

Bestimmung der mechanischen Stabilität von Biofilmen

Volker Körstgens¹, Werner Borchard¹, Jost Wingender² und Hans-Curt Flemming²

¹ Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Lotharstr. 1, 47057 Duisburg

² Lehrstuhl für Aquatische Mikrobiologie, Geibelstr. 41, 47057 Duisburg

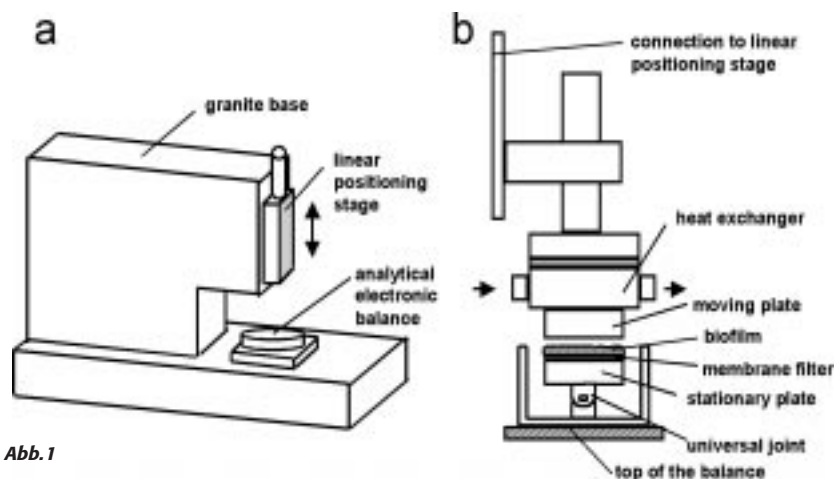


Abb. 1

Einleitung und Fragestellung

Biofilme bestehen aus Mikroorganismen, die in eine Schleim-Matrix eingebettet sind. Dieser Schleim ist ein Hydrogel aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die von Bakterien gebildet werden. In dieser Form besiedeln Bakterien eine Vielzahl von Oberflächen: Böden und Sedimente, Felsen, Steine, Blätter und viele technische Systeme. Die meisten Mikroorganismen auf der Erde leben in aggregierter Form, wobei die EPS für den Zusammenhalt der Matrix sorgen (WINGENDER ET AL., 1999). Sie bestehen überwiegend aus Polysacchariden und Proteinen, aber auch Glycoproteine, Glycolipide und Nucleinsäuren wurden in den EPS gefunden (SUTHERLAND, 2001). Die molekulare Grundlage für die Kohäsion liegt nicht in kovalenten Bindungen zwischen den Biopolymeren. Der Zusammenhalt wird vielmehr von schwachen physikalisch-chemischen Wechselwirkungen hervorgerufen. Dazu gehören elektrostatische Wechselwirkungen, Dispersionswechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen (FLEMMING ET AL., 2000, MAYER ET AL., 1999). Weil die EPS eine Vielzahl von möglichen Bindungsstellen aufweisen, multipliziert sich die an sich schwache Bindungsenergie zu einer Gesamt-Energie, die deutlich über jener kovalenter C-C-Bindungen liegen kann. Daraus können Biofilme mit erstaunlich hoher mechanischer Stabilität resultie-

ren, die starken Scherkräften widerstehen können – zum Beispiel direkt unter Wasserfällen, auf Felsen in der Brandung oder in Wasserrohren mit hoher Durchflusgeschwindigkeit. Die mechanische Stabilität spielt auch eine wichtige Rolle in der biologischen Abwasserreinigung, denn von ihr hängt ab, wie fest der Biofilm auf dem Aufwuchssubstrat haftet; wenn Teile sich ablösen, kann es zu ernststen Störungen des Prozesses kommen. Bei Reinigungsvorgängen hingegen, wenn unerwünschte Biofilme entfernt werden sollen, muss der Biofilm destabilisiert werden. Dazu müssen die Kräfte, welche die Kohäsion vermitteln, überwunden werden.

Die Gestalt und Erscheinungsform von mikrobiellen Lebensgemeinschaften, die unter dem Begriff „Biofilm“ zusammengefasst werden, ist vielfältig und reicht von losen Flocken bis hin zu dichten Belägen. Eine Methode zur Bestimmung der Materialeigenschaften von Biofilmen, die all diesen Formen von Biofilmen gerecht wird, kann es nicht geben, vielmehr muss die Methode an die jeweilige Form des zu untersuchenden Biofilms angepasst werden.

