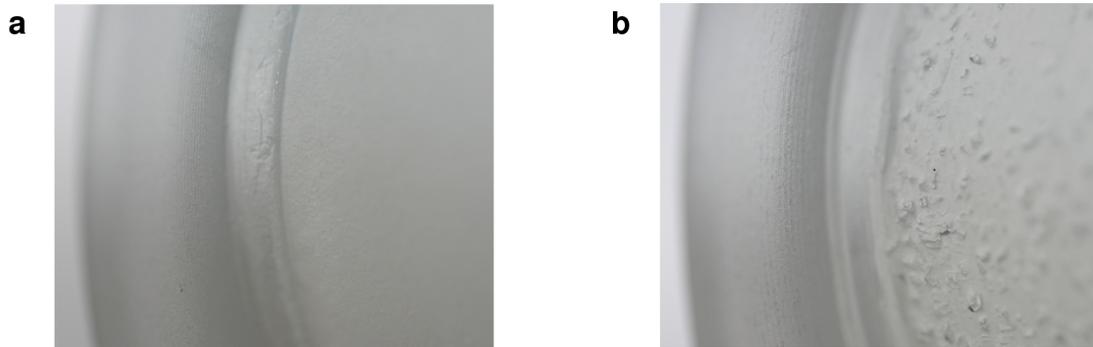


Abb. 29: Vergleich zwischen einem im Rohrsegment angebrachten Agarosefilm a) mit glatter Oberfläche und b) mit mechanisch perforierter Oberfläche

In Abb. 29 ist ein unbehandelter homogener Agarosefilm im Vergleich zu einem perforierten Agarosefilm dargestellt. Die Ausschnitte zeigen den Rand an der Öffnung eines Rohrsegments sowie den an der Rohrsegmentinnenwand anhaftenden Agarosefilm. Während in Abb. 29a der Agarosefilm so glatt ist, dass man ihn kaum sieht, ist in Abb. 29b die durch die mechanische Perforierung mit dem Schleifpapier entstandene raue Oberfläche des Agarosefilms deutlich zu erkennen.

Mikroskopische Aufnahmen mit Hilfe der CLSM (Abb. 31b-d) zeigen die entstandenen Poren im Agarosefilm ebenfalls sehr gut. Vergleichend dazu ist in Abb. 31a nochmals ein Biofilm mit glatter Oberfläche dargestellt. Zwar konnte bei den CLSM-Aufnahmen die Agarose nicht markiert werden, jedoch ist die Bakteriendichte so hoch, dass die Strukturen trotzdem sehr gut zu erkennen sind. Die durch die Perforierung anzunehmende hohe Schwankung in der Bakterienverteilung im Film konnte durch Auswertung der CLSM-Daten bestätigt werden. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abb. 30 dargestellt.

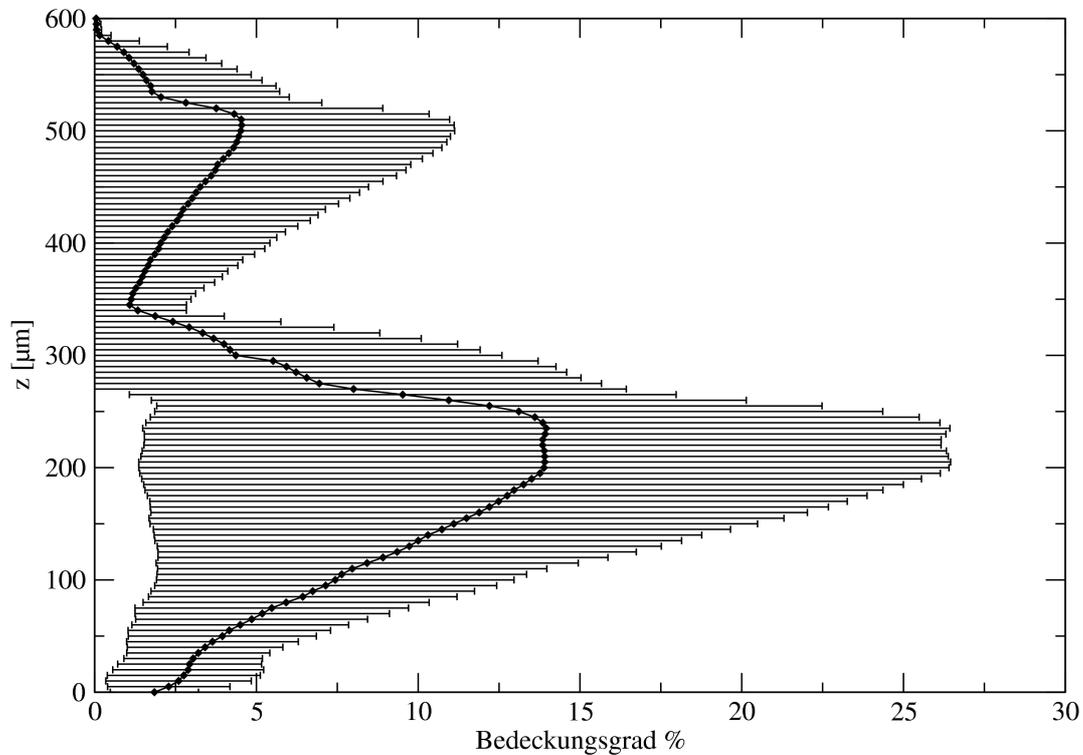


Abb. 30: Aus den CLSM-Daten berechnete Verteilung der Bakterien im heterogenen Biofilm

Die höchste Bakteriendichte wurde in einer Tiefe von 200 μm bis 250 μm errechnet. Jedoch ist auch die Standardabweichung der berechneten Daten (in Abb. 30 durch die Balken dargestellt) an dieser Stelle am größten. Die am weitesten herausragenden Sandkörner des Schleifpapiers hinterließen nach der Perforierung des Biofilms Poren und Kanäle, die fast durch die gesamte Dicke des Biofilms gehen. Dadurch kann die Bakteriendichte in der Tiefe stark variieren. Unterhalb von 200 μm nimmt die Dichte der Bakterien stark ab, was jedoch nicht an fehlenden Bakterien in der Tiefe liegt, sondern – wie schon bei den Aufnahmen des homogenen Biofilms erklärt – daran, dass der Farbstoff hier nicht mehr binden konnte.

