



# Kapitel 1

## Einleitung und Zielsetzung

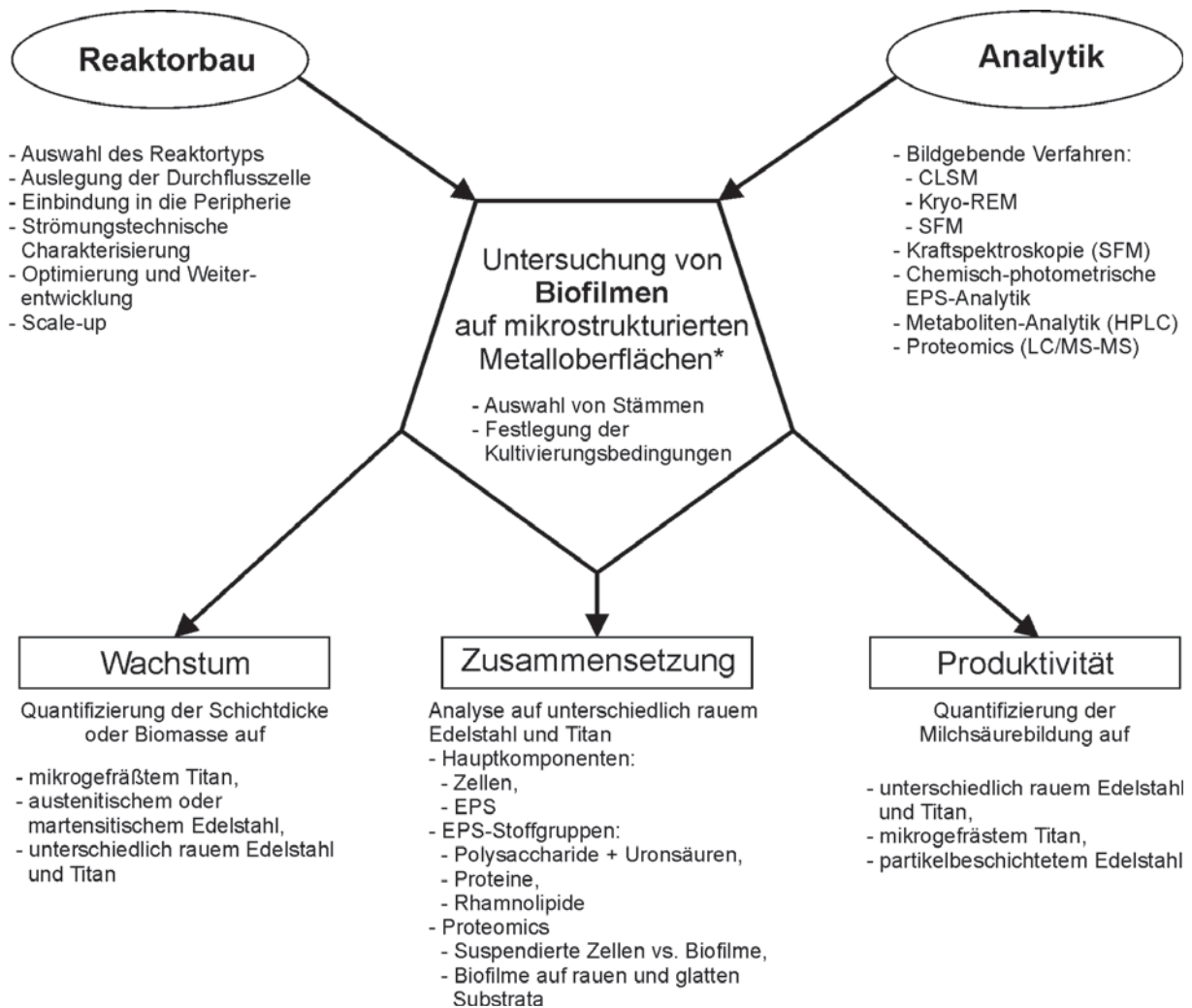
Als bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen sind Biofilme allgegenwärtig. Die auf Grenzflächen jeder Art wachsenden Kulturen tragen das natürliche Ökosystem mit und werden doch häufig als unerwünschte Effekte wahrgenommen. So lassen Zahnbelag oder unschöne Blicke in das Abwassersystem nützliche Biofilme in den Hintergrund treten. Dass eben diese Biofilme z. B. bei der Abwasserreinigung große Dienste leisten, bleibt unbemerkt. Die hauptsächlich aus Einzellern aufgebauten Kulturen erscheinen auf den ersten Blick wie einfache Ansammlungen von Mikroorganismen. Doch die in einer extrazellulären Matrix aus verschiedensten Molekülen eingebetteten Zellen profitieren von ihrem Konsortium und es herrschen komplexe Wirkungszusammenhänge. Nach außen geschützt schaffen sich Kulturen verschiedenster Spezies einen Raum für synergetisches Wachstum. Adhärent wachsend und nur schwer zu entfernen, reduziert sich durch die gesteigerte Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Umgebungseinflüssen einerseits die Leistung von Prozessanlagen oder die Produktqualität sinkt. Andererseits gilt die Immobilisierung von Mikroorganismen in biotechnologischen Prozessen als eine Strategie zur Produktivitätssteigerung. Die Idee, Zellen zur Biokatalyse zu nutzen, die sich selbst in Form von Biofilmen immobilisieren, liegt also nicht fern. Gegenüber den Mischkulturen aus der Umwelt werden dazu jedoch i. d. R. Monospezies-Biofilme bevorzugt. Da zahlreiche Faktoren auf die Biofilmbildung und -entwicklung einwirken können, ist ein umfassendes Verständnis der artentypischen Spezifika, aber auch die Kenntnis der wesentlichen äußeren Einflüsse unabdingbar. Von grundlegender Bedeutung ist die Adhäsion der Mikroorganismen auf einer Oberfläche, Substratum genannt. Neben den Umgebungsbedingungen sowie den Eigenschaften der Mikroorganismen können dabei beispielsweise auch die chemische Zusammensetzung, Ladung, Hydrophobizität oder Mikrostruktur des Substratums eine Rolle spielen.

