

**Entwicklung von faseroptischen Fluoreszenzsensoren für die
Analyse von Biofilmen und deren Mikroumgebung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Jana Schlaugat, M.Sc.

2019

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 19.12.2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zunächst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Scheper** bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion am Institut für Technische Chemie anzufertigen und mir als Doktorvater mit vielen Ideen zur Seite stand.

PD Dr. Sascha Beutel danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank gilt **Dr. Iliyana Pepelanova**, die mir in den letzten Jahren bei Projekt-treffen und bei sämtlichen anderen Fragen zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt **Dr. Christian Ude**. Danke für die ständige Hilfe im Labor, die vielen Ideen und aufmunternden Worte.

Auch möchte ich mich bei **Martina Weiß** besonders bedanken. Ohne dich wären so viele Arbeiten im Labor nicht schnell oder gar nicht möglich gewesen.

Ulrike Dreschel, Cornelia Alic und **Christiane Hellwig** danke ich für die Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Ein großer Dank gilt **Thorleif Hentrop** und **Kai Patzer**. Vielen Dank für die Hilfe bei der Umsetzung und den Aufbau des Sensors. Und noch viel wichtiger: Danke für die zahlreichen Kaffeestunden, die mich vor allem die letzten Monate der Promotion haben durchhalten lassen.

Beim gesamten TCI möchte ich mich für die schöne Atmosphäre bedanken. Insbesondere **Alina, Lisa, Semra, Jan, Lena, Svenja, Taieb** und **Ole** möchte ich für die vielen fachlichen Diskussionen, Gespräche und Aktivitäten danken.

Außerdem möchte ich mich besonders bei meiner Schwester **Julia** bedanken. In meinem zweiten Zuhause konnte ich mich immer wieder ablenken, egal in welcher Phase der Promotion.

Der größte Dank gilt allerdings meinem Freund **Marc**, der mich immer unterstützt egal in welchen Lebenssituationen. Vielen Dank für deine unendliche Geduld und Ruhe.

Für
Sophie, Henri, Carina & Aaron

Kurzfassung

Das Wachstum von Mikroorganismen auf Oberflächen und Grenzflächen im Biofilm ist sehr verbreitet und spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Bereichen wie unter anderem den Materialwissenschaften, der Biomedizin und der Abwasseraufbereitung. Aufgrund der inhomogenen Struktur und der Varianz in den Konsortien der Mikroorganismen stellt die Analyse von Biofilmen allerdings eine große Herausforderung dar. Um eine nicht-invasive online Analyse von Biofilmen zu ermöglichen, wurde ein Fluoreszenzsensor für die Messung der wichtigsten biologischen Fluorophore (Proteine, NADH und Flavin) in Biofilmen entwickelt. Der Sensor bietet die Möglichkeit, kontinuierlich den Stoffwechszustand des Biofilms zu analysieren. Besonders hervorzuheben ist die Messspitze des Sensors, welche einen Durchmesser von 1 mm aufweist und eine Messung auf der Biofilmoberfläche sowie in der Biofilmstruktur ermöglicht. In dieser Arbeit konnten der Messbereich des Sensors und die Langzeitstabilität bestimmt und die Systemtauglichkeit bestätigt werden. Die Anwendung des Sensors in einem Biofilm wurde schrittweise angenähert. Zunächst wurde der Sensor in Zellsuspensionen und in biofilmähnlichen Strukturen eingesetzt. Abschließend wurde die Bildung eines abwasserbasierten Biofilms mit dem entwickelten Sensor analysiert. Als Proof-of-Principle-Experiment bestätigt dies die Funktionalität des Sensors für den Einsatz in der Biofilmanalyse.

Zusätzlich zum Fluoreszenzsensor wurde ein kommerziell erhältliches pH- sowie pO_2 -Sensorsystem auf die Anwendung in Biofilmen übertragen. Hierzu wurde das System in einer biofilmähnlichen Struktur aus Alginate und anschließend in einer mikrobiellen Brennstoffzelle getestet. Beide Sensorsysteme eignen sich für die Anwendung in Biofilmkultivierungen. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die Messungen in einer biofilmähnlichen Struktur maßgeblich von der Diffusionslimitierung beeinflusst werden.