4. Ergebnisse und Diskussion

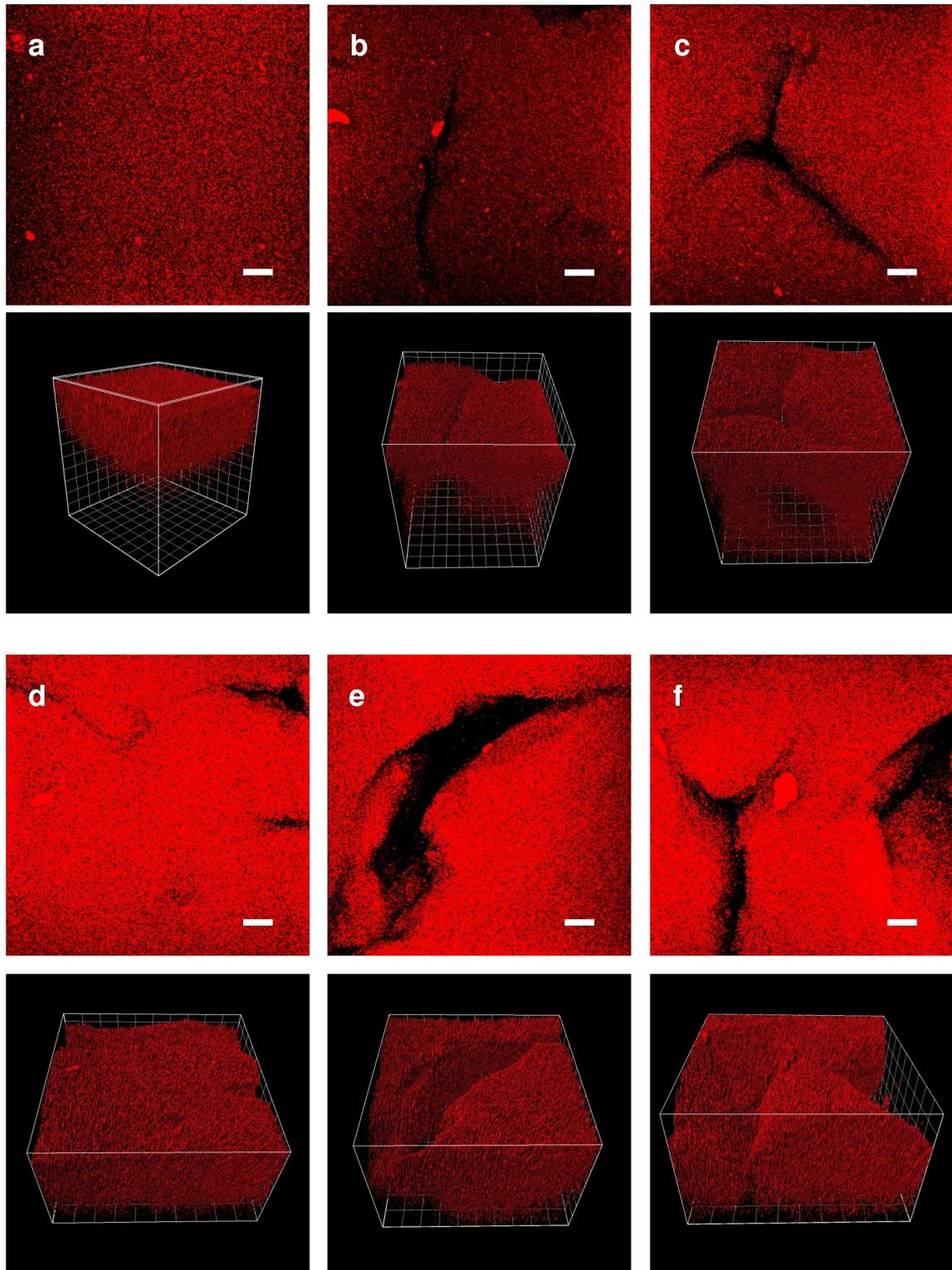


Abb. 31: CLSM-Aufnahmen eines homogenen Biofilms (a) und eines heterogenen Biofilms (b-f). Längenmarkierungen und Gitterkästen haben je 50 μm Länge

4. Ergebnisse und Diskussion

Zur Biofilmoberfläche hin liegt erwartungsgemäß eine geringere Bakteriendichte als in der Mitte des Biofilms vor, da die Körner des Sandpapiers nach der Perforierung eine raue Oberfläche des Biofilms hinterließen.

Mit Hilfe der Software ConAn konnte die Porosität als weiteres Charakteristikum des heterogenen Biofilms berechnet werden. Im Folgenden ist die Porosität der Bilddaten aus Abb. 31d, e und f angegeben:

Tab. 7: Beispiele für aus den CLSM-Daten berechneten Porositäten

	Abbildung 31d	Abbildung 31e	Abbildung 31f
Porosität	0.91	0.94	0.92

Die Porosität beschreibt die Kompaktheit eines Biofilms über den Anteil des Lückenvolumens. Bei Vergleich der drei Bilder mit ihren jeweiligen Porositäten zeigt sich, dass der lange und wahrscheinlich recht tiefe Kanal in Abb. 31e zu einer erhöhten Porosität des Biofilms führt. Bei Abb. 31d mit der größten Kompaktheit (also der geringsten Porosität) ist dagegen auch visuell zu sehen, dass nur die Oberfläche des Biofilms angeraut ist und keine größeren Kanäle vorhanden sind. Bei Abb. 31f sind die Kanäle zwar groß, gehen allerdings nicht so sehr in die Tiefe, so dass die berechnete Porosität geringer ist, als bei Abb. 31e.

Die erhaltenen Daten zur Biomasseverteilung der Bakterien und Porosität des Biofilms könnten, über diese Arbeit hinausgehend, für eine Erweiterung des mathematischen Modells, in dem die Parameter für eine heterogene Struktur implementiert werden könnten, genutzt werden.

4.4 Mikroelektrodenmessung

4.4.1 Bestimmung von Sauerstoffprofilen und Grenzschichtdicken

Über Mikroelektrodenmessungen kann die Abhängigkeit des Stofftransports von der Strömungsgeschwindigkeit untersucht werden. Dabei werden zunächst Sauerstoffprofile am und im Biofilm bei unterschiedlichen Reynolds-Zahlen gemessen. Aus den sich ergebenden Kurven kann an-

4. Ergebnisse und Diskussion

schließlich die Dicke der Konzentrationsgrenzschicht bestimmt werden. Abb. 32 zeigt ein Beispiel für die Bestimmung der Grenzschichtdicken aus Sauerstoffkonzentrationsprofilen, die bei drei verschiedenen Reynolds-Zahlen aufgenommen wurden.

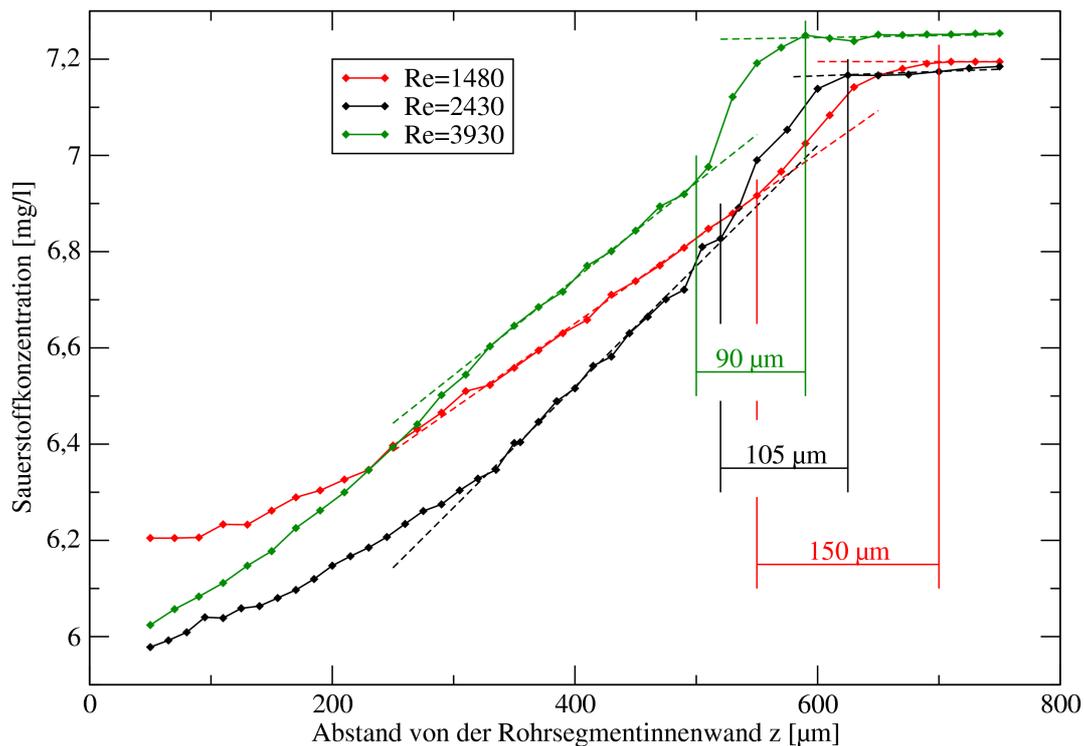


Abb. 32: Ein Beispiel für Sauerstoffkonzentrationsprofile, die bei verschiedenen Anströmungen aufgenommen wurden. Es ist außerdem die grafische Bestimmung der dazugehörigen Grenzschichtdicken zu sehen.

Den Kurven kann man entnehmen, dass im künstlichen Biofilm keine Sauerstofflimitierung auftritt, da selbst in der Tiefe des Biofilms, bei einem Abstand von etwa $50 \mu\text{m}$ von der Rohrsegmentinnenwand, noch immer um die 6 mg/l Sauerstoff gemessen werden konnten.

4. Ergebnisse und Diskussion

Desweiteren ist auch deutlich zu erkennen, dass die Grenzschichtdicke bei höherer Anströmung, also bei größeren Reynolds-Zahlen, geringer wird. Dieser Befund bestätigt die Abhängigkeit des Stoffübergangs von der Strömungsgeschwindigkeit, wie in Kapitel 2.3.2 angesprochen.

Ein Vergleich der ermittelten Grenzschichtdicken in Abhängigkeit von der Reynolds-Zahl mit berechneten Grenzschichtdicken aus in der Literatur angegebenen empirischen Gleichungen (Vgl. Kapitel 2.3.2) ist in Abb. 33 dargestellt.

Für die Berechnung der Kurven aus den empirischen Gleichungen wurde die in dieser Arbeit verwendete Rohrreaktorlänge L von 0,55 m, sowie ein Rohrreaktordurchmesser d von 0,026 m eingesetzt. Die grüne Kurve wurde aus der Arbeit von Wäsche für eine Biofilm, der bei $2,5 \text{ g/m}^2\text{d}$ und $Re = 6000$ gewachsen ist, entnommen [47].

