

KONFOKALE RAMANMIKROSKOPIE IN LIFE SCIENCE

Nichtinvasive Untersuchung von
Bakterien der biologischen Abwasserreinigung

Bestimmung der Melaninverteilung
in murinen Melanomzellen und Melanozyten

Von der Fakultät für Mathematik und Physik
Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Maike Keuntje
geboren am 24.02.1978 in Seesen

2006

Referentin Prof. Dr. Angelika Anders-von Ahlften
Korreferent Prof. Dr. Hans-Albert Kolb

Tag der Promotion: 24. Februar 2006

Kurzzusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der konfokalen Ramanmikroskopie in zwei ausgewählten Bereichen der Life Sciences. Die Vorteile der eingesetzten Messmethode liegen in der nicht-invasiven und substanz-spezifischen Untersuchung mit hoher räumlicher Auflösung (etwa $1,5 \mu\text{m}$ axial und 260 nm lateral), die keine Probenaufbereitung erfordert. Dies erlaubt die Analyse von heterogenen Biofilmen in ihrer natürlichen Umgebung, ohne sich dabei auf die komplizierte Biofilmstruktur auszuwirken.

Vor 10 Jahren konnte experimentell ein Prozess entdeckt werden, welcher den einstufigen Abbau von Ammonium im Abwasser ermöglicht. Die technische Realisierung dieser so genannten anaeroben Ammoniumoxidation in der biologischen Reinigung hoch stickstoffhaltiger Abwässer würde zu einer Kostenersparnis von etwa 90 % führen. Doch ist die großtechnische Umsetzung dieser Reaktion bislang nicht gelungen. Zu viele Prozesse innerhalb des Biofilmes sind noch ungeklärt, da insbesondere die Schwierigkeit besteht, Biofilme so zu untersuchen, dass sie in ihrer komplexen Struktur weder beeinflusst noch zerstört werden.

Mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, spezifische Spektren der am Abwasserreinigungsprozess beteiligten Bakterien zu gewinnen und diese in eine eigene spektrale Datenbank einzuspeisen. Hierbei können Bakterien nicht nur auf der Gattungsebene unterschieden werden, sondern sogar auf der Art- und Stammebene. Damit lassen sich die im Biofilm enthaltenen Bakterien genauestens auf ihre Lokalisation und Vergesellschaftung überprüfen. Die gewonnenen Ramanspektren aus dem Biofilm können mit der eigenen Datenbank verglichen und zugeordnet werden, wodurch Aussagen über die Bakterienverteilung im Biofilm möglich werden.

Darüber hinaus wurden zwei murine melaninproduzierende Zelllinien in Kultur untersucht. Im Zentrum stand die Frage nach der Melaninverteilung innerhalb der Zellen, welche sich dreidimensional darstellen ließ. Die konfokale Ramanmikroskopie erlaubt folglich die Überprüfung der Melaninsynthese bzw. die Analyse des Melanintransports von den Melanozyten zu den Keratinozyten, welche bis heute noch nicht vollständig verstanden ist.

Schlagwörter: Bakterien, Melanin, Ramanmikroskopie

Abstract

The aim of this work was the establishment of confocal Raman microscopy in two selected fields of the life sciences. The advantages of the deployed method lie in the non-invasive and substance-specific analysis with high spatial resolution (about $1.5 \mu\text{m}$ in axial direction and 260 nm laterally). In addition, no sample preparation is necessary with this method. This allows the investigation of heterogeneous biofilms in their natural environment without influencing the complex structure of the biofilm.

One decade ago a process was discovered experimentally where the one-stage removal of ammonium in wastewater is possible. The technical realization of this so-called anaerobic ammonium oxidation in the biological wastewater treatment of highly nitrogen polluted water would lead to a reduction of 90 % of the operational costs. However, the implementation of this reaction in a full scale wastewater reactor hasn't been successful until now. Too many processes inside the biofilm aren't completely understood yet. In particular, it is a very challenging task to analyze biofilms without affecting or destroying their complex structure.

Within the scope of this work it was possible to obtain specific spectra of bacteria that participate in the biological wastewater treatment using confocal Raman microscopy. These spectra were introduced into an own spectral database. Here, bacteria could be differentiated on the genera, species and even on the strain level. Now bacteria inside the biofilm can be investigated with regard to their localization and socialization. The recorded Raman spectra from the biofilm can be compared with the spectral database. This allows for the assignment of the spectra to the responsible bacteria and gives information about the microbial distribution inside the biofilm.

Additionally, two murine cell cultures were analyzed which are able to produce melanin. The main issue of this work was the mapping of the melanin distribution inside the cells which could be displayed in three dimensions. Confocal Raman microscopy permits to validate the melanin synthesis and the transport of melanin from the melanocytes to the keratinocytes, respectively, which is not clear until now.

Keywords: bacteria, melanin, Raman microscopy

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Einleitung	3
1 Physikalische Grundlagen	7
1.1 Ramanspektroskopie	7
1.1.1 Weitere Spektroskopietechniken	11
1.2 Konfokale Mikroskopie	13
1.2.1 Das konfokale Prinzip	13
1.2.2 Räumliche Auflösung	15
1.2.3 Konfokale Ramanmikroskopie	17
2 Biologische Grundlagen	19
2.1 Biofilme	19
2.2 Biologische Abwasserreinigung	21
2.2.1 Anaerobe Ammoniumoxidation	21
2.2.2 Stickstoffkreislauf	23
2.3 Abwasserrelevante Bakterien	23
2.4 Melanin	25
2.4.1 Melaninproduktion in den Melanozyten	27

3	Material und Methoden	31
3.1	Konfokales Ramanmikroskop CRM 200	32
3.1.1	Anregungslaser	33
3.1.2	Objektiv	34
3.1.3	Filter	35
3.1.4	Detektionseinheiten	36
3.1.5	Messmethoden	37
3.2	Bakterien	39
3.2.1	Kultivierung der Bakterienstämme	39
3.2.2	Isolation von ANAMMOX-Bakterien über einen Percoll-Dichte- gradienten	40
3.3	Deammonifizierende Biofilme	42
3.4	Melanin	42
4	Aufbau einer Bakteriendatenbank für abwasserrelevante Mikroorganismen	45
4.1	Standardisierte Auswerteprozedur	46
4.1.1	Intensitätskalibrierung	49
4.2	Erstellung und Validierung einer Bakteriendatenbank	51
4.2.1	Datenvorbehandlung	51
4.2.2	Berechnung der spektralen Distanz	53
4.2.3	Validierung	56
4.3	Hierarchische Clusteranalyse	57
5	Ramanmikroskopische Bakterienanalyse	59
5.1	Vorbereitungen	60
5.1.1	Axiale Auflösung des konfokalen Ramanmikroskops	61
5.1.2	Laserleistung	62
5.1.3	Immobilisierung und Feuchthalten der Bakterien	63
5.2	Analyse bekannter Bakterien	66
5.2.1	<i>Escherichia Coli</i>	66

5.2.2	<i>Bacillus pumilus</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	68
5.2.3	<i>Staphylococcus cohnii</i>	72
5.2.4	<i>Planctomyces maris</i>	73
5.3	Analyse von abwasserrelevanten Bakterien	74
5.3.1	<i>Anammox</i>	75
5.3.2	Differenzierung verschiedener <i>Nitrosomonas</i> -Arten und -Stämme	79
5.3.3	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	84
5.3.4	<i>Acidovorax temperans</i>	85
5.4	Parameter für die eigene Bakteriendatenbank und Clusteranalyse	89
5.4.1	Identitätstest	90
5.4.2	Clusteranalyse	91
5.5	Untersuchung von deammonifizierenden Biofilmen aus der biologischen Abwasserreinigung	94
5.5.1	Vermessung der Bakteriencluster innerhalb des Biofilms	94
6	Räumlich aufgelöste Analyse von Zellkulturen	99
6.1	Granulosa- und Linsenzellen	100
6.2	Murine Melanozyten	102
6.2.1	Referenzspektren von gelöstem Melanin	104
6.2.2	Verteilung von Melanin innerhalb der Zelle	105
6.2.3	Überprüfung der Melaninproduktion	107
6.3	Melaninproduktion in murinen Melanomzellen	109
	Zusammenfassung und Ausblick	117
	Anhang	121
	A Kulturmedien	121
	B Technische Daten	127
	Kooperationen	129

Abbildungsverzeichnis	130
------------------------------	------------

Literaturverzeichnis	133
-----------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

<i>Acidovorax Hn</i>	<i>Acidovorax temperans Halo negative</i>
<i>Acidovorax Hp</i>	<i>Acidovorax temperans Halo positive</i>
α -MSH	α -Melanozyten stimulierendes Hormon
Anammox	Anaerobe Ammoniumoxidation
APD	Avalanche Photodiode
CCD Kamera	charge-coupled device Kamera
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CRM	Konfokales Ramanmikroskop
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FISH	Fluoreszente in situ Hybridisierung
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FT Raman	Fourier-transformierte Ramanspektroskopie
IfB	Institut für Biophysik
ISAH	Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik
MiBi	Mikrobiologie
NIR	Nahes Infrarot
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
SBR	Sequencing Batch Reactor
SERS	Surface-enhanced Raman Spectroscopy (Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie)
UV	ultraviolett

Einleitung

Biofilme begegnen dem Menschen in vielen Lebensbereichen. Sie können sich auf Zähnen ansiedeln, auf Schiffsböden, aber auch in Rohren, auf Steinen im Wasser und auf medizinischen Geräten wie Kathetern. Oft sind diese Wohngemeinschaften von Mikroorganismen unerwünscht oder sogar schädlich: Sie bremsen die befallenen Schiffe aus, führen zu Korrosion von wichtigen Rohrleitungen, zu Karies beim Menschen oder auch zu lebensgefährlichen Infektionen in Krankenhäusern. Doch Biofilme übernehmen auch wichtige Aufgaben bei der Reinigung von Gewässern sowie dem kommunalen Abwasser [1]. Die biologische Abwasserreinigung, bei der Bakterien schädliche Substanzen abbauen, ist ein wichtiger Teil jeder Kläranlage. Dennoch sind Biofilme zu großen Teilen bislang unerforscht. Das Problem besteht darin, diese Bakterienlebensgemeinschaften so zu untersuchen, dass sie in ihrem komplexen Metabolismus nicht beeinflusst oder gar gestört werden.

Informationen über die räumliche Biofilmstruktur lassen sich über die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) gewinnen, bei der Stoffe im Biofilm mit Fluoreszenzmarkern versehen und anschließend mit einem Laser im ultravioletten oder sichtbaren Strahlenbereich angeregt werden [2]. Kombiniert mit Mikroelektroden [3] und der fluoreszenten in situ Hybridisierung (FISH), bei der Bakterien mit speziellen Sonden nachgewiesen werden können [4], [5], stellt die CLSM die wichtigste Untersuchungsmethode für Biofilme dar. Allerdings bedeuten auch die Farbstoffe einen Eingriff in das komplexe Biofilmgebilde, und für die Untersuchung mit Sonden müssen die Proben intensiv aufbereitet werden. Eine komplett nicht-invasive Analyse von Biofilmen ist bislang nicht etabliert.

Die konfokale Ramanmikroskopie bietet sich mit ihren Vorzügen für die Aufklärung dieser Fragestellung an, denn Biofilme können mit ihr völlig ohne Probenvorbereitung im wässrigen Medium auf ihre bakterielle Zusammensetzung untersucht werden. Darüber hinaus ermöglicht die sehr hohe Stoffspezifität die eindeutige Identifikation der Bakterien [6] und damit die dreidimensionale Darstellung ihrer Verteilung im Biofilm. Hierdurch lässt sich überprüfen, welchen Einfluss verschiedene Betriebsparameter auf die genaue mikrobielle Zusammensetzung des Biofilmes haben, woraus sich wichtige Informationen für die großtechnische Umsetzung gewinnen lassen [7].

Ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet der Life Sciences, in welchem sich die konfokale Ramanmikroskopie in den vergangenen 15 Jahren als vielversprechend erwiesen hat, ist die menschliche Haut [8]. Diese nimmt insbesondere in der heutigen Zeit, in der Menschen sich bei abnehmender Ozonkonzentration immer häufiger der Sonnenstrahlung aussetzen, eine zunehmend wichtigere Schutzfunktion ein. Die Haut ist nicht nur das größte Organ des Menschen, sondern sie gibt jedem ein individuelles Aussehen und übernimmt lebenswichtige Aufgaben wie den Schutz vor Hitze oder Kälte, vor schädlichen Substanzen oder eben vor gefährlicher UV-Strahlung. Die genauen optischen Eigenschaften der Haut speziell bei UV-Exposition sind allerdings bis heute unbekannt [9]. Bekannt sind jedoch die Eindringtiefen von ultraviolettem Licht in Haut, so erreicht das energiereiche UV-B-Licht tiefere Schichten der Epidermis und kann dort die Zellkerne der Keratinozyten schädigen.

An dieser Stelle übernimmt das Melanin eine zentrale Aufgabe, indem es die Zellkerne der Keratinozyten umgibt und dadurch vor eindringendem ultraviolettem Licht schützt. Problematisch zu bewerten ist jedoch, dass eine sichtbare Pigmentierung erst Stunden nach einer möglicherweise bereits gefährlichen UV-Einwirkung auf die Haut zu bemerken ist. Dies stellt ein Risiko dar, sodass es von großer Wichtigkeit ist, die genaue Wirkung von UV-Licht auf die Melaninsynthese zu kennen. Mit dem Wissen, welche Wellenlänge die Melaninproduktion am effektivsten anregt, könnte Haut gezielt mit einer geringen Lichtdosis bestrahlt werden, um den größtmöglichen Hautschutz zu erreichen. Diese Information wäre insbesondere in der Phototherapie hilfreich, in welcher die Haut zu therapeutischen Zwecken bestrahlt wird, aber auch Sonnenstudios könnten von diesem Wissen profitieren.

Zellkulturen bzw. menschliche Haut werden schon seit Beginn der 1990-er Jahre mittels konfokaler Ramanmikroskopie räumlich aufgelöst analysiert, wobei sich beispielsweise die Chromosomenverteilung in der DNS nachweisen lässt [10]. Neu ist jedoch die Analyse von melaninproduzierenden Zelllinien, da erst im Jahr 2004 das eindeutige Ramanspektrum von Melanin aufgenommen werden konnte [11]. Die konfokale Ramanmikroskopie erlaubt die räumliche Darstellung der Melaninverteilung innerhalb der Melanozyten, welche Aufschluss geben kann über die Melaninsynthese, über die Menge des produzierten Melanins und auch über den Transport der Melanosome zu den benachbarten Zellen. Zwar konnte die Melaninverteilung auch mit Hilfe von Reflexionsmessungen bestimmt werden [12], doch bietet diese Technik keine so hohe Stoffspezifität wie die konfokale Ramanmikroskopie, mit der genau zwischen verschiedenen Substanzen unterschieden werden kann.

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst die physikalischen und biologischen Grundlagen geklärt, wobei insbesondere die Messmethode genau vorgestellt und auch mit anderen experimentellen Techniken verglichen wird. Die biologischen Grundlagen erklären kurz den Prozess der anaeroben Ammoniumoxidation und die Notwendigkeit für die enge Kooperation von unterschiedlichen Bakterien im gleichen Biofilm. Weiterhin werden die Aufgaben und Funktionen des Melanins besprochen. Im Anschluss daran werden Material und Methoden vorgestellt, wobei das vorhandene konfokale Ramanmikroskop CRM200 der Firma WITec und die Kultivierungstechniken der Proben im Mittelpunkt stehen. In Kapitel 4 wird in Grundzügen die erforderliche Theorie zur Ramandatenbankerstellung präsentiert, welche im darauf folgenden Kapitel auf die eigenen Messergebnisse angewendet wird. Dieses Kapitel diskutiert ausführlich die experimentellen Herausforderungen und Ergebnisse anhand der untersuchten Bakterien und wird darüber hinaus auf die Bakterienverteilung im deammonifizierenden Biofilm eingehen. Im letzten Kapitel werden schließlich die Ergebnisse der Zellkulturmessungen dargestellt, die insbesondere die Melaninverteilung in zwei verschiedenen Zelllinien verdeutlichen. Außerdem gehen sie auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Melanozyten im Gegensatz zu Melanomzellen ein.

Kapitel 1

Physikalische Grundlagen

Viele unterschiedliche optische Spektroskopietechniken haben speziell in den letzten Jahren Einzug gehalten in das Gebiet der Biophysik. Durch die Möglichkeit zur Resonanzverstärkung des schwachen Ramaneffekts und durch die Entwicklung neuer Methoden wie die konfokale Ramanmikroskopie oder die Fourier-transformierte Ramanspektroskopie erhält die Fluoreszenzspektroskopie immer mehr Konkurrenz durch Methoden, die auf dem Effekt der Ramanstreuung beruhen. Die Ramanspektroskopie bringt viele Vorteile mit sich wie zum Beispiel die hohe Spezifität, welche bei der Fluoreszenzspektroskopie nur mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenzmarkern gegeben ist.

Zu Beginn der 1990-er Jahre wurden erstmals Publikationen über die konfokale Ramanmikroskopie zur Untersuchung von Zellen und Chromosomen veröffentlicht [10], [13], welche eine stetige Ausbreitung dieser Methode einläuteten. Die Position, Breite und Intensität der auftauchenden Ramanbanden geben hierbei Auskunft über die Zusammensetzung einer Probe, über die enthaltenen Moleküle und ihre Interaktion. Auf diese Weise ist es möglich, eine Fülle von Informationen aus einem einzelnen Ramanspektrum zu ziehen, die schließlich dabei helfen kann, kleine Probenstrukturen und dort ablaufende Prozesse besser zu verstehen.

1.1 Ramanspektroskopie

Sämtliche Spektroskopietechniken beruhen auf einem Wechselwirkungsprozess zwischen dem einfallenden (Laser-)licht und der zu untersuchenden Probe. Wenn Licht auf Materie trifft, so treten die Photonen mit den Atomen und Molekülen der Probe in Wechselwirkung. Hierbei können die Photonen absorbiert oder gestreut werden. Bei der Absorption von Licht aus dem infraroten Spektralbereich werden Vibrationsschwingungen in der Probe angeregt. Die Absorption ultravioletten Lichts führt dagegen zu einer Anregung eines

elektronischen Zustandes, welcher häufig Fluoreszenzen nach sich zieht (s. Abb. 1.1 a). Der Streuprozess kann elastisch oder inelastisch ablaufen. Bei der so genannten (elastischen) Rayleighstreuung findet kein Energieübertrag zwischen Licht und Materie statt, anders bei der inelastischen Ramanstreuung, bei der die Probe entweder Energie abgibt (Anti-Stokes) oder Energie aufnimmt (Stokes). Als Folge der Ramanstreuung wird Licht emittiert, dessen Wellenlänge von derjenigen des Anregungslichtes abweicht und dabei charakteristisch von der Probe geprägt wurde. In der Laserspektroskopie werden diese verschiedenen Effekte zur gezielten Untersuchung vielfältigster Proben ausgenutzt.

Bei der Ramanspektroskopie handelt es sich um eine Lasermethode, welche detaillierte Informationen über Molekülstruktur und -zusammensetzung der zu analysierenden Probe liefert. Da der Wirkungsquerschnitt für nichtresonante Ramanstreuung allerdings um einige Größenordnungen kleiner ist als der der Resonanzfluoreszenz, ist die geringe Intensität der erzeugten Streustrahlung der begrenzende Faktor dieser Methode. Erst mit Entwicklung der Laser konnte sich daher die Ramanspektroskopie als Untersuchungsmethode etablieren. Der Ramaneffekt wurde 1923 von A. Smekal vorhergesagt und 1928 von Sir Chandrasekhara Raman, nach dem der Effekt benannt wurde, und fast gleichzeitig auch von G. Landsberg und L. Mandelstam beobachtet.

Beim Streuprozess zwischen einem Photon und einem Molekül wird das Molekül kurzzeitig in einen virtuellen Zustand angeregt, von dem aus es entweder in den Grundzustand zurück- oder in einen angeregten Zustand übergeht. Die Lebensdauer eines virtuellen Zustandes liegt im Bereich von 10^{-15} s und ist durch die Heisenbergsche Energie-Zeit-Unschärferelation $\Delta t \cdot \Delta E \geq \frac{\hbar}{2}$ gegeben.

Bei der spontanen Ramanstreuung handelt es sich um eine inelastische Streuung zwischen Photonen und Materie, bei der eine Frequenzänderung der einfallenden Strahlung (mit Frequenz ω_1) auftritt, da ihre Energie teilweise in Schwingungsenergie des Moleküls umgewandelt wird. Nach dem Streuvorgang lassen sich Strahlung mit unveränderter Frequenz ω_1 und Strahlung der Frequenzen ($\omega_s = \omega_1 - \omega_n$) und ($\omega_a = \omega_1 + \omega_n$) beobachten, wobei ω_n eine Moleküleigenfrequenz ist (s. Abb. 1.1). Die Energiedifferenz zwischen einfallendem Licht und gestreutem Photon ist dabei also gleich der Energie der im Molekül angeregten Vibrationsschwingung. Die Strahlung der Frequenz ω_s wird als Stokes-Komponente des spontanen Ramanstreuungsprozesses bezeichnet, die Strahlung der Frequenz ω_a als Anti-Stokes-Komponente.

Die Besonderheit der Ramanstreuung liegt in der Anregung einer Molekülschwingung durch das einfallende Licht. Da nur molekülspezifische Schwingungen angeregt werden können, ist dieser Energieübertrag charakteristisch für das Molekül und stellt somit einen Fingerabdruck für die untersuchte Probe dar und erlaubt hierdurch die Identifikation von Molekülen. Unter Verwendung monochromatischen Lichts resultiert folglich ein Spektrum diskreter Linien, deren Positionen mit der Energie korrespondieren, die zur

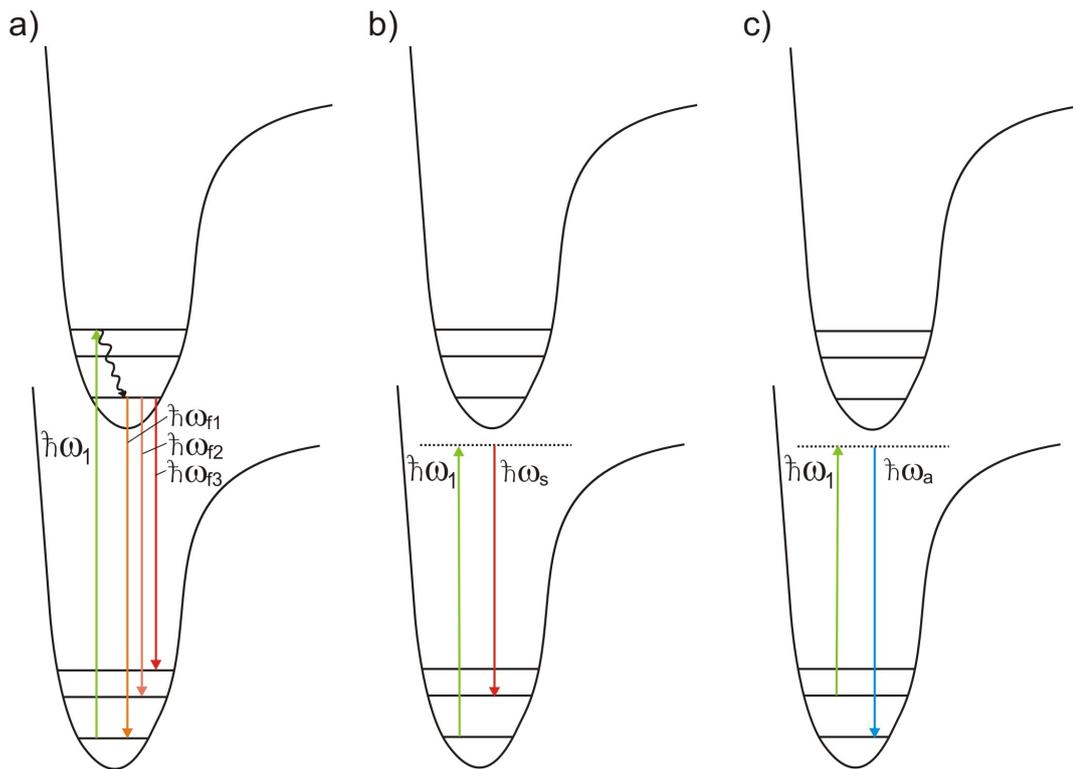


Abbildung 1.1: Wechselwirkungsprozesse zwischen Licht und Materie: a) zeigt die Fluoreszenz eines Stoffes. Zunächst wird das einfallende Licht der Frequenz ω_1 absorbiert, anschließend finden strahlungslose Übergänge statt, bevor die Fluoreszenz einsetzt. b) und c) stellen die Ramanstreuung dar. Diese kommt ohne den Übergang in einen reellen Zustand aus, da das Anregungslicht nicht ausreicht, um reelle Zustände des Moleküls anzuregen. Bei der Ramanstreuung nimmt das Molekül einen virtuellen Zustand ein, bevor die inelastische Streuung auftritt. Hier sind zwei verschiedene Prozesse möglich: Im Stokes-Fall (b) geht das Molekül durch den Streuprozess in einen höheren Schwingungszustand über, bei der Anti-Stokes-Streuung (c) liegt das Molekül anfangs im angeregten Zustand vor und geht durch die Ramanstreuung in den Grundzustand über.

Anregung von charakteristischen Vibrationsschwingungen benötigt wird.

Bei einem Ramanspektrum wird die Intensität des gestreuten Lichts gegen die Energiedifferenz aufgetragen. Angegeben wird die Energie dabei üblicherweise als relative Ramanverschiebung in der Einheit „Wellenzahl“ ($\frac{1}{\text{cm}}$), welche die Energiedifferenz relativ zur Anregungswellenlänge angibt:

$$\bar{\omega} = \frac{1}{\lambda_{\text{einfallend}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{gestreut}}}, \quad (1.1)$$

wobei $\lambda_{\text{einfallend}}$ und $\lambda_{\text{gestreut}}$ die Wellenlängen der einfallenden bzw. ramangestreuten Photonen angeben. Die Intensität des gestreuten Lichts hängt dabei stark von der Frequenz des eingestrahlten Laserlichts ab: $I \propto \omega^4$, sodass die Verwendung des grünen Lasers bei 532 nm eine 4,7-fache Ramanintensität liefert verglichen mit einem NIR-Laser bei 785 nm. Die Intensität der Ramanstreuung ist um mehrere Größenordnungen geringer

als die der elastischen Rayleighstreuung. Allerdings ist eine Resonanzverstärkung möglich, wenn die Wellenlänge des einfallenden Lichts genau (bzw. hinreichend genau) mit einer Absorptionsbande der Probe übereinstimmt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit zur selektiven Anregung einzelner molekularer Untergruppen.

Darüber hinaus ist die Intensität der Ramanbanden abhängig von der Besetzungsdichte N_i der Moleküle im Ausgangszustand $|i\rangle$. Im Fall der Stokes-Ramanstreuung handelt es sich beim Ausgangszustand um den Grundzustand des untersuchten Moleküls, während die Anti-Stokes-Streuung nur aus einem angeregten Zustand heraus auftreten kann. Die Besetzungsdichte eines angeregten Zustandes wird beschrieben durch die Boltzmannverteilung und ist bei Zimmertemperatur geringer als diejenige des Grundzustandes [14]:

$$I \propto N_i \propto e^{-E_i/k_B T}, \quad (1.2)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante ist. Üblicherweise werden bei der Ramanspektroskopie daher die Stokes-Ramanlinien detektiert und zur Analyse herangezogen, denn die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül im ersten angeregten Zustand zu finden, ist wesentlich geringer als diejenige, ein Molekül im Grundzustand zu vermessen. Die Intensität der Anti-Stokeslinien ist daher um den Faktor $e^{-E_i/k_B T}$ schwächer als die Intensität der Stokes-Ramanlinien.

Zur Erklärung des Ramaneffekts kann ein klassisches Modell herangezogen werden: Die physikalische Ursache aller linearen und nichtlinearen Ramaneffekte ist die Induzierung eines Dipolmoments in einem Molekül, welches entsteht, wenn Licht ein Medium durchläuft und dabei eine Verformung der Molekülstruktur verursacht. Hierbei erzeugt es lokale Dipolmomente und somit ein Polarisationsfeld, welches abhängig ist vom eingestrahlten elektrischen Feld.

Eine einfallende monochromatische Lichtwelle $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega t)$ erzeugt im Medium folglich ein oszillierendes Dipolmoment $\vec{p}_{ind} = \tilde{\alpha} \vec{E}$ (mit der Polarisierbarkeit $\tilde{\alpha}$), welches sich dem eventuell vorhandenen permanenten Dipolmoment $\vec{\mu}$ überlagert. Hieraus ergibt sich das gesamte Dipolmoment \vec{p} :

$$\vec{p} = \vec{\mu} + \vec{p}_{ind}. \quad (1.3)$$

Solange die Frequenz des anregenden Lichts von elektronischen Resonanzen bzw. Eigenfrequenzen des Moleküls entfernt ist, können Dipolmoment und Polarisierbarkeit in eine Taylorreihe der Normalkoordinaten q_n des Moleküls entwickelt werden. Für kleine Schwingungsamplituden und mit einigen trigonometrischen Umformungen ergibt sich

schließlich das gesamte zeitabhängige Dipolmoment [14]:

$$\vec{p}(t) = \underbrace{\vec{\mu}_0}_1 + \underbrace{\sum_{n=1}^N \left(\frac{\partial \mu}{\partial q_n} \right)_0 q_{n0} \cos(\omega_n t)}_2 + \underbrace{\tilde{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega t)}_3 + \underbrace{\frac{\vec{E}_0}{2} \sum_{n=1}^N \left(\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial q_n} \right)_0 q_{n0} \cos[(\omega \pm \omega_n) t]}_{4/5}, \quad (1.4)$$

wobei N die Zahl der Normalschwingungen ist. Hierbei steht der erste Term für das permanente Dipolmoment und der zweite für den oszillierenden Anteil, welcher für die Infrarotaktivität des Moleküls verantwortlich ist. Der dritte Term markiert die Rayleighstreuung, und die beiden letzten Terme kennzeichnen schließlich die inelastische Ramanstreuung.

Aus (1.4) lässt sich die Auswahlregel für Ramanstreuung ablesen, denn diese tritt nur auf, falls die Änderung der Polarisierbarkeit $\left(\frac{\partial \tilde{\alpha}}{\partial q_n} \right)_0$ ungleich Null ist. Dagegen ist eine Schwingung ω_n nur dann infrarotaktiv, falls die Änderung des Dipolmoments $\left(\frac{\partial \mu}{\partial q_n} \right)_0$ ungleich Null ist.

Aus einem Ramanspektrum kann eine Fülle von Informationen abgelesen werden [15]:

1. Die Position der einzelnen Ramanbanden gibt die Frequenz der Vibrationsschwingungen in der Probe an, welche abhängig ist von der Molekülstruktur, der Masse der schwingenden Atome und den chemischen Bindungen.
2. Die Intensität der Ramanbande ist direkt proportional zur Konzentration der Probe und zur Intensität des anregenden Lichts.
3. Die Breite einer Ramanbande gibt Auskunft über die Molekülstruktur und wird beeinflusst durch dynamische Prozesse und Molekülbewegungen.

Bereits seit den frühen 1970-er Jahren wird die Ramanspektroskopie verstärkt zur Untersuchung biologischer Makromoleküle eingesetzt (Proteine, Chromophore, Lipide...), seitdem ist die Ramanspektroskopie aus dem Feld der Biophysik gar nicht mehr wegzudenken.

1.1.1 Weitere Spektroskopietechniken

Zur Untersuchung biologisch relevanter Proben (wie z.B. Zellen und Mikroorganismen) bieten sich zahlreiche Methoden der laseroptischen Spektroskopie an wie zum Beispiel

die Fluoreszenzspektroskopie. Diese ist allerdings nur bedingt zum molekülspezifischen Nachweis geeignet, da nicht alle Stoffe fluoreszieren und die Fluoreszenzbanden sehr breit sind und sich auch überschneiden können. Oftmals werden daher Fluoreszenzmarker eingesetzt, die allerdings das empfindliche biologische System beeinflussen können und einen Eingriff in die komplizierte Probenstruktur darstellen. Auch eine räumlich aufgelöste Untersuchung ist nicht immer möglich mit dieser Methode, zumal das UV-Licht der benötigten Laser nur noch eine sehr geringe Eindringtiefe in die Proben besitzt.

Die Ramanspektroskopie liefert dagegen spezifische Informationen über Molekülstrukturen und gibt Auskunft über den Aufbau einer Probe, ohne diese dabei zu berühren oder zu zerstören. Speziell im Bereich biologischer Fragestellungen werden allerdings hohe Anforderungen an die verwendete Messmethode gestellt, denn die Proben sind oft sehr gering konzentriert, liegen in der Größenordnung von wenigen Mikrometern oder sollen auf einer kurzen Zeitskala (im Sekunden- oder Minutenbereich) untersucht werden. Für jede dieser Aufgaben existieren inzwischen unterschiedliche Ramanmethoden, die im jeweiligen Untersuchungsfeld zu bestmöglichen Ergebnissen führen. Neben der konfokalen Ramanmikroskopie sind insbesondere die Oberflächenverstärkte (SERS) [16], [17], [18], [19] und die Fourier-transformierte (FT) [20], [21], [22], [23] Ramanspektroskopie von Bedeutung.

Die Vorteile der SERS liegen in der hohen Verstärkung der spezifischen Ramanbanden und im Quenchen der Fluoreszenz [16], die durch die Applizierung von Silber oder Schwermetall erreicht werden. Allerdings kann die erforderliche Metallkonzentration empfindliche biologische Proben zerstören. Abhilfe können hier kleine Metallspitzen bringen, die nur zur Messung auf den Messfleck gehalten werden. Die SERS wird häufig eingesetzt zur Spurenanalyse und ermöglicht unter guten Messbedingungen sogar die Untersuchung einzelner Moleküle [18]. Dies umgeht lange Kultivierungszeiten, die für herkömmliche Identifikationstechniken notwendig sind. Gleichzeitig liefert die SERS detailreiche Ramanspektren, welche eine eindeutige Probenidentifikation möglich machen, sodass Bakterien bis auf die Stammebene voneinander unterscheidbar werden.

Bei der FT-Ramanspektroskopie wird üblicherweise ein Nd:YAG-Laser (Anregungswellenlänge: 1064 nm) eingesetzt, welcher keine Fluoreszenzen mehr anregt, sodass viele biologische Proben bei dieser Anregungswellenlänge untersucht werden können. Zentrales Bauteil der FT-Ramanspektroskopie ist ein Interferometer, welches eine hohe Auflösung und die Detektion des NIR-Lichts erlaubt. Die FT-Ramanspektroskopie kann ebenfalls mit einem Mikroskop gekoppelt werden, wodurch Proben mit verhältnismäßig hoher räumlicher Auflösung ($\approx 10 \mu\text{m}$) untersucht werden können [24].

1.2 Konfokale Mikroskopie

Die Untersuchung von Zellen samt ihrer Struktur und Funktion steht im Zentrum moderner biophysikalischer und biomedizinischer Forschung. Als experimentelle Untersuchungsmethoden bieten sich daher Mikroskope an, die ein ganzes Bild einer Probe erstellen können und somit nicht nur punktuelle Informationen liefern. Zur Analyse empfindlicher biologischer Materialien scheiden Elektronenmikroskope trotz ihrer hohen Auflösung allerdings meist aus, weil die Proben nicht für elektronenmikroskopische Messungen präpariert werden können, ohne die sensiblen Strukturen zu zerstören oder zumindest zu beeinflussen. Aus diesem Grund werden häufig Lichtmikroskope eingesetzt, die keine bzw. wenig Probenpräparation erfordern und auch dickere Schichten untersuchbar machen [25].

Moderne Entwicklungen im technischen Bereich (wie die Möglichkeit zur digitalen Datenaufnahme oder die Verwendung kompakter Lasersysteme) wie auch die Entwicklung konfokaler Mikroskope, die schichtenaufgelöste Messungen mit hoher räumlicher Auflösung möglich machen, haben zu einem entscheidenden experimentellen Fortschritt geführt. So können bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewählte Bereiche einer Zelle, welche zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, dreidimensional untersucht werden. Auch die konfokale Ramanmikroskopie findet immer weiter Verbreitung, da sie die räumliche Auflösung des konfokalen Mikroskops mit der guten Spezifität der Ramanspektroskopie kombiniert und damit zu einer sehr leistungsstarken Analyse-methode wird.

1.2.1 Das konfokale Prinzip

Der Weg des Lichts durch ein konfokales Mikroskop unterscheidet sich deutlich von dem in einem Lichtmikroskop, denn während in einem konventionellen Lichtmikroskop die gesamte Probe belichtet wird und das Bild direkt mit dem Auge beobachtet werden kann, wird bei der konfokalen Mikroskopie ein fokussierter Laserstrahl über die Probe gescannt. Durch die Verwendung einer Lochblende wird die schichtenaufgelöste Untersuchung von Proben mit hoher Auflösung möglich.

Das Laserlicht wird durch ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert und wechselwirkt dort mit den Probenmolekülen. Das rückgestreute Licht wird durch das gleiche Objektiv aufgesammelt und durch das Mikroskop zurückgeleitet. Durch den Einsatz einer Lochblende, welche beim vorhandenen konfokalen Ramanmikroskop CRM200 durch eine Multimodefaser realisiert ist, gelangt hierbei nur das Licht aus der Laserfokusebene zum Detektor (s. Abb 1.2). Licht aus Ebenen ober- oder unterhalb der Fokusebene

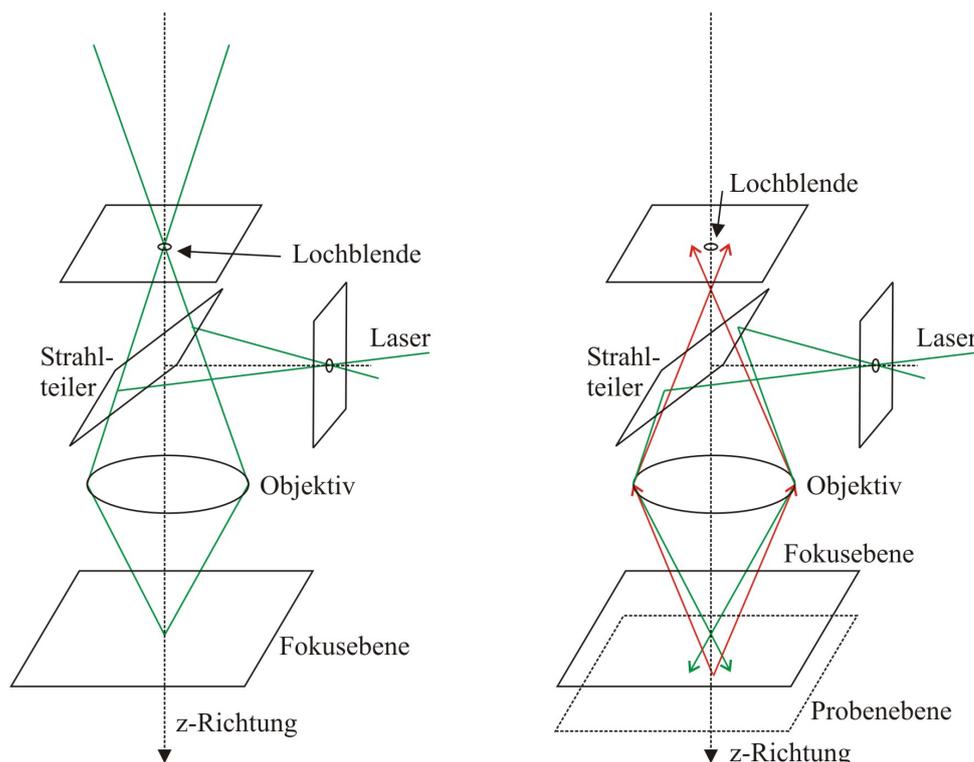


Abbildung 1.2: Das konfokale Prinzip: Durch eine kleine Lochblende wird gewährleistet, dass nur Licht aus einer bestimmten Schicht in die Faser eingekoppelt wird, welche das gestreute Licht zum Spektrometer leitet. In a) trifft das Licht aus der Fokusebene auf die Lochblende und kann weitergeleitet werden. In b) ist zu sehen, dass Licht aus Schichten oberhalb oder unterhalb der Probenebene so durch das Mikroskop zurückgeleitet wird, dass es nicht in die Lochblende fokussiert wird. Somit kann es auch nicht in das Spektrometer gelangen und zum Ramanspektrum beitragen.

wird so durch das Mikroskop abgebildet, dass es die Lochblende nicht oder nur zu einem geringen Teil passieren kann, sodass es höchstens schwach zum Spektrum beiträgt. Der größte Vorteil eines konfokalen Mikroskops verglichen mit einem konventionellen Lichtmikroskop ist somit die Unterdrückung von Beiträgen aus Schichten außerhalb des Fokus, wodurch die axiale Auflösung sowie der Bildkontrast erhöht werden.

Problematisch erscheinen im Grunde genommen zwei Dinge: Erstens muss die Probe abgerastert werden, um ein komplettes Bild zu erhalten, was die Messzeiten erhöht und gerade bei der konfokalen Ramanmikroskopie zu einem begrenzenden Faktor werden kann. Zweitens können zu tief liegende Schichten (ähnlich wie beim Lichtmikroskop) nicht mehr analysiert werden. Die mögliche Messtiefe wird einmal durch die eingesetzte Laserwellenlänge vorgegeben.¹ Aber auch die Probe an sich beeinflusst diese Messtiefe, denn stark absorbierende und dunkle Proben können nicht so gut untersucht werden wie helle Proben mit einer geringen Absorption.

Speziell bei der Ramanspektroskopie wird das resultierende Spektrum nicht nur durch

¹Licht im NIR-Bereich dringt natürlich deutlich weiter in die Probe ein als kurzwelligeres Licht.

die zu untersuchende Probe hervorgerufen, sondern auch durch ihre Umgebung, wie z.B. das Lösungsmittel bzw. Medium. Dieser Effekt führt zu einer Unschärfe des aufgenommenen Bildes und möglicherweise sogar zu einer Überlagerung der gewünschten Ramanbanden durch Raman- oder Fluoreszenzbeiträge der Umgebung.² Durch das konfokale Prinzip können die störenden Beiträge des Probenumfelds und auch Fluoreszenzbeiträge des Mediums zum Ramanspektrum unterdrückt werden, wodurch der Bildkontrast verstärkt wird. Außerdem wird eine Verbesserung der lateralen und axialen Auflösung durch Verkleinerung des Lochblendendurchmessers erwartet [26]. Dies geschieht allerdings auf Kosten der Lichtintensität, sodass zwischen optimaler Auflösung und Ausbeute am Detektor abgewogen werden muss.

Interessant erscheint insbesondere die Möglichkeit zur Unterdrückung von Fluoreszenzen, denn es konnte gezeigt werden, dass stark fluoreszierende Proben ramanspektroskopisch nicht analysierbar waren, sehr wohl aber durch konfokale Ramanmikroskopie [27]. Dies lässt sich durch die hohe Laserleistung begründen, welche die Fluoreszenz innerhalb weniger Minuten quenchen kann, außerdem führt eine weitere Verringerung der konfokalen Blende zur effektiveren Fluoreszenzunterdrückung aus Gebieten außerhalb des Laserfokus. Nicht-fluoreszierende Bereiche können somit identifiziert werden, selbst wenn die interessierenden Probenbereiche von fluoreszierendem Material umgeben sind.

1.2.2 Räumliche Auflösung

Für die konfokale Mikroskopie ist die mögliche räumliche Auflösung von entscheidender Bedeutung. Bevor Messungen gestartet werden, muss diese Auflösung also bestimmt werden, um Auskunft darüber zu erhalten, wie groß der Messfleck ist, aus welchem Licht zum Detektor gelangen kann. Auch ein beugungsbegrenzt arbeitendes optisches System kann einen Punkt nicht als solchen abbilden. Das entstehende Bild wird vielmehr durch die so genannte Punktverbreiterungsfunktion (Englisch: „point-spread function“) beschrieben, welche in diesem Fall wie ein kometenähnliches, rotationssymmetrisches Gebilde aussieht. Der Kern der Punktverbreiterungsfunktion, in welchem 86,5 % der Lichtenergie konzentriert sind, lässt sich durch einen Rotationsellipsoid beschreiben [28].

Für die Berechnung der lateralen und axialen Auflösung muss zunächst bestimmt werden, welche Art von Konfokalität vorliegt. Im Fall des hier verwendeten Lochblendendurchmessers von $50 \mu\text{m}$ liegt geometrisch-optische Konfokalität vor [28], sodass sich die laterale Auflösung nach dem bekannten Rayleigh-Kriterium bestimmen lässt: Nach diesem Kriterium können zwei Punkte aufgelöst werden, wenn das erste Minimum der

²In Zellkulturmedien werden z.B. häufig Farbindikatoren eingesetzt, die zu hohen Fluoreszenzen führen und eine ramanspektroskopische Untersuchung der Zellen unmöglich machen. Farblose physiologische Lösungen wie PBS zeigen dagegen keine Fluoreszenzen und sind für Untersuchungszwecke daher wesentlich besser geeignet.

ersten Airy-Scheibe³ in das zentrale Maximum der zweiten Airy-Scheibe fällt. Üblicherweise wird die laterale Auflösung eines konfokalen Mikroskops über den Abstand des zentralen Maximums und des ersten Minimums der Airy-Scheibe berechnet, sodass sich ergibt [29]:

$$r_{lateral} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}, \quad (1.5)$$

wobei λ die Laserwellenlänge ist und NA die numerische Apertur des verwendeten Mikroskopobjektivs. Wesentlich beeinflusst wird die Punktverbreiterungsfunktion und damit auch die Auflösung durch das Objektiv und die Anregungswellenlänge. Je kleiner die numerische Apertur des Objektivs ist, desto breiter wird die Punktverbreiterungsfunktion und desto schlechter wird damit auch das Auflösungsvermögen [30].

Die axiale Auflösung dagegen ist proportional zur Anregungswellenlänge und zum Brechungsindex des Probenmediums sowie antiproportional zum Quadrat der numerischen Apertur:

$$r_{axial} = \frac{1,4 \cdot \lambda \cdot n}{NA^2}. \quad (1.6)$$

Im Grenzfall, wenn der Durchmesser der Lochblende gegen Null geht, kann eine Verbesserung der räumlichen Auflösung um den Faktor 1,4 erreicht werden [28]. Für praktische Anwendungen ist dies allerdings nicht sinnvoll, da eine starke Verkleinerung der Lochblende eine nicht mehr akzeptable Verringerung der Effizienz bedeuten würde.

In der Praxis wird das axiale Auflösungsvermögen üblicherweise nicht berechnet, sondern direkt vermessen, indem das Intensitätsprofil einer starken Ramanbande in Abhängigkeit der z-Position des Laserfokus bestimmt wird. Eine Probe muss hierbei in axialer Richtung abgescannt werden, während die Antwortfunktion einer charakteristischen Ramanlinie in Reflexion oder Streuung detektiert wird. Die volle Halbwertsbreite des sich ergebenden Intensitätsprofils gibt direkt die axiale Auflösung an und wird beeinflusst durch die numerische Apertur des verwendeten Objektivs und durch den Lochblendendurchmesser.

Mit der konfokalen Mikroskopie können nun Zellen in lebendem Gewebe untersucht werden, ohne störende Einflüsse durch eine Probenpräparation, wie sie für die Elektronenmikroskopie nötig wäre. Darüber hinaus werden dynamische Prozesse und Strukturen zugänglich [26]. Hierbei müssen allerdings notwendige Messzeiten berücksichtigt werden. Da es sich bei der konfokalen Mikroskopie um ein rasterndes Verfahren handelt, werden kurze Belichtungszeiten benötigt, die dynamische Prozesse zeitlich auflösen können.

³Im vorliegenden Fall handelt es sich bei der Airy-Scheibe um den größten Kerndurchmesser in lateraler Richtung der Punktverbreiterungsfunktion.

Der Vorzug dieser Methode besteht im Gegenzug darin, dass die spektroskopische Information jedes einzelnen Punkts im Computer gespeichert werden kann und im Anschluss daran eine umfassendere Auswertung erlaubt. Interessante Probenbereiche können mit dieser Methode beispielsweise als dreidimensionales Bild dargestellt werden. Für das Abscannen einer Probe muss diese jedoch gut fixiert werden, da bereits Bewegungen im Mikrometerbereich einen großen Einfluss auf die Messergebnisse haben.

1.2.3 Konfokale Ramanmikroskopie

Die konfokale Ramanmikroskopie verbindet die Vorzüge der Ramanspektroskopie (spezifischer und nicht-invasiver Molekülnachweis ohne erforderliche Probenpräparation) mit der hohen axialen Auflösung ($\approx 1 - 3\mu m$) des konfokalen Mikroskops. Außerdem bietet sie eine Verbesserung der Empfindlichkeit, falls eine Resonanzverstärkung der Raman-signale nicht möglich oder gewünscht ist. Mit dieser Methode können folglich mikroskopisch kleine biologische Proben wie z.B. Einzelzellen und Chromosomen umfassend untersucht werden. Hierbei lässt sich bestimmen, an welchem Ort der Probe sich welche Moleküle befinden und in welcher Konzentration bzw. Konformation sie vorliegen. Die hohe räumliche Auflösung erlaubt die gezielte Untersuchung von Zellkernen ohne störende Beiträge zum Spektrum durch das Cytoplasma. Auf dem Gebiet der Zellbiologie ist eine besonders gewinnbringende Anwendung der konfokalen Ramanmikroskopie zur Untersuchung komplexer biologischer Strukturen wie Chromosomen oder lebender Zellen zu erwarten [15]. Auch auf dem Gebiet der Mikroorganismenidentifikation kommt der Ramanmikroskopie eine besondere Bedeutung zu, da herkömmlichen Nachweisverfahren eine teilweise mehrtägige Kultivierungsphase vorgeschaltet ist, die bei ramanmikroskopischen Untersuchungen aufgrund der sehr geringen benötigten Probenmenge nur wenige Stunden betragen muss.