Im Sonderforschungsbereich (SFB) 926 der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT (TU) KAISERSLAUTERN stehen Bauteiloberflächen auf der Mikroskala im Fokus der Forschungsaktivitäten. Die topografische Gestalt, der mikrostrukturelle Aufbau sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmen deren Morphologie und Einsatzverhalten. Untergeordnete Teilprojekte befassen sich entlang einer kausalen Kette mit der Herstellung, Charakterisierung sowie Anwendung mikrostrukturierter metallischer Oberflächen. Teilprojekt C03 untersucht in diesem Zusammenhang deren Wechselwirkungen mit Mikroorganismen bzw. Biofilmen. Über die Gestaltung der Oberfläche soll die Anzucht von Biofilmen für die katalytische Nutzbarmachung optimiert werden. Dazu wird die Wirkung deterministisch mikrostrukturierter und statistisch geprägter Substrata auf verschiedene Bakterien in unterschiedlichen Kultivierungssystemen getestet. Letztlich sollen die gesammelten Erkenntnisse zur Gestaltung neuartiger Biofilmreaktoren genutzt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die grundsätzliche Eignung mikrostrukturierter Edelstahl- und Titanoberflächen (Edelstahl, Werkstoff Nr. 1.4571 und *commercially pure* (cp)-Titan, Grade 2, Werkstoff Nr. 3.7035/34)



für die Kultivierung von produktiven Biofilmen zu untersuchen. Dazu muss zunächst ein geeignetes Kultivierungssystem designt und gebaut werden. Weiterhin ist es erforderlich, mikroskopische Methoden für die wissenschaftliche Untersuchung der Biofilme zu testen und zu etablieren. Im Anschluss sollen Vermessungen von Modell-Biofilmen des Stammes *Pseudomonas fluorescens* auf unterschiedlich mikrostrukturierten Substrata erfolgen. Abschließend wird in Versuchsreihen mit *Lactobacillus delbrueckii lactis* überprüft, ob die Mikrostruktur auch auf die Milchsäureproduktion der Bakterien Wirkung zeigt. Eine Gliederung der durchzuführenden Arbeitsschritte ist in Abbildung 1.1 gezeigt.



**Abbildung 1.1:** Schematische Übersicht zur Gliederung der Arbeit

\*Edelstahl (Werkstoff Nr. 1.4571) und *commercially pure* (cp)-Titan, Grade 2, Werkstoff Nr. 3.7035/34

Die Auslegung der Kultivierungssysteme orientiert sich in erster Linie an den im SFB 926 verwendeten Probengeometrien. Außerdem soll eine mikroskopische Begutachtung der möglichst ungestörten Biofilme entwickelt werden. Nicht zuletzt sind aber auch steril- sowie strömungstechnisch Anforderungen zu erfüllen. Mit dem Ziel, eine Förderung des Biofilmbewuchses zu erreichen, kommen deterministisch mikrogefräste, mit Partikeln beschichtete sowie durch Schleifen statistisch geprägte, unterschiedlich raue Edelstahl- und Titanoberflächen zum Einsatz. Bei den Untersuchungen stehen die gebildeten Schichtdicken, strukturelle Eigenschaften sowie die Zusammensetzung der Biofilme im Fokus. Eine große Methodenvielfalt bei der Untersuchung der Biofilme soll die komplexen Wirkungszusammenhänge von mehreren Seiten beleuchten. Zur mikroskopischen Untersuchung



kommen ein Konfokales Laser Scanning Mikroskop (engl. *Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM), ein Tieftemperatur-Rasterelektronenmikroskop (Kryo-REM) sowie ein Rasterkraftmikroskop (engl. *Scanning Force Mikroscope*, SFM) zum Einsatz. Der Zusammensetzung der Biofilme wird nach der extraktiven Trennung der Bestandteile mittels chemisch-photometrischer sowie massenspektrometrischer Analysen auf den Grund gegangen.





## Kapitel 2

# Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel stellt zu Beginn die wichtigsten mikrobiologischen Grundlagen für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge in Biofilmen dar. Außerdem werden die beiden im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* vorgestellt. Auf die den jeweiligen Methoden und Ergebnissen zugrunde liegende Theorie wird zu Beginn der jeweiligen Kapitel detailliert eingegangen.

### 2.1 Mikrobielles Wachstum in Biofilmen

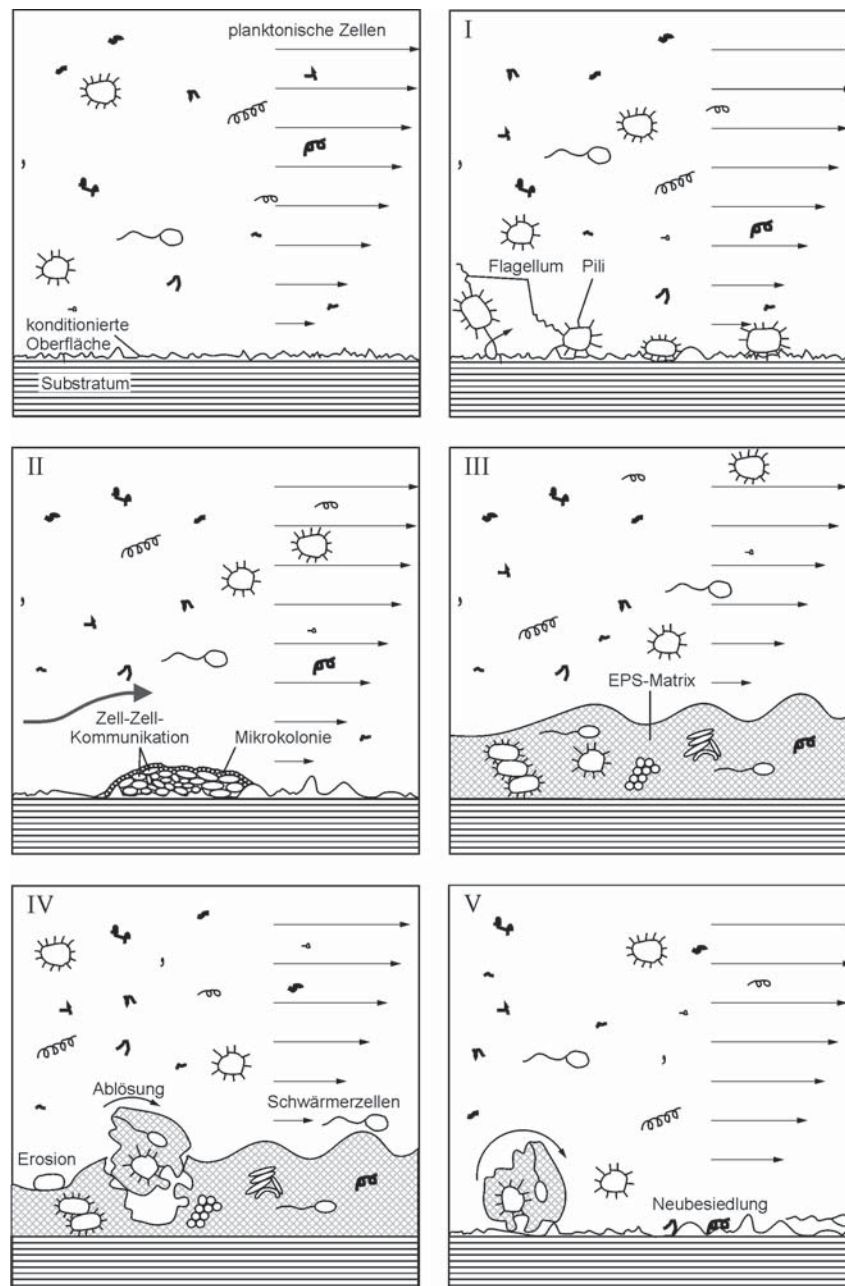
Besiedeln Mikroorganismen natürliche Ökosysteme, geschieht dies selten in Form der aus dem Labor bekannten Suspensionskulturen, sondern vielmehr in symbiotischen Gemeinschaften. Freischwimmende Konsortien fallen unter die Flocken. An Grenzflächen fest-flüssiger Systeme wachsende Kulturen werden dagegen als Biofilme bezeichnet [1]. Deren Aufbau reicht von einfachen, flachen und kompakten Zelllagen, bis hin zu komplexen 3D-Strukturen mit pilzartigen Auswüchsen und Kanälen [1] und folgt einer fünfstufigen Entwicklung (s. Abbildung 2.1) [2]. Die Benetzung und Konditionierung des Substrats durch ein Medium sowie die Adsorption seiner Bestandteile erfolgt binnen kurzer Zeit [2]. Veränderte Oberflächeneigenschaften wirken sich i. d. R. positiv auf den elementaren ersten Schritt der Biofilmbildung, die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche, aus (s. Abbildung 2.1 I). Nach Muffler et al. [3] wird diese im Wesentlichen von drei Faktoren beeinflusst:

