

Band 80

Schriftenreihe des Lehrstuhls für  
Wasserchemie und Wassertechnologie  
und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

**Untersuchungen zum Einfluss von Eisen auf die Struktur  
und mechanischen Eigenschaften von  
*Bacillus subtilis* Biofilmen**

Luisa Gierl

Herausgeber

Harald Horn

Karlsruhe 2020

Luisa Gierl

Untersuchungen zum Einfluss von Eisen auf die Struktur und mechanischen Eigenschaften von *Bacillus subtilis* Biofilmen

Herausgeber: Harald Horn

Band 80

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Karlsruhe 2020

ISSN: 2195-2973

Lehrstuhl für Wasserchemie und Wassertechnologie und DVGW-Forschungsstelle  
am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Engler-Bunte-Ring 9

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-42581

Fax: +49-(0)721-608-46497

E-Mail: [ebi-sekretariat-wasserchemie@kit.edu](mailto:ebi-sekretariat-wasserchemie@kit.edu)

<http://wasserchemie.ebi.kit.edu/>

Titelbild: OCT-Aufnahmen einzelner, in Fließzellen (FZ) kultivierter Biofilme (Höhentopographie)

**Untersuchungen zum Einfluss von Eisen auf die Struktur  
und mechanischen Eigenschaften von  
*Bacillus subtilis* Biofilmen**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
**DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)**

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

**DISSERTATION**

von  
M. Sc. Luisa Gierl  
aus Landau (Pfalz), Deutschland

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Horn  
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Gescher

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2020



*“Sich Limitationen bewusst zu sein, bedeutet bereits, darüber hinaus zu gehen.”*

**- Georg Friedrich Hegel**

# Danksagung

Zunächst möchte ich mich aufrichtig bei Prof. Harald Horn für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen, bedanken. Von Beginn an, haben Sie mich mit Ihren wertvollen Ratschlägen unterstützt und die vorliegende Arbeit in die „richtige“ Richtung gewiesen. Vielen Dank dafür.

Besonders danken möchte ich weiterhin Dr. Michael Wagner, der hauptsächlich meine Betreuerfunktion einnahm. Ohne ihn wäre diese Arbeit, wie sie jetzt vorliegt, definitiv nicht zustande gekommen. Hier und da gab es immer wieder Stolpersteine, die er sofort zu beheben wusste, wenn ich es nicht konnte. Durch seine Kenntnisse in der Bildauswertung und seiner stetigen Unterstützung konnte ich viel erlernen, was mich persönlich als auch meine fachspezifischen Kenntnisse förderte.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Arbeitskollegen der Wasserchemie. Mit Laure, Annika und Max H. konnte ich über alle Themen sprechen. Auch fand ich unsere gegenseitige Unterstützung und unsere Zusammenarbeit bezüglich unseres altertümlichen OCTs sehr wertvoll und es gab immer wieder einen Grund mit euch zu lachen. Zudem bin ich froh, dass ich mit den anderen PhD-Studenten diese Zeit erleben durfte. Es gab immer Anregungen, Diskussionen, Erfahrungen, Planungen und auch Unternehmungen, die uns begleitet haben und die wir zusammen gemeistert haben. Vielen Dank an: Claire, Alondra, Fabi, Philip, Ali, Rowayda, Oli, Flo R., Flo B., Andreas, Max M., Alex, Marc, Amélie, Dámare, Peng, Prantik, Giorgio, Steffi K. und Michael S. Danken möchte ich außerdem herzlich meinen Arbeitskollegen: Florencia, Ewa, Andrea, Birgit, Gudrun Abbt-Braun, Steffi W., Uli R., Axel, Matthias W., Antje, Katharina, Dunja, Uli S., Reinhard, Norbert, Tanja, Sylvie und Ursula. Mein besonderer Dank gilt natürlich Rafi, der mich stets in allem unterstützte, mir hilfreiche Ideen gab und sich meine Leiden in den Tälern dieser Reise anhören musste.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Mathias K., Fabrice, Erwin und Freddy, die auch bei kurzfristigen Anfragen alles in Bewegung setzten um Bauteile zum Bewegen zu bringen oder wiederherzurichten. Auch die Gespräche mit euch waren mir sehr wichtig.

Ein Dankeschön auch an die Firma Thorlabs, vor allem an Sebastian Schäfer, Martin Thunert und Martin Krahe, die uns bei der Reparatur des Ganymedes I und allen möglichen Fragestellungen rund um die OCT mehr als behilflich waren.

Weiterhin dankbar bin ich darüber, dass Prof. Johannes Gescher sich meiner Dissertation als Korreferent annahm. Danken möchte ich außerdem Markus Glaß für die Hilfe in ImageJ und Volker Zibat für die REM-Aufnahmen. Auch Dr. Lena Yoshihara, Harald Willmann und meinem Studenten Oliver Birchen danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und Oliver zusätzlich für seine nicht nachlassende Motivation.

Ganz besonders danke ich meinen Freunden und meiner lieben Familie: meiner Mama, meinen Brüdern und Franzi für die stetige Unterstützung seit Beginn meines Studiums und dafür, dass sie immer für mich da waren.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in den letzten 3 ½ Jahren unterstützt und auf diesem Weg begleitet haben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) – Projektnummer HO 1910/16-1 gefördert.

# Zusammenfassung

Biofilme sind Aggregationen von Mikroorganismen, die in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind und hauptsächlich an Grenzflächen in wässrigen Umgebungen auftreten. Die Biofilmforschung ist von großem Interesse, um operative Parameter in Tröpfchen-Bewässerungssystemen, Kläranlagen, Trinkwasseraufbereitungssystemen oder auch in Reaktorsystemen zur Produktion von Chemikalien bestimmen zu können.

In der vorliegenden Dissertation wurde deshalb auf die Biofilmentwicklung sowie auf die Interaktion des Biofilms mit seiner Umgebung (Fluid-Struktur-Dynamik) unter dem Einfluss verschiedener Eisenkonzentrationen ( $\beta = 0,25$  und  $2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) sowie Volumenströmen ( $Q = 1$  und  $5$  mL/min) näher eingegangen. Dabei fanden Wachstumsexperimente im Hinblick auf strukturelle Biofilmeigenschaften sowie Deformationsstudien unter dem Aspekt der Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften in Fließzellen statt. Weiterhin wurde die Automatisierung von Laborabläufen sowie die Automatisierung der Versuchsauswertung näher betrachtet.

Die Untersuchungen erfolgten dabei mittels optischer Kohärenztomographie (OCT). Die OCT ist ein Verfahren, welches die Biofilmstruktur *in situ*, nicht-invasiv und hochauflösend abbildet. Die Integration der OCT in ein neues und automatisiertes Kultivierungs- und Monitoringsystem zeigte hier die Notwendigkeit einer Mindestanzahl von statistisch relevanten Biofilmreplikaten und die Möglichkeit diese mit dem System simultan abzubilden.

Eine Differenzierung der Biofilmentwicklung bzw. -stabilität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte unter Anwendung des Kultivierungs- und Monitoringsystems beurteilt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt dabei, dass eine Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  zum Kultivierungsmedium die Differenzierung zu voll entwickelten Biofilmen maßgeblich beeinflusst. Es wurde nachgewiesen, dass erhöhte Mengen an  $\text{Fe}^{2+}$  ( $2,5$  mg/L) das Biofilmwachstum bezogen auf die Biofilmdicke, Fließkanalbedeckung sowie weitere Strukturparameter förderte. Es konnte demonstriert werden, dass das  $\text{Fe}^{2+}$  sich in die Biofilmmatrix einlagert und in Form von Eisenoxidhydroxiden ( $x\text{-FeO(OH)}$ ) vorliegt.

Innerhalb der Deformationsstudien wurde weiterhin illustriert, dass auch nach hohen Wandschubspannungen  $\tau_W$  noch Biofilmmasse in den Fließzellen vorhanden war, was vor allem für Aufreinigungsprozesse in Trinkwassersystemen von Bedeutung ist. Weiterhin zeigten die Versuche, dass ein erhöhtes Vorkommen von  $\text{Fe}^{2+}$  im Nährmedium zu einer erhöhten Kompressibilität der Biofilme führt. Die Dissertation begründet die Notwendigkeit der Durchführung von Replikaten in der Biofilmforschung. Weiterhin zeigt sie auch die Notwendigkeit der Nutzung einer Vielzahl von Strukturparametern zur vollständigen Analyse der Fluid-Biofilm-Interaktion und der Biofilmentwicklung. Auch demonstriert sie, dass eine Automatisierung der Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften sinnvoll ist. Da die physikalische Struktur eines Biofilms die Interaktion mit seiner Umgebung determiniert, sind die hier dargestellten Ergebnisse von immenser Bedeutung für den Forschungsbereich Biofilmkontrolle.

# Abstract

Biofilms are aggregations of microorganisms that are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) and which mainly occur at interfaces in aqueous environments.

Biofilm research is of great interest in order to be able to determine operational parameters in drip irrigation systems, sewage treatment plants, drinking water treatment systems or in reactor systems for the production of chemicals.

In the present thesis, therefore, biofilm development and the interaction of the biofilm with its environment (fluid-structure-dynamics) under the influence of different iron concentrations ( $\beta = 0.25$  and  $2.5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) and volume flows ( $Q = 1$  and  $5 \text{ mL/min}$ ) are discussed in more detail. Growth experiments with regard to structural biofilm properties as well as deformation studies under the aspect of the analysis of mechanical biofilm properties in flow cells took place. Furthermore, the automation of laboratory processes and the automation of the test evaluation were examined more closely.

The examinations were carried out using optical coherence tomography (OCT). OCT is an imaging modality that maps the biofilm structure *in situ*, non-invasively and with high resolution. The integration of the OCT into a new and automated cultivation and monitoring setup showed the necessity to carry out a minimum number of statistically relevant biofilm replicates and the possibility to display them simultaneously with this system.

A differentiation of the biofilm development and biofilm stability under different growth conditions could be assessed using the cultivation and monitoring system. The present study shows that an addition of  $\text{Fe}^{2+}$  to the cultivation medium significantly influences the differentiation into fully developed biofilms. It was proven that increased amounts of  $\text{Fe}^{2+}$  ( $2.5 \text{ mg/L}$ ) promoted biofilm growth in relation to the biofilm thickness, surface coverage and further structural parameters. It could be demonstrated that  $\text{Fe}^{2+}$  is stored in the biofilm matrix and that it is present in the form of iron oxide-hydroxides ( $x\text{-FeO(OH)}$ ).

Furthermore, the deformation studies illustrated that biomass was still present in the flow cells even after high shear stress, which is particularly important for purification processes in drinking water systems. The experiments also showed that an increased occurrence of  $\text{Fe}^{2+}$  in the nutrient medium leads to an increased compressibility of the biofilms.

The thesis justifies the need to carry out replicates in biofilm research. Additionally, the study verifies the need to use a variety of structural parameters for a complete analysis of the fluid-biofilm interaction and for biofilm development. It demonstrates that automating the analysis of mechanical biofilm properties makes sense. Since the physical structure of a biofilm determines the interaction with its environment, the results presented here are of enormous importance for the research area of biofilm control.

# Publikationsliste

## Peer-reviewed Publikationen

**Gierl, L.,** Stoy, K., Faína, A., Horn, H. & Wagner, M.: An open-source robotic platform that enables automated monitoring of replicate biofilm cultivations using optical coherence tomography. *npj Biofilms Microbiomes* **18**, 1-9 (2020).

## Konferenzbeiträge

**Gierl, L.,** Wagner, M. & Horn, H.: Introducing a novel, fully-automated cultivation and screening tool for the structural and mechanical investigation of biofilms by means of optical coherence tomography. *Biofilms 8*, 27. – 29. Mai 2018, Åarhus, Dänemark.

**Gierl, L.,** Horn, H. & Wagner, M.: Iron as a biofilm control agent: manipulation of biofilm development and differentiation. *Biofilms 9*, 28. September – 1. Oktober 2020, Karlsruhe, Deutschland.

## Nicht begutachtete Publikationen

**Gierl, L.** & Wagner, M.: Charakterisierung struktureller und mechanischer Eigenschaften von Biofilmen unter Anwendung eines vollautomatisierten Screening-Setups. *Fachbericht aus Forschung und Lehre, Sonderdruck gwf Wasser / Abwasser* **159**, 40-41 (2018).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Biofilmstruktur – und entwicklung.....	1
1.2	Optische Kohärenztomographie.....	2
1.3	Aktueller Forschungsstand .....	4
1.4	Motivation.....	5
1.5	Fragestellungen und Ziele .....	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	6
2.1	Optische Kohärenztomographie.....	6
2.2	Auswertung der Bilddaten .....	7
2.3	Monitoring- und Kultivierungsplattform .....	14
2.4	Eisenbestimmung im Biofilm.....	16
2.5	Biofilmkultivierung .....	17
<b>3</b>	<b>Statistische Betrachtung der Biofilmentwicklung in Biofilmreplikaten</b> .....	24
3.1	Positioniergenauigkeit.....	24
3.2	Notwendigkeit der Analyse von Biofilmreplikaten.....	27
<b>4</b>	<b>Manipulation der Biofilmentwicklung und -struktur unter dem Einfluss von Fe<sup>2+</sup> im Medium</b> .....	35
4.1	Primäre Biofilmentwicklung.....	35
4.2	Steigende Akkumulation von Eisen im Biofilm.....	47
4.3	Einlagerung in Form von Eisenoxidhydroxiden.....	50
<b>5</b>	<b>Biofilmstabilität</b> .....	57
5.1	Semi-automatisierte Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften.....	57
5.2	Unterschiede in der Biofilmdeformation.....	60
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	77
	Literaturverzeichnis .....	80
	Anhang.....	89

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anzahl an Publikationen mit den Begriffen „Biofilm“, „OCT“ und „automated“ .....	3
Abb. 2 Autokorrelationsartefakte in einem 2D-Scan. ....	8
Abb. 3 Generierung der MIPs aus dem Binärdatensatz. ....	9
Abb. 4 Darstellung von Topographien und Änderung der Parameterwerte.....	12
Abb. 5 Kombination aus der experimentellen und der Observationsebene .....	14
Abb. 6 Schema der robotischen Plattform.....	15
Abb. 7 3D-Rendering und Foto der sticky-Slides I Luer 0.4 Fließzellen .....	19
Abb. 8 Aufbau der Kultivierung mit Monitoringsystem .....	20
Abb. 9 Schema der Deformationsversuche .....	22
Abb. 10 Abweichungen $\Delta x$ bzw. $\Delta y$ der je $N = 100$ Positionierungen .....	25
Abb. 11 Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) einzelner Biofilme.....	28
Abb. 12 Entwicklung der Biofilmstruktur.....	29
Abb. 13 Heatmaps der Biofilmparameter aller $N = 24$ Biofilme.....	31
Abb. 14 Unter- bzw. Überschätzung bei unterschiedlicher Anzahl an Replikaten .....	32
Abb. 15 Übersichtsbilder von je $N = 3$ Fließzellen.....	36
Abb. 16 Höhenkartierungen (MIPs) der Biofilme jeder Bedingung.....	37
Abb. 17 Vergleich der strukturellen Biofilmparameter 1.....	39
Abb. 18 Vergleich der strukturellen Biofilmparameter 2.....	42
Abb. 19 Im Biofilm eingelagertes Eisen an Tag 10 der Wachstumsversuche .....	47
Abb. 20 Akkumulationsverlauf von Eisen im Biofilm .....	48
Abb. 21 ATR-IR-spektroskopische Aufnahmen der Biofilme.....	50
Abb. 22 Potenzielle Transformationsprozesse von Eisen .....	56
Abb. 23 Verfahren zur Bestimmung der beiden Parameter $\alpha$ und $L$ .....	58
Abb. 24 Fließschema der Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften.....	59
Abb. 25 Vergleich der Längenänderungen .....	61
Abb. 26 Korrelationen der Winkeländerung $\Delta\alpha$ und der Längenänderung $\Delta L$ .....	63
Abb. 27 Längenänderungen der $N = 5$ Kolonien bis $\tau_w = 16$ Pa.....	66
Abb. 28 Winkeländerungen der $N = 5$ Kolonien bis $\tau_w = 16$ Pa.....	67
Abb. 29 Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) einzelner Biofilmkolonien.....	68
Abb. 30 Elastizitäten von Gummiband und Stahl. ....	72
Abb. 31 Abnahme der $\bar{L}_F$ sowie Reduktion der $SC$ . ....	74
Abb. 32 Mittlere Aggregatlänge $AHRL$ sowie relative Aggregatlänge $AHRL/AHRL_0$ .....	75

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der ausgewerteten Strukturparameter .....	8
Tab. 2 Verwendete Nährmedien .....	18
Tab. 3 Übersicht der Experimente .....	21
Tab. 4 Entsprechende Wandschubspannung bei angegebenem Volumenstrom .....	22
Tab. 5 Detaillierte Werte der Positioniergenauigkeit.....	25
Tab. 6 Versuchsübersicht zur Analyse struktureller Biofilmeigenschaften. ....	35
Tab. 7 Zweifaktorielle Varianzanalyse der ermittelten Strukturparameter .....	45
Tab. 8 Übersicht der aufgetretenen Absorptionen bei der ATR-FTIR.....	52
Tab. 9 Am häufigsten vertretene Eisenverbindungen.....	54
Tab. 10 Versuchsübersicht zur Analyse der mechanischen Biofilmeigenschaften .....	57
Tab. 11 Zusammenhang zwischen Wachstumsbedingungen und mechanischen Eigenschaften.....	64
Tab. 12 Kompressibilität $\beta_k$ .....	70
Tab. 13 Abtrag der Biofilmkolonien .....	73

# Abkürzungen

## Allgemeine Abkürzungen

API	engl. <i>application programming interface</i> , Programmierschnittstelle
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
CLI	engl. <i>command line interface</i> , Kommandozeilenschnittstelle
CLSM	engl., konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CNC	engl. <i>computerized numerical control</i> , computergestützte numerische Steuerung
CoM	engl. <i>center of mass</i> , Zentrum der Masse
EDM	engl. <i>euclidean distance mapping</i> , euklidische Abstandskartierung
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
Fe <sup>2+</sup>	Eisen(II)-Ionen
FT	Fourier-Transformation
FZ	Fließzelle
GUI	engl. <i>graphical user interface</i> , grafische Benutzeroberfläche
ICP-OES	engl., optische Emissionsspektrometrie mit induktiv-gekoppeltem Plasma
IR	infrarot
IQR	engl. <i>interquartile range</i> , Interquartilsabstand
LB	Luria-Broth Medium
LUT	Lookup Tabelle
MIP	Maximumintensitätsprojektion
OCT	engl., optische Kohärenztomographie
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PVC	Polyvinylchlorid
Px	Pixel
RC	Referenzchemikalie (FeCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SDK	engl. <i>software development kit</i> , Softwareentwicklungssystem
SLD	Superlumineszenzdiode
TIFF	engl. <i>tagged image file format</i>
TS	Trockensubstanz
VE	voll entsalzt
x-FeO(OH)	Polymorph eines Eisenoxidhydroxids

## Nomenklatur

$A$	Fläche	( $\mu\text{m}^2$ )
$a, b$	Pixelwerte	(-)
$E$	Elastizitätsmodul	(Pa)
$F$	Kraft	(N)
$G$	Schubmodul	(Pa)
$H$	Höhe des Fließkanals	( $\mu\text{m}$ )
$i$	Position im Bildstapel $i$	(-)
$K$	Kompressionsmodul	(Pa)
$L$	Länge	( $\mu\text{m}$ )
$\Delta L$	Längenänderung der Aggregate	( $\mu\text{m}$ )
$L_{relax}$	Relaxation der Aggregatlänge	(%)
$N$	Anzahl	(-)
$n$	Brechungsindex	(-)
$P$	Wahrscheinlichkeit	(-)
$p$	Wahrscheinlichkeitswert	(-)
$Q$	Volumenstrom	(mL/min)
$s$	Standardabweichung	(-)
$u$	Fließgeschwindigkeit	(cm/s)
$\tilde{x}$	Median	(-)
$\bar{x}$	Mittelwert	(-)
$\Delta x, \Delta y$	laterale Auflösung	(-)
$\Delta z$	axiale Auflösung	(-)

## Griechische Symbole

$\alpha$	Scherwinkel (Mechanik)	( $^\circ$ )
$\Delta\alpha$	Winkeländerung der Biofilmmaggregate	( $^\circ$ )
$\alpha_{0,01}$	Signifikanzniveau (Statistik)	(-)
$\alpha_{relax}$	Winkel der Aggregate nach Relaxation	( $^\circ$ )
$\beta_{Fe^{2+}}$	Konzentration von $Fe^{2+}$	(mg/L)
$\beta_K$	Kompressibilität (Mechanik)	( $\text{Pa}^{-1}$ )
$\varepsilon$	Dehnung nach Scherbeanspruchung	(-)
$\lambda$	Wellenlänge	(nm)
$\nu$	Poissonzahl	(-)
$\tau_w$	Wandschubspannung in Flüssigkeiten	(Pa)
$x_c, y_c$	Clusterpixel in x- bzw. y-Richtung	(-)
$x_r, y_r$	Pixelreihe in x- bzw. y-Richtung	(-)

# 1

## Einleitung

Biofilme sind sessile Lebensgemeinschaften, die sich bevorzugt in wässrigen Umgebungen an Grenzflächen ausbilden. Sie bestehen aus Mikroorganismen, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS; Proteine und Polysaccharide), extrazellulärer DNA und Wassereinlagerungen.<sup>1</sup> Im Vergleich zu suspendierten Zellen bietet die Lebensweise als Biofilm sowohl räumlichen als auch biochemischen Schutz vor äußeren Einflüssen (z. B. abiotische und biotische Faktoren oder auch Antibiotikazugabe). Aus diesem Grund können sich Ablagerungen solcher Mikroorganismen unter extremen Bedingungen ausbilden und einen großen Einfluss auf ihre Umgebung ausüben.<sup>1,2</sup> Dies macht die Biofilmentwicklung und ihre Charakterisierung zu einem bedeutenden Forschungsfeld in der Wasserforschung sowie in der Produktion (z. B. Biofilmreaktor oder auch Schädigung industrieller Apparate).

### 1.1 Biofilmstruktur – und entwicklung

Zur Kontrolle eines Biofilms in einem Produktionsreaktor oder in der Abwasseraufreinigung ist es zur Effizienzsteigerung notwendig, deren Entwicklung und Verhalten unter bestimmten Bedingungen zu kennen bzw. zu verstehen.

Seit einigen Jahren werden deshalb Studien durchgeführt, die die Auswirkungen von verschiedenen Elementen bzw. Kationen und Anionen auf das Biofilmverhalten untersuchen, da verfügbare Nährstoffe und vorliegende hydrodynamische Bedingungen die Haupteffektoren im Lebenszyklus eines Biofilms repräsentieren.<sup>3-10</sup> Des Weiteren ist das Verständnis der umgebungsbedingten Faktoren wie pH-Wert, Temperatur etc. eine wichtige Herausforderung, um die Adhäsion von Biofilmen und die Biofilmformation zu beurteilen.<sup>10,11</sup>

Von bivalenten Kationen wie Calcium oder Magnesium ist bekannt, dass diese das Wachstum und die Stabilität von Biofilmen positiv beeinflussen.<sup>6,9,12</sup> Untersuchungen zufolge liegt die Ursache dafür hauptsächlich darin, dass beispielsweise Magnesium ein molekularer Schlüssel ist, der wichtige Enzyme in biochemischen Reaktionen in lebenden Zellen aktiviert.<sup>9,13-15</sup> Auch Calcium dient in prokaryotischen Zellen als Zellregulator und tritt in einigen Membranstrukturen, wie Kanälen, Antiportern und ATP-abhängigen Pumpen, auf.<sup>16</sup> In Biofilmen wurde zudem eine erhöhte Calciumkonzentration mit einer stärkeren Bindung zwischen den geladenen extrazellulären Polymeren indiziert.<sup>17,18</sup>

Weiterhin wurde durch Möhle *et al.* (2007) der positive Effekt von Eisen auf die Biofilme bzw. die Biofilmstabilität beschrieben.<sup>18</sup> Eisen ist essenziell für nahezu alle lebenden Organismen und bildet einen Co-Faktor in vielen zellulären Proteinen, die in Elektronentransport, Detoxifikation von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) oder auch DNA-Synthese involviert sind.<sup>19</sup> Einige Studien zeigen, dass sowohl eine Limitation<sup>20,21</sup> als auch ein Überschuss von Eisen in der Umgebung<sup>22-24</sup> die Formation und Entwicklung von Biofilmen gegenüber suspendierten Zellen inhibiert. In Studien mit *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen liegt der Zusammenhang nahe, dass Eisen die Oberflächenbewegung der Bakterien und die Biofilmformation durch Stabilisierung der Polysaccharidmatrix reguliert.<sup>23,25,26</sup>

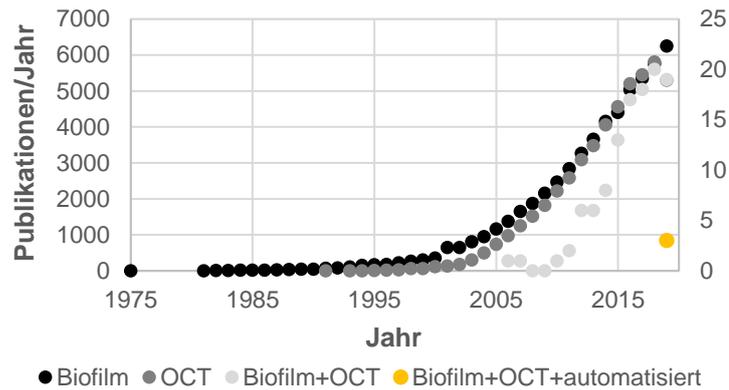
Bezüglich Konzentrationen, Reaktortyp und Organismus weisen diese Studien jedoch unterschiedlichste Resultate auf. Musk *et al.* (2005) definierten beispielsweise einen optimalen Wachstumsbereich von *P. aeruginosa* bei Zugabe von 1-100 µM Eisen. Unter bzw. über diesem Bereich konnte der Organismus lediglich in planktonischem Zustand in den Titerplatten existieren.<sup>22</sup> Möhle *et al.* (2007) hingegen nutzten bis zu 10 mg/L Eisensulfat zur Stabilisierung ihrer Biofilme im Rotations Scheiben-Bioreaktor.<sup>18</sup>

Ebenso in wasserführenden Systemen wie Eisenrohren werden, womöglich durch eine sukzessive Biokorrosion, massive Ablagerungen bzw. Biofouling erzeugt. Eine Analyse der vorliegenden physikalischen Biofilmstrukturen ist dabei essenziell, da diese die Interaktion mit der Umgebung determinieren.<sup>27</sup>

Die Persistenz der Zellaggregate unter verschiedenen hydrodynamischen Bedingungen ist ein weiterer fundamentaler Faktor in der Adhäsion von Biofilmen zu deren Grenzfläche sowie in dessen Lebenszyklus. Biofilme bilden sich bevorzugt in wässrigen Umgebungen aus. Dabei modifizieren auch lokale hydrodynamische Bedingungen die Struktur von Biofilmen, indem sie die Ausbildung von sogenannten Biofilm-Streamern verursachen können. Diese Strukturen bewirken ein rapides Zusetzen bzw. Verstopfen von industriellen und medizinischen Fließsystemen.<sup>8,28</sup> Unter anderem für Reinigungsverfahren von Rohrleitungen ist die Untersuchung der hydrodynamischen Bedingungen und der Mineralien führenden Medien mit Korrelation zur Biofilmstruktur zur erweiterten Biofilmkontrolle wichtig.

## 1.2 Optische Kohärenztomographie

Biofilme wurden erstmals im Jahr 1943 beschrieben,<sup>29</sup> im Jahr 1975 als solche deklariert<sup>30-32</sup> und bis zum Beginn der 1980er Jahre wurde kaum in diese Richtung weitergeforscht. Danach stieg die Untersuchung dieser sich an Grenzflächen ausbildenden Akkumulationen stetig an, was an der Anzahl der Publikationen pro Jahr zu erkennen ist (Abb. 1). Auch die optische Kohärenztomographie ist eine relativ junge Analysemethode, die im Jahre 1991 erstmals beschrieben wurde.<sup>33,34</sup> Sie wird hauptsächlich in der Augenheilkunde angewandt, seit ca. 2005 erlangt sie jedoch auch hinsichtlich der Untersuchung von Biofilmen immer mehr Aufmerksamkeit.<sup>35-37</sup> Dennoch werden jährlich nicht mehr als 10-20 Publikationen in Kontext mit Biofilmen veröffentlicht. Dabei bietet die OCT gegenüber anderen (optischen) Analysemethoden eine zerstörungsfreie, realgetreue und dreidimensionale Visualisierung von mesoskopischen Biofilmen (im mm-Bereich).<sup>37</sup>



**Abb. 1** Anzahl an Publikationen, die seit 1975 jährlich mit den Begriffen „Biofilm“, „OCT“ und „automated“ in der Datenbank Pubmed<sup>30</sup> veröffentlicht wurden. Hellgraue (Biofilm+OCT) und gelbe Datenpunkte (Biofilm+OCT+automatisiert) befinden sich auf der Sekundärachse (rechte y-Achse).

#### Automatisierung von OCT-Aufnahmen

Ein Nachteil der bewährten optischen Messgeräte, wie z. B. dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) oder dem Rasterelektronenmikroskop (REM), sind die Wege der Probe (hier: Biofilm in Fließzellen) zu den Systemen.

Das bedeutet: (i) das Biofilm-Experiment muss abgebrochen werden, die Bestimmung des Biofilmverhaltens unter Strömungsbedingungen ist selten möglich; (ii) der Biofilm wird verändert, durch Zugabe von Farbstoffen bzw. Destruktion seiner Mikroumgebung; (iii) durch Lösen der für das Experiment wichtigen Utensilien wie Schläuche und Pumpen kann ein Biofilm abreißen – demnach kann eine Analyse der tatsächlich im Biofilm vorherrschenden Bedingungen nicht realisiert werden.<sup>37</sup> Da Biofilme einer kontinuierlichen Veränderung unterliegen, ist es sinnvoll, diese Situationen zu umgehen. Aus diesen Gründen ist die Automatisierung von Handlungsabläufen und die Routine von Messmethoden ein wichtiger Aspekt, um Unterschiede innerhalb der Experimente auf die tatsächlich vorliegenden Bedingungen beziehen zu können und Fehler durch die Handhabung des Nutzers/Wissenschaftlers zu minimieren.

Im Vordergrund steht dabei, das Messgerät zur Probe zu bringen, vor allem, um einen Abriss des Biofilms zu vermeiden. Mikroskope sind meist schwer und groß.<sup>38</sup> Es ist problematisch sie zu bewegen und einige Instrumente müssen justiert sein. Weiterhin können Aufnahmen bei kleinsten Erschütterungen ungenau und unscharf werden.

Die OCT gibt es beispielsweise als Variante, bei der der Probenarm mit Linse mobil und nicht am Gerätefuß fixiert ist. Der Probenarm wiegt lediglich ca. 1,5 kg und könnte demnach in ein Automatisierungssystem integriert werden, bei dem die zu untersuchenden Proben fixiert bleiben.<sup>39</sup> Aktuell sind einige Systeme kommerziell verfügbar, die mit der OCT-Bildgebung kombiniert werden können, wie z. B. 3D-Drucker oder CNC-Systeme.<sup>40-42</sup> Diese Systeme sind zwar robust und akkurat, jedoch haben sie unterschiedliche Nachteile, beispielsweise Preis, Quelltextoffenheit, spezifische Hard- und Software, oder sie können den Probenarm des OCTs mit 1,5 kg nicht tragen (geringe Belastungsmöglichkeit).<sup>42</sup>

Seit einigen Jahren ist jedoch die robotische Plattform „EvoBot“ verfügbar, die innerhalb des EVOBLISS Projektes<sup>43</sup> entwickelt wurde und die keine Limitation in den gelisteten Nachteilen aufweist.<sup>44,45</sup> Diese

Plattform erlaubt eine einfache Konvertierung von Befehlen in Funktionen, ist quelltextoffen und kann den Probenarm der OCT tragen.<sup>46</sup> Sie könnte mit der OCT kombiniert, als Alternative dienen, Gegenmaßnahmen zu den oben genannten Nachteilen i)-iii) der allgemein vertretenen Messsysteme (CLSM, REM) zu treffen. Ein weiterer wichtiger Vorteil gegenüber den derzeit verfügbaren Methoden<sup>41,47</sup> ist die Möglichkeit zum Aufbau von Statistiken durch das automatisierte Anfahren mehrerer Positionen.

### 1.3 Aktueller Forschungsstand

Aktuell werden kaum statistische Analysen innerhalb der Biofilmforschung durchgeführt. Dies kann zu hohen Standardabweichungen der Ergebnisse sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Forschungsinstituten führen. Weiterhin kann eine Fehlinterpretation von Ergebnissen erhebliche Auswirkungen auf die Aussagen von beispielsweise Antibiotikaeffizienz, auf die Wahl von Optimierungsparametern eines Biofilmreaktors zur Abwasserbehandlung, oder zur Anwendung der bestmöglichen Lösung zur Verhinderung von Schäden in industrieller Umgebung haben.<sup>42,48</sup> Bislang wurden (2019) lediglich zwei mit OCT kombinierte, automatisierte Systeme vorgestellt, die den Faktor der Replizierung bisher nicht ausreichend berücksichtigen bzw. nicht auf mesoskopische Biofilme in Fließzellen angewandt wurden.<sup>41,47</sup>

Der Effekt des Eisens auf suspendierte und akkumulierte Bakterienzellen wurde in einigen Studien untersucht. Dabei fanden die Studien in verschiedenen Reaktorsystemen und Modellorganismen, unter anderem mit genetischen Mutationen, statt.<sup>18,20,22-24,26,49,50</sup> Eine realgetreue Betrachtung des Effektes auf Biofilme in Fließzellen und auf die Erforschung des Einflusses auf die Biofilmstabilität bei Scherbeanspruchung ist bisher noch nicht gegeben. Unter anderem fehlen Daten zur physikalischen Struktur der Biofilme, die die Interaktion mit der Grenzfläche determinieren. Ausschließlich Möhle *et al.* (2007) korrelierten eine erhöhte Eisensulfatkonzentration in der Substratlösung mit erhöhter Stabilität bzw. Biofilmdicke von Mischkultur-Biofilmen in einem Rotationsscheiben-Bioreaktor.<sup>18</sup>

Zur Analyse der Materialeigenschaften bzw. der Stabilität von Biofilmen unter erhöhten Fließgeschwindigkeiten in wasserführenden Systemen eignen sich Deformationsversuche als sinnvolle Analyseverfahren.

Bisher wurden diese Deformationsversuche in Fließzellen hauptsächlich von Blauert *et al.* (2015) und Stoodley *et al.* (1999) umgesetzt, wobei die Anwendung mittels OCT-Bildgebung erstmals durch Blauert im Jahr 2015 stattfand.<sup>51-53</sup> Die manuelle Auswertung dieser Bilddaten gestaltet sich dabei jedoch als fehleranfällig, problematisch und nutzerabhängig. Aus diesem Grund werden selten Deformationsversuche durchgeführt, die Anwendung von Rheometern, der Rasterkraftmikroskopie oder computergestützten Modellierungen tritt immer mehr in den Vordergrund.<sup>54-56</sup> Allerdings sind auch die Simulationen nicht fehlerfrei und können durch die Wahl der Parameter leicht manipuliert werden. Weiterhin sind Rheometer oder Rasterkraftmikroskope destruktive Methoden, die teilweise nur eine separate Untersuchung von Bakterien bzw. EPS-Matrix ermöglichen.<sup>51</sup>

## 1.4 Motivation

Biofilme geraten immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, da sie sowohl den Bereich Wassertechnologie als auch die chemische Produktion divers beeinflussen. Beispielsweise sind diese Aggregationen, nach erfolgter Etablierung, nur schwer von ihrer Grenzfläche zu entfernen. Dies kann sich massiv durch Schädigung von industriellen Apparaten auswirken, die oft oder unentwegt im Kontakt mit Wasser stehen.<sup>56</sup> Sie können damit die Effizienz von Wärmetauschern reduzieren oder auch zu Druckverlust von Apparaten führen. Darüber hinaus sind chronische Infektionen des menschlichen Körpers möglich, wenn beispielsweise medizinische Implantate kontaminiert sind.<sup>42,56-58</sup>

Biofilme haben aber auch positive Eigenschaften. Aktuelle Forschungsfelder beziehen sich auf durch Biofilm generierte Bioelektrizität, die Produktion von Bioplastik, Milchsäure oder Methan. Auch die Konvertierung beziehungsweise die Produktion von (Plattform-) Chemikalien wie Propionsäure aus biologischen Abfällen ist durch die Nutzung von Biofilmsystemen möglich.<sup>59</sup>

Für alle genannten Anwendungen ist es von Bedeutung, sowohl die Biofilmentwicklung als auch das Biofilmverhalten unter bestimmten Bedingungen zu verstehen. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei die strukturellen und die mechanischen Eigenschaften der Biofilme, die sich mittels optischer Kohärenztomographie in 3D und nicht-invasiv analysieren lassen.<sup>37</sup>

Die Forschungsgruppe um Roland Möhle der TU Braunschweig kam vor einigen Jahren zu dem Ergebnis, dass die Zugabe von Eisensulfat das Wachstum ihrer Biofilme in einem Rotationsscheiben-Biofilmreaktor vor Abriss bzw. Abscherung (engl. *erosion/sloughing*) bewahrt.<sup>18</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde demnach die Fragestellung untersucht, ob  $\text{Fe}^{2+}$  das Wachstum von Biofilmen in Fließzellen fördert. Des Weiteren wurde ermittelt, ob  $\text{Fe}^{2+}$  einen positiven Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften (z. B. Stabilität) der Biofilme besitzt. Die Ergebnisse können bedeutend sein, um das Wachstum gewünschter Biofilme zu unterstützen (Produktion im Bioreaktor) oder die Entwicklung ungewünschter Biofilme zu vermeiden (Trinkwasser, industrielle Apparate).

## 1.5 Fragestellungen und Ziele

- 1 Eignet sich die optische Kohärenztomographie für die Untersuchung der Biofilmstruktur bzw. des mechanischen Biofilmverhaltens?
- 2 Wie wichtig ist eine statistische Betrachtung der Biofilmkultivierung?
- 3 Wie wirkt sich die Anwendung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen im Medium auf die Struktur und mechanischen Eigenschaften der Biofilme aus?
- 4 Gibt es Unterschiede bezüglich der Biofilmstabilität?

## Material und Methoden

### 2.1 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (kurz OCT) ist eine nicht-invasive 3D-Visualisierungstechnik, die es ermöglicht, bis 3 mm tief in lichtdurchlässige Gewebe zu messen. Die Vorteile der OCT liegen hauptsächlich in der zerstörungsfreien 3D-Visualisierung sowie in der hohen Auflösung und Messgeschwindigkeit.

#### Genereller Überblick

Die OCT wendet eine Superlumineszenzdiode (SLD) an. Der von der SLD generierte Lichtstrahl ( $930 \pm 80$  nm) gelangt über die Lichtwellenleiter zu einem Strahlteiler, welches das Licht in einen Referenz- und Probenarm teilt. Das Licht des Probenarms penetriert dabei die lichtdurchlässige Probe und wird zum Referenzarm zurück reflektiert. Dadurch entsteht ein Interferenzmuster, welches im Michelson-Interferometer mittels Fourier-Transformation zu einem tiefenaufgelösten Intensitätsprofil konvertiert wird. Diese Punktmessung definiert den sogenannten eindimensionalen A-Scan, der entlang der z-Achse (Höhe bzw. Tiefe) einer Probe generiert wird. Mehrere dieser A-Scans entlang der xz-Fläche bilden dabei einen zweidimensionalen B-Scan, der eine Aufnahme des Querschnitts der Probe erzeugt. Um eine volumetrische (3D) Aufnahme der Probe oder des Biofilms zu erhalten, ist es notwendig, eine Vielzahl der B-Scans in y-Richtung durchzuführen.

Mit aktuellen SD-OCTs (aus dem Jahr 2018/19) ist es heutzutage möglich, bis zu 248.000 A-Scans pro Sekunde zu erreichen.<sup>39</sup>

#### Aufnahmen

Für die Analyse der Biofilme wurde ein *spectral domain* (SD-) bzw. *frequency domain* (FD-) OCT (Ganymede I, Thorlabs GmbH, Lübeck, Deutschland) verwendet, bei der die Interferenzen der einzelnen spektralen Komponenten unabhängig vom Signal im Zeitbereich (engl. *time domain*, TD-OCT) erfasst werden. Das Ganymede I besitzt eine optische Auflösung von  $8 \times 8 \times 2,1 \mu\text{m}^3$  (LSM 03) in Wasser ( $n = 1,33$ ), bei einer maximalen Aufnahmegröße von  $10 \times 10 \times 2,14 \text{ mm}^3$ .

Innerhalb der Experimente A2-C wurden je einmal täglich 3D-Aufnahmen vom Zentrum der Fließzellen mit  $7 \times 6 \times 0,5 \text{ mm}^3$  (A-Scan Averaging = 3) und einer Pixelauflösung von  $10 \times 10 \times 2,1 \mu\text{m}^3$  generiert. Zusätzlich wurden bei den Deformationsversuchen (Experiment C) nach jeder Steigerung des Volumenstroms 3D-Aufnahmen von  $5 \times 5 \times 0,5 \text{ mm}^3$  (mit einer Pixelauflösung von  $7 \times 7 \times 2,1 \mu\text{m}^3$ ) nach einer Wartezeit von  $t = 30$  s generiert (A-Scan Averaging = 3; Zusammenstellung der Experimente siehe Tab. 3).

## 2.2 Auswertung der Bilddaten

Die aufgenommenen Bilddatensätze wurden mittels quelltextoffener Software Fiji<sup>60,61</sup> zugeschnitten und ausgewertet. Fiji ermöglicht die Erstellung von Makros, die eine semi-automatisierte Bearbeitung der Aufnahmen und Analyse der Biofilm-Strukturparameter erlauben. Durch ein institutseigenes Makro wurden die 3D-Datensätze in *TIFF (Tagged Image File Format)* Dateien konvertiert.

Zum besseren Verständnis der Arbeit sind die durchgeführten Experimente, die weiterhin mit A1-C betitelt sind, am Ende dieses Kapitels unter 2.5 Biofilmkultivierung (Tab. 3) gelistet.

### A1 - Analyse der Positioniergenauigkeit

Die Analyse der Mikroskop-Datensätze erforderte zunächst die Anwendung eines Rangordnungsfilters mit einem Radius von 2 Pixeln („mean filter“), um Störungen der Bildintensitäten zu reduzieren.<sup>62–65</sup> In einem zweiten Schritt wurden die Aufnahmen zu 8-bit Graustufenbildern konvertiert und das Zielobjekt durch Binärisierung (weiß, Vordergrund) vom Hintergrund (schwarz) mittels des „converting to mask“ Plugins (Schwellenwert = 120) separiert. Unter Nutzung des integrierten Plugins „analyze particles“ konnten Artefakte im Bild (z. B. Sand, Staub, Partikel) ausgeschlossen und das Zentrum der Masse (engl. *Center of Mass*, kurz CoM) berechnet werden. Einfache geometrische Formen wie das Zielobjekt haben ihr CoM im Zentrum, was auch als Mittelpunkt des Objekts beschrieben wird.<sup>66</sup>

Die Mittelwerte  $\bar{x}_{CoM}$  und  $\bar{y}_{CoM}$  aller Mittelpunkte wurden berechnet und wie folgt von den einzelnen Messungen  $x_{CoM,i}$  und  $y_{CoM,i}$  subtrahiert:

$$\Delta x_{CoM} = x_{CoM,i} - \bar{x}_{CoM} \quad (1)$$

$$\Delta y_{CoM} = y_{CoM,i} - \bar{y}_{CoM} \quad (2)$$

wobei  $\Delta x_{CoM}$  und  $\Delta y_{CoM}$  die Abweichungen des Mittelwerts des CoM in  $x$ - und  $y$ -Richtung beschreiben. Die Messungen sind in  $\mu\text{m}$ .

Je höher die Werte von  $\Delta x_{CoM}$  and  $\Delta y_{CoM}$ , desto geringer ist demnach die Positioniergenauigkeit.

### A2 - Replikatanalyse

Die OCT-Aufnahmen wurden auf die Maße bzw. das Zentrum des Fließkanals zugeschnitten ( $7 \times 5 \times 0,45 \text{ mm}^3$ ) und es erfolgte die weitere Bearbeitung wie oben beschrieben (A1 – Analyse der Positioniergenauigkeit). Nach der Binärisierung der Datensätze wurden folgende Strukturparameter der Biofilme berechnet: mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ , Fließkanalbedeckung  $SC$ , interne Porosität  $\Phi_{int}$  und (textuelle) Entropie (engl., *textural entropy*)  $TE$ . Die Auflistung und Berechnung der einzelnen Parameter ist unter B – Strukturelle Biofilmeigenschaften gegeben. Aufgrund der Entstehung von Autokorrelationsartefakten, konnte lediglich der halbe Fließkanal (bis  $H = 225 \mu\text{m}$ ) analysiert werden. Autokorrelationsartefakte entstehen generell bei Proben mit mehreren reflektierenden Schichten. Dabei kommt es zu sogenannten Kreuzkorrelationen des reflektierten Lichts aus unterschiedlichen Probentiefen; der abgebildete Probenbereich wird spiegelverkehrt gedoppelt – wie Abbildung 2 beispielhaft zeigt.

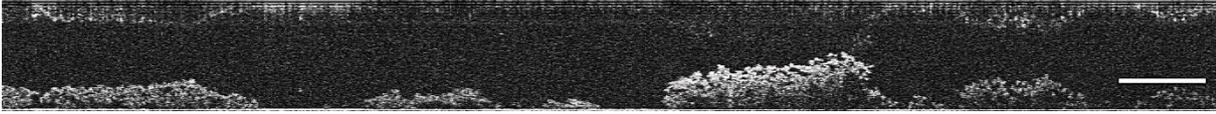


Abb. 2 Autokorrelationsartefakte in einem 2D-Scan. Der Maßstab beträgt 500  $\mu\text{m}$ .

### B - Strukturelle Biofilmeigenschaften

Es wurde wie unter A2 – Replikatanalyse vorgegangen.

Eine Auflistung der ermittelten Strukturparameter erfolgt in Tab. 1.

Tab. 1 Übersicht der ausgewerteten Strukturparameter.

Parameter (deutsch)	Parameter (englisch)	Kürzel	Einheit
Mittlere Biofilmdicke	Mean biofilm thickness	$\bar{L}_F$	$\mu\text{m}$
Fließkanalbedeckung	Substratum coverage	$SC$	%
Interne Porosität	Intrinsic porosity	$\Phi_{int}$	%
Globale Porosität	Global porosity	$\Phi_{global}$	%
Textur-Entropie	Textural entropy	$TE$	-
Fraktaldimension	Fractal dimension	$FD$	-
Schiefe	Skewness	$R_{SK}$	-
Wölbung	Kurtosis	$R_{KU}$	-
Flächenmoment 2	Average second moment	$ASM$	-
Inverses Differenzmoment	Inverse difference moment	$IDM$	-
Mittlere Aggregatbreite	Avg. vertical run length	$AVRL$	$\mu\text{m}$
Mittlere Aggregatlänge	Avg. horizontal run length	$AHRL$	$\mu\text{m}$

Die **mittlere Biofilmdicke**  $\bar{L}_F$  wurde vom Substratum (Boden) der Fließzelle bis zur Grenzschicht von Biofilm und Flüssigphase (z-Richtung) unter Nutzung von Gleichung 3 ermittelt:

$$\bar{L}_F = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N L_{F,i} \quad (3)$$

$L_{F,i}$  ist dabei eine lokale Biofilmdickenmessung bei Position  $i(x,y)$ , und  $N$  entspricht der Anzahl der Dickenmessungen (bei kompletter Analyse eines C-Scans entspricht  $N$  der Anzahl von A-Scans<sup>37</sup>).

