

Biomediierte Materialsynthese mittels Phototaxis und Rheotaxis

Moritz Michael Klotz

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Bastian Blombach

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Cordt Zollfrank
2. Prof. Dr. Rubén D. Costa

Die Dissertation wurde am 21.11.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch den TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 02.03.2023 angenommen.

„Und jedem Ende wohnt ein Zauber inne“

– Inspiriert von Hermann Hesse, *Stufen*

Danksagung

Dieser Arbeit vorangestellt möchte ich meinem „Doktorvater“ Prof. Dr. Cordt Zollfrank sowie meinem Forschungsgruppenleiter Dr. Daniel Van Opdenbosch meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Von der Schaffung und Bereitstellung des guten Arbeitsumfeldes über Eure kontinuierliche Unterstützung, Motivation und Inspiration bis hin zur fachlichen Auseinandersetzung mit meinen Arbeiten, konnte ich mich auf Euren Rat und Eure Expertise stützen. Den direkten und offenen Umgang wusste ich stets sehr zu schätzen. Ich danke Euch herzlich für Eure Zeit und den direkten und unkomplizierten Draht. Durch Euch durfte und konnte ich in meiner Zeit am Lehrstuhl für Biogene Polymere wachsen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Bastian Blombach für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rubén D. Costa als Mitglied der Prüfungskommission. Als renommierte Experten tragen sie zu einem wichtigen Teil dieser Arbeit bei.

Herzlichst danke ich auch meinen Bürokollegen Matthias und Felix für die sehr angenehme Zeit, den täglichen Ratsch, privaten sowie fachlichen Austausch und gegenseitige Unterstützung. Auch an die übrigen Kollegen – vom hinteren technischen Büro bis vorne zum Sekretariat – denke ich dankend und mit Freude. Die freundschaftliche Mit- und Zusammenarbeit am Lehrstuhl für Biogene Polymere war und ist etwas Besonderes.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Projekte sowie meiner Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Meinen abschließenden Dank möchte ich an meine Familie richten. Insbesondere danke ich meiner Frau Julia für die durchgehend liebevolle Unterstützung, Motivation und Begleitung auf meinem Weg in einer privat herausfordernden Zeit. Meinen Brüdern danke ich für den ungebrochenen Zusammenhalt, ohne den sich alles anders entwickelt hätte. Auch danke ich meiner im weiteren Sinne „Alteglofsheimer“ Familie für die große Unterstützung. Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mit ihrem Vertrauen in mich das Fundament für meine persönliche Entwicklung gegossen haben.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	9
1 Einleitung: Verwendung mikrobiologischer Systeme zur Materialsynthese	11
1.1 Einordnung	11
1.2 Gezielte Steuerung mikrobiologischer Systeme	16
1.2.1 Reizinduzierte biologische Bewegungsreaktionen	16
1.2.2 Taxien	17
1.2.3 Phototaxis	18
1.2.4 Rheotaxis	19
1.3 Motivation und Forschungsfrage	20
1.4 Zielsetzung und Umsetzung	21
2 Methoden	23
2.1 Phototaxis	23
2.1.1 Phototaktische Strukturierungsversuche	23
2.1.2 Mikrobiologische Modellsysteme	24
2.1.3 Oberflächennahe Lichtprojektion	26
2.1.4 Volumenbezogene Lichtprojektion	28
2.2 Rheotaxis	30
2.2.1 Rheotaktische Strukturierung	30
2.2.2 Mikrobiologische Modellsysteme	30
2.2.3 Strukturierte Flusszelle	31
3 Ergebnisse	33
3.1 Übersicht	33
3.2 Phototaktische Strukturierung	33
3.2.1 Beschreibung der Veröffentlichung – Publikation A	33
3.2.2 Oberflächennahe Phototaxis	34
3.2.3 Volumenbezogene Phototaxis	37
3.3 Rheotaktische Strukturierung	41
3.3.1 Beschreibung der Veröffentlichung – Publikation B	41
3.3.2 Weitere EPS	42
4 Diskussion	43
4.1 Rubrum	43

4.2	Allgemeine Betrachtung	43
4.3	Phototaxis als Methode zur Struktur- und Templateerzeugung	45
4.3.1	Phototaktische Strukturierung	45
4.3.2	Oberflächennahe Strukturierung	47
4.3.3	Volumenbezogene Strukturierung	48
4.4	Rheotaxis als Methode zur Struktur- und Templateerzeugung	54
4.5	Fazit	56
5	Ausblick	59
6	Zusammenfassung	61
6.1	Zusammenfassung in Deutsch	61
6.2	English summary	62
7	Eigene Arbeiten	63
	Literaturverzeichnis	64
	Anhang	77
	Publikation A	79
	Publikation B	89

Vorwort

Diese kumulative Dissertationsschrift baut auf drei der unter Kapitel 7 aufgelisteten Publikationen mit Beteiligung des Autors auf. Die ersten beiden, **Publikation A** und **Publikation B**, wurden dabei vom Autor federführend als Erstautor verfasst. Die beiden Publikationen sind der vorliegenden Dissertationsschrift im Anhang beigelegt. In der dritten Publikation, **Publikation C**, einem Review-Paper, hat der Autor als Co-Autor mitgewirkt. Alle Ergebnisse aus **Publikation A** und **Publikation B** wurden selbstständig in Laborversuchen erarbeitet. Zum geringen Teil wurden einzelne Versuche unter Anleitung des Autors von betreuten Studenten durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit schließt einen thematischen Rahmen um **Publikation A** und **Publikation B**, die jeweils unter einem eigenständigen Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft strukturiert waren. Weiterhin werden noch nicht publizierte Ergebnisse in den Kontext eingebunden.

1 Einleitung: Verwendung mikrobiologischer Systeme zur Materialsynthese

1.1 Einordnung

Von Anbeginn der Menschheit ist ihr zivilisatorischer Fortschritt eng mit der Nutzung von Werkstoffen verbunden, wie die Epocheneinteilungen in Stein-, Bronze- oder Siliziumzeitalter verdeutlichen [1]. Seit Tausenden Jahren nutzt der Mensch dabei natürliche Materialien und Stoffe, um sie entweder direkt oder nach Umwandlung als Werkstoff¹ für einen technischen Gebrauch zu verwenden. Die Herkunft der Werkstoffe kann dabei in drei Arten eingeteilt werden. Die erste beinhaltet geologisch erzeugte Materialien wie Gestein und gediegene Metalle. Diese finden und fanden direkt als Werkstoff Anwendung, ebenso wie auch die zweite, die biologisch gewachsenen und erzeugten Materialien, zu denen Holz, Bein, Perlmutter, Naturfasern etc. gehören. Die dritte Art enthält die vom Menschen aus verfügbaren Stoffen erzeugten Materialien, zu denen beispielsweise Legierungen, Gläser, Keramiken, Kunststoffe und auch aus ihren Oxiden gewonnene Metalle zählen.

Die Entstehung und Herstellung zweit- und drittgenannter biologisch und menschengemachter Materialien und Werkstoffe ist in ihrem Ansatz grundverschieden [2]. Menschen-gemachte, im weiteren Verlauf als künstliche Materialien bezeichnet, werden aus einer Vielzahl verfügbarer Elemente und Stoffe hergestellt. Die Auswahl, die Verarbeitung und die Form der Stoffe wird dabei von der beabsichtigten Funktion des Werkstoffes und Bauteils abgeleitet. Biologische Materialien hingegen bestehen aus einer deutlich reduzierten Anzahl an Elementen, aus denen einzelne Bausteine wie beispielsweise Zucker oder Aminosäuren gebildet werden. Aus diesen Bausteinen wiederum wird der Werkstoff auf Grundlage des genbasierten Bauplans zusammengesetzt und über das Wachstum in seiner Form und Mikrostruktur genau auf die zu erfüllende Funktion angepasst [2–4]. Mikrostruktur und Form sind dabei im Gegensatz zu künstlichen Werkstoffen, in denen sich mit beiden voneinander losgelösten Strukturmerkmalen die Funktion des Werkstoffes gestalten lässt, eng miteinander verbunden. Beides wächst in biologischen Stoffen gleichzeitig und bildet das Werkstück, das beispielsweise einen Ast oder Knochen darstellt, als hierarchische Einheit [5], eine Einheit, die mehr als fünf einzelne, über alle Größenordnungen verteilte hierarchische Ebenen aufweist, siehe² **Publikation C**. Die einzelne Hierarchieebene

¹Definiert wird ein Werkstoff als technisch nutzbares Material [1].

²Eine Auflistung der Arbeiten des Autors ist Kapitel 7 zu entnehmen.

zeichnet sich dabei durch gemeinsame, wiederholend angeordnete Strukturmerkmale aus, die wiederum als Bausteine angesehen werden können. Diese Bausteine formen sich aus den darunterliegenden Hierarchieebenen und bilden im selben Zuge die Grundlage für die in der nächsten Größenordnung folgende Hierarchieebene. Auf diese Weise ergibt sich ein Material, das vom molekularen Aufbau im Nanometerbereich bis hin zur makroskopischen Form als letzte Hierarchieebene als in sich verzahnt beschrieben werden kann.

Dieser bausteinbasierte Aufbau über mehrere Ebenen ermöglicht den Biomaterialien maßgeschneiderte Eigenschaften, die sich zudem in einem lebenden biologischen System oftmals über die Lebensdauer an neue Bedingungen, wie zum Beispiel eine veränderte Belastung, adaptieren und Schwachstellen durch beständiges Reparieren verringern, siehe **Publikation C** sowie [6]. Durch den hierarchischen und teilweise anisotropen Aufbau bestreitet die Natur die vielfältigsten Herausforderungen: Mechanisch belastete Werkstücke wie Äste oder Knochen zeichnen sich unter anderem durch ihre hohe Zug- beziehungsweise Druckfestigkeit bei gleichzeitigem geringen Gewicht aus [6]. Dabei hilft der strukturell anisotrope Aufbau der Hierarchieebenen, dass einseitiger mechanischer Beanspruchung optimal entsprochen wird und sich beispielsweise Zug- und Druckfestigkeit je nach Ausrichtung unterscheiden [2, 3]. Insekten und Reptilien wird durch hierarchische Strukturen das Bewegen an Wänden und Decken ermöglicht [7], andere Strukturen hingegen verhindern Anhaftung und verursachen den bekannten Lotuseffekt [8] und manchen Lebewesen ermöglichen hierarchisch optische Strukturen das Sehen [9] oder auch das Gesehenwerden [10]. Faszinierend sind auch die gezielten Bewegungen, die in leblosen hierarchischen Strukturen eingespeichert sind und unter anderem dabei helfen, Pflanzensamen tiefer in den Boden einzugraben [11], oder ihn erst bei optimalen Umgebungsbedingungen aus der schützenden Hülle freigeben [12].

Um genannte Funktionen zu erfüllen, sind oftmals unterschiedliche Bausteine auch innerhalb einer Hierarchieebenen verzahnt vorzufinden. So sind feste, spröde, oft kristalline Phasen immer wieder in einer weichen, zähen, amorphen Polymermatrix eingebettet [13, 14]. Eine Kombination, die durch die von den Polymerphasen hervorgerufenen sogenannten „Opferbindungen und versteckten Längen“ die Belastbarkeit des Werkstoffes erhöht und eingetragene Energie durch Dehnung und schrittweises Lösen der Polymerbindungen abbaut [15]. Auch sind Hierarchieebenen der spröden Phasen, in der Regel mineralische Bausteine, in ihrer Größe so gestaltet, dass sich Defekte nicht weiter ausbreiten und entstandene Risse gestoppt werden [16].

Zusammengefasst kann ein biologischer Werkstoff vor allem aufgrund seiner hierarchischen und anisotropen Strukturierung maßgeschneiderte Eigenschaften, spezialisiert auf das Umfeld der Entstehung, aufweisen³. Genau in dieser Spezialisierung liegt der Reiz,

³Zur Vervollständigung: Die auf die zu erfüllende Funktion spezialisierte Gestaltung der Hierarchieebenen in Anzahl, Bausteinen und Anisotropie kann bei einer Änderung der Umgebungsbedingungen

mit der Herstellung hierarchisch anisotroper strukturierter Werkstoffe die ideale Lösung für ein technisches Problem bereitzustellen. Die einfachste Herangehensweise dazu ist sicherlich die direkte Nutzung biologischer Werkstoffe und ihre Anpassung durch Bearbeitung der äußeren Form, wie es weltweit mit Holz im Megatonnenmaßstab angewandt wird⁴. Allerdings sind technische Herausforderungen vorstellbar, die nur ungenügend mit natürlich entstandenen Materialien abgedeckt werden können. An dieser Stelle werden maßgeschneidert hergestellte Biowerkstoffe interessant.

In der Forschung werden biologische Materialien und Systeme vielfältig verwendet, auch mit dem Ziel, die genannte Lücke natürlich entstandener Materialien zu überwinden. Die Methodik sowie Begrifflichkeit der Ansätze geht dabei oftmals fließend ineinander über. In **PUBLIKATION C** wird deshalb eine klassifizierende Einordnung in fünf Level mit aufsteigender Abstraktion der biologischen Materialien/Systeme getroffen. Beginnend mit der direkten Nutzung in Level 0, „Direct usage of (modified) biological systems“, und endend mit der abstrahiertesten Verwendung in Level 4, „Abstraction of problem-solving strategies“. Bezogen auf die technisch maßgeschneiderten Biowerkstoffe können die unter Level 3, „Emulation of biological systems“, genannten Ansätze der bioinspirierten und -mimierten Materialsynthese [17,18] sowie die Biomimetik, beziehungsweise Bionik [19,20], die beschriebene Lücke zum Teil füllen. Die erhaltenen Materialien können allerdings aufgrund ihrer reduzierten Anzahl an Hierarchieebenen meistens nur eine gewünschte Eigenschaft abbilden und sind auf diese beschränkt. Ein ebenfalls naheliegender Ansatz besteht darin, natürliche Materialien als Template für die Synthese neuer Werkstoffe zu nutzen. Das hierfür in **Publikation C** im Level 1 „Transfer of structure“ genannte Biotemplating nutzt diese Möglichkeit, indem natürliche Materialien nach einer Vorbehandlung mit anorganischen Präkursoren infiltriert werden. Dadurch können alle Ebenen der anisotropen, hierarchisch gewachsenen Struktur übertragen und gegebenenfalls mit der biologischen Struktur als Hybridwerkstoff verwendet werden [21–23]. Auch optische und mechanische Eigenschaften wie durch Feuchte hervorgerufene Aktuation ließen sich so durch eine anorganische Phase darstellen [21, 24]. Die Nachteile liegen jedoch auf der Hand: Zum einen setzt die benötigte Infiltrationsmethode einen Zugang zu den Poren voraus, der meist erst mithilfe thermischer oder chemischer Mittel geschaffen werden muss. Zum anderen bedingen die Methode und die daraus erhaltenen Resultate den Einsatz bereits gewachsener, biologischer Templates [21]. Auch ist die technische Umsetzung einer solchen Herstellung vor allem im anwendungsorientierten, makroskopischen Maßstab weiterhin herausfordernd.

allerdings auch hinderlich sein. So wird ein durch andere Bäume immer vom Wind geschützter, steif gewachsener Baum nach dem Fällen der umliegenden Bäume kaum mehr die Flexibilität aufweisen können, einem schweren Sturm zu trotzen.

⁴Siehe Food and Agriculture Organization of the United Nations – Industrial roundwood – <https://www.fao.org/forestry/statistics/80938/en/> [zugegriffen am 04.11.2022].

Mit der in **PUBLIKATION C** im Level 2, „Usage of biological systems“, genannten und in der Veröffentlichung diskutierten biomediierten Materialsynthese können diese Nachteile überwunden werden. Durch gezielte Attraktion lassen sich reizinduzierte Bewegungsreaktionen von Prokaryonten und Eukaryonten anregen und steuern [25, 26]. Mittels dieser beeinflussten Bewegungsreaktionen, welche sich in Taxien, Tropismen und Nastien unterteilen⁵, lassen sich je nach Organismus im Folgenden die Ausrichtung des Organismus, die Richtung seines Wachstums, oder ein Ansammeln beziehungsweise ein Leeren lokaler Bereiche steuern. Im Zuge dieser Reaktionen entsteht im nächsten Schritt die Möglichkeit der Bildung eines ganzen, durch den Organismus geformten Template mit maßgeschneiderter äußerer Form und idealerweise in Teilen auch gezielten inneren Parametern wie der lokalen Dichte und struktureller Anisotropie. Vergleichend mit der bereits dargestellten biologischen Materialbildung dient in diesem Ansatz der verwendete Organismus als Baustein, aus dem durch die Methodik der gesteuerten Bewegungsreaktion gezielt eine übergeordnete Form gebildet werden kann. Diese Freiheit in der Strukturierung kann je nach Auswahl des Organismus und somit des Bausteins mit zusätzlichen Strukturmerkmalen, wie einer hierarchischen, anisotropen Strukturierung bis in den Nanometerbereich, versehen werden. Hierzu bieten sich Organismen an, die diese Strukturmerkmale bereits besitzen [27] oder Stoffe herstellen, die diese aufweisen [28, 29].

Als Attraktanden für Organismen kommen die unterschiedlichsten Methoden in Betracht, wie in **PUBLIKATION C** diskutiert wird. Kontaktbasiert⁶, durch geeignete Oberflächen und/oder äußere Kräfte, wie auch kontaktlos, durch Nutzung von Licht, Kraftfeldern, Lockstoffen, Gradienten wie Viskosität oder Feuchte und einigen weiteren Methoden, können Organismen erfolgreich gesteuert werden. Im Prinzip ist eine Anwendung für alle dieser Methoden in einer biomediierten Materialsynthese denkbar, wie beispielgebend Murugarren et al. anhand der chemotaktischen Strukturierung von bakterieller Cellulose zeigt [30]. Weiter Beispiele werden in **Publikation A** und **Publikation B** genannt. Auch abseits der akademischen Einordnung als biomediierte Materialsynthese wird das dahinter stehende Prinzip auch bereits bewusst und unbewusst genutzt, wie ein Blick in Alltag und Literatur verdeutlicht: Historisch gesehen wird beim in **PUBLIKATION C** genannten *Live Assembly* bereits seit Jahrtausenden strukturiertes Material synthetisiert. Denn die Struktur von Brot und Käse wird rein durch die geeignete Umgebung von Hefen oder Milchsäurebakterien mittels deren angeregten Metabolismen gebildet⁷. Etwas näher

⁵Die Definition der Unterteilung wird in Kapitel 1.2 gegeben.

⁶Die Begrifflichkeit in Verbindung mit einer einzelnen reizinduzierten Bewegungsreaktion ist hierbei ungenau. Ein Zusammenspiel von Hapto-, Mechano-, Chemo-, Stereo- und Thigmotaxien, -nasiten und -tropismen könnte den Sachverhalt illustrieren, dass sich Organismen entlang bestimmter Oberflächen bewegen. Vielfach besteht gravitationsbedingt und aus Mangel an Alternativen auch keine andere Möglichkeit zur freien Bewegung. Näheres in Kapitel 1.2.

⁷Ähnlich eingeordnet können auch durch Mikroben induzierte strukturbeeinflussende Maßnahmen in geologischer Größenordnung werden [31, 32]. Da diese Anwendungen allerdings entfernt von der Herstellung eines Werkstoffes zu sehen sind, werden sie an dieser Stelle nur zur Vollständigkeit erwähnt.

am Werkstoff und auf Basis richtungsbeeinflusster Organismen war die Verwendung von Matten aus Pilzmyzel, welche in Baumritzen wuchsen. Diese Myzelmatte wurden durch indigene Völker in Nordamerika zu Kleidungsstücken weiterverarbeitet [33]. Auf dieser Grundlage gibt es heute eine Vielzahl pilzmyzelbasierter Materialien und Verfahren [34], bei denen das Myzelwachstum kontaktbasiert und chemotaktisch beeinflusst wird. Diese werden mittlerweile mit zunehmendem Erfolg kommerziell vertrieben⁸. Auch interessant sind die auf den ersten Blick passiv erscheinenden Verfahren, bei denen die Organismen ihre Struktur lediglich entlang einer geeigneten Oberflächen ausbilden und somit der diskutierten kontaktbasierten Beeinflussung zuzuordnen sind. So wird beispielsweise nach Einbringen eines Metallkörpers in eine Muschel darauf Perlmutter abgeschieden [35]. Ein festes, anisotropes Cellulosenetzwerk bildet sich innerhalb einer mikrobiell erzeugten sogenannten Kahnhaut [36], oder ein Dach aus Seide entsteht [37]. Insbesondere die genannte Kahnhaut findet bereits im medizinischen Bereich [38] sowie als Werkstoff im Atelier⁹ ihre Anwendung und ist als Material durch ihren stark anisotropen und hierarchischen Aufbau zur Anwendung in der biomediierten Materialsynthese von Interesse [29].

Die dargestellten Verfahren zeigen den vielversprechenden Weg der biomediierten Materialsynthese auf. Um die Entwicklung neuer Materialien und Werkstoffe durch die Anregung eines Organismus mittels des geeigneten Attraktanden und der folgenden Bewegungsreaktion voranzubringen, sind darauf hinführend grundlegende Fragen zu beantworten. Vor einer auf Erhalt eines Werkstoffes ausgelegten biomediierten Materialsynthese gilt es, anhand Literatur und experimentell festzustellen:

1. Das grundlegende Zusammenspiel des eingesetzten Organismus mit der ausgewählten Bewegungsreaktion,
2. die grundlegende Möglichkeit einer Strukturbildung mittels Organismus und Bewegungsreaktion,
3. die räumliche und zeitliche Einwirkung der Bewegungsreaktion über die Dauer einer Materialsynthese
4. und die Reproduzierbarkeit eines gewonnenen Materials sowie die Skalierbarkeit der eingesetzten Methode.

Mit der nahezu unüberschaubaren Anzahl an zur Verfügung stehenden Organismen und den verschiedenen Bewegungsreaktionen verdeutlicht sich die Breite des Forschungsfeldes, das sich mit der biomediierten Materialsynthese innerhalb der Materialwissenschaften eröffnet. Die vorliegende Arbeit zielt dabei innerhalb dieses Forschungsfeldes darauf, sich mit der in Kapitel 1.3 definierten Forschungsfrage den oben genannten Punkten 1 und 2

⁸Siehe Ecovative LCC und Lizenznehmer – <https://ecovative.com> [zugegriffen am 04.11.2022] sowie Stichwort Mycelium als Baustoff.

⁹Siehe Inhabitat – <https://inhabitat.com/could-bacteria-grown-materials-be-the-future-of-building/> [zugegriffen am 04.11.2022].

zu nähern. Dafür wurden die Organismen auf mikrobiologische Organismen und innerhalb dieser auf wenige Modellsysteme reduziert. Grundlage hierfür waren die umfassende zur Verfügung stehende Literatur über mikrobielle Taxien sowie die Möglichkeit, die Taxien unter den gegebenen Bedingungen im Labormaßstab anzuregen.

1.2 Gezielte Steuerung mikrobiologischer Systeme

1.2.1 Reizinduzierte biologische Bewegungsreaktionen

Einführend ist es im Sinne der vorliegenden Arbeit notwendig, die in der Biologie verwendeten Termini der reizinduzierten Bewegungsreaktion zu erläutern, sodass diese im materialwissenschaftlichen Kontext richtig eingeordnet werden können. Prinzipiell ist die biomediierte Materialsynthese wie in Kapitel 1.1 erläutert mit allen Bewegungsreaktionen, die durch steuerbare Reize hervorgerufen und beeinflusst werden können, vorstellbar. Bewegungsreaktionen, die periodisch durch endogene biologische Schwingungen hervorgerufen werden, wie beispielsweise die täglich wiederkehrende Blattbewegung einiger Pflanzen, sind zur biomediierten Materialsynthese durch ihre funktionelle Einschränkung vermutlich weniger geeignet und werden im Folgenden nicht behandelt.

Genannte reizinduzierte Bewegungsreaktionen von Organismen lassen sich in freie und ortsgebundene (sessile) Bewegungen einteilen. Die Unterscheidung beruht dabei darauf, ob ein Organismus sich frei und ungebunden in seiner Umwelt, beispielsweise durch das Schwimmen mittels Geißeln, oder sich ortsgebunden an seinem Wachstumsort, beispielsweise durch gezieltes Wachstum oder sich bewegendes Gewebe, bewegt. Ersteres trifft für die meisten Mikroorganismen, zweiteres für alle mit Erde, Holz und anderen Substraten verbundenen vielzelligen Gewächse und Pflanzen zu. Die Terminologie der reizinduzierten Bewegungsreaktionen selbst wird unterteilt in Taxien, Tropismen und Nastien. Als Taxien gelten die der frei beweglichen Organismen. In sessilen Organismen wird bei gerichteten Wachstumsbewegungen von Tropismen und bei durch Motorgewebe hervorgerufenen Bewegungen von Nastien gesprochen. Die Abgrenzung ist dabei nicht immer vollständig möglich. [26]

Es ist anzunehmen, dass reizinduzierte Bewegungsreaktionen als „Teil der umfassenden Optimierungsprozesse bei der Anpassung an die Umwelt“ von äußeren Reizen ausgelöst werden [26]. Terminologisch wird der auslösende äußere Reiz und gegebenenfalls die Reaktion der Organismen meist aus dem Griechischen oder Altgriechischen abgeleitet der jeweiligen Bewegungsreaktion vorausgesetzt. Zusammengeführt ergeben sich dadurch Begriffe wie Hydrotaxis (Reaktion auf Feuchtegradienten), Thigmonastie (Reaktion auf Berührungen) und Trophotropismus (Reaktion auf Nährstoffe) sowie viele weitere.

Da in der vorliegenden Arbeit nur frei bewegliche mikrobielle Systeme zum Einsatz in der biomediierten Materialsynthese untersucht werden, wird im Folgenden nur die Anregung von Taxien behandelt. Die verwendete Photo- und Rheotaxis wird näher erläutert.

1.2.2 Taxien

Taxien, die terminologisch somit alle reizinduzierten Bewegungsreaktionen von sich frei bewegenden Lebewesen, ob Prokaryont oder Eukaryot, einschließen, lassen sich weiter unterteilen. Zum einen gibt es die Aufgliederung in die Art der Reaktion, zum anderen ist die Unterteilung in aktive und passive Taxien möglich.

Reaktionsart

Ist die Bewegungsreaktion zur Reizquelle ausgerichtet, wird von positiver Taxis gesprochen. Negative Taxis wird hingegen als Reaktion weg von der Reizquelle definiert. Als Topotaxis wird die geradlinige Bewegung zur Reizquelle, unbeeinflusst von der zwischenzeitigen Reizstärke, bezeichnet. Als Phobotaxis gilt die sogenannte Schreckreaktion, die durch einen Gradienten der Reizstärke ausgelöst wird. [39]

In Kombination ist dann bei der chemisch induzierten Bewegungsreaktion beispielsweise eine positive Chemotopotaxis möglich, die für chemotaktische Mikroben die direkte Bewegung hin zur Attraktanden bedeutet. Bei einer positiven Chemophobotaxis würde sich die Mikrobe entlang des Gradienten den höher konzentrierten Bereichen annähern, wobei die Bewegung nicht gradlinig sein muss. [39]

Eine weitere, tiefere Unterteilung in die Art und Weise der Reizaufnahme und Verarbeitung durch beispielsweise einen oder zwei Rezeptoren, die durch Begriffe wie Klino-, Telo-, Tropo-, Mnemotaxis und weitere getroffen wird, ist für den beabsichtigten Anwendungszweck nicht notwendig und nur zur Einordnung genannt.

Reaktionsmechanismus

Wie beschrieben sind Taxien Bewegungsreaktionen, die durch äußere Reize ausgelöst werden. Zur deren Wahrnehmung benötigen die Organismen im Regelfall einen Rezeptor, um aufgrund dessen Signals eine Taxis aktiv auszuführen. Denn fehlt dieser Rezeptor, so sind die Verarbeitung des Reizes und eine Reaktion darauf nicht möglich. So können beispielsweise Menschen nicht auf polarisierte elektromagnetische Strahlung oder Infraschall reagieren, da die passenden Rezeptoren fehlen. Dennoch ist es allerdings möglich, dass äußere Reize auch ohne Rezeptor die Bewegungsreaktion beeinflussen. Um diesbezüglich bei dem Beispiel Mensch zu bleiben, nimmt dieser trotz eines fehlenden Rezeptors für ultraviolettes Licht dieses verzögert indirekt wahr und bewegt sich aus der Sonne in Richtung Schatten, da die Haut schmerzt. Diese passive Taxis trifft auch auf verschiedene Reize bei

Mikroben zu. So schwimmen beispielsweise begeißelte Mikroalgen in dem als Gravitaxis bekannten Phänomen durch ihren Versatz zwischen Auftriebs- und Schwerpunkt gegen die Schwerkraft an [40]. Der Reiz ist hier das rein physikalische Einwirken einer Kraft, welche die Bewegungsreaktion steuert. Zusätzliche Scherkräfte beeinflussen die Bewegungsreaktion weiterhin, was dann als Gyrotaxis gilt [40, 41] und im Zusammenspiel als Phänomen der Biokonvektion zu beobachten ist [42].

1.2.3 Phototaxis

Seit der Entdeckung des Mikroskops im 17. Jahrhundert und der sich damit öffnenden mikroskopischen Welt fasziniert die lichtabhängige Bewegung kleinster Lebewesen. Vor allem im Verlaufe des vergangenen Jahrhunderts, versuchten dutzende Botaniker, Biologen und Forschungsgruppen, Licht in das breite, biologisch diverse Forschungsfeld zu bringen, wie von Posudin et al. lesenswert dargestellt wurde [43]. Aber auch heute ist das Thema noch von Interesse, wobei die 1983 von Haupt getroffene Feststellung „*The only generalization that can be made for photomovement is its diversity*“ nichts an Aktualität verloren hat [44].

Über die Gründe kann nur spekuliert werden, aber ebenso wie biologisch eine große Diversität herrscht, ist die photoinduzierte Bewegungsreaktion auch terminologisch divers und nicht überein mit der anfangs in Kapitel 1.2 ausgeführten Terminologie der biologischen, reizinduzierten Bewegungsreaktion. So werden neben einer unterschiedlichen Bedeutung des Wortes Phototaxis noch Begriffe wie Photokinese, Orthokinese und weitere für photoinduzierte Bewegungsreaktionen verwendet [43]. Vermutlich haben hier die über Jahrhunderte getroffenen und zitierten Begriffe, deren Übersetzungen sowie die spezielle und anwendungsferne Nische der Phototaxis ihren Anteil, der bis heute wirkt. Jüngst im Jahr 2010 schrieben Posudin et al., wobei dieses Thema ausgiebig dargelegt wird, passend von „*Chaos in Terminology*“ und der Anekdote, dass selbst Mitglieder des 1976 extra gebildeten „Committee in Behavior Terminology“ ihre getroffenen terminologischen Definitionen im Anschluss nicht anwandten [43]. Für die Zukunft empfehlen Posudin und Kollegen eine parametrisierte Benennung, die der Vielzahl an Beleuchtungs- und der darauffolgenden Bewegungsreaktionen unter dem Überbegriff der Phototaxis gerecht wird.

In der vorliegenden Arbeit wird die 1978 von Nultsch et al. [45] getroffene Einteilung angewandt¹⁰. Diese Definition ist, auch wenn sie nicht immer präzise verwendet wurde, etabliert und vorwiegend in der einschlägigen Literatur der vergangenen Jahrzehnte vorzufinden:

¹⁰Nultsch als Mitglied des „Committee in Behavior Terminology“ überarbeitete die in der Konferenz von Diehn [46] niedergeschriebenen Definitionen im Anschluss nochmals, siehe [43].

Photokinese: Abhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit von der Lichtintensität.

Phototaxis: Abhängigkeit der Bewegungsrichtung bezogen auf die Lichtrichtung.

Photophobische Reaktion: Reaktion der Mikroben auf Änderungen der Lichtintensität.
Verkürzt als phobische Reaktion bezeichnet.

Die Phototaxis ist hierbei gleichbedeutend mit der Photokinese und der photophobischen Reaktion eine von drei lichtinduzierten Bewegungsreaktionen. Um eine gezielte Ansammlung zu erreichen, sind alle drei Bewegungsreaktionen von unterschiedlicher Bedeutung: Die Anregung von Phototaxis ermöglicht eine gerichtete Bewegung der Mikroben. Durch Anregung der photophobischen Reaktion kann mittels eines Gradienten im Lichtstrom eine Barriere gesetzt werden, welche die Bewegung begrenzt. Die Anregung der Photokinese wiederum beeinflusst die Ausprägung der anderen beiden Bewegungsreaktionen durch die Aktivität der allgemeinen, ungerichteten Bewegung.

Soweit in dieser Arbeit die phototaktische Strukturierung allgemein und als übergeordnete Methode der biomediierten Materialsynthese behandelt wird, werden die drei Teilreaktionen zur Bewahrung der Übersichtlichkeit nicht differenziert und unter dem Oberbegriff Phototaxis beziehungsweise phototaktische Reaktion behandelt.

1.2.4 Rheotaxis

Fische [47], aber auch deutlich kleinere, dem Plankton zuzuordnende Tiere [48] zeigen aktive Rheotaxis. Rezeptoren, wie das Seitenlinienorgan der Fische [49] oder die Setae der Ruderfußkrebse [50], liefern dazu Informationen der umgebenden Strömungsbedingungen, auf die die Bewegungsreaktion folgt. In Mikroben sind hingegen keine solchen Rezeptoren bekannt. Das Verhalten frei schwimmender Mikroben in fließender Umgebung hängt im Wesentlichen von ihrer Motilität, einer durch externe Faktoren (beispielsweise Chemotaxis) hervorgerufenen Vorzugsbewegungsrichtung, ihrer Form und ihrem Auftrieb ab [51]. Eine Reaktion gegenüber den in Strömungen herrschenden Scherkräften kann deshalb allgemein mit wenigen Ausnahmen als passiv, ohne aktive Bewegungsreaktion angesehen werden [52]. Der Mechanismus der einzeln beobachteten Ausnahmen, in denen sich die Mikroben aktiv quer zur Strömung orientieren, ist noch nicht aufgeklärt [53, 54].

Ein passives Taumeln mit der Strömung kann aber noch nicht als Bewegungsreaktion und damit Rheotaxis gedeutet werden. Hierzu ist wenigstens ein Verlassen des Strömungsvektors notwendig, das eine echte, wenn auch passive Reaktion auf die einwirkenden Scherkräfte darstellt. Gerade bei motilen Mikroben kann dieses Phänomen durch das Zusammenspiel ihrer gerichteten Bewegung mit dem vorherrschenden Strömungsvektor durch das Ansammeln innerhalb von Strömungszonen beobachtet werden. Dabei wird die Festlegung auf den Begriff Rheotaxis jedoch noch selten getroffen [52, 55]. Verglichen mit

der etablierten Verwendung des Begriffes Gyrotaxis ist die Einordnung und Benennung allerdings durchaus sinnig und empfehlenswert [40, 41].

Aber auch in freier Umgebung können nicht motile Mikroben, die ohne Flagellen oder Geißeln drehend oder taumelnd mit der Strömung schwimmen [51] und alleine keinerlei Rheotaxis zeigen [52], durch einwirkende Scherkräfte beeinflusst werden, solange sie Motilität auf Substrat zeigen. Denn eingebettet in einen Biofilm, reagieren dieser und damit auch die enthaltenen Mikroben durch sein viskoelastisches Verhalten auf Strömungen [56]. Annähernd frei schwimmende Biofilme, sogenannte Streamer, überbrücken Strömungsvektoren [57], wobei sich die Mikroben innerhalb des Biofilms bewegen, ausrichten und die Struktur beeinflussen [56–59]. Für die vorliegende Arbeit ist es dabei von Bedeutung, dass auch auf den ersten Blick nicht motile Bakterien wie die verwendeten Cellulosebildner durch ihre Sekretion bakterieller Cellulose innerhalb der Biofilme diese Bewegung zeigen und somit als motil gelten [60, 61].

1.3 Motivation und Forschungsfrage

Der unterschiedliche Weg, der jeweils von Natur und von den Menschen bei der Herstellung von Materialien angewendet wird, spiegelt sich wie in Kapitel 1.1 beschrieben im Aufbau des Materials wider. Der natürliche Ansatz, Materialien aus wiederkehrenden Strukturelementen herzustellen, resultiert in Materialeigenschaften, die von Menschen hergestellte Materialien nicht abdecken, wie beispielsweise mit dem Ashby-Diagramm am Beispiel von Holz deutlich wird [62]. Einzelne ausgewählte Eigenschaften können dabei technisch oft mit reduzierter Anzahl an Hierarchieebenen zum Nachteil anderer Eigenschaften adoptiert werden. Dies zeigen Beispiele aus den Feldern der bioinspirierten und -mimierten Materialsynthese [17, 18] und der Bionik [19, 20]. Auch das Transformieren biologischer Materialien ist möglich [22–24], jedoch beschränkt sich das transformierte Material auf die eingesetzten biologischen Templates.

Um makroskopische Materialien frei von den Einschränkungen auf einzelne Eigenschaften oder natürlich gewachsene Templates zu produzieren, stellt sich die Frage nach einer geeigneten Herstellungsmethode. Der Blick auf die in Kapitel 1.1 vorgestellten Materialien und Werkstoffe gibt hierfür die Anregung: Durch ihre oftmals bereits vorhandene hierarchische Strukturierung liegt die Nutzung biologisch erzeugter Substanzen als Bausteine auf der Hand. Mit gezielter Beeinflussung des Wachstums dieser Bausteine ist die Herstellung weiterer makroskopischer Materialien mit definiertem, hierarchisch anisotrop strukturiertem Aufbau und festgelegter äußerer Form möglich. Die Eigenschaften dieser erzeugten Materialien sind dabei durch natürliche Werkstoffe wie Holz oder Bein inspiriert [6] und können durch gezielte Anpassung der äußeren Hierarchieebenen zudem an eine zu lösende technische Problemstellung angepasst werden.

Wie am Beispiel der Kahmhaut sichtbar, eignen sich insbesondere mikrobiell extrazellulär erzeugte Substanzen wie Exopolysaccharide (EPS) als Bausteine. Diese zeigen bereits eine hierarchische Grundstruktur über mehrere Ebenen [28,29]. Kann nun mittels der vorgestellten Taxien derart Einfluss auf die eingesetzten Mikroben genommen werden, dass diese, beziehungsweise ihre EPS, beabsichtigte makroskopische Strukturen annehmen, ist eine unbeschränkte Materialerzeugung hierarchischer Materialien vorstellbar. Aus den gewonnenen Materialien könnten dann, direkt oder nach weiterer Prozessierung, Werkstoffe mit spezialisierten Eigenschaften gewonnen werden.

An der experimentellen Umsetzung dieser Vorstellung setzt die vorliegende Arbeit an. Um die technische Machbarkeit der mikrobiellen Materialsynthese festzustellen, wurde folgende Forschungsfrage definiert:

Ist es, abgeleitet von der biomediierten Materialsynthese, mittels mikrobiologischer Systeme technisch möglich, durch gezielte Anregung einzelner Taxien, räumlich makroskopisch ausgedehnte, hierarchisch strukturierte Materialien und/oder Strukturtemplates für biomimetische Kompositmaterialien zu erzeugen?

Zur konkreteren Ausrichtung dieser umfassend formulierten Forschungsfrage werden zwei zu untersuchende Taxien ausgewählt. Durch gezielte Anregung mittels **Phototaxis** oder **Rheotaxis** sollen geeignete mikrobiologische Systeme, genannte Materialien und/oder Strukturtemplates für die Erzeugung biomimetischer Kompositmaterialien bilden.

1.4 Zielsetzung und Umsetzung

Resultierend aus der Forschungsfrage ist das primäre Ziel der Forschungsarbeit die Feststellung der technischen Machbarkeit dessen, inwieweit sich hierarchisch strukturierte Materialien/Templates mit makroskopischen Abmessungen durch photo- oder rheotaktische Anregung mikrobiologischer Systeme erzeugen lassen. Da die beabsichtigten Synthesewege bei erfolgreicher Durchführung auf die Herstellung von Werkstoffen abzielen, besteht die Anforderung an die Größe des erzeugten Materials/Template. Diese sollte wenige Millimeter nicht unterschreiten und idealerweise nach oben skalierbar sein. Weiterhin sollen bereits strukturierte Hierarchieebenen direkt im Material enthalten sein. Die erzeugten Strukturen sollten zudem in möglichst fester und zusammenhängender Form vorliegen beziehungsweise die Möglichkeit einer solchen Form durch anschließende Prozessierungsschritte wie beispielsweise die Biotemplation oder Einbettung in Polymerphasen eröffnen [21, 63].

Als Teil des Forschungsvorhabens zur biomediierten Materialsynthese wurden vorausgehend grundlegende methodische Rahmenbedingungen zur Bearbeitung der Forschungsfrage festgelegt:

- a) Einsatz von Mikroben der Risikogruppe 1 nach § 3 Biostoffverordnung
- b) Phototaktische Materialsynthetisierung über Lichttemplates, die durch holografische Methodik erzeugt wurden
- c) Rheotaktische Materialsynthetisierung mittels strukturierter Flusszellen

Der bei den Taxien unter Punkt b) und c) zugrunde gelegte Mechanismus soll sich wie folgt gestalten. Durch das Projizieren eines Lichttemplate innerhalb eines beimpften Mediums sollen sich Mikroben durch eine hervorgerufene phototaktische beziehungsweise phobische Reaktion innerhalb des Lichttemplates in eine erhöhte Ansammlungsdichte aufkonzentrieren (b). Ebenso soll die strukturierte Flusszelle durch örtlich unterschiedliche Strömungsbedingungen erhöhte Ansammlungsdichten bewirken (c). Die von den Mikroben örtlich abgeschiedenen EPS stabilisieren darauffolgend das abgebildete Lichttemplate oder erhalten durch die einwirkende Strömung eine ausgerichtete Struktur. Die EPS stellen schließlich die Grundstruktur des Materials dar und dienen gegebenenfalls wie benannt als Template für eine weitere Prozessierung. Auf die verwendete Methodik wird vertiefend in **Publikation A**, **Publikation B** sowie in Kapitel 2 eingegangen.

2 Methoden

2.1 Phototaxis

2.1.1 Phototaktische Strukturierungsversuche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit zwei phototaktisch aktiven Mikroben durchgeführt. Mit dem Ziel, die technische Machbarkeit phototaktisch erzeugter Strukturen zu prüfen und definierte dreidimensionale mikrobiologische Strukturen in makroskopischer Größe zu erzeugen, wurden die Versuche in vier aufeinander aufbauende Schritte gegliedert. Das Erreichen eines Zwischenziels war dabei wesentliche Voraussetzung des nächsten, in Komplexität oder Freiheitsgrad erweiterten Schrittes.

1. Einfache oberflächennahe Strukturierung

Projektion einer maskenbasierten Lichtprojektion mit unterschiedlicher Lichtintensität auf die Oberfläche mikrobeimpfter Medien. Dadurch gezielte Erzeugung makroskopisch zweidimensionaler oberflächennaher Bereiche, die erhöhte Ansammlungsdichten an Mikroben im Zusammenhang mit der Lichtprojektion aufweisen.

2. Komplexe oberflächennahe Strukturierung

Projektion einer holografischen Lichtprojektion mit unterschiedlicher Lichtintensität auf die Oberfläche mikrobeimpfter Medien. Dadurch gezielte Erzeugung mikro- und makroskopisch zweidimensionaler oberflächennaher Strukturen aus Mikroben, die einen Zusammenhang mit der Lichtprojektion aufweisen.

3. Einfache volumenbezogene Strukturierung

Projektion eines Lichtkegels mit geometriebedingter Variation der Lichtintensität in ein mikrobeimpftes Medium. Dadurch innerhalb des Mediums gezielte Erzeugung von dreidimensionalen makroskopischen Bereichen, welche erhöhte Ansammlungsdichten an Mikroben im Zusammenhang mit dem projizierten Lichtkegel aufweisen.

4. Komplexe volumenbezogene Strukturierung

Projektion einer holografischen Lichtprojektion mit mikro- und makroskopischer Variation der Lichtintensität in ein mikrobeimpftes Medium. Dadurch gezielte Erzeugung definierter dreidimensionaler mikro- und makroskopischer Strukturen aus Mikroben, die einen Zusammenhang mit der Lichtprojektion aufweisen.

Bei der Durchführung der Schritte wurden die Lichtparameter sowie die verwendeten Aufbauten variiert. Um im 1. und 2. Schritt eine räumliche Begrenzung der mikrobiellen Bewegungsfreiheit zu erreichen, wurden die beimpften Nährmedien in Petrischalen gegeben

und das Lichttemplate vertikal eingestrahlt. Der Fokus lag dabei auf der Phasengrenze Luft/Medium oder war unendlich. Photoinduzierte Effekte konnten so hauptsächlich auf die Phasengrenze reduziert werden. Versuche mit räumlich unbegrenzter mikrobieller Ausbreitungsmöglichkeit der Schritte 3 und 4 wurden in Küvetten unterschiedlicher Größe und Form durchgeführt. Die Lichttemplates wurden dabei entweder vertikal oder horizontal in ein beimpftes Nährmedium eingestrahlt, wobei der Fokus entweder innerhalb der Küvette oder auf unendlich gesetzt war.

2.1.2 Mikrobiologische Modellsysteme

Die Auswahl der verwendeten Mikroalgen *Porphyridium purpureum* und *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte primär aufgrund deren phototaktischer Aktivität¹. Weitere zentrale Merkmale waren die EPS-Bildung von *P. purpureum* sowie der je unterschiedliche Fortbewegungsmechanismus und die daraus resultierende Fortbewegungsgeschwindigkeit. Während sich *C. reinhardtii* begeißelt mit bis zu $100\text{--}200\ \mu\text{m s}^{-1}$ bewegt [64], gleitet *P. purpureum* mithilfe des sekretierten EPS deutlich langsamer mit $2\text{--}3\ \mu\text{m min}^{-1}$ vorwärts [65]. Mittels der schnellen *C. reinhardtii* konnte die technische Machbarkeit der gezielten phototaktischen Steuerung und Strukturbildung im zeitlich kürzeren Rahmen untersucht werden. Die Bildung einer Struktur, die eine mögliche Weiterbehandlung überdauert, ist hingegen nur nach erfolgreicher vorheriger Stabilisierung vorstellbar, da die gebildete Struktur lediglich aus den Mikroalgen selbst bestehen würde. Dagegen stabilisieren *P. purpureum* ihre Struktur durch lokale Viskositätserhöhung, die aus ihren produzierten EPS resultiert. Weitere Auswahlkriterien bestanden in einer guten Kultivierbarkeit und einer Einstufung als Risikogruppe 1 nach § 3 Biostoffverordnung.