In Kombination bieten die Sensoren die Möglichkeit, nicht-invasive Biofilmanalysen durchzuführen und so Rückschlüsse auf den Zellzustand und die Prozessumgebung zu erhalten. Ein möglicher Einsatzbereich der Sensoren kann die mikrobielle Brennstoffzelle sein, deren Effizienz maßgeblich durch Sauerstoff und den metabolischen Zustand des Biofilms beeinflusst wird.

Schlüsselwörter: Biofilmanalyse, Fluoreszenzsensor, biogene Fluorophore, pH-Sensor, pO_2 -Sensor

Abstract

The growth of microorganisms on surfaces as a biofilm on surfaces is common and plays an important role in various areas such as material science, biomedicine and waste water treatment. The analysis of biofilms represents a significant challenge due to its inhomogeneous structure and a dynamic composition of the microorganism consortia.

In order to enable an online and non-invasive analysis of biofilms, a fluorescence sensor was developed, which facilitates the measurement of the most important biological fluorophores (proteins, NADH and flavins). The sensor thus makes it possible to continuously observe the metabolic state of the biofilm. The developed sensor is characterized by its small diameter of 1 mm at the measuring tip. In this work, the measuring range of the sensor and the longterm stability could be determined and system suitability was confirmed. The intended application of the sensor in biofilms was approached stepwise. Initially, the sensor was used in cell suspensions and in biofilm-like structures. Finally, the formation of a wastewater-based biofilm was monitored using the developed sensor. This demonstrated the functionality of the sensor in the analysis of biofilm growth in a proof-of-principle experiment.

In addition to the fluorescence sensor, the application of a commercially available pH and pO₂ sensor system in biofilm systems was also investigated. For this purpose, the pH and pO₂ sensors were first tested in alginate gels as a model system of a biofilm-like structure and afterwards in a microbial fuel cell. It could be shown that both sensors are suitable for the use in biofilm cultivations, but that the measurement in biofilm structures is significantly influenced by diffusion limitations.

The combination of the fluorescence sensor, the pH and the pO₂ sensors offers the possibility to monitor a biofilm in real-time and to obtain information concerning metabolic state and process microenvironment. One possible application of the sensors can be for the monitoring of microbial fuel cells, whose efficiency is significantly influenced by the presence of oxygen and the metabolic state of the biofilm.

Keywords: Monitoring of biofilms, fluorescence sensor, biogenic fluorophores, pH sensor, pO₂ sensor

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzfassung	III
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung.....	3
3 Theoretischer Hintergrund.....	4
3.1 Biofilme	4
3.1.1 Definition und Eigenschaften	4
3.1.2 Entstehung und Entwicklung.....	5
3.1.3 Bedeutung von Biofilmen für die mikrobielle Brennstoffzelle.....	6
3.1.4 Charakterisierung von Biofilmen	8
3.2 Fluoreszenz.....	10
3.2.1 Grundprinzip.....	10
3.2.2 Intrinsische Fluorophore.....	13
3.2.3 Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses	14
3.3 Einsatz von optischen Sensoren in Biofilmen	15
4 Entwicklung und Charakterisierung des Fluoreszenzensors.....	17
4.1 Anforderungen.....	17
4.2 Allgemeiner Aufbau	18
4.2.1 Exzitations- und Emissionswellenlängen	21
4.3 Prototyp 1	23
4.3.1 Optimierung der Lichteinkopplung	24
4.3.2 Bestimmung des linearen Messbereichs.....	27
4.3.3 Schlussfolgerung	28
4.4 Prototyp 2	29
4.4.1 Aufbau der Messeinheit.....	30
4.4.2 Evaluierung des Sensors.....	37
4.4.3 Bestimmung der Sensitivität.....	44
4.4.4 Bestimmung der Spezifität und Selektivität	46