Sind die Lagen  $i$  zu deren Positionen im z-Bilderstapel ( $\Delta z$ ) bestimmt und im Binärbild (0,255) gesetzt, so ist es möglich,  $L_{F,i}$  zu ermitteln (Gleichung 4, Generierung der MIPs/ Topographien):

$$L_{F,i} = \frac{i \cdot \Delta z}{255} \quad (4)$$

Die **Bedeckung des Fließkanalbodens  $SC$**  wurde von diesen Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) in  $xy$ -Richtung berechnet.

Alle Pixel mit Pixelwerten  $> 0$  wurden im Histogramm als auf dem Substratum wachsende Biofilmmasse definiert. Pixel mit Pixelwerten  $= 0$  werden als Substratum determiniert.

Die farbkodierten Pixel wurden demnach gezählt und von der Gesamtanzahl an verfügbaren Pixeln im Bilddatensatz, wie in Gleichung 5 gezeigt, subtrahiert:

$$SC = \frac{A_{Biofilm}}{A_{gesamt}} \cdot 100 [\%] \quad (5)$$

wobei  $A_{Biofilm}$  die mit Biofilm bedeckte Fläche bezeichnet und  $A_{gesamt}$  die abgebildete Gesamtfläche (mit Hintergrund) ist. Die Projektion ist beispielhaft in Abbildung 3 gezeigt.

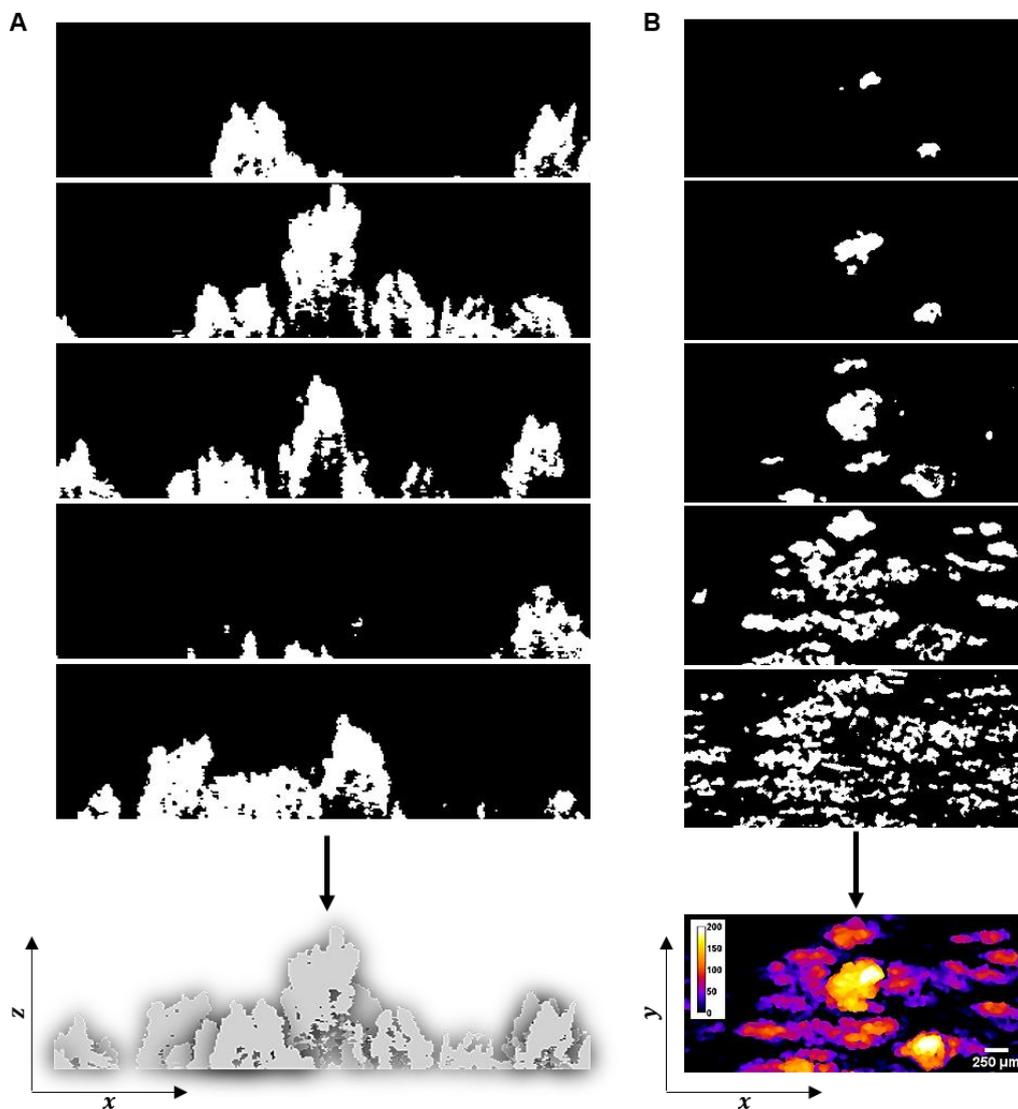


Abb. 3 Generierung der MIPs aus dem Binärdatensatz. Gezeigt sind einzelne binäre 2D-Scans (= B-Scans) und ihre Summation in  $y$ -Ausrichtung (A) bzw. in  $z$ -Ausrichtung (B). Zur Vereinfachung sind nur je fünf 2D-Scans gezeigt. Die Topographien entstehen aus der Summation der B-Scans in  $xy$ -Ausrichtung (B). Dabei ist der Fließkanalboden schwarz und die Farbe nimmt mit der Höhe der Biofilmmaggregate ab (200  $\mu\text{m}$  = weiß).

Die **interne Porosität**  $\Phi_{int}$  wurde in  $xz$ -Richtung der Fließzelle (longitudinal, B-Scan Analyse) und nach Blauert *et al.* (2015) berechnet.<sup>52</sup>

In der Studie von Blauert *et al.* (2015) sowie in der vorliegenden Arbeit wurden Hintergrundsignale außerhalb der Struktur ausgeschlossen.<sup>42</sup> Durch Nutzung eines institutseigenen Makros konnten die Struktur (i), Hohlräume innerhalb der Struktur (ii) sowie der Hintergrund (iii) automatisch durch drei verschiedene Schwellenwerte (150, 50, 0) bestimmt und demnach die interne Porosität, wie in Gleichung 6 erklärt, errechnet werden:

$$\Phi_{int} = \frac{A_{Hohlraum}}{A_{Biofilm} + A_{Hohlraum}} \cdot 100 [\%] \quad (6)$$

$A$  indiziert dabei die entweder mit Biofilm oder Hohlräumen (Wasserkanäle, Poren) ausgefüllte Fläche. Die Berechnung wurde auf alle B-Scans angewendet und darauffolgend gemittelt.

Zur Berechnung der **textuellen Entropie**  $TE$  wurden die MIPs mittels des Fiji MiToBo Plugin analysiert, welches von Möller *et al.* (2016)<sup>67</sup> generiert und von Markus Glaß (Universität Halle, 2018) um zusätzliche Biofilm-Strukturparameter erweitert wurde (Gleichung 7):

$$TE = - \sum_1^{N(a)} \sum_1^{N(b)} p_N(a, b) \ln(p_N(a, b)) \quad (7)$$

wobei jedes Element  $p(a, b)$  in einem Bild die Wahrscheinlichkeit des Wechsels von Pixelintensität/-wert von  $a$  zu  $b$  definiert. Der natürliche Logarithmus  $\ln$  des Übergangs beschreibt den strikt monotonen Anstieg des Farbwechsels mit der Anzahl der Messungen. Die textuelle bzw. strukturelle Entropie ist somit ein Maß der Zufälligkeit der Pixelintensitätsverteilung, demnach der Heterogenität des Biofilms. Weiterführende Informationen sind in Beyenal *et al.* (2000)<sup>68</sup> zu finden.

Die **Fraktaldimension**  $FD$  ist ein Strukturparameter, der die Irregularität der Aggregatoberflächen beschreibt. In zweidimensionalen Aufnahmen variiert der Faktor zwischen 1 und 2, bei dreidimensionalen Datensätzen zwischen 1 und 3. Je höher dabei der Wert, desto höher die Irregularität des Umfangs bzw. des Perimeters der Kolonien. Innerhalb der Dissertation wurde dieser Parameter von der Projektion mittels euklidischer Abstandskartierung (engl. Abk. EDM von *euclidean distance mapping*) unter Zuhilfenahme des MiToBo Plugins ermittelt. Das Plugin differenziert dabei Hintergrund von Biofilm und konvertiert die Pixel dieser Grenzphasen mit vier möglichen Pixelradien (*dilation radius values*) zu 0 (Grenzphase) und 1 (innerhalb der Kolonie und Hintergrund). Per EDM wird ein Datenfeld/Matrix generiert, in welcher jeder Pixel einem Wert entsprechend der Distanz zur Grenzphase entspricht. Die Anzahl der Pixelwerte innerhalb der gewählten Pixelradien wird summiert und als  $\ln$  vom Umfang gegenüber dem  $\ln$  des Durchmessers

eines Aggregats aufgetragen. Die Steigung der Punkte auf einer Geraden wird von 1 (2D) oder von 2 (3D) subtrahiert und resultiert im Parameter  $FD$ .<sup>68</sup>

Die **Schiefe (Skewness)  $R_{SK}$**  definiert die Unregelmäßigkeit oder Asymmetrie innerhalb des MIP-Histogramms. Sie determiniert somit das Auftreten von kleineren (Täler) und höheren Kolonien (Berge) innerhalb des Biofilms bzw. Abweichungen von der mittleren Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ . Dabei bedeutet ein Quantilkoeffizient  $R_{SK}$  der Schiefe<sup>69</sup>:

- $R_{SK} < 0$  Asymmetrie in Richtung vermehrt auftretender Täler
- $R_{SK} = 0$  Symmetrie, d.h. eine ähnliche Höhenverteilung
- $R_{SK} > 0$  Asymmetrie in Richtung vermehrt auftretender Berge

Die Berechnung der Schiefe erfolgte nach Gleichung 8:

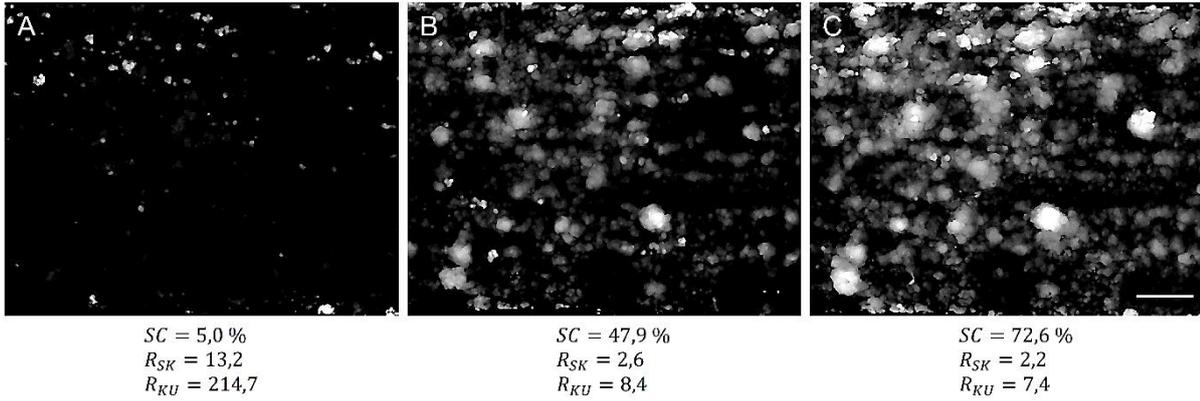
$$R_{SK} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{L_{F,i} - \bar{L}_F}{s} \right)^3 \quad (8)$$

wobei  $s$  als Standardabweichung der lokalen Biofilmhöhen  $L_{F,i}$  von der mittleren Biofilmhöhe  $\bar{L}_F$  definiert wird.

Die **Wölbung** oder auch **Kurtosis  $R_{KU}$**  beschreibt die Steilheit einer Häufigkeitsverteilung, im vorliegenden Fall der Verteilung der farbkodierten Werte in der MIP. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Häufigkeitsverteilung (Exzess  $R_{KU}$ ) wird ein Vergleich zur Normalverteilung angestellt. Liegen die Werte der Häufigkeitsverteilung nahe einer Normalverteilung, so gilt das Ausmaß  $R_{KU} = 0$ , die Verteilung gilt als normalgipflig. Bei  $R_{KU} > 0$  handelt es sich um Steilgipfligkeit, bei  $R_{KU} < 0$  liegt Flachgipfligkeit vor. Der Parameter beschreibt somit die Verteilung von Tälern und Bergen in der Biofilmoberfläche, die folgendermaßen ermittelt wurde<sup>69</sup>:

$$R_{KU} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{L_{F,i} - \bar{L}_F}{s} \right)^4 \quad (9)$$

Abbildung 4 veranschaulicht anhand von ausgewählten Topographien beispielhaft die Änderung der Werte für  $SC$ ,  $R_{SK}$  und  $R_{KU}$ .



**Abb. 4** Darstellung von Topographien und Änderung der Parameterwerte  $SC$ ,  $R_{SK}$  und  $R_{KU}$  durch das Wachstum von Biofilm. A) Tag 1; B) Tag 5; C) Tag 10. Der Maßstab beträgt 1 mm für die x-Achse und 1,4 mm für die y-Achse. Deutlich wird die Bedeckung des Fließkanalbodens  $SC$  über den zeitlichen Verlauf. Eine hohe Schiefe  $R_{SK}$  an Tag 1 determiniert wenige hohe Aggregate, die Abnahme der Kurtosis  $R_{KU}$  definiert ein gleichmäßiges Streuen der Pixelverteilungen zu Tag 10 hin. Da der Wert dennoch  $> 0$  bleibt, treten Verteilungen mit starken Peaks (helle Aggregate) auf.

Das **2. Flächenmoment (average 2<sup>nd</sup> moment)  $ASM$**  ist wie die  $TE$  ein weiterer Indikator zur Beschreibung der Zellcluster, jedoch richtungsorientiert. Höhere Werte indizieren direktionale Uniformität, ein Absinken der Werte beschreibt eine Richtungsänderung der Kolonien innerhalb des Fließkanals, bzw. hier das erweiterte Wachstum in die Breite.<sup>68</sup>

$$ASM = \sum_1^{N(a)} \sum_1^{N(b)} \{p_N(a, b)^2\} \quad (10)$$

Das **Inverse Differenzmoment  $IDM$**  gleicht ebenfalls der Berechnung von der  $TE$ , ist aber gegenüber dem  $ASM$  distanzorientiert. Sinken die Werte der  $IDM$ , bedeutet dies die Änderung der Koloniegrößen, d. h. die Distanzen zwischen den Aggregaten verkleinern sich; die Biofilmkolonien wachsen.<sup>68</sup>

$$IDM = \sum_1^{N(a)} \sum_1^{N(b)} \frac{1}{1 + (a + b)^2} p_N(a, b) \quad (11)$$

Die **Durchschnittslängen und -breiten der Biofilmkolonien  $AHRL$  und  $AVRL$**  (engl. *average horizontal und vertical run lengths*) wurden wie folgt berechnet:

$$AHRL = \frac{\sum x_c}{\text{Anzahl } x_r} \quad (12)$$

$$AVRL = \frac{\sum y_c}{\text{Anzahl } y_r} \quad (13)$$

Dabei wird die Summe der zusammenhängenden Pixel mit Werten  $> 1$  im Binär-Bildstapel in  $x$ - bzw.  $y$ -Richtung ( $\sum x_c$  bzw.  $\sum y_c$ ) durch die Anzahl der Pixelreihen (*Anzahl  $x_r$*  bzw. *Anzahl  $y_r$* ), in denen diese zusammenhängenden Clusterpixel auftreten, geteilt. Beyenal *et al.* (2004) geben ein erläuterndes Übersichtsbild zu dieser Berechnung.<sup>70</sup>

### Statistische Auswertung

Innerhalb der Versuche A1-B wurden Ausreißertests nach Grubbs und Normalitätstests nach Shapiro-Wilk mittels Origin (OriginPro, Version 2018G, OriginLab 275 Corporation, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Ausreißer wurden nicht in die Wertung mit aufgenommen.

Zusätzlich wurden in Experiment B zweifaktorielle Varianzanalysen ausgeführt, um mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen statistisch zu belegen bzw. zu verifizieren. Bei Normalverteilung fand die Anwendung der ANOVA mit Messwiederholung statt, bei nicht vorhandener Normalverteilung der Scheirer-Ray-Hare-Test. Dabei sollte der Einfluss des Spurenelements  $\text{Fe}^{2+}$  und der hydrodynamischen Bedingungen auf die Biofilmformation, -entwicklung und -struktur differenziert werden. Dazu wurden drei Hypothesen mit folgender Prädikation aufgestellt:

- H<sub>1</sub>: Keine Unterschiede durch verschiedene Fließgeschwindigkeiten
- H<sub>2</sub>: Keine Unterschiede durch verschiedene Eisenkonzentrationen
- H<sub>3</sub>: Keine Korrelation zwischen den beiden Parametern

Zur Bestimmung der Annahme oder des Verwurfs der Hypothesen wurden die  $p$ -Werte zur Wahrscheinlichkeit von  $p < \alpha$  bei  $\alpha = 0,01$  verglichen. Werte  $p < \alpha$  beschreiben dabei den Verwurf der individuellen Hypothese.

### C - Mechanische Biofilmeigenschaften

Die Analyse mechanischer Eigenschaften ist notwendig, um Wechselwirkungen eines Materials (Biofilm) mit den von außen darauf einwirkenden Kräften verstehen zu können. Zur Ermittlung der mechanischen Biofilmeigenschaften (z. B. Elastizität oder Scherung unter Strömung) mittels optischer Kohärenztomographie wurden Experimente mit stetig erhöhter Fließgeschwindigkeit durchgeführt. Nach jeder Steigerung der Strömung gab es eine Wartezeit von 30 s, nach der eine 3D-Messung durchgeführt wurde. Die Wartezeit diente dabei dem Biofilm zur Adaption an die erhöhte Scherbeanspruchung. Somit lag die Zeit zwischen den Stufen bei ca. 90 s.

Die Durchführung erfolgte nach Blauert (2017)<sup>51</sup> und ist am Ende des Kapitels illustriert (Tab. 4 und Abb. 9).

Die Auswertung der mechanischen Biofilmeigenschaften ist in Kapitel 5 beschrieben.

## 2.3 Monitoring- und Kultivierungsplattform

Für die Wachstums- und Deformationsversuche mit Biofilmen in Fließzellen wurde die robotische Plattform EvoBot genutzt, die eine parallele Kultivierung und Analyse mehrerer Fließzellen ermöglichen sollte.<sup>71</sup> Durch die Anwendung dieser Plattform können somit statistisch relevante Replikate gebildet und simultan gemessen werden. Darüber hinaus wird ein ungewünschter Abriss der Biofilme durch Bewegung der Fließzellen gemindert werden.

Die genutzte Plattform bestand aus einem Aluminiumgerüst, welches zwei Ebenen aufweist. Die obere Ebene hat eine Fläche von  $60 \times 90 \text{ cm}^2$  und gilt als sogenannte Observationsebene. Von dieser Ebene aus war es möglich ein Kamera- oder Mikroskop-Modul automatisiert über die zweite (= experimentelle) Ebene zu steuern. Auf der experimentellen Ebene wurden die Fließzellen auf einer Platte aus Polyvinylchlorid (PVC) installiert (siehe Abb. 5).

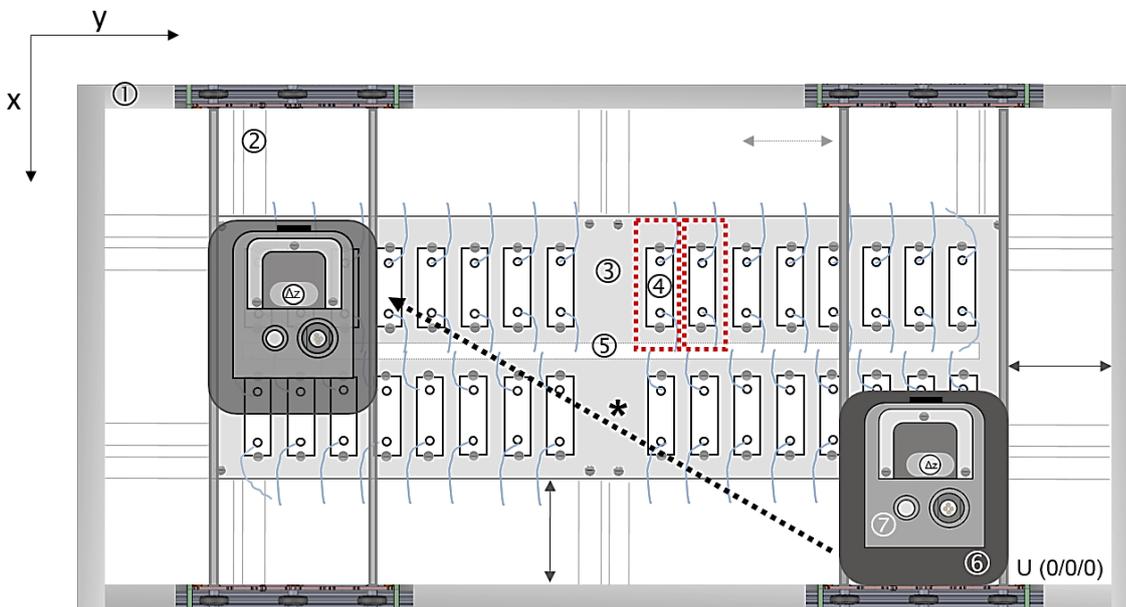


Abb. 5 Kombination aus der experimentellen und der Observationsebene. Der äußere Rahmen (1) und die Halterungen (2) dienen zur Fixierung und Stabilisierung der experimentellen Ebene. Innerhalb der Abbildungsfläche (3) können bis zu  $N = 32$  Fließzellen (4) in Platzhaltern mit Schrauben fixiert werden. Dabei ist ausreichend Platz (5) für Schläuche gegeben. Der Stellkopf (*payload module*) (6) dient der Positionierung des OCT-Scankopfes (7). Die rot gestrichelten Linien illustrieren die generelle Fläche, die nötig ist, um die Fließzellen mit Schläuchen, Schrauben und ausreichend Platz zwischen benachbarten Zellen zu montieren. \*P1:  $xy$ -Verfahrensweg. Der Ursprungspunkt U (0/0/0) befindet sich im unteren rechten Eck der Plattform, wo die Positionierkalibrierung des Systems (*homing*) realisiert wird.

Der Raum unter der experimentellen Ebene bot Platz für Magnetrührer, Pumpen und weitere Geräte.<sup>42</sup>

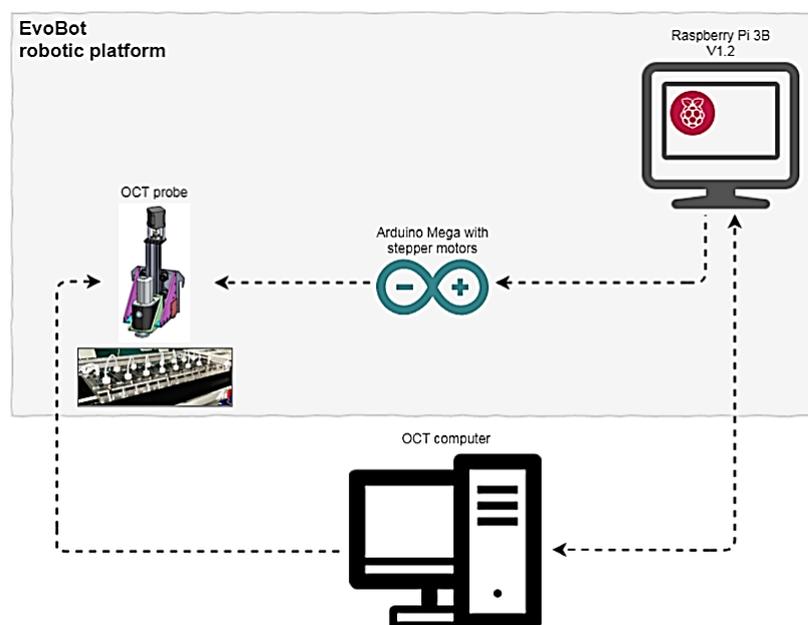
### Software (nach Gierl *et al.* (2020))

Auf der Observationsebene war ein Stellglied/Antriebsselement (engl. *actuator head*) implementiert, welches sich in horizontaler Ebene ( $x, y$ ) bewegen ließ und das OCT-Modul trug. Weiterhin war ein Modul installiert, welches die schwere Nutzlast des OCT-Scanner tragen sollte und in alle Raumrichtungen

positionierbar war. Die Positionierung fand über Schrittmotoren statt, die ein stufenloses und präzises Positionieren gewährleisten sollten.

Die Ansteuerung des Stellglieds wurde durch ein Arduino Mega Microcontroller Board (Arduino S.r.l., Ivrea, Italien) kontrolliert, welches mit einer RAMPS Steuerplatine (Version 1.4, Pololu electronics, Massachusetts, USA) verbunden war. Der Arduino Mega nutzte dabei eine angepasste Marlin Firmware. Es bot durch eine nutzerfreundliche Programmierschnittstelle (engl. API) einfache Befehle für die Positionierung des OCT-Scanners in alle drei Dimensionen ( $x, y, z$ ). Die Programmierung und Kontrolle fand dabei durch einen kostengünstigen Einplatinencomputer (Raspberry Pi 3B, rev. 1.2, Raspberry Pi Foundation, GB) statt, welcher Raspbian als Betriebssystem nutzte. Die Programmierung erfolgte in Python (Python 2.7, Python Software Foundation, USA).

Die Aufnahme der 3D-OCT-Datensätze erfolgte bei der Replikatanalyse (A2) durch eine Kommandozeilenschnittstelle (engl. CLI) für das Thorlabs Software Entwicklungskit (engl. SDK). Der Einplatinencomputer war mit dem OCT Computer (ThorImage Version 4.3) über ein lokales Netzwerk verbunden, um die 3D-Aufnahme durch Aufrufen und Ausführen der OCT-CLI auszulösen (separates Pythonskript; s. Abb. 6). Dies führte zur automatisierten, nicht-invasiven *in situ* Visualisierung der Biofilme mittels OCT. Neben der Kommandozeilen-basierten Visualisierung bot eine graphische Benutzeroberfläche (engl. GUI) eine manuelle Bedienung der Plattform und Aufnahme der OCT-Daten an.<sup>42</sup>



**Abb. 6** Schema der robotischen Plattform und Interaktion der einzelnen steuerbaren Systeme.

Zur Validierung der Nutzbarkeit der Plattform für die Optische Kohärenztomographie und zur Analyse der Biofilme wurden zunächst Tests zur Positioniergenauigkeit sowie zur Anwendbarkeit auf Fließzellen vorgenommen.

### Ermittlung der Positioniergenauigkeit

Um die Positioniergenauigkeit der Plattform zu prüfen, wurde ein vereinfachtes Zielobjekt (roter Kreis auf weißem Papier, Durchmesser = 1 mm) auf der experimentellen Ebene der Plattform fixiert. An das Antriebselement der Observationsebene wurde ein hochauflösendes USB-Mikroskop (1600 px × 1200 px) befestigt.

Die Aufgabe des Einplatinencomputers (Raspberry Pi) bestand darin, das USB-Mikroskop über vier potenzielle horizontale Fahrwege P1-P4 zum Zielobjekt zu leiten und danach ein Bild von genanntem Objekt aufzunehmen. Dies wurde dann für jeden der folgenden Fahrwege 100-mal wiederholt (Details s. Anhang Teil A):

- P1** Direkte  $xy$ -Bewegung vom Ursprungspunkt (0/0/9,05) zum Zielobjekt
- P2** Direkte  $xy$ -Bewegung eines zufälligen Ausgangspunkts zum Zielobjekt
- P3** Sukzessive Bewegung vom Ursprungspunkt zum Zielobjekt ( $x \rightarrow y$ )
- P4** Sukzessive Bewegung vom Ursprungspunkt zum Zielobjekt ( $y \rightarrow x$ )

Nach Erreichen des Zielobjektes wurden, durch Verwendung des USB-Mikroskops, Fotos von diesem generiert und anschließend ausgewertet.

## 2.4 Eisenbestimmung im Biofilm

Zur Bestimmung der Eisengehalte und des zeitlichen Verlaufs der Eisenakkumulation wurden zwei Aufschlussmethoden angewandt. Weiterhin wurden die vorliegenden Eisenverbindungen genauer bestimmt.

### Quantifizierung von Eisen (Fe) im Biofilm

Zur Gehaltsbestimmung von Eisen im Biofilm wurde die optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (kurz: ICP-OES) angewandt (ICP-OES 5110, Agilent Technologies Incorporation, Santa Clara, CA, USA). Die ICP-OES wird zur quantitativen Ermittlung von Ionenkonzentration in einer Probe verwendet.

#### Methode 1: Endpunktmethode

Vor der Kultivierung mit Biofilm wurden die leeren Fließzellen gewogen. Kultivierte Fließzellen ( $N = 3$ ) wurden nach Beendigung der Wachstumsversuche (Tag 10) bei 105 °C getrocknet (Universalschrank UN, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) und abermals gewogen (Sartorius MC 1 RC 210 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Nach Öffnen der Zellen wurden diese in spezielle, mit Teflon beschichtete, Behälter für den Mikrowellen-Aufschluss gegeben (XP 1500 Plus Liner, CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland), um ein rückstandsfreies Lösen des Biofilms zu gewährleisten. Die darin enthaltenen Substanzen, wie das Eisen, wurden mit 3 mL  $\text{HNO}_3$  (Salpetersäure) und 9 mL  $\text{HCl}$  (Salzsäure) in der Mikrowelle (Mars 5, CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland) für 20 min bei 181 °C und 50 Watt extrahiert und anschließend gemessen.

Die Leergewichte wurden im Nachhinein vom Gesamtgewicht der Probe abgezogen.

#### Methode 2: Zeitlicher Verlauf der Akkumulation

Das Leergewicht der Fließzellen wurde bestimmt. Um den Verlauf der Eisenakkumulation nachzuvollziehen, wurden Wachstumsversuche nach Schema von Experiment B durchgeführt. Es wurden je  $N = 4$  Fließzellen je Bedingung (V1-V4) auf der Plattform installiert. Dabei wurden die Fließzellen an Tag 1, 3, 6 und 9 entnommen, gewogen und danach mit 10 mL zehnpromzentiger Salzsäure gespült. Der Eluent wurde per ICP-OES gemessen und die leeren Fließzellen abermals getrocknet und gewogen.

Die Leergewichte wurden im Nachhinein vom Gesamtgewicht der Probe abgezogen.

#### Chemische Charakterisierung der Eiseneinschlüsse

Die Infrarotspektroskopie ist eine Messtechnik, die zur Identifikation von meist organischen Stoffen eingesetzt wird. Durch das Aufbringen der Probe auf einen Kristall (hoher Brechungsindex) wird ein auf diese Probe gerichteter Lichtstrahl durch Interaktion mit der evaneszenten Welle abgeschwächt reflektiert. Evaneszente Wellen entstehen durch interne Reflexionen im optisch dichten Kristall. Die Intensität der abgeschwächten Totalreflexion (engl. *attenuated total reflexion*, ATR) ist für jedes Molekül spezifisch, wodurch ein Material auf dessen Komponenten hin bestimmbar ist.

Vor Nutzung des Spektrometers mit Diamant-Kristall (Vertex 70, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) wurde die ATR-Einheit für ca. 30 min mit Stickstoff gespült. Jede Messung beinhaltete einen PQ- und OQ-Softwaretest (*performance & operational qualification tests*). Je  $N = 1$  Fließzelle pro Versuchsbedingung (V1-V4) wurde über Nacht bei 105 °C getrocknet und die Fließzellen geöffnet. Die getrockneten Biofilme wurden vorsichtig abgetragen und auf den Kristall aufgebracht. Dasselbe wurde mit einem Gemisch aus  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  und Wasser in einer separaten Fließzelle durchgeführt, um einen Vergleichswert bzw. eine Basislinie zu erstellen.

Pro Versuch wurden Aufnahmen mit einem Averaging von je 30 Scans bei Wellenzahlen von 4000-200  $\text{cm}^{-1}$  gemacht.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte in der Spektroskopiesoftware OPUS (Version 7.5, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA).

## 2.5 Biofilmkultivierung

Für die Kultivierung der Biofilme zur Analyse struktureller sowie mechanischer Eigenschaften wurde wie folgt vorgegangen: Glycerol-Stammlösungen von *Bacillus subtilis* wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank (Tiefkühlschrank EW-V86-120.1, Ewald Innovationstechnik GmbH, Rodenberg, Deutschland) entnommen und aufgetaut (siehe Tab. 2). Unter der Sterilbank (HERAsafe® KS, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) wurde die Spitze einer Impföse in die Stammlösung gestochen und die anhaftende Flüssigkeit danach vorsichtig auf einer LB-Platte (Luria-Broth Medium, Tab. 2) ausgestrichen, um einen Verdünnungsausstrich zu erhalten. Die Bakterien wurden danach über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kulturplatte entnommen, und eine einzelne Kolonie wurde wiederum unter der Sterilbank mit der Impföse gepickt und in einen mit flüssigem LB-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben überführt. Die Kolonien wurden

abermals bei 37 °C und 150 Umdrehungen pro Minute (2“ orbital Schüttler, New Brunswick™ Innova ®44, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) über Nacht kultiviert (nach Dervaux *et al.* (2014)).<sup>72</sup> Diese Kulturlösung diente in allen gelisteten Versuchen zur Inokulierung und wurde jeweils am Anfang der Versuche einmalig zugegeben.

Die verwendeten Chemikalien sowie deren Konzentration für die Nährmedien sind in Tab. 2 aufgeführt (abgeändert aus Wang *et al.* (2015); Si *et al.* (2016)).<sup>73,74</sup> Um die Bakterien mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen, wurde wiederholt neues Nährmedium hinzugegeben, sobald das Vorhandene aufgebraucht war.

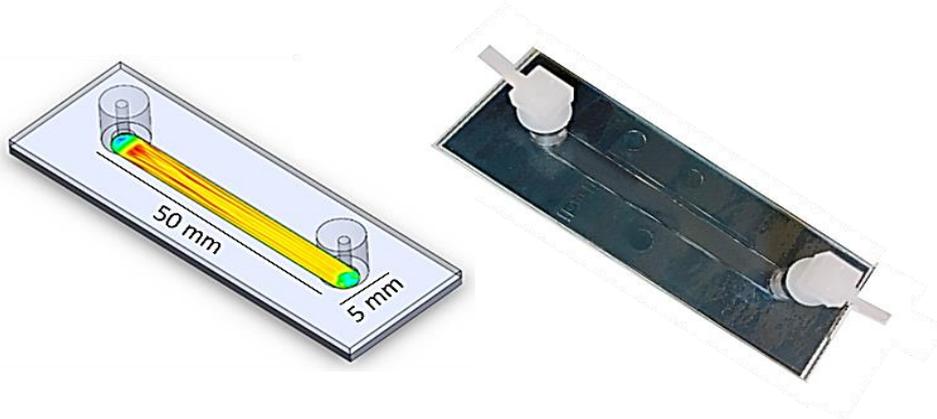
**Tab. 2** Verwendete Nährmedien (Kultivierungsmedien). Das LB-Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Alle Lösungen wurden zu einem pH-Wert = 6,8 gepuffert. \*Agarzugabe erfolgte bei der Herstellung von festem Medium (Agarplatten). Inhaltsstoffe des Karlsruher Leitungswassers sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. B1 und B2).

Medium	Chemikalie	Konzentration/ Volumen
<b>Glyzerol-Stammlösung</b>	Flüssige Bakteriensuspension	1 mL
	Glyzerin, 1:1 verdünnt mit Wasser	1 mL
<b>Luria Broth (LB)</b>	Trypton	10 g/L
	NaCl	10g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaOH (5 M)	~ 0,1 mL
	*Agar	15 g/L
	VE-Wasser	ad 1000 mL
<b>Nährmedium I</b>	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	410 mg/L
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	110 mg/L
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	9,9 mg/L
	Glyzerin	5 mg/L
	Phenylalanin	5 mg/L
	Tryptophan	5 mg/L
	FeCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8,9 mg/L
	Thiaminhydrochlorid	0,67 mg/L
	ZnCl <sub>2</sub>	0,14 mg/L
	VE-Wasser	ad 1000 mL
<b>Nährmedium II</b>	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/L
	Phenylalanin	5 mg/L
	Glyzerin	5 mg/L
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	4 mg/L
	Tryptophan	3,5 mg/L
	FeCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	je nach Versuch: 0,89 mg/L 8,9 mg/L
	Leitungswasser	ad 1000 mL

Die Zugabe von Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat resultierte in Fe-Konzentrationen von 0,25 und 2,5 mg/L.

Genereller Aufbau (abgeändert von Sternberg & Tolker-Nielsen (2005))<sup>75</sup>

In den Experimenten A-C wurden sticky-Slides I Luer 0.4 (ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) mit Fließkanal-Dimensionen von  $5 \times 0,45 \times 50 \text{ mm}^3$  als Fließzellen verwendet (Abb. 7). Als Substratum bzw. Fließkanalboden dienten dunkelgraue PVC-Zuschnitte mit Dimensionen von  $25 \times 2 \times 75 \text{ mm}^3$ .



**Abb. 7** 3D-Rendering und Foto der sticky-Slides I Luer 0.4 Fließzellen der ibidi GmbH. Das Modell wurde mittels SolidWorks generiert.

Die minifluidischen Fließzellen wurden auf der EvoBot Plattform installiert und mittels L-förmigen Verbindern (Elbow connector 0.8, ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) mit Schläuchen ( $\varnothing = 1,5 \text{ mm}$ ) verbunden. Mittels peristaltischen Pumpen (IPC, Ismatec®, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) wurde das in einem 60 L großen Tank angesetzte Nähr- bzw. Kultiviermedium über einen Reservoirbehälter (5 L Flasche) zu den Blasenfallen (design copyright Biocentrum-DTU, 2005) und letztendlich zu den Fließzellen gepumpt (Abb. 8). Wasserpegelschalter (WPS 3000plus, H-Tronic GmbH, Hirschau, Deutschland) dienten hierbei als Schutz vor Überlaufen/Leerlaufen des Reservoirbehälters. Für die stetige Durchmischung des Nährmediums dienten Magnetrührer (IKA C-MAG HS 7, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland).

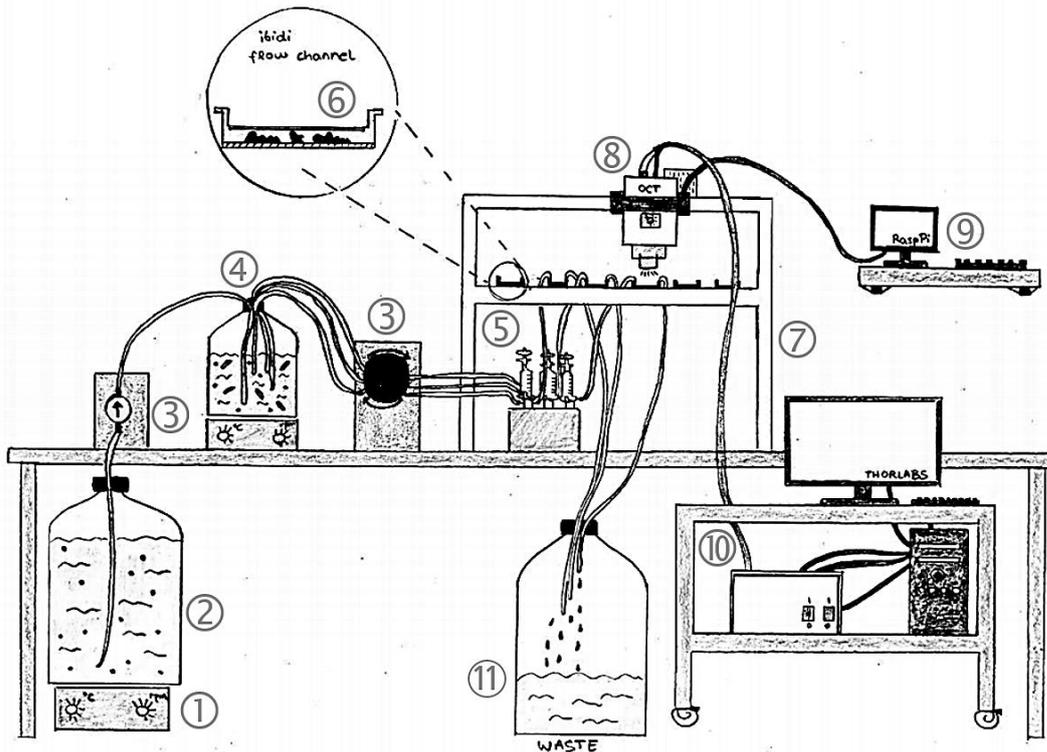


Abb. 8 Aufbau der Kultivierung mit Monitoringsystem. Ein Magnetrührer (1) sorgt für die Durchmischung des Kultiviermediums (2), welches mittels peristaltischer Pumpe (3) über den Reservoirbehälter (4) zu den Blasenfallen (5) gepumpt wird. Von dort gelangt das Kultiviermedium sowie die zugesetzte Inokulationslösung zu den Fließzellen (6), die auf der EvoBot Plattform (7) installiert sind. Mittels OCT-Scankopf (8) werden Aufnahmen vom Fließkanal durchgeführt. Die Bewegung des Scankopfes über den Fließzellen erfolgt über den Raspberry Pi (9), die Aufnahmen erfolgen durch die Thorlabs Software (Base Unit (10)). Das verbrauchte Nährmedium wird gesammelt (11).

Die Experimente wurden im Durchflussmodus ausgeführt, weshalb der Ablauf verworfen wurde.

Zu Beginn jeder Kultivierung wurden 10 mL der Inokulierlösung zum Reservoirbehälter zugegeben ( $OD_{600} = 0,5$ ) und das Medium für 15 min durch die Fließzellen geleitet. Die Strömung wurde danach für eine Stunde gestoppt, um den Bakterien die Möglichkeit zur Sedimentation zu geben. Nachfolgend begannen die jeweiligen Versuche im Durchflussmodus.

Die Einordnung der Experimente ist in Tabelle 3 aufgeführt. Insgesamt wurden in den Experimenten B und C je zwei unterschiedliche Eisenkonzentrationen und zwei Fließgeschwindigkeiten miteinander verglichen.

Tab. 3 Übersicht der Experimente.

Experiment	Zielsetzung	Nährmedium	Versuch	$Q$ (mL/min)	$Fe^{2+}$ (mg/L)
A1	Positioniergenauigkeit	-	-	-	-
A2	Replikatanalyse mittels robotischer Plattform	Nährmedium I	-	0,8	2,5
B	Wachstumsversuche	Nährmedium II	V1	1	2,5
			V2	1	0,25
			V3	5	2,5
			V4	5	0,25
C	Deformationsversuche	Nährmedium II	V5	1	2,5
			V6	1	0,25
			V7	5	2,5
			V8	5	0,25

A2 - Kultivierung zur Replikatanalyse

Zur Evaluierung der Monitoring-Plattform und zur Analyse der Notwendigkeit von Replikaten wurden Versuche mit dem Nährmedium I durchgeführt. Mit diesem Medium sollte ein schnelles Biofilmwachstum durch alle vorhandenen Nähr- und Spurenstoffe gefördert werden. Des Weiteren wurde der Volumenstrom auf 0,8 mL/min gesetzt, um einen Abtrag des Biofilms durch erhöhte Scherkräfte zu vermeiden und ebenfalls eine schnelle Akkumulation zu begünstigen. Insgesamt wurden 24 Fließzellen auf der Plattform installiert und entsprechend  $N = 24$  Biofilme über 6 Tage hinweg analysiert.

B - Wachstumsversuche

Der Einfluss des Eisens auf die strukturelle Entwicklung der Biofilme wurde per Wachstumsversuche untersucht. Um eine in gewöhnlichen Trinkwassersystemen realgetreue Nährstoffversorgung zu etablieren und ein langsames Biofilmwachstum vorauszusetzen, wurde Karlsruher Leitungswasser (s. Anhang B) mit wenigen weiteren Nähr- und Spurenstoffen versetzt (Nährmedium II, s. Tab. 2).

Dabei wurden je  $N = 10$  Fließzellen pro Versuch (V1-V4) für 10 Tage analysiert.

C - Deformationsversuche

Für die Ermittlung des Biofilmverhaltens bei Scherbeanspruchung, d. h. erhöhter Strömung, dienten die Deformationsversuche (V5-V8). Die Kultivierbedingungen waren dabei denen der Wachstumsversuche gleich. Jedoch wurden die gewachsenen Biofilme nach einer Kultivierdauer von sechs Tagen (V5 + V7) sowie nach einer Kultivierdauer von 13 Tagen (V6 + V8) erhöhten Fließgeschwindigkeiten ausgesetzt (s. Tab. 4). Die Differenzierung beim Biofilmmalter lag hauptsächlich am verlangsamten Wachstum der Biofilme in den Versuchen V6 und V8.

Die Wandschubspannung wurde nach Blauert (2017) berechnet.<sup>51</sup>

Tab. 4 Entsprechende Wandschubspannung bei angegebenem Volumenstrom

Einstellung der Pumpe	Volumenstrom $Q$ (mL/min)	Fließgeschwindigkeit $u$ (cm/s)	Wandschubspannung $\tau_w$ (Pa)
1	21,1	15,6	1,1
2	42,3	30,6	2,2
3	72,2	53,5	3,9
4	90,0	66,7	4,8
5	118,6	87,8	6,4
6	143,6	106,4	7,7
7	168,0	124,5	9,0
8	195,8	145,0	10,5
9	215,1	159,4	11,6
10	240,0	177,8	12,9
11	254,2	188,3	13,7
12	278,1	206,1	14,9
13	300,2	222,4	16,2

Nach jeder Erhöhung der Scherrate wurde eine Wartezeit von  $t = 30$  s eingehalten und danach für 60 s ein C-Scan vom Zentrum des jeweiligen Fließkanals aufgenommen. Somit hatten die Biofilme stets 90 s Zeit, sich an die vorliegende Strömung zu gewöhnen, bevor dieser erhöht wurde (s. Abb. 9).

Es wurden je Versuch (V5-V8)  $N = 4$  Fließzellen untersucht.

