

Rheologische Untersuchungen
an nativen Biofilmen
von *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Chemie

der Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Markus Wloka

Dortmund 2006

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2002 und April 2006 an den Universitäten Duisburg-Essen und Dortmund durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Heinz Rehage

Koreferent: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2006

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rehage für die Überlassung des interessanten interdisziplinären Themas und die fortwährende Unterstützung während der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Flemming, Dr. Wingender und den Mitarbeitern des Arbeitskreises Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg, Standort Duisburg, bedanken für die wertvolle Unterstützung bei mikrobiologischen Fragestellungen. Sabine Dietl und Astrid Dannehl gilt besonderer Dank für die Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Physikalische Chemie II vielen Dank für die freundschaftlichen Kontakte, das angenehme Arbeitsklima und die Hilfestellungen.

Der DFG vielen Dank für die finanzielle Unterstützung.

Für Heike und meine Eltern

Tue erst das Notwendige, dann das Mögliche, und plötzlich schaffst du das Unmögliche.

Franz von Assisi, ca. 1181-1226

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		8
1 Einleitung		10
2 Theoretische Grundlagen		15
2.1	Biofilme	15
2.1.1	Allgemeines	15
2.1.2	Biofilmentstehung	17
2.1.3	Biofilmstruktur	20
2.1.4	Bakterien	21
2.1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.1.6	Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)	24
2.2	Polysaccharide	26
2.2.1	Alginate	26
2.3	Gele	31
2.4	Rheologie	37
2.4.1	Begriffsdefinition: Schubspannung und Scherrate	38
2.4.2	Ideale Substanzen	39
2.4.3	Reale Substanzen	41
2.4.4	Fließgrenze	44
2.4.5	Oszillationsmessungen	45
2.4.6	Zeitabhängiges Fließverhalten	50
2.4.7	Zusammenhang zwischen stationärem Scherfließen und Oszillationsmessungen	51
2.4.8	Normalspannungen	52

2.5	Strömungsdoppelbrechung	54
3 Experimenteller Teil		60
3.1	Biologische Methoden	60
3.1.1	EPS Herstellung	60
3.1.2	Herstellung homogener Kalzium Alginat Gele	61
3.1.3	Herstellung von Biofilmen	62
3.1.3.1	Biofilme mit Filter	62
3.1.3.2	Biofilme ohne Filter	63
3.1.3.3	Biofilme mit Filter und Ionen	63
3.2	Das Rheometer	64
3.3	Die rheologischen Untersuchungsmethoden	67
3.3.1	Der Scherratenversuch	68
3.3.2	Der Deformations- oder Amplitudentest	69
3.3.3	Der Frequenztest	70
3.3.4	Der Zeittest	71
3.3.5	Der Relaxationstest	71
3.3.6	Datenkonversion	72
3.4	Methoden der Strömungsdoppelbrechung	74
4 Ergebnisse und Diskussion		77
4.1	EPS Lösungen	77
4.2	Kalzium vernetzte EPS und Natriumalginat	81
4.3	Gegenüberstellung EPS Lösung und Biofilmlösung	91
4.4	Voruntersuchungen: Biofilme mit und ohne Filter	96
4.5	Voruntersuchungen: Einfluss der Messgeometrie	98
4.6	Voruntersuchungen: Andere Einflussgrößen	99

4.7	Untersuchungen an <i>P. aeruginosa</i> SG81	100
4.7.1	Amplitudentests	100
4.7.2	Zeittests	102
4.7.3	Frequenztests	103
4.7.4	Weitere Untersuchungen	107
4.7.5	Der Einfluss von zweiwertigen Ionen auf <i>P. aeruginosa</i> SG81	110
4.7.5.1	Kalzium	110
4.7.5.2	Magnesium	118
4.7.5.3	Mangan	126
4.7.6	Rheologische Unterschiede zwischen <i>P. aeruginosa</i> FRD1 und FRD1153	127
4.7.7	Der Einfluss von Kalziumionen auf Biofilme von FRD1 und FRD1153	133
4.8	Aufbau einer Strömungsdoppelbrechungsapparatur	142
5	Zusammenfassung	146
6	Literaturverzeichnis	151
7	Anhang	156

Abkürzungsverzeichnis

c	Konzentration	\vec{E}	elektrische Feldstärke
d	Durchmesser, Dicke	F	Kraft
dA	differentielles Volumenelement	F_N	Normalkraft
dF	differentielle Oberflächenkraft	G	Schub-/Schermodul
dh	differentielle Schichtdicke	G'	Speichermodul
dv	Geschwindigkeits- differential	G''	Verlustmodul
dy, dx, dz	Raumrichtungsdifferentiale	G_0	Ruhschermodul
h	Abstand	G^*	komplexes Schubmodul
i	Index	$G(t)$	Relaxationsmodul
j	Index	\vec{H}	Magnetfeldstärke
k	Verschiebungsfaktor	$H(\lambda)$	Relaxationszeitspektrum
k_B	Boltzmannkonstante ($1,380662 \cdot 10^{-23} \text{J} \cdot \text{K}^{-1}$)	I	Intensität
n	Brechungsindex	L	Länge
Δn	Doppelbrechung	LVE	linear viskoelastischer Bereich
n'	Realteil des Brechungsindex	M	Molekulargewicht, Drehmoment
n''	Imaginärteil des Brechungsindex	N_1	erste Normalspannungsdifferenz
$\Delta n'$	ström. ind. Doppelbrechung	N_2	zweite Normalspannungsdifferenz
$\Delta n''$	Dichroismus	R	Radius
\vec{n}	Normalvektor des Flächen- elements	T	Temperatur, Transmission
p	hydrostatischer Druck	α	Anisotropiefaktor, Position
t	Zeit	β	Kegelwinkel, Winkel
t_E	elektronische Verzögerungszeit	δ	Phasenverschiebung
t_M	mechanische Verzögerungszeit	γ	Deformation
t_M	Gesamtverzögerungszeit	$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
v	Geschwindigkeit	$\bar{\gamma}$	Deformationstensor
\vec{x}	Ortsvektor		
A	Fläche, Amplitude, Faktor		
\vec{B}	magnetische Flussdichte		
C	Spannungsoptischer Koeffizient		
\vec{D}	elektrische Verschiebungsdichte		
D_r	Rotationsdiffusionskonstante		

$\bar{\dot{\gamma}}$	Scherratentensor	τ	Schubspannung
$\hat{\gamma}$	Amplitude der sinusförmigen Deformation	τ_0	Zeitkonstante
$\hat{\gamma}_{12}$	Amplitude der Deformation	$\tau_{12}(0)$	Schubspannung im Ruhezustand
γ_e	Rückdeformation	$\tau_{xx}, \tau_{yy}, \tau_{zz}$	Normalkraftkomponenten
γ_L	Grenzwert des linear viskoelastischen Bereichs beim Amplitudentest	$\bar{\tau}$	Schubspannungsvektor
γ_v	bleibende Deformation	$\dot{\tau}$	Ableitung der Schubspannung
λ	Relaxationszeit, Wellenlänge	$\bar{\tau}$	Schubspannungstensor
η	Scherviskosität	$\hat{\tau}_{12}$	Amplitude der Schubspannung
η'	Realteil der kompl. Viskosität	ρ	Dichte
η''	Imaginärteil der komplexen Viskosität	ν	Anzahl der Teilchen/cm ³
η_0	Nullviskosität	ν	Frequenz
$ \eta^* $	komplexe Viskosität	ω	Kreisfrequenz
η_{LM}	Viskosität des Lösungsmittels	Φ	Orientierungswinkel
η_n	normierte Scherviskosität	Θ	Orientierungswinkel
$ \eta^* _n$	normierter Betrag der komplexen Viskosität	ξ	normierte Frequenz
		χ	normierte Scherrate
		$\Theta(t)$	Winkelgeschwindigkeit
		Ψ_1	erster
			Normalspannungskoeffizient
		Ψ_2	zweiter
			Normalspannungskoeffizient

1 Einleitung

Die bislang älteste bekannte Form von Lebensgemeinschaften sind Biofilme, rückdatierbar anhand von mineralisierten fossilen Biofilmfunden auf über 3,5 Milliarden Jahre (Flemming 1994). Dieser Zeitraum verdeutlicht, um welches ein erfolgreiches System es sich handelt. Umso erstaunlicher ist die späte Erforschung dieser mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Seit der ersten mikroskopischen Sichtbarmachung von Bakterien durch Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), über Robert Koch (1843-1919), der im späten 19. Jahrhundert Bakterien als Krankheitserreger identifizierte, wurden Bakterien meist als planktonische Zellen in Reinkulturen untersucht. Selbst entstehender Filmbewuchs an der Wand von Schüttelkulturen wurde lange als Störung betrachtet und nicht eingehender untersucht. Dies führte u.a. zu Fehlschlüssen, da die Kulturbedingungen als einzelne freie Zelle meist nichts mit der normalen Umwelt der Mikroben zu tun haben (Costerton & Stewart 2001). Viele dieser Mikroorganismen besiedeln gerne alle möglichen Oberflächen und bilden dort Kolonien, die zu einer großen Vielfalt von Lebensgemeinschaften führen.

Es gibt in der Umwelt praktisch keine Grenzflächen, die nicht von Mikroorganismen besiedelt werden können, auch sind keine Werkstoffe bekannt, die dauerhaft einer mikrobiellen Besiedlung widerstehen. Für den Menschen widrige Umweltbedingungen sind für Biofilme kein Hindernis. Biotopie wie schwefelhaltige heiße Quellen, hypersaline und saure Seen, arktische und heiße Wüsten, Heißwassersysteme, Elektroden, hochbestrahlte Bereiche von Kernkraftwerken und Quarzschutzmäntel von UV-Lampen werden besiedelt (Krumbein W.E. & Villbrandt M. 1993), (Flemming & Wingender 2001). Dabei können nicht nur Bakterien Biofilme bilden, auch Algen und Pilzen sind dazu fähig. Meist sind Biofilme ohnehin ein Lebensraum verschiedenster Zellen. Biofilme und ihre Bakterien sind dabei Segen und Fluch zugleich. Beim Menschen können aus dem Gleichgewicht geratene Biofilme im Darmbereich, den Schleimhäuten oder der Haut zu schweren Krankheiten führen, andererseits können unerwünschte Biofilme auf medizinischen Geräten und Implantaten lebensbedrohende Infektionskrankheiten auslösen. Biofilme in technischen Bereich sind verantwortlich für hohen wirtschaftlichen Schaden. So erhöhen sie beispielsweise den Strömungswiderstand in Rohren oder auf

Schiffsrümpfen, verschlechtern den Wärmeübergang oder beschleunigen die Korrosion von Materialien. Weiterhin tragen Biofilme im positiven Sinn zur Bioverfügbarkeit essentieller Metallionen wie Eisen, Mangan oder Kobalt bei, wenn sie auf Gesteinsoberflächen den Verwitterungsprozess beschleunigen (Flemming & Wingender 2002). Andererseits haben zweiwertige Kationen selbst einen großen Einfluss auf die Stabilität der Biofilmmatrix, da sie z.B. anionische Polysaccharide verbrücken können, was zu stark verändertem mechanischem Verhalten führt (Flemming & Wingender 2001).

Ab circa den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde vermehrt mit der Erforschung der Biofilme begonnen, um die genannten unerwünschten Effekte zu beseitigen. 1985 analysierte z.B. Lewandowski et al. das chemische Milieu im Biofilm direkt mit Hilfe von Mikroelektroden. Ab 1991 war es durch die neu entwickelte konfokale Laser Scanning Mikroskopie erstmals möglich, optische Schichten aus dem Innern eines Films sichtbar zu machen (Costerton & Stewart 2001). Bis dahin konnte durch die Lichtmikroskopie nur ein Blick auf die Oberfläche eines Biofilms und die Bakterien in den äußeren Schichten geworfen werden.

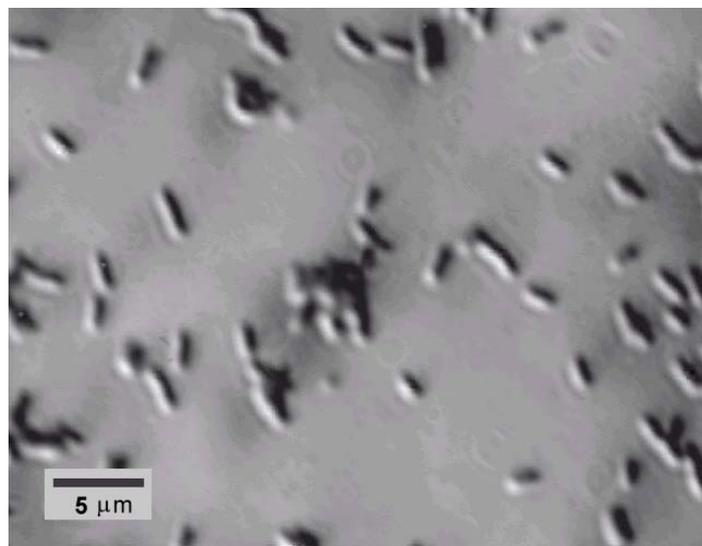


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas fluorescens* Bakterien als Einzelzellen an einer Oberfläche.

Die neuen Techniken erlauben eine weitaus intensivere Erforschung lebender Filme als bisher. Innerhalb eines Films leben die Mikroorganismen in winzigen Enklaven, auch Mikrokolonien genannt, die von einer schleimigen Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben sind. Zwischen den Enklaven erstreckt sich ein Netzwerk von Wasserwegen, welches u.a. für die Nährstoffversorgung zuständig ist. Da nicht alle Zellen gleichen Bedingungen ausgesetzt sind, befinden sich die Bakterien auch in unterschiedlichen Stoffwechselzuständen. Die EPS Matrix ist der Schlüssel zum Verständnis der Biofilme. Ihr Aufbau und ihre Funktionen sind es, die den Film so außerordentlich widerstandsfähig machen, und gegen Umwelteinflüsse schützen. Reiniger wirken meist nur an der Oberfläche der Filme und töten Bakterien im Innern nicht ab. Selbst Chlor oder Bleichkalk brennen sich zwar letzten Endes durch den Film, brauchen aber eine Weile, bis Schicht um Schicht der neutralisierenden Matrix überwunden ist. Desinfektionsmittel erfordern so unverhältnismäßig viel Zeit und größere Mengen, bis ein Biofilm restlos abgetötet ist. Antibiotika ihrerseits haben Schwierigkeiten Bakterien in verschiedenen Stoffwechselzuständen zu töten. Dennoch gibt es verschiedene Ansätze Mechanismen zu entwickeln um unerwünschte Biofilme zu entfernen und die Entstehung von neuen Filmen zu verhindern. Die Blockade von Botenstoffen, die Störung der EPS Synthese oder neuartige Beschichtungen von Oberflächen seien hier als Beispiel genannt (Costerton & Stewart 2001).

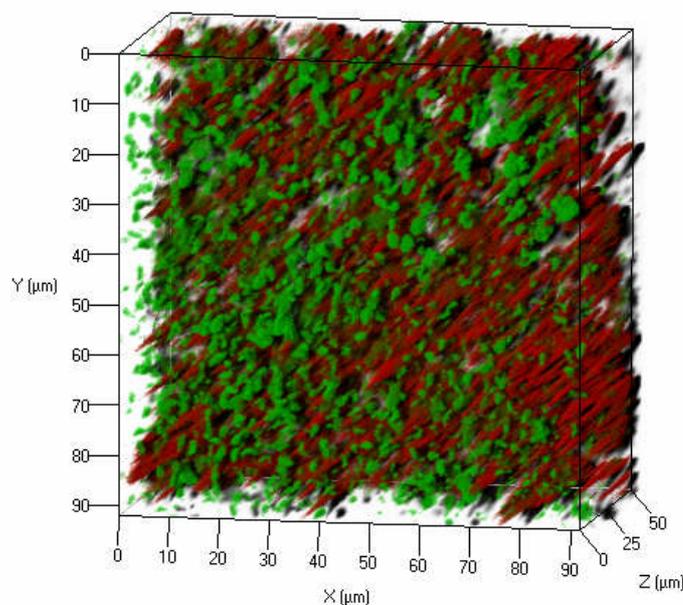


Abb. 2: Laser Scanning Mikroskopieaufnahme eines Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* SG81. Gefärbt mit SYTO9 (Zellen) und Alexa-660-ConA-Lektin (EPS) (Bild aus dem AK Flemming).

Ein weiterer Ansatz zum Verständnis des strukturellen Zusammenhalts der EPS Matrix sind Messungen, welche die mechanischen Eigenschaften eines Films untersuchen. Ein geeignetes Mittel hierfür ist die Rheologie. Schon 1979 führte Characklis et al. erste Untersuchungen mit einem Weissenberg Rheogoniometer durch, und bestimmte ein Gleichgewichts-Schermodul von 60 Pa (Characklis W.G. 1979). Stoodley et al. untersuchte Biofilme mittels Fließzell-Experimenten und detektierte ein Elastizitätsmodul zwischen 17-40 Pa (Stoodley et al. 1999). Weiterhin wurde ein Schermodul in der Größenordnung von 27 Pa gemessen, sowie ein Dehnmodul zwischen 67-85 Pa (Stoodley et al. 2002). Ohashi et al. untersuchte systematisch die Zugfestigkeit von Biofilmen und beobachtete ein geschätztes Elastizitätsmodul zwischen 500-1000 Pa (Ohashi et al. 1999). Körstgens hat ungesättigte Biofilme mittels eines Kompressionsrheometers verglichen und eine Fließgrenze von 980 Pa, sowie ein Dehnmodul von 6500 Pa bestimmt (Körstgens et al. 2001). Neuere Arbeiten von Towler et al. mit Mischkulturbiofilmen und Messungen in einer Fließzelle ergaben ein Schermodul im Bereich von 0,2-24 Pa (Towler et al. 2003).

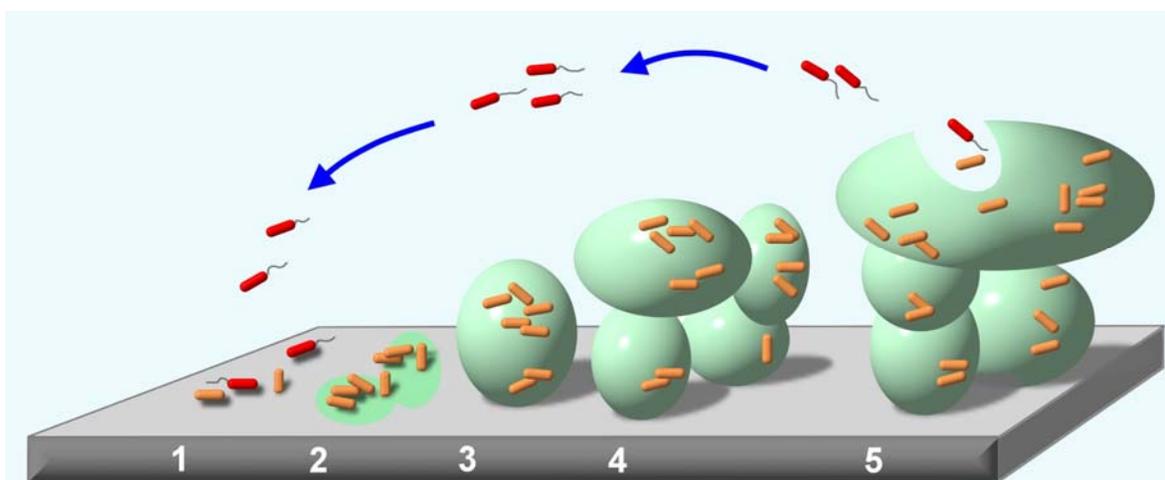


Abb. 3: Schematisch dargestellte Entstehung eines Biofilms (nach Stoodley P. et al. 2002).

Trotz diverser Untersuchungen an verschiedenen Arten von Biofilmen ist noch relativ wenig über den inneren Zusammenhalt der EPS Matrix bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitergehende Messungen und erstmalig dynamische Experimente an lebenden Biofilmen durchzuführen. Dazu wurde u.a. die EPS als Lösung vermessen und mit anderen bekannten Alginaten verglichen. Der Einfluss von Kalzium auf dieses System wurde ebenso bestimmt, wie der Einfluss niedermolekularer Bestandteile. Lebende Filme verschiedener *Pseudomonas aeruginosa* Stämme wurden untereinander verglichen, so z.B. im Hinblick auf den Acetylgruppendefekt von FRD1153, um eine Korrelation zwischen strukturellem Aufbau und mechanischen Eigenschaften zu ermöglichen. Der Einfluss mehrerer zweiwertiger Kationen auf die untersuchten Biofilme wurde bestimmt und zu allen Systemen rheologische Daten, wie z.B. die dynamischen elastischen und viskosen Eigenschaften, typische Gleichgewichtsgrößen und typische zeitabhängige Prozesse gemessen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biofilme

2.1.1 Allgemeines

Der Begriff „Biofilm“ kennzeichnet synergetische Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen in Filmen, Schlämmen, Flocken etc. Gemeinsames Kennzeichen ist, dass die Mikroorganismen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (kurz: EPS) eingebettet sind, welche die Matrix zusammenhalten, und eine Bindung an Oberflächen ermöglichen. Auf die zentrale Rolle der EPS wird in Kapitel 2.1.6 noch genauer eingegangen. Die möglichen Oberflächen können vielfältiger Natur sein, Biofilme entstehen an Grenzflächen von Wasser und festen Medien ebenso, wie an der Grenze von Feststoffen und Luft. Das Vorhandensein von Wasser, verwertbaren Nährstoffen und den Mikroorganismen reicht meist schon aus, Biofilme entstehen zu lassen. Diese Bedingungen machen deutlich, dass der Biofilm die eigentliche Lebensweise von Bakterien in der Natur darstellt und sowohl in der Natur selbst, als auch in technischen Systemen oder in medizinischen Bereichen weit verbreitet ist. Scheinbar lebensfeindliche Bereiche in z.B. stark schwefelhaltiger, saurer, extrem heißer oder kalter Umgebung werden so besiedelt (Flemming & Wingender 2001).

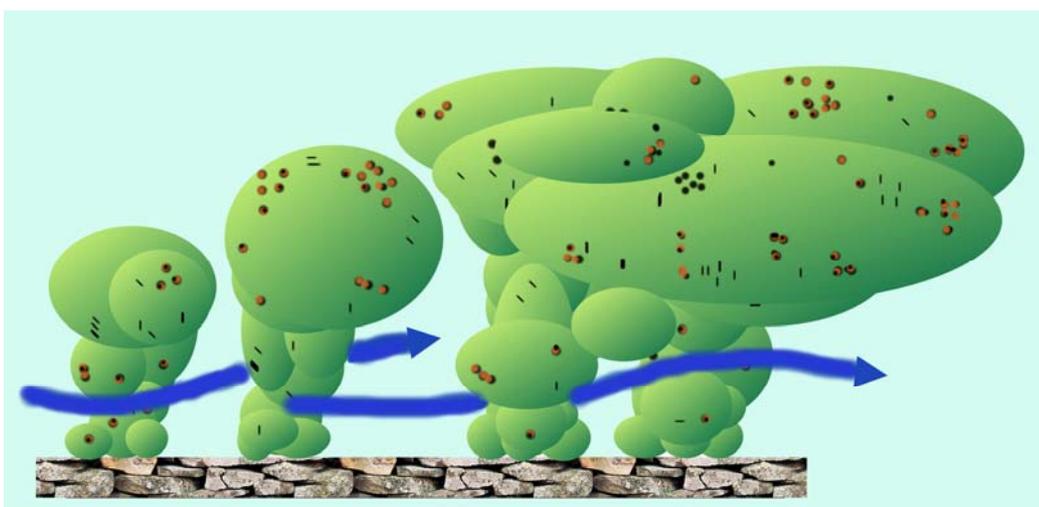


Abb. 4: Modellvorstellung eines Biofilms. Die Kavernenstruktur ermöglicht eine Umspülung mit Wasser und somit eine Versorgung des Biofilms mit Nährstoffen (nach Costerton J.W. & Irvin R.T. 1981).

Je nach Umgebung variiert auch der Wassergehalt in Biofilmen, er kann bis zu 98 % in wässriger Umgebung betragen, oder aber im trockenen Umfeld wesentlich geringer sein, wo dann die Matrix auch die Funktion eines Wasserrückhaltesystems übernimmt (Flemming & Wingender 2001).

Die Mikroorganismen selbst leben im Film in kleinen Enklaven, während ein Netzwerk von Wasserwegen den Biofilm durchzieht und die Mikrokolonien so mit Nährstoffen versorgt, und Stoffwechselabfälle entsorgt. Die hohe Zelldichte im Film ermöglicht eine Zell-Zell Kommunikation über Gentransfer oder mit Hilfe von niedermolekularen Signalmolekülen, wie z.B. den Homoserinlactonen, die von vielen gramnegativen Bakterien genutzt werden (Flemming & Wingender 2002).

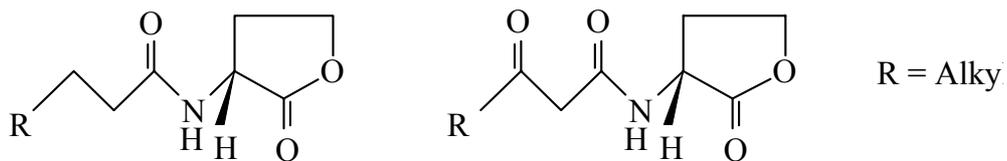


Abb. 5: Beispiele für Homoserinlactone, die von Bakterien als Signalmoleküle genutzt werden. Der Rest R stellt den Bestandteil der Signalspezifität dar.

Signalmoleküle steuern viele Funktionen, wie beispielsweise die Bildung extrazellulärer Produkte, sie haben damit auch Einfluss auf die Entstehung eines Biofilms. Bei *Pseudomonas aeruginosa* werden schon kurz nach dem Andocken auf Oberflächen die zur Bildung der EPS-Matrix erforderlichen Gene eingeschaltet. Diesem Prozess geht die Abgabe von Acyl-Homoserinlactonen voraus. Kommen genügend Zellen zusammen, steigt die Konzentration soweit an, dass eine Reihe von Genen daraufhin ihre Aktivität ändert. Dieser Mechanismus wird auch als *Quorum Sensing*, als Gruppenwahrnehmung, bezeichnet. Fehlt das Gen für die Signalmoleküle, können keine Biofilme gebildet werden, es entstehen lediglich unorganisierte Zellhaufen (Costerton & Stewart 2001).

2.1.2 Biofilmentstehung

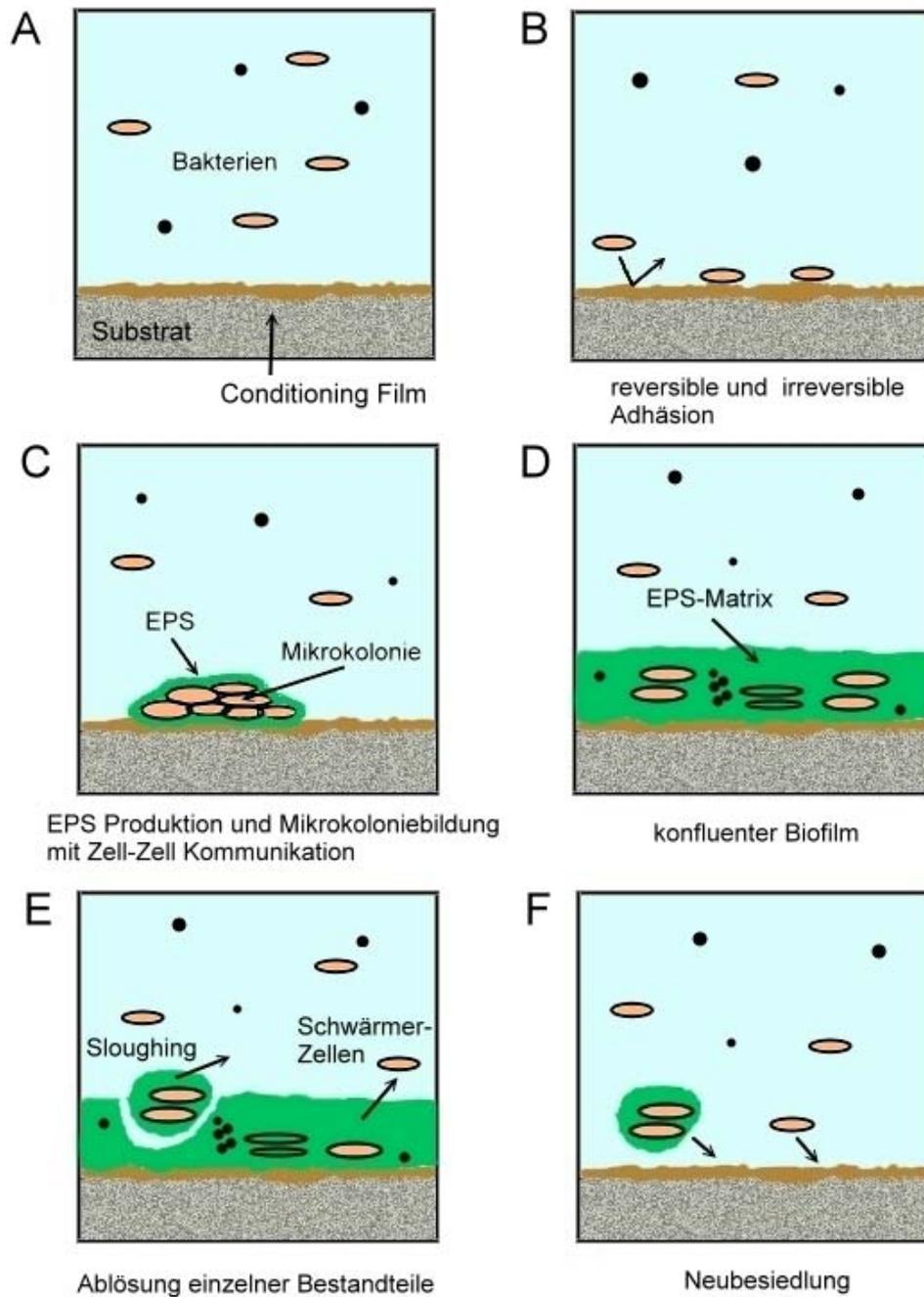


Abb. 6: Schema der Biofilmentstehung in einem wässrigen System auf einem festen Untergrund, unterteilt in einzelne unterscheidbare Schritte A-F (nach Flemming & Wingender 2001).

Das Schema der Biofilmentstehung in einem wässrigen System kann wie folgt zusammengefasst werden:

In Lösung vorhandene Bakterien siedeln sich auf einer Oberfläche an. Ein Bewuchs mit organischen Substanzen (*Conditioning Film*) fördert dies. Die Bakterien beginnen mit der Zellteilung (Abb. 6 A-B).

Durch Zell-Zell Kommunikation und EPS Bildung entstehen Mikrokolonien, deren fortgesetztes Wachstum einen konfluenten Biofilm bildet (Abb. 6 C-D).

Durch passives Ablösen einzelner Bestandteile z.B. in der Strömung, oder aktives Austreten von Zellen kann an anderer Stelle eine Neubesiedlung stattfinden (Abb. 6 E-F).

Der gesamte Vorgang der Biofilmbildung ist weitaus komplexer und durch verschiedene Einflüsse auf das Medium, das Substrat und die Mikroorganismen gesteuert. Hydrodynamische Eigenschaften, Temperatur und pH-Wert beeinflussen beispielsweise die flüssige Phase. Chemische Zusammensetzung, Oberflächenspannung und Ladung, sowie Rauigkeit und Porenweite haben einen Einfluss auf die feste Phase und somit die Besiedelbarkeit. Letztlich ist die Entwicklung der Mikroorganismen z.B. von der Spezies, der Zellzahl, und der EPS Produktion abhängig (Flemming & Wingender 2001).

Dennoch lassen sich für die Entwicklung eines Biofilms folgende allgemeingültige Faktoren festlegen. Neben der Induktionszeit, die benötigt wird bis zum logarithmischen Biofilmwachstum, sind dies die Wachstumsrate und das Ausmaß des Wachstums, das die Dicke und die Auswirkung des Biofilms beschreibt (Flemming 1994).

Der Transport der Bakterien zu einer Oberfläche erfolgt meist durch Konvektion bis zur laminaren Grenzschicht. Die laminare Grenzschicht ist meist viel dicker als die Abmessungen eines Bakteriums. Diese Schicht muss durchdrungen werden, um zum Substrat bzw. zum *Conditioning Film* zu gelangen, der durch Adsorption von organischen

Molekülen auf fast allen Oberflächen zu finden ist. Der erste Kontakt der Zelle mit der Oberfläche ist noch reversibel, erst allmählich wird die Adhäsion aufgrund vermehrter Wechselwirkungen von Zellwandbestandteilen und Besiedlungsoberfläche irreversibel. Bei vielen Bakterienarten spielen diese Zelloberflächenproteine eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung, so ermöglichen sie auch eine Bewegung der Bakterien auf Oberflächen (Flemming & Wingender 2001).

Über welchen Mechanismus Bakterien wahrnehmen, dass sie sich an einer Oberfläche befinden, ist noch weitgehend ungeklärt. Der irreversible Kontakt führt jedoch zu einer Änderung der Genaktivitäten, wodurch sich die Zellstruktur und die Stoffwechselaktivität ändert. Bei *P. aeruginosa* wird durch den Oberflächenkontakt die Produktion von Alginate initiiert, wodurch die sich bildenden Mikrokolonien stabilisieren (Flemming & Wingender 2001).

Biofilme besitzen eine relativ hohe Zelldichte an Mikroorganismen. An aquatischen Standorten kann sie bis zu 10^{12} Zellen/ml Biofilmvolumen betragen, dies ist ein Faktor 1000 bis 10000 größer als in der freien Wasserphase, bzw. in Laborflüssigkulturen (Costerton et al. 1995).

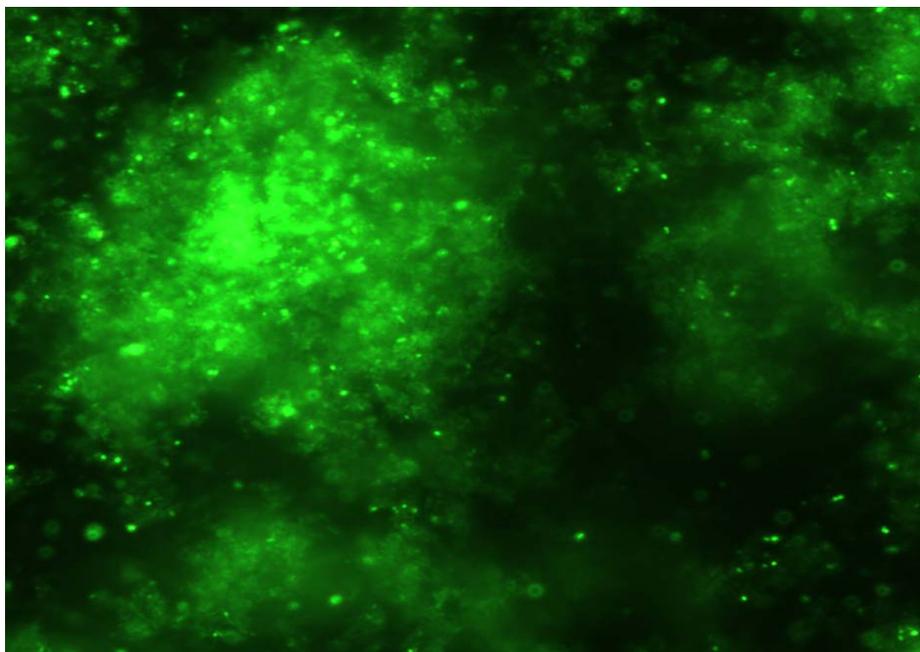


Abb. 7: Mikroskopiebild eines Biofilms von *P. aeruginosa*, die Bakterien sind mit SYTO 9 angefärbt (Bild aus dem AK Flemming).

Das Biofilmwachstum ist nicht unbegrenzt. Die Dicke, die ein Biofilm erreichen kann, ist ein Gleichgewicht aus Neubildung und Ablösung von Bestandteilen durch Umwelteinflüsse. Daraus wird auch deutlich, dass es kein allgemeines Modell einer Biofilmarchitektur geben kann. Die Einflüsse die zur Entstehung eines Films beitragen sind abhängig von o.g. Faktoren zu unterschiedlich. Auch finden sich in der Natur zumeist Biofilme mit Mischpopulationen unterschiedlicher Mikroorganismen. Neben Bakterien können auch Algen, Pilze, Protozoen und auch mehrzellige Organismen vorhanden sein (Flemming & Wingender 2001).

2.1.3 Biofilmstruktur

Ein gängiges Modell für Biofilme ist in Abb. 4 dargestellt. Dieses geht von pilzförmigen EPS-Clustern aus, in denen sich Kolonien von Bakterien befinden, während Wasserkanäle diese Strukturen umspülen. Die Poren und Kanäle mit Durchmessern von bis zu 100 μm können dabei den Biofilm komplett durchziehen und Nährstoffe transportieren, sowie Stoffwechselabfälle entsorgen. Innerhalb der Kanäle findet sich selbst in unteren Biofilmschichten noch Sauerstoff (Debeer, Stoodley P., & Lewandowski 1994) (Okabe, Hirata, & Watanabe 1997). Für Biofilme in durchströmten Systemen konnte in den Kanälen Konvektion nachgewiesen werden (Lewandowski, Stoodley, & Altobelli 1995). In den Pilzstrukturen selbst dominiert diffuser Stofftransport (Debeer, Stoodley P., & Lewandowski 1994). Es gibt aber auch Modelle für weitgehend homogene Biofilme, Zahnbelag sei als Beispiel dafür genannt, ebenso wie Biofilme an Agaroberflächen (Auerbach et al. 2000). Auch Mischformen sind möglich. Die endgültige Struktur hängt von Umwelteinflüssen, wie z.B. auch der Nährstoffsituation, ab.

Der Aufbau des Biofilms spielt auch eine Rolle für die Art der Spezies und die Aktivität der besiedelnden Organismen. Während an der nährstoffreichen Peripherie der EPS-Cluster vorwiegend aerobe Bakterien siedeln, bieten die nährstoffarmen Zonen im Innern eines Biofilms z.B. anaeroben Organismen ideale Bedingungen (Debeer, Stoodley P., & Lewandowski 1994), da die Bakterien im Biofilm weitgehend immobilisiert sind, und unter normalen Umständen nicht selbständig Ihren Standort wechseln können. Derartige Strukturen begünstigen die Entstehung von Mikrokonsortien, die z.B. bei der Selbstreinigung von Gewässern eine Rolle spielen (Bishop 1997).

Vorteile bietet diese Struktur selbst Bakterien im Innern eines Films, die aufgrund der Nährstoffsituation in ein Ruhestadium übergehen. Durch dieses Nebeneinander verschiedener Stoffwechsellustände unterscheiden sich Biofilme auch deutlich von typischen Laborkulturen (Costerton & Stewart 2001). Der Einsatz von Reinigern und Bioziden wirkt meist nur an der Oberfläche und erreicht kaum die Zellen im Zentrum eines Biofilms. Antibiotika wie z.B. Penicillin setzen bei sich teilenden Zellen an. Bei Bakterien im Ruhestadium wird keine Wirkung erzielt. So überleben Mikroorganismen im Innern eines Biofilms zum Teil Faktoren, die Zellen in der Peripherie töten, welche dann aber als Rohstoff überlebenden Zellen wieder zur Verfügung stehen. So kann die Biofilmstruktur als überaus erfolgreiche Anpassung an Umweltbedingungen angesehen werden (Flemming & Wingender 2001) .

2.1.4 Bakterien

Bakterien als Lebewesen ohne echten Zellkern, werden auch als Prokaryonten bezeichnet. Sie besitzen in ihrem Innern eine ringförmige DNA. Das Zytoplasma, die innere Zellmembran besteht ebenso wie die äußere Membran der Zellwand aus einer Phospholipiddoppelschicht. Bakterien können kugelförmig (Kokken), stäbchen- oder spiralförmig sein und einen aeroben oder anaeroben Stoffwechsel besitzen. Sie vermehren sich durch Zellteilung, können aber auch Sporen bilden, die praktisch keinen Stoffwechsel zeigen, um ungünstige Lebensbedingungen zu überstehen. Geißeln dienen den Bakterien zur Fortbewegung, während Fimbrien den Kontakt zu Oberflächen erlauben. Zusätzlich können Bakterien mit einer Kapsel aus Polysacchariden und Proteinen umgeben sein.

Eine Einteilung der Bakterien erfolgt u.a. durch die Gramfärbung. Bei dieser Methode, nach dem dänischen Arzt Christian J.Gram (1853-1938) entwickelt, wird das Murein, ein Zellwandbestandteil, mit Kristallviolett eingefärbt, mit Jod/Kaliumiodid gebeizt und mit Alkohol wieder entfärbt. Abhängig von der Anzahl der Mureinschichten, verhalten sich Bakterien unterschiedlich. Bakterien mit zwei bis fünf Mureinschichten geben den Farbstoff wieder ab, sie werden als gramnegativ bezeichnet. Bakterien mit bis zu 40 Mureinschichten behalten die blaue Färbung bei. Sie werden als grampositiv bezeichnet (www.medizininfo.de).

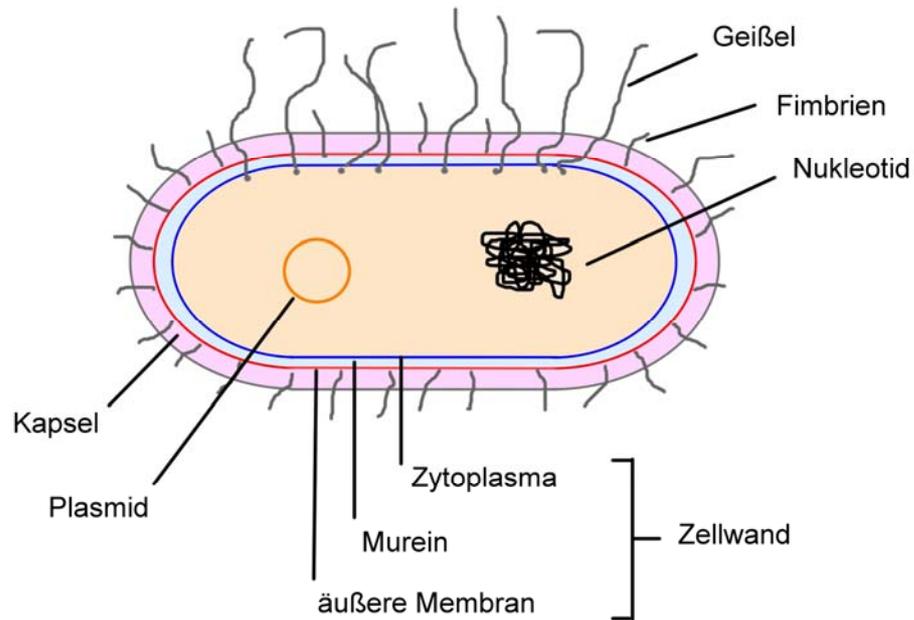


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines Stäbchenbakteriums mit Geißel und Kapsel (nach www.medizininfo.de).

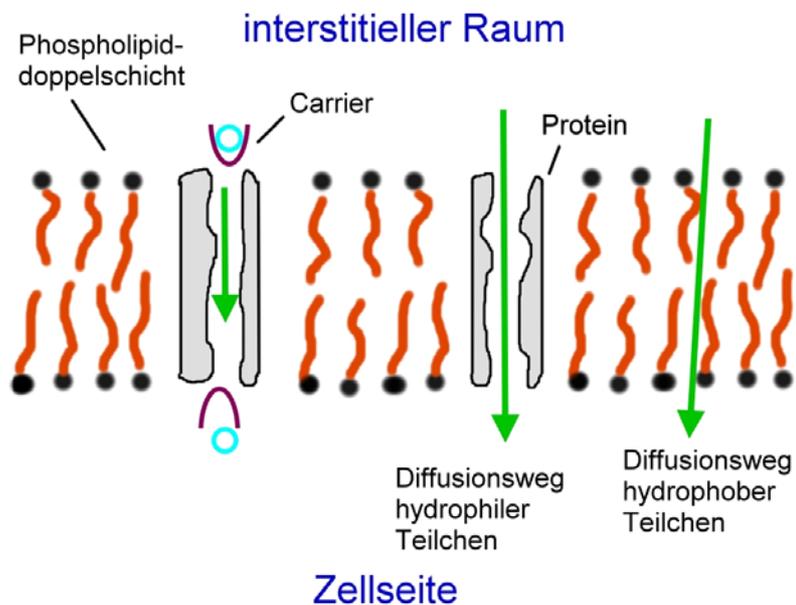


Abb. 9: Schematischer Querschnitt durch eine Zellmembran, mit den unterschiedlichen Diffusionswegen für hydrophile und hydrophobe Teilchen, sowie dem Transport über Carrier (nach www.medizininfo.de).

2.1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa gehört zu den gramnegativen Bakterien. Es ist weitgehend in molekulargenetischer, biochemischer und physiologischer Hinsicht charakterisiert worden, und wird aufgrund dessen häufig als Modellorganismus für Biofilme eingesetzt (Wingender et al. 2001). Die Forschung an Bakterien von Stamm *Pseudomonas aeruginosa* war anfänglich medizinischer Natur. Das Bakterium wurde schon in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts als schleimbildende Komponente von Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose identifiziert (Linker & Jones 1964). Es wechselt unter den Bedingungen in der Lunge eines Mukoviszidose (auch zystische Fibrose (CF)) Patienten zum mukoiden Phänotyp, was mit der Biofilmbildung einher geht, und eine chronische Lungenentzündung verursacht (Hentzer et al. 2001), (Costerton, Stewart, & Greenberg 1999). Die Kolonisation des Nasen-Rachenraums geht der Infektion des Epithelgewebes der Lunge voraus. Dort werden im Besiedlungsstadium Mikrokolonien gebildet, sowie EPS produziert, welches die Lungenfunktion beeinträchtigt. Abgegebene bakterielle Stoffe führen zu Krankheitserscheinungen wie Fieber, Husten und Appetitlosigkeit. Im chronischen Stadium schafft es das menschliche Abwehrsystem nicht mehr die Bakterien aus den Atemwegen zu eliminieren. Es kommt zu einer andauernden Stimulation des Abwehrsystems, aus der eine Minderung der Atemaustauschfläche resultiert (www.medizininfo.de). Weitere mögliche Lebensräume für mukoide Bakterien von Stamm *P. aeruginosa* sind technische Wassersysteme (Grobe, Wingender, & Truper 1995).

Tabelle 1: Zusammensetzung auf PIA Medien angewachsener Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (Wingender, Strathmann, Rode, Leis, & Flemming 2001).

	Biofilm [$\mu\text{g}/10^9$ Zellen]	davon extrazellulärer Anteil [%]	entsprechender EPS Anteil [$\mu\text{g}/10^9$ Zellen]
Kohlenhydrate	1006	76,2	767
Proteine	585	45,5	266
Uronsäuren	474	85,0	403

2.1.6 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)

Die EPS stellen die Schlüssel-moleküle für die Organisationsform des Biofilms dar. Sie sind von wesentlicher Bedeutung für Struktur, Funktion und Zusammensetzung von Biofilmen (Flemming & Wingender 2001). Die EPS Matrix bietet den Organismen Schutz vor Umwelteinflüssen, wie z.B. Austrocknung, puffert Änderungen des pH-Wertes ab oder schützt vor toxischen Metallionen, die von der Matrix gebunden werden können.

Die EPS halten die Filme zusammen und verleihen ihnen Form und Haftung auf Oberflächen. Die physikalischen Eigenschaften von Biofilmen werden maßgeblich von der EPS beeinflusst. Dies gilt für alle Arten von Biofilmen. Die EPS bilden eine Schleimmatrix, welche die Mikroorganismen umschließt. Diese Matrix ist hoch hydratisiert und als Schwamm-ähnliches Gel aufgebaut (Wingender, Neu, & Flemming 1999). Die Immobilisierung der Mikroorganismen in der Matrix gilt als Voraussetzung für die Entwicklung synergistischer Gemeinschaften. Abhängig von Umweltbedingungen, wie Nährstoffgehalt und Spezies der Mikroorganismen ist sie sehr heterogen mit stark variierenden Bestandteilen. EPS können von prokaryotischen (z.B. Bakterien) und eukaryotischen (z.B. Algen und Pilze) Mikroorganismen gebildet werden (Flemming & Wingender 2002).

Die überwiegenden Bestandteile der EPS sind geladene (meist anionische) oder neutrale Polysaccharide mit einer molaren Masse von 0,5 bis $2 \cdot 10^6$ g/mol und Proteine. Ebenfalls können deutliche Anteile an Nukleinsäuren, Lipiden und anderen Makromolekülen vorhanden sein. Carboxylgruppen von Uronsäuren und Acetylgruppen von Polysacchariden, wie sie in bakteriellem Alginat vorkommen, beeinflussen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der EPS. Dies kann sich auf die Festigkeit, die Viskosität, die Wasserbindungskapazität und die Bindung von anorganischen Ionen auswirken (Wingender, Strathmann, Rode, Leis, & Flemming 2001).

Der mengenmäßige Anteil der EPS am Biofilm kann zwischen 50 und 90 % der organischen Substanz schwanken. Dies liegt zum Teil auch an der Akkumulation von Partikeln aus der umgebenden Phase des Biofilms, die aufgrund der „klebrigen“ Oberfläche eingebunden werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch di- oder trivalente Kationen, besonders Kalzium, das die Carboxylgruppen der Zuckersäuren in Polysacchariden verbrücken kann und damit einen entscheidenden Einfluss auf die Festigkeit der Matrix ausübt (Wingender, Strathmann, Rode, Leis, & Flemming 2001).

Die EPS können durch aktive Sekretion der Zellen, Ablösen von Membran/Zellwandbestandteilen, Lysis von Zellen oder durch Sorption gebildet werden. Weiterhin können bei gramnegativen Bakterien durch Freisetzung von Membranvesikeln, welche Enzyme enthalten, benachbarte Zellen im Biofilm angegriffen und lysiert werden. Das so entstehende Biomaterial wird in der Matrix zurückgehalten und steht verbleibenden Populationen als Rohstoff zur Verfügung (Flemming & Wingender 2001).

Die EPS Struktur wird von Kräften zusammengehalten die nicht auf kovalenten Bindungen, sondern auf schwachen Wechselwirkungen beruhen (Mayer et al. 1999). In Frage kommen dafür drei Typen von Bindungsformen:

- Dispersionswechselwirkungen („hydrophobe Wechselwirkungen“) mit einer Bindungsenergie von ca. 2,5 kJ/mol
- Elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Bindungsenergie zwischen 12-29 kJ/mol
- Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Bindungsenergie zwischen 10-30 kJ/mol

Die Bindungsenergie einer einzelnen schwachen Wechselwirkung ist zwar gering, hochgerechnet auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen brauchen jedoch nur ca. 10 % der Bindungsstellen an den Wechselwirkungen beteiligt sein, um in den Bindungsenergiebereich kovalenter Bindungen zu kommen. Die resultierende Kraft ergibt sich aus den drei Bindungstypen, und erstreckt sich über alle EPS Bestandteile. Diese attraktive Wechselwirkung ist auch der Grund, warum die EPS für Partikel als „Klebstoff“ wirkt (Flemming & Wingender 2002).

Die schwachen Wechselwirkungen bewirken ebenfalls ein Netzwerk fluktuierender Haftpunkte, die sich ständig verbinden und wieder lösen. Dies bewirkt die dynamischen und viskoelastischen Eigenschaften der Matrix. Durch zusätzliche Coulombsche Wechselwirkungen, z.B. durch divalente Kationen, können fest vernetzte Gele entstehen.

2.2 Polysaccharide

2.2.1 Alginate

Polysaccharide sind in der Natur weit verbreitet. Sie bilden die Gerüste von Pflanzen und Tieren (Cellulose, Chitin), und dienen als Energiespeicher (Glykogen, Stärke). In Biofilmen sind sie am Aufbau der extrazellulären Substanzen (EPS) beteiligt. Bei fast allen bakteriellen Polysacchariden handelt es sich um Homopolysaccharide oder regelmäßige Copolymere aus zwei bis acht verschiedenen Monosacchariden (Aspinall 1982), (Sutherland 2001).