- Umgebung: pH-Wert, hydrodynamische Bedingungen, Nährstoffe, etc.
- Material: Ladung, Hydrophobizität, Mikrostruktur, etc.
- Mikroorganismus: Hydrophobizität, Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), *Quorum Sensing* (QS)

Sobald der Kontakt hergestellt ist, kommt es zu genetischen und physiologischen Veränderungen der Zellen. Die Mikroorganismen binden zunächst reversibel an das Substratum [2]. Mit fortschreitender Zeit intensiviert sich der Kontakt jedoch. Die Bildung von EPS als „Kleber“ bedingt eine stabilere, als irreversible angenommene Oberflächenbindung [4]. Mehr und mehr Zellen besiedeln die Oberfläche, teilen sich und bilden EPS. Es entstehen Mikrokolonien (II). Der Biofilm, die in EPS gebetteten Zellen, reift heran und 3D-Strukturen entstehen. Auch Phasen gleichgewichteter Neubildung und Ablösung sind beschrieben (III). Schließlich entlassen reife Biofilme Zellen aus dem Konsortium (IV), die wiederum neue Orte besiedeln (V) [2]. Als wesentliche Komponenten von Biofilmen lassen sich Wasser (70-95 %), Zellen und EPS unterscheiden [5]. Hinzu kommen sorbierte Substanzen und Partikel. Die EPS



bestehen aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden sowie Desoxyribonukleinsäure (DNS) und verleihen dem Biofilm seine mechanischen Eigenschaften [2].



**Abbildung 2.1:** Biofilmentwicklung in fünf Stufen (nach Flemming und Wingender [2])

Die Ausbildung der Biofilmstruktur ist ein sehr dynamischer Prozess und wird ebenfalls von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Wie schon bei der Adhäsion sind die Umgebungsbedingungen sowie Eigenschaften der Mikroorganismen und des Substrats wichtige Einflussparameter. Hinzu kommen allerdings noch Aspekte wie die initiale Zellverteilung und auch die bisherige Struktur selbst, denn eine vergrößerte Oberfläche erleichtert den Austausch mit der Umgebung [4]. So führen die EPS beispielsweise zu einer Einschränkung des Stofftransports innerhalb des Biofilms. Nährstoffe (Edukte), Zwischenprodukte und Produkte gelangen, bis auf wenige Ausnahmen über Kanäle, nur durch Diffusion an Ort und Stelle. Selbst in einfachen, scheinbar strukturlosen Zelllagen kommt es daher schnell zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten und Nischen. Da der Zellstoffwechsel unmittelbar an



die Umgebungsbedingungen gekoppelt ist, adaptieren sich die Zellen an die vorherrschenden Bedingungen. Eine Differenzierung der Zellen ist die Folge [6]. Diese bedingt neben den hydrodynamischen Bedingungen die Ausbildung von 3D-Strukturen (z. B. das „Mushroom“-Modell [7]). Zur Koordination der Aktivitäten innerhalb des Konsortiums dienen extrazelluläre chemische Signale, deren Wirksamkeit sich insbesondere durch die hohe Zelldichte entfalten kann. So wird über *Quorum Sensing* die Genexpression der Zellen reguliert [2].

Mit dem Biofilmwachstum gehen zudem eine höhere Robustheit und Resistenz gegenüber schädigenden Umgebungsbedingungen (z. B. antimikrobielle Substanzen, Toxine, etc.) einher. Die Ursachen dafür liegen u. a. bei der als Barriere wirkenden EPS [2]. Insbesondere die Diversität und konzentrierte Masse sind dabei aber auch von großem Vorteil für das Weiterbestehen der Biofilme [4]. Durch dieses Beharrungsvermögen kommt es, dass die Biofilme mehrheitlich mit negativen Assoziationen verknüpft sind. Denn ob sie nun im medizinischen Bereich durch die Besiedlung von Zähnen, Kathetern oder Implantaten schwer behandelbare Infektionen hervorrufen [1] oder in Form von Biofouling sowie Korrosion die Effizienz industrieller Prozesse reduzieren [8], die deutlichste negative Eigenschaft ist die schwierige Bekämpfung. Das folgende Kapitel wird nun deutlich machen, welcher Nutzen andererseits aus derartigen Konstellationen gezogen werden kann.