Mikroalge: *Porphyridium purpureum*

Die kugelförmige, eukaryontische Mikroalge *Porphyridium purpureum*, die in der Literatur oft unter dem Synonym *Porphyridium cruentum* zu finden ist, hat, je nach Lichtintensität, die zum Wachstum zur Verfügung steht, einen Durchmesser von $4\text{--}7\ \mu\text{m}$ und ist in der Natur in maritimer Umgebung zu finden [66, 67]. Durch ihre photosynthetische Energiegewinnung ist ihre Generationszeit intensitätsabhängig und beträgt wenigstens 18 h [66]. Neben den beschriebenen lichtabhängigen Reaktionen der Zelle, weist *P. purpureum* durch gerichtete oder ungerichtete Bewegung auch photoinduzierte Reaktionen auf. So bewegt sie sich bei Bestrahlung mit weißem Licht mit $2\text{--}3\ \mu\text{m min}^{-1}$ auf die Lichtquelle zu (positive Phototaxis) [65], wobei die Populationsgeschwindigkeit bis zu $0,87\ \mu\text{m min}^{-1}$ beträgt, siehe **Publikation A**. Untersuchungen des Lichtspektrums haben ergeben, dass diese positive phototaktische Reaktion, abhängig von der Lichtintensität, hauptsächlich von blauem Licht hervorgerufen wird [68, 69]. Rote Hintergrundbeleuchtung wirkt dabei

¹Dies beinhaltet ebenso die Photokinese wie auch die photophobische Reaktion.

verstärkend und versetzt die Mikroalge zusätzlich in eine ungerichtete Bewegung (Photokinese) [69]. Die phobische Reaktion hat bei *P. purpureum* ihre größte Ausprägung bei einer Wellenlänge von 500 nm [65]. Eine unterschiedliche Polarisationsrichtung hat keinen Effekt auf die Phototaxis [68]. Der gleitende Fortbewegungsmechanismus wird in Zusammenhang mit der Sekretion von EPS vermutet [70], allerdings ist er für *P. purpureum* wie auch für andere gleitende Mikroben noch unzureichend aufgeklärt [71–73]. Sekretierte EPS setzen sich hauptsächlich aus den Monosacchariden Galaktose, Glucose und Xylose zusammen und haben eine mittlere Molmasse von $2,3 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ [74, 75]. Es kann angenommen werden, dass die EPS mehrere Hierarchieebenen aufweisen [28].

In den durchgeführten Versuchen wurde *P. purpureum* aus dem Centre Algatech des tschechischen Institut of Microbiology, Třeboň, eingesetzt. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich um Artificial Sea Water (ASW) [67], das sich aus 27 g l^{-1} NaCl, $6,3 \text{ g l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $5,6 \text{ g l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, $1,13 \text{ g l}^{-1}$ CaCl_2 , $1,0 \text{ g l}^{-1}$ KNO_3 , $0,07 \text{ g l}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0,04 \text{ g l}^{-1}$ NaHCO_3 , 20 ml l^{-1} Tris-HCl, und 1 ml l^{-1} Spurenelementen, bei einem pH von 7,6, zusammensetzte. Die Spurenelementlösung bestand aus $2,4 \text{ g l}^{-1}$ FeCl_3 in 0,05 M EDTA, $0,6 \text{ g l}^{-1}$ H_3BO_3 , $0,04 \text{ g l}^{-1}$ $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, $0,004 \text{ g l}^{-1}$ $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, $0,004 \text{ g l}^{-1}$ ZnCl_2 , $0,037 \text{ g l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ und $0,0015 \text{ g l}^{-1}$ $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$. Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bei VWR International (Darmstadt, Deutschland), beziehungsweise Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), bezogen.

Mikroalge: *Chlamydomonas reinhardtii*

Die ovale Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* hat Abmessungen von etwa $3 \times 10 \mu\text{m}^2$ und ist in der Natur in Süßwassergewässern zu finden [76]. Mit ihren zwei etwa $12 \mu\text{m}$ langen Geißeln bewegt sie sich mit ziehenden Schwimmbewegungen mit $100\text{--}200 \mu\text{m s}^{-1}$ fort [64]. Ihre Generationszeit ist abhängig vom eingesetzten Medium, von der Möglichkeit zur Photosynthese und beträgt unter den verwendeten Bedingungen etwa 9 h [77]. Mit ihrem seitlich platzierten Augenfleck detektiert *C. reinhardtii* durch eine Rotationsbewegung einfallendes Licht und zeigt hauptsächlich bei blau-grüner Lichtfarbe positive Phototaxis [78, 79]. Ist die Lichtintensität zu stark, kann auch eine negative Phototaxis beobachtet werden [80]. Die Phototaxis zeigt dabei neben der verwendeten Lichtintensität eine starke Abhängigkeit von dem Kulturalter und Änderungen der Medienzusammensetzung [79, 81–83]. Bei einer Wellenlänge von 500 nm ist die phobische Reaktion am ausgeprägtesten [84].

In den durchgeführten Versuchen wurde der Algenstamm 11-32a der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich um das Medium I nach [77], das sich aus $0,1 \text{ g l}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0,1 \text{ g l}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0,3 \text{ g l}^{-1}$ NH_4NO_3 , $0,3 \text{ g l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0,04 \text{ g l}^{-1}$ CaCl_2 , $0,01 \text{ g l}^{-1}$ $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g l}^{-1}$ Natriumcitrat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und 10 ml l^{-1} Spurenelementen, bei einem pH von 6,8, zusammensetzte. Im in [77] ebenfalls angegebenen Medium II zeigt

C. reinhardtii keine phototaktische Reaktion. Die eingesetzte Spurenelementlösung bestand aus $0,1 \text{ g l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0,1 \text{ g l}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0,04 \text{ g l}^{-1} \text{ MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, $0,02 \text{ g l}^{-1} \text{ CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, $0,02 \text{ g l}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und $0,004 \text{ g l}^{-1} \text{ CuSO}_4$. Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bei VWR International (Darmstadt, Deutschland), beziehungsweise Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), bezogen.

2.1.3 Oberflächennahe Lichtprojektion

Zur Durchführung der oberflächennahen, makroskopischen Strukturierung wurden Petrischalen im Durchmesser von 8,5 cm verwendet und in allen Versuchen mit 25–30 ml beimpftem Nährmedium gefüllt. Um ein Verfälschen der Bewegung und Position von *P. purpureum* bei der Handhabung der Petrischalen zu verhindern, wurden diese mit $2,5\text{--}3 \text{ g l}^{-1}$ Agar (VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland) stabilisiert. Vorversuche zeigten, dass eine Einschränkung der vertikalen Motilität durch den Agar bei *P. purpureum* nicht gegeben war, *C. reinhardtii* hingegen zeigte bereits bei 1 g l^{-1} keine Fortbewegung mehr. Dessen Versuche wurden ohne stabilisierenden Agar durchgeführt.

Lichtprojektion (Einfache Strukturierung)

Eine detaillierte Beschreibung der mittels Lichtprojektion durchgeführten einfachen oberflächennahen Strukturierung von *P. purpureum* ist **Publikation A** zu entnehmen. Neben der darin beschriebenen Methodik wurde in weiteren Versuchen ein Anteil *P. purpureum* einer stationären Kultur entnommen und mit 9 Teilen ASW mit $0\text{--}5 \text{ g l}^{-1}$ Agar bei 40°C dispergiert. Die Beleuchtung erfolgte analog zu **Publikation A** im 16 beziehungsweise 8 stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei $120 \mu\text{mol (m}^2 \text{ s)}^{-1}$ einer Leuchtstofflampe. Mittels Maske wurden die Petrischalen mit den dispergierten *P. purpureum* bis zu 30 Tage bei 20°C punktuell beleuchtet.

Mit 25 ml einer stationären Kultur von *C. reinhardtii* in Medium I erfolgte die Beleuchtung der maskierten Petrischale bei $0,7\text{--}1,0 \mu\text{mol (m}^2 \text{ s)}^{-1}$ durch gefiltertes Umgebungslicht bei 20°C . Als Filter wurde eine blaue Folie (119 Dark Blue, PAR-64 EUROLITE, Steinigke Showtechnik, Waldbüttelbrunn, Deutschland) verwendet.

Holografische Projektion (Komplexe Strukturierung)

Für die oberflächennahen holografischen Projektionen wurden verschiedene computergenerierte Hologramme (CGHs) mit dem SLM-Pattern-Generator (Holoeye Photonics AG, Berlin, Deutschland) erzeugt. Die erhaltenen $4000 \text{ px} \times 2160 \text{ px}$ großen Fourier-Hologramme wurden zur Fokussierung mit einer computergenerierten Fresnel-Zonenplatte überlagert und mittels eines Spatial-Light-Modulators (SLM, GAEA-2, Holoeye Photonics, Berlin, Deutschland) angezeigt. Das Auslesen der Hologramme erfolgte mittels kohärentem La-

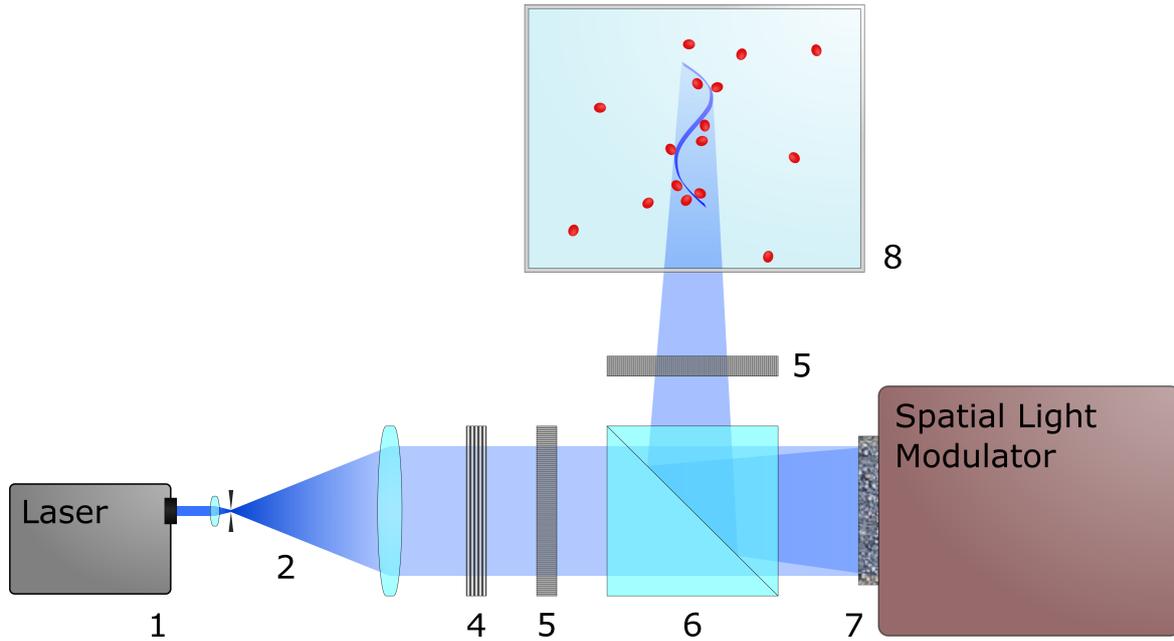


Abbildung 2.1: Optischer Aufbau zur Erzeugung holografischer Projektionen. Kohärentes Licht (1) mit 457 nm wird in (2) fokussiert ($f = 11$, A220TM-A), gefiltert ($20 \mu\text{m}$, P20S) und parallelisiert ($f = 250$, AC254-250-A-ML). Nach Drehen der Polarisierung [(4), AHWP10M-600] kann die Helligkeit über zwei Polfilter [(5), WP25M-VIS] eingestellt werden. Der Strahlenteiler [(6), BS013] ermöglicht die Auskopplung des gebeugten Lichts aus dem SLM (7). Die Projektion erfolgt horizontal oder optional vertikal mit einem vorgeschalteten Spiegel (BB2-E02) in eine Küvette (8). Die optischen Bauteile (2–6) wurden über die Thorlabs GmbH aus Bergkirchen, Deutschland bezogen.

serlicht (05-01 Series, Cobolt, Solna, Schweden) bei 457 nm mit dem in Abbildung 2.1 dargestellten optischen Aufbau.

Eine detaillierte Beschreibung der mittels holografischen Projektion durchgeführten komplexen oberflächennahen Strukturierung von *P. purpureum* ist **Publikation A** zu entnehmen. Für Versuche mit *C. reinhardtii* wurden diese in eine 26 cm vom SLM entfernte Petrischale gegeben. Die Petrischale war dabei 5 mm hoch mit Medium bedeckt. Die vertikal mit $5 \mu\text{mol}(\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ eingestrahltten holografischen Lichttemplates hatten eine Größe von $1,8 \text{ mm} \times 1,8 \text{ mm}$ beziehungsweise $1,2 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$. Die Bewegung der Lichttemplates erfolgte in $0,3 - 0,6 \text{ mm}$ großen Schritten, in Geschwindigkeiten zwischen $0,2 \text{ mm min}^{-1}$ und $1,4 \text{ mm min}^{-1}$. In einzelnen Versuchen wurden auf die Oberfläche des Mediums Glaskugeln mit dem Durchmesser von $0,4 \text{ mm}$ gesetzt, sodass die Kugeln über die Oberflächenspannung an der Oberfläche gehalten wurden.

2.1.4 Volumenbezogene Lichtprojektion

Mit dem Ziel, makroskopisch dreidimensionale Strukturen zu erhalten, kamen bei der volumenbezogenen Lichtprojektion Küvetten in unterschiedlicher Form und Größe zum Einsatz. In den Versuchen wurden mit *P. purpureum* oder *C. reinhardtii* beimpfte Medien ohne stabilisierendem Agar sowie auch mit solchem verwendet.

Lichtkegelprojektion (Einfache Strukturierung)

Für die einfache volumenbezogene Strukturierung wurden vertikale Lichtkegel in Küvetten mit 3 ml (CV10Q3500F, Thorlabs, Bergkirchen, Deutschland), beziehungsweise 10 ml eingestrahlt (MI-150, Edmund Optics, Barrington, USA; EKE/X 150W, Osram, München, Deutschland; Y-Faser 48-56, JM Microsystems, Essingen, Deutschland). Je 0,25 ml beziehungsweise 1 ml einer stationären *P. purpureum* Kultur wurden in die mit ASW gefüllten Küvetten bodennah beimpft. Kultur sowie ASW wurden zuvor mit 0–3,5 g l⁻¹ Agar verdickt, wobei vor Zugabe der Mikroalgen der Agar bereits auf 40 °C abgekühlt war. Nach Gelierung des Agars wurden die Küvetten vollständig abgedunkelt und ein vertikal eingestrahelter Lichtkegel mit dessen Taille, die im Durchmesser 3 mm betrug, etwa 1 cm über dem Küvettenboden platziert. Der Strahlendurchmesser am Küvettenboden hatte 5 mm. Das verwendete Weißlicht wurde mit 145–300 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$, das Blaulicht (BG12, Reichmann Feinoptik, Brokdorf, Deutschland) mit 4,5 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ in einem Zeitraum zwischen 2 und 10 Tagen eingestrahlt. Dabei wurden Veränderungen stündlich dokumentiert (EOS 550D, Canon, Tokio, Japan mit AT-X 100 mm 2.8 Pro D Makro, Tokina, Tokio, Japan).

Horizontale Lichtkegel wurden konvergierend oder divergierend auf der kurzen Seite einer Küvette (75×50×50 mm³) eingestrahlt. Stationäre *P. purpureum* Kulturen wurden in 200 ml ASW, das mit 3 g l⁻¹ Agar verdickt war, dispergiert. Dadurch stellten sich optische Dichten (OD) im Bereich $0,03 \leq \text{OD}_{456} \leq 0,94$ ein. Nach Gelierung wurden die Küvetten vollständig abgedunkelt und blaues Licht (457 nm) mittels einer direkt anliegenden Linse ($f = 60$, LA1401-A, Thorlabs, Bergkirchen, Deutschland) konvergierend oder weißes Licht einer LED (QAUR1361L030, Signal-Construct, Niefern-Oeschelbronn, Deutschland) mittels einer 4 cm entfernten Linse ($f = 40$, LA1274-A, Thorlabs, Bergkirchen, Deutschland) divergierend eingestrahlt. Die Helligkeit lag dabei jeweils am Lichteintritt bei 9,5 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ (blau) und 500–5000 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ (weiß). Nach 6 bis 15 Tagen wurde das Auftreten erhöhter Ansammlungsdichten visuell überprüft.

Nach 2 Tagen Wachstum wurden *C. reinhardtii* in 3-ml-Küvetten horizontal mit konvergierenden, divergierenden oder parallelen Lichtkegeln beleuchtet. Zwei Lichtkegel konnten dabei gleichzeitig um 90° versetzt (qpod mit Linsen QCL-UV und QIL-UV, Quantum Northwest, Spokane, USA) eingestrahlt werden, was eine mittige Überschneidung ermöglichte. Die Helligkeit lag vor den eingesetzten Linsen bei 145–300 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$. Die phototakti-

sche Reaktion konnte durch die Küvettenöffnung senkrecht zu den Lichtkegeln beobachtet werden.

Holografische Projektion (Komplexe Strukturierung)

Für die komplexe volumenbezogene holografische Projektion wurden die Hologramme auf zwei unterschiedliche Arten erzeugt. Neben Fourier-Hologrammen, die sich mit dem SLM-Pattern-Generator mit $4000 \text{ px} \times 2160 \text{ px}$ berechnen ließen, konnten Fresnel-Hologramme mit dem von Latychevskaia et al. entwickelten Algorithmus in einer Größe von $4160 \text{ px} \times 2464 \text{ px}$ erzeugt werden [85]. Durch den optischen Aufbau aus Abbildung 2.1 wurden dann mithilfe der Hologramme Lichttemplates horizontal in Rundküvetten mit 1 cm oder 10 cm Durchgangslänge (QS120-10-40 und QS120-100-40, Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) projiziert. Lichttemplates aus Fourier-Hologrammen wurden mit überlagerter Fresnel-Zonenplatte in etwa 1,5 cm Entfernung vom Strahlungseintritt 20 cm entfernt vom SLM fokussiert. In manchen Versuchen wurden Bestandteile des Musters oder das gesamte Muster alle 90 s für 30 s ausgeblendet, um zusätzliche Anregung zu generieren. Aus Fresnel-Hologrammen erzeugte kreuzförmige Lichttemplates wurden etwa 2 cm entfernt vom Strahlungseintritt innerhalb der Küvette platziert. Sinusförmige Lichttemplates durchstrahlten die Küvetten in ihrer gesamten Länge. Die Küvetten waren mit *P. purpureum* aus einer stationären Kultur, dispergiert in ASW mit 3 g l^{-1} Agar, vollständig oder zu etwa 75 % gefüllt. Bei Verwendung der Rundküvetten mit 10 cm Länge wurde durch das zugegebene Volumen an *P. purpureum* eine optische Dichte von $0,5 \leq \text{OD}_{456} \leq 0,6$ eingestellt. Die Helligkeit am Strahlungseintritt wurde daraufhin so justiert, dass dort, wo das Lichttemplate im Fokus war, eine Helligkeit von $4 - 5 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{ s})^{-1}$ innerhalb der gefüllten Küvette erreicht werden konnte. Dies wurde durch Berücksichtigung der Lichtschwächung des Mediums und gleichzeitige Bündelung durch Fokussierung vorab rechnerisch ermittelt. Weitere Versuche fanden mit zugesetzten *P. purpureum* im Bereich von $0,02 - 0,26 \text{ ml ml}^{-1}$ und einer Helligkeit am Strahlungseintritt von $0,1 - 37 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{ s})^{-1}$ statt. Meistens wurden die Küvetten während der Versuche gleichmäßig mit $12 - 17 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{ s})^{-1}$ Rotlicht beleuchtet (iDual, Müller-Licht, Lilienthal, Deutschland).

Um bei *C. reinhardtii* eine negative phototaktische Reaktion hervorzurufen, wurden $0,65 \text{ ml}$ einer 3 Tage gewachsenen Kultur in eine Küvette mit den Abmaßen $3 \times 3 \times 75 \text{ mm}^3$ gegeben. Nach Erzeugen eines Fourier-Hologramms mittels der SLM-ToolBox (FREE GUI software for spatial light modulators, Version 0.0.8) wurde die Küvette mit einem $3 \times 3 \text{ mm}^2$ großen Lichttemplate, das mittig einen runden Bereich mit deutlich reduzierter Helligkeit im Durchmesser von 1 mm aufwies, beleuchtet. Zur Änderung der Helligkeit des Lichttemplates wurde anschließend die Laserleistung im Bereich $10 - 100 \text{ mW}$ variiert. Eine qualitative Messung des Lichtstromes war in dem verwendeten Leistungsbereich wegen Übersättigung des Messgeräts nicht möglich.

2.2 Rheotaxis

2.2.1 Rheotaktische Strukturierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit zwei EPS sekretierenden Bakterien durchgeführt. Mit dem Ziel, die technische Machbarkeit rheotaktisch erzeugter Strukturen zu prüfen und definierte mikrobiologische Strukturen zu erzeugen, wurde der Einfluss von Strömung auf das Biofilmwachstum untersucht. Dazu wurden Bakterien in einem mikrofluidischen System mit unterschiedlichen Volumenflüssen im Kreislauf durch eine vorstrukturierte Flusszelle gepumpt. Das Wachstum in der Flusszelle ließ sich dabei durch einen optischen Aufbau unmittelbar, *in situ*, über eine große Fläche beobachten. Mittels optischer Filter konnten zudem Gradienten im Brechungsindex und somit Dichtunterschiede sichtbar gemacht werden.

2.2.2 Mikrobiologische Modellsysteme

Die Auswahl der verwendeten Bakterien *Komagataeibacter xylinus* und *Leuconostoc dextranicum* erfolgte primär im Zusammenhang mit der Art der produzierten EPS (Cellulose bei *K. xylinus* und Dextran bei *L. dextranicum*), der hohen Produktionsrate und der Eignung zur Struktur- und Materialbildung. Weitere Faktoren waren eine gute Kultivierbarkeit durch schnelles aerobes beziehungsweise aerotolerantes Wachstum und eine Einstufung als Risikogruppe 1 nach § 3 Biostoffverordnung.

Bakterium: *Komagataeibacter xylinus*

Das unbewegliche, stäbchenförmige, gramnegative Bakterium *Komagataeibacter xylinus* hat eine Größe von $0,6-0,8 \times 1-3 \mu\text{m}^2$, tritt in der Natur vorwiegend im Boden und auf Fallobst auf und kann sich kettenförmig anordnen [86–88]. In flüssige Medien eingebracht, sammelt sich *K. xylinus* mit seinem strikt aeroben Metabolismus bei stehender Kultivierung vorwiegend an der Grenzfläche Luft/Medium an. Mit Bereitstellung einer zuckerförmigen Kohlenstoffquelle produziert *K. xylinus* durch seine 5–12 Sekretionsporen hochkristalline Cellulose-I α -Mikrofibrillen mit einem Querschnitt von $7 \times 13 \text{ nm}^2$. Aus den Mikrofibrillen formt sich darauf ein Band, das sich durch die Bewegung der Bakterien zu einem Bündel von etwa $0,6-0,8 \times 1,0-4,0 \mu\text{m}^2$ aufspult [89]. Makroskopisch bildet sich an der Phasengrenze eine feste, zusammenhängende Schicht, die Kahmhaut und umgangssprachlich Essigmutter genannt wird. Diese enthält einen Großteil der Bakterien, wächst von der Grenzfläche mehrere Zentimeter dick und kann sich unter stark bewegter Kultivierung auch kugelförmig ausbilden [90, 91]. Die Produktionsrate der bakteriellen Cellulose ist dabei abhängig vom verwendeten Reaktor, Medium und der Kohlenstoffquelle und liegt zwischen $0,3$ und $2,5 \text{ g (l Tag)}^{-1}$ [86].

In den durchgeführten Versuchen wurde der Bakterienstamm DSM 2004 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) mit dem DSMZ-Medium 105 verwendet. Dieses enthielt 100 g l^{-1} Glucose, 10 g l^{-1} Hefeextrakt und 20 g l^{-1} CaCO_3 bei einem pH von 6,8. Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bei VWR International (Darmstadt, Deutschland), beziehungsweise Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), bezogen.

Bakterium: *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*

Das unbewegliche, kugelförmige, grampositive Milchsäurebakterium *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* hat einen Durchmesser von $0,5\text{--}1,2\text{ }\mu\text{m}$ und bildet bevorzugt Kettenkokken [92, 93]. Bei Anwesenheit von Saccharose bildet *L. dextranicum* außerhalb der Zelle über ausgeschiedene Hexosyltransferasen zudem das Enzym Dextranase. Dieses synthetisiert aus dem Substrat Saccharose unter Entstehung von Fructose das Exopolysaccharid Dextran mit Molekulargewichten bis zu mehreren Millionen Da. Die entstandene Fructose wird weiter zu Milchsäure vergoren und dient dem Bakterium als Kohlenstoffquelle. In der Natur tritt *L. dextranicum* auf Pflanzen auf, der Mensch verwendet es seit vielen Hundert Jahren meist unbewusst zur Fermentierung von Lebensmitteln, insbesondere von Sauerkraut. Das synthetisierte Dextran zählt mittlerweile zu den technisch bedeutendsten mikrobiell erzeugten Biopolymeren und wird im Kilotonnenmaßstab produziert [93]. Die maximale Dextrankonzentration ist im Wesentlichen von der eingesetzten Saccharosekonzentration abhängig und kann über 90 g l^{-1} erreichen [94]. Es ist gut wasserlöslich und bildet bei einer Produktionsrate von etwa $0,4\text{--}4,0\text{ g (1h)}^{-1}$ mit zunehmender Konzentration eine hochviskose Lösung [93, 95].

In den durchgeführten Versuchen wurde der Bakterienstamm DSM 20484 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen eingesetzt. Das verwendete Medium enthielt 10 g l^{-1} Trypton, 5 g l^{-1} Hefeextrakt, 3 g l^{-1} K_2HPO_4 und 50 g l^{-1} Saccharose bei einem pH von 7,2 und wurde [93] entnommen. Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bei VWR International (Darmstadt, Deutschland), beziehungsweise Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), bezogen.

2.2.3 Strukturierte Flusszelle

Eine vorkultivierte Batch-Kultur wurde im Kreislauf mittels einer Spritzenpumpe (nemesys 290N with QmixElements, CETONI, Korbussen, Deutschland) zyklisch durch eine Anordnung mikrofluidischer Bauteile gepumpt. Nach dem Entfernen von Luftblasen erreichte das gepumpte Medium unter dem versuchsabhängigen Volumenstrom die mikrofluidische Flusszelle. In dieser wurde das Medium gleichmäßig und laminar einer $9\times 11\times 0,05\text{ mm}^3$ großen Kammer zugeführt, die alle $0,5\text{ mm}$ mit runden Hindernissen im Durchmesser von $50\text{ }\mu\text{m}$ strukturiert war. Das dort stattfindende Biofilmwachstum

konnte über einen optischen Aufbau bei einer Auflösung von $7\ \mu\text{m}$ auf einer Fläche von $10,2 \times 6,8\ \text{mm}^2$ beobachtet werden. Eine detaillierte Beschreibung ist **Publikation B** zu entnehmen.

Wasserunlösliche EPS: Bakterielle Cellulose

Die detaillierte Methodik zu den Versuchen mit *G. xylinus* kann der anliegenden Veröffentlichung **Publikation B** entnommen werden.

Wasserlösliche EPS: Dextran

Mit Überimpfen von 25 ml einer elf Tage gewachsenen Vorkultur auf 225 ml S-Medium wurde nach drei Tagen Wachstumszeit eine Batch-Kultur von *L. dextranicum* bereitgestellt. Nach Vorbereitung des mikrofluidischen Systems analog zu **Publikation B** wurde das Inokulum im Kreislauf mit $0,45\ \mu\text{l s}^{-1}$ gepumpt. Nach 70 h wurde der Volumenstrom für weitere 20 h auf $0,225\ \mu\text{l s}^{-1}$ gesenkt. Zur Visualisierung der Dichteunterschiede mithilfe des Brechungsindexgradienten wurde eine scharfkantige Blende in den optischen Filter (Position 9 in Abbildung 1, **Publikation B**) eingefügt und die Brennebene zu 50 % beziehungsweise 80 % einseitig abgeschnitten.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

Die Ergebnisse der beiden bearbeiteten Taxien Photo- und Rheotaxis sind in der vorliegenden Arbeit aufgeteilt dargestellt. Die folgenden Kapitel 3.2 und 3.3 beginnen mit Beschreibungen der bereits veröffentlichten Arbeiten **Publikation A** und **Publikation B**, die vom Autor als Erstautor verfasst wurden und die Hauptergebnisse der durchgeführten Forschung enthalten. Auf die Beschreibungen folgen bisher unveröffentlichte Ergebnisse, mit denen die Forschungsarbeit ergänzt wird.

3.2 Phototaktische Strukturierung

3.2.1 Beschreibung der Veröffentlichung – Publikation A

M. Klotz, S. Deuerling, S. Kugler, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „Lightdiffractive patterning of porphyridium purpureum,“ *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 19, Nr. 4, S. 515–523, 2020.

Die Veröffentlichung „Lightdiffractive patterning of Porphyridium purpureum“ enthält Durchführung, Ergebnisse und Diskussion im Rahmen der auf Seite 23 definierten Zwischenziele 1 und 2, der einfachen und komplexen oberflächennahen Strukturierung. Es konnte die Möglichkeit einer komplexen zweidimensionalen Strukturierung der Mikroalge *P. purpureum* durch phototaktische Anregung bestätigt werden.

In den mit *P. purpureum* durchgeführten Versuchen wurde zunächst die Fortbewegungsgeschwindigkeit und -konstanz in Agar eingebetteter Mikroalgenpopulationen ermittelt. Über 20 Tage konnte dabei eine Geschwindigkeit von $0.87 \pm 0.04 \mu\text{m min}^{-1}$ von den Mikroalgen aufrechterhalten und die Mikroalgenpopulationen gleichmäßig phototaktisch bewegt werden. Weiterhin wurden die Mikroalgen mittels holografischer projizierter zweidimensionaler Lichttemplates an der Grenzfläche Luft/Medium phototaktisch strukturiert. Aus punktförmigen Mikroalgenansammlungen mit einer Größe von $< 0,1 \text{ mm}$ konnten so auf dem Prinzip einer Pixelgrafik Muster mit mehreren Zentimetern Größe gebildet werden. Die Ansammlungsparameter wurden dann bezüglich Lichtstroms, Kontrasts und Pixelgröße ausgewertet und in Bezug auf die eingesetzte Methode, auch mittels statistischer Verfahren, diskutiert. Es zeigte sich, dass vor allem ein hoher Kontrast zu höheren Ansammlungsdichten führte. Eine

Verdopplung des Kontrasts resultierte in etwa in einer Verdopplung der Ansammlungsdichte.

Die Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Daniel Van Opdenbosch am Lehrstuhl für Biogene Polymere (Prof. Dr. Cordt Zollfrank) an der Technischen Universität München durchgeführt. Probenherstellung, Charakterisierung und Datenauswertung wurden vom Autor durchgeführt. Die Publikation wurde vom Autor verfasst und mit den Co-Autoren, Mitglieder der Arbeitsgruppe Biomediierte Materialsynthese, abgestimmt.

3.2.2 Oberflächennahe Phototaxis

Ergänzend zu den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen oberflächennahen Strukturierungen von *P. purpureum* wurden weitere Versuche mit beiden verwendeten Mikroalgen durchgeführt. Neben einfachen Lichtprojektionen durch Maskierung wurde *C. reinhardtii* dynamischen holografischen Projektionen ausgesetzt.

Lichtprojektion (Einfache Strukturierung)

Nach sieben Tagen wurden die kreisrund projizierten Lichtkegel von *P. purpureum* mit bloßem Auge sichtbar, jeder weiterer Tag erhöhte die Ansammlungsdichte, siehe Abbildung 3.1(a). Bei vollständiger Verdunklung konnte die Ansammlung über mehrere Wochen aufrechterhalten werden. Innerhalb weniger Minuten konnte *C. reinhardtii*, wie anhand Abbildung 3.1(b) an dem gut lesbar abgebildeten Schriftzug TUM erkennbar, das projizierte blaue Licht abbilden. Nach Unterbrechung der Lichtprojektion wurde die Ansammlung innerhalb weniger Minuten zunehmend diffuser, bis sie sich schließlich nach > 5 min zur Unkenntlichkeit auflöste.

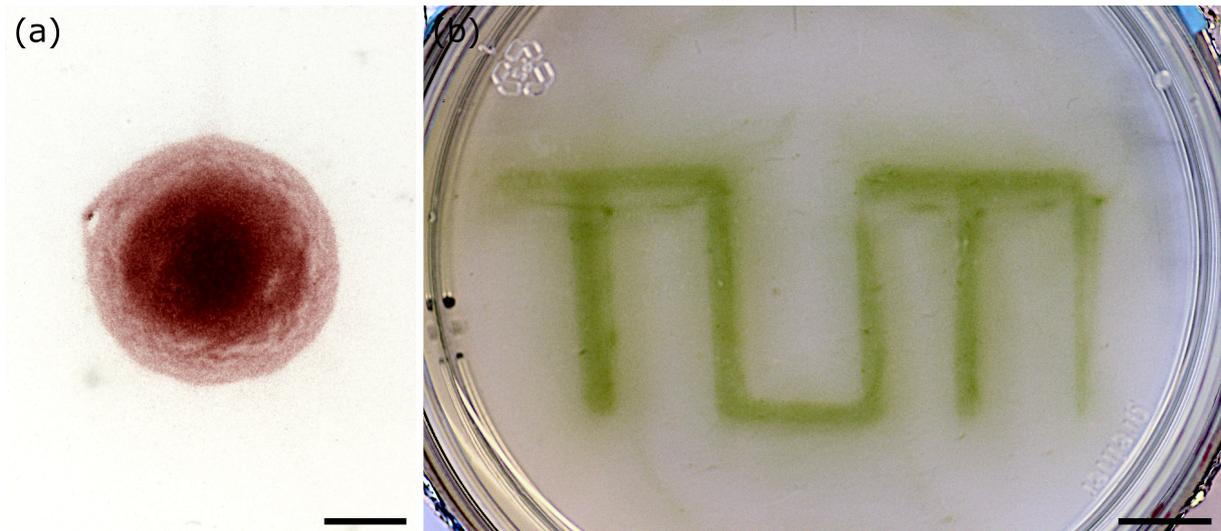


Abbildung 3.1: Durch (a) *P. purpureum* und (b) *C. reinhardtii* in Petrischale abgebildete Lichttemplates, gebildet nach 20 Tagen beziehungsweise 10 Minuten. Die Lichttemplates wurden durch vertikal beleuchtete Masken erzeugt. Der Maßstab bei (a) misst 2 mm und bei (b) 1 cm.

Holografische Projektion (Komplexe Strukturierung)

Die höchste Konturenschärfe der angesammelten Mikroalge *C. reinhardtii* konnte mit $5 \mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ ermittelt werden, eine zusätzliche Einstrahlung von etwa $12 \mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ Rotlicht verstärkte die Ansammlungsdichte geringfügig. Einer mit $0,2 \text{ mm min}^{-1}$ sowie mit $1,4 \text{ mm min}^{-1}$ bewegten Lichtprojektion folgten *C. reinhardtii* größtenteils wie in Abbildung 3.2(a, b) sowie (c, d) erkennbar. Je höher die Geschwindigkeit, desto diffuser wurde die Lichtprojektion abgebildet. Bereits geringfügiges Streulicht führte zu einem Ablösen von Algenansammlungen, die sich dann von dem projizierten Lichttemplate entfernten. Andere Ansammlungen hingegen bewegten sich auf das Lichttemplate zu, sodass ein stetiger Austausch stattfand.

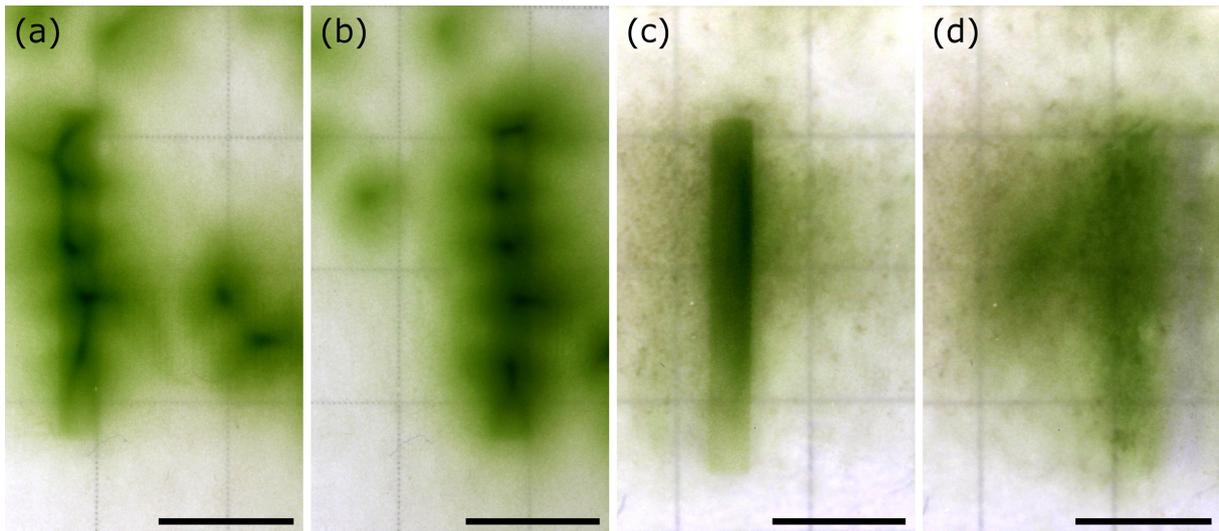


Abbildung 3.2: Bewegung phototaktisch angesammelter *C. reinhardtii* von links nach rechts durch vorheriges Versetzen der Lichttemplates in gleiche Richtung. Zeitlicher Abstand (a, b) 28 Minuten und (c, d) 10 Minuten. Die Lichttemplates wurden holografisch erzeugt und vertikal projiziert. Der Maßstab beträgt 5 mm.

Mittels gezielter Bewegung angesammelte Mikroalgen ließen sich von der Oberflächenspannung schwimmend gehaltener Glaskugeln manipulieren. Die Glaskugel setzte sich in Bewegung, nachdem sie die $0,25 \text{ mm min}^{-1}$ schnelle Ansammlung passiert hatte, siehe Abbildung 3.3. Dabei konnte die Glaskugel mit gleicher Geschwindigkeit mehrere Millimeter weit bewegt werden. Öltröpfchen zwischen 0,1 mm und 2,5 mm hingegen zeigten keine Bewegung.

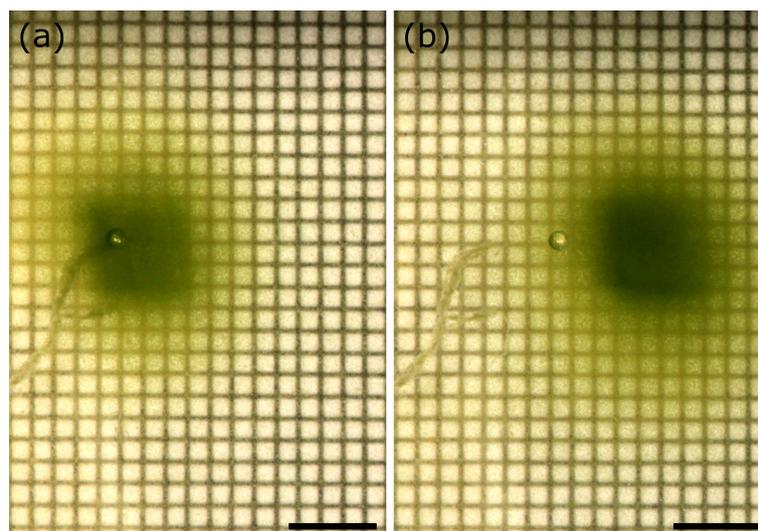


Abbildung 3.3: Bewegung einer Glaskugel von 0,4 mm durch Bewegung phototaktisch angesammelter *C. reinhardtii* von links (a) nach rechts (b). Die Lichttemplates wurden holografisch erzeugt und vertikal projiziert. Der Maßstab beträgt 2 mm.

3.2.3 Volumenbezogene Phototaxis

Für die volumenbezogene phototaktische Strukturierung wurden zum einen divergierende beziehungsweise konvergierende Lichtkegel vertikal oder horizontal in Küvetten eingestrahlt, die mit *P. purpureum* oder *C. reinhardtii* beimpft waren. Zum anderen wurden Versuche mittels dreidimensionaler holografischer Lichttemplates durchgeführt.

Lichtkegelprojektion (Einfache Strukturierung)

Ohne Stabilisierung der Mikroalgen durch Agar verteilten sich bodennah eingebrachte *P. purpureum* nach spätestens zwei Tagen vollständig homogen im Medium. Eine zwischenzeitliche Ansammlung im Bereich des Lichts ließ sich für das vertikal eingestrahlte Weiß- oder Blaulicht nicht feststellen, siehe Abbildung 3.4(a, b). Nach Stabilisierung mit Agar wurde ein Verteilen der bodennah eingebrachten Mikroalgen vermieden, allerdings konnte ebenfalls bei keiner der verwendeten Konzentrationen eine phototaktische Reaktion auf das eingestrahlte Licht beobachtet werden, siehe Abbildung 3.4(c, d). Lagern Mikroalgen nach dem Einbringen nicht nur bodennah, sondern auch in der Nähe der Phasengrenze Luft/Medium vor, konnte teilweise eine erhöhte Ansammlungsichte direkt am Strahlungseintritt an der Phasengrenze festgestellt werden. Eine Ausdehnung der Ansammlungen in Richtung des Lichtkegels war nicht erkennbar.

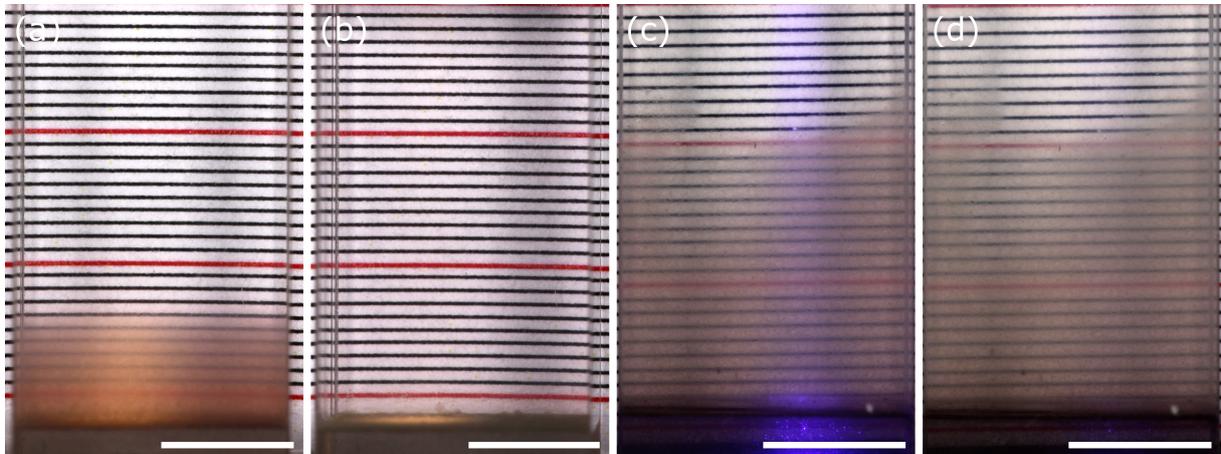


Abbildung 3.4: (a, b) vertikal mit Weißlicht beleuchtete *P. purpureum* in 3-ml-Küvetten ohne stabilisierenden Agar im zeitlichen Abstand von 22 Stunden. (c, d) *P. purpureum* vertikal mit Blaulicht beleuchtet und $2,5 \text{ g l}^{-1}$ Agar stabilisiert im zeitlichen Abstand von zwei Tagen. Der blaue Lichtkegel in (c) ist zur Illustration verstärkt dargestellt. Der Farbunterschied von *P. purpureum* zwischen (a) und (c, d) resultiert aus der verringerten Konzentration, da die Mikroalge über ein größeres Volumen verteilt war. Der Maßstab beträgt 5 mm.

Mit horizontal eingestrahlt, kegelförmigem Weiß- oder Blaulicht war in den $75 \times 50 \times 50 \text{ mm}^3$ großen Küvetten ebenfalls keine phototaktische Reaktion ersichtlich. Aufgrund der

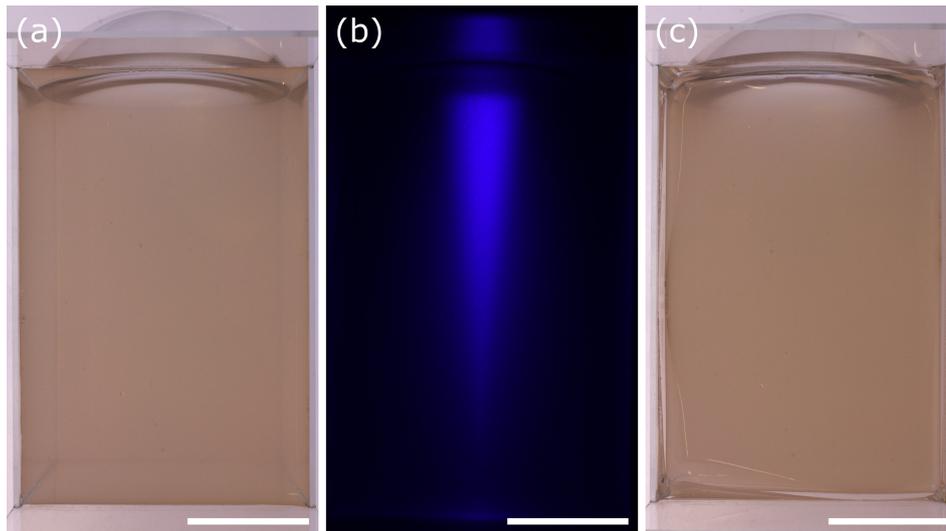


Abbildung 3.5: Vertikale Perspektive auf *P. purpureum* in $75 \times 50 \times 50 \text{ mm}^3$ großen Küvetten in 3 g l^{-1} Agar dispergiert, zu Versuchsbeginn (a) und nach sieben (c) Tagen horizontaler Beleuchtung. In (b) ist der blaue, horizontale Lichtkegel der $2''$ großen Linse ($f = 60$) deutlich erkennbar. Der Maßstab beträgt 25 mm.

mehrtägigen Versuchsdauer war das Aufrechterhalten steriler Bedingungen in der offenen Küvette nicht über den gesamten Versuchszeitraum hinweg möglich. Hieraus resultierte die in Abbildung 3.5(c) erkennbare Trübung.

Mit horizontalen Lichtkegeln beleuchtete *C. reinhardtii* sammelten sich nach wenigen Minuten an den Oberflächen des Strahlungseintritts- und -austrittspunktes der verwendeten 3-ml-Küvetten an. Auch unterschiedliche Helligkeitsbereiche, die durch Fokussierung und Überschneidung von Lichtkegeln hervorgerufen wurden, führten wie in Abbildung 3.6 zu keiner erhöhten Ansammlungsdichte innerhalb des Volumens. *C. reinhardtii* sammelte sich in allen Versuchen am Strahlungseintritt und -austritt an.