4.4.5	Vergleich der Fluoreszenz zwischen suspendiertem und immobilisiertem Riboflavin	50
4.5	pH- und pO ₂ -Sensoren	51
4.5.1	Messprinzip und Aufbau	51
4.5.2	Einsatz in Modellbiofilmen	52
5	Anwendung der Sensoren in biologischen Systemen	56
5.1	Anwendung der pO ₂ - und pH-Sensoren in der mikrobiellen Brennstoffzelle ..	56
5.2	Anwendung des Fluoreszenzsensors in verschiedenen biologischen Systemen.....	59
5.2.1	Enzymatische Umsetzung von Pyruvat	59
5.2.2	Einsatz des Sensors in einer Schüttelkolbenkultivierung	61
5.2.3	Induzierte Metabolismusänderung bei Bäckerhefe	66
5.2.4	Einsatz des entwickelten Sensors in der Biofilmmessung	72
6	Zusammenfassung und Ausblick	76
7	Anhang.....	81
7.1	Ergänzende Daten.....	81
7.1.1	Einfluss der LED-Leistung auf die Fluoreszenz in der Schüttelkolbenkultivierung.....	81
7.2	Materialien.....	82
7.2.1	Chemikalienliste	82
7.2.2	Liste verwendeter Software	83
7.2.3	Material- und Geräteliste	84
7.2.4	Kulturmedien und Pufferlösungen.....	86
7.2.5	Verwendete Stämme.....	88
7.3	Aufbau und Funktion des Sensors „Prototyp 2“	89
7.4	Methoden	95
7.4.1	Bestimmung der Exzitations- und Emissionswellenlängen	95
7.4.2	Linsenpositionierung	96
7.4.3	Kalibrationen	96
7.4.4	Einfluss der LED Leistung	97
7.4.5	Einfluss des Umgebungslicht	97
7.4.6	Langzeitstabilität	98
7.4.7	Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit	98
7.4.8	Einfluss der Temperatur	99

7.4.9	Spezifität der Messkanäle	99
7.4.10	Selektivität der Messkanäle	100
7.4.11	Immobilisierung Alginat	101
7.4.12	Vergleich der Fluoreszenz zwischen suspendiertem und immobilisiertem Riboflavin	101
7.4.13	Enzymatische Umsetzung von Pyruvat	101
7.4.14	Biofilmkultivierung in der mikrobiellen Brennstoffzelle	102
7.4.15	Bestimmung der optischen Dichte	102
7.4.16	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> im Schüttelkolben	102
7.4.17	Induzierte Änderung des Metabolismus von suspendierter Bäckerhefe .	103
7.4.18	Induzierte Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe	104
7.4.19	HPLC-Methode	104
7.4.20	GC-Methode	105
7.4.21	Kultivierung eines abwasserbasierten Biofilms	105
7.4.22	Vorbereitung der Polymerfasern	106
7.4.23	Kalibration der pO ₂ -Sensoren	106
7.4.24	Kalibration der pH-Sensoren	106
7.4.25	Messungen des pH- und pO ₂ -Werts in einem Modellbiofilm	107
8	Publikationsliste	108
9	Unterstützende Arbeiten	109
10	Literaturverzeichnis	110
11	Abbildungsverzeichnis	117
12	Tabellenverzeichnis	119
13	Lebenslauf	120

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μm	Mikrometer
A	Analyt
AFM	engl. atomic force microscope, Rasterkraftmikroskop
BSA	Bovines Serumalbumin
CFU	engl.: colony forming unit, koloniebildende Einheit
CLSM	engl.: confocal laser scanning microscopy, konfokale Laserscanningmikroskopie
cm	Zentimeter
EFL	engl.: effective focal length, effektive Brennweite
EM	Emission
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EX	Exzitation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	engl.: fluorescence correlation spectroscopy, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K _{SV}	Stern-Volmer-Konstante
L	Liter
LED	engl.: light emitting diode, Leuchtdiode
MBZ	Mikrobielle Brennstoffzelle
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
N ₂	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NB	nutrient broth
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte

PBS	engl.: phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Q	Quencher
QCM	engl.: quartz crystal microbalance, Quarzkristall-Mikrowaage
q-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
r	Radius
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RSI	Relative Signalintensitäten
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	engl.: synthetic defined
SEM	engl.: scanning electron microscope, Rasterelektronenmikroskop
SFR	engl.: shake flask reader
SMD	engl.: surface-mounted device
SNR	engl.: signal-to-noise ratio, Signal-Rausch-Verhältnis
SPR	engl.: surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
U	Enzymaktivität
V	Volt
w/v	engl.: weight by volume, Gewicht pro Volumen
YFP	engl.: yellow fluorescent protein
YNB	engl.: yeast nitrogen base

1 Einleitung

Der nachhaltigen Stromerzeugung kommt in der heutigen Zeit eine immense Bedeutung zu. Neben der immer größer werdenden Bedeutung der Solar- und Windenergie nimmt auch der Einsatz an Bioenergie mehr und mehr zu. Hier werden immer neue Bereiche erforscht, welche als Energiequelle genutzt werden können. Einer dieser Bereiche ist die mikrobielle Brennstoffzelle. Sie ermöglicht eine Stromerzeugung aus Abwasser und nutzt somit Ressourcen, die im großen Maß zur Verfügung stehen. Die Hauptkomponente der mikrobiellen Brennstoffzelle ist der Biofilm, welcher verantwortlich für eine effiziente Stromerzeugung ist.

