

Experimentelle Untersuchungen zur mechanischen Beanspruchung von künstlichen Biofilmsystemen

Stipendiat: Dipl.-Ing. J. Hellriegel, Institut für Bioverfahrenstechnik, TU Braunschweig

1 Abstract

Das Ziel des Projektes bestand in der experimentellen Charakterisierung von künstlichen, wachstumsentkoppelten Biofilmimitaten auf Hydrogel-Basis unter fluidmechanischen Belastungen in einem Durchflussbiofilmreaktor (Flow Through Biofilm Tube Reactor, FTBTR).

Untersuchungen mit unterschiedlichen Materialformulierungen sollten es ermöglichen, die mechanische Stabilität und die Struktur dieser synthetischen Biofilme zu charakterisieren sowie die mechanischen Eigenschaften realer Biofilme nachzubilden, um damit ein auf der Finite-Elemente (FE)-Methode basierendes adaptives Hybridmodell zur Beschreibung fluid-dynamischer Beanspruchungen von Biofilmen zu entwickeln. Aufbauend auf diesen synthetischen Filmen sollten auch Single-Spezies-Biofilme (SSBs) vergleichend in die Untersuchungen einbezogen werden.

Als künstliches Biofilmsystem wurde ein Hydrogel auf Basis von Gellan etabliert, das sich ähnlich einem viskoelastischem Fluid verhält. Der Vernetzungsgrad kann bei unterschiedlichen Gellan-Gehalten durch die Zugabe von ein- und zweiwertigen Ionen (Na^+ , Mg^{2+}) variiert werden. Durch statistische Versuchsplanung mittels Central Composite Design (CCD) wurden durch rheologische Experimente in einem vorgegebenen Bilanzraum bei Variation des Gellan-Gehalts sowie der Na^+ - und Mg^{2+} -Konzentration die Materialkonstanten des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') für das Biofilm-ähnliche Hydrogel bestimmt. Das daraus resultierende empirische Modell stellt ein geeignetes Werkzeug dar, um das mechanische Verhalten realer Biofilme zu simulieren. Die prädiktierten und experimentell bestimmten viskoelastischen Kennwerte für G' und G'' des Hydrogels unterschieden sich im Frequenzbereich zwischen $0,1$ und 10 s^{-1} um weniger als 17% und zeigen ähnliche Werte auf, wie reale Modellbiofilmproben von *Pseudomonas putida* KT2440.

Die entwickelte Methode erlaubt es, die mechanischen Eigenschaften eines Biofilms auf der Grundlage des Gellan-basierten Hydrogels ohne Berücksichtigung biologischer Wachstumseffekte zu bestimmen. Damit können nunmehr weitere Charakterisierungsmethoden getestet und Biofilme mit geringen spezifischen Wachstumsraten, deren Systemfehler oft kleiner als die biologische Varianz ist, überprüft werden. Letztendlich ermöglicht die Methode eine schnelle und zuverlässige mechanische Prüfung von Biofilmsystemen.

2 Ergebnisse

2.1 Versuche mit künstlichen Biofilmen

Zur Entwicklung eines geeigneten künstlichen Biofilmsystems wurde aufgrund seines thermoreversiblen Sol-Gelverhaltens ein Hydrogel auf Basis von Gellan etabliert. Um eine geeignete Materialkomposition zu generieren, die das Biofilmverhalten imitiert, wurde der Gellan-Gehalt sowie die Konzentration an NaCl und MgSO_4 verändert und die Rheologie der Gele in Oszillationsversuchen bei identischen Einstellungen bestimmt (vgl. **Abb 1**).