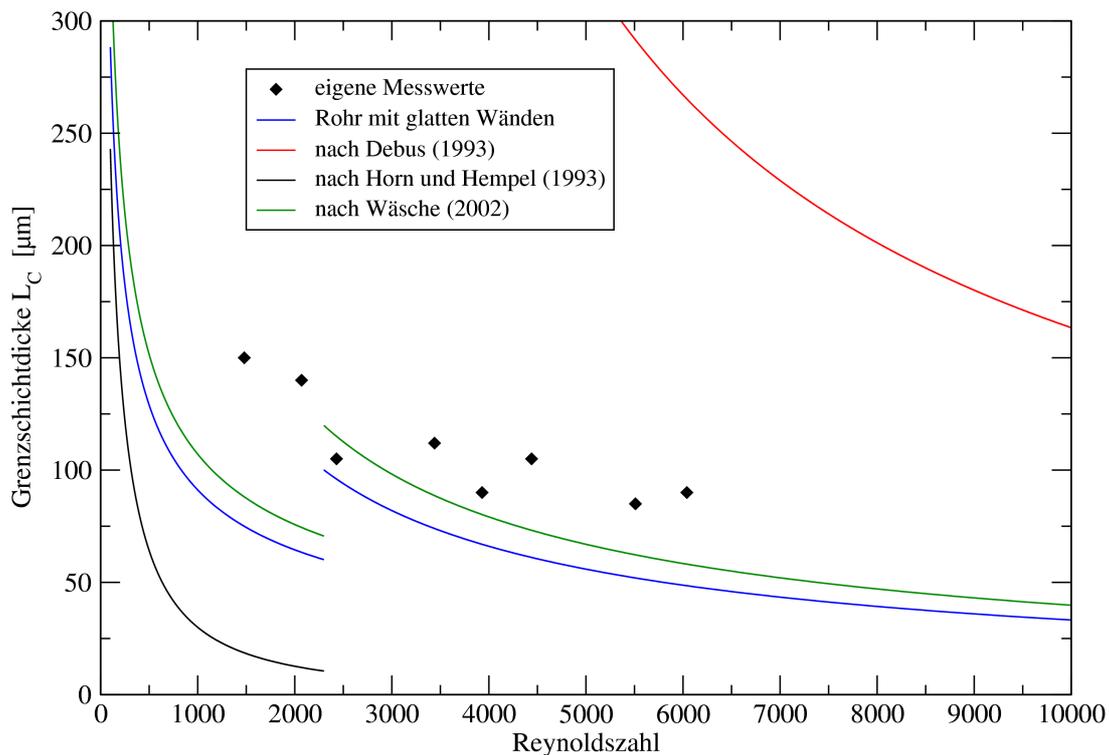


Abb. 33: Vergleich der ermittelten Grenzschichtdicken am künstlichen Biofilm mit Literaturdaten [44]

Die Kurvenverläufe nach glatten Rohren [44] und nach Wäsche [47] stimmen - vor allem im turbulenten Bereich, also ab $Re = 2300$ - am ehesten mit den Messwerten überein. Die Kurve nach Debus [45] zeigt dagegen viel zu große Grenzschichtdicken. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die von ihm empirisch bestimmten Gleichungen auf Membranreaktoren zugeschnitten und nicht für Rohrreaktoren geeignet ist. Im laminaren Bereich sind die größten Abweichungen der berechneten Kurven von den Messwerten zu finden. Die Kurven nach glatten Rohren und nach Wäsche liegen aufgrund der eingesetzten Reaktorlänge von nur 55 cm tiefer als die Messwerte. Gäbe man hier die von Wäsche gewählte Reaktorlänge von 1,35 ein, lägen die Kurven wiederum recht nah an den Messwerten. Erstaunlich dagegen ist die große Abweichung der nach Horn und Hempel [46] berechneten Kurve. Relativ unabhängig von der Reaktorlänge sind hier die Grenzschichtdicken im laminaren Bereich wesentlich kleiner, als die experimentell bestimmten Werte. Die Grenzschichtdicken im laminaren Strömungsbereich nach Debus [45] sind dagegen so hoch, dass sie in dieser Abb. 33 nicht mehr dargestellt sind.

4.4.1.1 Validierung der Grenzschichtdicken für das mathematische Biofilmmodell

Die recht gute Übereinstimmung der Kurve nach Wäsche mit den Messwerten im turbulenten Strömungsbereich (Abb. 33) zeigt, dass über eine Parameteranpassung der Sherwood-Zahl, wie sie für glatte Rohre angegeben ist, eine Funktion durch die Messwerte gelegt werden kann, die den Verlauf der Grenzschichtdicken bei zunehmender Reynolds-Zahl ausreichend genau beschreibt. Für die Validierung der Grenzschichtdicken im mathematischen Modell wurde daher aus den aufgenommenen Messwerten im turbulenten Strömungsbereich eine Parameteranpassung der Gleichung für glatte Rohre [44] vorgenommen. Bei der Gleichung der Sherwood-Zahl für glatte Rohre sind die Terme für Reynolds- und Schmidt-Zahl aus einer Dimensionsanalyse hervorgegangen. Um diese Terme nicht zu verändern, wurde bei der Parameteranpassung zunächst nur der Vorfaktor geändert. In Abb. 34 ist die Anpassung des Vorfaktors auf den Wert 0.027 durch die gestrichelte blaue Linie gezeigt. Im Vergleich dazu ist nochmals der Verlauf der Grenzschichtdicken bei unveränderter Gleichung der Sherwood-Zahl für glatte Rohre durch die gepunktete blau Linie dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Eine Verringerung des Vorfaktors führt zu einer allgemeinen Anhebung der Kurve, jedoch auch zu einem steileren Abfall im Anfangsbereich. Dadurch verläuft die um den Vorfaktor angepasste Kurve ab $Re \sim 4500$ nicht mehr durch die Messwerte. Die gegenüber der angepassten Kurve erhöhten Werte der gemessenen Grenzschichtdicken können jedoch aus dem Versuchsaufbau resultieren. Mit nur 55 cm Länge könnte der Rohrreaktor für Durchströmungsversuche zu kurz sein, so dass sich an der Messstelle für die Mikroelektrode noch keine ganz konstanten Strömungsprofile ausgebildet haben könnten. Für das mathematische Biofilmmodell ist deshalb die um den Vorfaktor geänderte Gleichung für die Sherwood-Zahl

$$Sh = 0,027 \cdot Re^{0,75} \cdot Sc^{0,5}$$

ausreichend.

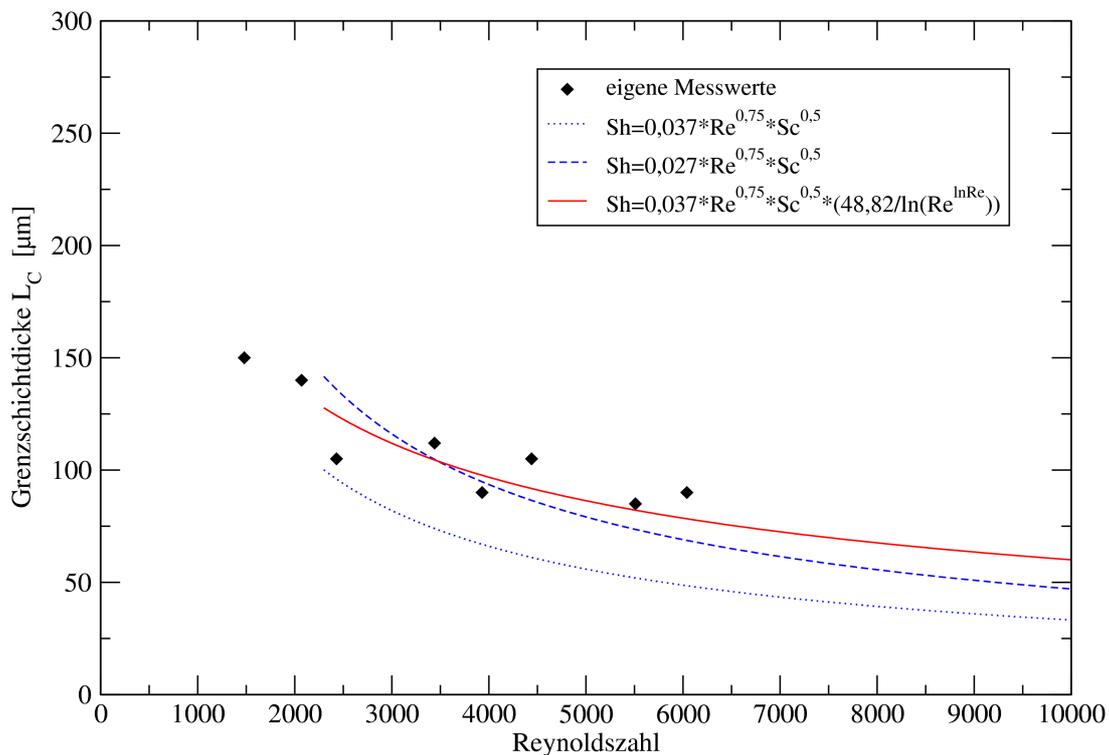


Abb. 34: Paramteranpassung der Gleichung für glatte Rohre [44] an die Messwerte

Eine den Messwerten der Grenzschichtdicken besser angepasste Funktion ist in Abb. 34 durch die rote Kurve dargestellt. Hier fällt die Kurve durch den Parameter $48,82/(\ln Re^{\ln Re})$ weniger steil ab und liegt gut zwischen den Messwerten. Da in diesem Parameter jedoch die Reynold-Zahl stark integriert ist, ist die Analogie zu dem aus der Dimensionanalyse gewonnenen Term für die Reynolds-Zahl nicht mehr gegeben.