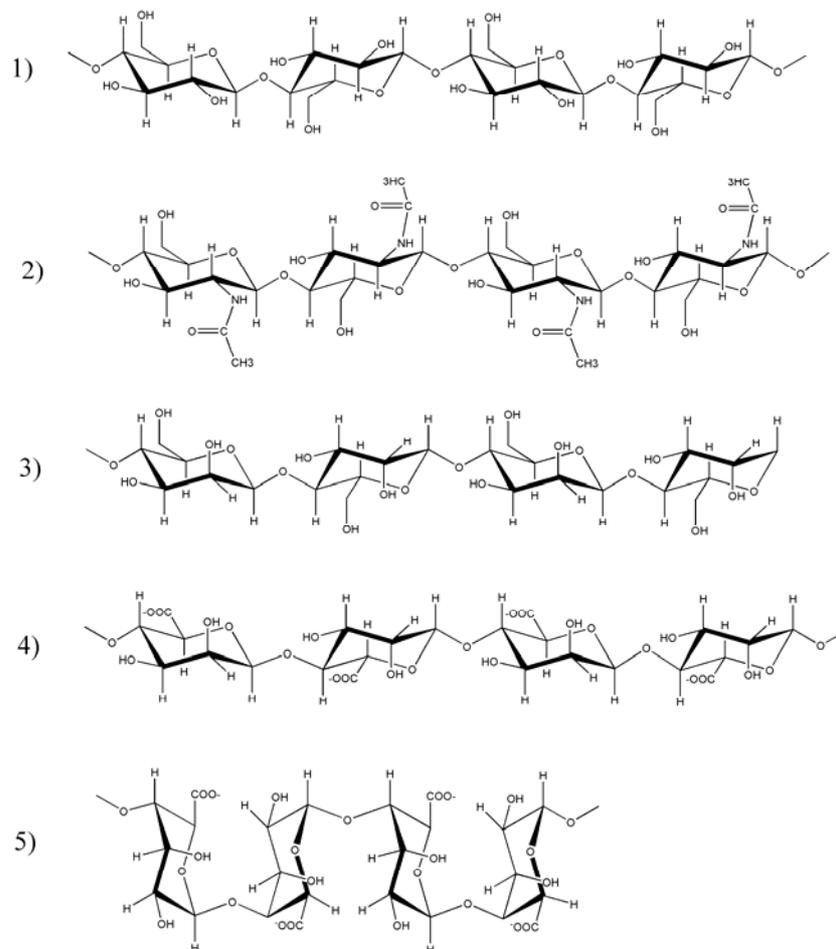


Abb. 10: Primärstruktur einiger Homopolysaccharide: 1) Cellulose, 2) Chitin, 3) Mannan, 4) Poly(D-Mannuronat), 5) Poly(L-Guluronat) (nach Aspinall 1982).

Eine Sonderstellung haben hier die bakteriellen Alginat, die statische Copolymere aus den Monosacchariden Mannuronat (kurz: M) und Guluronat (kurz: G) sind (Sutherland 1994). Die Monomere liegen real in der energetisch günstigen Sesselkonformation vor. Die Eigenschaften der Polymere werden durch die Art der Bindung maßgeblich beeinflusst. Zu finden sind 1,4 und 1,6 glykosidische Bindungen, die nach den beteiligten Kohlenstoffatomen benannt werden.

Der Begriff Alginat stammt von der Alginsäure, ihren strukturvermittelnden Polysaccharid-Monomeren, und den zahlreichen zugehörigen anorganischen Salzen ab, die in verschiedenen Arten von Algen zu finden sind (z.B. *Phaeophyceae*). Die monovalenten Salze werden oft als Alginat bezeichnet. Gerade das Natriumsalz der Alginsäure findet auch in der Lebensmittelindustrie weitläufige Anwendung (Gacesa 1988). Bei vielen mukoiden Bakterienstämmen, so auch den hier untersuchten Bakterien vom Stamm *Pseudomonas aeruginosa*, bilden Alginat den polysacchariden Hauptbestandteil der Extrazellulären Polymeren Substanzen (kurz: EPS). Alginat spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Biofilme und deren mechanischer Stabilität (Wingender, Neu, & Flemming 1999).

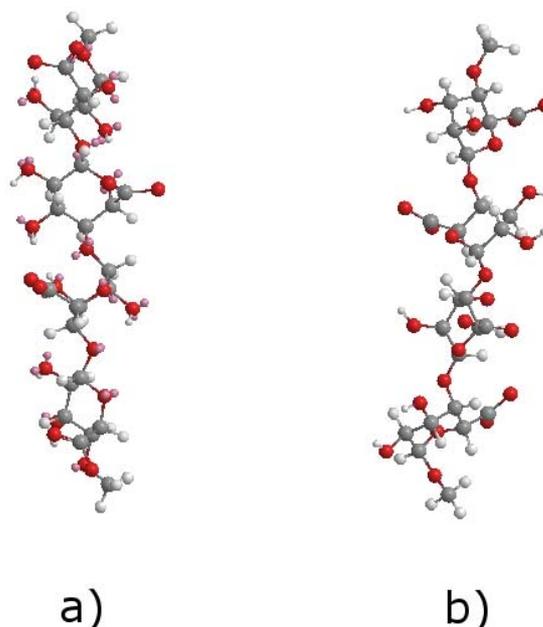


Abb. 11: Schematische 3D Struktur von a) Polymannuronat und b) Polyguluronat.

Bei den untersuchten Alginaten des Bakterienstammes *Pseudomonas aeruginosa* sind vor allem 1,4 glykosidische Bindungen zwischen β -D-Mannuronat und α -L-Guluronat, aber auch zwischen den Monomeren untereinander zu finden, die hochmolekulare, unverzweigte Polymere ergeben. Es gibt Bereiche in denen mehrere Mannuronateinheiten zu so genannten M-Blöcken verknüpft sind, diese Blöcke werden durch Bereiche getrennt, in denen die Verteilung der Monomere statistisch ist. Das M/G Verhältnis liefert keine vollständige Information zur Charakterisierung der Alginate. Dies ist erst durch Kernresonanzspektroskopie und beispielsweise Triadenanalyse möglich, wo Dreierbausteine der Monomereinheiten untersucht werden (z.B. MMM, MMG, etc.) (Schürks et al. 2002). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die molekulare Masse der Alginate die im Bereich $10^4 - 10^6$ g/mol liegen, wobei bakterielle Alginate gegenüber Algenalginaten meist die größere molare Masse besitzen.

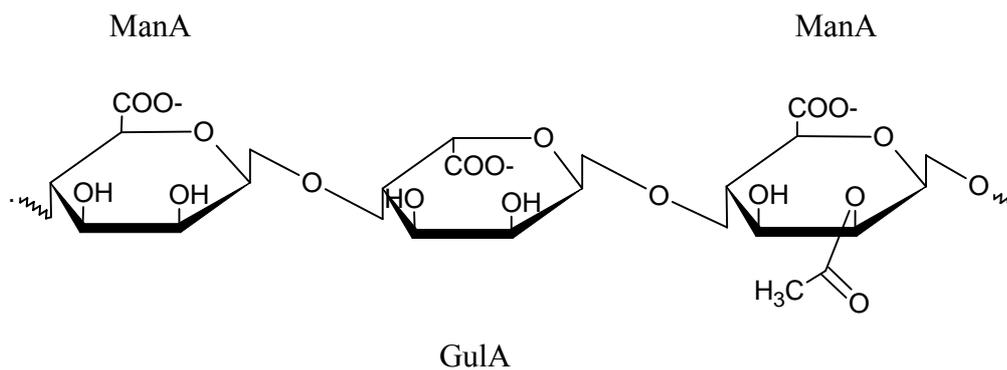


Abb. 12: Ein Ausschnitt aus der Alginatstruktur von *P. aeruginosa*, mit teilweise acetylierten Mannuronateinheiten (ManA), sowie Guluronateinheiten (GulA).

Der Unterschied zwischen bakteriellem Alginat und Algenalginat (z.B. Manucol, Manugel), liegt in der Anwesenheit von Acetylgruppen an den Mannuronatresten der Bakterialginat. So ist bei *P. aeruginosa* das Kohlenstoffatom C-2 und/oder C-3 teilweise acetyliert. Diese Acetylierung schützt die Polysaccharide teilweise vor einem enzymatischen Abbau (Sutherland 1994), und beeinflusst die physikalischen Eigenschaften der Polymere. So zeigen sich beispielsweise Unterschiede in der Oberflächengestalt, der Biofilmdicke, der Molmasse und Konformation (Tielen et al. 2005). Die Einführung von

Acetylgruppen in die Alginatkette bei Algenalginaten setzt z.B. die Gelfestigkeit herab, und erhöht andererseits das Quellvermögen (Skjak-Braek G., Zanetti P., & Paoletti S. 1989).

Tabelle 2 zählt einige Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Alginat auf.

Tabelle 2: Eigenschaften verschiedener Alginat (nach Körstgens Diss.).

Alginattyp	Molmasse [g/mol]	M/G Verhältnis ⁴⁾	Acetylierungsgrad ⁴⁾⁵⁾
Bakterialginat <i>P. aeruginosa</i> SG81	1000000 ¹⁾²⁾	3,17	0,30
Bakterialginat <i>P. aeruginosa</i> FRD1	1000000 ³⁾	2,13	0,29
Bakterialginat <i>P. aeruginosa</i> FRD1153	800000 ³⁾	2,23	<0,02

1) (Windhues T. & Borchard W. 2003a)

2) (Straatmann A. & Borchard W. 2002)

3) (Windhues T. & Borchard W. 2003b)

4) (Schürks, Wingender, Flemming, & Mayer 2002)

5) Der Wert 1 entspricht einer Acetylgruppe pro Alginatmonomer

Eine wichtige Eigenschaft der Polymere in denen α -L-Guluronat vorkommt, ist ihr ausgezeichnetes Bindungsvermögen für mehrwertige Kationen, bedingt durch die Struktur der Polymerkette. Während Poly-Mannuronat räumlich ein ausgedehntes Band darstellt, unterscheidet sich Polyguluronat durch die axial-axial Anordnung der glykosidischen Bindungen, was eine gefaltete Kettenstruktur ergibt. Das „Egg-Box“ Modell beschreibt hier die eigentliche Bindung. Es bilden sich Vernetzungspunkte aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem Kation und dem Carboxylatsauerstoff und dem O-5 von einem Monomer, sowie dem glykosidischen Sauerstoff und dem O-2 und O-3 des darauf

folgenden Monomers. Die entstehenden Komplexe sind sehr stabil und für die Gelbildung verantwortlich. Das „Egg-Box“ Modell liegt mittlerweile in einer quantitativ ausgeweiteten Form vor (Stokke et al. 2000), (Yuguchi et al. 2000).

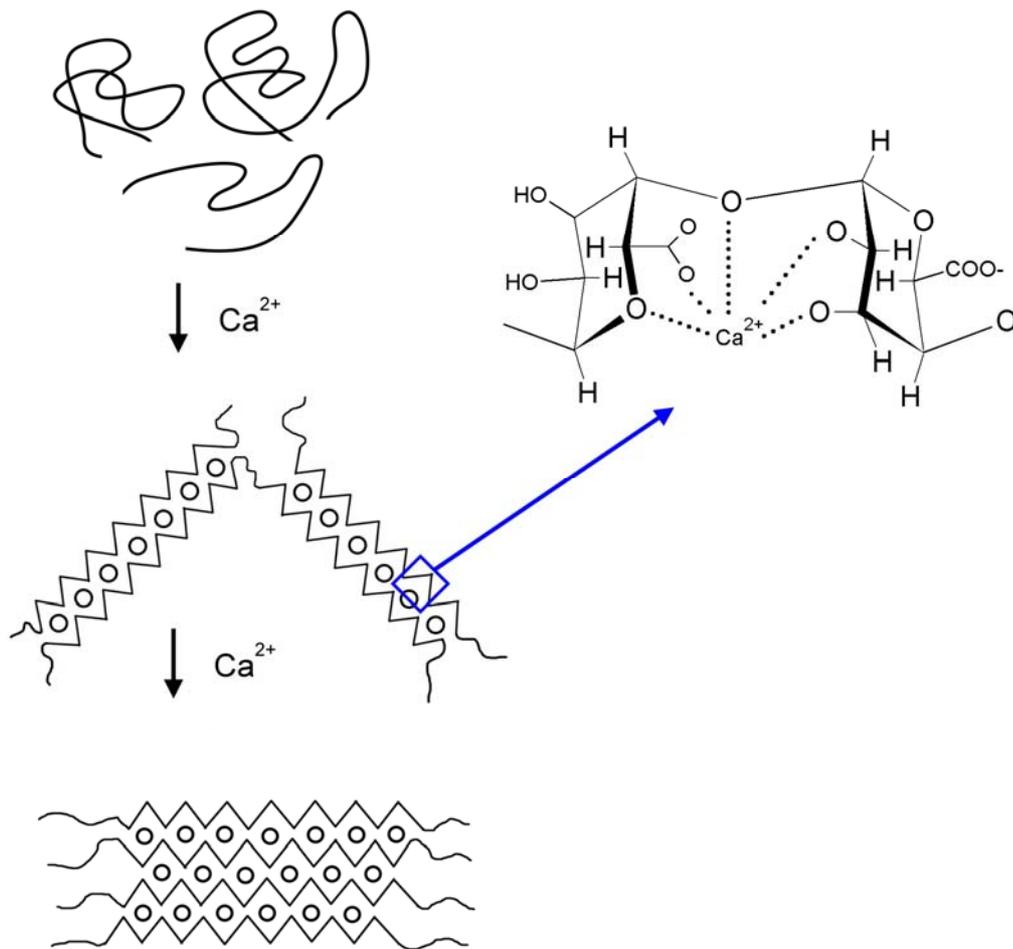


Abb. 13: Das „Egg-Box“ Modell für Polyguluronateinheiten und Kalziumionen (nach Yalpani 1988).

2.3 Gele

Gele sind kohärente Systeme mit spezifischer Hohlraumstruktur. Sie sind im prinzipiellen Aufbau den Schäumen strukturell nahe stehend. Gele sind Mischphasen, bei denen eine Komponente ein Polymer ist und die zweite Komponente ein Dispersions- oder Lösungsmittel. Bei kohärenten Systemen durchdringen sich sowohl die dispergierte Substanz, als auch das Dispersionsmittel gegenseitig. Mit wachsender Konzentration der dispergierten Phase, lagert sich diese zu Hohlraumstrukturen zusammen, die das Dispersionsmittel umschließt (Dörfler 2002).

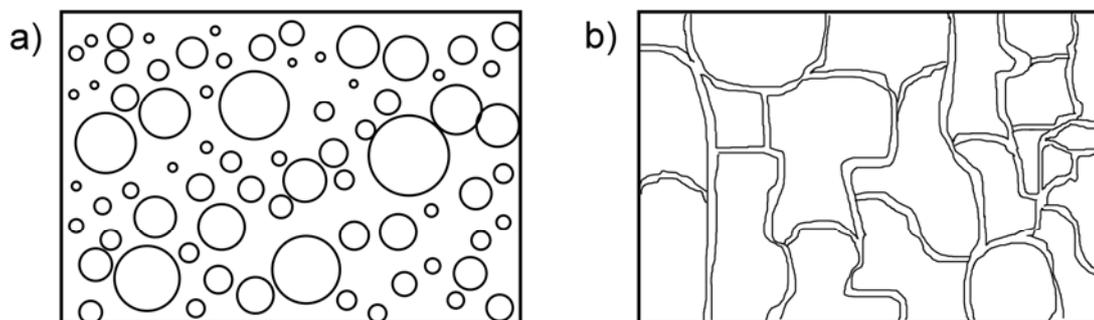


Abb. 14: a) inkohärentes konzentriertes System, b) kohärentes konzentriertes System (nach Dörfler 2002)

Die Struktur der Gele wird weitgehend vom geometrischen Aufbau (Kugel, Blättchen, Stäbchen) und den Eigenschaften der dispergierten Phase bestimmt. Weiterhin sind die thermodynamischen Zustandsfunktionen der Gele (ΔG , ΔS , ΔH) in Analogie zu den Festkörpern, vom Dehnungs- und Spannungszustand des Systems stark beeinflusst.

Es wird zwischen Lyogelen und den Xerogelen unterschieden. Die Lyogele sind formbeständig, elastisch und besitzen eine Fließ- und Bruchgrenze. Sie entstehen aus einem flüssigen System oder durch Flüssigkeitsaufnahme aus einem flüssigkeitsfreien Festkörper. Xerogele entstehen aus Lyogelen durch Flüssigkeitsabgabe unter Volumenverminderung (Dörfler 2002).

Der Aufbau der Gele ist von den Eigenschaften der Bauelemente abhängig. Es wird zwischen Hauptvalenz- und Nebenvalezen unterschieden. Hauptvalenzgele besitzen

Vernetzungen die durch chemische Bindungen erfolgen. Durch die kovalenten Verknüpfungspunkte verhalten sich diese Gele wie ein viskoelastischer Festkörper. Sie besitzen zudem einen Gleichgewichtswert des Relaxationsmoduls. Nebervalenzgele besitzen Bauelemente, die an den Berührungspunkten aneinander haften, und physikalische Wechselwirkungen ausbilden. Die Haftung kann durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen, Dispersionskräfte, Wasserstoffbrücken oder Coulomb-Kräfte erfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist die Vernetzung durch Verschlaufung fadenförmiger Moleküle („Entanglements“) (Dörfler 2002). Diese tritt bei Lösungen von Polymeren und Polymerschmelzen mit einer molaren Masse größer $1,5 \cdot 10^5$ g/mol auf. Man beobachtet einen Anstieg der Viskosität proportional $M^{3,4}$ (Graessly W.W. 1975). Kennzeichnend für diese Arten der Vernetzungen ist, dass die Lebensdauer der Verknüpfungsstellen endlich ist. Es entstehen dynamische fluktuierende Netzwerke. Zahl und Position der Netzwerke ändern sich mit der Zeit. Verschlaufungsnetzwerke besitzen keinen Gleichgewichtswert des Relaxationsmoduls, es erfolgt eine vollständige Relaxation auf den Wert null (Mezger & Zorll 2002).

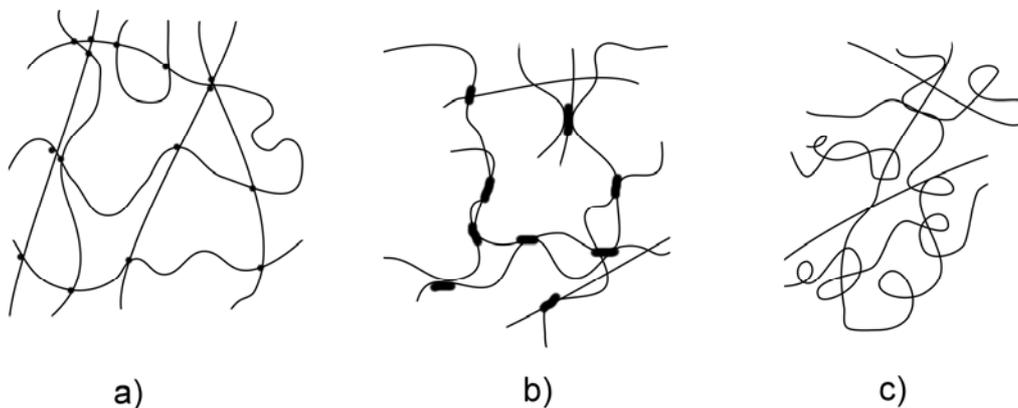


Abb. 15: Schematisierte Netzwerkstrukturen hochpolymerer Gele: a) (chemische) Hauptvalenzvernetzung, b) (physikalische) Nebervalenzvernetzung, c) Verschlaufung, („Entanglements“) (nach Dörfler 2002).

Diese Gele verhalten sich in Oszillationsexperimenten bei höheren Frequenzen wie ein permanentes Gel, bei niedrigen Frequenzen wie eine viskose Flüssigkeit. Die Lebensdauer der Vernetzungsstellen ist ebenso wie deren Anzahl über die Rheologie zugänglich (Kapitel 2.4). Gele physikalischer Netzwerke besitzen rheologische Eigenschaften, die

zwischen denen kovalenter Netzwerke und Verschlaufungsnetzwerke liegen. In der Natur besitzen die Nebenvalenzgele mit physikalischen Wechselwirkungen, sowie Gele durch Verschlaufungen die größte Bedeutung (Mezger & Zorll 2002).

Die meisten biologischen Gewebe liegen in Form eines Gels vor. Die Vorteile eines solchen Zustandes sind die kohäsiven Eigenschaften eines Feststoffes verbunden mit den diffusen Transporteigenschaften einer Flüssigkeit (Silberberg 1989). Für Biofilme hat sich der Begriff „organisches Polymergel mit eingeschlossenen lebenden Zellen“ durchgesetzt. (Christensen B.E. & Characklis W.G. 1990). Diese Biopolymere bilden sich aufgrund physikalischer Aggregation und besitzen entweder eine lokale Ordnung, oder partikulare ungeordnete Strukturen. Man kann sie auch als Multikomponentengel betrachten (Flory P.J. 1975).

Die rheologischen Eigenschaften ändern sich, wenn in den Gelen Einschlüsse vorhanden sind. In Biofilmen sind dies vornehmlich Mikroorganismen. Einschlüsse können die mechanischen Eigenschaften schwächen oder stärken. Dies hängt von Größe, Form und Art des Füllmaterials ab, sowie vom Vorhandensein einer Wechselwirkung zwischen Partikel und Matrix. Derart gebildete Polymernetzwerke entsprechen Kompositgelen, deren Gelmatrix einen Feststoff umschließt (Olsson C. 1998). Die Einschlüsse in der Matrix wirken als Defekte, die zu verminderter Bruchspannung führen kann. Für Gelantine-Gele sind verschiedene Partikel-Matrix Wechselwirkungen formuliert worden (Ross-Murphy & Todd 1983). Ist die umgebende Matrix kein Gel, sondern in einer Lösung suspendierte Partikel ergibt sich nach Einstein die relative Viskosität des Systems nach Gleichung (1), die für den Fall rigider Kugeln in großer Verdünnung ($\Phi > 0,01$) einer Newtonschen Lösung gilt.

$$\eta_r = \frac{\eta_s}{\eta_L} = 1 + 2,5\Phi \quad (1)$$

η_s = Viskosität der Suspension, η_L = Viskosität des Lösungsmittels, Φ = Volumenanteil der Partikel in der Suspension.

Aus Polymersystemen her ist bekannt, dass feste Partikel den Elastizitätsmodul erhöhen, und die Fähigkeiten des Polymers reduzieren, elastischen Deformationen unter vergleichbaren Schubspannungen standzuhalten. Weiterhin kann man beobachten, dass eine Beigabe von Füllerpartikeln zu einem Polymer eine Verschiebung des Relaxationszeitspektrums hin zu längeren Zeiten bewirkt. Im stationären Fließzustand kann man eine Viskositätszunahme beobachten, allerdings ohne Auswirkung auf die Normalspannungen (Vinogradov & Malkin 1980).

Für nicht mit dem Polymer wechselwirkende Füllpartikel scheint der Schubmodul im Plateau- und Endbereich unabhängig von der Partikelgröße zu sein. Er erhöht sich in Abhängigkeit von dem Volumenanteil des Füllpartikels nach folgender empirischer Gleichung (Ferry 1980):

$$\frac{G_e}{G_{e0}} = \left[\frac{1 + 1,25\Phi}{1 - \Phi / \Phi_m} \right]^2 \quad (2)$$

G_{e0} = Gleichgewichtsmodul des ungefüllten Polymers, Φ = Volumenanteil der Partikel, Φ_m = maximal möglicher Volumenanteil in dichtester Packung (Werte zwischen 0,74 und 0,80).

Die Bildung von Gelen mittels mehrvalenten Kationen ist weitgehend untersucht (s.o.). Für diese Art von Gelbildung ist das Phänomen der ionotropen Gelierung bekannt, dies gilt auch für Alginat. „Ionotropie“ beschreibt das Ordnen von fadenförmigen Molekülen durch Ionendiffusion (Thiele 1967). Erfolgt die Gelherstellung durch das Einbringen einer Lösung von Kationen (z.B. CaCl_2 -Lsg.) in eine Polymerlösung (z.B. Alginatlösung) erhält man Gelkugeln, bzw. Gele mit einer ausgeprägten Inhomogenität. In den entstehenden Strukturen spiegelt sich die Diffusionsfront der verbrückenden Kationen wieder. Solche Strukturen zeigen u.a. Doppelbrechungseigenschaften (s. Abb. 16).

Es gibt drei große praktische Methoden zur Herstellung von weitgehend homogenen Alginatgelen. Als da wären diffusionsgesteuerte Prozesse, intern kontrollierte Prozesse und

temperaturgesteuerte Prozesse. Bei diffusionsgesteuerten Prozessen lässt man Kationen (z.B. Kalzium) in eine Alginatlösung diffundieren. Da die Diffusion langsam ist, ist diese Methode nur für dünne Gele effektiv. Bei den temperaturgesteuerten Prozessen werden die Ausgangsstoffe erhitzt und vermischt. Bei der Abkühlung erfolgt die Gelbildung. Derartige Alginatgele sind nicht thermo-reversibel. Die letzte Methode ist die der intern gesteuerten Prozesse, wobei die verbrückenden Kationen langsam und kontrolliert erst während einer Reaktion entstehen (www.ispcorp.com).

Eine Möglichkeit dafür ist die kontrollierte pH-gesteuerte Freisetzung von Kalziumionen mittels der schwach hydrolisierenden Säure Gluco- δ -lacton (GDL) aus schwerlöslichen Verbindungen wie CaCO_3 , die in Alginatlösung suspendiert sind (Draget, Ostgaard, & Smidsrod 1990). Derart hergestellte Gele zeigen eine weitgehend homogene Struktur und keine Doppelbrechung (s. Abb. 16).

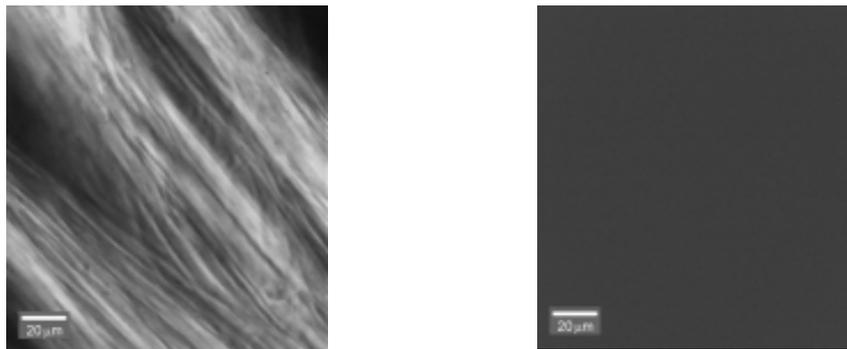


Abb. 16: Alginat-Kalzium Gele, hergestellt mittels CaCl_2 -Lsg. (links), zeigen Doppelbrechung (ionotrope Struktur). Mittels GDL (Bild rechts) sind weitgehend homogenen Strukturen entstanden (keine Doppelbrechung).

Die Gelfestigkeit der durch multivalente Kationen hergestellten Gele ist ebenfalls abhängig von der Art der verwendeten Ionen. Für Gelkugeln wurde folgende Reihenfolge gefunden: $\text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Die entstehenden Komplexe korrelieren nicht mit dem Radius der Ionen oder der Hydrolysekonstante des hydratisierten Ions, wohl aber mit der Assoziationskonstante des Ion-Alginat-Komplexes (Ausnahme Kupfer) (Ouwerx et al. 1998). Die Wechselwirkung der Ionen mit dem Alginat findet jedoch ionenspezifisch an unterschiedlichen Bindungsstellen des Alginats statt, wie NMR

Messungen ergeben haben (Wang et al. 1993). Auch die Acetylierung zeigt Einfluss auf das Bindungsverhalten. So konnte u.a. eine Erhöhung der Selektivität gegenüber bestimmten Ionen beobachtet werden. Algen und Bakterienalginat zeigen ein relatives Ausfällungsvermögen in der Reihenfolge $\text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$, wobei die Acetylierung zu einer Verminderung dieses Effektes bei Alginaten unter Verwendung von Kalziumionen führte (Lee, Ashby, & Day 1996).

2.4 Rheologie

Rheologie, abgeleitet vom griechischen „*rheos*“ = *der Fluss, das Fließen*, ist die Lehre vom Fließverhalten der Flüssigkeiten, ebenso wie vom Deformationsverhalten der Festkörper, unter Einwirkung äußerer Kräfte.

Die Rheologie ist heutzutage ein gängiges Mittel zur Charakterisierung und Entwicklung sowohl technischer Produkte wie Shampoos, Cremes, Farben oder Lacke, als auch verschiedenster Produkte aus dem Lebensmittelbereich wie Eiscreme, Schokolade, oder Ketchup. Rheologische Messungen erlauben die Untersuchung der Stabilität und Alterung von Stoffen. Sie lassen aber auch einen Einblick in die molekulare Struktur von Proben zu. Über Messungen sind Daten wie das Molekulargewicht oder die Molekulargewichtsverteilung von Makromolekülen wie z.B. Proteinen, Viren, oder Polymeren zugänglich. Aber auch die Vernetzungsdichte von Gelen kann über die elastischen Eigenschaften bestimmt werden. Die Rheologie dient somit auch zur Strukturaufklärung verschiedenster Systeme (Kulicke 1986).

Vermeehrt findet die Rheologie auch bei biologischen Systemen Anwendung. In der Biorheologie werden Krankheiten anhand von Messdaten aus beispielsweise Blut oder Kniegelenkflüssigkeit diagnostiziert (Kulicke 1986). Messdaten aus lebenden Systemen wie bakteriellen Biofilmen liefern Aufschluss über die mechanische Stabilität derartiger Strukturen und somit einen ersten Schritt zur Entwicklung von Reinigern oder Medikamenten über welche eine Entfernung ungewünschter Systeme möglich ist.

Die zu untersuchenden Bereiche der Rheologie liegen in der Regel außerhalb des Geltungsbereiches einfacher Theorien wie des Newton'schen oder Hooke'schen Gesetzes. Sie stellen die Grenzfälle des möglichen Verhaltens dar. So entsprechen idealviskose Flüssigkeiten, wie z.B. Wasser oder Mineralöl, dem Newton'schen Gesetz, während idealelastische Festkörper, wie z.B. Stahlkugeln, dem Hooke'schen Gesetz folgen. Die meisten realen Substanzen besitzen sowohl elastische, als auch viskose Anteile, und damit auch verschiedenste Formen von Fließ- und Deformationseigenschaften (s. Abb. 17). Die häufigsten Phänomene werden im Folgenden erklärt.

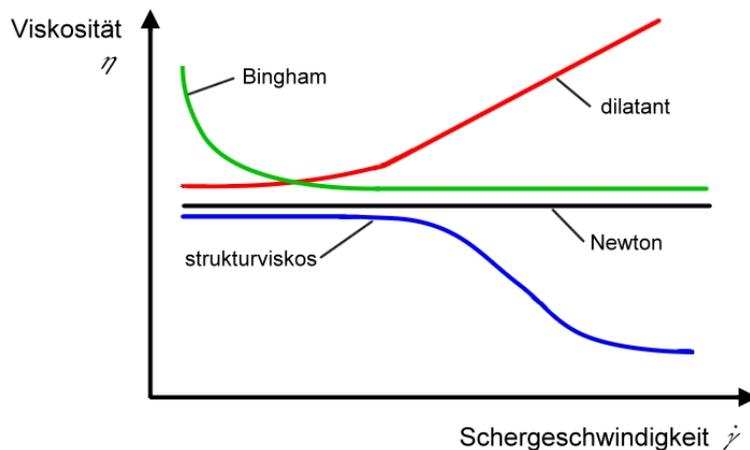


Abb. 17: Auftragung der scheinbaren Viskosität gegen die Schergeschwindigkeit bei verschiedenen Arten möglichen Fließverhaltens.

2.4.1 Begriffsdefinition: Schubspannung und Scherrate

Bei einfachen rheologischen Untersuchungen von beispielsweise Flüssigkeiten, werden Rotationsversuche durchgeführt. Auf die zu untersuchenden Stoffe werden hierbei verschiedene Spannungen ausgeübt. Beim tangentialen Scheren einer Substanz, wird so z.B. ein einfacher Schub angewandt. Das 2-Platten Modell (Abb. 18) beschreibt diese einfachen Verhältnisse. Zwischen zwei parallelen Platten mit dem Abstand h und der Fläche A befindet sich die zu untersuchende Probe.

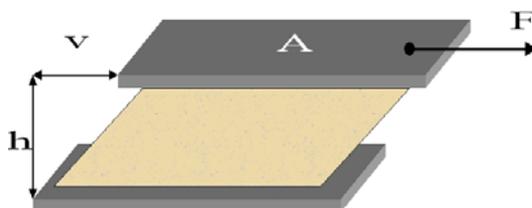


Abb. 18: Das 2-Platten Modell bei einfacher Scherung.

Eine Platte ist beweglich, eine stationär angeordnet. Bewegt sich die mobile Platte mit der Geschwindigkeit v , so wird durch die angelegte Kraft F eine Schubspannung τ in der Probe erzeugt. Der Quotient aus Geschwindigkeitsdifferenz dv und der Schichtdicke h wird als Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ bezeichnet. Daraus ist bereits die dynamische Viskosität η zugänglich. Sie ist temperatur- und stoffspezifisch (Mezger & Zorll 2002).

$$\text{Schubspannung:} \quad \tau = \frac{\text{Kraft}}{\text{Fläche}} = \frac{F}{A} \quad [\text{N/m}^2], \text{ bzw. } [\text{Pa}] \quad (3)$$

$$\text{Schergeschwindigkeit:} \quad \dot{\gamma} = \frac{\Delta \text{Geschwindigkeit}}{\text{Schichtdicke}} = \frac{dv}{dh} \quad [\text{s}^{-1}] \quad (4)$$

$$\text{Dynamische Viskosität:} \quad \eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad [\text{Pas}] \quad (5)$$

2.4.2 Ideale Substanzen

Die Viskosität η einer idealviskosen (newton'schen) Substanz ist unabhängig von der mechanischen Beanspruchung. Die Schubspannung τ verhält sich proportional zur Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$. Die Newton'sche Gleichung beschreibt diesen einfachsten Fall.

$$\text{Die Newton'sche Gleichung:} \quad \tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (6)$$

τ = Schubspannung

η = Viskosität

$\dot{\gamma}$ = Schergeschwindigkeit

Die Beschreibung derartigen Verhaltens kann durch ein Dämpfungsmodell erfolgen. Dies kann mit einem Kolben beschrieben werden, der sich in einer viskosen Flüssigkeit bewegt. Eine Kraft wirkt auf die sich im Dämpfer befindende Flüssigkeit, wodurch eine Verformung stattfindet, die auch nach Beenden der Krafteinwirkung bestehen bleibt.

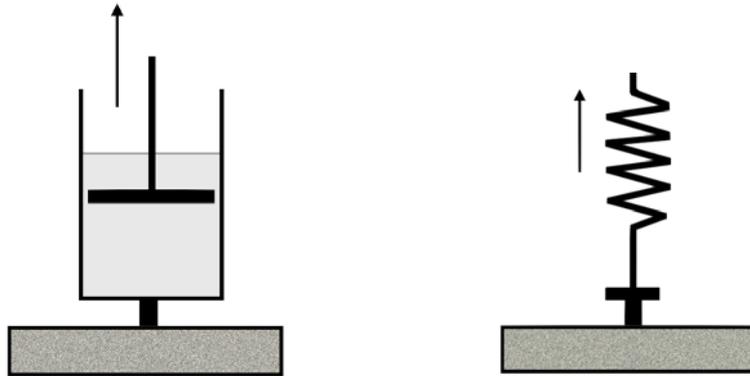


Abb. 19: Idealvorstellungen: Das Dämpfermodell (links) für viskoses Verhalten, und das Federmodell (rechts) für elastisches Verhalten.

Eine idealelastische Substanz kann mit dem mechanischen Federmodell beschrieben werden. Beim Einwirken einer Schubspannung τ tritt unmittelbar eine reversible Deformation γ ein, die proportional zu τ ist. Der Proportionalitätsfaktor G des Hooke'schen Gesetzes wird als Schub- oder Schermodul bezeichnet. Die Deformation abgeleitet nach der Zeit ergibt wiederum die Scherrate. Nach Beendigung der einwirkenden Kraft auf den mit einer Feder verbundenen Körper, erfolgt eine vollkommene Rückstellung auf den ursprünglichen Zustand (Ferry 1980).

$$\text{Das Hooke'sche Gesetz} \quad \tau = G \cdot \gamma \quad (7)$$

Stoffe mit einer Fließgrenze beginnen erst dann zu fließen, wenn die externen Kräfte größer als die im Stoff wirkenden Strukturkräfte sind. Solche Substanzen werden auch ideal plastische Stoffe oder Bingham Körper genannt. Ein mechanisch passendes Modell wäre ein Reibungskörper. Beschrieben wird dieses Verhalten mit dem St. Venant Modell.

Unterhalb der Fließgrenze zeigt sich idealelastisches Verhalten, beim Überschreiten der Fließgrenze plastisches Verhalten, und bei einer höheren Scherrate verhalten sich diese Substanzen dann wieder gemäß dem Newton'schen Gesetz (Mezger & Zorll 2002).

2.4.3 Reale Substanzen

Im einfachsten Fall kann das Deformationsverhalten realer Substanzen als Kombination idealviskosen und idealelastischen Verhaltens beschrieben werden. Flüssigkeiten, die sowohl viskoses als auch elastisches Verhalten zeigen, nennt man viskoelastische Flüssigkeiten. Solche Stoffe können z.B. auch strukturviskoses oder dilatantes Verhalten zeigen (s. Abb. 17). Das einfachste Modell hierfür wäre das Maxwell Modell, die Reihenschaltung eines Dämpfers und einer Feder. Festkörper die viskoelastisches Verhalten zeigen, werden z.B. durch das Kelvin-Voigt Modell beschrieben, der Parallelschaltung von Feder und Dämpfer (Mezger & Zorll 2002).

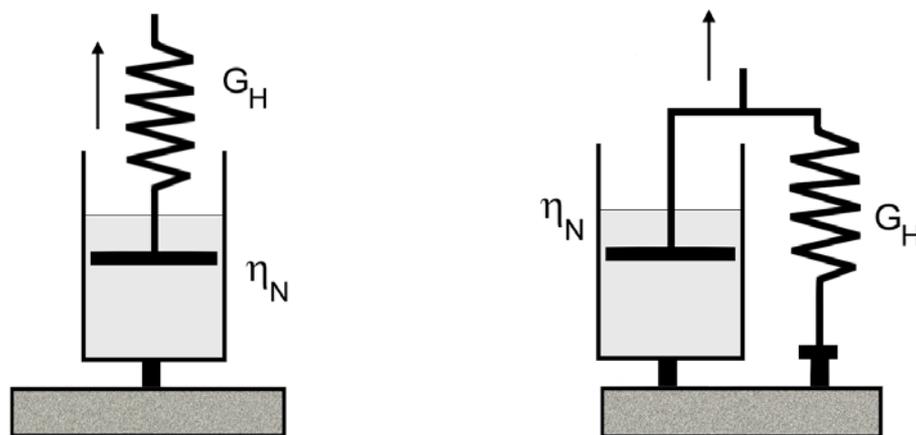


Abb. 20: Mechanische Darstellung des Maxwell Modells für viskoelastische Flüssigkeiten links, und des Kelvin-Voigt Modells für viskoelastische Festkörper rechts.

Die allgemeine Stoffgleichung des Maxwell Modells ergibt sich aus der Addition der Scherraten für den Dämpfer- und den Federteil. Bei Einwirkung einer Kraft erfolgt eine

sofortige Verformung der Feder, während der Dämpfer zeitverzögert reagiert. Bei Entlastung bleibt der Dämpfer nach vollständiger Entlastung der Feder ausgelenkt. Dies hat zur Folge, dass das Maxwell Modell einem neuen Gleichgewichtszustand zustrebt. Damit verbunden ist eine Relaxation von Größen wie der Deformation, Scherrate oder Schubspannung. Die Einstellung der Gleichgewichtslage ist mit einer charakteristischen Zeitkonstante, der Relaxationszeit λ verbunden (Mezger & Zorll 2002).

Die Stoffgleichung des Maxwell Modells:
$$\dot{\gamma} = \frac{\dot{\tau}}{G_H} + \frac{\tau}{\eta_N} \quad (8)$$

Die Stoffgleichung des Kelvin-Voigt Modells:
$$\tau = G_H \cdot \gamma + \eta_N \cdot \dot{\gamma} \quad (9)$$

Die Relaxationszeit ist definiert als:
$$\lambda = \frac{\eta_N}{G_H} \quad (10)$$

Das Kelvin-Voigt Modell ist das Analogon für viskoelastische Festkörper. Die Stoffgleichung ergibt sich aus der Addition des elastischen und viskosen Anteils. Die Unterscheidung zwischen viskoelastischer Flüssigkeit und viskoelastischem Festkörper kann praktisch über Kriech- und Relaxationsversuche erfolgen. Bei viskoelastischen Flüssigkeiten findet eine zeitverzögerte, aber vollständige Relaxation statt, bei viskoelastischen Festkörpern relaxiert die Schubspannung auch nach einer sehr langen Zeit nur zu einem gewissen Teil, und die $\tau(t)$ -Kurve nähert sich asymptotisch einem Endwert. Der Grund sind hierbei chemisch oder physikalisch gebundene Moleküle, die sich nicht frei bewegen können.

Die Relaxationseigenschaften des Maxwell Elements sind messbar, wenn man die Deformation, die Schubspannung oder die Scherrate sprunghaft zu einem Zeitpunkt t_0 ändert. Die resultierende Messgröße $G(t)$, das Relaxationsmodul ergibt sich aus der Schubspannung τ zum Zeitpunkt t , sowie der vorgegebenen Deformation γ_0 . Der Wert G_0

wird als Ruheschermodul bezeichnet, und ergibt sich als Quotient aus Anfangsschubspannung τ_0 und der vorgegebenen Deformation γ_0 .

$$\text{Das Relaxationsmodul } G(t): \quad G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma_0} = G_0 \cdot \exp\left(\frac{-t}{\lambda}\right) \quad (11)$$

Aus der Gleichung ist ersichtlich, dass über das Relaxationsmodul $G(t)$ ebenfalls die Relaxationszeit λ bestimmt werden kann. Bei kleinen Zeiten besitzt die Kurve des Relaxationsmoduls einen Plateauwert (G_0), in diesem Bereich dominieren die elastischen Eigenschaften. Im Bereich größerer Zeiten herrschen viskose Eigenschaften vor. Bei vernetzten Strukturen ist der Plateauwert G_0 proportional der Vernetzungsdichte. Die Anzahl der elastisch effektiven Ketten ν pro m^3 Lösung ergibt sich aus der Boltzmann-Konstante k , der Temperatur T und G_0 :

$$\nu = \frac{G_0}{kT} \quad (12)$$

Speicher und Verlustmodul des Maxwell Elementes lassen sich über die Gleichungen (13) und (14) darstellen. Beim Auftrag der Module gegen die Kreisfrequenz ergibt sich ein charakteristischer Verlauf. Bei höheren Frequenzen erhält man für G' ein Plateau. Dieser Wert wird als Ruheschermodul G_0 bezeichnet und kennzeichnet das elastische Verhalten der Substanz. Bei niedrigen Frequenzen dominiert viskoses Verhalten. Hier erhält man auch einen Plateaubereich für die komplexe Viskosität, dessen Wert der Nullviskosität η_0 entspricht (Mezger & Zorll 2002).

$$G'(\omega) = G_H \frac{\omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} \quad (13)$$

$$G''(\omega) = G_H \frac{\omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} \quad (14)$$

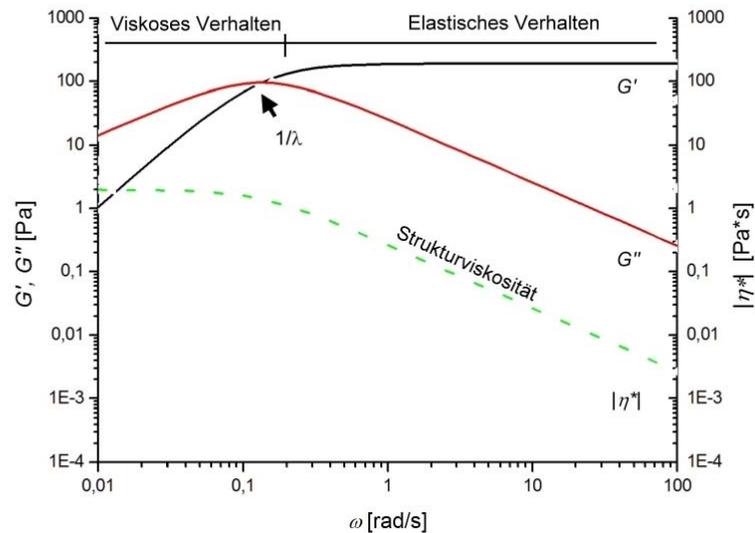


Abb. 21: Beispielhafter Verlauf von Speicher- und Verlustmodul, sowie der komplexen Viskosität als Funktion der Kreisfrequenz für eine dem Maxwell Modell entsprechende strukturviskose Substanz.

2.4.4 Fließgrenze

Bei Substanzen mit einer Fließgrenze muss eine Mindestkraft aufgebracht werden, damit diese beginnen zu fließen, d.h. die von außen wirkenden Kräfte müssen größer sein, als die Strukturkräfte dieser Substanz. Unterhalb der Fließgrenze zeigen derartige Stoffe elastisches Verhalten. Beispiele für solche Stoffe sind Pasten, Cremes, Ketchup, sowie Dispersionen mit hoher Feststoffkonzentration und Gele. Vielfach ist der Übergang von der elastischen Deformation zum viskosen Fließen nicht durch eine abrupte Änderung gekennzeichnet, sondern geschieht allmählich. Bei solchen Stoffen ist der Begriff *Fließzone* angebracht. Ursache für derartiges Fließverhalten sind zwischenmolekulare physikalische Wechselwirkungskräfte mit einer Bindungsenergie von unter 20 kJ/mol, wie Dipol-Dipol Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Induktionswechselwirkungen und Dispersionswechselwirkungen (Mezger & Zorll 2002).

Die scheinbare Fließgrenze kann als Obergrenze der Schubspannung vor dem Fließen detektiert werden. Diese Fließgrenze hängt allerdings von der Drehzahlaufösung des Rheometers ab. Genauer ist die Bestimmung der Fließgrenze als Grenze zwischen dem

elastischen und viskosen Deformationsbereich mit der Tangentenmethode. Bei der doppeltlogarithmischen Auftragung der Schubspannung gegen die Deformation, ist die Fließgrenze der Wert, bei dem der linear elastische Bereich verlassen wird, was durch einen Knick in der Kurve ersichtlich ist. Die Fließgrenze aus beiden Methoden ist allerdings keine Stoffkonstante, sondern hängt von der zeitlichen Vorbehandlung der Probe und den Messbedingungen ab. Eine Abschätzung, ob eine Fließgrenze vorhanden ist, erlaubt auch die doppeltlogarithmische Auftragung der Scherviskosität oder der komplexen Viskosität gegen die Scherrate bzw. die Kreisfrequenz (Mezger & Zorll 2002).

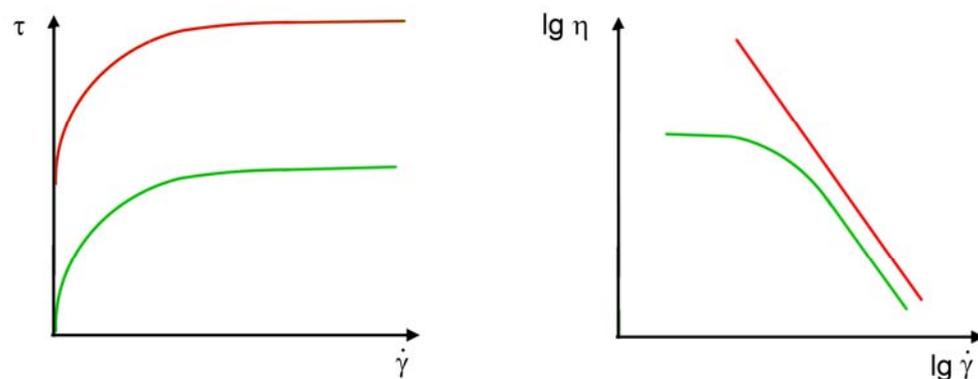


Abb. 22: Fließkurven mit (rote Kurve) und ohne (grüne Kurve) scheinbarer Fließgrenze (links), und gleicher Bedeutung bei Viskositätskurven (rechts). Besitzt die Substanz eine Nullviskosität, hat sie keine Fließgrenze.

2.4.5 Oszillationsmessungen

Neben dem stationären Scherfließen gibt es noch die Möglichkeit der periodischen Beanspruchung durch mechanische Schwingungsmessungen. Der Vorteil ist, dass man sich über den gesamten Frequenzbereich im linear viskoelastischen Bereich befindet, wenn die gewählte Amplitude der Deformation genügend klein ist. Die Ruhestuktur empfindlicher Stoffe wird so nicht verändert. Beim stationären Scherfließen liegt linear viskoelastisches Verhalten nur im Bereich der Ruhescherviskosität η_0 vor, außerhalb davon gelten nichtlineare Differentialgleichungen. Die Substanz wird bei Schwingungsmessungen

sinusförmig deformiert, wobei die Deformation $\gamma(t)$ als kosinusförmige Funktion gemäß Gleichung (15) vorgegeben wird; ω ist hierbei die Kreisfrequenz.

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \cos(\omega t) \quad (15)$$

Die Antwort des Systems auf die Beanspruchung ist ein komplexer Schubmodul G^* , der nach Aufteilung in einen Real- und Imaginärteil die Module G' , und G'' liefert. G' ist ein Maß für die elastisch gespeicherte Energie (Speichermodul), G'' ist ein Maß für die durch das viskose Fließen dissipierte Energie (Verlustmodul).

Das komplexe Schubmodul G^* :
$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} \quad (16)$$

Das Speichermodul G' :
$$G' = \frac{\tau_A}{\gamma_A} \cdot \cos \delta \quad (17)$$

Das Verlustmodul G'' :
$$G'' = \frac{\tau_A}{\gamma_A} \cdot \sin \delta \quad (18)$$

Für G^* als Betrag gilt nach dem Satz des Pythagoras:

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (19)$$

Das Verhältnis von dissipierter zu gespeicherter Energie ist durch den Verlustwinkel δ definiert. Es gilt folgende Beziehung:

Der Verlustwinkel δ :
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (20)$$

Bei einem reinen Hooke'schen Festkörper ergibt sich dann nach Deformationsaufgabe ein kosinusförmiger Verlauf der Schubspannung (s. Gl. (21)). Bei reinen Newton'schen Flüssigkeiten (s. Gl. (22)) tritt eine Phasenverschiebung von 90° der Schubspannung gegenüber der Deformation auf. Für viskoelastische Flüssigkeiten liegt die Phasenverschiebung zwischen 0° und 90° (Ferry 1980).

Für reine Hooke'sche Festkörper gilt: $\tau(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega t)$ (21)

Für reine Newton'sche Flüssigkeiten gilt: $\tau(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega t + \pi/2)$ (22)

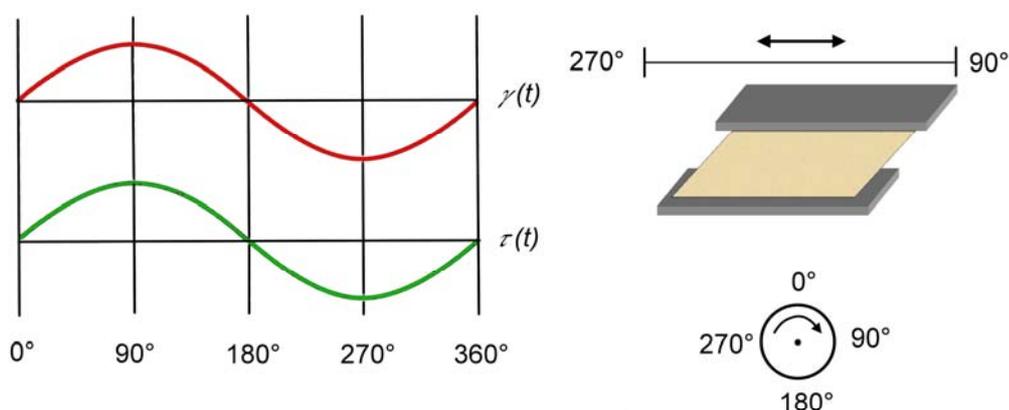


Abb. 23: Beispiel idealviskose Flüssigkeit beim Oszillationstest und die dazugehörigen Kurven für $\tau(t)$ und $\gamma(t)$.