Bereits 1969 wurde laut Delhaye und Dhamelincourt erstmals ein Mikroskop für raman-spektroskopische Aufnahmen verwendet [27]. Im Jahre 1993 veröffentlichte Barbillat verschiedene experimentelle Entwicklungen zur Aufnahme konfokaler Bilder, die zur Unterdrückung von Licht außerhalb der Fokusebene führten. Doch erst neuere technische Errungenschaften wie spezielle Filtersysteme zur Unterdrückung der elastischen Rayleighstreuung und empfindliche CCD-Kameras zur Aufnahme der schwachen Ramansignale haben den breiten Einsatz der konfokalen Ramanmikroskopie möglich gemacht.

Kapitel 2

Biologische Grundlagen

Biofilme sind ein weit verbreitetes Phänomen und hochaktuelles Forschungsfeld, da Biofilme nicht nur eine wesentliche Rolle in der biologischen Abwasserreinigung spielen, sondern sich in vielen Lebensbereichen auch negativ auswirken. So können sich diese Bakterienkolonien auf Zähnen ansiedeln, in Rohren oder auf Schiffsböden, wo sie große gesundheitliche bzw. finanzielle Schäden anrichten. Das genaue Verständnis über die im Biofilm ablaufenden Prozesse ist daher von großer Bedeutung, da Bakterien innerhalb eines Biofilmkomplexes deutlich widerstandsfähiger sind und sogar Resistenzen gegenüber Antibiotika entwickeln. Aus diesem Grund werden Biofilme aus unterschiedlichsten Habitaten intensiv untersucht.

Auch die Haut mitsamt der in ihr stattfindenden Reaktionen wie der Melaninsynthese wird bereits seit vielen Jahren erforscht, dennoch sind viele Vorgänge noch nicht vollständig verstanden. Das Melanin nimmt hierbei eine zentrale Stellung ein, da Melaninsynthese und die darauf folgende Hautbräunung nicht nur kosmetische Konsequenzen haben, sondern vor allem dem aktiven Schutz der Haut vor dem UV-Licht dienen. Doch bis heute ist nicht bekannt, welche ultravioletten Wellenlängen die Melaninentstehung am effektivsten anregen, sodass auch hier noch viel Forschungsbedarf besteht.

2.1 Biofilme

Unter so genannten Biofilmen werden mikrobielle Lebensgemeinschaften verstanden, welche an Grenzflächen mit (mindestens) einer wässrigen Phase wachsen [1]. Wenn Mikroorganismen an dieser Grenzfläche vorbeischwimmen und an ihr haften bleiben, entstehen zunächst kleine Mikrokolonien aus Bakterien, welche schließlich in eine gelartige Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet werden, die sie selbst

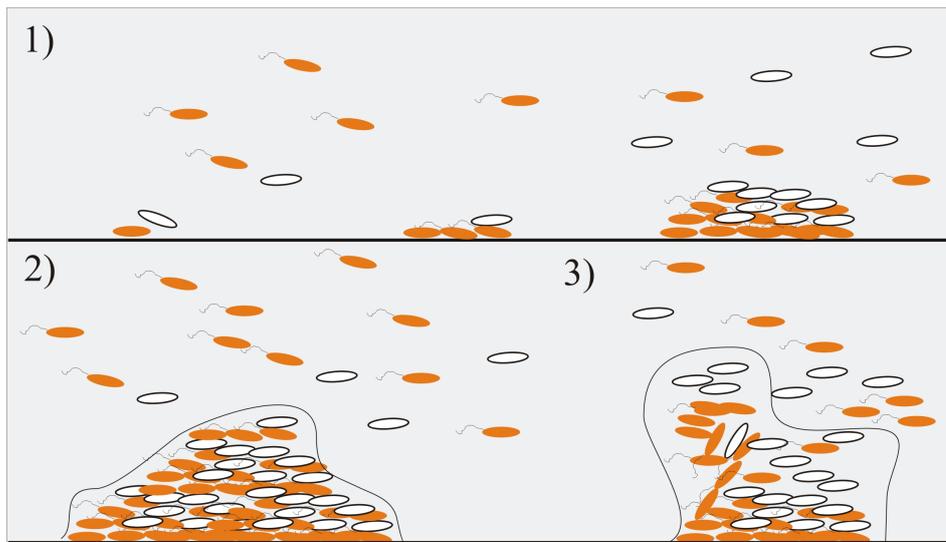


Abbildung 2.1: Entstehung eines Biofilms auf einem festen Substratum: Mikroorganismen strömen am Substratum vorbei. Anfangs bleiben nur wenige Mikroorganismen haften (1), es entstehen Mikrokolonien. Mit zunehmender Biofilmdicke bilden die Mikroorganismen EPS aus, welche für die Biofilmstabilität sorgen (2). Wenn der Biofilm zu dick wird bzw. die Scherkräfte durch die Strömung zu stark, kommt es zur Ablösung (3).

produzieren (s. Abb. 2.1). Bestandteil der stark wasserhaltigen EPS, welche 70-95 % der Trockenmasse eines Biofilms ausmachen, sind Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine und Lipoproteine. Die EPS nehmen eine Schlüsselfunktion für die Biofilmstruktur, -funktion und -organisationsform ein und beeinflussen seine Eigenschaften [31]. Biofilme sind für Mikroorganismen die bevorzugte Lebensform, weil diese feste Struktur die in ihr lebenden Organismen vor schädlichen Umwelteinflüssen schützt. Sogar langsam wachsende Mikroorganismen (wie z.B. die hier interessierenden *Candidatus „Brocadia Anammoxidans“* und *Candidatus „Kuenenia Stuttgartiensis“*) können sich in einem Biofilm ansiedeln, da sie nicht ausgeschwemmt werden [32].

Das Wachstum eines Biofilms wird bestimmt durch das vorhandene Nährstoffangebot, während die Ablösung von Teilen des Biofilms durch die Scherkräfte des vorbei strömenden Wassers beeinflusst wird. Die Dichte eines Biofilms nimmt von seiner Oberfläche zur Aufwuchsfläche hin zu. Biofilme stellen im Allgemeinen eine Diffusionsbarriere für Substanzen dar, sodass schädliche Stoffe die im Biofilm wohnenden Mikroorganismen schwerer erreichen können. Dies ist ein weiteres Anzeichen dafür, wie sinnvoll die Zusammenschließung zu einem Biofilm ist.

Trotz ihrer weiten Verbreitung und großen Bedeutung in vielen Lebensbereichen konnten Biofilme lange Zeit nicht effektiv analysiert werden. Es fehlten die erforderlichen Messmethoden, die in der Lage sind, den Biofilm umfassend zu untersuchen, ohne die komplizierten Vorgänge im Biofilm zu stören. Die heute wichtigsten Untersuchungsmethoden stellen Mikroelektroden und die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie dar, die

nicht nur die Biofilmstruktur analysieren können, sondern auch punktuelle Informationen über die Stoffe im Biofilm liefern [32].

Stofftransport über Konvektion bzw. Diffusion und auch Stoffreaktionen sind die wichtigsten Vorgänge im Biofilm. Je nach Biofilmstruktur und -charakteristika sowie mikrobiellen Umsatzgeschwindigkeiten können sich im Inneren eines Biofilms mehr oder weniger starke Konzentrationsgradienten ausbilden, die eine Schichtung von Mikroorganismen in unterschiedlichen Tiefen ermöglichen. Speziell die Sauerstoffkonzentration nimmt zur Aufwuchsfläche des Biofilms hin ab, sodass sich in tieferen Schichten des Biofilms anoxische und anaerobe Bereiche ausbilden. Hier können die jeweiligen Mikroorganismen leben, die für Denitrifikation und den Anammoxprozess zuständig sind. Diese Schichtung ist es, die Biofilme für die biologische Abwasserreinigung so interessant macht, da sich unterschiedliche Mikroorganismen im Biofilm anreichern lassen, die für die verschiedenen Stoffwechselreaktionen verantwortlich sind. Aus diesem Grund werden Biofilme seit geraumer Zeit zur Abwasserreinigung eingesetzt.

2.2 Biologische Abwasserreinigung

Wasser ist für den Menschen lebensnotwendig, kann jedoch nicht beliebig nachgeliefert werden. Daher muss es das Ziel der Abwassertechnik sein, das Abwasserreinigungsverfahren immer weiter zu verbessern. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hierbei auf biologischen Reinigungsverfahren, welche biologisch abbaubare Schmutzstoffe eliminieren. Neue Vorgaben des Gesetzgebers erfordern eine stetige Weiterentwicklung der Abbauverfahren, die auch aktuellen Anforderungen gerecht werden können [32].

2.2.1 Anaerobe Ammoniumoxidation

Aufgrund thermodynamischer Berechnungen wurde im Jahr 1977 vorhergesagt, dass Ammonium auch unter anoxischen Bedingungen oxidiert werden kann [33], doch erst 1995 konnte diese Reaktion experimentell bestätigt werden [34]. Bis heute liegen die für die anaerobe Ammoniumoxidation¹ verantwortlichen Bakterien nicht in Reinkultur vor. Anammoxbakterien konnten jedoch unter Idealbedingungen hoch angereichert und über einen Percoll-Dichtegradienten aus dem Biofilm heraus „isoliert“² werden, sodass die genaue Identifikation und die Analyse ihrer Physiologie möglich waren.

¹Als Abkürzung wird im Folgenden stets nur noch „Anammox“ verwendet.

²Durch einen Percoll-Dichtegradienten können Anammoxbakterien weiter aufgereinigt werden. In diesem Sinne ist „isoliert“ im Zusammenhang mit dem in Referenz [35] beschriebenen Verfahren zu verstehen.

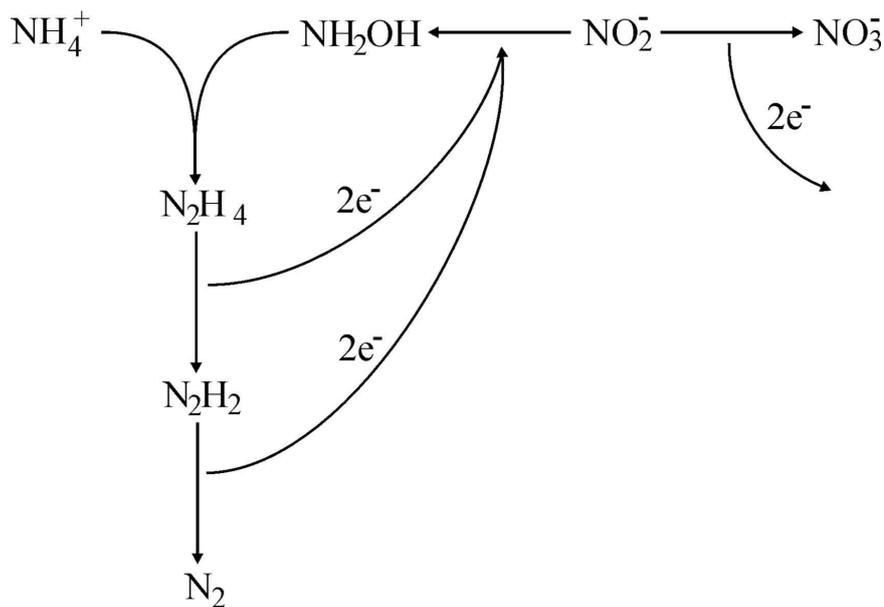


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der anaeroben Ammoniumoxidation: Ammonium wird mit Hydroxylamin über Hydrazin und Diimin zu molekularem Stickstoff oxidiert, während die frei werdenden Elektronen der Reduktion von Nitrit zu Hydroxylamin dienen [37].

Inzwischen konnten drei verschiedene Bakteriengattungen identifiziert werden, welche zu der anaeroben Ammoniumoxidation in der Lage sind, nämlich *Candidatus* „Brocadia Anammoxidans“, *Candidatus* „Kuenenia Stutgartensis“ und *Candidatus* „Scalindua Sorokinii“, welche der Ordnung Planctomycetales zugeordnet werden konnten und bis heute noch Kandidatenstatus haben. Darüber hinaus wurden diese Bakterien in zahlreichen Frischwasser- und Meeresökosystemen wie dem Schwarzen Meer gefunden, sodass davon auszugehen ist, dass Anammox möglicherweise die Hälfte der marinen N_2 -Produktion ausmacht [36].

Anammox stellt ein neues und kostengünstiges Verfahren zum Abbau von Stickstoff in der biologischen Abwasserreinigung dar, welches nach dem Schema aus Abb. 2.2 abläuft. Hierbei wird Ammonium NH_4^+ mit Hydroxylamin NH_2OH über Hydrazin N_2H_4 und Diimin N_2H_2 zu molekularem Stickstoff N_2 oxidiert, während die frei werdenden Elektronen der Reduktion von Nitrit NO_2^- zu Hydroxylamin dienen [37]. Eine Besonderheit ist das Auftauchen von Hydrazin als Zwischenprodukt der Reaktion. Kurz lässt sich die Reaktion wie folgt schreiben [38]:



Im Fall hoch stickstoffhaltiger Abwässer können mit Hilfe des Anammoxprozesses etwa 90 % der Betriebskosten einer Kläranlage eingespart werden, da Anammox die Denitrifikation ersetzen kann und hierbei 50 % weniger Sauerstoffeintrag notwendig ist [39].

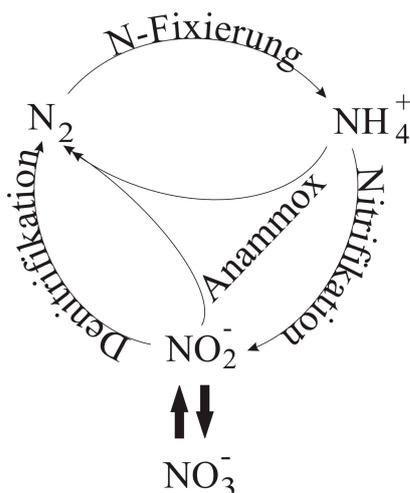


Abbildung 2.3: Der natürliche Stickstoffkreislauf mit Anammox: Über die Reaktionen der Nitrifikation und der Denitrifikation wird traditionell Ammonium zu molekularem Stickstoff umgesetzt. Anammox ist die einstufige Abkürzung dieses Prozesses und wurde erst Mitte der 1990-er Jahre experimentell entdeckt [38].

Zur Anreicherung von Anammoxorganismen hat sich das Prinzip des Sequencing Batch Reactor (SBR) am effektivsten erwiesen. Im SBR bilden Anammoxbakterien Granula, welche sich gut absetzen und somit leicht im Reaktor zurückgehalten werden können.

2.2.2 Stickstoffkreislauf

Obwohl Anammoxbakterien über sehr lange Generationszeiten verfügen, spielen sie eine wichtige Rolle im Stickstoffkreislauf in natürlichen Ökosystemen (wie dem Ozean). Entscheidend ist hierbei, dass Anammox einen neuen und vor allem vielversprechenden Pfad im natürlichen Stickstoffkreislauf darstellt (s. Abb. 2.3). Der Anammoxprozess könnte in der technischen Abwasserreinigung den klassischen Weg über die Nitrifikation und die Denitrifikation ersetzen, da er signifikant weniger Energie benötigt. Externe Kohlenstoffquellen werden nicht länger benötigt und auch der Sauerstoffbedarf wird deutlich verringert. Durch die langen Wachstumszeiten der Anammoxorganismen entsteht darüber hinaus wesentlich weniger Überschussschlamm, sodass Anammox diese entscheidenden Vorteile mit sich bringt.

2.3 Abwasserrelevante Bakterien

Durch die genaue Untersuchung von verschiedenen Abwasserreinigungssystemen und Frischwasserökosystemen konnten zahlreiche Anammoxpopulationen gefunden werden.

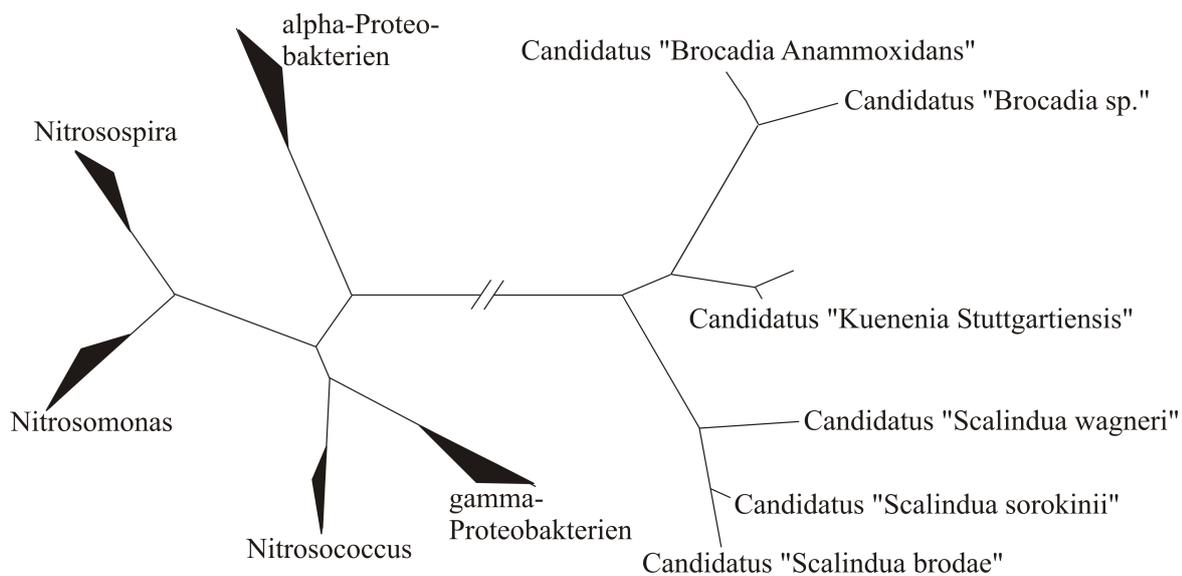


Abbildung 2.4: Phylogenetische Beziehungen von Anammoxbakterien verglichen mit aeroben Ammoniumoxidierern (nach [36]). Die horizontale Linie steht für eine 10%ige Änderung der 16S rRNA Gensequenz.

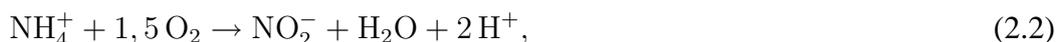
Drei verschiedene Gattungen von Anammoxbakterien wurden hierbei identifiziert, nämlich *Brocadia* (*B. Anammoxidans*, *B. fulgida*), *Kuenenia* (*K. Stuttgartiensis*) und *Scalindua* (*S. wagneri*, *S. brodae*, *S. sorokinii*), welche alle drei aus der Abstammungslinie der Ordnung der Planktomyzeten abzweigen (s. Abb. 2.4) [36]. Obwohl alle drei Gattungen über den gleichen Metabolismus verfügen und über eine ähnliche Struktur, liegt ihre Übereinstimmung in den 16S rRNA Gensequenzen bei etwa 90 % [7].

Die meisten Informationen über Anammox wurden aus hochangereicherten Kulturen von *Brocadia Anammoxidans* erhalten. So ist heute bekannt, dass sich Anammoxbakterien durch ein sehr langsames Wachstum auszeichnen. Unter Idealbedingungen wird eine Verdopplungszeit von 11 Tagen angegeben, unter Betriebsbedingungen werden eher zwei bis drei Wochen erwartet [36]. Die Anammoxbakterien sind für ihre Reaktion auf benachbarte Nitritquellen angewiesen. Bei diesen Nitritquellen kann es sich um Ammoniumoxidierer handeln, welche Ammonium zu Nitrit umwandeln, aber auch die Denitrifikation, d.h. die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, kann eine mögliche Nitritquelle sein. Welche Nachbarschaftsverhältnisse in Biofilmen für Anammoxbakterien wirklich vorherrschen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Wie andere Vertreter der Ordnung der Planktomyzeten verfügt auch *Brocadia Anammoxidans* über eine Zellwand aus Proteinen. Der Anammoxstoffwechsel läuft jedoch autotroph ab, das heißt, Anammoxbakterien benötigen keine organischen Stoffe zum Überleben. Der vielleicht wichtigste Unterschied findet sich aber in der außergewöhnlichen Membranstruktur des Anammoxosoms, also des Zellorganells eines Anammoxbakteriums. Diese besonders dichte Membran besteht aus drei bis fünf zusammengesetzten Cy-

lobutanringen, welche die so genannten Ladderane bilden [40]. Die im Anammoxosom gefundenen Ladderanstrukturen sind einzigartig in der Natur.

Doch die Anammoxbakterien sind nicht alleine für den Stickstoffabbau im Abwasser verantwortlich. Für die Oxidation von Ammonium zu Nitrat sind zwei verschiedene Bakteriengattungen verantwortlich, und zwar Ammoniumoxidierer (z.B. *Nitrosomonas*) und Nitritoxidierer (z.B. *Nitrobacter*). *Nitrosomonas* übernimmt hierbei die Ammoniumoxidation:



während *Nitrobacter* für die Nitritoxidation zuständig ist [32]:



Beide Bakteriengattungen werden unter dem Begriff Nitrifikanten zusammengefasst. Charakteristisch für die Nitrifikanten ist ihre langsame Wachstumsdauer. An den obigen Gleichungen kann abgelesen werden, dass beide Reaktionen Sauerstoff benötigen und folglich in sauerstoffreichen Zonen des Biofilms ablaufen müssen. Anammox dagegen wird durch Sauerstoff gehemmt und eher in tieferen Biofilmschichten ablaufen. *Nitrobacter* und *Nitrosomonas* sind eng miteinander verknüpft, da *Nitrobacter* nur geringe Ammoniumkonzentrationen verträgt und daher auf den Umsatz der *Nitrosomonas* bzw. anderen Ammoniumoxidierern angewiesen ist. Folglich ist zu erwarten, dass sich im Biofilm Bakteriengattungen nicht isoliert voneinander anordnen, sondern in enger Kooperation anzutreffen sind. Hier setzt die konfokale Ramanmikroskopie ein, welche diese Nachbarschaftsverhältnisse aufklären kann.

2.4 Melanin

Insbesondere im Zusammenhang mit der Abnahme der stratosphärischen Ozonkonzentration und der dadurch angestiegenen Zahl von Hautkreberkrankungen kommt dem Pigment Melanin³ eine immer wichtigere Bedeutung zu. Das Melanin ist derjenige Farbstoff, welcher für die Färbung der Haut zuständig ist und damit für den hauteigenen Sonnenschutz sorgt.

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und wiegt zwischen 3,5 und 10 kg. Sie

³Hierbei werden zwei unterschiedliche Melanine unterschieden: Phäomelanin (gelblich bis rot) und Eumelanin (schwarz-braun).

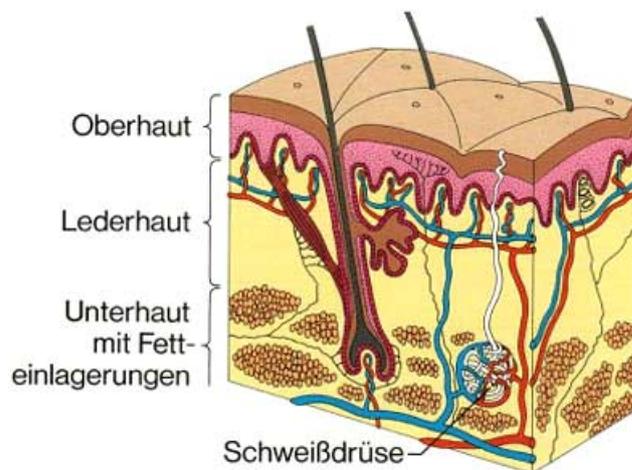


Abbildung 2.5: Aufbau der menschlichen Haut: Abgebildet sind die drei verschiedenen Hautschichten. Die Melanozyten finden sich in der untersten Schicht der Epidermis (Oberhaut) in der so genannten Basalzellschicht [42].

übernimmt eine Vielzahl von Schutzfunktionen (Wärmespeicher, Schutz vor schädlichen äußeren Einflüssen wie Kälte, Hitze, Strahlung oder auch Mikroorganismen etc.) und ist aufgeteilt in drei Schichten (s. Abb. 2.5): die Epidermis, die Dermis und die Subcutis, wobei die jeweiligen Schichtdicken je nach Körperregion variieren können.

Die Epidermis (Oberhaut) wird nochmals in mehrere Schichten unterteilt (Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale). Die für die Melaninproduktion wichtigen Melanozyten, in welchen das Melanin synthetisiert wird, befinden sich in der so genannten Basalzellschicht, dem Stratum basale, und machen etwa 8 bis 10 % der epidermalen Zellen aus [41].

In der heutigen Zeit, in der bei abnehmender Ozonschicht der Sonnenkonsum der Menschen durch ein verändertes Freizeitverhalten (z.B. die gestiegene Zahl der Solarienbesuche) und durch die gesteigerte Mobilität⁴ immer weiter zunimmt, muss die Haut immer größeren Belastungen durch Licht und hier speziell UV-Licht standhalten. Das ultraviolette Sonnenlicht kann zahlreiche Auswirkungen auf die Haut haben, hier sind insbesondere DNS-Schäden⁵, Apoptose und Stimulation der Melanogenese als Sofortfolgen zu nennen, Spätfolgen können Hautalterung und Photokarzinogenese sein [41].

Das UV-Licht wird in drei Bereiche eingeteilt, nämlich in das UV-A (ca. 315-400 nm), das UV-B (ca. 280-315 nm) und das UV-C (ca. 100-280 nm). Der UV-C-Anteil des Sonnenlichts wird komplett durch die intakte Ozonschicht absorbiert⁶, während fast das gesamte

⁴Dieser Faktor wirkt sich beispielsweise aus durch mehr Badeurlaube in sonnenintensiven Ländern oder auch die gestiegene Anzahl hellhäutiger Emigranten in Ländern wie Australien.

⁵DNS steht als Abkürzung für Desoxyribonukleinsäure.

⁶Die Filterfunktion der Ozonschicht ist stark wellenlängenabhängig, UV-Licht mit Wellenlängen un-

UV-A-Licht die Erde erreicht und immerhin etwa 10 % des UV-B-Lichts. Mit sinkender Ozonkonzentration in der Stratosphäre erhöht sich insbesondere der UV-B-Anteil auf der Erde, während UV-C-Strahlung weiterhin nur in sehr geringen Mengen die Erdoberfläche erreicht. Die Eindringtiefen der unterschiedlichen UV-Bereiche in die Haut variieren sehr stark. Wichtig ist hierbei, dass über die Hälfte des UV-A-Lichts bis zu 5 mm eindringen und somit auch tiefe Hautschichten erreichen kann. UV-A-Licht ist daher beispielsweise Verursacher von Falten. Das UV-B-Licht hingegen dringt zwischen 50 und 100 μm in die Haut ein und ist in der Lage, die Keratinozyten zu schädigen. In den Zellen absorbiert vor allem die DNS das schädliche UV-Licht, sodass hier die Schutzfunktion des Melanins einsetzen muss. Zum Schutz vor gefährlicher Strahlung besitzt die menschliche Haut im Wesentlichen zwei Abwehrmechanismen, und zwar eine epidermale Verdickung sowie die Stimulation der Melaninsynthese durch die Melanozyten mit anschließender Bräunung, welche als effektivere Maßnahme gilt.

2.4.1 Melaninproduktion in den Melanozyten

Die Farbe der menschlichen Haut wird vor allem durch vier verschiedene Pigmente bestimmt: Karotinoide geben der Haut eine gelbliche Farbe, Melanin eine braune Färbung, mit Sauerstoff angereichertes Hämoglobin färbt die Haut in den Kapillaren rötlich, während reduziertes Hämoglobin in den Venen der Dermis der Haut eine bläuliche Farbe gibt [44]. Melanin jedoch ist der ausschlaggebende Farbstoff, der für einen individuellen Hautton sorgt.

Eine wichtige Schlüsselfunktion im Prozess der Hautpigmentierung nehmen die Melanozyten ein, in denen das Melanin synthetisiert wird. Die Melanozyten bilden lange Dendriten zu den umliegenden Keratinozyten aus, über welche das Melanin in Form von Melanosomen transportiert werden kann (s. Abb. 2.6). In der menschlichen Epidermis versorgt hierbei ein Melanozyt insgesamt 30 bis 40 Keratinozyten mit Melanin, wobei die Menge an Melanin die Hautunterschiede zwischen ethnischen Gruppen hervorruft und das Melanin zum Schutz der Haut vor gefährlichem UV-Licht dient. Die Prozesse, welche der Melaninentstehung zugrunde liegen sowie ihre Regulierung als Antwort auf eine Hautbräunung, sind bis heute noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Aber auch über das gesamte Aufgabenfeld der Melanozyten ist noch nicht alles bekannt, so sind Melanozyten mehr als reine Melaninproduzenten, sie reagieren auch auf Stress und senden wichtige Botenstoffe aus [45].

Die Anzahl der Melanozyten ist in unterschiedlichen ethnischen Gruppen und Hauttypen

terhalb von 330 nm wird durch das stratosphärische Ozon stark abgeschwächt. Durch die Ozonabnahme erhöht sich generell die Bestrahlungsstärke, zusätzlich verschiebt sich die Grenzwellenlänge, unterhalb derer alles Licht von der Ozonschicht absorbiert wird. Dadurch erreicht mehr hochfrequentes UV-Licht die Erde [43].

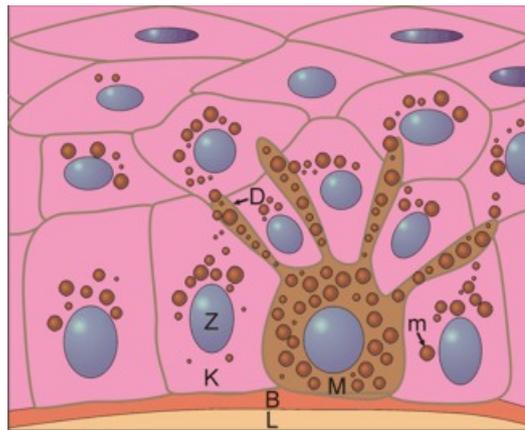


Abbildung 2.6: Melanintransport: Das Melanin wird in den Melanozyten (M) synthetisiert und über die Dendriten (D) in Form von Melanosomen (m) an die umliegenden Keratinozyten (K) weitergegeben. In den Keratinozyten ordnet sich das Melanin fächerartig über den Zellkernen (Z) an, um diese vor eindringendem UV-Licht zu schützen [46].

gleich und bestimmt folglich nicht die Hautfärbung. Entscheidend ist vielmehr die Art des vorhandenen Melanins, so dominiert das rötlich-gelbe Phäomelanin bei hellen Hauttypen, während bei dunklen Hauttypen eher das dunkle Eumelanin vorliegt, welches einen größeren Hautschutz bietet.

Die Melaninsynthese findet in speziellen intrazellulären membranumgebenen Organellen, den Melanosomen, statt. Diese entstehen aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Eine wichtige Rolle in der Hautbräunung spielt unter anderem das so genannte α -MSH (α -Melanozyten stimulierendes Hormon), welches die Melanogenese stimulieren und darüber hinaus das Verhalten der Melanozyten beeinflussen kann. Nach der Melaninbildung werden die Melanosomen zu den Keratinozyten abgegeben, wo sich das Melanin fächerartig um die Zellkerne anordnet, um diese vor eindringendem UV-Licht zu schützen. Die Größe und Anzahl der Melanosomen bestimmen die Hautpigmentierung. Der Transportvorgang der Melanosomen zu den Keratinozyten ist bislang nicht vollständig aufgeklärt und birgt noch viel Potenzial für weitere Forschung [45].

Beim Menschen werden zwei verschiedene Hautpigmentierungen unterschieden, nämlich die konstitutive und die induzierte Hautfarbe. Erstere ist unabhängig von der Sonneneinstrahlung und wird durch die Menge an Melanin hervorgerufen, welche aufgrund genetisch bedingter zellulärer Vorgänge produziert wird. Die induzierte Hautfarbe ist durch Lichteinfall bestimmt und unterteilt sich in die Sofortpigmentierung, welche nach wenigen Minuten einsetzt, und die verzögerte Pigmentierung, die zwei bis drei Tage später zu bemerken ist [44].

Die Sofortpigmentierung wird hauptsächlich durch UV-A-Licht hervorgerufen und besteht in einer Photooxidation des vorhandenen Melanins, während die verzögerte Pig-

mentierung sowohl durch UV-A als auch durch UV-B ausgelöst wird. Als Folge nimmt die Anzahl der aktiven epidermalen Melanozyten zu, die Ausschüttung von Tyrosinase und anderen wichtigen Proteinen steigt an, wodurch die Melanogenese stimuliert wird. Weiterhin bilden die Melanozyten nach UV-Einstrahlung mehr Dendriten aus, sodass die Interaktion zwischen Melanozyten und Keratinozyten verbessert wird und hierdurch der Transport der Melanosomen ansteigen kann [45].

Zellen verfügen über Reparaturmechanismen, mit denen sie auf starke UV-Einwirkungen reagieren können. Wenn aber die DNS-Schäden zu groß sind, sterben die Zellen durch Apoptose oder überleben mit ihren Schädigungen weiter und können somit zu malignen Mutationen führen. In diesem Fall ist der programmierte Zelltod vorzuziehen, der sich beispielsweise beim Sonnenbrand zeigt. Zahlreiche Studien haben inzwischen zeigen können, dass nicht nur der absolute Melaningehalt der Haut einen wesentlichen Einfluss auf den hauteigenen UV-Schutz hat, sondern auch die Verteilung der Melanosomen sowie das Verhältnis von Phäomelanin und Eumelanin zueinander. Aber auch die Keratinozyten müssen berücksichtigt werden, da Melanozyten in Co-Kultur mit Keratinozyten eine verstärkte Melanogenese nach UV-Wirkung gezeigt haben [41]. All diese Parameter sind durch aktuelle Messtechniken zugänglich geworden und insbesondere das Zusammenspiel von Melanozyten und Keratinozyten kann in einer Co-Kultur mittels konfokaler Ramanmikroskopie umfassend analysiert werden.

Kapitel 3

Material und Methoden

Das am Institut für Biophysik vorhandene konfokale Ramanmikroskop CRM200 der Firma WITec erwies sich bei der Untersuchung abwasserrelevanter Bakterien und auch bei der Analyse von Zellkulturen als außerordentlich leistungsstark. Für die eindeutige Bestimmung von Bakterien ist eine hochsensitive Messmethode erforderlich, welche Mikroorganismen bereits in sehr geringen Probenmengen bestimmen und voneinander differenzieren kann [47], [48], [49], [50].

In unterschiedlichen Lebensbereichen ist die nicht-invasive, also die zerstörungsfreie und berührunglose, Untersuchung von Mikroorganismen von großem Interesse. In Krankenhäusern steht mit der Ramanspektroskopie eine Analysemethode zur Verfügung, die Bakterien eindeutig und nach kürzerer Kultivierungszeit als bisherige biologische Methoden bestimmen kann. Dies erlaubt eine bedeutend schnellere, gezielte Medikation für die betroffenen Patienten [51], [52], [53], [54].

Aber auch in der Abwassertechnik werden Methoden benötigt, welche unbekannte Mischkulturen ohne nötige Probenaufbereitung analysieren können. So ist es von entscheidender Bedeutung, die genaue mikrobielle Zusammensetzung einer Mischkultur bzw. eines Biofilms zu kennen, um Anfahrstrategien oder auch Reaktorlebensbedingungen zu optimieren. Für die Bestimmung der in einem Biofilm enthaltenen Bakterien wird nach wie vor die fluoreszente in situ Hybridisierung (FISH) eingesetzt, zum Teil kombiniert mit der so genannten Mikroautoradiographie, bei der radioaktive Tracer in die Mischkultur eingebracht werden müssen. Die speziellen Sonden sind jedoch kostenintensiv und benötigen eine aufwändige Probenvorbereitung des Biofilms, die für ramanmikroskopische Messungen nicht notwendig ist [4], [55], [56], [57].

Für die Analyse von Zellkulturen muss eine Methode verwendet werden, die zusätzlich zu der Substanzspezifität auch hohe räumliche Auflösung ermöglicht, da Strukturen innerhalb der Zelle Ausmaße typischerweise im Mikrometerbereich besitzen. Auch für

diese Erfordernisse ist die konfokale Ramanmikroskopie ideal, da sie beugungsbedingte laterale Auflösung liefert und außerdem eine axiale Auflösung im Bereich von 1-2 μm . Diese ist ausreichend, um gängige Zelltypen wie Granulosazellen oder Melanozyten im Hinblick auf spezielle Fragestellungen intensiv zu untersuchen.

3.1 Konfokales Ramanmikroskop CRM 200

Da es sich beim Ramaneffekt um einen sehr schwachen Wechselwirkungsprozess handelt, konnte sich die Ramanspektroskopie erst mit Erfindung der Laser etablieren. Aber auch technische Weiterentwicklungen wie die stetig leistungsfähiger werdenden CCD-Kameras, von denen die aktuellsten bereits einzelphotonenempfindlich sind, tragen erheblich zum Erfolg der Ramanspektroskopie bei.

Beim eingesetzten konfokalen Ramanmikroskop CRM200 der Firma WITec wird der Laser über ein Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert (s. Abb. 3.1) und ermöglicht dadurch die Untersuchung mikroskopisch kleiner Proben. Das rückgestreute Licht wird vom gleichen Objektiv aufgesammelt und über eine Multimodefaser, die gleichzeitig als Lochblende dient, zu einem Gitterspektrometer geführt. Zur Abschwächung der intensiven Rayleighbande werden wahlweise Kantenfilter oder Super-Notch-Filter eingesetzt. Als Detektor kamen für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse eine Avalanche Photodiode (APD) und eine CCD-Kamera (charged-coupled device camera) zum Einsatz. Die Aufnahme eines Bildes geschieht durch das Abscannen der Probe mittels eines piezoelektrischen Scantischs, der lateral eine Genauigkeit von 3 nm aufweist. Der Scan erfolgt ohne Drift und Hysterese-frei [58].

Der Versuchsaufbau besteht im Wesentlichen aus folgenden zentralen Bauteilen:

- Konfokales Ramanmikroskop CRM 200 der Firma WITec aus Ulm,
- ein frequenz-verdoppelter Nd:YAG-Laser (532 nm, WG-SLM-020) mit maximal 13 mW auf der Probe,
- Wasserimmersionsobjektiv (NIKON CFI Fluor 60x; NA 1,0) oder Ölimmersionsobjektiv (Nikon CFI Achromat 100x; NA 1,25; 0,17 mm Deckglas-korrigiert),
- drei mögliche Lochblenden mit den Durchmessern 25 μm , 50 μm oder 100 μm ,
- Gitterspektrometer Acton 308-SP (drei verschiedene Gitter: 150 $\frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$, 600 $\frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$ oder 1200 $\frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$)¹,
- Avalanche Photodiode (SPCM-AQR) oder CCD-Kamera (DU401-BR-DD, Andor).

¹ Alle später gezeigten Ramanspektren wurden aufgenommen unter Verwendung des 600 $\frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$ -Gitters.

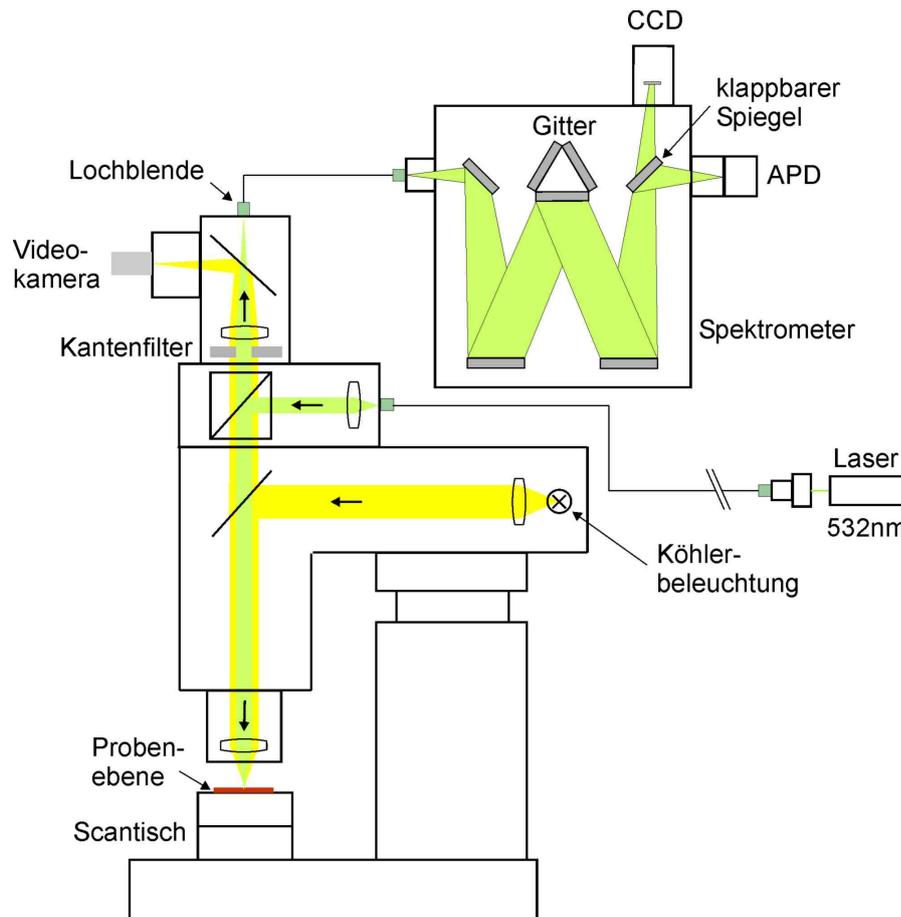


Abbildung 3.1: Aufbau des konfokalen Ramanmikroskops CRM200: Der Laser wird über eine Single-mode-faser in das Mikroskop eingekoppelt und über einen holografischen Bandpassfilter in Richtung Mikroskopobjektiv gelenkt. Nach Durchgang durch einen Strahlteiler fokussiert das Objektiv das Laserlicht auf die Probenebene, in der die Probenmoleküle angeregt werden. Das gleiche Objektiv sammelt das rückgestreute Licht auf und leitet es zurück durch das Mikroskop. Nach dem holografischen Bandpassfilter muss es den Kantenfilter passieren, wo das elastisch gestreute Licht zu einem wesentlichen Teil geblockt wird. Am Kopf des Mikroskops findet sich die Lochblende, welche Licht aus Schichten außerhalb der Fokusebene diskriminiert. Die Multimodefaser leitet im Wesentlichen nur das Licht aus der Fokusebene zum Gitterspektrometer. Im Spektrometer wird das Licht durch ein Gitter aufgeweitet und über einen klappbaren Spiegel auf eine der beiden Detektionseinheiten gelenkt.

3.1.1 Anregungslaser

Als Lichtquelle standen prinzipiell zwei verschiedene Anregungslaser zur Verfügung und zwar ein dioden-gepumpter Nd:YAG-Laser im grünen Spektralbereich (532 nm) und ein Diodenlaser mit Anregungswellenlänge im nahen Infrarot (NIR, 785 nm). Aufgrund der sehr geringen Quantenausbeute der Ramanstreuung, welche um mehrere Größenordnungen schwächer ausfällt als die Fluoreszenz, werden zur Untersuchung biologischer Proben oftmals Laser im NIR eingesetzt, welche üblicherweise keine Fluoreszenzen anregen. Aufgrund der $I \propto \omega^4$ -Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz wird mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser jedoch fast die fünffache Signalintensität erreicht.

Eine Anregung im NIR bringt dem gegenüber den Vorteil einer höheren Eindringtiefe mit sich. Die zu untersuchenden, deammonifizierenden Biofilme bestehen größtenteils aus kleinen Granula, welche einen Durchmesser von etwa einem Millimeter haben. Ein grüner Anregungslaser kann allerdings nur etwa die obersten $100\ \mu\text{m}$ der Probe untersuchen, da er keine größeren Tiefen erreicht. Im NIR wird die Analyse bis in eine Tiefe von etwa $500\ \mu\text{m}$ möglich, die selbstverständlich ein deutlich kompletteres Bild von der Probe liefern kann. Dennoch hat sich aus mehreren Gründen die Verwendung des grünen Lasers als vorteilhafter erwiesen:

- Bei Anregung im NIR bieten die Ramanspektren keine so schmalbandigen und intensiven Ramanpeaks wie bei Anregung im grünen Bereich [59], sodass insbesondere die Differenzierung von Bakterienspektren deutlich erschwert wird.
- Die Aufnahme von signifikanten Ramanspektren erfordert Belichtungsdauern von etwa 1-5 s pro Messpunkt. Da die Probe abgescannt werden muss, ergeben sich je nach gewünschtem Bildausschnitt Messdauern von einigen Stunden bis Tagen. Aus rein praktikablen Gründen ist es daher ohnehin unmöglich, ein Granulum komplett abzurastern, sodass auch bereits die Analyse der obersten $100\ \mu\text{m}$ eine extrem aufwändige Messaufgabe darstellt.
- Eine Messung in zu hoher Tiefe macht auch physikalisch wenig Sinn, da nur das rückgestreute Licht, welches wieder das Mikroskopobjektiv erreicht, detektiert werden kann. Da der Biofilm jedoch sehr heterogen aufgebaut ist, erreichen kaum Ramanphotonen aus einer Tiefe von $500\ \mu\text{m}$ wieder die Oberfläche, sodass hier keine sinnvollen Aussagen mehr möglich wären.

3.1.2 Objektiv

Das Mikroskopobjektiv nimmt eine zentrale Stellung des konfokalen Mikroskops ein, da es das Laserlicht auf die Probe fokussiert und darüber hinaus das rückgestreute Licht wieder einsammelt. Das Objektiv trägt entscheidend zur Qualität der aufgenommenen Spektren bei. Die numerische Apertur (NA) des Objektivs bestimmt dabei die Effizienz des Mikroskops und ist gegeben durch $NA = n \cdot \sin\theta_{max}$, wobei θ_{max} den Akzeptanzwinkel des Objektivs angibt und n den Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe. Die Vergrößerung des Objektivs ist bei der konfokalen Mikroskopie sekundär, da der Bildausschnitt durch die Scanweite gegeben ist. Sie wird nur benötigt für die optimale Wahl des Lochblendendurchmessers. Die Verwendung eines Immersionsobjektivs kann sich für die Effizienz und die räumliche Auflösung von Vorteil erweisen, zumal die Brechungsverluste verringert werden [27].

Zusammen mit der Anregungswellenlänge und der Lochblende, welche realisiert ist durch die Multimodefaser, bestimmt das Objektiv durch seine numerische Apertur wesentlich die räumliche Auflösung des konfokalen Mikroskops. Die in den Ergebniskapiteln vorgestellten Experimente wurden mit zwei verschiedenen Objektiven durchgeführt: Für die Bakterienmessungen wurde das Ölimmersionsobjektiv eingesetzt, die Messungen an Zellen fanden im wässrigen Medium statt und daher mit dem Wasserimmersionsobjektiv. Aus obigen Werten ergeben sich bei Verwendung einer Lochblende von $50\ \mu\text{m}$ für die Objektive folgende Parameter für die räumliche Auflösung:

1. **Wasserimmersionsobjektiv:** axial: $2,0\ \mu\text{m}$, lateral: $325\ \text{nm}$
2. **Ölimmersionsobjektiv:** axial: $1,75\ \mu\text{m}$, lateral: $260\ \text{nm}$

Das konfokale Prinzip verbessert entscheidend den Bildkontrast und führt zur Unterdrückung störender Einflüsse des benachbarten Probenvolumens, wodurch ramanspektroskopische Untersuchungen optimiert werden. Die Wahl der richtigen Lochblende beeinflusst hierbei nicht nur die axiale Auflösung, sondern auch die Signaleffizienz. Dennoch ist bei allen drei verfügbaren Lochblenden gewährleistet, dass mindestens 75 % der ramangestreuten Photonen von der Faser aufgesammelt werden [58].

3.1.3 Filter

Von großer experimenteller Wichtigkeit ist die effektive Abschwächung der elastisch gestreuten Laserlinie im Ramanspektrum, welche die Ramanbanden üblicherweise um etliche Potenzen übersteigt. Für diesen Zweck wird ein geeigneter Filter benötigt, der idealerweise nur 1 von 10^{12} Rayleighphotonen durchlässt und gleichzeitig für möglichst alle Ramanphotonen transparent ist [27]. Erst ein solcher Filter macht die Konstruktion eines Ramanmikroskops sinnvoll. Für diese Erfordernisse bieten sich zwei verschiedene Arten von Filtern an:

- **Holografische Notch-Filter**, welche sowohl für die Stokes- wie auch die Anti-Stokes-Banden eine gute Transmission zeigen oder
- **Kantenfilter**, die nur die Stokes-Photonen transmittieren.

Holografische bzw. Kantenfilter sind dünne ebene Filme, die üblicherweise auf Glas- oder Quarzsubstrat wachsen und die senkrecht zum Film periodisch im Brechungsindex variieren. Hergestellt werden holografische Filter durch Beleuchtung eines lichtempfindlichen Polymerfilms mit einem holografischen Interferenzmuster. Kantenfilter entstehen durch den schichtweisen Aufwuchs zweier oder mehrerer Substanzen auf das Substrat.

Mit Hilfe von holografischen Filtern lassen sich Ramanbanden ab etwa 50 cm^{-1} untersuchen, bei Wellenzahlen oberhalb von 100 cm^{-1} liegt die Transmission des Filters bereits bei über 90%. Aktuell verfügen die holografischen Filter über die vorteilhafteren Merkmale, sie ermöglichen eine höhere Abschwächung der Rayleighbande und gleichzeitig die bessere Transmission für Ramanphotonen. Allerdings sind sie beschränkt auf Wellenlängen im sichtbaren nahen Ultraviolett und auf das NIR. Kantenfilter werden für den Wellenlängenbereich zwischen 350 und 800 nm eingesetzt und erlauben die Beobachtung von Ramanbanden oberhalb von 200 cm^{-1} . Eine Transmission von über 90 % erreichen sie ab 400 cm^{-1} [27]. Da der eingesetzte frequenz-verdoppelte Nd:YAG-Laser eine Anregungswellenlänge von 532 nm liefert, kommt bei den vorgestellten Messungen ein Kantenfilter zum Einsatz, der für die beschriebene Anwendung vollkommen ausreicht, da keine spezifischen Ramanbanden unterhalb von 400 cm^{-1} erwartet werden.