4.4.2 Sauerstoffprofile im heterogenen Biofilm

Um den Einfluss von struktureller Heterogenität auf den Stofftransport im turbulenten Strömungsbereich zu untersuchen, wurden Sauerstoffprofile eines perforierten künstlichen Biofilms bei $Re = 3440$ aufgenommen.

Aus der Gegenüberstellung der Sauerstoffprofile eines heterogenen Biofilms und eines homogenen Biofilms (Abb. 35), die ebenfalls bei $Re = 3440$ gemessen wurden, ist deutlich zu sehen, dass der Sauerstoffgehalt im Innern des heterogenen Biofilms wesentlich geringer abfällt, als dies im homogenen Biofilm der Fall ist. Zudem variiert beim heterogenen Film auch der Übergangsbereich zwischen dem linearen Sauerstoffprofil in der Bulkphase und dem linearen Profil im Biofilm sehr stark. Dies weist darauf hin, dass zum einen die Grenzschicht an den verschiedenen Messorten unterschiedlich dick ist. Zum anderen kann hieran auch erkannt werden, dass der Beginn der Oberfläche des Biofilms aufgrund seiner Rauigkeit nicht mehr einheitlich bei $500 \mu\text{m}$ liegt.

Der höhere Sauerstoffgehalt im Biofilm lässt auf einen verbesserten Stofftransport schließen. Nach de Beer et al. [82] und Picioreanu [83] findet ein verbesserter Stofftransport in heterogenen Biofilmen nicht alleine durch die vergrößerte spezifische Oberfläche, sondern erst unter erhöhter Anströmung statt. Bei geringer Anströmung auf einen heterogenen Biofilm ist die Konzentrationssgrenschicht recht dick und liegt, wie bei einem homogenen Biofilm, gleichmäßig – also ungeachtet der Struktur – über der Biofilmoberfläche. Innerhalb der Grenschicht findet nur Diffusion statt, so dass auch in den Poren und Kanälen eines heterogenen Biofilms die Transportvorgänge rein diffusiv sind. Eine Erhöhung der Anströmung führt zu einer dünneren Grenzschicht, die nun den Konturen der Biofilmoberfläche folgt. Je stärker die Anströmung ist, desto enger folgt die Grenzschicht der Oberflächenstruktur. Dadurch kann nun auch Konvektion aus der

4. Ergebnisse und Diskussion

Bulkphase innerhalb der Kanäle und Poren des Biofilms erfolgen. Diese wiederum sorgt dafür, dass eine größere Stoffkonzentration durch die Kanäle an die Biofilmoberfläche herangetragen wird, was durch alleinige Diffusion nicht möglich wäre. Die gemessenen Werte entsprechen dieser Hypothese.

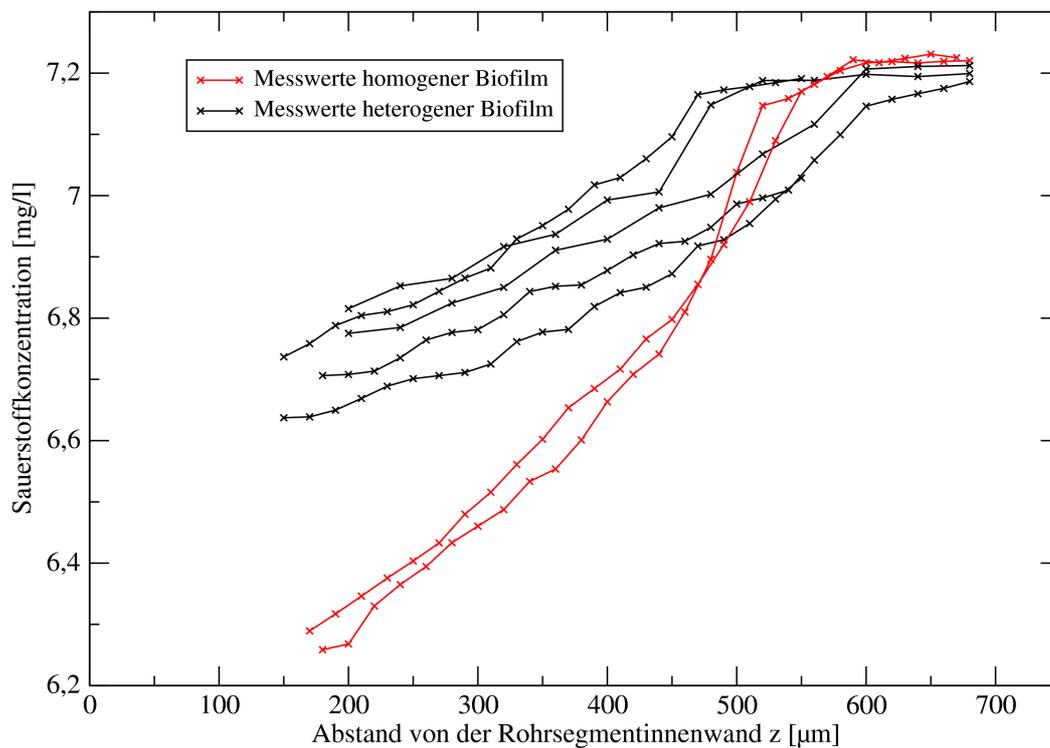


Abb. 35: Vergleich von Sauerstoffprofilen an einem homogenen und einen heterogenen Biofilm. Die Messungen erfolgten jeweils bei $Re = 3440$.

Der verbesserte Stofftransport lässt sich auch auf die Signalmoleküle schließen. Je besser der Stofftransport ist, desto besser bzw. schneller werden die von den Bakterien produzierten Signalmoleküle aus dem Biofilm heraus in die Bulkphase getragen.

4.5 Simulation des Stofftransports im künstlichen Biofilm

Aus den Batchkultivierungen und Mikroelektrodenmessungen konnten die Parameter für die mathematische Modellierung des Stofftransports in einem Biofilmsystem genutzt werden. Die Stoffwechselaktivität der Zellen wird dabei über die Versorgung mit Sauerstoff aus der voll belüfteten Bulkphase reguliert.

Zunächst wurde ein Biofilmmodell mit ähnlichem Ansatz, wie es das mathematische Modell der Batchkultivierung besitzt, entwickelt. Hierfür wurden die für die Lichtproduktion zuständigen Enzyme sowie ihr Abbauprozess in das Modell integriert. Da sich die Enzyme im Realfall in den Zellen befinden, wurde für das Modell ein sehr kleiner Diffusionskoeffizient der Enzyme angegeben (da AQUASIM keine Diffusionskoeffizienten mit dem Wert Null erlaubt). Damit befinden sich die Enzyme zwar in der flüssigen Phase des Biofilms, diffundieren aber nicht heraus.

Für die Abhängigkeit der Leuchtaktivität von der Strömungsgeschwindigkeit ergab sich jedoch, dass das Wechselspiel zwischen der Enzymproduktion und dem Enzymabbau zu lange dauert, bis sich ein stationärer Zustand ausgebildet hat. Zudem ist durch die Integration der Prozesse für die Enzyme der Lichtproduktion das Modell so komplex geworden, dass das Zusammenspiel der verschiedenen Parameter kaum noch überschaut und kontrolliert werden kann. Für das Modell bedeutet dies, dass keine realistische Voraussage für das Transportverhalten der Signalmoleküle in Abhängigkeit der Strömungszustände getroffen werden kann.

Eine Vereinfachung des Modells erfolgte in einem zweiten Ansatz durch die Herausnahme der Enzymprozesse. Dabei steigt jedoch die Konzentration der Signalmoleküle so stark an, dass ein Verdünnungsprozess implementiert werden musste. Für die Darstellung der realtiven Leuchtaktivität wurde der Biofilm, ausgehend vom Substratum, in Abschnitte eingeteilt. Ähnlich einem Schalter wurde ein Abschnitt dann als leuchtend definiert, wenn in ihm die Schwellkonzentration der Signalmoleküle überschritten ist. Liegt die Konzentration der Signalmoleküle in diesem Abschnitt unterhalb der Schwellkonzentration, findet keine Leuchten statt. Die relative Leuchtaktivität des gesamten Biofilms konnte nun als Mittel der Leuchtaktivitäten der Abschnitte dargestellt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Mit diesem Modell gelang es zumindest ansatzweise, eine Voraussage zum Verhalten der Leuchtaktivität bei Erhöhung der Reynolds-Zahl zu treffen. In Abb. 36 ist das Ergebnis der Simulation vergleichend zu gemessenen Werten der Leuchtaktivität (siehe Kapitel 4.6) dargestellt.