Allen rheologischen Untersuchungen (Untersuchungen der Fließeigenschaften) von Biofilmen ist gemein, dass eine Kraft auf den Biofilm einwirkt, die dessen Deformation bewirkt. Die Einwirkung einer definierten Kraft ist dabei die Voraussetzung, um zu quantitativen Aussagen zu gelangen,

ist zugleich jedoch das größte Problem bei einem heterogenen Gebilde wie einem Biofilm. Bemühungen zur Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften von Biofilmen hat es bereits gegeben, beispielsweise haben OHASHI ET AL. (1999) durch die Streckung von auf Probekörpern aufgewachsenen Biofilmen elastische Koeffizienten ermittelt. STOODLEY ET AL. (2000) haben aufgrund der strömungstechnischen Analyse von filamentösen Biofilmstrukturen („streamers“) deren apparente Elastizitätsmoduli bestimmt und die Fließeigenschaften dieser Biofilme demonstriert.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode vorgestellt, die es erlaubt, mittels uniaxialer Kompressionsmessungen den apparenten Elastizitätsmodul von Biofilmen zu bestimmen.

Bestimmungsmethode

Der grundsätzliche Aufbau der in *Abbildung 1* skizzierten Apparatur folgt einer Messanordnung, die für die Untersuchung der Gelierung von Systemen aus Biopolymeren und Wasser gebaut wurde (TRICOT 1989). Die Deformation der Probe erfolgt mittels eines rückstoßfreien Linearverstellers; die zur Deformation des Biofilms notwendige Kraft wird mit einer digitalen Analysenwaage gemessen. Die einzelnen Komponenten sind durch einen Rechner verbunden, der die Steuerung sowie die Aufnahme und Verarbeitung der Daten übernimmt (KÖRSTGENS ET AL., 2001 A).

Das hier untersuchte Biofilm-System besteht aus einem auf Agar-Nährmedium gewachsenen mucoiden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa*. Der Biofilm wird gewonnen, indem zunächst eine Suspension aus etwa einer Million Bakterienzellen durch einen Membranfilter gesaugt wird. Nach 24 Stunden bei 36° Celsius auf einem *Pseudomonas*-Isolierungs-Agar resultiert eine vollständige Bedeckung des Filters mit einem schleimigen, zusammenfließenden Biofilm. Die Filme bestehen zu 94 Prozent aus Wasser. Etwa zwei Prozent des Volumens wird durch die Mikroorganismen eingenommen.

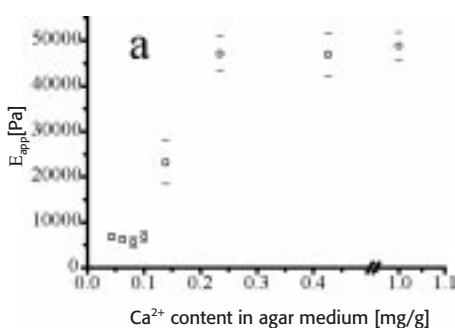


Abb. 3

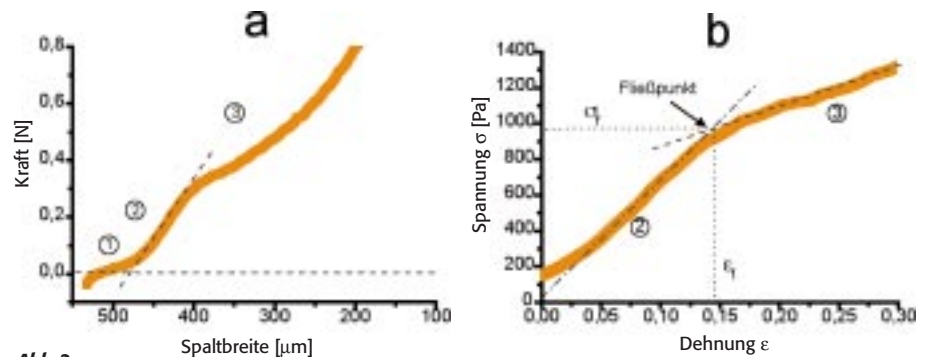


Abb. 2

Die rheologische Untersuchung der Biofilme erfolgt, indem die eine kreisrunde Probe mit einem Durchmesser von zwei Zentimetern ausgeschnitten und samt Filtermembran auf den unteren Stempel des Filmrheometers gelegt wird. Nach der Bedeckung des Biofilms mit ein paar Tropfen Paraffinöl, welches die Austrocknung des Biofilms verhindert, wird die Messung gestartet. Dabei nähert sich der obere Stempel dem Biofilm mit einer konstanten Geschwindigkeit (hier: 1 µm/s) und verringert so den Spalt zwischen den beiden Stempeln.