3.1.4 Detektionseinheiten

Das konfokale Ramanmikroskop CRM200 stellt zwei verschiedene Detektionssysteme zur Verfügung, die je nach Fragestellung gezielt eingesetzt werden können (technische Daten s. Anhang B). Durch einen umklappbaren Spiegel im Spektrometer lässt sich das spektral zerlegte Licht auf einen der beiden Detektoren lenken. Im Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 1060 nm stellt die Avalanche Photodiode (APD) einen einzelphotonenempfindlichen Detektor dar, der sich daher besonders zur Detektion schwacher Ramansignale eignet. Bei einer Wellenlänge von 633 nm beträgt die Detektionseffizienz der APD über 55 % [58].² Der Dunkelstrom der APD liegt zwischen 50 und 100 Zählern pro Sekunde. Durch die thermoelektrische Kühlung und Temperaturstabilisierung der APD wird der zuverlässige Betrieb bei der jeweiligen Raumtemperatur gewährleistet.

Bei der zweiten Detektionseinheit handelt es sich um eine rückseitengedünnte „deep depletion“-CCD-Kamera der Firma Andor, die für die Experimente auf -70°C herunter gekühlt wurde. Die Detektionseffizienz der CCD-Kamera liegt über einen großen Wellenlängenbereich bei über 70 %. Mit der CCD-Kamera können Ramanspektren über einen sehr großen Wellenzahlbereich aufgenommen werden. In Kombination mit dem $600 \frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$ -Gitter lässt sich ein Ausschnitt von mehr als 4000 cm^{-1} beobachten. Die Kalibrierung der CCD-Kamera läuft automatisiert mit Hilfe einer Hg-Ar-Kalibrierlampe ab, indem die charakteristischen Quecksilber- und Argon-Spektrallinien angefahren und auf bestimmte Bereiche des CCD-Arrays abgebildet werden.

Der CCD-Chip ist aufgeteilt in ein Array aus 10-20 μm kleinen Siliziumdetektoren, welche die Pixel der Kamera darstellen. Bei der Messung werden Photonen im Silizium

²Üblicherweise liegt die Effizienz in diesem Wellenlängenbereich bei etwa 70 %.

absorbiert, wodurch Elektronen produziert werden, die über ein System aus Elektroden im Chip gespeichert werden können. Diese Elektroden bewegen schließlich die Elektronen durch den Chip, damit diese gezählt werden. In der vertikalen y-Richtung empfängt jeder Pixel Licht von einem unterschiedlichen Punkt des Eingangsspalts, sodass hierdurch die räumliche Information über die Probe aufgenommen wird.

3.1.5 Messmethoden

Das konfokale Ramanmikroskop CRM200 erlaubt verschiedene Messmethoden, sodass die unterschiedlichen Fragestellungen gezielt untersucht werden können. Hierbei ist nicht nur die Aufnahme einzelner Ramanspektren möglich, sondern auch die Erstellung zweidimensionaler Bilder, die mit der entsprechenden Software zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden können. Folgende Methoden werden angeboten:

1. **Raman Fast Imaging:** Das „Fast Image“ ist die beste Methode, um einen schnellen Überblick über einen größeren Probenbereich zu erlangen. Hierbei wird die Probe in einem eingestellten Bereich abgescannt, während die einzelphotonenempfindliche APD das rückgestreute Licht einer ausgewählten Ramanbande detektiert. Beim „Fast Image“ entsteht folglich die Intensitätsverteilung einer charakteristischen Ramanbande, die Auskunft gibt über die vorliegende Probenstruktur und über die Verteilung einer speziellen Stoffgruppe. Ein „Fast Image“ enthält jedoch keine spektrale Information, sodass zwischen Fluoreszenz und hoher Ramanintensität nicht unterschieden werden kann. Beim „Raman Fast Imaging“ sind drei verschiedene Einstellungen möglich: ein lateraler Scan, ein axialer Scan und ein so genannter Image Stack, bei dem das Mikroskop eigenständig nach der Aufnahme des ersten Bildes eine neue Schicht anfährt und dabei sukzessive ein dreidimensionales Probenbild erstellt.
2. **Raman Chemical Imaging:** Auch bei dieser Einstellung wird ein bestimmter Probenbereich lateral oder axial abgescannt, die Detektion erfolgt allerdings nicht mit der APD, sondern mit der CCD-Kamera. Ein „Chemical Image“ enthält daher die gesamte spektrale Information für jeden einzelnen Messpunkt. Im Anschluss an die Messungen sind bei dieser Messmethode unzählige Auswertemöglichkeiten gegeben. So können Stoffverteilungen nun anhand der spezifischen Ramanspektren dargestellt werden, indem über eine charakteristische Ramanbande integriert wird. Ein grundlegender Nachteil dieser Methode sind die langen Messzeiten, denn beim Scan über einen Biofilm sollte pro Messpunkt 1 bis 5 s belichtet werden, sodass Messdauern im Bereich von Stunden keine Seltenheit sind.
3. **Time Spectrum:** Beim „Time Spectrum“ detektiert zwar die CCD-Kamera, jedoch wird die Probe nicht abgescannt. Mit dieser Methode kann also das Ausbleichen

bestimmter Signale aufgenommen werden, auch lässt sich überprüfen, welchen Einfluss eine längere Belichtungszeit an einem Messfleck auf das entstehende Raman-Spektrum hat. Räumliche Informationen werden nicht geliefert.

4. **Line Spectrum:** Hierbei wird die Probe auf einer Linie abgescannt, während die Detektion mit Hilfe der CCD-Kamera stattfindet. Insbesondere bei Tiefenscans bietet sich diese Methode an, um einen schnellen Überblick über einen großen Probenbereich zu erhalten. Auch lässt sich mit dieser Einstellung recht leicht der Laserfokus finden.
5. **Aufnahme von Einzelspektren:** Bei dieser Messmethode wird an einem speziellen Punkt ein einzelnes Spektrum mit beliebig langen Belichtungszeiten durch die CCD-Kamera aufgenommen.

Für die Analyse von Biofilmen bietet sich besonders das „Raman Chemical Imaging“ an, da dies die einzige Methode ist, mit der sich die räumliche Verteilung verschiedener Bakterienspezies ermitteln lässt. Die Bakterienspektren sind zu ähnlich, um sie mit der APD auseinander zu halten.

3.2 Bakterien

Zur Erstellung der spektralen Datenbank für abwasserrelevante Bakterien wurden ausgewählte Bakterienstämme kultiviert. Um den prinzipiellen Messaufbau zu kontrollieren und die Datenbankerstellung zu testen, wurden Bakterien ausgesucht, die hinlänglich bekannt und deren Spektren mit Literaturspektren zu kontrollieren sind. Im Mittelpunkt der Messungen standen schließlich Bakterien der biologischen Abwasserreinigung, die ihren Beitrag zum Stickstoffkreislauf leisten.

Bakterium	Herkunft	Medium	Temp.
<i>Escherichia Coli</i>	IfB, Hannover	LB Medium	37°C
<i>Bacillus pumilus</i> DSM Nr. 27	DSMZ	Med. 1 DSMZ	30°C
<i>Bacillus subtilis</i>	MiBi, Hannover	Med. 1 DSMZ	37°C
<i>Staphylococcus cohnii</i> DSM Nr. 6669	DSMZ	Med. 92 DSMZ	37°C
<i>Planctomyces maris</i>	DSMZ	Med. 514 DSMZ	30°C
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> DSM Nr. 10229	DSMZ	Med. 756 DSMZ	28°C
<i>Acidovorax temperans</i> Hp	School of biol. sci.	R2A-Agar	28°C
<i>Acidovorax temperans</i> Hn	School of biol. sci.	R2A-Agar	28°C
<i>Nitrosomonas europaea</i> 50	MiBi, Hamburg	Medium 1a, MiBi HH	28°C
<i>Nitrosomonas eutropha</i> 53	MiBi, Hamburg	Medium 1a, MiBi HH	28°C
<i>Nitrosomonas eutropha</i> 57	MiBi, Hamburg	Medium 1a, MiBi HH	28°C
<i>Brocadia Anammoxidans</i>	Delft	-	4°C

Tabelle 3.1: Liste der untersuchten Bakterien mit Angabe ihrer Herkunft, ihres Kulturmediums und der Temperatur, bei der die Bakterien kultiviert wurden. Hierbei stehen IfB als Abkürzung für Institut für Biophysik, DSMZ für die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, MiBi für Mikrobiologie und School of biol. sci. für School of biological sciences in Auckland/Neuseeland.

3.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Sämtliche Bakterienstämme wurden von der Chemisch-Technischen Assistentin des Instituts für Biophysik, Heidemarie Bliedung, und zeitweise auch von Felicitas Schöbel unter optimalen Bedingungen (s. Tab. 3.1 sowie Anhang) kultiviert. Alle verwendeten Medien waren steril, das Arbeiten mit den Bakterien fand ebenfalls unter sterilen Bedingungen an der Zellbank statt. Die Stämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen bzw. von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Stets war gewährleistet, dass die Bakterien regelmäßig überimpft und gegebenenfalls (im Fall von *Nitrosomonas*) im pH-Wert eingestellt wurden.

Vorbereitung der Bakterien auf die Messungen am CRM200

Für die Messungen am konfokalen Ramanmikroskop musste stets eine Bakteriensuspension vorbereitet werden, welche je nach Bakterienkultur nach zwei verschiedenen Prozeduren gewonnen wurde:

1. **Bakterien auf Agarplatte:** *Acidovorax temperans* wuchs überwiegend auf Agarplatten. Für die Messung wurde mit einer Impföse unter der Zellbank eine kleine Menge Bakterien von der Platte entnommen und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-cup) gegeben. Dieses wurde mit etwas PBS (s. Anhang) versetzt und mit Hilfe eines Vortex zu einer Bakteriensuspension verarbeitet.
2. **Bakterien in Flüssigkultur:** Zur Vorbereitung musste 1 ml (bzw. bei *Nitrosomonas* 2-4 ml) Probensuspension aus der Bakterienkultur entnommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert werden. Anschließend wurde die Probe bei 9500 g 5 Minuten lang abzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μ l PBS resuspendiert. Für die Messungen an *Nitrosomonas* konnte diese Suspension direkt auf einen Glasobjektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt werden. Andere Bakterien ließen sich auf Polylysin vermessen, sodass die Suspension auf Polylysinobjektträger der Firma LaboMed aufgebracht werden konnte.

3.2.2 Isolation von ANAMMOX-Bakterien über einen Percoll-Dichtegradienten

Da Anammoxbakterien bislang nicht in Reinkultur vorliegen, ist die Aufnahme von Referenzspektren deutlich schwieriger als bei kultivierbaren Bakterien. Aus dem Biofilm heraus können keine solchen Spektren aufgenommen werden, da sich dort viele verschiedene Bakterien ansiedeln und es daher nie sicher ist, welches Bakterium aktuell vermessen wird. Es bieten sich momentan nur zwei verschiedene Möglichkeiten an, um Referenzspektren für *Candidatus* „*Brocadia Anammoxidans*“ bzw. *Candidatus* „*Kuenenia Stutgartiensis*“ zu erhalten:

- *Brocadia Anammoxidans*: Die Messungen an dieser Bakterienart fanden an einer hochangereicherten Kultur aus Delft statt, in der etwa 70-80% der vorhandenen Biomasse aus Anammoxbakterien besteht. Die Kultur wurde vor etwa zwei Jahren im gekühlten Zustand aus Delft bezogen und hier bei 4°C gehalten. Da das Medium nicht ausgetauscht wurde, ist zu vermuten, dass die Bakterien nicht mehr aktiv sind.

- *Kuenenia Stuttgariensis*: In den Biofilmreaktoren des ISAH herrscht diese Bakterienart vor. Nach dem Anreicherungsverfahren aus Referenz [35] wurde *Kuenenia Stuttgariensis* isoliert und anschließend ramanmikroskopisch vermessen. Hierbei muss die Biomasse mittels Ultraschall auf Zellgröße verkleinert werden, wobei die Anammoxcluster auseinander gerissen werden. Durch diesen Eingriff stellen die Bakterien ihren Umsatz ein und liegen ebenfalls im inaktiven Zustand vor.

Die genannten Verfahren sind zwar nicht ganz exakt, da auch in der hochangereicherten Kultur weitere Bakterien vorliegen können und die Aufreinigung sehr sorgfältig durchgeführt werden muss, dennoch bieten sich bislang keine anderen Möglichkeiten an.

Die Aufreinigung wurde angelehnt an [35] über folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. 50 ml Probenmenge werden aus dem SBR2 entnommen und in einen hohen und schmalen Messbecher gefüllt. Anschließend wird dieser geschüttelt, um die Granula gut zu durchmischen. Nach dem Schütteln muss der Messbecher einige Sekunden ruhig hingestellt werden, bis die roten Granula abgesunken sind. Nun kann die obere Hälfte der Flüssigkeit abgegossen werden. Anschließend wird mit etwas Leitungswasser aufgefüllt und die Prozedur wiederholt. Am Ende sollten 20 ml Flüssigkeit übrig behalten werden, in der größtenteils rote Granula vorliegen sollten.
2. In einem schmalen Becherglas wird die verbliebene Probenmenge im Ultraschallbad zerkleinert (60 s, 100 W).
3. Zwei Zentrifugenröhrchen (je 10 ml Inhalt) werden mit der zerkleinerten Biofilmmasse befüllt und anschließend zentrifugiert (10000 g, 5 min., 10°C).
4. Der Überstand kann verworfen werden. Die obere Schicht des Pellets muss vorsichtig abgekratzt werden, um Biofilmfragmente von den Einzelzellen zu trennen.
5. In beiden Röhrchen verbleibt ein kleiner Pelletrest, welcher in etwa 3 ml HEPES-Puffer durch Schütteln resuspendiert wird. Anschließend werden beide Zentrifugenröhrchen mit 6,9 ml Percoll (Sigma-Aldrich) aufgefüllt (hierbei dürfen die Röhrchen nicht geschüttelt werden, um die beiden Schichten nicht zu vermischen).
6. Beide Röhrchen werden nun zentrifugiert (10000 g, 70 min., 5°C).
7. Bei der Zentrifugation bildet Percoll einen Dichtegradienten aus, in welchem sich die verschiedenen Probenbanden verteilen. Etwa auf halber Höhe des Zentrifugenröhrchens ist eine rötliche Schicht an Zellen zu erkennen, welche abpipettiert und in HEPES gewaschen wird, hierbei handelt es sich um die isolierten Anammoxbakterien.

Nur etwa 1 % der eingesetzten Biomasse bleibt am Ende übrig, doch ist diese geringe Probenmenge für die konfokale Ramanmikroskopie absolut ausreichend.

3.3 Deammonifizierende Biofilme

Die vermessenen Biofilmprouben stammen ausschließlich aus Sequencing Batch Reaktoren (SBR1 und SBR2) des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik. Der Betrieb der Reaktoren (jeweils 10l) sowie die begleitende Analytik wurden von unseren Kooperationspartnern Tobias Gaul und Ilona Wesoly durchgeführt. Ein Reaktor (SBR1) wurde mit deammonifizierender Biomasse aus Mechernich angeimpft, während der zweite Reaktor (SBR2) ohne ein spezielles Animpfen auf die anaerobe Ammoniumoxidation eingestellt werden konnte. In beiden Reaktoren herrscht *Kuenenia stuttgartiensis* vor, es bleibt allerdings zu überprüfen, unter welchen Bedingungen sich welche Gattung Anammoxbakterien ansiedelt. Diese Fragestellung wird im Zentrum zukünftiger Forschung stehen.

Aus beiden Reaktoren wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, um Granula verschiedener Färbung gezielt zu untersuchen. Nur in den rötlich-schimmernden Granula werden Anammoxbakterien erwartet, sodass zum Abgleich auch schwarze bzw. dunkelbraune Flocken entnommen wurden, um auch diese auf ihren Bakteriengehalt zu untersuchen. Für die Messung wurden einige Flocken mit etwas Medium in einen vertieften Objektträger gefüllt und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Anammoxmedium wurde intensiv ramanmikroskopisch untersucht, zeigte aber keine über die Wasserbanden hinausgehenden Signale. Aus diesem Grund konnte das Medium beibehalten werden. Auf dem Piezotisch lassen sich nun gezielt unterschiedliche Granula in den Laserfokus bewegen, um mögliche Unterschiede zwischen dunklen und roten Flocken zu untersuchen.

3.4 Melanin

Die Messungen an melaninproduzierenden Zelllinien wurden an murinen Melanozyten (melan a) und Melanomzellen (B16F0) durchgeführt, die von Ines Pardo kultiviert wurden. Die Proben sowie die notwendigen zellbiologischen Arbeiten zur Kultivierung der Zellen sind in [60] aufgeführt und dort nachzulesen. Beide Zelllinien produzieren Melanin und wurden aus der Haut der so genannten C57BL/6-Maus (schwarzer Phänotyp) gewonnen und in DMEM/F12 D8900 (Sigma-Aldrich) mit 10 % FCS (fetales Kälberserum) und 200 nM TPA (in Ethanol gelöste Phorbol ester) kultiviert. Dem Medium mussten darüber hinaus Antibiotika zugesetzt werden: Penicilin/Streptomycin (Endkonzentration

100 U/ml Penicilin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) und Partricin (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) (Gibco).

Die Zellkulturen wurden in einem Klimabrutschrank der Firma Heraeus bei 37°C und unter einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre gehalten. Zur Kultivierung wurden Petrischalen mit 10 cm Durchmesser verwendet, für die etwa 10 ml Nährmedium notwendig waren. Um ein günstiges Wachstum zu erhalten, ist ein Medienwechsel alle zwei bis drei Tage erforderlich. Die Zellen wachsen auf sterilen Quarzglasobjektträgern (Carl Zeiss), die vor der Aussaat in die Petrischale gelegt wurden. Sobald sich auf dem Objektträger ein Monolayer aus Zellen angesiedelt hat, wurde das Nährmedium aus der Petrischale entfernt. Anschließend wurden 1 ml einer 0,25 %-igen Trypsinlösung (s. Anhang) auf die Zellschicht gegeben, um die Zelladhäsionsmoleküle abzubauen. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten wurde Nährmedium hinzugefügt, um die Wirkung des Trypsin zu stoppen. Diese Zellsuspension kann nun als neue Passage weiter kultiviert werden.

Für die Messungen am Ramanmikroskop wurden die Petrischalen mitsamt den bewachsenen Objektträgern aus dem Brutschrank herausgenommen. Obwohl die Messungen mit dem Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt wurden, konnte das Kulturmedium nicht verwendet werden, da es zu starke Fluoreszenzen zeigte, welche die interessierenden Proben signale überdeckt haben. Folglich musste das Medium vor der Messung getauscht werden. Hierfür wurde das Kulturmedium aus der Petrischale abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmter Kochsalzlösung gewaschen und für die Dauer der Messung ebenfalls in NaCl-Lösung aufbewahrt. Diese Prozedur hat sich als sehr geeignet für die Messungen erwiesen, da die Zellen weiterhin in physiologischer Lösung vorlagen, ihre Ramanspektren aber nicht durch störende Fluoreszenz des Mediums überlagert wurden.

Für die Aufnahme der Referenzspektren wurde kommerziell erhältliches *Sepia Officinalis* und synthetisches Melanin (beides Sigma-Aldrich) vermessen. Beide Melanine mussten in destilliertem Wasser untersucht werden, da sonstige Lösungsmittel einen zu starken Einfluss auf die Ramanspektren hatten. In destilliertem Wasser gelang zwar keine homogene Lösung, dennoch konnte im Ultraschallbad zumindest eine Suspension hergestellt werden, die auf einem Objektträger leicht zu analysieren war.

Kapitel 4

Aufbau einer Bakteriendatenbank für abwasserrelevante Mikroorganismen

Für Bakterien aus der biologischen Abwasserreinigung gibt es bislang keine Referenzspektren und folglich auch keine spektrale Datenbank, mit deren Hilfe Bakterien aus Biofilmen identifiziert und zugeordnet werden können. Eine zentrale Aufgabe der vorgestellten Arbeit war daher die genaue Vermessung ausgewählter Bakterien in Reinkultur. Die untersuchten deammonifizierenden Biofilme sind in der Lage, Ammonium anaerob zu oxidieren, sodass definitiv mit Anammoxbakterien im Biofilm zu rechnen ist. Darüber hinaus spielen *Nitrobacter* und *Nitrosomonas* eine Rolle bei den Umsatzprozessen in der biologischen Abwasserreinigung.

Exemplarisch wurden daher für den Aufbau einer eigenen Spektrenbibliothek erstmalig Reinkulturen von *Nitrobacter hamburgensis* (DSMZ), *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha* (Kooperation mit der Mikrobiologie, Hamburg) und *Acidovorax temperans* (Kooperation mit der *Microbiology* in Auckland/Neuseeland) sowie eine hochangereicherte Kultur von *Candidatus Brocadia Anammoxidans* untersucht. Bakterien wie *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* oder *Escherichia Coli*, von denen in der Literatur bereits Spektren veröffentlicht worden sind [50], [48] und deren Ramanbanden sich recht deutlich von denen der Abwasserbakterien unterscheiden, wurden verwendet, um die Methoden der Datenvorbehandlung und der Datenbankerstellung zu überprüfen und zu optimieren.

Im folgenden Kapitel wird die grundlegende Theorie zur Datenbankerstellung und der dazu erforderlichen Datenvorbereitung dargestellt, wobei auch verschiedene Möglichkeiten zur Berechnung der spektralen Distanz zweier Spektren diskutiert werden. Im Kapitel 5 werden diese Kenntnisse auf die eigenen Bakterienspektren angewendet, um ein geeignetes Prozedere für die spezielle Anwendung im Hinblick auf die Untersuchung von Biofilmen der biologischen Abwasserreinigung zu finden.

4.1 Standardisierte Auswerteprozedur

Für den Aufbau einer Bakteriendatenbank ist nicht nur ein exaktes und reproduzierbares Messverfahren notwendig, sondern auch ein standardisiertes Auswerteverfahren für die eingespeisten Referenzspektren, da die durch die Bruker-Software „OPUS Version 5.5“ möglichen Manipulationen die Ramanspektren stark verändern können. Folgende Prozedur wurde für die eigene Auswertung der Bakterienspektren verwendet:

1. **Hintergrundkorrektur:** Die CCD-Kamera zeigt je nach Belichtungszeit einen hohen Offset von mindestens 1400 counts (bei mehr als einer Sekunde Integration auch mehr), welcher nicht durch die Probe hervorgerufen wird. Dieses Hintergrundspektrum wurde für jede benötigte Belichtungszeit aufgenommen und von den Probenspektren abgezogen.
2. **Abschneiden:** Nicht relevante Bereiche wie beispielsweise die breite Wasserschwingung bei etwa 3400 Wellenzahlen oder der Bereich um 0 Wellenzahlen, welcher durch die hohe Laserlinie dominiert wird, wurden herausgeschnitten, da sie in allen Spektren gleichermaßen zu finden waren und nicht zur Identifikation von Bakterien beitragen. Nach dem Abschneiden bleiben nur die für den Bakterienvergleich interessierenden Spektralbereiche wie der Fingerprintbereich bis 1800 Wellenzahlen übrig.
3. **Grundlinienkorrektur:** Die gemessenen biologischen Proben weisen oft starke Fluoreszenzen auf, welche durch Anlegen eines Polygonzuges aus dem Ramanpektrum herausgerechnet werden können [61], ohne dabei die relativen Verhältnisse der Ramanbanden zueinander zu verändern. Die Bruker-Software erlaubt ein solches Herausrechnen durch eine so genannte Gummibandmethode. Als Ergebnis bleiben die ermittelten Ramanbanden übrig, die nun nicht länger auf einem Fluoreszenzhintergrund detektiert werden müssen.
4. **Normierung:** Um Spektren miteinander vergleichen zu können, ist ein Normierungsverfahren in jedem Fall notwendig, um auftretende Schwankungen der Ramanintensitäten herauszurechnen. Im Falle von organischen Ramanspektren hat sich die Normierung auf den CH-Peak bei etwa 2935 cm^{-1} durchgesetzt, da diese Ramanbande nicht nur die Gesamtmenge organischen Inhalts der untersuchten Zellen angibt, sondern auch im Hinblick auf die Klassifizierung von Bakterien die besten Ergebnisse liefert [47]. Im folgenden Ergebnisteil wird bei den meisten Spektren daher nur noch der Fingerprintbereich gezeigt, da dank der Normierung im weiteren Verlauf der Spektren keine Unterschiede mehr auftreten.

An einem ausgewählten Bakterienspektrum sollen exemplarisch die einzelnen Auswerteschritte dargestellt werden. In Abb. 4.1 ist der positive Effekt der Grundlinienkorrektur

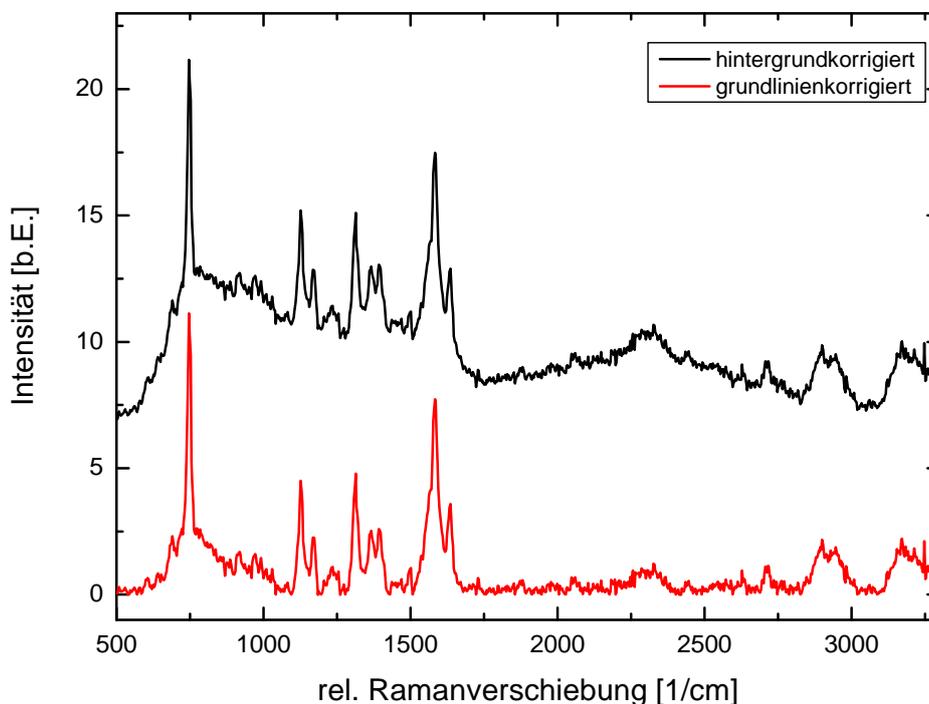


Abbildung 4.1: Beide Anammoxspektren sind hintergrundkorrigiert, das rote Spektrum wurde zusätzlich mit der Gummibandmethode grundlinienkorrigiert. Fluoreszenzeinflüsse wurden dadurch weitestgehend entfernt.

dargestellt. Das obige Spektrum wurde lediglich hintergrundkorrigiert, wodurch Einflüsse des CCD-Offsets herausgerechnet werden. Das untere Spektrum wurde zusätzlich mit der Gummibandmethode grundlinienkorrigiert. Im Anschluss an diese Korrektur bleiben die Ramanbanden übrig, die nun nicht länger auf einem störenden Fluoreszenzhintergrund detektiert werden müssen.¹

Mittels eines Savitzky-Golay-Filters können die Spektren zusätzlich geglättet werden. Allerdings muss diese Methode mit einer gewissen Skepsis betrachtet werden, da die Wahl zu vieler Glättungspunkte die Ramanspektren so stark beeinflussen kann, dass ein zuverlässiger Spektrenvergleich hiermit nicht mehr möglich ist (s. Abb. 4.2). Zu stark geglättete Spektren sind für den Aufbau einer Ramandatenbank nicht geeignet. In Abb. 4.2 ist deutlich zu erkennen, dass durch die Glättung die Ramanbanden bei 747 cm^{-1} und bei 1588 cm^{-1} in ihrem Verhältnis zueinander stark verzerrt wurden. Der Doppelpeak bei 1369 cm^{-1} und 1393 cm^{-1} ist sogar nahezu verschwunden. Wird der Software das

¹Im Fall der hier gezeigten Anammoxspektren ist der Fluoreszenzhintergrund jedoch so hoch, dass er nicht komplett herausgerechnet werden kann.

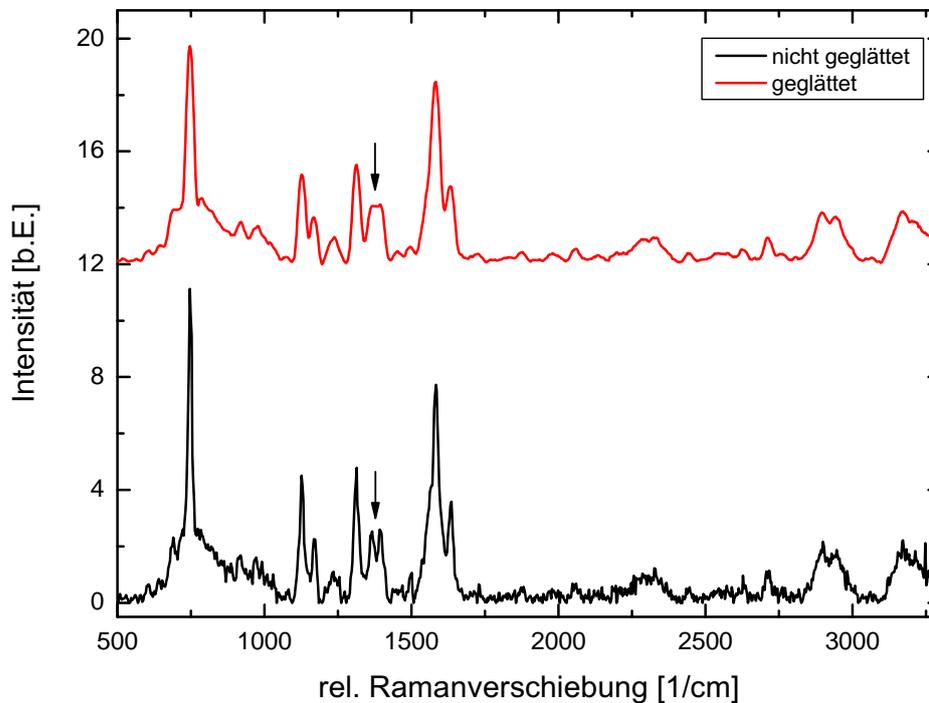


Abbildung 4.2: Auswirkung der Glättung mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters: Das untere Spektrum ist lediglich hintergrund- und grundlinienkorrigiert, das obere Spektrum wurde zusätzlich mit 17 Glättungspunkten geglättet.

stark geglättete Ramanspektrum als Referenzdatei für den Identifikationsschnelltest vorgegeben, so wird nur noch eine Übereinstimmung von 96,8 % erkannt, obwohl es sich ursprünglich um identische Spektren handelte. Da die zu erwartenden Bakterienspektren von vornherein nur geringfügige Unterschiede aufweisen, wurde im Hinblick auf die eindeutige Zuordnung der Spektren auf eine Glättung der Referenzspektren verzichtet.²

Das Kernstück der Bruker-Software ist die Erstellung eines Identifikationstests, welcher Spektren mit einer bereits vorhandenen Datenbank vergleicht. Hierzu werden zunächst zahlreiche Referenzspektren eingespeist. Für jede Probe werden mehrere Spektren aufgenommen, damit die Software die möglichen Schwankungen in die weiteren Berechnungen mit einbeziehen kann. Aus den für jede Probe vorhandenen Spektren wird schließlich ein Mittelwert berechnet, der für die Vergleiche herangezogen wird. Wird der Software ein unbekanntes Spektrum vorgegeben, so entscheidet diese darüber, welchem Bakterien-

²Bei der späteren Datenvorbehandlung wird allerdings die erste Ableitung ausgewählt, die mit einer gleichzeitigen Glättung gekoppelt ist. In der Literatur wird eine Glättung über 13 Punkte angegeben [62], die sich bei eigenen Tests allerdings als zu stark erwiesen hat, sodass neun Glättungspunkte gewählt wurden.

stamm die nicht-identifizierte Probe am nächsten kommt. Beim so genannten Identifikationsschnelltest berechnet die Software die prozentuale Übereinstimmung in ausgewählten Bereichen der zu vergleichenden Spektren, sodass hiermit eine recht handliche Bakteri-
enunterscheidung bzw. -bestimmung möglich wird. Mit Hilfe der Clusteranalyse können Ramanspektren in verschiedene Cluster eingeteilt werden. Auch für diese Methode müssen Prozeduren zur Datenvorbehandlung und zur Berechnung der Cluster vorgegeben werden. Das Ergebnis der Clusteranalyse erscheint als ein Dendrogramm, in welchem Bakterien auf der Art- und Stammebene differenziert werden können. In einem Dendrogramm werden die Bakterien nach ihrer Ähnlichkeit angeordnet, wobei zunächst viele kleine Cluster entstehen, die dann mit zunehmender Heterogenität in größere Cluster zusammengefasst werden. In den kleinen Clustern sollen Bakterien idealerweise bis auf die Stammebene differenziert werden, in der nächsten Stufe findet die Zusammenfassung auf Artebene statt.

4.1.1 Intensitätskalibrierung

Jedes aufgenommene Ramanspektrum wird durch eine Instrumentenfunktion beeinflusst, in der sich die Effizienzen der verwendeten Bauteile (sämtliche Optiken sowie die CCD-Kamera) niederschlagen. Eine Intensitätskalibrierung ist auch in aktuellen Publikationen für Ramanspektren eher die Ausnahme, da das notwendige Verfahren nach wie vor aufwändig und teuer ist. Zwei verschiedene Methoden sind möglich, um ein Instrument einer Intensitätskalibrierung zu unterziehen:

- Üblicherweise wird das Spektrum eines schwarzen Körpers bekannter Temperatur mit dem eingesetzten Ramanaufbau gemessen. Das idealerweise zu erwartende kontinuierliche Spektrum des schwarzen Körpers kann bei vorgegebener Temperatur leicht berechnet werden. Mit Hilfe dieses Standards kann nun das gemessene Spektrum, welches durch die Effizienzen der einzelnen Optiken beeinflusst wird, verglichen werden, woraus sich auf die Instrumentenfunktion des Ramanmikroskops schließen lässt.
- Eine zweite Möglichkeit stellt die Kalibration über sekundäre Standards dar [63], [64]. Hierzu werden spezielle Gläser oder Farbstoffe verwendet, die von der jeweiligen Laserwellenlänge zu Fluoreszenzen angeregt werden können; schmale Ramanbanden sind hierbei nicht erwünscht. Diese Standards können in die Probenebene eingebracht und dort wie eine normale Probe vermessen werden. Das resultierende breite Fluoreszenzspektrum ist anschließend mit dem bekannten Spektrum einer Wolframlampe zu vergleichen und erlaubt hierüber die schnelle Berechnung der Instrumentenfunktion [64].

Insbesondere die Kalibration mit Hilfe des schwarzen Strahlers weist nicht zu vernachlässigende Schwierigkeiten auf [65], denn schwarze Strahler sind für übliche Spektrometer zu lichtintensiv, außerdem können ihre Spektren normalerweise nicht unter den gleichen Bedingungen aufgenommen werden wie Probenspektren. Eine solche Kalibration ist daher nicht aussagekräftig, da Referenz- und Probenspektren unter verschiedenen Messbedingungen aufgenommen werden müssen und folglich nicht vergleichbar sind.

Sekundäre Standards repräsentieren dagegen einen zuverlässigen Standard, da sie unter den gleichen Bedingungen vermessen werden können wie andere Proben. Allerdings sind diese Standards bislang nicht kommerziell erhältlich, und auch sie müssen mit einem bekannten Spektrum verglichen und kalibriert werden. Bevor diese Probleme nicht gelöst sind, können auch sekundäre Standards nicht regelmäßig und zuverlässig für die Intensitätskalibrierung eingesetzt werden.

Allerdings sind auch (Intensitäts-)korrigierte Ramanspektren nicht universell vergleichbar, da sie von weiteren Parametern abhängen. Bei unterschiedlichen spektralen Auflösungen verändert sich beispielsweise das Verhältnis verschiedener Ramanbanden zueinander. In einem dispersiven Spektrometer, wie es für die gezeigten Messungen verwendet wurde, hängt darüber hinaus die Linienbreite der Ramanbanden vom Eingangsspalt, der linearen Dispersion und der Pixelbreite ab. Aus diesem Grund bleiben auch korrigierte Ramanspektren schwer quantifizierbar und mit verschiedenen Aufbauten vergleichbar.

Zahlreiche Wiederholungsmessungen am CRM200 haben die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gezeigt, sodass die hier aufgeführten Ramanspektren untereinander durchaus vergleichbar sind und in eine gemeinsame Datenbank aufgenommen werden können. Auf eine Intensitätskorrektur wurde jedoch aus den oben angeführten Gründen verzichtet, da eine zuverlässige Methode hierfür bislang nicht etabliert ist. Um die Spektren mit den Ergebnissen anderer Aufbauten vergleichbar zu machen, wurden die Messparameter und die technische Ausstattung angegeben. Die vorgestellten Messergebnisse zeigen, dass der Aufbau einer Bakteriendatenbank prinzipiell mit dem vorhandenen konfokalen Ramanmikroskop möglich ist. Weitere Optimierungen durch den Aufbau einer verlässlichen optischen Pinzette sind allerdings noch möglich.

4.2 Erstellung und Validierung einer Bakteriendatenbank

Spektrale Datenbanken enthalten zahlreiche Referenzspektren verschiedener Substanzen und dienen der Identifikation unbekannter Proben bzw. der Identitätskontrolle von Substanzen. Für jede Referenzprobe müssen mehrere Spektren aufgenommen und in die Datenbank eingespeist werden, damit die Software die für eine Substanz möglichen Schwankungen berücksichtigen kann. Die Aufnahme von Spektren in eine Datenbank muss nach einer vereinheitlichten Prozedur erfolgen, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Darüber hinaus müssen der Software Methoden für die Datenvorbehandlung und auch die Berechnung der spektralen Distanz zwischen verschiedenen Spektren vorgegeben werden. Eine ideale Methode gibt es hier nicht, für die jeweilige Anwendung muss vielmehr eine optimierte Lösung gefunden werden, die schlussendlich die bestmögliche Identifikation liefert.

Für die Messung von Referenzspektren standen zahlreiche Reinkulturen ausgewählter Bakterienstämme zur Verfügung. Um die mit dem konfokalen Ramanmikroskop aufgenommenen Ramanspektren (vor allem von Bakterien) prinzipiell zu kontrollieren, wurden zunächst Bakterien gemessen, deren Ramanspektren bereits von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurden, wie z.B. *Escherichia Coli* und *Bacillus subtilis*. Erst nachdem die Messprozedur generell überprüft war, wurden die unbekanntes Bakterien vermessen. Hierbei wurden speziell Bakterien berücksichtigt, die relevant für die biologische Abwasserreinigung sind, da Bakterien aus dem medizinischen Bereich von anderen Arbeitsgruppen analysiert werden [47] und eine gezielte Auswahl bei der Fülle von Bakterien unbedingt notwendig ist. Bei der Bakterienanalyse sind vor allem zwei Fragestellungen zu klären, nämlich ob bei unterschiedlichen Bedingungen (Alter der Bakterien, Milieubedingungen etc.) die sich ergebenden Ramanspektren Veränderungen aufweisen und ob verschiedene Bakterienstämme innerhalb einer Art (hier: *Nitrosomonas eutropha* und *Acidovorax temperans*) differenziert werden können, die phylogenetisch bereits genauestens untersucht sind.

4.2.1 Datenvorbehandlung

Bevor unbekannte Bakterienspektren mittels der Bruker-Software identifiziert werden können, muss eine eigene Datenbank erstellt werden. Dazu sind viele Parameter zu bedenken, die die Leistungsfähigkeit einer Datenbank stark beeinflussen können. Zunächst muss daher ein eigener Identitätstest erstellt werden. Hierfür werden zahlreiche Ramanspektren von unterschiedlichen Bakterien in die neue Bibliothek eingespeist und in Gruppen und Unterbibliotheken eingeteilt. In eine Gruppe gehören verschiedene Spektren des gleichen Bakterienstamms. Falls die spätere Validierung der Software keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert, schlägt die Bruker-Software möglicherweise vor, gewisse

Spektren zusammen zu gruppieren. Dies sollte allerdings nur dann getan werden, wenn es sich hierbei um den gleichen Bakterienstamm handelt.

Bevor der Software eine Methode vorgegeben wird, um die spektrale Distanz der Raman-spektren zu berechnen, müssen die Daten vorbehandelt werden. Hierbei kann zwischen keiner Datenvorbehandlung, der Vektornormierung, der ersten und zweiten Ableitung und einer Kombination aus Vektornormierung und Ableitung gewählt werden. Für jede Problemstellung ist somit eine passende Datenvorbehandlung möglich. Darüber hinaus kann die Datenvorbehandlung für jede Unterbibliothek verschieden eingestellt werden. Auch wenn es sich auf der Ebene der Unterbibliotheken um unterschiedliche Bakterienspezies handelt, sollte dennoch eine einheitliche Datenvorbehandlung verwendet werden.

Neben der Datenvorbehandlung müssen Bereiche ausgewählt werden, die für die Analyse berücksichtigt werden sollen. Hier bietet es sich an, für die Hauptbibliothek einen großen Bereich anzugeben, für die Unterbibliotheken kann eine Einteilung in mehrere Bereiche sinnvoll sein. Für die Bakterienspektren sind von vornherein nur zwei Spektralbereiche von Interesse, nämlich der Bereich der CH-Schwingung um 2935 cm^{-1} herum und der Fingerprintbereich zwischen 500 und 1800 cm^{-1} . Die Datenvorbehandlung sollte gewährleisten, dass alle verwendeten Referenzspektren bei der Bibliotheksvalidierung eindeutig identifiziert werden können.

Vektornormierung

Ramanspektren zeigen häufig Schwankungen in den jeweiligen Peakintensitäten, die mittels einer Normierung herausgerechnet werden können. Die Vektornormierung erweist sich als nützliche Methode für die Erstellung einer Ramandatenbank [66], da hierbei schwankende Intensitäten herausgerechnet werden. Für die ausgewählten Spektralbereiche wird bei dieser Methode zunächst der Mittelwert der y-Werte berechnet:³

$$\bar{I} = \frac{\sum_{k=1}^N I_k}{N}. \quad (4.1)$$

Der errechnete Wert wird vom Spektrum I' subtrahiert, wodurch dieses bei etwa Null zentriert wird:

$$I'_k = I_k - \bar{I}. \quad (4.2)$$

³Im Fall von Ramanspektren handelt es sich bei den y-Werten um Intensitätswerte.

Im nächsten Schritt wird die Summe der Quadrate der Intensitätswerte berechnet; das Spektrum I'' wird nun durch die Quadratwurzel aus der sich ergebenden Summe dividiert:

$$I''_k = \frac{I'_k}{\sqrt{\sum_{k=1}^N I_k'^2}}. \quad (4.3)$$

Die Vektornorm des Ergebnisspektrums I'' liegt folglich bei 1, sodass alle Spektren auf der Einheitskugel liegen [67].

Bei der Vektornormierung bleibt die Form der einzelnen Spektren unverändert, sodass die Daten leichter interpretierbar sind. Der größte Vorteil dieser Datenvorbehandlung liegt in der Reduzierung von Schwankungen in den verschiedenen Ramanspektren derselben Probe. Da die Ramanspektren von Bakterien recht unterschiedlich ausfallen können, je nachdem, wie lange ein Bakterium im Laserfokus festgehalten werden konnte, bietet sich die Methode der Vektornormierung für den Aufbau einer Bakteriendatenbank an.

Ableitung

Für die Datenvorbehandlung stehen die erste und zweite Ableitung zur Verfügung, wahlweise mit anschließender Vektornormierung. Bei der Ableitung müssen darüber hinaus die Glättungspunkte gewählt werden, die zwischen 5 und 25 liegen. Wie oben bereits beschrieben, dürfen Ramanspektren nicht zu stark geglättet werden, um keine spektrale Information zu verlieren. Bei der Ableitung als ausgewählte Methode zur Datenvorbehandlung sollte die Glättung nicht mehr als 9 oder maximal 13 Punkte betragen.

Die erste Ableitung wird insbesondere für die Auswertung scharfbandiger, aber kleiner Signale verwendet, die möglicherweise auf einem hohen und breiten Untergrund detektiert werden müssen. Dieser wird durch die Bildung der ersten Ableitung herausgerechnet, sodass prinzipiell sogar eine Grundlinienkorrektur unnötig wird. Bei dieser Datenvorbehandlung gewinnen Signale mit steilem Anstieg an Bedeutung gegenüber flachen Strukturen. Die zweite Ableitung wird meist eingesetzt für eher flache Strukturen.

4.2.2 Berechnung der spektralen Distanz

Für die Berechnung der spektralen Distanz eines Testspektrums mit den Spektren einer Datenbank stehen insgesamt vier verschiedene Methoden zur Verfügung, nämlich die Standardprozedur, die Faktorisierung, die Skalierung auf einen Bereich oder die Normierung auf ein Reproduktionslevel. Bei der IDENT-Analyse vergleicht die Bruker-Software

das Testspektrum mit allen eingespeisten Referenzspektren und berechnet die Distanz zwischen diesen Spektren. Je kleiner die spektrale Distanz ist, umso ähnlicher sind sich die Spektren.

Standardprozedur

Mit Hilfe der Standardprozedur wird die euklidische Distanz D zweier Spektren a und b berechnet, welche proportional ist zu der Fläche zwischen beiden Spektren (s. Abb. 4.3). Hierbei werden die Spektren als Vektoren im N -dimensionalen Raum betrachtet, wenn N die Anzahl der Datenpunkte ist. Die Länge des resultierenden Differenzvektors gibt in diesem Fall die Euklidische Distanz an:

$$D = \sqrt{\sum_{k=1}^N (a(k) - b(k))^2}, \quad (4.4)$$

wobei über alle Datenpunkte k summiert wird. Die Länge des Vektors ist abhängig von den Intensitäten der Spektren, für eine bessere Vergleichbarkeit sollten daher die Spektren zuvor normiert werden.

In Kombination mit der Vektornormierung lässt sich der Wertebereich der spektralen Distanz D genau angeben, denn eine spektrale Distanz $D = 0$ deutet auf identische Spektren hin, während $D = 2$ die größtmögliche Distanz vektornormierter Spektren angibt.

Faktorisierung

Bei der Faktorisierung werden Spektren als eine Linearkombination aus so genannten Faktorspektren f_1, f_2, f_3, \dots dargestellt [67]:

$$a = T_{1a} \cdot f_1 + T_{2a} \cdot f_2 + T_{3a} \cdot f_3 + \dots, \quad (4.5)$$

wobei a das Originalspektrum darstellt und die T_{ia} die Koeffizienten, welche zur Berechnung der spektralen Distanz D zwischen zwei Spektren a und b eingesetzt werden:

$$D = \sqrt{\sum_i (T_{ia} - T_{ib})^2}. \quad (4.6)$$

Die Differenzen zwischen dem Originalspektrum und dem rekonstruierten werden als Residuen bezeichnet. Bei der Faktorisierung werden die Mittelwertspektren in Faktorspektren umgewandelt, welche orthogonal zueinander sind. Jedes Faktorspektrum erhält

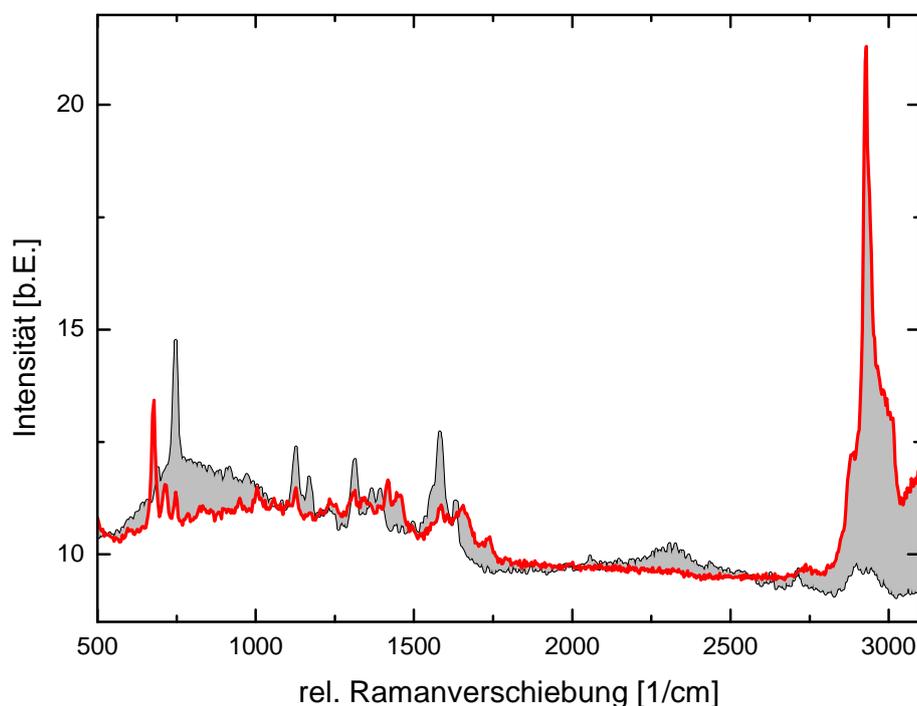


Abbildung 4.3: Die euklidische Distanz zwischen den beiden Spektren ist proportional zu der grau markierten Fläche zwischen den Spektren.

einen unterschiedlichen Stellenwert, der gekennzeichnet wird durch den zugehörigen Eigenwert. In der Bruker-Software werden die Faktorspektren nach ihren Eigenwerten sortiert. Für die weitere Berechnung sollten nur diejenigen Spektren berücksichtigt werden, deren Eigenwerte am größten sind, denn mit abnehmendem Eigenwert erhöht sich das spektrale Rauschen des Faktorspektrums, welches die Berechnung der spektralen Distanz verfälschen würde.