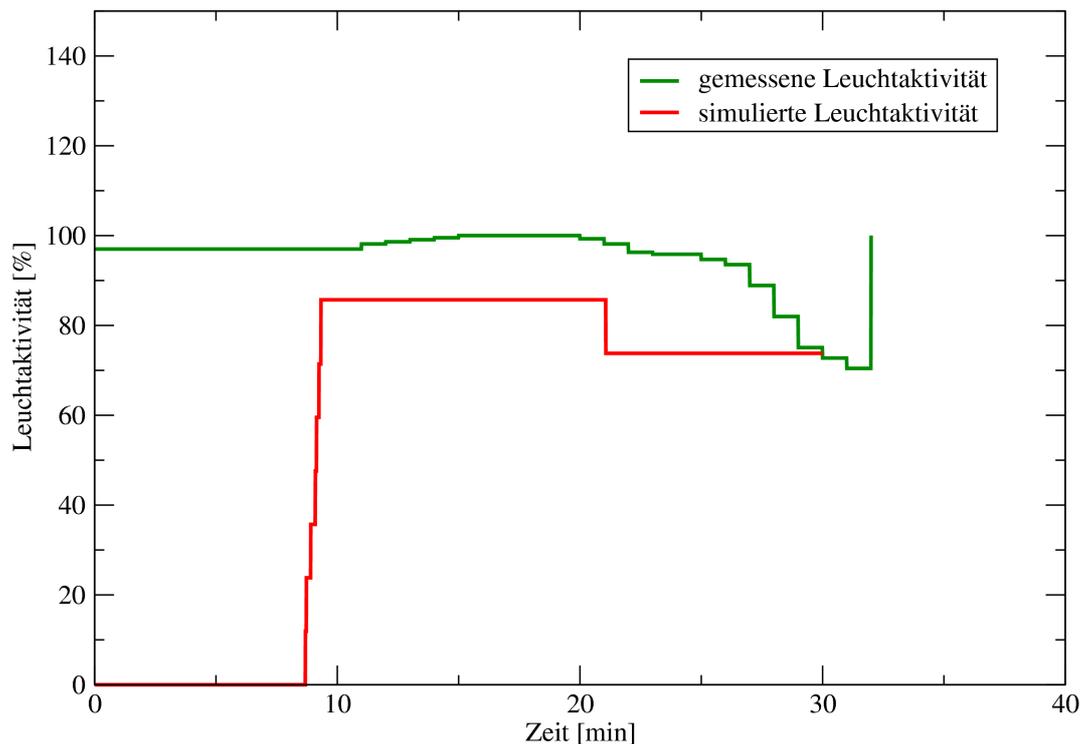


Abb. 36: Vergleich der simulierten (rot) zur experimentell gemessenen (grün) Leuchtaktivität der Zellen in einem Biofilm

Die Kurven geben den Verlauf der Leuchtaktivitäten in Abhängigkeit der Reynolds-Zahl wieder, deren Einstellung jeweils eine Minute lang gehalten wurde. Die zum Kurvenverlauf zugehörigen Reynolds-Zahlen können aus Abb. 37 entnommen werden und gelten sowohl für die gemessene, als auch für die simulierte Leuchtaktivität.

Während der reale Biofilm von Anfang an voll leuchtet, braucht der Biofilm im Modell etwa acht Minuten, bis die Schwellkonzentration der Signalmoleküle überschritten ist und Licht pro-

duziert wird. Anschließend bleibt die simulierte Leuchtaktivität - ähnlich der gemessenen - mit zunehmender Anströmung konstant, bis sie bei $Re = 7620$ absinkt. Im Modell erfolgt ein sprunghaftes Absinken der Lichtemission um etwa 15 %. Eine weitere Erhöhung der Reynolds-Zahl führt zu keiner weiteren Absenkung der Leuchtaktivität. Die experimentellen Leuchtaktivitäten sinken jedoch in diesen Strömungsbereichen stetig ab.

Das mathematische Biofilmmodell kann die Abhängigkeit der Signalmolekülkonzentration von den Strömungsbedingungen also nur grob vorhersagen. Eine Einbindung der aus den Mikroelektrodenexperimenten validierten Grenzsichtdicken brachte ebenfalls keine quantitative Verbesserung des Modells, so dass hier keine Aussage über den Einfluss der Parameteranpassung der Sherwood-Zahl (siehe Kapitel 4.4.1.1) auf das Modell gemacht werden kann.

4.6 Lichtemissionsmessung am Rohrreaktor

Das Gelingen einer Messung der Leuchtaktivität immobilisierter *V. fischeri*-Bakterien in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit im Rohrreaktor ist stark vom physiologischen Zustand der Bakterien abhängig. Tests mit Bakterien, die auf verschiedene optische Dichten in Batchkultur gewachsen sind, ergaben, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, während der eine maximale Lichtproduktion stattfindet, befinden müssen. Die Zellen sollten also immobilisiert werden, solange sie nicht über eine optische Dichte von 1,2 gewachsen sind. Für höhere Zelldichten im künstlichen Biofilm muss demnach entsprechend mehr Zellsuspension abzentrifugiert und die Zellen in der gewünschten Menge resuspendiert werden. Künstliche Biofilme mit Bakterien, die in Batchkultur über eine OD von 1,2 hinaus gewachsen sind, auch wenn sie noch eine hohe Leuchtaktivität aufweisen, leuchten nach der Regenerationszeit der Bakterien (Erholung vom Hitzeschock, siehe Kapitel 4.3.2.2) nur so schwach, dass der Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Leuchtaktivität nicht von der Fotosonde detektiert werden kann. Wahrscheinlich ist hier die Fotosonde nicht sensitiv genug, um auch geringe Änderungen in der Leuchtaktivität bei ohnehin nur schwach leuchtenden künstlichen Biofilmen zu detektieren. Diese fehlende Sensitivität zusammen mit der starken Abhängigkeit der Leuchtaktivität vom physiologischen Zustand der Bakterien führte zu einer Reihe von Fehlversuchen mit künstlichen

4. Ergebnisse und Diskussion

Biofilmen, die zwar - mit dem bloßen Auge sichtbar - etwas leuchteten, jedoch mit der Fotosonde nicht ausreichend detektiert werden konnten.

Trotzdem gelang es, den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Leuchtaktivität von Bakterien, die auf eine $OD = 1,2$ gewachsen sind und anschließend zu einer Zellzahl von $3,2 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³ (entsprechend einer $OD = 2,0$) immobilisiert wurden, zu zeigen (Abb. 37):

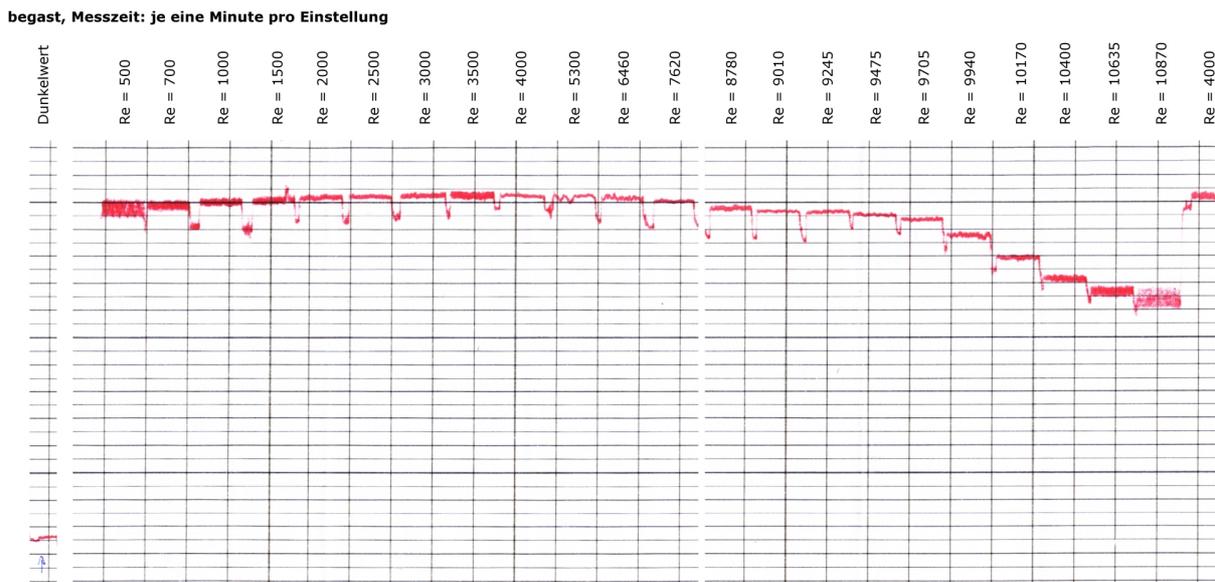


Abb. 37: Schreiberdruck einer Leuchtaktivitätsmessung am Rohrreaktor bei verschiedenen Reynolds-Zahlen

