

"Biofilme und Wasserchemie"

Hans-Curt Flemming

Biofilme sind überall

Wasser ist voller Leben. Seine Hauptbewohner, die Mikroorganismen, sind nur mit sehr großem Aufwand daraus zu entfernen und fernzuhalten. Besonders beliebte Besiedlungsräume sind die Grenzflächen des Wassers – und alles Wasser ist von Grenzflächen umgeben; es gibt sie auch im Wasser, zum Beispiel an Partikeln oder Öl. Dort akkumulieren sie sich und bilden Biofilme.

Denn nur ein winziger Anteil der Mikroorganismen auf der Erde lebt als Singles, während die überwiegende Mehrzahl sich in Aggregaten zusammengetan hat, die kollektiv als "Biofilme" bezeichnet werden. Diese Bezeichnung ist zugegebener Maßen unscharf, denn sie umfasst nicht nur die Mikroorganismen, die sich als schleimige Beläge auf feuchten Oberflächen, als "Kahmhaut" auf dem Wasser oder an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser entwickelt haben, sondern auch Flocken im Wasser, die als "schwimmende Biofilme" betrachtet werden oder Schlämme die besonders dicke Biofilme darstellen. Im Boden und in Sedimenten kommen Mikroorganismen praktisch ausschließlich als Biofilme vor, gebunden an die Oberfläche von Mineralien oder auch an tote Biomasse. Diese unterschiedlichen Erscheinungsformen einiae haben aber Gemeinsamkeiten, die es rechtfertigen, sie unter einem einzigen Begriff zu erfassen. Wichtigster Gesichtspunkt ist, dass die Mikroorganismen in Biofilme eingehüllt sind, in eine schleimige Schicht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), bestehend aus Nucleinsäuren und Lipiden, Polysacchariden, Proteinen, und zwar unterschiedlicher Zusammensetzung [1]. Trotz dieser Verschiedenheiten stellen die EPS die unmittelbare Umgebung der Zellen dar, sie sind sozusagen das "Haus der Biofilm-Bewohner". Ihre Eigenschaften bestimmen die Lebensbedingungen, und sie tun dies in einer Weise, die so vorteilhaft ist, dass eben fast alle Mikroorganismen in Biofilmen leben. Sie sind die älteste, erfolgreichste und am weitesten verbreitete Form des Lebens auf der Erde. Und das hat gute Gründe.

Die Stärke der Gemeinsamkeit: "emergente Eigenschaften" der Biofilme

Im Biofilm können die Mikroorganismen kollektive und interaktive Eigenschaften und Fähigkeiten entwickeln, die Einzelzellen nicht haben und von ihnen auch nicht vorausgesagt werden können [2]. Das nennt man "emergente Eigenschaften" – sozusagen die "Stärke der Gemeinsamkeit". Ein Schlüssel dafür ist die EPS Matrix [1]. Bild 1 a-d zeigt die Biofilm-Matrix schematisch in verschiedenen Dimensionen.

Diese Matrix bildet einen funktionellen Gemeinschaftsraum für die Biofilm-Organismen. Wenn frei suspendierte (planktonische) Mikroorganismen sessil werden, reagieren sie darauf. Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, wie die Genexpression in Reaktion auf die Lebensweise im Biofilm auf- und abreguliert wird. Hier können die Biofilmorganismen komplexe Interaktionen entwickeln [3]. Der Biofilm stellt ein Stadium im Lebenszyklus für viele Mikroorganismen dar und bietet die Möglichkeit, zwischen sessilem und planktonischem Lebensstil zu wechseln. Biofilme sind komplex, vielseitig, widerstandsfähig und ubiquitär; sie kommen auch in extremen Habitaten vor und sind die

älteste und erfolgreichste Lebensform auf der Erde. Die Biofilm-Forschung konzentriert sich bisher auf Bakterien, aber Biofilme können auch Viren, Protozoen und Metazoen enthalten; deren Rolle ist bisher allerdings bisher viel weniger untersucht.