Skalierung auf ersten Bereich und Normierung auf Reproduktionslevel

Diese beiden Methoden können speziell bei der Analyse von Mikroorganismen eingesetzt werden. Überlappende Spektralbereiche werden im Gegensatz zur Standardmethode bzw. Faktorisierung nicht zusammengefasst, sodass bei überlappenden Bereichen Datenpunkte durchaus doppelt berücksichtigt werden können. Darüber hinaus können die festgelegten Spektralbereiche unterschiedlich gewichtet werden. Eine Vektornormierung muss bei diesen beiden Methoden nicht explizit ausgewählt werden, da sie automatisch in allen ausgewählten Spektralbereichen separat durchgeführt wird.

Bei der Skalierung auf den ersten Bereich werden zunächst die spektralen Distanzen im ersten ausgewählten Spektralbereich berechnet. Im Anschluss daran werden die anderen Bereiche ausgewertet und so skaliert, dass sie den gleichen Wertebereich für die Distanzen abdecken und somit auch die gleichen Minima und Maxima aufweisen. Dem ersten ausgewählten Spektralbereich kommt somit eine besondere Bedeutung zu, sodass es wichtig ist, welcher als erster Bereich ausgewiesen wird. Auch beim späteren Identitätstest wird der erste Spektralbereich besonders berücksichtigt.

Bei der Normierung auf ein Reproduktionslevel müssen Reproduktionsniveaus für jeden ausgewählten Spektralbereich angegeben werden. Die errechneten spektralen Distanzen werden bei dieser Methode durch das jeweilige Reproduktionsniveau geteilt. In der Literatur wird die Normierung auf ein Reproduktionslevel als Methode zur Clusteranalyse bei der Bakterienuntersuchung angegeben [62].

4.2.3 Validierung

Wenn die Methoden für die Datenvorbehandlung sowie die Berechnung der spektralen Distanz ausgewählt sind, muss die Bibliothek validiert werden. Bei diesem Rechenschritt werden sämtliche Spektren mit den Mittelwertspektren der Unterbibliotheken verglichen. Als Ergebnis sind hierbei „uniquely identified“, „not identified“ und „can be confused with“ möglich. Darüber hinaus ordnet die Bruker-Software alle Spektren in eine entsprechende Klasse ein und gibt am Ende des Validierungsreports an, wie viele Spektren eindeutig identifiziert und wie viele nicht genau zugeordnet werden konnten. Außerdem sind dort diejenigen Gruppen zu finden, deren zugehörige Spektren sämtlich eindeutig zugewiesen werden konnten. Ziel der ausgewählten Methoden für die Datenvorbehandlung und die Berechnung der spektralen Distanz ist natürlich, dass möglichst alle eingespeisten Spektren eindeutig bestimmt werden können. Speziell bei der Faktorisierung muss genau geprüft werden, wie viele Faktorspektren für die Berechnung berücksichtigt werden sollen, weil zu viele Faktorspektren das Rauschen des Ergebnisspektrums erheblich verstärken würden.

Um die Leistungsfähigkeit der vorgegebenen Prozedur zu testen, muss die eigene Datenbank stets validiert werden, wenn Änderungen vorgenommen wurden. Zahlreiche Kombinationen aus Datenvorbehandlung und Berechnung der spektralen Distanz müssen ausprobiert und validiert werden. Sukzessive ergibt sich hierbei die bestmögliche Methode zur Datenbankerstellung. Nach der erfolgreichen Erstellung eines eigenen Identitätstestes können der Software unbekannte Spektren vorgegeben werden, die sich mit einer ausgewählten selbsterstellten Datenbank vergleichen lassen.

4.3 Hierarchische Clusteranalyse

Die Vorbereitungen für die Clusteranalyse laufen nach einem ähnlichen Schema ab wie bei der Identitätstesterstellung. Auch für die Clusteranalyse müssen Spektren als Referenzspektren ausgewählt werden. Außerdem sind die Art der Datenvorbehandlung sowie die Rechenmethode zur Bestimmung der spektralen Distanz anzugeben. Als Ergebnisbericht ist in diesem Fall die Anordnung der Spektren in einem Dendrogramm gewünscht, welches die spektrale Verwandtschaft der Spektren widerspiegelt. Idealerweise sollten die Spektren des gleichen Bakterienstamms folglich zu einem Cluster angeordnet werden.

Als Algorithmus zur Berechnung der Distanzen zwischen den einzelnen Clustern wird für Mikroorganismen üblicherweise der sogenannte Ward's Algorithmus angewendet [48], für Ähnlichkeitsberechnungen ist oft die Euklidische Distanz üblich. Der Software muss außerdem die Anzahl der gewünschten Cluster vorgegeben werden. Wenn der Software beispielsweise fünf verschiedene Bakterienstämme vorgelegt werden, sollten auch fünf unterschiedliche Cluster als Ergebnis herauskommen, werden nur drei Cluster zugelassen, so ist ein fehlerhaftes Ergebnis vorprogrammiert.

Die hier vorgestellte Theorie wird in Kapitel 5 auf die verschiedenen Bakterienspektren angewendet, um eine Datenbank zu erstellen, die die eindeutige Identifikation der Bakterien aus der Abwasserreinigung und darüber die genaue Analyse von Biofilmen erlaubt.

Kapitel 5

Ramanmikroskopische Bakterienanalyse

In diesem Kapitel werden die mit dem konfokalen Ramanmikroskop gemessenen Ergebnisse der Bakterienanalyse vorgestellt und ausführlich diskutiert. Bei den Experimenten stand der Aufbau einer Bakteriendatenbank für abwasserrelevante Bakterien im Vordergrund, die in Zukunft helfen soll, Biofilme und ihre Zusammensetzung genau zu analysieren. Der prinzipielle Aufbau einer Ramandatenbank wurde bereits im vorigen Kapitel ausführlich besprochen, nun geht es um die speziellen Überlegungen im Hinblick auf eine spektrale Datenbank für den Abwasserbereich. Außerdem sind die gewonnenen Ramanspektren verschiedener Bakterien dargestellt, die zum Teil einige auftauchende experimentelle Schwierigkeiten demonstrieren und Möglichkeiten zur Optimierung aufzeigen.

Trotz des wachsenden Forschungsinteresses sind Biofilme bis heute noch nicht vollständig erforscht, da bislang ausschließlich präparative und/oder invasive Methoden zur Biofilmuntersuchung verwendet werden. Aus diesem Grund konnte die genaue Verteilung der Bakterien, ihre Gruppierung zu Clustern und auch die Vergesellschaftung von bestimmten Bakteriengruppen noch nicht unter natürlichen Bedingungen (d.h. nicht-invasiv und ohne Probenpräparation) aufgeklärt werden. Üblicherweise wird die Biofilmstruktur mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und entsprechenden Färbetechniken bestimmt. Konzentrationsprofile werden mit Mikrosensoren aufgenommen, und die Bakterienanalyse findet durch FISH (eventuell in Kombination mit der Mikroautoradiographie) statt. Für die genaue Analyse von Anammoxbakterien wird bislang jedoch eine Kombination aus verschiedenen Methoden benötigt [7]. Die konfokale Ramanmikroskopie bietet nun die Möglichkeit, Biofilme und die in ihnen enthaltenen Bakterien in ihrem natürlichen Medium zu untersuchen.

Für abwasserrelevante Bakterien existiert bislang keine Datenbank, sodass die vorran-

gige Messaufgabe dieser Promotion darin bestand, die Unterschiede in den verschiedenen Bakterienspektren qualitativ und quantitativ zu untersuchen und dabei zu testen, ob auch Mikroorganismen aus der biologischen Abwasserreinigung signifikante spektrale Unterschiede aufweisen und somit in eine Spektrenbibliothek aufgenommen werden können. Dazu wurden ausgewählte Bakterienstämme in Reinkultur vermessen bzw. das Anammoxbakterium in einer hochangereicherten Kultur, da *Candidatus* „Brocadia Anammoxidans“ und *Candidatus* „Kuenenia Stuttgartiensis“ bislang nicht in Reinkultur vorliegen.

Bakterien zeigen sehr ähnliche Ramanspektren, die mit bloßem Auge oft kaum unterscheidbar sind, aus diesem Grund wurde die Bruker-Software „OPUS 5.5“ zur Datenauswertung herangezogen, die die weitere Verarbeitung der Rohdaten und schließlich den Vergleich von Ramanspektren mit einer (in diesem Fall selbst angelegten) Datenbank ermöglicht. Mit Hilfe dieser Software konnten sämtliche Spektren derart vorbehandelt werden, dass sie als Vergleichsspektren in eine eigene Datenbank aufgenommen werden konnten. Darüber hinaus wurde exemplarisch für *Acidovorax temperans* und *Nitrobacter hamburgensis* untersucht, welchen Einfluss Wachstumszeiten auf die Ramansignale haben. Die Kultivierungsbedingungen können Auswirkungen auf die Bakterienzusammensetzung haben, aber auch Parameter wie das Alter der Bakterien verändern die Ramansignale [48]. Um eine eindeutige Identifikation mittels einer Spektrendatenbank zu gewährleisten, müssten somit alle Bakterien nach der gleichen Wachstumsdauer und unter Idealbedingungen vermessen werden. Speziell im Abwasserbereich ist dies allerdings nicht möglich, da die hier wichtigen Bakterien sehr lange Wachstumszeiten haben und nach wenigen Stunden¹ noch nicht genügend Biomasse vorhanden ist, um aussagekräftige Ramanspektren zu erhalten.

5.1 Vorbereitungen

Zur Vorbereitung auf die eigentlichen Messungen an biologisch relevanten Proben wurden zunächst einige wichtige Parameter des konfokalen Ramanmikroskops bestimmt wie z.B. die axiale Auflösung bei unterschiedlichen Kombinationen aus Lochblende und verwendetem Objektiv. Außerdem musste genau ermittelt werden, wie hoch die auf die Probe applizierte Laserleistung ist, da biologische Proben sehr lichtempfindlich sind und durch starke Laserstrahlung leicht zerstört werden können. Für den Aufbau einer Ramandatenbank muss ein standardisiertes Auswerteverfahren festgelegt werden, da jede Manipulation am Spektrum das Ergebnis stark beeinflussen kann.

¹In der Literatur wird oft eine Kultivierungsdauer von 6 Stunden als bestes Alter für die Aufnahme von Ramanspektren angegeben [54].

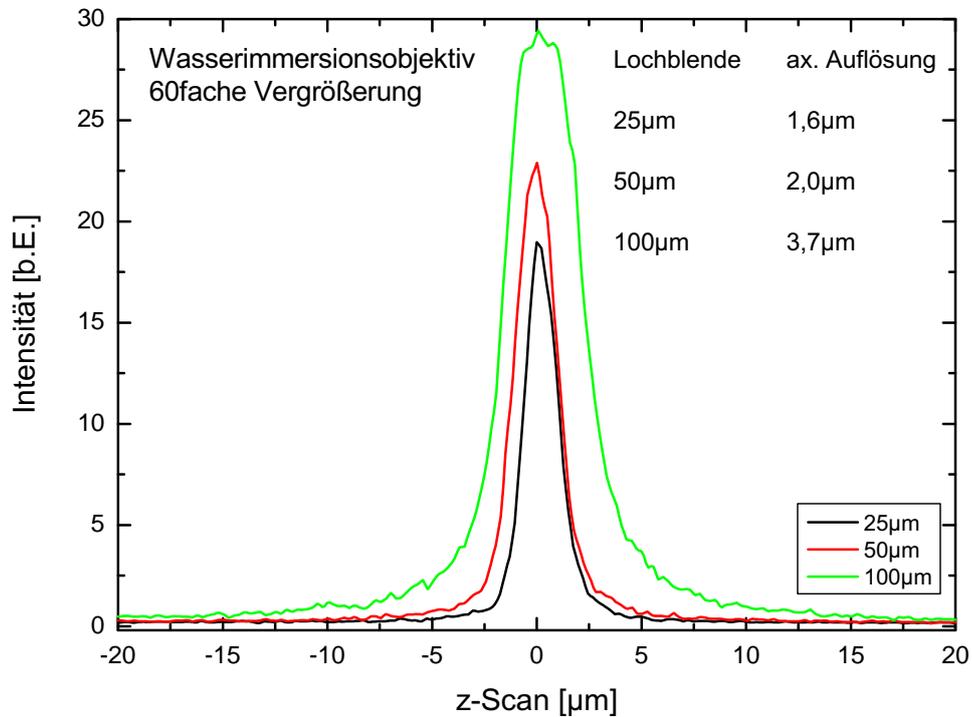


Abbildung 5.1: Axiale Auflösung der Messapparatur bei Verwendung des Wasserimmersionsobjektives (60fache Vergrößerung) und verschiedenen Lochblenden.

5.1.1 Axiale Auflösung des konfokalen Ramanmikroskops

Die axiale Auflösung des konfokalen Ramanmikroskops ist abhängig von der Lochblende und dem eingesetzten Objektiv, sodass für alle relevanten Kombinationen die axiale Auflösung bestimmt werden muss. Die Experimente an Bakterien wurden mit dem Ölimmersionsobjektiv (100fache Vergrößerung) vorgenommen, die Messungen an Zellkulturen mit dem Wasserimmersionsobjektiv (60fache Vergrößerung). Für diese Objektive wurde daher die axiale Auflösung ermittelt. Dies geschieht, indem die starke Siliziumramanbande bei 519 Wellenzahlen in Reflexion detektiert wird, während gleichzeitig der Laserfokus in z-Richtung durch die Probenebene gescannt wird. Die axiale Auflösung ergibt sich schließlich aus der vollen Halbwertsbreite der resultierenden Lorentzkurve, welche die Signalintensität der ausgewählten Ramanbande in Abhängigkeit der z-Position angibt.

Abb. 5.1 zeigt exemplarisch für das Wasserimmersionsobjektiv, dass eine Lochblende von 100 µm zwar die höchste Zahl an Ramanphotonen zum Spektrometer durchlässt, aber auch den größten Verlust an axialer Auflösung mit sich bringt. Die Auflösung ist bei Verwendung der kleinsten Lochblende dagegen am besten, die Effizienz ist hierbei allerdings

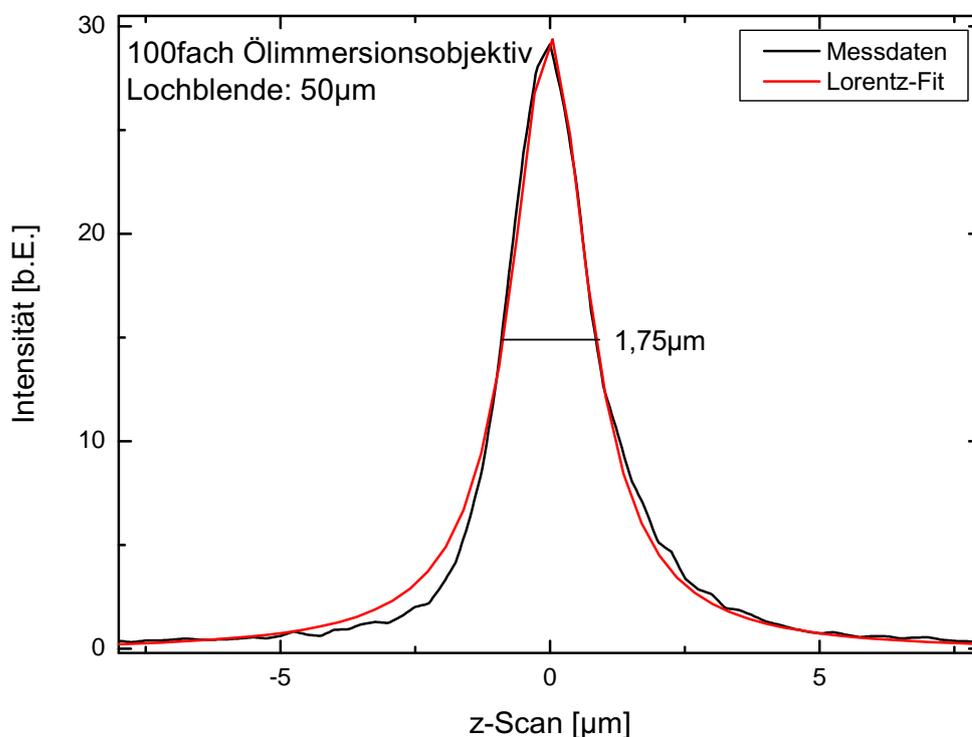


Abbildung 5.2: Axiale Auflösung der Messapparatur bei Verwendung des Ölimmersionsobjektives (100fache Vergrößerung) und einer Lochblende von $50 \mu\text{m}$. Die axiale Auflösung errechnet sich aus der vollen Halbwertsbreite des Lorentz-Fits und ergibt sich hier zu $1,75 \mu\text{m}$.

zu gering, um schwach ausgeprägte Ramanspektren aufzunehmen. Da stets ein Kompromiss zwischen maximaler axialer Auflösung und höchster Signaleffizienz gefunden werden muss, wurde für die folgenden Experimente die mittlere Lochblende ausgewählt, die eine hohe Auflösung ermöglicht, gleichzeitig aber auch eine möglichst hohe Effizienz.

5.1.2 Laserleistung

Sämtliche Messergebnisse aus diesem Promotionsteil wurden unter Verwendung eines Dioden-gepumpten Nd:YAG-Lasers im Dauerstrichbetrieb mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm gewonnen. Der verwendete Laser ist frequenzstabilisiert sowie mit einem Verschluss und einem manuellen Strahlabschwächer ausgestattet. Mit Hilfe einer Mikrometerschraube lässt sich die Abschwächung der Laserleistung regulieren oder auch vollkommen abblocken. Für jede Einstellung der Mikrometerschraube wurde die Laserleistung in der Probenebene bestimmt, um bei den Experimenten an Bakterien und Zellen

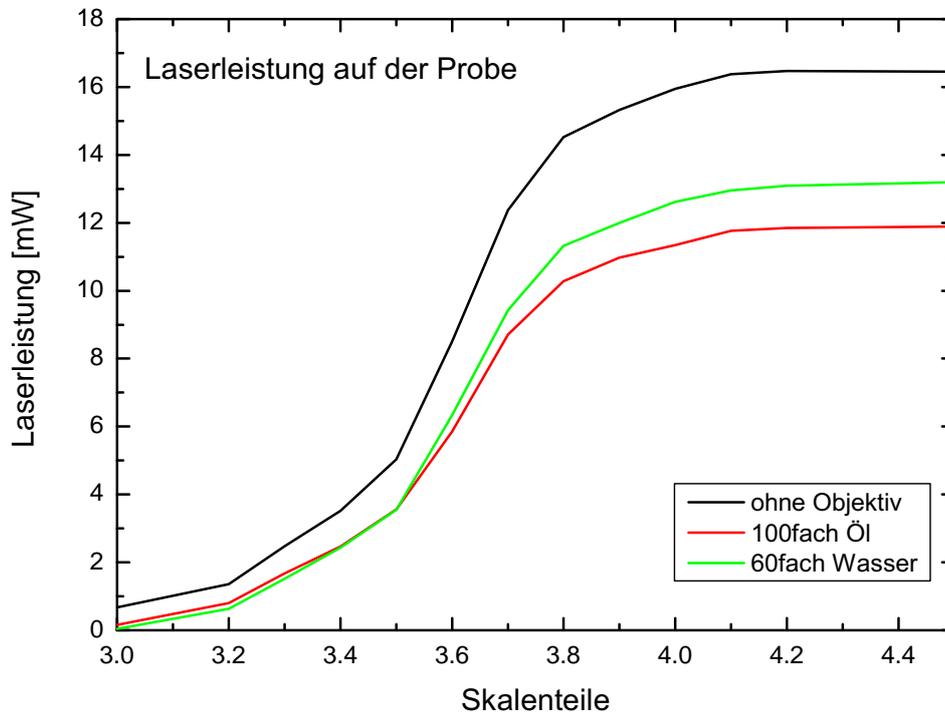


Abbildung 5.3: Laserleistung auf der Probe in Abhängigkeit der Stellung der Mikrometerschraube: Für die beiden verwendeten Objektive wurde die Laserleistung in der Probenebene bestimmt. Als Vergleich ist die maximal mögliche Laserleistung angegeben, die durch das Mikroskop transportiert wird, wenn sich kein Objektiv im Strahlengang befindet.

gewährleisten zu können, dass die Proben keiner zu starken Einstrahlung ausgesetzt werden. Regelmäßige Kontrollmessungen haben die Leistungsstabilität des Lasers überprüft.

5.1.3 Immobilisierung und Feuchthalten der Bakterien

Alle Bakterien wurden für die Messungen in PBS suspendiert, um die Zellen vor dem Platzen zu schützen. In ihrem Medium können die Bakterien sich allerdings frei bewegen, sodass nicht sicher ist, über welche Zeit die Bakterien bei der Messung im Laserfokus verbleiben. Für die Experimente sind daher zwei Dinge zu bedenken: Einmal müssen die Bakterien feucht gehalten werden, da trockene Proben durch die stark fokussierte Laserstrahlung zu leicht zerstört werden. Auf der anderen Seite wären immobilisierte Bakterien ideal, um quantifizieren zu können, über welchen Zeitraum das zu untersuchende Bakterium im Laserfokus festgehalten werden konnte.

In der Praxis erwies sich die Untersuchung der Bakterien als sehr aufwändig, da verschiedene Ansätze versucht werden mussten:

- **Messungen an einer Bakteriensuspension:** Die einfachste Möglichkeit zur Bakterienanalyse ist die Applizierung eines Tropfens Bakteriensuspension auf einen Objektträger. Über den Tropfen wird ein Deckglas² gelegt, damit die Bakterien nicht mit dem Objektiv in Berührung kommen (s. Abb. 5.4). Der Bakterientropfen unter dem Deckglas trocknet allerdings sehr schnell aus, sodass die Ränder des Deckglases mit Nagellack versiegelt werden müssen, um diesen Trocknungseffekt zu verhindern. Dadurch kann die Probe über zwei oder drei Tage hinreichend feucht gehalten werden.
- **Verwendung einer Zählkammer:** Zwischen der Zählkammer und dem Deckglas verbleibt eine Schicht von $200\ \mu\text{m}$, sodass die Bakterien auch in dieser Anordnung in ihrem Medium verbleiben, allerdings sind sie hierbei ebenfalls nicht immobilisiert. Für die vorgestellten Experimente wurde diese Probenanordnung nicht verwendet, da die Zählkammer zu sehr starken Glasbeiträgen in den Ramanspektren führte, welche mit der einfachen Objektträgeranordnung nicht so stark ausgeprägt waren.
- **Immobilisierung der Bakterien auf Polylysin:** Bei den obigen Methoden können die Bakterien weiterhin frei im Medium schwimmen, sodass nie sicher ist, wie lange ein Bakterium überhaupt im Laserfokus verbleibt. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Bakterien auf eine Polylyschicht aufgebracht. Auf einer solchen Schicht werden die Bakterien immobilisiert, sodass sie zuverlässig vermessen werden können. Bei dieser Anordnung ergaben sich jedoch andere Probleme, denn die Polylyschicht wurde durch die stark fokussierte Laserleistung sehr schnell zerstört. Auch die Bakterien waren auf der Schicht (licht-)empfindlicher als ohne, was sich in dem schnellen Ausbleichen der starken Ramanbanden niederschlug.
- **Optische Pinzette:** Als Lösung bietet sich eine optische Pinzette an, mit der die Bakterien oder andere kleine Partikel berührungslos im Laserfokus festgehalten und bewegt werden können. Hierdurch werden Einflüsse vom darunter liegenden Objektträger ausgeschlossen [50]. Außerdem kann gewährleistet werden, dass die Probe über die gesamte Belichtungsdauer im Fokus verbleibt. Zudem verhindert die optische Pinzette, dass das zu untersuchende Bakterium eine Verbindung mit der Polylyschicht eingeht und dabei nicht vorhersagbar in seiner Funktion beeinflusst wird. Doch auch mit der optischen Pinzette werden keine wesentlich längeren Belichtungszeiten möglich sein, da einige Bakterien sich als sehr lichtempfindlich erwiesen haben und schon nach wenigen Sekunden zerstört wurden. Zur Zeit wird

²Für die Messung mit dem Ölimmersionsobjektiv muss ein genau passendes Deckglas verwendet werden, um Verluste durch Brechung zu verhindern.

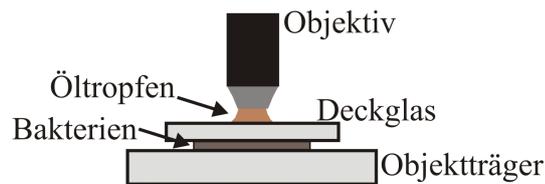


Abbildung 5.4: Probenanordnung: Ein Tropfen Bakteriensuspension wird auf den Objektträger bzw. in die Zählkammer appliziert, darüber wird ein Deckglas gelegt. Bei Verwendung des Ölimmersionsobjektivs muss zwischen Deckglas und Objektiv ein Öltropfen gebracht werden, um Verluste durch Brechung zu verhindern.

eine solche optische Pinzette am Institut für Biophysik realisiert, doch stand sie für die hier vorgestellten Messungen noch nicht zur Verfügung. Allerdings konnte eine optische Pinzette manchmal als eine Art „zufälliger Effekt“ beobachtet werden.

- **Ausbleichen:** Insbesondere die *Nitrosomonas*-Bakterien erwiesen sich als äußerst lichtempfindlich. Auf der Polylysinschicht verbrannten sie sofort und konnten nicht detektiert werden, aber auch in PBS bleichten die starken Ramansignale schnell aus, sodass für diese Bakterien nur kurze Belichtungszeiten von maximal 5 Sekunden sinnvoll erscheinen.

5.2 Analyse bekannter Bakterien

Zunächst stand die Etablierung einer möglichst idealen Messprozedur im Vordergrund. Hierfür wurden bekannte Bakterien vermessen, deren Spektren durch Publikationen leicht überprüft werden konnten. Bei der Vermessung von Bakterienkulturen stellen sich einige wichtige Fragen hinsichtlich der Messanordnung an den Experimentator, die zuvor ausführlich beschrieben wurden. Die auftauchenden Probleme bei den Bakterienmessungen samt eigener Lösungsvorschläge sollen im Folgenden anhand der Ramanspektren verschiedener Bakterien dargestellt werden.

5.2.1 *Escherichia Coli*

E. Coli ist ein beliebtes Untersuchungsobjekt für ramanspektroskopische Messungen, da diese Bakteriengattung eine Verdopplungszeit von nur 20 Minuten hat und somit schnell einsatzbereit und vermessbar ist. Für die Messungen mit dem konfokalen Ramanmikroskop an *E. Coli* wurden die Bakterien auf eine Polylysinschicht aufgebracht und dadurch immobilisiert. *E. Coli* konnte zerstörungsfrei sehr lange belichtet werden und zeigte im Ramanspektrum dann einige Banden, die Schwingungen der DNS zugeordnet werden können (s. Abb. 5.5, s. Tab. 5.1).

Wellenzahl	zugehörige Schwingung
667	Guanin (RNA)
741	nicht zugeordnet
780	Cytosin, Thymin (DNS)
991	nicht zugeordnet
1122	Protein: C-N, C-C Streckschwingung oder C-O-C
1301	Adenin, Guanin
1330	Guanin, Protein
1441	CH_2 , Lipide, Proteine
1576	NH Deformation, CN Streckschwingung
1607	Phenylalanin, Tyrosin
1655	$C = C$, Amide I

Tabelle 5.1: Ramanbanden von *Escherichia Coli*: *E. Coli* zeigt bei langen Belichtungszeiten viele Raman-signale, die der DNS und auch Proteinen zugeordnet werden können (aus [50]).

Tab. 5.1 listet die aufgefundenen Ramanbanden mitsamt der zugehörigen Schwingungen auf, wobei sich zu zwei Signalen keine bekannte Molekülschwingung findet. Da bei 1607 cm^{-1} der Phenylalaninpeak auftaucht, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bande bei 991 cm^{-1} ebenfalls um Phenylalanin handelt, die Bande aber etwas nach links

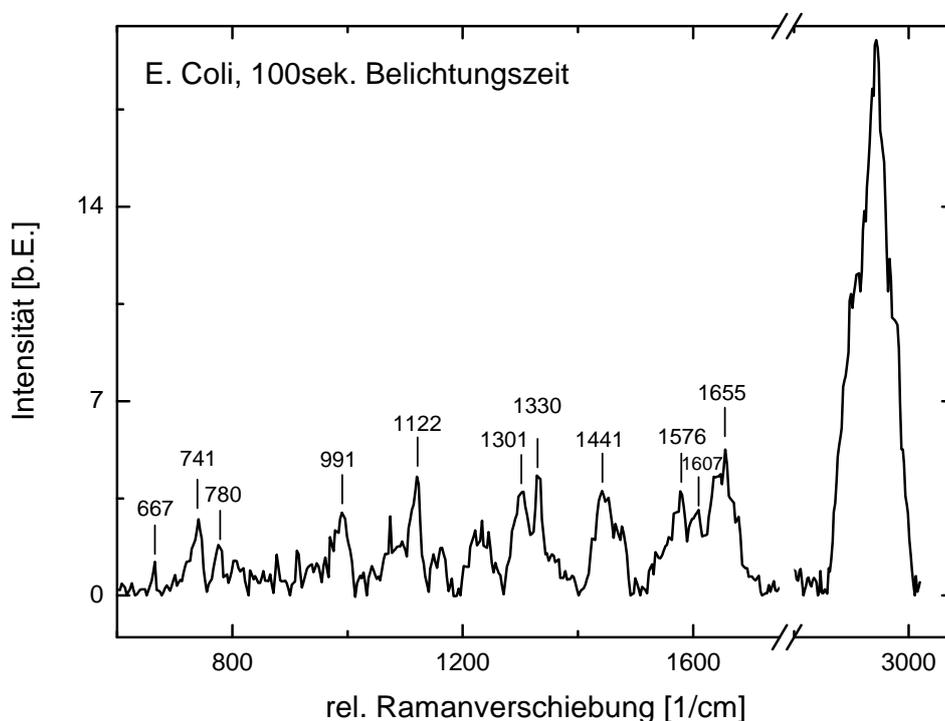


Abbildung 5.5: Ramanspektrum von *Escherichia Coli*: Die Belichtungszeit beträgt 100 s, die Laserleistung 10 mW auf der Probe.

verschoben ist. Bei dem Ramanpeak bei 741 cm^{-1} könnte es sich um die bislang nicht identifizierte Bande handeln, die bei Bakterien häufig auftritt. Warum einige Banden etwas verschoben detektiert wurden, konnte nicht geklärt werden, da andere Peaks genau bei der erwarteten Wellenzahl auftauchten.

Bei längeren Messungen konnte dank der kurzen Generationszeiten dieses Bakterienstamms sogar die Zellteilung beobachtet werden. Abb. 5.6 zeigt zwei verschiedene APD-Aufnahmen der gleichen *Escherichia Coli*-Probe, welche in axialer Richtung abgescannt wurde. Beide Bilder stellen folglich einen z-Schnitt durch die Bakterien auf der Polylysinschicht dar. Das untere Bild wurde eine halbe Stunde nach dem obigen aufgenommen und zeigt im gelb umrandeten Bereich ein Bakterium mehr. Aufgrund einer Verdopplungszeit von nur 20 Minuten ist davon auszugehen, dass mit der APD in diesem Fall eine Zellteilung detektiert werden konnte.

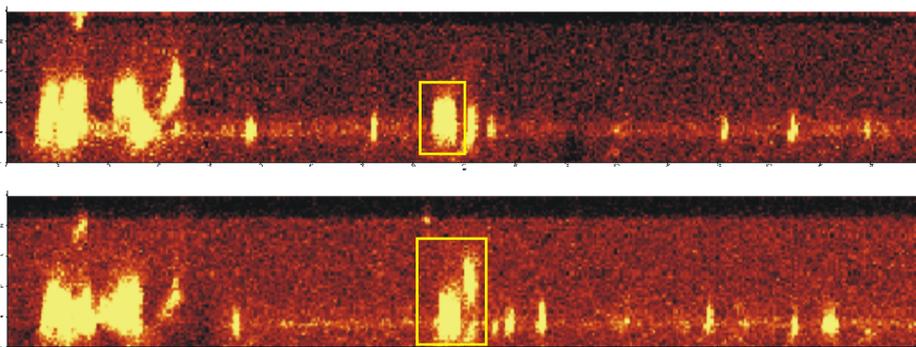


Abbildung 5.6: Zellteilung von *E. Coli*: Beide Bilder zeigen einen Ausschnitt von $30 \cdot 180 \mu\text{m}^2$ (in zx -Richtung) und wurden mit der APD aufgenommen, wobei die Bande bei 2935 Wellenzahlen vermessen wurde. Gelb markiert sind die Bereiche, in denen wahrscheinlich die Zellteilung stattgefunden hat. Im oberen Bild ist nur ein Bakterium zu sehen, im unteren Bild taucht ein zweites auf. Aufgrund der charakteristischen Verdopplungszeit von *Escherichia Coli* ist davon auszugehen, dass hier eine Zellteilung beobachtet werden konnte.

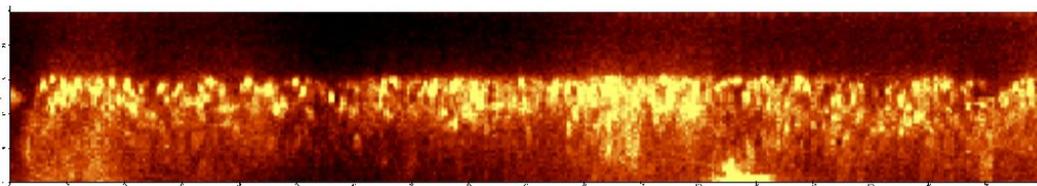


Abbildung 5.7: Tiefenscan eines *Bacillus subtilis*-Clusters: Die Aufnahme zeigt einen Ausschnitt von $30 \cdot 180 \mu\text{m}^2$, der in z -Richtung abgescannt und mit der APD aufgenommen wurde. Hierbei wurde die Bande bei 2935 Wellenzahlen detektiert. Die Belichtungszeit pro Pixel beträgt 0,01 s, die Laserleistung auf der Probe 10 mW. Bis in eine Tiefe von etwa $15 \mu\text{m}$ in den Cluster hinein konnten hierbei Bakterien detektiert werden.

5.2.2 *Bacillus pumilus* und *Bacillus subtilis*

In der Literatur wurden bereits etliche Ramanspektren verschiedener *Bacillus*-Stämme veröffentlicht, um beispielsweise die Einflüsse von Kultivierungsbedingungen auf die Ramanspektren und damit die Identifizierung unterschiedlicher *Bacillus*-Stämme zu analysieren [48], [47]. Auch kann hierdurch die Leistungsfähigkeit der hierarchischen Clusteranalyse überprüft werden. Für den Aufbau der eigenen Bakteriendatenbank wurden zwei verschiedene *Bacillus*-Arten verwendet, die zusammen mit weiteren bereits bekannten Ramanspektren (die im Allgemeinen recht unterschiedlich aussehen) helfen konnten, das Auswerteverfahren zu optimieren. Die bislang nicht publizierten Ramanspektren der abwasserrelevanten Stämme (*Brocadia*, *Kuenenia*, *Acidovorax*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*) erfolgte erst, nachdem die anderen Bakterienstämme und -arten korrekt in Cluster eingeteilt werden konnten.

Für die Ramanexperimente an *Bacillus subtilis* wurden die Bakterien auf eine Polylysinschicht aufgebracht. Die Bakterien ordneten sich hierbei in dicken Clustern an (s. Abb.

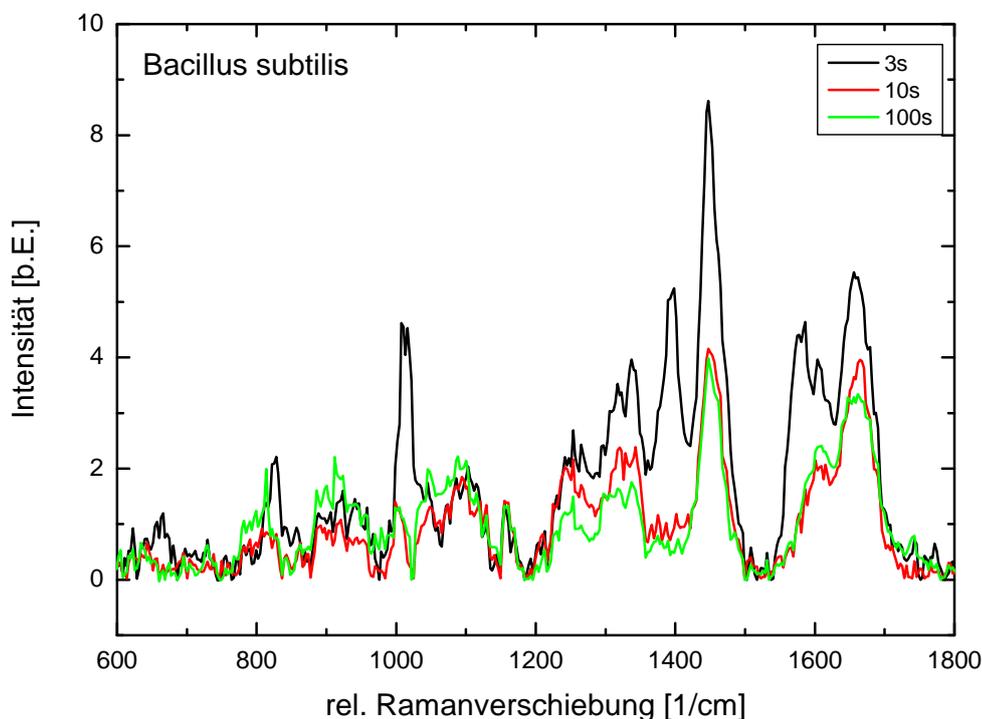


Abbildung 5.8: Messungen mit verschiedenen langen Belichtungszeiten an *Bacillus subtilis*: Alle Messungen wurden bei einer Laserleistung von 10 mW auf der Probe durchgeführt, schon bei einer Belichtungszeit von 10 s sind starke Veränderungen der Signalintensitäten zu bemerken. Die Spektren wurden auf den Bereich der CH-Schwingung normiert, außerdem wird nur der wichtige Fingerprintbereich dargestellt, in welchem die Signalverluste zu bemerken sind.

5.7), in denen die Mikroorganismen in ihrer festen Position verblieben sind, sodass zuverlässige Langzeitmessungen möglich waren. Messungen mit längeren Belichtungszeiten wurden auf zwei verschiedene Arten durchgeführt: Einmal kann die Probe während der Messung abgescannt werden, die längstmögliche Belichtungszeit beträgt hierbei 5 s pro Messpunkt. Beliebig lange Messzeiten sind dagegen an einem festen Messfleck möglich.

Die Langzeitmessungen an *Bacillus subtilis* ergaben, dass bei Belichtungszeiten von mehr als 5 Sekunden ein deutlicher Signalabfall zu bemerken ist. Während in der Region bei 2935 Wellenzahlen, in welcher die asymmetrische CH₂-Schwingung zu sehen ist, keine Intensitätseinbrüche auch bei längeren Belichtungszeiten zu sehen sind, fallen im Fingerprintbereich auf den ersten Blick Ramanbanden auf, die bei Belichtungszeiten von 10 s nicht mehr so stark ausgeprägt sind (s. Abb. 5.8). Besonders deutlich sind die Einbrüche bei 1004 cm⁻¹ (Phenylalanin), bei 1395 cm⁻¹ (nicht zugeordnet), bei 1578 cm⁻¹ (Adenin, Guanin) und bei 1607 cm⁻¹ (Phenylalanin, Tyrosin).

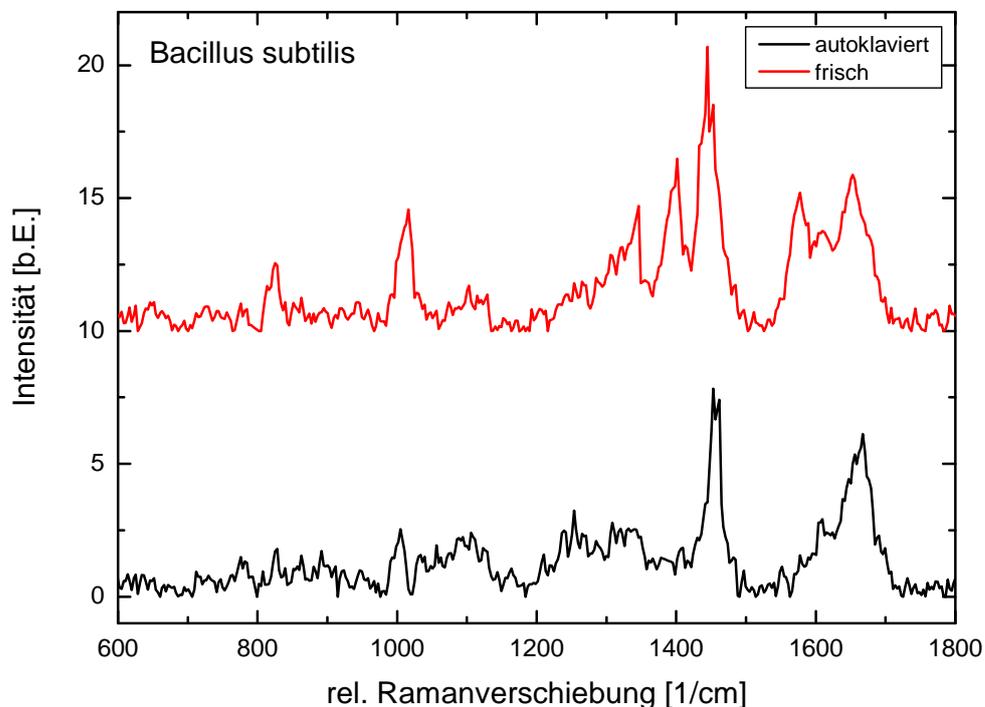


Abbildung 5.9: Ramanspektren von *Bacillus subtilis* - Vergleich zwischen einer frischen Bakterienprobe und einer autoklavierten Probe: Beide Spektren wurden mit 10 mW Laserleistung auf der Probe aufgenommen und 5 s lang belichtet, der Übersichtlichkeit halber wurden die Spektren in y-Richtung verschoben. Deutlich ist zu erkennen, dass die Ramanbanden der frischen Bakterienprobe wesentlich ausgeprägter sind als diejenigen der autoklavierten Bakterien. Wie erwartet, verändern die Bakterien sich also durch die Autoklavierung.

Obwohl also bei längeren Belichtungszeiten theoretisch mit ausgeprägteren Ramansignalen zu rechnen ist, können Bakterien nicht beliebig lang belichtet werden, da sie durch die stark fokussierte Laserstrahlung leicht zerstört werden können. Belichtungszeiten von 3-5 s erscheinen für Bakterienuntersuchungen daher praktikabel. In der Literatur wurde das Ausbleichen signifikanter Ramanbanden bereits erwähnt, konnte jedoch noch keinen bestimmten photosensiblen Substanzen zugeordnet werden, die speziell im grünen und auch blauen Bereich absorbieren und durch entsprechende Wellenlängen leicht zerstört werden. Vermutet werden als Ursache photochemische Prozesse, während die zu starke Erhitzung der Probe ausgeschlossen werden konnte [68].

Im Autoklaven können selbst resistente Bakteriensporen abgetötet werden. Es ist bereits gezeigt worden, dass sogar unterschiedliche Kultivierungsbedingungen zu Veränderungen der Schwingungsbanden führen [62]. Folglich ist davon auszugehen, dass eine derart radikale Methode wie die Autoklavierung ebenfalls veränderte Ramansignale hervorru-

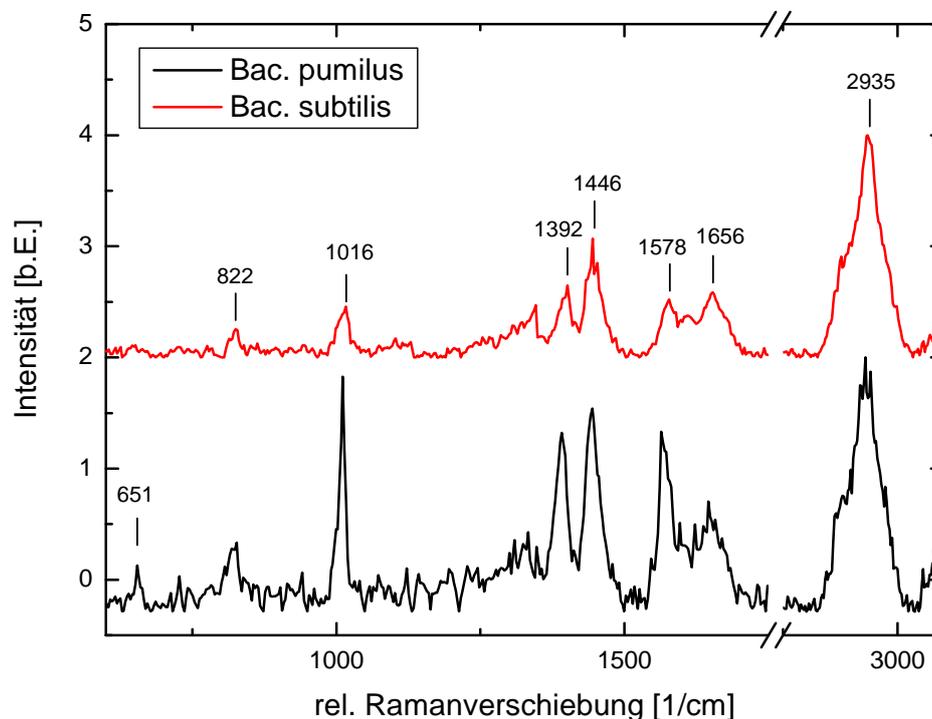


Abbildung 5.10: Spektrenvergleich zwischen *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus*: Beide Spektren wurden mit 10 mW Laserleistung auf der Probe gemessen und 5 s belichtet. Auch unter gleichen Messbedingungen zeigen diese verwandten Bakterienstämme deutliche Unterschiede, obwohl auch die Verwandtschaft klar wird beim Vergleich der Spektren.

fen müsste. Um dies zu untersuchen, wurde eine Kultur von *Bacillus subtilis* autoklaviert (121°C, 2 bar, 15 min.) und anschließend mit dem konfokalen Ramanmikroskop untersucht. Auch nach der Autoklavierung sind ähnliche Ramansignale aufzufinden (s. Abb. 5.9), doch sind auch signifikante Unterschiede zwischen den Ramanspektren frischer Bakterien und autoklavierter Bakterien zu bemerken. Ähnlich wie bei zu langen Belichtungszeiten fehlen die Peaks bei 1395 cm⁻¹ und bei 1578 cm⁻¹, die Phenylalanin-peaks bei 1004 cm⁻¹ und 1607 cm⁻¹ konnten dagegen weiterhin detektiert werden.

Um verschiedene *Bacillus*-Arten miteinander vergleichen zu können, wurde neben *Bacillus subtilis* auch *Bacillus pumilus* untersucht. Beide Bakterienarten zeigen ähnliche, aber dennoch gut voneinander unterscheidbare Ramanspektren (s. Abb. 5.10), die eine Einsortierung in Bakteriencluster leicht möglich machen. Anders als bei den *Nitrosomonas*-Stämmen (s. u.) sind spektrale Unterschiede schon mit bloßem Auge erkennbar, sodass auch die Bruker-Software die beiden Arten leicht voneinander unterscheiden kann, dennoch aber in der zweiten Stufe die *Bacillus*-Spektren in einen gemeinsamen Cluster einsortiert (s. Abb. 5.21).

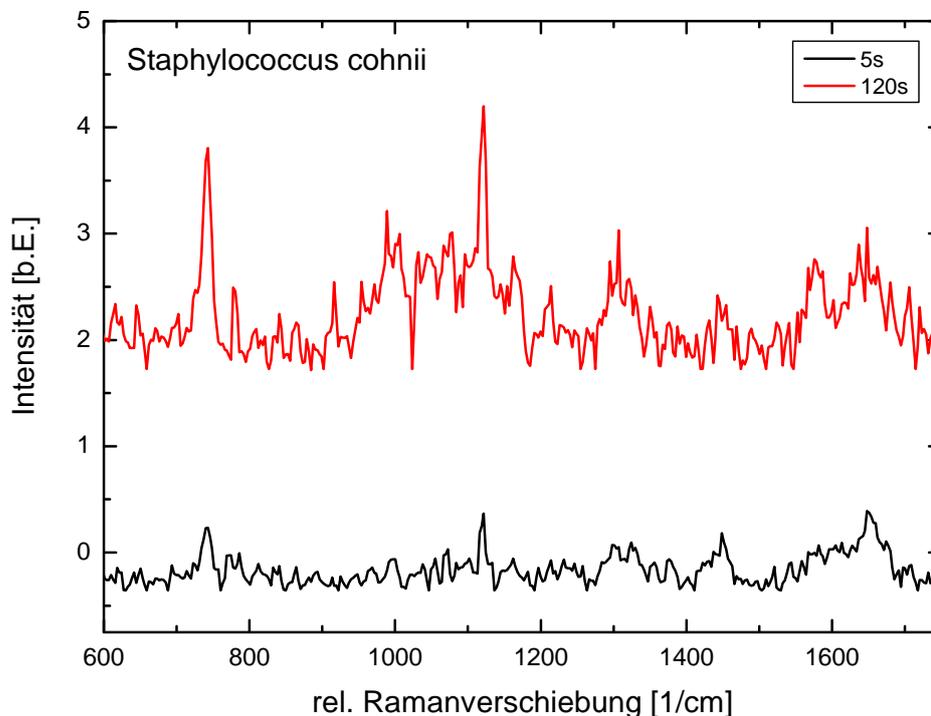


Abbildung 5.11: Ramanspektren von *Staphylococcus cohnii* bei unterschiedlichen Belichtungszeiten, die Laserleistung beträgt in beiden Fällen 10 mW auf der Probe. Deutlich ist zu erkennen, dass die Ramansignale von *Staphylococcus cohnii* erst bei sehr langen Belichtungszeiten hervortreten.