Die Messung der Lichtemission begann bei geringen Reynolds-Zahlen, bei denen im Rohrreaktor noch laminare Strömungsbedingungen herrschen. Pro eingestellter Strömungsgeschwindigkeit wurde 1 Minute lang die Leuchtaktivität aufgezeichnet. Während dieser Messzeit blieb die verzeichnete Leuchtaktivität konstant. Eine Erhöhung der Reynolds-Zahl in den turbulenten Strömungsbereich hinein bringt zunächst einen leichten Anstieg der Leuchtaktivität mit sich, was möglicherweise auf eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen zurückzuführen ist. Erst ab einer Reynolds-Zahl von etwa $Re = 7500$ sinkt die Leuchtaktivität wieder, wenn auch zunächst nur schwach. Ein signifikanter Abfall der Leuchtaktivität ist dagegen ab einer sehr hohen Reynolds-Zahl von $Re = 9700$ zu sehen. Um $Re = 10700$ scheint die Leuchtaktivität wieder einen stationären Zustand zu erreichen, wobei sie jedoch noch immer etwa 70 % ihrer maxima-

4. Ergebnisse und Diskussion

len Leuchtleistung erbringen. Aufgrund der begrenzten Leistung der Zahnradpumpe konnte der Verlauf bei weiterer Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit jedoch nicht untersucht werden.

An dieser Stelle wäre es außerdem interessant gewesen zu sehen, ob eine Zugabe von C6-HSL zum Medium bei hohen Reynolds-Zahlen zu einem Wiederanstieg der Leuchtaktivität führen würde.

Bei einem weiteren Versuch mit einer Zelldichte immobilisierter Zellen von $1,6 \cdot 10^{10}$ Zellen/cm³ (das entspricht einer OD = 1,0), um den Effekt der geringeren Zellzahlen und damit geringerer relativer Lichtproduktion zu untersuchen, konnte kein Licht im ausreichenden Maße detektiert werden. Möglicherweise ist hier die Zellzahl trotz guter Lichtproduktion zu gering, um eine für die Lichtemissionsmessung ausreichende Leuchtaktivität zu haben. Es könnte jedoch auch sein, dass sich die Zellen nicht im optimalen physiologischen Zustand befanden, vielleicht aufgrund geringer Schwankungen im Medium oder der Temperatur, und daher weniger leuchtaktiv waren. Eine einfache Wiederholung des Versuchs könnte mehr Aufschluss über den Sachverhalt bringen, konnte jedoch aufgrund des begrenzten Zeitrahmens der Diplomarbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Analog zu den Batchversuchen, bei denen die Lichtproduktion nicht lumineszierender Kulturen durch Zugabe von C6-HSL induziert wurde, sollte überprüft werden, ob auch im künstlichen Biofilm, der nur 4,8 Zellen/cm³ (OD = 0,3) enthält, Lichtproduktion auf diese Weise aktiviert werden kann. Doch konnte bei diesem Biofilm trotz hoher C6-HSL-Gaben kein Licht mit der Fotosonde detektiert werden. Nach Entnahme des Rohrsegments mit dem Immobilisat aus dem Rohrreaktor stellte sich bei einer visuellen Kontrolle mit dem bloßen Auge allerdings heraus, dass die Zellen im künstlichen Biofilm durchaus etwas leuchteten, wenn auch wesentlich schwächer, als in der Batchkultur.

Wie bereits erwähnt, scheint die fehlende Sensitivität der Fotosonde einen wesentlichen limitierenden Faktor für das Gelingen der Versuche zur Lichtemissionsmessung am Rohrreaktor darzustellen. Für weiterführende Arbeiten sollte daher versucht werden, das System zur Messung der Leuchtaktivität zu verbessern, zum Beispiel durch Verwendung noch empfindlicherer Fotosonden oder anderer Lichtdetektoren.

4. Ergebnisse und Diskussion

Nichtsdestotrotz konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Quorum Sensing-abhängige Leuchtaktivität von *Vibrio fischeri* nur bei turbulenten Strömungsbedingungen mit sehr hohen Reynolds-Zahlen signifikant beeinflusst werden kann. Dies bedeutet für Biofilme mit glatter Oberfläche, bei denen Quorum Sensing stark an der Entwicklung beteiligt ist, dass die Produktion der Signalmoleküle so hoch ist, dass ihre Verteilung innerhalb des Films kaum durch die hydrodynamischen Bedingungen beeinflusst wird. Dieses Ergebnis konnte mit der mathematischen Modellierung des Biofilms grob vorhergesagt werden.

Bei heterogen strukturierten Biofilmen verhält es sich wahrscheinlich anders. Anhand der Sauerstoffkonzentrationsprofile, die an einem heterogenen künstlichen Biofilm aufgenommen wurden (Kapitel 4.4.2), lässt sich auf eine wesentliche Verbesserung des Stofftransports bei turbulenten Strömungsbedingungen schließen. Ein verbesserter Stofftransport bedeutet für die Signalmoleküle eine schnellere Diffusion aus dem Biofilm heraus in die Bulkphase. Damit entsteht bei vergleichsweise geringeren Anströmungen ein größerer Konzentrationsgradient der Signalmoleküle innerhalb der Biofilms. Die Schwellkonzentration der Signalmoleküle wird vor allem in den oberen Biofilmschichten eher unterschritten und die Zellen stellen ihren Stoffwechsel um. Bei den *Vibrio fischeri*-Bakterien würde dies ein Absinken der Leuchtaktivität bei geringeren Reynold-Zahlen bedeuten, als dies in einem homogenen Biofilm der Fall ist. Da die Versuche zur Lichtemissionsmessung jedoch nur an glatten künstlichen Biofilmen durchgeführt wurden, bleibt die Hypothese des Verhaltens der Leuchtaktivität der Bakterien, die sich in einem heterogen strukturierten Biofilm befinden, experimentell zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Quorum Sensing ist eine erst seit wenigen Jahrzehnten bekannte Form inner- und zwischenartlicher Kommunikation von Bakterien, mit dessen Hilfe verschiedene Prozesse genetisch gesteuert werden können. Derartige zelldichteabhängige Regulationsmechanismen, die auf der Produktion von leicht diffusiblen Signalmolekülen basieren, scheinen auch eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von Biofilmen zu spielen. Es ist anzunehmen, dass die Konzentrationsverteilung der Signalmoleküle innerhalb des Biofilms unter anderem von der Grenzschichtdicke zwischen Biofilmoberfläche und Bulkphase abhängt, wie es auch bei anderen Stoffen (z.B. Sauerstoff) nachgewiesen wurde. Mit einer Kombination aus mathematischer Modellierung und experimentellen Versuchen wurde in dieser Arbeit untersucht, wie und in welchem Maße die von Strömungsbedingungen abhängige Grenzschichtdicke die Konzentration der Signalmoleküle und damit das Quorum Sensing in einem Biofilm beeinflusst.

Zunächst wurde ein mathematisches Modell erstellt, welches den Stoffübergang der Signalmoleküle aus dem Biofilm heraus in Abhängigkeit verschiedener Strömungsbedingungen simuliert. Die Überprüfung der Simulationsergebnisse des mathematischen Biofilmmodells erfolgte an einem künstlichen Biofilm im Rohrreaktor. Hierfür wurde eine neuartige Methode entwickelt, um einen nur 500 µm dicken Hydrogelfilm aus Agarose auf die Innenwand von Rohrreaktorsegmenten anzubringen. Die hergestellten künstlichen Biofilme sind sehr genau definiert und weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die einheitliche Dicke des Films und seine homogen glatte Oberfläche, sowie eine gleichmäßige Verteilung darin eingebetteter Bakterien konnte über lichtmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten und mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) bestätigt werden.

In den künstlichen Biofilmen wurde das Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* immobilisiert. Mit Hilfe einer Fotosonde konnte dessen Quorum Sensing-regulierte Leuchtaktivität in Abhängigkeit von Strömungsgeschwindigkeiten im Rohrreaktor zeitkontinuierlich untersucht werden. Dabei ergab sich, dass die Produktion der Signalmoleküle so hoch ist, dass erst ab Reynolds-Zahlen

über $Re = 9000$ der Stofftransport der Moleküle aus dem Biofilm heraus groß genug ist, um eine Reduktion der Lichtemission zu bewirken. Aufgrund einer sich ergebenden hohen Komplexität des mathematischen Modells und damit dem Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren konnte das mathematische Modell dieses experimentelle Ergebnis jedoch nur grob voraussagen.