## 2.2 Produktive Biofilme

Die Immobilisierung von Zellen ist in der Biotechnologie eine viel genutzte Strategie, um Fermentations- und Biotransformations-Prozesse einfacher und effizienter zu gestalten [9]. So können in kontinuierlichen Prozessen beispielsweise höhere Produktivitäten erreicht werden, da die Zellen im Reaktor zurückgehalten werden und ein höherer Durchsatz möglich ist (Wachstumsrate  $\mu$  von Verdünnungsrate  $D$  entkoppelt) [10]. Weiterhin erleichtert die Immobilisierung der Biomasse die Produktaufreinigung. Dennoch verkomplizieren die mit der Immobilisierung verbundenen Arbeitsschritte (z. B. die Verkapselung) oder die dazu notwendige zusätzliche Technik (z. B. Membranmodule) den Prozessaufbau oder -ablauf. Außerdem von Nachteil sind eine Reduzierung der Zellaktivität durch die jeweils verwendeten Chemikalien sowie ein verschlechterter Stofftransport im Immobilisat. Vor diesem Hintergrund erscheinen in Biofilmen immobilisierte Zellen in einer Matrix aus eigenen EPS als eine vielversprechende Kulturform für die Ganzzell-Biokatalyse. Insbesondere die Differenzierung und Koordination der Zellen erreicht eine bessere Adaption an die jeweiligen Bedingungen und zudem werden negative Einflüsse durch künstliche Immobilisierungsmethoden umgangen. Tabelle 2.1 stellt die Vorteile den Nachteilen bei der Anwendung von Biofilmen in Produktionsprozessen gegenüber.

**Tabelle 2.1:** Vor- und Nachteile bei der Anwendung von Biofilmen in Produktionsprozessen (nach Muffler et al. [3])

Vorteile	Nachteile
Natürliche Immobilisierung, keine (schädlichen) Chemikalien nötig	Stofftransportlimitierung durch EPS
Robustheit gegenüber wechselnden Prozessbedingungen	Keine Standardverfahren für die Degradierung vorhanden (z.B. für Reinigungsprozesse)
Langzeitstabilität, kontinuierliche Prozesse möglich	Prozesskontrolle eingeschränkt
Zielgene häufig vermehrt exprimiert	Kontrollierte Aufzucht und Aufrechterhaltung für Produktionsprozesse aktuell nicht ausreichend





Obwohl die Idee der Nutzbarmachung von Biofilmen nicht neu ist - schon sehr früh wurden Biofilme beispielweise zur Herstellung von Essig kultiviert - beschränkt sich deren großskalige Anwendung bisher im Wesentlichen auf die mikrobiologischen Sanierung bzw. Aufbereitung von Böden und Wasser (s. [11]). Dabei kommen Mischkulturen zum Einsatz. Für die Produktion von Fein- und Massenchemikalien werden in der Biotechnologie jedoch i. d. R. Reinkulturen verwendet. Somit sind, wenn auch nur im Labormaßstab, für derartige Prozesse hauptsächlich Monospezies-Biofilme beschrieben. Einige Beispiele dazu sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Prozesse zur Milchsäureproduktion sind hier nicht enthalten, da darauf in Kapitel 6 nochmals näher eingegangen wird (s. Tabelle 6.1). Eine ausführlichere Darstellung findet sich zudem bei Muffler et al. [3].

**Tabelle 2.2:** Ausgewählte Biofilmprozesse zur Herstellung von Fein- und Massenchemikalien (nach Muffler et al. [3])

Produkt	Mikroorganismus	Reaktortyp	Substratum	Quelle
1,3-Propandiol	<i>Pantoea agglomerans</i>	Festbettreaktor	PUR*-Schaum	[12]
Cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	Wirbelschichtreaktor	Edelstahl	[13]
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	Rührkesselreaktor	PCS**	[14]
Ethanol	<i>Zymomonas mobilis</i>	Wirbelschichtreaktor	Glaspartikel	[15]
Essigsäure	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Festbettreaktor	Edelstahl	[16]
(S)-Styroloxid	<i>Pseudomonas sp.</i>	Membranreaktor	Keramik	[17]

\*Polyurethane; \*\*Plastic Composite Supports (engl. für Kunststoff-Verbundwerkstoffträger)

Tabelle 6.1 zeigt, dass neben gängigen Massenchemikalien wie 1,3-Propandiol und Ethanol auch Nischenprodukte (z. B. Enzyme und Antibiotika) mittels Biofilmen hergestellt werden können. Wie mit immobilisierten Systemen bezweckt, handelt es sich bei diesen Verfahren um wiederholte („repeated“ Batch-Prozess) oder kontinuierliche Prozesse. Die zum Einsatz kommenden Mikroorganismen sind vielfältig. Li et al. [18] zeigten in einem breit angelegten Screening, dass viele der gängigen Mikroorganismen zu adhärentem Wachstum befähigt sind. Auch die in Biofilmprozessen verwendeten Reaktoren und Substrata sind zahlreich. Auf die Wahl des Reaktortyps wird in Kapitel 3 näher eingegangen. Hier soll im Folgenden noch ein kurzer Abriss über die Möglichkeiten bzgl. der Substrata erfolgen.

Das zur Biofilmanzucht verwendete Substratum sollte nach Demirci et al. [19] in erster Linie folgende Kriterien erfüllen:

- Fördernde Wirkung auf die Adhäsion der Mikroorganismen
- Ausreichende mechanische Stabilität gegenüber Strömungen und Partikelkollisionen
- Kostengünstig
- Ausreichend verfügbar

Generell kommen nach den oben formulierten Kriterien anorganische (z. B. Keramiken, Glas, Metalle), aber auch organische Materialien (z. B. natürliche oder künstliche Polymere) für die Biofilmkultivierung in Frage. Werkstoffe beider Kategorien bieten wiederum Vor- und Nachteile. Während Polymeroberflächen beispielsweise i. d. R. einfacher zu bearbeiten und zu modifizieren sind, kann eine Freisetzung der darin enthaltenen Verbindungen (z. B. Weichmacher o. ä.) die Biofilmbildung beeinflussen oder das Produkt verunreinigen. Als wiederverwendbare Reaktormaterialien in der Biotechnologie kommen aber auch aus Gründen der Sterilisier- und Reinigbarkeit traditionell Glas und Edelstähle zum Einsatz. In dem Forschungsprojekt bzw. Forschungsverbund, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist, steht die Bearbeitung und Anwendung metallischer Werkstoffe im Fokus. Zur Untersuchung von Biofilmen