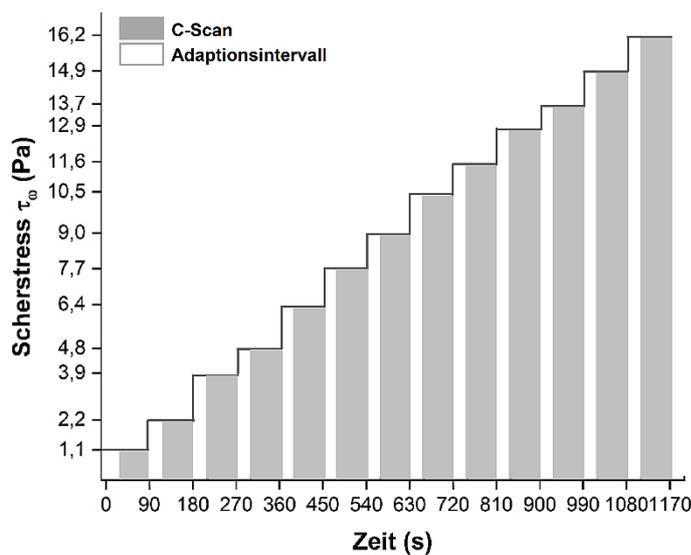


Abb. 9 Schema der Deformationsversuche. Eine Erhöhung der Wandschubspannung  $\tau_w$  wurde alle 90 Sekunden gesetzt, wobei die Biofilme stets 30 Sekunden Zeit zur Adaption an die Scherbelastung hatten und ein C-Scan mit einer Aufnahmedauer von 60 Sekunden folgte.

Zur Berechnung der viskoelastischen Eigenschaften der Biofilme wurden weiterhin C-Scans durchgeführt, die das Biofilverhalten zurück zum Ausgangszustand bei  $\tau_w = 0$  Pa nach einer Wartezeit von  $t = 60$  s erfassen sollten (z. B. Relaxation der elastischen Biofilmanteile).

# 3

## Statistische Betrachtung der Biofilmentwicklung in Biofilmreplikaten

Im vorliegenden Kapitel wird die Notwendigkeit der Analyse im Hinblick auf eine Mindestanzahl an Biofilmreplikaten beschrieben. Des Weiteren werden die Ergebnisse zur Anwendbarkeit der robotischen Plattform EvoBot als Kultivierungs- und Monitoringplattform für eine statistische Untersuchung von Biofilmreplikaten diskutiert.

### 3.1 Positioniergenauigkeit (Experiment A1)

Um die Plattform zum Monitoring von Biofilmentwicklungen in Fließzellen nutzen zu können, ist es notwendig, dass die Positionierabweichungen unter der optischen Auflösung des OCTs (8  $\mu\text{m}$  axial) liegen bzw. unter der gewählten Pixelauflösung. Dadurch können Abweichungen optisch nicht mehr aufgelöst werden.

Vier unterschiedliche Verfahrenwege wurden mit dem Positionierungssystem getestet:

- |           |  |
|-----------|--|
| <b>P1</b> | Simultane $xy$ -Bewegung vom Ursprungspunkt zum Zielobjekt               |
| <b>P2</b> | Simultane $xy$ -Bewegung von unterschiedlichen Positionen zum Zielobjekt |
| <b>P3</b> | Sukzessive Bewegung vom Ursprung, beginnend mit der $x$ -Bewegung        |
| <b>P4</b> | Sukzessive Bewegung vom Ursprung, beginnend mit der $y$ -Bewegung        |

In Abbildung 10 sind dabei die Abweichungen vom Mittelpunkt des Zielobjekts abgebildet.

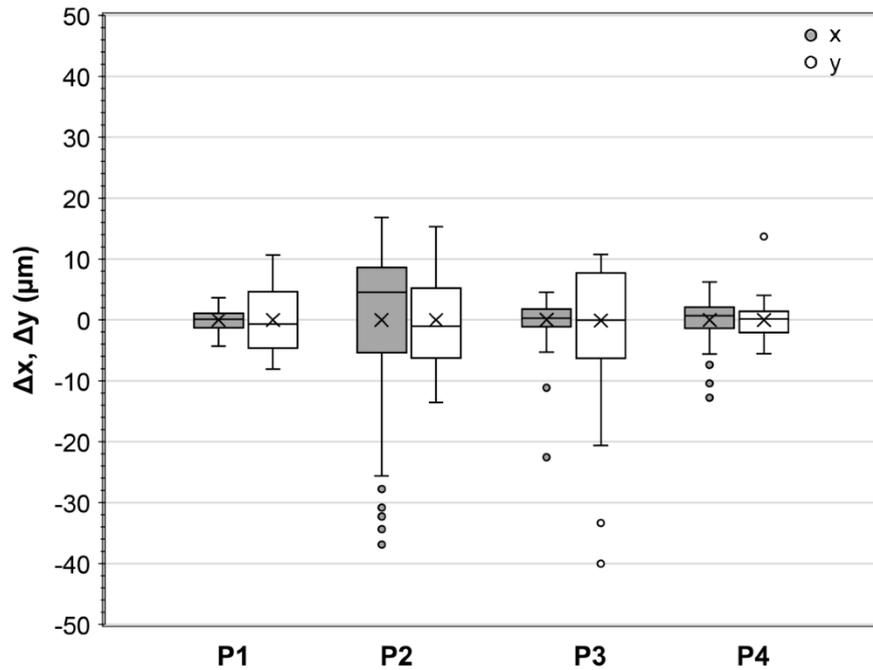


Abb. 10 Abweichungen  $\Delta x$  bzw.  $\Delta y$  der je  $N = 100$  Positionierungen vom jeweiligen Mittelwert  $\bar{x}$  bzw.  $\bar{y}$  dieser  $N = 100$  Positionierungen für die Verfahren P1-P4 im Boxplot. Die Box zeigt den Wertebereich des Interquartilsabstands, kurz IQR, an. Der kleinste und der größte Datenwert des Datensatzes werden durch das Ende der Antennen bzw. die Werte außerhalb  $1,5 \times \text{IQR}$  („Ausreißer“) definiert. Der Querstrich determiniert den Median (–), der unabhängig von Ausreißern ist und die Verteilung in zwei gleich große Hälften teilt. Der Mittelwert ist als Kreuz (×) dargestellt.

Tabelle 5 repräsentiert die genauen Werte des Boxplots inklusive der Anzahl an Werten außerhalb des Interquartilabstands ( $1,5 \times \text{IQR}$ ).

Tab. 5 Detaillierte Werte der Positioniergenauigkeit der robotischen Plattform in  $\mu\text{m}$ . IQR = Interquartilsabstand;  $N_{\text{Ausreißer}}$  = Anzahl der Werte außerhalb der Antennen; – = es traten keine Werte außerhalb der Antennen ( $1,5 \times \text{IQR}$ ) auf. P1-P4 geben den Verfahrenweg der jeweiligen Positionierungen an.

Achse	Positionierung	IQR	$1,5 \times \text{IQR}$	$N_{\text{Ausreißer}}$
x	P1	-1,3 – 1,1	-4,3 – 3,6	-
	P2	-5,4 – 8,6	-25,6 – 16,8	6
	P3	-1,1 – 1,8	-5,3 – 4,5	2
	P4	-1,4 – 2,1	-5,6 – 6,2	3
y	P1	-4,6 – 4,6	-8,0 – 10,7	-
	P2	-6,3 – 5,2	-13,6 – 15,3	-
	P3	-6,3 – 7,6	-20,6 – 10,7	2
	P4	-2,1 – 1,4	-5,6 – 4,0	2

Im Positionierungsversuch P1 waren die geringsten Abweichungen von der  $x$ -Achse mit  $\Delta x = -4,3 - 3,6 \mu\text{m}$  vom Mittelwert  $\bar{x}_{CoM}$  für 100 % der Daten gegeben. Demnach waren die Abweichungen aller  $N = 100$  Positionierungen hier kleiner als  $8 \mu\text{m}$ . Mit  $\Delta y = -8,0 - 10,7 \mu\text{m}$  Abweichung vom Mittelwert  $\bar{y}_{CoM}$  war die Positionierung auf der  $y$ -Achse weniger präzise. Dennoch lag der Großteil der Daten (= *interquartile range*, kurz: IQR) für  $\Delta x$  mit  $-1,3 - 1,1 \mu\text{m}$  und  $\Delta y$  mit  $-4,6 - 4,6 \mu\text{m}$  unter der optischen Auflösung des verwendeten Ganymede I OCT. Bei P2 und P3 waren die Abweichungen deutlich höher. P2 und P3 wiesen mit Daten außerhalb der Whisker von  $\Delta x = -36 \mu\text{m}$  und  $-40 \mu\text{m}$  die größten Positionierungsabweichungen  $\Delta x$  auf. Dennoch lagen auch hier 50 % der Positionierungen in P2 und P3 unterhalb von  $8,6 \mu\text{m}$  Abweichung, der gleiche Trend war bei  $\Delta y$  zu erkennen. Hier traten für die Gesamtzahl der Datenpunkte Abweichungen von bis zu  $\Delta y = -20,6 \mu\text{m}$  ( $1,5 \times \text{IQR}$ ) bei P3 auf. Verglichen mit P2, war die Anzahl der Ausreißer außerhalb  $1,5 \times \text{IQR}$  mit  $N = 2$  für  $\Delta x$  bei P3 geringer, dagegen mit  $N = 2$  für  $\Delta y$  höher als bei P2.

P4 wies einen ähnlichen Trend wie P1 auf, der  $1,5 \times \text{IQR}$  war mit je  $\Delta x = -5,6 - 6,2 \mu\text{m}$  und  $\Delta y = -5,6 - 4,0 \mu\text{m}$  entsprechend gering. Lediglich  $N = 3$  ( $x$ -Achse) und  $N = 2$  ( $y$ -Achse) Werte außerhalb des  $1,5 \times \text{IQR}$  erhöhten die Abweichung aller aufgenommenen Daten in P4 auf maximal  $\Delta x = -12,7 \mu\text{m}$  und  $\Delta y = 14 \mu\text{m}$ . Letztendlich war die auf alle Positionierungsversuche und -richtungen (P1-P4) bezogene maximale Abweichung mit  $-40 \mu\text{m}$  gering. Bei der Quantifizierung der Mesoskala (mm-Bereich) eines Biofilms im gesamten Fließkanal würde solch ein Fehler bei  $8 \mu\text{m}$  Pixelauflösung lediglich 5 Pixel entsprechen. Diese Abweichung beträgt bei einem, wie in dieser Arbeit genutzten, Fließkanal von 5 mm Breite weniger als 1 %.

Durch die Lage der Fließzellen im Experiment war es nötig, alle 4 Positionierungswege zu kombinieren.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse der statistischen Evaluierung die Tauglichkeit des EvoBots zur kontinuierlichen und automatisierten Untersuchung der Biofilmstruktur und -entwicklung.<sup>42</sup> Die präziseste Positionierung findet dabei statt, wenn der OCT-Scanner vor Bewegung zur Zielposition einem *homing* (Kalibrierung am Ursprungspunkt, = P1) unterzogen wird.

Die Ursache der Differenzen zwischen den Positionierungsmöglichkeiten innerhalb der vorliegenden Arbeit besteht definitiv in der Art des Verfahrensweges. Zusammengefasst war die Positionierung auf der  $y$ -Achse in drei Szenarien unpräziser als auf der  $x$ -Achse (Tab. 5, P1-P3), was auf die Geometrie der Plattform zurück zu führen sein könnte.

Verglichen mit der Studie von Nejatimoharrami *et al.* (2016), den Entwicklern des EvoBots, ist die Positionierung in der vorliegenden Arbeit dennoch präziser.<sup>44</sup> Depetris *et al.* (2019) zeigen mit ihrem automatisierten System zur Nutzung der OCT für die Untersuchung von Biofilmen mit einer Positioniergenauigkeit von  $\pm 50 \mu\text{m}$  ähnliche Abweichungen.<sup>41</sup> Hansen *et al.* (2019) wiesen für ihr automatisiertes Probenahmesystem  $\pm 25 \mu\text{m}$  in  $x$ - und  $\pm 10 \mu\text{m}$  Abweichung in  $y$ -Richtung nach.<sup>47</sup>

Eine Ursache für die unpräzisere Positionierung auf der  $y$ -Achse liegt im Aufbau des EvoBots und der Wahl der Schrittmotoren. Durch die Dimensionen des EvoBots mit  $60 \times 90 \text{ cm}^2$  ( $x, y$ -Achse), war für die  $y$ -Achse ein distanzbezogen weiterer Verfahrensweg nötig. Dadurch kann es bei nicht-konstanter Einhaltung der Schrittlänge zu einer Summation der Abweichungen pro Schritt kommen. Des Weiteren gibt es einige Stellgrößen der Schrittmotoren, die beachtet werden müssen, da sie unterschiedliche Auswirkungen auf die Positioniergenauigkeit haben können, wie beispielsweise die Wahl der Mikroschritte, die Resonanz,

zusätzliche Kodierer, das Drehmoment der Schrittmotoren, die Geschwindigkeit, Auflösung und weitere. Einige sind in Gierl *et al.* (2020) gelistet und näher beschrieben.<sup>42</sup>

Insgesamt sind die genannten Positionierungen schneller und genauer als eine manuelle Ausrichtung von optischen Messgeräten wie dem USB-Mikroskop oder auch dem OCT-Scanner.

Die gewählten Optionen erfüllten dadurch die Notwendigkeiten, um den EvoBot für die Charakterisierung von Biofilmen und deren Entwicklung mittels OCT zu nutzen.

### 3.2 Notwendigkeit der Analyse von Biofilmreplikaten (Experiment A2)

Aufgrund eingeschränkter Ressourcen und der Handhabung bzw. dem Aufwand von Biofilmreplikaten werden diese oft nicht durchgeführt. In vielen Studien kommt deshalb oft nur eine Mindestmenge von  $N \leq 3$  Replikaten zur Anwendung.<sup>76-78</sup> Abbildung 11 zeigt bereits bei acht Biofilmreplikaten aus einer Gesamtmenge von  $N_{max} = 24$  deutlich sichtbare Unterschiede in der Biofilmentwicklung bei den gleichen Wachstumsbedingungen.

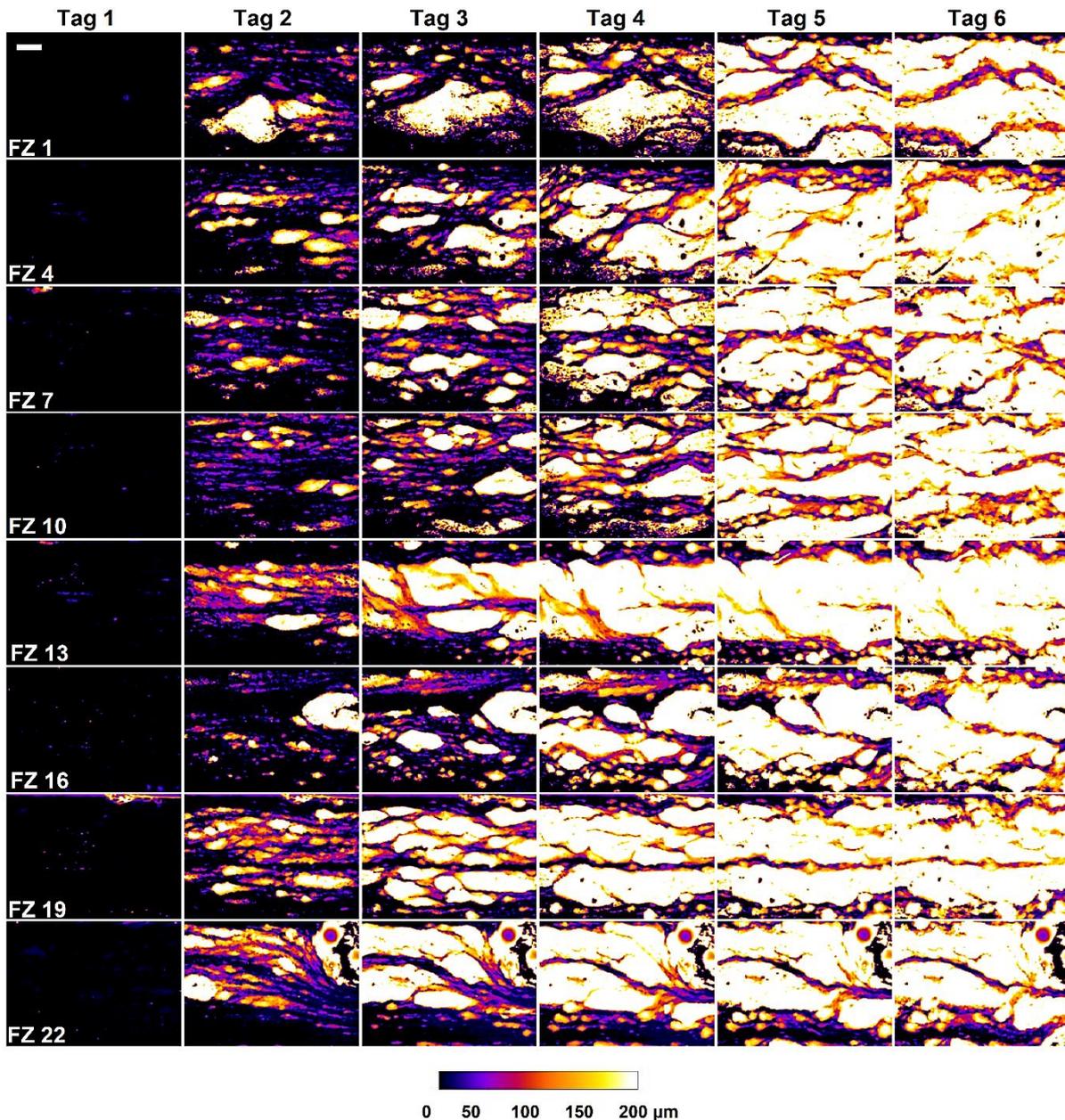


Abb. 11 Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) einzelner Biofilme über die Versuchsdauer von sechs Tagen. Gezeigt ist beispielhaft jede dritte Fließzelle (FZ). Fluss von links nach rechts. Der Maßstab beträgt 1 mm. Zur besseren Darstellung wurde ein LUT („fire“) angewendet.

An Tag 1 des Versuches war der Fließkanalboden (schwarz) kaum mit Biofilmmasse bedeckt. FZ 7 und 19 deuteten im Vergleich zu den restlichen Fließzellen bereits erste Akkumulationen von Biofilm an. Bereits an Tag 2 waren größere Anlagerungen zu sehen. Die Ausbildung von Streamern war in allen Fließzellen ersichtlich, die Biofilme in FZ 1 und in FZ 16 wiesen dabei frühzeitig 1 bis 2 mm lange Patches auf. In den darauffolgenden Tagen fand dann vermehrtes Wachstum in laterale Richtung ( $x, y$ ) und vor allem in die Höhe statt. Am Ende der Versuchsdauer war der Kanal vollständig mit nahezu 200  $\mu\text{m}$  hohen Kolonien bedeckt (weiße Farbkodierung) und es gab kaum Variation innerhalb der einzelnen Fließzellen, was auf die

Darstellung von lediglich  $N = 8$  aus  $N_{max} = 24$  zurück zu führen ist. Die mit dem Auge erfassbaren Unterschiede in den MIPs sind vor allem in den ersten vier Tagen auszumachen.

Um die Unterschiede zu quantifizieren, wurden die vier Strukturparameter mittlere Fließkanalbedeckung  $SC$ , mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ , interne Biofilmporosität  $\Phi_{int}$  und die texturale Entropie  $TE$  analysiert (s. Abb. 12).

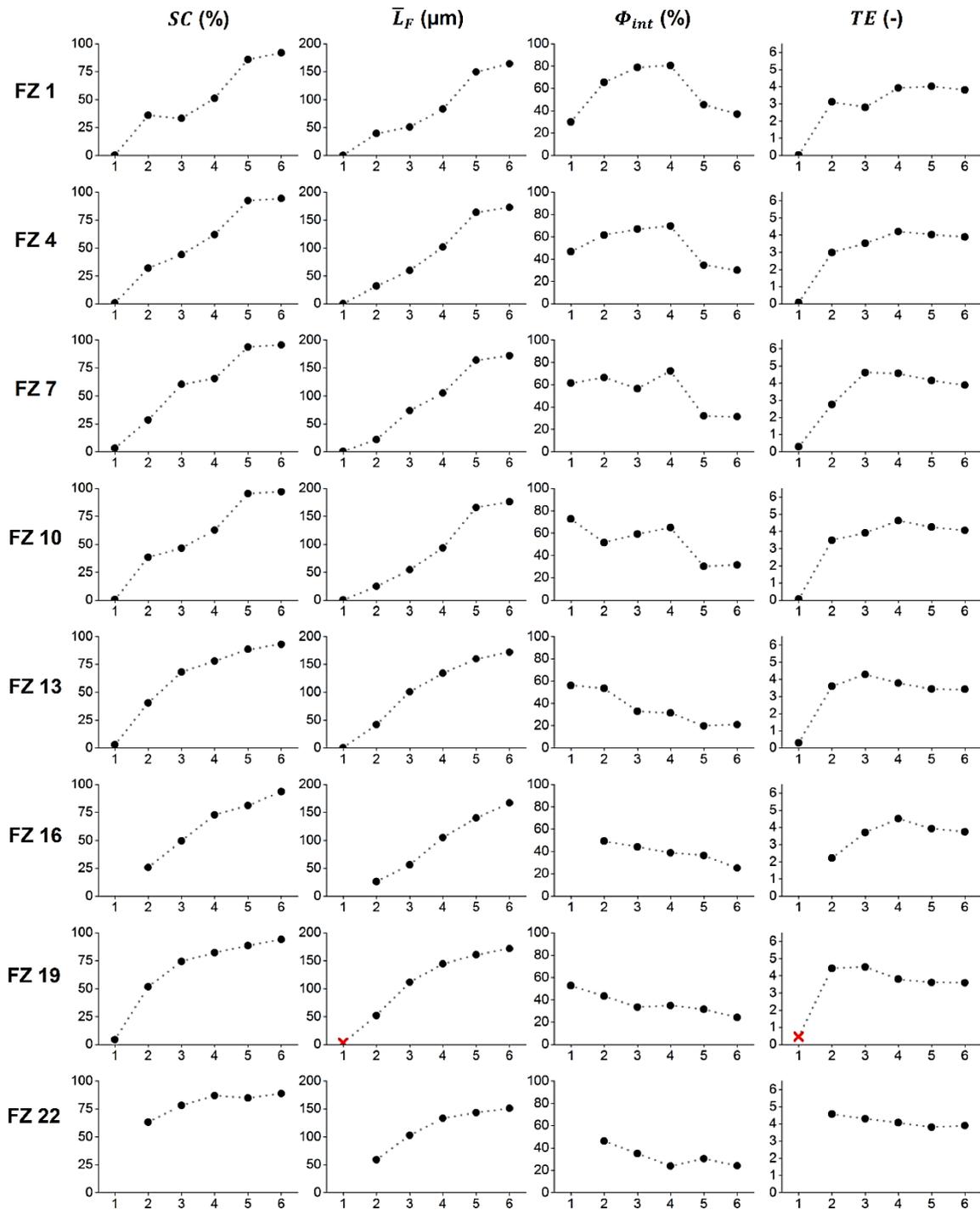


Abb. 12 Entwicklung der Biofilmstruktur. Gezeigt sind die Fließkanalbedeckung  $SC$ , die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ , die interne Porosität  $\Phi_{int}$  und die texturale Entropie  $TE$  für  $N = 8$  aus  $N_{max} = 24$  Biofilme über die Dauer des Experiments. Rote Kreuze indizieren Ausreißer in FZ 19. Fehlende Werte beruhen auf Abbildungsartefakten (z. B.  $\bar{L}_F$  an Tag 1 in FZ 22) und wurden von den Berechnungen ausgenommen.

Abb. 12 illustriert dabei den Entwicklungsverlauf der strukturellen Parameter über die Versuchsdauer. Wie bereits in den Topographien offensichtlich (s. Abb. 11), war der Fließkanalboden an Tag 1 noch nicht mit Biofilm bedeckt ( $SC = 0\%$ ). An Tag 2 variierten die Bedeckungen des Kanals mit Biofilmmasse zwischen ca. 25 % (FZ 7 und 16) und 50 % (FZ 19 und 22). Während die Biofilme in FZ 13 und 19 ein logarithmisches Wachstum mit typischer Plateauphase zu Tag 6 hin aufwiesen, zeigten die übrigen Fließzellen unterschiedlichste Entwicklungen. Bei FZ 1 fand während Tag 2 und 3 womöglich ein Verlust an Biofilm statt, da die Fließkanalbedeckung um einige Prozent sank.

Die Biofilme in FZ 1 bis 10 illustrierten einen ähnlichen Trend mit beginnender Plateauphase an Tag 5 und 6. Die Zunahme der Fließkanalbedeckung in FZ 16 deutete kein Plateau an, FZ 22 wiederum begann aufgrund der rapiden Akkumulation früh, ein Plateau auszubilden.

Betrachtet man die Wachstumsverläufe der mittleren Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ , ist eine entsprechende Tendenz im Entwicklungsverlauf zu erkennen. FZ 13 und 19 wiesen, wie bei dem Parameter  $SC$  ersichtlich, den typischen Wachstumsverlauf von Bakterien mit *lag-* (verzögerte), *log-* (exponentieller) und *stationärer Phase* (Plateau) auf. Im Vergleich zur  $SC$  in FZ 1 ist bei der  $\bar{L}_F$  zwischen Tag 2 und 3 kein Biofilmbriß bzw. keine Dickenabnahme erkennbar. Das bedeutet, dass trotz Abnahme der Fließkanalbedeckung, die mittlere Biofilmdicke im Kanal zunahm (bis 200  $\mu\text{m}$  an Tag 6). Die Plateauphase war in jeder FZ zwischen Tag 5 und 6 erkennbar, lediglich FZ 16 schien, wie auch bei der  $SC$ , geringfügig abzuweichen. Der Parameter  $\Phi_{int}$  determiniert die interne Porosität des Biofilms, demnach ob und wie viele Hohlräume vorhanden sind. Generell nahm die Porosität in allen Biofilmen ab. Eine Abweichung ließ sich in FZ 1 feststellen. Hier begann die Porosität zunächst zu steigen (an Tag 1 ca. 20 %). Im Vergleich dazu waren die anderen Biofilme mit 60 bis 80 % an Tag 1 poröser. Über die Versuchsdauer hinweg wurde in allen 8 Biofilmen eine Porosität von 20 % an Tag 6 erreicht. Unterschiede zwischen den FZ sind aus den Kurven ersichtlich. Grundsätzlich stimmte die Zunahme der  $SC$  und  $\bar{L}_F$  mit der Abnahme von  $\Phi_{int}$  überein.

Die textuelle Entropie  $TE$  stieg in allen Zellen mit Ausnahme von FZ 22 mit der Kultivierungsdauer an. Ein Anstieg der  $TE$  ging mit einer Erhöhung der Heterogenität des Biofilms einher. In den MIPs in Abb. 11 wurden in den ersten 3 bis 4 Tagen die größten Unterschiede in der Biofilmentwicklung ersichtlich. Dies bewies der starke Anstieg der  $TE$  in den FZ 1 bis 19. Da sich an Tag 5 und 6 bauchige, den ganzen Kanal bedeckende und hohe Kolonien ausgebildet hatten (s. Abb. 11), stagnierte die  $TE$  bei einem Wert von ca. 4 und die Biofilme hatten räumlich gesehen, keine Möglichkeit sich weiter zu differenzieren.

Insgesamt konnten kleinere und auch größere Abweichungen in den Verläufen der einzelnen Parameter ausgemacht werden, weshalb eine vollständige Betrachtung aller  $N = 24$  Biofilmreplikate sinnvoll und auch notwendig ist. Dies ist in Abb. 13 illustriert.

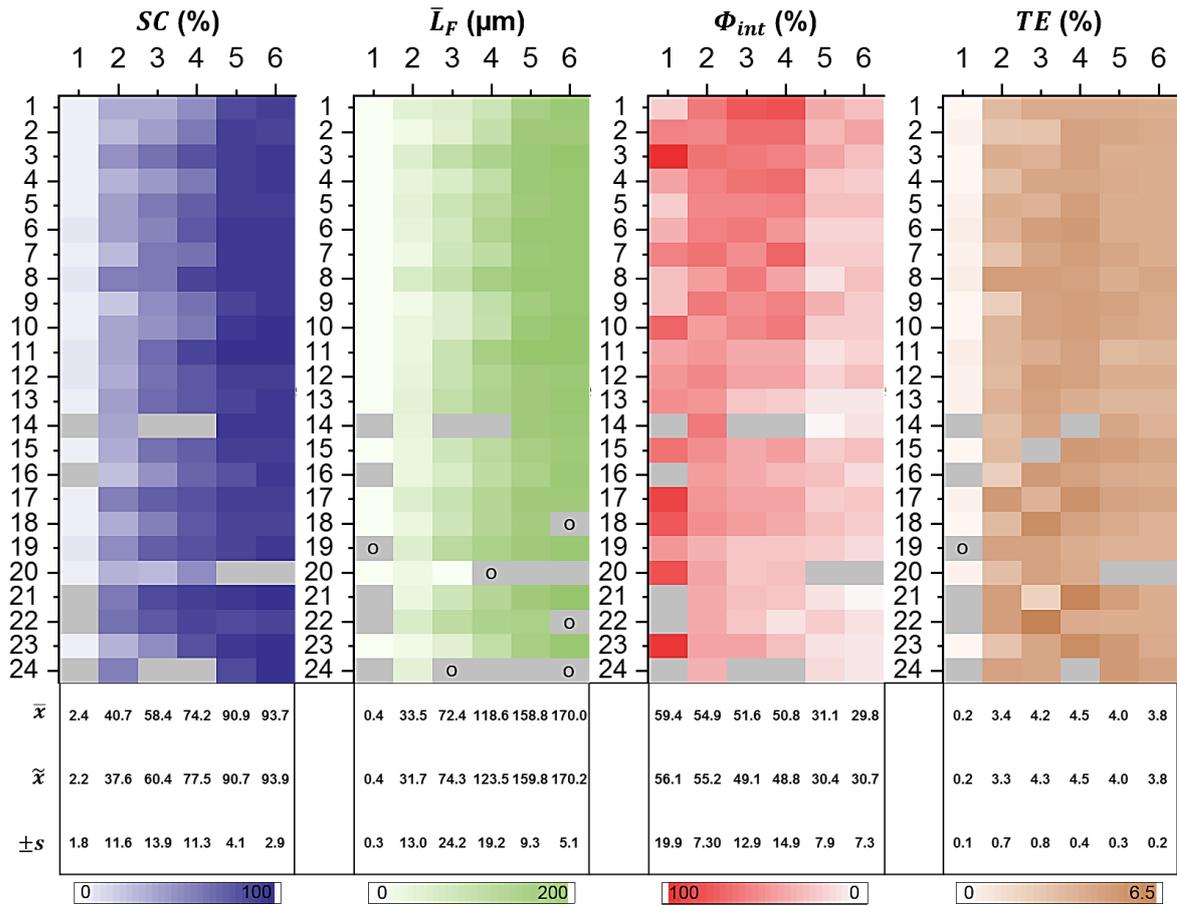


Abb. 13 Heatmaps der Biofilmparameter aller  $N = 24$  kultivierten Biofilme. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Mediane ( $\tilde{x}$ ) und Standardabweichungen ( $s$ ) sind gegeben. Die Spalten determinieren dabei die Tage des Versuchs (Tag 1-6). Graue Zellen definieren fehlende Werte (z. B. durch Abbildungsartefakte); „o“ repräsentiert Ausreißer. Nach Gierl *et al.* (2020).<sup>42</sup>

In den Heatmaps sind die Parameterwerte intensitätskodiert aufgetragen. Werte nahe 0 sind dabei weiß gekennzeichnet. An Tag 1 lagen die Werte für die Strukturparameter  $SC$ ,  $\bar{L}_F$  und  $TE$  für alle Fließzellen bei 0 und nahmen in der Intensität, also in Bedeckung, Höhe und Heterogenität, zu. Der Strukturparameter  $\Phi_{int}$  besaß bei Kultivierungsbeginn die höchsten Werte, die Kolonien waren, wie bereits in Abb. 11 zu sehen war, eher bauschig und schwammähnlich. Sie wurden zum Ende der Kultivierungsdauer hin kompakter, was bedeutet, dass Poren oder Wassereinschlüsse durch die Volumeneinnahme der Biofilme verdrängt bzw. kleiner wurden. Was die Grafik belegt, sind die starken Schwankungen in der Mitte des Experiments (Tage 2-4). Während beispielsweise bei der Fließkanalbedeckung  $SC$  die FZ 5, 6, 10 und 11 an Tag 2 ein gleiches Farbschema einnahmen, kodierten die FZ 8, 17, 21 und 22 in weit höherer Farbsättigung. Entsprechende Abweichungen wurden ebenso an Tag 3 und 4 deutlich. Die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  variierte weniger, einzelne Abweichungen, wie hauptsächlich in FZ 3, 8, 11, 19 und 22, repräsentierten höhere Werte zwischen dem zweiten und vierten Tag des Versuchs. Die Porosität  $\Phi_{int}$  zeigte das weiteste Spektrum der Farbsättigung. Die Heterogenität  $TE$  dagegen wies wieder eine eher homogene Intensitätsverteilung auf. Diese Beobachtung widerspricht der Abbildung 12, bei der die Hauptunterschiede zwischen den Biofilmen bei  $\Phi_{int}$  und  $TE$  auftraten. Die Ursache liegt in der willkürlichen Selektion der Fließzellen in Abbildung 12 (die erste FZ wurde als FZ 1 deklariert). In der Betrachtung der Mittel- und Medianwerte sowie der

Standardabweichung spiegeln sich die Kodierungen wider: Die Tage 2 bis 4 wiesen die höchsten Abweichungen der Mittelwerte vom Median bei  $SC$ ,  $\bar{L}_F$  und  $\Phi_{int}$  auf. Die Standardabweichungen lagen an den Tagen 2 bis 4 am höchsten und nahmen zum Ende des Versuchs hin ab, was mit einer Annäherung der Parameterwerte zwischen allen Biofilmen einherging und durch die MIPs in Abbildung 11 belegt wird. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Biofilme insoweit entwickelten, dass eine räumliche Heterogenität sowie eine Differenzierung in den Parametern  $SC$ ,  $\bar{L}_F$  und  $\Phi_{int}$  aufgrund der vollen Volumeneinnahme des Fließkanals nicht mehr möglich war.

Die vorliegenden Versuche zeigen, dass unter gleichen Kultivierungsbedingungen Unterschiede in der Biofilmentwicklung und -struktur zwischen den Replikaten quantifiziert werden können. Diese Variationen waren bei Biofilmen in der Mitte des Experiments am größten (Tag 2-4) und wurden zum Ende des Versuchs aufgrund der Volumeneinnahme hin verringert und gleichten sich an. Aus diesem Grund ist es notwendig, ausreichend Replikate für eine Analyse zur Verfügung zu stellen, da eine geringe Anzahl an Replikaten ( $N \leq 2$ )<sup>76-78</sup> zu fehlerhaften Schlussfolgerungen bzw. Fehlinterpretation von Ergebnissen führen kann. Eine mögliche Unrichtigkeit ist zudem nicht erkennbar, da der „richtige“ Wert eines Parameters aufgrund fehlender Statistik nicht bestimmt werden kann.

Ein Beispiel ergibt sich aus Abb. 13 für den Parameter  $\bar{L}_F$ , bei der die Fließzellen 1, 3, 5 und 9 unterschiedlichste Farbkodierungen an Tag 4 liefern. In diesen Fällen kann die reale mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  von je  $N = 2$ ,  $N = 3$  oder  $N = 4$  Replikaten je nach Auswahl der Fließzellen unter- oder überschätzt werden, da notwendige Replikate fehlen. Veranschaulicht wird dieser Zusammenhang in Abbildung 14. Je mehr Biofilmreplikate dabei durchgeführt werden, desto mehr nähern sich die Werte dem Mittelwert aus  $N = 24$  an. Eine Probenanzahl von  $N = 10$  bis  $N = 12$  scheint für die Parameter  $\bar{L}_F$  und  $TE$  ausreichend zu sein.

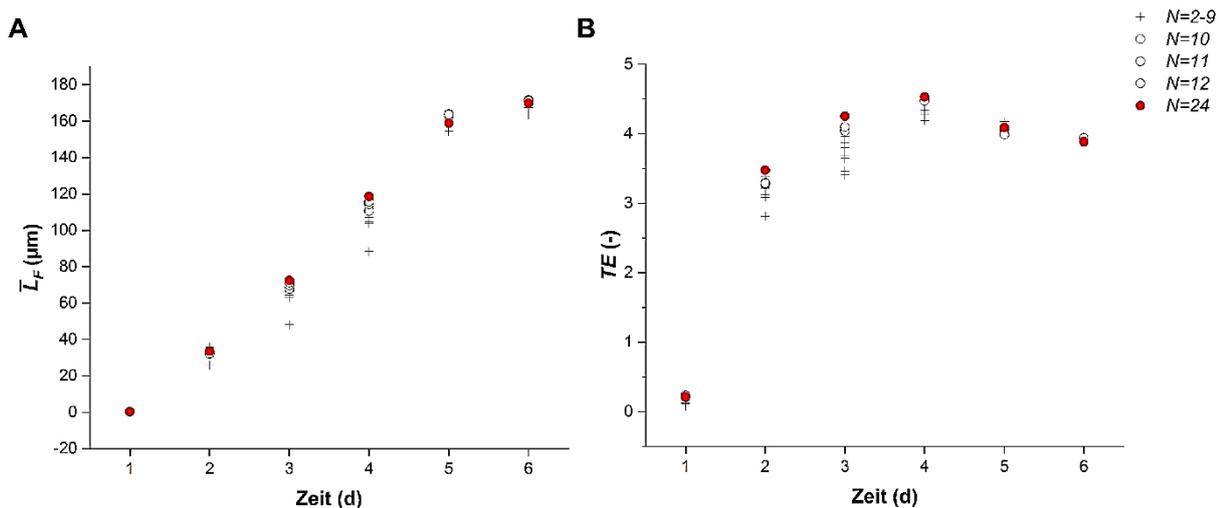


Abb. 14 Unter- bzw. Überschätzung bei unterschiedlicher Anzahl an Replikaten für die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  (A) und die texturale Entropie  $TE$  (B). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus  $N = 2$  bis  $N = 12$  Replikaten und der Mittelwert aus  $N = 24$  in Relation dazu.

In der Wissenschaft bzw. Statistik ist allgemein bekannt, dass eine erhöhte Anzahl an Replikaten mit der Sicherheit bzw. Schärfe und Präzision des zu bestimmenden Parameters einhergeht.<sup>79,80</sup> Dennoch werden Experimente oft nur mit wenigen unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

Selbst Studien mit einer höheren Anzahl an Replikaten von  $N = 6$  bis  $N = 12$  können noch hohe Standardabweichungen für die gleichen Kultivierungsbedingungen aufweisen. Dies ist beispielsweise in der Studie von Ahimou *et al.* (2007) der Fall, wo hohe Standardabweichungen der Biofilmdicke von ca.  $\pm 200 \mu\text{m}$  ( $\cong 17 \%$ ) bei 12 Tage alten Biofilmen ( $N = 6$ ) auftraten.<sup>11</sup> Auch Turonova *et al.* (2012) nutzten in deren Studie Triplikate, wobei die maximalen Biofilmdicken Standardabweichungen von bis zu  $\pm 100 \mu\text{m}$  ( $\cong 29 \%$ ) aufzeigten.<sup>81</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden bei Bester *et al.* (2013) bei der Nutzung von Duplikaten<sup>82</sup>, Sauer *et al.* (2009) bei der Nutzung von Triplikaten<sup>83</sup>, sowie bei Koseki *et al.* (2014) bei der Nutzung von  $N = 12$  Replikaten<sup>84</sup> dokumentiert.<sup>42</sup>

Zum Teil können hohe Abweichungen abhängig vom Strukturparameter sein. Beispielsweise können bei einem speziellen Parameter bereits Triplikate den realen Wert wiedergeben, während ein anderer Strukturparameter hohe Diskrepanzen aufweist. Geringe Standardabweichungen können dabei zufallsbedingt oder kultivierbedingt entstehen. Ein Exempel zeigt der Parameter  $SC$  an Tag 2 für die Fließzellen 8, 17 und 19, die kaum untereinander variieren (s. Abb. 13). Bei Betrachtung von  $N = 24$  Fließzellen wird jedoch indiziert, dass der reale Wert des Parameters  $SC$  in einem anderen Bereich liegt. Solche fehlerhaften Bewertungen der Strukturparameter des Biofilms können entscheidende Konsequenzen haben. Da die physikalische Struktur eines Biofilms die Interaktion mit dessen Umgebung determiniert, kann eine zu kleine Stichprobe zur Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. Werden Ergebnisse aus Daten eines Versuchs mit fehlender Statistik gewonnen und unter- bzw. überschätzt, so kann dies beispielhaft die Effektivität eines Antibiofilmmittels oder auch die Wahl von Optimierungsparametern eines Biofilmreaktors zur Abwasserbehandlung in der Kläranlage beeinflussen.<sup>48</sup> Weiterhin kann eine Fehlkalkulation durch eine zu geringe Probenanzahl die geeignetste Maßnahme zum Verhindern von Verblockung durch Biofilm, mit darauffolgenden Schäden in industriellen Apparaten, einschränken.

### Zwischenfazit

Durch Nutzung der Monitoringplattform (EvoBot + OCT) kann eine hohe Anzahl an mikro- oder minifluidischen Fließzellen (hier:  $N = 24$  Fließzellen) montiert, betrieben und on-line sowie automatisiert abgebildet werden können.<sup>42</sup>

Die vorliegenden Experimente zeigen die Notwendigkeit und Relevanz von Replikaten und dem Aufbau einer statistischen Analyse in der Biofilmforschung, um Falschaussagen zur Biofilmstruktur zu vermeiden. Die simultane Analyse der  $N = 24$  Fließzellen demonstrierte, dass strukturelle Unterschiede zwischen den Biofilmen für bestimmte Parameter bereits bei gleichen Bedingung auftreten können. Es liegt in der Hand des Wissenschaftlers, die Anzahl der Replikate sowohl an die Messgröße als auch an die Forschungsstudie anzupassen. Generell steigert eine höhere Probenanzahl auch die statistische Aussagekraft bzw. Teststärke einer Studie.<sup>42,80</sup>

Die Vorteile des Monitoringsystems sind:

- ein **akkurates** und **zuverlässiges** Positionieren des OCT-Scanners mit Abweichungen auf dem Niveau der optischen Auflösung (Pixelgröße: 8  $\mu\text{m}$ )
- eine **semi-automatisierte** und **nichtinvasive** Abbildung der Biofilmentwicklung
- **statistisch verifizierte** Rückschlüsse über die Biofilmentwicklung
- **Replikatanalyse** mit Zeitersparnis

# 4

## Manipulation der Biofilmentwicklung und -struktur unter dem Einfluss von Fe<sup>2+</sup> im Medium

Die Robotik-Plattform EvoBot hatte sich in Kombination mit der OCT in Kapitel 3 als geeignetes Kultivierungs- und Monitoringwerkzeug erwiesen und wurde im folgenden Kapitel zur Analyse von Biofilmreplikaten genutzt, um den Effekt von Fe<sup>2+</sup> auf die Biofilmentwicklung mit statistischer Sicherheit zu untersuchen.

Dazu wurden Versuche mit den in Tabelle 6 gelisteten Wachstumsbedingungen durchgeführt.

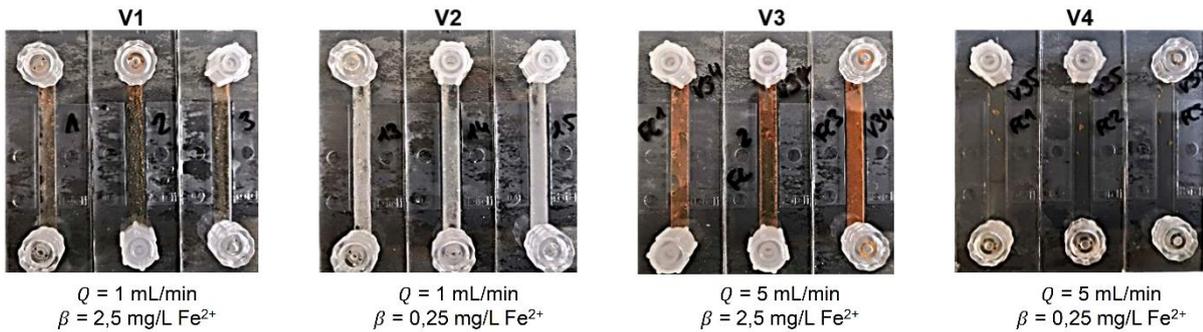
**Tab. 6** Versuchsübersicht zur Analyse struktureller Biofilmeigenschaften unter dem Einfluss von Fe<sup>2+</sup>.

Versuch	<i>Q</i> (mL/min)	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)
V1	1	2,5
V2	1	0,25
V3	5	2,5
V4	5	0,25

### 4.1 Primäre Biofilmentwicklung

In Kapitel 3 sind die Biofilme aufgrund eines optimalen Nährstoffangebotes und geringer Fließgeschwindigkeiten rapide gewachsen und bereits frühzeitig (Tag 5 und 6) konnten Unterschiede nur noch schwer differenziert werden. Zur Beurteilung des Einflusses von Fe<sup>2+</sup> auf die Biofilmkolonien wurde demnach ein Nährmedium gewählt, welches ein langsames Wachstum begünstigte.

Abb. 15 zeigt die optischen Unterschiede zwischen den Versuchen V1-V4 an Tag 10.



**Abb. 15** Übersichtsbilder von je  $N = 3$  Fließzellen nach Beendigung der Versuche an Tag 10. Gezeigt sind der Fließkanalein- und -ausgang sowie der Fließkanal mit innewohnendem Biofilm. Fließrichtung von oben nach unten.

In allen je  $N = 10$  Fließzellen war über die Dauer des Wachstumsversuchs Biofilmmasse angewachsen. Dabei wurde eine rostbraune Färbung vor allem in V1, V3 und V4 deutlich. In V2 dagegen ist ein eher weißlicher Film ersichtlich. Durch die partielle Trübung des Mediums konnten primär keine Rückschlüsse auf die Stärke und/oder Art des Wachstums gezogen werden. In Abb. 16 sind MIPs der OCT-Aufnahmen dargestellt, die die ersten Unterschiede innerhalb der Versuchsbedingungen über eine Dauer von 10 Tagen nachweisen. Im Anhang C sind die Aufnahmen aller Fließzellen jeden Versuchs an jedem Tag im Detail gezeigt.