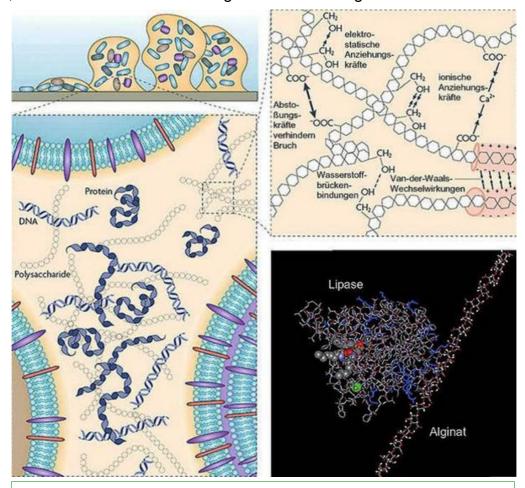


Abbildung 1:

- a) Biofilm mit typischer Pilz-Struktur;
- b) der wasserhaltige Raum zwischen den Zellen mit Proteinen, Polysacchariden und DNA;
- c) Wechselwirkungen zwischen Polysaccharid-Molekülen der Matrix;
- d) Molekulare Modellierung der Interaktion zwischen dem Exopolysaccharid Alginat und Lipase, Brückenbildung zwischen kationischen Aminosäuren und Carboxylgruppen von Mannuronat- und Guluronatresten im Alginat [1].

Das externe Verdauungssystem

Zu den Hauptbestandteilen der EPS-Matrix zählen die extrazellulären Enzyme. Wie in Bild 1d dargestellt, können sie an extrazelluläre Polysaccharide gebunden und dadurch in der Matrix zurückgehalten werden, wie am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa gezeigt wurde [1]. Sie bilden ein externes Verdauungssystem für die Biofilm-Organismen. Die Matrix verhindert, dass sie fortgeschwemmt werden, so dass ihre Produkte in unmittelbarer Nähe der Zellen bleiben und keine langen Diffusionswege zu überbrücken sind. Mit dieser enzymatischen Ausstattung können Biofilme auch ungelöstes Material, z.B. organische und anorganische Partikel verwerten. Für die Selbstreinigung von Böden, Sedimenten und Gewässern ist dies von globaler Bedeutung. Das ist die Grundlage für die Abwasserbehandlung; Hälfte biologische Trinkund die der organischen Abwasserinhaltsstoffe ist partikulär und kann erst durch die extrazellulären Enzyme für die Bakterien verfügbar gemacht werden. Bei der biologischen Laugung bildet die EPS-Matrix einen aktiven Reaktionsraum, in dem die Interaktion mit Mineralien stattfindet.

Synergistische Mikrokonsortien

Der Lebensraum Biofilm wird gestaltet durch die Interaktionen der Populationen über Selektion, Antagonismen und Synergismen. Dabei können synergistische Mikrokonsortien entstehen, die über längere Zeit hinweg stabil bleiben. Ein Beispiel ist die Nitrifikation. Es ist aber auch bekannt, dass Bakterien sich u.U. auch im Biofilm bewegen können und neue Interaktionen eingehen. Aus der Bildung der Mikrokonsortien und der Rückhaltung der extrazellulären Enzyme ergibt sich eine funktionelle Architektur, mit der sich die Biofilm-Bewohner Nährstoff-Quellen erschließen können, welche ihnen als Einzelzellen nicht zugänglich wären.

Konzentrationsgradienten schaffen viele verschiedene Habitate

weitere emergente Eigenschaft von Biofilmen ist die Entstehung Konzentrationsgradienten im Mikrometer-Maßstab. Die Gradienten können erst durch die EPS-Matrix entstehen. Diese stellt – entgegen dem intuitiven Eindruck – keine starke Diffusionsbarriere für ungeladene Moleküle dar; immerhin besteht sie zu über 95 % aus Wasser, und die Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff, viele anorganische Ionen sowie eine Vielzahl von organischen Substanzen sind ziemlich ähnlich wie jene im freien Wasser. Was die Gradienten verursacht, ist die physiologische Aktivität der Organismen. So können in Biofilmen von weniger als 50 µm Dicke anaerobe Bereiche entstehen, wenn aerobe Organismen den Sauerstoff schneller verbrauchen als er nachdiffundieren kann. Der Unterschied zur freien Wasserphase besteht darin, dass im Biofilm praktisch kein konvektiver Stofftransport stattfindet. Damit wird die Diffusionsgeschwindigkeit limitierend. Hier spricht man von einer Diffusions-Reaktions-Barriere. Sie führt dazu, dass auf mehreren Mikrometern Entfernung aerobe und anaerobe Habitate nebeneinander existieren können. Weitere Gradienten können sich natürlich auch hinsichtlich des pH-Wertes oder des Redox-Potentials bilden. In mikrobiellen Matten kommt auch noch der Licht-Gradient dazu, wodurch sich eine faszinierende funktionale Strukturierung von phototrophen sowie heterotrophen aeroben und anaeroben Organismen entwickelt.