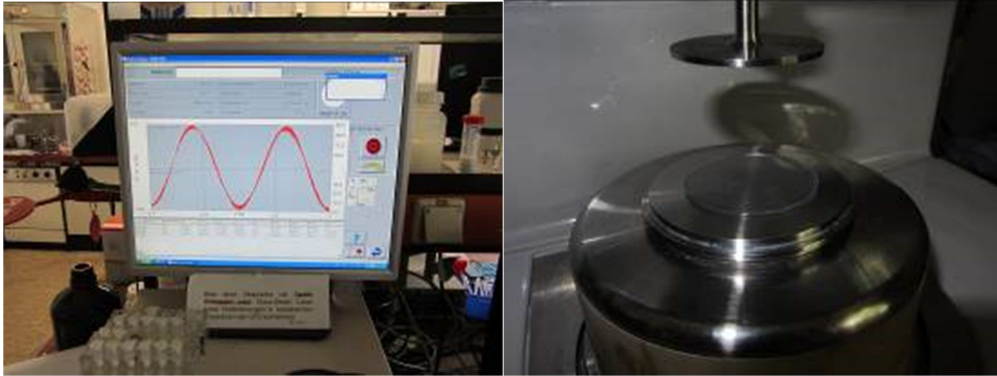


Abb. 1: Oszillationsversuch mit Hydrogel zur Ermittlung von Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') bei Variation des Gellan-Gehaltes und der $MgSO_4$ - und $NaCl$ -Konzentration.

Mittels einem Central Composite Design (CCD) wurden die durch rheologische Experimente ermittelten Werte für den Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') in Abhängigkeit vom Gellan-Gehalt (x_{Gellan}) sowie der Na^+ - (c_{Na^+}) und Mg^{2+} -Ionenkonzentration ($c_{Mg^{2+}}$) bei einer vorgegebenen Frequenz (f) ausgewertet. Bei bekannten viskoelastischen Eigenschaften können so beispielsweise die mechanischen Eigenschaften von realen Biofilmen prädictiert werden.

Durch Anwendung des CCD wurde für den Bilanzraum mit $x_{Gellan} = 0,5$ bis $1,17$ % (w/w) sowie $c_{Na^+} = 23$ bis 57 mM und $c_{Mg^{2+}} = 5$ bis $9,5$ mM im Frequenzintervall von $0,1$ und 10 s^{-1} ein empirisches Modell zur Berechnung von G' (**Gl. 1**) und G'' (**Gl. 2**) erhalten:

$$\sqrt{G'} = -161,103 + 250,869x_{Gellan} + 9,136c_{Mg^{2+}} + 3,215c_{Na^+} + 2,911 \log(f) - 4,484x_{Gellan}c_{Na^+} \quad (1)$$

und

$$\log(G'') = -2,311 + 5,452x_{Gellan} + 0,621c_{Mg^{2+}} + 0,030c_{Na^+} + 0,020 \log(f) - 0,047x_{Gellan}c_{Na^+} - 2,008x_{Gellan}^2 - 0,038c_{Mg^{2+}}^2 + 0,045 \log(f^2). \quad (2)$$

Während der Einfluss des Gellan und der Ionen auf G' vorwiegend linearer Natur ist, weist die Beziehung mit G'' einen komplexeren Charakter auf. Der Einfluss des Logarithmus der Frequenz (f) ist linear bzw. quadratisch für G' bzw. G'' .

Die mechanischen Parameter können mit diesen Modellgleichungen für ein Gellan-, $NaCl$ - und $MgSO_4$ -basierten Hydrogel berechnet und mit realen Biofilmen verglichen werden. In **Abb. 2** und **Abb. 3** sind G' und G'' in Abhängigkeit zum Gellan-Gehalt und der Mg^{2+} -Ionenkonzentration bei konstanter Na^+ -Ionenkonzentration (40 mM) bei einer Frequenz von 1 s^{-1} dargestellt.