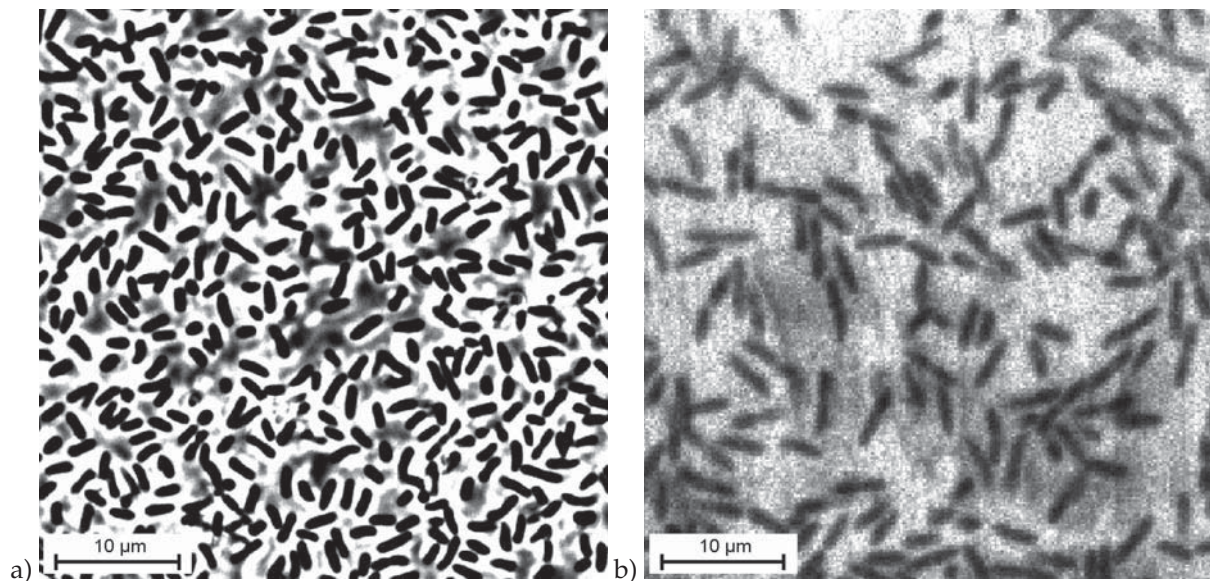


auf mikrostrukturierten Oberflächen kamen daher ein für den Reaktorbau in der Biotechnologie bevorzugt eingesetzter Edelstahl (Werkstoff Nr. 1.4571) sowie cp-Titan (Werkstoff Nr. 3.7035/34) zum Einsatz. Letzteres findet eigentlich u. a. aufgrund seines inerten Charakters vermehrt Anwendung in der medizinischen Technik (z. B. Implantate). Diese Gegensätzlichkeit beider Werkstoffe macht allerdings den Vergleich hinsichtlich der Wirkung von Mikrostrukturen auf Biofilme besonders interessant.

### 2.3 *Pseudomonas fluorescens*

Bei einem der beiden in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 (ATCC 13525). Als bereits vielfach in der Literatur beschriebener Biofilmbildner (s. z. B. [20–24]) diente das Bakterium hier als Modellorganismus für die Etablierung von Biofilmreaktoren, Messverfahren sowie für die Untersuchungen grundlegender Effekte der Mikrostruktur des Substrats auf Biofilme. In diesem Kapitel werden einige Charakteristika von *P. fluorescens* Stämmen zusammengefasst.

Die Gattung *Pseudomonas* vereint verschiedene typische Biofilmbildner. Neben den prominenten Vertretern wie *P. aeruginosa* und *P. putida* gehört das gram-negative, stäbchenförmige und strikt aerobe Bakterium *P. fluorescens* ebenfalls dazu [25]. Die Größe von Pseudomonaden erstreckt sich über einen Bereich von  $0,5\text{--}1 \times 1\text{--}4 \mu\text{m}$  [26] und polare Flagellen verleihen zudem die Möglichkeit zur aktiven Bewegung [25]. Abbildung 2.2 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Zellen aus einer Suspensionskultur bzw. im Biofilm.



**Abbildung 2.2:** Mikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas fluorescens* Zellen: a) Aus einer Suspensionskultur im Phasenkontrastmikroskop [27]; b) Im Biofilm nach Gegenfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Dextran am konfokalen Laser Scanning Mikroskop\* [28]

\*Einstellungen:  $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda_{em} = 500 - 561 \text{ nm}$

Ein Vergleich der Abbildungen zeigt, dass sich die Morphologie der Zellen in Suspension und im Biofilm unterscheidet. Wie bereits in Kapitel 2.1 erläutert, sind im Biofilm zahlreiche Einflüsse für die Ausbildung der jeweiligen Struktur entscheidend. Morphologische Änderungen von Zellen können sich zum Beispiel durch veränderte Ernährungsbedingungen [29] oder Sauerstofflimitierung [30] ergeben. Die oben genannte Größe ist also nur als Richtwert zu sehen.

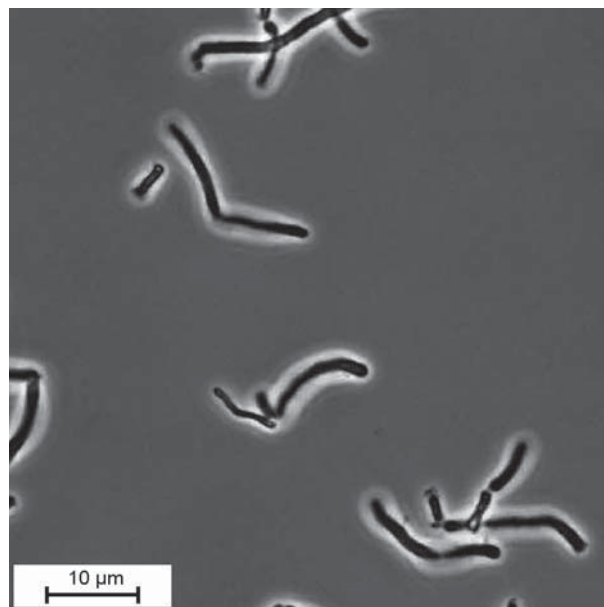


Namensgebend für *P. fluorescens* ist seine Eigenschaft unter Eisenmangel das ca. 889-1.764 Da große gelb-grüne Siderophor Pyoverdin [31] zu bilden, das durch Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert ( $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ ) [32]. Insbesondere in seinen natürlichen Habitaten (z. B. Boden, Wasser oder Pflanzen [25]) schafft dieser wasserlösliche  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexbildner [33] einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen [34]. Weiterhin sind die Stämme für eine breite biochemische Aktivität, geringe Medienansprüche und Wachstum bei niedrigen Temperaturen (z. B. bei  $T = 4 \text{ °C}$  im Kühlschrank; Optimum  $T = 23 - 25 \text{ °C}$ ; maximal  $T = 40 \text{ °C}$ ) bekannt [25,26]. Große Probleme verursacht *P. fluorescens* daher durch den Verderb von Nahrungsmitteln. Dazu trägt auch die Ausscheidung hitzestabiler proteolytischer und lipolytischer Enzyme bei [26]. Andererseits werden *Pseudomonas*-Arten aber auch biotechnologisch genutzt (z. B. zur Fermentation organischer Säuren [26] oder Biotransformation [35]). Viele der Pyoverdin-Eigenschaften sind zudem sehr ähnlich zu Peptidantibiotika [32] und zählen somit zu den Antibiotika [36,37].