Holografische Projektion (Komplexe Strukturierung)

Die Qualität der verwendeten Fourier-Hologramme wurde in **Publikation A** erläutert. Beim Auslesen erzeugen diese eine planare Ebene mit festgesetztem Fokus in z-Richtung, die in den Versuchen innerhalb der Küvetten platziert wurde. Mit Verwendung der Fresnel-Hologramme hingegen konnte beim Auslesen ein fokussiertes Lichttemplate in z-Richtung erzeugt werden, siehe Abbildung 3.7(b). Die maximale Auflösung der mittels Fresnel-Hologramme erzeugten Lichttemplates konnte für einen einzelnen Lichtpunkt [vgl. Abbildung 3.7(a)] in x- und y-Richtung mit $10 \mu\text{m}$ und in z-Richtung mit $0,7 \text{ mm}$ ermittelt werden. Da der Abstand zum SLM variiert wurde, lag die Auflösung in den Versuchen in x- und y-Richtung bei $10 - 33 \mu\text{m}$ und in z-Richtung bei $0,7 - 1,8 \text{ mm}$.

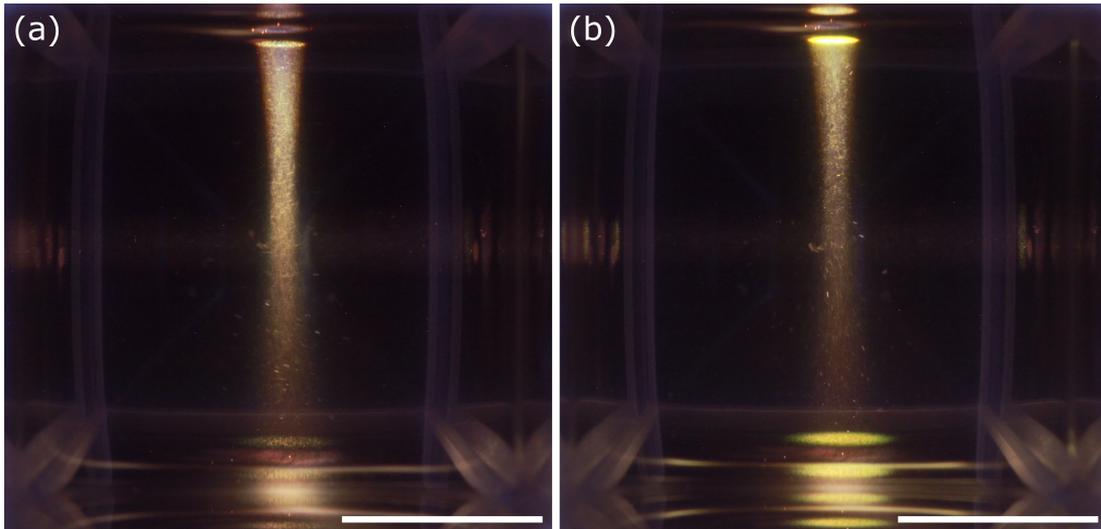


Abbildung 3.6: Vertikale Perspektive auf *C. reinhardtii* in 3-ml-Küvette nach 0 min (a) und 5 min (b). Zwei horizontal eingestrahelte und um 90° versetzte Lichtkegel, von denen der hellere mittig fokussiert ist, überschneiden sich im Zentrum der Küvette. Der Maßstab beträgt 5 mm.

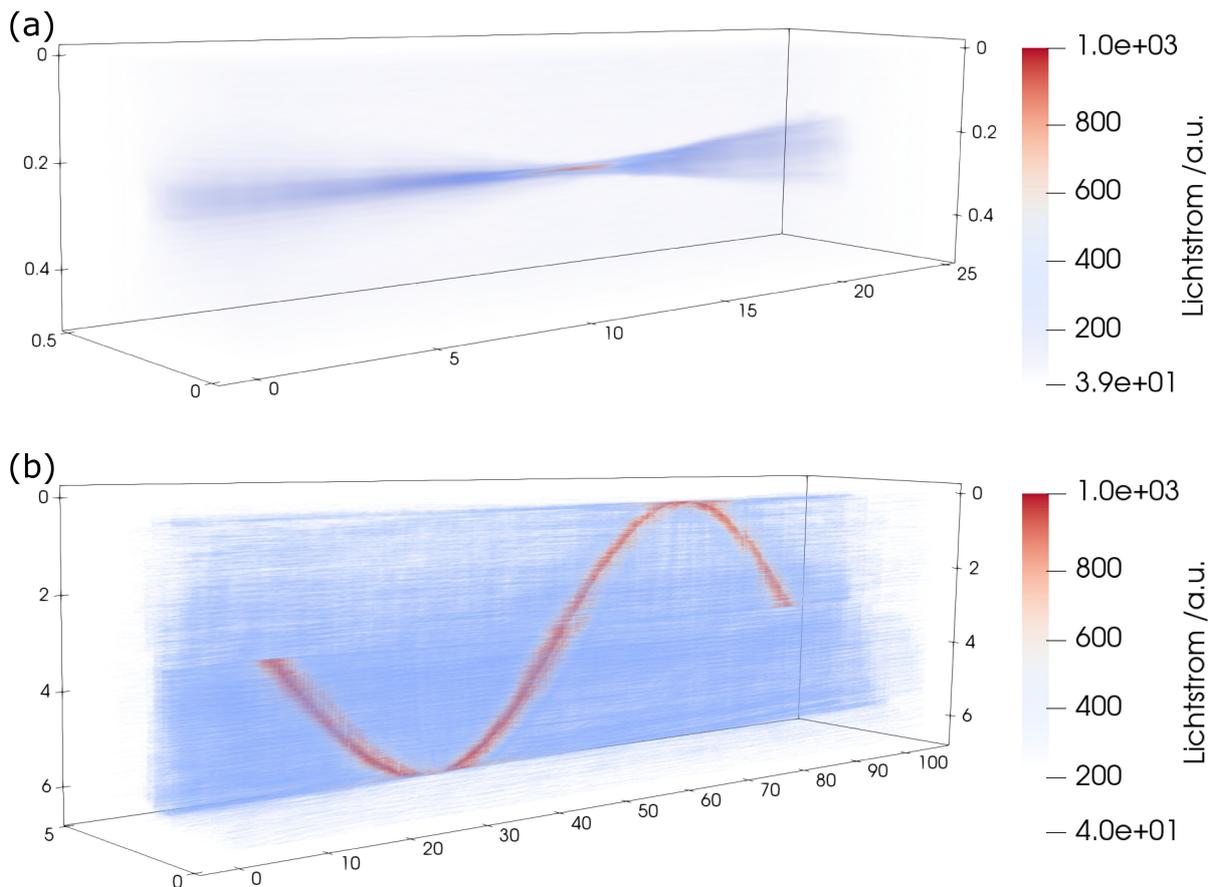


Abbildung 3.7: Gemessene Intensitätsverteilung von mittels Fresnel-Hologrammen erzeugten Lichttemplates, einem Lichtpunkt (a) und Sinusfunktion (b). Die Maßangaben der Koordinatensysteme sind in Millimetern angegeben. Die lange Achse zeigt die z-Richtung.

Unabhängig davon, ob das eingestrahlte Lichttemplate mittels Fourier- oder Fresnel-Hologramm erzeugt wurde, konnte in den Versuchen keine Strukturbildung innerhalb der Küvetten erreicht werden. Dabei war das Lichttemplate selbst zwar messbar (siehe Abbildung 3.7), bei Beobachtung der Küvetten mit bloßem Auge aber nicht sichtbar. Die einzige sichtbare phototaktische Reaktion konnte am Strahlungseintritt festgestellt werden und ist beispielgebend in Abbildung 3.8 dargestellt. Zudem war bei Verwendung von Rotlicht insgesamt eine wachstumsbedingte Zunahme der Ansammlungsichte festzustellen, die in einer verstärkten Rotfärbung sichtbar wurde. Mit den helleren Streifen in Abbildung 3.8(b), die aus einer Verschattung des Rotlichts durch den Küvettenhalter resultieren, wird dies verdeutlicht.

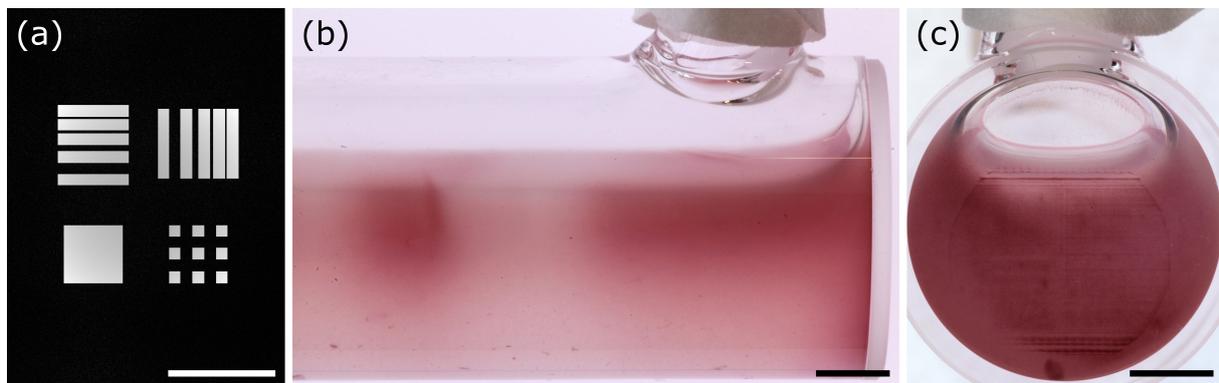


Abbildung 3.8: (b, c) Küvette mit *P. purpureum* nach neun Tagen Beleuchtung mittels eines durch ein Fourier-Hologramm erzeugten Lichttemplates. Die Fokusebene des Lichttemplates, die der Simulation in (a) gleicht, lag 1,5 cm entfernt vom flachen Rand der Küvette in (b). Dort am Strahlungseintritt (c) wurde das unfokussierte Lichttemplate von den Mikroalgen abgebildet. Die vertikalen hellen Streifen in (b) lagen unter der Küvettenhalterung, vom Rotlicht abgeschattet. Der Maßstab beträgt 5 mm.

Um mittels einer negativen phototaktischen Reaktion gezielt die Ansammlungsichten von *C. reinhardtii* im Volumen zu erhöhen, war, um den notwendigen Lichtstrom mit dem verwendeten holografischen Aufbau zu erreichen, im Gegensatz zu den anderen holografischen Versuchen ein stark eingeschränktes Küvettenvolumen und ein vereinfachtes Lichttemplate erforderlich. Ziel war es, eine erhöhte Ansammlungsichte in der helligkeitsreduzierten Mitte eines 3×3 mm großen Lichtfeldes entlang der 75 mm langen Küvette festzustellen. Nachdem die Mikroalgen zuerst mit niedrigem Lichtstrom am Strahlungseintritt gesammelt wurden, entfernten sich diese nach Erhöhung größtenteils vom Strahlungseintritt. Eine verstärkte Ansammlungsichte in der helligkeitsreduzierten Lichtfeldmitte konnte dabei nicht beobachtet werden, die Mikroalgen verteilten sich dispers und strebten dem anderen Küvettenende entgegen.

3.3 Rheotaktische Strukturierung

3.3.1 Beschreibung der Veröffentlichung – Publikation B

M. Klotz, D. Bajrami, und D. Van Opdenbosch, „Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned cellulose networks,” *Material Advances*, Vol. 3, Nr. 15, S. 6191-6207, 2022.

Die Veröffentlichung „Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned cellulose networks“ enthält Durchführung, Ergebnisse und Diskussion zur rheotaktischen Materialsynthese. Neben der Ermittlung grundlegender Syntheseparameter, welche die Materialbildung darstellen, konnte durch den Erhalt von hierarchisch anisotrop strukturierten Proben die Möglichkeit einer rheotaktischen Strukturierung durch vorstrukturierte Flusszellen bestätigt werden.

In den mit *K. xylinus* durchgeführten Versuchen wurden vorstrukturierte Flusszellen mit Inokulum in unterschiedlichen Volumenströmen beschickt. An den Strömungskörpern der Flusszelle bildeten sich abhängig von den vorliegenden Scherkräften bakterielle Streamer, die sich zunächst in Strömungsrichtung und dann übergeordnet vernetzten. Durch Evaluierung der Wachstumsparameter konnten ein zweiteiliges logistisches Biofilmwachstum nachgewiesen und die Wachstumsparameter in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit ermittelt werden. Durch eine höhere Strömungsgeschwindigkeit ließ sich die Konzentration an Biofilm erhöhen, der zugrunde gelegte Mechanismus wurde diskutiert. Der Autor konnte zeigen, dass die aus Cellulose-Mikrofibrillen bestehenden Bänder im gewachsenen Biofilm anisotrop in Strömungsrichtung strukturiert wurden. Die Herstellung hierarchisch anisotroper Materials vom Nanometerbereich bis zur makroskopischen Größenordnung wurde mit den knapp 1 cm² großen Proben somit erreicht. Weiterhin wurden Versuche zur Mineralisierung durchgeführt, in denen sich zeigte, dass eine Übertragung der Anisotropie auf eine Kompositphase möglich ist.

Die Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Daniel Van Opdenbosch am Lehrstuhl für Biogene Polymere (Prof. Dr. Cordt Zollfrank) an der Technischen Universität München durchgeführt. Probenherstellung, Charakterisierung und Datenauswertung wurden vom Autor durchgeführt. Daten zur Strömungssimulation wurden vom Co-Autor D. Bajrami erhoben. Die Publikation wurde vom Autor verfasst und mit den Co-Autoren abgestimmt.

3.3.2 Weitere EPS

Es ist anzunehmen, dass sich die technische Machbarkeit rheotaktischer Strukturen bei Biofilmen mit wasserunlöslichen und wasserlöslichen EPS unterscheidet. Letztere wurden deshalb ebenfalls mit der angewandten Methode der vorstrukturierten Flusszelle getestet. Da der Brechungsindex der EPS je nach Konzentration und Molekulargewicht durch deren Wasserlöslichkeit nur gering von dem umgebenden Medium abweicht [96], sind niedrig konzentrierte EPS kaum sichtbar beziehungsweise optisch detektierbar. Eine Untersuchung der Strukturierbarkeit wird dadurch wesentlich erschwert. Um dieses Hindernis zu umgehen, wurde mittels der Technik der Schlierenfotografie durch Einsatz eines Schlierenfilters die Sichtbarkeit der Brechungsindexgradienten auf der gesamten beobachteten Fläche von $10,2 \times 6,8 \text{ mm}^2$ erhöht.

Nachdem sich bis etwa 25 h nach Versuchsbeginn zunehmend ringförmige Biofilme um die Strömungskörper bildeten, begannen diese, sich tropfenförmig abzulösen, Abbildung 3.9(b,c). Die Größe der tropfenförmigen Biofilme stagnierte gegen Ende des Versuchs. Auch das anschließende Halbieren der Strömungsgeschwindigkeit führte zu keiner wesentlichen Änderung in Form oder Größe. Ohne Verwendung des Schlierenfilters war eine Beobachtung nicht möglich, mit zunehmender Filterung der Filterbrennebene nahm der Kontrast resultierend aus dem Brechungsindexgradienten zu. Die Auflösung hingegen verschlechterte sich.

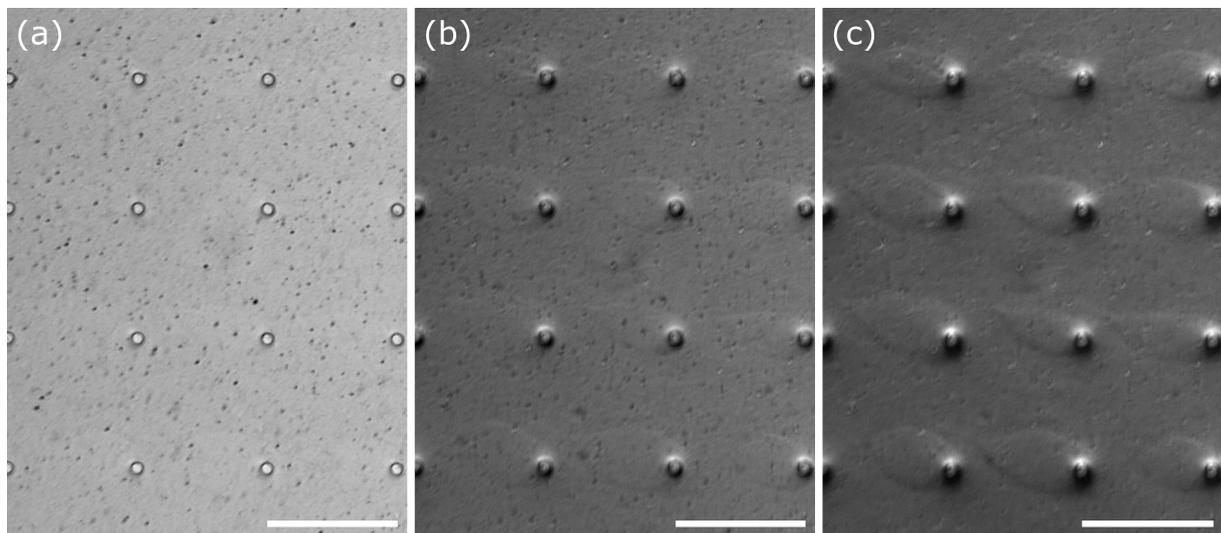


Abbildung 3.9: Deckungsgleiche Ausschnitte aus der mikrofluidischen Flusszelle mit Biofilm von *L. dextranicum* nach gesamt 90 h Wachstum. Sichtbar gemacht durch Schlierenfilterung. (a) ohne Filter, (b) mit 50%iger und (c) mit 80%iger Filterung der Filterbrennebene. Der Fluss, zum Zeitpunkt der Bildnahme $0,225 \mu\text{s}^{-1}$ kommt von rechts. Der Bildkontrast aller Bilder wurde zur Hervorhebung für die vorliegende Arbeit nachträglich erhöht. Der Maßstab beträgt 0,5 mm.

4 Diskussion

4.1 Rubrum

Durch gezielte Beeinflussung von Taxien mikrobieller Systeme werden in der vorliegenden Arbeit Grundlagen aus dem Bereich der biomediierten Materialsynthese erarbeitet. Bezogen auf die in Kapitel 1.3 gestellte Forschungsfrage müssen auf die zwei untersuchten Anregungsarten unterschiedliche Antworten gegeben werden. Die biomediierte Erzeugung räumlich ausgedehnter, makroskopisch und hierarchisch strukturierter Materialien mittels

Phototaxis konnte nicht in beabsichtigter Weise durch die Anwendung von (holografisch erzeugter) Lichttemplates realisiert werden.

Rheotaxis ist möglich und konnte mittels Verwendung vorstrukturierter Flusszellen und der Erzeugung und Vernetzung bakterieller Streamer dargestellt werden.

Eine einzelne Bewertung kann dabei für beide Taxien anhand der in Kapitel 1.1 auf Seite 15 aufgestellten Punkte 1–4 getroffen werden. Diese sind am Ende der Diskussion in Kapitel 4.5 als Fazit gegeben.

4.2 Allgemeine Betrachtung

Eingangs werden die Besonderheiten der materialbildenden Phase – die mikrobiellen Systeme – einführend betrachtet und diskutiert:

Um mittels mikrobiologischer Systeme makroskopische Templates oder Materialien herzustellen, ist die zielgerichtete Ausrichtung oder Platzierung einzelner Mikroben auf eine Vielzahl zu skalieren. Bei der Auswahl der Taxis, mit der die ausgewählten Mikroben angeregt oder beeinflusst werden sollen, ist deshalb darauf zu achten, dass diese möglichst kontrollierbar auf eine Vielzahl an Mikroben gleichzeitig wirken. Die Komplexität je Taxis dürfte dabei stark variieren, zum einen bedingt durch die Ausprägung der jeweiligen Taxis und zum anderen technisch bedingt durch die Möglichkeit, die Taxis flächig und reproduzierbar möglichst vielen Mikroben zu vermitteln. Denn die technische Herausforderung wird sich beispielsweise bei der Anwendung von chemischen (Chemotaxis) oder osmotischen (Osmotaxis) Gradienten von Strömungs- (Rheotaxis), Licht- (Phototaxis), oder Magnetfeldern (Magnetotaxis) unterscheiden. Ebenso zu beachten, ist eine mögliche Überlagerung von Taxien. Beispielgebend ist eine mit Gyro- und Gravitaxis überlagerte phototaktische Anregung, bei der durch die verstärkte Ansammlung von Grünalgen

die erzeugte Struktur destabilisiert wird [42, 97]. Ähnliches kann auch bei anderen Taxien, etwa der Chemotaxis, auftreten [98, 99]. Weiterhin ist nach erfolgreicher Anregung und Strukturierung mit einer Sättigung und Abnahme des Effektes zu rechnen: Erreichen die Mikroben am Ansammlungsort hohe Konzentrationen, wird der anregende Impuls für andere Mikroben von ihnen abgeschirmt, gestreut oder es entstehen sterische Effekte [100, 101]. Auch das Auftreten eines lokalen Nährstoffmangels ist je nach Verfügbarkeit und Konzentration denkbar.

Nach erfolgreicher Anwendung der Taxien auf das mikrobielle System, das sich nach der in Kapitel 1.4 gestellten Zielsetzung über wenigstens millimetergroße gezielt erzeugte Mikrobenstrukturen definiert, ist die Erzeugung von Materialien prinzipiell auf drei Wegen vorstellbar. Erstens können die strukturierten Mikroben selbst als Template für weitere Schritte dienen [102–104]. Zweitens ist die direkte [105] oder drittens die indirekte [106, 107] Nutzung der Metabolismusprodukte möglich. Zwischen der Mikrobenstruktur und dem darauffolgenden Syntheseweg besteht dabei ein direkter Zusammenhang. Denn entweder ist die per Taxis erzeugte Struktur oder, bei Nutzung der Metabolismusprodukte, die Umgebung der Mikroben strukturgebend für das Material. Als weitere, anschließende Möglichkeit zur Materialsynthese kann noch die Einbettung gesehen werden. Ähnlich der Infiltration und Einbettung von Holz in verschiedene Polymere ist für jede der mittels der drei Wege erhaltenen Strukturen eine Einbettung und Überführung in ein Komposit denkbar [63].

Zur Beantwortung der Forschungsfrage und der beschriebenen Zielsetzung kamen die ersten beiden beschriebenen Wege zur Materialsynthese in Betracht. Wie eingangs in Kapitel 1.1 beschrieben, bietet vor allem der zweite Syntheseweg über die Nutzung von EPS die Möglichkeit, Materialien mit einem hierarchischen Aufbau über mehrere Größenordnungen zu erhalten. Aus diesem Grund wurde primär eine Strukturierung mit *P. purpureum* und *K. xylinus* bearbeitet, die beide EPS erzeugen. Die Strukturierung von *P. purpureum* erfolgte mittels phototaktischer, die von *K. xylinus* mittels rheotaktischer Anregung. Zur Überprüfung der technischen Umsetzbarkeit einer aufs Volumen ausgedehnten phototaktischen Strukturierung und Templateerzeugung wurden Versuche mit *C. reinhardtii* durchgeführt. Da diese keine EPS produzieren, wäre bei erfolgreicher Strukturbildung der erstgenannte Weg zur Materialbildung nach erfolgreicher vorheriger Stabilisierung der Struktur prinzipiell denkbar. Weiterhin wurde eine mögliche rheotaktische Strukturierung wasserlöslicher EPS anhand des Bakteriums *L. dextranicum* getestet.

4.3 Phototaxis als Methode zur Struktur- und Templateerzeugung

4.3.1 Phototaktische Strukturierung

Licht als anregender Impuls bietet vielseitige und flexible technische Möglichkeiten zur gezielten Steuerung phototaktisch aktiver Mikroben. Mit geeigneten technischen Mitteln kann Licht präzise im μm -Bereich oder auch flächig, beziehungsweise voluminös in makroskopischer Größenordnung eingesetzt und in Intensität, Spektrum, Frequenz und Muster hochfrequent geändert werden.

Mit der Voraussetzung einer ausreichenden optischen Transparenz des umgebenden Mediums können durch einstrahlendes Licht oder erzeugte Lichttemplates phototaktisch aktive Mikroben präzise angeregt und gesteuert werden. Es lassen sich einzelne Mikroben [65] sowie ganze Kolonien durch einstrahlendes Licht bewegen, siehe **Publikation A** sowie [69]. Dabei ist die Reaktion der Mikroben je nach Spezies abhängig von dem Lichtspektrum, dem Intensitätsgradienten und der Intensität. Im blauen Lichtspektrum zeigen *P. purpureum* beispielsweise positive Phototaxis, im roten Spektrum wird Photokinese angeregt [68,69,108]. Je nach Lichtintensität sind die phototaktischen Reaktionen unterschiedlich ausgeprägt [65,69,108], auch negative Phototaxis kann initiiert werden [80]. Bei starken Intensitätsgradienten wird ein von der photophobischen Reaktion hervorgerufenen Bremsen oder Umkehren der Bewegung beobachtet [65]. Zusätzlich können weitere Parameter Einfluss haben. Eine Variation der Frequenz im Sekundenbruchteil zeigt beispielsweise bei *C. reinhardtii* eine unwesentliche Reaktion [109,110], deutlich langsamere Zyklen allerdings lösen gebildete Strukturen in der Dunkelphase wieder auf [111]. Je nach Aufbau des Augenflecks kann auch die Polarisationsrichtung Einfluss auf die Phototaxis haben, wie bei *Euglena* festgestellt werden konnte [78].

Für die Erzeugung makroskopischer Strukturen ist nach Kapitel 1.4 eine Verwendung makroskopischer Lichtprojektionen angedacht, die den Mikroben als Templates dienen. Diese Lichttemplates sollen umgebende Mikroben durch ihre Phototaxis anziehen und sammeln, sodass sie durch eine erhöhte Ansammlungsdichte der Mikroben nachgebildet werden. Der biologische Mechanismus, der zur erhöhten Ansammlungsdichte führt, beruht hauptsächlich auf der phototaktischen sowie auf der phobischen Reaktion. Durch die Phototaxis sollen sich umliegende Mikroben gezielt auf das Lichttemplate zubewegen. Dort angekommen verhindert beziehungsweise verzögert die phobische Reaktion ein Verlassen des Lichttemplate, wodurch sich die Ansammlungsdichte zunehmend erhöht. Bei längerer Versuchsdauer ist auch lokal indiziertes Wachstum ein verstärkender Faktor. Technisch sind für die Erzeugung flächiger, zweidimensionaler Lichttemplates in jedem Umfeld einsetzbare Digitalprojektoren Stand der Technik. Auch voluminöse, dreidimen-

sionale Lichttemplates lassen sich erzeugen. Mikrospiegelaktoren oder SLMs können mittels Amplituden- oder Phasenhologrammen Licht dreidimensional fokussieren [85]. Auf diesem Wege kann eine Anregung auch ortsspezifisch im Volumen erfolgen, die Variation des Lichtspektrums ist hier ebenfalls bereits realisierbar [112].

Die Wahl des mikrobiologischen Systems hängt im Wesentlichen von der phototaktischen Reaktion, dem Fortbewegungsmechanismus und dem zu erreichenden Template/Material ab. Während sich die Parameter der Lichtanregung flexibel durch die genannten Techniken auf die phototaktische Reaktion anpassen lassen, kann auf den Bewegungsapparat und Metabolismus weniger präzise oder nur mit gesteigertem Aufwand Einfluss genommen werden. Die mikrobielle Fortbewegung erfolgt substratgebunden oder davon abgelöst, mittels Flagellen, Zilien oder durch gezielte Kontraktion oder Drehbewegung [113]. Substratgebundene Fortbewegung, insbesondere die von Eukaryoten, geht dabei meistens mit der Sekretion von EPS einher [114]. Je nach zu erreichendem Template/Material und verwendeten Mikroben sind die Versuchsparameter anzupassen. Für ein Template, das nur aus Mikroben bestehen soll, ist die Wahl sich schnell fortbewegender flagellierter Mikroben zielführend. Sind EPS ein Strukturelement, kann ein geeignetes Substrat zur Fortbewegung notwendig sein.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroalge *P. purpureum* wurde bereits in Vorarbeiten als Strukturelement verwendet [105] und ist aufgrund ihrer phototaktischen Reaktion und EPS-Sekretion ausgewählt worden, siehe Kapitel 2.1.2. Die Medien der Versuche mit *P. purpureum* wurden mit Agar stabilisiert. Ohne Zugabe von Agar verteilten sich *P. purpureum* wie bei einer Batch-Kultur homogen im Medium, ohne eine phototaktische Reaktion aufzuzeigen, siehe Abbildung 3.4(a, b). Die Auswahl der flagellierten phototaktischen Mikroalge *C. reinhardtii*, die gegenüber *P. purpureum* eine rund $4 \cdot 10^3$ mal schnellere Fortbewegung zeigt [64, 65], erfolgte aufgrund des schnellen und substratlosen Fortbewegungsmechanismus. Auf diesem Weg konnte die technische Machbarkeit der Abbildung dreidimensionaler Lichttemplates substratunabhängig und zeitreduziert getestet werden. Die geringere Versuchszeit reduzierte dabei Störfaktoren wie aufkommende mikrobielle Verunreinigungen, Verdunstung, Zellalterung sowie Zellteilung.

Die Versuchsdurchführung wurde nach den in Kapitel 2.1 genannten Schritten durchgeführt. Aufbauend auf den Vorarbeiten von Zollfrank et al. [105] wurde im 1. und 2. Schritt eine zweidimensionale Strukturierung der Mikroalgen angestrebt (folgend in Kapitel 4.3.2 diskutiert). Lichttemplates, die über eine Maske oder holografisch erzeugt wurden, strahlten dazu vertikal in die mit Mikroalgen beimpften Medien. Eine Fokussierung erfolgte auf die Phasengrenze Luft/Medium oder war unendlich. Im 3. und 4. Schritt wurde eine dreidimensionale Strukturierung angestrebt (folgend in Kapitel 4.3.3 diskutiert). Dazu wurden ausgedehnte Lichtkegel oder holografisch erzeugte Lichttemplates in beimpfte Me-

dien eingestrahlt. Im Gegensatz zu den ersten beiden Schritten war der Fokus innerhalb des Mediums oder auf unendlich gesetzt.

4.3.2 Oberflächennahe Strukturierung

Die Versuche zeigten, dass sowohl eine einfache als auch eine komplexe zweidimensionale Strukturierung der verwendeten Mikroalgen durch phototaktische Anregung¹ realisierbar ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur: Über senkrechte Einstrahlung eines blauen Lichtpunktes konnten Arrieta et al. und Deravaux et al. *C. reinhardtii* ansammeln und im Falle von Deravaux et al. die Zellzahl auf das 42-fache erhöhen [97, 111]. Phototaktische Strukturierung von *P. purpureum* durch Verwendung einfacher Maskierung konnte von Schuchart et al. [65, 115] und Zollfrank et al. [105] erreicht werden. Auch andere als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen ließen sich phototaktisch strukturieren. Mit *Phormidium uncinatum* hat Häder eine Lichtprojektion mit hoher Auflösung übertragen können [116]. Und mittels der negativen phototaktischen Reaktion von *Escherichia coli* ließen sich Lichttemplates als zweidimensionale Strukturen abbilden [117–120].

Eine sichtbare Erhöhung der Algendichte von *C. reinhardtii* in gezielter Form war durch Verwendung einfacher Maskierung [Abbildung 3.1(b)] oder holografischer Projektionen (Abbildung 3.2 und 3.3) innerhalb weniger Minuten möglich. Bei Verwendung der holografischen Projektionen konnten die Strukturen zudem bewegt werden, wobei höhere Bewegungsgeschwindigkeiten die Struktur zunehmend auflösten. Durch die Bewegung der Algenstrukturen war es möglich, auf der Medienoberfläche schwimmende Glaskugeln zu bewegen, die ein Vielfaches größer als die Mikroalgen selbst waren, siehe Abbildung 3.3. Als Mechanismus kommt eine durch den Dichteunterschied hervorgerufene horizontale Konvektion in Betracht [97]. Nach dem Nachbilden der maskenbasierten Strukturgebung von *P. purpureum* [Abbildung 3.1(a)] wurden mittels holografisch erzeugter Lichttemplates mehrere Zentimeter große makroskopische Strukturen erzeugt, die aus einzelnen Algenansammlungen in einer Größe $< 100 \mu\text{m}$ bestehen. Es konnten somit komplexe zweidimensionale Strukturen gebildet werden, wobei die Algendichte im Wesentlichen vom Kontrast des anregenden Lichttemplate zur Umgebung abhängig ist, siehe **Publikation A**. Alle gebildeten Strukturen zeigten die höchste Übereinstimmung mit den Lichttemplate an der Phasengrenze Luft/Medium. Mit zunehmender Tiefe wurden die Strukturen diffuser und zunehmend undefiniert. Als Hauptursachen werden die durch die Mikroben verursachte Lichtstreuung sowie sie gegenseitige Verschattung angenommen [100].

¹Die phototaktische und phobische Reaktion liegt hierbei überlagert vor. Auf eine Differenzierung wird im Folgenden verzichtet.

4.3.3 Volumenbezogene Strukturierung

Mit erfolgreicher Strukturbildung bei Durchführung der ersten beiden in Kapitel 2.1 genannten Schritte wurden darauf aufbauend Versuche zur Strukturierung im Volumen durchgeführt. Dabei konnte keine dreidimensionale Strukturierung durch phototaktische Anregung erreicht werden. Bei Projektion von Lichtkegeln in ein mit *C. reinhardtii* beimpftes Medium sammelten sich die Mikroalgen, obwohl die höchste Lichtintensität durch Überschneidung von Lichtkegeln in der Küvettenmitte verortet war, in allen Versuchen nach wenigen Minuten am Strahlungseintritts- beziehungsweise -austrittsort an. Dies ist deutlich erkennbar in Abbildung 3.6(b). In den Versuchen mit *P. purpureum* blieb eine phototaktische Reaktion bei Projektion von Lichtkegeln weitgehend aus. Durch senkrechte Einstrahlung weißer Lichtkegel trat je nach Verteilung der Mikroalgen im Medium nur eine erhöhte Ansammlungsdichte unmittelbar am Strahlungseintritt auf. Bei Anwendung der holografischen Projektionen war eine erhöhte Ansammlungsdichte, resultierend aus der eingestrahnten Projektion, ebenfalls direkt am Strahlungseintritt und bei gleichzeitiger Verwendung roter Hintergrundbeleuchtung zu beobachten, siehe Abbildung 3.8.

Zusammenfassend konnte entweder keinerlei Zusammenhang zwischen der Ansammlungsdichte der Mikroalgen und der eingestrahnten Projektion festgestellt werden, es trat keine Änderung der Ansammlungsdichte auf, oder eine erhöhte Ansammlungsdichte und Abbildung der projizierten Lichttemplates war lediglich am direkten Strahlungseintrittsbeziehungsweise -austrittsort des Lichts und somit an der Grenzfläche Medium/Glas nachweisbar.

Ansammlungsfaktoren

Modell. Die angewandten dreidimensionalen Lichtprojektionen, die den phototaktischen Mikroben als Templates dienen sollten, bestanden je aus einem definierten Bereich mit festgelegtem Lichtstrom. Diese Bereiche ließen sich mittels Überlagerung konvergierender Lichtstrahlbündel umsetzen, die idealerweise durch ihre Brennpunkte dann die Lichttemplates erzeugen. Zur Erzeugung der überlagerten Lichtstrahlbündel bieten sich holografische Methoden an. Die Hologramme beinhalten dabei das Wellenfeld, das beim Projizieren die benötigten Brennpunkte direkt (Fresnel-Hologramm) oder nach weiterer Fokussierung (Fourier-Hologramm) als reelles Bild darstellt. Zur Verbildlichung kann ein Fresnel-Hologramm dabei als Überlagerung von Fresnel-Zonenplatten angesehen werden, die jeweils ein konvergierendes Lichtstrahlbündel hervorrufen. In einer Vereinfachung ist ein dreidimensionales Lichttemplate folglich durch konvergierendes Licht, beispielsweise erzeugt durch eine Sammellinse, darstellbar. Mit dieser Vereinfachung lässt sich verdeutlichen, dass neben dem Brennpunkt mit dem maximalen Lichtstrom entlang der Lichtbündel immer auch weitere Bereiche mit geringerem Lichtstrom vorhanden sind.

Das Erzeugen erhöhter Ansammlungsichten durch lichtbasierte Templates erwies sich in den durchgeführten Versuchen als nicht realisierbar. Die Begründung lässt sich dabei anhand des vereinfachten Lichttemplates einer Sammellinse, in zwei Bereiche aufgeteilt, darstellen: Die im Volumen vorhandenen phototaktischen Mikroben, die von dem Lichttemplate angeregt werden sollen, befinden sich entweder innerhalb oder außerhalb des Lichtbündels. Je nachdem erreicht sie das Licht entweder direkt aus der Lichtquelle, die auch dem Lichtemittenten nachgeschaltete optische Bauteile wie Linsen, reflektierende und, wie angewandt, holografische Strukturen einschließt, oder indirekt über Streulicht.

Außerhalb des Lichtbündels. Befinden sich die Mikroben außerhalb des Lichtbündels, nehmen sie folglich nur Streulicht wahr, das durch Mikroben und Medienbestandteile im Lichtbündel hervorgerufen wird. Die Konzentration der Mikroben oder Medienbestandteile beeinflusst die Extinktion beziehungsweise die optische Dichte (OD). Neben der Lichtabsorption beinhaltet die OD Lichtstreuung, welche für die folgende prinzipielle Herleitung mit der von Svenson et al. ermittelten Streuung an *C. reinhardtii* mittels der Streufunktion $F(\theta) = 1 \cdot 10^{-5} \cdot \theta^{-2,845}$ (550 nm) beschrieben wurde (Abbildung 6 in [121]) und dem Streuverhalten anderen Phytoplanktons ähnelt [122]. Das gestreute Licht nimmt mit zunehmendem Abstand quadratisch ab und unterliegt auf dem weiteren Weg zur Mikrobe ebenso weiterer Extinktion. Nach Berücksichtigung dieser Faktoren wird ein konvergierendes Lichtbündel perspektivisch aus der Sicht einer Mikrobe wie in Abbildung 4.1, vereinfacht im Querschnitt dargestellt, wahrgenommen. Die Mikrobe befindet sich in diesem Fallbeispiel bei $d=1$ cm und mit $z=-1$ cm entfernt von der abgebildeten Ebene. Die optischen Dichten der Medien betragen 0,25 (a), 0,5 (b) und 0,75 (c). Die konvergierende Geometrie erhöht den Lichtstrom und damit die örtliche Streuung, bis die Lichtbündel nach dem Brennpunkt wieder divergieren. Eine erhöhte OD resultiert in vermehrtem Streulicht, schwächt allerdings gleichzeitig auch das Licht, das die Mikrobe letztlich erreicht. Trotzdem zeigt das Modell in Abbildung 4.1, dass das Lichttemplate (in dieser Vereinfachung der einzelne Brennpunkt) bei ausreichender Kollimation auch bei unterschiedlicher Extinktion für die Mikrobe den lichtintensivsten Punkt darstellen kann und die Bildung eines Lichttemplates prinzipiell möglich ist.

Der lichtintensivste Punkt muss allerdings nicht unbedingt die höchste phototaktische Wirkung auf die Mikroben haben²: Durch ihren einzelnen Augenfleck mit einem weiten Sichtfeld und der im Zusammenhang stehenden Drehbewegung zur Richtungsbestimmung des Lichtsignals detektiert und reagiert *C.reinhardtii* mit seiner Phototaxis auf das gesamte eingestrahlte beziehungsweise gestreute Licht und nicht nur auf einzelne Punktquellen [78, 123]. Dies ist auch für *P. purpureum* trotz fehlender einzelner lichtdetektierender

²Dies lässt sich auch evolutionär begründen [78].

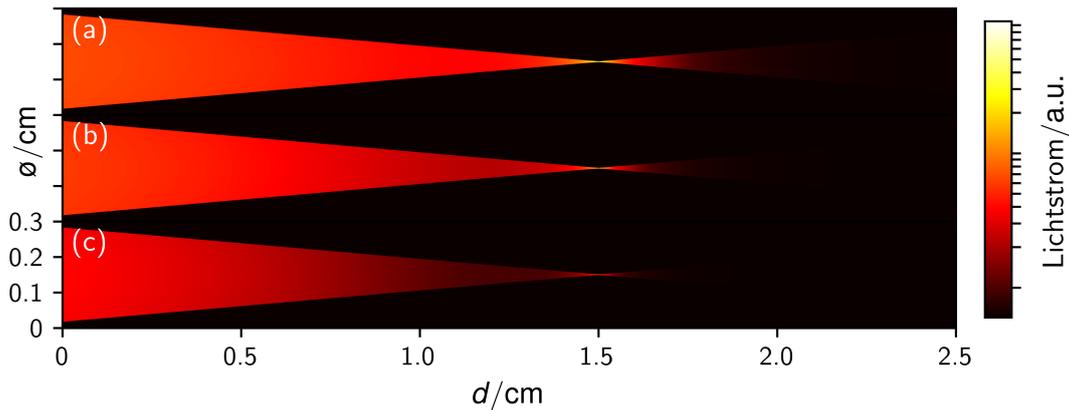


Abbildung 4.1: Modell der Lichtstreuung eines mit 10° fokussierten Lichtbündels aus der Perspektive einer Mikrobe (Position $d = 1$ cm, $z = -1$ cm). Die z -Achse steht dabei orthogonal zu der bei $z = 0$ dargestellten Ebene. Die optischen Dichten der Medien betragen 0,25 (a), 0,5 (b) und 0,75 (c). Dazu angenommen wird eine Streuung nur an den Mikroben selbst, die homogen verteilt vorliegen. Eine weitere Streuung des bereits gestreuten Lichts ist nicht abgebildet.

Struktur³ (Augenfleck) anzunehmen [125, 126]. Denn deren Verhalten gegenüber Punktquellen ist unabhängig davon ähnlich. Ein höherer Helligkeitsunterschied resultiert eher in einer erhöhten Ansammlungsdichte als die Maximalhelligkeit, siehe **Publikation A**.

Wie Buder bereits 1919 mit dem von ihm benannten Resultantengesetz für verschiedenste phototaktische Mikroben feststellte, erfolgt die phototaktische Bewegung immer in die Richtung des gesamten Lichteindrucks und nicht dorthin, wo ein Optimum zu erwarten wäre [123]. Die resultierende Bewegungsrichtung lässt sich dabei zum Beispiel für zwei winklig angeordnete Lichtquellen mithilfe eines Kräfteparallelogramms als Resultierende bestimmen.

Wird nun, um den gesamten Lichteindruck dazustellen, die gesamte Helligkeit in Abbildung 4.1 je Abschnitt auf der Abszisse berücksichtigt, ergeben sich die am Strahlungseintritt befindenden Maxima aus Abbildung 4.2. Diese sind für verschiedene Positionen (rotes Kreuz) und Abstände z der Mikrobe aufgetragen. Es wird deutlich, dass der Brennpunkt der Lichtbündel (rote gestrichelte Linie) nicht den höchsten Lichtstrom und somit Lichteindruck erzielt. Das Maximum liegt in jedem Fall nahe der Strahlungsquelle. Mit erhöhtem Abstand flacht das Maximum ab und wird diffuser. Eine erhöhte OD wiederum reduziert den Lichtstrom insbesondere mit zunehmendem Abstand deutlich. Insgesamt zeigt sich, dass der gesamte Lichteindruck des Streulichtes in jedem der Fälle in Richtung der Strahlungsquelle am stärksten ist. Bezogen auf das Streulicht kann somit davon ausgegangen werden, dass die resultierende phototaktisch induzierte Bewegungsrichtung

³Von den ähnlichen Cyanobakterien wird abgeleitet, dass das Trichome für die Lichtdetektion zuständig sein kann, wobei der eigentliche Photorezeptor noch nicht identifiziert wurde [124].

nicht auf das vermeintliche Optimum im Brennpunkt, sondern in Richtung der Strahlungsquelle zielt, unabhängig von Abstand und ihrer relativen Position zum Brennpunkt und Lichttemplate.

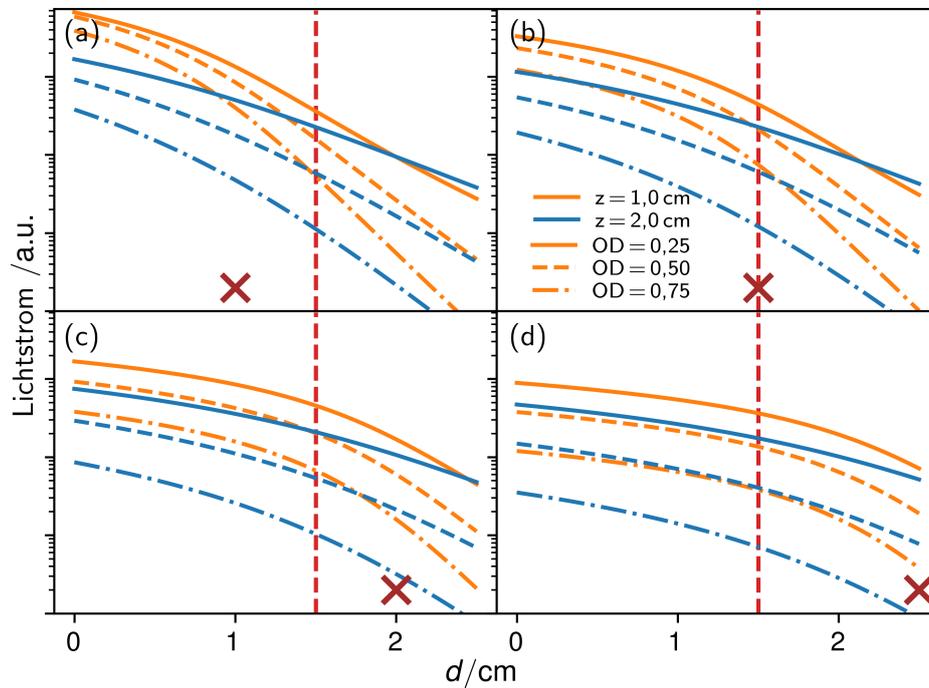


Abbildung 4.2: Kumulierter Lichtstrom aus Abbildung 4.1 entlang eines fokussierten Lichtbündels aus der Perspektive einer Mikrobe. Die Position der Mikrobe variiert in (a-d) und ist durch das rote Kreuz dargestellt. Der Brennpunkt des fokussierten Lichtbündels wird durch die senkrecht gestrichelte rote Linie angezeigt.

Innerhalb des Lichtbündels. Mikroben, die sich im Lichtbündel befinden oder es erreichen, sollten sich idealerweise phototaktisch zu dem Optimum (der Brennpunkt beziehungsweise das Lichttemplate) bewegen und dort ansammeln. Die phobische Reaktion würde dies ermöglichen, da dadurch die Mikroben beim Verlassen der optimalen Bedingungen stoppen oder umkehren. Empirisch kann dies aber nicht erreicht werden. Das zeigen die von Buder für viele verschiedene Mikroben durchgeführten und unter anderem von Halldal wiederholten Experimente [123, 127]. Auch nach Passieren eines örtlichen Lichtstrommaximums, wie durch den Brennpunkt gegeben, oder, anders ausgedrückt, auch nach Passieren eines Optimums bewegten sich die Mikroben weiterhin in Richtung der Strahlenquelle, immer entlang der einstrahlenden Lichtbündel.