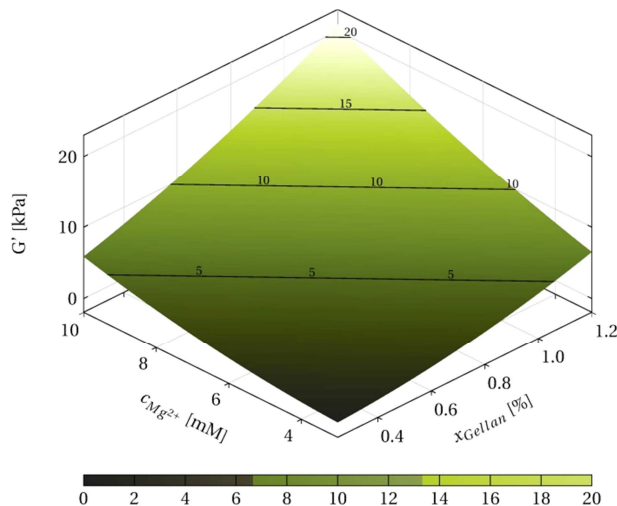


Abb. 2: Response Surface für den Speichermodul (G') in Abhängigkeit vom Gellan-Gehalt (x_{Gellan}) und der Mg^{2+} -Konzentration ($c_{\text{Mg}^{2+}}$) bei konstanter Na^+ -Konzentration und einer Frequenz von 1 s^{-1} .

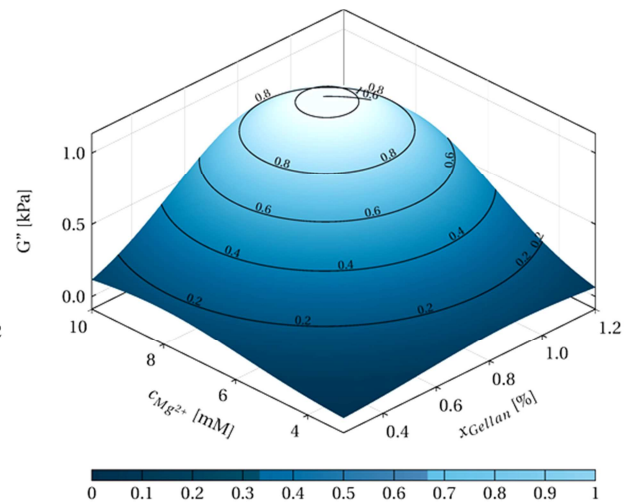


Abb. 3: Response Surface für den Verlustmodul (G'') in Abhängigkeit vom Gellan-Gehalt (x_{Gellan}) und der Mg^{2+} -Konzentration ($c_{\text{Mg}^{2+}}$) bei konstanter Na^+ -Konzentration und einer Frequenz von 1 s^{-1} .

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse für G' , die gemittelten Messpunkte sowie die Modellergebnisse mit einem 95 %-igen Konfidenzintervall. Das maximale G' mit etwa 20 kPa wird bei maximalem x_{Gellan} von 1,17 % (w/w) und der höchsten Mg^{2+} -Konzentration von $c_{\text{Mg}^{2+}} = 9,5 \text{ mM}$ erzielt. Minimale G' -Werte mit 2 kPa treten beim niedrigsten Gellan-Gehalt von 0,5 % (w/w) und $c_{\text{Mg}^{2+}} = 5 \text{ mM}$ auf. Bei konstantem c_{Na^+} (40mM) wird durch Zugabe von Mg^{2+} der Speichermodul G' deutlich erhöht (vgl. Abb. 4A), während bei konstantem $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (6,7 mM) und Erhöhung der Na^+ -Konzentration der Einfluss des Gellan-Gehaltes auf G' immer geringer wird (vgl. Fig. 4B). Der Einfluss des Gellan-Gehaltes ist ähnlich dem von Mg^{2+} . Wenn c_{Na^+} mit 30 mM konstant und der Gellan-Gehalt gesteigert wird, führt dies zu einer Erhöhung von G' (vgl. Fig. 4C). Bei konstanter $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (8,4 mM), hohem x_{Gellan} und niedrigem c_{Na^+} ist G' hoch, nimmt aber bei geringen Gellan-Gehalten deutlich ab (vgl. Abb. 4D).