## 2.4 *Lactobacillus delbrueckii lactis*

Das hier vorgestellte Forschungsprojekt zielt auf das Züchten von Biofilmen auf mikrostrukturierten Metalloberflächen zur biotechnologischen Produktion von Wertstoffen ab. Eine zentrale Frage dabei ist, ob durch die Mikrostrukturierung des Substratums Einfluss auf den Biofilm und im Speziellen auf die Produktivität der im Biofilm gebundenen Mikroorganismen genommen werden kann. Der in Kapitel 2.3 beschriebene Stamm *Pseudomonas fluorescens* diente als Modellorganismus für grundlegende Untersuchungen. Als Produktionsstamm fiel die Wahl auf den milchsäurebildenden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20073 (ATCC 14933). Wesentliche Informationen zu diesem Stamm, dem Produkt sowie dessen fermentativer Herstellung sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

Das zur Ordnung der Milchsäurebakterien (MSB) gehörige gram-positive, stäbchenförmige Bakterium *Lactobacillus delbrueckii lactis* (s. Abbildung 2.3) wurde ursprünglich aus Speichel isoliert [38] und findet heute Anwendung in der Bio- und Lebensmitteltechnologie (z. B. zur Käseherstellung [39]).



**Abbildung 2.3:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Lactobacillus delbrueckii lactis* Zellen aus einer Suspensionskultur



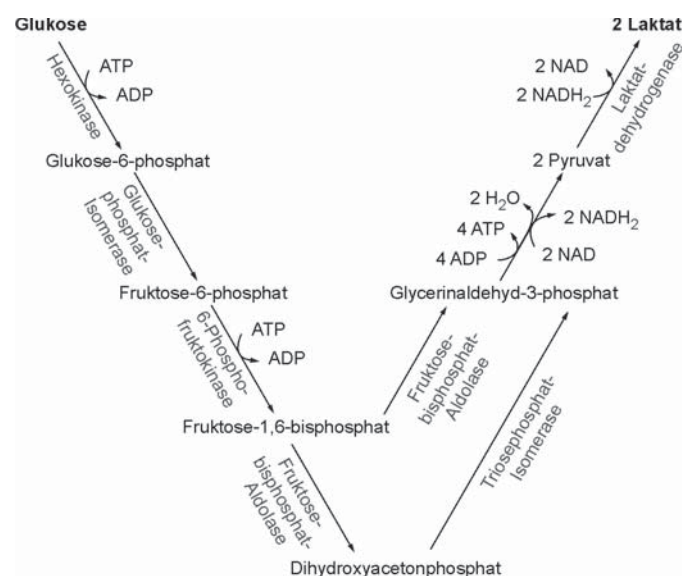
Unter Stämmen der zu den effizientesten Milchsäureproduzenten gehörigen Gattung *Lactobacillus* zeichnet sich *Lactobacillus delbrueckii lactis* insbesondere durch eine hohe Milchsäurebildung bei  $T = 45\text{ °C}$  aus (s. Tabelle 2.3) [40]. Hinzu kommt eine ausgeprägte Säuretoleranz bis zu einem pH-Wert von 4 [41]. Beide Aspekte stellen Selektionsvorteile gegenüber anderen Mikroorganismen dar und senken das Kontaminationsrisiko.

**Tabelle 2.3:** Eduktbezogene Produktausbeuten und Produktivitäten milchsäureproduzierender *Lactobacillus delbrueckii* Stämme bei  $45\text{ °C}$  (nach Hofvendahl und Hahn-Hägerdal [40])

<i>Lactobacillus delbrueckii</i> - Stamm	Eduktbezogene Produkt- ausbeute $Y_{P/E}$ in $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute* $RZA$ in $\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Quelle
subsp. <i>lactis</i> ATCC 8000	0,83	-	[41]
subsp. <i>lactis</i> DSM 20073	0,82	-	[41]
subsp. <i>delbrueckii</i> DSM 20074	0,48	0,72	[42]
mutant DP3	0,64	1,7	[42]
mutant DP3, 19	0,57	1,2	[42]
subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081	0,11**	0,56**	[43]

Fett gedruckt: Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Stamm; \*hier als Produktivität bezeichnet; \*\*Hydrolysat als Kohlenstoffquelle, bei den anderen Glukose

Als mikroaerophiles, homofermentatives Bakterium nutzt *Lactobacillus delbrueckii lactis* Pyruvat statt Sauerstoff zur Regeneration des im Zellstoffwechsel mit Wasserstoff beladenen Coenzym  $\text{NADH}_2$  (s. Abbildung 2.4). Die dabei gebildete Milchsäure ist somit ein an den Energiestoffwechsel gekoppeltes Produkt. Im Gegensatz zu heterofermentativen MSB entstehen keine Nebenprodukte wie Kohlenstoffdioxid, Ethanol oder Essigsäure.



**Abbildung 2.4:** Stoffwechselweg der homofermentativen Milchsäuregärung ausgehend von Glukose (nach Schlegel [33])



Weiterhin wird durch die Glykolyse abgebaute Glukose, ob als eigentliche Kohlenstoffquelle oder Produkt vorgeschalteter Stoffwechselaktivitäten anderer Verbindungen, theoretisch vollständig zu Milchsäure umgesetzt [33].

Milchsäure mit einem chiralen C-Atom kann in den Isomeren D(-)- und L(+)-Milchsäure vorliegen und ist eine schwache, organische Carbonsäure [44]. Ob als Säuerungs- oder Konservierungsstoff in der Lebensmittelindustrie (Lebensmittelzusatzstoff E270) oder im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich in Form von intravenösen Elektrolyten oder in Cremes genutzt, die Verwendungsmöglichkeiten für Milchsäure sind zahlreich. Eine der modernsten Anwendungen liegt im Bereich der Biokunststoffe aus Polymilchsäure (engl. *Polylactic Acid*, PLA) [45, 46]. Zu den drei größten Herstellern der 2013 weltweit produzierten 800.000 t Milchsäure gehören CORBION (Niederlande), CARGILL (USA) und HENAN JINDAN LACTIC ACID TECHNOLOGY CO. LTD. (China) [47]. Der Wertmarktpreis lag 2010 bei 1,50 €/kg [48].