Buder benutzt hierfür den Begriff Photopotaxis, „zur Lichtquelle hin- oder von ihr fortswimmen“, der auch der heute angewandten Terminologie für reizinduzierte Bewegungsreaktionen entspricht, siehe Kapitel 1.2. Mechanistisch ist dabei anzunehmen, dass der Lichtstromgradient in einem kollimierenden Brennpunkt auf die Größe der Mikrobe be-

zogen als gering anzusehen ist und die phobische Reaktion für eine Ansammlung nicht ausreichend eintritt. Folglich wird die phototaktische Bewegung entgegen der Lichtquelle fortgesetzt, im Brennpunkt sogar verstärkt [80], wobei die phobische Reaktion koordinierend unterstützt [84].

Nun kann die phobische Reaktion beispielsweise für *P. purpureum* mit einer anderen als der verwendeten Wellenlänge zulasten der phototaktischen Reaktion verstärkt werden [65]. Da aber innerhalb der in den Versuchen verwendeten Lichtmuster über ein breites Parameterspektrum, keinerlei erhöhte Ansammlungsichten beobachtet werden konnten, ist davon auszugehen, dass auch unter Licht anderer Wellenlänge die Phototaxis dominieren würde. Dies gilt wahrscheinlich auch für Mikroben, die in der Literatur als nicht phototaktisch, sondern als dominierend photophobotaktisch angegeben werden [128]. Bei Versuchen dieser Art wird in der Regel die Bewegung senkrecht zum eingestrahlt Licht beobachtet. Die Mikroben sind folglich in ihrer phototaktischen Bewegung durch den Küvettenrand oder das Deckglas eingeschränkt. Es kann somit bezweifelt werden, dass die verwendeten *Eglena* auch in einem dreidimensionalen Aufbau das rein phobische Verhalten gezeigt hätten. Diese Einschränkung gilt im Übrigen auch für die von Halldal durch diffuses Licht in einer Kapillare mittig angesammelten Mikroben [127].

Zusammengefasst ist die Phototaxis als Phototaxis anzusehen. In der in Kapitel 1.2.3 dargelegten Diffusität der Terminologie ist die daraus resultierende Folge, vor allem in englischsprachiger Literatur, verloren gegangen. Teilweise sinngemäß getroffene Definitionen „... towards/along the light source/vector ...“ der Phototaxis wurden ungenügend eingeordnet [78, 129–132], was zur Folge hatte, dass heute die bereits damals von Buder widerlegte Theorie einer Ansammlung im Optimum erneut möglich erschien. Das topotaktische Verhalten der Mikroben ist aber das größte Hindernis dafür, Mikroben im Volumen mittels projizierter Lichttemplates anzusammeln.

Somit ist davon auszugehen, dass sich die im Volumen verteilten Mikroben in Richtung der Strahlungsquelle bewegen. Eine eventuell eintretende phobische Reaktion, zum Beispiel senkrecht zum Strahlenbündel, wird dabei von der Phototaxis überlagert und tritt nicht auf. Weiter verstärkt eine hervorgerufene erhöhte Konzentration an Mikroben nahe des Strahlungseintritts die phototaktische Anregung aufgrund der Verschiebung des gesamten Lichteindrucks. Als Konsequenz ergibt sich eine hauptsächliche Ansammlung am Strahleneintritt, wie sie in Abbildung 3.6 für *C. reinhardtii*, aber auch in Abbildung 3.8 für *P. purpureum* beobachtet wurde. Die erhöhte Ansammlung am Strahlenausritt (Abbildung 3.6) ist auf die durch Reflexion an der Glasküvette hervorgerufene erhöhte Helligkeit zurückzuführen.

Tabelle 4.1: Ursachen, die zum Ausbleiben einer phototaktischen Reaktion bei *C. reinhardtii* (C) oder *P. purpureum* (P) führen können. Die letzte Spalte gibt den angenommenen Einfluss auf die durchgeführten Experimente wieder, mit 0 = unwahrscheinlich; 1 = geringe Wahrscheinlichkeit; 2 = mittlere Wahrscheinlichkeit; 3 = hohe Wahrscheinlichkeit

Nr.	Spezies	Ursachen	Einfluss
1.	P, C	Fehlerhafte phototaktische Anregung	1
2.	C	wachstumsabhängige Hemmung	1
3.	P, C	stoffliche Hemmung	2
4.	P	mechanisch/physikalische Hemmung	3

Störfaktoren

Das Ausbleiben der phototaktischen Reaktion⁴, wie es in den durchgeführten Versuchen hauptsächlich für *P. purpureum* beobachtet wurde, kann in mehreren Ursachen begründet sein, über die in Tabelle 4.1 ein Überblick gegeben wird.

Eine fehlerhafte Parameterwahl der verwendeten Lichtprojektionen nach Tabelle 4.1, Nr. 1, die im Ausbleiben einer phototaktischen Reaktion resultiert, oder diese verhindert, wurde durch das Verwenden verschiedener Aufbauten und Einstellungen minimiert. Durch die Verwendung von Lichtkegeln, die geometriebedingt unterschiedliche Helligkeitsbereiche aufweisen, und durch die von den Mikroalgen hervorgerufene Lichtschwächung war davon auszugehen, dass für eine phototaktische Anregung optimale Intensitätsbedingungen zumindest in Teilstücken oder in Bereichen, die nur Streulicht erhellte, erfüllt wurden. Erhöhte Ansammlungsdichten innerhalb von Teilstücken des Volumens wären somit zu erwarten gewesen. Auch konnte auf die Parameter der oberflächennahen Strukturierung zurückgegriffen werden, mit denen bereits erfolgreich eine phototaktische Reaktion hervorgerufen werden konnte. Der Einfluss ist deshalb als gering zu werten.

Unterschiedliche Methoden der Kultivierung (Tabelle 4.1, Nr. 2) zeigen Einfluss auf die Phototaxis. Mit zunehmendem Kulturalter schwächte sich die phototaktische Reaktion von *C. reinhardtii* ab [132]. Ebenso zeigt auch die Beleuchtung einen Effekt, nach einer Dunkelphase ist bei *C. reinhardtii* beispielsweise noch nach mehreren Tagen eine ungleichmäßige Phototaxis messbar [81]. Da die ausbleibende phototaktische Reaktion in den durchgeführten Versuchen hauptsächlich *P. purpureum* betraf und die verwendeten Kulturen über 20 Tage eine stabile Phototaxis (siehe **Publikation A**), vergleichend zur homokontinuierlichen Kultivierung [69], zeigten, ist ein Einfluss der Kultivierungsmethode allerdings als gering anzunehmen.

Eine Hemmung der phototaktischen Anregung durch externe Faktoren wie pH, vorhandene oder fehlende Substanzen (Tabelle 4.1, Nr. 3) ist bei Mikroalgen zu beobachten [45,127].

⁴Die phototaktische und phobische Reaktion liegt hierbei überlagert vor. Auf eine Differenzierung wird im Folgenden verzichtet.

Neben Inhibitoren wie beispielsweise 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU), welche die Photosynthese hemmen [108], können auch die Bestandteile der Umgebungsluft und Kationen hemmende, aber auch stimulierende Wirkung auf die verwendeten Mikroalgen haben [82, 83]. Mit dem Stabilisieren des Mediums von *P. purpureum* mittels Agar ergibt sich ein bislang unzureichend untersuchtes Hindernis: Mit zunehmender Dicke und Konzentration des Agars, wird ein Gas- und Nährstoffaustausch verzögert. Dadurch können lokal Mangel- oder Sättigungseffekte eintreten, welche die phototaktische Reaktion beeinflussen. Allerdings wäre hierbei mit zunehmendem Abstand von der Grenzfläche Luft/Medium eine graduelle Reduzierung zu erwarten gewesen. Dies konnte zwar nicht beobachtet werden, ein Einfluss als zusätzlicher Faktor ist trotzdem wahrscheinlich.

Ebenfalls ist durch das Stabilisieren des Mediums von *P. purpureum* mit Agar eine mechanisch-physikalische Hemmung möglich (Tabelle 4.1 Nr. 4). Zwar zeigte *P. purpureum* sowohl aufgebracht auf [69] als auch eingebettet (siehe **Publikation A**) in mit Agar verdicktes Nährmedium eine eindeutige horizontale Bewegung, eine vertikale Bewegung konnte allerdings in keinem der Versuche nachgewiesen werden. Erhöhte Ansammlungs-dichten bei vertikaler Lichteinstrahlung am Strahlungseintritt traten nur bei dispergierten und folglich am Strahlungseintritt vorhandenen *P. purpureum* auf. Überschichtete *P. purpureum* wie in Abbildung 3.4 zeigten dies nicht. Über die zugrunde liegenden Hindernisse kann dabei nur spekuliert werden. Eins kann in einer unzureichenden Möglichkeit des Fortbewegungsapparates, schräg oder vertikal zu gleiten, bestehen, hervorgerufen beispielsweise durch den erhöhten Kraftbedarf. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Insgesamt ist diese Hemmung als wahrscheinlichster Faktor für das Ausbleiben einer phototaktisch induzierten Ansammlungsdichte und einer daraus folgenden Strukturierung zu sehen.

4.4 Rheotaxis als Methode zur Struktur- und Templateerzeugung

Die Verwendung von Strömungsfeldern bietet eine vielversprechende technische Möglichkeit zur Materialsynthese mittels rheotaktischer Steuerung von Mikroben und deren extrazellulären Produkten. Bestmöglich steuerbar kann ein initiales Strömungsfeld mit örtlich unterschiedlichen Strömungsbedingungen mittels geeigneter Flusszellen und Strömungskörper erzeugt werden. Die Größe der Flusszelle ist im Wesentlichen auf die Gewährleistung steriler Bedingungen limitiert und gibt gleichzeitig die Größe des Materials vor. Die Richtung, Länge und zeitliche Kontinuität der Strömungsvektoren lassen sich prinzipiell in der Größenordnung der Mikroben sowie im makroskopischen Maßstab gestalten. Strömungssimulationen (CFD) können dabei unterstützen, die passende Geometrie einzusetzen, mit der sich beispielsweise gezielt Verwirbelungen erzeugen lassen [133]. Neben

dem Strömungsfeld ist bei der rheotaktischen Materialsynthese das verwendete Medium ein weiterer wesentlicher Parameter. Über zeitliche und räumliche Änderung lassen sich Gradienten unterschiedlichster Art (Nährstoff, Temperatur, Dichte, Toxizität etc.) mit Einfluss auf die Mikroben und deren extrazelluläre Produkte einstellen.

Zur gezielten Materialsynthese ist der Einfluss verschiedener Strömungsfelder vorab auf die zu verwendenden Biofilme zu untersuchen. Denn Scherkräfte können je nach Oberfläche die Biofilmbildung verstärken oder verhindern [134–137], die Verfügbarkeit und Proliferation der Bakterien ändern [138] sowie eine Anhaftung an Oberflächen und die Bildung von EPS beeinflussen [56, 139]. Zur Untersuchung der Einflussfaktoren können Methoden wie die in Kapitel 3.3.2 beim Bakterium *L. dextranicum* angewandte Schlierentechnik helfen. Die Sichtbarkeit abgeschiedener Biofilme, insbesondere derer auf Basis wasserlöslicher EPS, kann damit wesentlich erhöht beziehungsweise erst ermöglicht werden. Denn bereits eine einfache Filterung der Fourier-Ebene des in **Publikation B** verwendeten optischen Aufbaus um 80% würde den Kontrast der Brechungsindexgradienten um den Faktor 5 verstärken. Nach weiteren Anpassungen ist ein Faktor von 25 und mehr erreichbar [140].

Insgesamt ist der zeitliche Verlauf der Materialsynthese und des Strömungsfeldes zu berücksichtigen, da Biofilme das initiale Strömungsfeld und somit auch die rheotaktische Strukturierung zunehmend verändern. Dadurch ist davon auszugehen, dass sich eine hohe Komplexität der initialen Strömungsbedingungen kaum über den Zeitraum der Synthese aufrechterhalten lässt und in einem reproduzierbaren Material resultiert. Auch durch Verwendung turbulenter Strömung ist keine reproduzierbare Materialsynthese zu erwarten.

Das gestaltete Strömungsfeld stellt folglich nur die Startbedingung für die rheotaktische Strukturierung dar, die den weiteren zeitlichen Verlauf beeinflusst. Um die Unsicherheit dieses Verlaufes zu reduzieren, liegt ein Ansatz nahe. Die natürliche Bildung biologischer Materialien gibt hierfür das Vorbild [6], ein zusammenhängendes Material, zusammengesetzt aus kleineren, besser kontrollierbaren Bausteinen, zu formen. Bakterielle Streamer, die über laminare Strömung an Strömungskörpern erzeugt werden können [57, 58], stellen sich hierfür als geeignet heraus. In der vorliegenden Arbeit konnten aus insgesamt 374 Streamern zusammenhängende Biofilme auf Basis bakterieller Cellulose gebildet werden, siehe **Publikation B**. Der Einsatz bakterieller Cellulose als Hauptbestandteil des durch *K. xylinus* erzeugten Biofilms erfolgte dabei aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und der hohen anwendungsorientierten Perspektive [141, 142].

Durch die angewandte Methode lassen sich mehrere Strukturmerkmale beeinflussen. Die laminaren Strömungsbedingungen ermöglichten ein reproduzierbares Abscheiden der bakteriellen Cellulose mit Ausrichtung der Cellulosefibrillen parallel zur Strömung. Zudem konnten in den gewonnenen Biofilmen makroskopische alternierende Bereiche mit höheren und niedrigeren Konzentrationen realisiert werden. Dies resultierte direkt aus der Vernetzung der einzelnen Streamer, die durch die platzierten Strömungskörper initiiert wurden.

Die freie Anordnung der Strömungskörper ermöglicht folglich eine exakte und vielfältige Methode zum Einstellen der örtlichen Materialdichte, was als Vorteil gegenüber der Synthese in durchströmten Batch-Kulturen gesehen werden kann. Mit diesen konnten bereits strömungsstrukturierte Materialien mit richtungsabhängigen mechanischen Eigenschaften auf Basis bakterieller Cellulose hergestellt werden [143, 144].

Auch Materialien mit kombinierten Vorzugsrichtungen sind mit der angewandten Methode einer linearen und laminaren Abscheidung in Flusszellen vorstellbar und wären gegenüber einer Abscheidung im komplexen Strömungsfeld durch ihre einfachere Realisierung und eine höhere Reproduzierbarkeit im Vorteil. Mit Modifikation der Flusszelle, wodurch die laminare Strömung richtungsversetzt erfolgen kann, könnten EPS zeitversetzt in unterschiedlichen Richtungen miteinander vernetzt abgeschieden werden. Durch einen niedrigen Volumenstrom könnten dabei die laminare Strömung und eine reproduzierbare Abscheidung gewährleistet werden.

Eine anschließende Weiterbehandlung des gewonnenen Materials, auch noch innerhalb der Flusszelle, konnte bereits in der vorliegenden Arbeit getestet werden und zeigt die Möglichkeit zur Herstellung von strukturierten Kompositmaterialien auf. So ließ sich eine Übertragung der anisotropen Strukturmerkmale der strukturierten bakteriellen Cellulose auf die anorganische Phase feststellen.

4.5 Fazit

Die Eingangs im Rubrums (Kapitel 4.1) vorangestellte zusammengefasste Bewertung der beide Taxien erfolgt folgend anhand der in Kapitel 1.1 auf Seite 15 aufgestellten **Punkte 1 – 4**.

Phototaxis

Nach **Punkt 1** ließen sich, wie in **Publikation A** beschrieben, Ansammlungsfaktoren von *P. purpureum* bei zweidimensionaler Projektion von Lichttemplates bestimmen. Es zeigte sich, dass insbesondere der Kontrast die Ansammlungsdichte beeinflusste. Weiterhin zeigen die Versuche unter Kapitel 4.3.3, dass ein dreidimensionales Aufkonzentrieren durch Lichttemplates nicht realisierbar ist. Dies kann mit der Diskrepanz zwischen Lichteindruck und Lichttemplate, sowie mit der bereits in der Literatur beschriebenen Phototopotaxis erklärt werden.

Eine Strukturbildung, die nach **Punkt 2** phototaktisch möglich war, beschränkte sich auf zweidimensionale Ansammlungen von *P. purpureum* und *C. reinhardtii*. Um darüber hinaus verwertbare Strukturen zu erhalten, könnte eine Änderung der Methode helfen, die auch die Phototopotaxis berücksichtigt. Es ist vorstellbar, die in der additiven Fertigung (3-D-Druck) etablierte Methode der Stereolithografie auf die phototaktische Mate-

rialsynthese zu übertragen. Die Strukturbildung würde hierbei in Rastern immer an der Grenzfläche Luft/Medium verortet sein. Zur Anregung der Phototaxis ist dann weiterhin die Verwendung der zweidimensionalen holografischen Lichttemplates möglich. Weiterhin ist denkbar, dass diese Methode keiner Viskositätserrhöhung zur Stabilisierung der Struktur bedarf, da sich die lokal gebildeten EPS-Strukturen auf der sich in Rastern anenkenden Plattform der Apparatur Halt geben. Bei alternativ vorstellbaren Methoden, die Berücksichtigung der Phototaxis durch Beseitigung der für die Mikroben sichtbaren Lichtquelle finden, da das anregende Licht direkt im Lichttemplate entsteht, ist durch den hohen Energieeintrag eine Zellschädigung wahrscheinlich. Ebenso wäre zu klären, wie sich die vom Medium hervorgerufene Lichtschwächung auf die Anregung von *upconverting nanoparticles* oder die sogenannten *Fairy Lights* auswirkt [145,146].

Über **Punkt 3** und **Punkt 4** lässt sich zur Phototaxis im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Aussage treffen.

Rheotaxis

Wie in **Publikation B** beschrieben, ließen sich nach **Punkt 1** durch die in der Flusszelle strukturierten Hindernisse gezielt bakterielle Streamer bilden, wobei die wirkende Scherkraft erwartungsgemäß in Zusammenhang mit der Konzentration an abgeschiedenem Biofilm stand. Mit den ermittelten Wachstumsdaten konnte Verständnis für die Streamerbildung sowie für die anschließende übergeordnete Vernetzung gewonnen werden. Diese Daten können eine hilfreiche Grundlage für neue und größer skalierte Versuche zu rheotaktisch biomedierter Materialsynthese liefern. Weiterhin ermöglicht das Verfahren zur Schlierenbildgebung (vgl. Kapitel 3.3.2) die Möglichkeit, optisch schwierig erkennbare (oft wasserlösliche) EPS zu untersuchen.

Bezogen auf **Punkt 2** ließen sich durch das gezielte Wachstum von *K. xylinus* mehrere μm dünne und knapp 1 cm^2 große Materialien, bestehend aus Biofilm, herstellen. Der durchgeführte Ansatz, eine Vielzahl einzelner bakterieller Streamer kontrolliert abzuscheiden und daraus ein übergeordnetes Netzwerk zu bilden, stellte sich als erfolgversprechend und für zukünftige Ansätze als vielversprechend heraus. Diese Vorgehensweise ermöglichte zudem, das gewonnene Material gegenüber natürlich gewachsener Kahmhaut mit zwei zusätzlichen anisotropen Hierarchieebenen zu versehen. Zum einen wurde eine gleichmäßige Ausrichtung der aus Cellulose-Mikrofibrillen bestehenden Bänder in Strömungsrichtung erreicht, zum anderen verfügte das Material über übergeordnete Stränge mit erhöhter Konzentration an Biofilm.

Die in **Punkt 3** genannte räumliche und zeitliche Kontrolle der Rheotaxis über den gesamten Zeitraum aufrechtzuerhalten, ist herausfordernd. Die verwendete Methode, eine Vielzahl einzelner Streamer bei laminaren, gut kontrollierbaren Strömungsverhältnissen zu bilden und zu vernetzen, kann hierzu hilfreich sein. Der Einfluss der bereits abgeschiedenen Biofilme auf die weitere Abscheidung ist zu untersuchen.

Die Reproduktion der Materialbildung, **Punkt 4**, war gegeben, jedoch unter einer hohen Standardabweichung. Hier ist es angebracht, insbesondere die beeinflussenden Auswirkungen des verwendeten Inokulums, das im Gegensatz zur Kahlhaut nur wenige Bakterien enthielt, festzustellen und eine stabilere Methode zu validieren. Zur möglichen Skalierung der Materialbildung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zudem ergaben sich während der Versuche, dass das Design der für die Versuche konstruierten Mikrofluidikzelle für darauf aufbauende Versuche zu überarbeiten ist. Dies betrifft hauptsächlich den Einströmbereich, der einerseits in dem verwendeten Design zu verfrühten Versuchsabbrüchen aufgrund von Verstopfung der Anschlüsse führte und andererseits bei hohen Volumenströmen das Fluid einseitig verteilte. Ersteres kann mittels horizontaler Anschlüsse in die Mikrofluidikzelle gelöst werden, die das bisherige senkrechte Einströmen um eine scharfe Kante ablöst und die verstärkt auftretende Biofilmbildung an dieser verhindert. Zweiteres ist durch einen geradlinigen Aufbau der Verteilungskanäle realisierbar [147].

5 Ausblick

Die biomediierte Materialsynthese steht als innovatives Fertigungskonzept noch am Beginn ihrer Transformation hin zur praxistauglichen Anwendung in Herstellungsverfahren. Die Identifikation und Evaluierung erfolgversprechender Synthesewege bedürfen noch wesentlicher Grundlagenforschung. Vielversprechende Taxien können dabei bereits in der Literatur identifiziert werden, da eine Vielzahl grundlagenbasiertern Forschungen zur gezielten biomediierten Manipulation und Abscheidung von Materialien verfügbar ist, siehe **Publikation C** und [148]. Nach Bearbeitung des vorliegenden Themas können aus Sicht des Autors insbesondere folgende Taxien in Verbindung mit den angefügten Methoden von Interesse sein und sollen zu weiteren Forschungen inspirieren.

Thermotaxis	Anregung und Strukturierung von thermotaktischen Mikroben ¹ an der Grenzfläche Luft/Medium mittels gezielter (punktuelle) Infrarotstrahlung nach dem Prinzip der im 3-D-Druck etablierten Stereolithografie
Mechanotaxis	Anregung und Strukturierung von Mikroben über Einkoppeln einer niederfrequenten mechanischen Welle in das Medium [150]
Chemotaxis	Anregung und Strukturierung von Mikroben über das Einbringen sogenannter growth factors [151] in Substrat, die den Mikroben als Template dienen

Wie auch bei der bearbeiteten Photo- und Rheotaxis wäre auch bei den vorgeschlagenen Taxien in der Reihenfolge der in Kapitel 1.1 auf Seite 15 aufgestellten Punkte vorzugehen. Aber auch die vorliegende Arbeit betreffend ergibt sich Bedarf an weiteren Forschungen, um von den bearbeiteten Methoden schrittweise geeignete Herstellungsverfahren für funktionale Werkstoffe abzuleiten. So können aus den erhaltenen Ergebnissen folgende zukünftige Forschungsfragen abgeleitet werden:

- Ist es möglich, aus den gebildeten zweidimensionalen *P. purpureum*-Strukturen abgechiedene EPS-Templates zu extrahieren?
- Welchen Einfluss hat der Beleuchtungswinkel zwischen horizontaler und vertikaler Einstrahlung auf die Phototaxis und Gleitbewegung von *P. purpureum*?
- Ist es möglich, die im 3-D-Druck etablierte Methode der Stereolithografie auf die phototaktische Materialsynthese anzuwenden?

¹*Escherichia coli* ließen sich beispielsweise bereits durch eine Temperaturspreizung von 23,2 auf 25,9 °C im warmen Bereich um den Faktor 5 anreichern [149]

- d) Wie kann die rheotaktische Materialsynthese auf größere Formate skaliert werden, um alle relevanten Eigenschaften der erhaltenen Materialien zu quantifizieren und um Werkstoffe herzustellen?
- e) Wie verhält sich die Biofilmbildung bei Änderung der Strömungskörperanordnung?
- f) Kann die rheotaktische Materialsynthese derart erweitert werden, dass zu den ausgerichteten Cellulosesträngen winklig versetzte weitere Stränge abgeschieden werden können?
- g) Ist eine verstärkte anisotrope Abscheidung von Kompositmaterialien auf den rheotaktisch vorstrukturierten Biofilm möglich?

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung in Deutsch

Als neuer materialwissenschaftlicher Bereich birgt die biomediierte Materialsynthese Potenzial zur Generierung hierarchisch und anisotrop strukturierter Werkstoffe. Insbesondere mikrobielle Systeme bieten sich dafür durch ihre ausgeprägten Taxien und ihre Produktion von bereits hierarchisch strukturierten exopolymeren Substanzen als Synthesewerkzeug an. Mit diesem mikrobiellen Fokus wurden in der vorliegenden Arbeit vorab definierte Konzepte zur photo- und rheotaktischen Materialsynthese experimentell auf ihre technische Umsetzbarkeit geprüft.

Die Versuche zur phototaktischen Materialsynthese zeigten anhand der Mikroalgen *P. purpureum* und *C. reinhardtii*, dass mit der beabsichtigten Anregung durch Lichttemplates eine zweidimensionale Strukturierung möglich ist. Aus den Mikroalgen konnten mehrere zentimetergroße Muster gebildet werden, wobei diese im Einzelnen aus Algenansammlungen $< 0,1$ mm bestanden. Dabei zeigte sich, dass insbesondere ein hoher Kontrast eine erhöhte phototaktische Ansammlungsdichte von *P. purpureum* zur Folge hatte. Eine dreidimensionale Strukturierung konnte hingegen aufgrund der phototaktischen Bewegungsreaktion selbst, aber nicht mittels eines Lichttemplate realisiert werden. In ihrer Bewegungsreaktion strebten die Mikroalgen nicht dem Lichttemplate, sondern der Lichtquelle entgegen.

Die Versuche zur rheotaktischen Materialsynthese zeigten anhand des Cellulose bildenden Bakteriums *K. xylinus*, dass mit Verwendung vorstrukturierter Flusszellen eine Vielzahl bakterieller Streamer kontrolliert gebildet und übergeordnet vernetzt werden können. Das Wachstum zeigte dabei einen zweigeteilten, logistischen Verlauf, der von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig war. Durch die Vernetzung einzelner Streamer konnten dem gewonnenen Material zwei anisotrope Hierarchieebenen kontrolliert zugefügt werden, sodass eine hierarchisch aufgebaute Struktur von der Molekülebene bis in den makroskopischen Bereich vorlag. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich eine Anisotropie des Biofilms auch auf Kompositphasen übertragen lässt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eine Basis, um mit weiterer Forschung Konzepte und Verfahren zur photo- und rheotaktischen Materialsynthese auf und mittels dieser nach Skalierung Funktionswerkstoffe herzustellen.

6.2 English summary

As a new field of materials science biomediated materials synthesis holds potential for the generation of hierarchically and anisotropically structured materials. In particular, microbial systems offer themselves as synthesis tools due to their distinct taxes and their production of already hierarchically structured exopolymeric substances. With this microbial focus, predefined concepts for photo- and rheotactic material synthesis were experimentally tested for their technical feasibility in this dissertation.

Using the microalgae *P. purpureum* and *C. reinhardtii*, the experiments on phototactic material synthesis showed that two-dimensional structuring is possible with the intended excitation by light templates. Patterns several centimetres in size were formed from the microalgae, which consisted of individual algal assemblages < 0.1 mm in size. The experiments showed that in particular a high contrast resulted in increased phototactic accumulation of *P. purpureum*. A three-dimensional structuring, however, could not be realized by means of a light template due to the phototactic movement reaction itself. The microalgae did not strive towards the light template, but towards the light source. The experiments on rheotactic material synthesis using the cellulose-forming bacterium *K. xylinus* showed that a large number of bacterial streamers can be formed in a controlled and cross-linked in a superordinate manner, using pre-structured flow cells. The growth showed a split logistic growth, which was dependent on the flow velocity. By the method of cross-linking individual streamers, two anisotropic hierarchical levels could be added to the obtained material in a controlled manner. This resulted in a hierarchical structure, present from the molecular to the macroscopic level. Furthermore, it could be shown that an anisotropy of the biofilm can also be transferred to composite phases.

The results of the present work provide a basis for further research. It gives inspiration to establish concepts and procedures for photo- and rheotactic material synthesis and the transfer to an upscaled production of functional materials.

7 Eigene Arbeiten

Der Autor hat von Dezember 2016 bis Dezember 2021 projektbezogen am Lehrstuhl für Biogene Polymere der Technischen Universität München gearbeitet. In diesem Zeitraum wurden folgende Arbeiten vom Autor in Verbindung mit den durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Projekten ZO113/20-1 (Reinhard Koselleck) und VA 1646/5 zur biomediierten Materialsynthese als Erstautor angefertigt:

Publikation A M. Klotz, S. Deuerling, S. Kugler, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „Light-diffractive patterning of *Porphyridium purpureum*,“ *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 19, Nr. 4, S. 515–523, 2020.

Publikation B M. Klotz, D. Bajrami, und D. Van Opdenbosch, „Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned bacterial cellulose networks,“ *Material Advances*, Vol. 3, Nr. 15, S. 6191-6207, 2022.

Folgende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Autor im Zusammenhang mit der Projektarbeit angefertigt. Neben Abstimmung und Konzeptionierung mit den Co-Autoren umfasste der Anteil des Autor die Recherche und Ausführung der Kapitel 4.1 und 4.2.

Publikation C S. Deuerling, S. Kugler, M. Klotz, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „A perspective on bio-mediated material structuring,“ *Advanced Materials*, Vol. 30, Nr. 19, S. 1703656, 2018.

Folgende Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Autor im Zusammenhang mit Themen des Lehrstuhls und im Rahmen der Masterthesis angefertigt:

Publikation D D. Van Opdenbosch, M. Klotz, M. Haslböck, und C. Zollfrank, „Free volumes and Grüneisen parameters in mixed-tacticity polyhydroxybutyrates,“ *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 222, Nr. 15, S. 2100087, 2021.

Publikation E M. Haslböck, M. Klotz, J. Sperl, V. Sieber, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „Mechanical and thermal properties of mixed-tacticity polyhydroxybutyrates and their association with iso-and atactic chain segment length distributions,“ *Macromolecules*, Vol. 52, Nr. 14, S. 5407–5418, 2019.

Publikation F M. Haslböck, M. Klotz, L. Steiner, J. Sperl, V. Sieber, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „Structures of mixed-tacticity polyhydroxybutyrates,“ *Macromolecules*, Vol. 51, Nr. 14, S. 5001–5010, 2018.

Publikation G M. Klotz, P. Otter, U. Feistel, J. Feller, und T. Grischek, „Untersuchungen zur elektrolytischen Oxidation von Arsen(III) im Grundwasser und anschließender Adsorption und Filterung,“ *Vom Wasser*, Vol. 114, Nr. 3, S. 103–106, 2016.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Ross, K. Maile, und M. Seidenfuß, *Werkstoffkunde für Ingenieure*. Springer, 2017.
- [2] P. Fratzl, „Biomimetic materials research: what can we really learn from nature’s structural materials?” *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 4, Nr. 15, S. 637–642, 2007.
- [3] C. Mattheck und I. Tesari, „The mechanical self-optimisation of trees,” *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, Vol. 73, 2004.
- [4] A. Öchsner, W. Ahmed, J. Fish, und T. Belytschko, *Biomechanics of Hard Tissues*. Wiley Online Library, 2011.
- [5] M. Elices, *Structural biological materials: design and structure-property relationships*. Elsevier, 2000.
- [6] P. Fratzl und R. Weinkamer, „Nature’s hierarchical materials,” *Progress in Materials Science*, Vol. 52, Nr. 8, S. 1263–1334, 2007.
- [7] E. Arzt, S. Gorb, und R. Spolenak, „From micro to nano contacts in biological attachment devices,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100, Nr. 19, S. 10 603–10 606, 2003.
- [8] W. Barthlott und C. Neinhuis, „Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces,” *Planta*, Vol. 202, Nr. 1, S. 1–8, 1997.
- [9] J. Aizenberg, A. Tkachenko, S. Weiner, L. Addadi, und G. Hendler, „Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars,” *Nature*, Vol. 412, Nr. 6849, S. 819–822, 2001.
- [10] P. Vukusic und J. R. Sambles, „Photonic structures in biology,” *Nature*, Vol. 424, Nr. 6950, S. 852–855, 2003.
- [11] R. Elbaum, L. Zaltzman, I. Burgert, und P. Fratzl, „The role of wheat awns in the seed dispersal unit,” *Science*, Vol. 316, Nr. 5826, S. 884–886, 2007.
- [12] M. J. Harrington, K. Razghandi, F. Ditsch, L. Guiducci, M. Rueggeberg, J. W. Dunlop, P. Fratzl, C. Neinhuis, und I. Burgert, „Origami-like unfolding of hydro-actuated ice plant seed capsules,” *Nature communications*, Vol. 2, Nr. 1, S. 1–7, 2011.
- [13] J. Keckes, I. Burgert, K. Frühmann, M. Müller, K. Kölln, M. Hamilton, M. Burghammer, S. V. Roth, S. Stanzl-Tschegg, und P. Fratzl, „Cell-wall recovery after

- irreversible deformation of wood,” *Nature materials*, Vol. 2, Nr. 12, S. 810–813, 2003.
- [14] R. Wang, Z. Suo, A. Evans, N. Yao, und I. A. Aksay, „Deformation mechanisms in nacre,” *Journal of Materials Research*, Vol. 16, Nr. 9, S. 2485–2493, 2001.
- [15] G. E. Fantner, E. Oroudjev, G. Schitter, L. S. Golde, P. Thurner, M. M. Finch, P. Turner, T. Gutsman, D. E. Morse, H. Hansma *et al.*, „Sacrificial bonds and hidden length: unraveling molecular mesostructures in tough materials,” *Biophysical journal*, Vol. 90, Nr. 4, S. 1411–1418, 2006.
- [16] H. Gao, „Application of fracture mechanics concepts to hierarchical biomechanics of bone and bone-like materials,” *International Journal of Fracture*, Vol. 138, Nr. 1, S. 101–137, 2006.
- [17] E. Dujardin und S. Mann, „Bio-inspired materials chemistry,” *Advanced Materials*, Vol. 14, Nr. 11, S. 775–788, 2002.
- [18] F. C. Meldrum und H. Cölfen, „Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems,” *Chemical reviews*, Vol. 108, Nr. 11, S. 4332–4432, 2008.
- [19] D. W. Green, „Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering,” *Biomedical Materials*, Vol. 3, Nr. 3, S. 034010, 2008.
- [20] M. H. Dickinson, „Bionics: Biological insight into mechanical design,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 96, Nr. 25, S. 14 208–14 209, 1999.
- [21] O. Paris, G. Fritz-Popovski, D. Van Opdenbosch, und C. Zollfrank, „Recent progress in the replication of hierarchical biological tissues,” *Advanced Functional Materials*, Vol. 23, Nr. 36, S. 4408–4422, 2013.
- [22] D. Van Opdenbosch, M. Thielen, R. Seidel, G. Fritz-Popovski, T. Fey, O. Paris, T. Speck, und C. Zollfrank, „The pomelo peel and derived nanoscale-precision gradient silica foams,” *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, Vol. 1, Nr. 2, S. 117–122, 2012.
- [23] G. Fritz-Popovski, R. Morak, T. Schöberl, D. Van Opdenbosch, C. Zollfrank, und O. Paris, „Pore characteristics and mechanical properties of silica templated by wood,” *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, Vol. 3, Nr. 3, S. 160–168, 2014.
- [24] D. Van Opdenbosch, G. Fritz-Popovski, W. Wagermaier, O. Paris, und C. Zollfrank, „Moisture-Driven Ceramic Bilayer Actuators from a Biotemplating Approach,” *Advanced Materials*, Vol. 28, Nr. 26, S. 5235–5240, 2016.
- [25] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer-Verlag, 2010.

- [26] H. Mohr und P. Schopfer, *Pflanzenphysiologie*, 7. Aufl. Springer-Verlag, 2010.
- [27] L. J. Gibson, „The hierarchical structure and mechanics of plant materials,” *Journal of the royal society interface*, Vol. 9, Nr. 76, S. 2749–2766, 2012.
- [28] I. Dogsa, M. Kriechbaum, D. Stopar, und P. Laggner, „Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS,” *Biophysical journal*, Vol. 89, Nr. 4, S. 2711–2720, 2005.
- [29] S. Koizumi, Y. Tomita, T. Kondo, und T. Hashimoto, „What Factors Determine Hierarchical Structure of Microbial Cellulose –Interplay among Physics, Chemistry and Biology–,” in *Macromolecular Symposia*, Vol. 279, Nr. 1. Wiley Online Library, 2009, S. 110–118.
- [30] N. Murugarren, S. Roig-Sanchez, I. Antón-Sales, N. Malandain, K. Xu, E. Solano, J. S. Reparaz, und A. Laromaine, „Highly Aligned Bacterial Nanocellulose Films Obtained During Static Biosynthesis in a Reproducible and Straightforward Approach,” *Advanced Science*, S. 2201947, 2022.
- [31] J. DeJong, C. Proto, M. Kuo, und M. Gomez, „Bacteria, biofilms, and invertebrates: the next generation of geotechnical engineers?” in *Geo-Congress 2014: Geo-characterization and Modeling for Sustainability*, 2014, S. 3959–3968.
- [32] K. Osinubi, A. Eberemu, T. Ijimdiya, S. Yakubu, E. Gadzama, J. Sani, und P. Yohanna, „Review of the use of microorganisms in geotechnical engineering applications,” *SN Applied Sciences*, Vol. 2, Nr. 2, S. 1–19, 2020.
- [33] R. A. Blanchette, D. T. Haynes, B. W. Held, J. Niemann, und N. Wales, „Fungal mycelial mats used as textile by indigenous people of North America,” *Mycologia*, Vol. 113, Nr. 2, S. 261–267, 2021.
- [34] K. Cerimi, K. C. Akkaya, C. Pohl, B. Schmidt, und P. Neubauer, „Fungi as source for new bio-based materials: a patent review,” *Fungal biology and biotechnology*, Vol. 6, Nr. 1, S. 1–10, 2019.
- [35] X.-X. Wang, L. Xie, und R. Wang, „Biological fabrication of nacreous coating on titanium dental implant,” *Biomaterials*, Vol. 26, Nr. 31, S. 6229–6232, 2005.
- [36] S. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsunashi, Y. Nishi, und M. Uryu, „The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose,” *Journal of materials science*, Vol. 24, Nr. 9, S. 3141–3145, 1989.
- [37] N. Oxman, J. Laucks, M. Kayser, J. Duro-Royo, C. G. Uribe, F. Gramazio, M. Kohler, und S. Langenberg, *Silk Pavilion: A case study in fibre-based digital fabrication*, DGO - Digital original Aufl. UCL Press, 2017, S. 248–255. [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/j.ctt1tp3c5w.34>

- [38] G. F. Picheth, C. L. Pirich, M. R. Sierakowski, M. A. Woehl, C. N. Sakakibara, C. F. de Souza, A. A. Martin, R. da Silva, und R. A. de Freitas, „Bacterial cellulose in biomedical applications: A review,” *International journal of biological macromolecules*, Vol. 104, S. 97–106, 2017.
- [39] E. W. Weiler und L. Nover, *Allgemeine und molekulare Botanik*. Thieme, 2008.
- [40] J. O. Kessler, „Hydrodynamic focusing of motile algal cells,” *Nature*, Vol. 313, Nr. 5999, S. 218–220, 1985.
- [41] W. M. Durham, J. O. Kessler, und R. Stocker, „Disruption of vertical motility by shear triggers formation of thin phytoplankton layers,” *science*, Vol. 323, Nr. 5917, S. 1067–1070, 2009.
- [42] C. R. Williams und M. A. Bees, „A tale of three taxes: photo-gyro-gravitactic bioconvection,” *Journal of Experimental Biology*, Vol. 214, Nr. 14, S. 2398–2408, 2011.
- [43] Y. I. Posudin, N. P. Massjuk, und G. G. Lilitskaya, *Photomovement of Dunaliella Teod.* Springer, 2010.
- [44] W. Haupt, „Photoperception and photomovement,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, Vol. 303, Nr. 1116, S. 467–478, 1983.
- [45] W. Nultsch und D.-P. Häder, „Photomovement of motile microorganisms,” *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 29, Nr. 2, S. 423–437, 1979.
- [46] B. Diehn, „Terminology of behavioral responses of motile microorganisms,” *Photochem. Photobiol.*, Vol. 26, S. 559–560, 1977.
- [47] G. Arnold, „Rheotropism in fishes,” *Biological reviews*, Vol. 49, Nr. 4, S. 515–576, 1974.
- [48] H. H. Jakobsen, „Escape response of planktonic protists to fluid mechanical signals,” *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 214, S. 67–78, 2001.
- [49] J. C. Montgomery, C. F. Baker, und A. G. Carton, „The lateral line can mediate rheotaxis in fish,” *Nature*, Vol. 389, Nr. 6654, S. 960–963, 1997.
- [50] J. R. Strickler und A. K. Bal, „Setae of the first antennae of the copepod *Cyclops scutifer* (Sars): their structure and importance,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 70, Nr. 9, S. 2656–2659, 1973.
- [51] R. Rusconi und R. Stocker, „Microbes in flow,” *Current opinion in microbiology*, Vol. 25, S. 1–8, 2015.
- [52] M. Marcos, H. Fu, T. Powers, und R. Stocker, „Bacterial rheotaxis,” Vol. 109, Nr. 13. National Acad Sciences, 2012, S. 4780–4785.

- [53] A. Chengala, M. Hondzo, und J. Sheng, „Microalga propels along vorticity direction in a shear flow,” *Physical Review E*, Vol. 87, Nr. 5, S. 052704, 2013.
- [54] S. Rafai, L. Jibuti, und P. Peyla, „Effective viscosity of microswimmer suspensions,” *Physical Review Letters*, Vol. 104, Nr. 9, S. 098102, 2010.
- [55] R. Rusconi, J. S. Guasto, und R. Stocker, „Bacterial transport suppressed by fluid shear,” *Nature physics*, Vol. 10, Nr. 3, S. 212–217, 2014.
- [56] P. Stoodley, R. Cargo, C. J. Rupp, S. Wilson, und I. Klapper, „Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 29, Nr. 6, S. 361–367, 2002.
- [57] R. Rusconi, S. Lecuyer, L. Guglielmini, und H. A. Stone, „Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers,” *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 7, Nr. 50, S. 1293–1299, 2010.
- [58] S. Das und A. Kumar, „Formation and post-formation dynamics of bacterial biofilm streamers as highly viscous liquid jets,” *Scientific reports*, Vol. 4, Nr. 1, S. 1–6, 2014.
- [59] J. A. Aufrecht, J. D. Fowlkes, A. N. Bible, J. Morrell-Falvey, M. J. Doktycz, und S. T. Retterer, „Pore-scale hydrodynamics influence the spatial evolution of bacterial biofilms in a microfluidic porous network,” *PloS one*, Vol. 14, Nr. 6, S. e0218316, 2019.
- [60] A. Basu, S. V. Vamanan, und S. Lim, „A novel platform for evaluating the environmental impacts on bacterial cellulose production,” *Scientific reports*, Vol. 8, Nr. 1, S. 1–8, 2018.
- [61] Y. Tomita und T. Kondo, „Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates,” *Carbohydrate Polymers*, Vol. 77, Nr. 4, S. 754–759, 2009.
- [62] M. F. Ashby und D. Cebon, „Materials selection in mechanical design,” *Le Journal de Physique IV*, Vol. 3, Nr. C7, S. C7–1, 1993.
- [63] Y. Li, Q. Fu, X. Yang, und L. Berglund, „Transparent wood for functional and structural applications,” *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, Vol. 376, Nr. 2112, S. 20170182, 2018.
- [64] D. B. Weibel, P. Garstecki, D. Ryan, W. R. Di Luzio, M. Mayer, J. E. Seto, und G. M. Whitesides, „Microoxen: Microorganisms to move microscale loads,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 102, Nr. 34, S. 11 963–11 967, 2005.
- [65] H. Schuchart, „Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegele III. Action Spectrum of the Photophobic Response,” *Archives of Microbiology*, Vol. 128, Nr. 1, S. 105–112, 1980.

- [66] F. X. Cunningham Jr, R. J. Dennenberg, L. Mustardy, P. A. Jursinic, und E. Gantt, „Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance,” *Plant physiology*, Vol. 91, Nr. 3, S. 1179–1187, 1989.
- [67] R. F. Jones, H. L. Speer, und W. Kury, „Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*,” *Physiologia Plantarum*, Vol. 16, Nr. 3, S. 636–643, 1963.
- [68] S. A. Hill, L. R. Towill, und M. R. Sommerfeld, „Photomovement responses of *Porphyridium purpureum*,” *Journal of Phycology*, Vol. 16, Nr. 3, S. 444–448, 1980.
- [69] W. Nultsch und H. Schuchart, „Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegeli II. Phototaxis,” *Archives of Microbiology*, Vol. 125, Nr. 1, S. 181–188, 1980.
- [70] A. Seminara, T. E. Angelini, J. N. Wilking, H. Vlamakis, S. Ebrahim, R. Kolter, D. A. Weitz, und M. P. Brenner, „Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109, Nr. 4, S. 1116–1121, 2012.
- [71] D. Häder, „Photosensory behavior in procaryotes,” *Microbiological reviews*, Vol. 51, Nr. 1, S. 1–21, 1987.
- [72] E. Hoiczkyk, „Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations,” *Archives of microbiology*, Vol. 174, Nr. 1, S. 11–17, 2000.
- [73] B. Nan und D. R. Zusman, „Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria,” *Annual review of genetics*, Vol. 45, S. 21–39, 2011.
- [74] A. K. Patel, C. Laroche, A. Marcati, A. V. Ursu, S. Jubeau, L. Marchal, E. Petit, G. Djelveh, und P. Michaud, „Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*,” *Bioresource technology*, Vol. 145, S. 345–350, 2013.
- [75] S. Geresh, I. Adin, E. Yarmolinsky, und M. Karpasas, „Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.*: molecular weight determination and rheological properties,” *Carbohydrate polymers*, Vol. 50, Nr. 2, S. 183–189, 2002.
- [76] S. Maloy und K. Hughes, *Brenner’s Encyclopedia of Genetics*. Elsevier Science, 2013.
- [77] R. Sager und S. Granick, „Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 56, S. 831–838, 1953.
- [78] K. Foster und R. Smyth, „Light antennas in phototactic algae,” *Microbiological reviews*, Vol. 44, Nr. 4, S. 572–630, 1980.
- [79] W. Nultsch, G. Throm, und I. von Rimscha, „Phototaktische untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardii dangeard* in homokontinuierlicher kultur,” *Archiv für Mikrobiologie*, Vol. 80, Nr. 4, S. 351–369, 1971.