Während für das komplexe Schubmodul lt. Gl. (16) das Hooke'sche Gesetz gilt, kann man analog eine komplexe Viskosität für das Newton'sche Gesetz formulieren:

Die komplexe Viskosität: $\eta^* = \frac{\tau(t)}{\dot{\gamma}(t)}$ (23)

Für den Zusammenhang zwischen komplexem Schubmodul und komplexer Viskosität gilt folgende Beziehung:

$$|G^*| = \omega \cdot |\eta^*| \quad (24)$$

Die komplexe Viskosität lässt sich als vektorielle Summe der beiden Komponenten η' und η'' darstellen.

Für den Realteil gilt:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} = \frac{(\tau_A \cdot \sin \delta)}{(\gamma_A \cdot \omega)} \quad (25)$$

Für den Imaginärteil gilt:

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} = \frac{(\tau_A \cdot \cos \delta)}{(\gamma_A \cdot \omega)} \quad (26)$$

Im Bereich linearviskoelastischen Verhaltens ist man in der Lage die Theorien der linearen Visokoelastizität anzuwenden und zu überprüfen. Man erhält so eine Meßmethode zur Untersuchung des viskosen und elastischen Verhaltens von Stoffen und Stoffgemischen. Die Abhängigkeit der Module von der Kreisfrequenz ω ist z.B. für Polymersysteme weitläufig untersucht worden. Man erhält charakteristische Kurvenverläufe, die sich in verschiedene Zonen aufteilen lassen.

In der *Fließzone* wird die Deformationsenergie zunehmend gespeichert, das Speichermodul G' steigt an. Lineare und verzweigte Polymere mit temporären Netzwerken zeigen den Verlauf (a), hauptvalenzmäßig vernetzte Polymere den Verlauf (b), und Substanzen ohne Netzwerkstruktur den Verlauf (c) (s. Abb. 24). Die durch zunehmende Frequenz eingebrachte Energie wird immer weniger durch viskoses Fließen dissipiert. Bei Stoffen mit nebenvalenzmäßiger Vernetzung (a) erhält man bei doppellogarithmischer Auftragung eine Steigung von 2 für das Speichermodul, und eine Steigung von 1 für das Verlustmodul.

In der *Plateauzone* lässt die Frequenz der Deformation ein Abgleiten der vorhandenen Verhängungspunkte der Polymerketten nicht mehr zu. Man erhält ein Netzwerk mit beweglichen Segmenten, wobei die Beanspruchungsgeschwindigkeit schneller ist, als das Relaxationsvermögen der Ketten. Weitere durch Frequenzerhöhung zugeführte Energie kann durch die Bewegung der Kettensegmente dissipiert werden. In dieser Zone gilt die Theorie der Gummielastizität, über das Speichermodul im Plateaubereich G_P' ist beispielsweise das Molekulargewicht und die Anzahl der elastisch effektiven Ketten zugänglich (s. Gl. (12)) (Kulicke 1986).

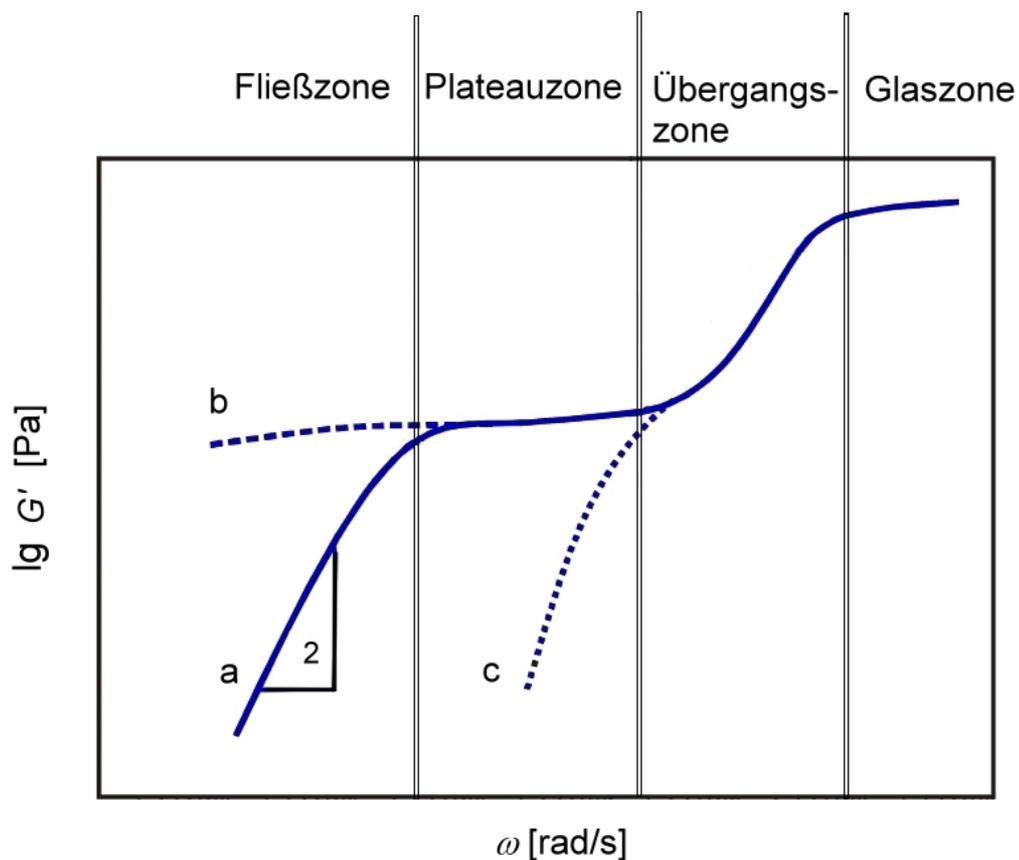


Abb. 24: Beispielhafter Verlauf des Speichermoduls G' als Funktion der Kreisfrequenz ω für Polymere mit temporären Netzwerken (a), permanenten Netzwerken (b) und ohne Netzwerkstruktur (c) bei doppellogarithmischer Auftragung (nach Kulicke 1986).

In der *Übergangszone* nimmt die Beweglichkeit der Kettensegmente ab. Eine Frequenzerhöhung hat einen Anstieg des Moduls zur Folge.

In der *Glaszone* gibt es keine Bewegungsmöglichkeit der Molekülsegmente mehr. Die eingebrachte Energie wird durch Deformation von Bindungsabständen und Bindungswinkeln gespeichert.

Netzwerkstrukturen werden durch die Plateauzone charakterisiert, bei amorphen Polymeren findet man unterhalb der Glasstemperatur T_P nur die Glaszone.

2.4.6 Zeitabhängiges Fließverhalten

Das Wort *Thixotropie* lässt sich in etwa mit „Umwandlung durch mechanische Belastung“ umschreiben, und bedeutet die Verringerung der Strukturstärke während der Scherbelastungsphase und ihren zeitverzögerten vollständigen Wiederaufbau während der nachfolgenden Ruhephase. Es handelt sich also um einen vollständig reversiblen Prozess.

Die *Rheopexie* kommt seltener vor. Während der Belastungsphase erhöht sich die Strukturstärke, indem durch die erhöhte Anzahl von Stößen zwischen Molekülen und Partikeln ein Aggregataufbau der zusammenprallenden Teilchen erfolgt. Während der anschließenden Ruhephase erfolgt ein zeitverzögerter vollständiger Abbau der Strukturverstärkung. Auch die Rheopexie ist ein vollständig reversibler Prozess (Mezger & Zorll 2002).

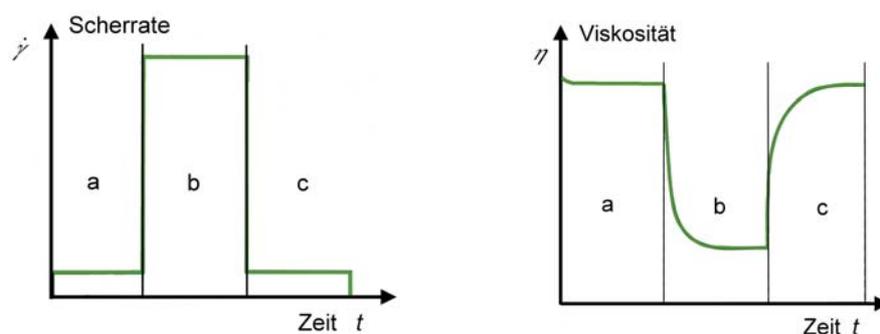


Abb. 25: Eine Belastung durch eine Scherratenstufe (links) führt bei thixotropen Stoffen zu einer Abnahme der Viskosität und anschließender vollständiger Rückkehr in den Ausgangszustand (rechts) (nach Mezger & Zorll 2002).

2.4.7 Zusammenhang zwischen stationärem Scherfließen und Oszillationsmessungen

Die Rheologie erlaubt es einen Zusammenhang zwischen dem inneren Aufbau und dem makroskopischen Zustand eines Systems herzustellen. Man erhält dabei gleiche Messwerte auch für sehr unterschiedliche Beanspruchungsformen. Ein Beispiel dafür ist die empirische Cox-Merz Regel, die besagt, dass die komplexe Scherviskosität $|\eta^*|$ aus Oszillationsmessungen gleich der Scherviskosität η aus Rotationsversuchen ist, für gleiche Werte der Kreisfrequenz ω und Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$.

$$|\eta^*(\omega)| = \eta(\dot{\gamma}) \quad \text{für} \quad \omega = \dot{\gamma} \quad (27)$$

Solange die Wechselwirkungen im System ausschließlich mechanische Ursachen, wie z.B. Verschlaufungen („Entanglements“) haben, ist diese Regel im LVE-Bereich und für Polymere mit einfacher Struktur auch über den Nullviskositätsbereich hinaus gültig. Die meisten Polymersysteme folgen der Cox-Merz Regel, sie gilt allerdings nicht für Dispersionen. Zu Abweichungen kommt es, wenn im System physikalische und/oder chemische Wechselwirkungen vorhanden sind (Mezger & Zorll 2002).

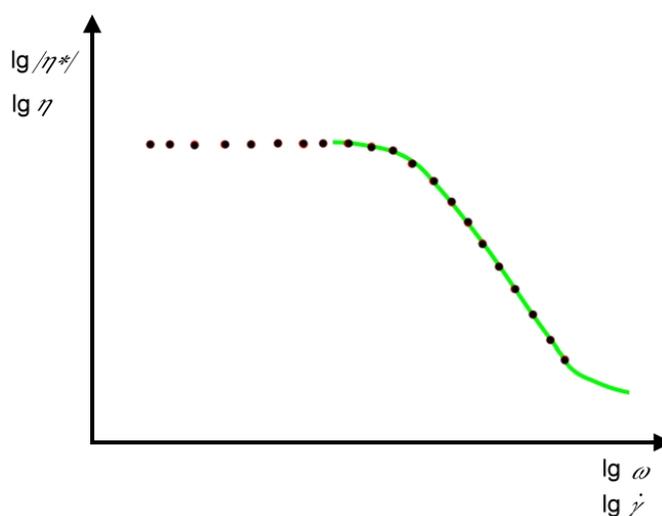


Abb. 26: Beispiel für die Cox-Merz Regel. Die komplexe Viskosität korreliert mit der Scherviskosität für gleiche Werte von Kreisfrequenz und Scherrate.

2.4.8 Normalspannungen:

Werden viskoelastische Substanzen deformiert, treten nicht nur eindimensionale Kräfte bzw. Spannungen in Deformationsrichtung auf. Real findet man einen dreidimensionalen Deformationszustand, der mit einem 3×3 Tensor beschrieben werden kann. Die 9 Informationen, die er beinhaltet, lassen sich im kartesischen Koordinatensystem räumlich darstellen.

- In der x-Richtung (Scher- oder Deformationsrichtung) finden sich folgende Einzelspannungen: τ_{xx} , τ_{xy} , τ_{xz}
- In der y-Richtung (Schergradientenrichtung) sind dies: τ_{yx} , τ_{yy} , τ_{yz}
- In der neutralen z-Richtung (indifferente Richtung) werden die Einzelspannungen mit τ_{zy} , τ_{zy} , τ_{zz} bezeichnet.

Der erste Index bezeichnet die Fläche eines würfelförmigen Elementes, auf welche die Spannung wirkt, während der zweite Index die Richtung beschreibt, in der die Spannung wirkt.

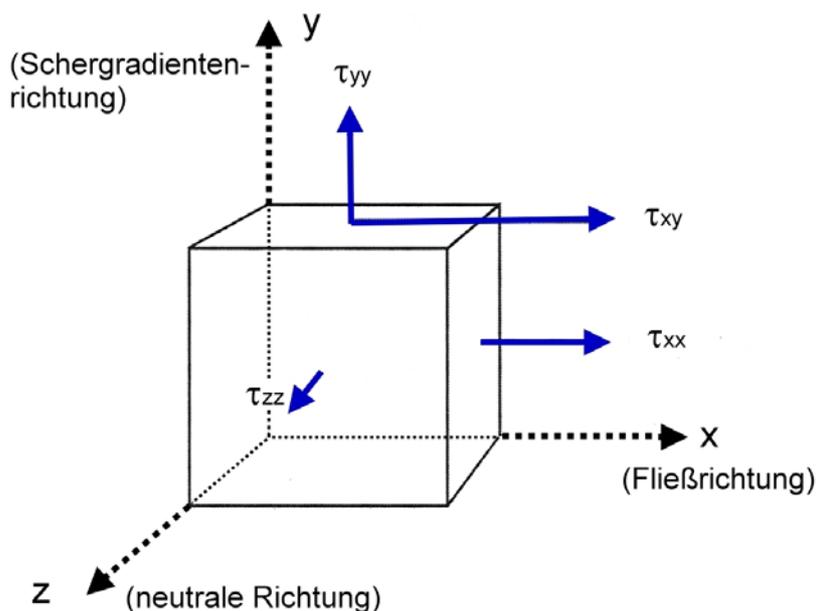


Abb. 27: Spannungszustände bei stationärer Scherströmung für eine viskoelastische Flüssigkeit dargestellt im kartesischen Raum (nach Kulicke 1986).

Unter den drei Normalspannungen τ_{xx} , τ_{yy} , τ_{zz} weist bei viskoelastischen Substanzen die τ_{xx} -Komponente meist den größten Betrag auf. Die restlichen 6 Schubspannungen reduzieren sich bei der Scherströmung einer Flüssigkeit, bei der viskoses Verhalten dominiert, auf die τ_{yx} -Komponente, die man sich als einzelne Strömungsschicht vorstellen kann. Es gelten folgende Definitionen für die Normalspannungsdifferenzen:

Die 1. Normalspannungsdifferenz N_1 :
$$N_1 = \tau_{xx} - \tau_{yy}, \text{ dargestellt als } N_1(\dot{\gamma}) \quad (28)$$

Die 2. Normalspannungsdifferenz N_2 :
$$N_2 = \tau_{yy} - \tau_{zz}, \text{ dargestellt als } N_2(\dot{\gamma}) \quad (29)$$

Das Rheometer misst beim Bestimmen der 1. Normalspannungsdifferenz als Rohwert die Normalkraft F_N [N] in y -Richtung. Diese Kraft wirkt beim Rotationsversuch in Richtung der Messgeometrie/Messplatte, und drückt diese auseinander.

Praktisch zeigen sich Normalkräfte z.B. in Form des Weissenberg Effektes beim Rühren, oder beim Extrudieren als Strangaufweitung (Mezger & Zorll 2002).

2.5 Strömungsdoppelbrechung:

Im Gegensatz zu der Rheologie, wo mit mechanischen Kraftaufnehmern integral über das gesamte Probenvolumen eine Substanz vermessen wird, erfolgt bei rheo-optischen Experimenten eine lokale Bestimmung der Wechselwirkungen von linear polarisiertem Licht mit der Probensubstanz.

Das Phänomen der Doppelbrechung ist schon seit langem z.B. von Kristallen her bekannt. Ein einfallender Lichtstrahl wird in zwei Komponenten aufgespalten, den so bezeichneten ordentlichen Strahl und den außerordentlichen Strahl. Beide besitzen im Medium unterschiedliche Geschwindigkeiten (v_1 und v_2). Ein unter dem Kristall liegendes Objekt wird daher doppelt abgebildet (s. Abb. 28) (Hecht 2005).

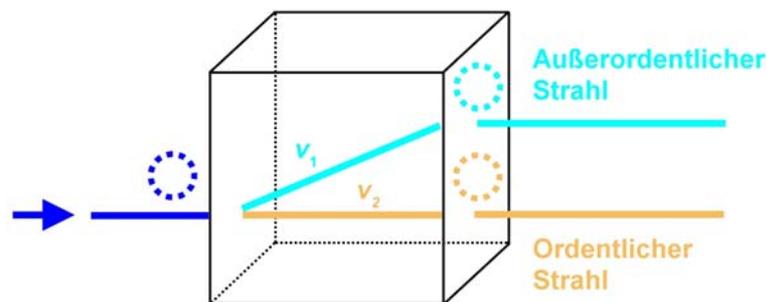


Abb. 28: Doppelbrechung an einem festen Medium, wie z.B. einem Kristall, schematisch dargestellt (nach www.wikipedia.de).

Bei der Strömungsdoppelbrechung wird Anisotropie erst durch das Anlegen einer Scherung erzeugt. Die Methode der Untersuchung von Polymerfluiden durch Rheo-optik stammt aus den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts, während in neuerer Zeit auch die Erweiterung der zu untersuchenden Substanzen hin zu Partikellösungen gelang (Fuller 1995).

Die elektromagnetischen Eigenschaften des eingestrahltten Lichtes werden durch die Elektronensysteme von in Lösung vorhandenen Strukturen (z.B. Polymerketten) verändert, was sich in Phasenverzögerungen und Absorptionsphänomenen bemerkbar macht. Ist z.B. ein transparentes Polymer frei von Spannungen und die Konfiguration der Ketten zufällig, so ist die Substanz isotrop und der Wert des Brechungsindex ist für alle Raumrichtungen gleich. Bei einer Deformation der Kettensegmente z.B. durch Strömung, führt die intrinsische Anisotropie der Ketten zu einer Netzanisotropie, so dass Unterschiede des Brechungsindex für die jeweiligen Raumrichtungen entstehen (Fuller 1995).

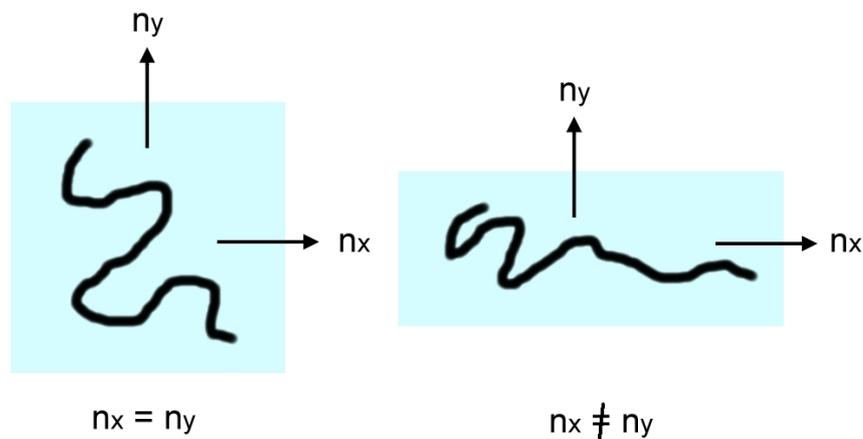


Abb. 29: Brechungsindexvergleich für ein isotropes Polymer (links) und eine deformierte anisotropische Probe (rechts) (nach TA Instruments 2004).

Die Wechselwirkung des Lichtes mit der Probe lässt sich über die Materialfunktionen *strömungsinduzierte Doppelbrechung* und *Dichroismus* erfassen. Licht als elektromagnetische Welle kann über die elektrische Feldstärke \vec{E} , die Magnetfeldstärke \vec{H} , die magnetische Flussdichte \vec{B} und die elektrische Verschiebungsdichte \vec{D} charakterisiert werden. Jede dieser Größen setzt sich aus der Summe der drei Vektoren in den jeweiligen Raumrichtungen x , y und z zusammen. Zur Beschreibung des Lichtes nutzt man meist die elektrische Feldstärke, da diese am stärksten mit dem optischen Medium wechselwirkt (Hecht 2005). Die drei Vektoren beschreiben je eine lineare harmonische Schwingung mit der Frequenz ν , der Amplitude A , und der Phasenverschiebung δ . Beispielhaft für die x -Richtung der elektrischen Feldstärke ergibt sich Gleichung (30).

$$\vec{E}_x = A_x \cdot x \cdot \cos(\omega t + \delta_x) \quad \text{mit} \quad \omega = 2\pi \cdot \nu \quad (30)$$

Bei der Ausbreitung einer Welle linear polarisierten Lichtes in z-Richtung schwingt der elektrische Feldvektor nur in der xy-Ebene. Bei einem Laser sind zudem beide Komponenten am Ursprung in Phase. Bei einem solchen System hängt die Phasendifferenz δ_j , vom Brechungsindex der Raumrichtung n_j , der Wellenlänge des jeweiligen Lichtes im Vakuum λ_0 , und der Position α in Richtung der Ausbreitung j ab (Fuller 1995).

$$\delta_j = \frac{2\pi \cdot n_j}{\lambda_0} \cdot \alpha \quad \text{mit } j = x, y, z \quad (31)$$

Der Brechungsindex n eines Stoffes ist definiert als das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zu der im Medium. Der Brechungsindex ist wellenlängenabhängig und lässt sich in einen Realteil n' und einen Imaginärteil n'' zerlegen. Trifft ein wie oben beschriebener Laserstrahl ein optisch anisotropes Medium, so kommt es zu einer möglichen Abschwächung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, und zu einer Intensitätsabnahme in den jeweiligen Raumrichtungen. Der Realteil n' des Brechungsindex ist dabei für die Phasenverzögerung zuständig und beschreibt die Doppelbrechung, der Imaginärteil n'' bewirkt die Abschwächung des Lichtes und wird als Dichroismus beschrieben (Fuller 1995).

Zur vollständigen Beschreibung der Wechselwirkung wäre also der Tensor des Brechungsindex nötig. Für rheo-optische Experimente genügt hingegen meist die Bestimmung der drei Materialfunktionen Doppelbrechung, Dichroismus und Orientierungswinkel. Doppelbrechung $\Delta n'$ und Dichroismus $\Delta n''$ sind die Differenzen der Real- (n') und Imaginärteile (n'') der Brechungsindizes der Hauptachsen des Tensors senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Der Orientierungswinkel Φ , bzw. Θ ist der Winkel, den die Hauptachse der Doppelbrechung bzw. des Dichroismus zur Fließrichtung des Stoffes einnimmt (Clasen 2001), (Fuller 1995).

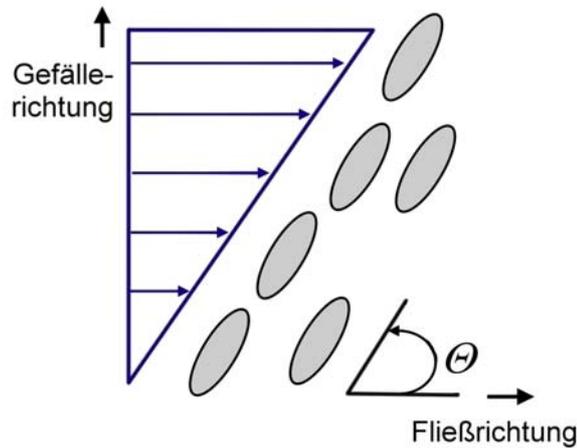


Abb. 30: Die mittlere Orientierung von Teilchen unter Strömungsbedingungen ist verantwortlich für den Orientierungswinkel θ (nach TA Instruments 2004).

Der Orientierungswinkel Φ der Doppelbrechung, bzw. θ des Dichroismus beschreibt somit die mittlere Orientierung der Moleküle bzw. die Richtung der Hauptachse des Brechungsindextensors zur Fließrichtung. Ohne Scherung liegen alle Substanzen statistisch verteilt vor, was z.B. bei Polymeren einer Orientierung zwischen 0° und 90° zur Fließrichtung entspricht. Die mittlere Orientierung bei solchen ruhenden Systemen wäre dann 45° . Beim Anlegen einer Scherung erfolgt eine Ausrichtung bzw. Deformation des Moleküls, was in anisotropen Strukturen resultiert.

Passieren zwei zueinander senkrechte Komponenten eines elektrischen Feldvektors ein anisotropes Polymersegment mit asymmetrischer Elektronenverteilung entlang der Hauptachse, werden diese unterschiedlich stark verzögert, wodurch eine Phasendifferenz δ_j hervorgerufen wird. Diese ist mittels Gl. (52) berechenbar. Bei einem Wert von $\delta_j = \pi/2$ erhält man zirkular polarisiertes Licht, andernfalls elliptisch polarisiertes Licht.

Bei einer dichroistischen Substanz bleiben die Geschwindigkeiten der beiden Feldvektorkomponenten konstant. Aufgrund der räumlichen anisotropen Beschaffenheit und Ausrichtung eines streuenden Teilchens ist jedoch die Amplitude um den Betrag Δ verringert. Zusätzlich ist die Polarisationsrichtung gedreht, obwohl nach der Vektoraddition der Teilwellen wieder linear polarisiertes Licht entsteht (Reinhardt 1995).

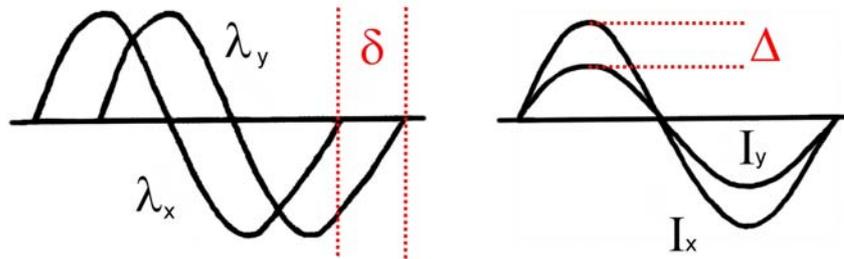


Abb. 31: Phasendifferenz δ (links) und Intensitätsabschwächung Δ (rechts) der beiden Komponenten eines elektrischen Feldvektors, welche zu Doppelbrechung und Dichroismus führen (nach Knarr 2003).

Die Grundlage der *spannungsoptischen Regel* beruht auf der Tatsache, dass die Orientierungen der Hauptspannungsachsen mit den Achsen des Brechungsindextensors übereinstimmen. Dieser Zusammenhang wird über Gl. (32) ausgedrückt. C ist dabei der temperaturabhängige und stoffspezifische spannungs-optische Koeffizient, $\Delta\tau$ der Spannungstensor (Janeschitz-Kriegl 1969).

$$\Delta n = C \cdot \Delta\tau \quad (32)$$

Die Hauptspannung $\Delta\tau$ kann aus der meßtechnisch zugänglichen Schubspannung τ_{yx} und der 1. Normalspannungsdifferenz N_I bestimmt werden.

$$\Delta\tau = \sqrt{4 \cdot \tau_{yx}^2 + N_I^2} \quad (33)$$

Rheologische Größen können aus den rheo-optischen Messwerten über die Gleichungen (34) und (35) berechnet werden. Dafür muss aber sowohl die Doppelbrechung, als auch der Orientierungswinkel bekannt sein.

$$\tau_{yx} = \frac{1}{2C} \cdot \Delta n' \cdot \sin 2\Phi \quad (34)$$

$$N_1 = \frac{1}{C} \cdot \Delta n' \cdot \cos 2\Phi \quad (35)$$

Ist der spannungs-optische Koeffizient nicht bekannt kann er über Gl. (36) aus rheologischen und rheo-optischen Werten berechnet werden (Janeschitz-Kriegl 1969).

$$C = \frac{\Delta n'}{2 \cdot \tau_{yx}} \cdot \sin(2 \cdot \Phi) \quad (36)$$

3 Experimenteller Teil

3.1 Biologische Methoden

3.1.1 EPS Herstellung:

Die für die Untersuchungen verwendete EPS Lösung stammt von mukoiden Bakterien der Art *Pseudomonas aeruginosa* SG81, die ursprünglich aus einem technischen Wassersystem isoliert wurden. Aus Trockengewichtsbestimmungen geht hervor, dass der Wassergehalt dieser Filme zwischen 92 % und 94 % beträgt (Mayer, Moritz, Kirschner, Borchard, Maibaum, Wingender, & Flemming 1999). Die EPS Isolierung wurde nach einer Methode des Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen durchgeführt (Wingender, Strathmann, Rode, Leis, & Flemming 2001), und als fertige Lösung für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Auf mit PIA (Pseudomonas Isolation Agar) beschichteten Petrischalen wurde ein Einzelkoloniausstrich von *Pseudomonas aeruginosa* angefertigt und diese für 24 h bei 36 °C im Brutschrank gelagert. Einige Einzelkolonien wurden im Anschluss in steriler 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert. Dies entsprach nach dem optischen McFarland Vergleichstest Nr. 2, in etwa $6 \cdot 10^8$ Zellen/ml. Die PIA Platten wurden konfluent mit je 0,1 ml der Bakteriensuspension beimpft und für weitere 24 h bei 36 °C gelagert. Der entstandene EPS-Schleim wurde abgekratzt 1:16 (w/v) in 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert, und anschließend 30 min mit einem Magnetrührer bei 1300 U/min bearbeitet, so dass eine gleichmäßige Verteilung der EPS in der Lösung stattfand. Diese Lösung wurde für 2 h einer Zentrifugation bei 40000 g und 10 °C unterzogen. Der entstandene Überstand im Anschluss mittels eines Celluloseacetatfilters mit der Porenweite 0,2 µm sterilfiltriert und in eine Flasche abgefüllt.

Die Lösung wurde zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei ca. 2 °C zwischengelagert und nur kleine Mengen zur jeweiligen Messung auf Raumtemperatur gebracht. Ein weiterer Teil wurde bei -25 °C im Gefrierschrank tiefgefroren.

3.1.2 Herstellung homogener Kalzium-Alginat Gele:

Die Methode der intern gesteuerten Gelbildung mittels CaCO_3 und Gluco- δ -lacton (GDL) bei der die verbrückenden Kationen langsam und kontrolliert erst während einer Reaktion entstehen (Draget, Ostgaard, & Smidsrod 1989), (Draget, Ostgaard, & Smidsrod 1990) wurde für die Messreihen genutzt, bei denen Kalzium-Alginat Gele verwendet wurden.

Als Algenalginat wurden Natriumalginat (Fluka), und Manucol LB (ISP Alginates) verwendet. Als Bakterienalginat wurde eine EPS-Lösung (Herstellung s.o.) genutzt (Wloka et al. 2004).

Kalziumcarbonat (Fluka) wurde in Wasser mittels Ultraschall fein dispergiert und den Algenalginat-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (1, 3, 5, 7, 10, 14, 20 mmol/l) unter intensivem Rühren beigefügt, so dass eine wässrige 1 % w/v Lösung entstand. Die verwendete Ausgangslösung wies eine Ruhescherviskosität von $\eta_0 = 0,04 \pm 0,01$ Pas auf.

Bei der EPS-Lösung wurde das CaCO_3 direkt hinzugefügt, und ebenfalls mittels Ultraschall und intensivem Rühren fein verteilt. Hier kamen CaCO_3 Konzentrationen zwischen 1-7 mmol/l zum Einsatz. Die Ausgangslösung wies eine Ruhescherviskosität von $\eta_0 = 0,07 \pm 0,02$ Pas auf.

Frisch angesetztes Gluco- δ -lacton (GDL) (Fluka) wurde jeweils im molaren Verhältnis von 2:1 zum Kalziumcarbonat den Lösungen hinzugefügt. Durch die schwach hydrolysierende Säure GDL kam es zu einer langsamen Freisetzung von Kalziumionen in der Lösung, welche die negativ geladenen Polysaccharidketten des Alginates verbrückten. Die Gelbildung erfolgte abhängig vom Alginat und der Kalziumkonzentration im Zeitraum von 2-12 Stunden. Die entstandenen Gele zeigten weitgehend isotrope Strukturen, was sich an der Abwesenheit von Doppelbrechungserscheinungen unter Verwendung eines Mikroskops mit gekreuzten Polarisationsfiltern beweisen lässt (Abb. 16.).

3.1.3 Herstellung von Biofilmen:

3.1.3.1 Biofilme mit Filter

Für die Untersuchung nativer Biofilmkulturen wurden Stämme der Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* SG81, FRD1 und FRD1153 verwendet. SG81 stammt ursprünglich aus einem technischen Wassersystem, FRD1 aus klinischen Proben, FRD1153 ist eine Mutante mit Acetylgruppendefekt. Bei allen Stämmen handelt es sich um mukoide Typen.

Die Mikroorganismen wurden auf *Pseudomonas Isolations Agar* (PIA) (Difco) für 24 Stunden bei 36 °C vorkultiviert. Nach dem Wachstum wurde eine Suspension einzelner Zellen in steriler, 0,14 molarer NaCl-Lösung präpariert. Die Zelldichte betrug unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer ca. 10^7 Zellen pro Milliliter Lösung. Ein Milliliter dieser Suspension wurde mittels VE-Wasser auf 100 ml verdünnt, und diese Lösung anschließend unter Verwendung von Celluloseacetatfiltern (GN-6, Pall Gelman Science) mit 50 mm Durchmesser und einem Porenradius von 0,45 µm filtriert.

Diese Membranfilter, bedeckt mit bakteriellen Zellen, wurden anschließend auf PIA Platten aufgebracht und im Brutschrank bei 36 °C für jeweils 24, 48 und 72 Stunden gelagert.

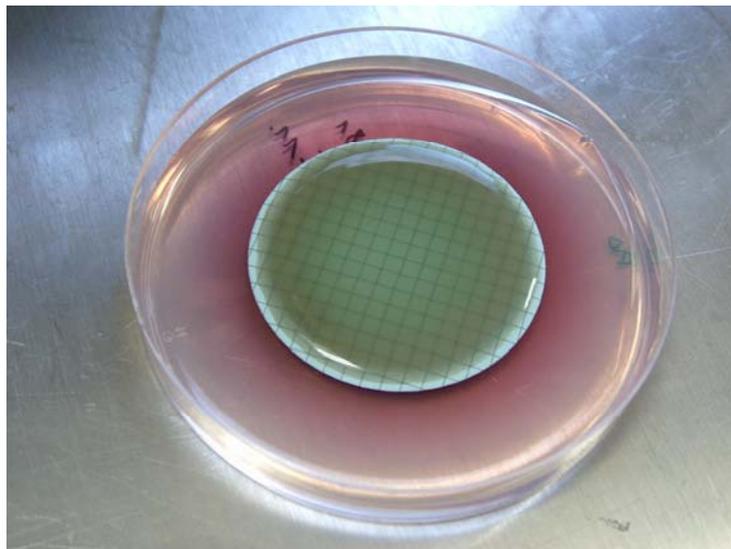


Abb. 32: Ein auf einem Celluloseacetatfilter und PIA Medium aufgewachsener Biofilm von *P. aeruginosa* SG81.

Die Filter mit dem aufgewachsenen Biofilm konnten nach der Inkubationszeit direkt vom Untergrund entfernt und in die Messzelle des Rheometers überführt werden. Damit war auch eine strukturelle Unversehrtheit des Biofilms gewährleistet. Alle Arbeiten wurden unter Verwendung mikrobiologischer Techniken zur Vermeidung von Kontamination steril durchgeführt.

3.1.3.2 Biofilme ohne Filter

Für einzelne Experimente wurden Biofilme ohne Filterunterlage präpariert. Die Mikroorganismen wurden ebenfalls auf Pseudomonas Isolations Agar (PIA) (Difco) für 24 Stunden bei 36 °C vorkultiviert. Nach dem Wachstum wurde eine Suspension einzelner Zellen in steriler, 0,14 molarer NaCl-Lösung präpariert. Die Zelldichte betrug ca. 10^7 Zellen pro Milliliter unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer. Ein Milliliter dieser Lösung wurde mit VE-Wasser auf 100 ml verdünnt. 0,1 ml dieser Suspension wurde direkt auf das PIA Medium aufgebracht und gleichmäßig verteilt. Auch diese Platten wurden im Brutschrank bei 36 °C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Der aufgewachsene Biofilm wurde mittels Spatel vorsichtig vom Untergrund entfernt, und in die Messzelle des Rheometers überführt.

3.1.3.3 Biofilme mit Filter und Ionen

Die Versuche zur Untersuchung des Ioneneinflusses auf Biofilme erfolgten wiederum unter Verwendung von Celluloseacetatfiltern jedoch mit Ionenzugabe zum Nährmedium. Die Aufzucht der Biofilme geschah wie im Kapitel „Biofilme mit Filter“ beschrieben. Verwendet wurden hierbei spezielle mit Ionen präparierte PIA Medien. Zum Einsatz kamen jeweils Kalzium, Magnesium und Mangan als Chloridverbindungen (Fluka). Dem Agar Pulver wurde bei der Herstellung der PIA Platten neben Glycerol und Wasser auch eine Lösung der Ionen in definierter Konzentration beigefügt. Da die Menge der PIA-Lösung beim Schütten der Platte bekannt war (25 ml), war damit auch eine quantitative Aussage über die Ionenkonzentration im Medium möglich.

3.2 Das Rheometer:

Für die durchgeführten Untersuchungen wurde hauptsächlich ein deformationsgesteuertes Rheometer der Firma Rheometrics Scientific, Modell RFS II eingesetzt. Das Rheometer arbeitet nach dem so genannten „Couette-Prinzip“. Dabei wird der untere Teil der Messgeometrie durch eine Motoreinheit angetrieben, während im oberen Teil über Torsionselemente die entstehende Normalkraft und das Drehmoment detektiert werden. Zur Messung wird über den Motor eine definierte Scherrate, Deformation oder Kreisfrequenz vorgegeben und die resultierende Schubspannung gemessen. Die Aufnahme und Umrechnung der rheologischen Größen erfolgt mittels der eigenen Rhios-Software.

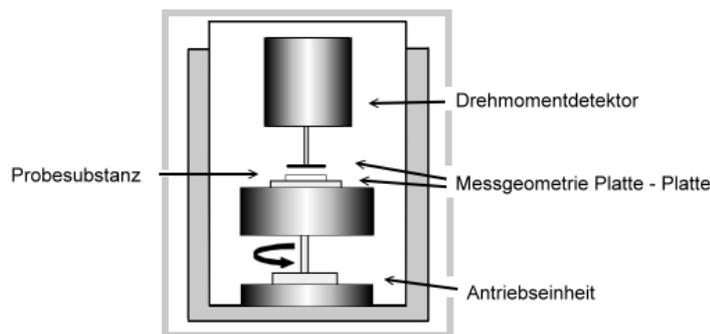


Abb. 33: Funktionsweise eines deformationsgesteuerten Rheometers.

Der Vorteil gegenüber einem schubspannungsgesteuerten Gerät, bei dem der untere Teil starr ist, während im oberen Teil über den Betriebsstrom des Motors eine Schubspannung vorgegeben und das Rückstellmoment der Probe gemessen wird, liegt hier u.a. in der Abwesenheit von Taylor-Wirbeln, die vor allem an Kanten rotierender Messkörper entstehen können. Die verwendbaren Messgeometrien sind austauschbar und den benötigten Verhältnissen anpassbar.

Verwendet wurden für niedrigviskose Systeme eine 3D-Couette Geometrie. Für höherviskose Substanzen wurde ein Platte-Platte System mit 50 mm Durchmesser, als auch ein Kegel-Platte System mit einem Kegelwinkel von 0,02 rad, und ebenfalls 50 mm Plattendurchmesser verwendet. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte über einen angeschlossenen Computer.



Deformationsgesteuert
 Messzelle: variabel
 Abstand der Geometrien: variabel

Deformation γ [%]: 0,25 - 2500
 Scherrate $\dot{\gamma}$ [1/s]: 0,25 - 5000
 Frequenz ω [rad/s]: 0,001 - 100

Abb. 34: Das Rheometer RFS II mit einigen technischen Daten

Für die einstellbaren Größen Scherrate [1/s], Deformation [%] und Kreisfrequenz [rad/s] ergeben sich folgende Zusammenhänge:

Für die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ gilt beim am häufigsten verwendeten Kegel-Platte System:

$$\dot{\gamma} = \left(\frac{\pi}{30\beta} \right) \cdot n \quad (37)$$

mit β = Kegelwinkel in rad, n = Drehzahl

Die Scherrate ist die zeitliche Ableitung der Deformation:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad (38)$$

Die Deformation γ wird als Amplitude der Schwingungsgleichung (s.Gl. (15)) über die Auslenkung der Messgeometrie vorgegeben und besitzt die Einheit [%]. Dabei bedeutet 100 % oder 1,0 eine Auslenkung der Geometrie von 45 °, aus der Beziehung des Phasenverschiebungswinkels δ : $\tan \delta = 1$, wenn $\delta = 45^\circ$.

Für die Kreis- oder Schwingungsfrequenz ω gilt folgender Zusammenhang:
(Mezger & Zorll 2002)

$$\omega = 2\pi \cdot f \quad (39)$$

mit f als Frequenz.

Die Schubspannung τ ergibt sich beim Kegel-Platte System nach folgender Gleichung:

$$\tau = \left(\frac{3}{2\pi \cdot R^3} \right) \cdot M \quad (40)$$

mit R = Plattenradius und M = Drehmoment

3.3 Die rheologischen Untersuchungsmethoden:

Zur Untersuchung der verwendeten Substanzen wurden verschiedene Testverfahren genutzt, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Tabelle 3 gibt zudem eine Übersicht über die einstellbaren Parameter und die direkt resultierenden Messgrößen. Diese lassen sich ggf. durch geeignete mathematische Verfahren in andere Größen umwandeln.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen rheologischen Testverfahren (nach Pflaumbaum 2002)

Testtyp	Vorgabeparameter (konstant)	Vorgabeparameter (regelbar) (x-Achse)	Resultierende Größen/ Erkenntnisse (y-Achse)
Scherratenest		$\dot{\gamma}$	η, τ, N_I
Deformationstest	ω	γ	G', G''
Frequenztest	γ	ω	$G', G'', \eta^* $
Relaxationstest	γ	t	$G(t)$
Zeittest	γ, ω	t	G', G''
Scherraten-Zeit (Stufen)test	$\dot{\gamma}$	$t, (\dot{\gamma})$	$\eta, Thixotropie$ <i>Rheopexie</i>

Legende:

τ = Schubspannung [Pa]

γ = Deformation [%]

$\dot{\gamma}$ = Scherrate [1/s]

ω = Kreisfrequenz [rad/s]

t = Zeit [s]

G' = Speichermodul [Pa]

G'' = Verlustmodul [Pa]

$G(t)$ = Relaxationsmodul [Pa]

η = Scherviskosität [Pas]

$|\eta^*|$ = komplexe Viskosität [Pas]

$N_I = 1$. Normalspannungsdifferenz [Pa]

3.3.1 Der Scherratenversuch:

Bei dieser Art von Test wird über die Drehzahl des Motors ein Scherratenprofil bzw. die Rotation vorgegeben. Gemessen wird über den Drehmomentaufnehmer das Drehmoment, weiterhin die Normalkraft, die Winkelgeschwindigkeit und die Zeit. Diese Daten werden geräte- bzw. softwareintern unter Berücksichtigung der verwendeten Messzelle in die Schubspannung bzw. Viskosität umgerechnet. Grafisch aufgetragen ergibt sich für die Vorgabe- und Antwortkurve für verschiedene Fließphänomene folgender Verlauf:

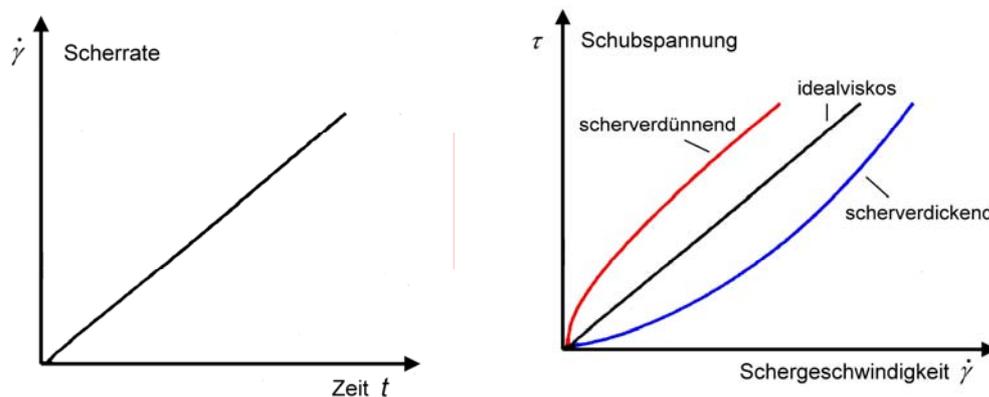


Abb. 35: Vorgabe- (links) und Antwortkurve (rechts) beim Scherratenversuch

Treten zusätzlich Phänomene wie Thixotropie und Rheopexie auf, verwendet man zur Untersuchung kein lineares Scherratenprofil, sondern eine Scherraten Sprungfunktion (Abb. 25) mit den drei Abschnitten geringe Scherbelastung/Belastungsphase/geringe Scherbelastung. Je nach vorhandenem Fließphänomen erhält man einen zeitabhängigen Verlauf der Viskosität entsprechend den vorgegebenen Belastungs-/Entlastungsphasen. Damit es sich um „echte“ Thixotropie/Rheopexie handelt müssen die zeitlichen Phänomene vollständig reversibel sein (Mezger & Zorll 2002).

3.3.2 Der Deformations- oder Amplitudentest:

Beim Deformationstest wird bei konstanter Frequenz die Amplitude der Schwingung schrittweise erhöht. Der Test liefert u.a. eine Aussage über die Grenze des linear-viskoelastischen Bereiches (LVE-Bereich). Der Begriff ist auf die Proportionalität von Vorgabe- und Messparameter zurückzuführen. In diesem Bereich gelten das Hooke'sche Gesetz (idealelastisch) und das Newton'sche Gesetz (idealviskos). Die Modulwerte $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ besitzen hier konstante Plateauwerte. Ab einem gewissen Grenzwert der Deformation (γ_L) wird der LVE-Bereich verlassen. Handelt es sich bei der Probe z.B. um eine Substanz mit einer stabilen Netzwerkstruktur, besitzt sie keine Möglichkeit nach Entlastung in den Ausgangszustand zurückzukehren. Es kommt zu einer bleibenden Zerstörung des molekularen Netzwerks (Ferry 1980).

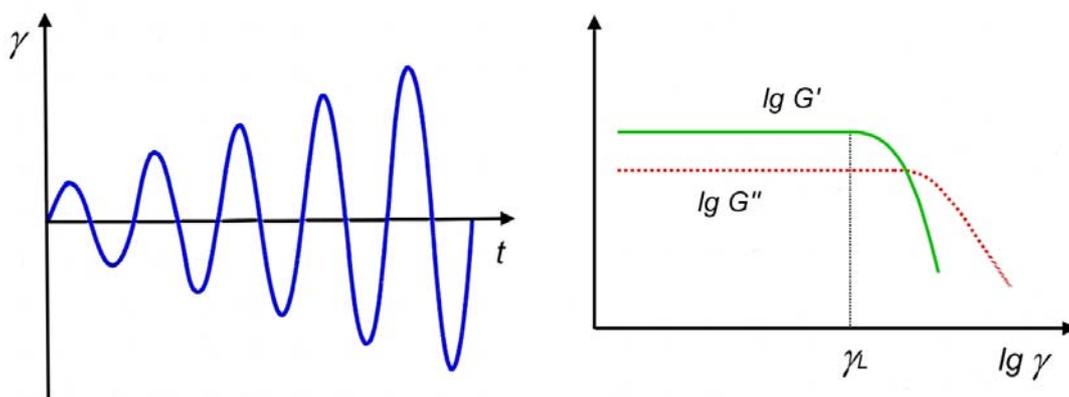


Abb. 36: Vorgabe- (links) und Antwortkurve (rechts) beim Amplitudentest (nach Mezger & Zorll 2002).

Der Amplitudentest liefert weiterhin eine Aussage über den Charakter der untersuchten Substanz. Zeigt die Struktur eine gewisse Steifigkeit und dominiert das elastische über dem viskosen Verhalten erhält man Kurven mit $G' > G''$. Flüssigkeiten, Pasten und Gele zeigen ein solches Verhalten. Dominiert hingegen das viskose Verhalten ($G'' > G'$) besitzt die Substanz im LVE-Bereich den Charakter einer Flüssigkeit. Auch hochviskose Substanzen mit verschlauften Molekülen ohne chemisches oder physikalisches Netzwerk zeigen ein solches Verhalten, sie sind nicht formstabil. Im LVE-Bereich gilt für Polymere außerdem, dass der Betrag der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ der Ruhe- oder Nullviskosität η_0 entspricht.

3.3.3 Der Frequenztest:

Beim Frequenztest wird die Amplitude konstant gehalten, und die Frequenz variiert. Man simuliert zeitabhängiges Scherverhalten. Bei hohen Frequenzen wird das Kurzzeitverhalten bei schnellen Bewegungen untersucht, bei niedrigen Frequenzen das Langzeitverhalten bei langsamen Bewegungen. Zu beachten ist, dass man sich im LVE-Bereich befinden muss.

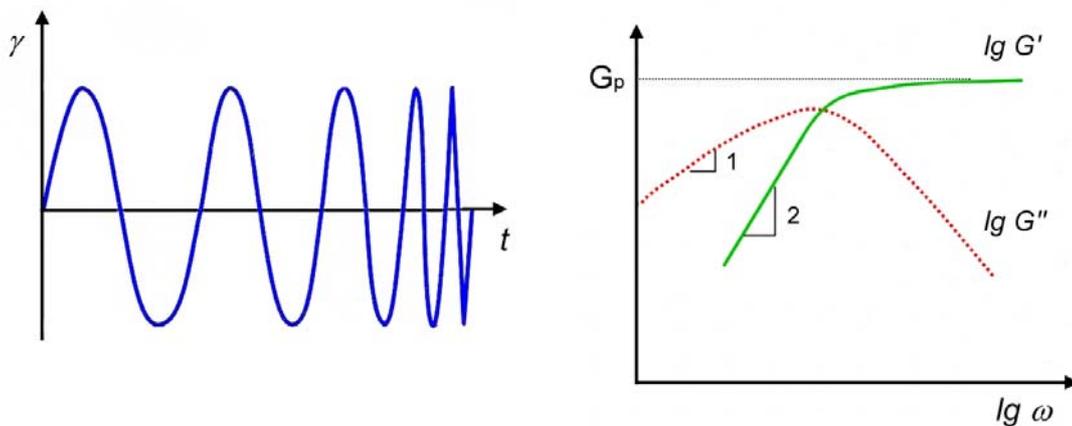


Abb. 37: Vorgabe- (links) und Antwortkurve (rechts) beim Frequenztest (nach Mezger & Zorll 2002).