Treten Biofilm und Stempel miteinander in Kontakt, erfolgt eine Anpassung der Filmoberfläche an den oberen Stempel. Dies wird durch die variable Neigung des unteren Stempels mittels eines Kardangelenks ermöglicht. Ebenso notwendig ist die durch Paraffin vermittelte Gleitfähigkeit der Oberflächen.

In der in *Abbildung 2 a* gezeigten Auftragung der Kraft gegen die Spaltbreite führen die erwähnten Ausrichtungseffekte, der Ausgleich von Oberflächenunebenheiten und das Abfließen von oberflächennahem Paraffinöl zu dem Verlauf des mit ① bezeichneten Kurvenstücks. Aus dem Kurvenabschnitt ② läßt sich einerseits durch Extrapolation auf die Kraft Null eine anfangs vorliegende, mittlere Filmdicke bestimmen. Zum anderen läßt sich in der Spannungs-Dehnungs-Auftragung nach *Abbildung 2 b* aus dem linearen Bereich ein apparenter

(scheinbarer) E-Modul berechnen, der den Widerstand des Biofilms gegenüber uniaxialer Kompression beschreibt. An einem bestimmten Punkt weicht die Messkurve vom linearen Verlauf ab und folgt dem mit ③ gekennzeichneten Teil der Kurve. Der Schnittpunkt der Kurvenzüge ② und ③ kann als Fließgrenze betrachtet werden.

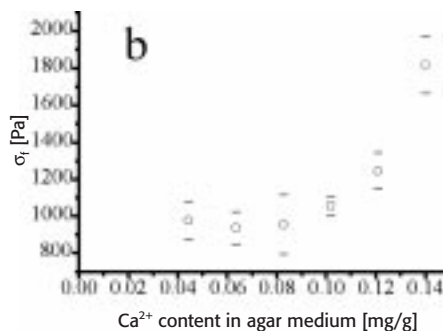
Ein Beispiel: Der Einfluss von Calciumionen

Die Anwendung des Filmrheometers wird hier anhand der Untersuchung der Auswirkung der Calciumionenkonzentration auf die mechanische Stabilität eines *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilms demonstriert (KÖRSTGENS ET AL. 2001 B).

Nutzt man mit Calciumchlorid versetzte Nährmedien, so ändert sich Zusammensetzung der sich bildenden Biofilme. Mit steigender Calciumionenkonzentration entstehen Filme, die nicht mehr schleimig sind, sondern fester und elastischer werden.

Dementsprechend weisen die Filme ein anderes Kompressionsverhalten auf: Mit steigender Calciumionen-Konzentration wird der apparente Elastizitätsmodul ebenso größer wie die Fließspannung. Der *Abbildung 3* ist zu entnehmen, dass im Anfangsbereich erhöhter Calciumionenkonzentration nur geringe Änderungen der mechanischen Eigenschaften beobachtet werden können.

Die veränderten mechanischen Eigenschaften der Biofilme mit erhöhter Calciumionenkonzentration können mit der Struktur der EPS erklärt werden. Ein extrazellulärer Hauptbestandteil des untersuchten Biofilms ist Bakterienalginat, ein Polymer, das als Polyanion eine Reihe negativer elektrischer Ladungen trägt. Die doppelt positiv geladenen Calciumionen können nun die Polymerstränge in der Form eines Komplexes zumindest temporär verbrücken. Auf diese Weise entsteht ein Netzwerk fluktuierender Verknüpfungspunkte mit dem sich die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften erklären lassen. Die



Vorstellung ist dabei, dass sich nicht die Anzahl der Verknüpfungspunkte ändert, sondern mit dem komplexierenden Metallion die Lebensdauer des Komplexes. Die Calciumionen stehen im vorliegenden Fall in Konkurrenz zu Magnesiumionen, die ebenfalls Bestandteil des Nährmediums sind.