Abb. 5 zeigt die Ergebnisse für den Verlustmodul G'' , die gemittelten experimentellen Daten und der Modellergebnisse mit einem 95 %-igen Konfidenzintervall. Der Hauptunterschied zu den Ergebnissen für G' ist ein deutliches Maximum in G'' bei der Auftragung gegen x_{Gellan} oder $c_{\text{Mg}^{2+}}$. Auch die Wirkung des einwertigen Na^+ zu G'' unterscheidet sich zum zweiwertigen Mg^{2+} und ist vergleichbar mit der Wirkung von G' (vgl. mit Abb. 4). Der maximale G'' -Wert liegt bei ca. 2 kPa, während das Minimum etwa 0,1 kPa aufweist. Wie Abb. 5A zeigt, ist G'' identisch für verschiedene $c_{\text{Mg}^{2+}}$ aufgrund der quadratischen Korrelation. Für geringe Gellan-Gehalte und konstanter $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (6,7 mM) ergeben sich nur geringe Unterschiede in G'' , diese erhöhen sich beträchtlich mit höheren Na^+ -Konzentrationen und Gellan-Gehalten (vgl. Abb. 5B). Maximale G'' -Werte werden bei $c_{\text{Mg}^{2+}}$ von 8,0 bis 9,0 mM und x_{Gellan} zwischen 0,75 bis 1,0 % (w/w) erreicht (vgl. Abb. 5C). Der Einfluss von Na^+ auf G'' ist ähnlich dem Einfluss auf G' . Bei niedrigem c_{Na^+} und hohem x_{Gellan} erreicht G'' ein Maximum, das aber schnell abnimmt, wenn die Na^+ -Konzentration erhöht wird. Bei niedrigem Gellan-Gehalt führt eine Erhöhung an c_{Na^+} zu einem geringen Anstieg des Verlustmoduls G'' (vgl. Abb. 5D).

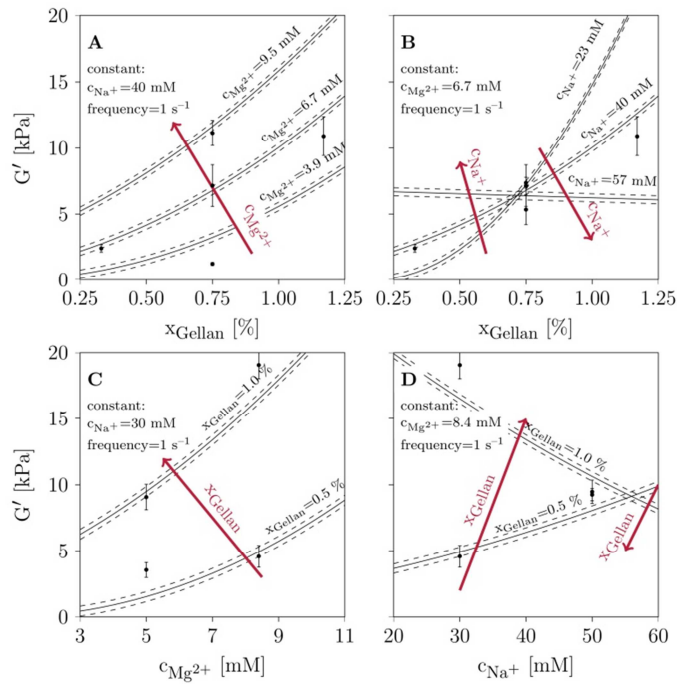


Abb. 4: Ergebnisse für den Speichermodul (G'): Die Designpunkte einschließlich der Standardfehler sind schwarz markiert. Die durchgezogenen Linien symbolisieren die Werte des Modells und ihre 95 %-Konfidenzintervalle sind durch gestrichelte Linien dargestellt. A: x_{Gellan} und $c_{\text{Mg}^{2+}}$ werden variiert, c_{Na^+} (40 mM) und die Frequenz (f) (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. B: x_{Gellan} und c_{Na^+} werden variiert, $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (6,7 mM) und f (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. C: $c_{\text{Mg}^{2+}}$ und x_{Gellan} werden, c_{Na^+} (30 mM) und f (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. D: c_{Na^+} und x_{Gellan} werden variiert, $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (8,4 mM) und f (1 s^{-1}) konstant gehalten werden.