5.2.3 *Staphylococcus cohnii*

Auch *Staphylococcus*-Bakterien wurden bereits hinlänglich untersucht und können daher gut mit Literaturspektren verglichen werden [62], [47]. Bei den Untersuchungen an *Staphylococcus cohnii* mit dem konfokalen Ramanmikroskop zeigten die Bakterien nur sehr schwache Signale, Belichtungszeiten von mindestens zwei Minuten waren notwendig, um überhaupt signifikante Ramansignale zu erhalten (s. Abb. 5.11). Diese Bakteriengattung zeigte im Gegensatz zu den *Bacillus*-Arten keine Zerstörung bei längeren Belichtungszeiten, sodass ohne Probleme Langzeitmessungen durchgeführt werden konnten. Ein Vergleich der erhaltenen Spektren mit den Literaturspektren von *Staphylococcus cohnii* zeigte sehr gute Übereinstimmungen nicht nur in der Lage der einzelnen Peaks, sondern auch in ihren relativen Intensitäten.

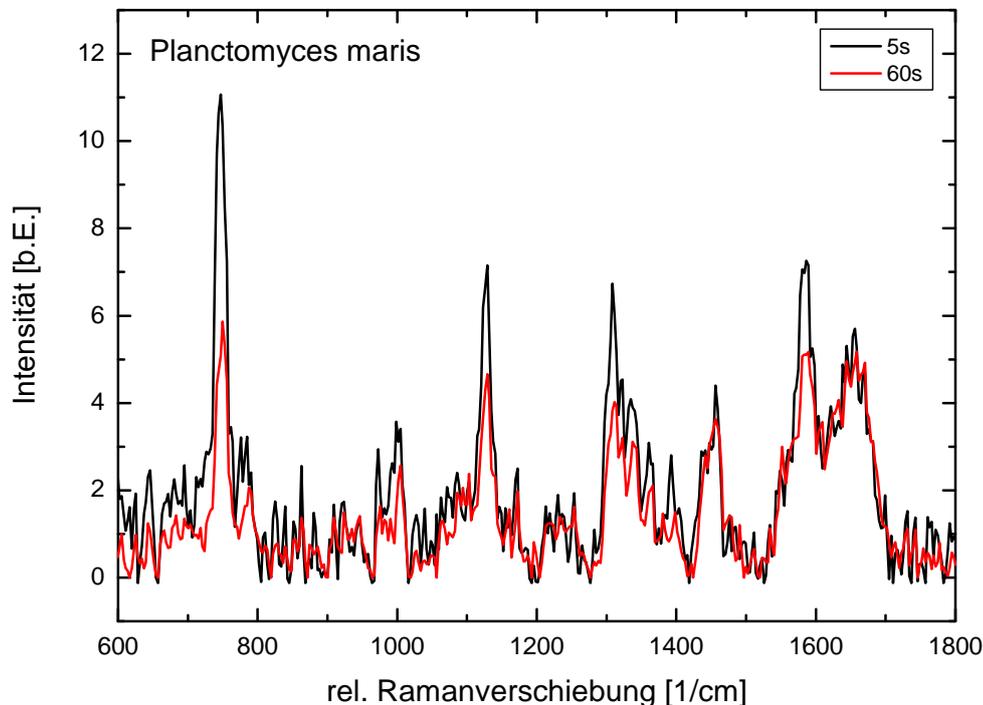


Abbildung 5.12: Ramanspektren von *Planctomyces maris* bei unterschiedlichen Belichtungszeiten, die Laserleistung beträgt in beiden Fällen 10 mW auf der Probe. Auch bei dieser Bakterienart sind Zerstörungserscheinungen bei zu langen Belichtungszeiten zu sehen. Speziell die vier starken Banden bei 747 cm^{-1} , 1127 cm^{-1} , 1309 cm^{-1} und bei 1586 cm^{-1} sind bei einer Belichtungszeit von einer Minute weniger ausgeprägt als bei 5 s. Es ist anzunehmen, dass Strukturen innerhalb des Bakteriums zerstört werden.

5.2.4 *Planctomyces maris*

Dieses Bakterium gehört wie das Anammoxbakterium zu der Ordnung der Planctomyzeten, ist phylogenetisch allerdings relativ weit entfernt von den verschiedenen Anammoxgattungen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde *Planctomyces maris* ausgewählt als Vergleichsbakterium, um noch eine weitere Planctomyzete der spektralen Datenbank vorgeben zu können.

Das Spektrum von *Planctomyces maris* wird dominiert durch vier intensive Ramanpeaks bei 747 cm^{-1} , 1127 cm^{-1} , 1309 cm^{-1} und 1586 cm^{-1} , welche in der Literatur nur zum Teil zugeordnet sind. Besonders die auffällige Bande bei 747 cm^{-1} konnte noch keiner speziellen Schwingung zugeordnet werden [62] und ist damit besonders interessant. Auch dieses Bakterium verhält sich sehr lichtempfindlich und wird durch zu lange Belichtungszeiten zerstört (s. Abb. 5.12). Bei Integrationszeiten von einer Minute fallen die charakteristischen Ramanbanden schwächer aus als bei kürzeren Belichtungszeiten von

etwa 5 s, dennoch fehlen hier keine Ramanbanden. Trotz einer Belichtungszeit von insgesamt einer Minute können bei diesem Bakterium weiterhin alle wichtigen Ramanpeaks detektiert werden.

5.3 Analyse von abwasserrelevanten Bakterien

In kommunalen Abwässern werden verschiedene Bakterien erwartet, welche für die unterschiedlichen Abbauprozesse verantwortlich sind. Für den Abbau von Ammonium in hochbelasteten Abwässern werden speziell *Nitrosomomas* und *Nitrobacter* benötigt, für die einstufige Umwandlung durch die anaerobe Ammoniumoxidation sind Anammoxbakterien verantwortlich. Dies sind folglich die für den Aufbau einer Bakteriendatenbank speziell für die Abwasseranalyse interessierenden Bakterien. *Nitrobacter hamburgensis* konnte vom DSMZ in Reinkultur bezogen werden, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas europea* und Anammoxbakterien standen über zwei Kooperationen zur Verfügung, sodass diese wichtigen Bakterien der Datenbank hinzugefügt werden konnten.

Die zu analysierenden Biofilme aus dem Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover sind deammonifizierend und konnten ohne ein spezielles Animpfen mit entsprechender Biomasse auf die anaerobe Ammoniumoxidation eingestellt werden. Bei den in SBR1 und SBR2 vorliegenden Anammoxbakterien handelt es sich um *Candidatus* „*Kuenenia stuttgartiensis*“, sodass die Spektren der Delfter Anammoxbakterien nicht direkt mit den Bakterienspektren aus den hiesigen Biofilmen verglichen werden können. Eine sich stellende interessante Frage ist allerdings, ob die beiden unterschiedlichen Anammoxbakteriengattungen mittels der konfokalen Ramanmikroskopie unterschieden werden können.

Bei der praktischen Untersuchung der beiden interessierenden Anammoxgattungen ergeben sich allerdings einige experimentelle Schwierigkeiten, die bislang noch nicht gelöst werden konnten. So liegt *Candidatus* „*Brocadia anammoxidans*“ in einer hochangereicherten Kultur vor, aus welcher Referenzspektren erhalten werden können. *Candidatus* „*Kuenenia stuttgartiensis*“ muss für die Aufnahme von Referenzspektren aus dem Biofilm heraus aufgereinigt werden. Für diese Prozedur müssen allerdings mittels Ultraschall oder Ultraturax die Aggregate aufgebrochen werden, um angereicherte Einzelzellen eines Typs zu erhalten. Dadurch wird der Umsatz der Bakterien sofort eingestellt. Laut [7] können diese Bakterien mit Hilfe von Hydrazin wieder aktiviert werden, dies konnte bei den vorliegenden Bakterien jedoch nicht bestätigt werden [69]. Sollen beide Anammoxgattungen also unter gleichen Bedingungen vermessen werden, so müsste *Candidatus* „*Kuenenia stuttgartiensis*“ folglich auch ähnlich hoch angereichert werden bzw. *Candidatus* „*Brocadia anammoxidans*“ müsste aus der hochangereicherten Kultur heraus isoliert werden. Allerdings sollten inaktive Bakterien als Referenz für die Bakterienda-

tenbank nicht verwendet werden, da davon auszugehen ist, dass die im Biofilm befindlichen Bakterien sehr wohl noch stoffwechselaktiv sind. Somit scheidet die Aufreinigung von Bakterien für die Datenbankerstellung als Methode aus, sodass in Zukunft versucht werden muss, eine ähnlich hoch angereicherte Kultur auch mit *Candidatus „Kuenenia stuttgartiensis“* zu züchten.

5.3.1 *Anammox*

Bis heute ist es nicht gelungen, Anammoxbakterien in Reinkultur zu erhalten. Stattdessen können sie durch entsprechende Betriebsparameter angereichert oder über einen Percoll-Dichtegradienten isoliert werden [35]. Aus Delft wurden dem Institut für Biophysik hochangereicherte Anammoxkulturen zur Verfügung gestellt, in denen *Candidatus „Brocadia anammoxidans“* auf 70 bis 80 % der Biomasse angereichert werden konnte. Diese Kulturen waren bereits Untersuchungsgegenstand einer vorangegangenen Arbeit [59], werden hier aber der Vollständigkeit halber mit aufgeführt und durch Spektren der isolierten *Kuenenia*-Bakterien ergänzt. Um ein Referenzspektrum für *Candidatus „Kuenenia stuttgartiensis“* zu erhalten, welche in den Biofilmen der Reaktoren vom Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik für den Stoffwechsel sorgen, wurden mit Hilfe der in [35] beschriebenen Methode Anammoxbakterien aus dem Biofilm heraus aufgereinigt und anschließend analysiert.

Anders als in den vorhandenen Reinkulturen gruppieren die Bakterien sich in der hochangereicherten Anammoxkultur bereits zu Clustern zusammen und schwimmen nicht mehr frei im Medium. Ramanspektren geben Auskunft über Bindungsstrukturen. Wenn sich Bakterien also zu festen Biofilmstrukturen zusammenschließen, verändern sich dadurch möglicherweise auch seine Ramanbanden. Es könnte folglich sein, dass einzelne Bakterien andere Signale aufweisen als solche, die sich innerhalb von Biofilmen zu größeren Clustern zusammen schließen und dabei EPS produzieren. Daher müssen bei der Erstellung der spektralen Datenbank für abwasserrelevante Bakterien Abweichungen der Ramanbanden in Kauf genommen werden. Inwieweit Referenzspektren aus Reinkulturen somit verwendet werden können zur Identifikation von Bakterien aus festen Biofilmstrukturen, muss noch genau untersucht werden.

Isolierte *Kuenenia*-Anammoxbakterien

Für die weitere Anreicherung von Anammoxbakterien wurde Biomasse aus dem SBR2 entnommen und durch Ultraschall auf Zellgröße zerkleinert. Problematisch ist hierbei die geringe Ausbeute der Prozedur, denn nur etwa 1 % der eingesetzten Biomasse bleibt nach der Trennung durch den Percoll-Dichtegradienten als Probenmenge übrig. Außerdem ist

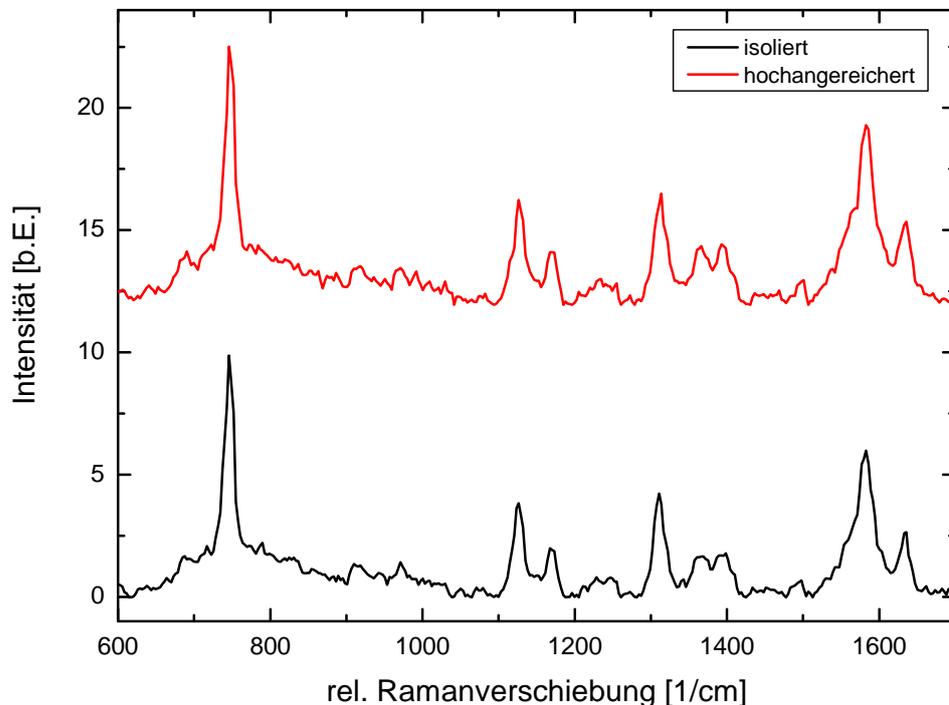


Abbildung 5.13: Vergleich der Ramanspektren des isolierten *Kuenenia*-Bakteriums, welches über den Percoll-Dichtegradienten gewonnen wurde, mit dem *Brocadia*-Bakterium aus der hochangereicherten Kultur: Beide Spektren wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen (5 s Belichtung, 5 mW Laserleistung auf der Probe, Wasserimmersionsobjektiv mit 60facher Vergrößerung) und mit Opus hintergrund- sowie grundlinienkorrigiert und auf den Bereich der CH-Schwingung normiert. Zwischen beiden Spektren sind äußerst gute Übereinstimmungen zu beobachten.

inzwischen bekannt, dass die Anammoxbakterien ihre Stoffwechselaktivität einstellen, wenn sie nicht mehr als Cluster vorliegen [69]. Wenn also Bakterien über den Percoll-Dichtegradienten weiter aufgereinigt und im Anschluss daran ramanmikroskopisch untersucht werden, handelt es sich bei den analysierten Bakterien um solche, die keinen Umsatz mehr machen.

Die isolierten Bakterien wurden ramanmikroskopisch untersucht und mit Spektren der hochangereicherten Kultur aus Delft verglichen. Da die Delfter Kultur nicht mehr mit frischem Medium versorgt wurde, ist anzunehmen, dass es sich bei den untersuchten Anammoxbakterien um inaktive Bakterien handelt. Daher sind die Spektren mit denen der isolierten Bakterien besser vergleichbar, auch wenn es sich um zwei verschiedene Anammoxkandidaten handelt. In Abb. 5.13 sind zwei ausgewählte Spektren der hochangereicherten Kultur und der isolierten Bakterien zu sehen. Da beide Spektren auf die CH-Schwingung normiert wurden, sind außerhalb des Fingerprintbereiches keine Unter-

schiede mehr erkennbar, sodass hier nur der Fingerprintbereich gezeigt wird. Ein Spektrenvergleich mit der Bruker-Software ergibt eine so hohe Übereinstimmung der beiden Spektren, dass die verschiedenen Anammoxspektren für die Erstellung der Bakteriendatenbank alle in dieselbe Unterbibliothek einsortiert wurden. Die Differenzen zwischen den Spektren isolierter Anammoxbakterien und den Spektren aus der hochangereicherten Kultur aus Delft sind so gering, dass es nicht sinnvoll erscheint, sie in unterschiedliche Unterbibliotheken zu gruppieren, da dies unweigerlich zu Schwierigkeiten bei der Bakterienbestimmung mit Hilfe dieser Datenbank führen würde. Aufgrund der erfolgreichen Unterscheidung zwischen isolierten *Kuenenia*-Bakterien und den hochangereicherten *Brocadia* mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse sollten die beiden Gattungen allerdings auch bei der Datenbankerstellung voneinander unterschieden werden können.

Hochangereicherte *Brocadia*-Kultur

In Delft konnte eine Kultur aus *Candidatus* „*Brocadia* Anammoxidans“ auf insgesamt 70-80 % der Biomasse angereichert werden. Diese stand für Messungen am konfokalen Ramanmikroskop zur Verfügung, um Referenzspektren von Anammoxbakterien zu erhalten. Die hochangereicherte Kultur besitzt eine intensive orangene Farbe und besteht aus kleinen Flocken, die für die Ramanmessungen in einen vertieften Objektträger gebracht wurden.

Die APD erlaubt einen schnellen Überblick über die Probenstruktur und die Auswahl markanter Bereiche. Anammoxbakterien gruppieren sich in kleinen Kugelkolonien zusammen, die mit Hilfe der APD schnell identifiziert werden können (s. Abb. 5.14). Gezielte Messungen mit der CCD-Kamera liefern schließlich spektrale Informationen über die Probe und die Ramanspektren für jeden Punkt des abgescannten Bereiches.

In Abb. 5.14 ist eine Kombination aus beiden Messmethoden zu sehen. Die APD-Bilder im unteren Teil liefern nur Intensitätsverteilungen und zwar in diesem Falle die Verteilung der Ramanbanden bei 747 bzw. bei 2935 Wellenzahlen. Es fällt sofort auf, dass im gelb markierten Bereich die Intensität der CH-Schwingung wesentlich höher ist als die der ansonsten so intensiven Bande bei 747 Wellenzahlen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich in diesem Bereich um ein anderes Bakterium handeln könnte als im blau markierten Kugelcluster, der in der Mitte des Bildes zu finden ist. Zumindest scheint der organische Anteil der Bakterien im gelb markierten Bereich höher zu sein als im blau markierten Cluster. Um dies zu überprüfen, wurde das Mittelwertspektrum für beide Bereiche gebildet und mit Hilfe der Bruker-Software verglichen. Tatsächlich liegt die Übereinstimmung der beiden Spektren bei niedrigen 85 %. Werden beide Mittelwertspektren mit der eigenen Datenbank verglichen, so erkennt die Software im gelb markierten Bereich die höchste Übereinstimmung mit *Anammox*, während im blau markierten Bereich *Nitrosomonas* vorzuliegen scheint. Dieses Ergebnis widerspricht ein wenig den Erwartungen, da

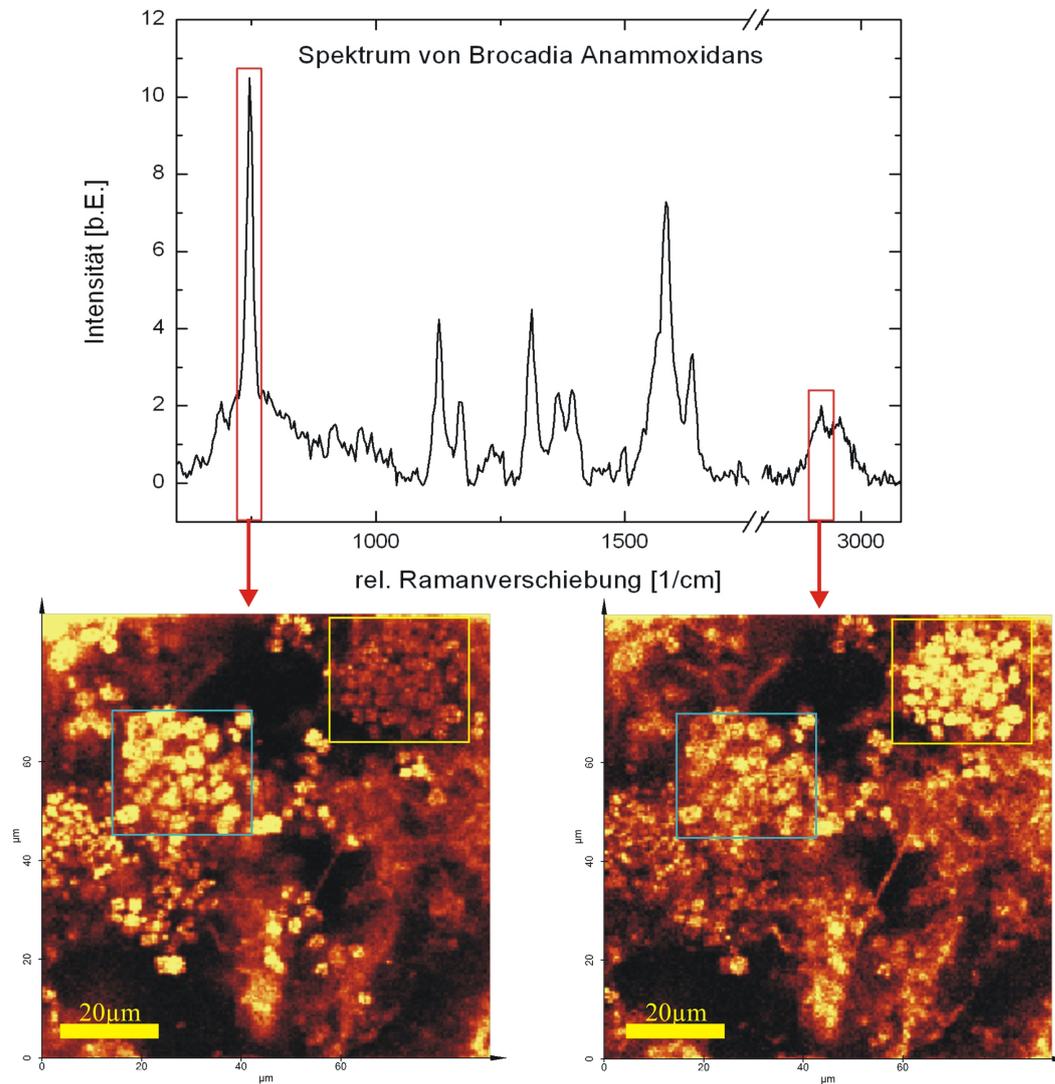


Abbildung 5.14: Analyse von Anammoxkugelkolonien: Im oberen Bereich des Bildes ist das Spektrum von *Brocadia Anammoxidans* zu sehen, im unteren Teil befinden sich zwei APD-Aufnahmen, die jeweils einen Bereich von $90 \cdot 90 \mu\text{m}^2$ umfassen. Das linke APD-Bild zeigt die laterale Verteilung der Ramanbande bei 747 Wellenzahlen, das rechte APD-Bild vermisst die CH-Schwingung bei 2935 Wellenzahlen. Auffällig ist der gelb markierte Bereich, welcher bei der Vermessung der 2935er Linie deutlich intensiver ausfällt und damit auf ein anderes Bakterium schließen lässt als im blau markierten Bereich.

Anammoxbakterien in den Ramanspektren meist einen eher geringen organischen Anteil zeigt und die Bande bei 2935 Wellenzahlen folglich dort eher schwächer ausfällt als bei *Nitrosomonas*. Eine mögliche Ursache wäre, dass die Referenzspektren für *Nitrosomonas* noch nicht gut genug sind, da gerade bei diesen drei Bakterienstämmen große experimentelle Schwierigkeiten auftraten (s.u.). Eine andere Erklärung könnte darin bestehen, dass die spektrale Datenbank bislang nicht umfassend genug ist, um die genaue mikrobielle Zusammensetzung eines Biofilmes schon jetzt eindeutig zu identifizieren.

5.3.2 Differenzierung verschiedener *Nitrosomonas*-Arten und -Stämme

Für *Staphylococcus* sowie *Bacillus* konnte bereits gezeigt werden, dass die konfokale Ramanmikroskopie eine Differenzierung der Bakterien auf der Art- und Stammebene ermöglicht [62]. Um dies auf den abwassertechnischen Bereich zu übertragen, wurde eine Unterscheidung verschiedener *Nitrosomonas*-Arten und -Stämme versucht. Dazu wurden vom Institut für Mikrobiologie aus Hamburg drei *Nitrosomonas*-Stämme zur Verfügung gestellt, von denen zwei der Art *Nitrosomonas eutropha* angehören, eines jedoch *Nitrosomonas europea* zugeordnet ist.

Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* haben verhältnismäßig lange Generationszeiten, darüber hinaus wuchsen die zu analysierenden *Nitrosomonas*-Bakterien unterschiedlich schnell, sodass nie alle drei Stämme zur gleichen Zeit in der gleichen Wachstumsphase vermessen werden konnten. Hier zeigen sich erneut die Schwierigkeiten beim Aufbau einer Raman-datenbank für Bakterien aus der biologischen Abwasserreinigung, die generell schwierig zu kultivieren sind und Verdopplungszeiten von fast 2 Wochen aufweisen. Daher können sie nicht zu einem fest definierten Zeitpunkt vermessen werden wie die Bakterien aus dem medizinischen Bereich oder aus der Reinraumanalytik.

Abbildung 5.15 zeigt die Ramanspektren der drei verschiedenen *Nitrosomonas*-Stämme, die unter gleichen Bedingungen (10 mW Laserleistung und 5 s Belichtungszeit) gemessen wurden. Da die Spektren auf den Bereich bei 2935 Wellenzahlen normiert sind, wird nur der Fingerprintbereich dargestellt. Auf den ersten Blick sind eigentlich keine spektralen Unterschiede auszumachen, dennoch erkennt die Bruker-Software zumindest zwischen den *N. eutropha*- und den *N. europea*-Stämmen Differenzen. Dies verdeutlicht, welchen hohen Stellenwert die Datenauswertung mit Hilfe einer leistungsstarken Spektroskopie-Software einnimmt.

Ähnlich wie dies in der Literatur schon für andere Gattungen gezeigt wurde, sollen auch *Nitrosomonas*-Bakterien in eine Ramandatenbank aufgenommen und in Dendrogramme einsortiert werden. In Abb. 5.16 ist ein Dendrogramm mit den zur Verfügung stehenden *Nitrosomonas*-Bakterien abgebildet. Als Referenzspektren wurden Spektren der drei verschiedenen *Nitrosomonas*-Stämme vorgegeben, welche mit unterschiedlich langen Belichtungszeiten aufgenommen wurden. Sofort fällt auf, dass die Heterogenität sogar zwischen den drei Spektren von *Nitrosomonas europea* 50 recht groß ist und diese nicht in einen gemeinsamen Cluster eingeordnet werden. Auch ist abzulesen, dass unterschiedlich lange Belichtungszeiten ebenfalls einen Einfluss auf die Sortierung haben, denn die Heterogenität ist beispielsweise bei den beiden 5 Sekunden Messungen von *Nitrosomonas eutropha* 53 und *Nitrosomonas eutropha* 57 sehr gering, während die beiden 3 Sekunden-Messungen an *Nitrosomonas eutropha* 53 eine größere Heterogenität zeigen. Als Konsequenz aus diesem Dendrogramm ist klar, dass zum Aufbau der Bakteriendatenbank und auch zur Clusteranalyse nur Spektren von 5 Sekunden Belichtungszeit vorgegeben wer-

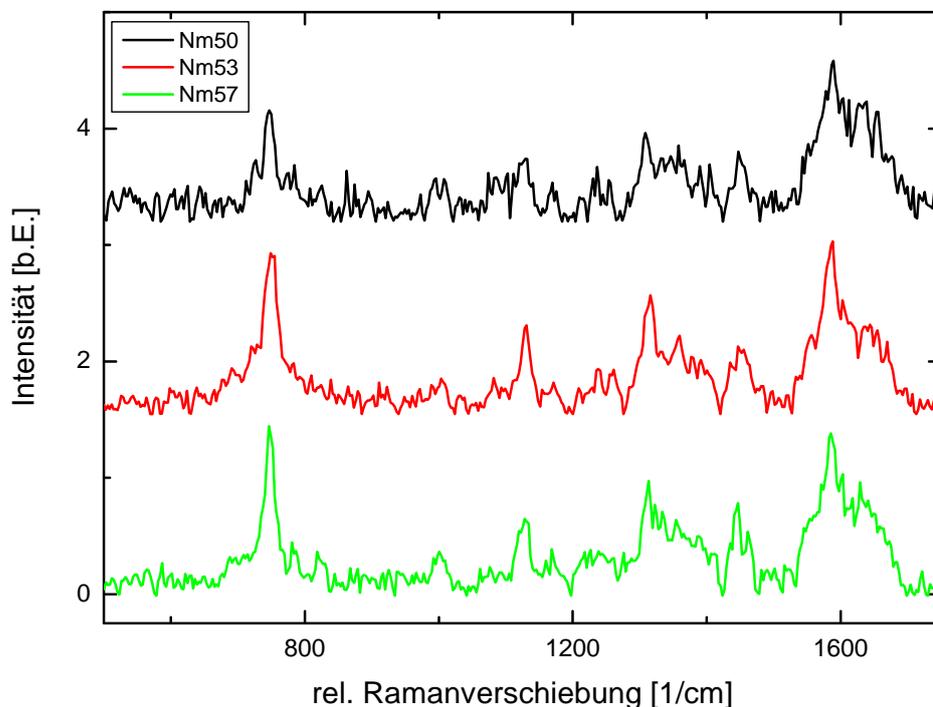


Abbildung 5.15: Vergleich der Ramanspektren der unterschiedlichen *Nitrosomonas*-Stämme: Alle Spektren wurden mit einer Belichtungszeit von 5 s und einer Laserleistung von 10 mW auf der Probe gemessen. Darüber hinaus wurden sie grundlinien- und hintergrundkorrigiert sowie auf den Bereich der CH-Schwingung normiert. Auf den ersten Blick sind kaum Unterschiede zwischen den drei Stämmen zu erkennen, allerdings fällt doch auf, dass die Peaks von *Nitrosomonas europaea* 50 nicht so stark ausgeprägt sind wie für die beiden anderen *Nitrosomonas*-Stämme, welche *Nitrosomonas eutropha* abgehören. Die Bruker-Software erkennt spektrale Unterschiede und kann die *Nitrosomonas*-Arten im Dendrogramm voneinander trennen.

den sollten, um Einflüsse der Messdauer auszuschließen.

Tendenziell wird an dem Dendrogramm deutlich, dass die Bruker-Software in der Lage ist, auch verschiedene Stämme und Arten der Gattung *Nitrosomonas* voneinander zu unterscheiden. Um jedoch eine noch bessere Identifizierung zu ermöglichen, sollten die Spektren mit Hilfe der optischen Pinzette aufgenommen werden, erst dann ist gewährleistet, dass während der gesamten Messdauer das Bakterium im Fokus verbleibt und vermessen werden kann. Sobald dies gesichert ist, können Bakterien sehr viel zuverlässiger analysiert werden, was die Erstellung der Bakteriendatenbank wesentlich erleichtern und verbessern wird.

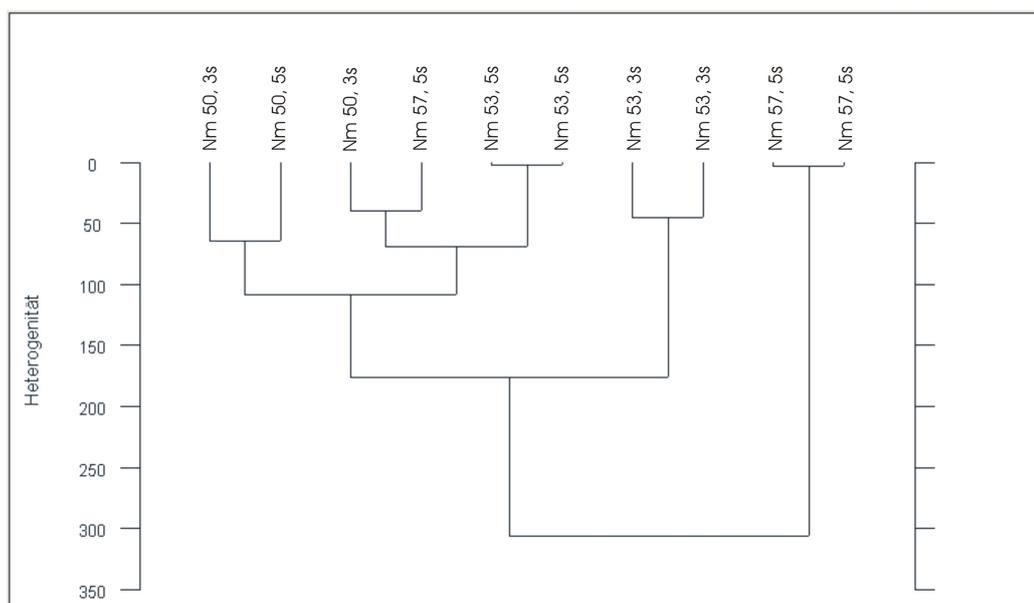


Abbildung 5.16: Dendrogramm verschiedener *Nitrosomonas*-Stämme: Der Bruker-Software wurden verschiedene *Nitrosomonas*-Spektren der drei vorhandenen Stämme vorgegeben. Dabei wurden auch mit Absicht verschiedene Belichtungszeiten ausgewählt, um zu testen, ob diese einen Einfluss auf die Berechnung der Cluster haben. Zur Berechnung wurden die Daten als Vorbehandlung einmal abgeleitet (13 Glättungspunkte). Die spektralen Distanzen wurden mit der Normierung auf den Reproduktionslevel, die Distanzen der Cluster per Ward's Algorithmus berechnet. Hierbei ist abzulesen, dass die Software nicht zuverlässig zwischen den verwandten *N. eutropha*-Stämmen unterscheiden kann. Außerdem fällt auf, dass unterschiedliche Belichtungszeiten auch in verschiedenen Clustern einsortiert werden.

Ausbleichen signifikanter Ramanbanden

In Ermangelung einer zuverlässigen optischen Pinzette wurden die *Nitrosomonas*-Stämme für die Experimente zunächst auf einer Polylysinschicht immobilisiert. Aufnahmen mit der APD zeigten durchaus die Lokalisation der Bakterien, doch erwiesen sich die *Nitrosomonas*-Stämme als so empfindlich, dass sie im immobilisierten Zustand nicht mit Hilfe der CCD-Kamera aufgenommen werden konnten, da Belichtungsdauern ab einer Sekunde direkt zur Zerstörung der Bakterien bzw. der in ihr enthaltenen Stoffe führten. Daraufhin mussten die *Nitrosomonas* zwischen einem Objektträger und einem Deckglas analysiert werden, auch wenn dabei in Kauf genommen werden musste, dass die Bakterien nicht im Laserfokus fixiert werden konnten. Allerdings zeigten die Messungen, dass die *Nitrosomonas* auch mit dem vorhandenen Messaufbau bereits im Fokus festgehalten und „mitgezogen“ werden konnten (s. Abb. 5.17).

Obwohl eine optische Pinzette prinzipiell beliebig lange Belichtungszeiten erlaubt, wird dies bei vielen Bakterienstämmen nicht möglich sein. So zeigten unter anderem die *Nitrosomonas* schnell Ausbleicherscheinungen. Wurde ein Bakterium im Laserfokus mit über die Probe bewegt (s. Abb. 5.17), so nahm die Intensität der Ramanbanden schnell ab. Schon bei der Aufnahme des zweiten Spektrums ist ein deutlicher Intensitätsverlust

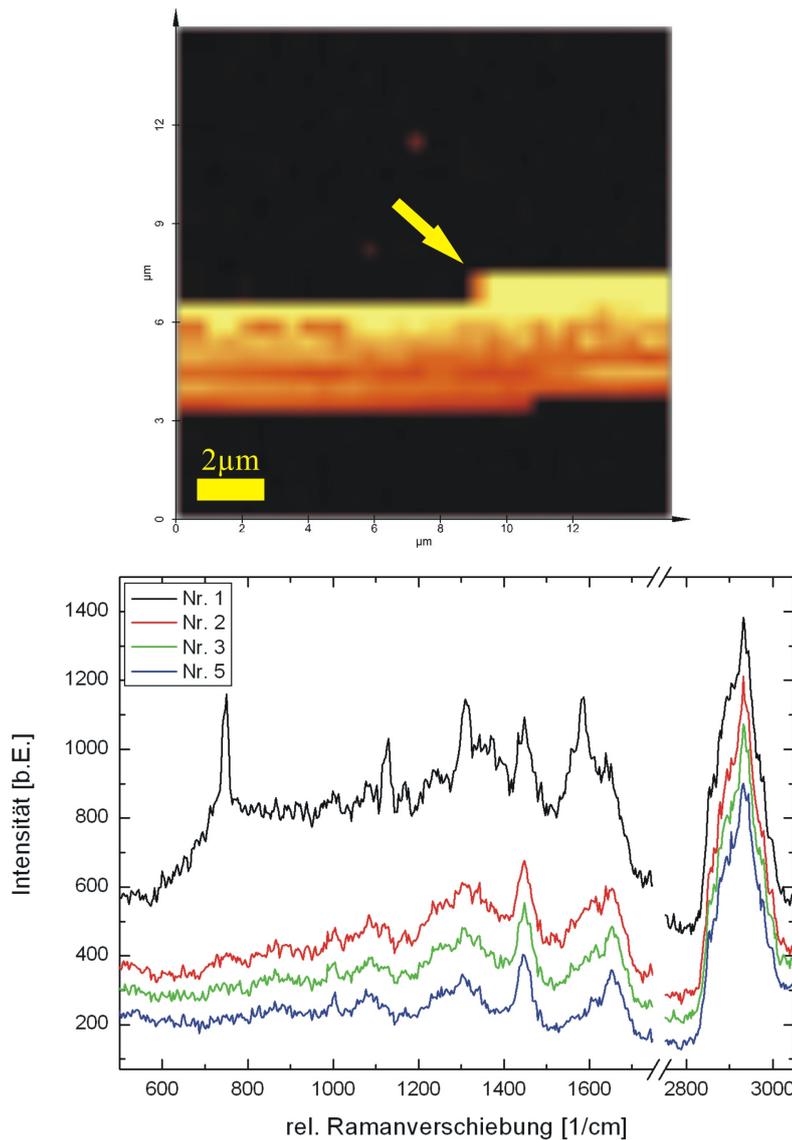


Abbildung 5.17: Ausbleichen der Ramansignale von *Nitrosomonas eutropha* 57 und zufällige optische Pinzette: Im oberen Teil ist ein lateraler Scan ($15 \cdot 15 \mu\text{m}^2$) über eine Bakterienprobe zu sehen. Im hellen Bereich konnte ein Bakterium im Laserfokus festgehalten und mitgezogen werden. Im unteren Teil sind die dazugehörigen Ramanspektren zu erkennen (Ölimmersionsobjektiv, 5 s Belichtungszeit, 10 mW auf der Probe), die mit der CCD-Kamera aufgenommen wurden. Die Ramanbanden sind im ersten Spektrum noch sehr ausgeprägt, doch schon im zweiten Spektrum ist zu sehen, dass das Bakterium von der Laserstrahlung zerstört wird. Je länger das Bakterium im Laserfokus bleibt, umso weniger ausgeprägt erscheinen die Ramanbanden. Die Spektren sind lediglich hintergrundkorrigiert, andere Korrekturen wurden für diese Darstellung nicht vorgenommen.

speziell im Bereich der starken Ramanbande bei 747 cm^{-1} zu bemerken. Je länger das Bakterium im Laserfokus verbleibt, umso schwächer ausgeprägt sind die Ramansignale.

Bei der konfokalen Ramanmikroskopie werden zwar nur sehr geringe Laserleistungen eingesetzt (maximal 10 mW auf der Probe), allerdings wird der Laser auf einen sehr klei-

nen Fleck fokussiert (Durchmesser $\approx 0,3 \mu\text{m}$), sodass hierbei dennoch hohe Leistungsdichten auftreten. Für die genannten Werte von 10 mW gebündelt auf einen kreisförmigen Messfleck mit einem Durchmesser von $0,3 \mu\text{m}$ ergibt sich folglich eine bestrahlte Fläche von

$$A = \pi r^2 = \pi \cdot (0,15 \mu\text{m})^2 \approx 7,1 \cdot 10^{-10} \text{cm}^2. \quad (5.1)$$

Daraus folgt bei einer Laserleistung von 10 mW auf der Probe eine Leistungsdichte LD von:

$$\text{LD} = \frac{10 \text{mW}}{7,1 \cdot 10^{-10} \text{cm}^2} \approx 1,4 \cdot 10^7 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}. \quad (5.2)$$

Dies entspricht den durchaus üblichen Leistungsdichten für die konfokale Ramanmikroskopie. Die Ramanbanden von Biofilmen im wässrigen Medium bleiben auch bei langen Belichtungszeiten am gleichen Messfleck konstant in ihrer Intensität, hier sind keine Ausbleicherscheinungen zu beobachten. Folglich kann angenommen werden, dass die Biofilmproben die applizierte Laserleistung vertragen und keine Strukturen im Biofilm zerstört werden. Einige Bakterien jedoch verhalten sich deutlich lichtempfindlicher. Besonders schnell bleicht die Ramanbande bei 747 Wellenzahlen aus, die bislang keiner Schwingung zugeordnet werden konnte. Sie muss jedoch durch eine Struktur hervorgerufen werden, welche die stark konzentrierte Laserleistung nicht übersteht.

Bei Verwendung der Laserwellenlängen 457,9 nm, 488 nm und 514,5 nm konnten bereits Ausbleicheffekte bei der Untersuchung an Chromosomen beobachtet werden [68], nicht aber bei Anregungswellenlängen oberhalb von 600 nm. Diese wiederum führen allerdings zu weniger signifikanten Ramanspektren, sodass die Wahl der Laserwellenlänge ein äußerst entscheidender Faktor für die Messungen ist. Eine Probenzerstörung durch Erhitzung konnte bei der Untersuchung an Chromosomen mit einem Laser bei 514,5 nm aufgrund der geringen Absorption jedoch ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass für die Zerstörung der Probe nicht die Intensität des Lichtes wichtig ist, sondern die auf die Probe applizierte Dosis an Licht. Mehrphotonenabsorption kann daher als Grund für die Ausbleicheffekte vernachlässigt werden [68].

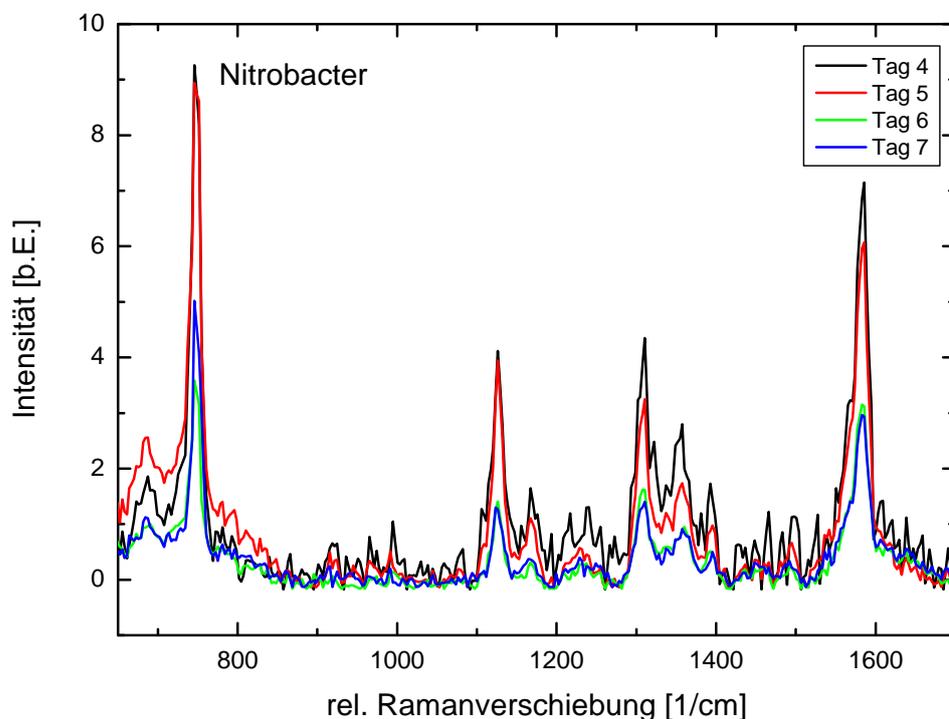


Abbildung 5.18: Ramanspektren von *Nitrobacter hamburgensis* in verschiedenen Wachstumsstadien: Die Spektren wurden an aufeinander folgenden Tagen aufgenommen, und es ist zu beobachten, dass die Raman-signale schwächer werden mit zunehmendem Alter der Bakterien. Alle Spektren wurden bei etwa 10 mW Laserleistung auf der Probe aufgenommen und 5 s lang belichtet. Die Spektren wurden auf den Bereich der CH-Schwingung normiert, sodass dieser ausgeschnitten werden konnte.

5.3.3 *Nitrobacter hamburgensis*

Die Gattung *Nitrobacter* spielt in der biologischen Abwasserreinigung ebenfalls eine sehr große Rolle, da diese Bakteriengattung Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) umwandelt und damit Teil des Stickstoffkreislaufs ist. Für den Aufbau der Datenbank für abwasserrelevante Bakterien ist *Nitrobacter* daher unerlässlich.

Nitrobacter hamburgensis wurde in Abhängigkeit der Wachstumsphase vermessen, um Einflüsse des Bakterienalters auf die Ramanspektren zu untersuchen. In Abb. 5.18 sind vier verschiedene *Nitrobacter*-Spektren zu sehen, welche an aufeinander folgenden Tagen aufgenommen wurden. Parallel zu den Ramanmessungen wurde auch die optische Dichte der Bakterien bestimmt, um zu protokollieren, in welcher Wachstumsphase sich das Bakterium befand. Die präsentierten Messungen wurden während der exponentiellen Phase durchgeführt und zeigten dennoch signifikante Unterschiede. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beiden schwächer ausgeprägten Spektren bereits zum Ende der exponenti-

ellen Phase aufgenommen wurden, wo die Bakterien nicht mehr so stark gewachsen sind. Anhand der Spektren wird deutlich, dass die vier dominanten Peaks ab einem bestimmten Zeitpunkt stark abnehmen, sodass die Aufnahme von *Nitrobacter*-Spektren dann erschwert wird und keine so guten Ergebnisse liefert wie zuvor. Also gibt es auch bei Bakterien aus dem Abwasserbereich einen Messzeitpunkt, welcher ideal erscheint. Allerdings muss dieser ideale Zeitpunkt für jedes Bakterium einzeln ausgetestet werden, da die Abwasserbakterien unterschiedliche Verdopplungszeiten haben und daher nicht nach einem vorgegebenen Schema analysiert werden können. Insgesamt ist dadurch die gezielte Analyse von Bakterien der Abwasserreinigung deutlich aufwändiger, da aufgrund der langen Verdopplungszeiten sämtliche Messreihen wesentlich länger dauern.

5.3.4 *Acidovorax temperans*

Acidovorax temperans ist eine Bakterienart, die in einer Neuseeländischen Arbeitsgruppe aus einem Abwasserbiofilm heraus isoliert werden konnte. Welche Aufgabe *Acidovorax temperans* bei der Abwasserreinigung übernimmt, konnte jedoch bis heute nicht genau geklärt werden. Aktuell wird *Acidovorax temperans* gentechnisch analysiert, um über seine Struktur und Funktion mehr zu erfahren. Bekannt ist bereits, dass sich bei Kultivierung auf R2A-Agar zwei verschiedene *Acidovorax temperans*-Stämme ausbilden. Nach etwa 5 Tagen Wachstum sind mit bloßem Auge Unterschiede im Wuchs der Bakterien zu erkennen, die sich auch in den dazugehörigen Ramanspektren widerspiegeln. Die beiden unterschiedlichen Stämme werden *Acidovorax temperans Hn* („Halo negative“) und *Acidovorax temperans Hp* („Halo positive“) genannt.

Unterscheidung der verschiedenen Stämme

R2A ist ein nährstoffarmer Agar, auf dem die Bakterien nur wenig Stoffe finden, von denen sie sich ernähren können. *Acidovorax temperans Hp* breitet sich daher auf der Agarplatte kreisförmig aus, um genügend Nährstoffe zu finden. Dabei bildet dieser Bakterienstamm eine Halo aus, weswegen dieser Stamm „Halo positive“ genannt wird. *Acidovorax temperans Hn* dagegen verhält sich träge und bildet keine Halo aus. Da nach der Überimpfung zunächst genug Nährstoffe zu finden sind, setzt die Ausbreitung von *Acidovorax temperans Hp* erst nach etwa 5 Tagen ein. Diese Unterscheidung zwischen den beiden *Acidovorax temperans*-Stämmen ist bisher nur auf R2A-Agar beobachtet worden, nicht aber in Flüssigkultur oder auf Nähragar. Aus diesem Grund wurden an *Acidovorax temperans* zwei verschiedene Fragestellungen untersucht:

1. Sind Unterschiede in den Ramanspektren der beiden *Acidovorax temperans*-Stämme zu erkennen, wenn sie auf R2A-Agar kultiviert werden?

2. Sind diese Unterschiede auch zu erkennen, wenn die Bakterien frisch überimpft wurden oder in Flüssigkultur bzw. auf Nähragar wachsen?

Zunächst muss experimentell überprüft werden, ob sich die morphologischen Unterschiede der beiden *Acidovorax temperans*-Stämme auch mit konfokaler Ramanmikroskopie nachweisen lassen. Dazu wurden beide *Acidovorax temperans*-Stämme nach Vorgabe auf R2A-Agar kultiviert und regelmäßig vermessen. Dabei zeigten sich anfangs tatsächlich keine spektralen Unterschiede zwischen *Acidovorax temperans Hn* und *Acidovorax temperans Hp* (Ergebnisse nicht aufgeführt). Ab fünf Tagen nach dem Überimpfen waren jedoch deutliche Unterschiede auszumachen, die nicht nur unter dem Lichtmikroskop zu sehen waren, sondern auch in den dazugehörigen Ramanspektren (s. Abb. 5.19. a). Beide Bakterienstämme wurden unter gleichen Bedingungen vermessen, zeigten aber signifikante Unterschiede in den Peakintensitäten. *Acidovorax temperans Hn* zeichnet sich durch einen höheren organischen Anteil aus, der sich in einer stärkeren CH-Schwingung bei etwa 2935 Wellenzahlen bemerkbar macht. Werden die Ramanspektren auf diese Schwingung normiert, so treten die Ramanpeaks im Fingerprintbereich bei *Acidovorax temperans Hp* noch stärker hervor, wodurch die Differenzen zwischen den beiden Bakterienstämmen mehr als deutlich werden.

Um zu überprüfen, ob sich Unterschiede in den Ramanspektren von *Acidovorax temperans* auch in anderen Medien nachweisen lassen, wurden die Bakterien zum Vergleich auch auf Nähragar und in Flüssigkultur gezüchtet. Nähragar ist ein nährstoffreicher Agar, auf welchem die meisten Bakterien sehr gut wachsen können. Von unseren Kooperationspartnern wurde allerdings R2A als idealer Agar zur *Acidovorax temperans*-Kultivierung angegeben. Da die morphologischen Unterschiede der beiden Bakterienstämme durch den Nährstoffmangel auf der Agarplatte hervorgerufen werden, erschien es sinnvoll, die Bakterien auch auf einem nährstoffreichen Agar wachsen zu lassen.