- [80] M. E. H. Feinleib und G. M. Curry, „The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*,“ *Physiologia Plantarum*, Vol. 25, Nr. 3, S. 346–352, 1971.
- [81] W. Nultsch und G. Throm, „Effect of external factors on phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Light.“ *Archives of microbiology*, Vol. 103, Nr. 2, S. 175–179, 1975.
- [82] W. Nultsch, „Effect of external factors on phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Carbon Dioxide, Oxygen and pH,“ *Archives of microbiology*, Vol. 112, Nr. 2, S. 179–185, 1977.
- [83] W. Nultsch, „Effect of external factors on phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Cations,“ *Archives of Microbiology*, Vol. 123, Nr. 1, S. 93–99, 1979.
- [84] D. N. Zacks und J. L. Spudich, „Gain setting in *Chlamydomonas reinhardtii*: mechanism of phototaxis and the role of the photophobic response,“ *Cell motility and the cytoskeleton*, Vol. 29, Nr. 3, S. 225–230, 1994.
- [85] T. Latychevskaia und H.-W. Fink, „Inverted Gabor holography principle for tailoring arbitrary shaped three-dimensional beams,“ *Scientific reports*, Vol. 6, Nr. 1, S. 1–13, 2016.
- [86] C. Campano, A. Balea, A. Blanco, und C. Negro, „Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review,“ *Cellulose*, Vol. 23, Nr. 1, S. 57–91, 2016.
- [87] R. E. Cannon, „*Acetobacter xylinum*: An inquiry into cellulose biosynthesis,“ *The American biology teacher*, Vol. 62, Nr. 6, S. 442–444, 2000.
- [88] S. M. Mohammad, N. Rahman, M. S. Khalil, und S. R. S. Abdullah, „An overview of biocellulose production using *Acetobacter xylinum* culture,“ *Advances in Biological Research*, Vol. 8, Nr. 6, S. 307–313, 2014.
- [89] P. Zugenmaier, *Crystalline cellulose and derivatives: characterization and structures*. Springer, 2008.
- [90] P. G. Verschuren, T. D. Cardona, M. R. Nout, K. D. De Gooijer, und J. C. Van den Heuvel, „Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles,“ *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 89, Nr. 5, S. 414–419, 2000.
- [91] W. Czaja, D. Romanovicz, und R. Malcolm Brown, „Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture,“ *Cellulose*, Vol. 11, Nr. 3, S. 403–411, 2004.

- [92] D.-S. Kim und H. S. Fogler, „The effects of exopolymers on cell morphology and culturability of *Leuconostoc mesenteroides* during starvation,” *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 52, Nr. 6, S. 839–844, 1999.
- [93] A. Steinbüchel, F. B. Oppermann-Sanio, C. Ewering, M. Pötter, und F. Reinecke, *Mikrobiologisches Praktikum*. Springer, 2003.
- [94] A. Onilude, O. Olaoye, I. Fadahunsi, A. Owoseni, E. Garuba, und T. Atoyebi, „Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc spp.*” *International Food Research Journal*, Vol. 20, Nr. 4, S. 1645, 2013.
- [95] M. Santos, J. Teixeira, und A. Rodrigues, „Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f),” *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 4, Nr. 3, S. 177–188, 2000.
- [96] A. M. Basedow, K. H. Ebert, und U. Ruland, „Specific refractive index increments of dextran fractions of different molecular weights,” *Die Makromolekulare Chemie*, Vol. 179, Nr. 5, S. 1351–1353, 1978.
- [97] J. Dervaux, M. C. Resta, und P. Brunet, „Light-controlled flows in active fluids,” *Nature Physics*, Vol. 13, Nr. 3, S. 306–312, 2017.
- [98] T. Abe, S. Nakamura, und S. Kudo, „Bioconvection induced by bacterial chemotaxis in a capillary assay,” *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 483, Nr. 1, S. 277–282, 2017.
- [99] W. Nultsch, „Studien über die Phototaxis der Diatomeen,” *Arch. Protistenk*, Vol. 101, Nr. 1, 1956.
- [100] A. Pentecost, „Effects of sedimentation and light intensity on mat-forming Oscillatoriaceae with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* Gomont,” *Microbiology*, Vol. 130, Nr. 4, S. 983–990, 1984.
- [101] S. K. Choudhary, A. Baskaran, und P. Sharma, „Reentrant efficiency of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* cells,” *Biophysical journal*, Vol. 117, Nr. 8, S. 1508–1513, 2019.
- [102] T. Nomura, Y. Morimoto, M. Ishikawa, H. Tokumoto, und Y. Konishi, „Synthesis of hollow silica microparticles from bacterial templates,” *Advanced Powder Technology*, Vol. 21, Nr. 1, S. 8–12, 2010.
- [103] S. Ozden, I. G. Macwan, P. S. Owuor, S. Kosolwattana, P. A. Autreto, S. Silwal, R. Vajtai, C. S. Tiwary, A. D. Mohite, P. K. Patra *et al.*, „Bacteria as bio-template for 3D carbon nanotube architectures,” *Scientific reports*, Vol. 7, Nr. 1, S. 1–8, 2017.
- [104] D.-P. Yang, S. Chen, P. Huang, X. Wang, W. Jiang, O. Pandoli, und D. Cui, „Bacteria-template synthesized silver microspheres with hollow and porous struc-

- tures as excellent SERS substrate,” *Green Chemistry*, Vol. 12, Nr. 11, S. 2038–2042, 2010.
- [105] C. Zollfrank, P. Cromme, M. Rauch, H. Scheel, M. H. Kostova, K. Gutbrod, S. Gruber, und D. Van Opdenbosch, „Biotemplating of inorganic functional materials from polysaccharides,” *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, Vol. 1, Nr. 1, S. 13–25, 2012.
- [106] G. Santomauro, J. Baier, W. Huang, S. Pezold, J. Bill *et al.*, „Formation of calcium carbonate polymorphs induced by living microalgae,” *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, Vol. 3, Nr. 04, S. 413, 2012.
- [107] M. A. Borowitzka, „Calcification in aquatic plants,” *Plant, Cell & Environment*, Vol. 7, Nr. 6, S. 457–466, 1984.
- [108] W. Nultsch, H. Schuchart, und M. Dillenburger, „Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegeli I. Photokinesis,” *Archives of Microbiology*, Vol. 122, Nr. 2, S. 207–212, 1979.
- [109] M. E. Feinleib, „Phototactic response of *Chlamydomon* as to flashes of light—I. Response of cell populations,” *Photochemistry and photobiology*, Vol. 21, Nr. 5, S. 351–354, 1975.
- [110] J. S. Boscov und M. E. Feinleib, „Phototactic response of *Chlamydomonas* to flashes of light—II. Response of individual cells,” *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 30, Nr. 4, S. 499–505, 1979.
- [111] J. Arrieta, A. Barreira, M. Chioccioli, M. Polin, und I. Tuval, „Phototaxis beyond turning: persistent accumulation and response acclimation of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Scientific reports*, Vol. 7, Nr. 1, S. 1–7, 2017.
- [112] Z. Zhang, S. Chen, H. Zheng, Z. Zeng, H. Gao, Y. Yu, und A. K. Asundi, „Full-color holographic 3D display using slice-based fractional Fourier transform combined with free-space Fresnel diffraction,” *Applied optics*, Vol. 56, Nr. 20, S. 5668–5675, 2017.
- [113] T. L. Jahn und E. C. Bovee, „Movement and locomotion of microorganisms,” *Annual Reviews in Microbiology*, Vol. 19, Nr. 1, S. 21–58, 1965.
- [114] M. Melkonian, *Algal cell motility*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [115] H. Schuchart, „Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Bewegungsreaktionen von *Porphyridium cruentum*,” *PhD Thesis*, 1978.
- [116] D.-P. Häder, „Wie orientieren sich Cyanobakterien im Licht,” *Biologie in unserer Zeit*, Vol. 14, Nr. 3, S. 78–83, 1984.
- [117] J. Arlt, V. A. Martinez, A. Dawson, T. Pilizota, und W. C. Poon, „Painting with light-powered bacteria,” *Nature communications*, Vol. 9, 2018.

- [118] J. Arlt, V. A. Martinez, A. Dawson, T. Pilizota, und W. C. Poon, „Dynamics-dependent density distribution in active suspensions,” *Nature communications*, Vol. 10, Nr. 1, S. 1–7, 2019.
- [119] J. Zhang, Y. Luo, und C. L. Poh, „Blue light-directed cell migration, aggregation, and patterning,” *Journal of molecular biology*, Vol. 432, Nr. 10, S. 3137–3148, 2020.
- [120] G. Frangipane, D. Dell’Arciprete, S. Petracchini, C. Maggi, F. Saglimbeni, S. Bianchi, G. Vizsnyiczai, M. L. Bernardini, und R. Di Leonardo, „Dynamic density shaping of photokinetic *E. coli*,” *Elife*, Vol. 7, S. e36608, 2018.
- [121] Ø. Svensen, Ø. Frette, und S. R. Erga, „Scattering properties of microalgae: the effect of cell size and cell wall,” *Applied optics*, Vol. 46, Nr. 23, S. 5762–5769, 2007.
- [122] H. Volten, J. De Haan, J. Hovenier, R. Schreurs, W. Vassen, A. Dekker, H. Hoo-genboom, F. Charlton, und R. Wouts, „Laboratory measurements of angular distributions of light scattered by phytoplankton and silt,” *Limnology and oceanography*, Vol. 43, Nr. 6, S. 1180–1197, 1998.
- [123] J. Buder, „der phototaktischen Richtungsbewegungen.” *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik*, Vol. 58, S. 105, 1919.
- [124] P. Gualtieri, „Morphology of photoreceptor systems in microalgae,” *Micron*, Vol. 32, Nr. 4, S. 411–426, 2001.
- [125] E. Gantt und S. Conti, „The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*,” *The Journal of cell biology*, Vol. 26, Nr. 2, S. 365–381, 1965.
- [126] J. L. Scott, B. Baca, F. D. Ott, und J. A. West, „Light and Electron Microscopic Observations on *Erythrolobus coxiae* gen. et sp. nov.(Porphyridiophyceae, Rhodophyta) from Texas USA,” *Algae*, Vol. 21, Nr. 4, S. 407–416, 2006.
- [127] P. Halldal, „Factors affecting light response in phototactic algae,” *Physiologia Plantarum*, Vol. 12, Nr. 4, S. 742–752, 1959.
- [128] E. Bünning und M. Tazawa, „Über die negativ-phototaktische Reaktion von *Euglena*,” *Archiv für Mikrobiologie*, Vol. 27, Nr. 3, S. 306–310, 1957.
- [129] G. Jékely, J. Colombelli, H. Hausen, K. Guy, E. Stelzer, F. Nédélec, und D. Arendt, „Mechanism of phototaxis in marine zooplankton,” *Nature*, Vol. 456, Nr. 7220, S. 395–399, 2008.
- [130] G. Jékely, „Evolution of phototaxis,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 364, Nr. 1531, S. 2795–2808, 2009.
- [131] W. Nultsch und D.-P. Häder, „Photomovement in motile microorganisms-II,” *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 47, Nr. 6, S. 837–869, 1988.

- [132] R. L. Stavis und R. Hirschberg, „Phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*,“ *The Journal of cell biology*, Vol. 59, Nr. 2, S. 367–377, 1973.
- [133] Q. Zhao, D. Yuan, J. Zhang, und W. Li, „A review of secondary flow in inertial microfluidics,“ *Micromachines*, Vol. 11, Nr. 5, S. 461, 2020.
- [134] P. Thomen, J. Robert, A. Monmeyran, A.-F. Bitbol, C. Douarche, und N. Henry, „Bacterial biofilm under flow: first a physical struggle to stay, then a matter of breathing,“ *PloS one*, Vol. 12, Nr. 4, S. e0175197, 2017.
- [135] X. Wang, M. Hao, X. Du, G. Wang, und J.-i. Matsushita, „The mechanical analysis of the biofilm streamer nucleation and geometry characterization in microfluidic channels,“ *Computational and mathematical methods in medicine*, Vol. 2016, 2016.
- [136] M. R. Nejadnik, H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher, und W. Norde, „Determination of the shear force at the balance between bacterial attachment and detachment in weak-adherence systems, using a flow displacement chamber,“ *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, Nr. 3, S. 916–919, 2008.
- [137] A. Park, H.-H. Jeong, J. Lee, K. P. Kim, und C.-S. Lee, „Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel,“ *BioChip Journal*, Vol. 5, Nr. 3, S. 236–241, 2011.
- [138] Y.-P. Tsai, „Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria,“ *Biofouling*, Vol. 21, Nr. 5-6, S. 267–277, 2005.
- [139] M. Liu, C. Zhong, X.-Y. Wu, Y.-Q. Wei, T. Bo, P.-P. Han, und S.-R. Jia, „Metabolic profiling coupled with metabolic network reveals differences in *Gluconacetobacter xylinus* from static and agitated cultures,“ *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 101, S. 85–98, 2015.
- [140] G. S. Settles, *Schlieren and Shadowgraph Techniques*. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2006.
- [141] N. Shah, M. Ul-Islam, W. A. Khattak, und J. K. Park, „Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material,“ *Carbohydrate polymers*, Vol. 98, Nr. 2, S. 1585–1598, 2013.
- [142] W. Liu, H. Du, M. Zhang, K. Liu, H. Liu, H. Xie, X. Zhang, und C. Si, „Bacterial cellulose-based composite scaffolds for biomedical applications: a review,“ *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 8, Nr. 20, S. 7536–7562, 2020.
- [143] Y. Wan, D. Hu, G. Xiong, D. Li, R. Guo, und H. Luo, „Directional fluid induced self-assembly of oriented bacterial cellulose nanofibers for potential biomimetic tissue engineering scaffolds,“ *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 149, S. 7–11, 2015.
- [144] H. Luo, W. Li, Z. Yang, H. Ao, G. Xiong, Y. Zhu, J. Tu, und Y. Wan, „Preparation of oriented bacterial cellulose nanofibers by flowing medium-assisted biosynthesis

- and influence of flowing velocity,” *Journal of Polymer Engineering*, Vol. 38, Nr. 3, S. 299–305, 2018.
- [145] S. Wilhelm, „Perspectives for upconverting nanoparticles,” *ACS nano*, Vol. 11, Nr. 11, S. 10 644–10 653, 2017.
- [146] Y. Ochiai, K. Kumagai, T. Hoshi, J. Rekimoto, S. Hasegawa, und Y. Hayasaki, „Fairy lights in femtoseconds: aerial and volumetric graphics rendered by focused femtosecond laser combined with computational holographic fields,” *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, Vol. 35, Nr. 2, S. 1–14, 2016.
- [147] H. Liu und P. Li, „Even distribution/dividing of single-phase fluids by symmetric bifurcation of flow channels,” *International journal of heat and fluid flow*, Vol. 40, S. 165–179, 2013.
- [148] J. P. Gurung, M. Gel, und M. A. Baker, „Microfluidic techniques for separation of bacterial cells via taxis,” *Microbial Cell*, Vol. 7, Nr. 3, S. 66, 2020.
- [149] A. Paulick, V. Jakovljevic, S. Zhang, M. Erickstad, A. Groisman, Y. Meir, W. S. Ryu, N. S. Wingreen, und V. Sourjik, „Mechanism of bidirectional thermotaxis in *Escherichia coli*,” *Elife*, Vol. 6, S. e26607, 2017.
- [150] S.-H. Hong, J.-B. Gorce, H. Punzmann, N. Francois, M. Shats, und H. Xia, „Surface waves control bacterial attachment and formation of biofilms in thin layers,” *Science advances*, Vol. 6, Nr. 22, S. eaaz9386, 2020.
- [151] N. Guan, Z. Liu, Y. Zhao, Q. Li, und Y. Wang, „Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering,” *Drug Delivery*, Vol. 27, Nr. 1, S. 1438–1451, 2020.

Anhang

Publikation A

Light-diffractive patterning of *Porphyridium purpureum*

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: **Springer Nature**, *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 19, Nr. 4, S. 515–523, M. Klotz, S. Deuerling, S. Kugler, C. Zollfrank, und D. Van Opdenbosch, „Light-diffractive patterning of *Porphyridium purpureum*,”, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0PP00014K>



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2020, **19**, 515

Received 21st January 2020,
Accepted 17th March 2020

DOI: 10.1039/d0pp00014k

rsc.li/pps

Light-diffractive patterning of *Porphyridium purpureum*

Moritz Klotz,^{id} Steffi Deuerling, Sabine Kugler, Cordt Zollfrank and Daniel Van Opdenbosch^{id}*

Light guidance is a convenient and versatile way to control the positions of phototactic microorganisms. However, the illumination strategies require adaption to the respective organism. We report on the generation of structures composed of the gliding and exopolysaccharide-secreting algae *Porphyridium purpureum* via their photomovement. Light patterns from a two-dimensional computer-generated hologram were projected onto inoculated agar plates. The obtained pixelated algae patterns were evaluated with regard to the illuminated intensity, contrast and pixel size. Upper and lower thresholds for algae accumulation were determined, allowing to enhance future manipulation of phototactic microorganisms.

1 Introduction

Light-induced movement, photomovement, is a characteristic of many microorganisms. Reaching favorable places for photosynthesis, spore release or escape from harmful radiation are evolved survival strategies.¹ In general, photomovement can be separated into three different responses to light. One of these, photokinesis, is a general nondirectional movement with velocity increases (positive) or decreases (negative), depending on the illumination conditions. The directional movement towards (positive), away from (negative) or at a certain angle tangential to the light source is called phototaxis. Finally, the phobic reaction is the response rate (positive or negative) to changes in the illumination conditions.¹

Photomovement is also a convenient and versatile way to control the placement of microorganisms. Using them as miniature beasts of burden is a striking example.^{2–5} They also can be used for template production,⁶ or for bicolor^{7,8} photographs.

The choice of the appropriate microorganism depends on the intended goal, e.g. transportation or structure-building. In the present work, we used the eukaryotic red algae *Porphyridium purpureum* to demonstrate the movement and the structurability of a model exopolysaccharide (EPS) secreting, gliding microorganism. The photomovement parameters of *P. purpureum* were extensively studied and reviewed by Schuchart and Nultsch *et al.*^{9–11} Even there are indications

that the gliding mechanism and EPS secretion are related,¹² and the movement mechanism of *P. purpureum*, synonymous to *P. cruentum*,¹³ is not fully understood.¹⁴

In addition to the response to wavelength and intensity, which for *P. purpureum* differs depending on the type of reaction, there are other parameters to which the microorganisms react and are influenced by the projection method when controlling their photomovements: Häder demonstrated with his 'algograph' the contrast sensitivity of *Phormidium uncinatum*, reacting to minor contrast changes.⁷ Schuchart, who determined the general photomovement parameters of *P. purpureum*, observed preferred accumulation at the edges of light fields under certain lighting conditions.^{11,15} Schuchart and Nultsch investigated an enhancement of the photomovement via additional irradiation of a second wavelength.¹⁰ Sommerfeld *et al.* measured the influence of perpendicular and unilateral illumination, where the latter causes a higher velocity,¹⁶ and Dervaux *et al.* investigated parameters to keep the concentration of phototactically attracted cells stable, avoiding density waves with the appropriate light intensities, initial cell concentrations and layer thicknesses.⁴

More general characteristics of photomovement should also be taken into account: photosynthesis does not always serve as a driving force for light-induced movement, as in *P. purpureum* photokinetic reactions.⁹ Arlt *et al.* exemplarily used the non-photosynthetic bacteria *E. coli* in his study,⁸ which under anaerobic conditions react to light,¹⁷ photokinetically positive, but phototactically negative. This can be used to clear areas of microorganisms, but is disadvantageous when aiming for defined microorganism densities in neighbouring areas, or if only confined regions should contain microorganism. Here, it could be of advantage to use phototactically positive microor-

Technical University of Munich, Campus Straubing for Biotechnology and Sustainability, Chair of Biogenic Polymers, Schulgasse 16, D-94315 Straubing, Germany. E-mail: daniel.van-opdenbosch@tum.de, moritz.klotz@tum.de

ganisms such as *Chlamydomonas reinhardtii*, where illumination is only necessary on single points, instead of the whole surface.

Projection techniques, used for the appropriate illumination to induce photomovement, range from irradiation with laser light^{4,18} over illumination of masks or photographic negatives^{7,10} to the usage of digital devices such as digital mirrors.⁸ Digital techniques offer a versatile and flexible way to influence photomovement. In the present work, we patterned *P. purpureum* with light, which was modulated with a spatial light modulator (SLM). With the usage of an SLM, we present a highly flexible method for generating a two dimensional light pattern that induces the photomovement of *P. purpureum*. In order to refine the understanding of microorganism accumulation when utilizing such techniques, it is necessary to evaluate the influence of the projection method on the used microorganism. In particular, we assessed the influence of the illumination intensity and the spot size on the spatial distribution of *P. purpureum*. By projecting a pixelated blue light pattern, we additionally evaluated the influence of the signal to noise rate.

2 Experimental

P. purpureum were obtained as a living stock (Centre Algatech, Institute of Microbiology, Trebon, Czech Republic), grown as batch culture in artificial sea water (ASW)¹⁹ at 20 °C, illuminated with a 40 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ white fluorescent lamp in a 16/8 hour light/dark cycle. Relative humidity was set to 70% (ICH 110L, Memmert, Schwabach, Germany). Light intensities were measured as photosynthetically active radiation (ULM-500, Sensor LS-C, Walz, Effeltrich, Germany).

For velocity measurements, algae from the stationary growth phase were tempered to 40 °C and spot-wise inoculated in plates filled with 28 ml of liquid agar (3 g l⁻¹ agar, VWR Chemicals, Darmstadt, Germany). The liquid agar temperature was 42 °C and gelled shortly after inoculation. Three agar plates with a diameter of 8.5 cm were inoculated on one end with three algae spots each. The spot-wise volume, inoculated at a distance of 2 cm, was 1 ml and resulted in a spot diameter of about 1 cm. The plates were lightproofed and kept at 20 °C and a humidity of 70%. Opposite to the three algae spots, at a distance of 5 cm, a perpendicular white fluorescent lamp light spot of 2 cm², with an intensity of 120 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ entered the plates in a 16/8 hour light/dark cycle. For velocity measurements, the 9 inoculated spots were recorded for 20 days and determined photographically by measuring the distance between the edge of the inoculated spot and the leading edge of the dense algae, Fig. 1. In few algae patterns isolated algae accumulations reached the agar surface and moved faster towards the light source. These were not considered. Although the movement of the algae continued longer than the period of evaluation, measurements were stopped after 20 days, since the algae left the measurement window. Photographs of the three plates were taken with transmitted light from a white

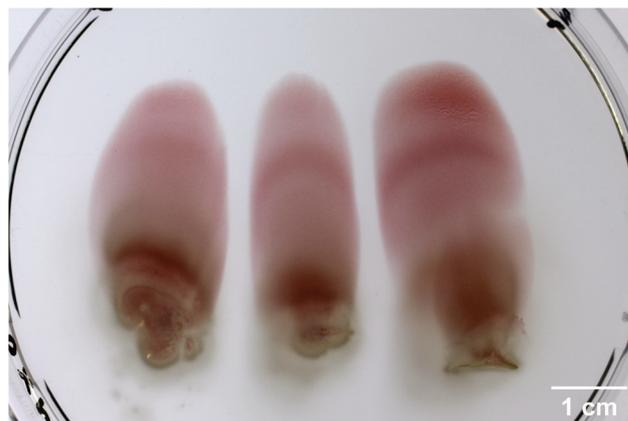


Fig. 1 Overview of the finger-like pattern of *P. purpureum* inoculated in 3 g l⁻¹ agar after 27 days. Distance of movement was measured between the edge of the inoculated spot and the leading edge of the dense algae.

fluorescent lamp of 22 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$. Therefore, the plates were exposed for approximately 30 s to 60 s to the light source. Velocity was obtained as the slope of linear fit to the measured data, and the corresponding uncertainty as the standard deviation.

For holographic light patterning two experiments were carried out: one for illustration and one for data evaluation. The illustration experiment was conducted in a Petri dish with a diameter of 8.5 cm. For the data evaluation experiment, four samples, each consisting of a 3.4 cm \times 3.4 cm basin with four stand-alone grown batch cultures of *P. purpureum* were used. The algae batch cultures were grown parallel but independent of one another under the same growth conditions.

In both experiments, 0.1 l l⁻¹ of stationary growth phase algae were tempered to 40 °C and suspended in ASW with 3 g l⁻¹ dissolved agar, which was cooled down to 42 °C. After casting 28 ml thereof in the Petri dish and 4.4 ml in each basin, the suspensions were cooled down to ambient temperature.

Differently shaped light patterns were obtained by using computer generated holograms (CGHs) with an SLM (GAEA-2, Holoeye Photonics, Berlin, Germany). CGHs with Fresnel lens superposition for focusing were calculated with a size of 4000 px \times 2160 px (SLM-Pattern-Generator, Holoeye Photonics AG, Berlin, Germany). Coherent and plane wave illumination of the SLM was performed at 457 nm (05-01 Series, Cobolt, Solna, Sweden). The resulting light pattern of the illustration experiment showed the lettering "TUMCS". For the data evaluation experiment, a pattern with four crosses was used, enabling the parallel processing of the four stand-alone and independent samples. Each cross had a dimension of 5 mm \times 5 mm and illuminated a separate basin. The basins were light-shielded from each other to avoid scattering. Light patterns generated from the SLM were reflected and radiated perpendicularly onto the agar plates continuously, 24 h a day from a total distance of 50 cm. Red background light with its maximum at 632 nm and an intensity of 12 $\mu\text{mol (m}^2 \text{s)}^{-1}$ for the illustration experi-

ment and $6 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ for the data evaluation experiment (iDual, Müller-Licht, Lilienthal, Germany) evenly illuminated the entire agar plates continuously, 24 h a day. The agar plates were transparently covered to avoid dehydration of the agar and the experiments were conducted at ambient temperature, 22 °C.

Four identical sections of each of the four crosses (S1–S4) were evaluated. Magnified sections of the recorded light patterns (UK1275-C, ABS, Jena, Germany), similar to Fig. 3(a), and of the obtained algae patterns (Dialux 20, Leitz, Wetzlar, Germany with camera $\alpha 7$ RII, Sony, Tokyo, Japan and adapter DSLRCC, Micro Tech Lab, Graz, Austria), similar to Fig. 4, were evaluated after 7 days of illumination. To obtain the relative algae density ρ , the backgrounds of the greyscale micrographs were subtracted and the mean brightness of the pure algae in a radius of $51.4 \mu\text{m}$ around the spot centres was measured, with higher algae densities resulting in increased blackening. The accumulation factor τ results from $\tau = \rho_{\text{max}}/\rho_{\text{min}}$, where ρ_{min} is the similarly measured algae density outside the

pattern. The light patterns' intensities η from the brightest pixels with its size of $3.2 \mu\text{m} \times 3.2 \mu\text{m}$ and the intensities η_0 of the surrounding radius of $256 \mu\text{m}$ (80 pixels) were measured with an ImageJ macro based on the Measure tool. These light intensity readouts, obtained from the holographic pattern, were compared to a calibration. In total, the algae density and light intensity of 69 spots per sample were evaluated. The full width at half maximum (FWHM) of 41 light and algae spots per sample was calculated from plots of the azimuthally integrated spots with an integration radius of $80 \mu\text{m}$ from the light- and $77 \mu\text{m}$ from the algae spot centres.

The depths of the light-induced algae accumulations were measured at five points per sample (S1–S4) microscopically, moving the z-axis from the patterns' surfaces to the layers where accumulation disappeared.

3. Results

We observed constant velocities of *P. purpureum* inoculated in 3 g l^{-1} agar over 20 days, Fig. 2. Linear fitting yielded a velocity of $(14.5 \pm 0.6) \times 10^{-3} \mu\text{m s}^{-1}$ with the uncertainty from the mean standard deviation. Algae movement generated finger-like patterns, with areas of higher densities forming density waves along the fingers which can be observed as a dark red semicircle in the middle of the right pattern, Fig. 1.

Illumination with the light pattern shown in Fig. 3a resulted in the algae pattern shown in Fig. 3b. Isolated, diffuse spots in Fig. 3b are due to inhomogeneities of the suspended stock solution. These inhomogeneities, which did not appear in the data evaluation experiments, Fig. 3c, stayed stable over the experimental period.

A magnification of Fig. 3b is shown in Fig. 4, where the spot-wise accumulation of *P. purpureum* becomes apparent. The strength of the accumulations varied: areas where pattern scattering caused by holographic imperfections and optical aberrations resulted in more background radiation showed

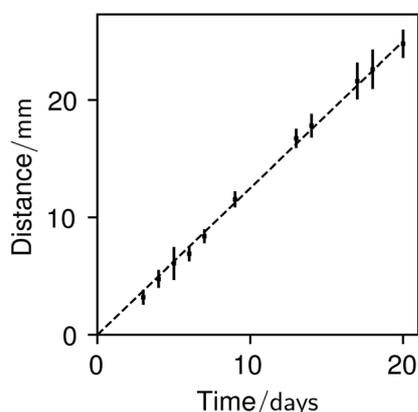


Fig. 2 Covered distances of *P. purpureum* inoculated in 3 g l^{-1} agar and perpendicularly illuminated with $120 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ in 16/8 hour light/dark cycles. The error bars indicate the standard deviations of 9 algae spots.

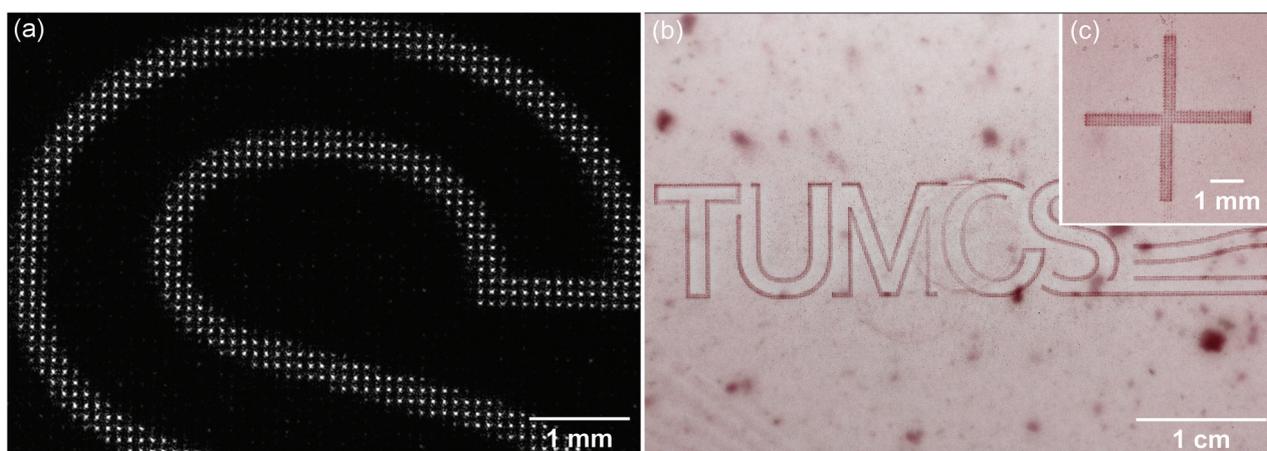


Fig. 3 (a) Light pattern section (greyscale) of the letter "S" from "TUMCS" and (b) patterned *P. purpureum* due to illumination with the light pattern after 8 days. Algae cross pattern shown in the inset (c) was used for data evaluation.

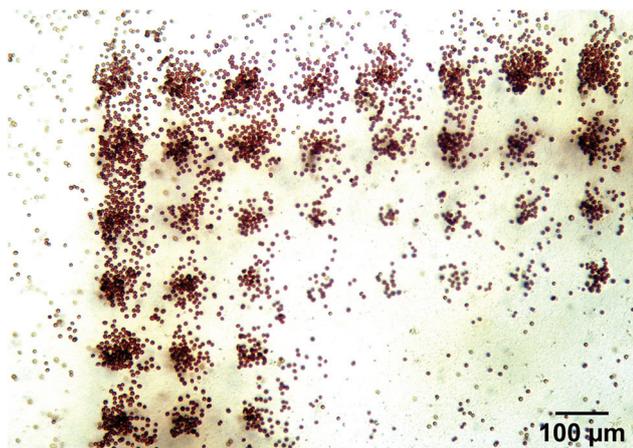


Fig. 4 Light micrograph of the agar surface showing a section of the letter "T" from the illustration experiment, Fig. 3b. Algae spots of *P. purpureum* are at the positions of the previously illuminated spots.

lower accumulations than *vice versa*. At spots of high accumulation, overlapping of the algae occurred. The spot-wise accumulation only appeared on the agar surface and continued as diffuse accumulation in the *z* direction with a depth of $142 \pm 8 \mu\text{m}$, which was measured in the data evaluation experiment. In one sample of the data evaluation experiment the algae spots were superimposed by a wave pattern, inhibiting the measurement of the FWHM of these spots.

The relationship between the algae density ρ and $\eta - \eta_0$ for the four samples S1–S4 of the data evaluation experiment, is shown in Fig. 5a. With a mean difference of $0.24 \pm 0.18 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, values of $\eta - \eta_0$ are close to the highest intensities η . Values of ρ over the Weber contrast $\eta/\eta_0 - 1$ of the same intensities are plotted in Fig. 5b. The FWHM of the light spots related to the algae density ρ is presented in Fig. 5c.

Fits of the plots from Fig. 5a and b were calculated using eqn (1). The parameters of the best fit is specified by ρ_{min} and a , Table 1. The upper and lower fits allowed fractions of 0.05 of the data points above and below the delimited ranges, respectively. Parameters $\rho_{\text{min Up}}$ and $\rho_{\text{min Low}}$ were obtained as the lowest and highest values in the area of one percent of the

Table 1 Fit parameters of eqn (1)

Sub-Fig. 5	(a)	(b)
x	$\eta - \eta_0$	$\eta/\eta_0 - 1$
$\rho_{\text{min}}/1$	0.10(2)	0.10(1)
$\rho_{\text{min Up}}/1$	0.15(4)	0.14(3)
$\rho_{\text{min Low}}/1$	0.008(4)	0.008(5)
a	0.12(1)	0.039(6)
a_{Up}	0.4(1)	0.056(2)
a_{Low}	0.09(1)	0.033(4)
$[a]$	$\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$	1

data range around the zero value of the abscissa, Table 1. The given uncertainties represent the standard deviation between the four samples.

$$\rho = \rho_{\text{min}} + e^{ax} - 1 \quad (1)$$

For statistic comparison of the four samples, a parametric one-way ANOVA and additionally a non-parametric Kruskal–Wallis *H*-test were performed by using the Python SciPy-package, using the values of $\rho/(\rho_{\text{min}} + e^{ax} - 1)$ which are plotted in Fig. 6. After correction of the heteroscedasticity *via*

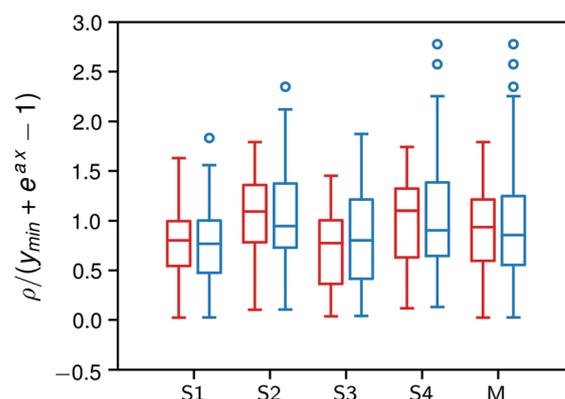


Fig. 6 Boxplots of the four samples S1–S4 and averaged data M for light intensity (red) and contrast (blue). The boxplot whiskers are a multiple of 1.5 of the interquartile ranges (IQR). Open dots are outliers outside of the width of the boxplot whiskers.

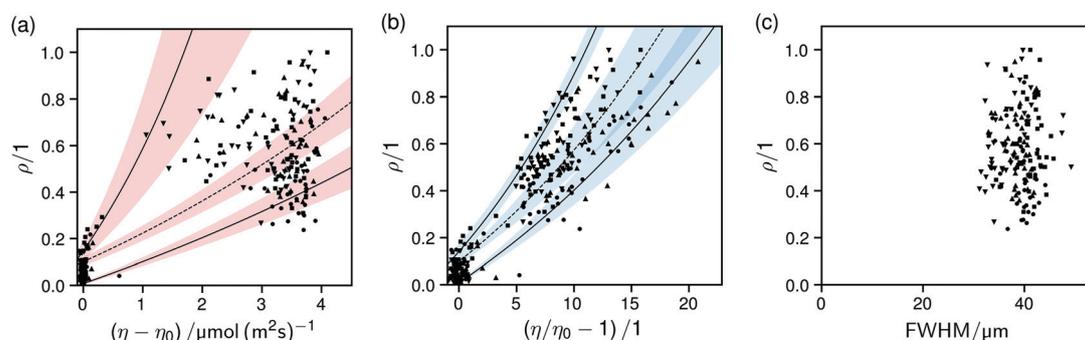


Fig. 5 Data evaluation experiment plots of the relative algae densities dependent on the (a) light intensity, (b) contrast and (c) FWHM. The four sets of data points represent the independent samples S1–S4, with S1 (●), S2 (■), S3 (▲) and S4 (▼). Best fit (dashed line) and boundaries (solid line) of the algae density range are delimited by fits *via* eqn (1). The uncertainties are shaded.

root transformation, the p -values of the light intensity and the contrast data of all four samples were 0.008 and 0.001, calculated by one-way ANOVA. Between sample S1 and S3, and S2 and S4 the p -value was 0.22 and 0.65, respectively. The Kruskal–Wallis H -test of all four samples, which is more appropriate with not ideal normally distributed data, yielded in $p = 0.005$ for the light-intensity and $p = 3 \times 10^{-6}$ for the contrast data.

4 Discussion

4.1 Moving to the pattern

The mean linear velocity of single cells was determined by Schuchart with a 6500 lx microscopic lamp as $2\text{--}3 \mu\text{m min}^{-1}$.¹¹ Homocontinuously grown algae were used at 21 °C with a concentration of 2.5×10^7 cells per ml in ASW. With 10^7 cells per ml, Nultsch *et al.* used the same culturing conditions and achieved a mean population velocity of $0.48 \mu\text{m min}^{-1}$ with a 1000 lx metal halide¹⁰ using a centrifuged algae concentration of 10^9 cells per ml in the experiment. Sommerfeld *et al.*, who used batch cultivation in ASW, obtained results up to $0.58 \mu\text{m min}^{-1}$ with a 2152 lx fluorescent lamp and a diluted solution.¹⁶

In the present work, we measured a mean population velocity of $0.87 \pm 0.04 \mu\text{m min}^{-1}$ in 3 g l^{-1} agar with $120 \mu\text{mol (m}^2 \text{ s)}^{-1}$, Fig. 2. For better comparison with the literature: $120 \mu\text{mol (m}^2 \text{ s)}^{-1}$ equals 8880 lx for a white fluorescent lamp.²⁰ In the experiment the illumination was alternated in a daily 16/8 hour light/dark rhythm and the illumination was perpendicular to the plates. This reduced the effective intensity the algae received. The observed movement rate remained constant over 20 days.

Comparison of the determined velocity with the values determined by Nultsch *et al.* and Sommerfeld *et al.* indicates that an inhibition of the algae movement due to the viscosity of the 3 g l^{-1} agar does not occur. Moreover, inoculation of the algae in the agar promotes a constant movement over 20 days. Since the cultivation media and temperatures are similar, and Nultsch *et al.* measured a saturation and therefore a constant velocity in the range of 10^2 to 3×10^4 lx with white light,¹⁰ the different velocities are probably due to different photoperiods, spectral distributions of the used lamps, or illumination and experimental conditions. Also possible is a mutual obstruction of the algae, due to the high algae density *via* centrifugation.

One aspect of these experimental conditions could be the inoculation method of *P. purpureum*: it is likely that nonflagellated, gliding microorganisms require a viscous surface or surrounding to move in the intended direction.¹⁴ For this reason, photomovement experiments by Nultsch *et al.* and Sommerfeld *et al.* were executed by inoculating *P. purpureum* on agar surfaces. By contrast, we inoculated *P. purpureum* in agar, shortly before the agar started to gelatinize, which might promote algae velocity: the surrounding agar could provide a faster swelling of the EPS, resulting in an increased feed.¹² Also, a more directional movement could be provided by the

agar, leading to an increased population velocity. Furthermore, inoculation on top of the agar could be dependent on the relative humidity. Hence, we believe that inoculation in agar, provides a constant environment. In addition, our agar plates were kept in a stable humidity of 70%. However, to determine the reasons for the different velocities and the possible effect of the viscous surrounding, further experiments are necessary.

To compare the measured velocity with the patterning experiments, the different light conditions must be taken into account. The patterning intensity of approximately $3 \mu\text{mol (m}^2 \text{ s)}^{-1}$ equates to 222 lx, compared to the fluorescent lamp used in the velocity experiment.²⁰ Since the aforementioned saturation of the velocity occurs in the range of 10^2 lx to 3×10^4 lx, and the used wavelength of 457 nm is highly phototactically active (discussed in section 4.4), it can be assumed that the velocity of *P. purpureum* equates to the measured value, $0.87 \pm 0.04 \mu\text{m min}^{-1}$.¹⁰ Hence, algae from the radius of around 8–9 mm were theoretically able to reach the bright spots of the blue pattern in the data evaluation experiment.

4.2 Patterning *via* photomovement

Patterning of microorganisms can be achieved in many ways, as reviewed by Deuerling *et al.*² Contact-free guidance as a patterning tool can be divided into techniques with and without external forces. The former includes guidance *via* magnetic fields or optical tweezers. The latter comprises photomovement.

We obtained algae patterns from *P. purpureum* similar to reports from the literature. Zollfrank and Schuchart structured *P. purpureum* *via* simple lithographic techniques.^{6,11,15} In both cases, light was projected through masks, resulting in algae accumulation. Zollfrank generated a pattern with a line-width of approximately 500 μm . Schuchart's squared structures resulted from the mask diameters at minimum 3 mm, depending on the illumination conditions. The latter found a circular surrounding algae accumulation, which protruded above the illuminated area. The same effect was observed in the present work, since accumulation spots seen in Fig. 4 have an average diameter 1.5 ± 0.5 times larger than that of the projected light spots. Schuchart observed that this was due to the light scattered by algae from inside the illuminated area.¹¹

Arranging the pattern in a pixelated manner (Fig. 3a) is apparently advantageous to pattern *P. purpureum* at the millimeter scale: Schuchart, who used similar illumination conditions, noticed the increasing accumulation of *P. purpureum* in areas of high contrast which will be further discussed in section 4.4.^{11,15} With the use of spot-wise arrangement of the light pattern, the increasing accumulation on edges can be counteracted. Otherwise, mainly outlines of the pattern would have been obtained.

Species of algae other than *P. purpureum* were patterned by Häder.⁷ His obtained 'allograph' shows similarities to the present work, since *Phormidium uncinatum* accumulation showed a high contrast sensitivity, also discussed in section 4.4.

The prokaryotic organism *E. coli* was used by Arlt *et al.*⁸ and visualized *via* phase-contrast microscopy. Their phototactic negative reactions lead to clearance of bright areas and thus to clearly visible transitions on the boundaries from bright to dark. The accumulation factor τ between these boundaries can be estimated by the published data between 3 and 4 after 16 minutes of illumination. In general, with a velocity of about $28 \mu\text{m s}^{-1}$, *E. coli* moves over a thousand times faster than *P. purpureum*. But higher velocities do not lead to better accumulation, since the accumulation factor in the present work was higher at $\tau = 16.9$. Due to a fast stop response when entering the dark area, the abovementioned increased accumulation on edges can also be observed for *E. coli*.⁸ This effect intensifies the visibility of structures, which is beneficial for resolution measurements. At about 10 microns, the resolution is near the magnitude of one single cell diameter of *E. coli*. While the resolution of the algae pattern was not investigated in the current work, it is conceivable to achieve an algae pattern resolution of the same magnitude for *P. purpureum* by minimizing the distance between the SLM and the light pattern, see section 4.3.

4.3 Handling the spots

To achieve a light pattern composed of uniformly arranged pixels, the use of an SLM provides a facile means. It is also advantageous due to the possibility to superimpose lenses and background functions. Yet, size, arrangement and quality of the light pattern depend on the SLM, the used algorithm for hologram calculation, optical devices such as lenses, and the operating distance.

For pattern calculation, we used the Holoeye SLM Pattern Generator, based on the Gerchberg-Saxton²¹ iterative Fourier transformation algorithm (IFTA). It calculates one diffraction order per input pixel, resulting in a uniform pixel-based pattern, as shown in Fig. 3a. Calculation of the input signal with other implementations of the IFTA may result in light patterns where pixels are superimposing, yielding a more uniformly lit pattern. In this case, an input signal where single dots are already drawn can be used to obtain pixelation.

In our setup, we used the diffracted light reflected from the SLM without further optical devices. The resolution R of the single spots is given by the Rayleigh criterion, eqn (2). With $n = 1$, the numerical aperture NA of our setup can be calculated *via* eqn (3) and (4), λ being the wavelength, h the number of SLM pixels in one direction, x the pixel pitch and l the distance between the SLM and the pattern. Calculated spot sizes dependent on the distances are plotted in Fig. 7 as a dotted line for the short side of the SLM with $h = 2160$ px, $x = 3.74 \mu\text{m}$ and $\lambda = 457$ nm.

$$R = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}} \quad (2)$$

$$\text{NA} = n \sin \theta \quad (3)$$

$$\theta = \arctan \left(\frac{hx}{2l} \right) \quad (4)$$

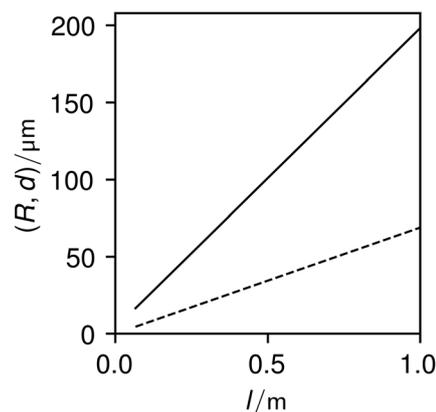


Fig. 7 Resolution R (dotted) and spot to spot distance d (solid) of the light pattern depending on the distance between the SLM and the light pattern l .

If the used software utilizes a uniform pixel based pattern, the determination of the spot to spot distance only from the input signal is difficult to predict, due to the scaling factor of the algorithm and setup divergences. However, the spot to spot distance d can be easily determined by dividing the measured total diameter D of the projected pattern by the number of pixels s from the input signal, bright to bright, in the same direction. To predict it in dependence of the distance l , it is useful to measure the whole pattern divergence α , eqn (5). In the following, d can be calculated using eqn (6). Using our illustration pattern as an example, we obtained with $D = 47$ mm, $s = 400$ px spot to spot distances shown as a solid line in Fig. 7.

$$\alpha = \arctan \left(\frac{D - hx}{2l} \right) \quad (5)$$

$$d = \tan \left(\frac{\alpha}{2} \right) l + x \quad (6)$$

For the utilized distance $l = 50$ cm, the measured spot size FWHM of $39 \pm 3 \mu\text{m}$ and the measured spot to spot distance of $114 \mu\text{m}$ fit well with the calculation, Fig. 7. This illustrates, that a higher resolution of the algae spots can be achieved by minimizing the distance between the SLM and the light pattern.