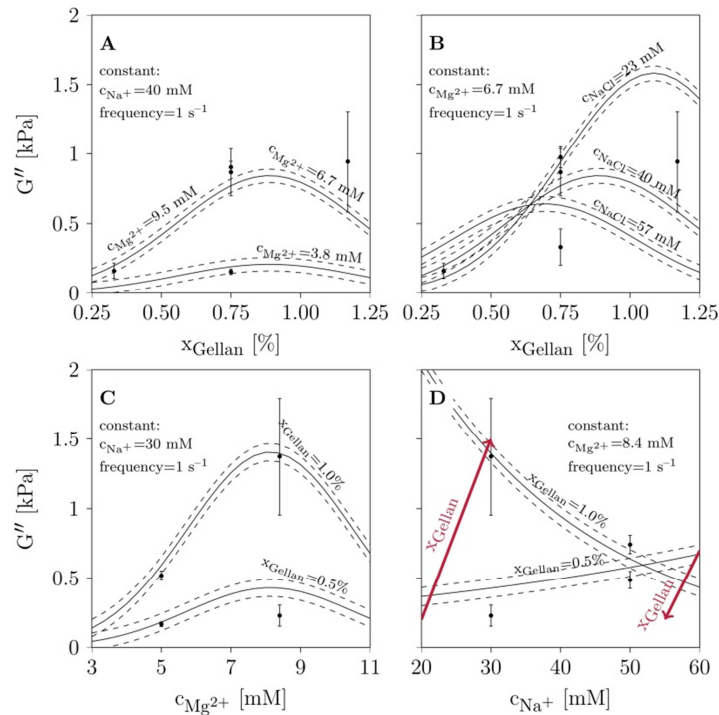


Abb. 5: Ergebnisse für den Speichermodul (G''): Die Designpunkte einschließlich der Standardfehler sind schwarz markiert. Die durchgezogenen Linien symbolisieren die Werte des Modells und ihre 95 %-Konfidenzintervalle sind durch gestrichelte Linien dargestellt. A: x_{Gellan} und $c_{\text{Mg}^{2+}}$ werden variiert, c_{Na^+} (40 mM) und die Frequenz (f) (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. B: x_{Gellan} und c_{Na^+} werden variiert, $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (6,7 mM) und f (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. C: $c_{\text{Mg}^{2+}}$ und x_{Gellan} werden, c_{Na^+} (30 mM) und f (1 s^{-1}) werden konstant gehalten. D: c_{Na^+} und x_{Gellan} werden variiert, $c_{\text{Mg}^{2+}}$ (8,4 mM) und f (1 s^{-1}) konstant gehalten werden.

2.2 Versuchsanlage

Ein Versuchsstand bestehend aus zwei Flow Through Biofilm Tube Reactors (FTBTR 1 und 2) wurde mit der üblichen Messperipherie aus pH-Wert-Regelung (pH), online-Messung für die optische Dichte (OD) und Bestimmung des Sauerstoffpartialdruck (pO₂) aufgebaut. (Abb. 6)