In verschiedenen Phasen nach der Überimpfung wurden die beiden Bakterienstämme ramanmikroskopisch untersucht, indem zunächst Bakterien von der Agarplatte gestrichen und anschließend in PBS resuspendiert worden sind. Für die Messung wurde die Bakteriensuspension schließlich auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Zunächst zeigten sich keine Unterschiede in den Ramanspektren der beiden Bakterienstämme, etwa anderthalb Monate nach der Überimpfung jedoch waren deutliche Differenzen im CH-Gehalt der beiden Bakterienstämme auszumachen. *Acidovorax temperans Hp* zeigt dabei einen geringeren organischen Anteil und eine schwächere CH-Schwingung bei 2935 Wellenzahlen. Durch die Normierung auf diesen Bereich treten schließlich die Ramanschwingungen im Fingerprintbereich bei *Acidovorax temperans Hp* wieder wesentlich stärker hervor als bei *Acidovorax temperans Hn* (s. Abb. 5.19. b). Ein Vergleich mit den *Acidovorax*spektren von R2A-Agar zeigt, dass sich der *Hp*-Stamm auf Nähragar ähnlich verändert. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass nach anderthalb Monaten Wachstum das Nährstoffangebot auch auf Nähragar so sehr abgenommen hat,

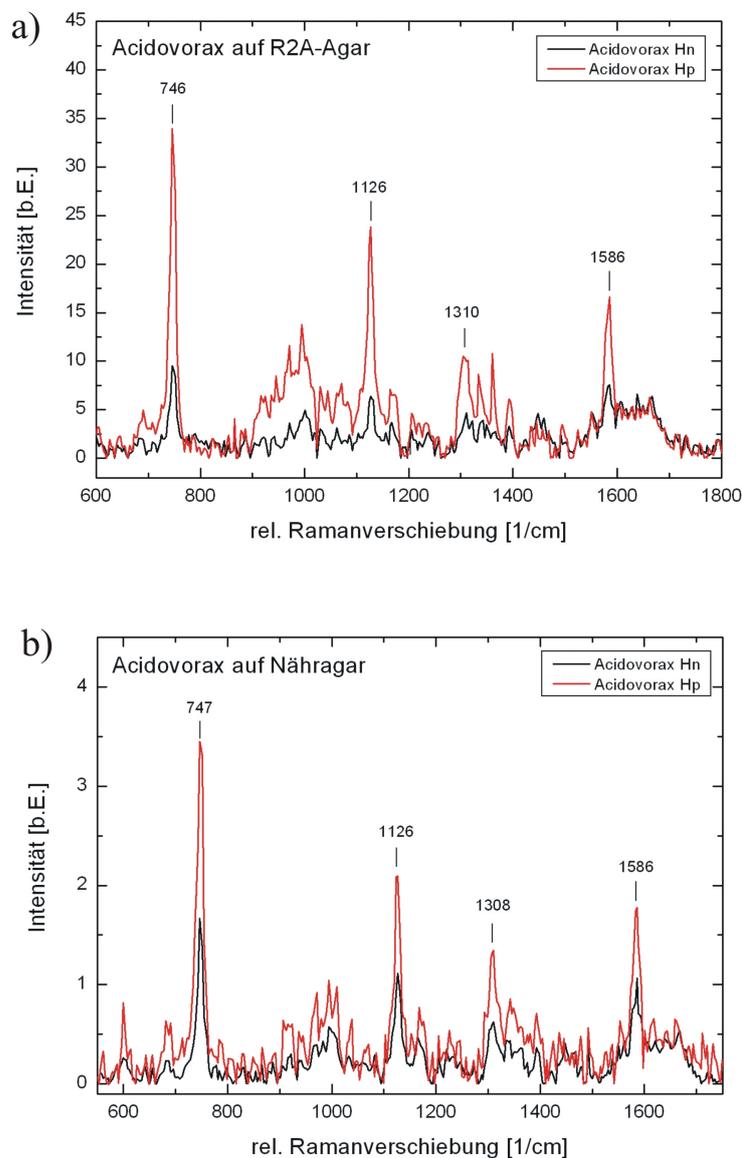


Abbildung 5.19: a) zeigt die *Acidovorax*spektren auf R2A-Agar, welche mit 100 s Belichtungszeit aufgenommen wurden. b) zeigt die Spektren von *Acidovorax temperans* auf Nähragar, die 10 s lang belichtet wurden. Alle Spektren entstanden bei etwa 10 mW Laserleistung auf der Probe und wurden identisch mit der Bruker-Software vorbehandelt. Die Spektren sind auf den Bereich der CH-Schwingung normiert, sodass die Darstellung des Fingerprintbereiches für den Vergleich ausreicht. Die vier dominanten Ramanpeaks von *Acidovorax temperans* Hn und *Acidovorax temperans* Hp sind beim Hp-Stamm wesentlich stärker ausgeprägt, was auf den geringeren organischen Anteil dieses Bakteriums zurückzuführen ist. Ohne die Normierung auf den Bereich bei 2935 Wellenzahlen ist der Bereich der CH-Schwingung beim *Acidovorax temperans* Hp-Stamm schwächer ausgeprägt. Durch die Normierung treten die Peaks im Fingerprintbereich folglich noch intensiver hervor.

dass *Acidovorax temperans* Hp sich auf der Agarplatte ausbreiten muss, um an Nährstoffe zu gelangen. Die Differenzen zwischen beiden *Acidovorax temperans*-Stämmen bilden

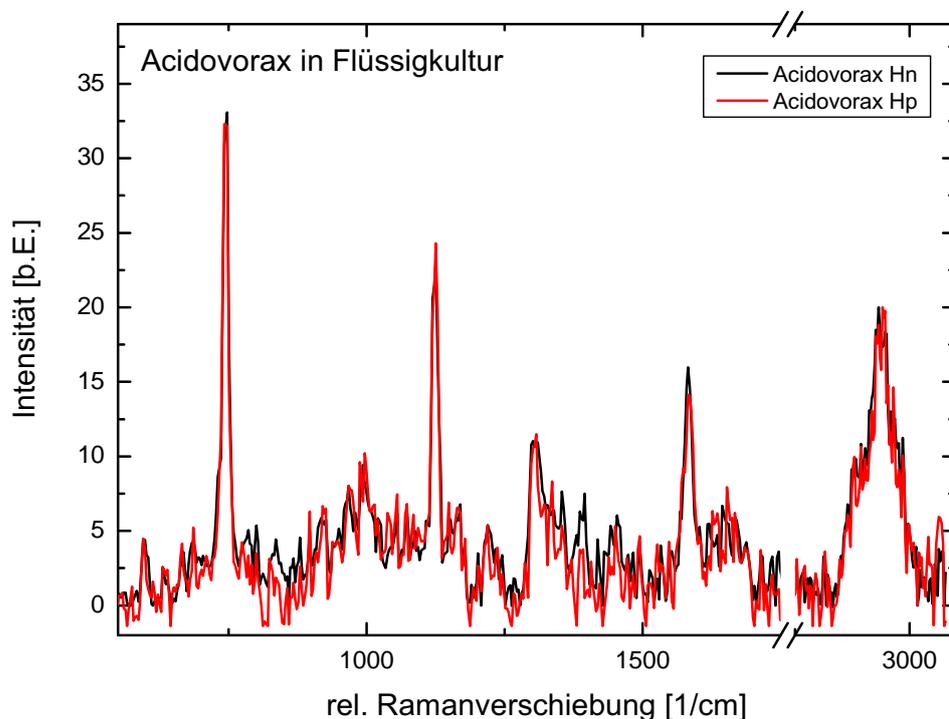


Abbildung 5.20: Ramanspektren von *Acidovorax temperans* Hn und *Acidovorax temperans* Hp in Flüssigkultur: Beide Spektren wurden bei etwa 5 mW Laserleistung auf der Probe 5 s lang belichtet und identisch mit der Bruker-Software vorbehandelt. Die Spektren sind auf den Bereich der CH-Schwingung normiert, sodass eigentlich wieder die Darstellung des Fingerprintbereiches für den Vergleich ausreicht, hier ist auch der hintere Spektralbereich abgebildet. Wie erwartet zeigen beide *Acidovorax temperans*-Stämme identische Ramanspektren.

sich allerdings wie erwartet erst sehr viel später aus, da die Notwendigkeit zur Ausbreitung auf Nähragar nicht so schnell gegeben ist und *Acidovorax temperans* Hp somit über längere Zeit an einem Ort verbleiben kann.

In Flüssigkultur ist auch bei längeren Wachstumszeiten nicht mit einer Auseinanderentwicklung der beiden *Acidovorax temperans*-Stämme zu rechnen, da sich *Acidovorax temperans* Hp natürlich nicht ausbreiten kann wie auf der festen Agarplatte. Um dies auch ramanmikroskopisch zu überprüfen, wurden beide Bakterienstämme in Flüssigkultur gehalten. Auf R2A-Agar zeigten sich nach etwa 5 Tagen schon deutliche Unterschiede in den Ramanspektren, sodass bei den Bakterien in Flüssigkultur die Vergleichsmessungen eine Woche nach Animpfung der Kultur vorgenommen wurden. Hierzu wurden Bakterien aus ihrer Kultur abpipettiert, abzentrifugiert und in PBS resuspendiert. Für die Messung wurde wiederum die Bakteriensuspension auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt.

In Abb. 5.20 sind zwei Ramanspektren der beiden unterschiedlichen *Acidovorax temperans*-Stämme zu sehen. Beide wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und gleichermaßen mit der Bruker-Software für die Darstellung vorbehandelt (Hintergrund- und Grundlinienkorrektur, Normierung auf die CH-Schwingung). Wie erwartet sehen beide Spektren identisch aus, da sich die *Acidovorax temperans*-Stämme in Flüssigkultur morphologisch nicht auseinander entwickeln und daher auch keine Unterschiede auftauchen dürften.

Die Ergebnisse an den *Acidovorax*-Bakterien zeigen hervorragend, dass mittels konfokaler Ramanmikroskopie verschiedene Bakterienstämme voneinander differenziert werden können und lichtmikroskopisch beobachtete Veränderungen der Bakterien sich auch spürbar in den Ramanspektren niederschlagen. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die eindeutige Bakterienidentifikation auch im Bereich der biologischen Abwasserreinigung gelingen kann, selbst wenn die für die Abbauprozesse verantwortlichen Bakterien sehr ähnliche Ramanspektren zeigen und diese lediglich mit Hilfe der Bruker-Software auseinander gehalten werden können. Da dies gelingt, ist der Aufbau einer spektralen Datenbank für Abwasserbakterien möglich.

5.4 Parameter für die eigene Bakteriendatenbank und Clusteranalyse

Die Untersuchung von Mikroorganismen mittels Ramanspektroskopie bzw. konfokaler Ramanmikroskopie ist noch ein verhältnismäßig junges Forschungsfeld. Ramandatenbanken für Bakterien existieren daher nur für einige einschlägige Bakterienstämme, die sich leicht kultivieren lassen bzw. die im medizinischen Bereich oder bei der Reinraumkontrolle eine wichtige Rolle spielen. Da auch die Bruker-Software noch nicht lange zur Bakterienanalyse verwendet wird, gibt es wenig Hinweise in der Literatur zu den erforderlichen Parametern für die Datenbankerstellung, sodass die hier notwendigen Parameter an eigenen Referenzspektren selbst ausgetestet und variiert werden müssen. Als Anhaltspunkt für sinnvolle Wege der Datenvorbehandlung und der Berechnung der spektralen Distanzen dient das OPUS-Manual [67], in welchem zumindest einige Tipps aufgeführt sind, welches aber auch nur darauf hinweisen kann, dass es kein Standardverfahren zur Datenbankerstellung gibt.

Um einen eigenen Identitätstest zu erstellen, wurden der Bruker-Software zunächst Spektren bekannter Bakterien wie *E. Coli*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus* vorgegeben, welche sich recht deutlich voneinander unterscheiden. Nur an derlei Spektren kann zuverlässig getestet werden, ob die ausgewählten Parameter sinnvoll sind oder nur aus der Notwendigkeit entstehen, die sehr ähnlichen Spektren von Abwasserbakterien auseinan-

der zu halten.

5.4.1 Identitätstest

Der Identitätstest ist ein Herzstück der so genannten IDENT-Software, welche einen Teil der Bruker-Software darstellt. Für die Identitätstesterstellung müssen Ramanspektren ausgewählt und in Gruppen und Unterbibliotheken einsortiert werden. Für jedes Bakterium wurden mehrere Ramanspektren ausgewählt, die die spektralen Schwankungen für das jeweilige Bakterium verdeutlichen sollen. Die Bruker-Software benötigt mehrere Spektren pro Probe, um möglicherweise auftauchende Variabilität bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Für jede Unterbibliothek müssen Methoden zur Datenvorbehandlung und zur Berechnung der spektralen Distanzen gewählt werden. Zitat [67] schlägt vor, die Referenzspektren lediglich zu vektornormieren und mit der Standardmethode zu behandeln. Als Spektralbereich für die Hauptbibliothek bietet sich die Verwendung der Dateigrenzen an, um sämtliche spektrale Information zu berücksichtigen. Bei der Berechnung der Unterbibliotheken erweist es sich als sinnvoll, kleinere Spektralbereiche auszuwählen.

	Ausgewählte Parameter
Unterbibliothek	Vektornormierung
Spektralbereiche	500-1800
	2750-3050
	Standardmethode
Hauptbibliothek	Erste Ableitung mit 9 Glättungspunkten
	Vektornormierung
Spektralbereich	500-3050
	Faktorisierung mit 9 Faktoren

Tabelle 5.2: Methoden zur Datenbankerstellung: In der Tabelle sind die ausgewählten Parameter für die Erstellung einer Ramanbibliothek für Bakterien aus der biologischen Abwasserreinigung dargestellt.

Für die Berechnung der Hauptbibliothek wurden andere Parameter ausgewählt (s. Tab. 5.2), um den Anforderungen für die Bakteriendatenbank gerecht zu werden. Für Ramanspektren ist die Bildung der ersten Ableitung zur Datenbankerstellung üblich, sodass auch hier auf diese Methode zurückgegriffen wurde. Für die Anzahl der Glättungspunkte wurde 9 ausgewählt, um wichtige Strukturen in den Spektren nicht durch eine zu starke Glättung zu verfälschen. Im Fall der Ramanspektren von Abwasserbakterien erwies sich die Wahl von neun Glättungspunkten als ideal, da hierbei alle Spektren eindeutig identifiziert werden konnten, während die Software acht der zwölf Unterbibliotheken nicht auseinander halten kann, wenn 13 Glättungspunkte verwendet werden.

Da die Ramanspektren von Bakterien nur in zwei breiten Spektralbereichen signifikante Ramanbanden zeigen, wurden auch nur zwei Bereiche für die Berechnung der Unterbibliotheken berücksichtigt, nämlich der Fingerprintbereich zwischen 500 und 1800 Wellenzahlen und der Bereich der CH-Schwingung. Als Parameter für die Hauptbibliothek wurden jedoch die Dateigrenzen als Spektralbereich ausgewählt, da speziell die Anamoxbakterien auch im Bereich zwischen Fingerprintbereich und CH-Schwingung spektrale Signaturen aufweisen. Die Validierung der Bibliothek ist hiervon nicht betroffen, sie ist erfolgreich für einen großen Spektralbereich und auch für zwei kleinere Bereiche. Bei der Bakterienidentifikation jedoch tauchten Unstimmigkeiten auf, wenn für die Hauptbibliothek zwei kleine Spektralbereiche verwendet wurden. Als Methode zur Berechnung der spektralen Distanz wurde die Faktorisierung ausgewählt, da sie die besten Ergebnisse liefert und in der Literatur auch bereits dokumentiert ist als beste Methode zur Ramandatenbankerstellung [66].

5.4.2 Clusteranalyse

Die für die Datenbankerstellung ausgesuchten Parameter erwiesen sich nicht als sinnvoll für die Clusteranalyse. Angelehnt an [47] wurden die Parameter wie in Tabelle 5.3 angegeben eingestellt. Bei der ersten Ableitung wurden jedoch wieder nur neun Glättungspunkte verwendet, da dies physikalisch sinnvoll ist und wiederum die besten Ergebnisse liefert. Wie auch schon bei der Datenbankerstellung wurden zwei größere Spektralbereiche ausgewählt, in denen sich die spezifischen Ramanbanden der Bakterien befinden. Entgegen den Angaben in [47] wurde der Startpunkt des ersten Spektralbereiches allerdings bei 650 Wellenzahlen gesetzt, um insbesondere die starke Ramanbande bei 747 Wellenzahlen in die Berechnung mit einzubeziehen. Als Rechenmethode wurde die Normierung auf das Reproduktionslevel ausgewählt sowie Ward's Algorithmus.

Clusteranalyse	Ausgewählte Parameter
Datenvorbehandlung	Erste Ableitung mit 9 Glättungspunkten
Spektralbereiche	650 - 1800
	2700 - 3050
Methode	Auf Reproduktionslevel normieren

Tabelle 5.3: Methoden zur Clusteranalyse: In der Tabelle sind die ausgewählten Parameter für die Erstellung der Clusteranalyse dargestellt.

Abbildung 5.21 zeigt das komplette Dendrogramm der im Rahmen dieser Promotion untersuchten Bakterien, welches nach dem in Tab. 5.3 angegebenen Muster errechnet wurde. Am Dendrogramm sind einige entscheidende Dinge abzulesen:

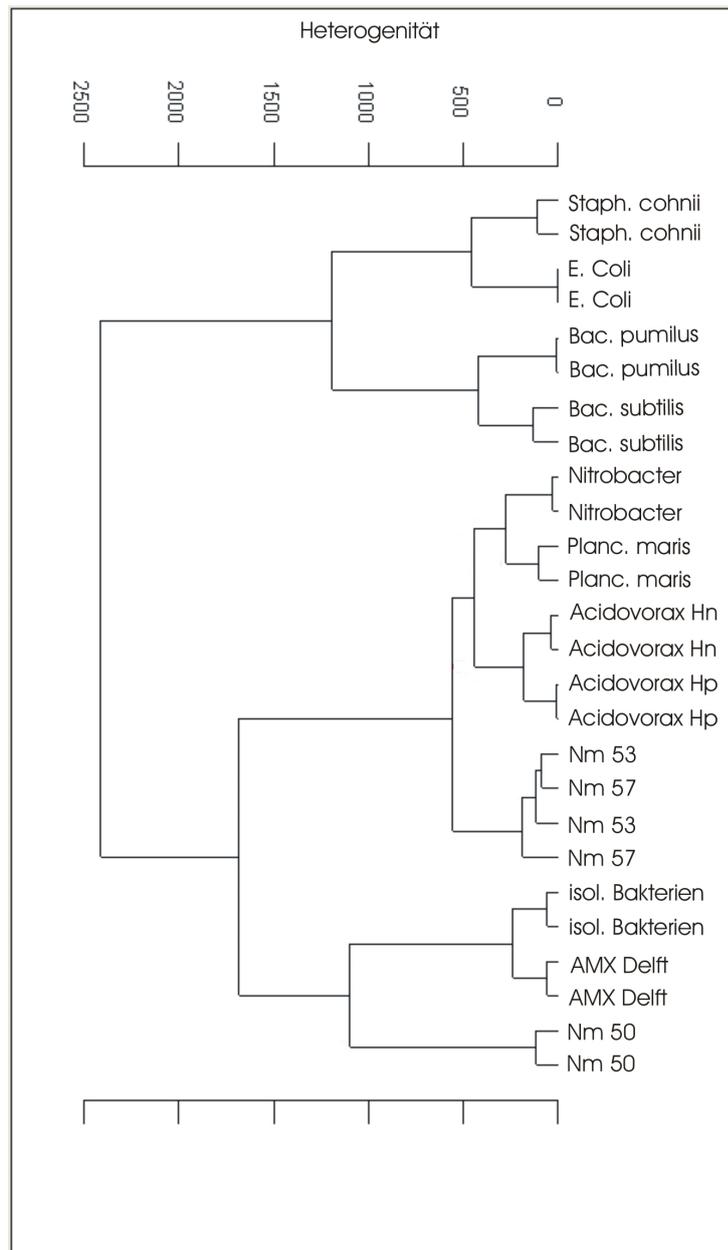


Abbildung 5.21: Dieses Dendrogramm zeigt alle experimentell analysierten Bakterien einsortiert in zugehörige Cluster, die die Verwandtschaft der Bakterien untereinander verdeutlicht. Das Dendrogramm zeigt die erfolgreiche Anwendung der hierarchischen Clusternanalyse, bei der die untersuchten Bakterien auf der Stamm-, Art- und Gattungsebene voneinander unterschieden werden konnten. Einzig die beiden verwandten *Nitrosomonas europaea*-Stämme ließen sich bislang nicht eindeutig trennen, was allerdings auf das schwierige Messverfahren zurückzuführen ist.

- Die Bruker-Software erkennt Unterschiede zwischen den isolierten Anammoxbakterien (*Kuenenia Stuttgartiensis*) und den Spektren aus der hochangereicherten Kultur aus Delft (*Brocadia Anammoxidans*). Daher liegt es nahe, dass sich die unterschiedlichen Anammoxgattungen mittels der eingesetzten Software voneinander unterscheiden lassen und somit wichtige Ansätze für die praktische Anwendung

eröffnen. Dann nämlich ist es möglich, Anreicherungsstrategien für die beiden verschiedenen Anammoxgattungen zu kontrollieren und Aussagen darüber zu treffen, bei welchen Bedingungen sich welche Gattung am besten anreichern lässt. Dieses Wissen lässt sich schließlich zur Optimierung der biologischen Abwasserreinigung einsetzen.

- Die Software stellt Unterschiede zwischen *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus* fest, erkennt aber auch gleichzeitig ihre nahe Verwandtschaft, sodass beide *Bacillus*-Arten einen eigenen Cluster erhalten, aber auf der nächsten Ebene in einem gemeinsamen Cluster zusammengefasst werden.
- Ähnliches ist auch für *Acidovorax temperans* festzuhalten: Beide *Acidovorax temperans*-Stämme erhalten einen eigenen Cluster, sind in der nächsten Ebene aber auch schon in einen gemeinsamen Cluster einsortiert. Hier wird sogar die Unterscheidung auf Stammebene deutlich.
- Eine Unterscheidung zwischen *Nitrosomonas eutropha* 53 und *Nitrosomonas eutropha* 57 konnte bislang nicht geleistet werden. Diese beiden Stämme zeigen so große Übereinstimmungen, dass sie in einen gemeinsamen Cluster zusammengefasst wurden. *Nitrosomonas europea* 50 dagegen ist relativ weit von den beiden *eutropha*-Stämmen entfernt. Dies wiederum bestätigt das phylogenetische Wissen über diese Bakterien und die Möglichkeit zur Unterscheidung verschiedener Bakterienarten. Es ist anzunehmen, dass sich durch ein verlässliches Messverfahren mittels optischer Pinzette auch die Unterschiede zwischen *Nitrosomonas eutropha* 53 und *Nitrosomonas eutropha* 57 im Dendrogramm niederschlagen werden.
- *Nitrobacter hamburgensis* und *Planctomyces maris* zeigen sehr ähnliche Raman-spektren und werden folglich sehr nah beieinander angeordnet. Die Ähnlichkeiten in den Ramanspektren sind bereits leicht anhand der Originaldaten erkennbar, sodass die Berechnung des Bakteriendendrogramms die vermutete Verwandtschaft beider Bakterien nochmals bestätigt.

Mit den in diesem Abschnitt angegebenen Parametern war es möglich, eine Datenbank für Abwasserbakterien zu erstellen, die nun die Überprüfung von Bakterien aus Biofilmen der biologischen Abwasserreinigung ermöglicht. Die Bruker-Software kann alle eingespeisten Spektren eindeutig identifizieren und bestätigt bei der erfolgreichen Validierung die Auswahl der Parameter. Im nächsten Abschnitt kommt die Datenbank bereits zum Einsatz, wenn die gewonnenen Messdaten der Biofilmexperimente mit Hilfe der Datenbank überprüft werden, um die dort aufgefundenen Bakterienkolonien zu identifizieren.

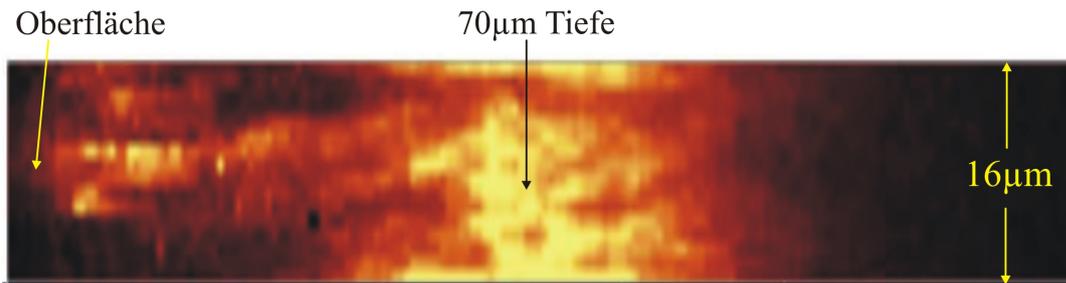


Abbildung 5.22: Tiefenscan durch eine rötliche Flocke aus dem SBR2: Mit Hilfe des Chemical Imaging wurde eine rötlich schimmernde Biofilmflocke aus dem SBR2 abgescannt, um herauszufinden, aus welchen Tiefen noch Signale zu detektieren sind. Die Laserleistung betrug etwa 6 mW auf der Probe, die Belichtungszeit war auf 3 s eingestellt. In der Mitte des Bildes ist eine Bakterienkolonie zu erkennen, welche sich in einer Tiefe von $70\ \mu\text{m}$ der Flocke befindet und dennoch analysiert werden kann. Bis in eine Tiefe von über $90\ \mu\text{m}$ ließen sich bakterientypische Ramanspektren detektieren.

5.5 Untersuchung von deammonifizierenden Biofilmen aus der biologischen Abwasserreinigung

In der Praxis soll die Bakteriendatenbank angewendet werden für die Analyse von Mischkulturen bzw. von Biofilmen der biologischen Abwasserreinigung. Über die genaue Kenntnis der Bakterienzusammensetzung eines Biofilms und auch die Vergesellschaftung von unterschiedlichen Bakterien können wichtige Rückschlüsse auf die optimalen Betriebsparameter für einen Biofilmreaktor getroffen werden. Die konfokale Ramanmikroskopie erlaubt erstmals die nicht-invasive Untersuchung der Bakteriencluster in einem Biofilm ohne jegliche Probenvorbereitung. Damit können Anfahrstrategien für die Biofilmreaktoren überprüft werden und auch die Anreicherung der Anammoxbakterien. Die Ergebnisse an isolierten und hochangereicherten Anammoxbakterien lassen vermuten, dass auch die Unterscheidung von *Candidatus* „Kuenenia stuttgartiensis“ und *Candidatus* „Brocadia anammoxidans“ möglich ist, sodass sich herausfinden lässt, unter welchen Bedingungen sich welche Anammoxgattung anreichert.

5.5.1 Vermessung der Bakteriencluster innerhalb des Biofilms

Die anaerobe Ammoniumoxidation wird durch Sauerstoff gehemmt, sodass die Anammoxbakterien nicht an der Oberfläche der Biofilmflocken zu erwarten sind. Zunächst muss also geprüft werden, ob eine nicht-invasive Bakterienanalyse per konfokaler Ramanmikroskopie prinzipiell möglich ist, da die Eindringtiefe in den Biofilm durch die Verwendung einer Anregungswellenlänge von 532 nm stark beschränkt ist.

Abbildung 5.22 zeigt einen Tiefenscan durch eine rote Flocke aus dem SBR2. Die Probe wurde mit einer Laserleistung von 6 mW auf der Probe und einer Belichtungszeit von 3 s

vermessen. Das Bild zeigt die Intensitätsverteilung der Ramanbande bei 747 cm^{-1} , welche mit Hilfe der CCD bestimmt wurde. Der große Bakteriencluster in einer Tiefe von etwa $70\ \mu\text{m}$ ist noch sehr deutlich mit der CCD vermessbar, und bis in eine Tiefe von fast $100\ \mu\text{m}$ können noch bakterientypische Ramansignale aufgesammelt werden.

Bei Verwendung des grünen Anregungslasers können folglich die obersten maximal $100\ \mu\text{m}$ des Biofilms überprüft werden. Dieser Wert ist allerdings nicht allgemein gültig für alle zu untersuchenden Biofilmflocken, da die maximale Messtiefe von verschiedenen Parametern abhängig ist wie der Dichte der Flocke oder auch den auftauchenden Fluoreszenzen. Bei starken Fluoreszenzen kann die maximal mögliche Messtiefe deutlich geringer sein. Auf den ersten Blick schränkt dies die Messungen zwar stark ein, dennoch zeigt sich hier die Überlegenheit der konfokalen Ramanmikroskopie gegenüber der FISH: Diese Technik kann nur stark vorbehandelte Biofilmproben analysieren und dies darüber hinaus nur in einer Ebene. Die konfokale Ramanmikroskopie stellt für diese Anwendung daher eine erhebliche Verbesserung gegenüber bislang üblichen Messmethoden dar.

Der selbst erstellten Ramandatenbank für abwasserrelevante Bakterien wurde das mittlere Spektrum aus dem gefundenen Bakteriencluster in $70\ \mu\text{m}$ Tiefe zum Identitätstest vorgegeben. Die beste Trefferqualität zeigte sich mit der Anammoxunterbibliothek, so dass dieser Bakteriencluster als Anammoxcluster identifiziert werden konnte. Dies ist sinnvoll, da die Anammoxbakterien sich in etwas größerer Biofilmtiefe aufhalten, um dort vor Sauerstoff geschützt zu sein.

Vergesellschaftung

Mit Hilfe konventioneller Methoden lässt sich lediglich bestimmen, welche Bakterien sich in Biofilmen überhaupt ansiedeln, die räumliche Verteilung der Bakterien ist nicht-invasiv und nicht-präparativ dagegen bislang wenig erforscht. Zur Klärung dieser Frage wurden zahlreiche Biofilmproben axial und lateral abgescannt, um einen Überblick über die vorhandenen Bakterien in den Biofilmen zu bekommen. In Abb. 5.23 sind zwei Ausschnitte von Biofilmproben dargestellt, die die Verteilung der starken Ramanbande bei 747 cm^{-1} zeigen. Die Zahlen geben diejenigen Stellen an, von denen Ramanspektren extrahiert und der Bruker-Software zum Identifikationstest vorgegeben wurden. Auf den ersten Blick zeigen die Spektren kaum Unterschiede, dennoch erkennt die Software zumindest im Ausschnitt b) verschiedene Bakterien, während sich in Bild a) offensichtlich nur *Nitrosomonas eutropha*-Bakterien angesiedelt haben. Tab. 5.4 zeigt die zugehörigen Bakterien, welche der selbst erstellte Identitätstest der Bruker-Software zugeordnet hat.

Aus der Theorie der Abbauprozesse ist bekannt, dass *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* in enger Kooperation arbeiten müssen, da sie aufeinander angewiesen sind (s. Kapitel 2). In Abb. 5.23. a) wären daher in der Nähe der *Nitrosomonas eutropha* auch *Nitrobacter*

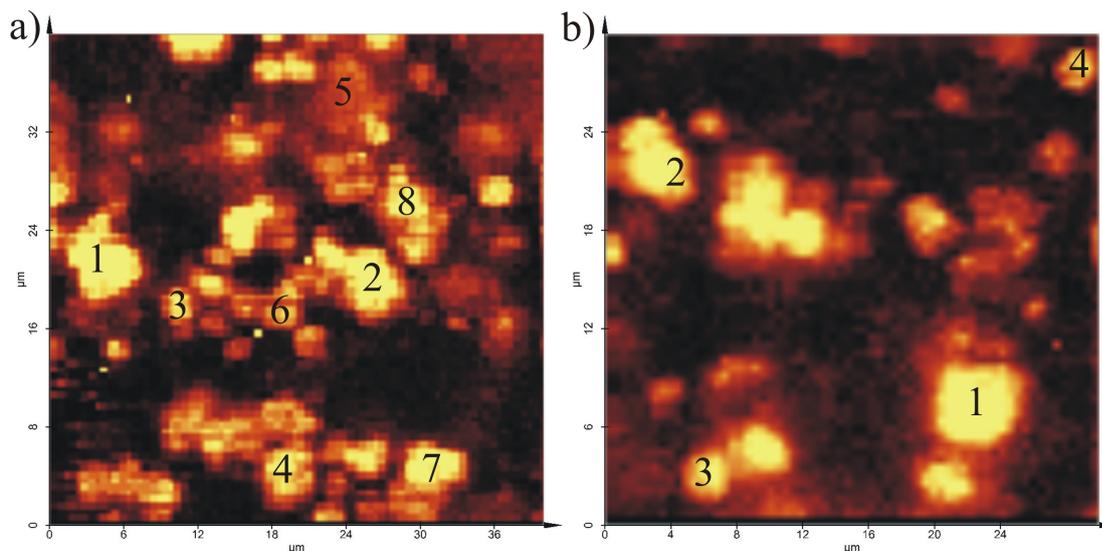


Abbildung 5.23: Messflecken aus SBR-Proben: Die Abbildung zeigt die Intensitätsverteilung der starken Ramanbande bei 747 cm^{-1} in zwei verschiedenen SBR-Proben. a) zeigt einen $40\cdot 40\text{ }\mu\text{m}^2$ -Ausschnitt einer SBR-Probe mit Granula, während in b) der $30\cdot 30\text{ }\mu\text{m}^2$ -Ausschnitt aus einer homogenisierten SBR-Probe dargestellt ist. Beide Proben wurden mit einer Laserleistung von 11 mW und einer Belichtungszeit von 1 s gemessen. Die Zahlen markieren diejenigen Stellen, an denen Spektren für den Identitätstest extrahiert wurden.

zu erwarten, dennoch konnte diese Bakteriengattung dort nicht gefunden werden. Dass aber *Anammox*, *Nitrosomonas eutropha* und *Nitrobacter hamburgensis* so eng beieinander liegen wie in Abb. 5.23. b), erscheint eher unwahrscheinlich. Ein Grund für diese Unstimmigkeit könnte die verhältnismäßig hohe Heterogenität der eingespeisten *Nitrosomonas*-Spektren sein, die noch optimiert werden könnte. Darüber hinaus können noch weitere *Nitrobacter*-Stämme bestellt werden, die vielleicht eher im Biofilm erwartet werden als der vorhandene *Nitrobacter hamburgensis*. Die aktuelle Datenbank kann selbstverständlich noch nicht als komplett angesehen werden, sodass eine verlässliche Bakterienidentifikation vorerst nicht in allen Fällen gewährleistet werden kann.

Charakteristisch für alle Bakterienkolonien im Biofilm sind Kugelstrukturen, die speziell in Abb. 5.23 sehr deutlich zu erkennen sind. Die Bakterien sammeln sich zu Kugelhaufen und finden sich nicht einzeln verteilt im Biofilm wieder. Für die Bakterienidentifikation per Bruker-Software wurde das gemittelte Spektrum aus den markierten Kugeln berechnet. Leider ist es nicht praktikabel, dem Identitätstest jedes einzelne Spektrum vorzugeben, denn alleine Abb. 5.23.a) besteht aus insgesamt 1600 Einzelspektren.

Abbildung 5.24 zeigt weitere Ramanmessungen an Biofilmen aus dem SBR, im linken Bild ist ein größerer Ausschnitt zu erkennen, welcher vorerst mit der APD detektiert wurde. Gelb markiert wurde derjenige Bereich, der im Anschluss an die Überblicksmessung durch Chemical Imaging genauer untersucht wurde. Im rechten Bild ist die Intensitätsverteilung der Ramanbande bei 747 Wellenzahlen zu sehen, darüber hinaus die Messflecken,

Messfleck	identifiziertes Bakterium
a) 1	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 2	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 3	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 4	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 5	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 6	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 7	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
a) 8	<i>Nitrosomonas eutropha</i>
b) 1	<i>Anammox</i>
b) 2	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> o. <i>Anammox</i>
b) 3	<i>Anammox</i>
b) 4	<i>Nitrosomonas eutropha</i>

Tabelle 5.4: Zuordnung der Ramansignale aus Abb. 5.23 zu Abwasserbakterien: Mit Hilfe des Bruker-Identitätstestes wurden die Ramanspektren der in Abb. 5.23 gekennzeichneten Messflecken bereits bekannten Bakterien zugeordnet. Laut Softwarevergleich sind in Abb. 5.23.a) nur *Nitrosomonas eutropha*-Cluster zu sehen, während die Software in b) auch *Nitrobacter hamburgensis* und/oder *Anammox* erkennt.

deren Ramanspektren dem Identitätstest vorgegeben wurden. In diesem Fall erkennt der Identitätstest die größte Übereinstimmung mit dem Anammoxbakterium, sodass es sich bei dem hier gemessenen Bakteriencluster um Anammoxbakterien zu handeln scheint. Auch hier ist eine deutliche Kugelstruktur erkennbar, die sich für alle abwasserrelevanten Bakterien wiederzufinden scheint. Von der reinen Verteilung her ist folglich keine Unterscheidung der Bakterien möglich, hier kann erst der Identitätstest Klarheit schaffen.

Die Identifikation der Bakterien mittels der Bruker-Software funktioniert mit einer vorhandenen Ramandatenbank recht einfach, sollte aber dennoch nicht ohne eingehende Prüfung akzeptiert werden. Die Referenzspektren wurden mit Ausnahme der Anammoxbakterien anhand von stark verdünnten Bakteriensuspensionen aus Reinkulturen aufgenommen. Im Biofilm liegen die Bakterien aber in einer vielschichtigen Struktur vor, die die Ramanspektren durchaus beeinflussen kann. Gerade bei den gegebenen Ähnlichkeiten aller Ramanspektren von abwasserrelevanten Bakterien kann nicht sorgfältig genug geprüft werden, ob der Identifikationstest überhaupt funktioniert hat.

Um die Leistungsfähigkeit der selbst erstellten Ramandatenbank zu testen, wurden dem Identitätstest der Bruker-Software zahlreiche Bakterienspektren, speziell von Biofilmen aus dem SBR, vorgegeben. Dabei fällt auf, dass die Bakterienkolonien aus den oberen Schichten des Biofilmes fast ausschließlich *Nitrosomonas eutropha* zugeordnet sind. Werden dem Identitätstest aber Bakterienspektren aus tieferen Schichten des Biofilmes eingespeist, so erkennt die Software diese stets als Anammoxbakterium. Wie oben bereits erwähnt, ist dies sinnvoll, da die anaerobe Ammoniumoxidation durch Sauerstoff

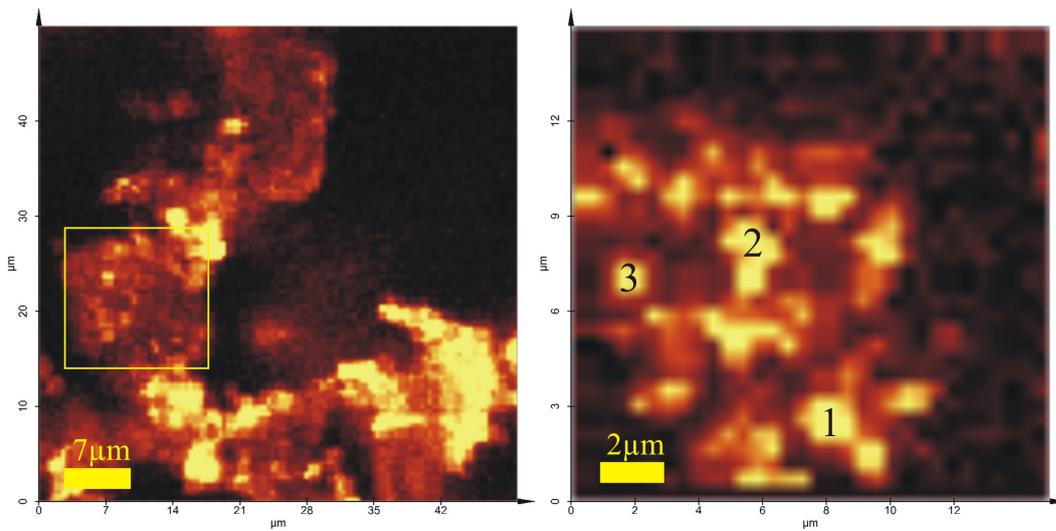


Abbildung 5.24: APD- und CCD-Bilder einer SBR-Biofilmprobe: Das linke Bild zeigt einen $50 \cdot 50 \mu\text{m}^2$ Ausschnitt der Probe, welcher mit der APD aufgenommen wurde. Gelb markiert ist der Bereich, welcher anschließend mittels Chemical Imaging vermessen wurde. Rechts ist die Intensitätsverteilung der Ramanbande bei 747 cm^{-1} zu sehen. Außerdem wurden dort die Stellen markiert, deren zugehörige Ramanspektren mit der Bruker-Software identifiziert wurden.

gehemmt wird und daher nicht an der Oberfläche des Biofilmes abläuft, welche dem Sauerstoff ausgesetzt ist.

Ein auftauchendes Problem sind die praktikablen Messzeiten, denn die Biofilmflocken haben einen Durchmesser von etwa 1 mm. Um signifikante Ramanbanden beim Abscannen der Probe zu erhalten, sollte jeder Messfleck allerdings mindestens 1 s belichtet werden, besser sogar 5 s. Soll ein Ausschnitt von $100 \cdot 100 \mu\text{m}^2$ mit einer Auflösung von $0,5 \mu\text{m}$ vermessen werden, so sind dafür 40000 Messpunkte erforderlich. Bei einer Belichtungszeit von nur 1 s ergibt sich dabei bereits eine Gesamtmesszeit von über 11 Stunden. Mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie kann folglich kein komplettes Bild der Probe erstellt werden, es können lediglich Stichproben vermessen werden. Dennoch schränkt auch dies die Messmethode kaum ein, da auch für die FISH nur ausgewählte Probenmengen analysiert werden können und nie eine gesamte Biofilmflocke.

Kapitel 6

Räumlich aufgelöste Analyse von Zellkulturen

Die konfokale Ramanmikroskopie wird schon seit Jahren zur Untersuchung von Zellen und Chromosomen sowie zur in-vivo-Analyse von Humanhaut eingesetzt [13], jedoch gelang die ramanspektroskopische Untersuchung von Melanin erst im Jahr 2004 [11]. Bei Anregung mit verschiedenen Wellenlängen konnte mit Hilfe der Ramanspektroskopie Melanin in vivo in der Haut von dunkelhäutigen Probanden nachgewiesen und mit gelöstem Melanin verglichen werden. Melanin zeigt dabei zwei starke Ramanbanden, welche zur eindeutigen Identifikation von Melanin dienen. Dieses Wissen kann besonders zur medizinischen Hautanalyse eingesetzt werden, da Melanin wichtige Schutzfunktionen in der Haut übernimmt, bislang aber noch nicht in vivo untersucht werden konnte. Experimente an Melanozytenkulturen erweisen sich als sehr vielversprechend, da an ihnen Prozesse in den Hautzellen genau beobachtet werden können. Mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie ist nicht nur der Nachweis von Melanin gelungen, sondern sogar die Bestimmung der Melaninverteilung innerhalb der Melanozyten. Hierbei können wichtige Informationen über die Melaninsynthese gewonnen werden.

Im Folgenden werden die Messergebnisse an verschiedenen Zellkulturen vorgestellt und diskutiert. Bei der Analyse der Zellkulturen interessierte insbesondere die Melaninverteilung innerhalb der Zellen, da das Melanin in den Melanozyten produziert und über die Dendriten zu den Keratinozyten transportiert wird. Über die genaue Kenntnis der Melaninverteilung und über die vorhandene Melaninkonzentration kann somit durch die konfokale Ramanmikroskopie verfolgt werden, wie erfolgreich die Zellkulturen arbeiten. Ein Fernziel wird die Analyse von Co-Kulturen mit Melanozyten und Keratinozyten sein, die durch diskrete Wellenlängen im UV-Bereich bestrahlt und anschließend am Ramanmikroskop untersucht werden, um die Veränderung der Melaninkonzentration zu detektieren.

6.1 Granulosa- und Linsenzellen

Zellen und Chromosomen sind bereits seit einigen Jahren Gegenstand ramanmikroskopischer Untersuchungen. Am Institut für Biophysik werden verschiedene Zelllinien in Kultur gehalten, sodass diese Zellen zunächst als Untersuchungsobjekt herangezogen wurden. Bei der Analyse von Granulosa- und Linsenzellen sind besonders die laterale Auflösung des Zellkerns und die Analyse von DNS innerhalb der Zelle interessant. Umfangreiche Messreihen wurden an murinen Melanomzellen und Melanozyten durchgeführt. Die Messungen an Granulosa- und Linsenzellen konnten verwendet werden, um verschiedene Zelltypen miteinander zu vergleichen.

Für sämtliche Experimente an Zellkulturen wurden diese auf Quarzglasobjektträger aufgewachsen und unter idealen Bedingungen kultiviert. Für die Ramanversuche musste das Zellmedium durch NaCl-Lösung ausgetauscht werden, um Fluoreszenzeinflüsse durch das Medium auszuschließen.¹ Mit dem konfokalen Ramanmikroskop ließen sich APD-Aufnahmen von den Zellkulturen machen, die einen Überblick über die Zellstrukturen gaben. Da die APD sehr lichtempfindlich ist, können größere Strukturen (bis zu $180 \cdot 180 \mu\text{m}^2$) in kurzer Zeit vermessen werden. Allerdings liefert die APD keine spektrale Information, es können aber bereits Aussagen über Zellverteilungen und Zellgröße getroffen werden (s. Abb. 6.1). Mit der Information über die Zellverteilung können CCD-Messungen gezielt an einzelnen Zellen vorgenommen werden, um Ramanspektren aus dem Zellinneren zu erhalten.

In Abb. 6.2 sind ausgewählte Ramanspektren von drei verschiedenen Zelllinien zu sehen. Die Spektren wurden mit der Bruker-Software vorbereitet und anschließend miteinander verglichen. Zwischen den einzelnen Spektren sind nur geringe Unterschiede zu bemerken, was jedoch nicht weiter verwunderlich ist, da Zellen aus den gleichen Bestandteilen aufgebaut sind. Auch wenn die Signale nur schwach ausgeprägt sind, können Ramanbanden, die von der DNS hervorgerufen werden, aus den Spektren abgelesen werden (s. Tab. 6.1). Vergleiche mit bestehenden Ramantabellen, in denen DNS-Signale speziellen Ramanbanden zugeordnet werden konnten, zeigen, dass nicht alle DNS-Schwingungen detektiert werden konnten. Dafür waren die Signale aus den Zellkulturen zu schwach. Exemplarisch zeigen diese Experimente jedoch, dass es prinzipiell möglich ist, mit dem vorhandenen konfokalen Ramanmikroskop Zellkerne und Zellbestandteile orts aufgelöst zu detektieren. Granulosa- und Linsenzellen haben eine hohe Transparenz und sind daher nicht so lichtempfindlich wie beispielsweise die schwarz gefärbten Melanozyten, die viel Laserlicht absorbieren. Die Experimente an den hellen Zellkulturen wurden daher bei einer relativ hohen Laserleistung von 10 mW auf der Probe vorgenommen. Durch Reproduktionsmessungen am gleichen Messfleck konnte gezeigt werden, dass die Zellen

¹Die Zellkulturmedien beinhalten meist einen Farbstoff bzw. einen Indikator, der sehr starke Fluoreszenzsignale zeigt, sodass keine Ramanbanden aus den Zellen nachgewiesen werden können.

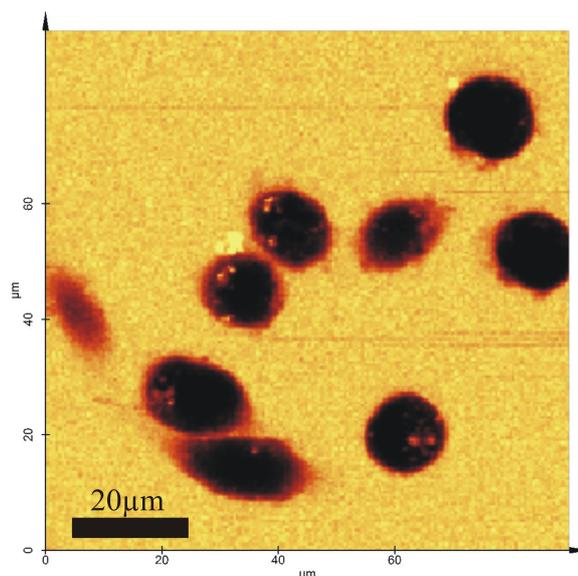


Abbildung 6.1: Kultur aus Granulosazellen: Die Aufnahme wurde mit der APD über einen Ausschnitt von $90 \cdot 90 \mu\text{m}^2$ gemacht und zeigt deutlich die Verteilung der Granulosazellen (schwarze Kugeln) in der untersuchten Kultur. Der beobachtete Zelldurchmesser beträgt etwa 10 bis 15 μm .

durch diese Laserleistung nicht zerstört wurden, die Stärke der Ramanbanden war gleichbleibend, außerdem konnten die Zellstrukturen auch nach einer Messung noch beobachtet werden.

Wellenzahl	zugehörige Schwingung
721	Adenin Ring-Atemschwingung
746	Thymin Ring-Atemschwingung
780	Cytosin Ring-Atemschwingung, Thymin
1000	Phenylalanin
1127	C-N
1307	Adenin, Guanin, Protein: CH Deformation
1338	Adenin, Guanin
1442	CH_2 , Lipide, Proteine
1581	Adenin, Guanin
1654	$\text{C} = \text{C}$, Amide I
2930	CH_2 asymmetrisch

Tabelle 6.1: Ramanbanden in Zellkulturen: In Abb. 6.2 sind die Ramanbanden drei verschiedener Zelllinien markiert, welche der DNS bzw. Proteinen zugeschrieben werden können [70].