4.4 Accumulation factors of *Porphyridium purpureum*

Since the photomovement of photosynthesis-driven microorganisms is primarily a strategy to promote reproduction *via* improvement of the phototaxis conditions,^{1,22,23} cell division should always be taken into account in long-term photomovement experiments. Thus, the formation of the resulting algae pattern should be seen as an overlay of spatially (blue pattern) and generally (red background illumination) induced cell division and directional movement. In the following, we assess the effect of growth on the accumulation in the present work.

Despite the effect on photosynthesis,²⁴ different spectral distributions showed only minor influence on the growth rate

of *P. purpureum*. You *et al.* used blue (400–500 nm), red (550–770 nm), or a mixture of blue and white light, resulting in nearly the same growth rate for light intensities of 20 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ and 40 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$.²⁵

Regardless of the spectral distribution, the spatial cell division induced by the light intensity of the blue pattern, and also the general cell division induced by the red background light, can be neglected: with a generation time of 72 h for 10 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ and 150 h for 6 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, the growth slows down significantly with decreasing light intensity.^{24,26} Considering the lag period which increases to several days, we estimate that no more than one cell division appears in the brightest spots of 4 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, induced by the blue pattern. Since the most algae would first have to move to the bright spots, this single cell division only would have insignificant influence on the relative algae density ρ . For the red background light illumination with its intensities of 12 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, respectively 6 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, distributed over the whole area, one single cell division seems to be realistic. Assuming that most algae already moved closer to the light spots, the algae density in the spots increased faster *via* this additional cell division. However, due to the uniform sample illumination and the usage of the relative algae density ρ , cell division based on the background light illumination do not affect the measured data.

Besides potential cell division, the parameters of the used projection method influence the cell accumulation and resulting cell patterns. For *P. purpureum*, the usage of red background light has advantages over a dark surrounding: the photomovement responses, which can be generally divided into photokinesis, phototaxis and the photophobic response¹ react differently, but on the whole are promotional on the algae density.

The photokinesis of the algae can lead to the so called “motility effect”, which is a clearance of illuminated spots, due to their unidirectional movement (activated photokinesis) in illuminated areas and their freezing in dark areas. The effect can be deactivated by Nultsch’s *et al.* dual wavelength irradiation,¹⁰ whereby light, which is only photokinetically active, illuminates the entire sample to steadily mobilize all algae. In the case of *P. purpureum*, wavelengths in the red spectrum cause this behavior. Further experiments with DCMU showed that the photokinesis is coupled with the photosystems I and II, providing energy.⁹ Therefore, a stimulation of both photosystems can increase photokinesis.

The phototaxis mechanism in red algae at the cell level is currently not well understood. Hoiczky reviewed that “the involved sensory transduction chain in [the similar] cyanobacteria starts at the photosynthetic pigments”.²⁷ By analogy, it is likely that the same holds true for red algae, which also lack an eye organelle. However, unlike photokinesis, phototactic responses were found to be uncorrelated to photosynthesis rates.¹⁰ Hence, the guidance signal, assuming that it arises from the photoreceptors, uses a distinct, and as of yet unknown, transmission channel. Outside the cell level, the phototaxis of *P. purpureum* still depends on the used wave-

length and photon flux rate. While the highest phototactic efficiency is at 512 nm when irradiated with 5.6 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, the efficiency for blue light increases with the use of phototactically inactive red background light.¹⁰ Besides the wavelength of the background light, its intensity effects the phototaxis: Nultsch *et al.* measured a phototactic enhancement for light of 424 nm supported by a red background light (635 nm) between 0.5 W m^{-2} and 50 W m^{-2} ,¹⁰ equating about 2 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ and 225 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$.²⁰

The photophobic reaction, responding to the variation of the illumination conditions, is important for algae accumulation. After filtering the photokinesis and phototactic reactions, the phobic reaction for *P. purpureum* shows its maximum at 560 nm, responding only insignificantly on the blue pattern color of 457 nm. But if one wavelength (in our case the blue pattern illumination) is stimulating chlorophyll a pigment (666 nm, 434 nm) of the photosystem I, the photophobic reaction can be enhanced by the stimulus of the photosystem II pigments which are phycocyanin (627 nm) (in our case the red background light with its maximum at 632 nm) and phycoerythrin (560 nm, 380 nm).^{11,15}

The calculated fitting parameters, discussed in the next paragraph, show uncertainties. We determined this uncertainties as the standard deviations of individual fits to reflect differences between the independent samples. For a more detailed analysis of their origins, we considered the dispersion-corrected boxplots, Fig. 6, and performed parametric and non-parametric one-way analyses of variance thereof, as described in Results. The plots themselves show that, for all samples, their interquartile ranges overlap, and that their medians fall well within the interquartile range of the averaged data, seen in boxplot M. On the other hand, the *p*-values between the independent data, both as functions of light intensity and contrast, show that the individual sample means are most likely different from one another. Hence, one or more random elements contributed to the obtained values of ρ . By its nature, we can only speculate as to their origins, and suggest slight differences in handling and illumination, despite applying best care. This illustrates the general sensitivity of microbial systems towards minor, *i.e.* not obvious differences in treatment. In turn, this is reflected by the, to our minds, comparatively large uncertainties of the fitted parameters in Table 1, which should be taken into consideration in future experiments.

In the experiments we conducted in the present work, the blue pattern was supported by the use of an even red background illumination. Even a slight increase of the photon flux induces a strong accumulation of *P. purpureum* since the zero threshold for a phototactic reaction without background illumination is about 1 lx ¹⁰ which is common for several pro- and eukaryotic organisms.²⁸ 1 lx equates to $1.4 \times 10^{-2} \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ for the used white light metal halide lamp.²⁰ With red background illumination, responses down to $10^{-4} \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ could be measured by Nultsch *et al.*¹⁰

Since saturation of phototaxis occurs in the range of $n \times 1 \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$ for the used wavelength of 457 nm, it can be

assumed that algae located in the light spot were attracted and moved to the agar surface.¹⁰ Despite the high sensitivity and the saturation of the phototaxis *via* the applied intensity of the blue light, the algae accumulation is still contained to an area where boundaries could be calculated, Fig. 5a. The appearance of the upper threshold region can be traced to the perpendicular illumination: due to the homogeneous algae dispersion in the agar plate, we can assume that the amount of algae in the direct light beam at the beginning of the experiment was only a fraction of the algae in the final pattern. Hence, a large fraction of *P. purpureum* were attracted due to light scattered on algae and agar and not by the direct light beam. Put simply, the intensity of the scattered light drops with the inverse of the squared distance. So the 'luring radius' is in the order of $n \times 100 \mu\text{m}$ at the beginning of the algae accumulation and increases with the amount of light scattering algae, according to the abovementioned phototactic sensitivity of up to $10^{-4} \mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$. The lower boundary area is also referable to the light scattering. Hereby, the surrounding region where algae responded to the scattered light increased with increasing pattern intensity. Overall, the radius will increase with the amount of illuminated algae, making further time-dependent accumulation experiments necessary to determine its total influence on the algae accumulation.

Furthermore, the availability of algae moving to a light spot plays an important role, since the spots in our experiments induce competitive light conditions for the algae. We showed, that the factor of the attracting light to the adjoining light, also named contrast, plays a more important role than only the intensity in this case, as described in the following.

Schuchart, who investigated the accumulation of *P. purpureum* in light fields which were large in comparison with the cell diameter, observed a strengthened accumulation at the boundary area between bright blue and dark illumination. This little-investigated edge effect was enhanced by red background illumination with a maximum at 600 nm.^{11,15} In observations of *P. purpureum* at the microscale with white light and without background illumination, the cells showed no true 'stop response' when trespassing into other illumination conditions. Moreover, some cells stop their motion a few microns into the region of the new conditions, others turn around and still others increased their linear velocity when returning to the more convenient area.¹¹ Cells that are back in, move, until they reach the edge again, where they stop moving or change direction once more. This behavior leads to *P. purpureum* oscillating around the contrast boundary. This causes an increased accumulation and can be enhanced by illuminating blue with red background light. Further investigations at the microscale are necessary to understand the promoting effect of red light, since it is not necessarily related to the phobic reaction.¹⁵

This edge effect and the phobic reaction are important driving forces for generating algae accumulations as illustrated in Fig. 5b. For contrasts $\eta/\eta_0 - 1$ up to the factor of approximately 16, it could be determined that a doubling approximately led to a doubling of the algae density, delimited by the parameters from Table 1. Regions of minimal and maximum

contrast for algae accumulation indicate the sensitivity range of *P. purpureum* phobic reaction combined with the edge effect. Thus, for accumulation of the algae, contrast, rather than light intensity, of the projection method should be taken into account with one limitation: the attracting intensity has to be strong enough to stimulate surrounding algae, which is not the case for high contrasts in badly illuminated areas.

Evolutionarily, with the response to low photonic flux variations, *P. purpureum* can minimize mutual shading and achieve the best lighting conditions, which appears to be a survival strategy of phototactic algae.^{2,3} The influence of low flux differences was impressively demonstrated with *Phormidium uncinatum* in the Häder 'algraph'.⁷ We propose that the enhanced accumulation and moving around contrast boundaries of *P. purpureum* could also be an evolutionary characteristic: the sunlight spectrum is changing from 'more red' in the morning and evening to 'more blue' in between. Hence, when the light conditions are best for the algae at the noon, they accumulate more at contrast boundaries. Instead of staying in uniformly bright areas, searching after contrast boundaries enhances the chance to move along the brightest and therefore best light conditions. For example a uniformly bright area could also be a shady place under a leaf, which the algae would otherwise not recognize.

Finally, the influence of the spot size, which can be seen in Fig. 5c, is negligible compared to the light intensity and the contrast. Calculated and measured spot sizes are mostly in the same range. Scattering of the sizes are due to imperfections in the displayed pattern which were induced by the hologram algorithm and optical aberrations. Low intensity spots tend to have lower FWHM, because pixels on the edges were more likely to be measured as background.

5. Conclusion

The usage of an SLM offers a very flexible and easy to use possibility to manipulate phototactic microorganisms such as algae. Based on a holographic generated light pattern, we accumulated the gliding algae *Porphyridium purpureum* into pixelated structures. The accumulations were measured pixelwise and compared to the spatial variations of the illumination intensity, contrast and size conditions. The evaluated statistical parameters and boundaries of the algae accumulation can be considered in future projection methods to increase the quality of the intended manipulation.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank the German Science Foundation (DFG) for funding our research through the Reinhardt Koselleck programm grant ZO113/20-1.

References

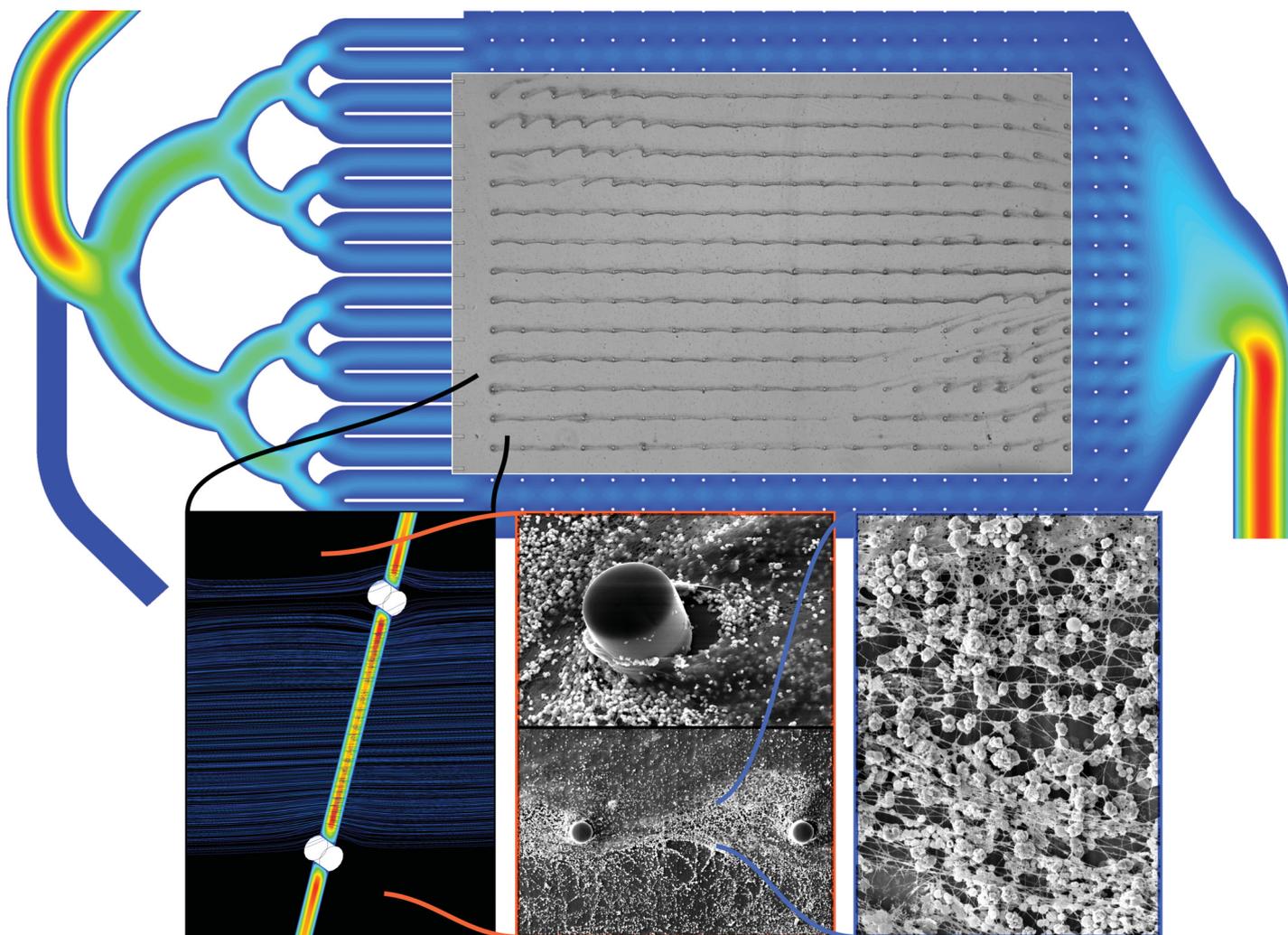
- 1 W. Nultsch and D.-P. Häder, Photomovement in motile microorganisms-II, *Photochem. Photobiol.*, 1988, **47**(6), 837–869.
- 2 S. Deuerling, S. Kugler, M. Klotz, C. Zollfrank and D. Van Opdenbosch, A perspective on bio-mediated material structuring, *Adv. Mater.*, 2018, **30**(19), 1703656.
- 3 G. Vizsnyiczai, G. Frangipane, C. Maggi, F. Saglimbeni, S. Bianchi and R. Di Leonardo, Light controlled 3D micro-motors powered by bacteria, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 15974.
- 4 J. Dervaux, M. C. Resta and P. Brunet, Light-controlled flows in active fluids, *Nat. Phys.*, 2017, **13**(3), 306.
- 5 X. Wang, N. Jiao, S. Tung and L. Liu, Locomotion of microstructures driven by algae cells, in *2018 International Conference on Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales (MARSS), IEEE*, 2018, pp. 1–5.
- 6 C. Zollfrank, Biotemplating: Polysaccharides in materials engineering, *WIT Trans. Ecol. Environ.*, 2010, **138**, 441.
- 7 D.-P. Häder, Wie orientieren sich Cyanobakterien im Licht, *Biol. Unserer Zeit*, 1984, **14**(3), 78–83.
- 8 J. Arlt, V. A. Martinez, A. Dawson, T. Pilizota and W. C. Poon, Painting with light-powered bacteria, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 768.
- 9 W. Nultsch, H. Schuchart and M. Dillenburger, Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegeli I. photokinesis, *Arch. Microbiol.*, 1979, **122**(2), 207–212.
- 10 W. Nultsch and H. Schuchart, Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegeli II. phototaxis, *Arch. Microbiol.*, 1980, **125**(1–2), 181–188.
- 11 H. Schuchart, Photomovement of the red alga *Porphyridium cruentum* (Ag.) Naegeli III. action spectrum of the photophobic response, *Arch. Microbiol.*, 1980, **128**(1), 105–112.
- 12 A. Seminara, T. E. Angelini, J. N. Wilking, H. Vlamakis, S. Ebrahim, R. Kolter, D. A. Weitz and M. P. Brenner, Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**(4), 1116–1121.
- 13 M. D. Guiry, *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli, 2019, Accessed 2019-03-14. [Online]. Available: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?speciesid=14589>.
- 14 D.-P. Häder, Photosensory behavior in procaryotes, *Microbiol. Rev.*, 1987, **51**(1), 1–21.
- 15 H. Schuchart, *Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Bewegungsreaktionen von Porphyridium cruentum*, PhD Thesis, Philipps University of Marburg, 1978.
- 16 M. R. Sommerfeld and H. W. Nichols, Comparative studies in the genus *Porphyridium* Naeg, *J. Phycol.*, 1970, **6**(1), 67–78.
- 17 J. M. Walter, D. Greenfield, C. Bustamante and J. Liphardt, Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**(7), 2408–2412.
- 18 K. Brown, K. Lamb, D. Russell, I. Ruddock, A. Cunningham and R. Illingworth, Holographic recording in algal suspensions, *Opt. Commun.*, 1996, **126**(4–6), 202–206.
- 19 R. F. Jones, H. L. Speer and W. Kury, Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*, *Physiol. Plant.*, 1963, **16**(3), 636–643.
- 20 R. W. Thimijan and R. D. Heins, Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: A review of procedures for interconversion, *HortScience*, 1983, **18**(6), 818–822.
- 21 R. W. Gerchberg and W. O. Saxton, A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures, *Optik*, 1972, **35**(2), 237–246.
- 22 W. Haupt and D.-P. Häder, Photomovement, in *Photomorphogenesis in plants*, Springer, 1994, pp. 707–732.
- 23 A. Pentecost, Effects of sedimentation and light intensity on mat-forming oscillatoriaceae with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* gomont, *J. Gen. Microbiol.*, 1984, **130**(4), 983–990.
- 24 I. Levy and E. Gantt, Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): Growth, photosynthesis, and phycobilisomes, *J. Phycol.*, 1988, **24**(4), 452–458.
- 25 T. You and S. M. Barnett, Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **19**(3), 251–258.
- 26 F. X. Cunningham, R. J. Dennenberg, L. Mustardy, P. A. Jursinic and E. Gantt, Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance, *Plant Physiol.*, 1989, **91**(3), 1179–1187.
- 27 E. Hoiczky, Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations, *Arch. Microbiol.*, 2000, **174**(1–2), 11–17.
- 28 W. Nultsch, H. Schuchart and M. Höhl, Investigations on the phototactic orientation of *Anabaena variabilis*, *Arch. Microbiol.*, 1979, **122**(1), 85–91.

Publikation B

Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned bacterial cellulose networks

Reproduced from Ref. M. Klotz, D. Bajrami, und D. Van Opdenbosch, „Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned bacterial cellulose networks,” *Material Advances*, Vol. 3, Nr. 15, S. 6191-6207, 2022 with permission from the Royal Society of Chemistry.

<https://doi.org/10.1039/D2MA00115B>



Showcasing research from Daniel Van Opdenbosch's group, Chair for Biogenic Polymers, Technical University of Munich

Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned bacterial cellulose networks

In this work, the flow-dependent growth dynamics of microbial exopolysaccharide networks in obstacle-studded microfluidic cells are tracked by shadowgraphy. Our setup allows quantifying the material density as a function of time and location with almost single microbial cell resolution. In this manner, an overall bi-logistic growth and local wall shear stress-dependent material formation around obstacles were determined.

As featured in:



See Daniel Van Opdenbosch *et al.*, *Mater. Adv.*, 2022, **3**, 6191.

Cite this: *Mater. Adv.*, 2022,
3, 6191Received 2nd February 2022,
Accepted 17th May 2022

DOI: 10.1039/d2ma00115b

rsc.li/materials-advances

Grow with the flow – observing the formation of rheotactically patterned bacterial cellulose networks†

Moritz Klotz,  Dardan Bajrami  and Daniel Van Opdenbosch*

The use of matrix-forming organisms is a promising way to obtain hierarchically structured materials. In this work, we investigate the rheotactic bio-mediated alignment and network formation of bacterial cellulose streamers, resulting in hierarchically patterned textiles. For this purpose, we devised a panoramic-view observation setup for a microfluidic cell. We observed a split growth, with first, a flow-aligned streamer formation and second, a streamer connection phase. The growth phase parameters showed dependence on flow rate. After aligned growth, a mineralisation step was conducted to the grown textiles with calcium carbonate and -sulfate to obtain nature-inspired organic/inorganic composite materials. Hereby, an anisotropic deposition of the gypsum phase due to the prealigned bacterial cellulose substrate was observed.

1 Introduction

The growth of natural materials differs fundamentally from the production of engineering materials: while engineering materials' requirements are typically fulfilled by choice of substance and shaping techniques, nature forms its materials from readily available elements into hierarchical structures.¹ Hence, biological materials derive their widely varying properties mainly from the adaptation of internal structuring to meet functional requirements.^{2,3} The most prominent aspects hereof are hierarchical structure and structural anisotropy. In addition, dispersed polymer phases enable stress relaxation and structural regression of the material due to their viscoelasticity, sacrificial bonds and 'hidden lengths'.⁴

In order to obtain bio-mimetic mechanical properties in engineering materials, different approaches can be pursued: applying biomorphism and biotemplating, it is possible to convert a naturally grown template into an inorganic replica material retaining most, or all, of the hierarchical levels of structuring, leading to exciting mechanical properties.^{5–8} With some restrictions, it is also possible to obtain hierarchical structures by the self-organizing material synthesis in an artificial process.⁹ However, up-scaling these processes, which were reviewed by Deuerling *et al.* as 'Level 1 – Transfer of

structure',¹⁰ to produce competitive engineering materials remains a challenge.

Nature, on the other hand, readily produces large-scale composite materials *via* hierarchical structuring. Therefore, bio-mediated material structuring, reviewed by Deuerling *et al.* as 'Level 2 – Usage of biological systems',¹⁰ offers the potential to control material formation from the micro to the macro level. Here, biological systems are influenced by stimuli to which the living cells and microbes react by movement, 'taxis'. The growth into a certain culture medium as an internal stimulus,¹⁰ as well as the directed growth after external stimuli, *e.g.* light,^{11–13} mechanical influences^{14–17} and a variety of other attractants,^{18–20} can serve to create a biological, hierarchically structured template to be used for different purposes than intended by nature. The advantage of this approach is that biological materials are typically already hierarchically structured, starting at the molecular level: Biofilms, for example, are micro-organisms embedded in their extracellular polymeric matrix (EPS).²¹ While they are undesirable in most living and technical systems, they feature a hierarchical structure.^{22,23} Specifically, bacterial cellulose biofilms (BCB) consisting mainly of bacterial cellulose (BC), exhibit several structural levels: starting from the cellulose molecules, the bacteria produce microfibrils at the nanometer level which consist of amorphous and crystalline regions. The microfibrils arrange into ribbons, building bundles, which then cluster into bacterial cellulose networks.^{24,25}

Several works have considered bio-mediated structuring of BCB, respectively the BC fibers: Kondo *et al.* and Uraki *et al.* similarly used already-deposited cellulose strands as templates for further deposition.^{16,26} Anisotropic deposition of BC is

Technical University of Munich, Campus Straubing for Biotechnology and Sustainability, Chair for Biogenic Polymers, Schulgasse 16, D-94315 Straubing, Germany. E-mail: moritz.klotz@tum.de

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2ma00115b>



possible by using nematic ordered cellulose (NOC) or stretched cellulose as templates.^{27,28} Also of interest is the alignment *via* growth on polydimethylsiloxane (PDMS) with a ridged morphology.^{29–31} By varying ridge sizes, Putra *et al.* archived a 2.3 times higher fracture stress and a 3.8 times lower elastic modulus, compared to air-grown BCB. His group was also able to produce mechanically anisotropic behavior with BCB grown in thin silicon tubes, as well as by influencing the culture interface *via* silicon oil.^{32,33} Also promising are the works of Sano *et al.* and Liu *et al.* who successfully used an electromagnetic field to align BCB.^{34,35}

Wan *et al.* and Luo *et al.* carried out structuring by a flow approach: Wan *et al.* were able to align the BCB with the flow and increase the tensile strength in the BC fiber direction from 0.9 MPa to 1.2 MPa, while the fracture strain decreased by 8%. Luo *et al.* even achieved a tensile strength of 1.5 MPa with a flow velocity of 150 mm⁻¹, with a fracture strain decrease of 12%.^{36,37} Using flow-producing rising bubbles, Chae *et al.* also attained a unidirectional deposition of BCB.³⁸

Since structuring of BCB by flow has already yielded interesting results, it is worth considering the mechanism: if a biofilm grows in a flowing medium, its viscoelastic morphology responds to the mechanical stimulus of the flow.³⁹ The form thereby differs if the biofilm is fully surface attached or if it adheres at least at one point, while the rest of the biofilm moves with the flow as a so-called streamer. The streamer formation and its physics have been studied by several research groups.^{40–43} As intuitively expected, the geometry and the flow velocities of the system have a great influence on the streamers' shapes.^{15,44–47} Interestingly, whether streamers start to form is largely independent of the Reynolds number, as summarized by Karimi *et al.*⁴¹ The dynamics of the flow can also influence the growth system, as can be seen in experiments with pulsative or split flow.^{48,49} Condensed, the streamers morphology but also the strength of attachment are strongly influenced by their viscoelastic behavior⁵⁰ which is a function of its structure. The structure formation in turn is influenced by the flow: in contrast to fish, copepods and some protists, which possess a receptor for flow forces and exhibit active rheotaxis, bacteria react in a passive way to the shear stress factor, comparable with other passive physical movement phenomena like gyro- and magnetotaxis.⁵¹ Bacterial rheotaxis is triggered by bacterial motility and morphology.⁵² While the swimming direction of motile bacteria is changed by torque, non-motile bacteria expand along their biofilm, due to the predominant shear forces under flow conditions.^{47,53} For BC producing bacteria, it is likely that extrusion of BC and cell division based fiber-anchoring²⁴ provide this movement. Together with the morphology induced alignment, which occurs for ellipsoidal bacteria like *Komagataeibacter xylinus* (*K. xylinus*),^{37,50} we consider the flow based forming of the BCB as a type of rheotaxis. So far, rheotaxis and streamer formation has been studied mainly in single, isolated samples. The formation of streamer networks has been investigated rarely, and mainly with the aim of being able to avoid them, and the associated clogging of fluidic systems. Worth mentioning is the work by

Hassanpourfard *et al.* who investigated fast-formed *Pseudomonas fluorescens* streamer-networks and found that they still moved by a viscoelastic 'stick-slip' dynamic, which allows the formation of channels, resulting in regions of varying density.^{54,55}

In summary, the *in situ* structuring and alignment of biofilm streamers, in particular of BCB, can be realised by a variety of approaches. However, in order to produce engineering materials, processes have to be adapted to include larger-scale hierarchical structuring and outer shapes, such as honeycomb structures.^{16,26} At this point, rheotactic structuring has advantages: flow bodies can have any shape and size and there is a high degree of flexibility due to the large number of parameters such as flow, species and medium composition. Another advantage is the direct introduction of additives into the growth system, which allows the formation of organic/inorganic composite *via* an *in situ* or quasi *in situ* mineralisation route.

Generally, composites with BCB, respectively, BC as the substrate are of interest, especially for medical purposes, as the reviews from Shan *et al.* and Liu *et al.* illustrate. Mainly for the investigation of new tissue materials, dozens of BC combinations with polymers or nanomaterials were tested.^{56,57} Excellent mechanical properties were obtained by impregnation of the grown BC *ex situ*.⁵⁸ However, *in situ* mineralisation by which the composites are produced during BCB growth, or quasi *in situ* mineralisation, where the BCB is treated in the same vessel directly after growth, are promising. Literature thereof, in the combination organic/inorganic, so far is limited to (nano)particle,^{59–61} fibers^{35,62} and minerals *e.g.* hydroxyapatite or clay.^{63–66} Inspired by biological materials with tough or self-healing properties like nacre,⁶⁷ we assume that rather the latter combination is suitable to obtain a scalable, hierarchically and nature oriented engineering material. Materials which can be processed by a wet mineralisation route in a quasi *in situ* setup.

CaCO₃/cellulose composites, serving as a model for quasi *in situ* mineralisation, can be achieved by different approaches, such as the already mentioned direct deposition of particles,^{59,60} or *via* the precipitation from precursors. The latter works *via* diffusive processes⁶⁸ or faster, *via* direct mixing. The intermediate which occurs during the precipitation of CaCO₃ is amorphous calcium carbonate (ACC), which can serve as the inorganic phase after stabilization^{69–71} or after crystallisation.^{72–75} ACC can be used in a one step process, without the need for a second reagent. Also a one step process is the deposition of gypsum from super-saturated solutions. Despite gypsum's low cost and the possibility to overcome drawbacks such as brittleness, gypsum/cellulose composites have not been the focus of many publications so far. However, due to the possibility of a one-step mineralisation and its typical acerous morphology, which lends itself to textured mineralisation, it is well suited for use with prealigned BCB. Gypsum mineralisation on a cellulose substrate was already achieved by Nissinen *et al.*, who used supersaturated CaCl₂-Na₂SO₄ solutions.⁷⁶

Bio-mediated materials with hierarchical structures can be made by rheotactic approaches as demonstrated by Wan *et al.*



and Luo *et al.*^{36,37} Building on these results, we aim to extend the fundamental knowledge of flow based material patterning for future upscaling and material production. Investigating the growth dynamics leads to an improved understanding of the rheotactic biofilm formation and enables prospective reproducible material production. We hypothesized that an initial homogeneous distribution of EPS-forming microbes on obstacles, positioned with a long-range order and subjected to volume-driven flow, will lead to their uniform growth, resulting in a network of streamers. The growth parameters thereby are a key aspect to tailor a well defined material with specific structural features on several hierarchical levels. Such a material can serve as a matrix for organic/inorganic composites whose hierarchical characteristics span its different phases. Therefore, we evaluated in a panoramic-view observation setup the obstacle-induced streamer and streamer-network formation of *K. xylinus* at three different flow rates. After growth, we assessed two potential mineralisation routes by a quasi *in situ* process: in a one step process either the amorphous precursor ACC or a supersaturated solution of CaSO_4 was added directly into the growth chamber.

2 Experimental

2.1 Setup

Fig. 1 shows the experimental setup for the growth experiments. A batch culture (1) of *K. xylinus* was pumped by a syringe pump (2) through a pressure sensor (3) and a double bubble trap (4, 5) into a microfluidic cell (8) in a circular flow. Growth in the microfluidic cell was observed using an optical setup (6–10).

Komagataeibacter xylinus. The *K. xylinus* strain DSM 2004 was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany). For each of the 12 experiments, a batch culture ((1) in Fig. 1) of 150 ml DSMZ medium 105 containing 100 g l^{-1} glucose (VWR International, Darmstadt, Germany), 10 g l^{-1} yeast extract (VWR International, Darmstadt, Germany) and 20 g l^{-1} CaCO_3 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at pH 6.8 was prepared in a 250 ml cone-shaped flask with a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE membrane lid (Duran, Schott, Mitterteich, Germany), and inoculated from *K. xylinus* grown on an agar plate (15 g l^{-1} agar, VWR International, Darmstadt, Germany). BC producing bacteria like *K. xylinus* are located almost exclusively in the BCB pellicle. To maintain a sufficient concentrated inoculum from below the pellicle, before use, inoculated cultures were stored at ambient temperature until the growth of the pellicle stagnated at a thickness of approximately 5 mm. The stagnation could be attributed to the conical shape of the used flasks.⁷⁷ Preliminary tests showed that glucose was sufficiently present and BCB production was unaffected by this storage time. Purity was checked before and after each experiment by streaking the *K. xylinus* culture on agar plates.

Microfluidic cell. For each experiment, a new microfluidic cell ((8) in Fig. 1) was cast from PDMS (SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit, Mixture Silicone/Initiator 1/10, Dow Chemical, Midland, United States) via the MicCell Tool Kit (GeSiM,

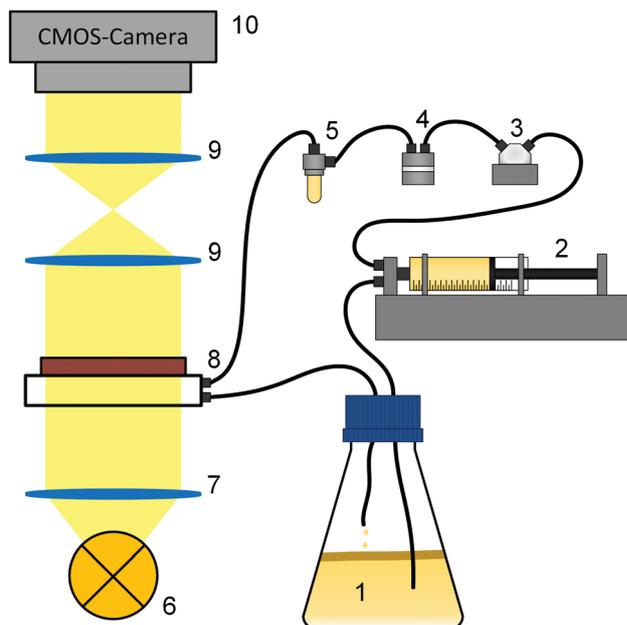


Fig. 1 Sketch of the experimental setup. The inoculum (1) of *K. xylinus* was taken from below the BCB pellicle by a syringe pump (2), injected via a pressure sensor (3) and a double bubble trap (4, 5) into the microfluidic cell (8), and recycled into the batch culture (1). The microfluidic cell was illuminated in transmission with nearly parallel light (7) emitted by a white LED (6). After passing an optional optical filter which allows schlieren techniques (9, not used in the current experiments), the observation took place using a camera (10). For clarity, the beam path is simplified.

Radeberg, Germany). After casting and cross-linking for 24 h at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, the sealing glass was permanently connected to the PDMS by a 45 s plasma treatment. The microfluidic cell, shown in Fig. 2, with its polycarbonate carrier and sealing glass on the PDMS was transparent, allowing observation of the $50 \mu\text{m}$ channel in transmission.

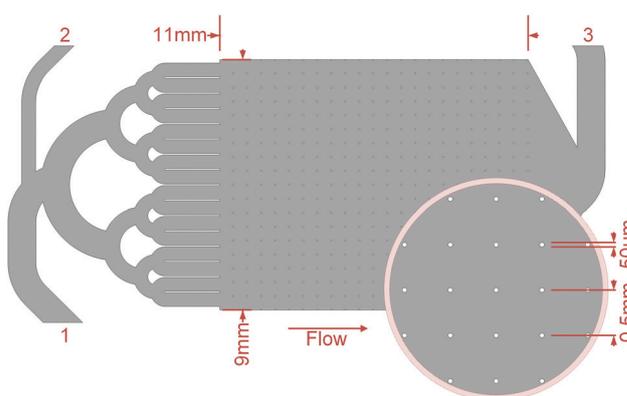


Fig. 2 Sketch of the microfluidic cell. The inoculum was injected into the larger inlet (1) from where it was evenly distributed into the inlet channels. This regularly allowed an even distribution of the fluid into the growth chamber, which was filled with evenly arranged obstacles with diameters of $50 \mu\text{m}$ in 0.5 mm distance. After the growth, the smaller inlet (2) was used to add mineralisation medium. The inset shows a magnified section of the growth chamber.



Optical setup. In the optical setup ((6–10) in Fig. 1) the microfluidic cell was illuminated (6) by a white LED without diffusor (QAUR1361L030, Signal-Construct, Niefern-Oeschelbronn, Germany). After passing the convex lens (7), the slightly divergent light passed the microfluidic cell (8). The optical filter (9) with $f = 100$ mm, while part of the setup, was not used in this experiment. The microfluidic cell was imaged on the 13.1 mm \times 8.8 mm camera chip (10) slightly magnified (1.28 \times) with 5472 px \times 3648 px (acA5472-17um, Basler, Ahrensburg, Germany), resulting in a viewing window of 10.2 mm \times 6.8 mm and a resolution of 7 μ m (144 line pairs per millimeter, measured with USAF 1951 Target).

2.2 Experimental procedure

For each of the three different flow rates, four repeating experiments were conducted at ambient temperature 21 ± 1 °C. The necessary volume flow for the mean flow rates of 1.0 mm s⁻¹, 12.5 mm s⁻¹ and 25.0 mm s⁻¹ were calculated for the growth chamber of the microfluidic cell.

Before each of the 12 experiments, all tubes (PTFE, inner diameter 1/32"), fittings and the second bubble trap were autoclaved. After assembly of the components, the setup was flushed with 20% H₂O₂ (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for one hour to sterilize all unautoclavable parts including the microfluidic cell, both bubble traps, the valve and the pressure sensor (CPS 2184 Z, 5 bar, CETONI, Korbussen, Germany).

At the start of an experiment, a syringe pump (neMESYS 290N with QmixElements, CETONI, Korbussen, Germany) equipped with a 3-2-way valve ((2) in Fig. 1), pumped inoculum from below the BCB pellicle in cycles through the microfluidic cell and back into the flask. During the experiments, which lasted up to 70 h, the syringes were automatically refilled. All pump parameters are listed in Table 1.

Since the long-lasting experiments were susceptible to air bubbles which degrade the grown biofilm, a double bubble trap ((4,5) Fig. 1) was used. The first (Bubble Trap for Microfluidics, ELVEFLOW, Paris, France) for large bubbles appearing in the starting phase and the second (Microfluidic Reservoir XS, ELVEFLOW, Paris, France), for small bubbles appearing during the experiments, which were not removable by the first trap. Additionally, the second bubble trap buffered pressure impulses and allowed a more even flow. With the pressure sensor, a servo loop was adjusted. The experiments were conducted until the slowly increasing pressure reached 1 bar and the servo loop started to minimize the flow rate from Table 1. For the evaluation, only the data before the start of the

servo loop with the constant adjusted flow (below 1 bar) were used. To document the growth, 8-bit black/white images were recorded *via* Micro-Manager⁷⁸ every 10 minutes.

After each experiment, the setup was flushed with 5–10 ml deionised water (DI) to remove all water-soluble substances. For this, the maximum pressure was step-wise increased, up to a maximum of 1.5 bar. After the following mineralisation steps which were conducted on some samples, the microfluidic cells were dried for 24 h at 45 °C and opened mechanically to obtain the biofilm.

2.3 Growth analysis

BCB concentration calibration. To relate the BCB transmitted light intensities imaged during growth to BCB concentrations, the Lambert–Beer law $A = \epsilon l_{\text{cell}} c$ was used. A accounts for all attenuating phenomena, including absorbance and scattering. ϵ is the molar attenuation coefficient, l_{cell} the path length of 50 μ m (chamber thickness) and c the BCB concentration.

For determining ϵ , the biofilm thickness l_{BCB} of one reference sample was obtained by breaking the sample after freezing in liquid nitrogen. l_{BCB} then was determined by SEM at 19 measuring points at the fracture plane. We assume that the vacuum-dried BCB was contracted compact and dense with marginal inter-spaces. This is supported by the SEM images (see Fig. S3(d), ESI†). Since only BCB influenced light absorbance due to the use of the reference images at t_0 , we defined the reference mass concentration c_{ref} with the measured BCB density ρ_{BCB} by eqn (1). To measure ρ_{BCB} , in total 48 BCB pieces of six separate batch-grown samples were washed, dried at 65 °C and weighed. Afterwards, they were soaked for 24 h in DI water at <0.1 bar to remove embedded air. Their densities were determined by Archimedes' principle (224-1S, Sotoris Entris, Göttingen, Germany) with a mean result of $\rho_{\text{BCB}} = 1.12 \pm 0.03$ g cm⁻³.

$$c_{\text{ref}} = \frac{\rho_{\text{BCB}} l_{\text{BCB}}}{l_{\text{cell}}} \quad (1)$$

With c_{ref} , l_{cell} and the reference absorbances A_{ref} , ϵ was determined as $\epsilon = (1.30 \pm 0.27) \times 10^5$ mm² g⁻¹, see Fig. S1 (ESI†). Thereby A_{ref} was obtained by eqn (2), with t_0 as the first image without biofilm and t as the last taken image during the growth experiment.

$$A(i, j, t) = \log_{10} \frac{I(i, j, t_0)}{I(i, j, t)} \quad (2)$$

BCB concentration. With the determined ϵ , all c_{BCB} values were calculated for all the measurement data *via* the Lambert–Beer law, eqn (3). Pixel values i, j stayed within the 8-bit range of the images. This showed that no saturation was reached during the experiments and all calculated concentrations were within the measuring range.

$$c_{\text{BCB}}(i, j, t) = \frac{A(i, j, t)}{\epsilon l_{\text{cell}}} \quad (3)$$

Statistical analysis. For the evaluation of biofilm growth in the function of the three flow rates 1.0 mm s⁻¹, 12.5 mm s⁻¹ and 25.0 mm s⁻¹, the borders of the viewing window were cut

Table 1 Pump parameters with the calculated mean flow rates in the growth chamber of the microfluidic cell. Syringe volumes differed to maintain a precise flow; the refill rate differed to avoid formation of bubbles in the syringes

Flow rate/ (mm s ⁻¹)	Syringe inject rate/(μ l s ⁻¹)	Syringe volume/ml	Syringe refill rate/(μ l s ⁻¹)
1.0	0.450	1	50
12.5	5.625	2	75
25.0	11.25	10	100



off to a section of $9 \times 6 \text{ mm}^2$, so that the identical sector inside of the growth chamber was analyzed in every experiment. Normalised cumulative histograms $\gamma(c_{\text{BCB},b}, t)$ of the obtained BCB concentrations were calculated to determine proportions of the material with concentrations of c_{BCB} or higher. Hence, values of γ represent the area fractions where the minimum concentrations are c_{BCB} . All 210 bins $c_{\text{BCB},b}$ in their logarithmic concentration range, ranging from -0.010 up to 0.347 g cm^{-3} , were summarised starting by the highest occurring bin $c_{\text{BCB},b_{\text{max}}}$.

After conversion, the isolines of $\gamma(c_{\text{BCB},b}, t)$ were fitted between $0 < \gamma \leq 1$ via a bi-logistic fit, which was performed by the least-squares algorithm of the Python lmfit package. With the maximum curve values S , the inflexion points Δt of the sigmoid curves and the logistic growth constants λ , fits were performed after eqn (4). The plots shown in this work ended when the fitted parameter of at least two measurements reached zero or unrealistic values.

$$c_{\text{BCB}}(\gamma, t) = \frac{S_1}{1 + e^{-\lambda_1(t-\Delta t_1)}} + \frac{S_2}{1 + e^{-\lambda_2(t-\Delta t_2)}} \quad 0 < \gamma \leq 1 \quad (4)$$

Cumulative analysis. From the $c_{\text{BCB}}(i,j,t)$ data, the average BCB concentrations $\bar{c}_{\text{BCB}}(i,j,t)$ were calculated. For determining the concentration increase rates, the resulting mean data of the three flow rates were fitted by linear regression via the Python SciPy theilslopes Theil-Sen estimator.

Azimuthal analysis. To obtain the average development of the concentration around the obstacles for every experiment, the azimuthal BCB concentrations $c_{\text{BCB}}(\alpha, t)$ were determined by calculating the radial average for any azimuthal angle α per image and timestep t , in a radius between $28 \mu\text{m} \leq r \leq 250 \mu\text{m}$ from the obstacles' centers. Per image, the data from 187 obstacles (see Fig. 2) were averaged.

Obstacle analysis. The spatial concentrations near the obstacles were determined as two profiles, averaged over 187 obstacles per timestep: one profile parallel and one perpendicular to the flow. The profile midpoints are the obstacle centers and with an x -axis length of $\pm 225 \mu\text{m}$, the total profile lengths cover approximately half the distance between two obstacles. Vertically, the y -axes of the profiles cover distances of $\pm 25 \mu\text{m}$, equating to the obstacles' diameters.

Robustness. To enhance the robustness of the obtained concentrations, all calculated averages are medians. All uncertainties are median absolute deviations.

2.4 Flow simulation

Two-dimensional finite volume element simulation of the fluid flow (CFD) in the microfluidic cell without biofilm was performed with ANSYS FLUENT (Ansys, Pennsylvania, USA) for the three different flow rates. The defined working fluid was the culturing medium before inoculation (dynamic viscosity = 1.34 mPa s (Ubbelohde viscometer with a type 50103/0c capillary, SI Analytics, Mainz, Germany), density = $0.99 \pm 0.01 \text{ g ml}^{-1}$). As the flow rates and Reynolds numbers where low, the flow was considered incompressible, laminar and steady state. The system was set as isothermal, without any gravity effects and the boundary conditions at the walls were considered as non-slip

and the pressure at the outlet as atmospheric. For the pressure-velocity linking, the coupled method was used. For discretisation, "second order upwind" was selected for pressure and momentum. The convergence criteria were set as 10^{-10} for all equations. For evaluation of the method, a grid independence study was performed, Fig. S6 (ESI†).

2.5 Mineralisation

Mineralisation of biofilms was conducted by crystallisation of CaCO_3 from ACC or CaSO_4 from a supersaturated solution. For the CaCO_3 mineralisation, the microfluidic cells, after they were flushed with water, were rinsed with $3 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Th. Geyer, Renningen, Germany) solutions for at least one hour. Under a continuous flow of $1 \mu\text{l s}^{-1}$, the second inlet ((2) in Fig. 2) was first flushed with DI-water and then with a $3 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) solution manually injected by a syringe until the microfluidic cells clogged. The ACC precipitated directly in the growth chambers, where the ensuing mineralisation could be observed. After a rest period of about 17 h, the cells were flushed with at least 5 ml DI-water at a pressure up to 1.5 bar.

For the CaSO_4 mineralisation, solutions of $0.4 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and Na_2SO_4 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) were mixed and injected via a $0.2 \mu\text{m}$ syringe-filter into the cell inlets until the filter clogged after 1–2 ml solution. After a rest period of about 17 h, when no further mineralisation was observable, the cell was dried at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, without flushing. Preliminary tests showed that a supersaturated solution of this concentration stays stable for approximately four minutes before crystallisation initiates.

2.6 Metrology

Imaging. Grown and optionally mineralised samples were analyzed via optical microscopy (OM, Dialux 20, Leitz, Wetzlar, Germany with camera a7 RII, Sony, Tokyo, Japan and adapter DSLRCC, Micro Tech Lab, Graz, Austria) and scanning electron microscopy (SEM, DSM 940A, Zeiss, Oberkochen, Germany).

X-Ray diffractometry. To trace ACC mineralisation, X-ray diffractometry in Bragg Brentano geometry (XRD, Miniflex, Rigaku, Tokyo, Japan with D/teX Ultra, Copper Ka, Divergence Slits 0.625° , Soller Slits 2.5°) was used. The ACC formation was repetitively measured at a speed of $10^\circ \text{ min}^{-1}$ between $28^\circ < 2\theta < 31^\circ$ in a rotating liquid sample holder (Item no: 1D0807AA with Mylar film, Rigaku, Tokyo, Japan) until no changes to the diffractograms of the mixed $3 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $0.25 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ solutions were recorded.