Eine Erweiterung des Modellsystems konnte durch die Entwicklung einer Methodik zur Herstellung einer heterogenen Oberflächenstruktur des künstlichen Biofilms geschaffen werden. Dabei wird der homogene Biofilm mechanisch perforiert. Mikroelektrodenmessungen von Sauerstoffprofilen an diesen Biofilmen mit immobilisierten Bakterien bestätigen einen, durch die Heterogenität hervorgerufenen, verbesserten Stofftransport. Mit Hilfe der aus CLSM-Daten gewonnenen Biomasseverteilungen und Porositäten des heterogenen Biofilms, sowie weitergehenden Untersuchungen des Stofftransportverhaltens in Abhängigkeit von Strömungsverhältnissen, ließe sich das mathematische Biofilmmodell erweitern. Die Entwicklung eines mehrdimensionalen, kontinuierlichen Modells mit Biofilmwachstum und verschiedenen numerischen Möglichkeiten zur Simulation einer heterogenen Struktur, sowie die aus dieser Arbeit experimentell gewonnenen Werte für die Validierung der Parameter ist in Zusammenarbeit von Roland B. Möhle (Institut für Bioverfahrenstechnik, TU-Braunschweig) und Erik Alpkvist (Fakultät für Technologie und Gesellschaft, Abt. Angewandte Mathematik, Universität Malmö, Schweden) geplant.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit komme ich zu dem Schluss, dass die Produktionsrate von Signalmolekülen in homogenen Biofilmen – ist sie erst einmal induziert – so hoch ist, dass unter den Strömungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Rohrleitungen der Nahrungsmittelindustrie, Kathetern oder künstlichen Venen vorherrschen, die Quorum Sensing-regulierten Mechanismen kaum durch den alleinigen Faktor Hydrodynamik beeinträchtigt werden. Bei heterogen strukturierten Biofilmen kann auf eine wesentliche Verbesserung des Stofftransports bei höherer Anströmung geschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, dass eine heterogene Struktur von Biofilmen maßgeblich zu einem stärkeren Einfluss von hydrodynamischen Bedingungen auf Quorum Sensing-regulierte Prozesse beiträgt.

5. Zusammenfassung



6. Symbolverzeichnis

Lateinische Symbole

Symbol	Beschreibung	Einheit
BTM	Biotrockenmasse	g
$c_{Bulk,i}$	Konzentration der Komponente i in der Bulkphase	g/m^3
$c_{Filmoberfläche,i}$	Konzentration der Komponente i an der Biofilmoberfläche	g/m^3
c_i	Konzentration der Komponente i	g/m^3
c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration	$g/m^3, mg/l$
$c_{O_2,sat}$	Sättigungskonzentration von Sauerstoff	g/m^3
c_S	Substratkonzentration	g/m^3
c_{AI}	Signalmolekülkonzentration	$g/m^3; \mu mol/l$
c_{LuxEnz}	Konzentration der Enzyme für Lichtproduktion	$g/m^3; \mu mol/l$
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	g/m^3
d	Reaktordurchmesser	m
D	Diffusionskoeffizient	m^2/h
D_i	Diffusionskoeffizient der Komponente i	m^2/h
D_{O_2}	Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Wasser	m^2/h
D_{AI}	Diffusionskoeffizient vom Signalmolekül in Wasser	m^2/h
j	Massenstromdichte	g/m^2h
j_i	Massenstromdichte der Komponente i	g/m^2h
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	1/h
k_{AI}	Produktionsrate der Signalmoleküle	1/h
k_{LI}	Korrekturfaktor für Leuchtaktivität	-
k_{LuxEnz}	Produktionsrate der Enzyme für Lichtproduktion	1/h
$k_{LuxEnz,decay}$	Abbaurrate der Enzyme für Lichtproduktion	1/h
K_{O_2}	Halbwertskonstante von Sauerstoff	g/m^3
K_S	Halbwertskonstante des Substrats	g/m^3
L	Reaktorlänge	m
L_C	Dicke der Konzentrationsgrenzschicht	μm
$L_{C,theor}$	theoretische Dicke der Konzentrationsgrenzschicht	μm
L_F	Biofilmdicke	μm
$m_{t,Agarose}$	Trockenmasse der Agarose	g
$m_{t,Zelle}$	Trockenmasse einer Vibrio fischeri-Zelle	g
P	Produkt	g/m^3
r_i	Prozessrate	g/m^3h

6. Symbolverzeichnis

Symbol	Beschreibung	Einheit
Re	Reynolds-Zahl	-
S	Substrat	g/m^3
Sc	Schmidt-Zahl	-
Sh	Sherwood-Zahl	-
Sh_{theor}	theoretische Sherwood-Zahl	-
t	Zeit	h
V	Volumen des Biofilms	m^3
V_{Zelle}	Volumen einer <i>Vibrio fischeri</i> -Zelle	μm^3
w	mittlere Strömungsgeschwindigkeit	m/s
X	Konzentration der Biomasse	g/m^3
$X_{Agarose}$	Konzentration der Agarose	g/m^3
X_i	Konzentration der partikulären Komponente i	g/m^3
X_{Zellen}	Konzentration der Zellen	g/m^3
Y_{X,O_2}	Ertragskoeffizient (Sauerstoff)	g X/g O_2
$Y_{X,S}$	Ertragskoeffizient (Substrat)	g X/g S
z	senkrecht zur Aufwuchsfläche stehende Raumkoordinate	μm

Griechische Symbole

Symbol	Beschreibung	Einheit
β	Stoffübergangskoeffizient	m/s
$\epsilon_{Agarose}$	Anteil der Agarose am Biofilmvolumen	-
ϵ_l	Anteil der flüssigen Phase am Biofilmvolumen	-
ϵ_s	Anteil der festen Phase am Biofilmvolumen	-
$\epsilon_{s,i}$	Anteil der Komponente i der festen Phase am Biofilmvolumen	-
ϵ_{Zellen}	Anteil der Zellen am Biofilmvolumen	-
μ	spezifische Wachstumsrate	1/h
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	1/h
ν	kinematische Viskosität	m^2/s
ρ_X	Biofilmdichte (Trockenmasse)	kg/m^3
$\rho_{X,Agarose}$	Biofilmdichte (Trockenmasse) der Agarose	kg/m^3
$\rho_{X,i}$	Biofilmdichte (Trockenmasse) der Komponente i	kg/m^3
$\rho_{X,Zellen}$	Biofilmdichte (Trockenmasse) der Zellen	kg/m^3
Ω	Strukturfaktor	-

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Petersen, F.C., Tao, L., Scheie, A.A.:** DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 187, 4392-4400, 2005
- [2] **Spoering, A.L., Gilmore, M.S.:** Quorum Sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 133-137, 2006
- [3] **Christensen, B.E., Characklis, W.G.:** Physical and chemical properties of biofilms. In Characklis, W.G., Marshall, K.C.: *Biofilms*. John Wiley & Sons, 1990
- [4] **Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.-C.:** *Bacterial extracellular polymer substances*. Springer Verlag, Heidelberg, , 1999
- [5] **Sutherland, I.W.:** Microbial polysaccharides - their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10, 173-201, 1984
- [6] **Costerton, J.W., Irvin, R.T.:** The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 299-324, 1981
- [7] **Christensen, B.E., Characklis, W.G.** Physical and chemical properties of biofilms. In Characklis, W.G., Marshall, K.C.: *Biofilms*. John Wiley & Sons, 1990
- [8] **Flemming, H.-C.:** The forces that keeps biofilms together. *DECHEMA Monographs* 133, 311-316, 1996
- [9] **Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P.:** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727-751, 1996
- [10] **Miller, M.B., and Bassler, B.L.:** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199, 2001
- [11] **Federle, M.J., Bassler, B.L.:** Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 112, 1291-1299, 2003

- [12] **Engebrecht, J., Nealson, K., Silverman, M.:** Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32, 773-781, 1983
- [13] **Lazazzera, B.A., Grossman, A.D.:** The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* 6, 288-294, 1998
- [14] **Hakenbeck, R., Stock, J.B.:** Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol.* 273, 281-300, 1996
- [15] **Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., Silverman, M.R.:** Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9, 773-786, 1993
- [16] **Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., Hughson, F.M.:** *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol. Cell* 15, 677-687, 2004
- [17] **Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., et al.** The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* 12 (6), 2477-2482, 1993
- [18] **Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E.T.:** A small diffusible molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12, 2467-2476, 1993
- [19] **Ruby, E.G.:** Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 591-624, 1996
- [20] **Parsek, M.R., Greenberg, E.P.:** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13 (1), 27-33, 2005
- [21] **Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., Kjelleberg, S.:** Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* 187 (10), 3477-3485, 2005