Ein ähnlicher Einfluss auf die mechanische Stabilität kann auch für andere multivalente Kationen beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den veränderten mechanischen Eigenschaften von *in situ*-*Paeruginosa*-Biofilmen bei Aluminiumchlorid-Zugabe (STOODLEY ET AL., 2001).

Zusammenfassung, Fazit

Mit dieser Testmethode lassen sich, wie am Beispiel von Calciumionen demonstriert, auf einfache Weise die Veränderung der Materialeigenschaften eines Modellbiofilms untersuchen. Eine Aussage über den Calciumioneneinfluss kann hier nur getroffen werden, da die Filme sich in signifikanten Größen, die ansonsten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften haben, gleichen. Dies sind beispielsweise der Wassergehalt und die Filmdicke. Die Filmdicke hat einen Einfluss auf die gemessenen Elastizitätsmoduli, da die Filme auf der Membran haften und somit deren laterale Ausdehnung behindert ist. Dies ist neben der Zeitabhängigkeit (siehe Kasten) ein weiterer Grund von apparenten Elastizitätsmoduli zu sprechen, da das Ausmaß der Adhäsion des Films Einfluss auf diese hat.

Spannung, Dehnung und der Elastizitätsmodul

Die **Spannung** σ , die sich aus der gemessenen Kraft f und der Anfangsfläche A_0 der Probe ergibt, sowie die **Dehnung** ϵ , die sich aus der Anfangsfilmdicke d_0 und der Filmdickenänderung Δd berechnet, sind notwendig zur Darstellung des Spannungs – Dehnungsverhaltens.

$$\sigma = \frac{f}{A_0} \quad \epsilon = \frac{\Delta d}{d_0}$$

Daraus lässt sich nach der Hookeschen Beziehung für elastische Festkörper der **Elastizitätsmodul** E bestimmen.

$$\sigma = E \cdot \epsilon$$

Beim Biofilm handelt es sich jedoch, wie bei den meisten biologischen Materialien um einen viskoelastischen Stoff. Dies bedeutet, dass sich das Material bei einer Beanspruchung weder wie ein reiner Feststoff noch wie eine reine Flüssigkeit verhält. Da das Material zu einem gewissen Anteil fließt, ist das Verhalten stark zeitabhängig; daher die Bezeichnung **apparenter Elastizitätsmodul**.

Natürlich lassen sich nicht nur bei unterschiedlichen Bedingungen angewachsene Biofilme vergleichen, sondern es kann auch die Einwirkung verschiedener Substanzen auf Biofilme getestet werden. So konnte beispielsweise die destabilisierende Wirkung von Komplexbildnern wie Ethylen-diamintetraessigsäure EDTA nachgewiesen werden.

Literatur

Flemming, H.-C., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V. and Borchard, W. (2000): Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: **Lappin-Scott, H., Gilbert, P., Wilson, M. and Allison, D. (Hrsg.):** Community structure and co-operation in biofilms. SGM symposium 59. Cambridge University Press, 87-105

Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J., and Borchard, W. (2001) a: Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J. Microbiol. Meth.* 46: 9-16

Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J., and Borchard, W. (2001) b: Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Wat. Sci. Technol.* 43 (6): 49-57

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., and Flemming, H.-C. (1999): The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26: 3-16

Ohashi, A., Koyama, T., Syutsubo, K. and Harada H. (1999): A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting erosion. *Wat. Sci. Technol.* 39: 261-268

Stoodley P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. (1999): Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 83-92

Stoodley, P., Jacobsen, A., Dunsmore, B.C., Purevdorj, B., Wilson, S., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. (2001): The influence of fluid shear and $AlCl_3$ on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 43 (6): 113-120

Sutherland, I.A. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9

Tricot, Y. (1989): A practical method to characterize the formation and mechanical properties of biopolymer gels. In: **Amman-Brass, H. and Pouradier, J. (Hrsg.):** Photographic Gelatin, Proc. 5th IAG Conf. 1988, Fribourg, Switzerland, 241-255

Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H.-C. (1999): What are Bacterial extracellular polymer substances? In: **Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H.-C. (Hrsg.):** Bacterial extracellular polymer substances. Springer, Heidelberg, Berlin, 1-19

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming
Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie
Universität Duisburg
Moritzstr. 26
D-45476 Mülheim
eMail: HansCurt.Flemming@compuserve.com