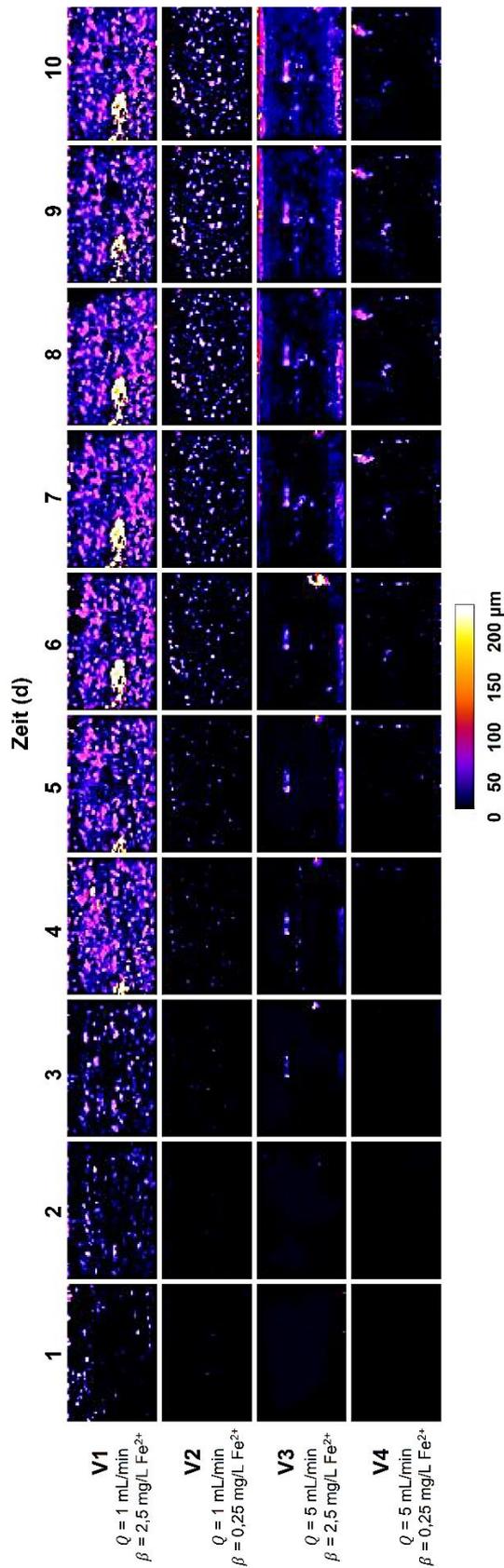


Abb. 16 Höhenkartierungen (MIPs) der Biofilme jeder Bedingung über die Dauer des Experiments. A)-D) = V1-V4. Es wurde ein LUT angewendet, die Höhenangabe mittels Kalibrierbalken (z) ist dabei in  $\mu\text{m}$  gegeben. Die Aufnahmen besitzen die Dimensionen  $5 \times 7 \text{ mm}^2$ . Fluss von links nach rechts. Jede Aufnahme bildet einen Tag des Experiments ab (Tag 1-10).

In den ersten zwei Tagen konnte lediglich bei V1 Wachstum ausgemacht werden. Hier waren schon frühzeitig einzelne Aggregate von geringer Höhe ( $< 50 \mu\text{m}$ ) erkennbar. Über die Dauer des Versuchs nahm die Anzahl sowie die Größe dieser Kolonien (bis  $100 \mu\text{m}$  an Tag 3) zu. An Tag 3 wurden ebenso erste, dagegen größere Anlagerungen in V3 sichtbar. Deutlich wurde vor allem das spät einsetzende Bewachsen des Fließkanals in V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ). Der Vergleich von V1 ( $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit V3 ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) und V2 ( $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit V4 ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) offenbart einen Trend der Wachstumsgeschwindigkeit der Biofilme. Durch die niedrige Fließgeschwindigkeit, gekoppelt mit der hohen Eisenverfügbarkeit (V1), wird das Biofilmwachstum positiv beeinflusst. Niedrige Eisenkonzentrationen mit niedriger Fließgeschwindigkeit (V2) und hohe Eisenkonzentrationen mit hoher Fließgeschwindigkeit (V3) schienen zu Beginn ähnliche Auswirkungen auf den Biofilm zu besitzen, da die Akkumulation hier zunächst an Tag 3 und Tag 4 deutlich wurden.

Innerhalb der Topographien in Abb. 16 wird angedeutet, dass V4 mit den Bedingungen einer niedrigen Eisenkonzentration und einem hohen Volumenstrom das geringste Aufwachsen auf das Substratum verursachte. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich zudem, dass die Biofilme in V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) zum Ende der Versuchsdauer hin zusammenhängende Aggregate ausbildeten. Hingegen entstanden bei V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) eher einzelne und in Breite sowie Länge kleinere Kolonien. Die Entwicklung zeigte einen nahezu vollständig bedeckten Fließkanalboden an den Tagen 9 und 10 innerhalb der Versuche V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ). Im Gegensatz dazu war das Substratum innerhalb der Versuche V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) nur partiell bedeckt. Mit ca.  $200 \mu\text{m}$  maximaler Biofilmhöhe  $L_{F,i}$  illustrierte V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) zudem einen der höchsten und längsten Patches (weiße Farbkodierung). Danach folgte V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) mit ebenso längeren und zusammenhängenden Kolonien, die ein Wachstum von den Fließkanalwänden zur Kanalmitte zeigten. Bei V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) findet sich ein einzelnes Aggregat mit ca.  $100\text{-}150 \mu\text{m}$  Höhe ab Tag 7 des Experiments. Durch das plötzliche Auftreten des Aggregats zwischen Tag 6 und Tag 7 wird dieses eher als Ablagerung statt Wachstum interpretiert, da dies dem Fließkanal nach zu urteilen eher der Ausnahme entsprach.

Mittels OCT konnten erste Unterschiede der Biofilme bei den verschiedensten Bedingungen ausgemacht werden. Um diese primären Differenzierungen mit statistischer Sicherheit zu belegen, wurden alle  $N = 10$  Biofilme je Versuch mittels Fiji hinsichtlich derer Strukturparameter analysiert (s. Abb. 17 und 18) und im Anschluss in einer statistischen Varianzanalyse beurteilt.



An Tag 1 besaßen die Biofilme unter allen Bedingungen nahezu gleiche mittlere Biofilmdicken  $\bar{L}_F$  von wenigen  $\mu\text{m}$ . An den Tagen 3 und 4 wurde die deutliche Zunahme der Biofilmmasse, wie in den MIPs (s. Abb. 16) gezeigt, für V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) ersichtlich. An den Tagen 5 und 6 war zunächst auch das verstärkte Wachstum der Biofilmmasse in V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) erkennbar. Besonders an Tag 6 ist die hohe Variation der mittleren Biofilmdicken von V1 illustriert. Hier entwickelten sich die Biofilme mit bis zu  $\bar{L}_F = 12,4 \pm 7,7 \mu\text{m}$  Biofilmdicke. Innerhalb der Kultivierungsstage 7 bis 10 wurden vor allem der Zuwachs in V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) und deren hohe Standardabweichungen von bis zu  $\bar{L}_F = \pm 15,4 \mu\text{m}$  für V3 ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) deutlich. Die Entwicklung der Biofilme in V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) war verlangsamt, und die maximalen mittleren Dicken der Kolonien betragen lediglich  $\bar{L}_F = 5,5 \pm 4,2 \mu\text{m}$  am Ende der Kultivierungsdauer.

Der Zuwachs an Aggregaten wurde auch in Abb. 17 anhand der Fließkanalbedeckung  $SC$  offensichtlich, die einen ähnlichen Trend für je V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) und je V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) aufwies. Ebenso wie bei der  $\bar{L}_F$  waren für V1 und V3 an Tag 10 die höchsten Standardabweichungen mit  $SC = \pm 14,3 \%$  Fließkanalbedeckung eindeutig. Innerhalb der Versuche V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) war die Fließkanalbedeckung mit bis zu  $SC = 16,2 \pm 6,9 \%$  am Versuchsende (Tag 10) im Vergleich zur Akkumulation in V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) von bis zu  $SC = 81,9 \pm 7,2 \%$  niedrig und betrug rund ein Fünftel.

Erneut wurde auch in der textuellen Entropie  $TE$  der gleiche Entwicklungsverlauf offenbart. Eine Zunahme der textuellen Entropie ging dabei mit einer steigenden Heterogenität des abgebildeten Fließkanalvolumens einher. Das bedeutet, dass sich die ausgebildeten Kolonien zunehmend in ihrer Form, Struktur sowie Verteilung unterscheiden. Hier jedoch wurden die höchsten Differenzen innerhalb der Entropie für V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) an den Tagen 5 und 6 gezeigt, welche zum Ende der Versuchsdauer hin abnahmen. Dies ist konform mit den MIPs (Abb. 16), an denen nach Tag 6 für V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) optisch kaum Unterschiede auszumachen sind, ausgenommen des Zuwachses in die Höhe ( $\bar{L}_F$ ).

Vor allem für V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) und erweitert auch für V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) zeigte die textuelle Entropie  $TE$  an den Tagen 9 und 10 die höchste Standardabweichung von bis zu zwei Einheiten. Die Biofilmaggregate aus V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) waren homogener als die Aggregate aus V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ). Dies spiegelt sich in den MIPs (s. Abb. 16) wider, in denen die Aufnahme von V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) an Tag 10 der Aufnahme von V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) an Tag 3 und die Aufnahme von V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) an Tag 10 der Aufnahme von V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) an Tag 5 hinsichtlich  $TE$ ,  $SC$  und  $\bar{L}_F$  ähnelt.

Die Schiefe  $R_{SK}$  der Farbverteilung, also der Verteilung der verschiedenen Koloniehöhen, in Abb. 17  $R_{SK}$  dokumentiert im Vergleich zu den ersten drei Strukturparametern eine Abnahme unter allen vier Bedingungen V1-V4.

Auch zwischen den Bedingungen war die Anordnung der Datenpunkte spiegelverkehrt. Hier lagen die Datenpunkte für die Biofilme in V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) an Tag 1 mit bis zu  $R_{SK} = 104,8 \pm 41,6$  Einheiten am höchsten, da voraussichtlich nur wenige Pixel in den C-Scans vorhanden waren. Dies kann durch die geringe Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  und die geringe Kanalbodenbedeckung  $SC$  in Abb. 17 belegt

werden. Danach folgten V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) und letztlich V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit einem  $R_{SK}$  Wert von  $R_{SK} = 10$ , da sich an Tag 1 bereits mehrere kleine Aggregate mit fast symmetrischer Verteilung ( $R_{KU}$ , s. Abb. 17) in den FZ entwickelt hatten.

Die Asymmetrie der Höhenverteilung nahm über die Kultivierungsdauer hinweg bis zu einer symmetrischen Verteilung der Koloniehöhen hin ab ( $R_{SK} = 0$ ). Dementsprechend sollten genauso viele kleine wie auch hohe Aggregate in den Biofilmen vorhanden gewesen sein. Die Struktur des Bulk-Biofilm-Interface wurde folglich gleichmäßiger. Ausschließlich die Biofilme in V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) wiesen einen geringfügig erhöhten (= positiven)  $R_{SK}$  Wert auf, da die Kolonien kein zusammenhängendes Aggregat ausbildeten und nur einzelne höhere Kolonien charakterisiert waren (vgl. Anhang C).

Der Parameter  $R_{SK}$  zeigt jedoch nicht den gleichen Trend ( $\beta \approx Q$ ) wie die Parameter  $\bar{L}_F$ ,  $SC$  und  $TE$  ( $\beta > Q$ ). Er wird womöglich gleichermaßen von der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration  $\beta$  als auch von der Fließgeschwindigkeit bzw. dem Volumenstrom  $Q$  beeinflusst.

Beim Strukturparameter der Wölbung  $R_{KU}$  war diese Tendenz ( $\beta \approx Q$ ) entsprechend vorhanden (s. Abb. 17  $R_{KU}$ ). Der Parameter beschreibt die Verteilung der Berge und Täler in der Biofilmoberfläche und verdeutlicht, dass in V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) eher einzelne größere Aggregate auftraten. Unter den Versuchsbedingungen V1-V3 lag somit eine relativ symmetrische Ausrichtung der Kolonien vor, die ab Tag 6 auch für die Biofilme in V4 auftrat.

Da die beiden Parameter  $R_{SK}$  und  $R_{KU}$  an den letzten 5 Tagen (Tage 6-10) die geringsten Unterschiede aufwiesen, wär eine Differenzierung des Einflusses von  $\beta_{\text{Fe}^{2+}}$  und  $Q$  ausschließlich durch diese Strukturparameter nicht möglich.

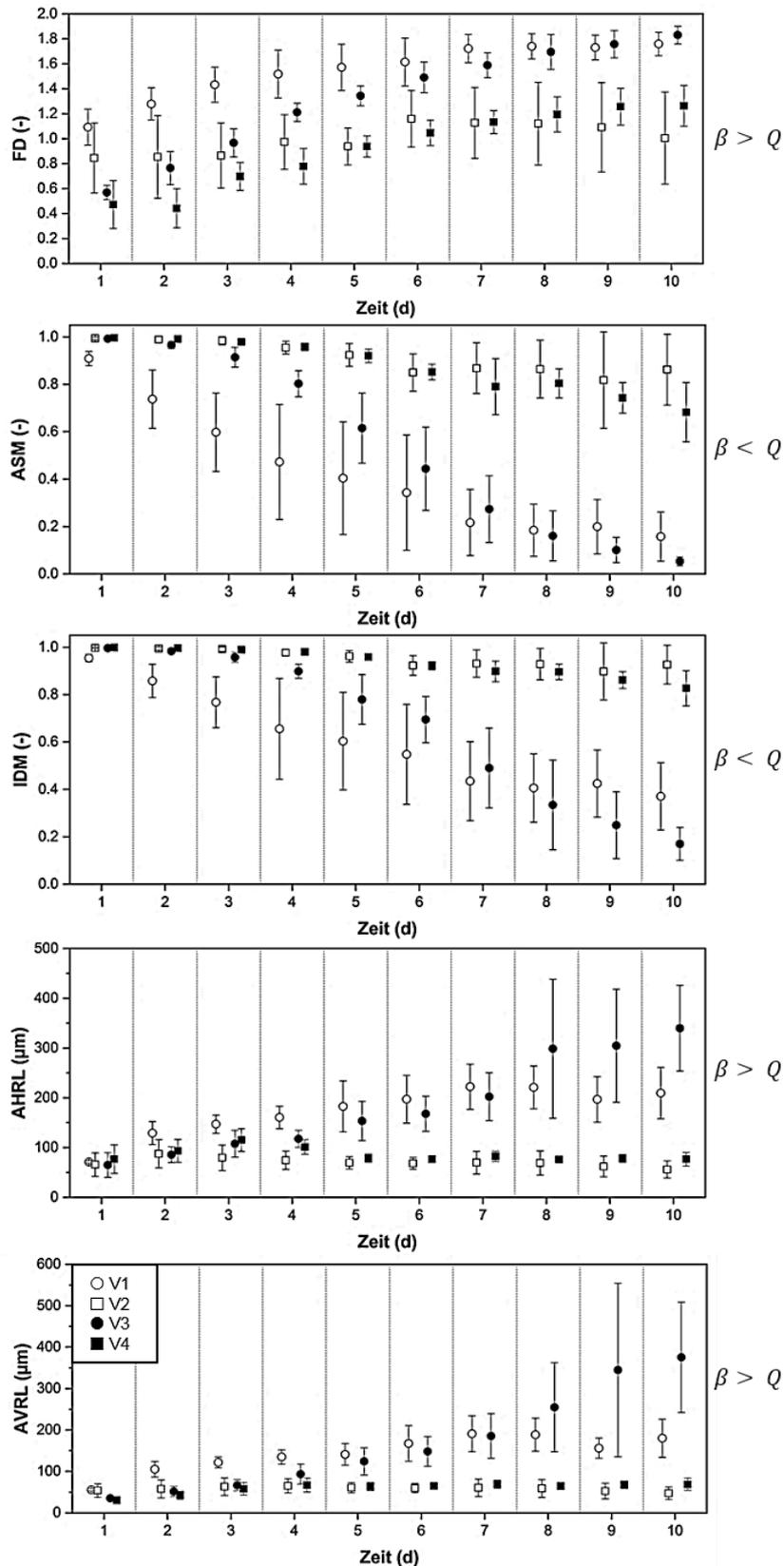


Abb. 18 Vergleich der strukturellen Biofilmparameer Fraktaldimension  $FD$ , zweites Flächenmoment  $ASM$ , Inverses Differenzmoment  $IDM$ , mittlere Kolonielänge  $AHRL$  und mittlere Koloniebreite  $AVRL$  im Wachstumsversuch über 10 Tage.  $N = 10$  Replikate;  $\circ \bullet \triangle \beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ;  $\square \blacksquare \triangle \beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ; geöffnete Datenpunkte  $\triangle Q = 1 \text{ mL/min}$ ; geschlossene Datenpunkte  $\triangle Q = 5 \text{ mL/min}$ . Die Tendenzen von  $\beta$  und  $Q$  sind gegeben.

Der Strukturparameter Fraktaldimension  $FD$  definiert die Irregularität der Biofilmmaggregate im Fließkanal. Je höher dabei die Werte, desto höher ist die Irregularität (s. Abb. 18). Auch hier war über die Versuchsdauer hinweg ein ähnlicher Trend ( $\beta > Q$ ) wie bei den Strukturparametern  $\bar{L}_F$ ,  $SC$  und  $TE$  in Abb. 17 zu erkennen. Dennoch waren die Unterschiede nicht so stark ausgeprägt wie in den Parametern von Abb. 17 und gerade zu Beginn der Experimente korrelierten eher  $V1$  und  $V2$  ( $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) sowie  $V3$  und  $V4$  ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ), was auf die genutzte Fließgeschwindigkeit zurück zu führen ist.

Das 2. Flächenmoment  $ASM$  und das Inverse Differenzmoment  $IDM$  nahmen über die Kultivierungsdauer hinweg für je  $V2$  und  $V4$  ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) um 10-30 % ab. Hingegen lagen für  $V1$  und  $V3$  ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) Werte von  $ASM = 0,05 \pm 0,01$  ( $V3$ ) bis zu  $IDM = 0,37 \pm 0,14$  ( $V1$ ) vor, entsprechend bestätigte sich eine Abnahme von bis zu 60-100 % von Tag 1 zu Tag 10. Dies bedeutet, dass sich sowohl die Richtung der Kolonien ( $ASM$ ) als auch die Distanz zwischen den Aggregaten ( $IDM$ ), vor allem für die Biofilme in  $V1$  und  $V3$  ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ), verstärkt geändert haben. Dies deutet darauf hin, dass die Biofilme in  $V1$  und  $V3$  zusätzlich zum Wachstum in die Länge ( $AHRL$ , s. Abb. 18) auch in die Breite ( $AVRL$ ) gewachsen und somit lateral gesehen größer geworden waren. Durch diese Entwicklung sank folglich auch die Distanz zwischen den Kolonien ( $IDM$ ). Die vier Parameter  $ASM$ ,  $IDM$ ,  $AHRL$  und  $AVRL$  stimmen in ihrer Aussage überein.

Erst die gemeinsame Betrachtung aller ausgewerteten Strukturparameter führt zu einer vollständigen Übersicht der Biofilmentwicklung über die Kultivierungsdauer von 10 Tagen. Generell konnten Unterschiede zwischen den Fließbedingungen  $Q$  (1 und 5 mL/min) schwer differenziert werden ( $V1$  und  $V3$ ;  $V2$  und  $V4$ ). Dennoch deuten die Strukturparameter  $ASM$  und  $IDM$  an, dass die Werte der Versuche mit der erhöhten Fließgeschwindigkeit ( $V3$ ,  $V4$ ) generell unter denen mit der niedrigen Fließgeschwindigkeit ( $V1$ ,  $V2$ ) lagen ( $V3 < V1$  und  $V4 < V2$ ). Die restlichen Strukturparameter (ausgenommen  $R_{SK}$  und  $R_{KU}$ ) zeigten eine entgegengesetzte Tendenz ( $V3 > V1$  und  $V4 > V2$ ). Somit lässt sich auch der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Biofilmmaggregate interpretieren.

Gezeigt wurde, dass sich die Biofilme bei  $Q = 5 \text{ mL/min}$  ( $V3$ ,  $V4$ ) zu Beginn aufgrund der erhöhten Wandschubspannung langsamer entwickelten, zum Ende des Experiments hin (Tage 8 bis 9) aber stabiler hinsichtlich  $\bar{L}_F$ ,  $SC$ ,  $ASM$  und  $IDM$  gegenüber denen mit  $Q = 1 \text{ mL/min}$  ( $V1$ ,  $V2$ ) waren. Hinsichtlich der unterschiedlichen Eisenkonzentration konnten eindeutigerer Unterschiede in allen Parametern ausgemacht werden (Korrelation von  $V1 + V3$  und  $V2 + V4$ ).

Zusammengefasst, entwickelten sich die Biofilme bei der erhöhten Eisenkonzentration schneller und bildeten allgemein größere Kolonien aus. Auch die Fließgeschwindigkeit hatte einen geringfügigeren Einfluss auf die Entwicklung der Biofilme. Erhöhte Geschwindigkeiten in  $V3$  ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) beeinflussten die Kolonien ebenso positiv, da hier sowohl höhere Biofilmdicken als auch vollständigerer und symmetrischer Fließkanalbedeckungen gegenüber der geringen Strömung in  $V1$  ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) bei reifen Biofilmen (Alter: ca. 8 bis 10 Tage) aufgezeigt werden konnten.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass  $\text{Fe}^{2+}$  einen positiven Einfluss auf die Biofilmmakkumulation ausübt. Innerhalb der Literatur konnten sich ähnliche Resultate finden. Bereits Körstgens *et al.* (2001)

konnten zeigen, dass bivalente Kationen wie Ca<sup>2+</sup> die Stabilität der Biofilmmatrix in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen steigern, was die erhöhte Adhäsion und eine vermehrte Biofilmmakkumulation in den Versuchen V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) bestätigt.<sup>17,18</sup> Auch in der Studie von Möhle *et al.* (2007) verhinderten erhöhte Konzentrationen von Eisensulfat im Nährstoffmedium ( $\beta = 10 \text{ mg/L}$ ) ein Abreißen mikrobieller Biofilme (Belebtschlamm) vom Substratum in einem Rotationsscheibenreaktor. Des Weiteren belegen die Autoren die Abhängigkeit der Biofilmdicke von der Substratkonzentration  $\beta$  und der Scherbeanspruchung an der Biofilmoberfläche. Dabei erzielte eine hohe Substratkonzentration (30 mg/L Glucose) mit niedriger Schergeschwindigkeit (3 Rotationen pro min) dicke Biofilme ( $\bar{L}_F = 412 \pm 129 \mu\text{m}$ ) und eine niedrige Substratkonzentration (5 mg/L Glucose) mit hoher Schergeschwindigkeit (9 Rotationen pro min) dünne Biofilme ( $\bar{L}_F = 103 \pm 10 \mu\text{m}$ ).<sup>18</sup>

Ein ähnlicher Zusammenhang stellte sich bei den hier gezeigten Experimenten ein, bei denen dickere und „bauschiebige“ Biofilme (s. Abb. 16) bei hoher Eisenkonzentration und niedriger Fließgeschwindigkeit (V1) auftraten und dünnere Biofilme bei hoher Eisenkonzentration und hoher Fließgeschwindigkeit (V3). Weiterhin wurde in Studien mit Eisenkomplexbildnern herausgefunden, dass eine minimale Konzentration von freiem Eisen für die Bildung von *P. aeruginosa* Biofilmen in Fließzellen notwendig ist.<sup>21,24,50</sup> Das Eisen reguliert dabei die Oberflächenbeweglichkeit der Bakterien und fördert die Biofilmbildung erneut durch Stabilisierung der EPS-Matrix, die hauptsächlich aus Polysacchariden besteht.<sup>20,23,25,26</sup>

Dennoch zeigen diese Studien auch, dass zu hohe Eisenkonzentrationen die Biofilmbildung inhibieren, da eine Freisetzung von DNA aus toten *P. aeruginosa* Zellen unterdrückt wird. Diese Freisetzung stellt dabei eine wichtige strukturelle Komponente der Biofilme dar.<sup>23,24</sup> Bezüglich einer optimalen Konzentrationsangabe von Eisen im Medium unterscheiden sich die Studien dennoch stark, was auf die gewählten Reaktorsysteme zurück zu führen ist. Während Berlutti *et al.* (2005) „hohe“ Eisenkonzentrationen von 10 - 100  $\mu\text{M}$  als positiv bezüglich Aggregation und Biofilmbildung in unterschiedlichen Reaktorsystemen und -tests definieren, berichten Yang *et al.* (2007) von einer Inhibition des Biofilmwachstums in Mikrotiterplatten sowie Fließzellen in diesem Konzentrationsbereich.<sup>24,26</sup>

Diese Inhibition der Biofilmbildung durch hohe Eisenkonzentrationen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Vermutlich wirkt nicht für jedes bakterielle Biofilmsystem die Zugabe von Eisen bzw. Fe<sup>2+</sup> stimulierend bzw. sind für unterschiedliche Arten differenzielle Eisenmengen für die Differenzierung zum Biofilm von Bedeutung. Jedoch bestätigt Weinberg (2004), dass Zink, Mangan und Eisen Schlüsselfunktionen in der biochemischen als auch morphologischen Konversion von Pro- und Eukaryoten besitzen.<sup>20</sup> Gerade in Erdböden kommen hohe Mengen an Eisen vor, was den positiven Einfluss auf das, auch hier verwendete, Bodenbakterium *Bacillus subtilis* manifestiert.<sup>49,85,86</sup>

Auch der Einfluss der hydrodynamischen Bedingungen auf die Biofilme ist weitreichend bekannt und in einigen Studien dokumentiert.<sup>3-8,87,88</sup> Durch diese Studien kann die Ausbildung von Streamern, d. h. ein vermehrtes Wachstum in die Länge (AHRL), vor allem für die Biofilme in V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ), belegt werden. Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften sowie die Stärke des Zellverbands charakterisieren den positiven Einfluss erhöhter hydrodynamischer Bedingungen weiterhin.<sup>3,53,89-93</sup>

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus V1-V4 in Abb. 17 und 18 wurden mit den Strukturparametern zweifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Diese Analysen stellen mit statistischer Sicherheit fest, ob und in welchem Ausmaß die folgenden Bedingungen untereinander korrelieren bzw. Grund für einen Unterschied in den Strukturparametern darstellen. Dazu wurden drei Hypothesen mit folgender Prädikation aufgestellt:

- H<sub>1</sub>: Keine Unterschiede durch verschiedene Fließgeschwindigkeiten
- H<sub>2</sub>: Keine Unterschiede durch verschiedene Eisenkonzentrationen
- H<sub>3</sub>: Keine Korrelation zwischen den beiden Parametern

Dies ist vor allem für den Einfluss des Volumenstroms  $Q$  von Bedeutung, da die Versuche mit gleicher Eisenkonzentration (V1 + V3 und V2 + V4) jeweils ähnliche Werte und zudem hohe, sich überlagernde Standardabweichungen in Abb. 17 und 18 aufwiesen.

Generell beweist ein  $p$ -Wert über dem Signifikanzniveau  $\alpha_{0,01}$ , dass die Hypothese angenommen und keine durch den vorliegenden Parameter hervorgerufenen Differenzen in den Strukturparametern festgelegt werden können. Dies zeigte sowohl die ANOVA als auch der Scheirer-Ray-Hare Test für alle Strukturparameter in der H1 (s. Tab. 7).

**Tab. 7** Zweifaktorielle Varianzanalyse der ermittelten Strukturparameter.  $p < \alpha$  entspricht einer Ablehnung der Hypothesen. H1: kein Unterschied zwischen den Volumenströmen  $Q$ ; H2: kein Unterschied durch variiertes  $\beta$  (Fe<sup>2+</sup>); H3: keine Korrelation zwischen den beiden Parametern  $Q$  und  $\beta$ . Rot markierte Werte zeigen zum besseren Verständnis Datenpunkte nahe dem Signifikanzniveau  $\alpha$  an.

<b>Zweifaktorielle Varianzanalyse (<math>\alpha = 0,01</math>)</b>			
	<i>ANOVA</i>		
<b>Strukturparameter</b>	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>
$\bar{L}_F$	0,45	0,90·10 <sup>-4</sup>	0,24
$SC$	0,84	0,10·10 <sup>-4</sup>	0,57
$TE$	0,35	0,30·10 <sup>-5</sup>	0,24
$R_{SK}$	<b>0,07</b>	0,18·10 <sup>-2</sup>	0,61
$FD$	<b>0,11</b>	0,12·10 <sup>-4</sup>	0,43
$ASM$	0,63	0,27·10 <sup>-5</sup>	0,32
$IDM$	0,79	0,97·10 <sup>-5</sup>	0,55
	<i>Scheirer-Ray-Hare</i>		
<b>Strukturparameter</b>	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>
$R_{KU}$	0,16	0,56·10 <sup>-5</sup>	0,21
$AHRL$	0,17	0,12·10 <sup>-6</sup>	<b>0,04</b>
$AVRL$	0,78	0,17·10 <sup>-4</sup>	0,21

Mit einem Minimalwert des Schiefeparameters  $R_{SK}$  ( $p = 0,07 > \alpha$ ) bis zu einem Höchstwert der Fließkanalbedeckung  $SC$  ( $p = 0,84 > \alpha$ ) gab es keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen dem niedrigen (1 mL/min) und dem hohen Volumenstrom  $Q$  (5 mL/min).

Bei Betrachtung der Schiefe  $R_{SK}$  in Abb. 17 wird ersichtlich, dass der Parameter deshalb den in der H1 niedrigsten  $p$ -Wert zeigte, da hier keine Überschneidungen der Standardabweichungen von V1 + V3 sowie V2 + V4 zum Versuchsende hin vorlagen. Dies belegt, dass der Volumenstrom geringfügig Einfluss auf die Biofilme hinsichtlich  $R_{SK}$  und der Fraktaldimension  $FD$  nimmt. Im Vergleich zum Einfluss von  $\text{Fe}^{2+}$  auf die Biofilmaggregate, konnte dies jedoch nicht mit statistischer Signifikanz bestätigt werden (vgl. Tab. 7 H2). Die Fließkanalbedeckung  $SC$  zeigt mit den Höchstwerten der ANOVA in der H1, was bereits aus Abb. 17 erkennbar wurde: die hohen Standardabweichungen innerhalb der Experimente mit gleichen Eisenkonzentrationen erschweren eine statistische Verifizierung der Einflussnahme von  $Q$  auf die Biofilme. Die  $p$ -Werte der H2 lagen im Gegensatz dazu weit unter dem Signifikanzniveau  $\alpha$ . Aus diesem Grund kann bestätigt werden, dass  $\text{Fe}^{2+}$  die Struktur mit statistischer Signifikanz beeinflusst. Im Vergleich mit Abb. 17 hat das  $\text{Fe}^{2+}$  einen positiven Effekt auf die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  und die Fließkanalbedeckung  $SC$ , also grundsätzlich auf die Biofilmmakkumulation.

Dagegen haben die Diagramme der Schiefe der Höhenverteilung  $R_{SK}$  und der Wölbung  $R_{KU}$  die geringsten Unterschiede zwischen den Bedingungen zum Versuchsende aufgezeigt. Dies wird durch die ANOVA mit dem an  $\alpha$  nahe gelegenen Wert ( $p = 0,18 \cdot 10^{-2} < \alpha$ ) für  $R_{SK}$  bestätigt. Der Wert der Wölbung  $R_{KU}$  hingegen liegt weit entfernt vom Signifikanzniveau ( $p = 0,56 \cdot 10^{-5} < \alpha$ ), obwohl er dem der Schiefe nach dem Verlauf in Abb. 17 ähneln sollte. Die Ursache könnte in der Nutzung des Scheirer-Ray-Hare-Tests liegen, der allgemein als ungenauer gegenüber der ANOVA definiert wird.<sup>94</sup>

Die Ergebnisse der H3 wiesen erneut, wie bei der H1 offensichtlich,  $p$ -Werte über dem Signifikanzniveau  $\alpha$  auf. Dies bestätigt die Annahme, dass der Einfluss des Volumenstroms  $Q$  und die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  nicht miteinander korrelieren. Ausschließlich der Wert der  $AHRL$  liegt relativ nahe am Signifikanzniveau  $\alpha$  ( $p = 0,04 > \alpha$ ). Eine Begründung findet sich in der sich nicht ändernden Fließrichtung im Kanal: die Aggregate wachsen bei ausreichender Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) bevorzugt in  $x$ -Richtung, da der Fluss unidirektional ist.

Die Betrachtung der Fluid-Struktur Interaktion manifestiert die Notwendigkeit der Analyse einer Vielzahl der Strukturparameter, da die Auswertung eines Parameters (möglicherweise) nicht genügt, um Unterschiede bzw. Abhängigkeiten oder auch Korrelationen festzustellen (z. B.  $R_{SK}$  und  $R_{KU}$ ).<sup>95</sup>

### Zwischenfazit

Mittels Wachstumsversuchen unter der Nutzung der Monitoringplattform konnte demonstriert werden, dass Eisen (hier  $\text{Fe}^{2+}$ ) einen Effekt auf die Biofilme ausübt. Biofilme, angewachsen mit einer erhöhten Eisenkonzentration, konnten schneller an Volumen zunehmen und waren zum Ende des Versuchs hin stabiler. Trotz hoher Standardabweichungen in den Strukturparametern konnte dieser Effekt des  $\text{Fe}^{2+}$  mittels statistischer Analysen manifestiert werden. Bezüglich der Auswirkung des Volumenstroms  $Q$ , scheint sich diese bei ausreichender Zugabe an  $\text{Fe}^{2+}$  positiv auf die Stabilität auszuwirken ( $0,25 \text{ mg/L} \leq \beta_{\text{Fe}^{2+}} \leq 2,5 \text{ mg/L}$ ).

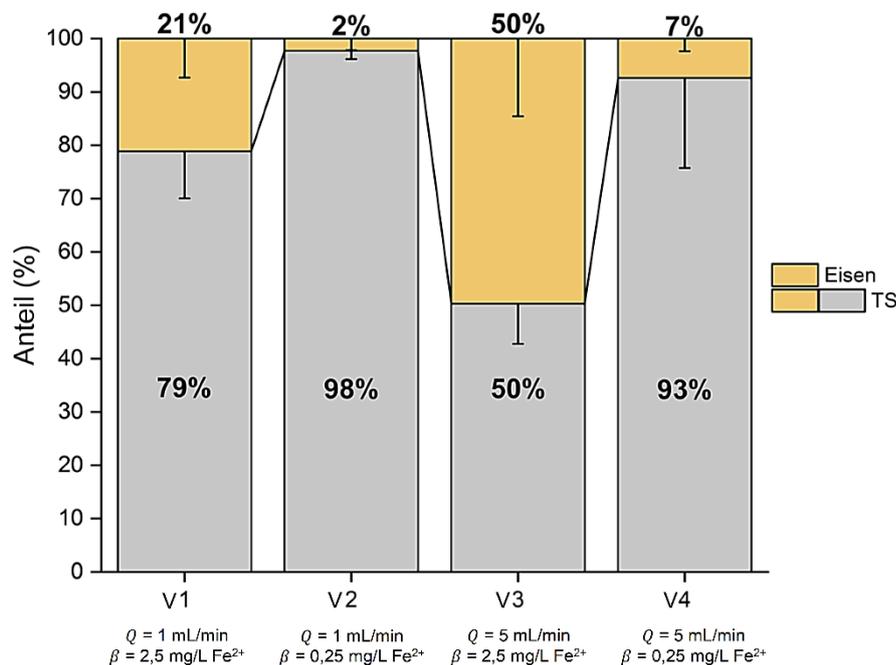
Die Wachstumsversuche beweisen somit:

- eine genutzte Probenanzahl von  $N = 10$  Replikaten gewährleistet die Unterscheidung der Biofilme unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen
- eine **statistische Verifizierung** der Ergebnisse mittels ANOVA und Scheirer-Ray-Hare-Test
- einen **positiven Effekt von  $\text{Fe}^{2+}$**  anhand von ausgeprägten Biofilmmakкумуляtionen und -entwicklungen
- einen positiven Effekt der erhöhten Fließgeschwindigkeit bei ausreichend vorhandenem  $\text{Fe}^{2+}$  bezogen auf die Biofilmdicke, Fließkanalbedeckung sowie Stabilität der Biofilme
- dass eine Biofilmkontrolle demnach möglich ist (Produktion/wasserführende Systeme)

## 4.2 Steigende Akkumulation von Eisen im Biofilm

Da die OCT ausschließlich Aufnahmen in Form von Grauwerten abbildet, wurden CLSM-Aufnahmen generiert, um die Biofilme als solche zunächst zu identifizieren. Mittels CLSM wurde das Vorkommen von DNA und EPS in den FZ bestätigt und die alleinige Ablagerung von Eisen bzw.  $\text{Fe}^{2+}$ -Präzipitaten widerlegt (s. Anhang D).

Um eine Übersicht über die Akkumulation und den Einlagerungsverlauf von Eisen in der Biofilmmatrix zu erhalten, wurde mittels ICP-OES der Eisengehalt bezogen zur Biofilmmasse ermittelt (s. Abb. 19).



**Abb. 19** Im Biofilm eingelagertes Eisen an Tag 10 der Wachstumsversuche. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen von  $N = 3$  Fließzellen für die Berechnung des Gesamt-Eisens und  $N = 2$  Fließzellen für die Berechnung der Trockensubstanz (TS).

Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich das  $\text{Fe}^{2+}$  in der Biofilmmatrix einlagert und nicht wieder mit dem durchlaufenden Nährmedium ausgespült wird. Dies konnte durch die gravimetrische Bestimmung (siehe Abb. 19) bestätigt werden. Dabei betrug der Anteil des Gesamteisens im Biofilm unter der

Versuchsbedingung V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) ca. 50 % der Biofilmmasse, gefolgt von der Einlagerung des Eisens in den Biofilmen in V1 (21 % Eisen;  $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ). In den Versuchen mit den niedrigen Eisenkonzentrationen (V2, V4) wurde entsprechend wenig Eisen vom Biofilm inkorporiert. In den Biofilmen unter V2 ( $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) wurden nur ca. 2 % des Eisens an Tag 10 eingelagert. Dies entsprach  $\beta = 0,23 \pm 0,22 \text{ mg Eisen}$ , obwohl über die Kultivierungsdauer hinweg mindestens 3,3 mg Eisen den Fließkanal passiert hatten. Auch in V4 ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) wurde mit 7 % vergleichsweise wenig Eisen akkumuliert. Da die Biofilme in V4 wiederum höhere Werte als die in V2 aufwiesen, wird davon ausgegangen, dass die interne Biofilmstruktur (Dichte, Diffusion) und die durchgeflossene Menge der Eisenionen (Beladung) eine Auswirkung auf das Maß der Akkumulation im Biofilm haben.

Da am Ende der Experimente jeweils weniger Eisen integriert als im Versuch zugegeben wurde, wird abgeleitet, dass sich das Eisen in der FZ nicht nur ablagert, sondern erst mit der Akkumulation von Biofilmmasse in den FZ verbleibt und in die Matrix eingebaut wird.

Um dies zu beurteilen, wurde der Akkumulationsverlauf von Eisen ermittelt. Dieser ist in Abb. 20 abgebildet.

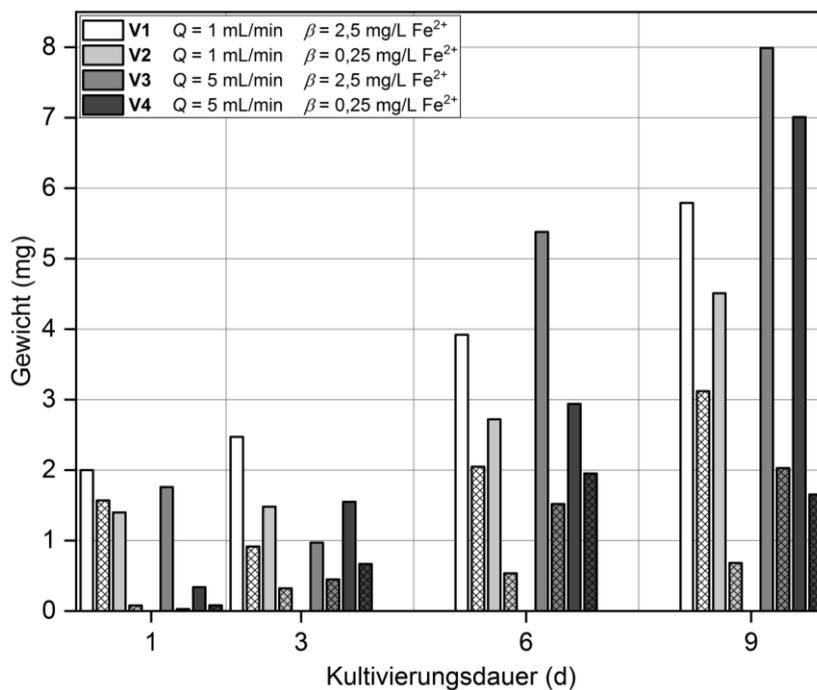


Abb. 20 Akkumulationsverlauf von Eisen im Biofilm über eine Kultivierungsdauer von 10 Tagen.  $N = 1$ . Leere Zellen definieren das Gewicht der Biofilme, schraffierte Zellen das Gewicht des Eisens.

Unter allen Versuchsbedingungen war über die Zeit hinweg sowohl eine kontinuierliche Akkumulation von Biofilmmasse als auch eine Einlagerung von Eisen in der Biofilmmatrix feststellbar. Deutlich wurde, dass bereits an Tag 1 bis zu 2 mg Biofilmmasse produziert wurden. Dabei wiesen die Biofilmaggregate unter V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) die höchste Masse auf, gefolgt von V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) > V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) > V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ).

Diese lineare Akkumulationsrate ist vergleichbar mit den Wachstumskurven in Abb. 17  $\bar{L}_F$  und  $SC$ . Der Grund für die bereits erhöhte Biofilmmasse liegt voraussichtlich an Rückständen vom Inokulat.

An Tag 3 hatte das Gewicht des Biofilms in V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) um 0,47 mg zugenommen, jedoch schien das Eisen zwischen Tag 1 und 3 ausgespült worden zu sein, da die Werte hier um ca. 0,67 mg abnahmen. Beachtet werden muss, dass jeder zweite Datenpunkt je einer individuellen, parallel geschalteten FZ entsprach (je Versuch V1-V4 wurden vier FZ aufgebaut: die erste wurde an Tag 1 entnommen, die zweite an Tag 3, die dritte an Tag 6 und die vierte an Tag 9). Aufgrund dessen kann es zu geringfügigen Abweichungen in der angenommenen Steigung der Wachstumskurve gekommen sein. Die Kolonien in V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) wiesen wiederum eine Gewichtszunahme von bis zu 1,21 mg an Tag 3 auf, lagen dennoch unter dem Gewicht in V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit 2,47 mg.

Nach drei weiteren Tagen hatte das Gewicht des Biofilms in V1 (Tag 6,  $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) im Vergleich zu Tag 1 um das Doppelte zugenommen, ähnlich in V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ). Die Biofilme in V3 und V4 ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) wiesen dabei mit bis zu + 230 % den höchsten Zuwachs an Biofilmmasse auf. Die Inkorporation von Eisen fiel geringfügiger aus, eine deutliche Steigung ist dennoch offensichtlich. Tag 9 zeigte die höchsten Akkumulationsraten an Biofilmmasse. Die Ergebnisse aus dem Akkumulationsverlauf von Eisen und Biofilm an Tag 9 in Abb. 20 korrelieren nicht exakt mit den Ergebnissen aus Abb. 19 an Tag 10. Hypothetisch sollte die Akkumulation von Eisen in V1 21 %, in V2 2 %, in V3 50 % und in V4 93 % entsprechen. Dennoch ist eine ähnliche Tendenz erkennbar.

Gründe für die Differenzen liegen in den unterschiedlichen Kultiviertagen zwischen den Diagrammen (Abb. 19 Tag 10; Abb. 20 bis zu Tag 9) und in der Einzelanalyse des Akkumulationsverlaufs ohne Replikate. Eine weitere Ursache für die hohen Biofilmgewichte in V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) in Abb. 21 im Vergleich zu der Entwicklung der Strukturparameter  $\bar{L}_F$  und  $SC$  in Abb. 17 liegt in der vollständigen gravimetrischen Bestimmung der vorhandenen Materie im gesamten Fließkanal. Während die OCT-Aufnahmen zur Analyse der Fluid-Struktur-Interaktion die Mitte des Kanals abbildeten, wurden bei der Gewichtsbestimmung auch die Ablagerungen in den Ecken am Fließkanalein- und ausgang mit einkalkuliert. Diese Begründungen rechtfertigen erneut, dass eine Mindestanzahl an Replikaten durchzuführen sowie eine standardisierte Extraktion der Biofilmmasse aus den Fließzellen anzuwenden ist.

Trotz weniger Diskrepanzen konnte durch die OCT-Aufnahmen mit  $N = 10$  Biofilmreplikaten der Zuwachs von Biofilmvolumen und durch Analyse mittels ICP-OES ( $N = 1-3$ ) die zunehmende Eiseneinlagerung in die Biofilmmatrix verifiziert werden.

Kang & Kirienko (2018) bestätigen sowohl die Aufnahme des Eisens durch sogenannte Siderophoren (Eisenträger) als auch die Speicherung von Eisen in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen.<sup>96</sup> Auch das hier verwendete Bakterium *Bacillus subtilis* nutzt die Bildung von Biofilmen und die Produktion von Siderophoren, um Eisen (Fe) aus dem Medium aufzunehmen und ein normales Wachstum zu gewährleisten, wie Rizzi *et al.* (2019) berichten. Dabei definieren sie Eisen (Fe) als das wichtigste Metall in der Biologie.<sup>49</sup> Oh *et al.* (2018) fanden weiterhin heraus, dass Eisen die Biofilmformation durch oxidativen Stress fördert und die EPS-Produktion in *Campylobacter jejuni* durch Eisen angeregt wird. So förderte eine Eisenzugabe in deren Studien signifikant die Ausbildung von Mikrokolonien im frühen Stadium sowie die

Differenzierung zu reifen Biofilmstrukturen<sup>97</sup>, was hier sowohl durch die Analyse der OCT-Daten als auch durch die gravimetrische Bestimmung von Eisengehalt und Biofilmmasse belegt werden kann. Dabei sollen Komponenten der Biofilmmatrix die Regulation zwischen essenzieller und überschüssiger Eisenaufnahme (toxische ROS-Produktion) unterstützen.<sup>96,97</sup>

Für die Ermittlung des Einflusses von  $\text{Fe}^{2+}$  auf die Biofilmmatrix bzw. Stabilität der Biofilme war es demnach notwendig, dessen Derivate und Struktur zu untersuchen, um die Interaktion mit der Biofilmstruktur genauer zu definieren. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.3 beschrieben.

### 4.3 Einlagerung in Form von Eisenoxidhydroxiden

Mittels der ATR-IR-Spektroskopie wurden die vorliegenden Moleküle und chemischen Verbindungen innerhalb der FZ von V1-V4 (je  $N=1$ ) determiniert. Abbildung 21 stellt die gemessenen Absorptionen bei den bestimmten Wellenzahlen grafisch dar.