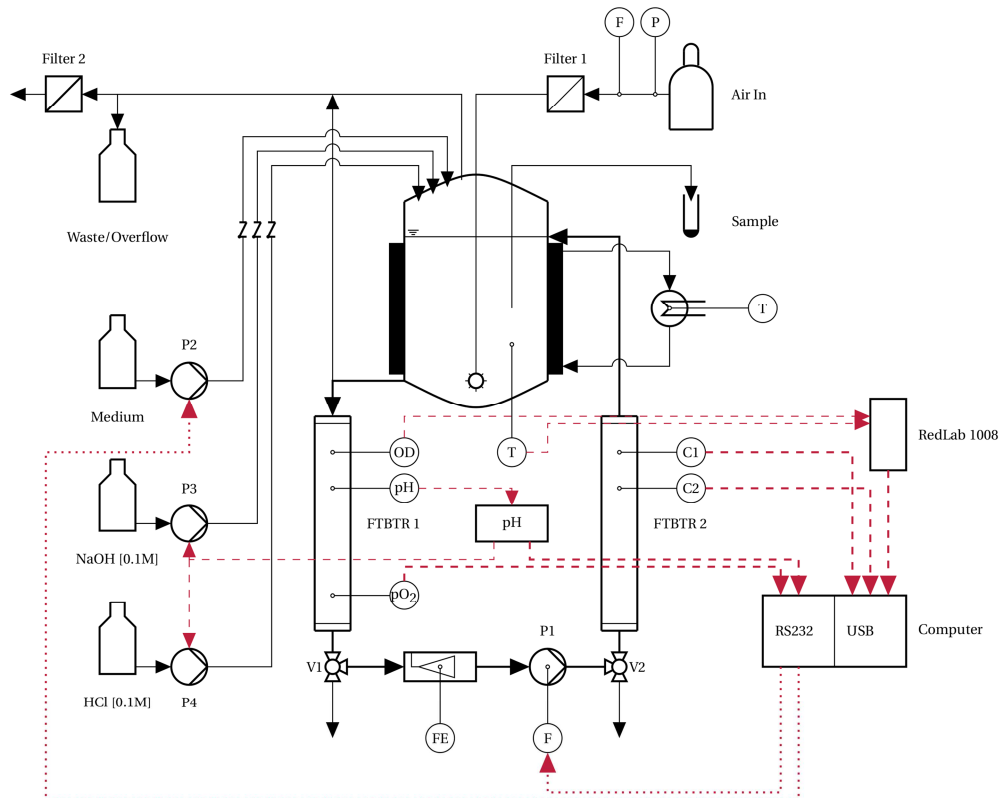


Abb. 6: Fließbild des Versuchstands mit Pumpen für Medium (P2) sowie zur pH-Regelung (P3 und P4), Begasungseinrichtung über das Sauerstoffsättigungsgefäß, optische Dichtemessung (OD), pH-Messungen (pH), Temperatur (T), Volumenstrom (FE) und Sauerstoffpartialdruck (pO₂). Zusätzlich sind zwei Kameras (C1, C2) installiert. Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgte über einen A/D Wandler (RedLab 1008), RS232 Schnittstelle und USB, die Auswertung über Matlab. Die Umwälzpumpe (P1) wurde über die Herstellersoftware gesteuert.

Die Anlage lässt sich demontieren und komplett autoklavieren. Nach dem Autoklavieren wurde der Versuchsstand in einer Sterilwerkbank wieder zusammengesetzt. Für einen Kultivierungsversuch wurde sie mit ca. 1 L Kultivierungsmedium gefüllt. Der pH-Wert und die Temperatur wurden geregelt. Mittels der Pumpe (P1) wurden Reynolds-Zahlen zwischen $100 < Re_{Rohr} < 4378$ eingestellt. Der überwiegende Teil der Versuche wurde im laminaren Strömungsbereich durchgeführt. Über die Feed-Regelung (P2) wurde die OD konstant gehalten. Die Begasung des Reaktorsystems erfolgte über das Sauerstoffsättigungsgefäß mittels steriler Luft. Die Inokulation des Systems erfolgte je nach Versuch über präparierte Objektträger oder Oberflächen (vgl. Abb. 7) sowie durch eine Vorkultur in exponentieller Wachstumsphase.

2.3 Etablierung des mikrobiellen Biofilmsystems

Um zu gewährleisten, dass mit dem Gellan-Hydrogel auch die mechanischen Eigenschaften realer Biofilme nachgebildet werden können, wurden identische rheologische Untersuchungen an realen Reinkulturbiofilmen von *P. putida* KT2440 durchgeführt. Dazu wurde im

FTBTR Biofilme unter konstanten Versuchsbedingungen auf verschiedenen Oberflächen kultiviert. **Abb. 7** zeigt den watteartigen Aufbau des *P. putida*-Biofilms nach 14-tägiger kontinuierlicher Kultivierung auf einem in der Rohrströmung ($Re_{\text{Rohr}} = 1400$) positionierten hydrophilisierten Objektträger. Zusätzlich ist ein mit Hydrogel und immobilisierten Zellen präparierter Objektträger dargestellt. Dieser ermöglicht eine gezielte Auftragung der Kultur auf eine gewünschte Oberfläche. Mittels Zeitreihenaufnahmen war es möglich, die Entstehung des Biofilms über mehrere Tage zu visualisieren.