Während bei der chemischen Produktion (z. B. durch Hydrolyse von Lactonitril [45]) ein Racemat entsteht, lassen sich durch Fermentation optisch reine Isomere gewinnen (*L. delbrueckii lactis* produziert z. B. D-Milchsäure [41], s. Abbildung 2.4) [46]. Da zudem keine Nebenprodukte enthalten sein sollen, kommen in kommerziellen Produktionsprozessen hauptsächlich fermentative Verfahren und überwiegend homofermentative GRAS (*Generally Recognized As Safe*, engl. für allgemein als sicher anerkannt) Stämme der Gattung *Lactobacillus* zum Einsatz [45]. Dies ist auch der Grund, weshalb andere bekannte Milchsäureproduzenten, z. B. MSB der Gattung *Lactococcus*, Pilze der Gattung *Rhizopus* sowie Stämme der Gattungen *Escherichia*, *Bacillus* oder *Corynebacterium* industriell zur Zeit nicht konkurrenzfähig sind [46]. Dennoch wird im Forschungsbetrieb stetig an der Verbesserung bestehender und auch der Etablierung neuer Verfahren gearbeitet. Allgemeine Übersichten dazu bieten z. B. Abdel-Rahman et al. [49], Castillo Martinez et al. [50] und Ghaffar et al. [51].

## Kapitel 3

# Reaktoren für die Biofilmkultivierung

Für die Biofilmkultivierung sind bereits zahlreiche Reaktorsysteme beschrieben. Im weitesten Sinne zählen dazu sogar natürliche Habitate (z. B. Flüsse). Eine weitaus größere Rolle in der Erforschung von Biofilmen kommt jedoch Biofilmreaktoren im Labormaßstab (engl. *Laboratory Biofilm Reactor*, LBR) zu. Je nach Einsatzzweck bzw. Kontroll- und Messgröße können unterschiedliche Reaktortypen geeignet sein [52]. Tabelle 3.1 fasst die gängigen Systeme aus verschiedenen Übersichtsartikeln zusammen und bewertet sie hinsichtlich der dieser Arbeit zugrunde gelegten wesentlichen Anforderungen (flaches Substratum und Online-Strukturanalyse).

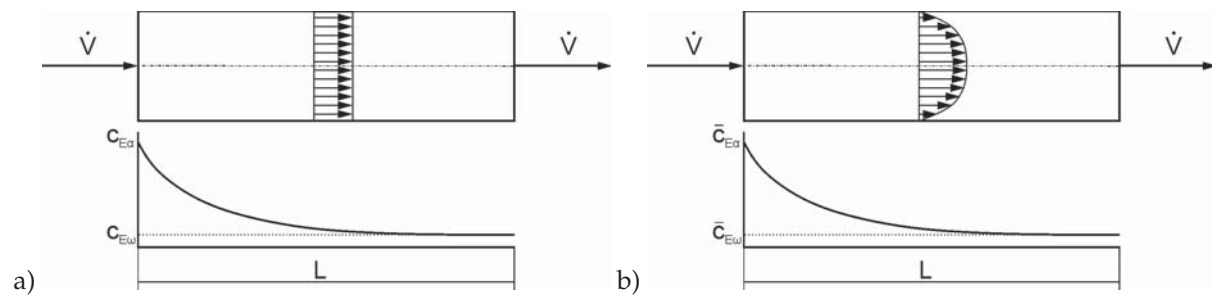
**Tabelle 3.1:** Gängige Reaktortypen (nach [3, 52–58]) und Bewertung für die hier vorgesehene Biofilmkultivierung

Reaktortyp	Beispiele	Erfüllte Anforderungen	
		Flaches Substratum	Online-Strukturanalyse
Festbettreaktor	Rieselbettreaktor	n. a.*	ja
Flachbettreaktor	<i>Open Channel</i> Reaktor, <i>Robbins' Device</i> , Durchflusszelle, <i>Drip Flow</i> Reaktor	ja	ja
Wirbelschichtreaktor	<i>Moving Bed</i> Reaktor	n. a.*	nein
Membranreaktor	AMS Reaktor	n. a.*	ja
Mikrotiterplatte	<i>Calgary Biofilm Device</i>	ja	ja
Rohreaktor	<i>Robbins' Device</i>	nein	nein
Rotierender Reaktor	<i>Rotating Disc</i> Reaktor, <i>Annular</i> Reaktor, CDC Reaktor, <i>Roller Bottle</i> Reaktor	ja	nein

\*Nicht anwendbar, da es sich bei den verwendeten Substrata um geometrisch vorgegebene Metallproben handelt

Einsatzmöglichkeiten für flache Substrata und zudem die Möglichkeit Online-Strukturanalysen durchführen zu können, bieten nur Flachbettreaktoren und Mikrotiterplatten. Für die weitere Festlegung des Reaktortyps ist zudem die angestrebte Betriebsform entscheidend. Bekanntermaßen werden Batch-, Fed-Batch- und kontinuierliche Prozesse unterschieden [59]. Für die Nutzbarmachung der Biofilme als Produktionssystem war letztlich die kontinuierliche Betriebsform vorgesehen. Da Mikrotiterplatten für Batch-Prozesse ausgelegt sind, wurde der Flachbettreaktor als Kultivierungssystem gewählt. Dieser Reaktortyp kann sehr unterschiedlich ausgelegt werden. Als eine Untergruppe der Flachbettreaktoren lassen sich sogenannte Durchflusszellen unterscheiden [52]. Technisch gesehen sind diese mit dem Modell des idealen Rohrreaktors (engl. *Plug Flow Reactor*, PFR) vergleichbar (s. Abbildung 3.1 a).