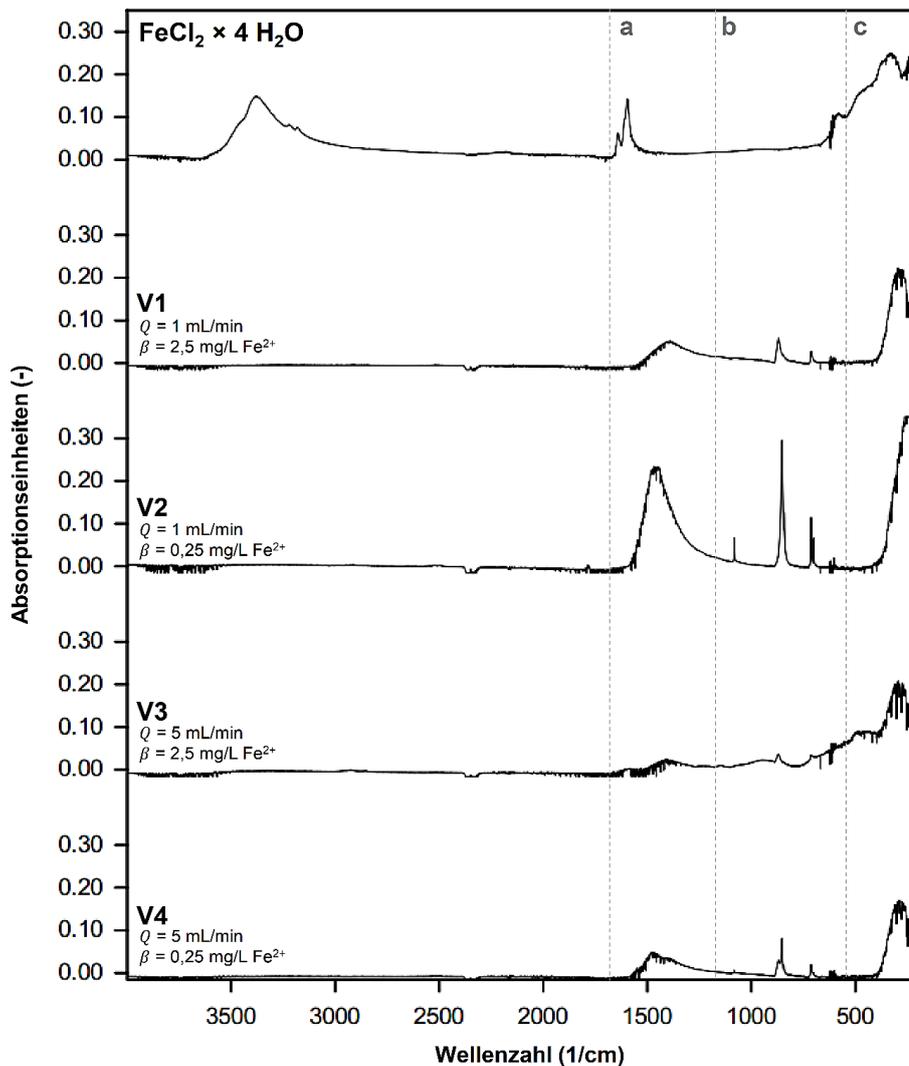


Abb. 21 ATR-IR-spektroskopische Aufnahmen der Biofilme aus den Versuchen 1-4 an Tag 10. Die Teilbereiche a)-c) markieren charakteristische Wellenzahl-Bereiche ( $1500\text{-}250 \text{ cm}^{-1}$ ) mit nahezu identischer Lage an Absorptionen zwischen den Versuchen.

In allen Versuchsbedingungen V1-V4 diente Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat als Spurenelement zur Ermittlung des Eiseneffekts, weshalb dieses zur Signalfindung im ATR genutzt wurde. Erkennbar war bei der Referenzchemikalie die Absorption bei einer Wellenzahl zwischen  $3000$  und  $3500\text{ cm}^{-1}$ , die bei den Messungen der Biofilme (V1-V4) ausblieb. Bei Betrachtung des Bereichs a) von  $1700$ - $1200\text{ cm}^{-1}$  traten hingegen für alle vier IR-Analysen Absorptionsbanden auf, die sich in einem Bereich um  $1500\text{ cm}^{-1}$  befanden. Dabei bestand die Bande beim Eisenchlorid im Gegensatz zu den Banden aus V1-V4 aus zwei kleineren Banden. Auch die Intensitäten variierten zwischen den Experimenten, da es aufgrund der Funktionsweise der ATR-IR-Spektroskopie zu Schwankungen kommen kann.<sup>98</sup> In Bereich b) zwischen  $1200$ - $600\text{ cm}^{-1}$  traten Absorptionen bei nahezu identischen Wellenzahlen auf, ausgenommen beim  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{ H}_2\text{O}$ , welches allgemein Richtung links verzerrt erschien (s. auch Bereich c)). Der Wellenzahlenbereich c) ab  $500\text{ cm}^{-1}$  wies vor allem für V1, V3 und V4 charakteristische Absorptionen auf. Für das Eisenhydrat wurde eine maßgeblich flachgipflige Bande illustriert, V2 ( $\beta = 0,25\text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1\text{ mL/min}$ ) dagegen stellte die steilste Bande in Bereich c) dar.

Allen Messungen gemeinsam war die Detektion einer Absorption im negativen Bereich bei einer Wellenzahl von ca.  $2300\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bande determinierte das Vorkommen von gelöstem  $\text{CO}_2$  aus der Raumluft.<sup>98</sup>

Eine detaillierte Übersicht bezüglich der Absorptionen bei exakter Wellenzahl und deren Charakterisierung findet sich in Tab. 8.

Tab. 8 Übersicht der aufgetretenen Absorptionen bei der ATR-FTIR. RC = Referenzchemikalie FeCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O; stretch = Dehnung; bend = Beugung; shift = Verschiebung.

	Bande (1/cm)	Mögliche Zuordnung	Aufgetreten u. a. bei (Literatur)	Literaturbande (1/cm)	Quelle
RC	3378	OH-stretch	Fe-OH	3378 3369	Wei <i>et al.</i> (2012) <sup>99</sup> Wan Nor <i>et al.</i> (2018) <sup>100</sup>
RC	1641	OH-stretch	Fe-OH FeOOH	1660 1630	Mei <i>et al.</i> (2015) <sup>101</sup> Dutcher <i>et al.</i> (2011) <sup>102</sup>
RC	1595	OH-shift	Romanit	1595	Litescu <i>et al.</i> (2012) <sup>103</sup>
V3	1585	COO-Fe	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	1587	Wei <i>et al.</i> (2011)
V4	1479	CH <sub>2</sub>		1479	Unger (2009) <sup>104</sup>
V2	1468	CH <sub>2</sub>		1466	Litescu <i>et al.</i> (2012)
V3	1416	COO-Fe	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	1393	Wei <i>et al.</i> (2012)
V1	1392	-CH=CH-	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	1412 1384	Wei <i>et al.</i> (2012)
V2	1083	P-O-stretch C-O-C-stretch Fe-OH-bend C-O	Eisenoxid-Nanopartikel  Eisen(III)phthalocyanin	900-1200 1080 1076 1050- 1100	Benyettou <i>et al.</i> (2012) <sup>105</sup> Filip <i>et al.</i> (2004) <sup>106</sup>  Luther & Günzler (1955) <sup>107</sup>
V4	871	OH-bend		865-894	Namduri & Nasrazadani (2008) <sup>108</sup>
V1	870	OH...O	α-FeOOH	883	Mei <i>et al.</i> (2015)
V3	870			960-870	Salzer <i>et al.</i> <sup>109</sup>
		Fe-O-Fe	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	863	Ulfa & Ulfa (2019) <sup>110</sup>
V2	853	OH-bend	β-FeOOH	847	Mei <i>et al.</i> (2015)
V4	853	-H- C-N		850 830-920	Luther & Günzler (1955)
V3	716	C=O		750-620	Litescu <i>et al.</i> (2012)
V4	714	C-C=O			
V1	713				
V2	713				
V2	700	C-H NO <sub>2</sub> OH-bend	β-FeOOH	900-700 680-740 696	Luther & Günzler (1955)  Mei <i>et al.</i> (2015)
RC	582	Fe-O	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	583 580 577	Sodipo & Azlan (2015) <sup>111</sup> Wei <i>et al.</i> (2011) Hwang <i>et al.</i> (2014) <sup>112</sup>
V3	493	Fe-O-stretch	α-FeOOH	499	Malathi <i>et al.</i> (2017) <sup>113</sup>
RC	477	Fe-F	Eisen(III)phthalocyanin	475	Kalz & Homborg (1983) <sup>114</sup>
V1	297	Fe-Cl	Eisen(III)phthalocyanin	303	Kalz & Homborg (1983)
V3	286				
V4	286				
V2	236	Fe-Br	Eisen(III)phthalocyanin	221	Kalz & Homborg (1983)
V3	217				
RC	203	Fe-I	Eisen(III)phthalocyanin	193	Kalz & Homborg (1983)
V1	203				
V2	203				
V4	203				

Die Messungen der einzelnen Biofilme aus den Versuchen V1-V4 wiesen unterschiedliche Banden auf. Dabei war zu erkennen, dass sich die Banden der Versuche V1 + V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) und wiederum der Versuche V2 + V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) ähneln. Alle analysierten Biofilme wiesen sowohl Deformationen in den OH-Bindungen als auch Schwingungen der Fe-Banden auf. Des Weiteren waren auch Vibrationen unterschiedlichster Kohlenstoffverbindungen (C-H, C-O, C=O, COO-Fe, CH<sub>2</sub>) vorhanden. Da Proteine und Polysaccharide zusätzlich in einem Bereich von 1200-1700 und 900-1150 cm<sup>-1</sup> absorbieren, kann zudem das Vorkommen von EPS in allen Fließzellen (V1-V4) belegt werden.<sup>115</sup>

Bei genauerer Betrachtung war zu sehen, dass auch die Proben Beugungen der Hydroxylgruppe (OH-) aufwiesen, die im Vergleich zur Referenzchemikalie (Bereich a)) im Bereich b) lagen (870, 853 und 700 cm<sup>-1</sup>).

Generell deuteten die Banden darauf hin, dass das Fe<sup>2+</sup> in Form von Eisenoxidhydroxiden (x-FeOOH) auftritt bzw. im Biofilm eingelagert wurde. Hier konnte zunächst beobachtet werden, dass V1 + V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) sowie V2 + V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) erneut miteinander gruppierten.

Die Schwingungen der Hydroxylgruppen (OH...O) der Biofilme in V1 und V3 traten bei einer Wellenzahl von 870 cm<sup>-1</sup> auf. Absorptionen in diesem Bereich finden sich laut Literatur auch bei  $\alpha$ -FeOOH.<sup>101,109</sup> Dagegen fanden sich die OH-Beugungen bei V2 und V4 bei einer Wellenzahl von 853 cm<sup>-1</sup> und für V2 zusätzlich bei 700 cm<sup>-1</sup>, was sich mit den Schwingungen der Hydroxylgruppen von  $\beta$ -FeOOH deckt.<sup>101,107</sup>

Auch bei den Fe-Schwingungen machte sich ein ähnlicher Trend bemerkbar. Hier wiesen V1 und V3 bei 1585 und 1392 cm<sup>-1</sup> Vibrationen auf, die COO-Fe-Verbindungen zugeordnet werden können.<sup>99</sup> Der Biofilm in V3 zeigte zusätzlich eine Streckung der Fe-O-Molekülgruppe bei 493 cm<sup>-1</sup>, die auch beim  $\alpha$ -FeOOH auftritt.<sup>113</sup> V2 dagegen wies lediglich eine Absorption in Nähe der Fe-OH-Beugung auf (1083 cm<sup>-1</sup>), die schon im Jahr 1955 durch Luther & Günzler beim Eisen(III)phthalocyanin beschrieben wurde.<sup>107</sup> Bei den Biofilmen in V1, V3 und V4 wiederum konnte das Vorkommen von Fe-O-Fe-Bindungen nachgewiesen werden, welche sich jedoch mit den Banden der OH-Beugung bzw. OH...O-Verbindungen (870 cm<sup>-1</sup>) überlagerten.<sup>109,110</sup>

Banden der Hydroxyl(OH-)beugung im FTIR bei  $\gamma$ -FeOOH und  $\delta$ -FeOOH treten laut Mei *et al.* (2015) bei 1020 und 750 cm<sup>-1</sup> sowie bei 1120 und 975 cm<sup>-1</sup> auf.<sup>101</sup>

Auf den Bereich von 400-100 cm<sup>-1</sup> wird in der Literatur kaum eingegangen, da die Untergrundabsorption dort meist zu hoch ist.<sup>114</sup> Kalz & Homborg beschrieben in diesem niederwelligen Bereich im Jahr 1983 das generelle Auftreten von Ringdeformations-Schwingungen und asymmetrischen Fe-N-Schwingungen.<sup>114</sup> Weiterhin treten dort unterschiedlichste Valenzschwingungen von Fe-X-Gruppen auf, die in der Tabelle 8 ausgewiesen sind. Die Fe-F-Bande bei 477 cm<sup>-1</sup> bei der Referenzchemikalie hat möglicherweise ihren Grund in der Auflösung mit Leitungswasser (Karlsruher Leitungswasser: Fluoridgehalt = 0,3 mg/L, s. Anhang B). Auch die weiteren Fe-X-Bindungen können aufgrund der Versorgung des Biofilms mit Nährstoff versetztem Leitungswasser zustande gekommen sein.

Generell ist die Identifizierung der eingelagerten Eisenverbindungen in die Biofilmmatrix komplex. In Tab.8 konnte anhand der Banden nachgewiesen werden, dass die Versuche V1 mit V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) sowie V2 mit V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) korrelieren, was mit den Ergebnissen der

Wachstumsversuche in Abb. 17 und 18 übereinstimmt. Allgemein sollte dabei die Intensität der Absorption nicht beachtet werden, da beim ATR-FTIR hohe Schwankungen, je nach Menge oder Dichte der pulverisierten Probe, auftreten können.

Laut Literatur findet die Einlagerung von Fe in den Biofilm hauptsächlich über polymorphe Eisenoxidhydroxide (x-FeOOH) statt.<sup>116-119</sup> Dies wurde auch in Wagner (2011) und Ivleva *et al.* (2010) gezeigt, wobei die analysierten Abwasser-Biofilme geringste Mengen von Eisen in Form von  $\gamma$ -FeOOH einlagerten.<sup>69,120</sup> Laut Wagner (2011) und Möhle *et al.* (2007) sorgt die Vernetzung von Eisen mit der Biofilmmatrix für eine erhöhte Stabilität der Biofilme.<sup>18,69</sup>

Nach den aktuellen Analysen spricht für V1 und V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) die Inkorporation von  $\alpha$ -FeOOH in die Biofilme und für V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) die Einlagerung von  $\beta$ -FeOOH. Möglicherweise sind die x-FeOOH-Modifikationen konzentrationsabhängig und auch abhängig vom bakteriellen Organismus bzw. dessen (Zell-)Oberfläche, da die Banden, wie auch in Mei *et al.* (2015) gezeigt, deutlich voneinander entfernt liegen.<sup>101</sup>

Da aber auch andere Eisenformen wie Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Hämatit/Maghemit) oder Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Magnetit) möglich sind, erfolgt die genauere Identifikation der Eisenverbindungen zusätzlich über deren charakteristische Färbung (s. Tab. 9).

**Tab. 9 Am häufigsten vertretene Eisenverbindungen und deren charakteristische Farbe. \*Gunawardana *et al.* (2011)<sup>121</sup>; \*\*Anthony *et al.* (2001)<sup>122</sup>.**

Formel*	Name*	Farbe**
$\alpha$ -FeOOH	Goethit	schwärzlich braun; gelblich- bis rötlich-braun in massereichen Aggregationen
$\beta$ -FeOOH	Akaganeit	gelblich-braun
$\beta$ -Fe <sup>3+</sup> O(OH,Cl)*	Lepidokrokit	rubinrot bis rötlich-braun
$\gamma$ -FeOOH	Feroxyhit	braun, gelb-braun
$\delta$ -FeOOH	Hämatit	stahlgrau, eventuell schimmernde Schatten, matt bis hellrot
$\alpha$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghemit	braun, bläulich-schwarz
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Wüstit	schwarz bis braun
FeO	Bernalit	dunkelgrün bis gelb-grün
Fe(OH) <sub>3</sub>	Magnetit	schwarz
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Ferrihydrit	gelb-braun bis dunkelbraun
Fe <sup>3+</sup> <sub>10</sub> O <sub>14</sub> (OH) <sub>2</sub>		

Bei Betrachtung der Übersichtsbilder am Anfang des Kapitels (s. Abb. 15) trat hauptsächlich die charakteristisch rote Färbung von Eisen(III) auf (V1, V3, V4). Dies liegt der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) in wässrigen Lösungen zugrunde.<sup>69,123</sup>

V2 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) zeigte dagegen eher eine weißliche Färbung des Fließkanals, die auf die Farbe des Biofilms (*B. subtilis*) bei geringer Oxidation von Fe<sup>2+</sup> zurückzuführen sind.

Da die Biofilme in V1, V3 und V4 eine eher rostbraune Färbung zeigten, ließen sich die vorliegenden Eisenverbindungen zunächst auf die polymorphen Eisenhydroxidoxide (x-FeOOH), sowie auf Maghemit

und Ferrihydrit eingrenzen. Die Biofilme in V2 zeigten mit ihrer weißlichen Färbung geringes Eisenvorkommen auf und können somit nur über die Ergebnisse aus der ATR charakterisiert werden.

Überdies sind im Anhang Abb. E REM-Aufnahmen aus Vorversuchen illustriert, die bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen und auch Fließgeschwindigkeiten stets die gleiche körnige, den Biofilm umgebende Struktur aufwiesen. Die EDX-Analyse (Anhang F) veranschaulichte das Vorhandensein hoher Eisen (Fe-) und Sauerstoff (O-) Peaks in der die Bakterienzellen umgebenden Matrix, die bei Bestrahlung einer einzelnen Zelle nicht auftraten. Auch dies deutet auf Akkumulation von Eisenverbindungen hin, die einen hohen Anteil an Sauerstoff aufweisen, wie es beispielsweise bei den polymorphen x-FeOOH der Fall ist.<sup>119</sup> Beim Vergleich mit der Literatur zeigen Rasterelektronen-Aufnahmen diese körnige und granuläre Struktur bei  $\alpha$ -FeOOH. Bei  $\beta$ -FeOOH wird dagegen eine stäbchen- bis keulenförmige Struktur nachgewiesen, wohingegen  $\gamma$ -FeOOH eher nadelförmige Strukturen aufweist.<sup>101</sup>

Durch den Nachweis der gelb- bis rötlich-braunen Farbe der Oberfläche, die Messungen mittels ATR und die Strukturgebung im REM wird davon ausgegangen, dass sich in den Versuchen mit hoher Eisenkonzentration  $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$  (V1 und V3) eher das  $\alpha$ -FeOOH in die Matrix einlagerte. Innerhalb der Versuche mit niedriger Eisenkonzentration  $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$  (V2 und V4) manifestierte sich die Inkorporation von  $\beta$ -FeOOH.

Das  $\alpha$ -FeOOH ist hochreaktiv, und bereits Omoike *et al.* (2004) konnten eine Interaktion von *Bacillus subtilis* Biofilmen mit  $\alpha$ -FeOOH nachweisen, die für eine energetisch stabile Verbindung für weitere EPS- bzw. Zelladhäsionen sorgte.<sup>118</sup> Dies ermöglichte es den Biofilmen in V1 und V3, stark anzuwachsen und auch bei einer hohen Strömungsgeschwindigkeit stabil zu bleiben, ohne dass eine Abscherung von Mikrokolonien auftrat. Weiterhin deuteten die zusätzlichen Absorptionen bei 1585 und 1393 cm<sup>-1</sup> in V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) eine Eisen-Carboxyl-Verbindung (COO-Fe) an, die innerhalb der anderen Versuche nicht aufzufinden war und eine Interaktion von organischer Masse bzw. der Biofilmmatrix und Eisen bestärkt.<sup>124</sup>

Das  $\beta$ -FeOOH zeigte mit seiner losen Struktur eher die Fähigkeit zur Einlagerung von hohen Anteilen an Wasser in Studien von Mei *et al.* (2015).<sup>101</sup> Die geringe Eisenzugabe in V2 und V4 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) sowie die Einlagerung von  $\beta$ -FeOOH könnte demnach für die verminderte Akkumulation der Biofilme verantwortlich sein.

Die Komplexität des genauen Nachweises eines x-FeOOH-Polymorphs ergibt sich aus den potenziellen Transformationsprozessen in Wasser und mit den EPS.<sup>117,119,123,125</sup>

Die Modifikationen sind, wie in Abb. 22 beispielhaft gezeigt, sowohl vom umgebenden Wasser als auch von den darin gelösten Ionen (z. B. Cl<sup>-</sup>) abhängig. Dabei wurde in der Literatur nicht auf eine Grenzkonzentration des Chlorid-Ions, das die Transformation in eine bestimmte Richtung lenkt, verwiesen.

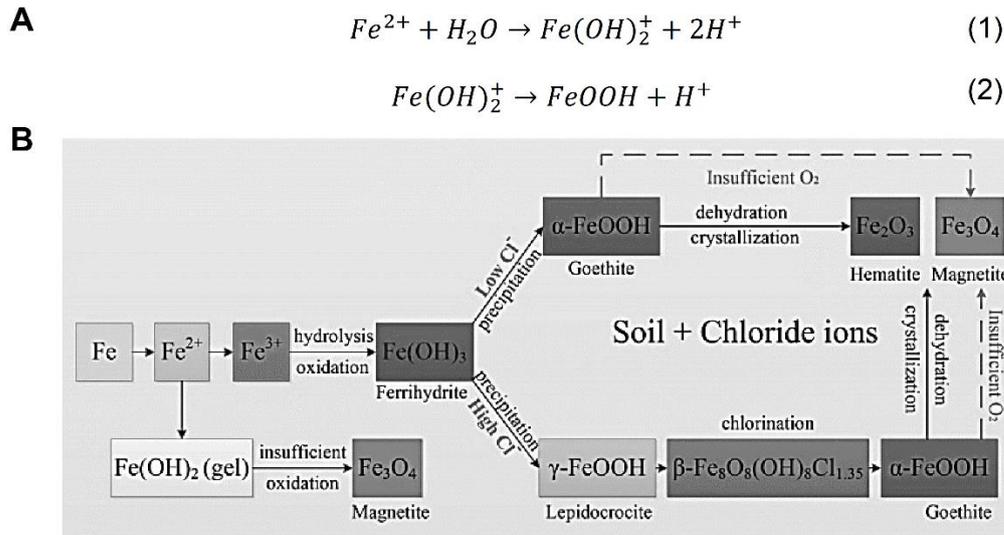


Abb. 22 Potenzielle Transformationsprozesse von Eisen in A) wässriger Umgebung und B) in Böden mit unterschiedlichen Chlorgehalten.<sup>117,125</sup>

Im Vergleich zu Wagner *et al.* (2010)<sup>69</sup> bzw. Ivleva *et al.* (2010)<sup>120</sup> mit 1,8 mg/L Cl<sup>-</sup> waren in der vorliegenden Arbeit Chlorid-Konzentrationen von 27,5 bis 28,3 mg/L Cl<sup>-</sup> im Nährmedium vorhanden, was die Chlorierung von γ-FeOOH zu β-Fe<sub>8</sub>O<sub>8</sub>(OH)<sub>8</sub>Cl<sub>1,35</sub> (β-FeOOH) begründet (V2, V4). Die Transformation zu α-FeOOH (V1, V3) kann durch das größere Biofilmvolumen entstanden sein.

Weinberg (2004) beschrieb die Notwendigkeit von Eisenvorkommen zur Bildung eines Biofilms aus suspendierten Zellen.<sup>20</sup> Ergänzend wurde in den Studien von Oh *et al.* (2018) berichtet, dass das Eisen die Biofilmbildung durch oxidativen Stress fördert, wodurch das Vorliegen von sauerstoffreichen x-FeOOH-Verbindungen bestätigt werden kann.<sup>97</sup> Darüber hinaus zeigten Kang & Kirienko (2018), dass die EPS-Matrix die Aufnahme von sauerstoffreichen Eisenverbindungen reguliert, um die Bildung von ROS zu unterbinden, was wiederum die Hypothese der Einlagerung von Eisen in die EPS stützt.<sup>96</sup>

### Zwischenfazit

Durch die Untersuchung des Eisenanteils im Biofilm sowie die Inkorporation der Eisenverbindungen konnten die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Das Fe<sup>2+</sup> im Nährstoffmedium wird vom Biofilm aufgenommen und verbleibt zu einem gewissen Anteil im Biofilm
- Je höher die Eisenkonzentration im Kultivierungsmedium ist, desto mehr Eisen wird im Biofilm akkumuliert
- Die Integration von Fe<sup>2+</sup> in die Biofilme erfolgt in Form von **x-FeOOH-Polymorphen**
- Je nach Konzentration im Kultivierungsmedium liegen zwei potenzielle Formen von x-FeOOH vor: **α-FeOOH** (V1 + V3) und **β-FeOOH** (V2 + V4)
- Verlinkung und/ oder Präzipitation von Fe<sup>2+</sup> im Biofilm erfolgt über die Matrix und fördert die EPS Produktion

## 5

## Biofilmstabilität

Mit Hilfe von Deformationsversuchen wurden mechanische bzw. materielle Eigenschaften der Biofilme untersucht. Betrachtet wurden dabei die Auswirkungen von erhöhten Fließgeschwindigkeiten (s. Tab. 4) auf einzelne Biofilmaggregate - auf den Grad der Scherung ( $\alpha$ ,  $G$ -Modul) sowie auf die Längenänderung (Kompression, Elongation,  $L$ ,  $E$ -Modul) der Aggregate. Die mechanischen Parameter wurden mittels OCT-Aufnahmen bestimmt und dienen zur Beurteilung von Biofilmstabilität. Im nachfolgenden Kapitel sind die Parameter detailliert beschrieben.

In Tab. 10 ist die Übersicht der Experimente gegeben.

**Tab. 10** Versuchsübersicht zur Analyse der mechanischen Biofilmeigenschaften unter dem Einfluss von  $\text{Fe}^{2+}$ .

Versuch	$Q$ (mL/min)	$\text{Fe}^{2+}$ (mg/L)
V5	1	2,5
V6	1	0,25
V7	5	2,5
V8	5	0,25

### 5.1 Semi-automatisierte Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften

In der Vergangenheit wurden das Elastizitätsmodul ( $E$ -Modul) sowie das Schubmodul ( $G$ -Modul) von Biofilmen in Fließzellen mittels Rheometrie oder anhand von stereomikroskopischen 3D-Aufnahmen bzw. 2D-OCT-Aufnahmen manuell bestimmt.<sup>52,53,93,126</sup>

Abb. 23 illustriert dabei die Vorgehensweise zur Bestimmung der beiden Parameter  $\alpha$  und  $L$  mittels OCT, über die es möglich ist, das Elastizitäts- und Schubmodul zu berechnen.

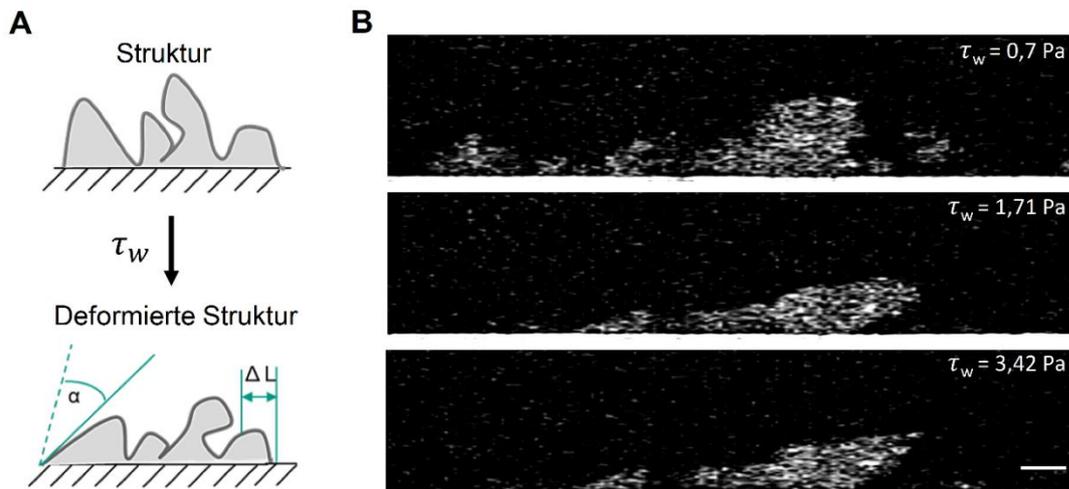


Abb. 23 Verfahren zur Bestimmung der beiden Parameter  $\alpha$  und  $L$  bzw.  $\Delta\alpha$  und  $\Delta L$ . A) Schematische Darstellung; B) Darstellung anhand von B-Scans. Der Maßstab beträgt  $100 \mu\text{m}$  für die x-Achse und  $65 \mu\text{m}$  für die y-Achse.

Deutlich zu erkennen sind dabei die Scherung sowie die Elongation des Aggregats in Abb. 23 B. Generell wird die Evaluation mechanischer Eigenschaften von Hand ausgeführt (Messen von  $\Delta\alpha$  und  $\Delta L$ ). Um eine manuelle Auswertung nur teilweise zu gestatten, wurden Auswertelgorithmen angenommen, um mögliche (subjektive) Kalkulationsfehler zu reduzieren.

#### Methodik:

Für alle Berechnungen wurden zunächst die MIP-Aufnahmen zur Selektion geeigneter Biofilmkolonien gesichtet. Danach erfolgte für die Berechnung von  $\Delta L$  die Anwendung einer „Bounding Box“, die das das Aggregat umgebende minimalste Rechteck darstellt.<sup>127</sup> Die Bounding Box wurde dabei mittels des Biovoxel-Plugins „Extended Particle Analyzer“ (EPA) in Fiji generiert (s. Abb. 24).<sup>61</sup>

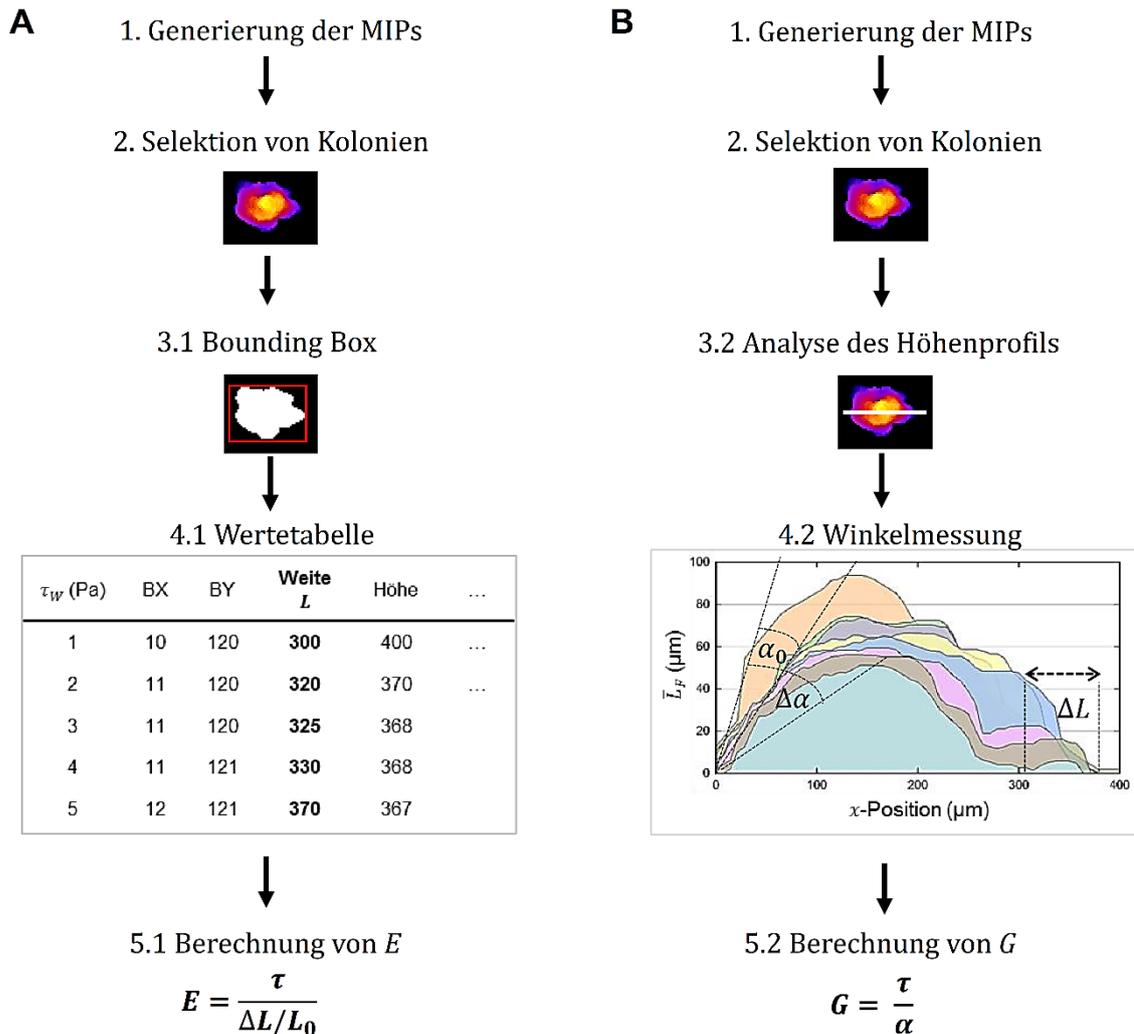


Abb. 24 Fließschema der semi-automatisierten Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften. A) Fließschema zur Berechnung der Elongation bzw. des  $E$ -Moduls; B) Fließschema zur Berechnung des Schergrades bzw. des  $G$ -Moduls. Das rot markierte Rechteck unter Schritt 3 kennzeichnet die Bounding Box, die weiß markierte Linie illustriert das Höhenprofil. BX und BY entsprechen den Koordinaten der oberen linken Ecke der Bounding Box.

Der Vorteil einer umgebenden Box (Abb. 24 A) liegt darin, die Gesamt-Elongation bzw. -Kompression eines Aggregats ermitteln zu können und manuelle bzw. willkürliche Messfehler zu reduzieren. Des Weiteren wird eine Verschiebung der Kolonie in  $x$ -Richtung mit einkalkuliert. Per „Extended Particle Analyzer“ innerhalb des Biovoxxel-Plugins werden mehrere Parameter bestimmt, die Aufschluss über die Deformation bzw. das Verhalten der Aggregate unter Scherbeanspruchung liefern, z. B. die analysierte Fläche, die Dichte der lateralen Pixel-Verteilung sowie der Startpunkt und die Ausdehnung der Bounding Box.

Zur Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E$  bzw. der Elongation/Kompression bedarf es zunächst lediglich der Werte für die Weite der Box in  $x$ -Richtung ( $= L, \Delta L$ ) und der Kenntnis über die angewandte Wandschubspannung  $\tau_w$ . Die Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E$  kann dann nach Stoodley *et al.* (1999) und Blauert *et al.* (2015) erfolgen (s. Abb. 24).<sup>6,52</sup>

Bei der Kalkulation des Schubmoduls  $G$  bzw. des Scherwinkels  $\alpha$  (Abb. 24 B) hingegen findet ein 2D-Scan ( $xz$ -Ausrichtung) aus der MIP einer Kolonie Anwendung. Hierfür wird mittels Fiji ein Höhenprofil durch die

Mitte des Aggregats generiert. Parallel dazu wird eine Tabelle mit allen  $x$ - und  $y$ -Werten des Höhenprofils erstellt. Somit kann vereinfacht vom Beginn der Box bei  $BX, BY$  bis hin zum höchsten Punkt des Biofilmaggregats ( $L_{F,max}$ ) eine Linie gezogen werden, die mittels „Measure“ den Winkel  $\alpha$  in Grad ( $^\circ$ ) wiedergibt. Hier wurde von einer Einberechnung der Verschiebung  $\Delta x$  abgesehen. Die Ermittlung des Schubmoduls  $G$  findet erneut nach Stoodley *et al.* (1999) und Blauert *et al.* (2015) statt.<sup>6,52</sup>

Durch die semi-automatisierte Methode wird die Nutzung von 2D- als auch 3D-Daten zusammengeführt, um ein detailliertes Bild über das Verhalten des Biofilms zu erlangen.

Durch die Methode kann:

- eine exakte Bestimmung des Scherwinkels  $\alpha$  (Höhenprofil) auch bei einer heterogenen Biofilmstruktur erfolgen
- die Gesamtelongation bzw. -kompression (Bounding Box) ermittelt werden, ohne Spezifikation auf ein bestimmtes Strukturareal
- eine Verschiebung der Position des Aggregats in Fließrichtung ( $\Delta x$ ) mit einkalkuliert werden
- eine Betrachtung mehrerer Biofilmaggregate (C-Scan) vereinfacht realisiert werden

## 5.2 Unterschiede in der Biofilmdeformation

### Längen- und Winkeländerung der Aggregate

Zunächst wurde die Längenänderung der Biofilmkolonien bei erhöhten Fließgeschwindigkeiten untersucht. Dabei wurde analysiert, in wie weit die Aggregate elongieren bzw. komprimieren. Dies liefert Hinweise auf die Elastizität der Biofilme bei mechanischer Beanspruchung (s. Abb. 25).

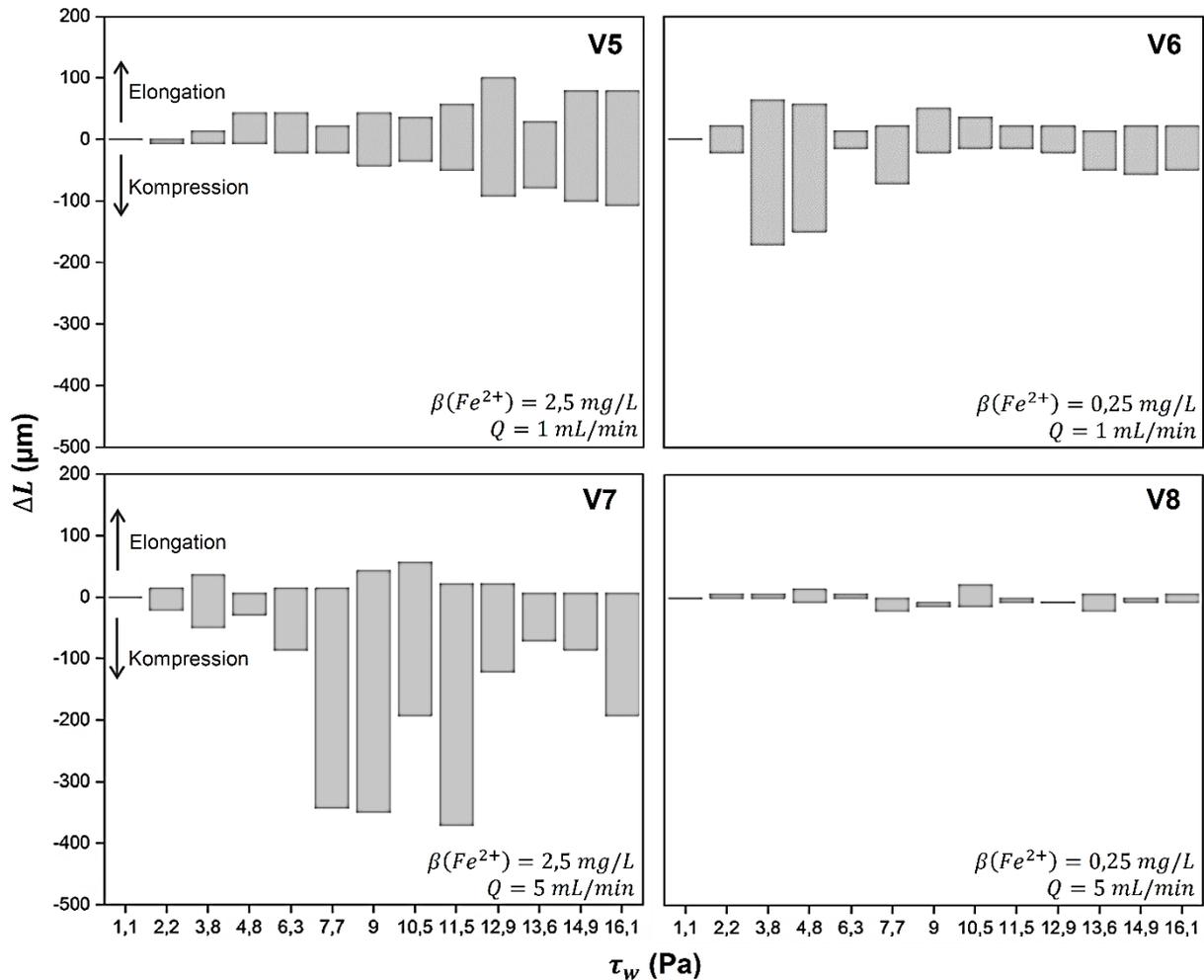


Abb. 25 Vergleich der Längenänderungen von Biofilmkolonien aus V5-V8. Gezeigt ist der Bereich zwischen der minimalen und der maximalen Längenänderung von je  $N = 10$  ausgewerteten Aggregaten (ausgenommen V8:  $N = 3$ ).  $\tau_{w,Kultivierung} = 0,05$  Pa (V5+V6) und  $0,27$  Pa (V7+V8).

Zunächst war aus den MIPs aller Versuche ersichtlich, dass ein vollständiges Versagen bzw. Abreißen der Biofilme selbst bei  $16,1$  Pa Wandschubspannung nicht auftrat und dass auch die Biofilmdicken  $L_{f,max}$  ( $\Delta z$ ) einzelner Aggregate keine großen Abnahmen aufwiesen. Dennoch konnten einige Kolonien der mechanischen Scherbeanspruchung nicht standhalten. Bei Betrachtung von Abb. 25 wird deutlich, dass sich die Biofilme bei den diversen Bedingungen unterschiedlich verhielten. Auch fand vermehrt Kompression der Biofilmaggregate gegenüber Elongation in die Fließrichtung statt. In V5 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) fand sich in einem Bereich von  $\tau_w = 6,3 - 7,7$  Pa ein ähnliches Elongations- und Kompressionsverhältnis. Je höher die Wandschubspannung, desto eher begannen sich die Kolonien in  $x$ -Richtung zu verlängern. Ab ca.  $12-13$  Pa traten demnach vermehrt Kompressionen oder Abrisse der Kolonien auf. V6 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) repräsentierte hingegen zu Beginn, zwischen  $\tau_w = 1,1 - 3,8$  Pa, die höchste Kompressionsrate mit bis zu  $150$   $\mu m$  Kompression in  $x$ -Richtung. Danach folgten nur geringfügige Änderungen in der Biofilmdeformation. Die Biofilme in V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) wiesen wiederum die höchsten Kompressionen von bis zu  $350-400$   $\mu m$  ( $\tau_w = 7,7 - 11,5$  Pa) auf. Auch hier fand Elongation nur bis  $50$   $\mu m$  statt.

V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) zeigte die geringsten Deformationen.

Eine erste Interpretation der Ergebnisse erfolgt über die eingelagerten Eisenverbindungen. In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, dass vor allem in den Wachstumsbedingungen von V1 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) bzw. V3 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) die höchsten Eisenkonzentrationen eingelagert wurden, was generell mit der Kultivierung konform ist.

Mei *et al.* (2015) beschrieben in ihrer Studie über die polymorphen Eisenhydroxid-Verbindungen, dass vor allem  $\beta$ - und  $\gamma$ -FeOOH durch deren lose Struktur die Eigenschaften besitzen, große Wassermengen zu speichern.<sup>90</sup> Es liegt nahe, dass die Biofilme in V6 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ), in denen generell das  $\beta$ -FeOOH akkumuliert, demnach zu Beginn stark komprimierten. Das vom Biofilm gespeicherte Wasser wurde unter der erhöhten Wandschubspannung aus den Hohlräumen des Biofilms (Poren, Wasserkanäle) herausgedrückt und das Biofilmvolumen verringerte sich. Nachfolgend veränderten die Biofilme in V6 und V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) kaum ihre Länge, was dem hohen Druckwiderstand von  $\beta$ -FeOOH zugeschrieben werden kann.<sup>128</sup> Zusätzlich definierten Mei *et al.* (2015) für  $\alpha$ -FeOOH (V5 + V7,  $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) eine granulare und relativ stabile Struktur.<sup>101</sup> Aber auch das  $\alpha$ -FeOOH kann hohen Drücken Stand halten sowie stabile Verbindungen mit EPS aufbauen.<sup>118,128</sup> Da das  $\alpha$ -FeOOH die Produktion der EPS-Matrix fördert, können die Kompressionen in V5 und V7 auf die Elastizität von Polymeren zurückzuführen sein.<sup>97,117,118</sup>

Es wird vermutet, dass eine Heterogenität an  $\alpha$ -FeOOH in den verschiedenen Teilstrukturen des Biofilms vorliegen könnte, da möglicherweise auch die Nährstoffe mit der Kultivierungsdauer heterogen verteilt werden (z. B. Transfer in lose und dichtgepackte Kolonien).

Zur weiteren Analyse der mechanischen Biofilmeigenschaften wurde der Deformationswinkel  $\alpha$  ermittelt. Er illustriert den Grad der Neigung einer Kolonie unter erhöhter Wandschubspannung  $\tau_w$  (s. Abb. 26).

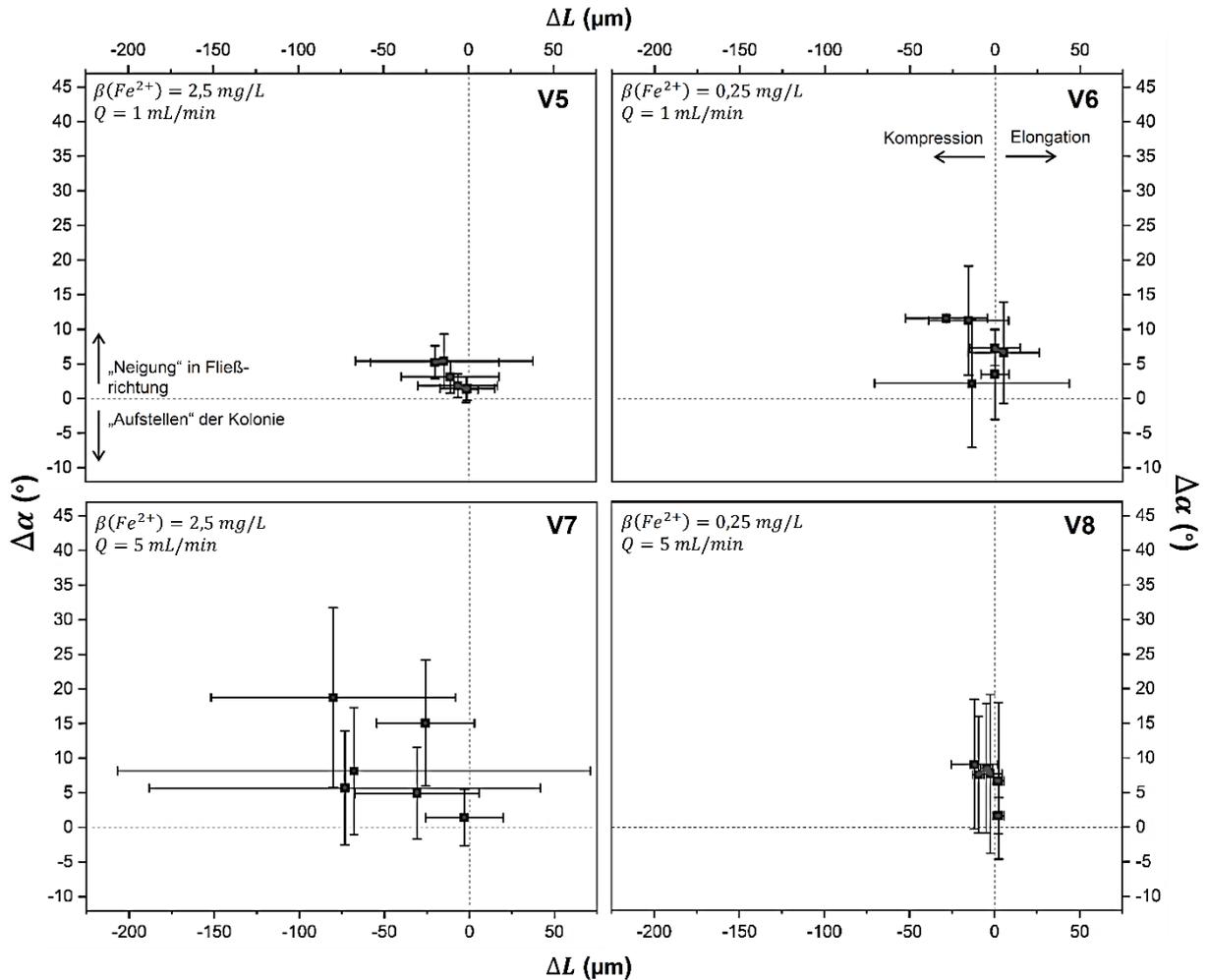


Abb. 26 Korrelationen der Winkeländerung  $\Delta\alpha$  und der Längenänderung  $\Delta L$ . Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von  $N = 10$  Kolonien bzw. Aggregaten (ausgenommen V8:  $N = 3$ ) bei  $\tau_W = 3,8, 6,3, 9, 11,5, 13,6$  und  $16,1 \text{ Pa}$ .