- [22] **González Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E., Wood, T.K.:** Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator. *J. Bacteriol.* 188 (1), 305-316, 2006
- [23] **Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Rich, C., Forestier, C.:** Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J. Bacteriol.* 187 (8), 2870-2880, 2005
- [24] **Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J., Stoodley, P.:** Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiol.* 151, 1569-1576, 2005
- [25] **Purevdorj, B., Costerton, J.W., Stoodley, P.:** Influence of hydrodynamics and cell signalling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (9), 4457-4464, 2002
- [26] **Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W.:** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol.* 104, 313-322, 1970
- [27] **Eberhard, A.:** Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 109, 1101-1105, 1972
- [28] **Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J.:** Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20, 2444-2449, 1981
- [29] **Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E.P., Ruby, E.G.:** The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems ain and lux sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol. Microbiol.* 50 (1), 319-331, 2003
- [30] **Hastings, J.W., Nealson, K.H.:** Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549-595, 1977
- [31] **Hastings, J.W., Potrikus, C.J., Gupta, S.C., Kurfurst, M., Makemson, J.C.:** Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26, 235-291, 1985

- [32] **Engebrecht, J., Silverman, M.:** Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4154-4158, 1984
- [33] **Meighen, E.A.:** Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142, 1991
- [34] **Fidopiastis, P.M., Miyamoto, C.M., Jobling, M.G., Meighen, E.A., Ruby, E.G.:** LitR, a newly described transcriptional activator homologue in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. *Mol. Microbiol.* 45, 131-143, 2002
- [35] **Kuo, A., Blough, N.V., Dunlap, P.V.:** Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 176, 7558-7565, 1994
- [36] **Gilson, L., Kuo, A., Dunlap, P.V.:** AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* 177, 6946-6951, 1995
- [37] **Kuo, A., Callahan, S.M., Dunlap, P.V.:** Modulation of luminescence operon expression by N-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 178, 971-976, 1996
- [38] **Callahan, S.M., Dunlap, P.V.:** *LuxR*- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-*lux* genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 182, 2811-2822, 2000
- [39] **Magasanik, B.:** Regulation of nitrogen utilization. In Neidhardt, F.C. et al. (ed.): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C., 1996
- [40] **Reitzer, L., Schneider, B.L.:** Metabolic context and possible physiological themes of sigma 54-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 422-444, 2001
- [41] **Wolfe, A.J., Millikan, D.S., Campbell, J.M., Visick, K.L.:** *Vibrio fischeri* sigma 54 controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4), 2520-2524, 2004

- [42] **Horn, H.:** Modellierung von Stoffumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. Hempel, D.C. (Hrsg.): *ibvt-Schriftenreihe*, Bd. 17. FIT-Verlag, Paderborn, 2003
- [43] **Horn, H.:** Simultane Nitrifikation und Denitrifikation in einem hetero-/autotrophen Biofilm unter Berücksichtigung der Sauerstoffprofile. *gwf Wasser/Abwasser* 133 (6), 287-292, 1992
- [44] **Baerns, M., Hofmann, H., Renken, A.:** Chemische Reaktionstechnik. G.Thieme, Stuttgart, 1987
- [45] **Debus, O.:** Aerober Abbau von flüchtigen Abwasserinhaltsstoffen in Reaktoren mit membrangebundenem Biofilm. Sekoulov, I. (Hrsg.): *Hamburger Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*. GFEU an der TUHH, Hamburg, 1993
- [46] **Horn, H., Hempel, D.C.:** Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Wat. Res.* 31, 2243-2252, 1997
- [47] **Wäsche, S.:** Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmen. Hempel, D.C. (Hrsg.): *ibvt-Schriftenreihe*, Bd. 14. FIT-Verlag, Paderborn, 2002
- [48] **Imboden, D.M., Koch, S.:** Systemanalyse – Einführung in die mathematische Modellierung natürlicher Systeme. Springer-Verlag, Berlin, 2004
- [49] **Fromm, J.:** *The Emergence of Complexity*. Kassel University Press, Kassel, 2004
- [50] **Williamson, K., McCarty, P.L.** A model of substrate utilization by bacterial films. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48 (1), 9-24, 1976
- [51] **La Motta, E.J.:** Internal diffusion and reaction in biological films. *Environ. Sci Technol.* 10 (8), 765-769, 1976
- [52] **Harris, N.P., Hansford, G.S.:** A study of substrate removal in a microbial film reactor. *Wat. Res.* 10, 935-943, 1976
- [53] **Characklis, W.G., Wilderer, P.A.:** *Structure and functions of biofilms*. John Wiley & Sons, New York, 1989
- [54] **Costerton, J.W., Lewandowski, Z., de Beer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G.:** Biofilms, the customized microninche. *J. Bacteriol.* 176 (4), 2137-2142, 1994

- [55] **Keevil, C.W., Rogers, J., Walker, J.T.:** Potable-water biofilms. *Microbiol. Europe* 3 (6), 10-14, 1995
- [56] **Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M.:** Use of mathematical modelling to study biofilm development and morphology. In Lens, P. et al.: *Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology - characteristics, analysis and control*. IWA Publishing, 2003
- [57] **Kreft, J.-U., Booth, G., Wimpenny, J.W.T.:** BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth. *Microbiol.* 144, 3275-3287, 1998
- [58] **Piciooreanu, C., Kreft, J.-U., van Loosdrecht, M.C.M.:** Particle-based multidimensional multispecies biofilm model. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5), 3024-3040, 2004
- [59] **Kreft, J.-U., Wimpenny, J.W.T.:** Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci. Technol.* 43, 135-141, 2001
- [60] **Wimpenny, J.W.T., Colasanti, R.:** A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilm based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 1-16, 1997
- [61] **Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J.:** Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 1001-116, 1998
- [62] **Hermanowicz, S.W.:** A simple 2D biofilm model yields a variety of morphological features. *Math. Biosci.* 169, 1-14, 2001
- [63] **Wanner, O., Gujer, W.:** A multispecies biofilm model. *Biotechnology and bioengineering* 28, 314-328, 1986
- [64] **Alpkvist, E.:** Modelling and simulation of heterogeneous biofilm growth using a continuum approach. Centre for mathematical sciences, Lund University: Licentiate theses in mathematical sciences 2005: 2. KFS, Lund, 2005
- [65] **Eberl, H.J., Parker, D., van Loosdrecht, M.C.M.:** A new spatio-temporal continuum model for biofilm development. *J. Theor. Med.* 3, 161-175, 2001

- [66] **Dockery, J., Klapper, I.:** Finger formation in biofilm layers. *SIAM J. Appl. Math.* 62 (3), 853-869, 2001
- [67] **Wanner, O., Reichert, P.:** Mathematical modelling of mixed-culture biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 49 (2), 172-184, 1996
- [68] **Möhle, R.:** Simulation der Biomasseverteilung in Biofilmen bei variierender hydrodynamischer Beanspruchung. 2004
- [69] **Gujer, W., Wanner, O.:** Modeling mixed population biofilms. In Characklis, W.G., Marshall, K.C.: *Biofilms*. John Wiley, 1989
- [70] **Strathmann, M.:** Herstellung und Untersuchung von Hydrogelen als Biofilm-Modelle. 1999
- [71] **Smidsrod, O., Skjak-Braek, G.:** Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8 (3), 71-78, 1990
- [72] **Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D.:** Characterization of alginate composition and block-structure by circular dichroism. *Carbohydr. Res.* 81 (2), 305-314, 1980
- [73] **Schanzenbach, D.:** Chitin und Chitosan: Chemie und Biochemie vielseitiger Naturstoffe. *Praxis der Naturwissenschaften-Chemie* 49 (6), 8-17, 2000
- [74] **Roberts, G.A.F.:** *Chitin Chemistry*. MacMillan Press, Basingstoke, 1992
- [75] **Römpp Chemie Lexikon, 9. Aufl.,** Georg Thieme Verlag, 1995
- [76] **Staudt, C.:** Entwicklung der Struktur von Biofilmen. Hempel, D.C. (Hrsg.): *ibvt-Schriftenreihe*, Bd. 22. FIT-Verlag, Paderborn, 2005
- [77] **Rochas, C., Hecht, A.M., Geissler, E.:** Swelling properties of agarose gels. *J. Chem. Phys.* 93, 850-857, 1996
- [78] **Dunlap, P.V., Kita-Tsukamoto, K., Waterbury, J.B., Callahan, S.M.** Isolation and characterization of a visibly luminous variant of *Vibrio fischeri* strain ES114 from the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. *Arch. Microbiol.* 164, 194-202, 1995

- [79] **Nealson, K.H.:** Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.* 112, 73-79, 1977
- [80] **Boettcher, K.J., Ruby, E.G.:** Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. *J. Bacteriol.* 172 (7), 3701-3706, 1990
- [81] **Bakken, L.R., Olsen, R.A.:** Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (4), 1188-1195, 1982
- [82] **de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z.:** Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Wat. Res.* 30 (11), 2761-2765, 1996
- [83] **Piciooreanu, C.:** Multidimensional modelling of biofilm structure. Delft University of Technology, Faculty of Applied Sciences, Delft, 1999

8. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe. Quellen, Literatur und Hilfsmittel, die von mir benutzt wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Braunschweig, den 14.07.2006