Der Frequenztest erlaubt eine ganze Reihe von Aussagen zur Charakterisierung einer Substanz. Mit seiner Hilfe lässt sich zwischen vernetzten und unernetzten Substanzen unterscheiden. Molekulargewichte und die Anzahl der elastisch effektiven Ketten (Vernetzungsgrad) sind über das Speichermodul im Plateaubereich (G'_p) zugänglich. Die Relaxationszeit ist als reziproker Wert des Schnittpunktes aus G' und G'' ermittelbar, die Ruhestrukturstärke von z.B. Dispersionen ist bestimmbar, ebenso wie die relative Molekulargewichtsverteilung von z.B. Polymeren. Des Weiteren lässt sich eine eventuell vorhandene Fließgrenze detektieren. Durch Konversion der durch Frequenztests erhaltenen dynamischen Daten, sind eine Reihe weiterer rheologischer Größen zugänglich. (Mezger & Zorll 2002)

3.3.4 Der Zeittest:

Bei einem Zeittest wird das Verhalten der Viskosität und/oder des Speicher- und Verlustmoduls als Funktion der Zeit bestimmt. Es lassen sich damit Aussagen über die Stabilität einer Substanz treffen, ebenso ob eine Reaktion abläuft, welche die Struktur der Substanz ändert. Ein Sol-Gel Übergang ist so z.B. detektierbar, allerdings muss für die genaue Bestimmung des Sol-Gel Punktes eine andere Methode eingesetzt werden.

3.3.5 Der Relaxationstest:

Beim Relaxationstest wird das viskoelastische Verhalten einer Substanz über einen Deformationsprung untersucht. Man beginnt mit einer geringen Vordeformation um die evtl. unterschiedliche Probenvorgeschichte auszugleichen, dann erfolgt ein spontaner Sprung auf einen höheren Deformationswert der konstant gehalten wird. Dabei ist zu beachten, dass man sich im LVE-Bereich bewegen muss. Je nach Art der Probe erhält man eine vollständige oder unvollständige Relaxation. Mittels dieser Methode ist auch eine Unterscheidung zwischen viskoelastischem Festkörper und viskoelastischer Flüssigkeit möglich.

Alle Kurven des Relaxationsmodul $G(t)$ zeigen im LVE-Bereich denselben Verlauf unabhängig von der vorgegebenen Deformation, da das Hooke'sche Gesetz gilt, und zu jeder vorgegebenen Deformation sich die proportionale Schubspannung einstellt.

Die Relaxationszeit λ entspricht der Umwandlung reversibel gespeicherter Energie in irreversibel dissipierte Energie. Dies ist die charakteristische Zeitkonstante mit der jede im System durch Deformation erzeugte Spannung relaxiert. In physikalisch vernetzten Systemen bestimmen Diffusionsprozesse diese Größe (Mezger & Zorll 2002).

Das Relaxationszeitspektrum $H(\lambda)$ ist hingegen nicht direkt messbar und nur durch Datenkonversion aus anderen Materialfunktionen, wie dem Speicher- und Verlustmodul, erhältlich. Es beschreibt die Verteilung der Zeitkonstanten mit der das System auf den Deformationsprung reagiert hat (Ferry 1980).

3.3.6 Datenkonversion:

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, sind einige rheologische Größen nur durch Konversion aus anderen, im LVE-Bereich bestimmten Daten zugänglich. Die Transformation erfolgt zumeist über die ans Messgerät angeschlossene Steuersoftware RSI Orchestrator. Dabei kommen sowohl empirische als auch exakte Transformationsmethoden zur Anwendung. Ist das Relaxationsmodul bekannt, können mittels Fourier-Transformation Speicher- und Verlustmodul berechnet werden (Ferry 1980):

$$G'(\omega) = \omega \int_0^{\infty} G(t) \sin(\omega t) dt \quad (41)$$

$$G''(\omega) = \omega \int_0^{\infty} G(t) \cos(\omega t) dt \quad (42)$$

Umgekehrt lässt sich bei bekannten Werten für das Speicher- und Verlustmodul das Relaxationsmodul berechnen:

$$G(t) = \left(\frac{2}{\pi}\right) \int_0^{\infty} \left(\frac{G'}{\omega}\right) \sin(\omega t) d\omega = \left(\frac{2}{\pi}\right) \int_0^{\infty} \left(\frac{G''}{\omega}\right) \cos(\omega t) d\omega \quad (43)$$

Durch Lösen der Integrale der Gleichungen (44) bis (46) ist über die Materialfunktionen G' , G'' und $G(t)$ das Relaxationszeitspektrum $H(\lambda)$ zugänglich (Tschoegl 1989).

$$G'(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} H(\lambda) \cdot \frac{\omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} d \ln \lambda \quad (44)$$

$$G''(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} H(\lambda) \cdot \frac{\omega\lambda}{1 + \omega^2\lambda^2} d \ln \lambda \quad (45)$$

$$G(t) = G_0 - \int_{-\infty}^{+\infty} H(\lambda) \cdot e^{-t/\lambda} d \ln \lambda \quad (46)$$

3.4 Methoden der Strömungsdoppelbrechung

Zur Bestimmung der rheo-optischen Größen wird ein Aufbau benötigt, bei dem das eingestrahlte Licht senkrecht zur Strömungsrichtung und dem Geschwindigkeitsgradienten geführt wird. Als Strahlungsquelle wird monochromatisches Licht (Laser, Quecksilberhochdrucklampe + Interferenzfilter, etc.) verwendet. Die induzierte Doppelbrechung wird mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert.

Zur Bestimmung des Auslöschwinkels bei z.B. stationärer Scherströmung befindet sich die Messzelle zwischen einer Polarisator-Analysator Einheit. Es müssen zwei Intensitäten I_1 und I_2 bestimmt werden, I_1 bei gekreuzter Messanordnung, I_2 bei paralleler Anordnung von Analysator und Polarisator (Fuller 1995).

$$I_1 = \frac{I_0}{2} \sin^2(2\Phi) \sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) \quad (47)$$

$$I_2 = \frac{I_0}{2} \left[1 - \sin^2(2\Phi) \sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) \right] \quad (48)$$

Die Ergebnisse können zu folgender Gleichung kombiniert werden:

$$\sqrt{\frac{I_1}{I_1 + I_2}} = \sin 2\Phi \sin\left(\frac{\pi \cdot \Delta n \cdot d}{\lambda}\right) \quad (49)$$

Die Messung muss weiterhin in zwei Abschnitten durchgeführt werden, wobei einmal bei 0° zur Messachse und einmal 45° verschoben dazu gemessen wird. Dazu wird die

Analysator und Polarisator Einheit beim zweiten Abschnitt komplett um 45° gedreht. Eine Einschränkung dieser Methode ist, dass vorausgesetzt werden muss, dass die Doppelbrechung keine Funktion der Wellenlänge ist.

Eine andere Schreibweise für die optische Transmission T des gesamten Systems ist in Gl. (50) dargestellt. A ist dabei noch ein Faktor zwischen 0 und 1, der die Absorptions- und Reflektionsverluste der optischen Bauteile beschreibt (Zimm 1958).

$$T = A \cdot \left(\sin^2 \frac{\delta}{2} \right) \cdot \sin^2 2\Phi \quad (50)$$

Die Phasendifferenz ergibt sich aus Gleichung (52). Für α wird die Schichtdicke oder Spaltbreite der Messanordnung verwendet. Abb. 38 zeigt schematisch eine solche Messanordnung.

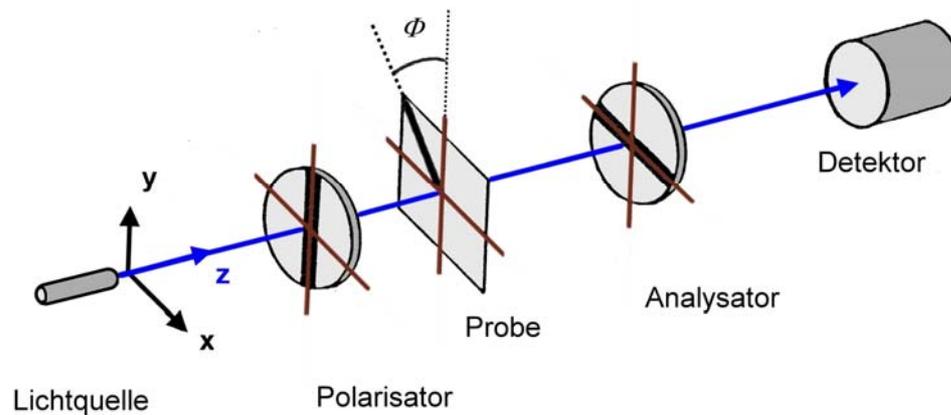


Abb. 38: Schematische Messanordnung zur Strömungsdoppelbrechung (nach Löbl M. 1984).

Eine andere Messmethode besteht in der Einführung eines $\lambda/4$ -Plättchens in den Strahlengang. Die Methode nach Senarmont ist vor allem für kleine Doppelbrechungsamplituden ($\Delta\hat{n} < 10^{-6}$) geeignet. Der Aufbau ist dem oben beschriebenen ähnlich. Zusätzlich wird zwischen Probe und Analysator ein $\lambda/4$ -Plättchen eingefügt, so

dass eine seiner Hauptachsen parallel zur Polarisationsrichtung des Polarisators liegt. Der Analysator wird weiterhin um einen kleinen Winkel β aus der gekreuzten Position bezüglich des Polarisators herausgedreht. Geht man von der Annahme aus, dass der Auslöschwinkel nahe dem isotropen Grenzwert von 45° ist, ergibt sich für das Verhältnis der Intensitäten Gl. (51) (Fuller 1995).

$$\frac{I}{I_0} = \frac{1}{4} (1 - \cos^2 2\beta \cdot \cos \delta + \sin^2 2\beta \sin \delta) \quad (51)$$

Unter der Annahme, dass $\delta \ll \beta \ll 1$ lässt sich der Ausdruck aus Gleichung (51) zu folgender Näherung umformulieren (Janeschitz-Kriegl 1969):

$$\delta = 2\beta \quad (52)$$

Damit ist die Phasendifferenz einfach aus dem Winkel β zugänglich, um den die Anordnung gedreht werden muss um wieder eine Auslöschung des Signals zu erhalten.

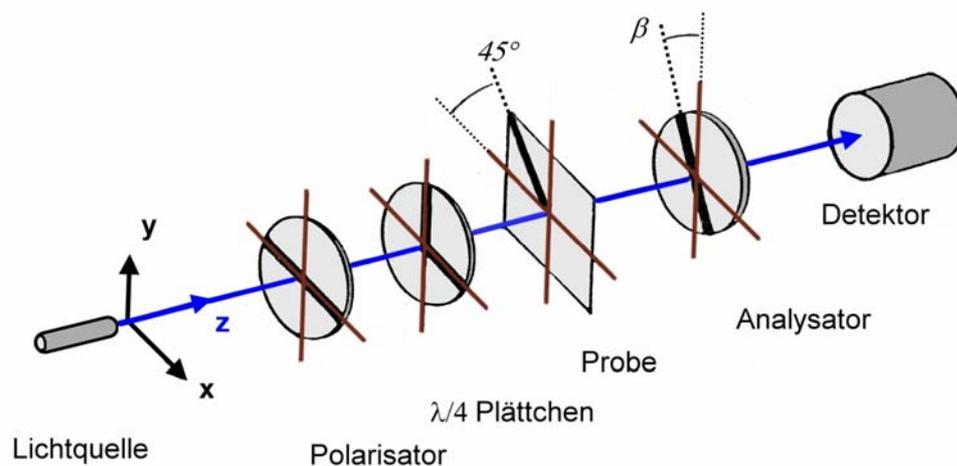


Abb. 39: Schematische Darstellung der Messanordnung zur Strömungsdoppelbrechung unter Verwendung eines $\lambda/4$ -Plättchens (nach Löbl M. 1984).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 EPS Lösungen

Im Vorfeld der Untersuchungen an lebenden Biofilmen wurde eine Testreihe mit EPS Lösungen und Lösungen verschiedener Natriumalginat durchgeführt (Wloka, Diplomarbeit 2002, Wloka 2004), dabei wurde auch der Einfluss von Kalziumionen auf diese Systeme untersucht und miteinander verglichen. Die Voruntersuchungen dienten der Vereinfachung der Messsysteme, da hier Parameter wie die Heterogenität und das Altern der Substanzen vernachlässigt werden konnten.

Abb. 40 zeigt einen typischen Frequenztest einer EPS Lösung der in seinem Verlauf einem verallgemeinerten Maxwell Modell ähnelt. Einsetzen der Werte aus Abb. 40 in Gleichung (12) liefert einen Durchschnittswert von $3,4 \cdot 10^{17}$ elastisch effektiven Ketten pro Liter Lösung. Die Anzahl der Polymerketten in Lösung wurde über die Konzentration der Uronsäuren berechnet. Spektroskopisch wurde dafür ein Ausgangswert von 1,12 g/l bestimmt (Wingender, Strathmann, Rode, Leis, & Flemming 2001), (Filisetticozzi & Carpita 1991). Das Molekulargewicht des Alginats war aus der Bestimmung intrinsischer Viskositäten zugänglich (2.370.000 g/mol) (Grobe, Wingender, & Truper 1995). Daraus ergab sich ein Wert von $2,9 \cdot 10^{17}$ Polymerketten pro Liter Lösung. Dies zeigte, dass die Polymerkettenkonzentration sich in derselben Größenordnung bewegte, wie die Konzentration an elastisch effektiven Ketten, die durch rheologische Methoden bestimmt wurden. Das bedeutete, dass jedes Makromolekül in Lösung zeitweise mit zwei anderen Ketten verbunden war. Da allerdings die Funktionalität der Verknüpfungen nicht bekannt war, konnte diese Aussage somit nur als durchschnittliche Konzentration der Netzwerkpunkte, die als entropieelastische Feder fungierten, gelten.

Aus vorausgegangenen Messungen war eine durchschnittliche Lebenszeit der Verknüpfungspunkte von 17 ± 5 ms bei einem Gleichgewichtsmodul G_0 von $1,4 \pm 0,2$ Pa bekannt (Wloka, Rehage, Flemming, & Wingender 2004). Abb. 41 zeigt zusätzlich das aus den Gleichungen (44) - (46) berechnete Relaxationszeitspektrum $H(\lambda)$. Ebenfalls durchgeführte dynamische Lichtstreuung an EPS Lösungen zeigte eine Übereinstimmung mit diesen Daten. Gefunden wurde eine Relaxationszeit von 19 ms, ebenso wie ein Abstand der Netzwerkpunkte von 117 nm (Shukla A., 2005, unveröffentlicht).

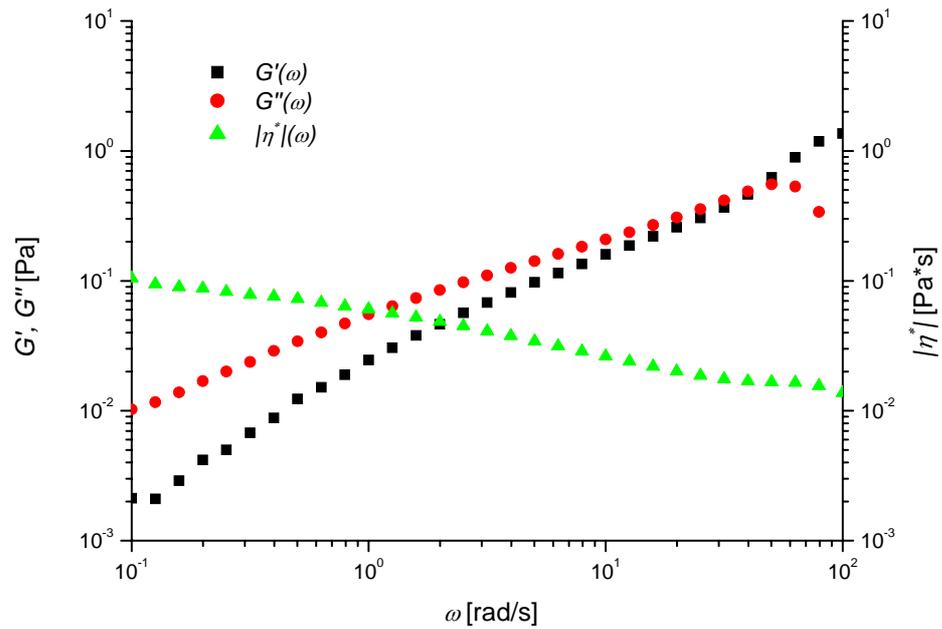


Abb. 40: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($T = 21$ °C, $\gamma = 50$ %) bei einer EPS Lösung (Wloka, Rehage, Flemming, & Wingender 2004).

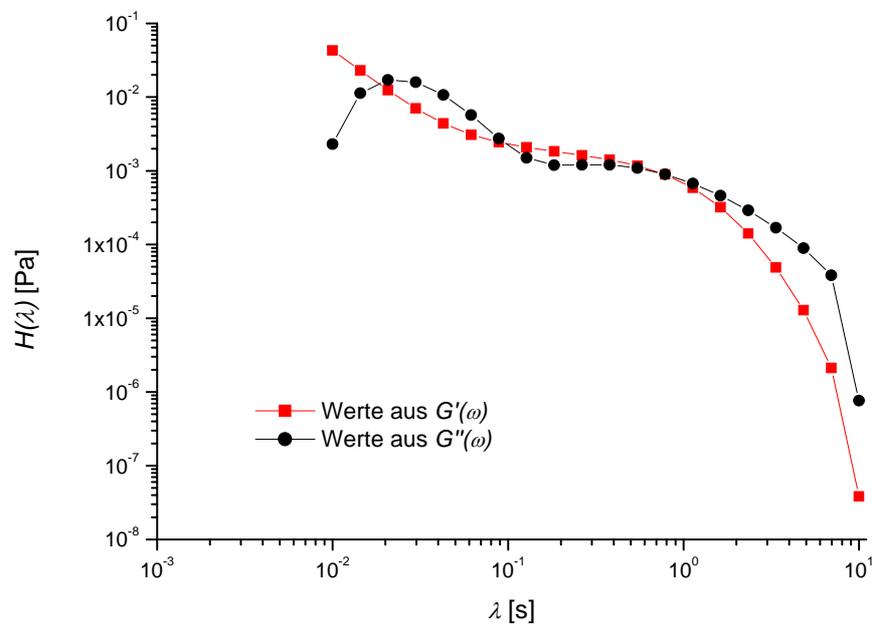


Abb. 41: Das Relaxationszeitspektrum $H(\lambda)$ einer EPS Lösung, berechnet aus den Werten von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ (Wloka, Rehage, Flemming, & Wingender 2004).

Aus Lichtstreuungsexperimenten war weiterhin das Zeta-Potential zugänglich. Für EPS Lösungen wurde ein Zeta-Potential von $-31,92$ mV gefunden (Shukla A., 2005, unveröffentlicht).

Für die Wechselwirkungen zwischen den Alginatmolekülen bestand zusätzlich die Möglichkeit für das Auftreten von London-Dispersionskräften aufgrund der hydrophoben Taschen, die von acetylierten Gruppen der Alginat gebildet werden konnten (Mayer, Moritz, Kirschner, Borchard, Maibaum, Wingender, & Flemming 1999).

Um eine Aussage über die Anzahl der hydrophoben Domänen zu erhalten, wurde die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Es ist bekannt, dass nichtpolare Fluoreszenzmarker wie Pyren, spezifisch an hydrophoben Gruppen adsorbiert werden (Dominguez et al. 1997). Über die Höhe der Peaks im Spektrum war eine Aussage über die Anzahl der hydrophoben Bereiche möglich. Für die untersuchten EPS Lösungen wurden keine hydrophoben Domänen gefunden (Optenhostert T., 2003, unveröffentlicht).

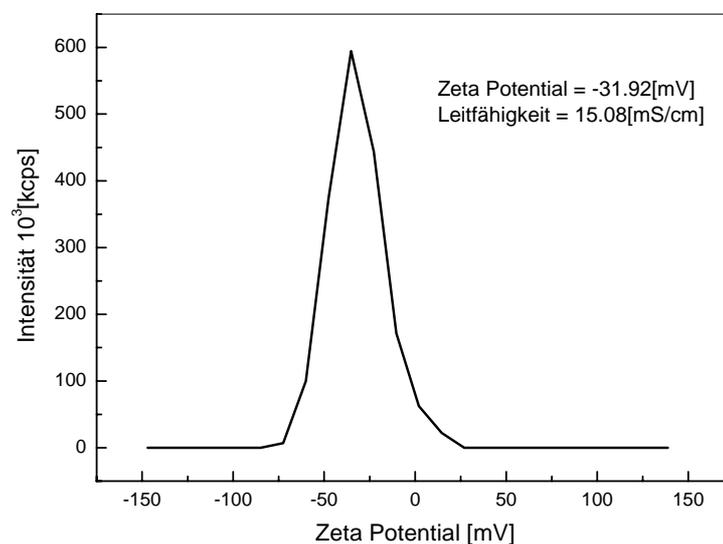


Abb. 42: Ergebnisse dynamischer Lichtstreuungsexperimente an EPS Lösungen durchgeführt an einem Zetasizer Nano-ZS von Malvern (Shukla A., 2005, unveröffentlicht).

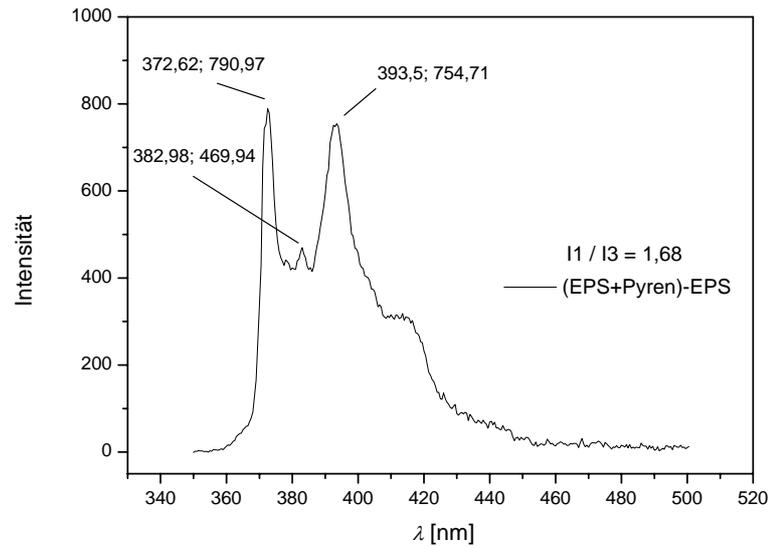


Abb. 43: Fluoreszenzspektrum einer EPS Lösung versetzt mit Pyren. Das schwache Fluoreszenzsignal der EPS Lösung ohne Pyren wurde vom Spektrum subtrahiert. $c(\text{Pyren}) = 10^{-7}$ mol/l (Wloka, Rehage, Flemming, & Wingender 2004).

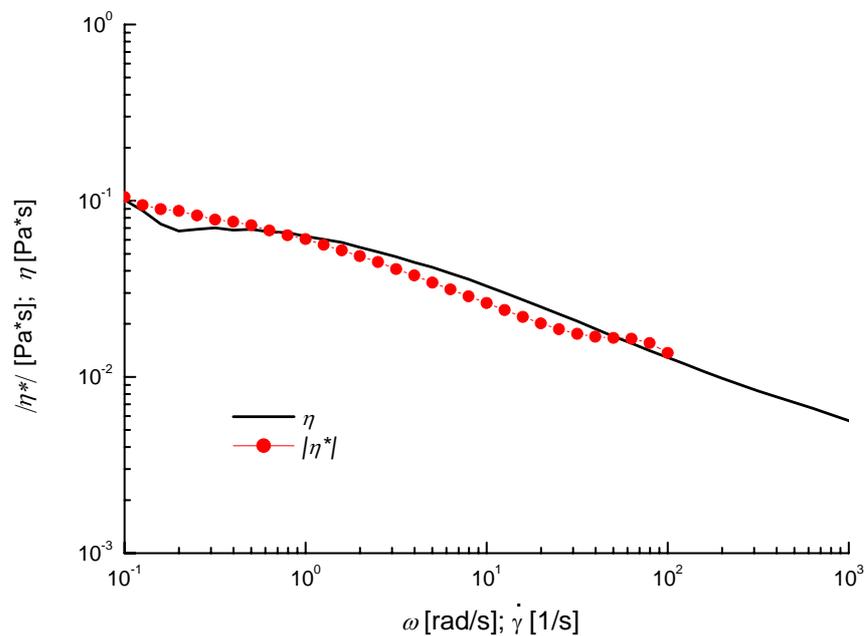


Abb. 44: Die Cox-Merz Regel: Vergleich der Scherviskosität $\eta(\dot{\gamma})$ und der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ bei gleichen Werten von Kreisfrequenz ω und Scherrate $\dot{\gamma}$ für eine EPS Lösung (Wloka, Rehage, Flemming, & Wingender 2004).

Die Cox-Merz Regel (Abb. 44, Gl. (27)) bestätigte, dass in den Lösungen der extrazellulären polymeren Substanzen, vornehmlich physikalische Wechselwirkungen das viskoelastische Verhalten prägen. Dies geschah durch Netzwerkpunkte, die von verschlauften Alginatmolekülen („Entanglements“) gebildet wurden.

4.2 Kalzium vernetzte EPS- und Natriumalginat

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten die Tendenz der EPS Lösungen schwach vernetzte temporäre Netzwerke zu bilden. Die Anwesenheit von Kalziumionen führte zu stabilen Vernetzungen aufgrund der eingeführten Coulomb-Wechselwirkungen. Um die dreidimensionale Netzwerkstruktur dieser Gele zu untersuchen, wurden homogene EPS- und Natriumalginatgele mit Kalziumkonzentrationen von 1, 3, 5, 7, 10, 14 und 20 mmol/l Ca^{2+} hergestellt (Methode s. Kapitel 3.1.2). Die aus älteren EPS-Lösungen präparierten Gele waren allerdings nicht länger als 24 Stunden stabil und zeigten ausgeprägte Syneresis Effekte. Gele, die aus frischen EPS Lösungen hergestellt wurden, zeigten keine solchen zeitabhängigen Effekte.

Abb. 45 und Abb. 46 zeigen den zeitabhängigen Verlauf der Gelbildung am Beispiel einer 1 % Natriumalginat/ CaCO_3 , bzw. EPS/ CaCO_3 Lösung mit zugefügtem Gluco- δ -Lacton. Nach dem Start der Reaktion überwogen die viskosen Eigenschaften (G'' liegt über G'), im weiteren Verlauf mit zunehmender Vernetzung der Polysaccharide durch Kalziumionen dominierten die elastischen Komponenten im entstehenden Gel (G' liegt über G''). Die exakte Lage des Sol-Gel Übergangs ist aus diesen Versuchen allerdings nicht zugänglich.

Abb. 47 bis Abb. 49 zeigen das Speichermodul G' aus Amplitudentests der hergestellten Gele mit Konzentrationen zwischen 1 und 20 mmol/l Ca^{2+} . Homogene EPS Gele mit höheren Kalziumkonzentrationen als 7 mmol/l ließen sich mit der beschriebenen Methode nicht mehr herstellen. Mit steigender Kalziumkonzentration nahm erwartungsgemäß die Anzahl der Verknüpfungsstellen zu. Die entstandenen EPS Gele zum Beispiel konnten bis zu mehreren hundert Prozent deformiert werden, bis nichtlineare Effekte auftraten. Dies ließ sich mit den gummielastischen Eigenschaften solcher Materialien erklären (Ferry 1980).

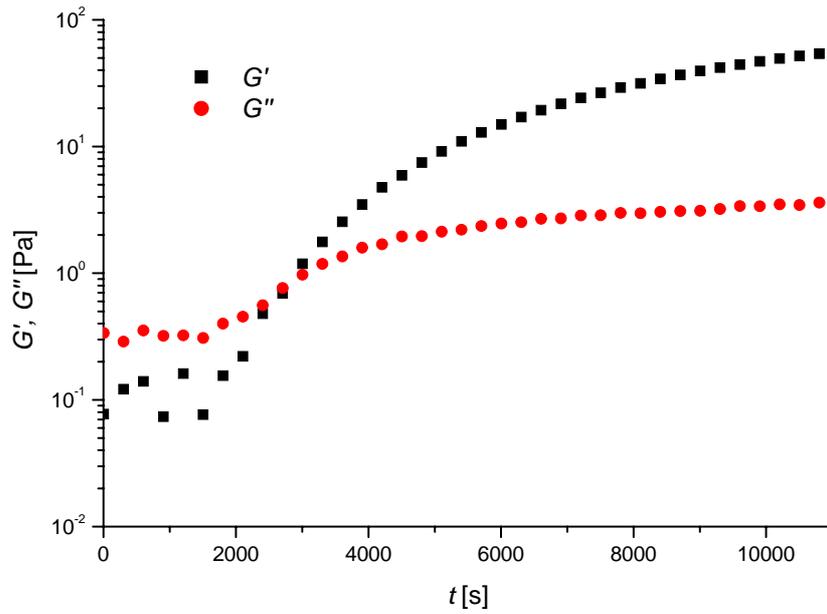


Abb. 45: G' und G'' als Funktion der Zeit t bei einer Kreisfrequenz $\omega = 10$ rad/s und einer Amplitude γ von 1 % für ein 1 % Natriumalginat/ CaCO_3 /Gluco- δ -Lacton System. $c(\text{Ca}^{2+}) = 5$ mmol/l.

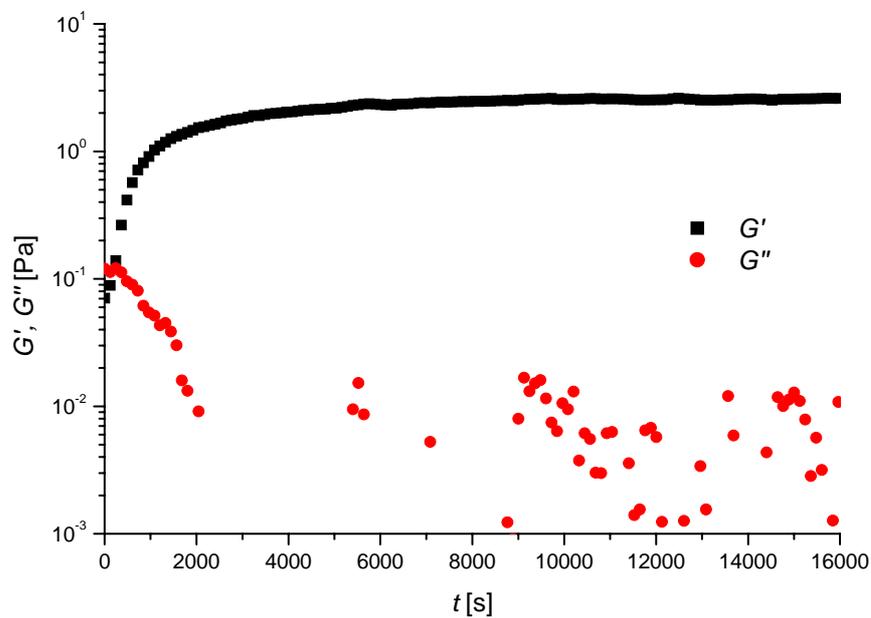


Abb. 46: G' und G'' als Funktion der Zeit t bei einer Kreisfrequenz $\omega = 10$ rad/s und einer Amplitude γ von 10 % für ein EPS/ CaCO_3 /Gluco- δ -Lacton System. $c(\text{Ca}^{2+}) = 3$ mmol/l.

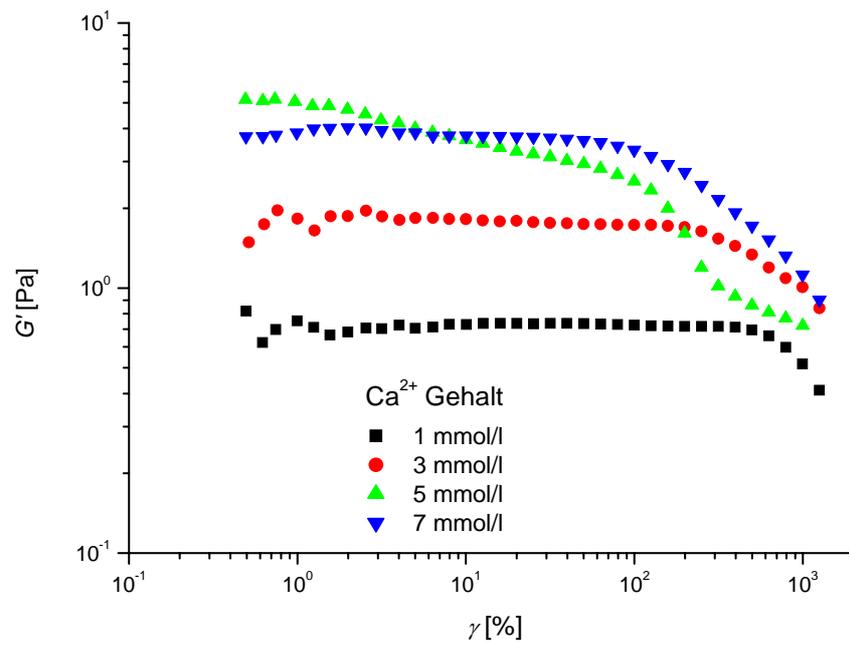


Abb. 47: Dynamische Eigenschaften von $G'(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ ($\omega = 10$ rad/s), für EPS Gele mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen.

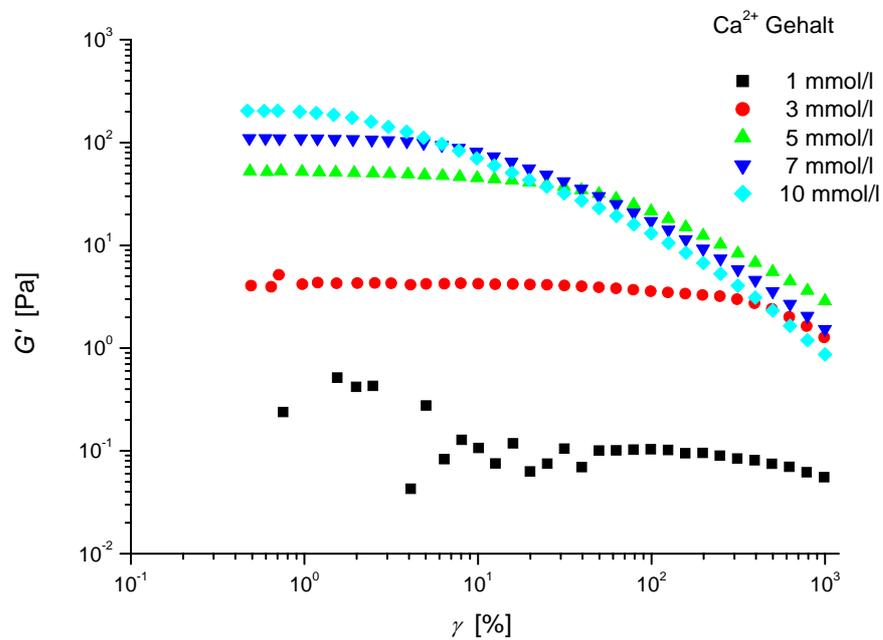


Abb. 48: Dynamische Eigenschaften von $G'(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ ($\omega = 10$ rad/s), für Natriumalginat Gele (aus 1 prozentiger Lösung) mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen.

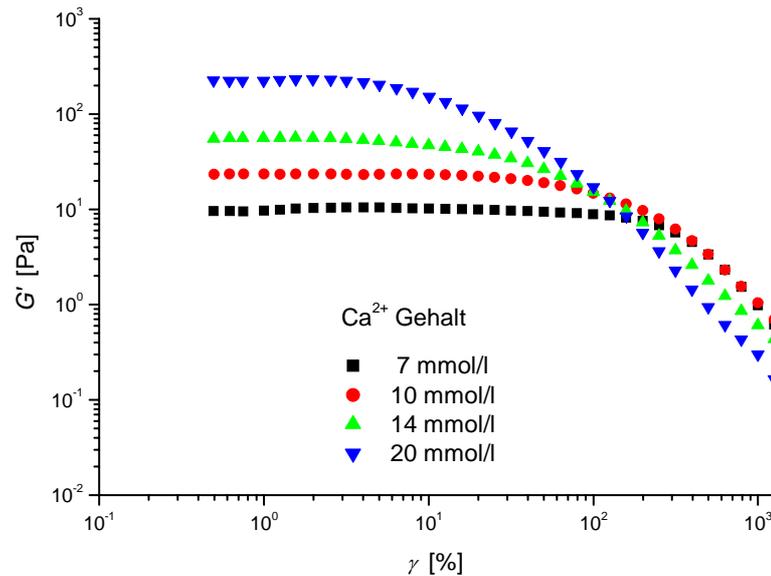


Abb. 49: Dynamische Eigenschaften von $G'(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ ($\omega = 10$ rad/s), für Manucol LB Gele (aus 2,5 prozentiger Lösung) mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen.

Die untersuchten Systeme zeigten entsprechend den Unterschieden in ihrem Aufbau (Molekulargewicht, Acetylgruppen in den Polysaccharidketten usw.) ein unterschiedliches Verhalten auf den Einfluss von Kalziumionen. Manucol LB mit dem geringsten Molekulargewicht (ca. 300.000 Da) zeigte auch bei höheren Ionenkonzentrationen noch die Tendenz zum Aufbau von stabilen Gelen, während 7 mmol/l $c(\text{Ca}^{2+})$ bei der EPS die Grenzkonzentration für die Gelierung mit der beschriebenen Methode darstellte. Der höhere Vernetzungsgrad bei größerer Ca^{2+} Konzentration führte, abhängig vom System, zu einer Verschiebung des Punktes bei dem der Strukturabbau unter Belastung begann, hin zu kleineren Deformationswerten.

Die Tendenz stabile Gele zu bilden zeigte sich auch in den durchgeführten Frequenztests, wobei je nach Ionenkonzentration ausgedehnte Plateaubereiche erhalten wurden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die gemessenen Werte des Gleichgewichtsschermoduls G_0 für die untersuchten Systeme. Die Abb. 50 und Abb. 51 zeigen beispielhaft Frequenztests für ein EPS/Ca- und ein Natriumalginat/Ca Gel mit einer Kalziumkonzentration von jeweils $c(\text{Ca}^{2+}) = 7$ mmol/l. Die Werte kleiner 10^{-3} rad/s wurden aus Relaxationstests bestimmt und

in dynamische Werte konvertiert. Aus dem Verlauf der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ war ersichtlich, dass diese Systeme keine Fließgrenze besaßen.

Tabelle 4: Gleichgewichtsschermodulwerte G_0 für die untersuchten Systeme bei verschiedenen Kalziumgehalten.

Gel System Ca ²⁺ Konzentration	EPS G_0 [Pa]	Na-Alginat (Fluka) G_0 [Pa]	Manucol LB G_0 [Pa]
1 mmol/l	0,6 ± 0,2	0,04 ± 0,01	-
3 mmol/l	2,7 ± 1,3	2,9 ± 0,6	-
5 mmol/l	6,4 ± 1,4	33,0 ± 6,6	-
7 mmol/l	4,2 ± 3,6	80,0 ± 16,2	5,6 ± 1,4
10 mmol/l	-	75,2 ± 15,3	14 ± 2,7
14 mmol/l	-	-	30 ± 8,3
20 mmol/l	-	-	122 ± 4,3

Aus den Gleichgewichtsschermodulwerten der Plateaubereiche ließ sich mit Gleichung (12) die Anzahl der elastisch effektiven Verknüpfungspunkte ν berechnen. Die Tabelle 5 bis Tabelle 7 geben eine Übersicht über die verschiedenen Gelsysteme in Abhängigkeit von den eingesetzten Kalziumkonzentrationen.

Tabelle 5: Zahl der elastisch effektiven Ketten ν bei EPS Gelen.

Ca ²⁺ Konzentration	$\nu * 10^{17}$ [1/l]
1 mmol/l	1,5 ± 0,4
3 mmol/l	6,5 ± 3,1
5 mmol/l	15,7 ± 3,5
7 mmol/l	10,2 ± 8,7

Tabelle 6: Zahl der elastisch effektiven Ketten ν bei Natriumalginat Gelen.

Ca ²⁺ Konzentration	$\nu * 10^{17}$ [1/l]
1 mmol/l	0,1 ± 0,02
3 mmol/l	7,0 ± 1,4
5 mmol/l	80,7 ± 16,3
7 mmol/l	196,0 ± 39,2
10 mmol/l	183,0 ± 36,6

Tabelle 7: Zahl der elastisch effektiven Ketten ν bei Manucol Gelen.

Ca ²⁺ Konzentration	$\nu * 10^{17}$ [1/l]
7 mmol/l	13,6 ± 3,4
10 mmol/l	34,1 ± 6,5
14 mmol/l	73,1 ± 20,2
20 mmol/l	297,4 ± 10,5

Abb. 52 zeigt den Zusammenhang der Tabelle 4 bis Tabelle 7 grafisch. Dabei ist gut zu sehen, dass für die EPS und das Natriumalginat eine Sättigung erreicht wurde, für das Manucol bei den eingesetzten Kalziumkonzentrationen hingegen nicht.

In Abb. 53 ist das Produkt aus Deformation γ und Kreisfrequenz ω gegen die komplexe Viskosität $|\eta^*|$ für verschiedene Werte der Kreisfrequenz eines EPS/Ca Systems mit $c(\text{Ca}) = 1 \text{ mmol/l}$ aufgetragen. Man erkannte den für diese Auftragung typischen Verlauf der Kurven, bei denen die Nicht-LVE Bereiche eine Gerade mit negativer Steigung ergeben würde. Daraus ließe sich für andere ω -Werte eine Aussage zum Bereich des irreversiblen Strukturabbaus abschätzen.

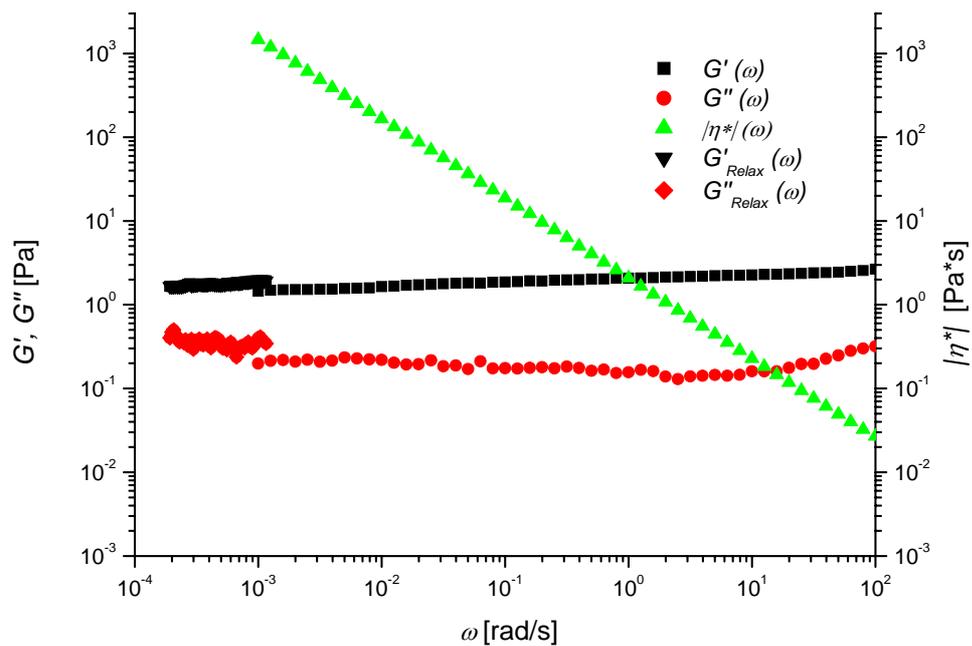


Abb. 50: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 10\%$) bei einem EPS/Ca Gel. $c(\text{Ca}^{2+}) = 7 \text{ mmol/l}$.

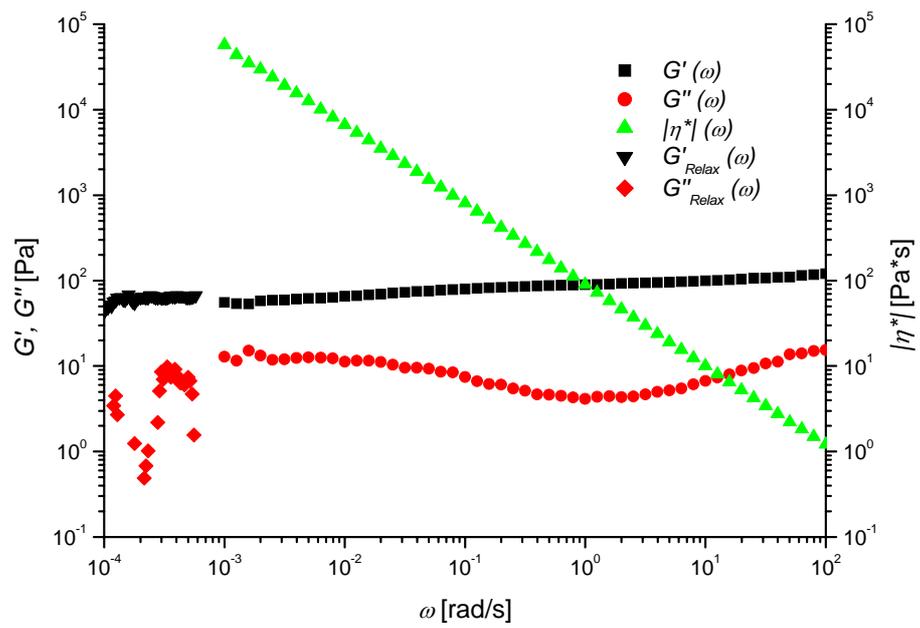


Abb. 51: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 2\%$) bei einem Natriumalginat/Ca Gel. $c(\text{Ca}^{2+}) = 7$ mmol/l.

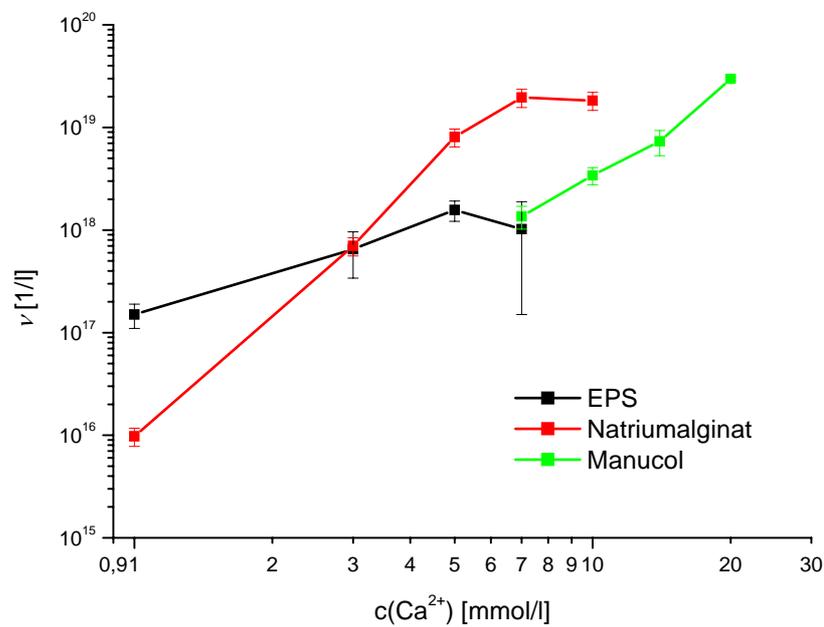


Abb. 52: Auftragung der Anzahl der elastisch effektiven Ketten ν gegen die Kalziumkonzentration für die untersuchten Gele.

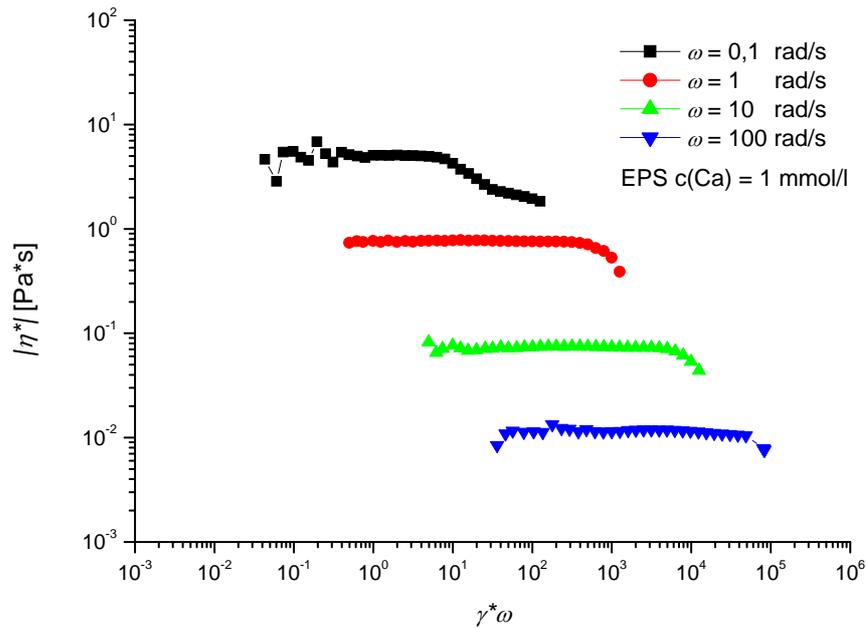


Abb. 53: Auftragung des Produktes aus Deformation γ und Kreisfrequenz ω gegen die komplexe Viskosität $|\eta^*|(\omega)$ für verschiedene Werte von ω .

Die Resultate der rheologischen Messungen an EPS Lösungen zeigten schwache elastische Effekte. Dieses Phänomen stammte u.a. von Entanglements der Alginatmoleküle ab, was durch die Cox-Merz Regel gezeigt wurde. Der temporäre Charakter des EPS Netzwerkes in Lösung resultierte ebenfalls in spezifischen Relaxationszeiten, die gemessen wurden. Die Netzwerkdichte konnte bestimmt werden und der Einfluss von Kalzium auf das System wurde untersucht. Eine zunehmende Anzahl an Kalziumionen resultierte in stärkerer Vernetzung durch Coulomb-Kräfte, und höheren Werten des Gleichgewichtsschermoduls.

Dynamische Messungen zeigten, dass die Verbindungspunkte eines solchen Systems im Zeitintervall zwischen 10 ms und mehreren Stunden nicht fluktuierten. Da keine Relaxationsprozesse im Gelzustand beobachtet werden konnten, schienen die Verbindungen stabil zu sein. Auch lag aus den gezeigten Messwerten die Vermutung nahe, dass es sich um „entrapped Entanglements“ handelte, also Verschlaufungen, deren Ketten durch Coulomb-Kräfte verknüpft waren, und die sich deshalb nicht öffnen konnten. Die

Mechanismen der Gelbildung schienen in allen untersuchten Alginaten ähnlich zu sein, obwohl ein genauer Vergleich trotz gleicher Viskosität der Ausgangslösungen, aufgrund der unterschiedlichen Molmasse und des unterschiedlichen Monomeraufbaus schwierig war. Dies zeigte auch der Verlauf der Anzahl der elastisch effektiven Ketten gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen. Jedes System verhielt sich hier anders, lediglich die grundlegende Vernetzung durch Entanglements und Coulomb-Kräfte war gleich.

Übertragen auf biologische Systeme in der Natur würden diese Messergebnisse bedeuten, dass eine höhere Kalziumkonzentration z.B. Bakterien im Netzwerk vollständig immobilisierten.

4.3 Gegenüberstellung EPS Lösung und Biofilmlösung

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde eine Lösung eines 24h alten Biofilms von *P. aeruginosa* SG81 entsprechend der Verdünnung einer EPS Lösung (1:16) angefertigt und rheologisch vermessen. Der Test sollte klären, inwieweit die Hauptkomponente Alginat für die rheologischen Eigenschaften verantwortlich war, und welchen Einfluss die weiteren Biofilmbestandteile für die strukturelle Stabilität hatten.