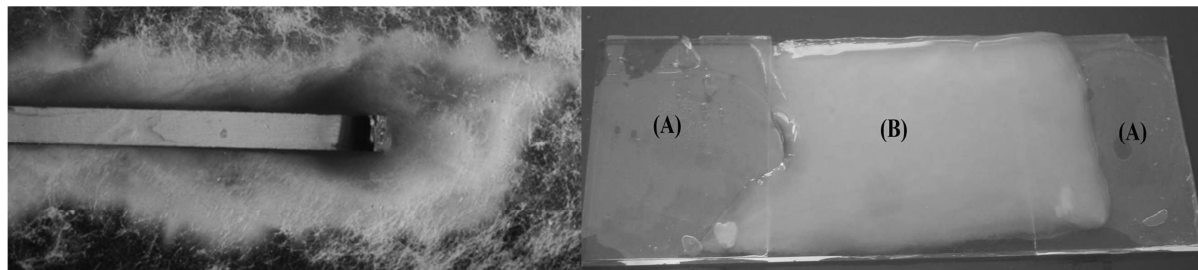


Abb. 7: Seitenansicht eines Biofilms von *P. putida* KT 2440 nach 14-tägiger Kultivierung auf silikonbeschichtetem Objektträger (links), zwischen zwei verklebten Deckgläsern (A) mit immobilisierten Zellen aufgebracht Hydrogel (B) (rechts).

Die Biofilme wurden auch auf Zellulose-Acetat-Filtern kultiviert. Dazu wurden aus einer *P. putida* KT2440-Schüttelkolben-Kultivierung Proben mit 10^6 Zellen entnommen, verdünnt und durch Filtration gleichmäßig auf dem Filter verteilt. Dieser wurde für 48 h auf LB-Agarplatten bei 30°C kultiviert. Die generierten Biofilme wurden analog zu den Hydrogelen rheologisch vermessen.

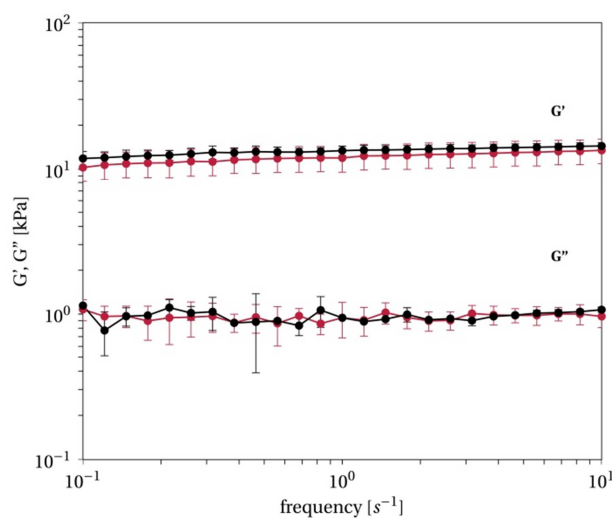


Abb. 8: Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') als Funktion der Frequenz. Der Biofilm von *P. putida* KT 2240 (rot) wurde über 6 Messungen gemittelt, während die Zusammensetzung des Hydrogels (schwarz; $x_{\text{Gellan}} = 0,75\%$ (w/w), $c_{\text{Mg}^{2+}} = 8,4 \text{ mM}$, $c_{\text{Na}^+} = 23 \text{ mM}$) basierend auf den G' - und G'' -Werten des Biofilms mit dem empirischen Modell (Gl. 1 und 2) berechnet wurde. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