Unter Berücksichtigung des Scherwinkels können konkretere Ergebnisse dargestellt werden. In V5 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) nahm mit zunehmender Kompression  $\Delta L$  auch das Ausmaß der Winkeländerung  $\Delta\alpha$  zu. Letztendlich wurden Elongationen bis  $\Delta L = 52,3 \mu\text{m}$  und Kompressionen bis  $\Delta L = -66,6 \mu\text{m}$  bei einer Winkeländerung von bis zu  $\alpha = 5,4 \pm 3,9^\circ$  erreicht. Die Biofilme mit der geringsten Eiseneinlagerung (V6,  $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) zeigten mit bis zu  $\Delta\alpha = \pm 20^\circ$  Standardabweichung höhere Neigungen in Strömungsrichtung. Hier korrelierten die größten Änderungen in der Kolonielänge ( $\Delta L = \pm 57,2 \mu\text{m}$ ) mit dem Mittelwert der kleinsten Änderung im Deformationswinkel ( $\Delta\alpha = 2,2 \pm 9,3^\circ$ ). Kolonien zeigten mit Winkeländerungen bis zu  $\Delta\alpha = 11,3 \pm 7,8^\circ$  wiederum kleinere Längenänderungen von  $\Delta L = -15,4 \pm 23,5 \mu\text{m}$  auf.

Eine andere Darstellung ergab sich für V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ). Hier ähnelte die Größenordnung  $\Delta L/\Delta\alpha$  der Größenordnung aus V5 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ), jedoch mit einer erhöhten Spannweite der Längenänderung. Bereits geringe Winkeländerungen korrelierten mit hohen Längenänderungen der Aggregate. Bei einer mittleren Winkeländerung von  $\Delta\alpha = 8,1 \pm 9,2^\circ$  zeigten sich beispielsweise große Änderungen in der Aggregatlänge von  $\Delta L = -67,8 \pm 138,9 \mu\text{m}$ . Höhere

Deformationswinkel von bis zu  $\Delta\alpha = 18,7 \pm 12,9^\circ$  gruppierten wiederum mit geringen Kompressionen bis zu  $\Delta L = -79,9 \pm 71,8 \mu\text{m}$ . Generell repräsentiert die Grafik für V7 die höchsten Änderungen in der Aggregatlänge sowie -neigung.

V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) zeigte die geringsten Modifikationen bezüglich Längenänderung. Hier traten vorwiegend Winkeländerungen bis zu  $\Delta\alpha_{max} = 19,1^\circ$  auf.

Zusammengefasst zeichneten sich die Biofilme durch ihr unterschiedliches Verhalten bei Scherbeanspruchung aus (s. Tab. 11).

**Tab. 11 Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und den mechanischen Eigenschaften der Biofilme.** ↑ = hoch; ➔ = mittel; ↓ = niedrig. Die Farben zeigen die korrelierenden Parameter.

Versuch	Parameter			
	Eisenzugabe $\beta_{\text{Fe}^{2+}}$	Volumenstrom $Q$	Winkeländerung $\Delta\alpha$	Längenänderung $\Delta L$
<b>V5</b> $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 1 \text{ mL/min}$	↑	↓	↓	➔
<b>V6</b> $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 1 \text{ mL/min}$	↓	↓	➔	➔
<b>V7</b> $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 5 \text{ mL/min}$	↑	↑	↑	↑
<b>V8</b> $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 5 \text{ mL/min}$	↓	↑	➔	↓

Tabelle 11 indiziert, dass sich eine Korrelation zwischen zugegebenem Eisen  $\beta_{\text{Fe}^{2+}}$  und angewandtem Volumenstrom  $Q$  im Zusammenhang mit einer Winkel- und Längenänderung der Biofilmaggregate als komplex darstellt. Biofilme, kultiviert mit  $Q = 1 \text{ mL/min}$  (V5 und V6) waren im Deformationsversuch beispielsweise einer mittelmäßigen Änderung in der Aggregatlänge  $\Delta L$  untergeordnet (gelbe Felder). Biofilme mit geringer Eisenzugabe (V6 und V8,  $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) tendierten weiterhin zu einer mittelmäßigen Winkeländerung  $\Delta\alpha$  (rötliche Felder). Während eine Eisenzugabe von  $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$  (V5) zu einer geringen Winkeländerung  $\Delta\alpha$  führte, zeigte ein erhöhter Volumenstrom von  $Q = 5 \text{ mL/min}$  (V8) eher eine geringe Längenänderung  $\Delta L$  der Kolonien (graue Felder). Hauptsächlich schien die Kultivierung der Biofilme in V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) große Auswirkungen auf die Winkel- und Längenänderung der Aggregate zu besitzen (blaue Felder).

Insgesamt waren die Biofilme in allen vier Versuchen V5-V8 relativ stabil. Dem liegt möglicherweise die Wahl des Fließkanalbodens zugrunde, bei der die Hydrophobizität des Substratums (PVC) das Wachstum von *Bacillus subtilis* in Fließzellen unterstützt, was über Jahre hinweg ausgeschlossen wurde.<sup>129-131</sup>

Ferner erhöht ein vermehrtes Vorkommen von Eisenressourcen (V5, V7) auch die Stabilität von Biofilmen. Dies wurde unter anderem für Biofilme in einem Rotationsscheiben-Biofilmreaktor mit  $10 \text{ mg/L}$  Eisensulfat innerhalb einer Studie von Möhle *et al.* (2007) gezeigt.<sup>18</sup> Auch Grumbein *et al.* (2014) konnten mit der

Untersuchung der Erosionsstabilität von *Bacillus subtilis* im Rheometer die positiven Eigenschaften von Eisen(II) und Eisen(III) belegen.<sup>10,132</sup>

Eine direkte Korrelation von  $\beta_{Fe^{2+}}$  und  $Q$  hinsichtlich mechanischer Biofilmparameter (bzw.  $\Delta\alpha$ ,  $\Delta L$ ) kann im Vergleich zur Auswirkung von  $\beta_{Fe^{2+}}$  und  $Q$  auf die strukturellen Biofilmparameter zunächst jedoch nicht mit Sicherheit ausgemacht werden. Jafari *et al.* (2019) zeigten in deren Studie, dass ein Dichte-Gradient im Biofilm auftritt, der sich bei den Berechnungen schwer berücksichtigen lässt.<sup>133</sup> Aus der Studie wurde deutlich, dass der „ältere“ Biofilm, der sich am Substratum befindet, eine dichtere Struktur aufwies als der Biofilm an der Oberfläche (Bulk-Biofilm-Interface). Diese Eigenschaft eines Biofilms verweist auf das Grundproblem der beiden Parameter  $\Delta\alpha$  und  $\Delta L$ . Während sich die Längenänderung  $\Delta L$  auf die Grundfläche des Biofilmaggregats bezieht („alte“, dichtere Biofilm-Basissschicht am Substratum), wird bei der Winkeländerung  $\Delta\alpha$  die „neue“, porösere Biofilm-Deckschicht (Bulk-Biofilm-Interface) analysiert, was zu einer Unbeständigkeit der mechanischen Parameter führen kann.

Im Vergleich zu Blauert (2017) sind die Winkeländerungen in der vorliegenden Arbeit mit bis zu  $\Delta\alpha = 31,6^\circ$  relativ hoch.<sup>51</sup> Dies liegt womöglich an der Anwendung von Wandschubspannungen bis zu  $\tau_W = 16,1$  Pa, die eine dreifach höhere Scherbeanspruchung darstellen als die von Blauert (2017) genutzte Wandschubspannung von bis zu  $\tau_W = 5$  Pa, bei denen Winkeländerungen lediglich im Bereich von  $\Delta\alpha = 3,0 - 9,8^\circ$  auftraten. Mit  $\tau_W = 10,11$  Pa und  $\Delta\alpha = 21,4 \pm 0,7^\circ$  zeigten Stoodley *et al.* (1999) durch die hohen Wandschubspannungen bereits höher liegende Winkeländerungen des Biofilms unter mechanischer Scherbeanspruchung.<sup>53</sup>

Bei Betrachtung der Biofilmaggregate in der vorliegenden Arbeit wurden bei  $\tau_W = 11,5$  Pa geringere Winkeländerungen  $\Delta\alpha$  im Vergleich zu Stoodley *et al.* (1999) ausgemacht (V5:  $\Delta\alpha = 3,1 \pm 2,3^\circ$ ; V6:  $\Delta\alpha = 7,3 \pm 2,5^\circ$ ; V7:  $\Delta\alpha = 8,1 \pm 9,1^\circ$ ; V8:  $\Delta\alpha = 8,14 \pm 9,3^\circ$ ).

Unterschiede in den Werten können durch viele Faktoren hervorgerufen werden, wie z. B. Biofilmalter, Wachstumsbedingungen (+ Nährstoffe), Dimensionen der Fließzellen, Mono- und Mischkultur oder auch Dichteunterschiede innerhalb der Biofilmaggregate. Während Stoodley *et al.* (1999) Mischkulturen aus vier gramnegativen Umwelt- bzw. industriell angelagerten Bakterien mit einem Biofilmalter von 23 Tagen für deren Deformationsstudie nutzte, einigten sich Blauert *et al.* (2015) auf Mischkulturen aus Belebtschlamm (aus Kläranlagen) ohne eindeutige Alterszuweisung. Des Weiteren waren auch die angegebenen Adaptionszeiten zwischen den Fließgeschwindigkeiten mit 90 s (Blauert *et al.* (2015)) bzw. 30 – 60 s (Stoodley *et al.* (1999)) unterschiedlich.<sup>52,53</sup>

In weiteren Studien sind anderweitige Adaptionszeiten, Anzahl an Replikaten, Biofilmkulturen und –alter, Wandschubspannungen und andere Messsysteme beschrieben, die vor allem auf die Beurteilung der Module  $E$  und  $G$  eingehen, auf die später im Kapitel näher eingegangen wird.<sup>91,93,134</sup>

Generell ist die Auflösung des OCTs mit ca. 8  $\mu\text{m}$  als hoch anzusehen. Durch den hohen Volumenstrom  $Q$  durch die Fließzelle kann es jedoch zu Abbildungsproblemen (Signal-Rausch-Verhältnis) kommen, die eine präzise Analyse erschweren.<sup>51</sup> Dadurch traten bei einigen Kolonien minimale Schwankungen im Bereich der Längenänderung auf.

Da die Abbildungen 25 und 26 nicht nachweisen können, ob Abrisse oder lediglich Kompressionen auftraten, sind zusätzlich in Abb. 27 und 28 ausschließlich die  $N = 5$  Kolonien dargestellt, die einer Wandschubspannung von bis zu  $\tau_W = 16,1$  Pa standhielten.

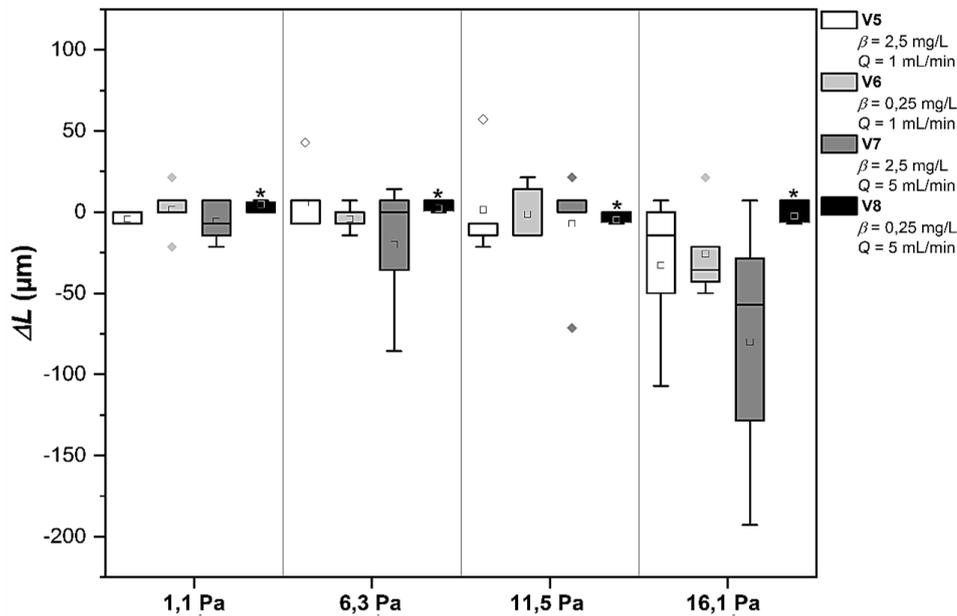


Abb. 27 Längenänderungen der  $N = 5$  Kolonien, die einer Scherbeanspruchung bis  $\tau_W = 16$  Pa gegenüber standhielten; \*V8:  $N = 3$ . Die Antennen im Boxplot zeigen den  $1,5 \times \text{IQR}$ .

Aus dem Boxplot wird die zunehmende Kompression der Biofilme aus V5 und V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) mit zunehmender Scherbeanspruchung bis  $\tau_W = 16,1$  Pa deutlich. Vor allem bei den Aggregaten in V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) begannen die Deformationen bei 6,3 Pa schon frühzeitig. Biofilme unter den Bedingungen aus V6 und V8 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) zeigten dabei die geringsten Modifikationen in der Länge.

Bei Betrachtung der Winkeländerung  $\Delta\alpha$  unter Scherbeanspruchung sind die Ergebnisse vergleichsweise weniger eindeutig (Abb. 28).

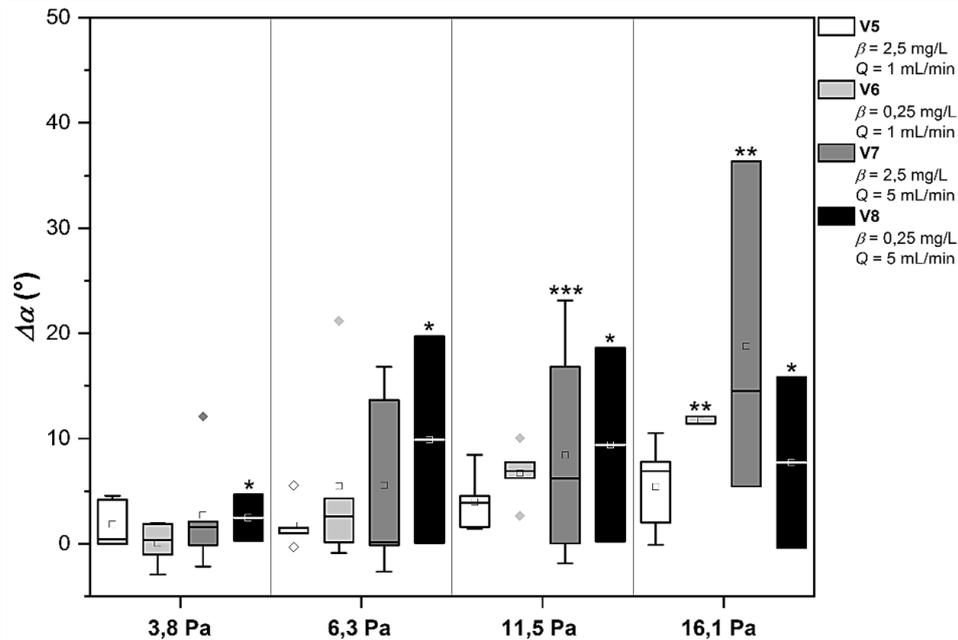


Abb. 28 Winkeländerungen der  $N = 5$  Kolonien, die einer Scherbeanspruchung bis  $\tau_W = 16$  Pa gegenüber stand hielten; \*V8:  $N = 2$ ; \*\* $N = 3$ ; \*\*\* $N = 4$ . Der Verlust an Replikaten entstand durch niedrige Signal-Rausch-Verhältnisse. Die Antennen im Boxplot zeigen den  $1,5 \times \text{IQR}$ .

Die Replikate aller Versuche neigten sich mit zunehmender Wandschubspannung über die Dauer des Deformationsexperiments in Flussrichtung (s. Abb. 28). Die Biofilme von V5 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) und V8 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) wiesen mit bis zu  $\Delta\alpha = 5^\circ$  bei  $\tau_W = 3,8$  Pa die höchsten Winkeländerungen auf. Bei  $\tau_W = 6,3$  Pa lag die Winkeländerung für die Biofilme in V8 mit bis zu  $\Delta\alpha = 20^\circ$  weiterhin am höchsten, gefolgt von V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) mit ca.  $\Delta\alpha = 18^\circ$  bei  $1,5 \times \text{IQR}$ . Zum Ende des Deformationsexperiments hin zeigte V7 die höchste Winkeländerung mit bis zu  $\Delta\alpha = 40^\circ$ , gefolgt von V8, V6 und V5. Dies ist nahezu konform mit den Korrelationen, die in Abb. 26 gezeigt sind.

Zusammengefasst charakterisieren sich die Aggregate aus V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) als die Biofilme mit der größten Deformation. Bezüglich Längenänderung  $\Delta L$  folgen die Biofilme aus V5 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min), danach V6 und V8 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Die Winkeländerung  $\Delta\alpha$  der Kolonien betrachtet, liegt die Reihenfolge bei  $V7 > V8 > V6 > V5$ , wobei hier die Anzahl an Replikaten mit erhöhtem Volumenstrom aufgrund eines geringen Signal-Rausch-Verhältnisses sank und in der Interpretation bedacht werden muss. Blauert (2017) bestätigt dabei, dass eine Selektion der Kolonien erfolgen muss, da nicht jedes Aggregat für die mechanischen Biofilmparameter auswertbar ist, und dass es zu optischen Abbildungsfehlern aufgrund von Partikelströmung (Nährstoffe, abreißende Biofilmpatches) kommen kann.<sup>51</sup> Blauert (2017) hat zudem in seiner Dissertation Kolonien von „ausreichender Größe“ untersucht und beschrieb diese als i) rund und „patchy“ bzw. ii) flach und stromlinienförmig, was die Heterogenität an Biofilmkolonien belegt.

Die Selektion geeigneter bzw. strukturell vergleichbarer Kolonien stellt dabei die Herausforderung der Analyse dar. Abbildung 29 zeigt beispielhaft die Diversität der hier genutzten Aggregate.

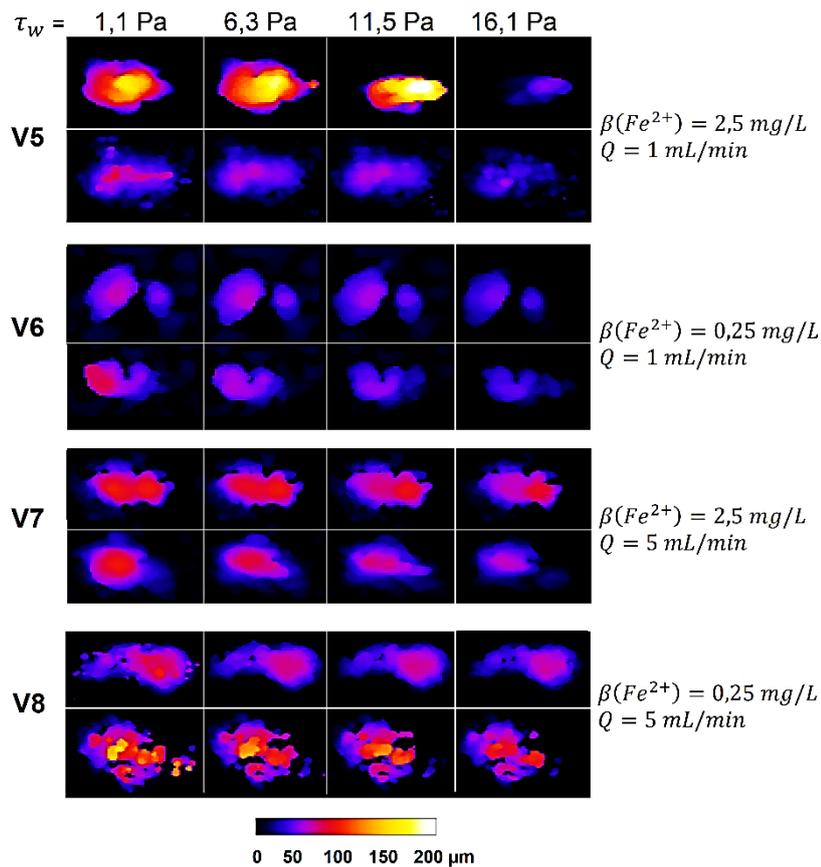


Abb. 29 Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) einzelner Biofilmkolonien zeigen die Diversität struktureller Teilbereiche. Der Kalibrierbalken zeigt die Biofilmdicke in  $\mu\text{m}$  an.

Die MIPs der genutzten Biofilmkolonien (Abb. 29) illustrieren unter anderem diverse Formen und unterschiedliches Verhalten mit der Zunahme der Wandschubspannung  $\tau_w$ . Weiterhin sind die Aggregate bezüglich ihrer Struktur heterogen und auch die Dimensionen der einzelnen Biofilmkolonien variieren.

Die Beurteilung des Biofilmverhaltens unter mechanischen Einflüssen bzw. unter Scherbelastung findet meist durch die Berechnung der elastischen Konstanten statt. Im Vordergrund stehen dabei das Elastizitäts- ( $E$ ) sowie das Schubmodul ( $G$ ), aus denen sich weitere Parameter wie das Kompressionsmodul ( $K$ ), die Querdehnungszahl (Poissonzahl,  $\nu$ ) sowie die Kompressibilität ( $\beta$ ) kalkulieren lassen.<sup>51</sup>

Die Berechnung dieser elastischen Konstanten konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der nichtlinearen Elastizität (nichtlineares Spannungs-Dehnungs-Diagramm, z. B. Gummi oder auch elasto-plastische Materialien<sup>135</sup>) und der vermehrten Kompression der Biofilme nicht durchgeführt werden. In früheren Studien wurde meist davon ausgegangen, dass Biofilme isotrope, homogene und möglicherweise auch auxetische Materialeigenschaften aufweisen.<sup>51</sup> Aktuell kann eine Homogenität angesichts der Nicht-Linearität im Elastizitätsverhalten nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund war oftmals auch nur eine Annäherung an das  $E$ -Modul berechenbar.<sup>52,54,55</sup> Da allgemein bekannt ist, dass Biofilme heterogene Strukturen bzw. partiell unterschiedliche Verteilungen von Polymeren, Mikroorganismen etc. aufweisen,

stellt diese Annäherung an das  $E$ -Modul ein Problem dar. Im vorliegenden Fall wurde deshalb von einer willkürlichen Betrachtung einzelner Bereiche der Biofilmkolonien abgesehen und die gesamte Biofilmkolonie bei der Berechnung berücksichtigt. Durch die Analyse konnte das Verhalten dieser Aggregate weitestgehend deskriptiv beschrieben werden und diejenigen Parameter selektiert werden, die generell auch für die Berechnung der mechanischen Module genutzt werden (Scherwinkel  $\alpha$  und Längenänderung  $\Delta L$ ). Da die Kalkulation der elastischen Konstanten jedoch in jedem Falle eine positive Längenänderung und Linearität voraussetzen, konnte die Berechnung mit Hilfe der Formeln aus Stoodley *et al.* (1999) selbst für die Kompressibilität  $\beta$  nicht verwirklicht werden.<sup>53</sup>

Weitere Gründe für das nichtlineare Elastizitätsverhalten und somit für die Unberechenbarkeit der elastischen Konstanten können in der Wahl des Reaktorsystems, des Biofilmalters, der Adaptionszeit, der gewählten Fließgeschwindigkeiten und anderweitigen Versuchsbedingungen liegen.

### Kompressibilität und Relaxation

Qian (2017) kam ebenso zu dem Schluss, dass eindeutige Ergebnisse zur Kompressibilität  $\beta$  in der Literatur fehlen. Demnach nutzte sie in ihrer Studie über die Untersuchung von Fouling-Faktoren in Tröpfchen-Bewässerungssystemen eine selbst erstellte Formel, die die Kompressibilität  $\beta_K$  in Zusammenhang mit der Biofilmdicke  $L_F$  stellt.<sup>136</sup> Da in der vorliegenden Arbeit die Kolonien in der Länge komprimierten, wurde die Berechnung der Kompressibilität  $\beta_K$  aus Qian (2017) abgeändert und folgendermaßen berechnet:

$$\beta_K = - \frac{1}{L_0} \frac{\Delta L}{\Delta \tau_W} \cdot [100 \text{ \%}] \quad (14)$$

wobei  $L_0$  die Ursprungslänge der Biofilmkolonie und  $\Delta L$  die Längenänderung dieser Kolonie bei erhöhter Wandschubspannung  $\Delta \tau_W$  bezeichnet. Die Werte  $\frac{\Delta L}{\Delta \tau_W}$  wurden im Diagramm über die Wandschubspannung  $\tau_W$  aufgetragen und der negative Anstieg der linearen Korrelation als Wert der Kompressibilität  $\beta_K$  festgesetzt. Des Weiteren wurde die Relaxation der Biofilme ( $\tau_W = 0$  Pa) nach einer Relaxationszeit von  $t = 1$  min bestimmt (Tab. 12):

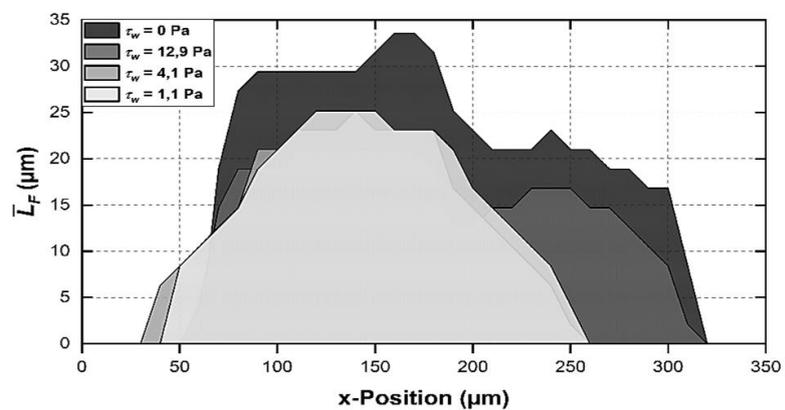
$$L_{relax} = \frac{L_{\tau_W=0}}{L_{\tau_W=1,1}} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad (15)$$

$$\alpha_{relax} = \frac{\alpha_{\tau_W=0}}{\alpha_{\tau_W=1,1}} \cdot 100 \quad (16)$$

Dabei stellen  $L_{\tau_W=0}$  und  $\alpha_{\tau_W=0}$  die Werte der Länge und des Scherwinkels ohne Strömung, nach gegebener Relaxationszeit, dar.  $L_{\tau_W=1,1}$  und  $\alpha_{\tau_W=1,1}$  entsprechen den Anfangswerten des Deformationsversuchs bei  $\tau_W = 1,1$  Pa (s. Tab. 12).

Tab. 12 Kompressibilität  $\beta_K$  berechnet aus der Steigungsgeraden der Längenänderungen von  $N = 5$  Kolonien (V8:  $N = 3$  Kolonien). Die Relaxationen der Länge  $L_{relax}$  und des Scherwinkels  $\alpha_{relax}$  wurden aus den  $N = 3$  Kolonien berechnet, mit denen eine Reformierung ohne Abriss möglich war. Je kleiner  $\alpha_{relax}$ , desto höher ist die Relaxation des Scherwinkels. Die Grafik zeigt beispielhaft ein Biofilmaggregat aus V5 mit und ohne Scherbeanspruchung  $\tau_w$ . Dabei verweist  $\tau_w = 0$  Pa auf die Relaxation nach Beendigung des Deformationsversuchs (nach  $t = 1$  min).

Parameter	V5	V6	V7	V8
	$\beta = 2,5$ mg/L $Fe^{2+}$ $Q = 1$ mL/min	$\beta = 0,25$ mg/L $Fe^{2+}$ $Q = 1$ mL/min	$\beta = 2,5$ mg/L $Fe^{2+}$ $Q = 5$ mL/min	$\beta = 0,25$ mg/L $Fe^{2+}$ $Q = 5$ mL/min
Kompressibilität $\beta_K$ ( $Pa^{-1}$ )	0,64	0,82	1,15	0,34
$L_{relax}$ (%)	$117 \pm 48$	$104 \pm 13$	$106 \pm 13$	$111 \pm 16$
$\alpha_{relax}$ ( $^\circ$ )	$0,7 \pm 3,0$	$2,2 \pm 0,9$	$-1,0 \pm 2,9$	$-9,3 \pm -13,4$



Dabei wiesen die Biofilme aus V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 5$  mL/min) mit  $\beta_K = 1,15$   $Pa^{-1}$  die höchste Kompressibilität auf, was auch mit der Grafik in Abb. 27 konform ist. Danach folgten die Aggregate aus V6 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) mit  $\beta_K = 0,82$   $Pa^{-1}$  und V5 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) mit  $\beta_K = 0,64$   $Pa^{-1}$ , obwohl die Kolonien in V5 stärker der Längenkürzung unterlegen waren. Generell wird davon ausgegangen, dass die Biofilme mit höherer Konzentration an anorganischen Partikeln stärkere Kompressionseigenschaften besitzen, wie auch Qian (2017) zeigen konnte.<sup>136</sup> Möglicherweise kommt die um 22 % geringere Kompressibilität in V5 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) gegenüber V6 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $Fe^{2+}$ ,  $Q = 1$  mL/min) durch das höhere Biofilmalter in V6 zustande, da nach 6 Tagen in V6 nicht ausreichend große Kolonien für die Deformationsstudie gewachsen waren. Ein Vergleich zu weiteren Studien hinsichtlich der Kompressibilität  $\beta_K$  ist schwierig, da die meisten Studien die mechanische Stabilität bzw. die viskoelastischen Eigenschaften von Biofilmen untersuchen, ohne einen genauen Wert für  $\beta_K$  anzugeben.<sup>5,136,137</sup>

Derlon *et al.* (2016) und Jafari *et al.* (2019) bestätigen jedoch, dass Biofilme hoch kompressible Strukturen darstellen.<sup>133,138</sup> In der Studie von Derlon *et al.* (2016) konnte eine direkte Korrelation zur Steigung der hydraulischen Widerstandsfähigkeit mit der Biofilmkompression hergestellt werden. Weiterhin sagen die Autoren aus, dass hydraulische Resistenz in Membranbiofilmen durch drei Parameter bestimmt wird: i) die Biofilmkomposition, ii) die unmittelbaren Kräfte, die auf den Biofilm wirken, sowie iii) die Wachstumshistorie.<sup>138,139</sup> Diese Resultate decken sich mit den hier gezeigten Wachstumsversuchen, der

Bestimmung der Strukturparameter und auch den Ergebnissen aus Studien, die die hydrodynamischen Bedingungen und das Nährstoffangebot auf das Biofilmwachstum untersuchten.<sup>6,7</sup>

Jafari *et al.* (2019) belegten weiterhin, dass die anfängliche Wachstumsgeschwindigkeit bzw. ein erhöhter Druck in der Wachstumshistorie von Fließzellenbiofilmen (isoliert aus Flusswasser) mit höherer hydraulischer Widerstandsfähigkeit assoziiert werden kann.<sup>133</sup> Dies korrespondiert mit den Biofilmen in V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ), die mit einer höheren Strömungsgeschwindigkeit kultiviert wurden. Zusätzlich hat das Biofilmalter einen Einfluss, was die erhöhte Kompressibilität aus V6 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) belegen könnte.

Bei Betrachtung der Kompressibilität  $\beta_K$  in Blauert (2017) stellt sich heraus, dass dessen Biofilme mit  $\beta_K = 0,01 - 0,92 \text{ Pa}^{-1}$  vergleichsweise ähnliche Kompressionen zeigten. Eine Kalkulation weiterer Kompressibilitäten  $\beta_K$  aus anderen Studien gestaltet sich vor allem daher schwierig, da unterschiedliche Messmethoden wie das Rasterkraftmikroskop, Rheometer und weitere zur Anwendung kommen.<sup>89,140</sup> Weiterhin liegen die Werte der elastischen Moduli in Bereichen von wenigen Pa bis einigen kPa, was eine eindeutige Aussage über den Effekt von Eisenzugabe  $\beta_{\text{Fe}^{2+}}$  und Volumenstrom  $Q$  bezüglich mechanischer Biofilmeigenschaften erschwert.<sup>51</sup>

Innerhalb der Analyse des (visko-)elastischen Verhaltens (Relaxation) konnte für alle Biofilme in V5-V8 ein elastisches bzw. elastoplastisches Verhalten nachgewiesen werden, da sich die  $N = 3$  Kolonien zum Teil nach Stoppen der Strömung relaxierten (Tab 12). Aus den Profilplots wurde deutlich, dass der Scherwinkel abnimmt und auch die Kompression teilweise aufgehoben wurde.

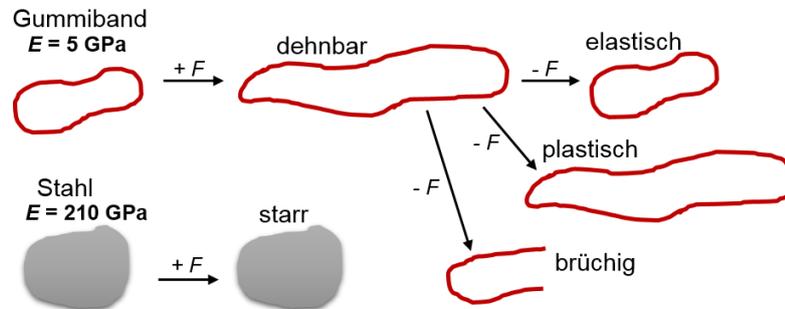
Hier war die höchste Relaxation der Biofilmaggregate nach Stoppen der Strömung in V5 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit  $L_{relax} = 117 \pm 48 \%$  gegeben. Die Kolonien in V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) wiesen mit  $L_{relax} = 111 \pm 16 \%$  die zweithöchste Relaxation bezüglich Kolonielänge auf, danach folgten V7 und V6. Die Reihenfolge unterscheidet sich von der Kompressibilität, wobei die Standardabweichungen hoch sind und sich die Werte zwischen den Versuchen überschneiden. Die Ursache liegt darin, dass sich einige Kolonien nach der kurzen Relaxationszeit kaum reformierten, während andere einen starken Rückgang zur Ursprungsform aufwiesen.

Bei Betrachtung der Relaxation des Scherwinkels  $\alpha$  konnte wiederum eine andere Reihenfolge bestätigt werden. Die Biofilmkolonien aus V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) wiesen mit  $\alpha_{relax} = -9,3 \pm -13,4^\circ$  die höchste Relaxation auf, gefolgt von den Aggregaten aus V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) mit  $\alpha_{relax} = -1,0 \pm 2,9^\circ$  und V5 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit  $\alpha_{relax} = 0,7 \pm 3,0^\circ$ . Die geringe mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  und die geringen Winkeländerungen  $\Delta\alpha$  in V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) schienen diese hohe Relaxation  $\alpha_{relax}$  zu verursachen.

Demnach lässt sich, wie auch bei der Kompressibilität  $\beta_K$ , ein genauer Zusammenhang zwischen Eisenzugabe  $\beta_{\text{Fe}^{2+}}$  und Volumenstrom  $Q$  nicht beurteilen. Die Ergebnisse belegen das viskoelastische bzw. viskoplastische Verhalten der Biofilme.<sup>141</sup> Zudem zeigen sie ein unterschiedliches Verhalten, je nach berechnetem Parameter.

Nach den Prinzipien der elastischen Konstanten bzw. dem Hookeschen Gesetz, stellen die geringsten Winkeländerungen  $\Delta\alpha$  sowie die geringsten Längenänderungen  $\Delta L$  der Biofilmkolonien die höchste

Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Kräften dar.<sup>51</sup> Dies bedeutet auch, dass Materialien wie beispielsweise Gummi, die sich stark dehnen lassen, geringe Elastizitätsmodule aufweisen, da sie schon bei kleinsten physikalischen Krafteinwirkungen in deren Struktur beeinflusst werden (s. Abb. 30).<sup>142</sup> Dabei sagen die elastischen Konstanten jedoch nichts über die Elastizität bzw. Härte eines Materials aus.<sup>143</sup>



**Abb. 30** Elastizitäten von Gummiband und Stahl. Beispielsweise besitzt Gummi ein geringes Elastizitäts-Modul  $E$ , ist aber hoch elastisch bis eine plastische, also irreversible Verformung auftritt. Stahl dagegen besitzt ein hohes  $E$ -Modul und ist somit widerstandsfähig, zeigt aber schnell ein plastisches Materialverhalten.<sup>142,143</sup>  $F$  = Kraft.

Für die Berechnung der Härte, Sprödigkeit oder auch Stabilität findet die Anwendung weiterer Formeln statt, die über eine Bildanalyse schwer zu lösen sind. Ferner findet auch die Berechnung der elastischen Konstanten im Falle eines nichtlinearen Verhaltens über computergestützte Methoden wie Simulationen, z. B. der Finite Elemente Methode, statt. Diese sind jedoch mit einem hohen Rechenaufwand verbunden.<sup>144,145</sup>

Auch bei Polymeren, die Hauptbestandteil der EPS sind, wurden geringe Elastizitätsmodule von  $E = 0,3 - 3,5$  GPa bestätigt.<sup>146</sup> Dies könnte die starke Kompression der Biofilme in V5, V6 und V7 belegen, da eine Einlagerung von Eisenoxidhydroxiden wie dem  $\alpha$ -FeOOH, eine Förderung der Biofilmentwicklung aus suspendierten Zellen sowie der Produktion an EPS zugesprochen wird.<sup>96,97,118</sup> Aber auch die Eigenschaft von  $\beta$ -FeOOH, hohe Mengen an Feuchtigkeit einzulagern und eine lose Struktur zu besitzen, kann den Grund für die starken Kompressionen darstellen, bei der durch den Volumenstrom hohe Mengen an eingelagertem Wasser herausgedrückt werden.<sup>101</sup> Ob Kompressionen, ähnlich einer geringen Dehnung der Aggregatlänge, hohe  $E$ -Module mit sich bringen, ist derzeit unbekannt.

Eine generelle Aussage über die Stabilität der Biofilme unter verschiedensten Wachstumsbedingungen gestaltet sich komplex, was auch durch das Alter der Biofilme begründet sein könnte. Während die Biofilme bei V5 und V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) schon an Tag 6 des Wachstums untersucht werden mussten, war eine Analyse der Kolonien in V6 und V8 ( $\beta = 0,25$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) wegen der geringen Biomassen-Zunahme erst an Tag 13 möglich. Während Galy *et al.* (2012) und Zrelli *et al.* (2013) eine Erhärtung der Biofilme mit zunehmendem Alter belegen, zeigten Patten *et al.* (2018) und Ohashi & Harada (1996) mit höherem Biofilmtalter (Tag 5 gegenüber Tag 3<sup>147</sup>) eher eine Abnahme in Zug- sowie Haftfestigkeit.<sup>147-151</sup>

Aufgrund der Fließkanalgeometrien ( $H = 450$   $\mu\text{m}$ ) und der Autokorrelationsartefakte war eine längere Wachstumszeit für die Aggregate in V5 und V7 ( $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) nicht möglich, da die Kolonien sonst zügig über die Kanalmitte ( $z$ -Richtung) hinausgewachsen bzw. zu dicht gewachsen wären.

In der Literatur finden sich keine Aussagen zur Berechnung von Kompressionen bei Nichtlinearität, abgesehen von computergestützten elastoplastischen Materialmodellen.<sup>152</sup>

Vergleicht man jedoch die zuvor getroffenen Resultate dieser Arbeit, kann die Hypothese angenommen werden, dass Biofilme, angewachsen mit erhöhter Eisenkonzentration, elastischer bzw. komprimierbarer sind und  $\text{Fe}^{2+}$  einen stabilisierenden Effekt auf die EPS-Matrix ausübt. Beispielsweise wurde in den Wachstumsversuchen (Abb. 17) gezeigt, dass die höchste Biofilmmasseproduktion und die dicksten Biofilme unter den hohen Eisenkonzentrationen ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) gegeben waren, wobei eine hohe Fließgeschwindigkeit ( $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) den Effekt verstärkte und zum Ende des Versuchs hin stabilere Biofilme ausbildete. Diese positiven Effekte der hydrodynamischen Bedingungen und des Eisens wurden auch in einigen vorherigen Studien nachgewiesen.<sup>6,18,20,96</sup>

Weiterhin konnte die Literatur auch die Art der eingelagerten Eisenverbindungen als Eisenoxidhydroxide ( $\text{FeOOH}$ ) bestätigen, welche Auswirkungen auf die Stabilität der Biofilme verursachen.<sup>117,118</sup>

#### Adhäsive und kohäsive Eigenschaften

Um die Auswirkung des Eisens auf die Biofilme unter Scherbeanspruchung bestmöglich zu charakterisieren, wurden die beiden Faktoren Abriss und Koloniehöhe einzelner Kolonien (Tab. 13), sowie die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$ , Fließkanalbedeckung  $SC$  und mittlere Aggregatlänge  $AHRL$  des gesamten Fließzellenausschnitts weiter berücksichtigt. Der Faktor Abriss beschreibt dabei das Versagen kohäsiver bzw. adhäsiver Kräfte des Biofilms. Die Koloniehöhe könnte weiterhin einen Einfluss auf das Biofilmverhalten bei der angewandten Scherbeanspruchung  $\tau_W$  haben.

**Tab. 13 Anzahl und gemittelte Wandschubspannung  $\tau_w$ , bei der die Biofilmkolonien abgetragen wurden. Mittelwert und Standardabweichung der Koloniehöhen  $L_F$  bei  $N = 10$  Aggregaten zu Beginn der Deformationsversuche (Zeitpunkt  $t_0$ ); ausgenommen V8:  $N = 3$  Kolonien.**

	V5 $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 1 \text{ mL/min}$	V6 $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 1 \text{ mL/min}$	V7 $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 5 \text{ mL/min}$	V8 $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ $Q = 5 \text{ mL/min}$
Höhe bei $t_0$ ( $\mu\text{m}$ )	$44,1 \pm 13,7$	$68,7 \pm 8,6$	$72,2 \pm 26,2$	$116,2 \pm 36,9$
Abriss bei $\tau_w$ (Pa)	14,4	13,5	13,5	16,1
Anzahl abgerissener Aggregate	3/10	4/10	5/10	0/3

Die Biofilmkolonien aller Versuche V5-V8 konnten im Mittel hohen Scherkräften von  $\tau_W = 13,5\text{-}16,1 \text{ Pa}$  Stand halten. In fast allen Versuchen waren einige der betrachteten Aggregate abgeschert worden, ausgenommen in V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ), in dem die Anzahl der analysierbaren Kolonien möglicherweise zu gering war (vgl. auch Wachstumsstudien). V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) zeigte mit fünf abgerissenen Kolonien bei  $\tau_W = 13,5 \text{ Pa}$  das höchste bzw. früheste Versagen der kohäsiven/adhäsiven Kräfte. Danach folgten V6 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit vier von zehn Kolonien bei  $\tau_W = 13,5 \text{ Pa}$  und V5 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit drei von zehn betrachteten Aggregaten bei  $\tau_W = 14,4 \text{ Pa}$ .

Auf den ersten Blick schienen die gemittelte Koloniehöhe die Anzahl und das frühzeitige Abreißen der Kolonien zu beeinflussen, da die Höhen mit der oben genannten Reihenfolge korrelierten ( $V7 > V6 > V5$ ). Dennoch zeigte gerade V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ), dass sich auch Kolonien mit hohen Biofilmdicken  $L_F$  von  $116,2 \pm 36,9 \mu\text{m}$  der erhöhten Scherbeanspruchung widersetzen konnten und eine gewisse Festigkeit aufwiesen.

Auch hier ist die Betrachtung mehrerer Replikate notwendig. Bei der Untersuchung von  $N \geq 20$  Aggregaten könnte sich die Verteilung aus Tab. 13 divergent darstellen.

Trotz des Abrisses einiger Kolonien konnte in der viskoelastischen Analyse die Reformierung/Relaxation und Stabilität der Biofilme auch nach einer hohen Wandschubspannung von  $\tau_W = 16,1 \text{ Pa}$  gezeigt werden (s. Tab. 12).

Abb. 31 A illustriert dabei, dass auch nach hohen Wandschubspannungen  $\tau_W$  noch einige Biofilmkolonien vorhanden waren, auch wenn diese nur noch wenige  $\mu\text{m}$  hoch waren (MIPs s. Anhang G und H).

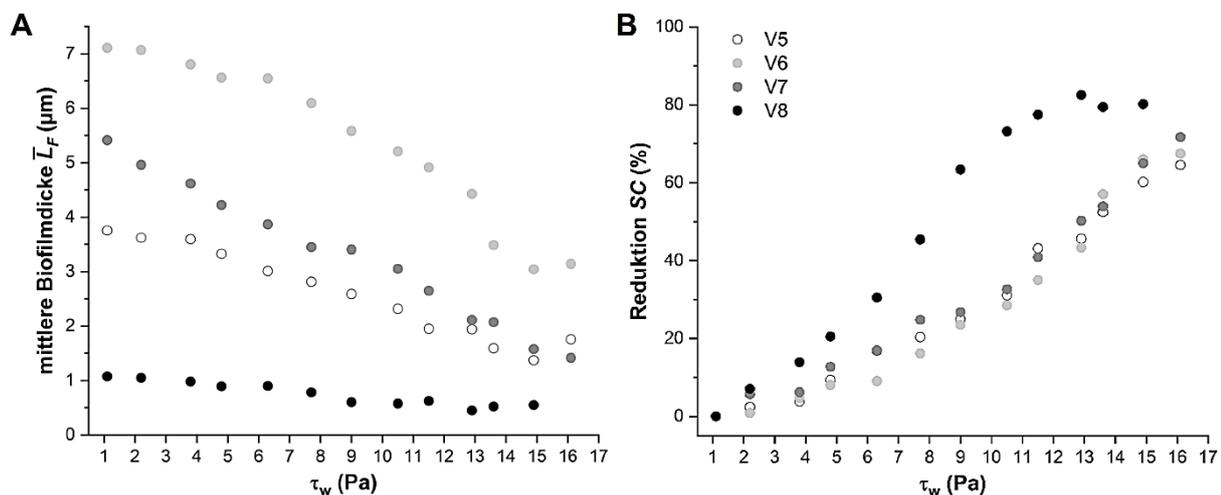


Abb. 31 Abnahme der mittleren Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  (A) sowie Reduktion der Fließkanalbedeckung  $SC$  (B) im Verlauf des Deformationsexperiments für die Versuche V5-V8. Das Biofilmalter betrug bei den Deformationsversuchen bei V5 und V7 sechs Tage und bei V6 und V8 dreizehn Tage. Gezeigt sind je die Mittelwerte aus  $N = 4$  Fließzellen; ausgenommen V8:  $N = 3$  Fließzellen.