For the assessment of biofilm mineralisation, the mineralised biofilms were measured for $10^\circ < 2\theta < 60^\circ$ and $0.5^\circ \text{ min}^{-1}$ while being spun to equalize any in-plane texture. Additionally, they were measured in transmission mode (Item no: 2101G102, Rigaku, Tokyo, Japan) with the flow direction parallel to the scattering vector, at $2\theta/2$. The measuring speed was $0.1^\circ \text{ min}^{-1}$, with divergence Slit = 0.1 mm . Since in transmission mode the sample height equals the XRD beam diameter, sample-dependent peak broadening and thus



crystallite sizes could only be obtained for the rotating in-plane measurements.

Evaluation of the data was performed by Rietveld refinement (BGMN,⁷⁹ Profex interface⁸⁰) with a verified machine line function (Standards NIST 640e and 660c). The lattice parameters of the refined phases calcite, vaterite, gypsum and halite were allowed to be in a range of $\pm 2\%$, the thermal displacement parameter were in the range of $0 \text{ nm} < B < 0.1 \text{ nm}$ and the sample offset was considered in the refinement. The crystallite sizes of the minerals were refined anisotropically and the preferred orientations by spherical harmonic functions ($1 + Y_{40}$ after Järvinen⁸¹) with directional weighting factors w . Not all experiments could be evaluated, due to a lack of sufficient sample volume and thus lack of anisotropical refinement. The comparatively few, weak and broad cellulose reflexes were not considered for refinement.

Cellulose orientation. Evaluation of cellulose orientation was performed by visualisation of the cellulose birefringence *via* polarized light microscopy (RMA 5, Mikroskop Technik Rathenow, Rathenow, Germany, with a λ (525 nm phase shift) retardation plate and Eos 550D, Canon, Tokyo, Japan). Between two crossed polarizers, the dried samples were oriented in the flow direction at 0° , at -45° and $+45^\circ$. The images at the different angles were taken at fixed exposure times and gain for comparability.

3 Results

3.1 Biofilm growth

At all flow rates, the biofilm growth started evenly at the obstacles and spread in the direction of the flow, connecting the obstacles, Fig. 3(b)–(i). From there, the development of a film, which connected the rows perpendicularly was visible and can be seen in Fig. 3(e)–(g) or as a video, see the ESI.† The growth speed at 1.0 mm s^{-1} was visibly slower than at higher flow rates. Independent of the flow rates, when the cells were increasingly filled by biofilm, the images darkened, indicating an increased concentration of BCB. When the flow was reduced by clogging of the setup, the darkening reduced and stagnated.

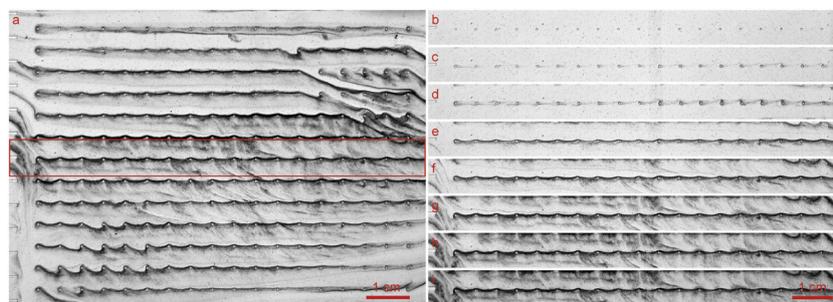


Fig. 3 Grown biofilm of *K. xylinus* in the microfluidic cell growth chamber (see Fig. 2) at a flow rate of 1.0 mm s^{-1} running from left to right. (a) Due to the panoramic viewing window of the optical setup, the biofilm growth around over 230 obstacles could be determined. The inlet channels, whose exits can be seen on the left, regularly allowed an even distribution of the fluid into the growth chamber. (b)–(i) is the cutout highlighted in (a) by a red frame. (b)–(h) Growth at the middle row in time steps of 6 h. Image (h) corresponds to the large image (a) and captures the moment after 36 h of growth when the pressure reached 1 bar and the flow reduces due to the servo loop. Image (i), unchanged from (h), shows the moment 94 h after the flow rate stagnated due to clogging of the setup.

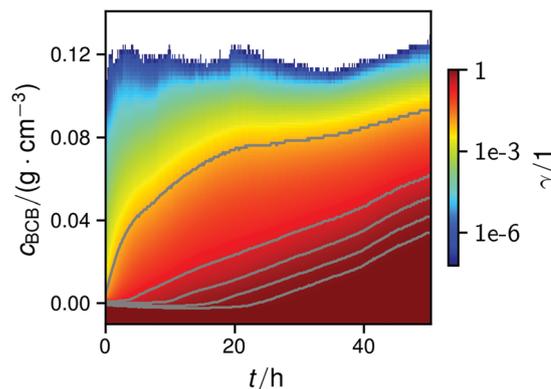


Fig. 4 Map of the normalized cumulative histogram $\gamma(c_{\text{BCB},b},t)$ at a flow rate of 12.5 mm s^{-1} . The gray plotted lines are isolines of $\gamma = 0.01, 0.25, 0.50, 0.75,$ and 0.9 . They were fitted with a bi-logistic function $c_{\text{BCB}}(\gamma,t)$, eqn (4).

Scanning electron micrographs showed that the BCB was built from several paper-like layers parallel to the flow, which were continuously connected by BC fibers. Between the obstacles and in the flow direction, the BCB appears to be thicker with a higher fraction of bacteria, which are roughly estimated at $0.01\text{--}0.1 \text{ ml ml}^{-1}$. At the higher concentrated spots, the thickness of the dried film only reached a few microns. For brevity, these images are shown as the ESI,† Fig. S2 and Fig. S3.

Statistic growth. The distribution of the BCB concentration could be illustrated over time. Fig. 4 shows exemplary which fraction γ of the total area of the microfluidic chamber reached at least a particular concentration c_{BCB} . A closer look at the plotted area fractions shows a bi-logistic growth with the second logistic function starting after the first reached its saturation.

In all conducted experiments, the c_{BCB} of the recorded data did not exceed 0.2 g cm^{-3} which was below the setup saturation. It should be noted, however that data collection always ended before the second logistic function could reach saturation due to clogging of the setup.

By fitting the histogram data with a bi-logistic function (eqn (4)), parameters from Fig. 5 were obtained. The fits'



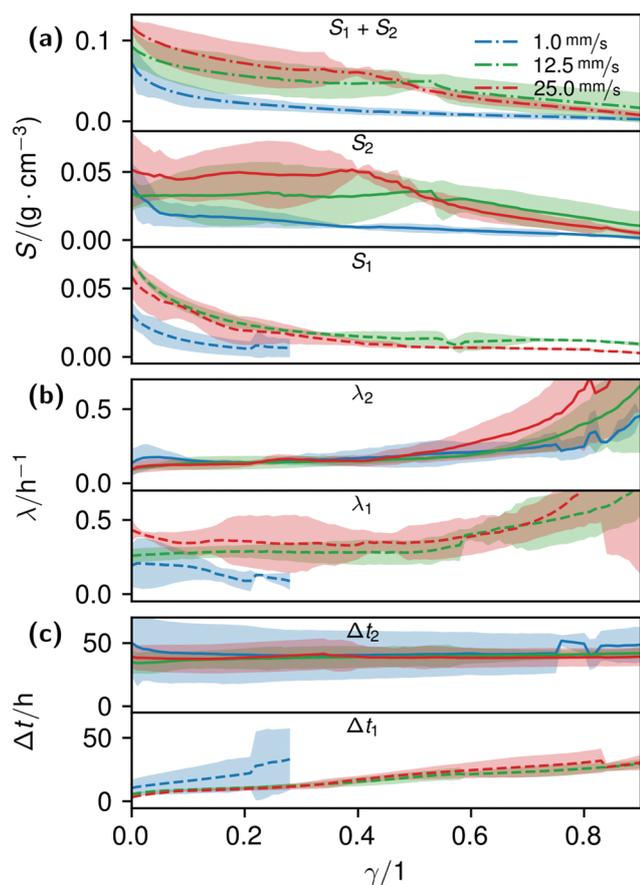


Fig. 5 Plots of the histogram parameters (e.g. Fig. 4) from eqn (4). The plots end when the fitted parameter of at least two of the four conducted measurements reached zero, or unrealistic values. Dashed lines (Index 1) are the parameters of the first term, solid lines (Index 2) of the second term of eqn (4). Dash-dotted lines in (a) represent the cumulative values S of the first and second terms.

uncertainties increase when the data increasingly shows only sections of entire logistic growth curves at high γ .

Cumulative growth. At higher flow rates, the average BCB concentrations of the biofilms rose initially linearly with a slope of $8.7 \pm 2.7 \times 10^{-4} g cm^{-3} h^{-1}$ for $12.5 mm s^{-1}$ and $9 \pm 4 \times 10^{-4} g cm^{-3} h^{-1}$ for $25.0 mm s^{-1}$. At $1.0 mm s^{-1}$, it started slower and slightly accelerated over time, see Fig. 6. A linear regression fit yielded a slope of $24 \pm 9 \times 10^{-5} g cm^{-3} h^{-1}$.

Azimuthal growth. Azimuthal analyses of the obstacles' surroundings are shown in Fig. 7. BCB concentrations initially increased along the flow, with a higher increase rate at higher flow rates, Fig. 7(a). In (b) it can be seen that the concentrations become more and more isotropic with time.

Obstacle growth. In Fig. 8, the BCB spatial concentration profiles around the obstacles, parallel (a) and perpendicular (b) to the flow, are displayed. While the concentration spreads evenly perpendicular to the flow (b), a maximum appears at the flow-facing sides. This effect increases with the flow rate, in particular between $1.0 mm s^{-1}$ and $12.5 mm s^{-1}$.

Cellulose orientation. The orientation of the BC was investigated from the dried BCB textiles by polarized light

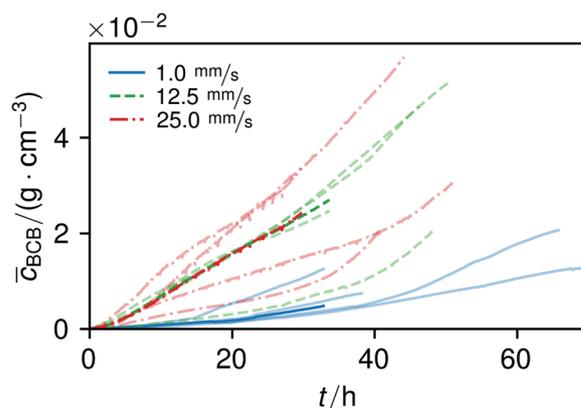


Fig. 6 Increase of the average BCB concentration over time, together with the median of the different flow series. To show the variance of the measurements, the data from the single experiments are overlaid in lighter tones.

microscopy. Fig. 9 shows the birefringence of the cellulose under different angles. According to the Michel-Lévy interference colour chart, the bright regions of the dried analysed sample had a film thickness of $2.5 \pm 1 \mu m$ which is in agreement with the measured thickness at the BCB concentration calibration.

3.2 Flow simulation

The local Reynolds number Re was determined in the CFD simulation for all flow rates. With the results of $Re_{max} = 24$ in the inlet, $Re_{max} = 20$ on the chamber and $Re_{max} = 3.7$ around the obstacles the flow was considered laminar, since all values were below $Re_{Kar} \sim 40$, at which Karman vortices start to appear after cylindrical obstacles.⁸²

Even though the flow was laminar all the time, at higher flow the field at t_0 was no longer perfectly distributed in the growth chamber, see Fig. S7 (ESI[†]). Nevertheless, the wall shear stress τ around parallel obstacles located in the middle of the growth chamber showed a high uniformity at every flow rate (Fig. 11(a)). This also illustrates the spatially resolved flow field, Fig. 10.

3.3 Mineralisation

ACC. To assess the ACC mineralisation method, the formation of a crystalline phase from ACC was analysed *in situ* by mixing 3 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 0.25 M Na_2CO_3 solutions. The development of the main calcite reflex (104) from ACC can be seen in Fig. S8 (ESI[†]) after 1–2 minutes. In parallel, the formation of crystals from the ACC slurry was observed after approximately two minutes. Beneficially for the conducted mineralisations, it emerged that ACC from mixtures where both reagents had a concentration of 3 M required more time to form and crystallise.

Crystallisation. ACC was distributed over the BCB in the growth chamber until no further change in brightness was visible. Then the formation of $CaCO_3$ crystals could be observed. The formation appeared stronger where the ACC was previously more concentrated. However, areas with higher BCB concentration also tend to show increased crystal



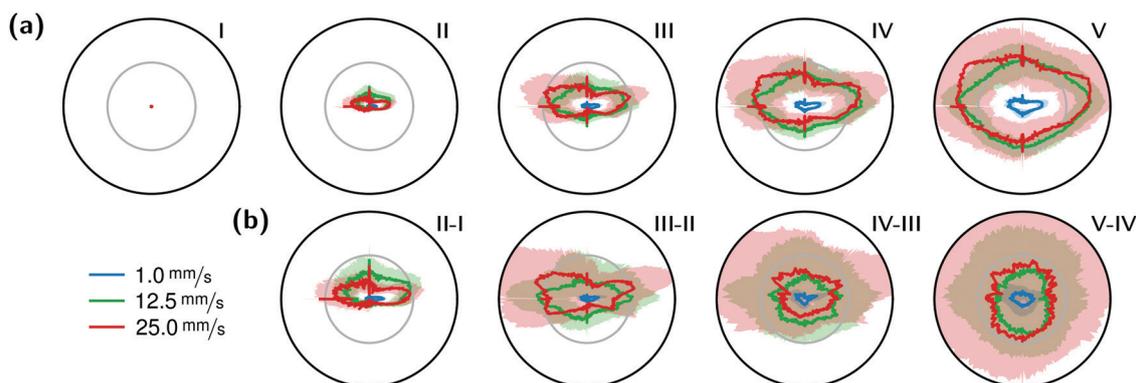


Fig. 7 Azimuthal plots of the obstacles' surroundings with the flow running from left to right in timesteps I–V of 7.5 h, whereby timestep I was 10 minutes after the start. Inner circles in row (a) represent a BCB concentration of 0.02 g cm^{-3} , outer circles 0.04 g cm^{-3} . Row (b) shows the differences between two timesteps from the upper row. Here, the inner circles represent 0.01 g cm^{-3} and the outer circles 0.02 g cm^{-3} .

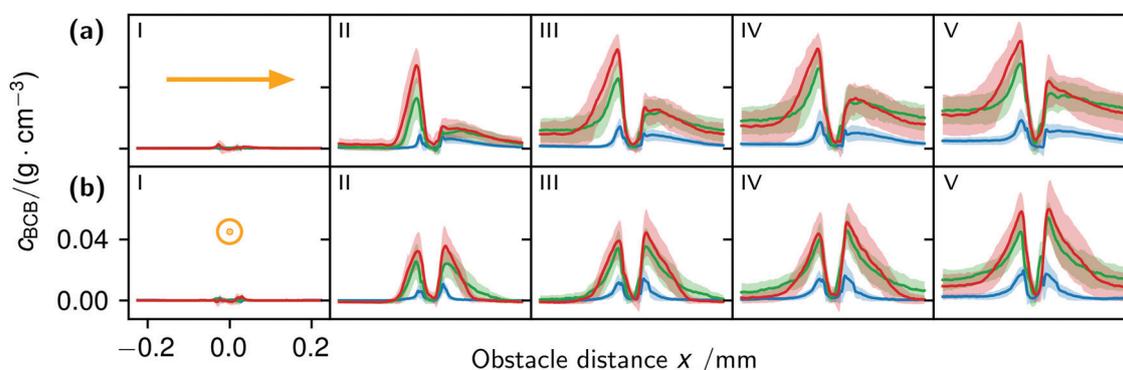


Fig. 8 Profile plots parallel (a) and perpendicular (b) to the flow in timesteps I–V of 7.5 h, where timestep I was 10 minutes after the start. The obstacle center is the x -axis center and fluid flow is indicated by the orange arrows. The blue line represents flow at 1.0 mm s^{-1} , the green line at 12.5 mm s^{-1} and the red line at 25.0 mm s^{-1} .

formation. In areas without BCB, no crystal growth was visible. Micrographs of the dried BCB showed that the crystals were distributed over the entire BCB surface with sizes from $0.1 \mu\text{m}$ to $100 \mu\text{m}$. No formation of aragonite was observed by microscope or XRD. A dependence of the ratio between the two CaCO_3 phases calcite and vaterite due to the different flow rates could not be detected. Nonetheless, the fraction of vaterite and thus the ratio between the phases varied considerably between the experiments. For future evaluation of the variation, the total mass balance between the organic fractions (BC amorphous, BC crystalline; hemicelluloses, bacteria, ...) and the mineral phases would need to be determined, which was not feasible with the current samples.

Gypsum formation, identified by XRD as $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, was observed to be more localised: approximately two minutes after injection, several hundred observable crystals formed. Growth was visibly concentrated on these aggregates which increased their sizes up to half a millimeter. These aggregates consisted of differently sized needles which appeared to have a slightly preferred orientation in the direction of the flow. During drying, the observed number of aggregates and single needle-like crystals smaller than a tenth of a millimeter increased.

Small amounts of halite, residual from the mineralisation reagents were observed, but not further considered.

Micrographs of the dried samples of both mineralisation paths showed that the crystals grew on both the BCB surfaces and between the layers, pressing them apart by being embedded in the BC network. An overview of the SEM images can be seen in the Fig. S4 and S5 (ESI[†]).

Oriented crystallisation. Further evaluation of the inorganic phases from the Rietveld refined data are compiled in Table 2. Notable is the smaller crystallite size L of calcite grown on BCB, grown at 25.0 mm s^{-1} . Gypsum shows a significant difference in the ratio of L and w between the a - and c -axes to the b -axis at all flow rates. In contrast, the w values of calcite and vaterite indicate no significant orientation.

4 Discussion

4.1 Biofilm growth

4.1.1 Dependence on flow rate. A correlation between the flow rate and the increase of the final BCB concentration was demonstrated: by increasing the flow from 1 mm s^{-1} to



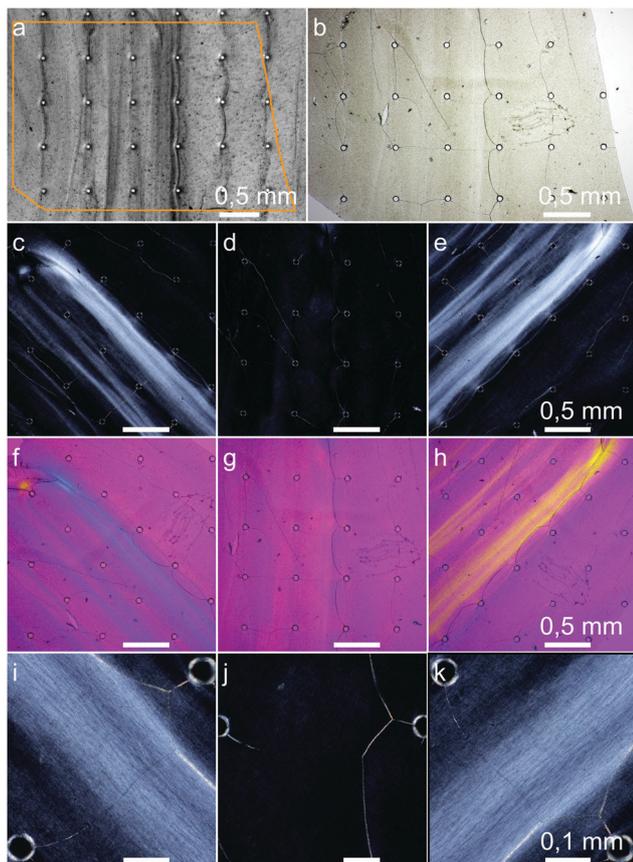


Fig. 9 Micrographs of cellulose structured at a flow velocity of 1.0 mm s^{-1} . (a) shows a clipping of the last image during the growth experiment near the inlet channels. The orange contour marked the piece of the dried cellulose film (b) which was investigated by polarized light microscopy. Images (c), (f), and (i) show the sample oriented at -45° , (e), (h), and (k) by $+45^\circ$ and (d), (g), and (j) by 0° in relation to the polarizers. For images (f), (g), and (h), a λ retardation plate was inserted.

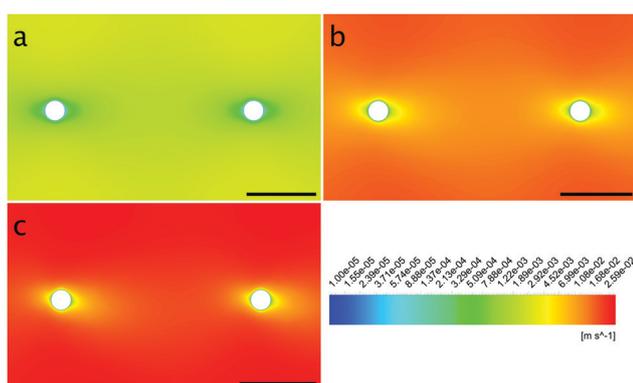


Fig. 10 Contour plots of the obstacles' surroundings at the flow rates 1.0 mm s^{-1} (a), 12.5 mm s^{-1} (b) and 25.0 mm s^{-1} (c) with flow from left to right.

12.5 mm s^{-1} , it was raised by a factor of 3.6. Since no difference in the rate of increase between 12.5 mm s^{-1} and 25 mm s^{-1} was

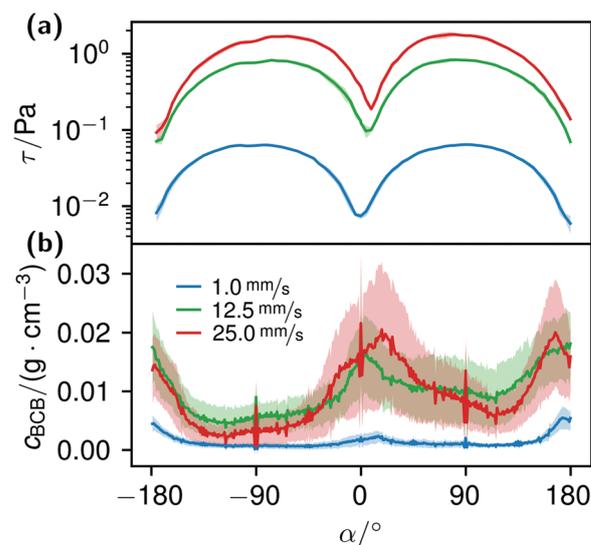


Fig. 11 Image (a) shows the calculated wall shear stress around nine parallel obstacles located in the middle of the microfluidic cell at different flow rates. In image (b) the azimuthal concentration $c_{\text{CCB}}(\alpha)$ around the obstacles, 15 h after the start of the experiments, is pictured. The flow direction was from 0° to $\pm 180^\circ$.

Table 2 Results of the Rietveld refinements. Crystallite size L and w_{\perp} values are from the measurements, measured with Bragg–Brentano geometry. w_{\parallel} values are from the measurements in transmission mode. With the former reflexes from lattice planes perpendicular to the flow, and with the latter, lattice planes in the direction of the flow were measurable. # denotes how many samples per flow rate were available and used to calculate the values. The gypsum crystal size value $L_b \gg 208$ indicates the method's detection limit

Mineral	Flow rate/ (mm s^{-1})	#	(hkl)	L/nm	$w_{\perp}/1$	$w_{\parallel}/1$	
Calcite	1.0	1	(100)	102 ± 3	0.28 ± 0.01	0.36 ± 0.01	
			(001)	99 ± 4	0.44 ± 0.02	0.29 ± 0.01	
	12.5	2	(100)	104 ± 5	0.33 ± 0.01	0.38 ± 0.04	
			(001)	103 ± 7	0.35 ± 0.02	0.24 ± 0.04	
	25.0	3	(100)	54 ± 1	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	
			(001)	50 ± 1	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	
Vaterite	12.5	1	(100)	28 ± 0	0.30 ± 0.00	0.31 ± 0.01	
			(001)	27 ± 0	0.40 ± 0.01	0.37 ± 0.02	
	25.0	3	(100)	23 ± 0	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.01	
			(001)	28 ± 2	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.03	
	Gypsum	1.0	1	(100)	120 ± 7	0.04 ± 0.00	0.57 ± 0.02
				(010)	$\gg 208 \pm 25$	0.87 ± 0.01	0.09 ± 0.00
(001)				123 ± 6	0.09 ± 0.00	0.33 ± 0.01	
12.5		2	(100)	127 ± 14	0.09 ± 0.01	0.47 ± 0.04	
			(010)	141 ± 5	0.79 ± 0.03	0.13 ± 0.01	
25.0		1	(100)	122 ± 20	0.13 ± 0.01	0.40 ± 0.04	
	(001)		87 ± 5	0.07 ± 0.00	0.53 ± 0.02		
25.0	1	(100)	208 ± 7	0.77 ± 0.03	0.05 ± 0.00		
		(001)	116 ± 8	0.15 ± 0.01	0.41 ± 0.01		

observed, it can be assumed that it saturates between 1 mm s^{-1} and 12.5 mm s^{-1} , Fig. 6.

To assess the system's productivity, the total volume of the pumped inoculum should be considered. Hence in the observed section, the productivity was $(1.8 \pm 0.7) \times 10^{-5} \text{ g (l h)}^{-1}$ for 1 mm s^{-1} , $(6 \pm 2) \times 10^{-6} \text{ g (l h)}^{-1}$ for 12.5 mm s^{-1} and $(3 \pm 1) \times 10^{-6} \text{ g (l h)}^{-1}$



for 25.0 mm s^{-1} . These productivities may be low, compared to the values Campano *et al.* reviewed in their Table 3.⁸³ However, our productivity only represents biomass from the viewing window and not from the whole setup, including the reservoir.

The interesting information from these values, which decrease with higher flow rates is another: they show that the concentration increase rate at higher flow rates is not explicable by a better nutrient or oxygen supply due to the higher agitation. Literature reports confirm that agitated bacteria cultures in general do not necessarily show a better performance than static ones.^{84,85} A higher biomass production follows from lower velocities, as Krsmanovic *et al.* reviewed.⁸⁶ This effect can also be observed in microfluidic systems.⁴⁵ Considering the production of BCB, Liu *et al.* found that the cell viability of *K. xylinus* was clearly increased by agitating. But the data also shows that even low agitation reduced the BCB production. Thus, referring to the BCB yield per cell, the agitation had a strong disadvantageous effect.⁸⁷ For aligned BCB, Luo *et al.* found similar results, with an observed biomass reduction from around 38 mg ml^{-1} to 24 mg ml^{-1} at flow rates of 30 mm s^{-1} and 150 mm s^{-1} (and around 55 mg ml^{-1} for the static reference).³⁷ The reason for this observation is rather not a genetic mechanosensing, but a prolonged lag-phase due to washout of biofilm substances.^{44,49}

4.1.2 Network formation. Interestingly, despite the significantly higher volume-dependent productivity of the 1 mm s^{-1} in our experiments, we partly observed a shorter lag phase, a higher growth constant and a higher concentration for the higher velocities as shown in Fig. 5. How does this fit together? An explanation for the observed flow dependence is that with an increasing flow rate, more bacteria attached to the obstacles' sides facing the incoming flow, resulting in an overall higher BCB production. Fig. 8 confirms this hypothesis, since the flow-facing side shows a significantly higher concentration which increases with the flow rate. We propose a mechanism as follows.

K. xylinus, which can be considered non-motile when floating freely, in principle, is not influenced by flow, except for a rotary type of stroke.^{51,52} Hence, it 'goes with the flow'. When the flow hits an obstacle, bacteria adhere to the obstacle. Once adhered, the bacterial BC then facilitates the attachment of further bacteria, leading to their rapid accumulation. The calculated shear stress at the obstacles, Fig. 11(a), supports this idea: with a maximum wall shear stress around 2 Pa for 25.0 mm s^{-1} perpendicular to the flow direction and a ten times lower minimum at the flow facing direction, we assume that the bacteria withstand the shear force at the flow-facing side. Although we could not find data about the specific adhesion force of *K. xylinus* to PDMS, it is likely that the critical shear stress, at which attachment and detachment are in balance, is not smaller by orders of magnitudes to *P. aeruginosa* with $1.1 \pm 0.2 \text{ Pa}$, due to their similar shapes and sizes.⁸⁸ The work of Chaen *et al.* supports this by demonstrating BCB structuring, formed at an estimated 1 Pa with *G. hansenii*. In our experiments, it can be assumed that the adhesion is even higher: *K. xylinus* seems to be more difficult to wash off polar surfaces such as PDMS due to microbial cellulose

hydrogen bond attachment.^{89,90} And additionally, if *K. xylinus* already extruded fibers, we assume that they further enhance adhesion, making it more difficult to detach.

The correlation of the minima and maxima in Fig. 11(a) and (b) indicates that *K. xylinus* started to form its biofilm with its origin in the areas that were protected from shear forces.⁸⁵ Hence *K. xylinus* initially attached to the obstacles' flow-facing sides, from where it excreted BCB, whereby the amount of initial bacteria depended on the flow speed, see sketch Fig. 12, left hand side. Extruded BCB then elongated with the flow, embracing the obstacles (Fig. 8(b) (II)) and forming an obstacle-to-obstacle network in the direction of the flow, Fig. 3(b)–(e) and sketch Fig. 12 center image. While for higher flow rates, the median BCB concentration is equal in front of and behind the obstacles (Fig. 7(a)), the spatial distribution has a maximum on the flow-facing side as already illustrated for all flow rates, Fig. 8(a). After the BCB streamers connected after about 10 h, this maximum value does not increase further. Rather, the obstacle-to-obstacle concentration rose, building a highly concentrated network in the direction of the flow, with an increasingly harmonised concentration distribution. All tested flow rates resulted in a distinct obstacle-to-obstacle network. At higher flow, the network was more highly concentrated. This concentration rise can be attributed to a better nutrient supply of the consisting network due to the higher dynamic pressure.

The initial bilateral flow-dependent concentration distributions became weaker with time, as Fig. 7(b) indicates. It changed from being aligned with the flow, to more uniform with and lateral to the flow. The lateral spreading of the BCB can also be observed with its spatial concentration profile in Fig. 8(b). Looking at the single strands, the spreading initially occurs unilaterally and becomes uniform after the strands connected. Fig. 8(b) indicates that when facing the flow, statistically the concentration distribution is slightly shifted to the right. But sometimes, it also occurred left-sided, as it can be seen with the spreading of the BCB in Fig. 3(e)–(g). We speculate that with time, the biofilm also grew in the microfluidic inlet. This caused minimal pressure differences between the grown strands due to different inlet flows. Under perfect initial conditions, the resulting cross flow in principle occurs randomly. But in CFD simulations, the used microfluidic cell already shows a very slight initial cross flow at 12.5 mm s^{-1} and 25 mm s^{-1} due to a short inlet channel (Fig. S7, ESI[†]). It is likely that the observed slight right-handed concentration distribution (Fig. 8(b)) can be contributed to a unilateral biofilm growth in the microfluidic inlet, caused by the initial cross flow. However, since the network concentration equalized with time, this probably had no effect on the final network. Its total concentration distribution becomes more and more uniform and a connected network with higher concentrated regions along the obstacles forms, see sketch Fig. 12, right image.

The angular changes of the total concentration from directional to uniform were visible after a similar growth duration at all tested flow rates with a minimal delay at 1 mm s^{-1} . This becomes visible in Fig. 7(b) IV–III and V–IV and is called the second growth phase in the following, being distinguishable from the first logistic growth phase, Fig. 4. In summary, the growth can be described in two sequential processes: first, the



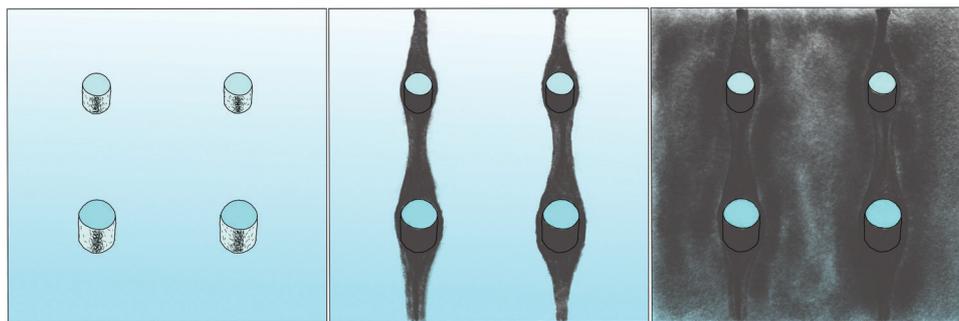


Fig. 12 Sketch of the BCB network formation around the PDMS obstacles with the initial bacteria accumulation (left), the first growth phase (middle) and the second growth phase (right). In this sketch, the flow comes from below.

interconnection of the obstacles in the direction of the flow and second, their connection with a general increase of the concentration over the whole biofilm.

The formation of the flow-aligned obstacle-to-obstacle network in the first phase can also be observed in the statistic growth data, as dashed lines in Fig. 5. Since the main concentration is located in the direction of the flow between the obstacles (Fig. 3) and the area of these interspaces equals $\gamma \approx 0.1$, it further can be assumed that the region of the first growth phase below $\gamma = 0.2$ in Fig. 5 mainly represents the obstacle-to-obstacle growth. That the relevant values of S_1 are mostly in this region fits this assumption. On the basis of the fitted parameters (Fig. 5), the forming of this network becomes traceable: a higher flow rate enhanced the growth constant, the final concentration and shortens the time-point of the inflection. We assume that the former change is due to an ongoing and flow dependent catching of floating bacteria similar to the “fishing-line” observation of Marty *et al.*⁹¹ The change of the latter two started to saturate with a higher flow. On the one hand, in contrast to the second growth phase, nutrients could reach easily the inner of the relatively small strands, while a higher dynamic pressure did not enhance the final concentration by the increased fluent exchange. On the other hand, the inflection time-point stops decreasing. It appears that the lag-phase became the speed-determining step, indicating that influences such as the nutrient resorption of the bacteria and other influences dominated.

The overall increase in concentration at the flow rates 12.5 mm s^{-1} and 25 mm s^{-1} in both phases was quite similar in their main grow directions (first phase with the flow; second phase uniformly) and mostly in a range between 0.005 and 0.01 g cm^{-3} in 7.5 h , see Fig. 7(b). At 1.0 mm s^{-1} it was around 0.001 g cm^{-3} in the same time-step. Interestingly, the growth constant of the second growth phase is widely the same for all flow rates, Fig. 5. Different from the “fishing-line” effect in the first phase, in the second growth phase the catching of bacteria seemed no longer to be the dominant mechanism. Rather, an equilibrium was reached at every flow rate, resulting in a growth constant which stayed stable and can be seen as the real growth constant for biofilm with the given culturing parameters. Because on the one hand, by a higher shear stress, more bacteria were embedded in the existing biofilm. On the

other hand, there were more high-shear regions, where bacteria and biofilm substances could no longer adhere or become detached. We assume that these high-shear regions arose from a smaller available volume, due to the increasing filling of the microfluidic cell. This is different from the observation by Drescher *et al.*, who consistently saw a more rapid clogging with higher flow rates.⁴⁵ By contrast to the present work, their setup was pressure-, and not flow-controlled, resulting in a defined maximum flow rate and therefore in a maximum shear stress the biofilms have to endure.

4.1.3 Statistic growth. As already mentioned, the BCB growth in the microfluidic chamber is characterised by two logistic growth phases. Fig. 5 shows the fitted parameters of the bi-logistic function, eqn (4). As already stated, the first phase can be related to the growth of the obstacle-to-obstacle BCB strands, whereas the second phase is related to the strands' connection. However, that they are clearly distinguishable in the statistic growth (Fig. 5), is due to their saturation. This saturation, in turn, was mainly triggered by a lack of space on which *K. xylinus* biofilm can spread. Presumably because of the comparatively thin microfluidic cell ($50 \mu\text{m}$), the BCB concentration reached levels where the nutrient supply decreased and thus the BCB concentrations leveled out. With a higher flow rate and the resulting higher dynamic pressure, this supply could be longer preserved by an elevated fluent exchange, leading to a higher total concentration $S_1 + S_2$, Fig. 5(a). In total, $S_1 + S_2$ can be interpreted as the concentration distribution over the observed area. It illustrates that the obtained BCB gel showed regions of different densities, similar to the biofilm of Hassanpourfard *et al.*^{54,55} Their observed ‘stick-slip’ behavior was not observable in our experiment, since the viscoelasticity of their EPS strongly differs from a web of bacterial cellulose. After drying, the different densities resulted in inhomogeneous film thickness. The thickness shrank by a factor of 10 to 30.

The average BCB concentration increase \bar{c} is nearly the same for 12.5 mm s^{-1} and 25 mm s^{-1} , Fig. 6. Since a higher flow rate does increase the total concentration over a broad range as in Fig. 5(a), the final average BCB concentrations will differ: Fig. 6 only shows the increase until the setup clogged. The end of this BCB gel redensification was only observable for two of the 1 mm s^{-1} flow rate experiments after approximately 60–70 h. Since the S_2 values in Fig. 5 are extrapolated by obtaining the



best fit, it is to be expected that all \bar{c} saturate. The appearing linear increase in Fig. 6 thus was the superposition of both growth phases. In the end, the saturated \bar{c} of 25 mm s^{-1} then will be higher than that of 12.5 mm s^{-1} . Moreover, the time-point of the saturations can be estimated. Since Δt_2 is very similar for all flow rates, and in the region of approximately 40 h, the observed 60–70 h are likely for all flow rates.

The median of the second phases' inflection points Δt_2 and growth constants λ_2 changed only insignificantly. It shows, as already stated, that the growth in the second phase was mainly independent of effects like an increased and continuous aggregation of bacteria. It should be noted that due to the increasingly shorter isolines at higher γ , in particular the uncertainty of λ strongly rose, making its interpretation difficult.

4.1.4 Hierarchical structure. That BC fibers can be aligned by growing in flow was observed in several experiments.^{36,37} The principal mechanism behind the alignment was the subject of several studies: Stoodley *et al.* observed that ellipsoidal bacteria, which *K. xylinus* belongs to, align with the flow within their streamers.⁵⁰ Furthermore, Holm *et al.* confirmed the intuitive assumption that fibers also align with the flow as largely correct. Although short fibers near the wall tend to orient perpendicular to the flow direction, the longer they become, the more they swim with the flow.^{92,93} Additional to this orientation of the BC fibers, for *K. xylinus* there is also the fact that already deposited cellulose strands serve as templates for further depositions.^{16,26}

Our experiments showed rheotactically aligned BC already at the lowest flow rate of 1 mm s^{-1} , Fig. 9. In images (c)–(k), the birefringence of the long optical axis in the direction of the (001) planes of the highly crystalline bacterial cellulose can be seen. Since the birefringence is strongest visible at $\pm 45^\circ$ between the flow direction and the crossed microscope polarizers, the fibers which are elongated along the (001) planes were aligned in the direction of the flow. The fact that also higher concentrated regions are outside of the highly concentrated obstacle-to-obstacle strands shows that the majority of the bacterial cellulose was flow-aligned. On closer inspection, the crystalline birefringent regions of the aligned fibers can even be seen in Fig. 9(i), (k) with an approximated mean length of about $10 \mu\text{m}$.

Besides the alignment, Chae *et al.* found, in their flow-driven alignment experiment with the BCB producing *G. hansenii*, an additional structural characteristic: in contrast to other alignment methods like BC stretching, the BC chains showed parallel packing. This results in macroscopic net dipoles *via* the alignment from the fibers' reducing end to their non-reducing end.³⁸ We assume it is possible that the current flow driven alignment approach results in the same packing and that the hierarchical structure features persist even more distinct from the molecular to the macroscopic level by rheotactic structuring compared to other structuring approaches.

4.2 Mineralisation

To obtain a composite material with structured BCB as the substrate, we performed two quasi *in situ* mineralisations.

In the gypsum mineralisation, flower-like gypsum aggregates occurred. Nissinen *et al.* and Nindiyasari *et al.*^{76,94} demonstrated gypsum/cellulose composites with mineralisation from hemihydrate or supersaturated $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{SO}_4$ solutions. The reason for the more uniform crystal distribution and size by Nissinen *et al.* can be seen in the used cellulose substrate. While Nissinen *et al.* used a cast cellulosic film, bacterial cellulose consists of ribbon-shaped cellulosic nanofibers with a width of 40–60 nm.²⁵ Cellulose in general can be seen as supportive for gypsum precipitation,⁹⁴ but the anhydride formed from the supersaturated solution requires water for the hydration steps over bassanite to the final $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.⁹⁵ Water-soaked cellulose can supply an anhydrid nuclei. If the water release decreases, due to a decreasing size of the fibers, the formation of nuclei becomes more unlikely,⁹⁴ resulting in a degraded and more heterogeneous crystal distribution.

To determine whether the anisotropic structure of the substrate affects the orientation of the crystals, we performed two different XRD measurements: measurements with Bragg–Brentano geometry and applied spin, to discriminate texture within or out of the sample plane (w_\perp). With measurements in transmission mode, textures along the sample plane in the direction of the flow are determinable (w_\parallel). Gypsum refined XRD data show that L and w_\perp in the direction of the (010) planes are increased against (100) and (001). The (001) planes show the same effect against the (100) planes to a lesser extent, Table 2. Thus the data indicate the texture in two directions: first, the (010) plane of the gypsum crystals, laid parallel to the BC film. This can also be seen in Fig. S5(b)–(d), ESI† where the acerous morphology has a distinct and visible tabular fraction largely facing the observer. We assume that this favored orientation normal to the BCB surface is due to the strong BCB shrinkage, since XRD measurements are obtained after drying. The gypsum crystals were probably twisted by the shrinking in a way that the biggest surface ((010) plane) finally lay between the BC layers, reducing the fibers' tensions. A slight decrease of this anisotropy with a higher flow rate and thus a higher concentration is explainable by better embedding, reducing the twisting of the crystals. Second, since w_\parallel of the (100) plane is slightly more distinctive than the (001) plane, slight orientation of the crystals in the direction of the flow is indicated. This orientation is probably caused by heterogeneous nucleation. Some of these crystals then formed large aggregates, which overall showed a slight statistic orientation with the flow, Fig. S5(a), (ESI†). The observed aggregates do not correspond to the determined L values. Since the XRD data represent the whole samples and SEM images are limited to the samples' surfaces, further evaluation of the interlayer BC structure, which is out of the scope of this work, might resolve the missing correspondence.

The stable ACC suspension was well distributed over the samples, resulting in a good final distribution of CaCO_3 with small crystallites embedded in the BCB. Since the directional w does not differ significantly from 0.33, the growth of the obtained CaCO_3 phases calcite and vaterite seemed to be isotropic and not affected by the aligned BCB substrate, Table 2. However, the mean crystallite size L of calcite was probably influenced, reducing to



half at a flow rate of 25 mm s^{-1} . Due to the lack of repeating measurements for the lower flow rates, this value has some scope for interpretation. But, an influence on L caused by the higher BCB concentration in areas $\gamma < 0.5$ is quite possible, since with a larger surface, more heterogeneous nucleation can take place.

We processed a one precursor mineralisation of the BCB samples, immediately after growth in the same setting. This quasi *in situ* mineralisation route, based on liquid impregnation,⁷² provides – besides its simplicity – advantages by comparison to other *in situ* or *in vitro* routes. Regarding the former, the growth process and thus BC properties such as crystallinity are not affected by mineralisation ingredients and can be conducted at optimal process parameters.⁵⁹ The latter on the other hand brings along some difficulties by transferring fragile samples into a new vessel where mineralisation can be performed, *e.g.* by a diffusion based⁶⁸ or time-consuming gas diffusion based mineralisation.^{68,96,97} The one-precursor method further was beneficial, since in our setup already minimal rinsing between the reagents prohibited the precipitation and a double diffusion method applied by Grassmann *et al.*⁹⁸ was rather inapplicable.

In conclusion, the slight effect of the anisotropic substrate on gypsum crystallisation seems promising for the production of a phase overlapping hierarchical engineering material. Even though gypsum had some limitations, other acerous minerals such as montmorillonite could overcome the insufficient distribution. However, due to its good distribution and embedment, the CaCO_3 route seems promising to create a biomimetic organic/inorganic composite. An interesting work was conducted by Yu *et al.* where a BC composite with tunable toughness was produced.⁹⁹ It is quite imaginable to apply the presented process with pre-aligned BCB as a substrate in a quasi *in situ* route. Indeed, fabrication steps like purification by boiling with sodium hydroxide, or blending of the BCB must be adapted. But even if bacteria remain after adaption in the composite similar to our experiments, they can induce interesting properties such as improved absorption capacity or higher maximum tensile/compressive strength.¹⁰⁰

4.3 Experimental setup

In principle, three types of biofilm reactors are suited for the targeted rheotactical cultivation of biofilm streamers.¹⁰¹ Rotational reactors, where either the inoculum or the sample is in rotation to produce a flow,^{36,37} or loop type reactor, where the reactor is fixed and constantly flushed by medium or inoculum. While the former two are mostly used to produce biofilms in large quantities, the latter method is suitable to evaluate biofilms during growth.^{15,44–46} Besides a better possibility to maintain axenic conditions, the loop type setup enables the use of flow- or pressure driven material synthesis. Since in open or rotational reactors, the inoculum primarily flows on top of the grown BCB, tracing increases in concentration to flow rates, as in this work, is not feasible.

The main limitation of the loop setup is the limited space of the reactor (in this work the microfluidic cell). In our experiments, the saturation occurred due to this limitation. While in other reactors, it can be expected that different growth

parameters will be obtained, since especially the way of nutrient supply differs by the higher degree of freedom of the medium/inoculum flow, an eventual saturation is inevitable. And, if the structuring element where the BCB grows is similar to the obstacle pattern used in this work, a two phase growth will probably also arise. Hence, for obstacle-induced growth, where a defined microbial streamer shall form a cohesive streamer network, our results give an appropriate basis that can be adapted to produce structured material with loop type reactors, but also with rotational reactors.^{36,37} To summarise, with our loop type reactor with a panorama view observation setup, we were able to observe the formation of the BCB network and spatial streamers simultaneously. To our best knowledge, investigation about the formation of larger bacterial streamer networks, in particular BCB streamer networks are not available. Thus, the flow-influenced formation of two hierarchical levels could be observed directly, knowing that also the subjacent levels like the direction of the cellulose fibers and ribbons are aligned by the flow, as apparent in Fig. 9.