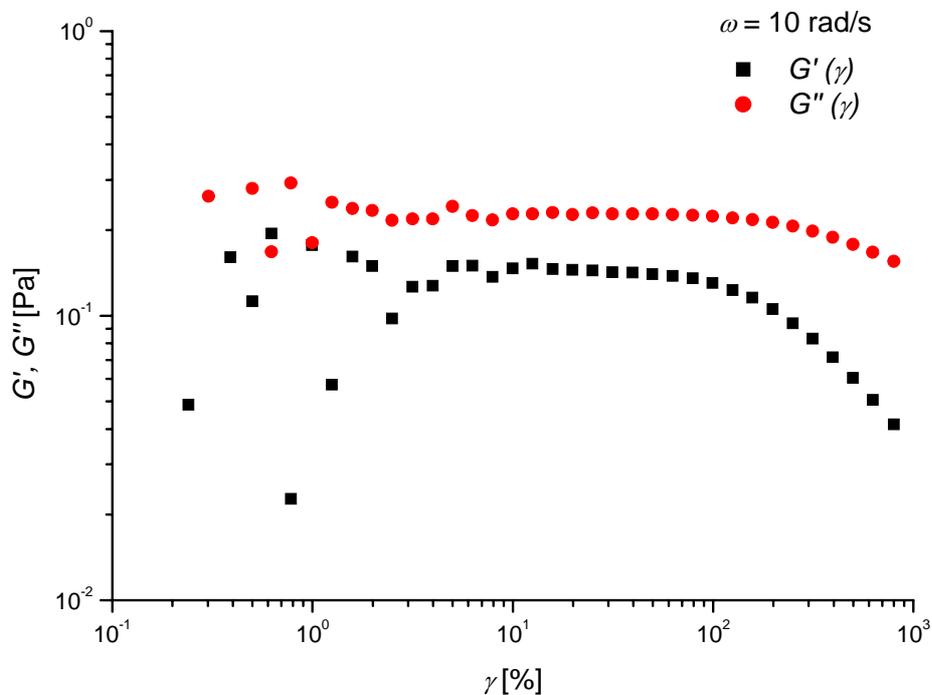


Abb. 54: Dynamische Eigenschaften von $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ ($\omega = 10$ rad/s), für eine Biofilmlösung von *P. aeruginosa* SG81.

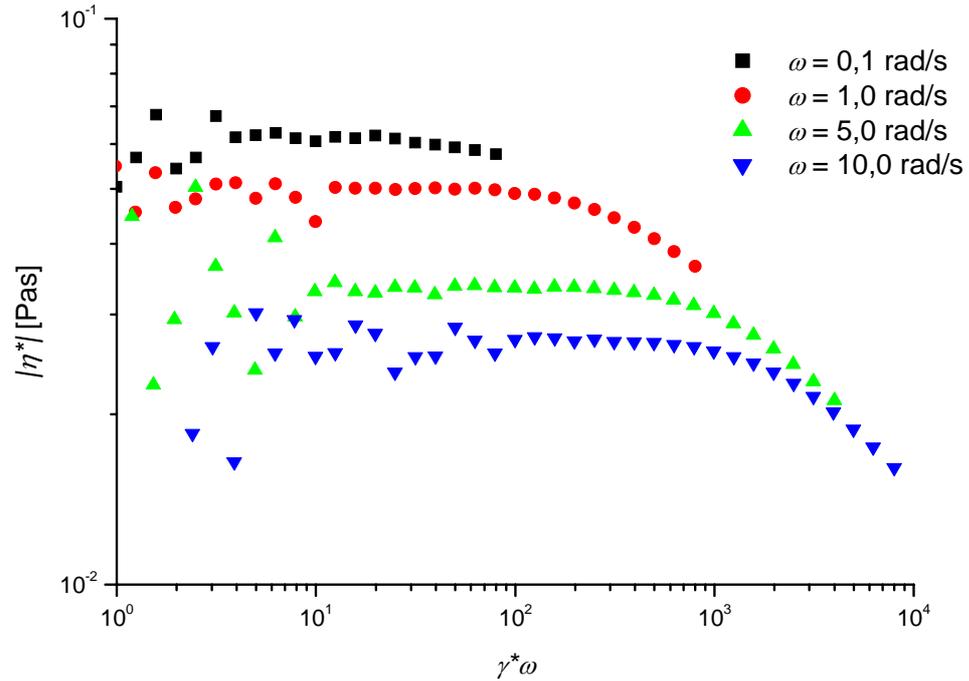


Abb. 55: Auftragung des Produktes aus Deformation γ und Kreisfrequenz ω gegen die komplexe Viskosität $|\eta^*|(\omega)$ für verschiedene Werte von ω , für eine Biofilmlösung von *P. aeruginosa* SG81.

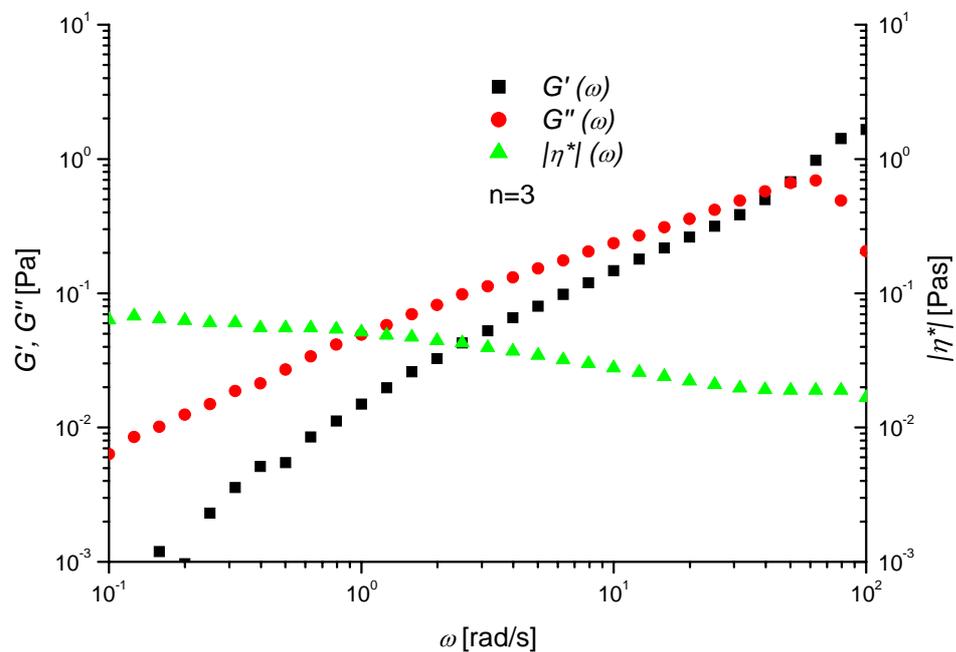


Abb. 56: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*|(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei einer Biofilmlösung von *P. aeruginosa* SG81.

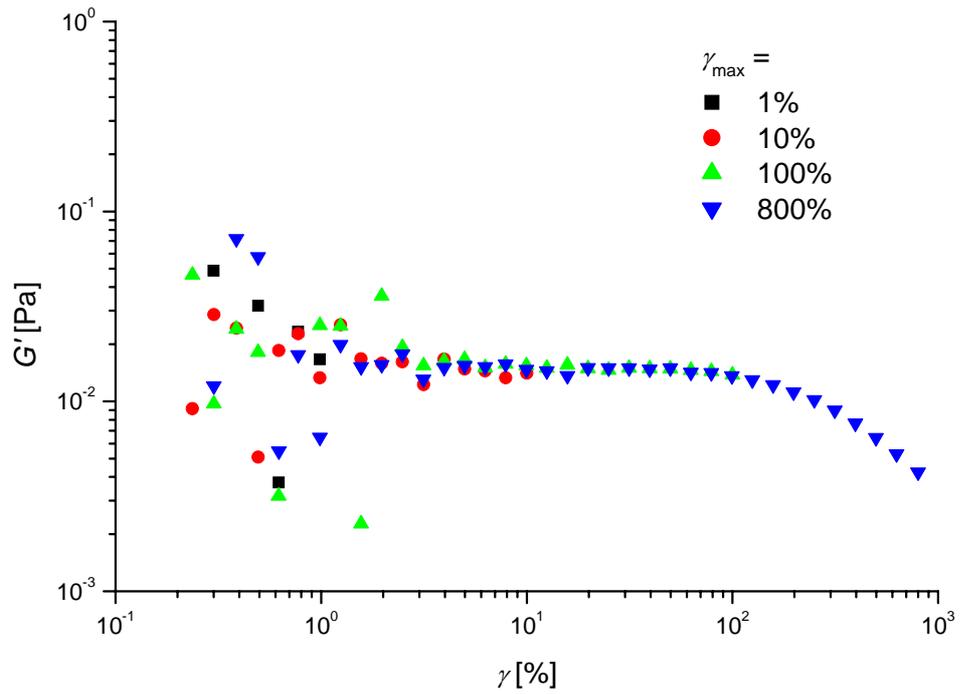


Abb. 57: Auftragung von $G'(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ für verschiedene Messungen mit unterschiedlichen γ_{max} .

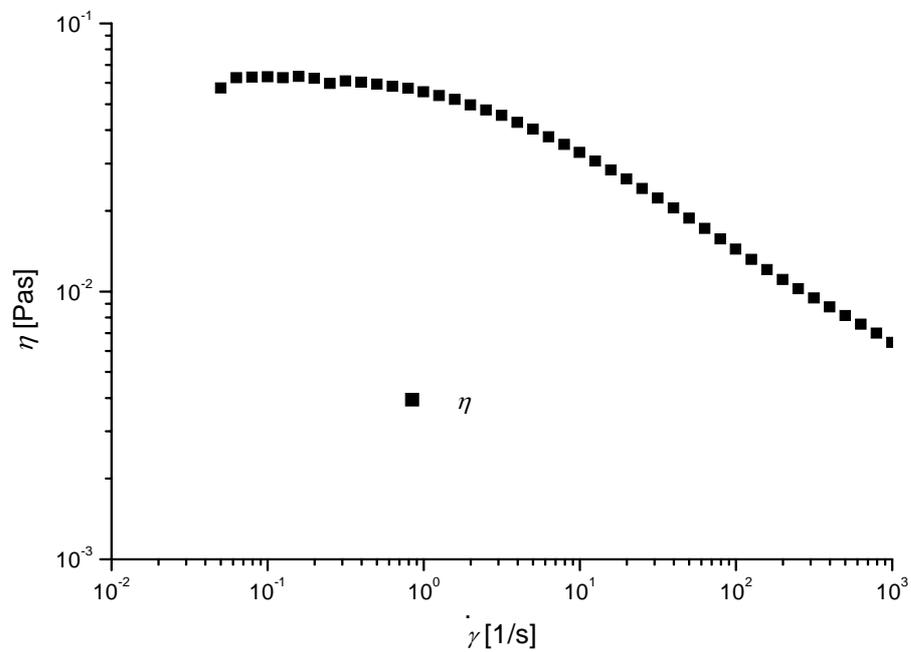


Abb. 58: Auftragung der Scherviskosität η gegen die Scherrate $\dot{\gamma}$ einer Biofilmlösung von *P. aeruginosa* SG81

Die Messungen der Biofilmlösung ergaben ein ähnliches Bild, wie bei den EPS-Lösungen. Das System zeigte strukturviskose Eigenschaften, mit einer Nullviskosität von ca. 0,064 Pas (Abb. 58) (EPS-Lösung: 0,067 Pas). Bei Deformationstests ließ es sich bis ca. 100 % deformieren, bevor ein Strukturabbau begann (Abb. 54). Das System besaß viskoelastische Eigenschaften mit überwiegend viskosen Anteilen. Frequenztests zeigten ein dynamisches Netzwerk, bei welchem erst bei hohen Frequenzen die elastischen Eigenschaften überwogen. Die Relaxationszeit für ein solches System lag im Mittel bei 0,020 s (EPS-Lösung: 0,017 s) (Abb. 56).

Der Vergleich zeigte, dass die Biofilmlösung sich fast identisch zur EPS-Lösung verhielt, die weiteren vorhandenen Bestandteile fast keinen Einfluss auf das rheologische Verhalten hatten, obwohl sie als Füllpartikel hätten wirken müssen, und die Daten von z.B. Speicher- und Verlustmodul somit etwas höhere Werte hätten besitzen müssen (Abb. 59). Nachteilig auf den Versuch wirkte sich sicherlich auch die unterschiedliche Grundsubstanz aus. Die Biofilmkulturen die den Ansätzen vorausgingen, lagen einen größeren Zeitraum auseinander. Zudem könnte die Verdünnung den Effekt kompensieren. Ein Aufkonzentrieren von EPS-Lösung auf Biofilmniveau erwies sich als technisch problematisch.

Der Vergleich zeigte jedoch, dass die EPS-Lösung und die daraus gewonnenen Werte durchaus das Verhältnis in einem (verdünnten) Biofilm widerspiegelte, und das Alginat als Hauptkomponente maßgeblich für die rheologischen Eigenschaften verantwortlich war.

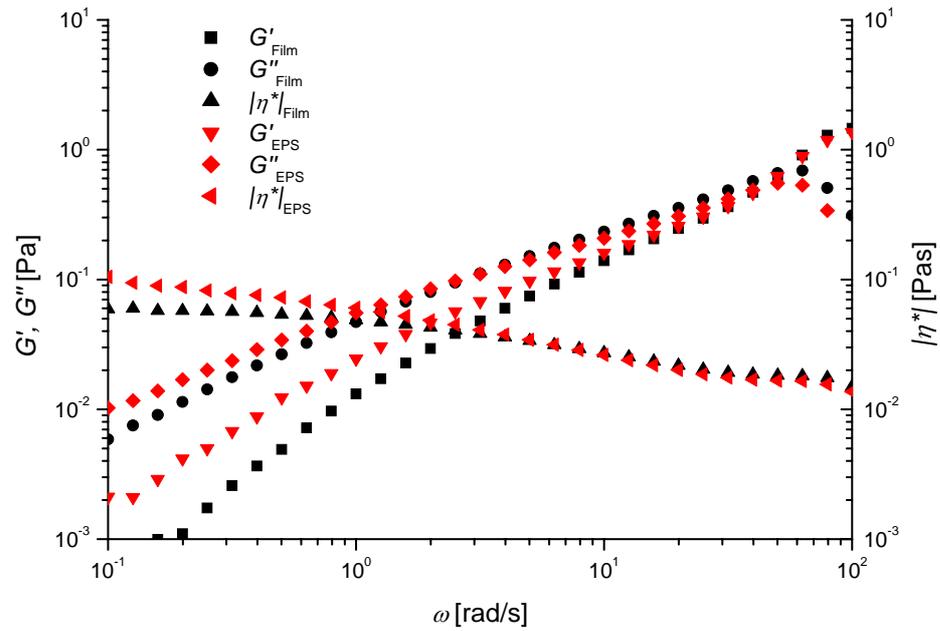


Abb. 59: Gegenüberstellung von Speichermodul $G'(\omega)$, Verlustmodul $G''(\omega)$ und komplexer Viskosität $|\eta^*|(\omega)$ als Funktion der Frequenz ω einer EPS Lösung und einer entsprechend aufbereiteten Biofilmlösung von *P. aeruginosa* SG81.

4.4 Voruntersuchungen – Biofilme mit und ohne Filter

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Biofilme sowohl auf der Agaroberfläche direkt, als auch auf Celluloseacetatfiltern angezchtet (s. Kapitel 3.1.3). In einer Messreihe sollte geklärt werden, ob der Filter Unterschiede in den Ergebnissen bedingt, oder ob die Methode der Anzucht auf Filtern die strukturelle Einheit des Biofilms bewahrt. Es zeigte sich, dass der Filter keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte hatte. Die erhaltenen Kurven zeigten dieselben Tendenzen. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurden die Biofilme dann auf Filtern angezchtet und untersucht. Unterschiede in den einzelnen Messungen waren biologisch bedingt, was sich auch in leichten Differenzen derselben Methode widerspiegelte. Diese Variationen wurden genutzt um Mittelwerte und Abweichungen zu bestimmen.

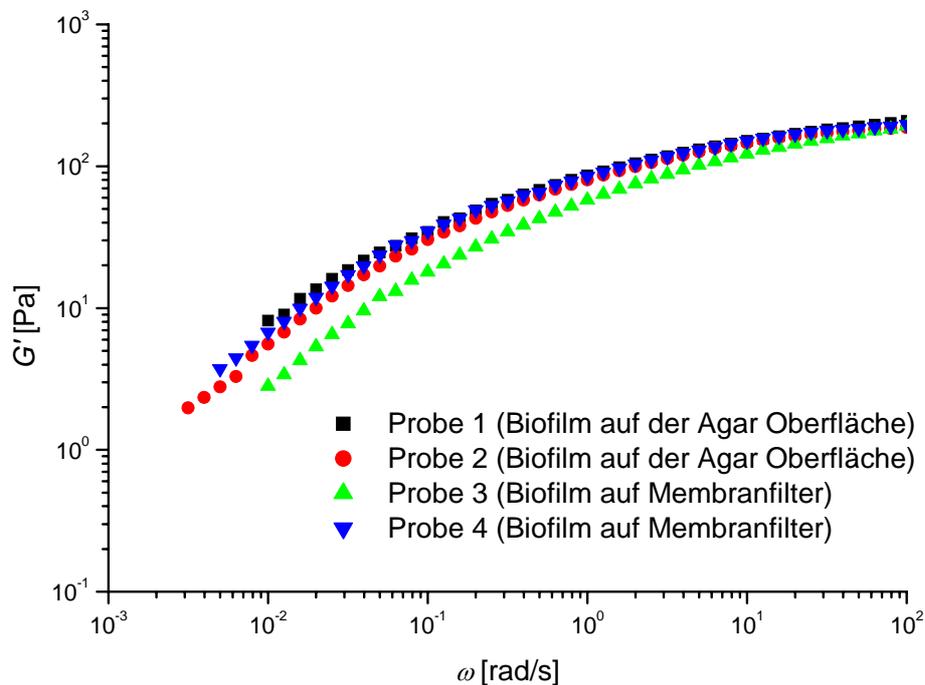


Abb. 60: Auftragung des Speichermoduls $G'(\omega)$ gegen die Kreisfrequenz ω für vier verschiedene 24h alte Biofilme, zwei direkt auf Agar angezchtet und zwei auf Membranfiltern.

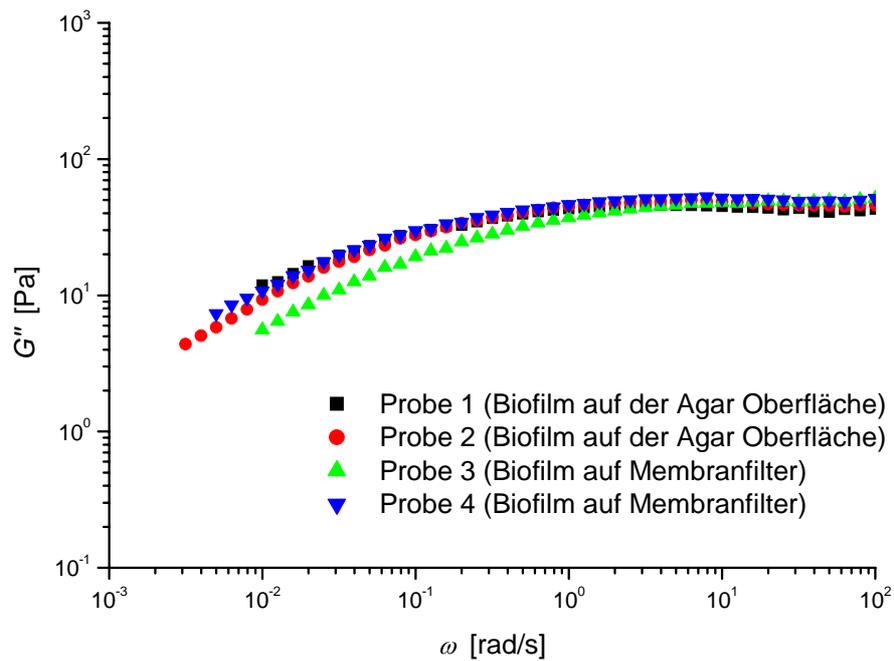


Abb. 61: Auftragung des Verlustmoduls $G''(\omega)$ gegen die Kreisfrequenz ω für vier verschiedene 24h alte Biofilme, zwei direkt auf Agar angezchtet und zwei auf Membranfiltern.

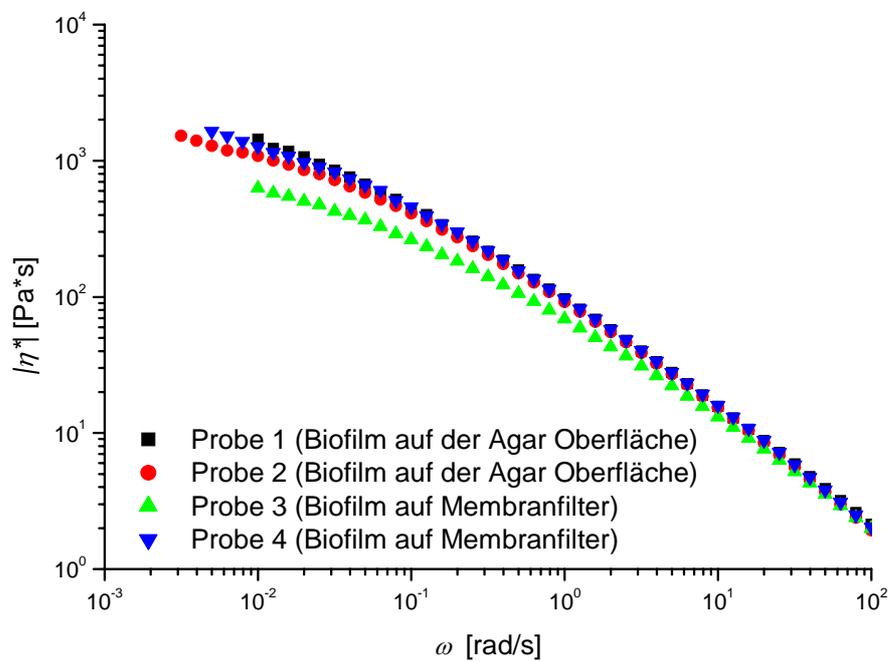


Abb. 62: Auftragung der komplexen Viskosität $|\eta^*(\omega)|$ gegen die Kreisfrequenz ω für vier verschiedene 24h alte Biofilme, zwei direkt auf Agar angezchtet und zwei auf Membranfiltern.

4.5 Voruntersuchungen – Einfluss der Messgeometrie

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde auch ein Vergleich des Einflusses der Messgeometrie auf den Kurvenverlauf der Ergebnisse untersucht. Aufgrund des Viskositätsbereiches der Biofilmproben und der Aufzucht der Filme auf Membranfiltern, sowie der Probenmenge, kamen nur Kegel-Platte (KP) und Platte-Platte (PP) Geometrien für die Messungen in Frage. Beim PP System ist die Scherrate nicht konstant, sie ist abhängig vom Abstand r von der Drehachse. Die Scherrate hängt ebenfalls vom Abstand der beiden Platten ab. Bei größeren Spaltabständen kann es zu inhomogenem Scherverhalten kommen. Bei nichtidealviskosen oder idealelastischen Substanzen kann der unkonstante Schergradient das Messergebnis verfälschen, diese Gefahr kann nur bei kleinen Deformationen im LVE Bereich vernachlässigt werden. Diese Einschränkungen gelten für KP Systeme nicht, hier ist u.a. die Partikelgröße der limitierende Faktor, da hier im Messspalt das freie Volumen zwischen den Partikeln eingeschränkt wäre und dies somit zu gestörtem Fließverhalten führen würde. Als Obergrenze der Partikelgröße kann ca. 50 μm gelten (Mezger & Zorll 2002).

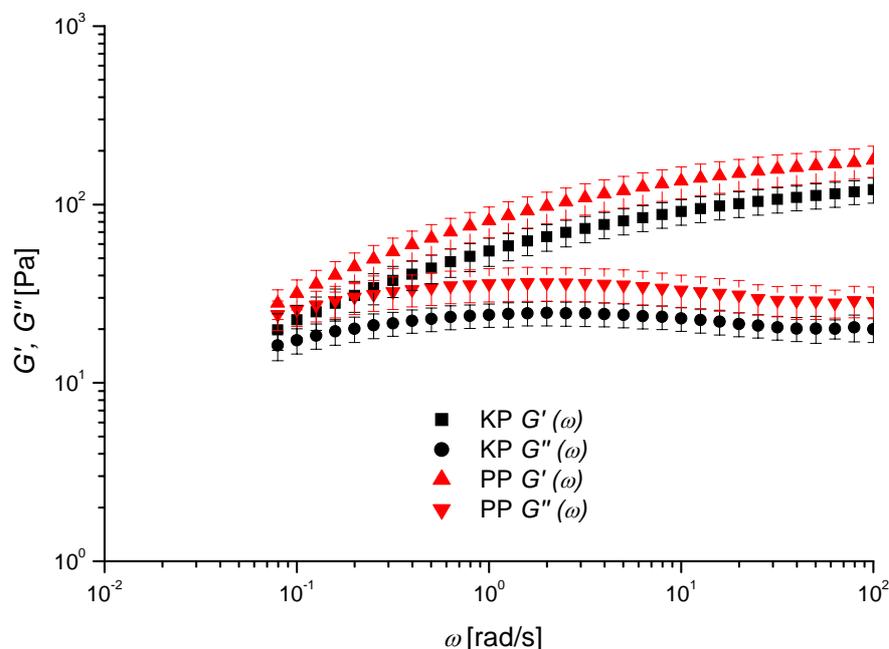


Abb. 63: Frequenztest eines Biofilms mit Platte-Platte (PP) und Kegel-Platte (KP) System.

Da solche Partikelgrößen im Biofilm nicht erreicht wurden, war hierfür das KP System ebenfalls einsetzbar. Ein Frequenztest mit 8 unterschiedlichen Messungen sowohl mit Konus-Platte, als auch mit Platte-Platte verdeutlichte dies (Abb. 63.). Der Verlauf der Kurven war weitgehend identisch. Für eine genauere Untersuchung hätten die mit Platte-Platte gemessenen Werte noch durch eine Weißenberg-Rabinowitch Korrektur ergänzt werden müssen. Die gemessenen Kurven würden dadurch enger beieinander liegen. Die vorgenommene Abschätzung zeigte allerdings schon, dass die Geometriewahl bei den durchgeführten Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss hatte.

4.6 Voruntersuchungen – andere Einflussgrößen

Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurden ebenfalls andere Einflussgrößen untersucht. So stellte sich die Frage der Alterung, bzw. des Wasserverlustes durch Verdunstung des Biofilms bei Messungen über einen längeren Zeitraum. Einige Biofilmproben wurden deswegen mit Parafin überschichtet, um Verdunstung auszuschließen. Es zeigte sich jedoch, dass im untersuchten Zeitbereich keine Unterschiede zur Messung mit einem mechanischen Verdunstungsschutz (Abdeckung, dessen Innenseite mit feuchtem Fliess bedeckt war) auftraten. Im weiteren Verlauf der Messungen wurde somit nur die Abdeckung als Feuchtigkeitsfalle verwendet.

Zu Frage der Haftung der Biofilmproben in der Messzelle wurden ebenfalls Untersuchungen durchgeführt. Die Filter sowie die Messgeometrie wurden markiert, um somit Fehler durch eine ungewollte Positionsverschiebung auszuschließen. Wo nötig wurden zusätzliche Klebepunkte aus neutral vernetzendem Silikon angebracht, die keinen Einfluss auf die Messwerte zeigten, und den Filter fest auf der Position fixierten. Mit den so ermittelten Messverfahren wurden dann die eigentlichen Untersuchungen mit nativen Biofilmen durchgeführt.

4.7 Untersuchungen an *P. aeruginosa* SG81

4.7.1 Amplitudentests

Zur Bestimmung des LVE Bereiches der untersuchten Proben von *P. aeruginosa* SG81 wurden zuerst Amplitudentests durchgeführt. Hierzu wurde die Schubspannung, bzw. das Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Amplitude gemessen. Einen typischen Verlauf für einen 24 Stunden alten Biofilm auf einer Celluloseacetatmembran zeigt Abb. 64. Man erkannte, dass das System bis zu ca. 70 % deformiert werden konnte, bevor nicht-lineare Effekte auftraten.

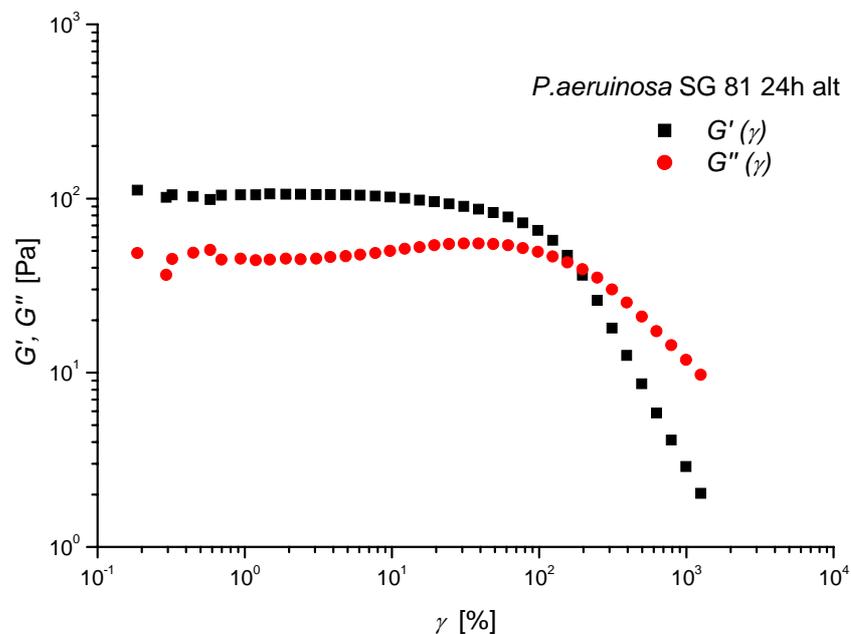


Abb. 64: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für einen 24h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81, $\omega = 1$ rad/s, $T = 22^\circ\text{C}$.

Die elastischen Eigenschaften, repräsentiert durch das Speichermodul G' , überwogen in dem vorliegenden System die viskosen Anteile, die durch das Verlustmodul G'' dargestellt werden. Ein interessanter Zusammenhang fiel auf, wenn man sich den Amplitudentest von älteren Biofilmen (z.B. 48h) ansah (Abb. 65).

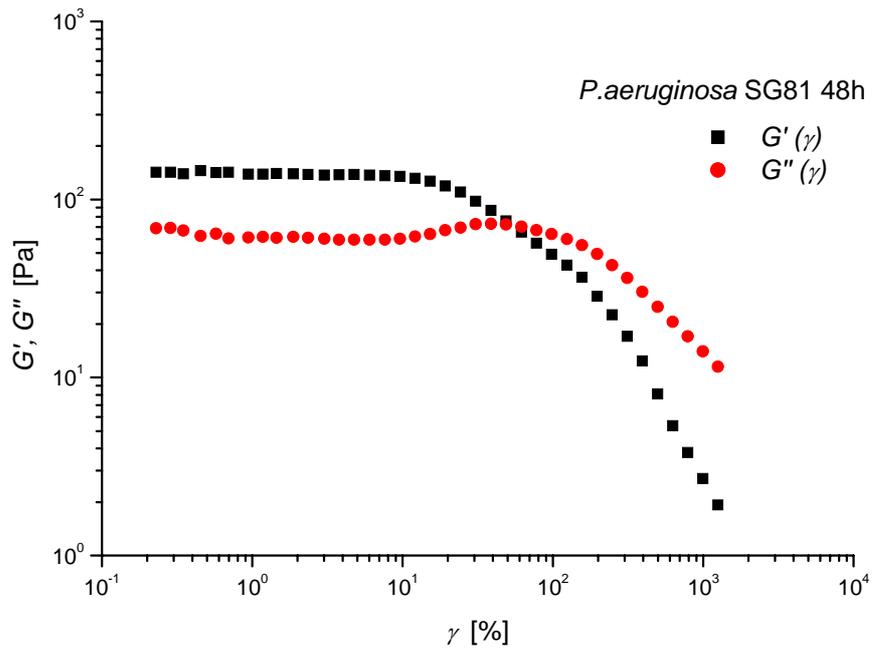


Abb. 65: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für einen 48h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81, $\omega = 1$ rad/s, $T = 21$ °C.

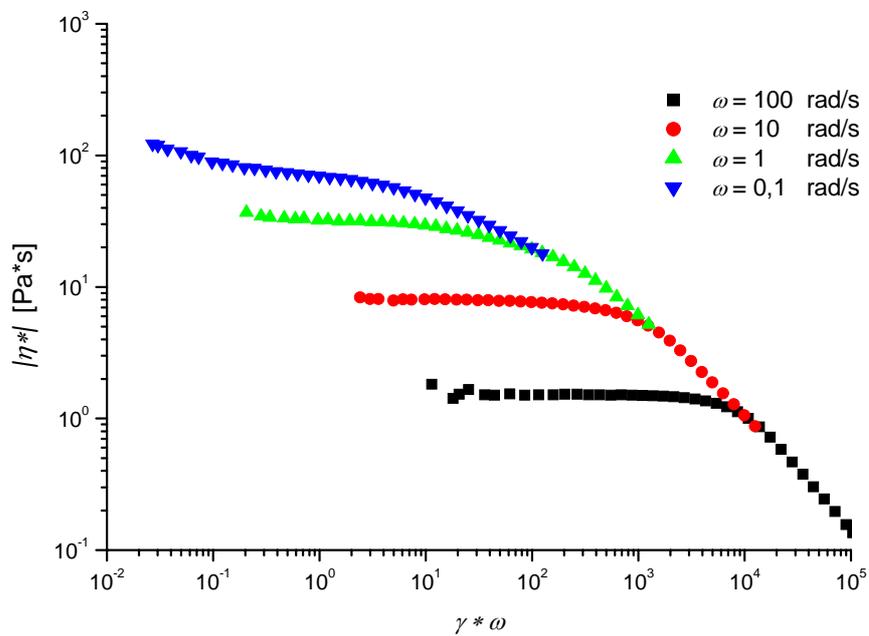


Abb. 66: Auftragung des Produktes aus Deformation γ und Kreisfrequenz ω gegen die komplexe Viskosität $|\eta^*(\omega)|$ für verschiedene Werte von ω für 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* SG81.

Ältere Biofilme konnten nur noch bis ca. 20 % deformiert werden, bevor der Bereich des Strukturabbaus begann. Dieser Alterungseffekt wurde auch bei anderen Messungen beobachtet. Eine mögliche Erklärung war der Verlust von Wasser im Biofilm, während der längeren Wachstumszeit im Brutschrank. Die kompaktere und festere Struktur hätte somit andere Messergebnisse geliefert. Eine weitere Erklärung war ein leicht veränderter Aufbau des Biofilms mit einer höheren Vernetzungszahl, einer höheren Anzahl an Bakterien und weiteren Makromolekülen, die eine Änderung bedingten. Die Vermutung lag nahe, dass es sich um eine Kombination dieser Möglichkeiten handelte, dies aber mit rheologischen Methoden allein soweit nicht beantwortbar war.

Abb. 66. zeigt den Zusammenhang zwischen komplexer Viskosität und dem Produkt aus Deformation und Kreisfrequenz für verschiedene Werte der Deformation. Man erkannte ein Zusammenlaufen der Kurvenabschnitte die den nichtlinearen Bereich kennzeichnen, analog den untersuchten Proben der EPS- und Alginategele.

4.7.2 Zeittests

Der Alterungseffekt zeigte sich auch in durchgeführten Zeittests, bei dem ein Biofilm angefangen bei einem Alter von 24 Stunden über mehrere Stunden hinweg vermessen wurde. Die verwendete Feuchtigkeitsfalle hat dem Wasserverlust entgegengewirkt, und trotz der Abwesenheit des Nährmediums hat in den Stunden während der Messung eine Veränderung des Biofilms stattgefunden, wie der leichte Anstieg von Speicher- und Verlustmodul zeigte. Auch hier war ersichtlich, dass das System viskoelastische Eigenschaften besaß, wobei die elastischen Anteile überwogen. Der Anstieg von G' und G'' während des Zeittest erfolgte für beide Anteile nahezu im gleichen Maße.

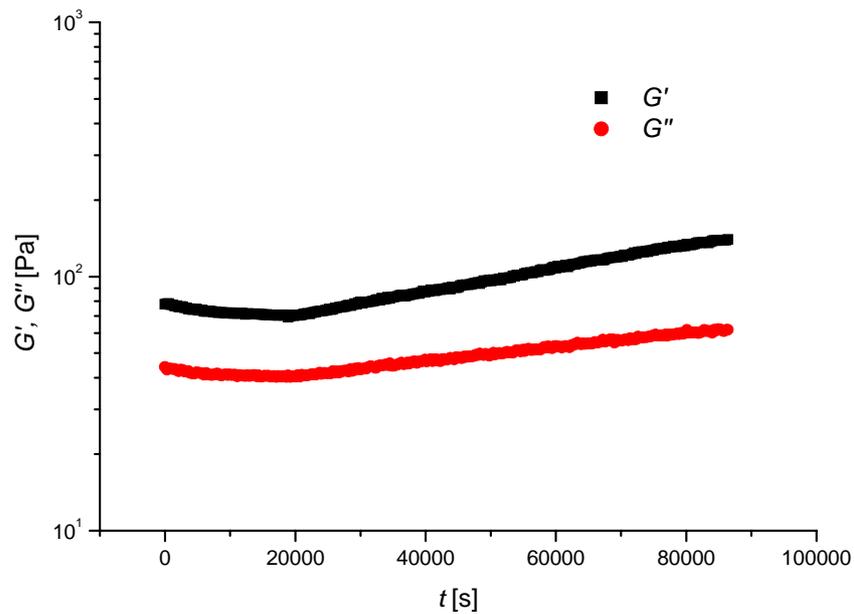


Abb. 67: G' und G'' als Funktion der Zeit t bei einer Kreisfrequenz $\omega = 1$ rad/s und einer Amplitude γ von 1 % für ein 24h alten Biofilm von *P. aeruginosa* SG81.

4.7.3 Frequenztests

Durchgeführte Frequenztests nativer Kulturen des Stammes *P. aeruginosa* SG81 zeigten ein dynamisches viskoelastisches Fließverhalten. Bei kleinen Frequenzen (Langzeitbeanspruchung) dominierten die viskosen Eigenschaften. Das Kurzzeitverhalten hingegen war durch elastische Eigenschaften geprägt. Der Kurvenverlauf entsprach dem verallgemeinerten Maxwell-Modell (Mezger & Zorll 2002), wobei die Spannungsrelaxation aufgrund von dissipativem Fließen des Dämpfungsteils des Maxwell Modells erfolgte, sobald die angelegten Kreisfrequenzen kleiner wurden. Ähnliche Kurvenverläufe von Frequenztests wurden so auch in einer neueren Arbeit für Stämme des Bakteriums *Streptococcus mutans* gefunden (Vinogradov A.M. et al. 2004). Der Schnittpunkt der beiden Modulkurven kennzeichnete die Relaxationszeit, d.h. die Lebensdauer der Netzwerkpunkte. Hierfür wurden gemittelte Werte von 16 ± 10 Sekunden

gemessen. Wenn die mittlere Lebenszeit der Verknüpfungen kleiner als die Beobachtungszeit war, entstanden zahlreiche Kettenöffnungen und erneute Verknüpfungen. Die angelegte Schubspannung relaxierte dabei durch chemische Prozesse. Bei kurzen Beobachtungsperioden, ohne das Auftreten von Fluktuationen, erhielt man das Verhalten eines permanent verknüpften Netzwerkes. Unter diesen Bedingungen erreichte das Speichermodul ein Plateaubereich. Die gefundenen G_0 Werte lagen zwischen 210 und 405 Pa (Tabelle 8). Aus diesen Werten war ebenfalls analog den EPS- und Alginat-Untersuchungen die Anzahl der elastisch effektiven Verknüpfungspunkte zugänglich (Tabelle 8).

Ein berechnetes Relaxationszeitspektrum zeigte multiexponentielles Relaxationsverhalten (Abb. 72). Bei dieser Methode erhielt man Relaxationszeiten zwischen 0,06 und 30 Sekunden. Der Verlauf des Spektrum entspricht schwach vernetzten Systemen (Ferry 1980). Die ermittelten Werte stimmten gut mit Größen überein, die für ähnliche Typen von Biofilmen veröffentlicht wurden (Klapper et al. 2002).

Interpretiert man die gefundenen Werte nicht als biologische Streuung innerhalb einer Messreihe, sondern als eine Altersabhängigkeit, ergibt sich der in Tabelle 8 dargestellte Zusammenhang.

Tabelle 8: Aus Frequenztests ermittelte Werte für *P. aeruginosa* SG81.

Biofilmalter [h]	Relaxationszeit λ [s]	G_0 -Wert [Pa]	$\nu \cdot 10^{19}$ [1/l]
24	16 ± 10	210 ± 35	$5,2 \pm 0,8$
48	51 ± 6	340 ± 40	$8,3 \pm 1,0$
72	49 ± 5	405 ± 10	$9,9 \pm 0,3$

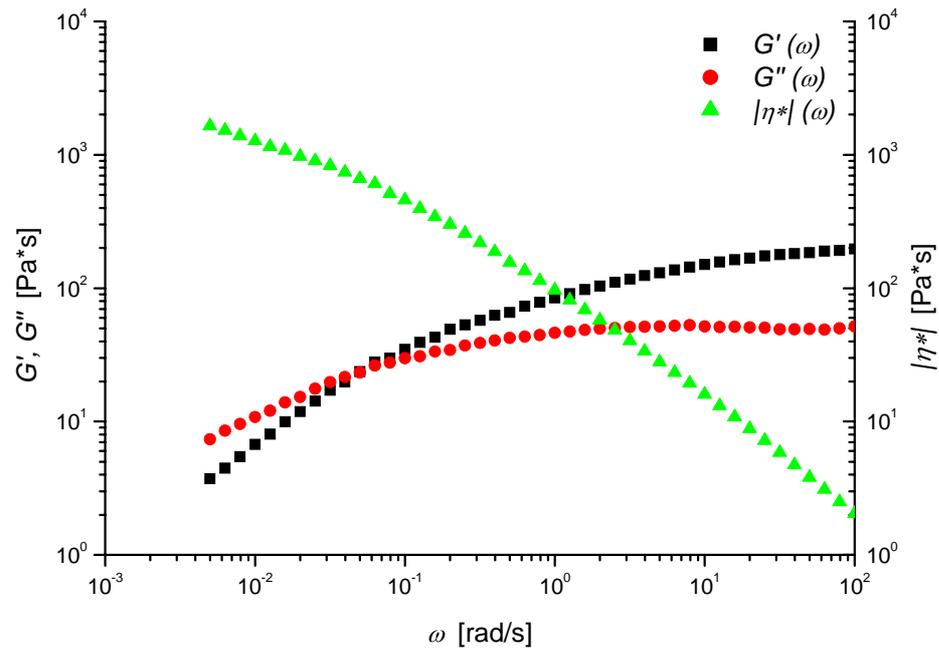


Abb. 68: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1$ %) eines 24h alten Biofilms.

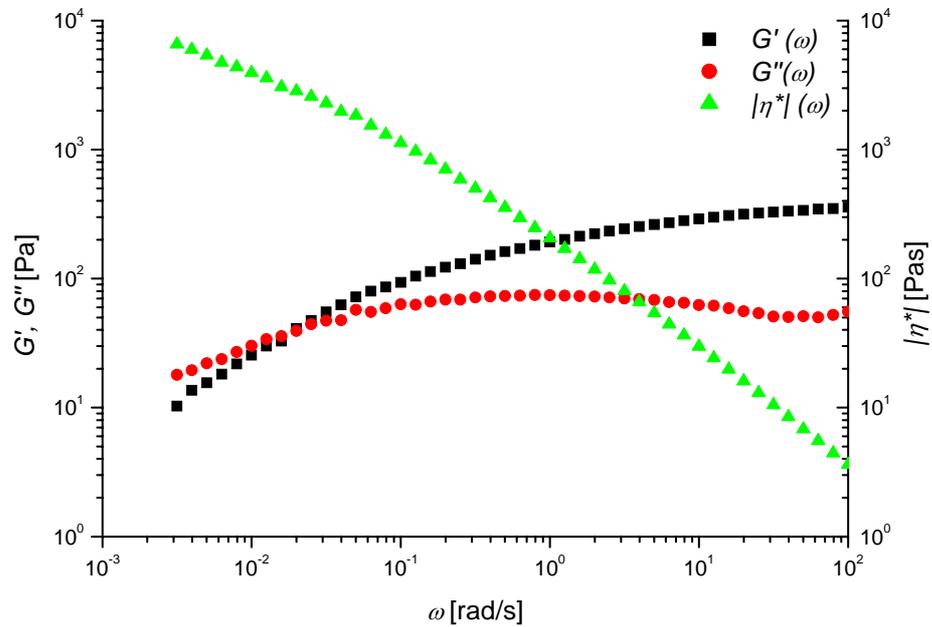


Abb. 69: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1$ %) eines 48h alten Biofilms.

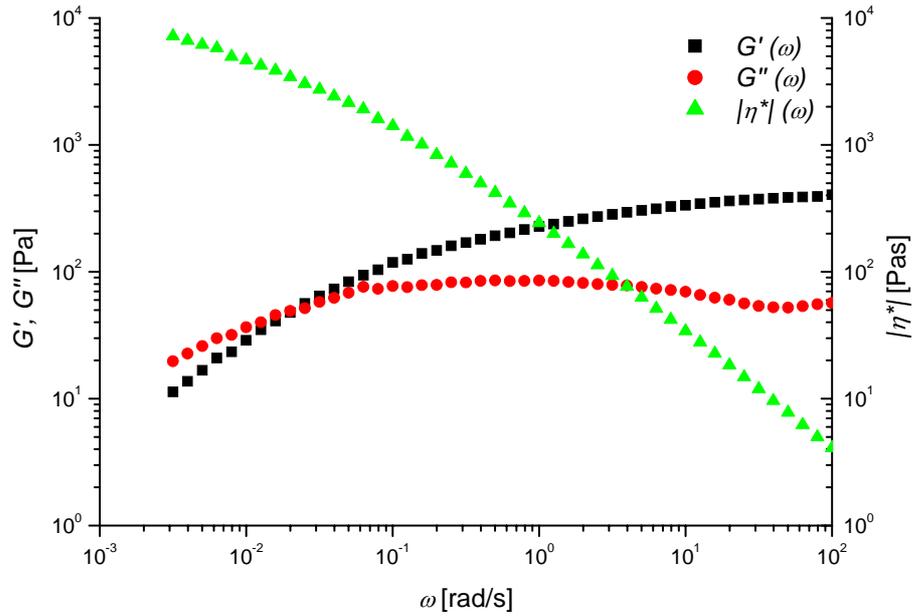


Abb. 70: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1$ %) eines 72h alten Biofilms.

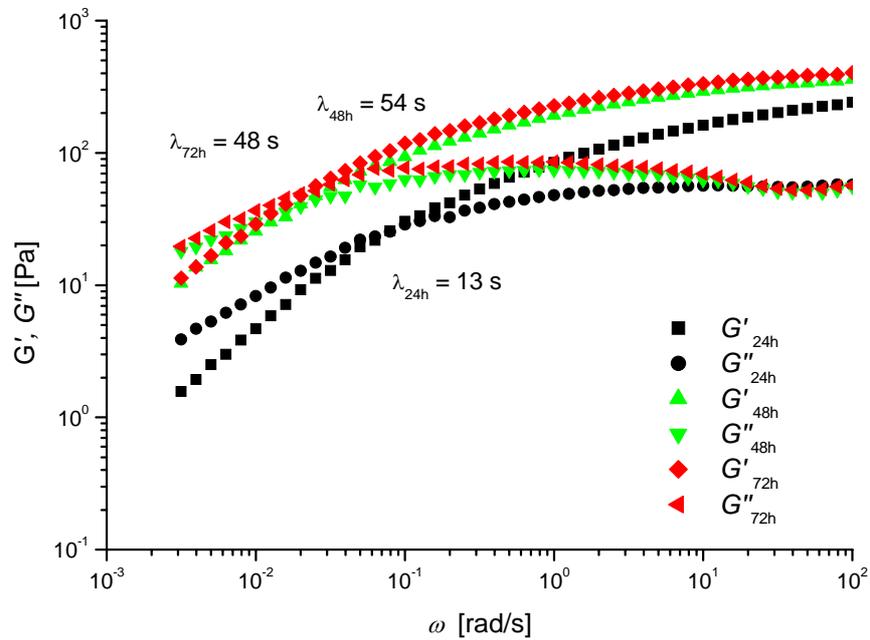


Abb. 71: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1$ %) beispielhaft für unterschiedlich alte Biofilme von *P. aeruginosa* SG81.

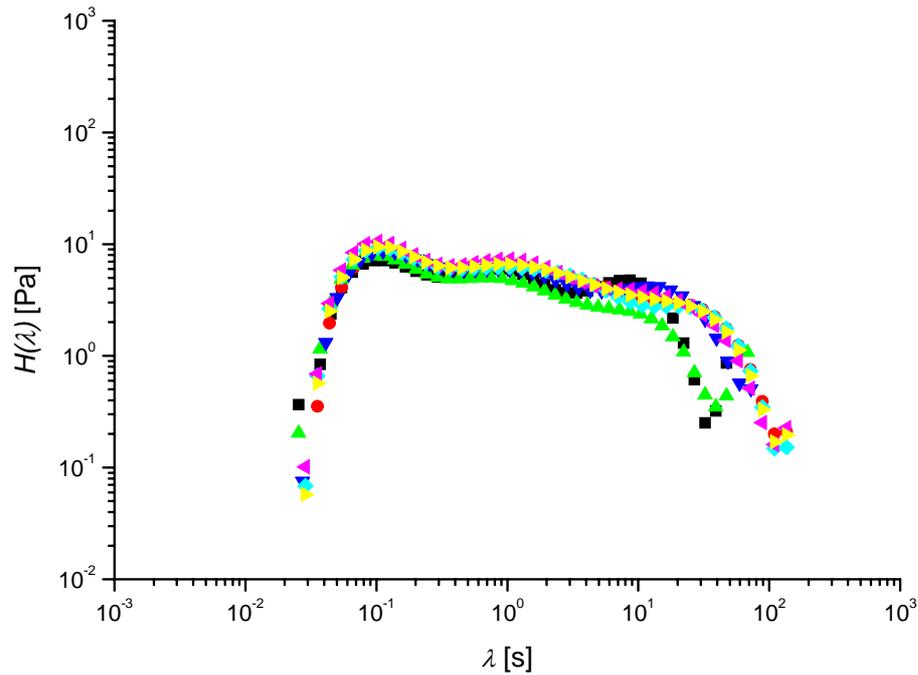


Abb. 72: Das Relaxationszeitspektrum $H(\lambda)$ für sechs verschiedene 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* SG81.

4.7.4 Weitere Untersuchungen

Analog den Untersuchungen an EPS Lösungen, handelte es sich bei der vorliegenden Struktur um ein dynamisches Netzwerk, was vornehmlich aus Verschlaufungen („Entanglements“) der Alginatmoleküle als Hauptbestandteil gebildet wurde. Dies konnte auch durch die Cox-Merz Regel gezeigt werden, die bei physikalischen Wechselwirkungen zutrifft. Wie man beispielhaft an Abb. 73 sieht, entsprach der Verlauf der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ der Scherviskosität η für gleiche Werte der Kreisfrequenz ω und Scherrate $\dot{\gamma}$. Die Bindungsmechanismen der Ketten konnten während der Scherbelastung beim Rotationsversuch aufbrechen, sie waren jedoch im LVE Bereich der sinusförmigen Deformation bei kleinen Amplituden intakt. Die Werte der komplexen Viskosität wurden dabei durch die schwachen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen beeinflusst, was zu etwas höheren Werten von $|\eta^*|$ führte.