Bei Biofilmen handelt es sich um eine Struktur, in der Mikroorganismen – auch verschiedener Spezies – in einer Art Lebensgemeinschaft nebeneinander vorkommen und sich gegenseitig vor äußeren Einflüssen schützen. Dies ermöglicht den Mikroorganismen nahezu jede Oberfläche zu besiedeln. Hierbei können sich Biofilme sowohl negativ als auch positiv auf ihre Umgebung auswirken. In Rohrleitungen sowohl von Nutz- als auch Brauchwasserinstallationen und in industriellen Anlagen stellen Biofilme oft problematische Strukturen dar, da sie sich negativ auf Produktionsprozesse auswirken können. Auch die typischen Krankenhauskeime *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* kommen als Biofilmstruktur vor und sind so gegenüber Sterilisationsmethoden unempfindlich. Im Gegenzug zu den oftmals negativen Vorkommen von Biofilmen, sind diese im Rahmen der mikrobiellen Brennstoffzelle unverzichtbar. Durch die metabolischen Prozesse im Biofilm wird Strom erzeugt, welcher als Nutzstrom z. B. in der Kläranlage verwendet werden kann.

Obwohl Biofilmen in zahlreichen Bereichen eine große Bedeutung zukommt, ist eine Analyse der Struktur noch immer mit großem Aufwand verbunden. Eine umfassende Analyse von Biofilmen ist nur offline und durch komplexe Methoden möglich. Eine Messung des Biofilms an der direkten Wachstumsfläche ist derzeit nicht umsetzbar, würde aber die genauesten Ergebnisse liefern. Hier könnten Fluoreszenzsensoren Anwendung finden. Sie bieten eine nicht-invasive online Messung, die auch an schwer zugänglichen Stellen wie in der mikrobiellen Brennstoffzelle möglich wäre. Des Weiteren können über

Fluoreszenzsensoren verschiedenste Parameter bestimmt werden, die direkte Rückschlüsse auf den Metabolismus geben. Sowohl der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt als auch biogene Fluorophore wie NADH und Riboflavin können über Fluoreszenzmessungen bestimmt werden und so eine schnelle Analyse des Metabolismus gewährleisten. Dies ermöglicht über eine vergleichsweise einfache Methode die Analyse des Biofilms hinsichtlich verschiedener Größen.

2 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation ist in Zusammenarbeit mit dem Konsortium „ElektroBak“, einem Projekt der Niedersächsischen Technischen Hochschulgruppe, entstanden. Ziel des Konsortiums ist es, das Konzept der abwasserbasierten mikrobiellen Brennstoffzelle zu optimieren. Ein Teil des Projekts war die Analyse des Biofilms, welcher maßgeblich für die Effizienz der mikrobiellen Brennstoffzelle ist. Als Analysemöglichkeit soll das Konzept der Fluoreszenzsensorik auf die Anwendung in Biofilmen übertragen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zum einen Fluoreszenzsensoren für die Analyse des Zellzustands des Biofilms zu entwickeln und zum anderen bestehende Sensorkonzepte auf die Anwendung im Biofilm zu übertragen.

Im Rahmen der Arbeiten sollen Fluoreszenzsensoren zur Analyse von Biofilmen und deren Mikroumgebung entwickelt und charakterisiert werden. Hier sollen sowohl biogene Fluorophore zur Bestimmung des Zellzustands sowie pH- und pO_2 -Wert bestimmt werden. Durch die Kombination dieser Parameter wird ein umfassender Einblick in den metabolischen Zustand der Zelle ermöglicht. Die Herausforderung hierbei ist, dass ein Biofilm hinsichtlich seiner Struktur nicht nur zeitlich sondern auch örtlich variabel ist und somit ein mobiler Sensor notwendig ist. Der Fokus liegt auf einem dünnen Sensor mit einem maximalen Durchmesser der Messspitze von 1 mm. Dies soll eine hochaufgelöste und flexible Messung ermöglichen, welche zugleich online durchgeführt wird.