Our method is suitable to measure the BCB concentration profile over the grown network *via* the Lambert–Beer equation in a dynamic range of 1 : 932. Even after several days of growth, the optical examination did not reach its saturation. Besides the attenuation of the light by BCB, a slight (focused) shadowgraph effect was visible at the thin edges between BCB and the surrounding inoculum (*e.g.* visible in Fig. 3(f) at the spreading BCB edge). This effect was caused by different refractive indexes of the inoculum and the BCB and the resulting refractive gradient.¹⁰² On the one hand, this effect resulted in a minimal and spatial finite overestimation of low measured BCB concentrations, but on the other hand the advantage is that the boundary layers become more visible. By including negative attenuation, our evaluation of the growth data was not affected by this focused shadowgraphy effect. Furthermore, at high refractive gradient edges caused by a higher BCB concentration, the effect largely disappeared, since the light attenuation of the BCB reduced the amount of deflected light.

Since the attenuation coefficient of BCB is relatively high compared to other EPS, the manner observation was sufficient. But, when growing biofilm streamers consisting of other bacteria and EPS, the sensitivity of the EPS detection and thus the determination of the concentration could become an issue, when the attenuation coefficient is lower. Here, the focused shadowgraphy or even better the schlieren techniques could play a major role in the sensitivity enhancement. Simply inserting a knife edge in the optional optical filter ((9) in Fig. 1) with a cutoff of 80% would intensify the refractive gradient edge by a factor of 5. Changing the lens to $f = 500 \text{ mm}$ would enhance the factor with the same cutoff to 25.¹⁰³

5 Outlook

We investigated the rheotactically formation of a bacterial cellulose network consisting of several single bacterial streamers. The formation could be separated into two logistic growth phases. The first was the strain formation between



the streamers in the direction of the flow. In the second phase, the grown strains connected, building a hierarchically structured BCB network with flow-aligned BC fibers. The first phase was dependent on the flow rate, since a higher flow provided the streamers with more bacteria. In the second phase, a higher flow with its higher dynamic pressure resulted in a higher final BCB concentration. These findings may form the basis for an upscaled material production of anisotropic cellulose substrates. With the flow rate and design of the flow reactor the concentration and distribution of the aligned BCB in the strands and in the whole material can be adjusted. A BCB-material interwoven with tailored BCB-strands can then be adapted to meet specific mechanical requirements.

We also conducted a quasi *in situ* mineralisation route to trace crystal growth in the hierarchically organised BCB. With ACC and a supersaturated CaSO₄ solution, mineral deposition was obtained. CaCO₃ thereby showed a more uniform distribution than gypsum. However, with the deposition of the needle shaped gypsum crystals, the anisotropic substrate features could be continued from the organic to the inorganic phase. It is quite conceivable that other minerals *e.g.* from the group of montmorillonite, or a biomineralisation path are sufficient for anisotropic hierarchical structured composites. These results illustrate that an evenly distributed mineral phase is attainable. This, in turn, can be utilised to tune the mechanical properties of bio-mimetic hierarchically structured BCB-mineral composite materials. Future applications of the obtained materials thereby could be manifold: in addition to obtaining tough materials, tailor-made surfaces for use as catalysis carriers, for defined adsorption tasks, or as a stationary phase in separating columns are also conceivable.

Author contributions

Moritz Klotz: data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, visualization, writing – original draft. Dardan Bajrami: software (CFD), formal analysis (CFD). Daniel Van Opdenbosch: conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, writing – review & editing.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank the German Science Foundation (DFG) for funding our research *via* grant VA 1349/5.

References

- 1 P. Fratzl and R. Weinkamer, Nature's hierarchical materials, *Prog. Mater. Sci.*, 2007, **52**(8), 1263–1334.
- 2 C. Mattheck and I. Tesari, The mechanical self-optimisation of trees, *WIT Trans. Ecol. Environ.*, 2004, **73**, 10.
- 3 A. Öchsner, W. Ahmed, J. Fish and T. Belytschko, *Biomechanics of Hard Tissues*, Wiley Online Library, 2011.
- 4 G. E. Fantner, E. Oroudjev, G. Schitter, L. S. Golde, P. Thurner, M. M. Finch, P. Turner, T. Gutschmann, D. E. Morse and H. Hansma, *et al.*, Sacrificial bonds and hidden length: Unraveling molecular mesostructures in tough materials, *Biophys. J.*, 2006, **90**(4), 1411–1418.
- 5 P. Greil, T. Lifka and A. Kaindl, Biomorphic cellular silicon carbide ceramics from wood: I. processing and microstructure, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 1998, **18**(14), 1961–1973.
- 6 D. Van Opdenbosch, M. Thielen, R. Seidel, G. Fritz-Popovski, T. Fey, O. Paris, T. Speck and C. Zollfrank, The pomelo peel and derived nanoscale-precision gradient silica foams, *Bioinspired, Biomimetic Nanobiomater.*, 2012, **1**(2), 117–122.
- 7 G. Fritz-Popovski, R. Morak, T. Schöberl, D. Van Opdenbosch, C. Zollfrank and O. Paris, Pore characteristics and mechanical properties of silica templated by wood, *Bioinspired, Biomimetic Nanobiomater.*, 2014, **3**(3), 160–168.
- 8 D. Van Opdenbosch, G. Fritz-Popovski, W. Wagermaier, O. Paris and C. Zollfrank, Moisture-driven ceramic bilayer actuators from a biotemplating approach, *Adv. Mater.*, 2016, **28**(26), 5235–5240.
- 9 H. Imai, Self-organized formation of hierarchical structures, in *Biomineralization I*, Springer, 2006, pp. 43–72.
- 10 S. Deuerling, S. Kugler, M. Klotz, C. Zollfrank and D. Van Opdenbosch, A perspective on bio-mediated material structuring, *Adv. Mater.*, 2018, **30**(19), 1703656.
- 11 D.-P. Häder, Wie orientieren sich Cyanobakterien im Licht, *Biol. Unserer Zeit*, 1984, **14**(3), 78–83.
- 12 J. Arlt, V. A. Martinez, A. Dawson, T. Pilizota and W. C. Poon, Painting with light-powered bacteria, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1–7.
- 13 M. Klotz, S. Deuerling, S. Kugler, C. Zollfrank and D. Van Opdenbosch, light-diffractive patterning of porphyridium purpureum, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2020, 22–34.
- 14 X.-X. Wang, L. Xie and R. Wang, Biological fabrication of nacreous coating on titanium dental implant, *Biomaterials*, 2005, **26**(31), 6229–6232.
- 15 R. Rusconi, S. Lecuyer, N. Autrusson, L. Guglielmini and H. A. Stone, Secondary flow as a mechanism for the formation of biofilm streamers, *Biophys. J.*, 2011, **100**(6), 1392–1399.
- 16 Y. Uraki, J. Nemoto, H. Otsuka, Y. Tamai, J. Sugiyama, T. Kishimoto, M. Ubukata, H. Yabu, M. Tanaka and M. Shimomura, Honeycomb-like architecture produced by living bacteria, *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydr. Polym.*, 2007, **69**(1), 1–6.
- 17 N. Oxman, J. Laucks, M. Kayser, J. Duro-Royo and C. Gonzales-Urbe, Silk pavilion: a case study in fiber-based digital fabrication, in *FABRICATE Conference Proceedings*, ta Verla, 2014, 248–255.
- 18 J. Loehr, D. Pfeiffer, D. Schüller and T. M. Fischer, Magnetic guidance of the magnetotactic bacterium *magnetospirillum gryphiswaldense*, *Soft Matter*, 2016, **12**(15), 3631–3635.
- 19 C. Pierce, E. Mumper, E. Brown, J. Brangham, B. Lower, S. Lower, F. Yang and R. Sooryakumar, Tuning bacterial



- hydrodynamics with magnetic fields, *Phys. Rev. E*, 2017, **95**(6), 062612.
- 20 E. Bonabeau, G. Theraulaz, J.-L. Deneubourg, S. Aron and S. Camazine, Selforganization in social insects, *Trends Ecol. Evol.*, 1997, **12**(5), 188–193.
- 21 Z. Lewandowski and H. Beyenal, *Fundamentals of Biofilm Research*, CRC press, 2013.
- 22 I. Dogsa, M. Kriechbaum, D. Stopar and P. Laggnier, Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS, *Biophys. J.*, 2005, **89**(4), 2711–2720.
- 23 T. Coviello, W. Burchard, E. Geissler and D. Maier, Static and dynamic light scattering by a thermoreversible gel from *Rhizobium leguminosarum* 8002 exopolysaccharide, *Macromolecules*, 1997, **30**(7), 2008–2015.
- 24 S. Koizumi, Y. Tomita, T. Kondo and T. Hashimoto, What factors determine hierarchical structure of microbial cellulose -interplay among physics, chemistry and biology, in *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, 2009, vol. 279, 1, pp. 110–118.
- 25 P. Zugenmaier, *Crystalline cellulose and derivatives: characterization and structures*, Berlin Heidelberg, Springer, 2008.
- 26 T. Kondo and W. Kasai, Autonomous bottom-up fabrication of three-dimensional nano/microcellulose honeycomb structures, directed by bacterial nanobuilder, *J. Biosci. Bioeng.*, 2014, **118**(4), 482–487.
- 27 T. Kondo, M. Nojiri, Y. Hishikawa, E. Togawa, D. Romanovicz and R. M. Brown, Biodirected epitaxial nanodeposition of polymers on oriented macromolecular templates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**(22), 14008–14013.
- 28 A. Nagashima, T. Tsuji and T. Kondo, A uniaxially oriented nanofibrous cellulose scaffold from pellicles produced by *Gluconacetobacter xylinus* in dissolved oxygen culture, *Carbohydr. Polym.*, 2016, **135**, 215–224.
- 29 A. Putra, A. Kakugo, H. Furukawa, J. P. Gong, Y. Osada, T. Uemura and M. Yamamoto, Production of bacterial cellulose with well oriented fibril on PDMS substrate, *Polym. J.*, 2008, **40**(2), 137–142.
- 30 S. Zang, Z. Sun, K. Liu, G. Wang, R. Zhang, B. Liu and G. Yang, Ordered manufactured bacterial cellulose as biomaterial of tissue engineering, *Mater. Lett.*, 2014, **128**, 314–318.
- 31 J. Yang, L. Wang, W. Zhang, Z. Sun, Y. Li, M. Yang, D. Zeng, B. Peng, W. Zheng and X. Jiang, *et al.*, Reverse reconstruction and bioprinting of bacterial cellulose-based functional total intervertebral disc for therapeutic implantation, *Small*, 2018, **14**(7), 1702582.
- 32 A. Putra, A. Kakugo, H. Furukawa, J. P. Gong and Y. Osada, Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface, *Polymer*, 2008, **49**(7), 1885–1891.
- 33 A. Putra, A. Kakugo, H. Furukawa and J. P. Gong, Orientated bacterial cellulose culture controlled by liquid substrate of silicone oil with different viscosity and thickness, *Polym. J.*, 2009, **41**(9), 764–770.
- 34 M. B. Sano, A. D. Rojas, P. Gatenholm and R. V. Davalos, Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers, *Ann. Biomed. Eng.*, 2010, **38**(8), 2475–2484.
- 35 M. Liu, C. Zhong, X. Zheng, L. Ye, T. Wan and S. R. Jia, Oriented bacterial cellulose/glass fiber nanocomposites with enhanced tensile strength through electric field, *Fibers Polym.*, 2017, **18**(7), 1408–1412.
- 36 Y. Wan, D. Hu, G. Xiong, D. Li, R. Guo and H. Luo, Directional fluid induced self-assembly of oriented bacterial cellulose nanofibers for potential biomimetic tissue engineering scaffolds, *Mater. Chem. Phys.*, 2015, **149**, 7–11.
- 37 H. Luo, W. Li, Z. Yang, H. Ao, G. Xiong, Y. Zhu, J. Tu and Y. Wan, Preparation of oriented bacterial cellulose nanofibers by flowing medium-assisted biosynthesis and influence of flowing velocity, *J. Polym. Eng.*, 2018, **38**(3), 299–305.
- 38 I. Chae, S. M. Bokhari, X. Chen, R. Zu, K. Liu, A. Borhan, V. Gopalan, J. M. Catchmark and S. H. Kim, Shear-induced unidirectional deposition of bacterial cellulose microfibrils using rising bubble stream cultivation, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **255**, 117328.
- 39 S. Das and A. Kumar, Formation and post-formation dynamics of bacterial biofilm streamers as highly viscous liquid jets, *Sci. Rep.*, 2014, **4**(1), 1–6.
- 40 A. Persat, C. D. Nadell, M. K. Kim, F. Ingremeau, A. Siryaporn, K. Drescher, N. S. Wingreen, B. L. Bassler, Z. Gitai and H. A. Stone, The mechanical world of bacteria, *Cell*, 2015, **161**(5), 988–997.
- 41 A. Karimi, D. Karig, A. Kumar and A. Ardekani, Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: Review of microfluidic methods, *Lab Chip*, 2015, **15**(1), 23–42.
- 42 Y. Yawata, J. Nguyen, R. Stocker and R. Rusconi, Microfluidic studies of biofilm formation in dynamic environments, *J. Bacteriol.*, 2016, **198**(19), 2589–2595.
- 43 M. G. Mazza, The physics of biofilms: An introduction, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2016, **49**(20), 203001.
- 44 P. Thomen, J. Robert, A. Monmeyran, A.-F. Bitbol, C. Douarache and N. Henry, Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing, *PLoS One*, 2017, **12**(4), 1–24.
- 45 K. Drescher, Y. Shen, B. L. Bassler and H. A. Stone, Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**(11), 4345–4350.
- 46 A. Marty, C. Roques, C. Causserand and P. Bacchin, Formation of bacterial streamers during filtration in microfluidic systems, *Biofouling*, 2012, **28**(6), 551–562.
- 47 R. Rusconi, S. Lecuyer, L. Guglielmini and H. A. Stone, Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers, *J. R. Soc., Interface*, 2010, **7**(50), 1293–1299.
- 48 D. R. Espeso and A. M.-C. Rodriguez, Modeling and simulation of bacterial biofilms, *PhD dissertation*, Universidad Carlos III de Madrid, 2013.
- 49 N. B. Aznavah, M. Safdar, G. Wolfaardt and J. Greener, Micropatterned biofilm formations by laminar flow-templating, *Lab Chip*, 2014, **14**(15), 2666–2672.
- 50 P. Stoodley, R. Cargo, C. J. Rupp, S. Wilson and I. Klapper, Biofilm material properties as related to shear-induced



- deformation and detachment phenomena, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **29**(6), 361–367.
- 51 M. Marcos, H. Fu, T. Powers and R. Stocker, Bacterial rheotaxis, *Bull. Am. Phys. Soc.*, 2011, **109**, 4780–4785.
- 52 J. D. Wheeler, E. Secchi, R. Rusconi and R. Stocker, Not just going with the flow: The effects of fluid flow on bacteria and plankton, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2019, **35**, 213–237.
- 53 J. A. Aufrecht, J. D. Fowlkes, A. N. Bible, J. Morrell-Falvey, M. J. Doktycz and S. T. Retterer, Pore-scale hydrodynamics influence the spatial evolution of bacterial biofilms in a microfluidic porous network, *PLoS One*, 2019, **14**(6), e0218316.
- 54 M. Hassanpourfard, Z. Nikakhtari, R. Ghosh, S. Das, T. Thundat, Y. Liu and A. Kumar, Bacterial floc mediated rapid streamer formation in creeping flows, *Sci. Rep.*, 2015, **5**(1), 1–12.
- 55 M. Hassanpourfard, R. Ghosh, T. Thundat and A. Kumar, Dynamics of bacterial streamers induced clogging in microfluidic devices, *Lab Chip*, 2016, **16**(21), 4091–4096.
- 56 N. Shah, M. Ul-Islam, W. A. Khattak and J. K. Park, Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **98**(2), 1585–1598.
- 57 W. Liu, H. Du, M. Zhang, K. Liu, H. Liu, H. Xie, X. Zhang and C. Si, Bacterial cellulose based composite scaffolds for biomedical applications: A review, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2020, **8**(20), 7536–7562.
- 58 Z. Cheng, Z. Ye, A. Natan, Y. Ma, H. Li, Y. Chen, L. Wan, C. Aparicio and H. Zhu, Boneinspired mineralization with highly aligned cellulose nanofibers as template, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, **11**(45), 42486–42495.
- 59 F. Mohammadkazemi, M. Faria and N. Cordeiro, *In situ* biosynthesis of bacterial nanocellulose-CaCO₃ hybrid bionanocomposite: One-step process, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **65**, 393–399.
- 60 G. Serafica, R. Mormino and H. Bungay, Inclusion of solid particles in bacterial cellulose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **58**(6), 756–760.
- 61 S. Yano, H. Maeda, M. Nakajima, T. Hagiwara and T. Sawaguchi, Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles, *Cellulose*, 2008, **15**(1), 111–120.
- 62 M. Pomet, J. Juntaro, J. Y. Heng, A. Mantalaris, A. F. Lee, K. Wilson, G. Kalinka, M. S. Shaffer and A. Bismarck, Surface modification of natural fibers using bacteria: Depositing bacterial cellulose onto natural fibers to create hierarchical fiber reinforced nanocomposites, *Biomacromolecules*, 2008, **9**(6), 1643–1651.
- 63 S. Shi, S. Chen, X. Zhang, W. Shen, X. Li, W. Hu and H. Wang, Biomimetic mineralization synthesis of calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite in a three-dimensional network of bacterial cellulose, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009, **84**(2), 285–290.
- 64 Y. Wan, Y. Huang, C. Yuan, S. Raman, Y. Zhu, H. Jiang, F. He and C. Gao, Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng., C*, 2007, **27**(4), 855–864.
- 65 M. Ul-Islam, T. Khan and J. K. Park, Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **89**(4), 1189–1197.
- 66 N. Khodamoradi, V. Babaeipour and M. Sirousazar, Bacterial cellulose/montmorillonite bionanocomposites prepared by immersion and in-situ methods: Structural, mechanical, thermal, swelling and dehydration properties, *Cellulose*, 2019, **26**(13), 7847–7861.
- 67 J. Sun and B. Bhushan, Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: A review, *RSC Adv.*, 2012, **2**(20), 7617–7632.
- 68 M. W. Rauch, M. Dressler, H. Scheel, D. Van Opdenbosch and C. Zollfrank, Mineralization of calcium carbonates in cellulose gel membranes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, (32), 5192–5198.
- 69 D. Kuo, T. Nishimura, S. Kajiyama and T. Kato, Bioinspired environmentally friendly amorphous CaCO₃-based transparent composites comprising cellulose nanofibers, *ACS Omega*, 2018, **3**(10), 12722–12729.
- 70 D. Gebauer, V. Oliynyk, M. Salajkova, J. Sort, Q. Zhou, L. Bergström and G. Salazar-Alvarez, A transparent hybrid of nanocrystalline cellulose and amorphous calcium carbonate nanoparticles, *Nanoscale*, 2011, **3**(9), 3563–3566.
- 71 T. Saito, Y. Oaki, T. Nishimura, A. Isogai and T. Kato, Bioinspired stiff and flexible composites of nanocellulose-reinforced amorphous CaCO₃, *Mater. Horiz.*, 2014, **1**(3), 321–325.
- 72 M. Stroescu, A. Stoica-Guzun, S. I. Jinga, T. Dobre, I. M. Jipa and L. M. Dobre, Influence of sodium dodecyl sulfate and cetyl trimethylammonium bromide upon calcium carbonate precipitation on bacterial cellulose, *Korean J. Chem. Eng.*, 2012, **29**(9), 1216–1223.
- 73 Q. Zhu, J. Wang, J. Sun and Q. Wang, Preparation and characterization of regenerated cellulose biocomposite film filled with calcium carbonate by *in situ* precipitation, *BioResources*, 2020, **15**(4), 7893.
- 74 M. Ciobanu, E. Bobu and F. Ciolacu, *In situ* cellulose fibres loading with calcium carbonate precipitated by different methods, *Cellul. Chem. Technol.*, 2010, **44**(9), 379.
- 75 A. Stoica-Guzun, M. Stroescu, S. Jinga, I. Jipa, T. Dobre and L. Dobre, Ultrasound influence upon calcium carbonate precipitation on bacterial cellulose membranes, *Ultrason. Sonochem.*, 2012, **19**(4), 909–915.
- 76 T. Nissinen, M. Li, N. Brielles and S. Mann, Calcium sulfate hemihydrate-mediated crystallization of gypsum on Ca²⁺-activated cellulose thin films, *CrystEngComm*, 2013, **15**(19), 3793–3798.
- 77 M. Iguchi, S. Yamanaka and A. Budhiono, Bacterial cellulose: A masterpiece of nature's arts, *J. Mater. Sci.*, 2000, **35**(2), 261–270.
- 78 A. D. Edelstein, M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale and N. Stuurman, Advanced methods of microscope control using µManager software, *J. Biol. Methods*, 2014, **1**(2), 1–18.
- 79 J. Bergmann, P. Friedel and R. Kleeberg, BGMN – a new fundamental parameters based Rietveld program for



- laboratory X-ray sources, its use in quantitative analysis and structure investigations, *CPD Newsletter*, 1998, **20**, 5–8.
- 80 N. Doebelin and R. Kleeberg, Profex: A graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN, *J. Appl. Crystallogr.*, 2015, **48**(5), 1573–1580.
- 81 M. Järvinen, Texture models in powder diffraction analysis, in *Materials Science Forum*, Trans Tech Publ, 1998, vol. 278, pp. 184–199.
- 82 J. H. Lienhard, *et al.*, Synopsis of lift, drag, and vortex frequency data for rigid circular cylinders, *Technical Extension Service*, Washington State University Pullman, WA, 1966, vol. 300.
- 83 C. Campano, A. Balea, A. Blanco and C. Negro, Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review, *Cellulose*, 2016, **23**(1), 57–91.
- 84 W. Czaja, D. Romanovicz and R. Malcolm Brown, Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, *Cellulose*, 2004, **11**(3), 403–411.
- 85 P. Singhsa, R. Narain and H. Manuspiya, Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions, *Cellulose*, 2018, **25**(3), 1571–1581.
- 86 M. Krsmanovic, D. Biswas, H. Ali, A. Kumar, R. Ghosh and A. K. Dickerson, Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2020, 102336.
- 87 M. Liu, C. Zhong, X.-Y. Wu, Y.-Q. Wei, T. Bo, P.-P. Han and S.-R. Jia, Metabolomic profiling coupled with metabolic network reveals differences in *Gluconacetobacter xylinus* from static and agitated cultures, *Biochem. Eng. J.*, 2015, **101**, 85–98.
- 88 M. R. Nejadnik, H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher and W. Norde, Determination of the shear force at the balance between bacterial attachment and detachment in weakadherence systems, using a flow displacement chamber, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**(3), 916–919.
- 89 J. Kuncova-Kallio and P. J. Kallio, PDMS and its suitability for analytical microfluidic devices, in 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE, 2006, 2486–2489.
- 90 D. J. Gardner, G. S. Oporto, R. Mills and M. A.-S. A. Samir, Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose, *J. Adhes. Sci. Technol.*, 2008, **22**(5-6), 545–567.
- 91 A. Marty, C. Causserand, C. Roques and P. Bacchin, Impact of tortuous flow on bacteria streamer development in microfluidic system during filtration, *Biomicrofluidics*, 2014, **8**(1), 014105.
- 92 R. Holm and D. Söderberg, Shear influence on fibre orientation, *Rheol. Acta*, 2007, **46**(5), 721–729.
- 93 S. B. Lindström and T. Uesaka, Simulation of semidilute suspensions of non-brownian fibers in shear flow, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**(2), 024901.
- 94 F. Nindiyasari, E. Griesshaber, T. Zimmermann, A. P. Manian, C. Randow, R. Zehbe, L. Fernandez-Diaz, A. Ziegler, C. Fleck and W. W. Schmahl, Characterization and mechanical properties investigation of the cellulose/gypsum composite, *J. Compos. Mater.*, 2016, **50**(5), 657–672.
- 95 A. Van Driessche, L. G. Benning, J. Rodriguez-Blanco, M. Ossorio, P. Bots and J. García-Ruiz, The role and implications of bassanite as a stable precursor phase to gypsum precipitation, *Science*, 2012, **336**(6077), 69–72.
- 96 H. K. Raut, A. F. Schwartzman, R. Das, F. Liu, L. Wang, C. A. Ross and J. G. Fernandez, Tough and strong: Cross-lamella design imparts multifunctionality to biomimetic nacre, *ACS Nano*, 2020, **14**(8), 9771–9779.
- 97 A.-W. Xu, M. Antonietti, H. Cölfen and Y.-P. Fang, Uniform hexagonal plates of vaterite CaCO₃ mesocrystals formed by biomimetic mineralization, *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**(7), 903–908.
- 98 O. Grassmann and P. Löbmann, Morphogenetic control of calcite crystal growth in sulfonic acid based hydrogels, *Chem. – Eur. J.*, 2003, **9**(6), 1310–1316.
- 99 K. Yu, E. M. Spiesz, S. Balasubramanian, D. T. Schmieden, A. S. Meyer and M.-E. Aubin-Tam, Scalable bacterial production of moldable and recyclable biomineralized cellulose with tunable mechanical properties, *Cell Rep. Phys. Sci.*, 2021, 100464.
- 100 Y. Wan, J. Wang, M. Gama, R. Guo, Q. Zhang, P. Zhang, F. Yao and H. Luo, Biofabrication of a novel bacteria/bacterial cellulose composite for improved adsorption capacity, *Composites, Part A*, 2019, **125**, 105560.
- 101 H. Kanematsu and D. M. Barry, *Formation and control of biofilm in various environments*, Singapore, Springer, 2020.
- 102 G. S. Settles and E. Covert, Schlieren and shadowgraph techniques: Visualizing phenomena in transport media, *Appl. Mech. Rev.*, 2002, **55**(4), B76–B77.
- 103 G. S. Settles, *Schlieren and Shadowgraph Techniques*, Berlin Heidelberg New York, Springer, 2006.



Appendix

Supplementary figures

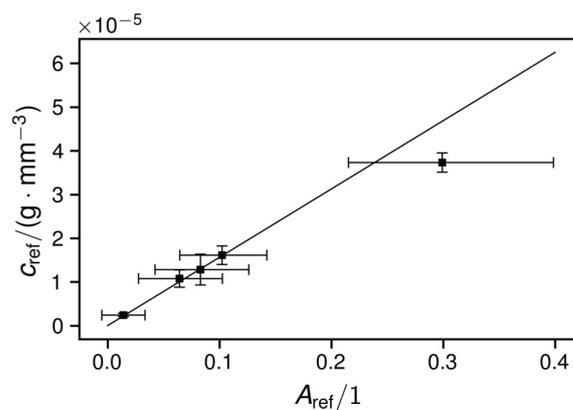


Figure S1: Relation of the absorbance A_{ref} to the BCB concentration. The regression line represents $c_{\text{ref}} = A_{\text{ref}}/(\epsilon l)$ from which ϵ could be obtained as $\epsilon = (1.30 \pm 0.27) \cdot 10^5 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1}$.

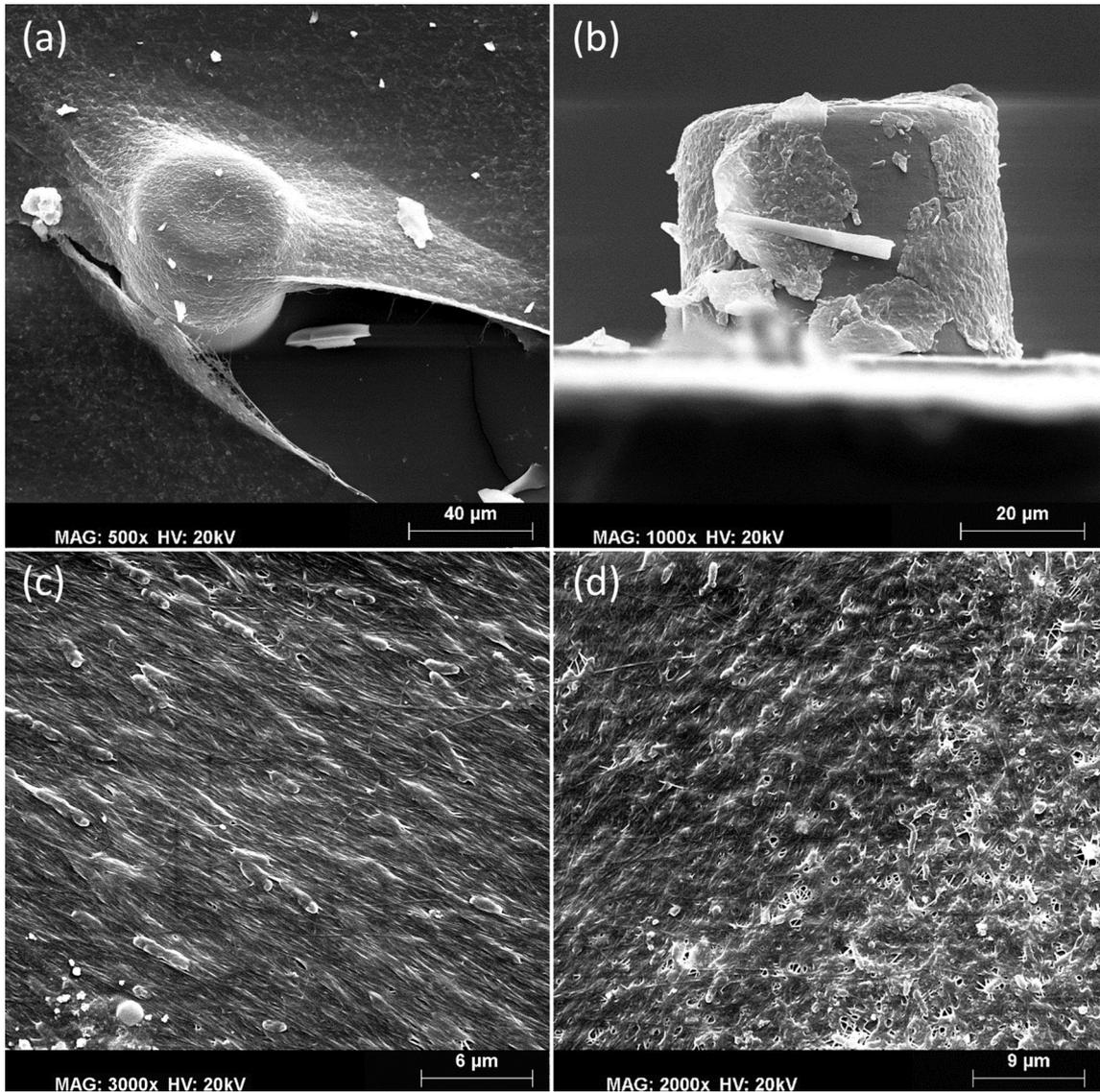


Figure S2: SEM micrographs of the BCB with (a) and (b) showing an obstacle covered by BCB. In (c) the fiber orientation is visible. Image (d) shows the difference between the thicker streamers (right) and the thinner film (left). Between the fibers *K. xylinus* can be observed as with its 2-4 μm length and 0.5 - 1 μm thickness.

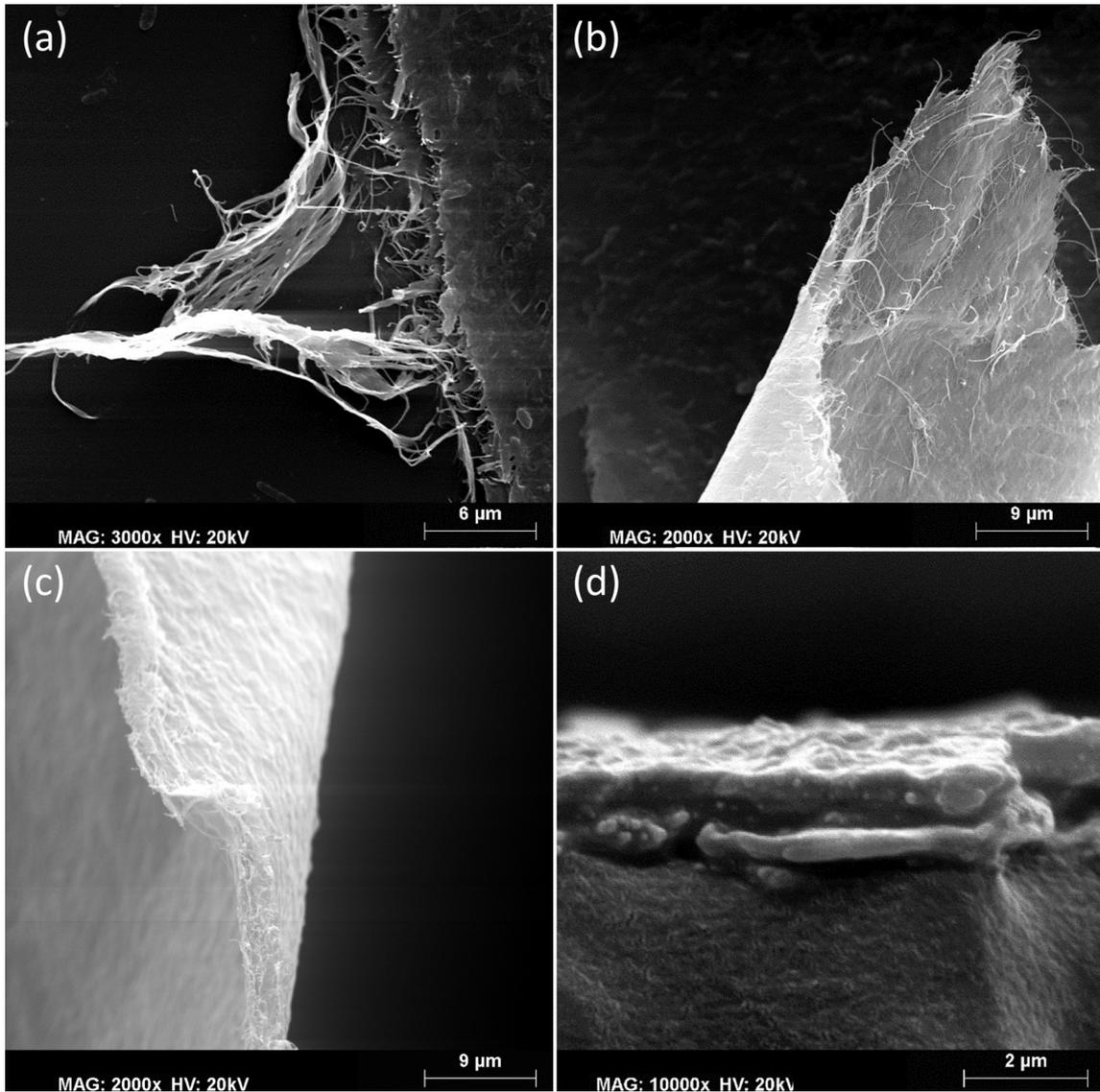


Figure S3: SEM micrographs of the BCB edge. In (a) the multilayered texture can be seen from above, with image (b) showing one of these layers. The topviewed layer in (c) is frayed after tearing, making the measurement of the thickness difficult. After freezing and breaking of the BCB the packed cross section could be obtained without fraying, image (d). This image was one used in the BCB concentration calibration steps.

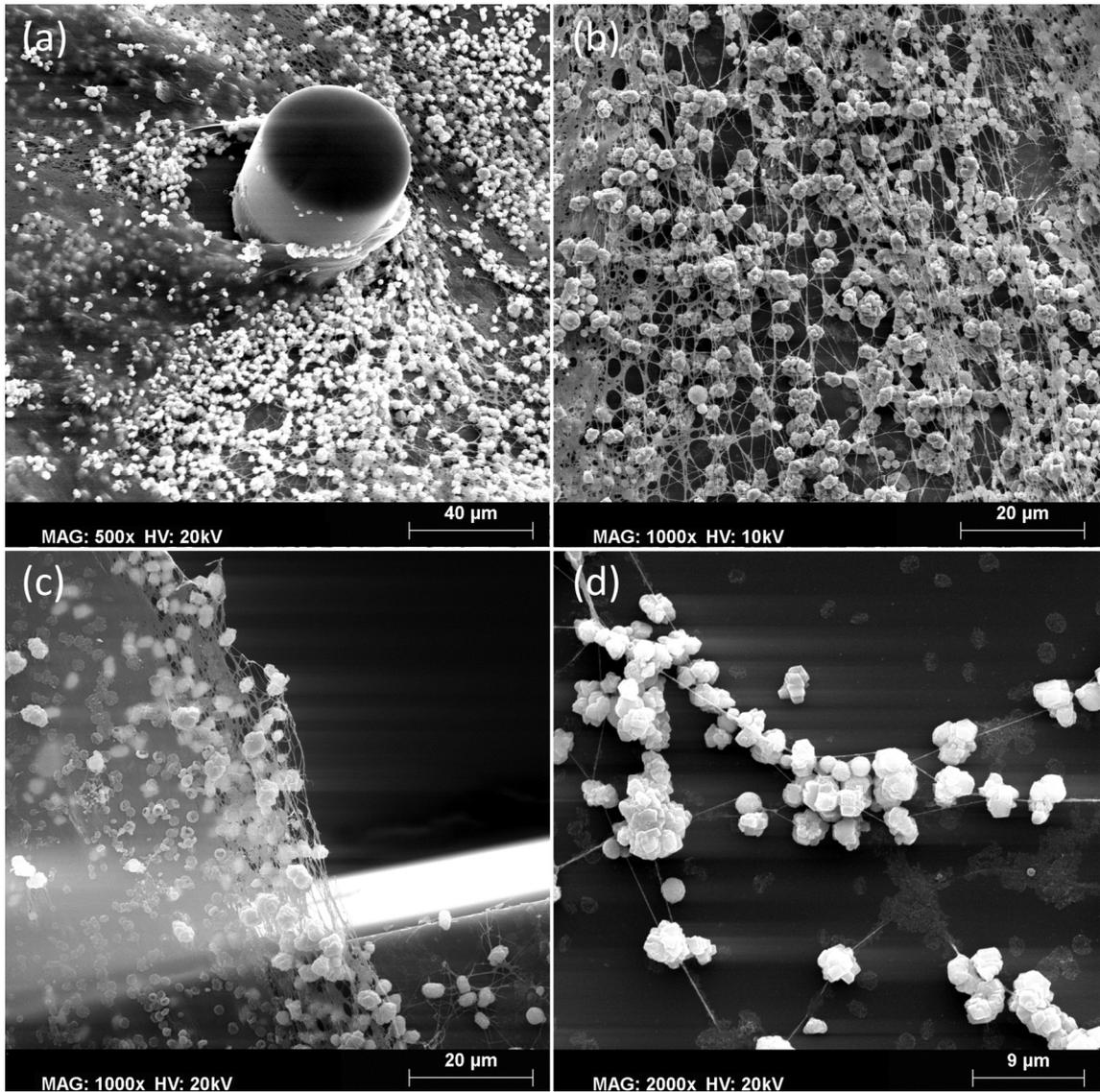


Figure S4: SEM micrographs of the CaCO_3 mineralised BCB. The CaCO_3 phases are embedded in the BC fiber networks.

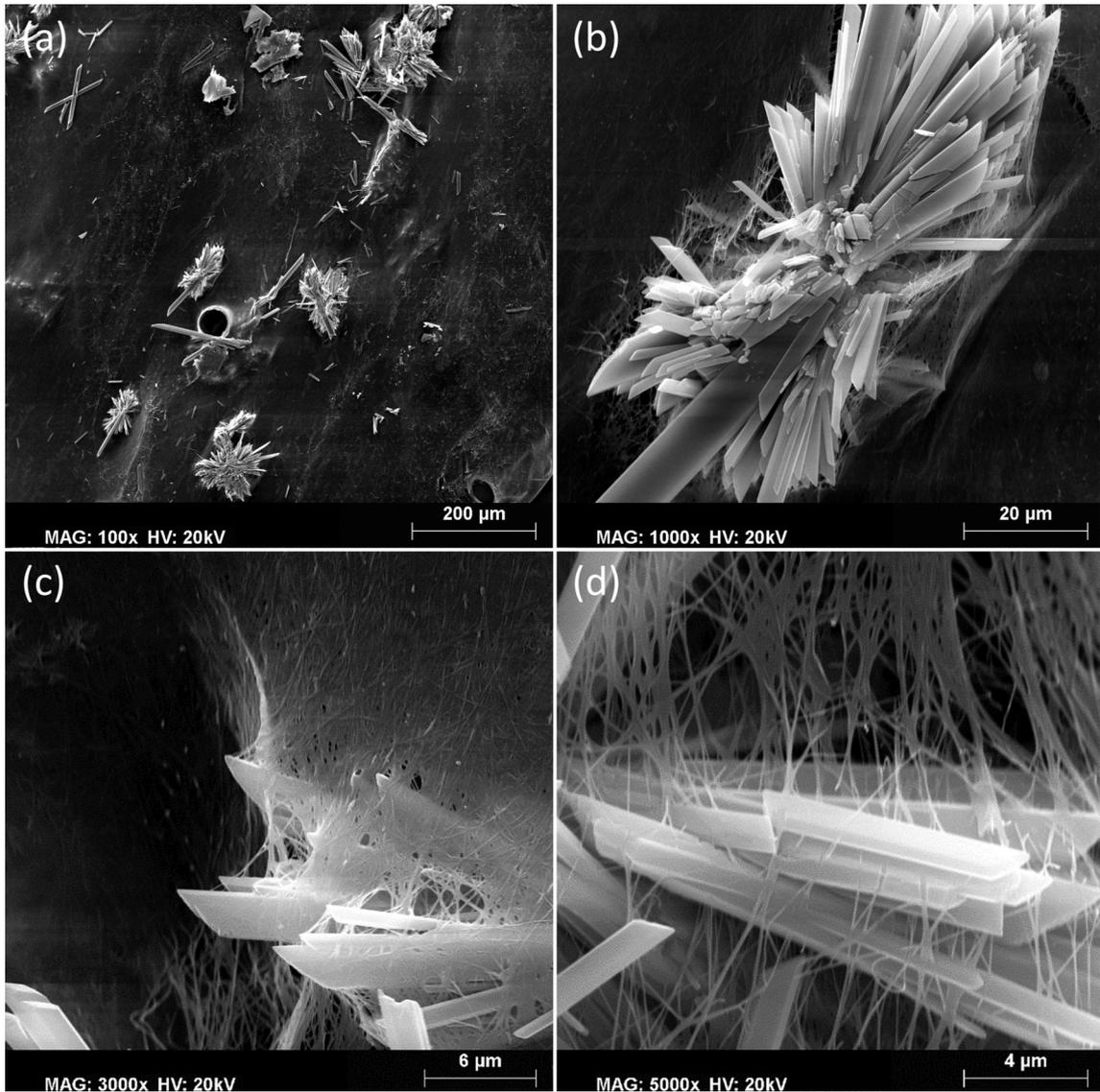


Figure S5: SEM micrographs of the gypsum mineralised BCB. The spatial spread gypsum aggregates (a) tended to grow slightly oval, apparently with no regard to the BCB (b). A closer look on the long side of the oval showing crystallites interact with the BCB network, which here is preferred perpendicular oriented (c, d).

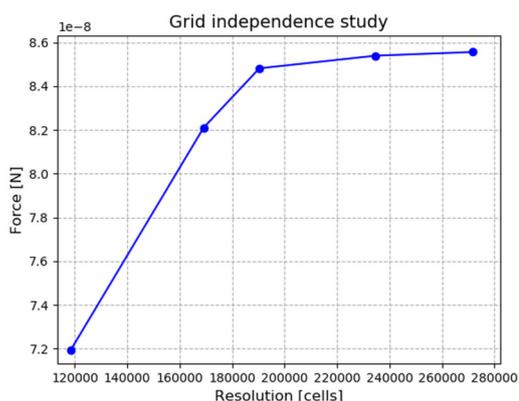


Figure S6: A graphical independence study was performed using, five different resolved meshes: very coarse (118347 cells), coarse (169108 cells), medium (190370 cells), fine (234714 cells) and extra fine (271818 cells). The simulation showed that the difference of the force on the last four separators of the inlet. It was 2.79 % between the coarse and the extra fine mesh, 0.74 % between the medium and extra fine mesh and 0.16 % between the fine and the extra fine mesh. It is therefore evident that from the fine mesh onwards there are no longer any significant changes of the result.

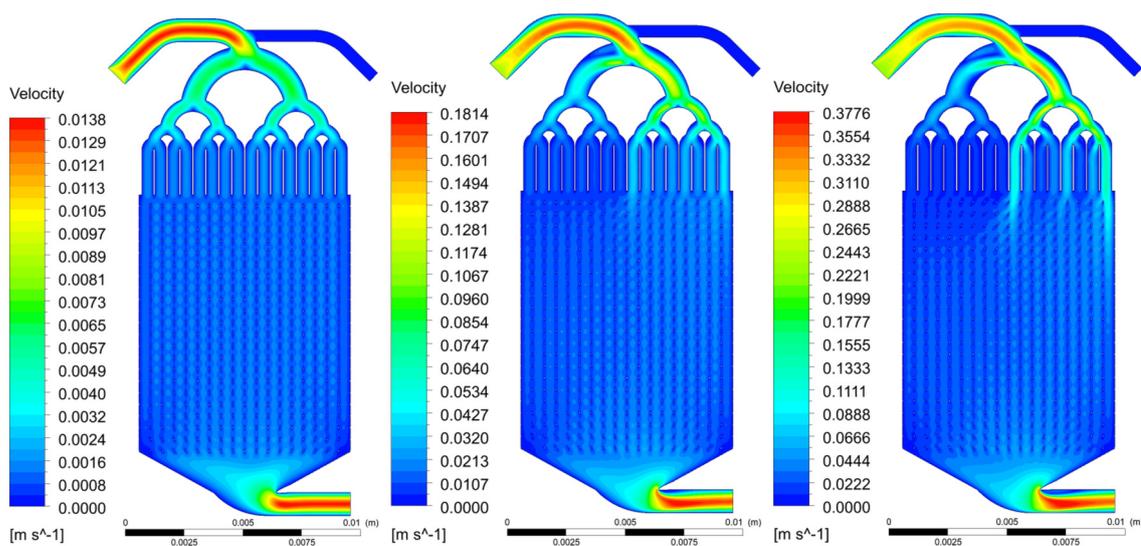


Figure S7: Contour plots of the microfluidic cell at the flow rates 1.0 mm s^{-1} (left), 12.5 mm s^{-1} (middle) and 25.0 mm s^{-1} (right)

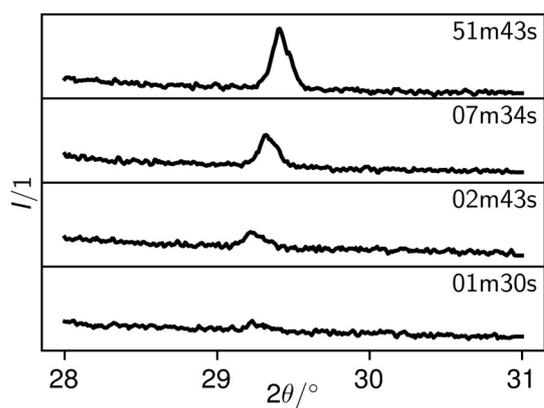


Figure S8: XRD data of the crystallization of ACC as calcite: Development of the (104) reflex. The slight displacement of the reflex results from the crystal displacement by sinking down in the sample holder during their formation.

Supplementary video

Figure S9: Growth of BCB in the microfluidic PDMS cell at a flow rate of 1.0 mm s^{-1} .