Abb. 8 zeigt G' und G'' für den Biofilm von *P. putida* KT 2240 (rot) sowie ein Gellan-Hydrogel (schwarz), dessen Zusammensetzung auf den G' - und G'' -Werten des Biofilms und dem empirischen Modell basiert in Abhängigkeit von der Frequenz. Das viskoelastische Verhalten des Biofilms entspricht dem Gellan-Hydrogel und weist ein nahezu festes Hooke-artiges Verhalten auf. Der Frequenzdurchlauf ergab ein G' von $11,96 \pm 2,41 \text{ kPa}$ und ein G'' von $0,94 \pm 0,26 \text{ kPa}$ bei einer Frequenz von 1 s^{-1} , was im Größenbereich des Hydrogels liegt.

2.4 Weiterführende Arbeiten

Die thermoreversiblen Gellan-Hydrogele wurden im FTBTR an der (gekühlten) Reaktoroberfläche gezielt abgeschieden und unterschiedlichen Strömungsbedingungen (laminar und turbulent) ausgesetzt. Da die Hydrogele auf dem empirischen physikochemischen Modell basieren, zeigen sie ein ähnliches mechanisches Verhalten wie die Modellbiofilme von *P. putida* KT 2240 hinsichtlich Speicher- und Verlustmodul. In weiterführenden Versuchen soll untersucht werden, inwieweit Anlagerungs- (Gelieren), Wachstums- und Abrisseffekte von Hydrogelen mit denen von Biofilmen vergleichbar sind.

Die FTBTR wurde dafür mit einem Stereo-Kamerasystem ausgestattet, das auch räumliche Aufnahmen der Biofilmentstehung ermöglicht. Das Kamerasystem gestattet die Beobachtung von Anhaftungs- bzw. Abtragsphänomenen in Echtzeit. Das Bildmaterial kann dahingehend ausgewertet werden, um auch reale dreidimensionale Modelle der beobachteten Prozesse zu erstellen. Derzeitig stellt es noch eine Herausforderungen dar, den Kontrast der Biofilme zu erhöhen, um eine genauere Positionserkennung zu ermöglichen. Hier sollen zukünftig die aufgenommenen Bilder mit CLSM-Aufnahmen einer GFP-bildenden Transformante verglichen werden. Die Ergebnisse können dann im weiteren Verlauf mit den Ergebnissen des FE-Modells (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Festkörpermateriale, Prof. Böhl, TU Braunschweig) verglichen werden und zur Verifizierung des Modells dienen.

3 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Böhl, M., Ehret, A. E., Bolea-Albero, A., Hellriegel, J., Krull, R. (2013) Recent advances in mechanical characterisation of biofilm and their significance for material modelling. *Critical Reviews in Biotechnology* 33, 145 – 171.

Hellriegel, J., Krull, R. (2012) Applied online image acquisition techniques for surface visualization of biofilms. *European Congress on Computational methods in Applied Sciences and Engineering, Micro-Symposium: Computational and experimental methods for mechanical analyses of microbial biofilms*, MS 642-2, 3182, ECCOMAS Vienna, Austria.

Böhl, M., Ehret, A.E., Boleo Albero A., Hellriegel, J., Krull, R. (2012) Mechanical characterisation of biofilm and their significance for material modelling. *European Congress on Computational methods in Applied Sciences and Engineering, Micro-Symposium: Computational and experimental methods for mechanical analyses of microbial biofilms*, MS 642-1, 2770, ECCOMAS Vienna, Austria.

Hellriegel, J., Bolea Albero, A., Böhl, M., Krull, R. (2011) Hydrogels imitating physiochemical properties of biofilms to increase the accuracy of FEM based biofilm models. *1st European Congress on Applied Biotechnology*, P 39.05, Berlin.

Hellriegel, J., Bolea Albero, A., Böhl, M., Krull, R. (2011) Hydrogele als biomimetische Modellsysteme zur Beschreibung des mechanischen Verhaltens von Biofilmen mit Hilfe von FEM. *Vortrags- und Diskussionstagung: „Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen“*, Kurzfassungsband, P 22, 103 - 104, Potsdam.