Neben den biogenen Fluorophoren NADH, Riboflavin und Proteinen soll zusätzlich ein fluoreszenzbasiertes Messsystem für pH- und pO_2 -Wert, welches kommerziell für die Messung in Suspensionskulturen erhältlich ist, auf die Messung im Biofilm angepasst werden. Hierbei stellt sich vor allem die Frage, ob beide Parameter direkt im Biofilm bzw. in gelartigen Strukturen bestimmt werden können und inwieweit die Diffusionslimitierung die Messung beeinflusst.

3 Theoretischer Hintergrund

Die vorliegende Arbeit vereint die beiden theoretischen Schwerpunkte „Biofilme“ und „Fluoreszenzsensorik“. Das Hauptaugenmerk liegt im Folgenden auf dem Einfluss der beiden Themen aufeinander. Es werden die Entwicklung und die Struktur von Biofilmen beschrieben sowie Möglichkeiten der Biofilmanalyse. Außerdem wird anhand der mikrobiellen Brennstoffzelle (kurz: MBZ) ein technisches Anwendungsbeispiel von Biofilmen aufgezeigt. Im Bereich der Fluoreszenzsensorik wird auf das allgemeine Prinzip eingegangen und anschließend werden die theoretischen Aspekte für den Einsatz im Biofilm geklärt.

3.1 Biofilme

Biofilme wurden erstmals im 17. Jahrhundert von Antoni van Leeuwenhoek – dem Erfinder des Mikroskops – in menschlichen Zahnbelägen entdeckt [14; 31]. Da zu dieser Zeit mikrobiologische Untersuchungen nur in Reinkulturen und an planktonischen Zellen durchgeführt wurden, wurden die als mikrobielle Aggregate von van Leeuwenhoek beschriebenen Strukturen zunächst nicht weiter erforscht. Erst 1978 wurde der Terminus „Biofilm“ von Bill Costerton eingeführt und die Forschung an Biofilmen nahm zu.

3.1.1 Definition und Eigenschaften

Bei Biofilmen handelt es sich um Mikroorganismen, die in gelartigen bzw. schleimähnlichen Strukturen eingebettet sind. Hierbei können sowohl Bakterien als auch Pilze oder Algen in einer Biofilmstruktur vorkommen, sodass es sich bei Biofilmen insgesamt um eine heterogene Lebensgemeinschaft handelt. Biofilme sind ubiquitär vertreten und kommen an Grenzflächen sowohl zwischen Feststoff und Flüssigkeit als auch zwischen Flüssigkeit und Atmosphäre und Feststoff und Atmosphäre vor. Die Voraussetzungen für die Bildung von Biofilmen sind hierbei lediglich das Vorhandensein von Flüssigkeit, mikrobiell verwertbaren Nährstoffen und entsprechenden Mikroorganismen [14; 17; 30; 53; 69].

Für den Aufbau eines Biofilms ist die Exkretion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) von besonderer Bedeutung. Diese bilden die Grundlage des Biofilms, schützen ihn zusätzlich vor äußeren Einflüssen und sind verantwortlich für dessen gelartige Struktur. Bei den EPS kann es sich sowohl um Polysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren als auch um Lipide handeln. Des Weiteren können auch anorganische Partikel als Grundlage genutzt werden [67]. Neben der Inhomogenität der EPS-Zusammensetzung ist auch die Zusammensetzung der Mikroorganismen heterogen. Durch diese Heterogenität schaffen sich Biofilme eine eigene ökologische Nische, in welcher die Mikroorganismen durch die Akkumulation von Nährstoffen sowie durch die EPS geschützt sind und auch unter harschen Bedingungen, wie z. B. pH-Extrema, Trockenheit und Scherstress existieren können [75; 44; 43].