Interzelluläre Kommunikation

Im Biofilm gibt es typischerweise hohe Zelldichten (bis zu 1010 Zellen pro cm2), was die Zell-Zell-Kommunikation auslöst und kontinuierlich weiter bestehen lässt [4]. Sie wird durch Signalmoleküle vermittelt wie zum Beispiel N-Acyl-Homoserinlactone bei vielen Gram-negativen Bakterien oder Oligopetide bei Gram-positiven Bakterien und Pilzen Mit Hilfe der Signalmoleküle ab einer bestimmten Schwellenkonzentration erhalten die Biofilmpopulationen Informationen über die Zelldichte ("Quorum sensing") und werden über dadurch ausgelöste Veränderungen der Genexpression zu gemeinschaftlichem Verhalten befähigt. Die emergente Eigenschaft der Kommunikation bewirkt, dass andere emergente Eigenschaften von Biofilmen reguliert werden und erlaubt koordinierte Prozesse im Biofilm. Kooperation und Konkurrenz, Interaktion mit der Umwelt, Nahrungsaufnahme und Abwehr von Fressfeinden, Expression von Virulenzfaktoren, Aufund Abbau der Matrix sowie die Ablösung von Zellen wird durch Signalmoleküle beeinflusst [4]. Interessant ist auch, dass die Zuwanderung neuer Organismen zu Biofilmen zu massiven Abwehrreaktionen in Form antimikrobieller Verbindungen, Enzyme und Metabolite seitens der Biofilm-Gemeinschaft führen kann. Strategie der Eindringlinge kann sein, die Zell-Zell-Kommunikation im Biofilm zu stören und auch die Matrix abbauen.

Zwar lassen sich mit mathematischer Modellierung Biofilm-ähnliche Strukturen ganz ohne Quorum-Sensing simulieren, dennoch sind diese Modelle bisher nicht in der Lage, auch Voraussagen über das Verhalten von Biofilmen zu machen [5].

Nicht nur die Anheftung an Oberflächen und der Aufbau von Biofilmen ist reguliert, sondern auch Prozesse der Dispersion der Matrix und die Ablösung von Biofilm-Zellen. In einem exzellenten Überblick zeigen McDougald et al. [6], dass in der Spätphase der Biofilm-Entwicklung Mechanismen wirksam werden und zu einer Ablösung von Schwärmerzellen ("disperser cells") führen, die sich zu neuen Habitaten tragen lassen.

Verstärkter Schutz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

Seit langem ist bekannt, dass Mikroorganismen in Biofilmen um Größenordnungen höhere Konzentrationen an Desinfektionsmitteln, anderen Bioziden und Antibiotika vertragen als wenn sie im planktonischen Zustand sind [7]. Plausibel, aber unzutreffend ist die Erklärung, dass die EPS-Matrix per se eine Diffusionsbarriere darstellt. Wie erwähnt, sind für kleine Moleküle (~ 103 Da) die Diffusionskoeffizienten im Biofilm etwa in gleicher Höhe wie in freiem Wasser. Erst, wenn eine Reaktion mit Biofilm-Bestandteilen stattfindet, werden biozide Stoffe zurückgehalten. Außerdem gibt es in der Tiefe von Biofilmen häufig Bereiche, in denen die Zellen nicht wachsen. Das macht sie gegenüber vielen Antibiotika und Desinfektionsmitteln erheblich weniger empfindlich – aber auch gegen die Immunabwehr des Körpers, wenn Gewebe, Knochen oder Implantate mit Biofilmen besiedelt sind; die Verbreitung von Resistenz-Genen ist aufgrund der hohen Zelldichte begünstigt [7].