Deutlich wird hier auch das Biofilmalter, welches zeigt, dass die Biofilme aus V6 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) mit 13 Tagen Biofilmalter die Biofilmdicken  $\bar{L}_F$  aus V5 und V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) mit 6 Tagen Wachstumsdauer überstiegen. V8 ( $\beta = 0,25 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) zeigte dabei, wie im Wachstumsversuch aus Kapitel 4, weiterhin geringe Biofilmdicken, was die hohen Relaxationszahlen sowie den Abriss einer geringeren Menge an Biofilmmasse bestätigt. Hingegen ist in Abb. 32 B ein identischer Trend der Abnahme der Fließkanalbedeckung für fast alle Biofilme unter den unterschiedlichen Bedingungen gezeigt. Hier schien V8 die geringste Adhäsion zum Substratum aufzuweisen.

Abb. 32 A veranschaulicht, dass das Biofilmalter auf die Kolonielängen  $AHRL$  keinen Einfluss ausübt. Hier zeigen V5 und V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ) weiterhin die längsten Biofilmaggregate (vgl. Abb. 18).

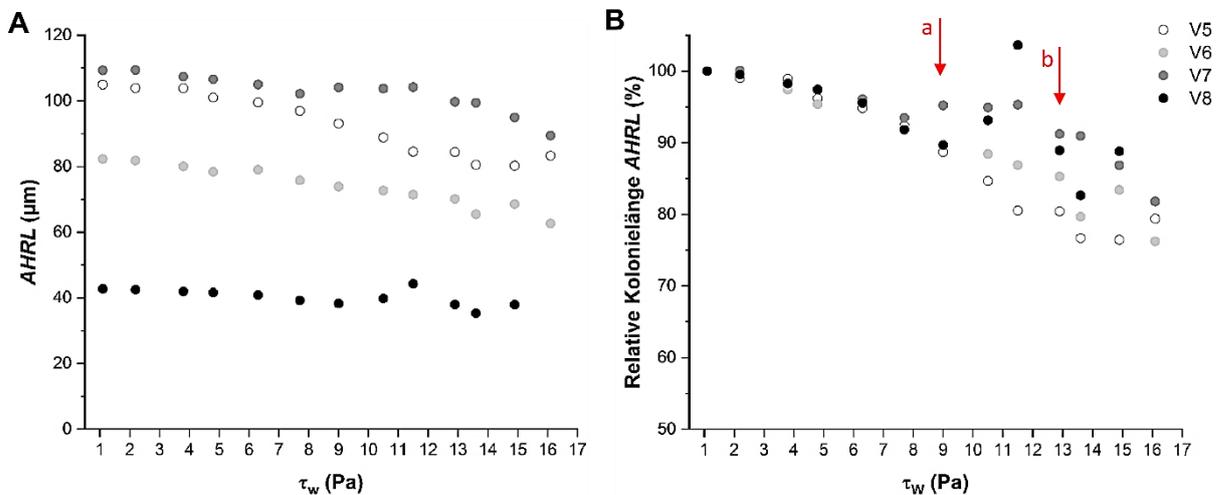


Abb. 32 Mittlere Aggregatlänge  $AHRL$  (A) sowie relative Aggregatlänge  $AHRL/AHRL_0$  in Prozent (B) im Verlauf des Deformationsexperiments für die Versuche V5-V8. Das Biofilmalter betrug bei den Deformationsversuchen bei V5 und V7 sechs Tage und bei V6 und V8 dreizehn Tage. Gezeigt sind je die Mittelwerte aus  $N = 4$  Fließzellen; ausgenommen V8:  $N = 3$  Fließzellen. a) anfängliche Elongation der Kolonien bzw. b) Kompression der Kolonien am Beispiel von V7.

Weiterführend ist durch Abb. 32 B erkennbar, dass eine Bestimmung der mechanischen Eigenschaften mit Hilfe von Strukturparametern ebenso komplex ist, da Abriss und Kompression unter Umständen nicht unterschieden werden können. Was jedoch deutlich wird ist, dass die Kolonien bis  $\tau_w = 9 \text{ Pa}$  entweder i) einer lediglichen Neigung ( $\alpha$ ) unterlagen oder ii) zunächst das Wasser aus Poren und Kanälen herausgedrückt wurde, da die mittlere Aggregatlänge  $AHRL$  der Biofilme aus V7 ( $\beta = 2,5 \text{ mg/L Fe}^{2+}$ ,  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) zunächst nochmal zunimmt (s. Abb. 32 B a)), bevor die vollständige Kompression einsetzt (s. Abb. 32 B b)). Dies wird anhand der relativen mittleren Aggregatlängenänderung  $AHRL$  (gesamter Bildausschnitt) im Vergleich zur Längenänderung  $\Delta L$  (einzelne Aggregate, Abb. 27) offensichtlicher.

Die Ergebnisse der Deformationsstudien zeigen die Notwendigkeit von Replikaten und der Automatisierung der Berechnung mechanischer Biofilmeigenschaften. In die Beurteilung des Verhaltens eines Biofilms können einige Parameter mit einfließen. Ungeklärt bleiben bis dato der Einfluss der Koloniedimensionen oder auch des Biofilmalters, welches unterschiedliche Ergebnisse in anderen Studien lieferte.<sup>147-151,153</sup> Weiterhin kann sich die Selektion der Aggregate aus der Mitte des Kanals schwierig gestalten.

### Zwischenfazit

Die physikalische Struktur eines Biofilms bestimmt seine Interaktion mit der Umgebung bzw. der Grenzfläche. Unterschiedliche Biofilmparameter, die das Biofilmverhalten bei Scherbeanspruchung beschreiben, konnten erfolgreich berechnet werden. Das sind mechanische Biofilmparameter wie z. B. die Kompressibilität  $\beta_K$  oder die Relaxationen  $\alpha_{relax}$  und  $L_{relax}$ , oder auch Biofilmstrukturparameter wie die Fließkanalbedeckung  $SC$  oder die mittlere Kolonielänge  $AHRL$ . Weiterhin konnten der Scherwinkel  $\alpha$  und auch die Elongation bzw. Kompression  $\Delta L$  individueller Kolonien semi-automatisiert abgebildet werden. Diese stellen die Ausgangsparameter für die Berechnung mechanischer Module ( $E, G$ ) dar.

Da Biofilme eher heterogene Strukturen aufweisen, können sich unterschiedliche Teilbereiche divers verhalten. Aus diesem Grund sollte eine selektive Darstellungsweise einzelner Parameter vermieden werden. Auch hier wird eine gewisse Anzahl an Replikaten ( $N = 10 - 20$ ) empfohlen.

Zusammengefasst, konnten die Deformationsstudien zeigen:

- dass eine semi-automatisierte Analyse zur Bestimmung mechanischer Module möglich ist
- dass die Analyse einer **Mindestanzahl von Replikaten** ( $N = 10 - 20$ ) als auch umfassender physikalischer Parameter (strukturelle und mechanische) notwendig ist, um das Verhalten von Biofilmen unter Scherbeanspruchung bestmöglich zu beschreiben
- dass auch nach hohen Wandschubspannungen von  $\tau_W = 16$  Pa noch Biofilmmasse vorhanden war
- dass anorganische Partikel wie Eisenoxidhydroxide zu einer **vermehrten Kompression** des Biofilms führen können und Eisen ( $Fe^{2+}$  bzw.  $Fe^{3+}$ ) somit das Verhalten des Biofilms beeinflusst<sup>154,155</sup>
- dass die **Parameter Kompressibilität  $\beta_K$ , Relaxation  $\alpha_{relax}$  und  $L_{relax}$**  eine gute Näherung für die Biofilmstabilität darstellen

# 6

## Zusammenfassung und Ausblick

Anhand des Anstiegs zahlreicher Publikationen wurde gezeigt, dass die optische Kohärenztomographie in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung für die Untersuchung von Biofilmen gewinnt. Die Analyse von Biofilmen ist dabei sehr komplex und je nach Reaktorsystem treten Limitierungen in der Durchführung von statistisch relevanten Replikaten auf.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Dissertation ein Monitoringsystem eingesetzt, das eine nicht-invasive und simultane (parallele) Untersuchung von mehreren Biofilmsystemen mittels OCT gewährleistete. Dabei fanden als Reaktorsystem mini-fluidische Fließzellen Anwendung. Ferner sollten die hier gezeigten Experimente Aufschluss über die strukturellen sowie mechanischen Biofilmeigenschaften geben, um das Verständnis der Biofilme sowie die Möglichkeiten zur Biofilmkontrolle weiter voranzutreiben. Im Vordergrund stand hierbei die Untersuchung des in Möhle *et al.* (2007) beschriebenen positiven Einflusses einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Zugabe auf die Biofilmstabilität<sup>18</sup> sowie auf die Struktur und das Verhalten mesoskopischer Biofilme.

Kapitel 1 und 2 beschreiben den aktuellen Forschungsstand in der Biofilmanalyse sowie die Etablierung und Anwendung des automatisierten Monitoringsystems mit optischer Kohärenztomographie.

In Kapitel 3 konnte anhand von Positionierungsversuchen gezeigt werden, dass diese Kultivierungs- und Monitoringplattform ein akkurates und zuverlässiges Positionieren des OCT-Scanners gewährleistete. Dabei waren Abweichungen von maximal  $8,6 \mu\text{m}$  für 75 % der Daten ( $N = 300$  von 400 Positionierungen, IQR) und Abweichungen von maximal  $-40 \mu\text{m}$  für 100 % der Daten ( $1,5 \times \text{IQR}$ ) gegeben. Weiterhin konnte ein vollautomatisiertes und nicht-invasives Abbilden der Biofilme durchgeführt werden. Die Plattform bot dabei die Möglichkeit, bis zu  $N = 32$  Fließzellen in Größe eines Objektträgers ( $76 \times 26 \text{ mm}^2$ ) zu installieren und somit statistisch verifizierte Rückschlüsse über die Biofilmentwicklung zu ziehen. Weitere Vorteile waren die durch Automatisierung einfachere Handhabung der Fließzellen, die Zeitersparnis sowie die Fixierung der Fließzellen, die ein ungewolltes Abreißen der Biofilme verhinderte. War eine Fließzelle dennoch nicht quantifizierbar (Abrissereignisse, Auflösungsfehler, Luftblasen), musste das Experiment aufgrund der Anzahl an Replikaten nicht unterbrochen werden. Die in Kapitel 3.2 beschriebene Replikatanalyse zeigte dabei aufgrund hoher Standardabweichungen in den strukturellen Biofilmparametern im Versuch bzw. in der Literatur diese Notwendigkeit einer Mindestanzahl an Biofilmreplikaten.

Der Einfluss der Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$  auf die strukturellen Biofilmeigenschaften wurde in Kapitel 4 beschrieben. Dabei konnte die Monitoringplattform zur Differenzierung der Biofilme erfolgreich angewendet werden. Eine genutzte Probenanzahl von  $N = 10$  Replikaten und eine statistische Verifizierung mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte weiterhin eine Differenzierung der Biofilme bei den verschiedenen Kultivierungsbedingungen gewährleisten.

Die Wachstumsversuche demonstrierten einen positiven Effekt von  $\text{Fe}^{2+}$  auf die Biofilmentwicklung (allgemein „reifere“, weitgehend differenzierte Biofilme von hoher Biofilmdicke), womit eine Biofilmkontrolle demnach möglich ist.

Mittels ATR-FTIR-Spektroskopie und gravimetrischer Ermittlungen wurde illustriert, dass das  $\text{Fe}^{2+}$  dabei vom Biofilm aufgenommen wird und in Form von  $x\text{-FeOOH}$ -Polymorphen erfolgt. Je nach Konzentration im Nährmedium ( $\beta = 0,25$  und  $2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ) lagen dabei zwei potenzielle Formen von Eisenoxidhydroxiden vor:  $\alpha\text{-FeOOH}$  und  $\beta\text{-FeOOH}$ . Dabei kann die Konversion verschiedener Eisenverbindungen ineinander durch das Vorhandensein weiterer Ionen wie  $\text{Cl}^-$  beeinflusst werden.<sup>125</sup> Weiterhin konnte belegt werden, dass die Inkorporation von Fe-Verbindungen aus dem Nährmedium mit der Entwicklung und Differenzierung von Biofilmen aus suspendierten Zellen verknüpft ist. Ferner erfolgt die Aufnahme von Fe-Derivaten über die Biofilmmatrix, wobei Fe zusätzlich die EPS-Produktion anregt.<sup>97</sup>

Die Deformationsversuche in Kapitel 5 zeigten, dass sich die Analyse mechanischer Biofilmeigenschaften mit Hilfe optischer Messmethoden immer noch komplex gestaltet. Dennoch konnte demonstriert werden, dass eine semi-automatisierte Analyse zur Bestimmung mechanischer Module mittels OCT möglich ist und diese manuelle Fehler minimieren kann. Weiterhin gewährleistet diese Methode eine nicht-invasive Untersuchung der mechanischen Biofilmparameter gegenüber von Rheometern oder beispielsweise der Rasterkraftmikroskopie.

Auch in diesem Kapitel wurde die Notwendigkeit sowohl von Replikaten als auch von physikalischen Parametern behandelt. Dabei konnten die Parameter Kompressibilität  $\beta_K$  und die Relaxationen von  $\alpha_{relax}$  und  $L_{relax}$  eine gute Näherung für die Biofilmstabilität darstellen. Es wurde deutlich, dass auch nach hohen Wandschubspannungen von  $\tau_W = 16$  Pa noch Biofilmmasse in allen Experimenten vorhanden war, was möglicherweise durch die Hydrophobizität von *Bacillus subtilis* verursacht wird. Weiterhin zeigten erhöhte Konzentrationen von  $\beta = 2,5$  mg/L  $\text{Fe}^{2+}$  im Nährmedium eine vermehrte Kompression des Biofilms. Somit beeinflusst  $\text{Fe}^{2+}$  auch das Verhalten des Biofilms bei Scherbeanspruchung, wobei von einer erhöhten EPS-Produktion ausgegangen wird.

Die Wachstums- sowie die Deformationsversuche beleuchteten die Diversität physikalischer Parameter der Biofilmstruktur, wobei nicht alle Parameter einen Zusammenhang zwischen der Kultivierungsbedingung und dem Biofilmverhalten herstellen konnten. Aus diesem Grund sind weitere Methoden zur Automatisierung physikalischer und vor allem mechanischer Biofilmeigenschaften wünschenswert. Eine Analyse weiterer Wachstumsbedingungen wie Biofilmalter oder Koloniedimensionen wäre in Deformationsstudien von Nutzen. Weiterhin wäre eine Implementation von Biofilm-Simulationen zum Abgleich mit experimentellen Ergebnissen sinnvoll, um die Fluid-Struktur-Dynamik genauer bestimmen zu können. Hier ist ein Softwarepaket nötig, welches quelltextoffen und einfach zu erlernen ist, sowie die Einbindung von Bilddaten ermöglicht.

Ein weiteres Problem, welches nur schwierig behoben werden kann bzw. innerhalb dessen eine Projektierung hilfreich wäre, ist der Abgleich der mechanischen Biofilmeigenschaften mit der Literatur. Durch die Nutzung verschiedener Reaktorsysteme und Messmethoden ist ein Vergleich mit den Daten anderer Arbeitsgruppen schwierig. Eine allgemeine Automatisierung oder Modellierungsmöglichkeit mit Anwendung auf unterschiedlichste Reaktorsysteme wäre hier hilfreich. Eventuell könnte eine Datenbank mit allen bisher durchgeführten Deformationsstudien (mechanische Module, Druck- und Zugversuche) und deren Stellparametern (Messmethoden, Wachstumsbedingungen, Biofilmalter, Mutanten und Organismen etc.) ein detailliertes Bild verschiedener Organismen bei Scherbeanspruchung liefern bzw. voraussagen. Dies könnte das Forschungsfeld der Biofilmmkontrolle (z. B. Stellparameter im Biofilmreaktor) weiter voranbringen und auch Reinigungsprozeduren verbessern.

## Literaturverzeichnis

1. Flemming, H. C., Wingender, J. & Szewzyk, U. *Biofilm Highlights - Springer Series on Biofilms Series*. 5 (2007). doi:10.1007/b136878
2. Lewandowski, Z. & Beyenal, H. *Fundamentals of biofilm research. 2nd edition* (2007). doi:10.1201/b16291
3. Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S. & Klapper, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 361–367 (2002). doi:10.1038/sj.jim.7000282
4. Park, A., Jeong, H.-H., Lee, J., Kim, K. P. & Lee, C.-S. Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel. *BioChip J.* 5, 236–241 (2011).
5. Paul, E., Ochoa, J. C., Pechaud, Y., Liu, Y. & Liné, A. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Res.* 46, 5499–5508 (2012).
6. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D. & Lappin-Scott, H. M. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 85, 19–28 (1999).
7. Teodósio, J. S., Simões, M., Melo, L. F. & Mergulhão, F. J. Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling* 27, 1–11 (2011).
8. Weiss, N., Obied, K. E. T. El, Kalkman, J., Lammertink, R. G. H. & van Leeuwen, T. G. Measurement of biofilm growth and local hydrodynamics using optical coherence tomography. *Biomed. Opt. Express* 7, 3508–3518 (2016).
9. Guvensen, N. C., Demir, S. & Ozdemir, G. Effects of Magnesium and Calcium Cations on Biofilm Formation by *Sphingomonas paucimobilis* from an Industrial Environment. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 3685–3692 (2013).
10. Grumbein, S., Opitz, M. & Lieleg, O. Metallomics Selected metal ions protect *Bacillus subtilis* biofilms from erosion †. *R. Soc. Chem. - Met.* 6, 1441–1450 (2014).
11. Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. & Novak, P. J. Effect of Protein, Polysaccharide, and Oxygen Concentration Profiles on Biofilm Cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2905–2910 (2007).
12. Sehar, S., Naz, I., Das, T. & Ahmed, S. Evidence of microscopic correlation between biofilm kinetics and divalent cations for enhanced wastewater treatment efficiency. *RSC Adv.* 6, 15112–15120 (2016).
13. Song, B. & Leff, L. G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* 161, 355–361 (2006).
14. Song, B. & Leff, L. G. Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. *Microbiol. Res.* 160, 111–117 (2004).
15. Todar, K. Nutrition and Growth of Bacteria. *Online Textbook of Bacteriology* 1–6 (2008). Verfügbar unter: [http://textbookofbacteriology.net/nutgro\\_1.html](http://textbookofbacteriology.net/nutgro_1.html).
16. Smith, R. J. Calcium and Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 83–133 (1995).
17. Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J. & Borchard, W. Influence of calcium ions on the

- mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* **43**, 49–57 (2001).
18. Möhle, R. B. *u. a.* Structure and Shear Strength of Microbial Biofilms as Determined With Confocal Laser Scanning Microscopy and Fluid Dynamic Gauging Using a Novel Rotating Disc Biofilm Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 747–755 (2007).
  19. Neilands, J. *MICORBIAL IRON METABOLISM*. (Elsevier, 1974).
  20. Weinberg, E. D. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med. Hypotheses* **63**, 863–865 (2004).
  21. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Lett. to Nat.* **417**, 552–555 (2002).
  22. Musk, D. J., Banko, D. A. & Hergenrother, P. J. Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* **12**, 789–796 (2005).
  23. Lin, M. H., Shu, J. C., Huang, H. Y. & Cheng, Y. C. Involvement of iron in biofilm formation by staphylococcus aureus. *PLoS One* **7**, 1–7 (2012).
  24. Yang, L. *u. a.* Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1318–1328 (2007).
  25. Singh, P. K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *BioMetals* **17**, 267–270 (2004).
  26. Berlutti, F. *u. a.* IRON AVAILABILITY INFLUENCES AGGREGATION, BIOFILM, ADHESION AND INVASION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA*. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **18**, 661–670 (2005).
  27. Renslow, R., Lewandowski, Z. & Beyenal, H. Biofilm Image Reconstruction for Assessing Structural Parameters. **108**, 1383–1394 (2011).
  28. Dreszer, C., Vrouwenvelder, J. S., Paulitsch-Fuchs, A. H., Zwijnenburg, J. C. & Flemming, H.-C. Hydraulic resistance of biofilms. *J. Memb. Sci.* **429**, 436–447 (2012).
  29. Zobell, C. E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity<sup>1</sup>. *J. Bacteriol.* **46**, 39–56 (1943).
  30. Pubmed NCBI. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. (Zugegriffen: 17. August 2020)
  31. Mack, W. N., Mack, J. P. & Ackerson, A. O. Microbial film development in a trickling filter. *Microb. Ecol.* **2**, 215–226 (1975).
  32. Høiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis* **125**, 272–275 (2017).
  33. Huang, D. *u. a.* *Optical coherence tomography*. *Science Reports* **254**, (1991).
  34. Schmitt, J. Optical Coherence Tomography (OCT): A Review. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **5**, 1205–1215 (1999).
  35. Haisch, C. & Niessner, R. Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Res.* **41**, 2467–2472 (2007).
  36. Xi, C., Marks, D., Schlachter, S., Luo, W. & Boppart, S. A. High-resolution three-dimensional imaging of biofilm development using optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* **11**, 34001/1-034001/6 (2006).
  37. Wagner, M. & Horn, H. Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive

- review. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1386–1402 (2017).
38. Zeiss. Konfokale Mikroskope. Verfügbar unter: <https://www.zeiss.de/mikroskopie/confocal.html>. (Zugegriffen: 17. August 2020)
39. Ganymede Series SD-OCT Systems. Verfügbar unter: <https://www.thorlabs.com/>. (Zugegriffen: 17. August 2020)
40. Fitzsimmons, R. E. *u. a.* Generating vascular channels within hydrogel constructs using an economical open-source 3D bioprinter and thermoreversible gels. *Bioprinting* **9**, 7–18 (2018).
41. Depetris, A. *u. a.* Automated 3D Optical Coherence Tomography to Elucidate Biofilm Morphogenesis Over Large Spatial Scales. *J. Vis. Exp.* 1–8 (2019). doi:10.3791/59356
42. Gierl, L., Stoy, K., Faína, A., Horn, H. & Wagner, M. An open-source robotic platform that enables automated monitoring of replicate biofilm cultivations using optical coherence tomography. *npj Biofilms Microbiomes* **18**, 1–9 (2020).
43. Stoy, K. EVOBLISS Project. Verfügbar unter: <https://blogit.itu.dk/evoblissproject/>. (Zugegriffen: 17. August 2020)
44. Nejatimoharrami, F. *u. a.* EvoBot : An Open-Source , Modular Liquid Handling Robot for Nurturing Microbial Fuel Cells. in *Proceedings of the Artificial Life Conference* 626–633 (2016).
45. Faiña, A., Nejadi, B. & Stoy, K. Evobot: An open-source, modular, liquid handling robot for scientific experiments. *Appl. Sci.* **10**, (2020).
46. Cejkova, J. EVOBLISS Project. Verfügbar unter: <https://blogit.itu.dk/evoblissproject/author/jitka/>. (Zugegriffen: 17. August 2020)
47. Hansen, S. H. *u. a.* Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
48. Christensen, F. R., Kristensen, G. H. & la Cour Jansen, J. Biofilm structure - An important and neglected parameter in waste water treatment. in *Water Science and Technology* **21**, 805–814 (Pergamon, 1988).
49. Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J. P. & Beauregard, P. B. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–10 (2019).
50. Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. From The Cover: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11076–11081 (2005).
51. Blauert, F. Investigating biofilm deformation using optical coherence tomography and fluid-structure interaction simulation. *Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)* **Band 72**, (2017).
52. Blauert, F., Horn, H. & Wagner, M. Time-resolved biofilm deformation measurements using optical coherence tomography. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1893–1905 (2015).
53. Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D. & Lappin-scott, H. M. Structural Deformation of Bacterial Biofilms Caused by Short-Term Fluctuations in Fluid Shear : An In Situ Investigation of Biofilm Rheology. (1999).
54. Aravas, N. & Lapidou, C. S. On the Calculation of the Elastic Modulus of a Biofilm Streamer. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 196–200 (2008).
55. Picioreanu, C., Blauert, F., Horn, H. & Wagner, M. Determination of mechanical properties of

- biofilms by modelling the deformation measured using optical coherence tomography. *Water Res.* **145**, 588–598 (2018).
56. Azeredo, J. *u. a.* Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **0**, 1–39 (2016).
57. Pogiatis, T. A., Vassiliadis, V. S., Mergulhão, F. J. & Wilson, D. I. When to clean, how to clean: Biofilms. *Heat Exch. Fouling Clean.* 178–186 (2013).
58. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80- )*. **284**, 1318–1322 (1999).
59. Laufende Projekte der Wasserchemie am KIT. Verfügbar unter: <https://wasserchemie.ebi.kit.edu/208.php>. (Zugegriffen: 18. August 2020)
60. Schindelin, J. *u. a.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
61. Rueden, C. T. *u. a.* ImageJ2 : ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 1–26 (2017).
62. Boyle, R. & Thomas, R. Computer Vision: A First Course. in 32–34 (Blackwell Scientific Publications, 1988).
63. Davies, E. Machine Vision: Theory, Algorithms and Practicalities. in (Academic Press, 1990).
64. Vernon, D. Machine Vision. in (Prentice-Hall, 1991).
65. *Advances in Computer Vision and Information Technology*. (Makhijani, Krishan, 2007).
66. Gross, D., Hauger, W., Schröder, J., Wall, W. A. & Rajapakse, N. Center of Gravity, Center of Mass, Centroids. in *Engineering Mechanics* 189–116 (2013).
67. Möller, B., Glaß, M., Misiak, D. & Posch, S. MiToBo – A Toolbox for Image Processing and Analysis. *J. Open Res. Softw.* **4**, 6–11 (2016).
68. Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. & Lewandowski, Z. Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbiol. Methods* **39**, 109–119 (2000).
69. Wagner, M. Anwendung und Vergleich bildgebender Verfahren zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der Struktur von Biofilmen in der Mikro- und Mesoskala. *Berichte aus der Siedlungswasserwirtschaft Technische Universität München 2011* (Technische Universität München, 2011). doi:ISSN 0942-914X
70. Beyenal, H., Donovan, C., Lewandowski, Z. & Harkin, G. Three-dimensional biofilm structure quantification. *J. Microbiol. Methods* **59**, 395–413 (2004).
71. Faina, A. *u. a.* EvoBot: An Open-Source, Modular Liquid Handling Robot for Nurturing Microbial Fuel Cells. 626–633 (2016). doi:10.7551/978-0-262-33936-0-ch099
72. Dervaux, J., Magniez, J. C. & Libchaber, A. On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilms. *Interface Focus* **4**, 1–12 (2014).
73. Wang, X., Wang, G. & Hao, M. Modeling of the *bacillus subtilis* bacterial biofilm growing on an agar substrate. *Comput. Math. Methods Med.* **2015**, 1–10 (2015).
74. Si, T. *u. a.* Characterization of *bacillus subtilis* colony biofilms via mass spectrometry and fluorescence imaging. *J. Proteome Res.* **15**, 1955–1962 (2016).
75. Sternberg, C. & Tolker-Nielsen, T. Growing and Analyzing Biofilms in Flow Cells. *Curr. Protoc. Microbiol.* 1–15 (2006). doi:10.1002/9780471729259.mc01b02s00

76. Urbance, S. E., Pometto, A. L., DiSpirito, A. A. & Demirci, A. Medium evaluation and plastic composite support ingredient selection for biofilm formation and succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Food Biotechnol.* **17**, 53–65 (2003).
77. Huang, Z. *u. a.* Shear-induced detachment of biofilms from hollow fiber silicone membranes. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 525–534 (2013).
78. Demirci, A., Pometto, A. L. I. & Ho, K. L. G. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 299–304 (1997).
79. Majewsky, M., Wagner, M. & Farlin, J. Do you reckon it's normally distributed? *Sci. Total Environ.* **548–549**, 408–409 (2016).
80. Wilson VanVoorhis, C. R. & Morgan, B. L. Understanding Power and Rules of Thumb for Determining Sample Sizes. *Tutor. Quant. Methods Psychol.* **3**, 43–50 (2007).
81. Turonova, H. *u. a.* Biofilm spatial organization by the emerging pathogen *Campylobacter jejuni* : comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-enriched conditions. *Front. Microbiol.* **6**, 1–11 (2015).
82. Bester, E., Wolfaardt, G. M., Aznavah, N. B. & Greener, J. Biofilms' Role in Planktonic Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21965–21982 (2013).
83. Sauer, K., Steczko, J. & Ash, S. R. Zuragen™, an Antimicrobial/ Antithrombotic Solution, is Effective Against Mature *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 937–945 (2009).
84. Koseki, H., Yonekura, A., Shida, T., Yoda, I. & Horiuchi, H. Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: In Vitro Study. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
85. Pelchovich, G., Omer-Bendori, S. & Gophna, U. Menaquinone and iron are essential for complex colony development in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).
86. Kolodkin-Gal, I. *u. a.* Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase. *Genes Dev.* **27**, 887–899 (2013).
87. Purevdorj, B., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Influence of Hydrodynamics and Cell Signaling on the Structure and Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Influence of Hydrodynamics and Cell Signaling on the Structure and Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4457–4464 (2002).
88. Manz, B., Volke, F., Goll, D. & Horn, H. Measuring Local Flow Velocities and Biofilm Structure in Biofilm Systems With Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 424–432 (2003).
89. Allen, A., Habimana, O. & Casey, E. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **165**, 127–134 (2018).
90. Safari, A., Tukovic, Z., Walter, M., Casey, E. & Ivankovic, A. Mechanical properties of a mature biofilm from a wastewater system : from microscale to macroscale level. *Biofouling* **31**, 651–664 (2015).
91. Rupp, C. J., Fux, C. A. & Stoodley, P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2175–2178 (2005).

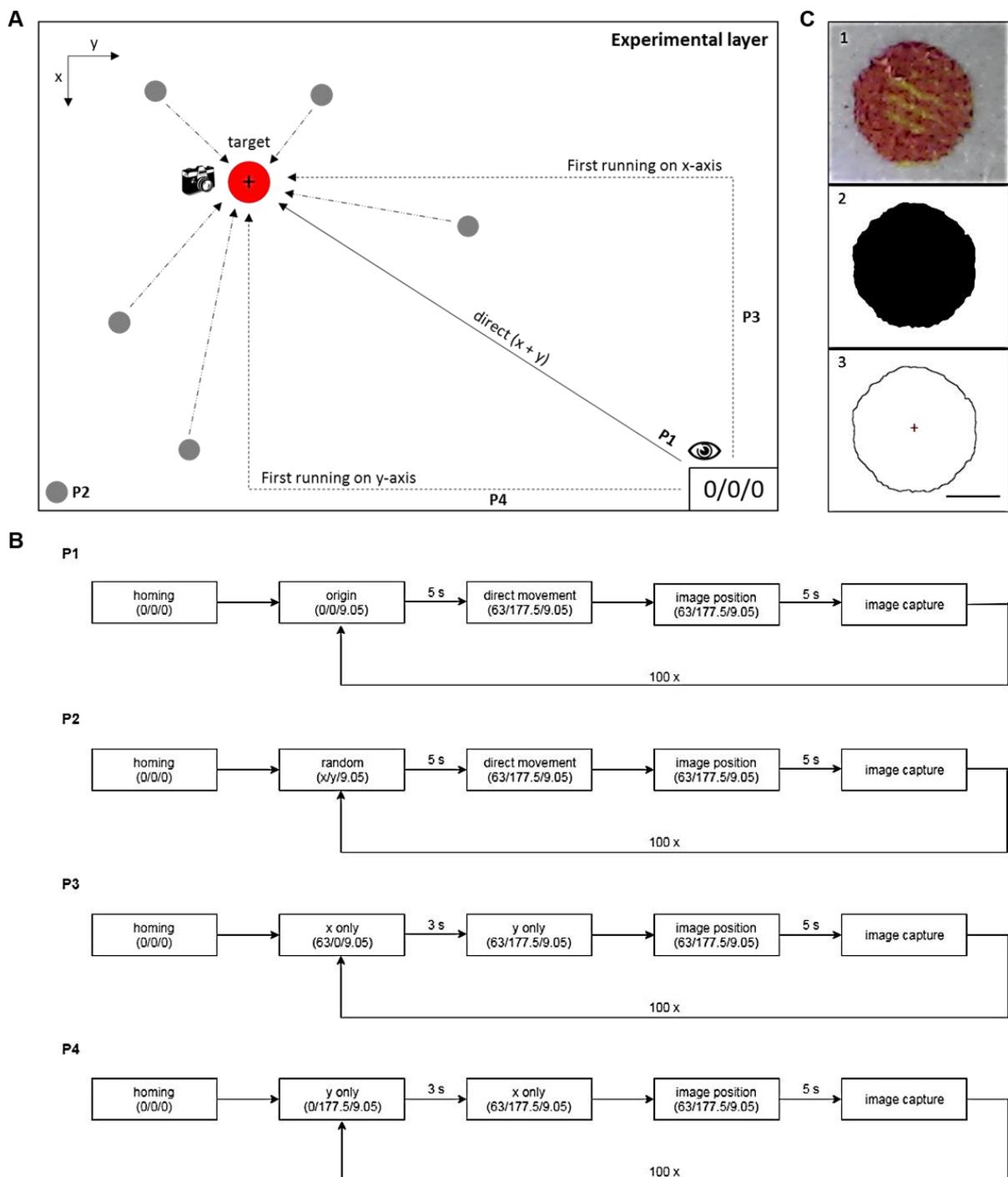
92. Peterson, B. W. *u. a.* Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 234–245 (2015).
93. Towler, B. W., Rupp, C. J., Cunningham, A. L. B. & Stoodley, P. Viscoelastic Properties of a Mixed Culture Biofilm from Rheometer Creep Analysis. *Biofouling* **19**, 279–285 (2003).
94. Dytham, C. *Choosing and Using Statistics A Biologist's Guide.* (Wiley-Blackwell, 2011).
95. Staudt, C. Entwicklung der Struktur von Biofilmen. (2005).
96. Kang, D. & Kirienko, N. V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* **56**, 449–457 (2018).
97. Oh, E., Andrews, K. J. & Jeon, B. Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018).
98. Günzler, H. & Gremlich, H.-U. *IR-Spektroskopie Eine Einführung.* (Wiley-VCH, 2003).
99. Wei, Y. *u. a.* Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Eng.* **27**, 632–637 (2012).
100. Wan Nor, W. F. K., Soh, S. K. C., Azmi, A. A. R., Yusof, M. S. M. & Shamsuddin, M. Synthesis and physicochemical properties of magnetite nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) as potential solid support for homogeneous catalysts. *Malaysian J. Anal. Sci.* **22**, 768–774 (2018).
101. Mei, L., Liao, L., Wang, Z. & Xu, C. Interactions between phosphoric/tannic acid and different forms of FeOOH. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2015**, 1–10 (2015).
102. Dutcher, B. *u. a.* Use of nanoporous FeOOH as a catalytic support for NaHCO<sub>3</sub> decomposition aimed at reduction of energy requirement of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> based CO<sub>2</sub> separation technology. *J. Phys. Chem. C* **115**, 15532–15544 (2011).
103. Litescu, S.-C., Teodor, E. D., Truica, G.-I., Tache, A. & Radu, G.-L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Useful Analytical Tool for Non-Destructive Analysis. in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology* 510 (2012). doi:10.5772/36428
104. Unger, M. Infrarot-spektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der thermischen und mechanischen Eigenschaften biologisch abbaubarer Polymere. (Duisburg-Essen, 2009).
105. Benyettou, F., Milosevic, I., Motte, L. & Olsen, J. Ultra-Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Made to Order. *J. Bioanal. Biomed.* **S5**, 1–6 (2012).
106. Filip, Z., Hermann, S. & Demnerová, K. FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Escherichia coli*. *Czech J. Food Sci.* **26**, 458–463 (2008).
107. Luther, H. & Günzler, H. Die Molekülschwingungsspektren des Naphthalins und seiner Derivate. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* 445–457 (1955). doi:10.1515/znb-1955-0808
108. Namduri, H. & Nasrazadani, S. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. *Corros. Sci.* **50**, 2493–2497 (2008).
109. Salzer, R., Thiele, S., Suemmenchen, L. & Machill, S. Übersicht über die Schwingungen von Carbonsäuren (Dimere). *Chemgapedia* Verfügbar unter: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/ir\\_spek/cho\\_verbindungen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/ir\\_spek/schwspek/spektreninterpretation/ir\\_13\\_4\\_7\\_3/carbonacid.vscml/Supplement/5.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/ir_spek/cho_verbindungen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/ir_spek/schwspek/spektreninterpretation/ir_13_4_7_3/carbonacid.vscml/Supplement/5.html). (Zugegriffen: 17. August 2020)
110. Ulfa, D. K. & Ulfa, M. Kinetics Performance for Cadmium (II) Ion Adsorption using Mesoporous

- Silica Embedded with Iron Oxide. *Orient. J. Chem.* **35**, 20–27 (2019).
111. Sodipo, B. K. & Azlan, A. A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles incorporated into silica nanoparticles by inelastic collision via ultrasonic field: Role of colloidal stability. *AIP Conf. Proc.* **1657**, (2015).
112. Hwang, S. W., Umar, A., Dar, G. N., Kim, S. H. & Badran, R. I. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles for phenyl hydrazine sensor applications. *Sens. Lett.* **12**, 97–101 (2014).
113. Malathi, A., Arunachalam, P., Madhavan, J., Al-Mayouf, A. M. & Ghanem, M. A. Rod-on-flake  $\alpha$ -FeOOH/BiOI nanocomposite: Facile synthesis, characterization and enhanced photocatalytic performance. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 435–445 (2018).  
doi:10.1016/j.colsurfa.2017.10.036
114. Kalz, W. & Homborg, H. Eisen(III)phthalocyanine: Darstellung und spektroskopische Charakterisierung von  $[\text{Fe}(\text{OR})_2\text{Pc}(-2)]^-$  (R = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), (FePc(-2))<sub>20</sub> und FeXPc(-2) (X = F, Cl, Br, I). *Zeitschrift für Naturforsch.* **38b**, 470–484 (1983).
115. Mosharaf, M. K. *u. a.* Metal-adapted bacteria isolated from wastewaters produce biofilms by expressing proteinaceous curli fimbriae and cellulose nanofibers. *Front. Microbiol.* **9**, 1–17 (2018).
116. Neu, T. R. *u. a.* Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 1–21 (2010).
117. Chan, C. S., Stasio, G. De, Welch, S. a, Fakra, S. & Banfield, J. F. Microbial Polysaccharides Template Assembly of Nanocrystal Fibers. *Science (80-. )*. **303**, 1656–1658 (2004).
118. Omoike, A., Chorover, J., Kwon, K. D. & Kubicki, J. D. Adhesion of bacterial exopolymers to  $\alpha$ -FeOOH: Inner-sphere complexation of phosphodiester groups. *Langmuir* **20**, 11108–11114 (2004).
119. Florea, L. J. *u. a.* Iron oxide and calcite associated with *Leptothrix* sp. biofilms within an estavelle in the upper Floridan aquifer. *Int. J. Speleol.* **40**, 205–219 (2011).
120. Ivleva, N. P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R. & Haisch, C. Raman microscopy and surface-enhanced Raman scattering (SERS) for in situ analysis of biofilms. *J. Biophotonics* **3**, 548–556 (2010).
121. Gunawardana, B., Singhal, N. & Swedlund, P. Degradation of chlorinated phenols by zero valent iron and bimetals of iron: A review. *Environ. Eng. Res.* **16**, 187–203 (2011).
122. Anthony, J. W., Bideaux, R. A., Bladh, K. W. & Nichols, M. C. *Handbook of Mineralogy*.
123. Yakabuskie, P. A. *u. a.* Iron oxyhydroxide colloid formation by gamma-radiolysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 7198–7206 (2011).
124. Wei, Y. *u. a.* Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Eng.* **27**, 632–637 (2012).
125. Song, Y., Jiang, G., Chen, Y., Zhao, P. & Tian, Y. Effects of chloride ions on corrosion of ductile iron and carbon steel in soil environments. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
126. Guélon, T., Mathias, J. & Stoodley, P. Advances in Biofilm Mechanics. in *Biofilm Highlights* **5**, 111–139 (2011).
127. O'Rourke, J. Finding minimal enclosing boxes. *Int. J. Comput. Inf. Sci.* **14**, 183–199 (1985).
128. Reagan, M. M., Gleason, A. E., Daemen, L., Xiao, Y. & Mao, W. L. High-pressure behavior of the polymorphs of FeOOH. *Am. Mineral.* **101**, 1483–1488 (2016).

129. Arnauteli, S., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 7–12 (2016).
130. Falcón García, C. *u. a.* Metal ions weaken the hydrophobicity and antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* NCIB 3610 biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* **6**, (2020).
131. Lopez, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 152–163 (2009).
132. Klotz, M., Kretschmer, M., Goetz, A., Ezendam, S. & Lieleg, O. Importance of the biofilm matrix for the erosion stability of *Bacillus subtilis* NCIB 3610 biofilms. *RSC Adv.* **9**, 11521–11529 (2019).
133. Jafari, M. *u. a.* Biofilm compressibility in ultrafiltration: A relation between biofilm morphology, mechanics and hydraulic resistance. *Water Res.* **157**, 335–345 (2019).
134. Vinogradov, A. M., Winston, M., Rupp, C. J. & Stoodley, P. Rheology of biofilms formed from the dental plaque pathogen *Streptococcus mutans*. *Biofilms* **1**, 49–56 (2004).
135. Merkel, M. & Öchsner, A. *Eindimensionale Finite Elemente - Ein Einstieg in die Methode*. (Springer Vieweg, 2014).
136. Qian, J. Investigation of the fouling driving factors in drip irrigation systems. *Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)* **Band 71**, (2017).
137. Dreszer, C. *u. a.* In-situ biofilm characterization in membrane systems using Optical Coherence Tomography : Formation , structure , detachment and impact of flux change ScienceDirect In-situ biofilm characterization in membrane systems using Optical Coherence Tomography : *Water Res.* **67**, 243–254 (2014).
138. Derlon, N. *u. a.* The composition and compression of biofilms developed on ultrafiltration membranes determine hydraulic biofilm resistance. *Water Res.* **102**, 63–72 (2016).
139. Telgmann, U., Horn, H. & Morgenroth, E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res.* **38**, 3671–3684 (2004).
140. Boudarel, H., Mathias, J. D., Blaysat, B. & Grédiac, M. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *npj Biofilms Microbiomes* **17**, 1–15 (2018).
141. Böl, M., Ehret, A. E., Bolea Albero, A., Hellriegel, J. & Krull, R. Recent advances in mechanical characterisation of biofilm and their significance for material modelling. *Crit. Rev. Biotechnol.* **33**, 145–171 (2013).
142. Rau, G. & Ströbel, R. *Die Metalle: Werkstoffkunde mit ihren chemischen und physikalischen Grundlagen*. (Verlag Neuer Merkur GmbH, 2004).
143. Späth, W. *Physik und Technik der Härte und Weiche*. (Springer, 1940).
144. Wriggers, P. *Nichtlineare Finite-Element-Methoden*. (Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001).
145. Klein, B. *FEM: Grundlagen und Anwendungen der Finite-Elemente-Methode*. (Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, 2013).
146. Roesler, J., Harders, H. & Baeker, M. *Mechanical Behaviour of Engineering Materials*. (Springer Berlin Heidelberg New York, 2006).
147. Patten, J. *u. a.* A Multi-scale Biophysical Approach to Develop Structure-Property Relationships in

- Oral Biofilms. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
148. Zrelli, K. *u. a.* Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death. *New J. Phys.* **15**, 1–17 (2013).
149. Galy, O. *u. a.* Mapping of Bacterial Biofilm Local Mechanics by Magnetic Microparticle Actuation. *Biophysj* **103**, 1400–1408 (2012).
150. Ohashi, A. & Harada, H. A novel concept for evaluation of biofilm adhesion strength by applying tensile force and shear force. *Water Sci. Technol.* **34**, 201–211 (1996).
151. Lau, P. C. Y., Dutcher, J. R., Beveridge, T. J. & Lam, J. S. Absolute Quantitation of Bacterial Biofilm Adhesion and Viscoelasticity by Microbead Force Spectroscopy. *Biophys. J.* **96**, 2935–2948 (2009).
152. Du, Z., Zhang, Y., Zhang, W. & Guo, X. A new computational framework for materials with different mechanical responses in tension and compression and its applications. *Int. J. Solids Struct.* **100–101**, 54–73 (2016).
153. Kundukad, B. *u. a.* Mechanical properties of the superficial biofilm layer determine the architecture of biofilms. *Soft Matter - Royal Soc. Chem.* **12**, 5718–5726 (2016).
154. Boller, M. & Blaser, S. Particles under Stress. *Water Sci. Technol.* **37**, 9–29 (1998).
155. Francois, R. J. Strength of Aluminium Hydroxide Floccs. *Water Res.* **21**, 1023–1030 (1987).

## Anhang



## Anhang A

A) Schema der Verfahrensweise zur Analyse der Positioniergenauigkeit. B) Skizze der Experimente P1-P4 zur Erläuterung der individuellen Schritte. C) Bildbearbeitungsschritte der Aufnahmen: 1 = Original; 2 = Binärbild; 3 = analysiertes Zielobjekt; das rote Kreuz indiziert das determinierte Zentrum der Masse. Der Maßstab besitzt eine Länge von 0,5 mm.

# Wasserqualität des Trinkwassers aus den Karlsruher Wasserwerken



## Jahresmittelwerte 2018

Untersuchungslabor: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe

Die Grenzwerte entsprechen der aktuellen Fassung der Trinkwasserverordnung (TrinkwV)

### Mikrobiologische Parameter (TrinkwV - Anlage 1: Teil I)

Parameter	Grenzwert (Anz./100 ml)	Mittelwert (Anz./100 ml)
Escherichia coli (E. coli)	0	0
Enterokokken	0	0

### Chemische Parameter, deren Konzentration sich im Verteilungsnetz einschließlich der Trinkwasser-Installation in der Regel nicht mehr erhöht (TrinkwV - Anlage 2: Teil I)

Parameter	Grenzwert (mg/l)	Mittelwert (mg/l)
Acrylamid	0,00010	n.a. <sup>1</sup>
Benzol	0,0010	< 0,0001
Bor	1,0	0,02
Bromat	0,010	< 0,001
Chrom	0,050	< 0,0005
Cyanid	0,050	< 0,01
1,2-Dichlorethan	0,0030	< 0,0001
Fluorid	1,5	0,06
Nitrat	50	3,3
Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und Biozidprodukt-Wirkstoffe	0,00010 <sup>2</sup>	n.b.
Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und Biozidprodukt-Wirkstoffe insgesamt	0,00050	n.b.
Quecksilber	0,0010	< 0,00005
Selen	0,010	< 0,001
Tetrachlorethen und Trichlorethen	0,010	n.b.
Uran	0,010	0,0012

### Chemische Parameter, deren Konzentration im Verteilungsnetz einschließlich der Trinkwasser-Installation ansteigen kann (TrinkwV - Anlage 2: Teil II)

Parameter	Grenzwert (mg/l)	Mittelwert (mg/l)
Antimon	0,0050	< 0,001
Arsen	0,010	< 0,001
Benzo-(a)-pyren	0,000010	< 0,000002
Blei	0,010	< 0,001
Cadmium	0,0030	< 0,0001
Epichlorhydrin	0,00010	n.a. <sup>3</sup>
Kupfer	2,0	< 0,01
Nickel	0,020	< 0,001
Nitrit	0,50 <sup>4</sup>	< 0,01
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	0,00010	n.b.
Trihalogenmethane	0,050	n.a. <sup>5</sup>
Vinylchlorid	0,00050	n.a. <sup>6</sup>

1 Im Trinkwasser nicht enthalten, da kein Einsatz polyacrylamidhaltiger Flockungshilfsstoffe in der Trinkwasseraufbereitung der Stadtwerke Karlsruhe.