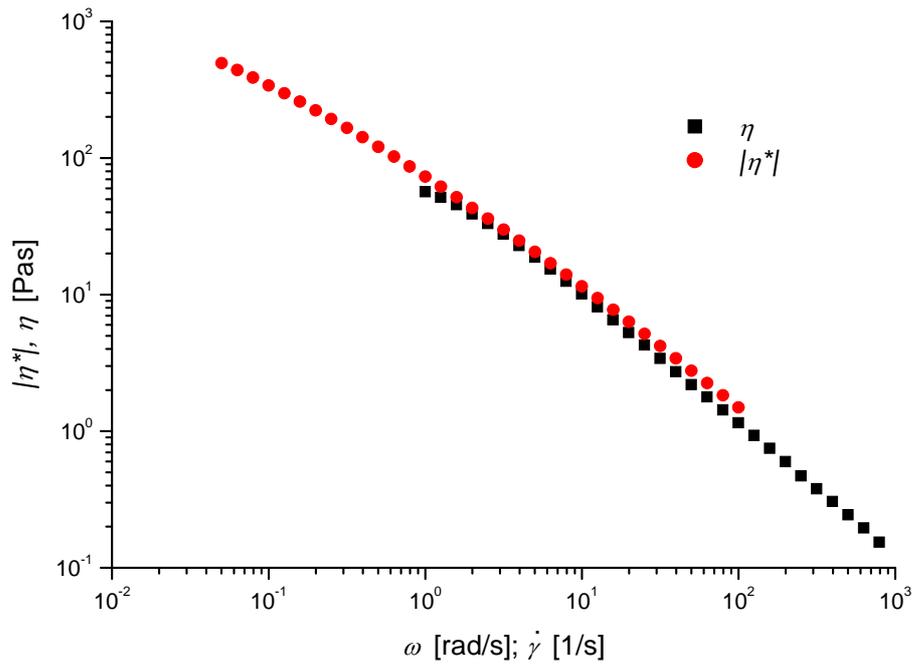


Abb. 73: Vergleich der Scherviskosität $\eta(\dot{\gamma})$ und der komplexen Viskosität $|\eta^*(\omega)$ bei gleichen Werten von Kreisfrequenz ω und Scherrate $\dot{\gamma}$ für einen 24h alten Biofilm.

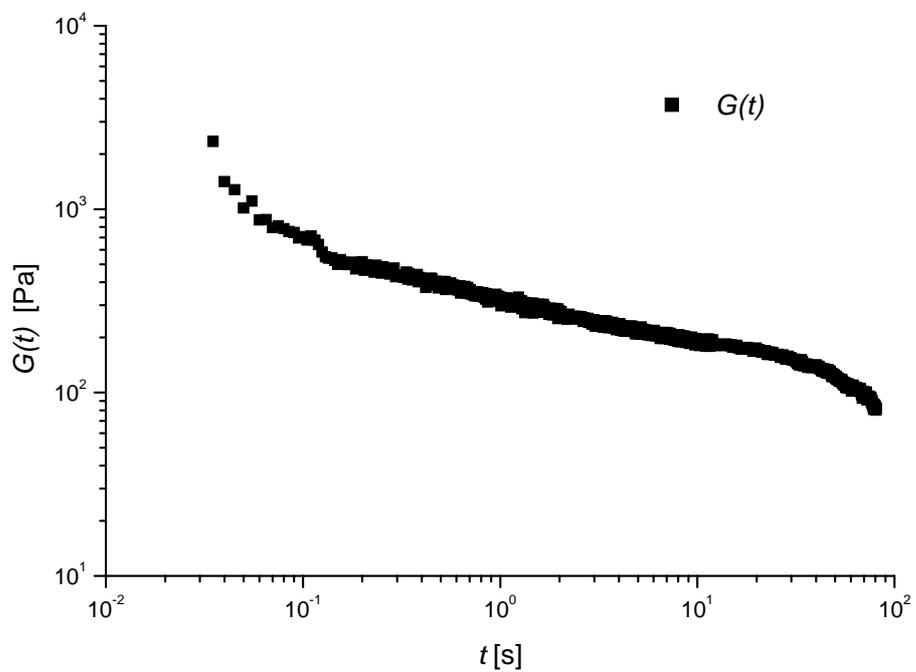


Abb. 74: Auftragung von $G(t)$ gegen t für einen Biofilm von *P. aeruginosa* SG81.

Die Daten eines Relaxationsversuches sind in Abb. 74 grafisch dargestellt. Das Relaxationsmodul $G(t)$ ist doppeltlogarithmisch gegen die Zeit t aufgetragen. Die durch den γ -Sprung resultierenden inneren Spannungen des Biofilms ließen sich als Schubspannung τ messen. Über die Definition von $G(t) = \tau(t)/\gamma_0$ erkannte man, wie die inneren Spannungen abgebaut wurden, was sich als abnehmende Kurvensteigung bemerkbar machte. Solange sich der τ -Wert und damit auch $G(t)$ änderte, bestand ein instationärer Fließzustand der Probe.

Abb. 75 zeigt einen mit dem Programm IRIS berechneten Fit ans allgemeine Maxwell Modell der Kurven aus einem Frequenztest. Eine Übereinstimmung wird bei 8 unterschiedlichen Relaxationszeiten als Rechenparameter erreicht.

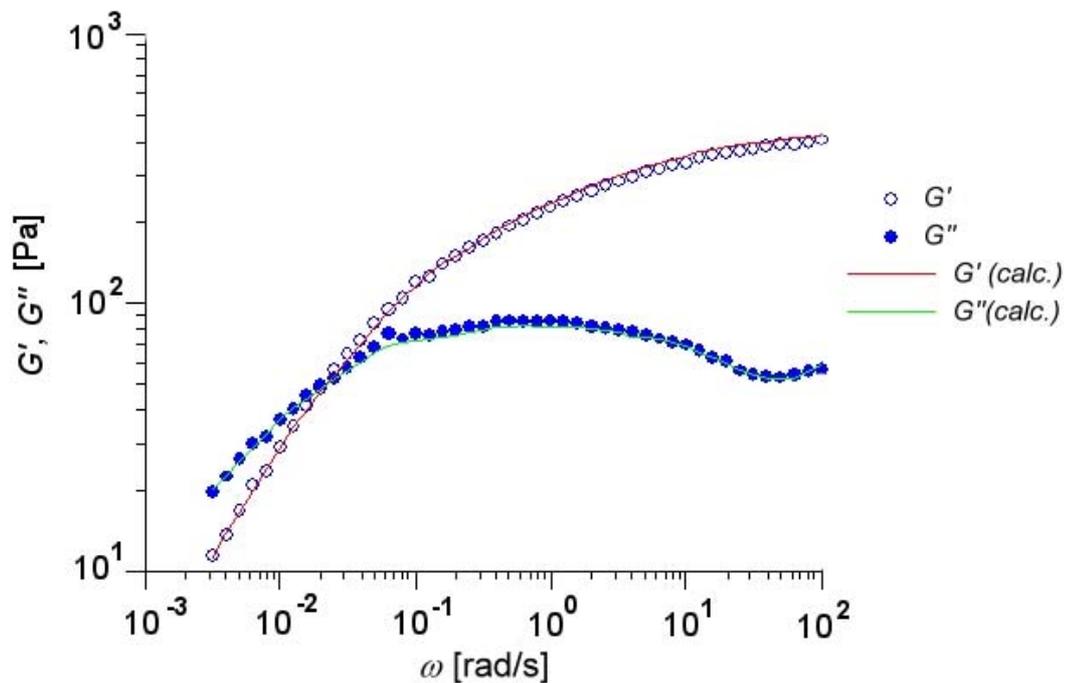


Abb. 75: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) eines 72h alten Biofilms von *P. aeruginosa* SG81. Die durchgezogenen Linien stellen einen Fit ans allgemeine Maxwell Modell mit 8 Relaxationszeiten dar. Berechnet mit dem Programm IRIS.

4.7.5 Der Einfluss von zweiwertigen Ionen auf *P. aeruginosa* SG81

4.7.5.1 Kalzium

Im Rahmen der Untersuchungen wurde der Einfluss der zweiwertigen Ionen von Kalzium, Magnesium und Mangan auf das rheologische Verhalten der Biofilme untersucht. Die Ionen wurden dabei, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, beim Aufwachsen des Films dem Nährmedium hinzugefügt. Abhängig von der Konzentration der im Nährmedium vorhandenen Ionen zeigten sich starke Unterschiede zum Biofilm ohne Ionenzugabe.

Die ins System eingebrachten Coulomb-Wechselwirkungen hatten z.B. bei Deformationstests zur Folge, dass der Strukturabbau infolge der erhöhten Zahl an Vernetzungspunkten bei niedrigeren Deformationen begann. Es zeigte sich jedoch, dass eine Steigerung z.B. der Kalziumionenkonzentration keine weitere signifikante Effektzunahme mehr bewirkte. Für Kalziumionen bei gleichaltrigen Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 zeigen die Abb. 76 bis Abb. 78 diesen Sachverhalt.

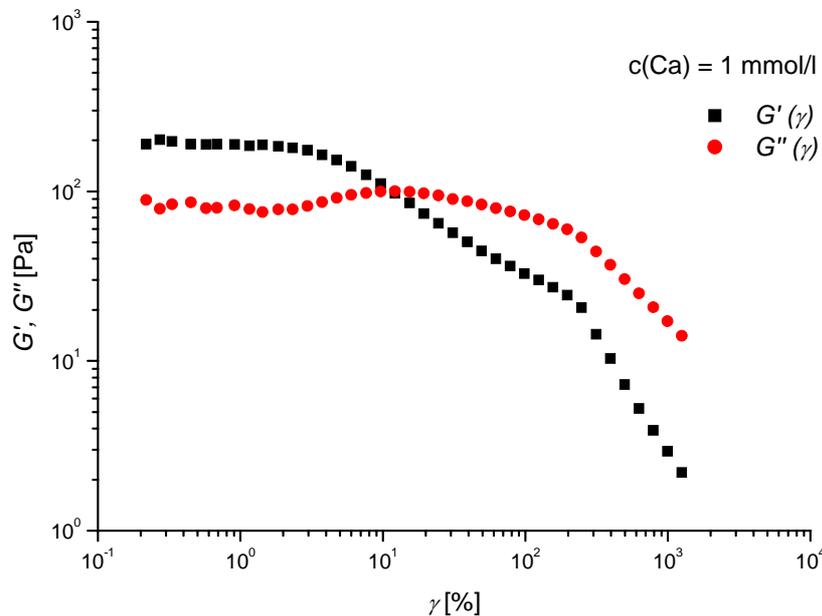


Abb. 76: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1 \text{ rad/s}$ und $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 1 \text{ mmol/l}$. Biofilmalter 48h.

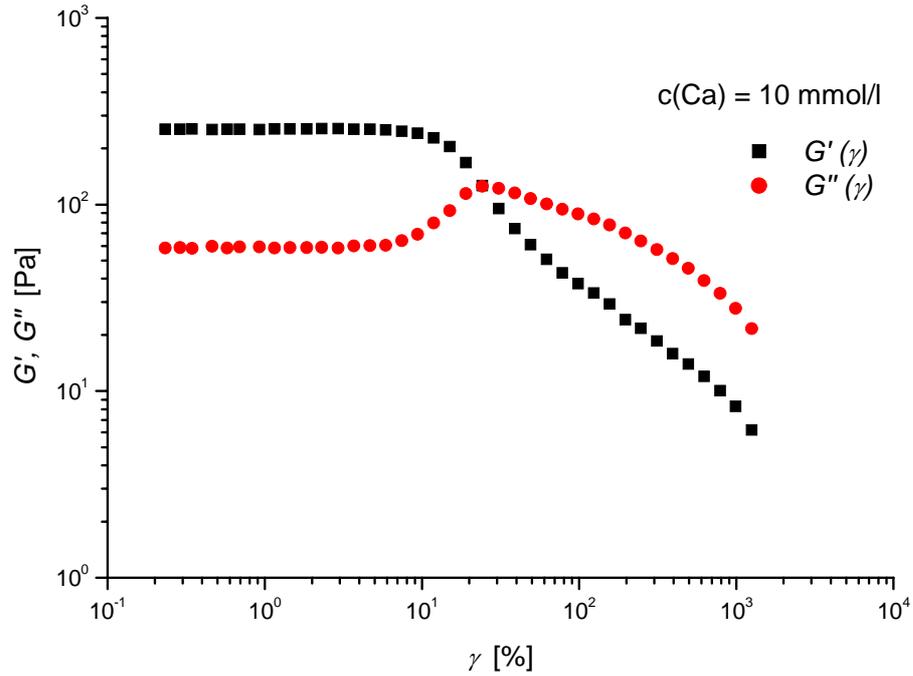


Abb. 77: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 10$ mmol/l. Biofilmmalter 48h.

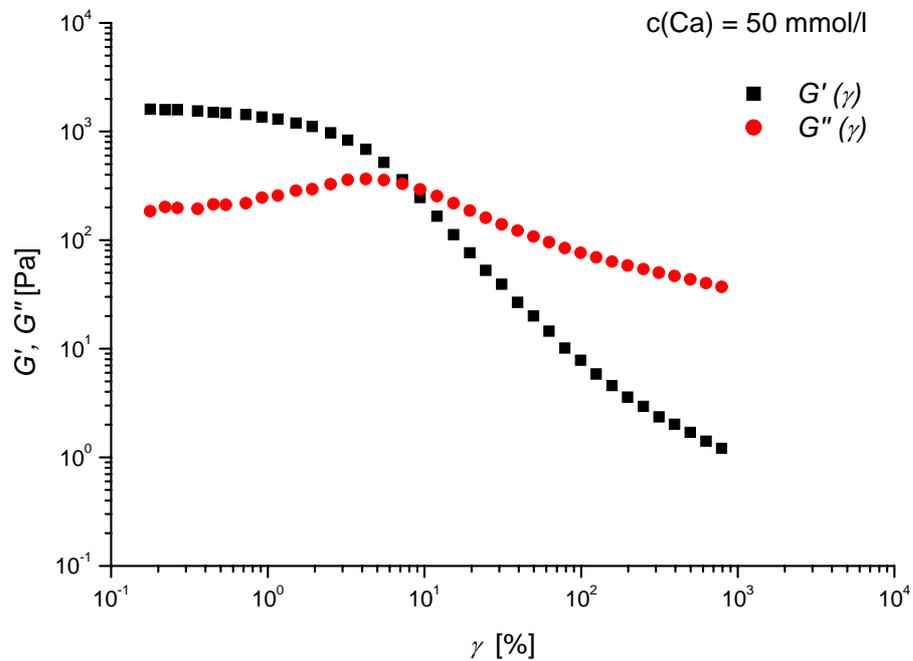


Abb. 78: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 50$ mmol/l. Biofilmmalter 48h.

Mit steigender Ionenkonzentration war ebenfalls eine Steigerung der Werte von Speicher- und Verlustmodul zu beobachten. Der bei Biofilmen ohne Ionen auch beim Deformationstest zu beobachtende Alterungseffekt konnte bei Ionenzugabe nicht mehr detektiert werden. Hier zeigten die unterschiedlich alten Biofilme einen Strukturabbau in derselben Größenordnung (Abb. 79 bis Abb. 81).

Die Abb. 82 bis Abb. 84 zeigen typische Frequenztests von Biofilmen mit Kalziumzugabe in unterschiedlichen Konzentrationen. Während bei geringer Konzentration im Nährmedium (1 mmol/l) noch keine signifikante Änderung der Module als Funktion der Kreisfrequenz beobachtet werden konnte, änderte sich dies zunehmend mit steigender Kalziumionenkonzentration (10 mmol/l, 50 mmol/l). Die vorhandenen Entanglements wurden zunehmend von Coulombschen Wechselwirkungen überlagert, das anfangs dynamische Netzwerk mit sich öffnenden und schließenden Verknüpfungspunkten wurde zunehmend fester vernetzt, was sich in der Ausbildung eines Plateaus bemerkbar machte. Dieser Verlauf lässt vermuten, dass die im System verbliebenen Verschlaufungen durch ionische Wechselwirkungen fixiert wurden („trapped Entanglements“).

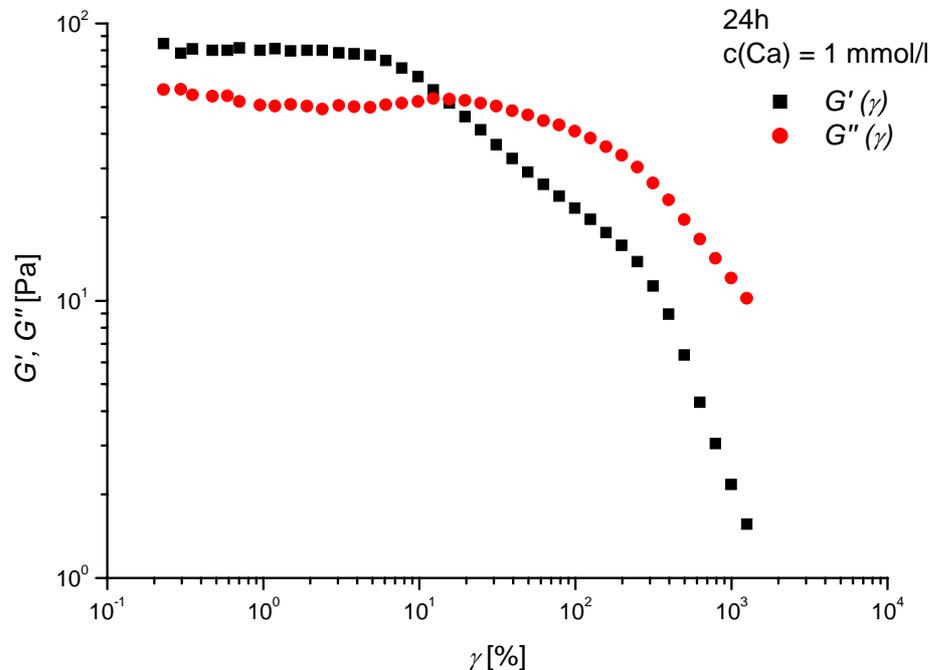


Abb. 79: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 1$ mmol/l. Biofilmalter 24h.

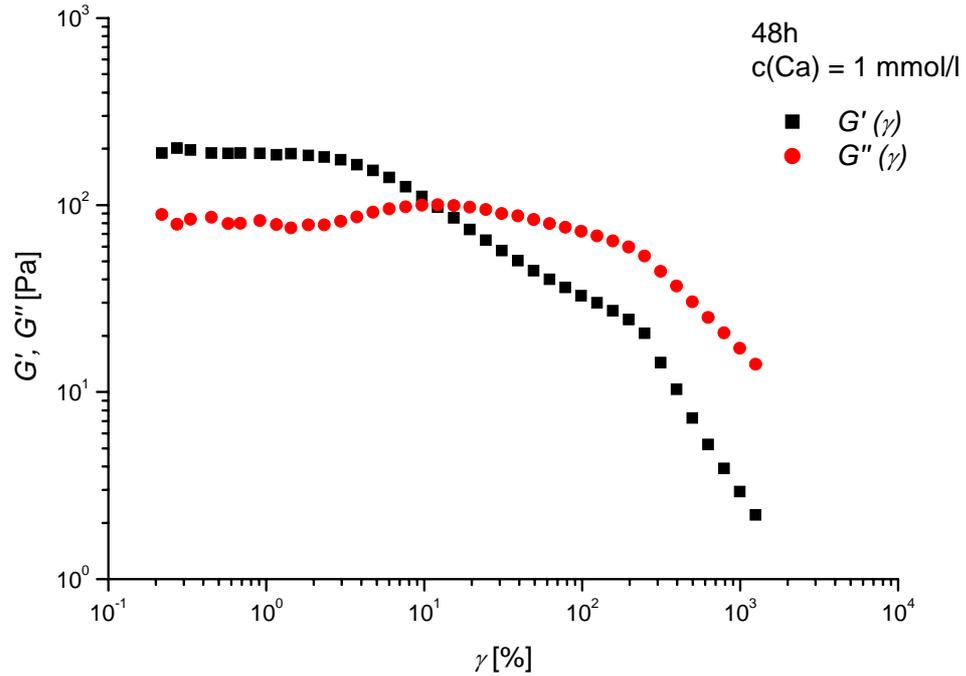


Abb. 80: Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 1$ mmol/l. Biofilmmalter 48h.

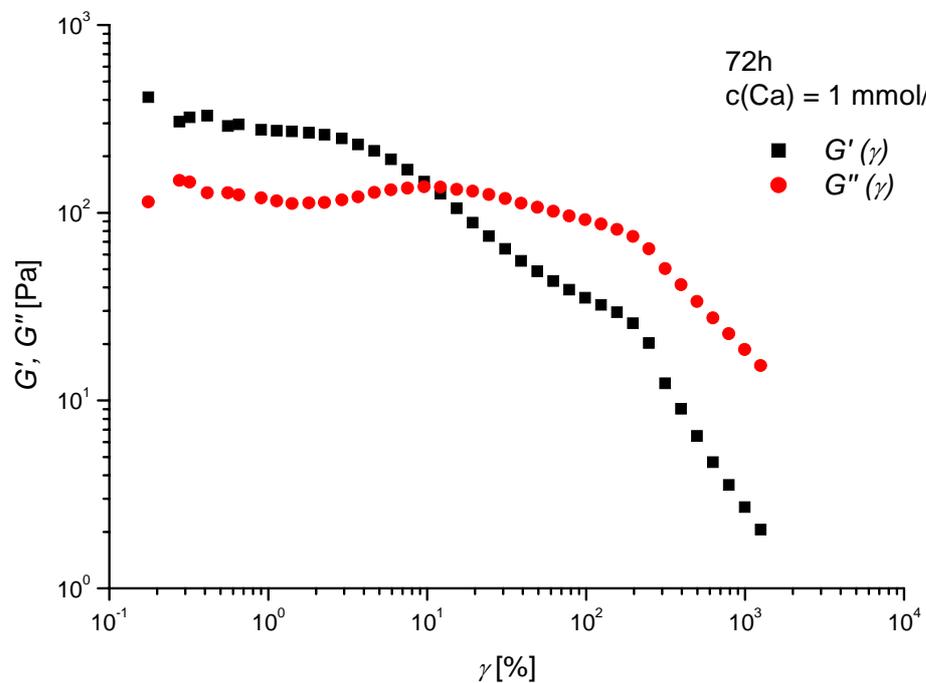


Abb. 81: Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Ca}) = 1$ mmol/l. Biofilmmalter 72h.

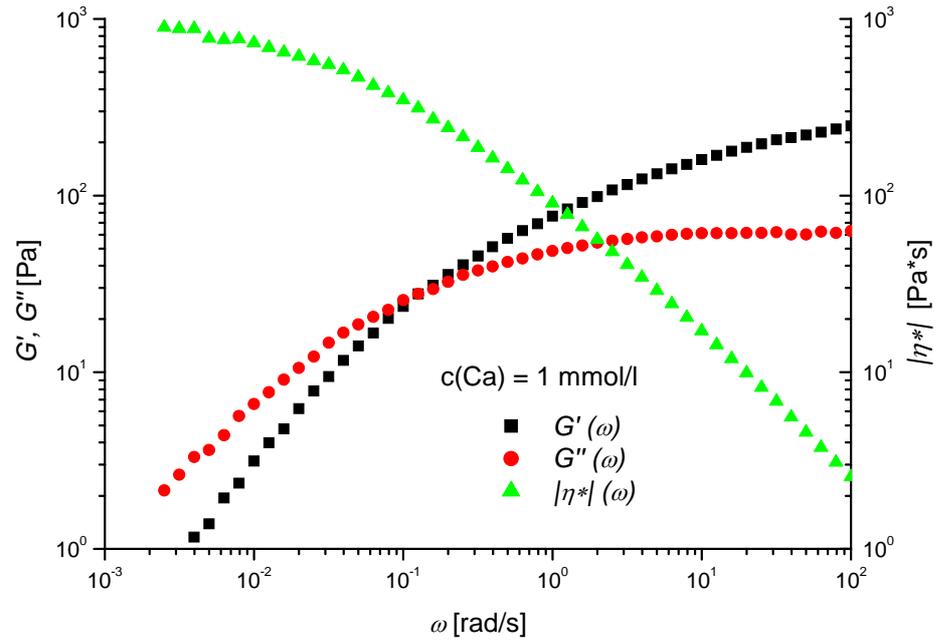


Abb. 82: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21,5\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Ca}) = 1\text{ mmol/l}$.

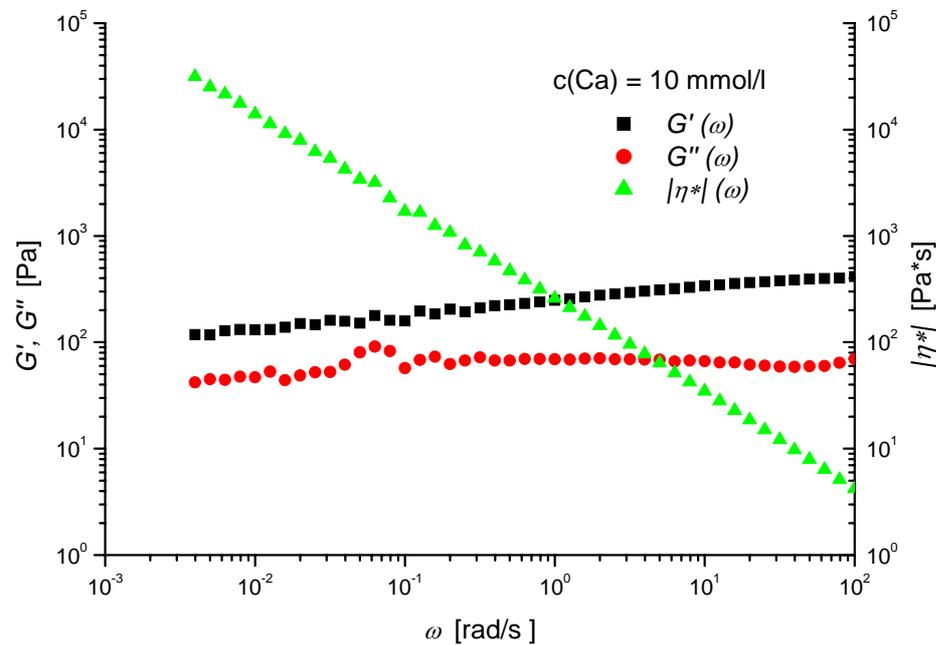


Abb. 83: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Ca}) = 10\text{ mmol/l}$.

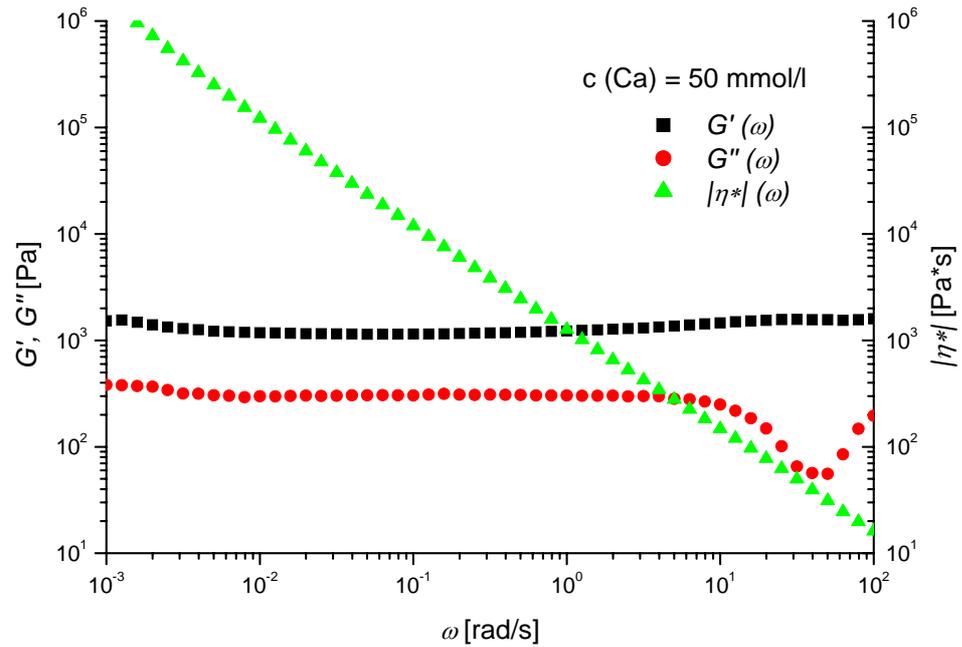


Abb. 84: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Ca}) = 50 \text{ mmol/l}$.

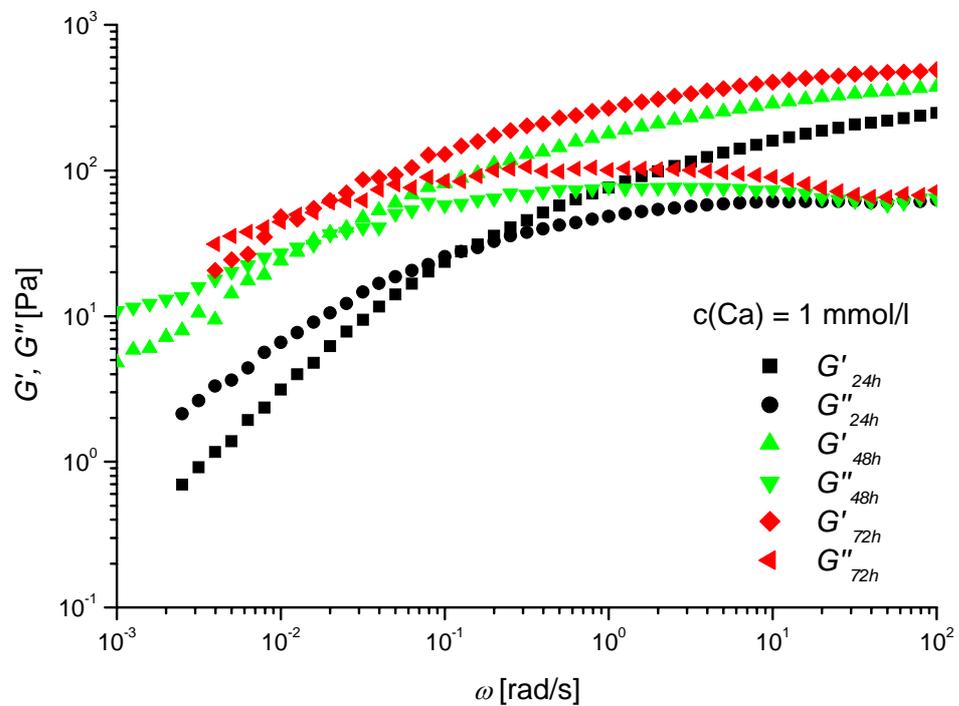


Abb. 85: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Ca}) = 1 \text{ mmol/l}$, für verschieden alte Biofilme

Bei 10 mmol/l Kalziumionen (Abb. 83) ließen sich die zwei Anteile (ionische Wechselwirkung und Entanglements) bei der Netzbildung gut unterscheiden. Bei niedrigen Frequenzen dominierten die ionischen Wechselwirkungen mit G_0 Werten im Bereich 143 ± 13 Pa, was einer Anzahl an elastisch effektiven Verknüpfungspunkten von $3,5 \pm 0,3 \cdot 10^{19}$ Ketten pro Liter entsprach. Bei höheren Frequenzen ergab sich der G_0 Wert aus der Kombination von ionischer Wechselwirkung und Beitrag der Entanglements, was ein G_0 Wert von 423 ± 8 Pa und eine Anzahl von $1,05 \pm 0,05 \cdot 10^{20}$ Ketten/l lieferte.

Betrachtete man die Kinetik beim Auftrag von G_0 gegen das Biofilmtalter, fiel auf, dass sowohl bei den Filmen ohne Ionenzugabe zum Nährmedium, wie auch bei den Proben mit 1 mmol/l Kalziumionen ein linearer Anstieg der Werte zwischen 24 und 72 Stunden Biofilmtalter zu beobachten war (Abb. 86, Abb. 87).

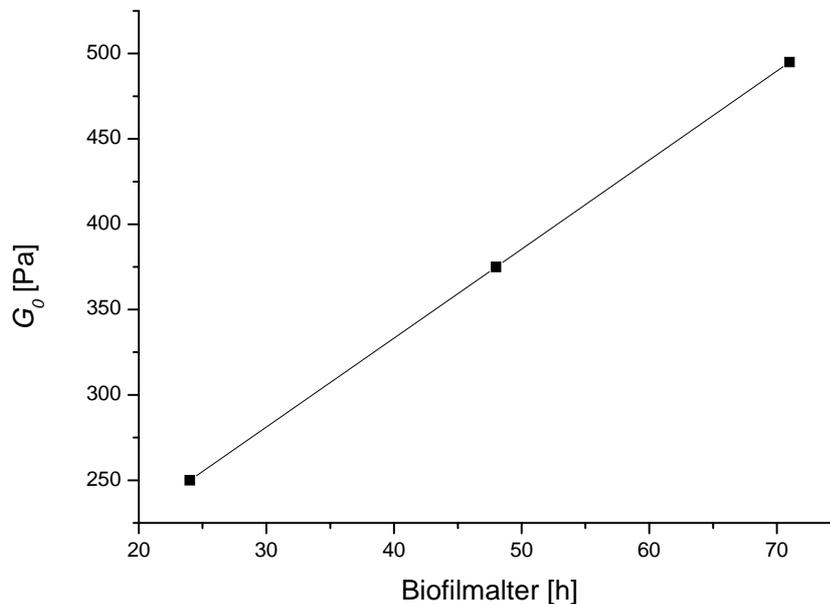


Abb. 86: Auftragung des G_0 Wertes gegen das Biofilmtalter für einen Film mit 1 mmol/l Kalziumionen.

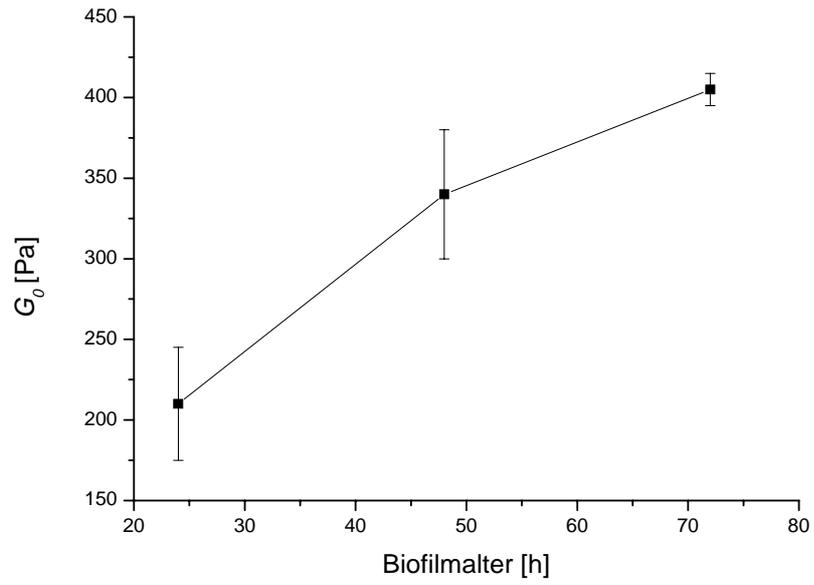


Abb. 87: Auftragung des G_0 Wertes gegen das Biofilmalter für Biofilme ohne Ionenzugabe.

4.7.5.2 Magnesium

Die Effekte, die unter dem Einfluss von Magnesiumionen beobachtet werden konnten, sind im folgenden Kapitel dargestellt. Bei Deformationstests zeigte sich ein Ende des Linear Viskoelastischen Bereiches bei knapp unter 10 % für Magnesiumkonzentrationen von 10 mmol/l im Nährmedium. Dies konnte für unterschiedlich alte Biofilme (24h, 48h, 72h) beobachtet werden. Die Abb. 88, Abb. 89 und Abb. 90 zeigen diesen Sachverhalt. Interessanterweise bewirkte eine Steigerung der Ionenkonzentration auf 50 mmol/l im Nährmedium eine Verlängerung des LVE Bereichs auf annähernd 100 % bei 24h alten Biofilmen, der bei älteren Filmen auf ca. 30 % zurückgeht (Abb. 91, Abb. 92).

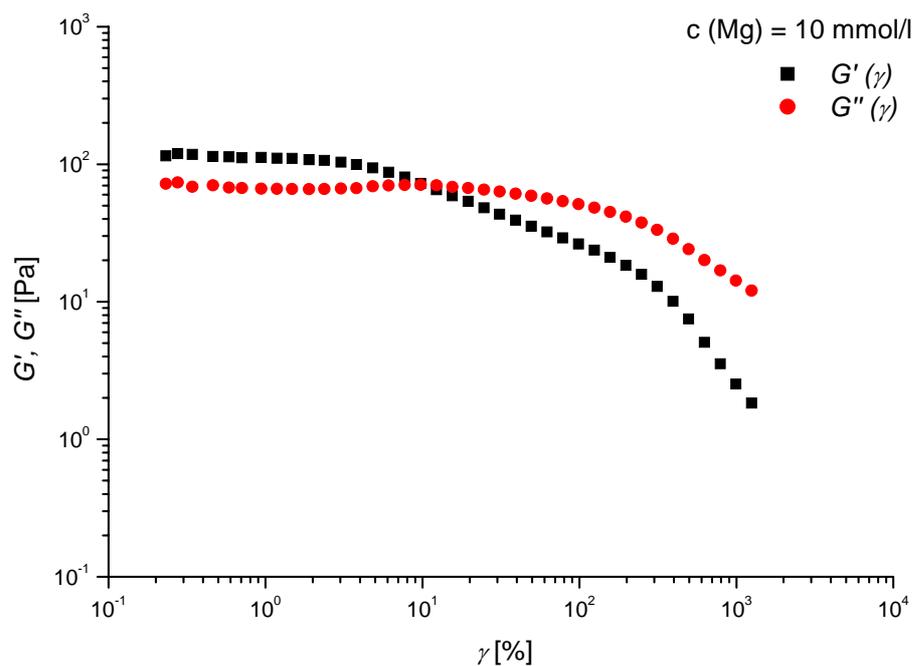


Abb. 88: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1 \text{ rad/s}$ und $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/l}$. Biofilmmalter 24h.

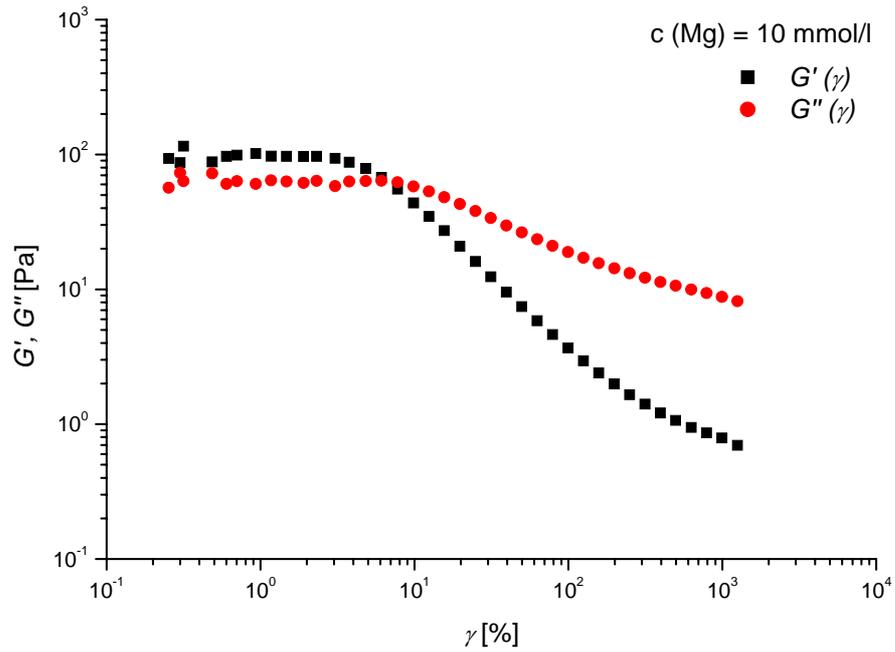


Abb. 89: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1 \text{ rad/s}$ und $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/l}$. Biofilmlalter 48h.

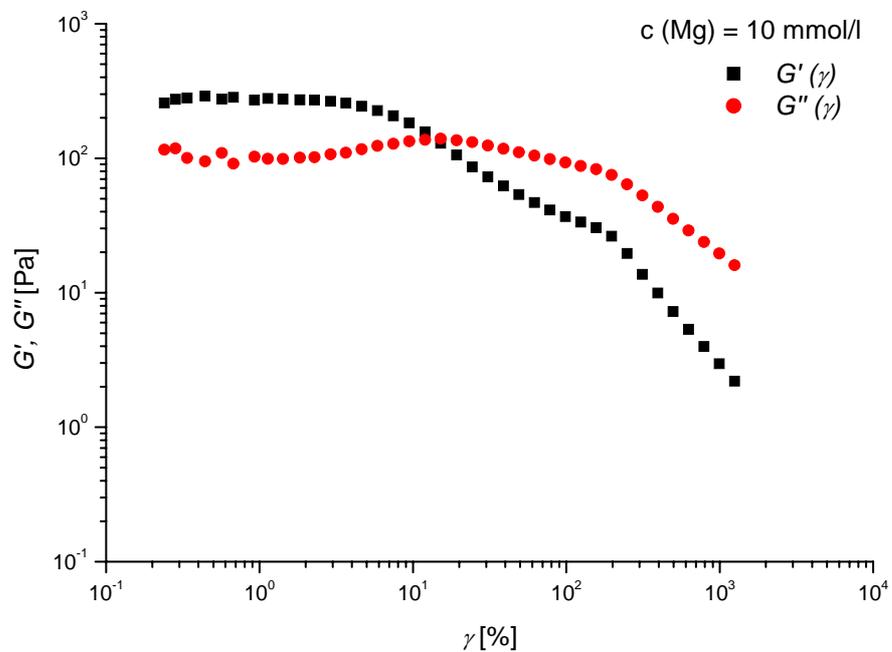


Abb. 90: Speicher- ($G'(\gamma)$) und Verlustmodul ($G''(\gamma)$) als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1 \text{ rad/s}$ und $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/l}$. Biofilmlalter 72h.

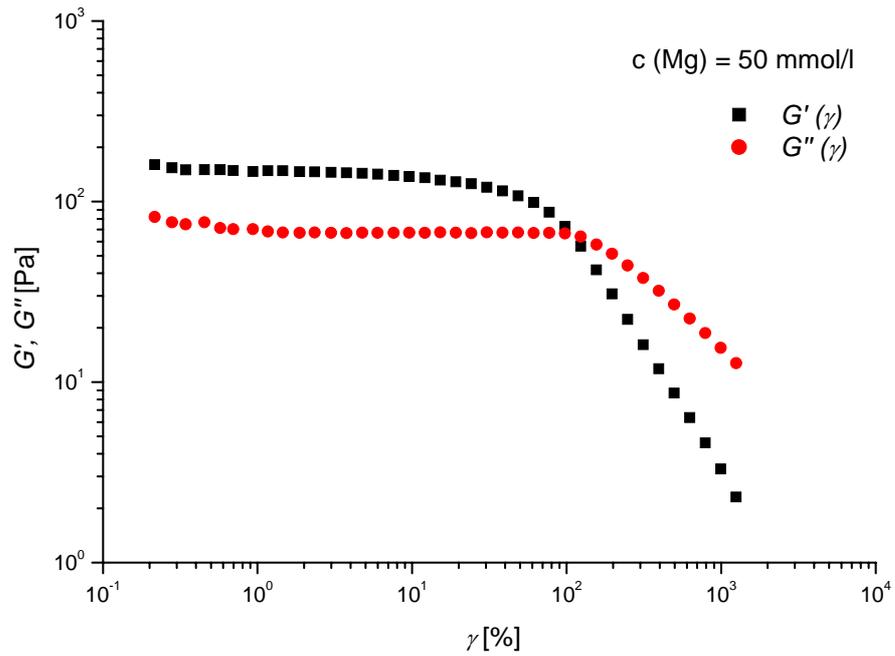


Abb. 91: Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Mg}) = 50$ mmol/l. Biofilmmalter 24h.

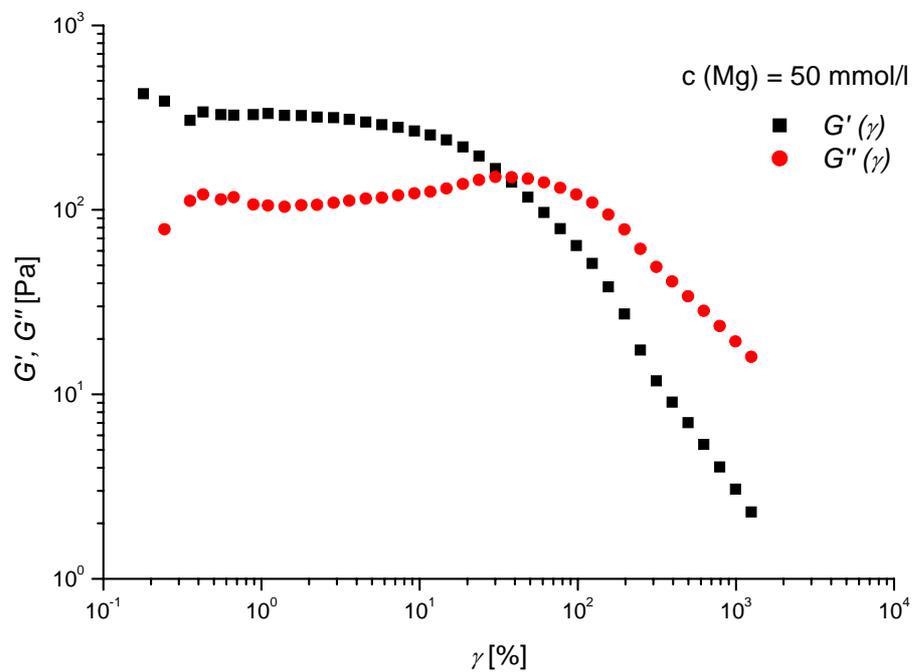


Abb. 92: Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Deformation γ für $\omega = 1$ rad/s und $T = 21$ °C, bei einer Kalziumionenkonzentration im Nährmedium von $c(\text{Mg}) = 50$ mmol/l. Biofilmmalter 72h.

Bei Frequenztests zeigte sich ein schwächerer Einfluss der Magnesiumionen gegenüber Kalzium. Bei gleichen Ionenkonzentrationen im Nährmedium, zeigten die mit Magnesium versetzten Proben im Gegensatz zu Kalzium immer noch einen dynamischen Verlauf mit sich überschneidenden Kurven für Speicher- und Verlustmodul, was auf den stärkeren Einfluss von Entanglements gegenüber Coulomb-Wechselwirkungen im System hindeutete. Bei älteren Filmen änderte sich an diesem Verlauf ebenfalls nichts. Besonders deutlich wurden die Unterschiede bei einer Ionenkonzentration von 50 mmol/l. Bei Kalziumionen wurde hier ein Plateauwert der Module erreicht, bei Magnesium hingegen konnte dies nicht beobachtet werden. In Abb. 93 werden die Einflüsse von Kalzium und Magnesium bei Frequenztests in einem Diagramm dargestellt. Zusätzlich gibt Tabelle 9 ausgewählte rheologische Größen numerisch wieder. Die Abb. 94 bis Abb. 99 zeigen Frequenztests mit variierendem Magnesiumgehalt und Alter der Biofilme.

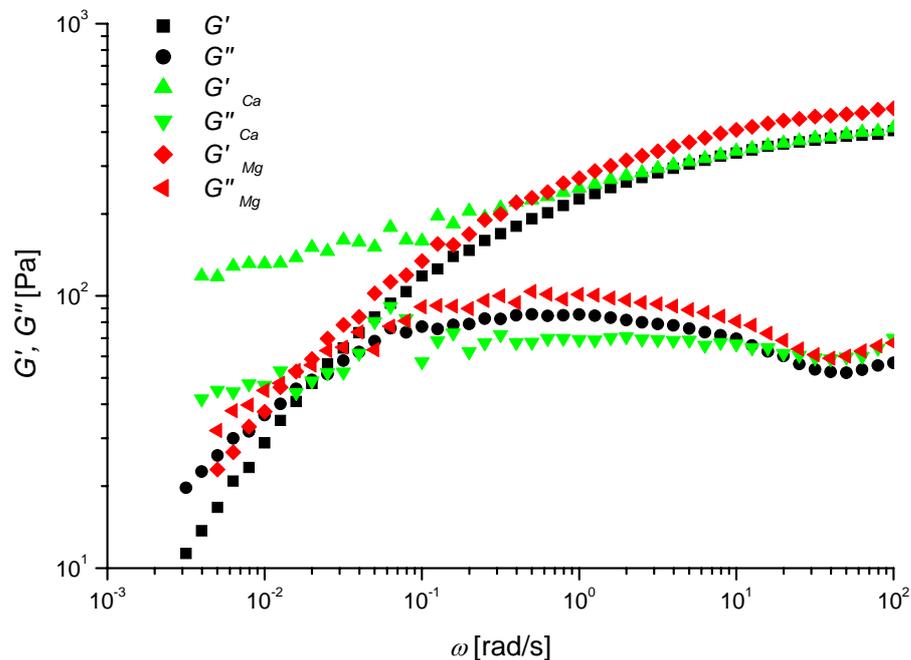


Abb. 93: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* SG81 ohne Ionenzugabe und mit je 10 mmol/l Kalzium- und Magnesiumionen.

Tabelle 9: Vergleich rheologischer Größen von *P. aeruginosa* SG 81 Biofilmen ohne Ionenzugabe und mit je 10 mmol/l Kalzium- und Magnesiumionen.

	Biofilm ohne Ionen	Biofilm mit Kalzium 10 mmol/l	Biofilm mit Magnesium 10 mmol/l
Relaxationszeit λ [s]	51 \pm 6 (48h) 49 \pm 5 (72h)	xx (48h) xx (72h)	56 \pm 6 (48h) 63 \pm 7 (72h)
G_0 -Wert [Pa]	340 \pm 40 (48h) 405 \pm 10 (72h)	430 \pm 50 (48h) 415 \pm 45 (72h)	353 \pm 40 (48h) 488 \pm 54 (72h)
Elastisch effektive Ketten [Ketten/l]* 10^{19}	8,3 \pm 1,0 (48h) 9,9 \pm 0,3 (72h)	10,5 \pm 1,2 (48h) 10,0 \pm 1,1 (72h)	8,6 \pm 1,0 (48h) 11,9 \pm 1,3 (72h)

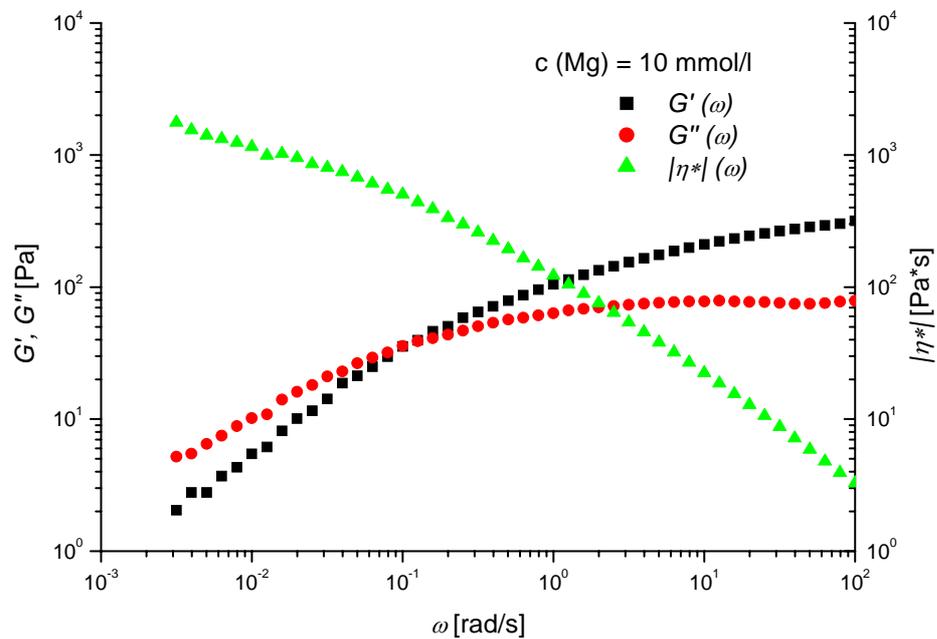


Abb. 94: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*|(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 10\text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmmalter 24h.