Nützliche und schädliche Biofilme

Biofilme bilden sozusagen die "globale Putzkolonne". Sie sind die Träger der Selbstreinigungskräfte der Natur und in der Lage, in Gewässern, Böden und Sedimenten organische Stoffe abzubauen. Diese Fähigkeit wird technisch in gewaltigem Maßstab genutzt, zum Beispiel bei der biologischen Abwasser-Behandlung, bei der Bodenfiltration und den biologischen Filtern der Trinkwasser-Aufbereitung. Hier ist es wichtig, die mikrobiellen Prozesse zu verstehen, die der Reinigungsleistung zugrunde liegen, um sie wirkungsvoll zu steuern und zu optimieren.

Biofilme können aber auch am falschen Ort und zur falschen Zeit auftreten. Ein Beispiel ist das sogenannte "Biofouling" [8], etwa, wenn sie sich auf Membranen in der Wassertechnik entwickeln. Dann verstärken sie den hydraulischen Widerstand der Membranen, führen zur Konzentrationspolarisation und auch zum Druckabfall. Bild 2 a-c zeigt einen Biofilm, der sich auf einer Umkehrosmose-Membran entwickelt hat und zahllose Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen überstanden hat, bis er zu irreversiblem Biofouling führte. Auch für die Bekämpfung unerwünschter Biofilme ist es wichtig, ihre grundlegenden Entwicklungsgesetze zu kennen, um wirklich effektive Gegenmaßnahmen zu ergreifen [8].

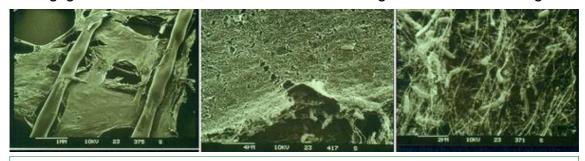


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf einer Umkehrosmose-Membran.

- A) Überblick: ein Netzwerk von EPS bedeckt Membran und Spacer.
- B) Ein Blick unter die EPS-Oberfläche.
- C) Nahaufnahme: Bakterien sind erkennbar. Die faserige Struktur entsteht durch den Trocknungsprozess, der zur Aufnahme erforderlich ist.

Biofilme und Wasserchemie

Biofilme sind an sehr vielen Prozessen beteiligt, mit denen sich die Wasserchemie beschäftigt – oft, ohne bemerkt zu werden. Dazu gehören zum Beispiel Sorptions-Verfahren, bei denen sie eine Zwischenschicht bilden, die Wasser vom Sorbens trennt, oder bei Langzeit-Messungen mit verschiedensten Sensoren in der Umwelt, wo sie die Sensoren besiedeln und das Signal beeinflussen. Biofilme gibt es auch an der Grenzfläche zur Atmosphäre; in den Ozeanen sind sie Teil des sogenannten Neustons. Dort beeinflussen sie den Übergang von Gasen in die Wasserphase und zurück. Es gibt noch sehr viele weitere Beispiele – für alle ist wichtig, zu verstehen, was Biofilme sind, was sie tun und auch, warum man sie nur vorübergehend bekämpfen kann. In ihnen ist das Leben unbesiegbar.

Kontakt: Schlauer Fuchs



Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

Universität Duisburg-Essen Biofilm Centre in der Fakultät für Chemie Universitätsstrasse 5 45141 Essen

IWW Zentrum Wasser Mülheim Moritzstrasse 26 45476 Mülheim

Tel.: +49 (0)172 9066119 E-mail: <u>hc.flemming@uni-due.de</u> Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Wovon werden die Mikroorganismen im Biofilm eingehüllt?

Literatur:

- [1] Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010): The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623-633
- [2] Flemming, H.-C. u. Wingender, J. (2012): Die Stärke der Gemeinsamkeit. BioSpektrum 18, 714-716
- [3] Jefferson K K (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol. Lett. 236:163-173
- [4] Greenberg E P (2003) Bacterial communication: tiny teamwork. Nature 424:134
- [5] Nadell C D, Xavier J B, Foster K R (2009) The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiol Rev 33:206-224
- **[6]** McDougald D, Rice S A, Barraud N, Steinberg P D, Kjelleberg S (2011) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. Nat Rev Microbiol 9:1-12
- [7] Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2:114-122
- **[8]** Flemming, H.-C.: Microbial biofouling unsolved problems, insufficient approaches and possible solutions. In: Flemming, Wingender, J., H.-C., Szewzyk, U. (eds.): Biofilm Highlights. Springer Int. Heidelberg, New York, 2011, 81-109