2 Der Grenzwert gilt jeweils für die einzelnen Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und Biozidprodukt-Wirkstoffe. Für Aldrin, Dieldrin, Heptachlor und Heptachlorepoxyd gilt der Grenzwert von 0,000030 mg/l.

3 Rechnerische Überprüfung nach Trinkwasserverordnung.

4 Am Ausgang des Wasserwerks darf der Wert von 0,10 mg/l für Nitrit nicht überschritten werden.

5 Keine Untersuchung erforderlich, da in der Trinkwasserversorgung der Stadtwerke Karlsruhe keine Chloresinfektion durchgeführt wird.

6 Im Trinkwasser nicht enthalten, da kein Einsatz von PVC-Rohren in der Trinkwasserverteilung der Stadtwerke Karlsruhe.

## Anhang B1

### Seite 1: Wasserqualität des Trinkwassers aus den Karlsruher Wasserwerken im Jahr 2018.

## Allgemeine Indikatorparameter (TrinkwV – Anlage 3)

Parameter	Einheit	Grenzwert (Anforderung)	Mittelwert
Aluminium	mg/l	0,200	< 0,02
Ammonium	mg/l	0,50	< 0,01
Chlorid	mg/l	250	22,6
Clostridium perfringens (einschließl. Sporen)	Anzahl/100 ml	0	n.a. <sup>7</sup>
Coliforme Bakterien	Anzahl/100 ml	0	0
Eisen	mg/l	0,200	< 0,01
Färbung (spektraler Absorptionskoeffizient Hg 436 nm)	m <sup>-1</sup>	0,5	< 0,1
Geruch (als TON)	–	3 bei 23 °C	< 1
Geschmack	Für den Verbraucher annehmbar und ohne anormale Veränderung		ohne
Koloniezahl bei 22 °C	Anzahl/ml	ohne anormale Veränderung	< 1
Koloniezahl bei 36 °C	Anzahl/ml	ohne anormale Veränderung	< 1
Elektrische Leitfähigkeit	µS/cm	2.790 bei 25 °C	661
Mangan	mg/l	0,050	< 0,005
Natrium	mg/l	200	11,0
Organisch gebundener Kohlenstoff (TOC)	mg/l	ohne anormale Veränderung	0,94
Oxidierbarkeit	mg/l O <sub>2</sub>	5,0	n.a. <sup>8</sup>
Sulfat	mg/l	250	49,5
Trübung	Nephelometrische Trübungseinheiten (NTU)	1,0	0,09
Wasserstoffionen-Konzentration	pH-Einheiten	≥ 6,5 und ≤ 9,5	7,23
Calcitlösekapazität	mg/l CaCO <sub>3</sub>	5	–
Calcitabscheidkapazität	mg/l CaCO <sub>3</sub>	–	19

## Stadtwerke Karlsruhe GmbH

Daxlander Straße 72  
76185 Karlsruhe  
Telefon 0721 599-3210

postbox@stadtwerke-karlsruhe.de

www.stadtwerke-karlsruhe.de

## Radioaktivitätsparameter (TrinkwV – Anlage 3a)

Parameter	Einheit	Parameterwert	Mittelwert
Radon-222	Bq/l	100	n.a. <sup>9</sup>
Tritium	Bq/l	100	n.a. <sup>9</sup>
Richtdosis	mSv/a	0,10	n.a. <sup>9</sup>

Zusätzlich überwachte Parameter<sup>10</sup>

Parameter	Einheit	Mittelwert
Calcium	mg/l	112
Magnesium	mg/l	9,7
Gesamthärte (Summe Calcium und Magnesium)	°dH mmol/l	17,8 3,18
Härtebereich <sup>11</sup>	–	hart
Basekapazität bis pH 8,2	mmol/l	0,66
Säurekapazität bis pH 4,3	mmol/l	5,32
Hydrogencarbonat	mg/l	322
Carbonathärte	°dH mmol/l	14,8 2,64
Sauerstoff	mg/l	8,0
Phosphat, gesamt	mg/l	< 0,01
Silicium	mg/l	5,4
Kalium	mg/l	1,7
Spektraler Absorptionskoeffizient (SAK) bei 254 nm	m <sup>-1</sup>	1,5

7 Dieser Parameter braucht nur bestimmt zu werden, wenn das Rohwasser von Oberflächenwasser stammt oder von Oberflächenwasser beeinflusst wird. Dies ist beim Trinkwasser der Stadtwerke Karlsruhe nicht der Fall.

8 Dieser Parameter braucht nicht bestimmt zu werden, wenn der Parameter TOC analysiert wird.

9 Bei der Erstuntersuchung des Trinkwassers der Stadtwerke Karlsruhe gemäß § 14a der Trinkwasserverordnung lagen die Mittelwerte für Radon-222 bei 9,2 Bq/l und für die Gesamt-Alpha-Aktivitätskonzentration bei 0,039 Bq/l. Entsprechend der Bewertung durch das Gesundheitsamt Karlsruhe sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich.

10 Nach Trinkwasserverordnung § 21 Absatz 1 und sonstige.

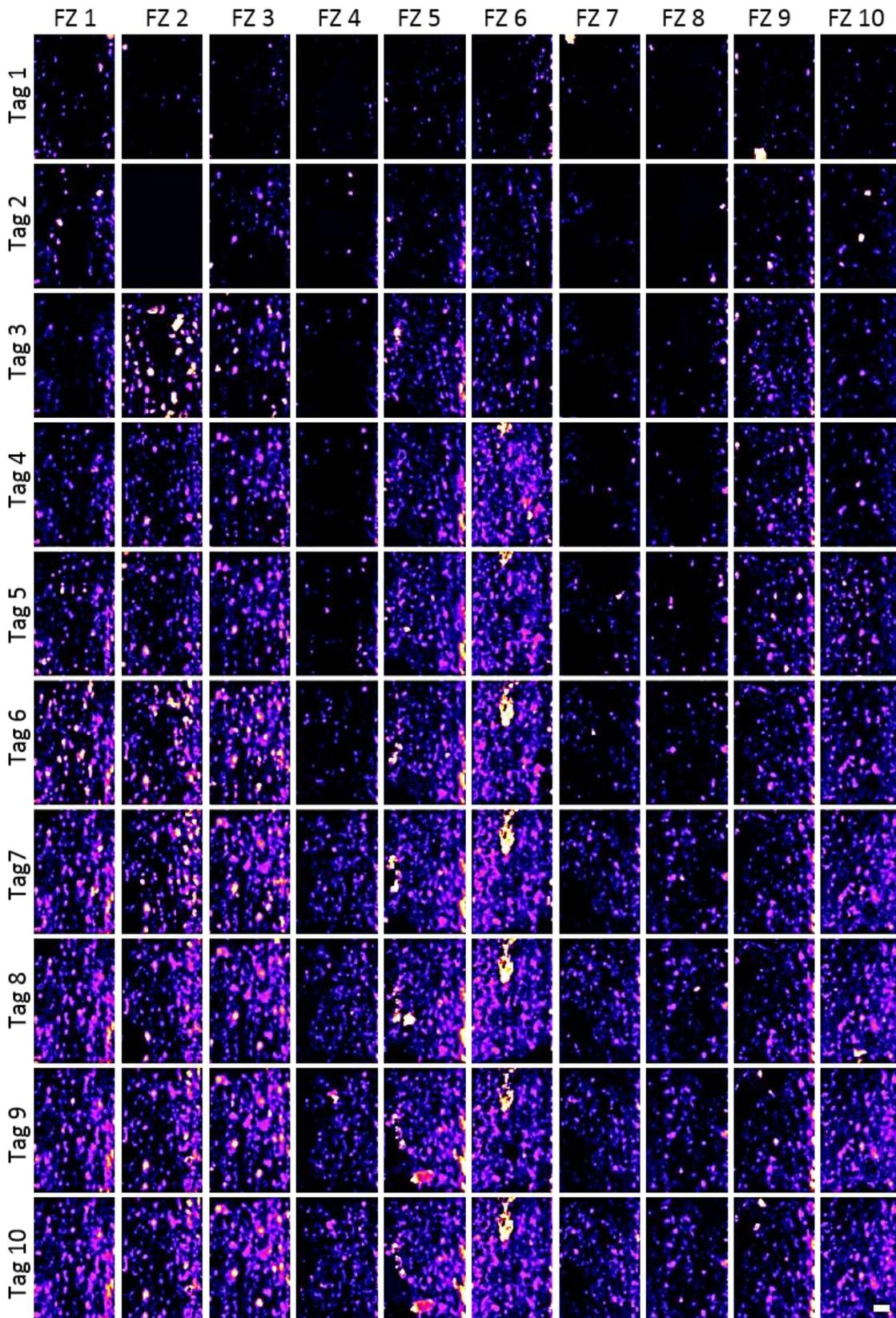
11 Nach Wasch- und Reinigungsmittelgesetz vom 29.04.2007.

n. a. = nicht analysiert

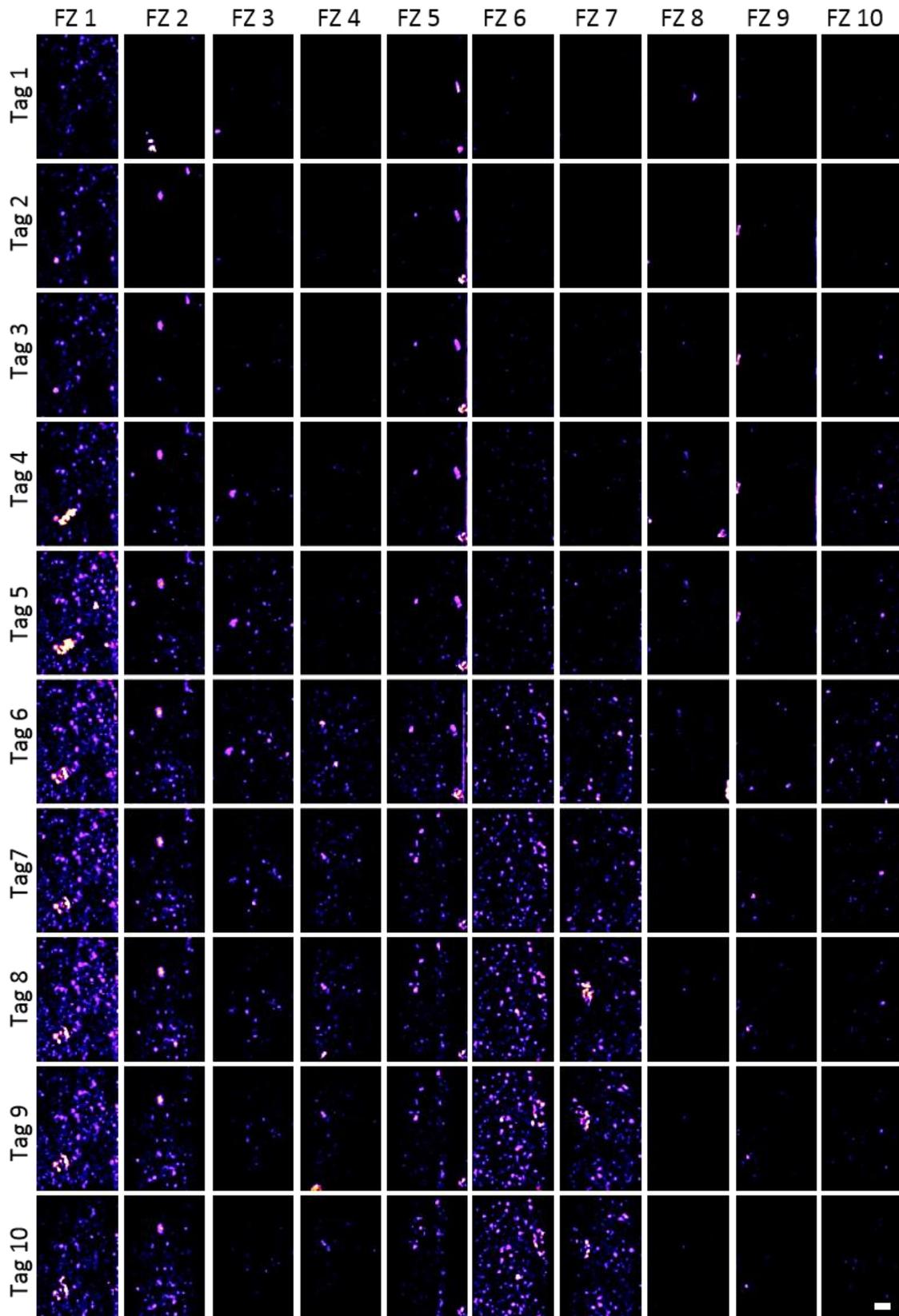
n. b. = nicht bestimmbar  
(Mittelwert liegt unterhalb der analytischen Bestimmungsgrenze der Einzelstoffe)

## Anhang B2

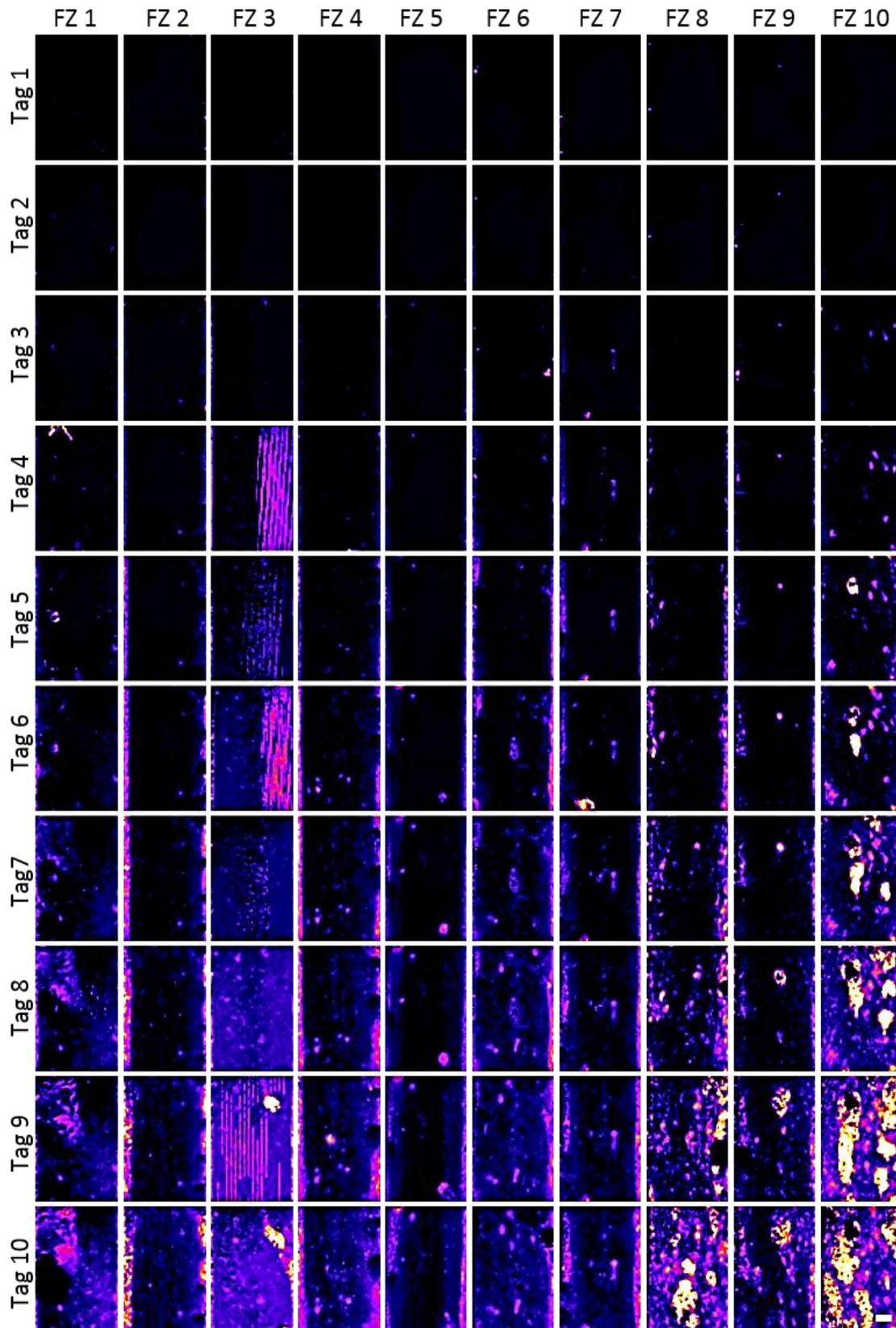
## Seite 2: Wasserqualität des Trinkwassers aus den Karlsruher Wasserwerken im Jahr 2018.

**Anhang C1**

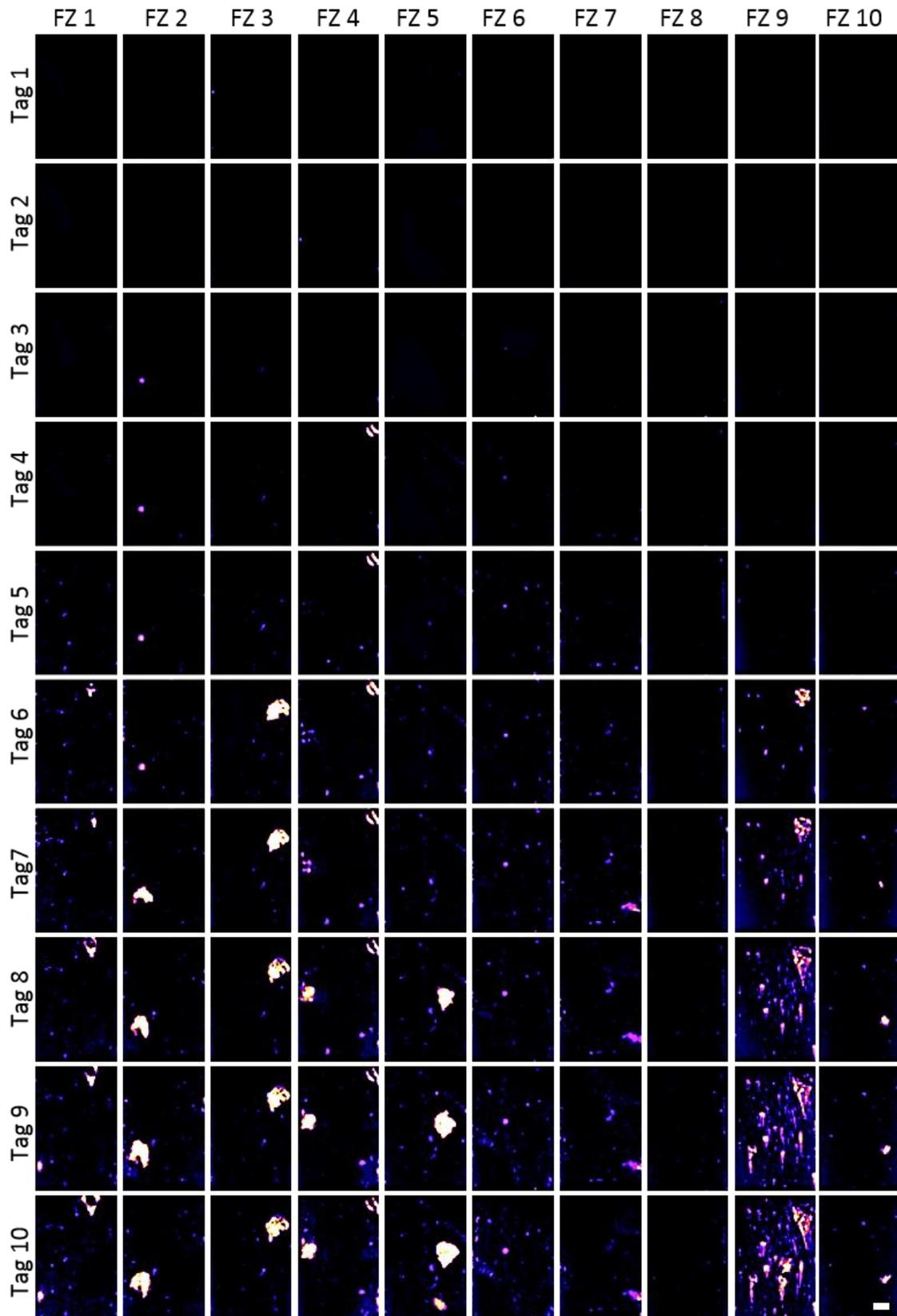
Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aller Replikate aus Versuch 1 ( $\beta_{Fe^{2+}} = 2,5 \text{ mg/L}$ ;  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) über eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Der Maßstab beträgt 1 mm.

**Anhang C2**

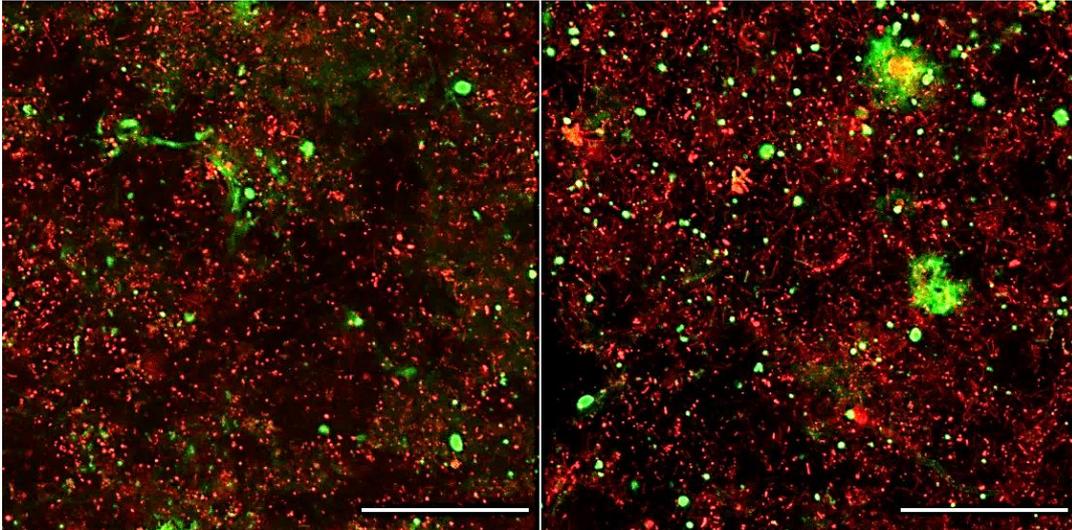
Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aller Replikate aus Versuch 2 ( $\beta_{Fe^{2+}} = 0,25 \text{ mg/L}$ ;  $Q = 1 \text{ mL/min}$ ) über eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Der Maßstab beträgt 1 mm.

**Anhang C3**

Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aller Replikate aus Versuch 3 ( $\beta_{Fe^{2+}} = 2,5 \text{ mg/L}$ ;  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) über eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Der Maßstab beträgt 1 mm. Die Artefakte in FZ 3 deuten auf Luftblasen hin.

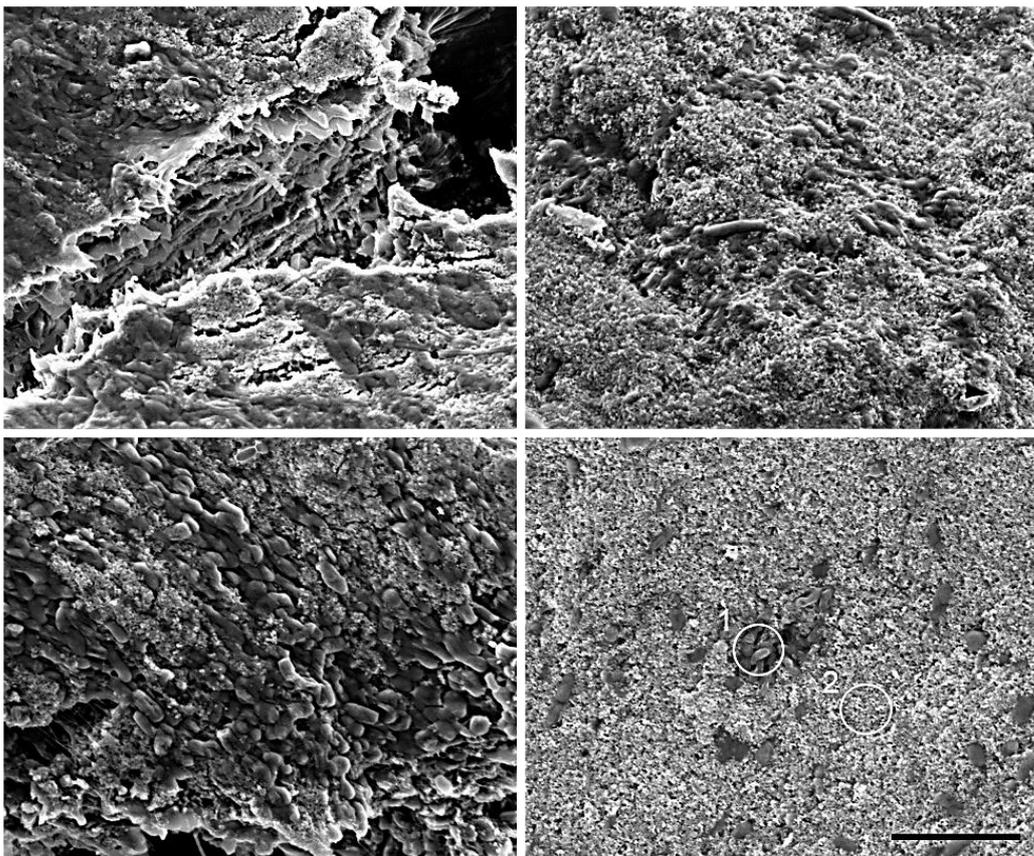
**Anhang C4**

Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aller Replikate aus Versuch 4 ( $\beta_{Fe^{2+}} = 0,25 \text{ mg/L}$ ;  $Q = 5 \text{ mL/min}$ ) über eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Der Maßstab beträgt 1 mm.



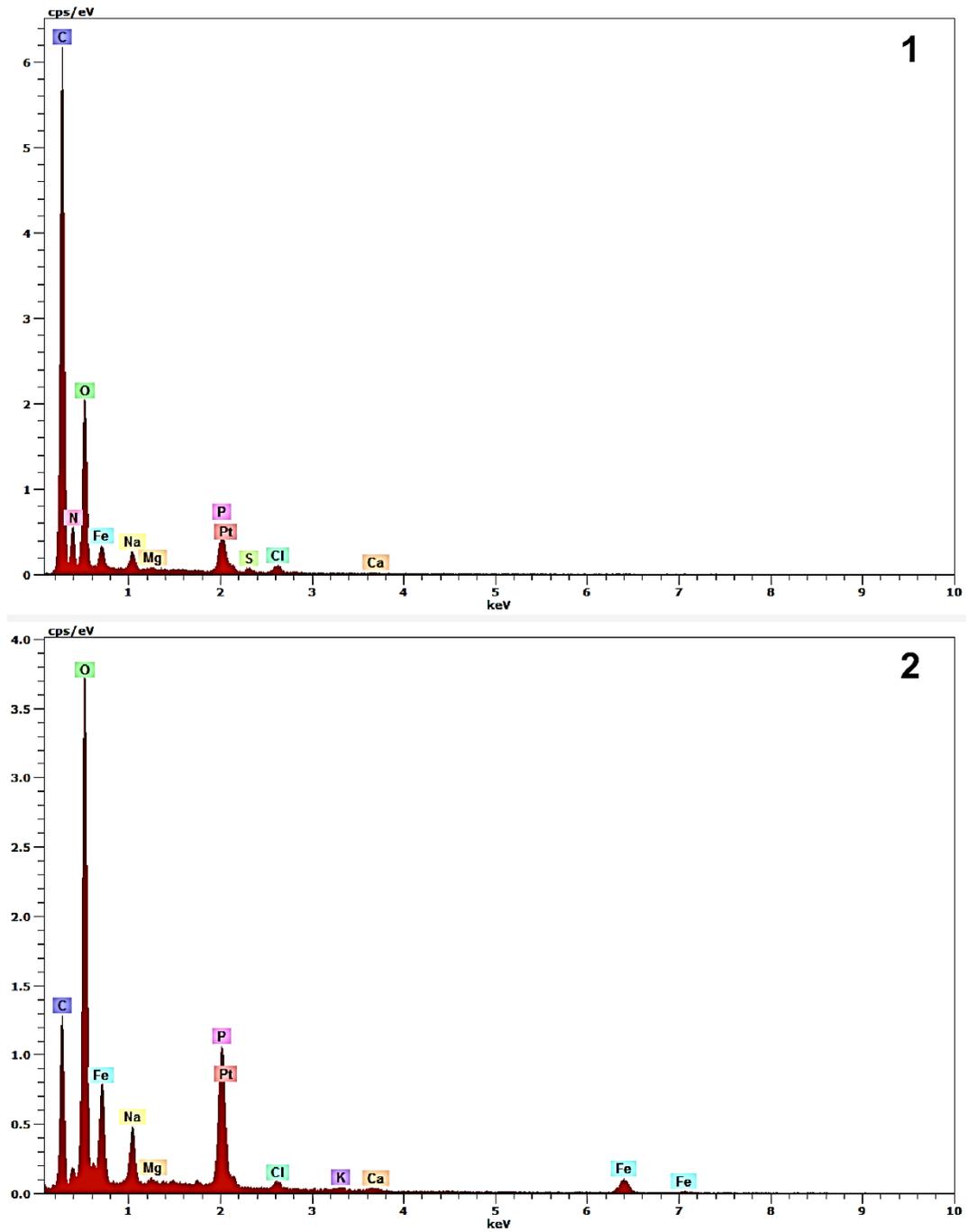
**Anhang D**

CLSM-Aufnahmen aus dem Wachstumsversuch V1 an Tag 10 (Zeiss LSM 700). Grüne Färbung = EPS-Glykokonjugate. Rote Färbung = Nukleinsäuren. Die Skalierungsbalken entsprechen 50  $\mu\text{m}$ .



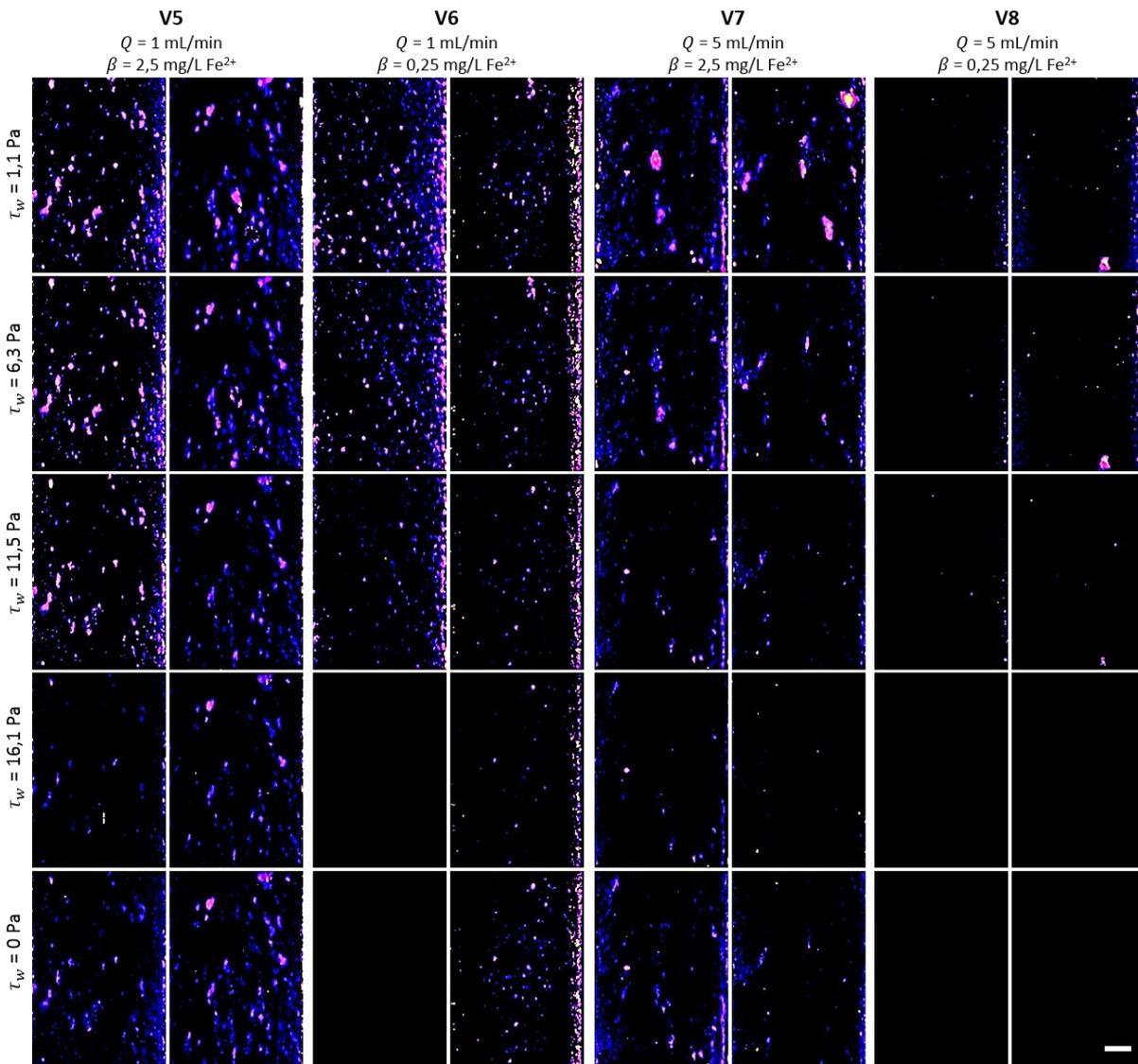
**Anhang E**

REM-Aufnahmen aus Vorversuchen. Der Maßstab beträgt 5  $\mu\text{m}$ . Die markierten Punkte 1 und 2 wurden in einer nachfolgenden EDX-Analyse untersucht.



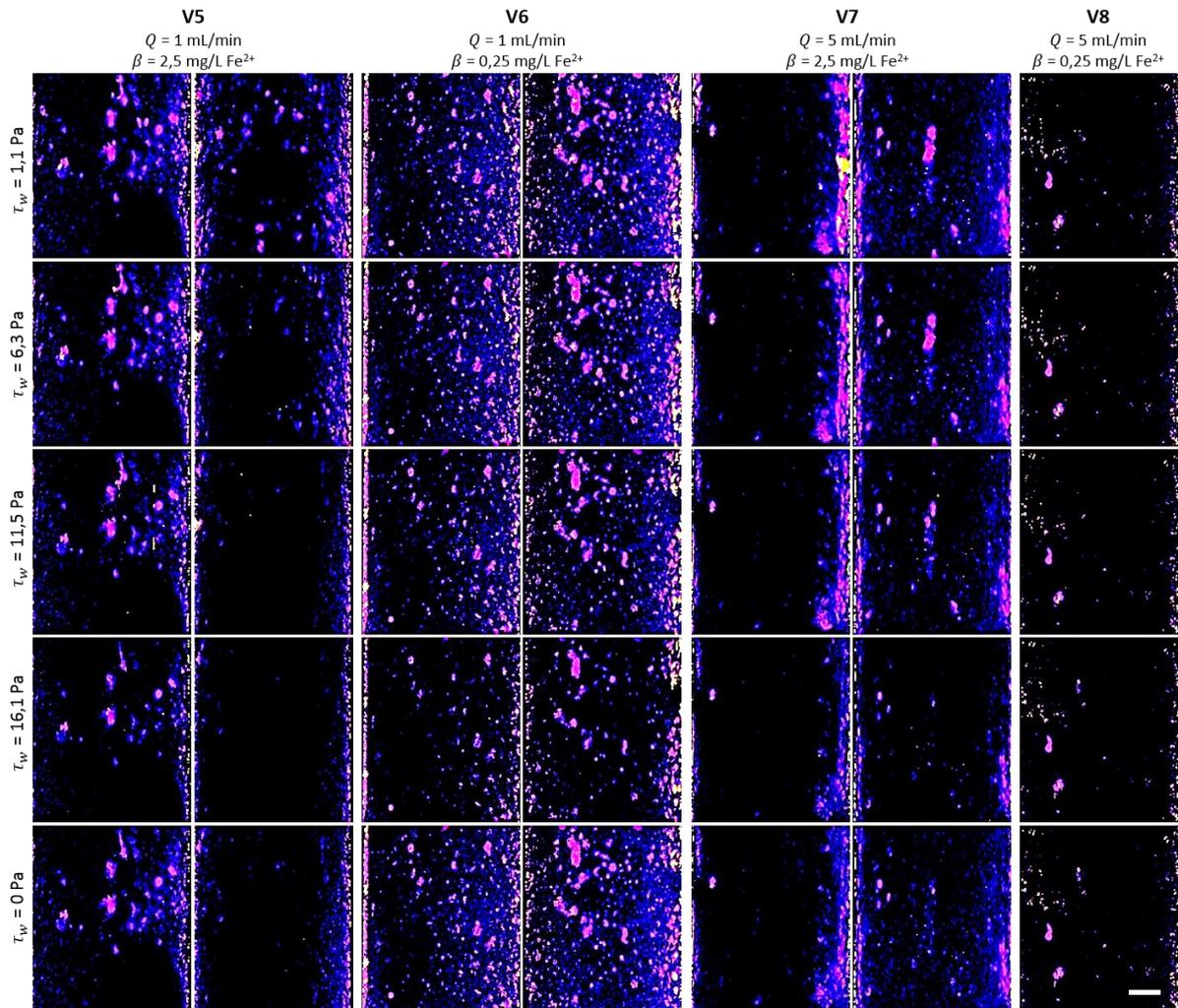
## Anhang F

EDX-Analyse zu den REM-Aufnahmen aus den Vorversuchen. 1 = Bakterielle Zellen. 2 = Mikroumgebung der Zellen.



Anhang G

Auswahl der Höhenprofile bei verschiedenen Scherbedingungen im ersten Deformationsversuch. Der Maßstab ist gegeben und beträgt  $100 \mu\text{m}$ . V5 und V7 zeigen die MIPs an Tag 6 der Kultivierung; V6 und V8 zeigen die MIPs an Tag 13 der Kultivierung.



## Anhang H

Auswahl der Höhenprofile bei verschiedenen Scherbedingungen im zweiten Deformationsversuch. Der Maßstab ist gegeben und beträgt  $100 \mu\text{m}$ . V5 und V7 zeigen die MIPs an Tag 6 der Kultivierung; V6 und V8 zeigen die MIPs an Tag 13 der Kultivierung.



Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und  
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

**Band 35:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE, 1997, 248 S., 12,80 €.

**Band 36:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE II, 2000, 265 S., 12,80 €.

**Band 37:** Thomas Brinkmann: Alkalischer und solarinduzierter Abbau von natürlicher organischer Materie, 2003, 212 S., 15,00 €.

**Band 38:** Andreas Gorenflo: Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration, 2003, 219 S., 18,00 €.

**Band 39:** Philip Hörsch: Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern, 2004, 210 S., 20,00 €.

**Band 40:** Margit B. Müller: Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern, 2004, 185 S., 18,00 €.

**Band 41:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 2004, 158 S., 18,00 €.

**Band 42:** Tusnelda E. Doll: Photochemischer und photokatalytischer Abbau von Carbamazepin, Clofibrinsäure, Iomeprol und Iopromid, 2004, 158 S., 18,00 €.

**Band 43:** Ayşe B. Değer: Entfernung von organischen Schadstoffen aus Wasser mit Hilfe von Poly( $\epsilon$ -caprolacton), 2005, 205 S., 18,00 €.

**Band 44:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Wassertechnologisches und wasserchemisches Praktikum, 2005, 201 S., 20,00 €.

**Band 45-I, 45-II:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun (Eds.): Humic Substances – Linking Structure to Functions. Proceedings of the 13<sup>th</sup> Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, Universität Karlsruhe, 2006, 492 S. (45-I), 623 S. (45-II), 50,00 €.

**Band 46:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen II, 2. verbesserte und ergänzte Neuauflage 2007, 139 S., 20,00 €.

**Band 47:** Thomas Glauner: Aufbereitung von Schwimmbeckenwasser – Bildung und Nachweis von Desinfektionsnebenprodukten und ihre Minimierung mit Membran- und Oxidationsverfahren, 2007, 233 S., 20,00 €.

**Band 48:** George Metreveli: Kolloidale Wechselwirkungen und kolloidgetragener Transport von Metall(oid)en in porösen Medien, 2008, 215 S., 20,00 €.

**Band 49:** Florencia Saravia: Entfernung von organischen Spurenstoffen und Untersuchung von Foulingprozessen in getauchten Membranen und Hybridverfahren, 2009, 213 S., 20,00 €.

**Band 50:** Markus Delay: Dynamische versus statische Elutionsversuche – Ein Beitrag zur Beurteilung der Wiederverwertbarkeit von Abfallmaterialien, 2010, 206 S., 20,00 €.

**Band 51:** Luis A. Tercero Espinoza: Heterogeneous photocatalysis with titanium dioxide suspensions containing bromide and dissolved organic matter, 2010, 172 S., 20,00 €.

**Band 52:** Ulrich-M. Metzger: Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen – Aufklärung von Strukturen und ihr Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren, 2011, 211 S., 20,00 €.

**Band 53:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 3. überarbeitete Neuauflage 2011, 139 S., 20,00 €.

**Band 54:** Markus Ziegmann: Beurteilung von Cyanobakterienblüten und Untersuchung geeigneter Verfahrenskombinationen zur Elimination cyanobakterieller Zellen und Toxine, 2011, 191 S., 20,00 €.

**Band 55:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 4. ergänzte Neuauflage 2012, 137 S., 20,00 €.

**Band 56:** Angela Klüpfel: Nanofiltration bei der Aufbereitung von Trink- und Schwimmbeckenwasser – Foulingmechanismen und Rückhalt anthropogener Kontaminanten, 2012, 259 S., 20,00 €.

**Band 57:** Christina Schmalz: Bildung, Phasentransfer und Toxizität halogener Desinfektionsnebenprodukte im Aufbereitungszyklus von Schwimmbeckenwasser – Schwerpunkt stickstoffhaltige Verbindungen, 2012, 195 S., 20,00 €.

**Band 58:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 5. ergänzte Neuauflage 2013, 120 S., 20,00 €.

**Band 59:** Heiko Schwegmann: Wechselwirkungen zwischen anorganischen Nanopartikeln und Mikroorganismen – Nutzungs- und Gefährdungspotentiale, 2013, 149 S., 20,00 €.

**Band 60:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 6. Überarbeitete Neuauflage 2014, 129 S., 20,00 €.

**Band 61:** Carsten Jobelius: Anaerobe Metabolite organischer Schadstoffe im Grundwasser - Analytik, Bildung und Nutzung als Indikatoren, 2014, 247 S., 20,00 €.

**Band 62:** Eva M. Gilbert: Partielle Nitritation / Anammox bei niedrigen Temperaturen, 2014, 115 S., 20,00 €.

**Band 63:** Aleksandr O. Kondrakov: Heterogeneous photocatalysis and sensitized photolysis for enhanced degradation of bisphenol A and its analogues, 2015, 155 S., 20,00 €.

**Band 64:** Meijie Ren: TiO<sub>2</sub>: application in photocatalysis for the degradation of organic pollutants and aggregation behavior in aquatic systems, 2015, 121 S., 20,00 €.

**Band 65:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 7. überarbeitete Neuauflage 2016, 126 S., 20,00 €.

**Band 66:** Chunyan Li: Using optical coherence tomography to quantify biofilm structure and mass transfer in combination with mathematical modeling, 2016, 121 S., 20,00 €.

**Band 67:** Maria Pia Herrling: Nanoparticles in biofilm systems – assessment of their interactions by magnetic susceptibility balance and magnetic resonance imaging, 2016, 132 S., 20,00 €.

**Band 68:** Elham Fatoorehchi: Sludge disintegration techniques – assessment of their impacts on solubilization of organic carbon and methane production, 2016, 116 S., 20,00 €.

**Band 69:** Norman Hack: Refraktäre organische Substanzen im Kapillarsaum: ihre Dynamik, Gradienten und Reaktionen, 2016, 152 S., 20,00 €.

**Band 70:** Di Peng: Disinfection by-products and the application potential of nanofiltration in swimming pool water treatment, 2016, 112 S., 20,00 €.

**Band 71:** Jueying Qian: Investigation of the fouling driving factors in drip irrigation systems, 2017, 112 S., 20,00 €.

**Band 72:** Florian Blauert: Investigating biofilm deformation using optical coherence tomography and fluid interaction simulation, 2017, 105 S., 20,00 €.

**Band 73:** Johannes Ruppert: Möglichkeiten der quantitativen Korrosionsvorhersage für Baustähle in Gewässern mittels einer elektrochemischen Messzelle, 2017, 202 S., 20,00 €.

**Band 74-I (in Englisch), 74-II (in Arabisch):** Oliver Jung: Handbook: Brackish Water Desalination In Water-Scarce Regions: The Jordan Valley, 2018, auf Anfrage (Copy On Demand).

**Band 75:** Marc Tuczinski: Applikation von keramischen Mikrofiltrationsmembranen in der zweistufigen Biogasproduktion, 2018, 134 S., 20,00 €.

**Band 76:** Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 8. überarbeitete Neuauflage 2019, 140 S., 20,00 €.

**Band 77:** Alexander Timm: Einfluss von Sonnenlicht auf den Abbau von Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Kinetik, Umwandlung und Wirkung, 2019, 132 S., 20,00 €.

**Band 78:** Philip Clifford Brown: Impact of antibiotics and particulate matter from wastewater discharges on the abundance of antibiotic resistance genes in river sediments, 2019, 101 S., 20,00 €.

**Band 79:** Annika Bauer: Einsatz der optischen Kohärenztomographie zur kontinuierlichen Überwachung von Scaling bei der Membrandestillation, 2020, 114 S., 20,00 €.

**Band 80:** Luisa Gierl: Untersuchungen zum Einfluss von Eisen auf die Struktur und mechanischen Eigenschaften von *Bacillus subtilis* Biofilmen, 2020, 100 S., 20,00 €.

Preise verstehen sich zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer und Versandkosten.

Bestellungen über:

DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT),

Wasserchemie und Wassertechnologie Engler-Bunte-Ring 9

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-42581

Fax: +49-(0)721-608-46497

E-Mail: [sekretariat-wasserchemie@ebi.kit.edu](mailto:sekretariat-wasserchemie@ebi.kit.edu)