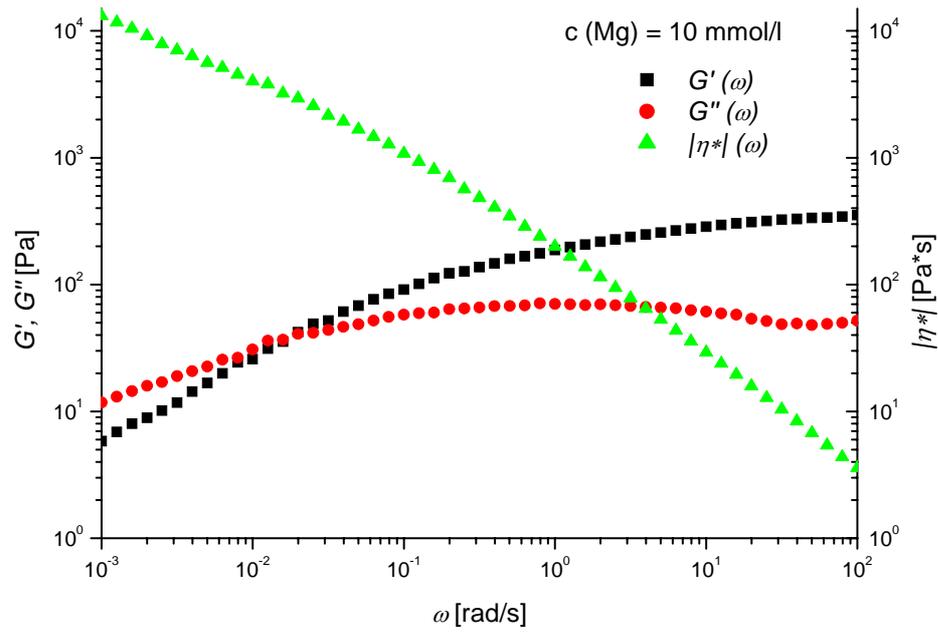


Abb. 95: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1 \%$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmalter 48h.

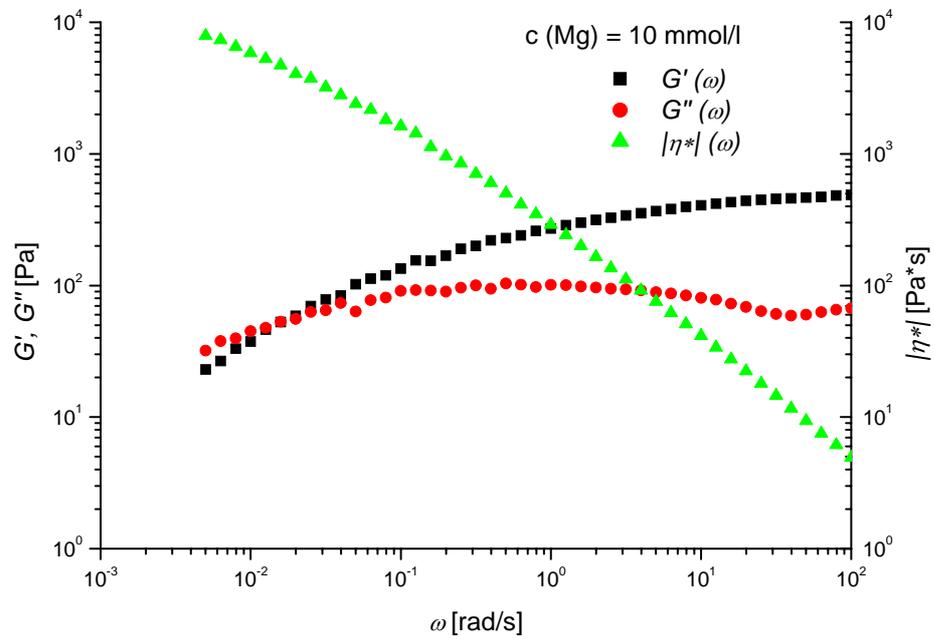


Abb. 96: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1 \%$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 10 \text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmalter 72h.

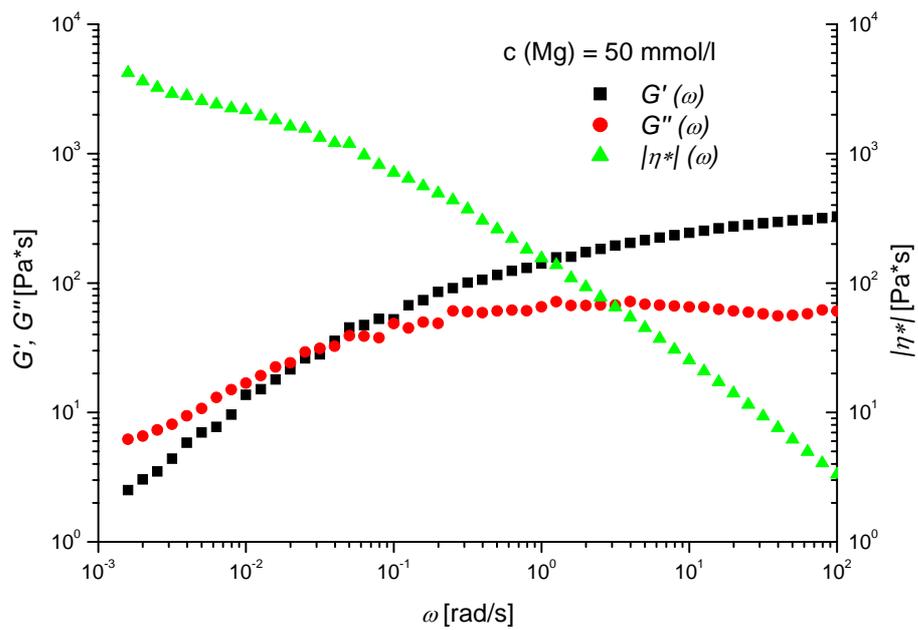


Abb. 97: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1 \%$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 50 \text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmalter 24h.

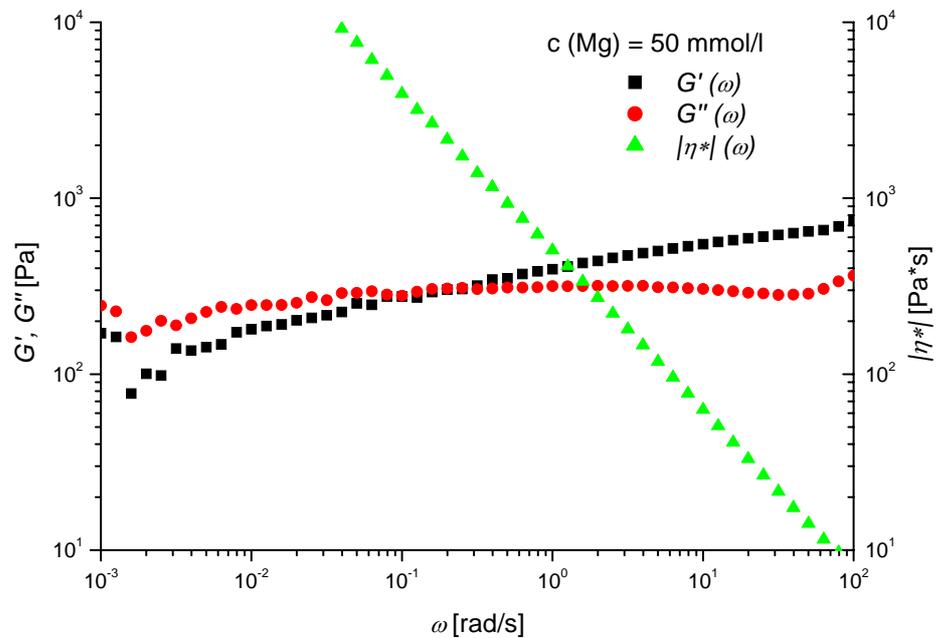


Abb. 98: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1 \%$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 50 \text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmalter 48h.

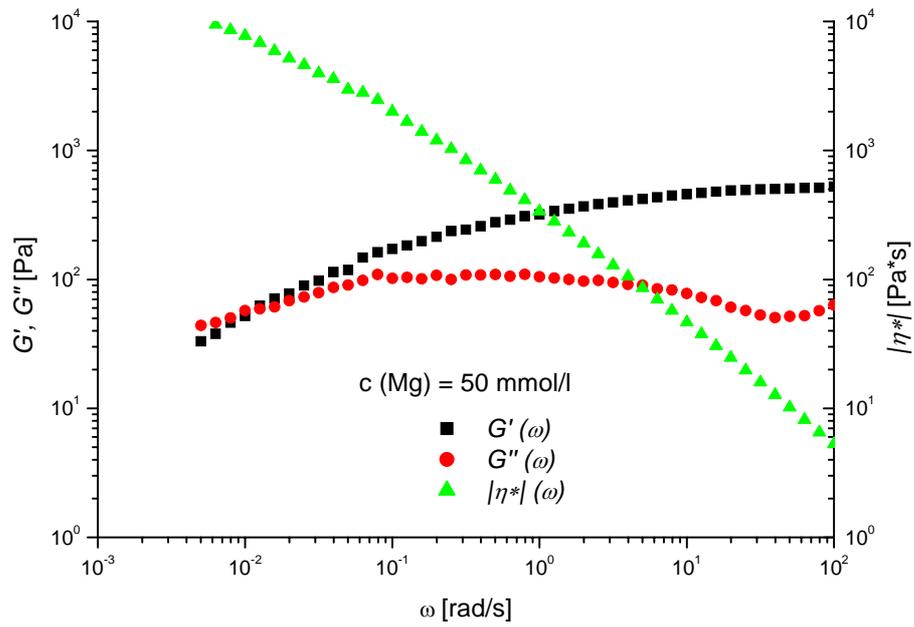


Abb. 99: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1 \%$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mg}) = 50 \text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmalter 72h.

4.7.5.3 Mangan

In einer weiteren Versuchsreihe wurde ebenfalls der Einfluss von Manganionen auf das strukturelle Verhalten von Biofilmen des Typs *P. aeruginosa* SG81 untersucht. Biofilme die auf mit Mangan versetztem Nährmedium aufwachsen, zeigten ein ähnliches Verhalten wie unter Kalziumeinfluss. Schon bei Zugabe von 10 mmol/l Manganionen zum Nährmedium erkannte man bei durchgeführten Frequenztests die Ausbildung eines Plateaus. Abb. 100 zeigt diesen Sachverhalt.

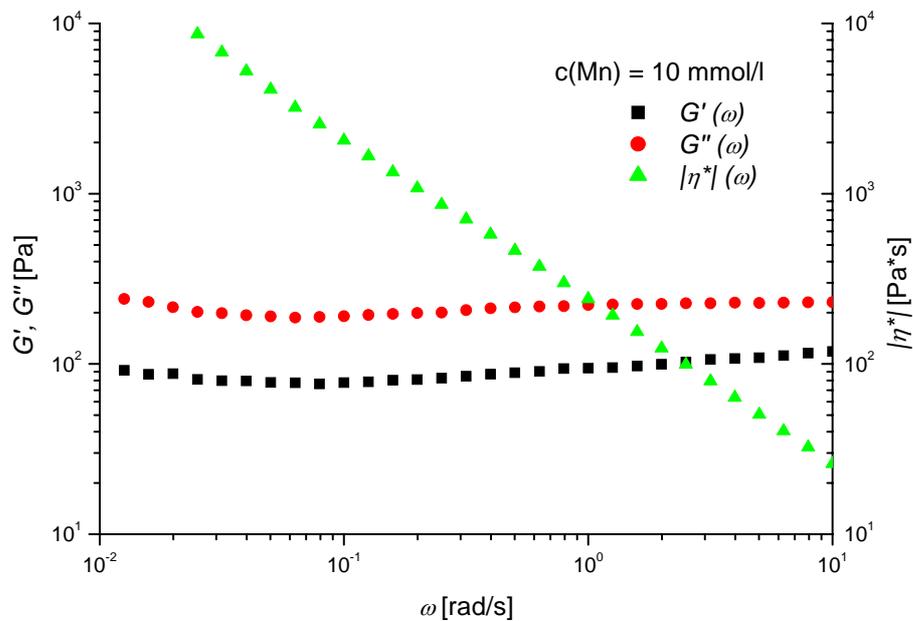


Abb. 100: $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$, sowie $|\eta^*(\omega)|$ als Funktion der Kreisfrequenz ω bei $\gamma = 1\%$, $T = 21\text{ °C}$, $c(\text{Mn}) = 10\text{ mmol/l}$. *P. aeruginosa* SG81 Biofilmbalter 24h.

4.7.6 Rheologische Unterschiede zwischen *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153

In einer Serie weiterer Experimente, wurde das rheologische Verhalten der Stämme *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 untersucht. Die EPS des mutanten Stammes FRD 1153 unterscheidet sich von derjenigen des Stammes FRD1 durch das Fehlen der partiell O-acetylierten Gruppen an der O-2 und/oder O-3 Position der Mannuronat Einheiten der Alginatketten. Dies bedingt u.a. unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit, unterschiedliche Biofilmdicken und Unterschiede in der molaren Masse (Tielen, Strathmann, Jaeger, Flemming, & Wingender 2005). Mittels der Rheologie konnten die strukturellen Unterschiede zwischen den Stämmen herausgearbeitet werden. Eine Übersicht über die gemessenen Werte für alle untersuchten Stämme von *P. aeruginosa* SG81, FRD1 und FRD1153 zeigt Tabelle 10.

Deformationstests zeigten, dass Biofilme des Typs FRD1 bis zu einem Bereich von 10 % deformiert werden konnten (Abb. 101), bis der linear viskoelastische Bereich verlassen wurde. FRD1153 zeigte diesen Strukturabbau schon bei einer Deformationsbelastung von knapp unter 1 %, was u.a. ein Hinweis auf eine höhere Netzwerkdicke oder kürzere Alginatketten war. Abb. 102 zeigt einen typischen Verlauf eines Deformationstests für beide Stämme. Die bei *P. aeruginosa* SG81 beobachtete deutliche Verschiebung hin zu kleineren Deformationswerten mit zunehmendem Biofilmalter konnte bei FRD1 und FRD1153 nicht beobachtet werden, bzw. war nur minimal bemerkbar. Der Vergleich zwischen Abb. 102 und Abb. 103 zeigte dies.

Bei Benutzung des Spaltmessgerätes des Rheometers, lies sich ebenfalls ein Wert für die Biofilmdicke bestimmen. Es wurden Werte zwischen $415 \pm 20 \mu\text{m}$ für 24h alte Biofilme von FRD 1 und $150 \pm 14 \mu\text{m}$ für 24h alte Biofilme von FRD 1153 gefunden.

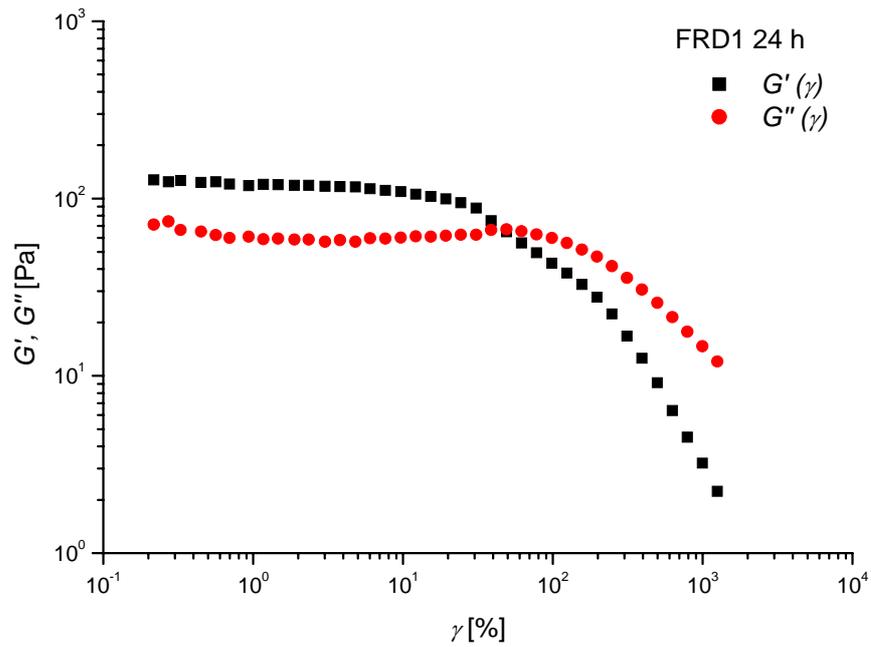


Abb. 101: Typischer Verlauf von $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für einen 24h alten Biofilm von *P. aeruginosa* FRD1, $\omega = 1$ rad/s, $T = 23$ °C.

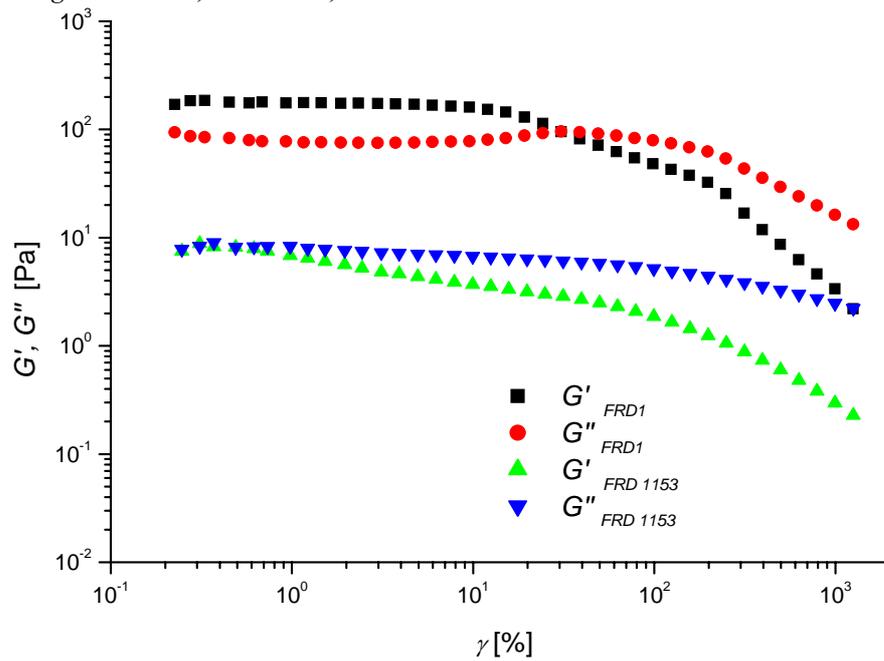


Abb. 102: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, $\omega = 1$ rad/s, $T = 25$ °C.

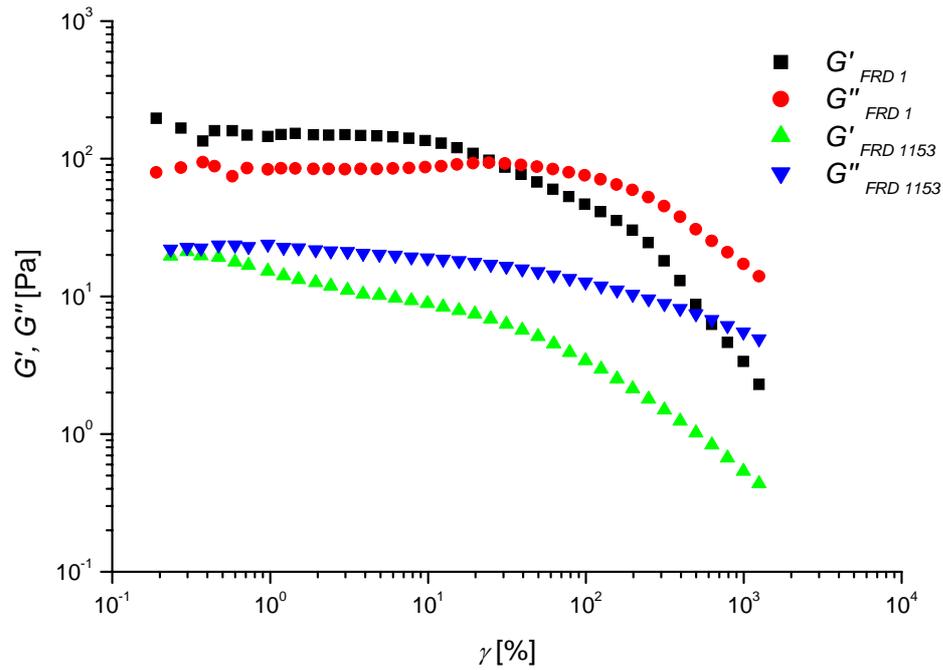


Abb. 103: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, $\omega = 1$ rad/s, $T = 25$ °C.

Tabelle 10: Übersicht einiger rheologischer Werte verschiedener 24h alter Biofilmstämme

	<i>P. aeruginosa</i> FRD1	<i>P. aeruginosa</i> FRD1153	<i>P. aeruginosa</i> SG81
Biofilmdicke [μm]	415 ± 20	150 ± 14	390 ± 25
Ende des LVE Bereichs [%] ($\omega = 1$ rad/s)	10 ± 2	$1 \pm 0,2$	100 ± 10
Durchschnittliche Relaxationszeit λ [s]	13 ± 7	$0,20 \pm 0,14$	16 ± 10
Schubmodul G_0 [Pa]	370 ± 75	83 ± 65	223 ± 42
Anzahl der elastisch effektiven Ketten ν [Ketten/l]* 10^{19}	$9,1 \pm 1,8$	$2,0 \pm 1,6$	$5,5 \pm 1,0$

Bei Frequenztests zeigten die Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 viskoelastische Effekte mit eindeutigen Unterschieden. Der Schnittpunkt von G' und G'' war bei Biofilmen des Stammes FRD1153 zu höheren Frequenzen, gleichbedeutend mit kürzeren Relaxationszeiten, hin verschoben. Dies könnte ein Indiz für ein geringeres Molekulargewicht der Alginatketten in der EPS im Gegensatz zu FRD 1 sein, und damit auf ein schwächeres Netzwerk mit einer kürzeren Lebenszeit der Vernetzungspunkte hinweisen. Die dynamische Netzwerkstruktur basierte auf physikalischen Eigenschaften, vornehmlich Entanglements, wie durch die Cox-Merz Regel (Abb. 104) gezeigt werden konnte. Die Lebensdauer der Netzwerkpunkte ist in Tabelle 10 aufgelistet. FRD1 zeigte bei den Messungen ein elastischeres Netzwerk, während FRD1153 eine viskosere Biofilmstruktur offenbarte.

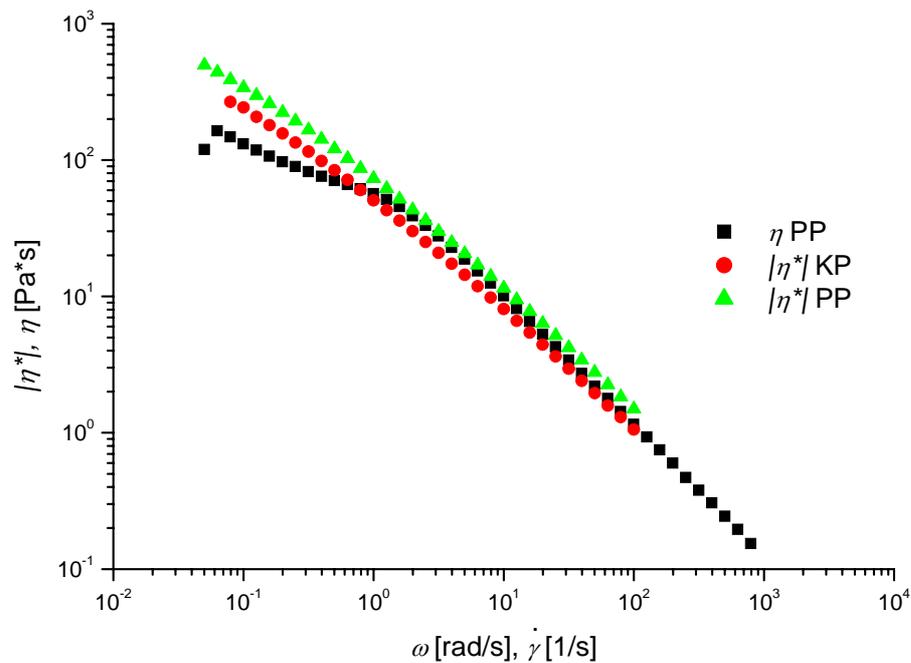


Abb. 104: Vergleich der Scherviskosität $\eta(\dot{\gamma})$ und der komplexen Viskosität $|\eta^*(\omega)$ bei gleichen Werten von Kreisfrequenz ω und Scherrate $\dot{\gamma}$ für einen 24h alten Biofilm von *P. aeruginosa* FRD1. Messwerte mit Konus-Platte (KP), und Platte-Platte (PP) Geometrie.

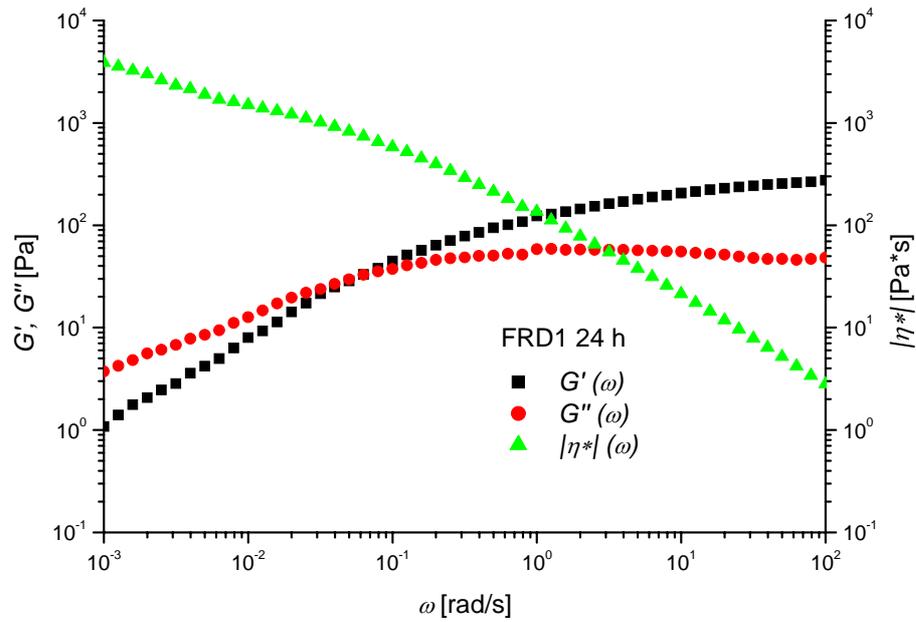


Abb. 105: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$, $G''(\omega)$ und $|\eta^*|(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) eines 24h alten Biofilms von *P. aeruginosa* FRD1.

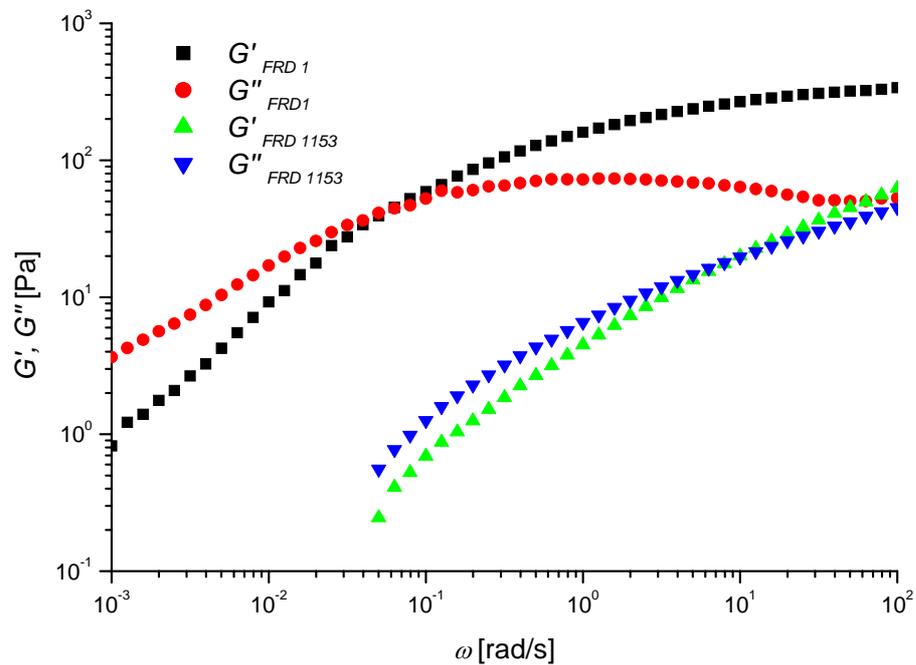


Abb. 106: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153.

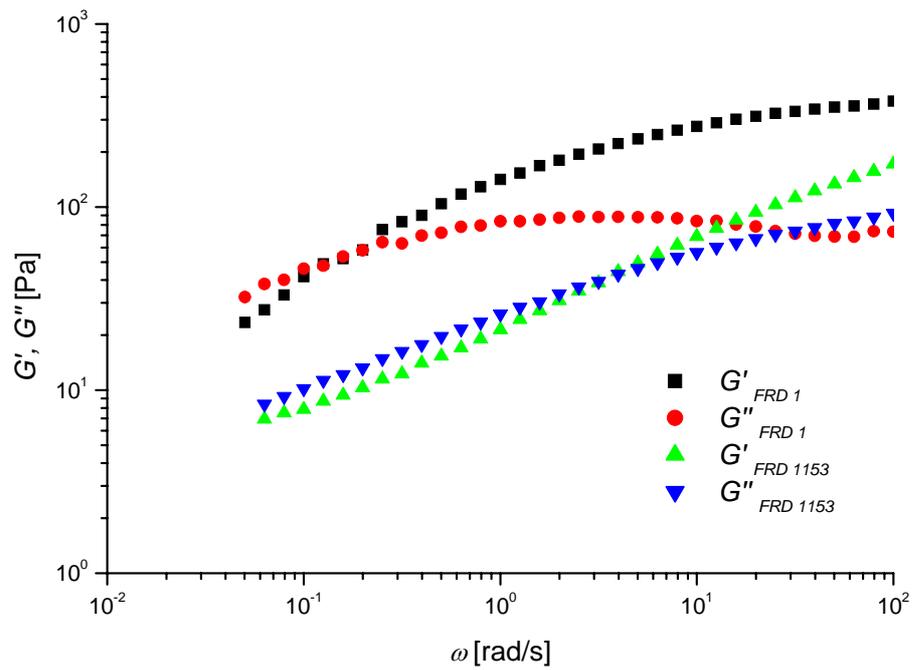


Abb. 107: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153.

4.7.7 Der Einfluss von Kalziumionen auf Biofilme von FRD 1 und FRD 1153

Zur Untersuchung des Kalziumeinflusses auf das EPS Netzwerk von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 wurden mehrere Biofilmproben mit unterschiedlichem Kalziumgehalt im Nährmedium angezchtet. Eine ebenfalls durchgeführte ICP-MS Analyse gab Auskunft über die tatsächlich im Biofilm vorhandene Menge an Kalzium nach 24 Stunden. Es zeigte sich bei allen 12 Proben, dass lediglich 5 % der eingesetzten Konzentration von 1 mmol/l Kalzium im Nährmedium, bzw. 3,4 % der eingesetzten Menge bei 10 mmol/l Kalzium im Nährmedium, im Biofilm gefunden werden konnte (Abb. 101, Tabelle 11). Dabei lagen die Werte für *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 in derselben Größenordnung, was darauf hindeutete, dass der Kalziumtransfer vom Nährmedium in den Biofilm nicht durch die Alginatstruktur beeinflusst wurde.

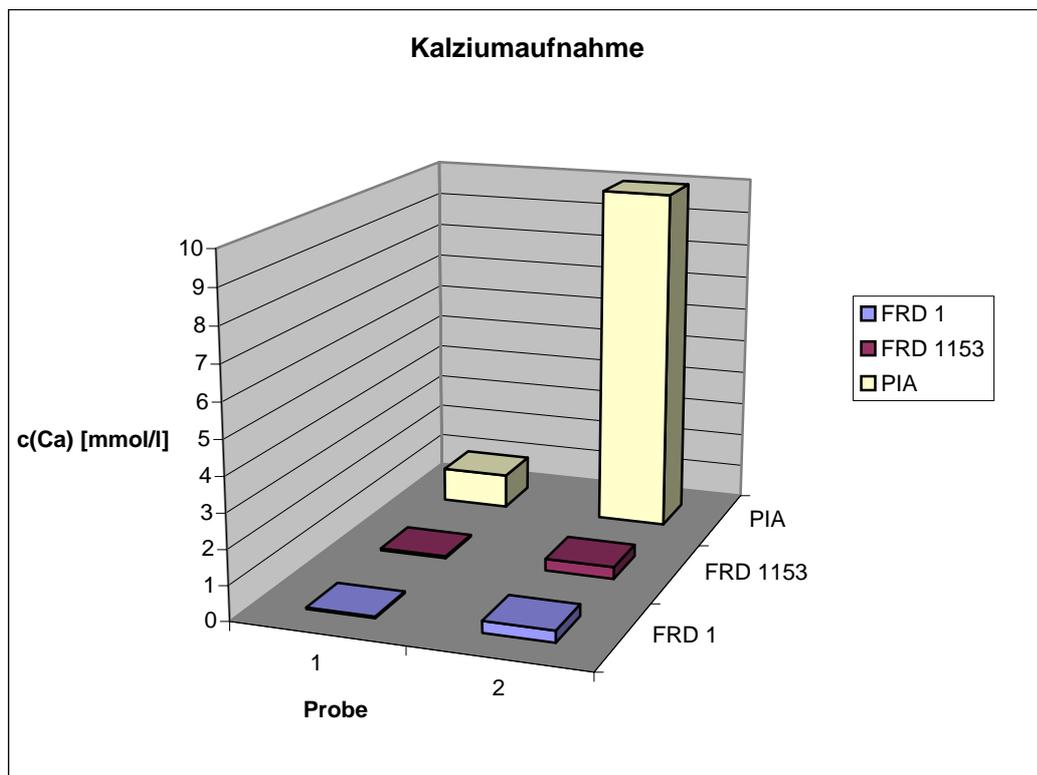


Abb. 108: Schematisch dargestellte Menge an Kalziumionen, die im PIA Nährmedium eingesetzt wurden und die in den Biofilmen nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 11: Eingesetzte und nachgewiesene Kalziumkonzentrationen im Biofilm.

Kalziumkonzentration im Nährmedium [mmol/l]	Kalziumkonzentration im Biofilm FRD1 [mmol/l]	Kalziumkonzentration im Biofilm FRD1153 [mmol/l]
1	$0,04656 \pm 0,00197$	$0,05295 \pm 0,00365$
10	$0,33382 \pm 0,03248$	$0,34675 \pm 0,0320$

Abb. 109 zeigt einen Vergleich des gemessenen Feuchtgewichtes von Biofilmen des Typs FRD1 und FRD1153 welche mit Kalzium im Nährmedium aufwuchsen. FRD1 produzierte die größere Menge an Alginate bei allen eingesetzten Kalziumkonzentrationen. Der Verlauf des Feuchtgewichtes als Funktion der Zeit war bei fast allen Kurven (Ausnahme: FRD1153 mit 1 mmol/l Ca^{2+} im Nährmedium) linear ansteigend.

Bei beiden eingesetzten Kalziumkonzentrationen produzierte FRD1 den stabileren und steiferen Biofilm, was sich in einem höheren Schermodul und einem früheren Ende des Linear Viskoelastischen Bereiches äußerte. Die vernetzenden Eigenschaften des Kalziums wirkten bei FRD1 somit effektiver. Die Abb. 110 bis Abb. 115 zeigen durchgeführte Deformationstests.

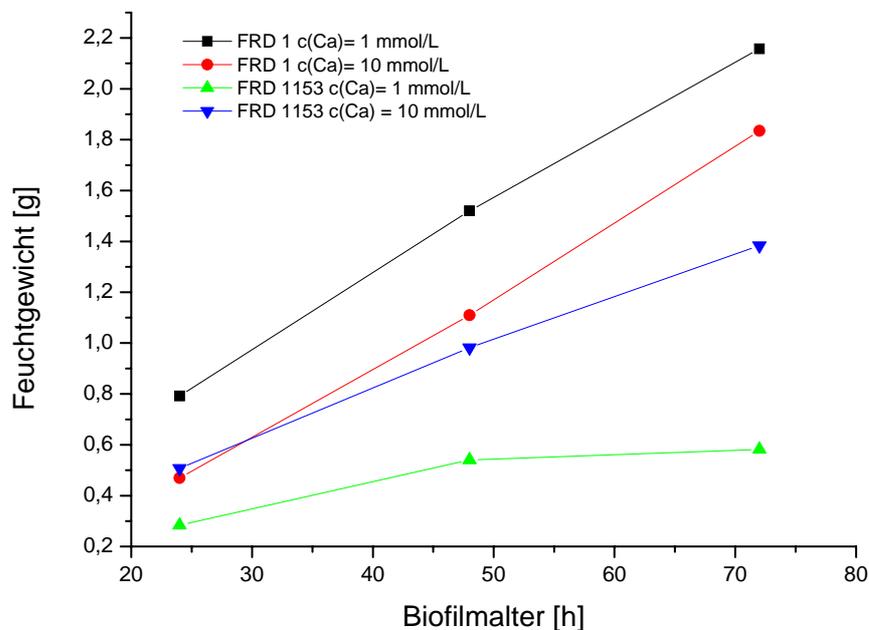


Abb. 109: Vergleich des Feuchtgewichtes als Funktion des Biofilmtalters für FRD1 und FRD1153 bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen im Nährmedium.

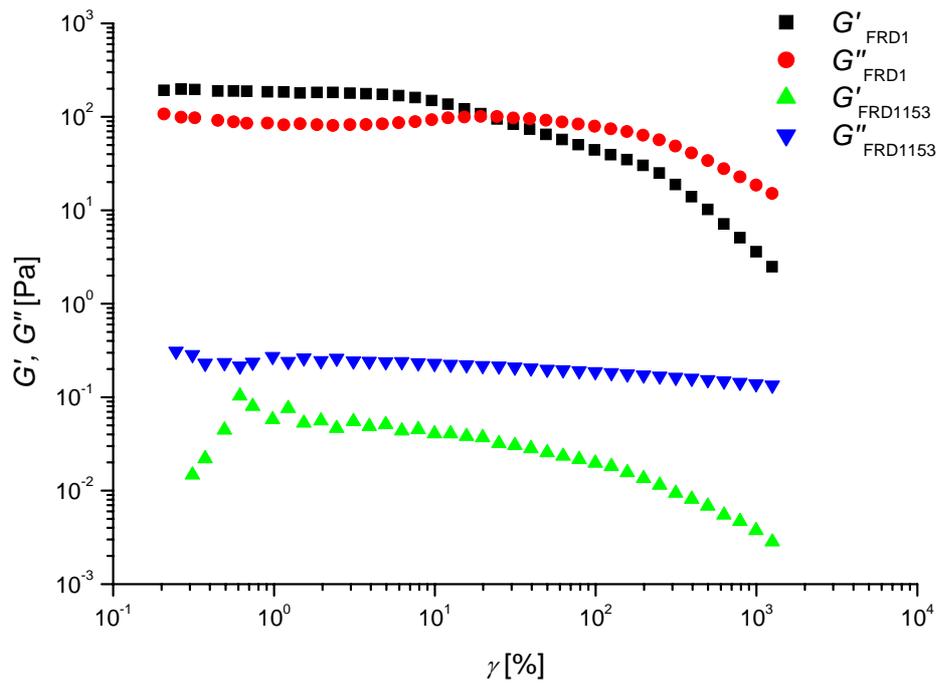


Abb. 110: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 1 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 24$ °C.

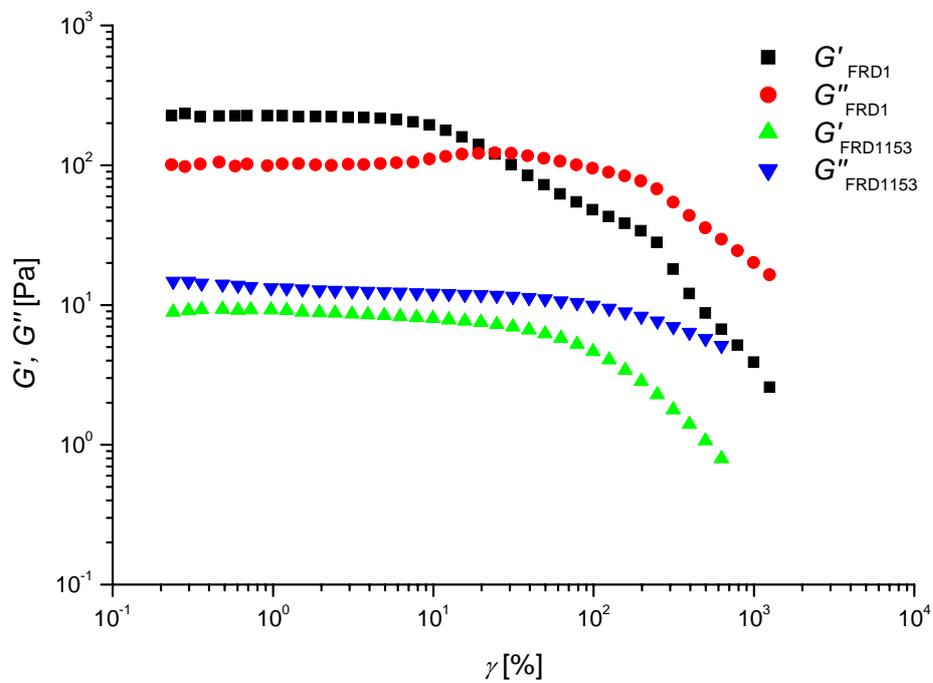


Abb. 111: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 1 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 24$ °C.

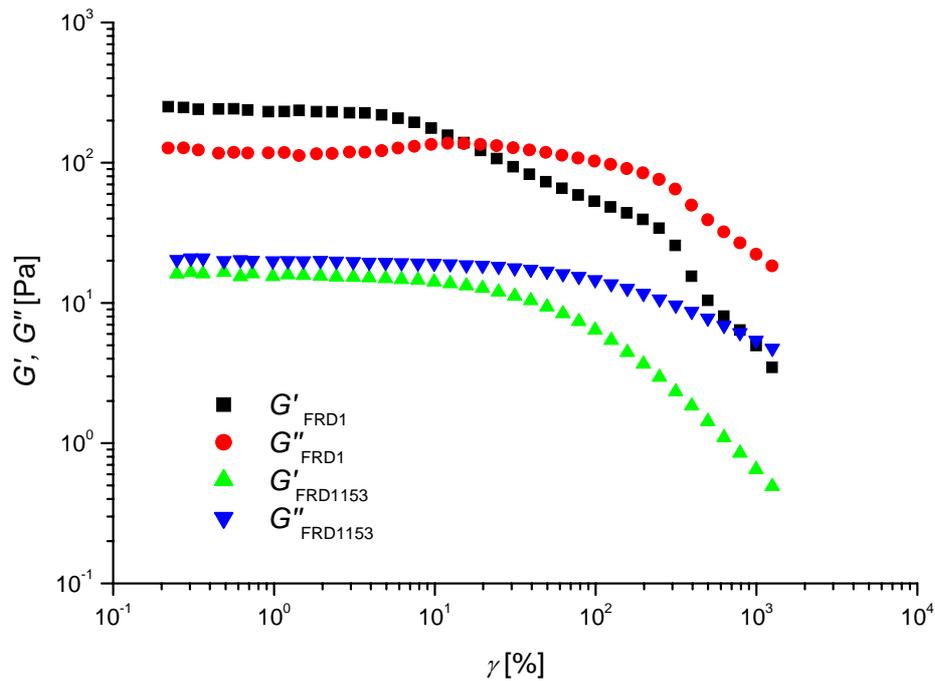


Abb. 112: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 1 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 23^\circ\text{C}$

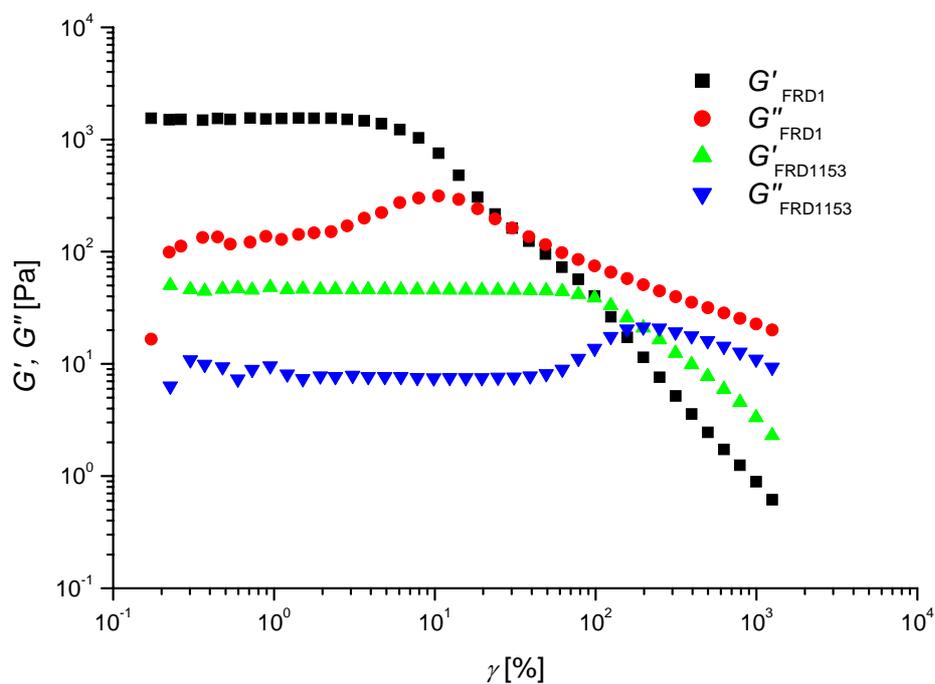


Abb. 113: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 10 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 23^\circ\text{C}$.

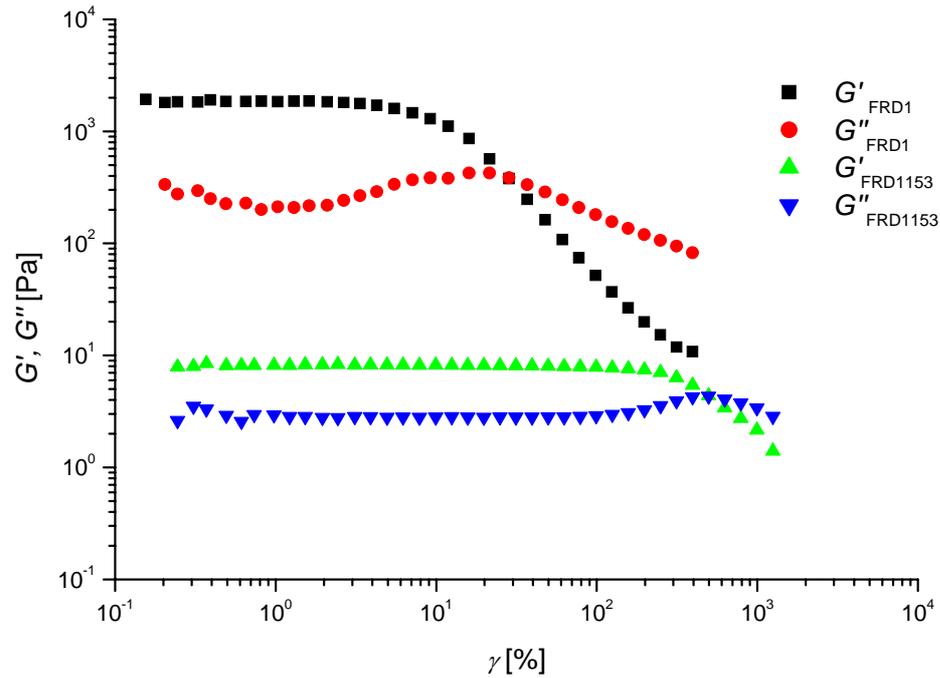


Abb. 114: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 10 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 23^\circ\text{C}$.

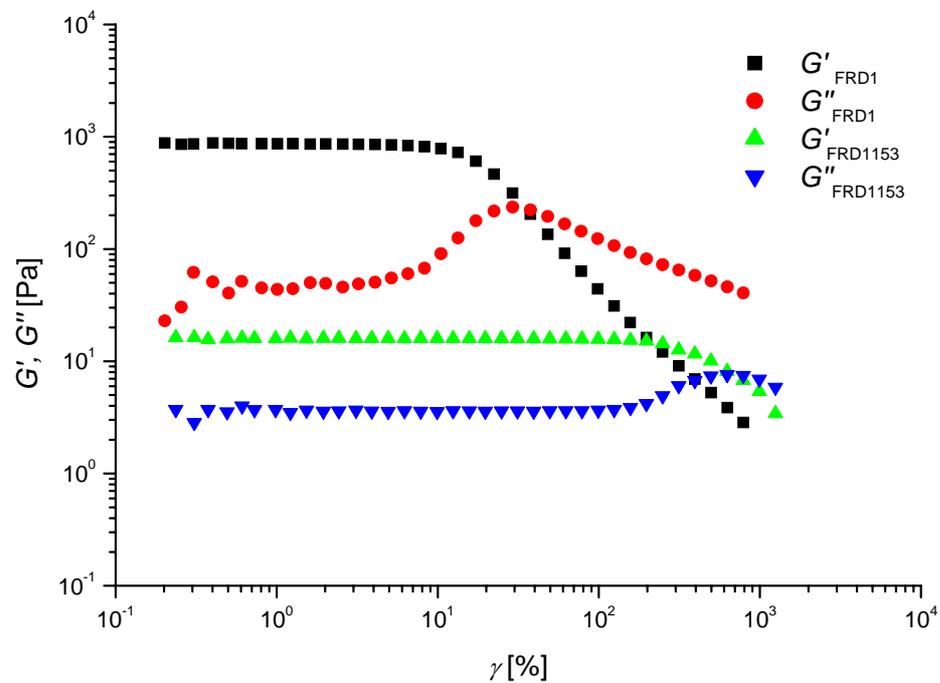


Abb. 115: $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$ als Funktion der Deformation γ , für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, bei einer Kalziumkonzentration von 10 mmol/l im Nährmedium. $\omega = 1$ rad/s, $T = 23^\circ\text{C}$.

Die Abb. 116 bis Abb. 121 zeigen Frequenztests der beiden Stämme FRD1 und FRD1153 unter dem Einfluss von sowohl 1 mmol/l Kalziumionen im Nährmedium, als auch von 10 mmol/l Ca^{2+} im Nährmedium. Die Darstellungen wurden außerdem in die unterschiedlichen Altersstrukturen (24h, 48h, 72h) aufgeteilt.

Bei 1 mmol/l Kalzium im Nährmedium fielen die Unterschiede zum System ohne Ionenzugabe nicht sehr groß aus. Unterschiede zwischen den Altersstufen waren vorwiegend bei FRD1153 zu bemerken. Die bei 24h noch überwiegenden viskosen Anteile des Biofilms wurden zunehmend durch elastische Anteile ergänzt. Der Schnittpunkt von Speicher und Verlustmodul verschob sich deutlich zu kleineren Frequenzwerten, d.h. zu einer höheren Lebensdauer des Netzwerkes.

Bei 10 mmol/l Kalzium im Nährmedium erkannte man bei FRD1 eine deutliche Plateauausbildung, die auf die zunehmende Vernetzung durch Coulomb Wechselwirkungen zurückzuführen war. Bei FRD1153 überwogen in diesen Systemen ebenfalls die elastischen Anteile, allerdings ohne ein deutliches Plateau auszubilden. Die Werte für das Speicher- und Verlustmodul bei gleichen Kreisfrequenzen lagen ebenfalls unter den des Stammes FRD1. Tabelle 12 zeigt einige rheologische Zusammenhänge auf.