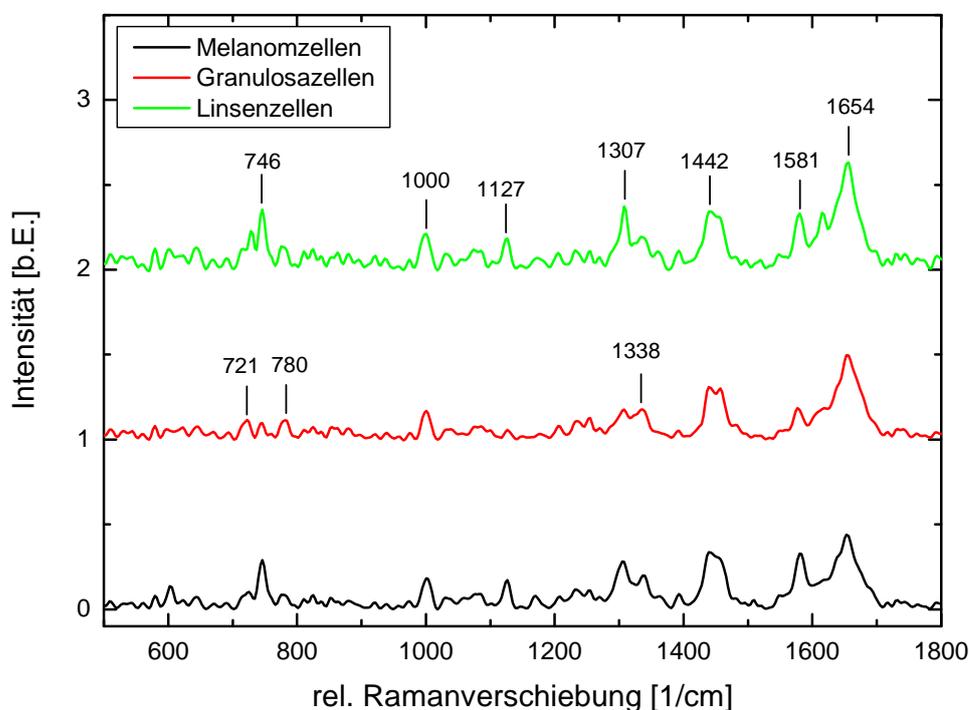


Abbildung 6.2: Vergleich der Ramanspektren verschiedener Zelllinien: Alle Spektren wurden mit dem Wasserimmersionsobjektiv (60fache Vergrößerung) aufgenommen, unter Verwendung der 50 μm Lochblende und mit einer Laserleistung von 10 mW auf der Probe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Spektren vertikal verschoben.

6.2 Murine Melanozyten

Melanine sind eine sehr wichtige Gruppe von Biopolymeren, die in vielen Bereichen unseres Lebens eine wichtige Rolle spielen und in lebenden Organismen zu finden sind. Besonders die molekulare Struktur von Melanin ist von Interesse, da sie die Funktionen des Melanins beeinflusst. Doch trotz zahlreicher Untersuchungen ist die genaue Melaninstruktur bis heute unbekannt [71]. Bislang existieren nur sehr wenige Publikationen zu ramanspektroskopischen Untersuchungen von Melanin. Die genaue Melaninverteilung in melaninproduzierenden Zellen (wie beispielsweise den murinen Melanozyten melan a bzw. Melanomzellen B16F0) scheint bis heute nicht orts aufgelöst untersucht worden zu sein.

Im Rahmen eines Projektes am Institut für Biophysik soll der Einfluss von UV-Strahlung auf die Melaninsynthese anhand muriner Melanozyten (s. Abb. 6.3) bestimmt werden [72], [60]. Dabei ist zu überprüfen, mit welcher Wellenlänge sich die Melaninproduktion

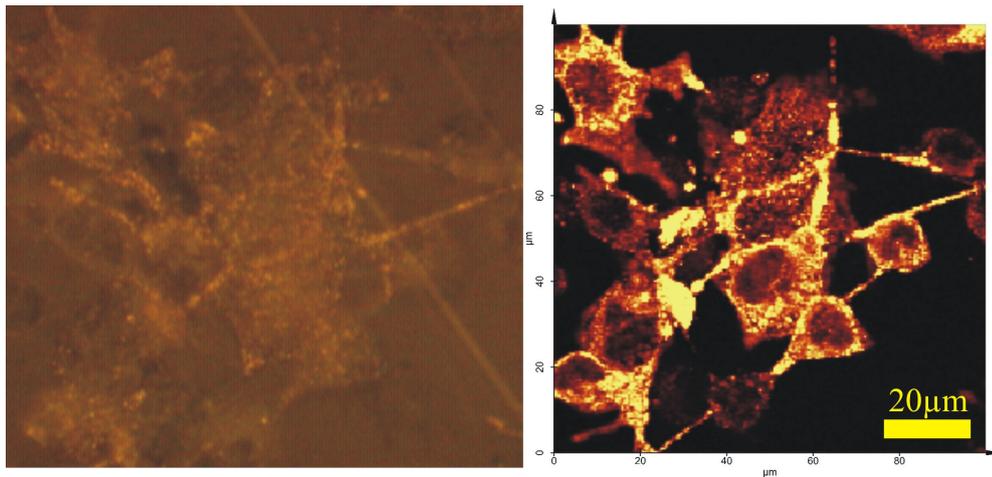


Abbildung 6.3: Melan a-Zellen: Bild aus der Köhlerbeleuchtung und Aufnahme der APD: Schon in der Köhlerbeleuchtung lassen sich viele Zellstrukturen erkennen, allerdings erscheint hier das Melanin in den Dendriten und den Zellrändern eher hell. Im rechten Teil ist der gleiche Ausschnitt als APD-Bild zu sehen, hier treten klar die hellen Strukturen hervor, in denen sich das Melanin angereichert hat.

in den Melanozyten am effektivsten angeregt lässt. Diese verbesserten Erkenntnisse über die Melaninsynthese können einen wichtigen Beitrag zur Phototherapie leisten, da die gezielte Bestrahlung mit Licht häufig zu therapeutischen wie auch kosmetischen Zwecken eingesetzt wird. Ein Beispiel ist die Behandlung von Psoriasis (Schuppenflechte), die zeit- und kostenintensiv ist und entscheidend verbessert werden könnte, wenn die genauen Wirkungen des UV-Lichts in der Haut bekannt wären. Auf der anderen Seite ließen sich mit dem Wissen über die genauen Zusammenhänge der Melaninsynthese auch wirksamere Solarien konstruieren. Dies würde nicht nur rein kosmetischen Zwecken dienen, sondern auch eventuell die Entstehung von Hautkrebs eindämmen, da Solarien wesentlich effizienter arbeiten könnten und die Haut daher nicht unnötig bestrahlt werden müsste.

Die Ramanspektroskopie erlaubt prinzipiell quantitative Aussagen über Stoffinhalt und -konzentration einer Probe, sodass eine möglicherweise angeregte bzw. verminderte Melaninproduktion durch UV-Einwirkungen hierdurch überprüft werden kann. Mit Hilfe des konfokalen Ramanmikroskops können auftretende Veränderungen sogar orts aufgelöst dargestellt werden. Mit dieser Methode kann also genau festgestellt werden, wie Melanin von den Melanozyten produziert und weitergegeben wird. Dabei müssen Melanozyten entlang der z-Achse abgescannt werden, um ein genaues Bild des Melanins innerhalb der Zelle zu erhalten. Mit Hilfe dieser Ergebnisse können Aussagen getroffen werden über eine Veränderung des Melaningehalts der Zellen.

Für die Ramanexperimente wurden zwei verschiedene murine Zelllinien (melan a-Zellen und B16F0) kultiviert, die beide in der Lage sind, Melanin zu produzieren. Vor den Messungen wurde auch hier das Zellmedium gegen NaCl-Lösung ausgetauscht, um störende Fluoreszenzeinflüsse auszuschließen. An den beiden Zelllinien konnte die Melaninver-

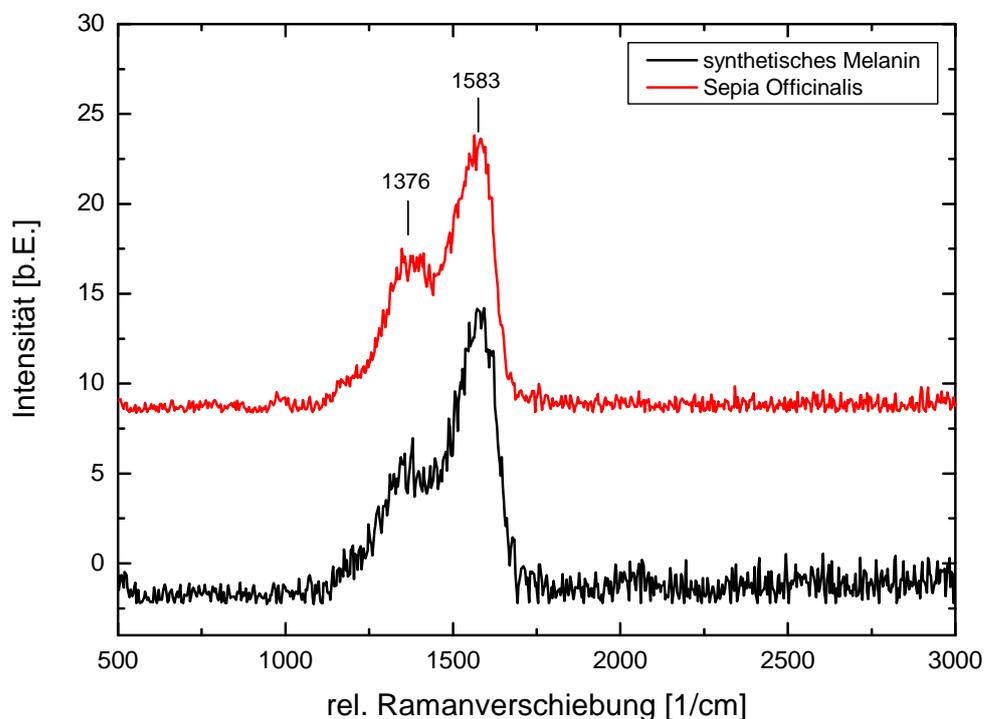


Abbildung 6.4: Vergleich von synthetischem Melanin und *Sepia officinalis*: Die Belichtungszeit beträgt in beiden Fällen 1 s, die Laserleistung auf der Probe 2 mW. Um störende Einflüsse des Lösungsmittels zu verhindern, wurden beide Melanine in destilliertem Wasser gelöst.

teilung mittels Ramanmikroskopie innerhalb einer Zellkultur und auch im Inneren einer Zelle bestimmt werden.

6.2.1 Referenzspektren von gelöstem Melanin

Um Referenzspektren von verschiedenen Typen von Melanin zu erhalten, wurden synthetisches Melanin und *Sepia officinalis* in gelöster Form mit dem Ramanmikroskop analysiert. Melanin ist bekanntlich sehr schwer löslich, da aber viele in Frage kommende Lösungsmittel (z.B. Soluen oder Alkohol) einen Einfluss auf das Ramanspektrum haben, wurden beide Melanine in destilliertes Wasser gegeben und im Ultraschallbad behandelt. Mit dieser Methode konnte zwar keine homogene Lösung hergestellt werden, doch da keine quantitativen Messungen geplant waren, spielte das in diesem Fall keine Rolle.

Sowohl *Sepia officinalis* wie auch synthetisches Melanin zeigen zwei ausgeprägte Banden in der Nähe von 1380 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} (s. Abb. 6.4), welche trotz ihrer Breite nicht

durch Fluoreszenz hervorgerufen werden. Da die beiden Banden bei verschiedenen Anregungswellenlängen immer an der gleichen Stelle gefunden werden konnten, kann ihre Ursache nur eine Ramanschwingung sein [11]. Für die Darstellung der Spektren ist nur der entscheidende Wellenzahlbereich ausgewählt, darüber hinaus wurden Fluoreszenzeinflüsse in beiden Spektren herausgerechnet. Ein Vergleich beider Spektren mit Hilfe der Bruker-Software ergab eine prozentuale Übereinstimmung von 98,18 %.

6.2.2 Verteilung von Melanin innerhalb der Zelle

Melanin zeigt sehr starke Ramansignale, die schnell zur Sättigung führen, darüber hinaus kann das Melaninmolekül sehr leicht zerstört werden. Aus diesen Gründen wurden die Messungen an Melanozytenkulturen mit geringerer Laserleistung (etwa 1 mW auf der Probe) und kürzeren Belichtungszeiten (0,5-1 s beim Chemical Imaging) durchgeführt. Während der Experimente wurde nie länger an einem Punkt gemessen, im Vordergrund stand vielmehr die räumliche Auflösung der Zellkulturen. Von Interesse war die Verteilung von Melanin und die Überprüfung der Hypothese, dass sich das Melanin in den äußeren Bereichen der Zellen und in den Dendriten anreichert [73].

Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie im Reflexionsmodus konnte die Melaninverteilung bereits in Melanozyten und in menschlicher Haut bestimmt werden [12]. Hierbei wurde darüber hinaus bestätigt, dass sich auch in pigmentierten Tierzellen das Melanin oberhalb des Zellkerns anordnet. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden zahlreiche Messungen an murinen Zellen vorgenommen, die ebenfalls nicht-invasiv die Melaninverteilung bestimmt haben. Ramansignale vom Zellkern und seinen Bestandteilen wurden nicht gefunden. Dies lässt sich aber leicht durch die zu geringe Laserleistung auf der Probe und die zu kurzen Belichtungszeiten erklären. Schon bei den obigen Messergebnissen an Granulosa- und Linsenzellen ist abzulesen, dass die DNS-Signale bei zehnfacher Laserleistung und fünffacher Belichtungszeit sehr schwach ausgeprägt sind.

Auch bei den melaninproduzierenden Zelllinien wurde die Strategie angewendet, zunächst größere Probenbereiche mit Hilfe der APD abzubilden, um einen Eindruck über die Zellverteilung zu erhalten (s. Abb. 6.5). An den APD-Bildern kann neben der Größe der Zellen auch ihre Anordnung zueinander abgelesen werden. Mit dieser Information können anschließend gezielt vielversprechende Bereiche herausgegriffen werden, um diese spektral mit der CCD aufzulösen (s. Abb. 6.6). Hier wird dann überprüft, ob die hohen Intensitäten, die mit der APD detektiert werden, von starken Ramansignalen des Melanins hervorgerufen werden oder durch auftretende Fluoreszenzen. Diese Informationen können nur mit der CCD-Kamera gewonnen werden.

Neben der hohen lateralen Auflösung erlaubt das konfokale Ramanmikroskop auch eine hohe axiale Auflösung, die die Aufnahme von dreidimensionalen Bildern ermöglicht.

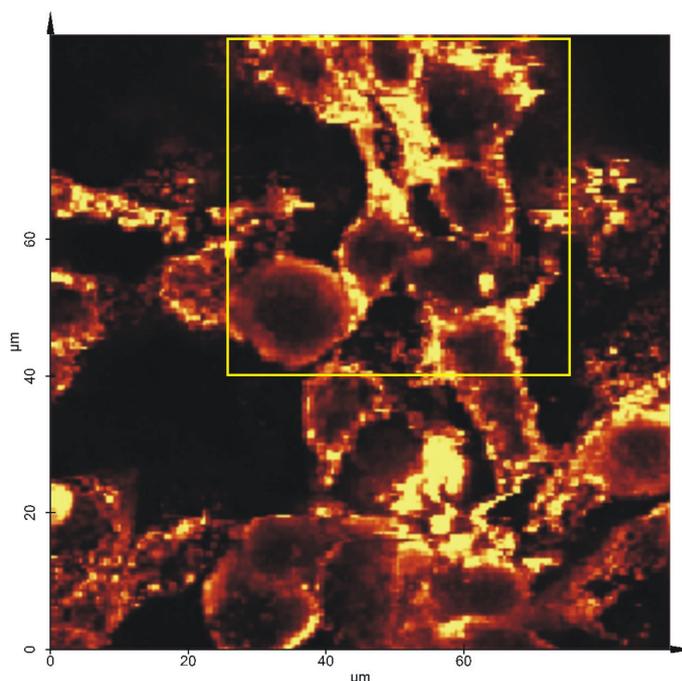


Abbildung 6.5: APD-Aufnahme einer Melanozytenkultur: Die hellen Bereiche markieren die Stellen, in denen eine hohe Konzentration an Melanin vorliegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Melanin in den Randbereichen der Zellen und in den Dendriten anreichert. Auch die Zellgröße von bis zu $20 \cdot 20 \mu\text{m}^2$ kann an diesem Bild abgelesen werden. Gelb markiert ist der Bereich, in welchem anschließend mit der CCD entsprechende Ramanspektren aufgenommen wurden.

Dazu werden zweidimensionale Bilder in verschiedenen Tiefen der Probe aufgenommen, die mit einer entsprechenden Software zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden können.² In Abb. 6.7 sind Bilder aus verschiedenen Tiefen einer Hautzelle zu sehen. In den hellgelben Bereichen findet sich wiederum das Melanin, sodass die Zellstrukturen klar erkennbar sind. Das erste Bild (s. Abb. 6.7.a) zeigt sozusagen den Kopf der melan a-Zelle, in welchem konzentriert das Melanin zu sehen ist. Die darauf folgenden Bilder sind jeweils $2 \mu\text{m}$ tiefer aufgenommen, sodass insgesamt ein axialer Ausschnitt von $16 \mu\text{m}$ dargestellt ist. Je tiefer der Laserfokus in die Zelle hineingefahren wird, umso mehr verschiebt sich das Melanin innerhalb der Zelle. Während das Melanin in den ersten beiden Bildern noch vorwiegend in der Mitte vorzufinden ist, ist es in den darauffolgenden Bildern (Abb. 6.7. c-h) in den Randbereichen konzentriert. Dies sind die Aufnahmen aus dem Inneren der Zelle. Die unteren Bilder müssten wieder ähnlich aussehen wie die ersten, doch wird das rückgestreute Licht aus dem unteren Teil der Zelle vermutlich zu stark durch das darüber liegende Melanin gestreut, sodass es nicht mehr durch das Objektiv aufgesammelt und schließlich detektiert werden kann.

²Beispielhaft werden hier die zweidimensionalen Schnitte durch eine Zelle dargestellt, die dreidimensionale Darstellung ist zukünftig ebenfalls vorgesehen.

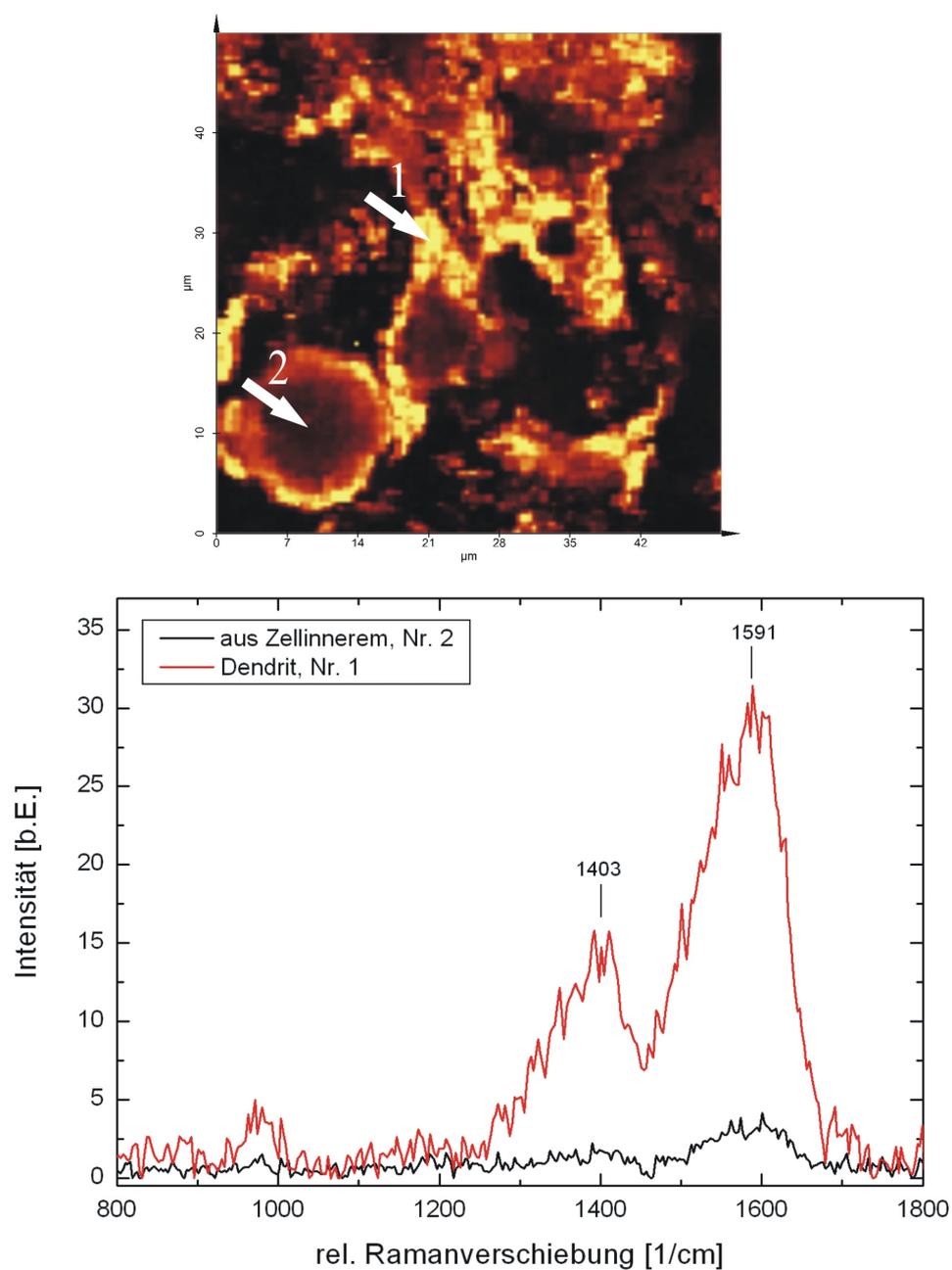


Abbildung 6.6: Melaninsignale aus einer Melanozytenkultur: Das Melaninramanspektrum aus dem Dendriten ist sehr stark ausgeprägt (Spektrum Nr.1), während aus dem Zellinneren nur ein sehr schwaches Signal zu detektieren ist (Spektrum Nr.2). Es kann also nicht nur die Melaninverteilung gemessen werden, sondern es sind auch Rückschlüsse auf die Melaninkonzentration möglich.

6.2.3 Überprüfung der Melaninproduktion

Neben der Bestimmung der Melaninverteilung innerhalb der Zelle können mit der konfokalen Ramanmikroskopie jedoch noch weitere Aspekte beleuchtet werden. So zeigen

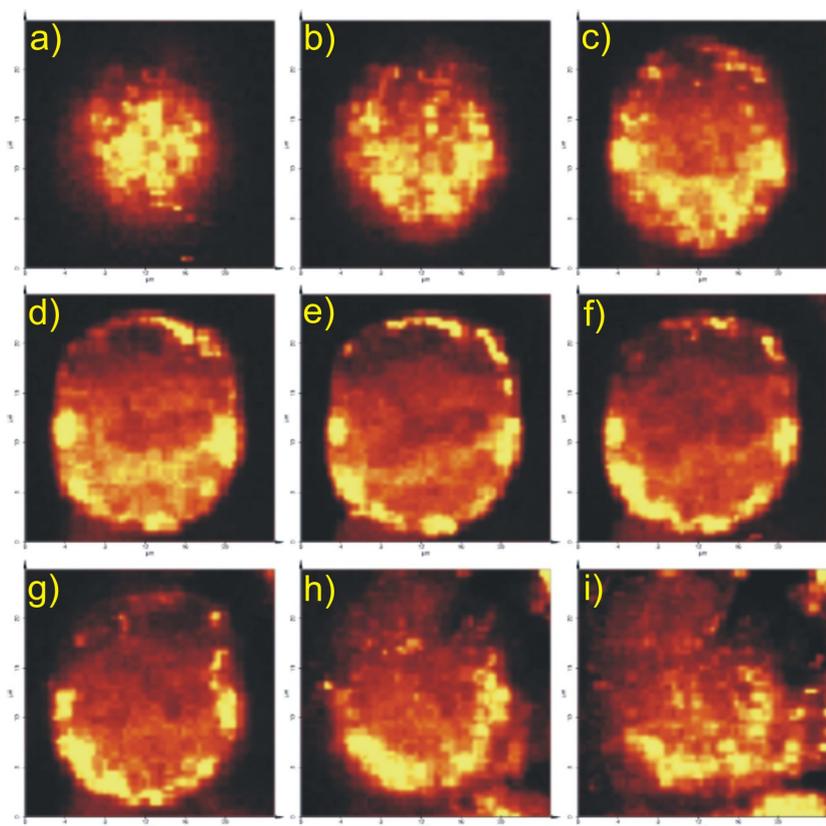


Abbildung 6.7: Schnitte durch einen Melanozyten: Die Aufnahmen ($25 \cdot 25 \mu\text{m}^2$) wurden mit der APD gemacht, zwischen den einzelnen Bildern wurde der Laserfokus in z-Richtung um $2 \mu\text{m}$ in die Tiefe gefahren. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Melanin (gekennzeichnet durch die hellgelben Bereichen) sich in den äußeren Bereichen der Zelle findet.

Reproduktionsmessungen, dass das Melanin in der Zelle auch bereits bei einer Laserleistung von nur $1,5 \text{ mW}$ auf der Probe zerstört werden konnte (s. Abb. 6.8). Bei der Messung an einer ausgewählten Zelle, welche insgesamt dreimal hintereinander abgescannt und vermessen wurde, sind die Verluste an Melanin deutlich zu erkennen. Die Zerstörung des Melanins zeigt sich hierbei sowohl in den Ramanspektren, als auch in den APD-Bildern, die keine derart intensiven hellen Bereiche mehr aufweisen. Schon durch die eigentlich geringe Laserleistung wird offenbar das Melaninmolekül zerstört, während die Zellstruktur an sich allerdings erhalten bleibt. Melanin absorbiert Licht im gesamten sichtbaren Bereich, stetig abnehmend zu höheren Wellenlängen hin [74]. Eine Anregung im grünen Bereich trifft somit zwar keine Absorptionsmaxima, allerdings wird das Laserlicht dennoch vergleichsweise gut vom Melanin absorbiert. Daher muss unbedingt darauf geachtet werden, dass die Zellen mit nur sehr geringer Laserleistung untersucht werden, um eine Zerstörung auszuschließen.

Auch zur Kontrolle des Zellwachstums und zur Überprüfung der Melaninproduktion an sich kann die konfokale Ramanmikroskopie eingesetzt werden. Nach einem Einfriervor-

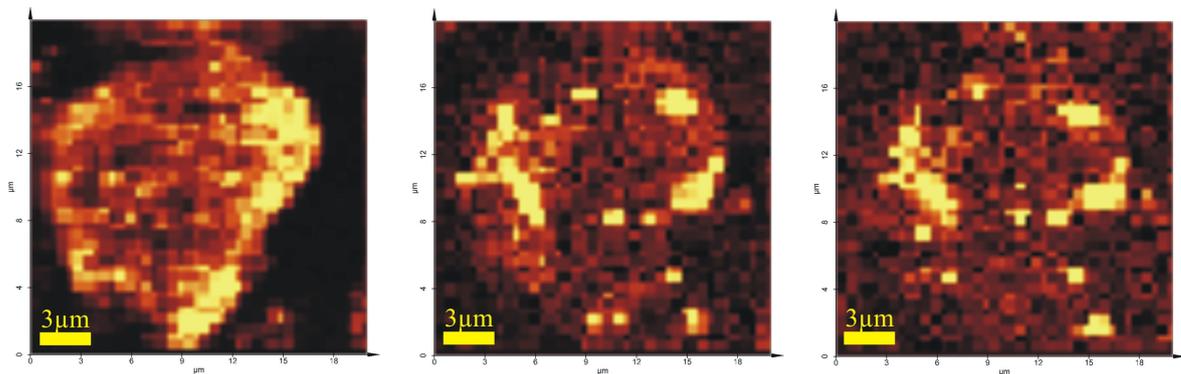


Abbildung 6.8: Reproduktionsmessungen an einer Zelle: Insgesamt drei halbstündige CCD-Messungen wurden an der gezeigten Zelle durchgeführt. Hierbei wurde die Probe mit 1,5 mW Laserleistung bestrahlt, die Belichtungszeit betrug 1 s. Während im ersten Bild noch eine klare Melaninverteilung in der Zelle zu sehen ist und auch die zugehörigen Ramanspektren ausgeprägte Banden zeigen, verschwinden die Melaninsignale schon bei der zweiten Messung spürbar. Die Verluste zwischen der zweiten und dritten Messung sind schließlich nur noch gering.

gang der melan a-Zellen konnte festgestellt werden, dass die Melaninproduktion nicht wieder einsetzte. Stattdessen waren Ramansignale der Zellbestandteile und Signale aus dem Zellkern nachweisbar (s. Abb. 6.9), die sonst durch das starke Melaninsignal überdeckt wurden. Bei fehlender Melaninproduktion konnten die melan a-Zellen mit höherer Laserleistung bestrahlt werden, sodass die Zellstrukturen genau vermessen und ramanmikroskopisch analysiert werden konnten. So lassen sich folglich verschiedene Methoden zum Einfrieren der Zellen mit der konfokalen Ramanmikroskopie überprüfen, denn wenn die Melaninproduktion nicht einsetzt, so ist dies leicht ramanmikroskopisch nachweisbar.

6.3 Melaninproduktion in murinen Melanomzellen

Melanin spielt eine sehr wichtige Rolle beim menschlichen Hautschutz, da sich die Melaninmoleküle um die Zellkerne der Keratinozyten herum anlagern und dadurch diese vor eindringendem UV-Licht der Sonne schützen. Doch neben den positiven Effekten von Melanin sind sowohl Eumelanin als auch Phäomelanin in die Entstehung von menschlichem Hautkrebs (Melanome) involviert. Auch aus diesem Grund sind Melanine ein hochaktuelles Forschungsfeld [75]. Die murine B16F0-Zelllinie zählt zu den Melanomzellen und ist in der Lage, Melanin zu produzieren. Aus diesem Grund wurden ramanmikroskopische Messungen auch an diesen Zellen vorgenommen, um Vergleiche zwischen den Melanozyten und den Melanomzellen anstellen zu können. Die Melanomzellen können hierbei mit höherer Laserleistung bestrahlt werden, da die Zellen nicht so stark dunkeln und auch nicht so viel Melanin produzieren. Dies führt dazu, dass neben den Melaninsignalen auch Ramanbanden aus dem Zellkern detektiert werden können.

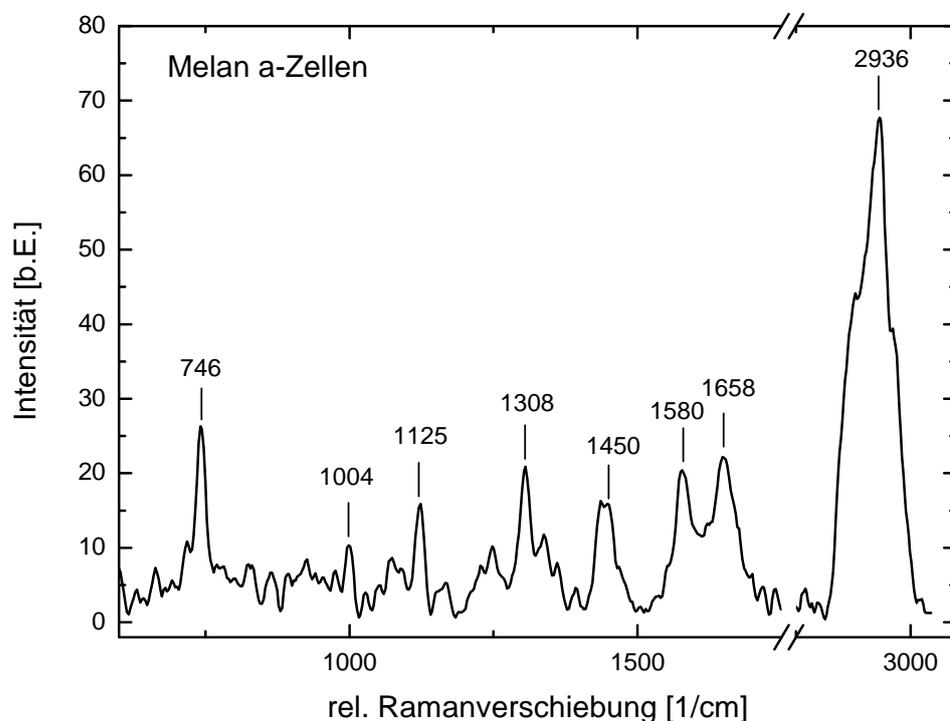


Abbildung 6.9: Ramanspektrum aus einer melan a-Zelle: Nach dem Einfrieren produzierten die melan a-Zellen kein Melanin, sodass starke Ramansignale aus dem Zellkern aufgenommen werden konnten. Die Laserleistung betrug 8 mW auf der Probe, die Belichtungszeit 1 s, das gezeigte Spektrum ist hintergrund- und grundlinienkorrigiert.

Die murinen Melanomzellen wurden gezielt in verschiedenen Stadien ihres Wachstums untersucht, um zu überprüfen, wie die Melaninproduktion sich mit dem Alter der Zellen verändert. So konnte zwei und drei Tage nach dem Aussäen der Zellen noch kein Melanin nachgewiesen werden, während schon einen Tag später deutlich mehr Melanin in den Zellen zu finden ist. Abb. 6.11 zeigt Bilder einer fünf Tage alten Melanomzellkultur, welche zunächst mit der APD vermessen wurde, um einen Überblick über die Probe zu erhalten. Abbildung 6.11. b) zeigt die Verteilung der CH-Schwingung bei 2935 Wellenzahlen am Beispiel einer Melanomzelle, in welcher zwei kugelförmige Zentren mit besonders hohem organischen Anteil zu erkennen sind. Am Rand der Zelle konnte darüber hinaus ein starkes Melaninsignal ausgemacht werden (s. Abb. 6.11. c), welches allerdings leicht von dem Melaninspektrum aus den Melanozyten abweicht. In diesen Experimenten zeigte sich erstmals, dass in den murinen Melanomzellen scheinbar eine andere Form des Melanins produziert wird, welche zwar weiterhin die ausgeprägte Bande bei etwa 1580 Wellenzahlen zeigt, daneben aber auch eine starke Bande bei 1330 Wellenzahlen. In [76] wird diese Bande bei 1325-1350 cm^{-1} dem Melanin zugeordnet. Außerdem fällt auf, dass

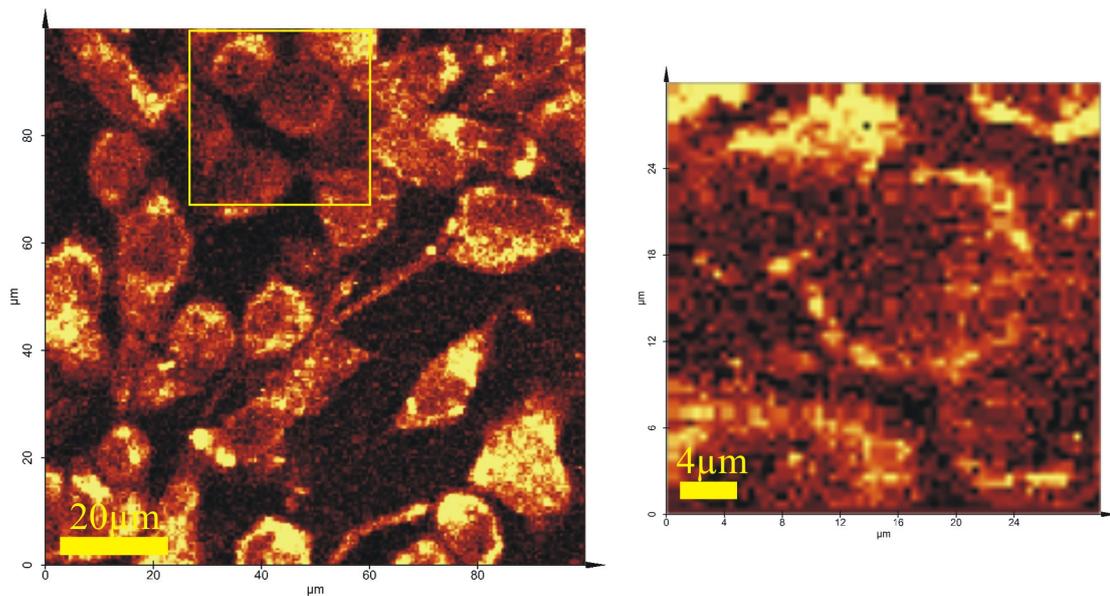


Abbildung 6.10: Melanin-Zellstrukturen: Im linken Teil ist die APD-Aufnahme eines größeren Ausschnitts der Zellkultur zu sehen, im rechten Teil ist der markierte Ausschnitt dargestellt, welcher mit der CCD-Kamera aufgenommen wurde und die Verteilung der intensiven Ramanbande bei 746 Wellenzahlen zeigt.

die beiden Melaninbanden hier wesentlich schmalbandiger sind. Diese spektralen Abweichungen sind ein Anzeichen dafür, dass Melanozyten durchaus ramanmikroskopisch von Melanomzellen unterschieden werden können, indem das Ramanspektrum des jeweiligen Melanins untersucht wird.

In der Literatur wurde bereits über die Differenzierung zwischen Muttermalen und Melanomen mittels optischer Spektroskopie berichtet [76]. Die Ergebnisse der konfokalen Ramanmikroskopie bestätigen ebenfalls, dass Unterschiede zwischen den Melanin- und Zellsignalen der Melanozyten und der Melanomzellen auszumachen sind. Bei der Bestimmung von Hautkrebs mit Hilfe optischer Methoden wird die Clusteranalyse eingesetzt, welche Muttermale und Melanome in ein Dendrogramm einsortiert und für verschiedene Tumorarten unterschiedliche Cluster verwendet. Besonders wichtig ist hierbei die Bestimmung der Spektralbereiche, welche zur Berechnung der spektralen Distanzen berücksichtigt werden. Hier sind unter anderem die Melaninsignale von entscheidender Bedeutung [76]. Ramanmikroskopische Experimente an Melanomzellen zur Analyse der Melaninverteilung innerhalb der Zellen werden nach Kenntnis der Autorin in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt.

Die nur schwache Melaninproduktion in murinen Melanomzellen ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von Melanin innerhalb der Zellen und auch der Zellbestandteile. Aufgrund der helleren Farbe der Zellen können längere Belichtungszeiten und höhere Laserleistungen gewählt werden, die neben den Melaninramansignalen auch Signale aus dem Zellkern sichtbar machen (s. Abb. 6.13).

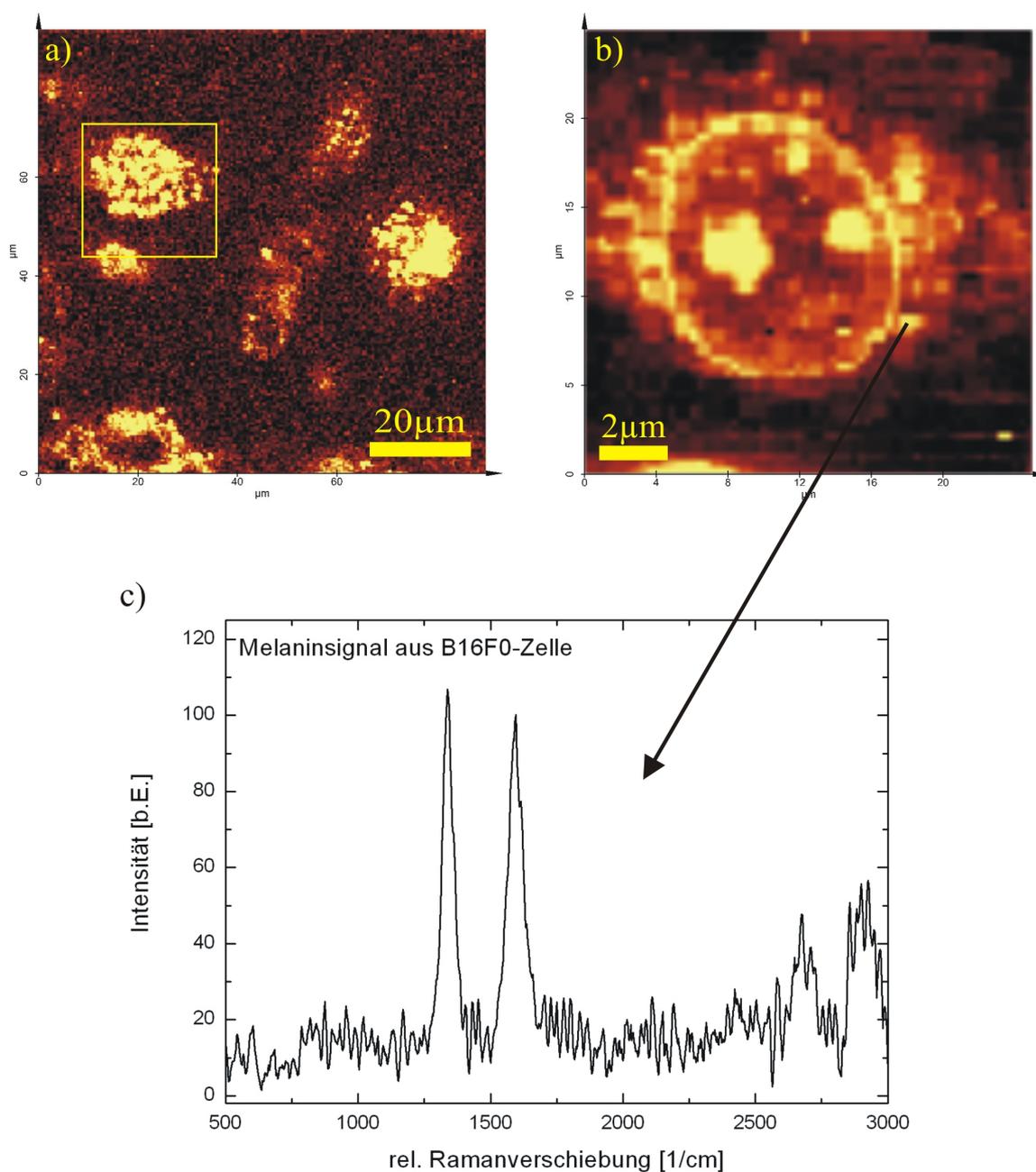


Abbildung 6.11: Messung an murinen Melanomzellen: a) zeigt einen $90 \cdot 90 \mu\text{m}^2$ -Ausschnitt einer Melanomzellkultur, welcher mit der APD aufgenommen wurde. b) stellt den gelb markierten Bereich dar, welcher mit der CCD vermessen wurde und die Intensitätsverteilung der CH-Schwingung bei 2930 Wellenzahlen angibt. Deutlich ist zu erkennen, dass innerhalb der Zelle zwei Zentren mit hohem CH-Anteil zu finden sind, und auch ein starkes Melaninsignal konnte am Rand der Zelle nachgewiesen werden.

Die Abbildungen Abb. 6.12 und Abb. 6.13 zeigen die genaue Vermessung zweier muriner Melanomzellen, die sehr nah beieinander liegen. Beide Zellen haben einen Durchmesser von etwa $13 \mu\text{m}$ und wurden bei einer Laserleistung von 9 mW auf der Probe und mit einer Belichtungszeit von 2 s untersucht. Abb. 6.12 zeigt die Verteilung zweier verschiedener Ra-

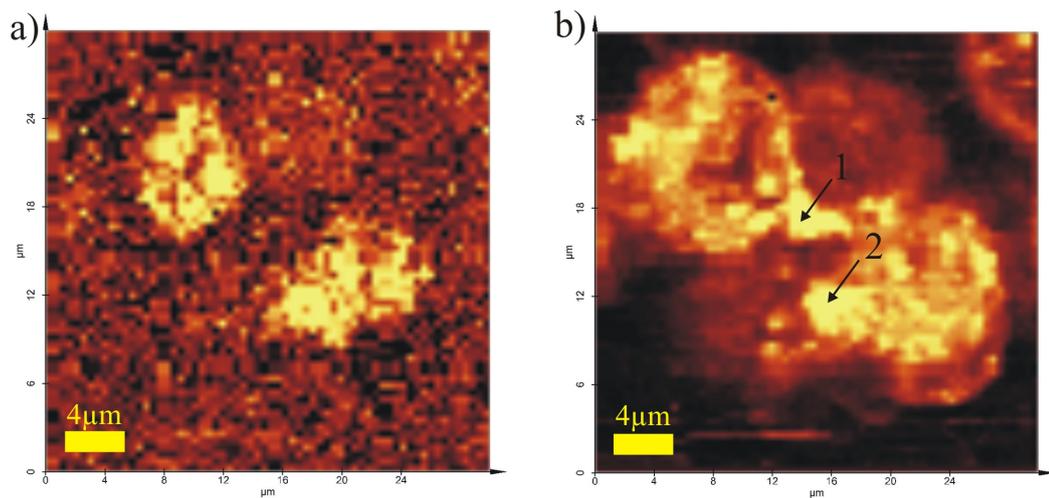


Abbildung 6.12: Intensitätsverteilung zweier Ramanbanden in murinen Melanomzellen: a) zeigt die Intensitätsverteilung der Ramanbande bei 790 cm^{-1} , b) zeigt die Verteilung der Bande bei 2935 cm^{-1} . Beide Bilder wurden mit der CCD Kamera aufgenommen, bei einer Laserleistung von 9 mW auf der Probe und bei 2 s Belichtungszeit. Beide Zellen haben einen Durchmesser von etwa $13\text{ }\mu\text{m}$. Mit den Ziffern 1 und 2 gekennzeichnet sind die Stellen, an denen die Spektren aus Abb. 6.13 aufgenommen wurden.

manbanden. In a) ist die Verteilung der Bande bei 790 Wellenzahlen zu erkennen, welche nur in den inneren Bereichen der Zellen gefunden werden kann, da sie die Schwingung von Thymin und Guanin angibt. Abbildung 6.12.b) dagegen symbolisiert die Teile der Zellen, in welchen organische Bestandteile zu finden sind, dargestellt ist die Verteilung der Ramanschwingung bei 2935 Wellenzahlen. Hier ist auch deutlich zu sehen, wie die beiden Zellen durch einen hellen Bereich miteinander verbunden sind, in welchem das Spektrum 1) aufgenommen wurde.

Abbildung 6.13 beinhaltet die beiden Spektren, welche aus zwei verschiedenen Bereichen der Melanomzellen aufgenommen werden konnten. Durch die höhere Laserleistung und die etwas längere Belichtungszeit (verglichen mit den Messungen an murinen Melanocyten) können neben den Melaninbanden auch Ramanpeaks aus dem Zellkern detektiert werden. In Tab. 6.2 sind die gefundenen Peaks mit der zugehörigen Schwingung aufgeführt. Das Melaninsignal der Melanomzellen ist recht schwach ausgeprägt und wird darüber hinaus von anderen Ramanbanden überlagert, welche neben den eigentlich so starken Melaninpeaks dennoch sichtbar sind. Speziell im Bereich um 1600 Wellenzahlen herum überlagern sich vermutlich drei verschiedene Schwingungen: Neben dem Melanin tauchen dort auch Phenylalanin, Lipide, Proteine und Amide I auf. Wie vielfältig die Ramanpektren aus verschiedenen Zellkulturen sein können, zeigt schon der Vergleich von Abb. 6.13 und Abb. 6.2. In beiden Grafiken sind Spektren von murinen Melanomzellen aufgeführt, dennoch sind einige signifikante Unterschiede festzuhalten. Abgesehen vom Wellenzahlbereich um 1600 cm^{-1} herum haben die Spektren nur die Phenylalaninbande gemeinsam.

Wellenzahl	zugehörige Schwingung
670	Thymin, Guanin
790	Cytosin, Thymin
1007	Phenylalanin
1097	DNA: $O - P - O^-$
1260	Amide III
1345	Adenin, Guanin; Protein: -CH Deformation, Melanin
1454	Lipide, Protein: -CH Deformation
1585	CH_2 , Lipide, Proteine und Melanin
1609	Phenylalanin, Tyrosin
1656	Amide I
2939	CH_2 asymmetrisch

Tabelle 6.2: Ramanbanden aus murinen Melanomzellen B16F0: In dieser Tabelle aufgeführt sind die Ramanbanden, welche in Abb. 6.13.2) gekennzeichnet sind.

Die aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass Zellkulturen mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie umfassend untersucht werden können. Besonders interessant ist hierbei die orts aufgelöste Analyse verschiedener Ramanbanden, welche mit einer speziellen Software prinzipiell sogar dreidimensional dargestellt werden kann. Nicht nur der Zellkern mitsamt seinen Bestandteilen kann genau untersucht werden, sondern auch die Melaninverteilung in melaninproduzierenden Zelllinien. Hierbei ist darüber hinaus die Kopplung an vorhergehende Bestrahlung durch UV-Licht möglich. Werden Melanozyten mit UV-Licht bestrahlt und anschließend ramanmikroskopisch analysiert, so kann die veränderte Melaninsynthese spezifiziert werden. Prinzipiell ist auch eine Quantifizierung der Melaninproduktion möglich, bringt allerdings zunächst die zu lösende Schwierigkeit mit sich, dass geeignete Konzentrationsreihen von Melaninen benötigt werden, welche einen Abgleich mit späteren Messungen erlauben. Aber auch ohne solche Konzentrationsreihen können schwache und starke Melaninproduktion nichtsdestotrotz unterschieden werden.