**Abbildung 3.1:** Strömungsgeschwindigkeit\* sowie Eduktkonzentration im Rohrreaktor: a) Ideales System; b) In Realität mit laminarer Strömung (nach Schwister und Leven [59])  
\*Geschwindigkeit steigt mit der Pfeillänge

Die Länge des Reaktionsraumes des Rohrreaktors ist wesentlich größer als der Durchmesser. Auf der einen Seite des Rohres treten Edukt ( $c_{E\alpha}$ ,  $\bar{c}_{E\alpha}$ ) und Lösungsmittel ein. Auf der anderen Seite wird das Gemisch aus Edukt ( $c_{E\omega}$ ,  $\bar{c}_{E\omega}$ ) und Produkt wieder abgeführt. Deren Konzentrationen ändern sich also örtlich, d. h. über die Reaktorlänge  $L$ . Axiale Durchmischung findet im Idealfall nicht statt. Da die Geschwindigkeit über den gesamten Rohrquerschnitt konstant ist, herrschen an jeder beliebigen Stelle dessen ebenfalls konstante Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer. Diese als Propfenströmung bezeichnete Vermischung bedingt unter Annahme keiner reaktionsbedingten Stoffmengenänderung eine identische mittlere Verweilzeit  $\bar{\tau}_t$  jeden Moleküls im Reaktor:

$$\bar{\tau}_t = \frac{V}{\dot{V}} \quad (3.1)$$

$V$  Reaktorvolumen,  $\dot{V}$  Volumenstrom [59]

In der Realität ist die Strömung jedoch reibungsbehaftet. Über den Rohrdurchmesser ergibt sich dadurch ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil (s. Abbildung 3.1 b). Statt konstanter Konzentrationen über den Rohrquerschnitt können nur noch gemittelte Werte angegeben werden [59].

Da Biofilme eine sehr komplexe Kulturform darstellen und die erhaltenen Ergebnisse stark von der Wahl des Reaktors abhängen, ist ein System mit reproduzierbaren Bedingungen von besonderer Wichtigkeit. In den folgenden Kapiteln werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reaktorsysteme beschrieben. Neben der Auslegung und Einbindung in einer Reaktorperipherie werden dabei auch die hydrodynamischen Bedingungen charakterisiert. Weiterhin werden optimierte, erweiterte und skalierte Systeme vorgestellt.

### 3.1 Design und Konstruktion einer Durchflusszelle

Für die Biofilmkultivierung in Durchflusszellen sind bereits diverse Konstruktionen beschrieben worden ([22, 52, 60–70]) und auch kommerzielle Systeme erhältlich (z. B. von BIOPTECHS, Butler, USA; BIOSURFACE TECHNOLOGIES CORPORATION, Bozeman, USA; IBIDI GMBH, Martinsried, D; MICRO DISH, Utrecht, NL; STOVALL LIFE SCIENCE, Greensboro, USA). Dennoch erfordern die jeweiligen Rahmenbedingungen (insbesondere der Probenwerkstoff und die -geometrie) ein individuell angepasstes Design des Reaktors. Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten war es, eine Durchflusszelle für die Kultivierung und Online-Mikroskopie monoseptischer Biofilme auf geometrisch vorgegebenen Metallproben zu entwickeln. Dazu wurden zunächst spezifische Anforderungen formuliert, anhand derer eine Durchflusszelle entworfen und zur Fertigung in Auftrag gegeben wurde. Nach Auswahl einer geeigneten Reaktorperipherie und dem Einsatz in Biofilmversuchen wurde die Konstruktion



weiterentwickelt und optimiert. Dazu diente auch eine numerische Simulation der Strömung. In den folgenden Kapiteln ist die gesamte Entwicklung detailliert ausgeführt.

### 3.1.1 Geometrie und Werkstoffauswahl

Für erste Biofilmkultivierungen auf im SFB 926 bereitgestellten Metallproben kamen kommerzielle Durchflusszellen (STOVALL LIFE SCIENCE, Greensboro, USA) zum Einsatz (s. Abbildung 3.2). Vorteil deren Verwendung war neben der schnellen Verfügbarkeit auch die Einsparung von Entwicklungsarbeit. Im laufenden Betrieb zeigten sich jedoch Schwächen des Systems. So handelt es sich um sterile *single-use* Produkte mit hohem Stückpreis ( $\approx 65$  €/Stk.). Der wiederholte Einsatz nach Reinigung und Sterilisierung ist aufgrund der geringen mechanischen Stabilität sowie Temperatur- und Chemikalienbeständigkeit nicht möglich. Ferner sind als Substratum für die Biofilme die Innenseiten der Sichtfenster vorgesehen [71]. Für den Einbau und die reproduzierbare Positionierung anderer Substrata wären im Vorfeld Modifizierungen erforderlich, die die Sterilität zunichtemachen und somit ein Kontaminationsrisiko bergen (z. B. Probeneinbau und -fixierung).



**Abbildung 3.2:** *Single-use* Durchflusszelle von STOVALL LIFE SCIENCE

Auch die Produkte der anderen, oben genannten Anbieter stellen für die hier verwandte Probengeometrie keine geeigneten Kultivierungsgefäße dar. Infolgedessen wurde eine speziell angepasste Durchflusszelle (im weiteren Text mit DFZ 3.1 abgekürzt) nach folgenden Anforderungen entworfen:

- Einbaumöglichkeit für 10x2x20 mm (BxHxL) große Metallproben als Substrata
- Vermeidung bzw. Minimierung von Strömungshindernissen und Totzonen
- Reproduzierbarkeit der Überströmung der Probenoberfläche (exakte Positionierung und homogene Strömungsbedingungen)
- Optische Beobachtungsmöglichkeit des Biofilmwachstums auf der Probenoberfläche (Okularinspektion und Mikroskopie)
- Sterilisierbarkeit und Erhalt monoseptischer Bedingungen während der Kultivierung
- Biologische Verträglichkeit der Werkstoffe

Um mikroskopische Untersuchungen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (engl. *Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM) durchführen zu können, ist unter anderem die uneingeschränkte Beweglichkeit des Mikroskoptisches wichtig. Aus diesem Grund sind bei der Konstruktion ein minimiertes Gewicht<sup>1</sup> sowie geringe Ausmaße der Durchflusszelle zu beachten. Die äußeren Maße von DFZ 3.1 (s. Abbildung 3.3) wurden daher auf 25x8x75 mm (BxHxL) festgelegt. Der durchströmte Innenraum (Flusskanal) mit rechteckigem Querschnitt bemisst sich auf 16x2x55 mm (BxHxL) und wird aus Unter- und Oberteil zusammengesetzt. An den kurzen Seiten des Unterteils dienen Tüllen ( $d = 1,5$  mm) als

<sup>1</sup>Maximale Gewichtslast des SUPERZ Mikroskoptisches am TCS SP5 II (LEICA MICROSYSTEMS GMBH, Wetzlar, D)  
 $m = 150$  g.