Tabelle 12: Der Einfluss von Kalziumionen auf die Stämme FRD1 und FRD1153

Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	Kalziumkonzentration im Nährmedium [mmol/l]	Durchschnittliche Relaxationszeit λ [s]	Schermodul G_0 [Pa]	Ende des LVE Bereichs [%] ($\omega = 1$ rad/s)
FRD1	1	13 ± 6	455 ± 56	5 ± 1
	10	-	1620 ± 560	7 ± 3
FRD1153	1	$6,9 \pm 4,0$	84 ± 60	10 ± 4
	10	-	42 ± 22	97 ± 38

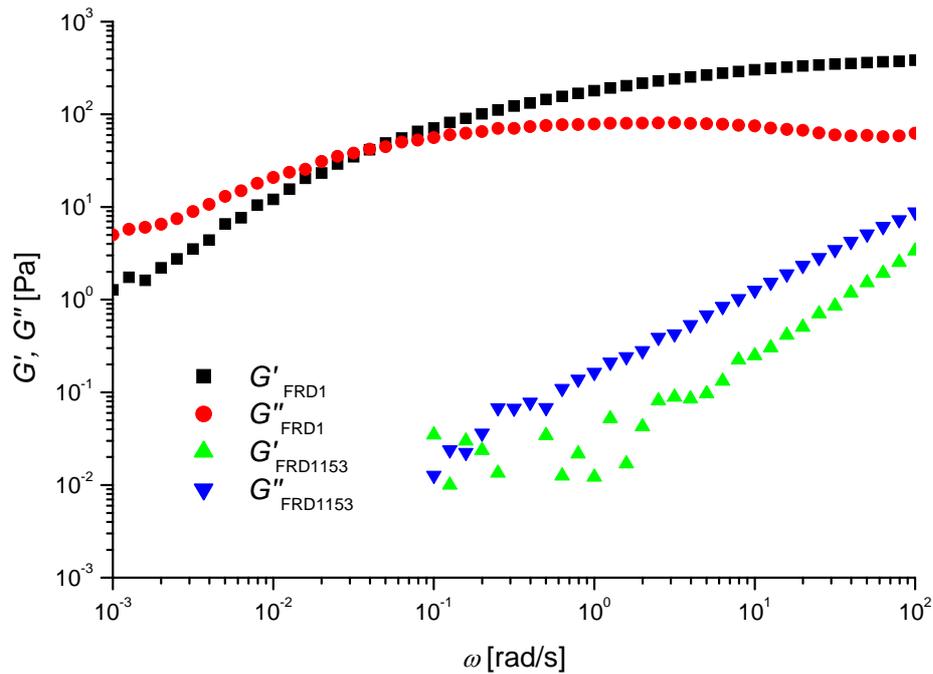


Abb. 116: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 1 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

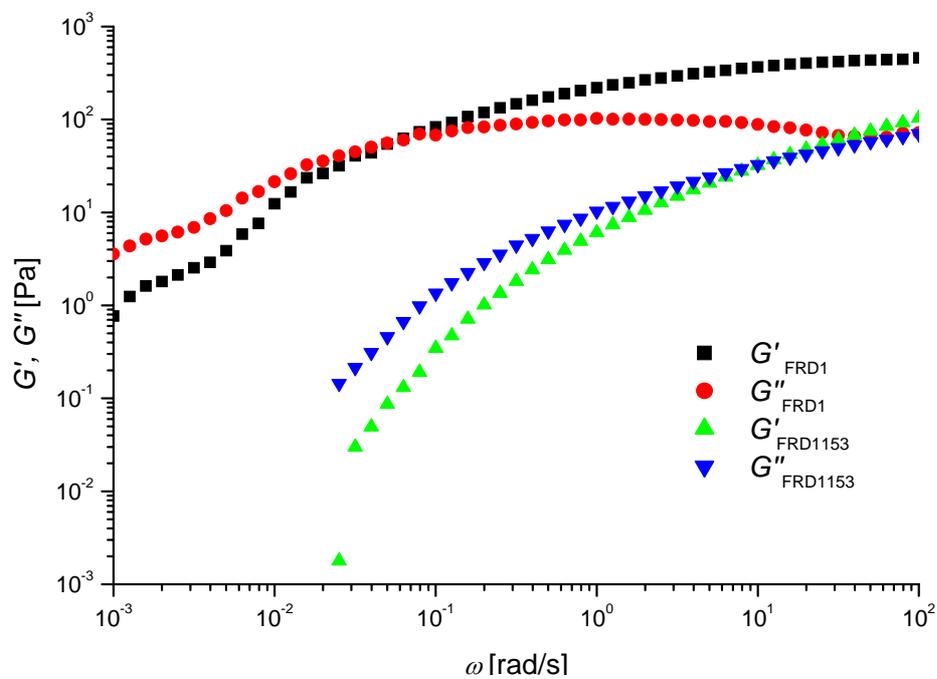


Abb. 117: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 1 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

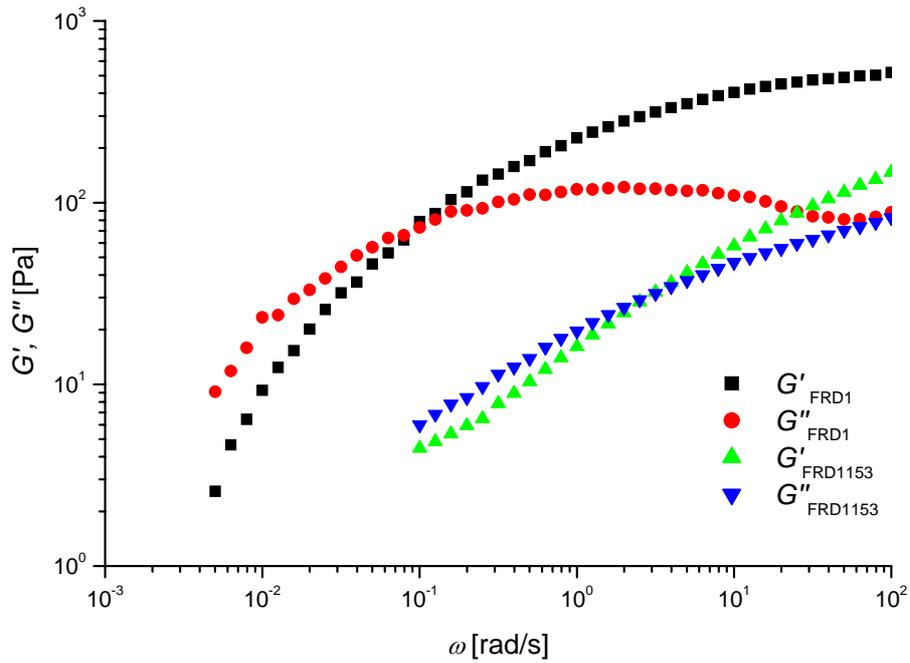


Abb. 118: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 1 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

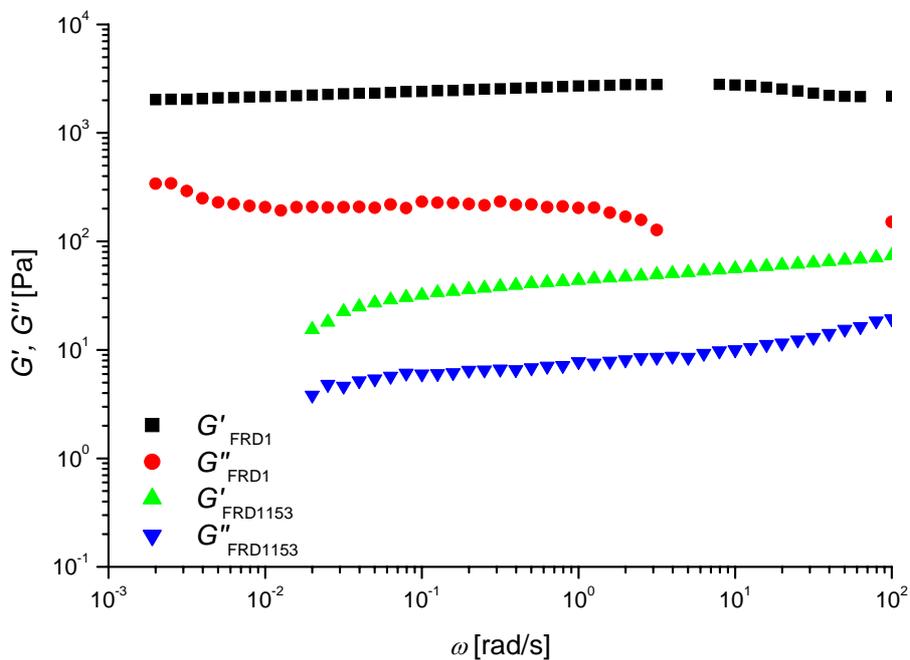


Abb. 119: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 24h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

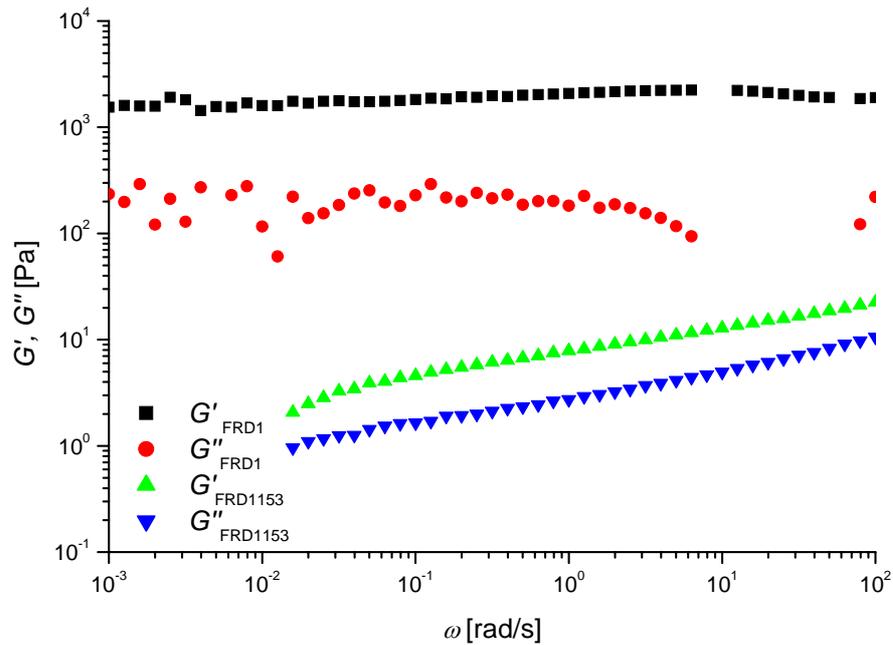


Abb. 120: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 48h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

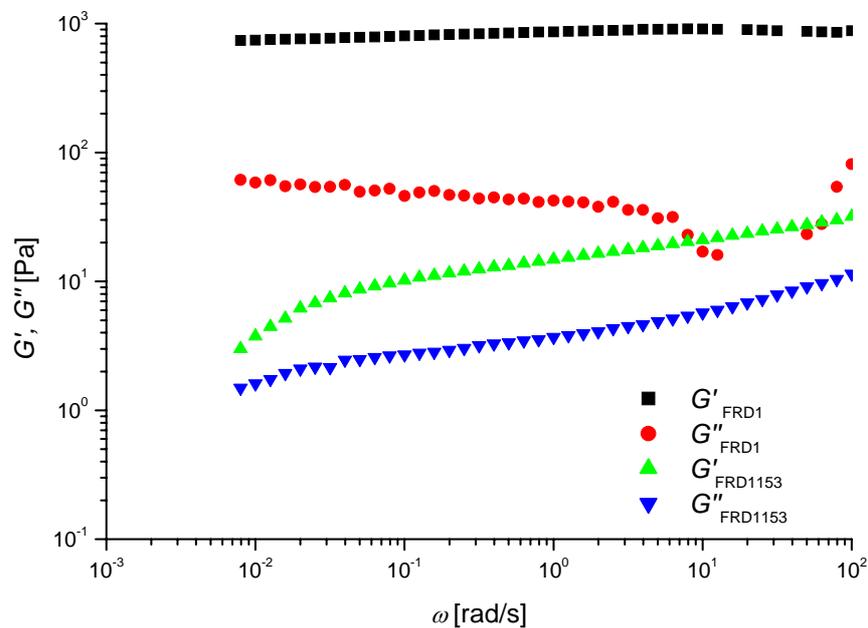


Abb. 121: Dynamische Eigenschaften von $G'(\omega)$ und $G''(\omega)$ als Funktion der Kreisfrequenz ω ($\gamma = 1\%$) für 72h alte Biofilme von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium.

4.8 Aufbau einer Strömungsdoppelbrechungsapparatur

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde ebenfalls eine Apparatur zur Messung der Strömungsdoppelbrechung von Biofilmen in einer Fließzelle aufgebaut. Dazu wurde ein modulares System der Firma Linos mit Mikrobank[®] Komponenten verwendet. Diese Art des Aufbaus ermöglicht eine Messdurchführung analog der in Kapitel 3.4 beschriebenen möglichen Methoden der Bestimmung der Strömungsdoppelbrechung.

Die verwendete Fließzelle wird im Biofilm Centre der Uni Duisburg-Essen für CLSM Mikroskopieuntersuchungen eingesetzt und sollte parallel auch in der Strömungsdoppelbrechung nutzbar sein, um nach der online erfolgten Detektion der Doppelbrechungseigenschaften auch eine anschließende Laser Scanning Mikroskopieuntersuchung zu ermöglichen. Die Zelle ist eine Spezialanfertigung aus Stahl mit eingesetzten optischen Glasfenstern. Um das System möglichst spannungsarm zu halten, wurden die optischen Bauteile durch eine Silikonverklebung befestigt.

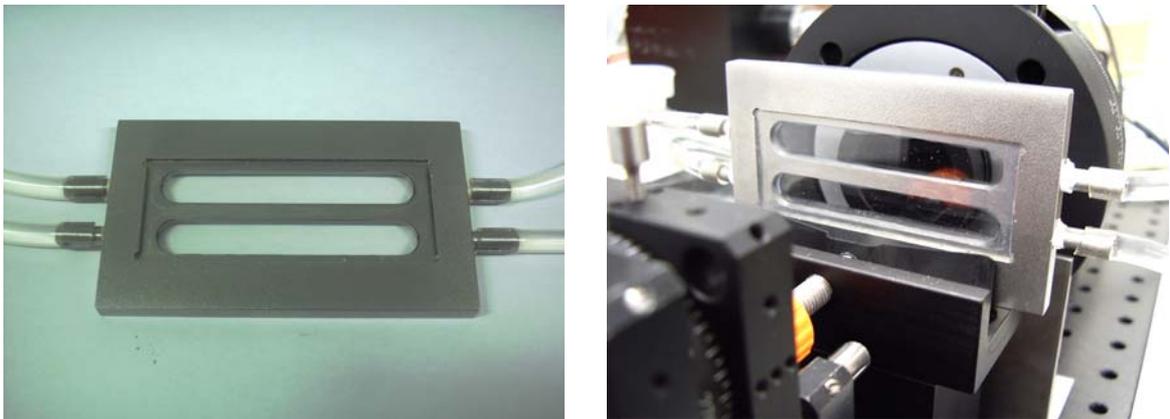


Abb. 122: Fließzelle zur Verwendung in der CLSM Mikroskopie und der Strömungsdoppelbrechung. Rechts in eingebautem Zustand.

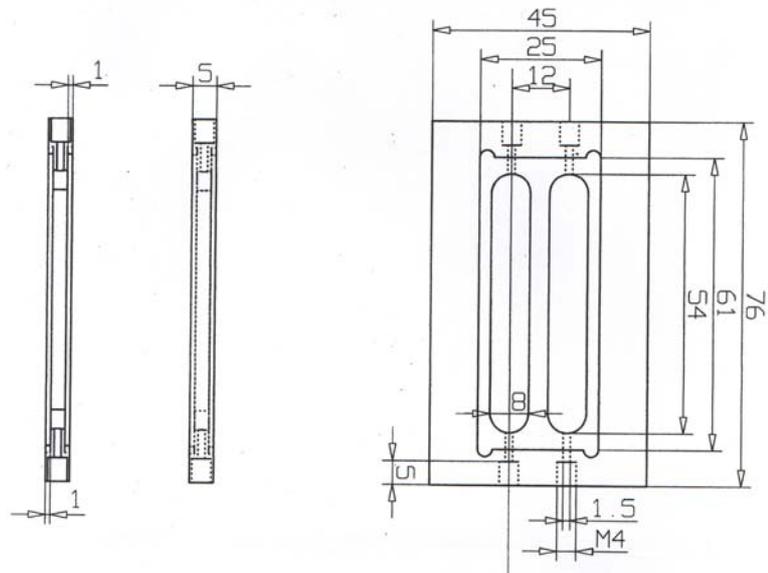


Abb. 123: Technische Daten / Abmessungen der Fließzelle in [mm]. (Bild aus dem AK Flemming).

Die Biofilme sollten direkt in der Zelle angezüchtet werden, als Durchflussmedium sollte deshalb eine vom gewünschten Biofilmtyp abhängende entsprechende Nährlösung verwendet werden. Der Durchfluss kann dabei auf einmalige Verwendung oder auch als Kreislauf eingestellt werden. Für kleine Durchflussmengen z.B. bei der Anzucht der Filme und für einen geringen Durchsatz an Nährlösung findet eine Ismatec Analysenpumpe IPC Verwendung. Die einstellbare Fließrate liegt zwischen 0,0015 und 44 ml/min. Für die eigentliche Messung und um einen möglichst pulsationsfreien Fluss zu erzeugen, wird eine Zahnradpumpe MCP-Z der Firma Ismatec verwendet. Die Fließrate ist abhängig vom verwendeten Pumpenkopf und liegt beim System Z142 zwischen 56 und 5640 ml/min, sowie beim System Z186 zwischen 1 und 102 ml/min.

Als Lichtquelle sind mehrere Optionen wählbar. Verwendet werden kann ein HeNe-Laser der Wellenlänge 633 nm, ein Diodenlaser der Wellenlänge 670 nm, und Halogenlicht in Verbindung mit entsprechenden Filtern. Die zu verwendende Lichtquelle kann mittels weniger Schrauben in der Grundplatte fixiert werden, und ist jederzeit austauschbar. Mikrobank-Polfilter werden als Polarisator und Analysator verwendet, ebenso ein auf die Wellenlänge abgestimmtes $\lambda/4$ -Plättchen. Die optischen Bauteile sind leicht in

vorgefertigte Fassungen einsetzbar und jederzeit den benötigten Bedingungen anpassbar. Um das System achsenabhängig rotieren zu können, finden zwei Drehtische Verwendung. Ein mechanischer Tisch mit Feineinstellung über eine Mikrometerschraube, sowie ein schrittmotorgesteuerter Tisch, der über ein eigenes Software Programm angesteuert wird. Zusätzlich sind noch mehrere der Bauteilhalterungen um bis zu 360° rotierbar.

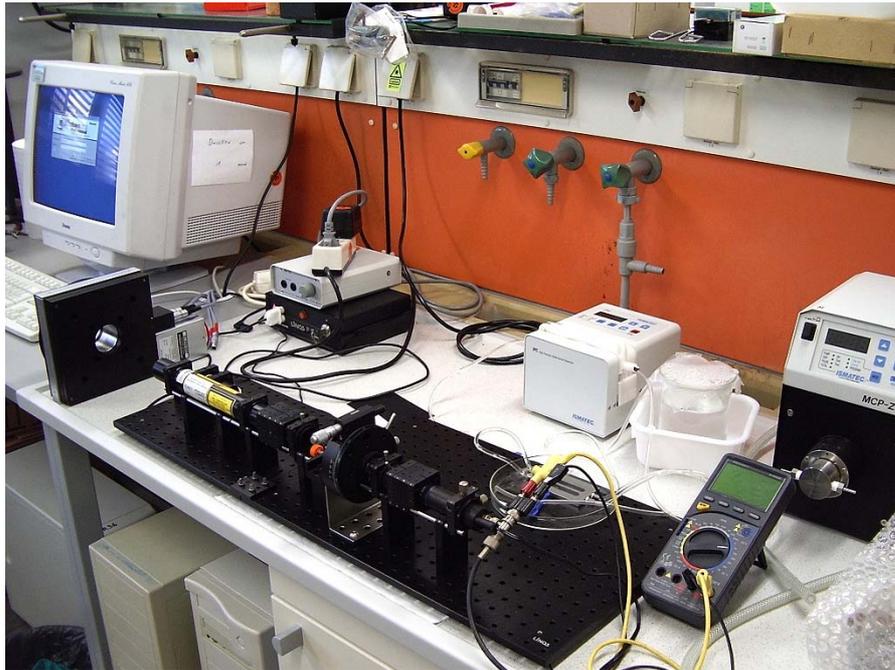


Abb. 124: Die Strömungsdoppelbrechungsapparatur in der Gesamtübersicht mit Fließzelle, Messwertaufnahme, Pumpen und EDV Verarbeitung.

Die Messsignalaufnahme erfolgt über ein Photodetektor, der an ein empfindliches Voltmeter M4660 der Firma Voltcraft angeschlossen ist. Dieses besitzt eine RS232 Schnittstelle um die Daten an ein eigenes Softwareprogramm zur Verarbeitung senden zu können. Eine weitere mögliche Ausbaustufe der Apparatur ist die Implementierung einer vorhandenen Becker&Hickl Lock-In PC-Verstärkerkarte LIA 150, da die möglichen Signale der Strömungsdoppelbrechung bei Biofilmen sehr gering sein können, sowie der Einbau einer vorhandenen Stemmer JAI M40 Kamera mit Progressive and Partial Scan Funktion, um den Aufwuchs der Filme in der Zelle optisch verfolgen zu können.

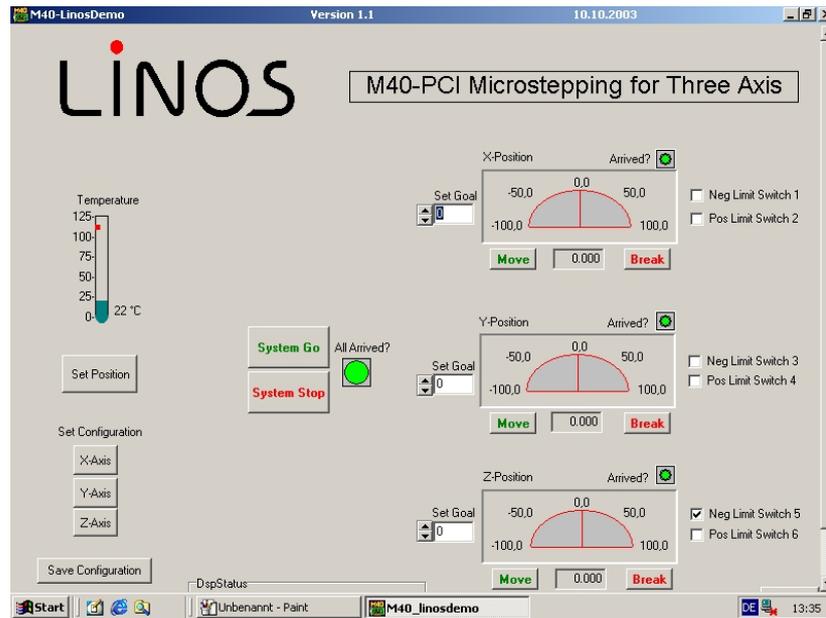


Abb. 125: Softwareprogramm zur Steuerung des Schrittmotors.

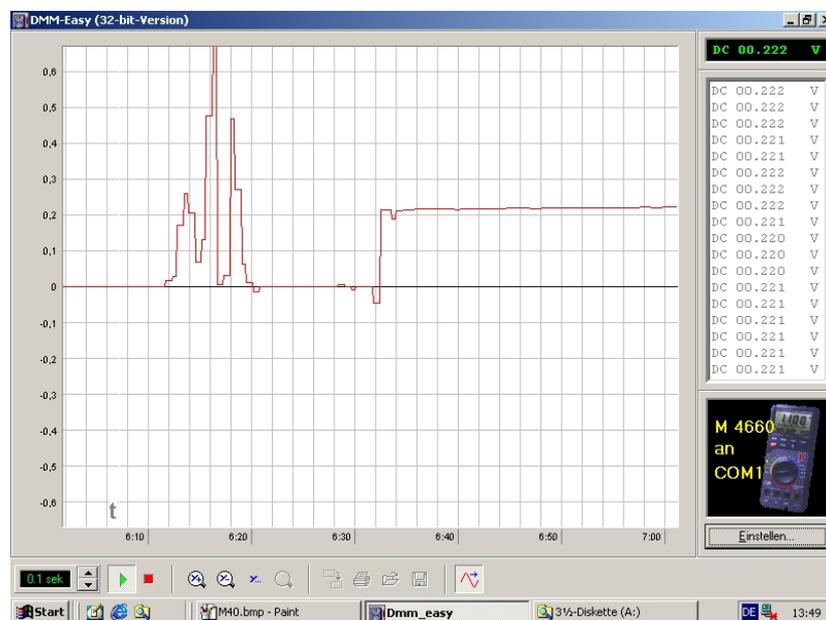


Abb. 126: Messwertaufnahme über ein eigenes PC Programm mittels des angeschlossenen Voltmeters.

5 Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen teilten sich in die Bereiche Untersuchungen zum Einfluss von Ionen an EPS Lösungen und vergleichbaren Systemen, Voruntersuchungen an Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81, Untersuchungen an Biofilmen von *P. aeruginosa* SG81 mittels rheologischer und ergänzender Methoden, Messungen zum Einfluss mehrwertiger Kationen wie Kalzium, Magnesium und Mangan auf *P. aeruginosa* SG81, Ermittlung struktureller Unterschiede mittels rheologischer Messungen an Biofilmen von *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153, und den Einfluss von Kalzium auf diese Systeme. Weiterhin wurde eine Apparatur zur Messung der Strömungsdoppelbrechung in Fließzellen konstruiert und aufgebaut, womit zukünftig Biofilme in Fließzellen online untersucht werden können.

Die Untersuchungen an EPS Lösungen zeigten ein dynamisches Netzwerk mit vorwiegend physikalischen Wechselwirkungen wie Entanglements, mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 17 ± 5 ms. Ausgehend vom gefundenen Durchschnittswert von $3,4 \cdot 10^{17}$ elastisch effektiven Ketten pro Liter Lösung in Abhängigkeit von der Konzentration, war jedes Makromolekül in Lösung zeitweise mit zwei anderen Ketten verbunden. Die gefundenen Relaxationszeiten wurden durch dynamische Lichtstreuungsexperimente bestätigt. Zusätzlich wurde für EPS Lösungen ein Zeta Potential von $-31,92$ mV gemessen. Die Messungen ließen vermuten, dass sich in der Lösung Cluster aus Alginatemolekülen bildeten. Fluoreszenzmessungen zeigten die Abwesenheit von hydrophoben Domänen.

Aus Lösungen der EPS, Natriumalginat und Manuocol wurden homogene Kalziumgele in verschiedenen Konzentrationen mittels CaCO_3 und Gluco- δ -Lacton hergestellt, und rheologische Parameter zur Struktur der Systeme bestimmt (Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2). Abhängig von Unterschieden in ihrem Aufbau (Molekulargewicht, Acetylgruppen in den Polysaccharidketten usw.) zeigten sie ein unterschiedliches Verhalten auf den Einfluss von Kalziumionen. Die grundlegenden Mechanismen der Vernetzung des dynamischen Netzwerkes mittels Coulombscher Wechselwirkungen waren jedoch einheitlich, so dass diese Systeme auch als einfache Modelle genutzt werden könnten.

Die EPS Lösung könnte ebenfalls als einfaches Modell des Biofilms betrachtet werden, unter Berücksichtigung der fehlenden weiteren Bestandteile und der entsprechenden Verdünnung. Ein Vergleich mit entsprechend 1:16 verdünntem Biofilm zeigte die Analogie. Es gab jedoch leichte Abweichungen von dem erwarteten Verhalten, da sich die Biofilmlösung zur EPS Lösung wie ein System mit Füllpartikeln verhalten müsste. Diese Abweichungen könnten aber mit der nicht identischen Grundsubstanz erklärbar sein. EPS Lösung und Biofilmlösung wurden zeitlich versetzt aus unterschiedlichen Biofilmen angezüchtet. Eine erneute Messung aus einheitlicher Grundsubstanz müsste dieses Verhalten klären.

Im Rahmen von verschiedenen Voruntersuchungen wurde u.a. untersucht, ob eine Aufzucht von Biofilmen auf Celluloseacetatmembranen ein Einfluss auf das Messergebnis hatte. Ein Vergleich zeigte keinen signifikanten Einfluss des Filters, weshalb weitere Untersuchungen größtenteils mit Filter stattfanden, was einen zerstörungsfreien Transport des Biofilms in die Messgeometrie ermöglichte. Der Einfluss verschiedener Messgeometrien wurde ebenfalls untersucht. Auch hierbei zeigte sich kein nachteiliger Einfluss bestimmter Messgeometrien. In weiteren Untersuchungen wurden andere Einflussgrößen untersucht und optimiert (Kapitel 4.6).

Rheologische Messungen nativer Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 zeigten ein viskoelastisches Verhalten, mit mehrheitlich elastischen Anteilen. Diese Filme ließen sich beim Amplitudentest bis zu ca. 70 % deformieren, bis ein Strukturabbau begann. Frequenztests zeigten ein dynamisches Netzwerk mit überwiegend physikalischen Wechselwirkungen („Entanglements“), welches eine durchschnittliche Lebensdauer von ca. 16 ± 10 Sekunden aufwies. Dieses Netzwerk ließ sich u.a. mit dem verallgemeinerten Maxwell-Modell beschreiben. Ein Relaxationszeitspektrum zeigte Relaxationszeiten zwischen 0,1 und 30 Sekunden. Die Anzahl der elastisch effektiven Ketten (Verknüpfungspunkte) ließ sich mit $5,2 \pm 0,8 \cdot 10^{19}$ Ketten/l für ein 24h alten Biofilm bestimmen. Des Weiteren konnte ein Alterungsprozess gefunden werden. Biofilme mit 48h oder 72h Lebensalter zeigten veränderte Werte, dessen Tendenz zu kleineren Deformationswerten bei Amplitudentests, bzw. zu höheren Modul-Werten und einer erhöhten Relaxationszeit bei Frequenztests führte. Auch ein durchgeführter Zeittest zeigte,

dass die rheologischen Eigenschaften des Biofilms sich mit der Zeit leicht veränderten. Da es sich um lebendes Material handelte, würden sich diese Beobachtungen mit Veränderungen im Material selbst z.B. durch Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen etc. erklären lassen. Eine Aufklärung dieses Phänomens würde jedoch weitergehende Untersuchungen mit anderen Methoden bedingen. In Kombination mit den Messergebnissen der EPS Lösungen, kann auch davon ausgegangen werden, dass vornehmlich das Alginat für die Netzwerkeigenschaften verantwortlich war.

Der Effekt der Vernetzung des Biofilmnetzwerkes mittels dem Nährmedium zugefügter zweiwertiger Ionen konnte in einer weiteren Untersuchungsreihe gemessen werden. Es zeigte sich eine Effektstärke in der Reihenfolge Kalzium > Mangan > Magnesium. Je nach Ionenkonzentration konnte bei Frequenztests der Übergang vom dynamischen Entanglement-Netzwerk zum durch Coulomb-Wechselwirkung fest vernetzten System beobachtet werden. Die vorhandenen dynamischen Netzwerkpunkte wurden dabei zunehmend durch Coulombsche Vernetzung überlagert, in Anlehnung an „trapped Entanglements“. Bei 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium entsprachen die Werte z.B. einer Verdopplung der elastisch effektiven Ketten im Netzwerk, im Vergleich zum System ohne Ionenzugabe. Damit verbunden wurden die jeweiligen spezifischen rheologischen Daten der untersuchten Systeme gemessen (Gleichgewichtsschermodul G_0 , Schub- und Verlustmodul, Anzahl der elastisch effektiven Ketten, z.T. Relaxationszeiten, Deformationsverhalten, etc.). Die höhere Vernetzung führte zu steiferen Biofilmstrukturen, was u.a. bei Amplitudentests in einem früheren Ende des LVE Bereiches detektiert werden konnte.

Auch bei den Filmen mit Ionenzugabe war ein Effekt des Messzeitpunktes zu beobachten. Mit zunehmendem Biofilmalter (24h, 48h, 72h) erfolgte eine leichte Änderung des rheologischen Verhaltens, analog den Messungen ohne Ionenzugabe. Für das Gleichgewichtsschermodul G_0 wurde ein annähernd linearer Verlauf über die Zeit gemessen.

Ausgehend von den gemessenen Werten, ist z.B. auch die im dynamischen Netzwerk vorhandene theoretische Beweglichkeit der Organismen in mit Ionen vernetzten Systemen eingeschränkt bis unmöglich, da hier die Verknüpfungsstellen nichttemporärer Natur sind.

Die vom Biofilm tatsächlich aufgenommene Menge an Ionen wurde an den Biofilmstämmen *P. aeruginosa* FRD1 und FRD1153 mit Acetylgruppendefekt am Beispiel des Kalziums analytisch untersucht. Hier zeigte sich, dass die effektive Menge an Kalzium im Biofilm bei eingesetzten 1 mmol/l ca. 0,05 mmol/l, bzw. bei eingesetzten 10 mmol/l bei ca. 0,34 mmol/l lag. Die effektive Konzentration war in beiden Stämmen gleich groß, der Mechanismus des Ionentransportes vom Nährmedium in den Biofilm war damit von der Alginatstruktur unabhängig.

Die Unterschiede in der Struktur des produzierten Alginates äußerten sich hingegen deutlich in den durchgeführten rheologischen Messungen. Mittels des Abstandsmessgerätes konnte auch eine Biofilmdicke von $415 \pm 20 \mu\text{m}$ (FRD1), $150 \pm 14 \mu\text{m}$ (FRD1153) und $390 \pm 25 \mu\text{m}$ (SG81) bestimmt werden.

FRD1153 bildete einen viskoelastischen Biofilm mit weitaus viskoserem Anteil als FRD1, sowie einem geringeren Feuchtgewicht. Bei FRD1 überwogen die elastischen Anteile. Die geringere Molmasse und somit kürzeren Ketten von FRD1153 äußerten sich in einem früheren Strukturabbau bei Amplitudentests. Auch der Schnittpunkt von Speicher- und Verlustmodul war bei FRD1153 zu höheren Frequenzen und somit zu einer kürzeren Lebensdauer des Netzwerkes verschoben (ca. 0,2 s bei FRD 1153 zu ca. 13 s bei FRD1). Ein durchgeführter Cox-Merz Test zeigte auch hier ein dynamisches Netzwerk mit überwiegend physikalischen Wechselwirkungen. Die Anzahl der elastisch effektiven Ketten im Netzwerk der EPS von FRD1153 lag bei etwas weniger als einem Viertel derjenigen von FRD1. Insgesamt konnten die Unterschiede im Alginat (Fehlen von Acetylgruppen), die zu einer veränderten Biofilmstruktur führten, rheologisch sehr gut charakterisiert werden.

Das Vorhandensein von Kalzium im Nährmedium führte zur Einführung von Coulombschen Wechselwirkungen ins EPS Netzwerk. Bei *P. aeruginosa* FRD1 ähnlich wie bei SG81. Hier wurden die vorhandenen Entanglements zunehmend durch Coulombsche Kräfte überlagert. Es bildete sich tendenziell ein starres, fest vernetztes System aus. Bei 1 mmol/l Kalziumgehalt war der Effekt noch nicht sichtbar (Relaxationszeit ca. 13 s), bei 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium war eine Plateaubildung detektierbar (keine Relaxation).

Bei FRD1153 wurden durch die Kalziumionen und die Coulombsche Vernetzung zunehmend elastische Anteile ins Netzwerk eingeführt und die Lebensdauer der elastisch effektiven Ketten erhöht (Relaxationszeit ca. 6,9 s bei 1 mmol/l Ca^{2+}). Bei 10 mmol/l Kalziumgehalt im Nährmedium überwogen dann die elastischen Anteile im viskoelastischen Netzwerk (keine Relaxation). Während FRD1 unter Kalziumeinfluss ein starres Netzwerk mit deutlichem Plateaubereich bildete, wurden bei gleichen Ionenkonzentrationen bei FRD1153 erst weitere elastische Anteile ins Netzwerk eingeführt. Das Netzwerk blieb flexibler, tendenziell war eine Plateaubildung erkennbar, jedoch weitaus schwächer als bei FRD1. Aufgrund der Netzwerkstruktur war bei geringen Kalziumkonzentrationen im Nährmedium (1 mmol/l) noch eine theoretische Beweglichkeit der Mikroorganismen im Biofilm gegeben. Diese war bei höheren Konzentrationen (10 mmol/l Ca^{2+} im Nährmedium) eingeschränkt, bis nicht mehr möglich.

Die Messergebnisse zeigten, dass die Bildung eines stabilen Biofilms von der Anwesenheit von Acetylgruppen in den von Bakterien produzierten extrazellulären Alginaten abhing. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von Kalziumionen, welche u.a. in der natürlichen Umgebung vorkommen, verstärkt. Dies könnte für das Überleben von Biofilmen in speziellen Lebensräumen ein Vorteil sein. Als Beispiel sei hier die Lungeninfektion von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) genannt, wo *P. aeruginosa* in Form von Mikrokolonien und Biofilmen siedelt (Lam et al. 1980, Singh et al. 2000). In dieser Umgebung herrscht keine große mechanische Beanspruchung, zusätzlich wurde eine erhöhte Kalziumkonzentration im Sputum dieser Patienten gefunden (Kilbourn 1978). Diese Umstände könnten die Bildung von mukoiden Biofilmen, ähnlich den hier untersuchten Systemen fördern, welche aufgrund ihrer Stabilität sehr widerstandsfähig gegen antimikrobielle Komponenten und Reaktionen des Immunsystems sind (Sarkisova et al. 2005).

6 Literaturverzeichnis

Aspinall G.O. 1982, *The polysaccharides*, Academic Press, New York.

Auerbach I.D., Sorensen C., Hansma H.G., & Holden P.A. 2000, "Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms", *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 13, pp. 3809-3815.

Bishop P.L. 1997, "Biofilm structure and kinetics", *Water Science and Technology*, vol. 36, no. 1, pp. 287-294.

Characklis W.G. 1979, *Biofilm development and destruction*, Electric Power Institute, Palo Alto.

Christensen B.E. & Characklis W.G. 1990, "Physical and chemical properties of biofilms," in *Biofilms*, Characklis W.G. & Marshall K.C. eds., John Wiley & Sons, New York, pp. 93-130.

Clasen C. 2001, *Neue Charakterisierungsmöglichkeiten von supramolekularen Strukturen in Biopolymerlösungen mit rheooptischen Methoden*, Shaker Verlag, Aachen.

Costerton J.W. & Irvin R.T. 1981, "The bacterial glycocalyx in nature and disease", *Ann.Rev.Microbiol.*, vol. 35, pp. 299-324.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., & Lappinscott H.M. 1995, "Microbial biofilms", *Annual Review of Microbiology*, vol. 49, pp. 711-745.

Costerton, J.W. & Stewart, P.S. 2001, "Bekämpfung bakterieller Biofilme", *Spektrum der Wissenschaft*, vol. 11, pp. 58-65.

Costerton J.W., Stewart P.S., & Greenberg E.P. 1999, "Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections", *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322.

Debeer D., Stoodley P., & Lewandowski Z. 1994, "Liquid flow in heterogenous biofilms", *Biotech.Bioeng.*, vol. 44, pp. 636-641.

Dominguez A., Fernandez A., Gonzalez N., Iglesias E., & Montenegro L. 1997, "Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques", *Journal of Chemical Education*, vol. 74, no. 10, pp. 1227-1231.

Dörfler H.D. 2002, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer Verlag, Berlin.

Draget K.I., Ostgaard K., & Smidsrod O. 1990, "Homogeneous alginate gels - a technical approach", *Carbohydrate Polymers*, vol. 14, no. 2, pp. 159-178.

- Draget K.I., Ostgaard K., & Smidsrod O. 1989, "Alginate-based solid media for plant-tissue culture", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 31, no. 1, pp. 79-83.
- Ferry J.D. 1980, *Viscoelastic properties of polymers*, 3rd ed., Wiley, New York.
- Filisetti-Cozzi T.M.C.C. & Carpita N.C. 1991, "Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars", *Analytical Biochemistry*, vol. 197, no. 1, pp. 157-162.
- Fischer P. 1995, *Nicht-lineare rheologische Phänomene in viskoelastischen Tensidlösungen*, Wissenschaftlicher Buchverlag Dr. Fleck, Giessen.
- Flemming H.C. 1994, *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Materialschädigung*, Band 129, Oldenbourg Verlag, München.
- Flemming H.C. & Wingender J. 2002, "Was Biofilme zusammenhält.", *Chemie in unserer Zeit*, vol. 36, pp. 30-42.
- Flemming H.C. & Wingender J. 2001, "Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien.", *Biologie in unserer Zeit*, vol. 31, pp. 169-180.
- Flory P.J. 1975, "Introductory lecture", *Farad discuss chem soc*, no. 57, pp. 7-18.
- Fuller G.G. 1995, *Optical rheometry of complex fluids*, Oxford University Press, New York.
- Gacesa P. 1988, "Alginates", *Carbohydrate Polymers*, vol. 8, no. 3, pp. 161-182.
- Graessly W.W. 1975, "The entanglement concept in polymer rheology", *Advances in Polymer Science*, vol. 16.
- Grobe S., Wingender J., & Truper H.G. 1995, "Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems", *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 79, no. 1, pp. 94-102.
- Hecht E. 2005, *Optik*, Oldenbourg Verlag, München.
- Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G.J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., & Parsek M. R. 2001, "Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function", *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 18, pp. 5395-5401.
- Janeschitz-Kriegl H. 1969, "Flow birefringence of elastico-viscous polymer systems", *Advances in Polymer Science*, vol. 6, pp. 170-318.
- Klapper I., Rupp C.J., Cargo R., Purvedorj B., & Stoodley P. 2002, "Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 80, no. 3, pp. 289-296.
- Knarr M. 2003, *Rheologische Untersuchungen und Modellierung der Sol-Gel Charakteristika von Methylcellulose und k-Carrageenan*, Dissertation, Universität Hamburg.

Körstgens V., Flemming H.C., Wingender J., & Borchard W. 2001, "Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 46, no. 1, pp. 9-17.

Krumbein W.E. & Villbrandt M. 1993, "Biofilme und Mikrobenmatten extremer Lebensräume," in *Extremophile: Mikroorganismen in extremen Lebensräumen*, Hausmann K. & Kraemer B.P., VCH Verlag, Weinheim, pp. 113-140.

Kulicke W. M. 1986, *Fliessverhalten von Stoffen und Stoffgemischen*, Huethig & Wepf, Basel; Heidelberg; New York.

Lee J.W., Ashby R.D., & Day D.F. 1996, "Role of acetylation on metal induced precipitation of alginates", *Carbohydrate Polymers*, vol. 29, no. 4, pp. 337-345.

Lewandowski Z., Stoodley P., & Altobelli S. 1995, "Experimental and conceptual studies on mass-transport in biofilms", *Water Science and Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 153-162.

Linker A. & Jones R.S. 1964, "Polysaccharide resembling alginic acid from *Pseudomonas* microorganism", *Nature*, vol. 204, no. 495, p. 187-&.

Löbl M. 1984, *Strömungsdoppelbrechung und Fließverhalten viskoelastischer Tensidlösungen*, Dissertation, Universität Bayreuth.

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., & Flemming H.C. 1999, "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 26, no. 1, pp. 3-16.

Meschede D. 2006, *Gerthsen Physik*, Springer Verlag, Berlin.

Mezger T. G. & Zorll U. 2002, *The rheology handbook : for users of rotational and oscillatory rheometers*, C. R. Vincentz Verlag, Hannover.

Pflaumbaum M. 2002, *Rheologische Untersuchungen an viskoelastischen Tensidlösungen*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen.

Ohashi A., Koyama T., Syutsubo K., & Harada H. 1999, "A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting erosion", *Water Science and Technology*, vol. 39, no. 7, pp. 261-268.

Okabe S., Hirata K., & Watanabe Y. 1997, "Significance of the spatial distribution of microbial species in mixed-population biofilms", *Biofouling*, vol. 11, no. 2, pp. 119-136.

Olsson C. 1998, *Structure-related rheology of colloidal biopolymer mixtures*, Göteborg.

Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., & Axelos M.A.V. 1998, "Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations", *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, no. 5, pp. 393-408.

Ross-Murphy S.B. & Todd, S. 1983, "Ultimate tensile measurements of filled gelatin gels", *Polymer*, vol. 24, no. 4, pp. 481-486.

- Reinhardt U.T. 1995, *Rheo-mechanische und rheo-optische Charakterisierung wässriger Biopolymerlösungen*, Shaker Verlag, Aachen.
- Schürks N., Wingender J., Flemming H. C., & Mayer C. 2002, "Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 30, no. 2, pp. 105-111.
- Silberberg A. 1989, "Gelled aqueous systems", *Advances in Chemistry Series* no. 223, pp. 3-14.
- Skjak-Braek G, Zanetti P., & Paoletti S. 1989, "Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates", *Carbohydrate Research* no. 185, pp. 131-138.
- Stokke B. T., Draget K. I., Smidsrod O., Yuguchi Y., Urakawa H., & Kajiwara K. 2000, "Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca-alginate gels", *Macromolecules*, vol. 33, no. 5, pp. 1853-1863.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., & Costerton, J.W. 2002, "Biofilms as complex differentiated communities", *Annu.Rev.Microbiol.*, vol. 56, pp. 187-209.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., & Klapper, I. 2002, "Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena", *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.*, vol. 29, no. 6, pp. 361-367.
- Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J.D., & 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", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 65, no. 1, pp. 83-92.
- Straatmann A. & Borchard W. 2002, "Determination of thermodynamic properties of sodium alginate from bacteria and seaweeds in aqueous solutions", *Progressiv Colloid Polymer Science*, no. 119, pp. 64-69.
- Sutherland I.W. 1994, "Structure-function-relationships in microbial exopolysaccharides", *Biotechnology Advances*, vol. 12, no. 2, pp. 393-448.
- Sutherland I.W. 2001, "Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures", *Water Science and Technology*, vol. 43, no. 6, pp. 77-86.
- TA Instruments 2004, *Optical analysis module user manual*. TA Instruments.
- Thiele H. 1967, *Histolyse und Histogenese Gewebe und ionotrope Gele. Prinzip einer Strukturbildung*. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M.
- Tielen P., Strathmann M., Jaeger K.E., Flemming H.C., & Wingender J. 2005, "Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*", *Microbiological Research*, vol. 160, no. 2, pp. 165-176.

Towler B.W., Rupp C.J., Cunningham A.B., & Stoodley P. 2003, "Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis", *Biofouling*, vol. 19, no. 5, pp. 279-285.

Tschoegl N.W. 1989, *The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior an introduction*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Vinogradov A.M., Winston M., Rupp C.J., & Stoodley P. 2004, "Rheology of biofilms formed from the dental plaque pathogen *Streptococcus mutans*", *Biofilms* no. 1, pp. 49-56.

Vinogradov G.V. & Malkin A.I. 1980, *Rheology of polymers viscoelasticity and flow of polymers*, Mir, Moscow.

Wang Z. Y., Zhang Q. Z., Konno M., & Saito S. 1993, "Sol-gel transition of alginate solution by addition of calcium ions. Alginate concentration-dependence of gel point", *Journal de Physique II*, vol. 3, no. 1, pp. 1-7.

Windhues T. & Borchard W 2003b, "Thermodynamic characterization of extracellular polymeric substances and their alginate component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with light scattering techniques", *International Journal of Biological Macromolecules*.

Windhues T. & Borchard W. 2003a, "Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques", *Carbohydrate Polymers*, no. 52, pp. 47-52.

Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., & Flemming, H. C. 2001, "Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*", *Methods Enzymol.*, vol. 336, pp. 302-314.

Wingender J., Neu T.R., & Flemming H.C. 1999, *Microbial extracellular polymeric substances. Characterization, structure, and function*, Springer, Berlin.

Wloka M., Rehage H., Flemming H.C., & Wingender J. 2004, "Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels", *Colloid and Polymer Science*, vol. 282, no. 10, pp. 1067-1076.

Yalpani M. 1988, *Polysaccharides, syntheses, modifications and structure/property relations*, Elsevier, Amsterdam.

Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwaru K., Draget K.I., & Stokke B.T. 2000, "Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 2. Time-resolved studies on ionotropic gels", *Journal of Molecular Structure*, vol. 554, no. 1, pp. 21-34.

Zimm B.H. 1958, "Photoelectric flow birefringence instrument of high sensitivity", *Review of Scientific Instruments*, vol. 29, no. 5, pp. 360-367.

7 Anhang

7.1 Gerätespezifische Berücksichtigungen des Rheometrics RFS II

Das verwendete Rheometer RFS II von Rheometrics Scientific wurde in regelmäßigen Abständen gewartet, kalibriert und lt. Herstellerangaben justiert.

Zur Kalibrierung wurde ein zertifiziertes Siliconöl mit einer Scherviskosität $\eta = 964$ Pas bei $T = 20$ °C der Physikalisch Technischen Bundesanstalt (PTB) verwendet. Als Geometrie kam ein Kegel-Platte System mit 0,02 rad Kegelwinkel zum Einsatz. Für Rotation- und Oszillationsversuche wurde ein Newtonsches Verhalten der Scherviskosität η und des Betrages der komplexen Viskosität $|\eta^*|$ mit einem mittleren absoluten Fehler von 5,1 % gemessen.

7.2 Elektronische und mechanische Verzögerungszeit

Die Gesamtverzögerungszeit t_G des Rheometers setzt sich zusammen aus der elektronischen Verzögerungszeit t_E und der mechanischen Verzögerungszeit t_M .

$$t_G = t_E + t_M \quad (53)$$

Die elektronischen Verzögerungszeit t_E ergibt sich aus dem elektronischen Datenaufnahmesystem des RFS II, während die mechanischen Verzögerungszeit t_M durch die mechanische Trägheit des Antriebs und des Messwertaufnehmers verursacht wird. Diese Größen sind bei Messungen als Funktion der Zeit (z.B. Relaxationsversuche) zu berücksichtigen.

Die Bestimmung der Zeitkonstanten t_E und t_M erfolgt in Schubspannungs-Zeit Diagrammen, die jeweils für Relaxationsversuche mit verschiedenen Deformationen γ erstellt wurden. (Fischer 1995).

Eine Übersicht über die Verzögerung der Schubspannung (Zeitkonstanten) für verschiedene Scherraten $\dot{\gamma}$ für den Relaxationsversuch gibt Tabelle 13 wieder. Die Werte zur Bestimmung der Zeitkonstanten der Schubspannung für konstante Deformationen γ im Bereich zwischen 0,5% und 50% ergeben sich aus Tabelle 14. Daraus ergibt sich, dass die Mechanik des Rheometers bei deformationsgesteuerten Versuchen deutlich schneller reagiert als bei scherratengesteuerten Versuchen, bei jeweils annähernd identischer elektronischer Verzögerungszeit t_E .

Tabelle 13: Zeitkonstanten der Schubspannung für den Relaxationsversuch bei konstanter Scherrate (Fischer 1995)

Scherrate $\dot{\gamma}$ [1/s]	Zeitkonstante der Schubspannung t_E [s]	Zeitkonstante der Schubspannung t_M [s]
0,5	0,005	0,06
1	0,005	0,06
10	0,01	0,06-0,08
50	0,01	0,11

Tabelle 14: Zeitkonstanten der Schubspannung für den Relaxationsversuch bei konstanter Deformation (Fischer 1995)

Deformation γ [%]	Zeitkonstante der Schubspannung t_E [s]	Zeitkonstante der Schubspannung t_M [s]
0,5	0,005	0,015
1	0,005	0,015
5	0,005	0,015
10	0,005	0,015
20	0,01	0,02
50	0,01	0,02

Lebenslauf

Name: Markus Wloka

Geburtstag: 05.10.1970

Geburtsort: Bottrop

Eltern: Vater: Klaus Wloka ,
Mutter: Irmgard Wloka, geb. Stolot

Schulbildung: von 08/1977 bis 07/1981 städtische
Grundschule Bottrop-Batenbrock

von 08/1981 bis 06/1990 Vestisches
Gymnasium Bottrop

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: von 07/1990 bis 09/1991, zuletzt
Verpflichtung auf 15 Monate

Studium: 10/1991 Beginn des Studiums der Diplom-
Chemie an der Universität-Gesamthochschule
Essen.
01/1995 Diplom-Vorprüfung.

Von 07/2001 – 08/2001 mündliche
Diplomhauptprüfungen DII.

Von 11/2001 – 04/2002 praktische
Diplomarbeit zum Thema Biofilme im AK
Prof. Rehage.

05/2002 – 07/2002 wissenschaftliche
Hilfskraft AK Rehage Uni Essen.

08/2002 – 07/2004 Doktorarbeit AK Rehage
Uni Essen.

08/2004 – 04/2006 Doktorarbeit AK Rehage
Uni Dortmund.