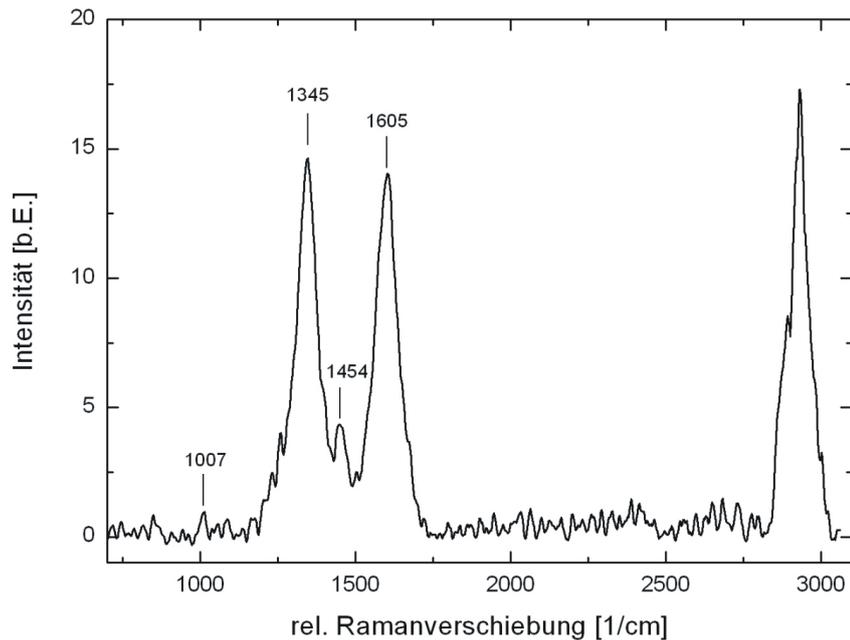
Die hier vorgestellten Messungen bestätigen nochmals die bereits publizierten Ergebnisse über die Melaninverteilung in Zellen [12]. Insgesamt jedoch erweist sich die konfokale Ramanmikroskopie in einigen Aspekten als leistungsstärker verglichen mit der konfokalen Mikroskopie im Reflexionsmodus:

- Quantitative Aussagen über den Melaningehalt in einer Zelle sind zwar mit der konfokalen Ramanmikroskopie bislang nicht getroffen worden, dennoch sind sie prinzipiell möglich. Durch Reflexionsmessungen kann dagegen nur festgestellt werden, ob überhaupt Melanin vorhanden ist.
- Die Ergebnisse aus [12] entsprechen etwa den hier vorgestellten Bildern, welche mit der APD aufgenommen wurden, denn auch die APD zeigt nur reine Intensitätsver-

teilungen und kann nicht entscheiden, wodurch sie hervorgerufen wurden. Dieses Problem bringt auch die Reflexionsmessung mit sich, die im Grunde genommen nicht entscheiden kann, was genau das Laserlicht reflektiert hat.

- Speziell die hier aufgeführten Ergebnisse an den murinen Melanomzellen zeigen, dass neben den Melansignalen auch Zellbestandteile in den Ramanspektren wiedergefunden werden können. Eine so hohe Spezifität wie mit der Ramanmikroskopie kann durch reine Reflexionsmessungen nicht erreicht werden, sodass auch hier der Informationsgehalt der Ramanspektren höher eingeschätzt werden muss.

1)



2)

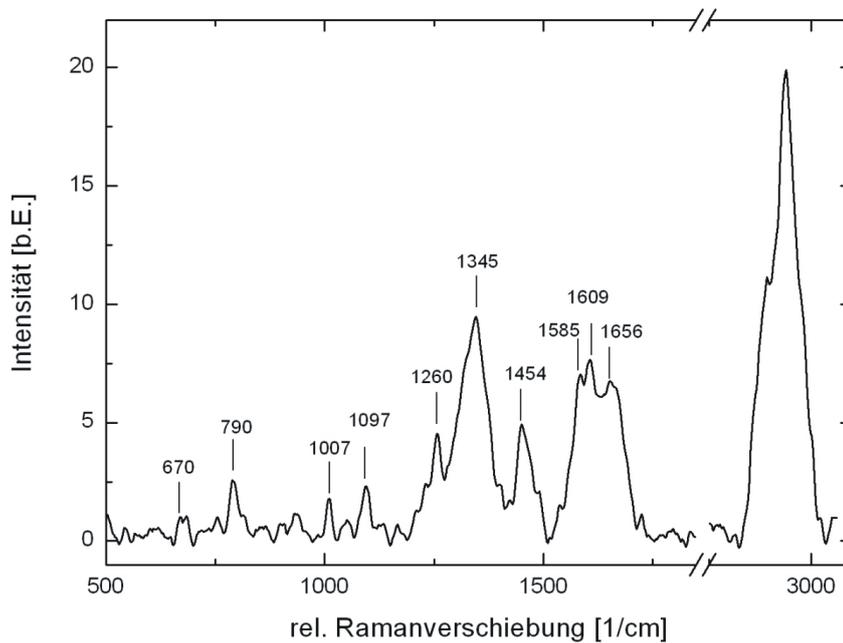


Abbildung 6.13: Ramanspektren von murinen Melanomzellen: Die Spektren 1) und 2) wurden in den Zellen aus Abb. 6.12 aufgenommen, 1) zeigt ein starkes Ramanspektrum von Melanin aus den Melanomzellen, welches neben den beiden dominanten Peaks bei 1345 cm^{-1} und 1605 cm^{-1} auch Banden bei 1007 cm^{-1} (Phenylalanin) und 1454 cm^{-1} (Lipide, Protein) aufweist. In 2) ist das Spektrum aus dem Zellrand zu sehen, welches sich durch die Überlagerung vieler Ramanbanden auszeichnet und neben den Melaninpeaks auch viele weitere Ramanschwingungen beinhaltet. Die Spektren wurden bei einer Laserleistung von 9 mW und einer Belichtungszeit von 2 s gemessen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass sich die konfokale Ramanmikroskopie gewinnbringend in den beiden ausgewählten Bereichen der Life Sciences einsetzen lässt. Die hierbei auftauchenden Fragestellungen nach der eindeutigen Bakterienidentifikation sowie nach der mikrobiellen Zusammensetzung im Biofilm konnten aufgeklärt und beantwortet werden. Darüber hinaus ließ sich die Melaninverteilung in zwei murinen Zelllinien darstellen.

Abwasserrelevante Bakterien: Ausgewählte Bakterienstämme aus der biologischen Abwasserreinigung wurden in Reinkultur bzw. im Fall von *Brocadia Anammoxidans* und *Kuenenia Stuttgartiensis* in hochangereicherter Kultur bzw. in aufgereinigter Form ramanmikroskopisch vermessen und analysiert. In diesem Zusammenhang musste zunächst ein verlässliches Messprozedere gefunden werden, mit welchem sich die Bakterien auch über längere Zeit untersuchen ließen. Hierzu wurden die Bakterien auf eine Polylysin-schicht aufgebracht, auf der sie immobilisiert sind. Da der Laserfokus beim verwendeten Messaufbau mikroskopisch klein ist (axial: $1,75 \mu\text{m}$, lateral 260 nm), besteht insbesondere bei Suspensionen, in der Bakterien frei schwimmen können, die Schwierigkeit, ein Bakterium über die gesamte Belichtungsdauer im Laserfokus zu halten. Abhilfe kann entweder eine optische Pinzette schaffen oder eine Substanz wie Polylysin, auf der die Bakterien festgehalten werden. Auf Polylysin zeigten Bakterien wie z.B. *Nitrosomonas* jedoch eine niedrigere Zerstörschwelle, sodass nicht alle Bakterien im bewegungslosen Zustand analysiert werden konnten.

Erstmals ließ sich mit der hier angewendeten hierarchischen Clusteranalyse für Bakterien der biologischen Abwasserreinigung zeigen, dass mit der konfokalen Ramanmikroskopie eine Unterscheidung der Bakterien nicht nur auf der Gattungs-, sondern auch auf der Art- und Stammebene möglich ist. So konnten die beiden unterschiedlichen *Anammox*-Gattungen in der Clusteranalyse voneinander unterschieden werden, aber auch die *Nitrosomonas*-Arten und die *Acidovorax temperans*-Stämme ließen sich differenzieren. Die *Nitrosomonas eutropha*-Stämme konnten nicht zuverlässig auseinander gehalten werden, was jedoch auf das schwierige Messprozedere zurückgeführt werden kann. In der Clusteranalyse wurde deutlich, dass verschieden lange Belichtungszeiten des gleichen Bakterienstamms zu abweichenden Ergebnissen führen können. Daher muss ein besonderes

Augenmerk darauf gerichtet werden, dass sich tatsächlich über die gesamte Messdauer das Bakterium im Laserfokus befindet.

Eine Optimierung des Messverfahrens wird in der Realisierung einer zuverlässigen optischen Pinzette bestehen, die am Beispiel von *Nitrosomonas* bereits demonstriert werden konnte. Mit der optischen Pinzette lassen sich Bakterien gezielt im Laserfokus festhalten und bewegen, wodurch Unregelmäßigkeiten bei der Messung ausgeschlossen werden können. Hiermit wird sich die spektrale Datenbank ergänzen lassen, insbesondere im Hinblick auf die Frage, welchen Einfluss unterschiedliche Wachstumsbedingungen auf die resultierenden Ramanspektren haben. Zur Beantwortung dieser Frage wird ein ausgewählter Bakterienstamm in unterschiedlichen Medien kultiviert und verglichen mit einem anderen Vertreter der Bakterienart, welcher ebenfalls in diesen Medien wächst. Bei diesen Experimenten soll schließlich geklärt werden, ob die Differenzen, die durch unterschiedliche Medien hervorgerufen werden, diejenigen überwiegen, die durch die Abweichungen innerhalb einer Bakterienart vorhanden sind.

Das Ziel nachfolgender Messungen wird eine umfassende Datenbank für abwasserrelevante Bakterien sein, die in der vorgelegten Arbeit bereits begonnen wurde. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich die angewendete Auswerteprozedur zur Erstellung einer spektralen Datenbank sehr gut eignet und dass sich auch abwasserrelevante Bakterien in eine solche Bibliothek einsortieren lassen. Anhand der bekannten Ramanspektren von Abwasserbakterien lassen sich diese innerhalb ihres natürlichen Lebensraumes untersuchen und identifizieren. Mit diesem Wissen kann die biologische Abwasserreinigung optimiert werden, da genau überprüft werden kann, bei welchen Betriebsbedingungen sich welche Bakterien anreichern lassen. Das Fernziel wird schließlich die großtechnische Umsetzung der anaeroben Ammoniumoxidation sein, bei der die konfokale Ramanmikroskopie voraussichtlich einen wichtigen Beitrag leisten wird.

Melaninverteilung: Das Potenzial der eingesetzten Messtechnik wird darüber hinaus durch die Ergebnisse der Zellkulturmessungen bestätigt. Die vorgestellten Messungen zeigen die Möglichkeit zur Überprüfung der Melaninproduktion und auch den Test verschiedener Methoden zum Einfrieren lebender Zellen. Nach einem Einfriervorgang setzte die Melaninproduktion der Melanozyten nicht wieder ein, was innerhalb weniger Stunden mittels konfokaler Ramanmikroskopie getestet und eindeutig nachgewiesen werden konnte. Da murine Melanozyten sowie Melanomzellen zur Verfügung standen, konnten darüber hinaus die Unterschiede zwischen beiden Zelltypen untersucht werden. Diese schlugen sich insbesondere in einem veränderten Melaninsignal nieder sowie in der Möglichkeit, die Melanomzellen auch auf Zellsignale hin zu analysieren, da diese eine geringere Melaninproduktion zeigten.

An melaninproduzierenden Zellkulturen konnte die Melaninverteilung innerhalb der Zellen dreidimensional dargestellt werden. Dies erlaubt nicht nur die Überprüfung der Me-

laninsynthese, sondern auch die Aufklärung ihrer Antwort auf vorherige Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Die Kombination aus UV-Bestrahlung und anschließender ramanmikroskopischer Untersuchung gestattet die gezielte Untersuchung der Frage, welche Wellenlänge und welche Lichtdosis die Melaninsynthese am besten anregen. Diese Experimente können in Zukunft wichtige Informationen über die optischen Eigenschaften der menschlichen Haut liefern.

Zusammenfassend: Die konfokale Ramanmikroskopie wurde erfolgreich in zwei ausgewählten Bereichen der Life Sciences eingesetzt. So wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit Bakterien der biologischen Abwasserreinigung analysiert sowie melaninproduzierende Zellkulturen. Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass sich sowohl abwasserrelevante Bakterien als auch die Verteilung von Melanin innerhalb der Zelle ramanmikroskopisch erfolgreich untersuchen lassen. Besonders vielversprechend erscheint der weitere Aufbau der spektralen Datenbank für abwasserrelevante Bakterien, der äußerst gewinnbringend zur Optimierung des biologischen Abwasserreinigungsverfahrens beitragen wird. Die Grenzen dieser experimentellen Methode liegen vor allem in den langen Messzeiten und in den benötigten Konzentrationen der untersuchten Substanzen. Da nur ein mikroskopisch kleines Volumen vermessen wird, muss einerseits die Probe abgerastert werden, was lange Messzeiten erfordert. Andererseits wird dadurch nur eine begrenzte Anzahl von Molekülen analysiert, sodass der konfokalen Ramanmikroskopie eine Konzentrationsbegrenzung gesetzt ist. Insgesamt ist dennoch damit zu rechnen, dass die vorgestellte Messtechnik weitere Einsatzgebiete erschließen wird. Speziell im Bereich biologisch relevanter Fragestellungen wird sich die konfokale Ramanmikroskopie noch weiter ausbreiten, da sie komplexe biologische Systeme analysieren kann, ohne sie während der Messung zu beeinflussen oder gar zu zerstören.

Anhang A

Kulturmedien

LB Medium für <i>E. Coli</i>	
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
pH-Wert	7,0±0,2

Tabelle A.1: LB-Medium für *E. Coli*

Medium 1 (Nähragar) für <i>Bacillus</i>	
Pepton	5 g/l
Fleischextrakt	3 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	7,0
für <i>Bacillus</i> + MnSO ₄	10 mg

Tabelle A.2: Medium 1 (Nähragar) für *Bacillus*

Medium 92 für <i>Staphylococcus cohnii</i>	
Trypticase soy broth	30 g/l
Hefeextrakt	3 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	7,0-7,2

Tabelle A.3: Medium 92 für *Staphylococcus cohnii*

Medium 514 (Marine broth (DIFCO 2216)) für <i>Planctomyces maris</i>	
Bacto Pepton	5 g/l
Bacto Hefeextrakt	1 g/l
Fe(III) Citrat	0,1 g/l
NaCl	19,45 g/l
MgCl ₂ getrocknet	5,9 g/l
NaCO ₄	3,24 g/l
NaCl ₂	1,8 g/l
KCl	0,55 g/l
Na ₂ CO ₃	0,16 g/l
KBr	0,08 g/l
SrCl ₂	34 mg/l
H ₃ BO ₃	22 mg/l
Na-Silikat	4 mg/l
NaF	2,4 mg/l
(NH ₄)NO ₃	1,6 mg/l
Na ₂ HPO ₄	1,6 mg/l
pH-Wert	7,6±0,2

Tabelle A.4: Medium 514 (Marine broth (DIFCO 2216)) für *Planctomyces maris*

Medium 756 für <i>Nitrobacter hamburgensis</i>	
Hefeextrakt	1,5 g/l
Pepton	1,5 g/l
Na-Pyruvat	0,55 g/l
Spurenelementelösung	1 ml
Stammlösung	100 ml
dest. Wasser	899 ml
pH-Wert	7,4
Stammlösung	
CaCO ₃	0,07 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
dest. Wasser	1 l
Spurenelementelösung	
MnSO ₄ x H ₂ O	33,8 mg/l
H ₃ BO ₃	49,4 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	43,1 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	37,1 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	97,3 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg/l
dest. Wasser	1 l

Tabelle A.5: Medium 756 für *Nitrobacter hamburgensis*

Medium 1a für <i>Nitrosomonas</i>	
NH ₄ Cl	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,3 mM
KCl	1,0 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 mM
NaCl	10 mM
Spurenelementlösung	1,0 mM
Kresolrotlösung	1,0 mM
Spurenelementlösung	
MnSO ₄	0,02 mM
H ₃ BO ₃	0,8 mM
ZnSO ₄	0,15 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,03 mM
FeSO ₄	3,5 mM
CuSO ₄	0,1 mM
HCl	0,025 N
Kresolrotlösung	
Kresolrot	500 mg
außerdem	1 l 0,01 N HCl

Tabelle A.6: Medium 1a für *Nitrosomonas*

PBS	
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,4 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
pH-Wert	7,4

Tabelle A.7: Rezept für PBS

0,25 %-ige Trypsinlösung	
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,4 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
EDTA	1 g/l
Trypsin	2,5 g/l
pH-Wert	7,4

Tabelle A.8: Rezept für 0,25 %-ige Trypsinlösung

R2A-Agar	
Hefeextrakt	0,5 g/l
Proteose-Pepton	0,5 g/l
Caseinhydrolysat	0,5 g/l
Glucose	0,5 g/l
Stärke löslich	0,5 g/l
Natriumpyruvat	0,3 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g/l
Magnesiumsulfat	0,05 g/l
Agar-Agar	12 g/l

Tabelle A.9: Rezept für R2A-Agar

Anhang B

Technische Daten

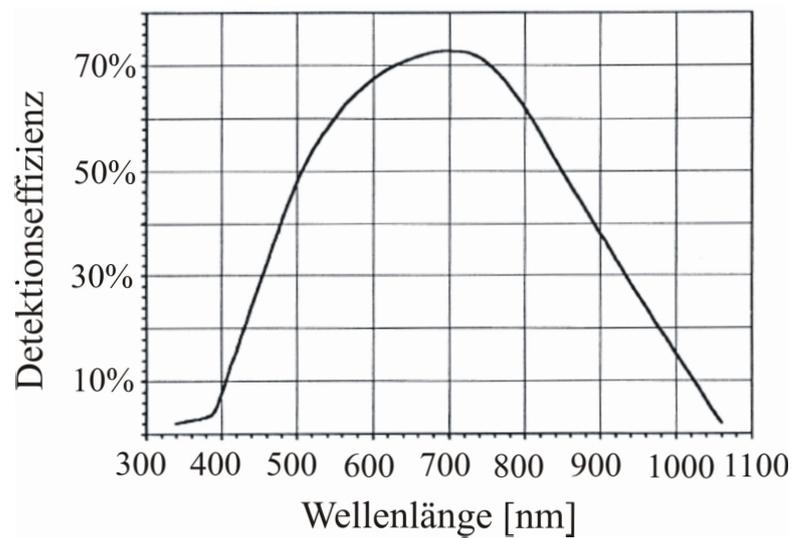


Abbildung B.1: Detektionseffizienz der eingesetzten Avalanche Photodiode

Avalanche Photodiode	
Typ	SPCM-AQR
Durchmesser der aktiven Zone	0,17-0,18 mm
Effizienz	typ. 70 % bei 630 nm
Dunkelstrom	typ. 50 Zähler pro Sekunde
Arbeitstemperatur	5-40°C

Tabelle B.1: Technische Daten der Avalanche Photodiode

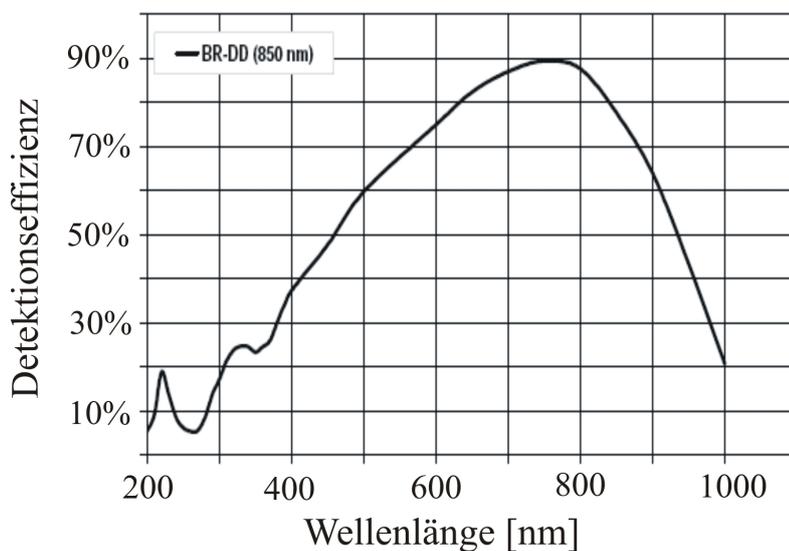


Abbildung B.2: Detektionseffizienz der CCD-Kamera DU401-BR-DD von Andor bei -100°C

CCD-Kamera	
Hersteller	Andor
Typ	rückseitengedünnt, deep-depletion
Aktive Pixel	1024 x 128
Pixelbreite	$26\ \mu\text{m} \cdot 26\ \mu\text{m}$
Dynamik	16 Bit
Systemrauschen	typ. $5\ \text{e}^-$ bei 31 kHz typ. $22\ \text{e}^-$ bei 1 MHz
Dunkelstrom	$216\ \frac{\text{e}^-}{\text{Pixel}\cdot\text{Stunde}}$ bei -90°C
Spektrale Auflösung	$0,28\ \text{nm}$ für das $600\ \frac{\text{Striche}}{\text{mm}}$ -Gitter
Arbeitstemperatur	-70°C

Tabelle B.2: Technische Daten der CCD-Kamera

Kooperationen

- **Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik, Abteilung Umweltbiotechnologie, Universität Hannover** (Prof. Dr. Dr. Sabine Kunst):
Etablierung und Präparation der Biofilme und ihre Vorbereitung für die Messungen am konfokalen Ramanmikroskop:
 - Dipl.- Biol. Tobias Gaul
 - Dipl.- Ing. Ilona Wesoly
- **School of biological sciences, Universität Auckland, Neuseeland** (Dr. Susan Turner):
Bereitstellung zweier Reinkulturen von *Acidovorax temperans*
- **Biozentrum Klein Flottbek, Abteilung Mikrobiologie, Universität Hamburg** (Dr. Andreas Pommerening-Röser, PD Dr. Stefan Schmidt):
Bereitstellung verschiedener *Nitrosomonas*-Stämme
- **Environmental Biotechnology, Delft, University of Technology, Niederlande** (Prof. Dr. Mark van Loosdrecht):
Hochangereicherte Kultur von *Brocadia Anammoxidans*

Abbildungsverzeichnis

1.1	Wechselwirkungsprozesse zwischen Licht und Materie	9
1.2	Das konfokale Prinzip	14
2.1	Entstehung eines Biofilms auf einem festen Substratum	20
2.2	Schematische Darstellung der anaeroben Ammoniumoxidation	22
2.3	Der natürliche Stickstoffkreislauf mit Anammox	23
2.4	Phylogenetische Beziehungen von Anammoxbakterien verglichen mit aeroben Ammoniumoxidierern	24
2.5	Aufbau der menschlichen Haut	26
2.6	Melanintransport	28
3.1	Aufbau des konfokalen Ramanmikroskops CRM200	33
4.1	Anammoxspektrum hintergrund- und grundlinienkorrigiert	47
4.2	Auswirkung der Glättung mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters	48
4.3	Euklidische Distanz zwischen zwei Spektren	55
5.1	Axiale Auflösung bei Verwendung des Wasserimmersinsobjektives	61
5.2	Axiale Auflösung bei Verwendung des Ölimmersinsobjektives	62
5.3	Laserleistung auf der Probe in Abhängigkeit der Stellung der Mikrometerschraube	63

5.4	Probenanordnung mit Bakterientropfen	65
5.5	Ramanspektrum von <i>Escherichia Coli</i>	67
5.6	Zellteilung von <i>E. Coli</i>	68
5.7	Tiefenscan eines <i>Bacillus subtilis</i> -Clusters	68
5.8	Messungen mit verschiedenen langen Belichtungszeiten an <i>Bacillus subtilis</i>	69
5.9	Ramanspektren von <i>Bacillus subtilis</i> - Vergleich zwischen einer frischen Bakterienprobe und einer autoklavierten Probe	70
5.10	Spektrenvergleich zwischen <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus pumilus</i>	71
5.11	Ramanspektren von <i>Staphylococcus cohnii</i>	72
5.12	Ramanspektren von <i>Planctomyces maris</i>	73
5.13	Vergleich der Ramanspektren des isolierten Anammoxbakteriums mit dem aus der hochangereicherten Kultur	76
5.14	Analyse von Anammoxkugelkolonien	78
5.15	Vergleich der Ramanspektren der unterschiedlichen Nitrosomonasstämme	80
5.16	Dendrogramm verschiedener <i>Nitrosomonas</i> -Stämme	81
5.17	Ausbleichen der Ramansignale von <i>Nitrosomonas eutropha</i> 57 und zufäl- lige optische Pinzette	82
5.18	Ramanspektren von <i>Nitrobacter hamburgensis</i> in verschiedenen Wachs- tumsstadien	84
5.19	Ramanspektren von <i>Acidovorax temperans</i> Hn und <i>Acidovorax temper-</i> <i>ans</i> Hp auf R2A-Agar und auf Nähragar	87
5.20	Ramanspektren von <i>Acidovorax temperans</i> Hn und <i>Acidovorax temper-</i> <i>ans</i> Hp in Flüssigkultur	88
5.21	Dendrogramm aller untersuchten Bakterien	92
5.22	Tiefenscan durch eine rötliche Flocke aus dem SBR2	94
5.23	Messflecken aus SBR-Proben	96

5.24	APD- und CCD-Bilder einer SBR-Biofilmprobe	98
6.1	Kultur aus Granulosazellen	101
6.2	Vergleich der Ramanspektren verschiedener Zelllinien	102
6.3	Melan a-Zellen: Bild aus der Köhlerbeleuchtung und Aufnahme der APD	103
6.4	Vergleich von synthetischem Melanin und <i>Sepia officinalis</i>	104
6.5	APD-Aufnahme einer Melanozytenkultur	106
6.6	Melaninsignale aus einer Melanozytenkultur	107
6.7	Schnitte durch einen Melanozyten	108
6.8	Reproduktionsmessungen an einer Zelle	109
6.9	Ramanspektrum aus einer Melan a-Zelle	110
6.10	Melan a-Zellstrukturen	111
6.11	Messung an murinen Melanomzellen	112
6.12	Intensitätsverteilung zweier Ramanbanden in murinen Melanomzellen . .	113
6.13	Ramanspektren von murinen Melanomzellen	116
B.1	Detektionseffizienz der eingesetzten Avalanche Photodiode	127
B.2	Detektionseffizienz der CCD-Kamera DU401-BR-DD von Andor bei - 100°C	128

Literaturverzeichnis

- [1] SZEWZYK, U ; SZEWZYK, R: Biofilme - die etwas andere Lebensweise. In: *BIO-Spektrum* 9. Jahrgang (2003), 3, S. 253–255
- [2] LEWANDOWSKI, Z ; WEBB, D ; HAMILTON, M ; HARKIN, G: Quantifying Biofilm Structure. In: *Water Science and Technology* 39 (1999), Nr. 7, S. 71–76
- [3] OKABE, S ; NAITOH, H ; SATOH, H ; WATANABE, Y: Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes. In: *Water Science and Technology* 46 (2002), Nr. 1-2, S. 233–241
- [4] NIELSEN, PH ; NIELSEN, JL: Microautoradiography: recent advances within the studies of the ecophysiology of bacteria in biofilms. In: *Water Science and Technology* 52 (2005), Nr. 7, S. 187–194
- [5] OKABE, S ; WATANABE, Y: Structure and function of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. In: *Water Science and Technology* 42 (2000), Nr. 12, S. 21–32
- [6] MAQUELIN, K ; CHOO-SMITH, LP ; ENDTZ, HP ; BRUINING, HA ; PUPPELS, GJ: Rapid Identification of *Candida* Species by Confocal Raman Microspectroscopy. In: *Journal of Clinical Microbiology* 40 (2002), February, Nr. 2, S. 594–600
- [7] SCHMID, MC ; MAAS, B ; DAPENA, A ; PAS-SCHOONEN, K van d. ; VOSSENBERG, J van d. ; KARTAL, B ; NIFTRIK, L van ; SCHMIDT, I ; CIRPUS, I ; KUENEN, JG ; WAGNER, M ; DAMSTÉ, JS S. ; KUYPERS, M ; REVSBECH, NP ; MENDEZ, R ; JETTEN, MSM ; STROUS, M: Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), April, Nr. 4, S. 1677–1684
- [8] CASPERS, P: *In vivo skin characterization by confocal Raman microspectroscopy*. Rotterdam, Diss., 2003
- [9] BASHKATOV, AN ; GENINA, EA ; KOCHUBEY, VI ; TUCHIN, VV: Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000nm. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 38 (2005), S. 2543–2555

- [10] PUPPELS, GJ ; MUL, FFM de ; OTTO, C ; GREVE, J ; ROBERT-NICOUD, M ; ARNDT-JOVIN, DJ ; JOVIN, TM: Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. In: *Nature* 347 (1990), September, S. 301–303
- [11] HUANG, ZW ; LUI, H ; CHEN, XK ; ALAJLAN, A ; MCLEAN, DI ; ZENG, HS: Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. In: *Journal of biomedical optics* 9 (2004), Nov-Dec, Nr. 6, S. 1198–1205
- [12] YAMASHITA, T ; KUWAHARA, T ; GONZALEZ, S ; TAKAHASHI, M: Non-Invasive Visualization of Melanin and Melanocytes by Reflectance-Mode Confocal Microscopy. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 124 (2005), Januar, Nr. 1, S. 235–240
- [13] PUPPELS, GJ: *Confocal Raman Microspectroscopy: a new look at cells and chromosomes*. Enschede, Univ. Twente, Proefschr., 1991
- [14] DEMTRÖDER, Wolfgang: *Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation*. 3. Berlin : Springer, 2003 (Advanced texts in physics)
- [15] Kapitel 29. In: MASON, WT: *Fluorescent and luminescent probes*. 2. 1999, S. 377–406
- [16] GESSNER, R ; RÖSCH, P ; KIEFER, W ; POPP, J: Raman Spectroscopy Investigation of Biological Materials by Use of Etched and Silver Coated Glass Fiber Tips. In: *Biopolymers (Biospectroscopy)* 67 (2002), S. 327–330
- [17] PETRY, R ; SCHMITT, M ; POPP, J: Raman Spectroscopy - A prospective Tool in the Life Sciences. In: *ChemPhysChem* 4 (2003), Nr. 1, S. 14–30
- [18] BELL, SEJ ; MACKLE, JN ; SIRIMUTHU, NMS: Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid - towards rapid anthrax endospore detection. In: *The Analyst* 130 (2005), S. 545–549
- [19] ZHANG, X ; YOUNG, MA ; LYANDRES, O ; DUYN, RP V.: Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. In: *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005), S. 4484–4489
- [20] URLAUB, E ; POPP, J ; KIEFER, W ; BRINGMANN, G ; KOPPLER, D ; SCHNEIDER, H ; ZIMMERMANN, U ; SCHRADER, B: FT-Raman Investigation of Alkaloids in the Liana *Ancistrocladus heyneanus*. In: *Biospectroscopy* 4 (1998), S. 113–120
- [21] JEHLICKA, J ; VILLAR, SE J. ; EDWARDS, HGM: Fourier transform Raman spectra of Czech and Moravian fossil resins from freshwater sediments. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 35 (2004), S. 761–767
- [22] SCHULZ, H ; BARANSKA, M ; BARANSKI, R: Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis. In: *Biopolymers* 77 (2005), S. 212–221

- [23] BARANSKA, M ; SCHULZ, H ; SIUDA, R ; STREHLE, MA ; RÖSCH, P ; POPP, J ; JOUBERT, E ; MANLEY, M: Quality Control of Harpagophytum procumbens and Its Related Phytopharmaceutical Products by Means of NIR-FT-Raman Spectroscopy. In: *Biopolymers* 77 (2005), S. 1–8
- [24] DIPPEL, B ; MUELLER, RT ; PINGSMANN, A ; SCHRADER, B: Composition, Constitution, and Interaction of Bone with Hydroxyapatite Coatings Determined by FT Raman Microscopy. In: *Biospectroscopy* 4 (1998), S. 403–412
- [25] HÄNNINEN, Pekka: *New Techniques in Confocal Microscopy*. Turku, Diss., August 1995
- [26] SHUMAN, H ; MURRAY, JM ; DILULLO, C: Confocal Microscopy: An Overview. In: *BioTechniques* 7 (1989), Nr. 2, S. 154–163
- [27] LEWIS, IR ; EDWARDS, H: *Practical Spectroscopy Seris*. Bd. 28: *Handbook of Raman Spectroscopy*. New York, Basel, 2001
- [28] WILHELM, S ; GRÖBLER, B ; GLUCH, M ; HEINZ, H: *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen*. Jena: Carl Zeiss Jena
- [29] CARLSSON, K ; ASLUND, N: Confocal Imaging for 3-D digital microscopy. In: *Applied Optics* 26 (1987), August, Nr. 16, S. 3232–3238
- [30] Kapitel 1. In: WEBB, RH: *Methods in Enzymology*. Bd. 307: *Theoretical Basis of Confocal Microscopy*. Academic Press, 1999, S. 3–20
- [31] FLEMMING, H-C ; WINGENDER, J: Was Biofilme zusammenhält. In: *Chemie in unserer Zeit* 36. Jahrgang (2002), Nr. 1, S. 30–42
- [32] MUDRACK, K ; KUNST, S: *Biologie der Abwasserreinigung*. 5. Ausgabe. Heidelberg Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 2003
- [33] BRODA, E: Two kinds of lithotrophs missing in nature. In: *Zeitschrift für Allgemeine Biologie* 17 (1977), Nr. 6, S. 491–493
- [34] MULDER, A ; GRAAF, AA van d. ; ROBERTSON, LA ; KUENEN, JG: Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. In: *FEMS Microbiological Ecology* 16 (1995), S. 177–184
- [35] STROUS, M ; FUERST, JA ; KRAMER, EHM. ; LOGEMANN, S ; MUYZER, G ; PAS-SCHOONEN, KT van d. ; WEBB, R ; KUENEN, JG ; JETTEN, MSM: Missing lithotroph identified as new planctomycete. In: *Nature* 400 (1999), July, S. 446–449
- [36] JETTEN, MSM ; CIRPUS, I ; KARTAL, B ; NIFTRIK, L van ; PAS-SCHOONEN, KT van d. ; SLIEKERS, O ; HAAIJER, S ; START, W van d. ; SCHMID, M ; VOSSENBERG, J van d. ; SCHMIDT, I ; HARHANGI, H ; LOOSDRECHT, M van ; KUENEN,

- J G. ; CAMP, H O. ; STROUS, M: 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. In: *Biochemical Society* (2005), S. 119–123
- [37] GRAAF, AA van d. ; BRUJN, P de ; ROBERTSON, LA ; JETTEN, MSM ; KUENEN, JG: Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. In: *Microbiology* 143 (1997), S. 2415–2421
- [38] <http://www.anammox.com>. Dezember 2005
- [39] STROUS, M ; HEIJNEN, JJ ; KUENEN, JG ; JETTEN, MSM: The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. In: *Applied Microbiological Biotechnology* 50 (1998), S. 589–596
- [40] DAMSTÉ, JSS ; STROUS, M ; RIJPSRA, WIC ; HOPMAN, EC ; GEENEVASEN, JAJ ; DUIN, ACT V. ; NIFTRIK, LA V. ; JETTEN, MSM: Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. In: *Nature* 419 (2002), S. 708–712
- [41] KADEKARO, AL ; KAVANAGH, RJ ; WAKAMATSU, K ; IO, S ; PIPITONE, MA ; ABDEL-MALEK, ZA: Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who Will Win the Final Round? In: *Pigment Cell Research* 16 (2003), S. 434–447
- [42] <http://www.bge.de/bge/m100/bild1.jpg>. Dezember 2005
- [43] STRAHLENSCHUTZ, Bundesamt für: <http://www.bfs.de/bfs?setlang=de>. Dezember 2005
- [44] JIMBOW, K ; QUEVEDO, MC ; FITZPATRICK, TB ; SZABO, G: Some Aspects of Melanin Biology: 1950-1975. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 67 (1976), Nr. 1, S. 72–89
- [45] TSATMALI, M ; ANCANS, J ; THODY, AJ: Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50 (2002), Nr. 2, S. 125–133
- [46] <http://www.humangenetik.uni-luebeck.de/Media/abb2.jpg>. Dezember 2005
- [47] RÖSCH, P ; HARZ, M ; SCHMITT, M ; PESCHKE, K-D ; RONNEBERGER, O ; BURKHARDT, H ; MOTZKUS, H-W ; LANKERS, M ; HOFERS, S ; THIELE, H ; POPP, J: Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), March, Nr. 3, S. 1626–1637
- [48] HUTSEBAUT, D ; MAQUELIN, K ; VOS, P D. ; VANDENABEELE, P ; MOENS, L ; PUPPELS, GJ: Effect of Culture Conditions on the Achievable Taxonomic Resolution of Raman Spectroscopy Disclosed by Three Bacillus Species. In: *Anal. Chem.* 76 (2004), November, Nr. 21, S. 6274–6281

- [49] CHAN, JW ; ESPOSITO, AP ; TALLEY, CE ; HOLLARS, CW ; LANE, SM ; HUSER, T: Reagentless Identification of Single Bacteria Spores in Aqueous Solution by Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), February, Nr. 3, S. 599–603
- [50] XIE, C ; MACE, J ; DINNO, MA ; LI, YQ ; TANG, W ; NEWTON, RJ ; GEMPERLINE, PJ: Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 77 (2005), July, Nr. 14, S. 4390–4297
- [51] RÖSCH, P ; SCHMITT, M ; KIEFER, W ; POPP, J: The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. In: *Journal of Molecular Structure* 661-662 (2003), S. 363–369
- [52] BERGER, AJ ; ZHU, Q: Identification of oral bacteria by Raman microspectroscopy. In: *Journal of Modern Optics* 50 (2003), Nr. 15-17, S. 2375–2380
- [53] MAQUELIN, K ; KIRSCHNER, C ; CHOO-SMITH, L-P ; BRAAK, N van d. ; ENDTZ, HP ; NAUMANN, D ; PUPPELS, GJ: Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. In: *Journal of Microbiological Methods* 51 (2002), S. 255–271
- [54] CHOO-SMITH, LP ; MAQUELIN, K ; VREESWIJK, T van ; BRUINING, HA ; PUPPELS, GJ ; THI, NA N. ; KIRSCHNER, C ; NAUMANN, D ; AMI, D ; VILLA, AM ; ORSINI, F ; DOGLIA, SM ; LAMFARRAJ, H ; SOCKALINGUM, GD ; MANFAIT, M ; ALLOUCH, P ; ENDTZ, HP: Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001), April, Nr. 4, S. 1461–1469
- [55] NOGUEIRA, R ; ELENTER, D ; BRITO, A ; MELO, LF ; WAGNER, M ; MORGENROTH, E: Evaluating heterotrophic growth in a nitrifying biofilm reactor using fluorescence in situ hybridization and mathematical modeling. In: *Water Science and Technology* 52 (2005), Nr. 7, S. 135–141
- [56] OKABE, S ; KINDAICHI, T ; NAKAMURA, Y ; ITO, T: Eco-physiology of autotrophic nitrifying biofilms. In: *Water Science and Technology* 52 (2005), Nr. 7, S. 225–232
- [57] JANG, A ; OKABE, S ; WATANABE, Y ; KIM, IS ; BISHOP, PL: Measurement of growth rate of ammonia oxidizing bacteria in partially submerged rotating biological contactor by fluorescent in situ hybridization (FISH). In: *Journal of Environmental Engineering and Science* 4 (2005), September, Nr. 5, S. 413–420
- [58] WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH: *Confocal Raman Microscope CRM 200*. 2001

- [59] PÄTZOLD, R.: *Laserbasierte Online Analytik umweltrelevanter Stoffe. Einsatz und Vergleich zweier Methoden*. Hannover, Dissertation, 2004
- [60] PARDO, I.: *Spektroskopische Untersuchungen zur Auswirkung von UV-Licht auf murine Melanozyten*. Hannover, Diplomarbeit, März 2005
- [61] *Kapitel 32*. In: WOLTHUIS, R ; SCHUT, TC B. ; CASPERS, PJ ; BUSCHMAN, HPJ ; RÖMER, TJ ; BRUINING, HA ; PUPPELS, GJ: *Raman Spectroscopic Methods for In Vitro and In Vivo Tissue Characterization*. 2. Academic Press, 1999 (Fluorescent and luminescent probes for biological activity), S. 433–454
- [62] HARZ, M ; RÖSCH, P ; PESCHKE, K-D ; RONNEBEGER, O ; BURKHARDT, H ; POPP, J: Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. In: *The Analyst* 130 (2005), S. 1543–1550
- [63] RAY, KG ; MCCREERY, RL: Simplified Calibration of Instrument Response Function for Raman Spectrometers Based on Luminescent Intensity Standards. In: *Applied Spectroscopy* 51 (1997), Nr. 1, S. 108–116
- [64] FROST, KJ ; MCCREERY, RL: Calibration of Raman Spectrometer Instrument Response Function with Luminescence Standards: An Update. In: *Applied Spectroscopy* 52 (1998), Nr. 12, S. 1614–1618
- [65] *Kapitel Photometric Standards for Raman Spectroscopy*. In: MCCREERY, RL: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Wiley, 2002
- [66] MANDAL, O: *Erstellung und Validierung einer kombinierten NIR/Raman-Bibliothek zur Identitätskontrolle organischer und anorganischer Substanzen*. Wuppertal, Dissertation, 1999
- [67] BRUKER: *opus - Spektroskopiesoftware IDENT Manual*. Version 5.5. Ettlingen: Bruker Optik GmbH, 2004
- [68] PUPPELS, GJ ; OLMINKHOF, JHF ; SEGERSNOLTEN, GMJ ; OTTO, C ; MUL, FFM de ; GREVE, J: Laser irradiation and Raman Spectroscopy of Single Living Cells and Chromosomes - Sample Degradation occurs with 514.5nm but not with 660nm laser-light. In: *Experimental Cell Research* 195 (1991), August, Nr. 2, S. 361–367
- [69] GAUL, T: *Persönliche Kommunikation*. 2005
- [70] PUPPELS, GJ ; GARRITSEN, HSP ; SEGERSNOLTEN, GMJ ; MUL, FFM de ; GREVE, J: Raman Microspectroscopic approach to the study of human granulocytes. In: *Biophysical Journal* 60 (1991), November, Nr. 5, S. 1046–1056

- [71] CAPOZZI, V ; PERNA, G ; GALLONE, A ; BIAGI, PF ; CARMONE, P ; FRATELLO, A ; GUIDA, G ; ZANNA, P ; CICERO, R: Raman and optical spectroscopy of eumelanin films. In: *Journal of molecular structure* 744-747 (2005), S. 717–721
- [72] KREBS, R ; BARTELS, M ; MEINHARDT, M ; LUBATSCHOWSKI, H ; ANDERS, A: Characterization of Optical Structures in Biological Tissue by Means of UV-Optoacoustics. In: *Laser Physics* 13 (2003), Nr. 5, S. 724–729
- [73] PROVANCE, DW ; WEI, M ; IPE, V ; MERCER, JA: Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. In: *Cell Biology* 93 (1996), Dezember, S. 14554–14558
- [74] KOLLIAS, N ; BAQER, AH: Absorption Mechanisms of Human Melanin in the Visible, 400 - 720nm. In: *Journal of Investigative Dermatology* 89 (1987), Oktober, Nr. 4, S. 384–388
- [75] POWELL, BJ ; BARUAH, T ; BERNSTEIN, N ; BRAKE, K ; MCKENZIE, RH ; MERRIDITH, P ; PEDERSON, MR: A first-principles density-functional calculation of the electronic and vibrational structure of the key melanin monomers. In: *Journal of Chemical Physics* 120 (2004), May, Nr. 18, S. 8608–8615
- [76] TFAYLI, A ; PIOT, O ; DURLACH, A ; BERNARD, P ; MANFAIT, M: Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1724 (2005), S. 262–269
- [77] IBACH, W ; HOLLRICHTER, O: *High Resolution Optical Microscopy*. WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, 2002

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Maike Keuntje
geboren	am 24.02.1978 in Seesen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

WERDEGANG

seit 04/06	Fachredakteurin Physik beim Bildungshaus Schulbuchverlage Westermann Schroedel Diesterweg Schöningh Winklers GmbH
09/02 - 12/05	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biophysik der Universität Hannover
06/2002	Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
1997 - 2002	Studium des gymnasialen Lehramts (Mathematik und Physik) an der Universität Hannover
1990 - 1997	Jacobson-Gymnasium Seesen
1988 - 1990	Orientierungsstufe Seesen
1984 - 1988	Grundschule Seesen

STIPENDIEN

07/03 - 08/05	Promotionsstipendium des Ev. Studienwerks Villigst e.V.
09/02 - 06/03	Stipendium der Graduiertenförderung an der Universität Hannover

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN UND PRAKTIKA

01/06 - 03/06	Redaktionelles Praktikum beim Bildungshaus Schulbuchverlage Westermann Schroedel Diesterweg Schönigh Winklers GmbH
seit 11/04	Mitarbeit beim Online-Buchmagazin www.buchwurm.info
04/00 - 07/04	Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft im physikalischen Praktikum der Medizinischen Hochschule Hannover bzw. im Institut für Mathematik der Universität Hannover
09/00	Fachpraktikum in Physik an der Goetheschule Hannover
07/00 - 08/00	Praktikum in der Gravitationswellengruppe des Instituts für Physik und Astronomie der Universität Glasgow, Schottland
09/98 - 10/98	Allgemeines Schulpraktikum in den Fächern Mathematik und Physik am Jacobson-Gymnasium Seesen
02/98 - 03/98	Sozialpraktikum bei der Evangelischen Jugend der Propstei Seesen

Publikationen

Publikationen

Pätzold R, Keuntje M, Anders-von Ahlften A, *A new approach to non-destructive analysis of microbial communities by confocal Raman microscopy*, submitted to Applied Environmental Microbiology (2005)

Keuntje M, Pätzold R, Meinhardt M, Pardo I, Anders A, *Noninvasive detection of the melanin distribution in murine melanocyte cell cultures depending on previous UV-exposure*, to be published in Biophysical Journal (2006)

Keuntje M, *Ozon - Stratosphärische Schutzhaut der Erde und troposphärisches Treibhausgas*, in: Haut - zwischen Innen und Außen, Organ. Fläche. Diskurs, Hrsg.: Villigster AG Körperstudien, Villigster Perspektiven (2006)

Vorträge

Konfokale Ramanmikroskopie zur nichtinvasiven Mikroorganismenbestimmung in ANAMMOX-Biofilmen, DPG-Frühjahrstagung, München (22. März 2004)

Konfokale Ramanmikroskopie als Methode zum online-Bakteriennachweis in der biologischen Abwasserreinigung, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (9. März 2005)

Poster

Pätzold R, Keuntje M, Anders A, *Online Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie*, 15. Norddeutscher Lasertag, Hamburg, Deutschland (8. Dezember 2004)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich Frau Prof. Dr. Angelika Anders-von Ahlften für die Betreuung des interessanten und umfassenden Promotionsthemas danken sowie für ihr freundliches und engagiertes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Albert Kolb für die Übernahme des Korreferates und sein damit verbundenes Interesse an meiner Arbeit danken sowie für die gute Zusammenarbeit mit ihm und seiner Arbeitsgruppe.

Tobias Gaul und Ilona Wesoly gilt mein Dank für die enge und intensive Kooperation und die Beantwortung vieler Fragen aus dem Bereich der Mikrobiologie und Abwassertechnik. Auch danke ich ihnen für die nette Zusammenarbeit und für die Überlassung zahlreicher Biofilmproben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Prof. Dr. Dr. Sabine Kunst danken für ihre Unterstützung unseres Forschungsvorhabens und die Möglichkeit, ihr Labor für die Isolation von Anammoxbakterien zu nutzen.

Heidi Bliedung und Felicitas Schöbel waren mir bei der Anzucht der Bakterienstämme eine sehr große Hilfe, die ich nicht missen möchte und für die ich ihnen sehr dankbar bin. Ein Dankeschön geht darüber hinaus an Inés Pardo für die Kultivierung der Hautzellkulturen und auch an Sabrina Schlie sowie Willem Bintig für ihre zuverlässige Unterstützung bei der Zellzüchtung.

Herrn Dr. Andreas Pommerening-Röser und Frau Dr. Susan Turner möchte ich für die Bereitstellung der Bakterienreinkulturen danken und auch für ihre Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, die für viele neue Anregungen gesorgt haben und damit diese Promotion sehr weitergebracht haben.

Herrn Dr. Jörg Müller von der Firma WITec möchte ich für seine fachliche und technische Unterstützung bei der Arbeit am konfokalen Ramanmikroskop sowie die Beantwortung meiner telefonischen Anfragen danken.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik für die nette und

herzliche Arbeitsatmosphäre danken, die auch in stressigen Phasen dafür gesorgt hat, dass ich mich im Institut sehr wohl gefühlt habe. Insbesondere möchte ich Dr. Ralf Pätzold für die Zusammenarbeit am konfokalen Ramanmikroskop und die Klärung fachlicher Fragen danken sowie für die Hilfe in technischen Angelegenheiten. Auch Harald Hake war mir eine große Hilfe im Kampf mit und oft auch gegen den Computer. Dr. Anaclet Ngezahayo gilt mein Dank für Anregungen aus dem Bereich der Zellbiologie, die besonders die Messungen der Zellkulturen sehr bereichert haben. Dr. Carsten Zeilinger danke ich für die Überlassung der *E. Coli*-Proben.

Finanziell wurde meine Promotion gefördert durch die Graduiertenförderung und das Evangelische Studienwerk Villigst e.V.. Beiden Förderwerken möchte ich mein herzliches Dankeschön aussprechen für die vielseitige Unterstützung, die insbesondere in Villigst weit über die rein finanzielle Hilfe hinaus ging.

Meinen Eltern gilt mein ganz großer Dank für ihre jahrelange finanzielle und ideelle Unterstützung. Nach anfänglichen Zweifeln haben sie an mich geglaubt und darauf vertraut, dass ich meinen Weg finde. Diese Unterstützung war und ist mir sehr wichtig. In jeder Situation konnte ich immer auf meine Eltern zählen, worum auch immer es ging.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Stefan dafür danken, dass er mich stets ermuntert und ermutigt hat, obwohl die Zeit meiner Promotion für ihn in vielerlei Hinsicht sicherlich ebenfalls nicht leicht gewesen ist. Für seine Ruhe und Gelassenheit in zahlreichen Situationen und seine nie nachlassende Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele möchte ich ihm an dieser Stelle danke sagen.

Hannover, im Dezember 2005