3.1.2 Entstehung und Entwicklung

Die Entwicklung eines Biofilms teilt sich in sechs Phasen (Abbildung 1) [13; 56]. Zunächst wird die Aufwuchsfläche in der Induktionsphase konditioniert. Hierzu lagern sich von den Mikroorganismen exkretierte EPS an der Aufwuchsfläche an. Anschließend erfolgt eine reversible Adhäsion erster suspendierter Zellen an der Aufwuchsfläche. Die Adhäsion kann bei weiterem Fortschreiten der Biofilmbildung zu einer irreversiblen Verbindung werden, nach welcher das Wachstum und die Zellakkumulation der Primärsiedler folgen und sich eine erste Biofilmschicht, ein sogenannter Monolayer, ausbildet. In der Wachstumsphase, welche vergleichbar mit der exponentiellen Phase in Zellsuspensionen ist, akkumulieren sich zum einen die Zellen und zum anderen beginnt die Zellteilung im Biofilm und es bilden sich weitere Schichten aus EPS und Zellen aus. Hier wird von einer Poly-layer-Struktur gesprochen. Der Biofilm nimmt in seiner Dicke zu. Ein Abtrag von Zellen ist nun durch Erosion oder Ablösung – sogenanntes sloughing – möglich [91; 21; 96; 66; 40]. Im Gegensatz zur Induktionsphase ist das Wachstum des Biofilms in dieser Phase nicht von der Beschaffenheit der Aufwuchsfläche abhängig sondern von der vorhandenen mikrobiellen Struktur [73; 15].

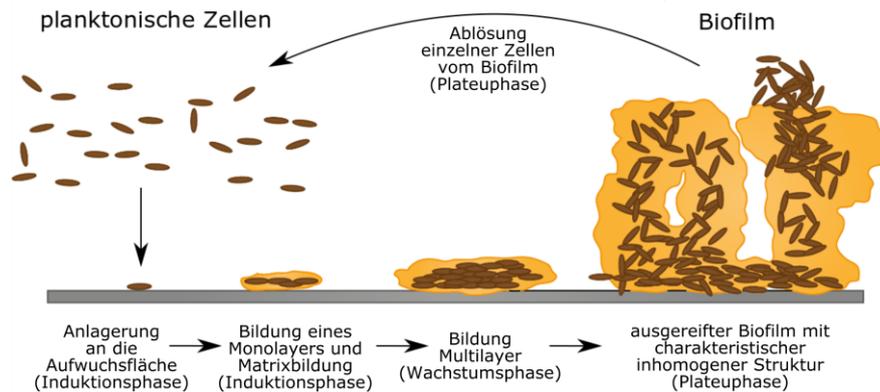


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Biofilms. Es sind die Phasen der Anheftung bis hin zum ausgereiften Biofilm dargestellt (modifiziert nach [38]).

In der Plateuphase verhält es sich ähnlich, wie in der stationären Phase von Suspensionskulturen. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen ablösenden und neu anhaftenden Zellen ein, welches nur durch die Nährstoffversorgung und die Scherkräfte beeinflusst wird. Die sich ablösenden Zellen können als sogenannte Schwärmerzellen an einer neuen Aufwuchsfläche anhaften und die Bildung eines weiteren Biofilms induzieren.

Durch die Wachstumsphasen, welche aufbauend auf bereits vorhandenen Strukturen folgen, sind Biofilme in ihrer Zusammensetzung weder örtlich noch zeitlich konstant. Aufgrund der Poly-layer-Struktur können sich unter anderem Sauerstoff- oder Nährstoffgradienten bilden.

3.1.3 Bedeutung von Biofilmen für die mikrobielle Brennstoffzelle

Im Bereich der Bioökonomie stellen Biofilme eine vielversprechende Struktur zur Abwasseraufreinigung und Energieerzeugung dar. Hier werden im Rahmen der mikrobiellen Brennstoffzelle, auch Biobrennstoffzelle genannt, Biofilme für die Stromgenerierung kultiviert. Eine Form der mikrobiellen Brennstoffzelle ist die Abwasserbasierte. Ziel dieser ist, die im Abwasser enthaltenen Bakterien zu nutzen, um Strom zu generieren und parallel Abwasser durch den Abbau organischer Substanzen aufzureinigen. Die mikrobielle Brennstoffzelle stellt somit eine nachhaltige Methode der Stromerzeugung dar [72; 82].

Die mikrobielle Brennstoffzelle ist nach dem Prinzip der klassischen Brennstoffzelle aufgebaut. Sie besteht grundlegend aus einer Anode und einer Kathode, welche je nach Art der Brennstoffzelle durch eine Membran voneinander getrennt sein können. In Abbildung 2 ist schematisch das Prinzip der mikrobiellen Brennstoffzelle dargestellt. Das Material der Elektroden sollte für eine MBZ porös sein, um eine möglichst große Aufwuchs- und optimale Adhäsionsfläche für die Mikroorganismen zu bieten. Häufig werden hier Kohlenstoffverbindungen – z.B. Graphit – verwendet, welche zusätzlich an der Oberfläche funktionalisiert werden können.

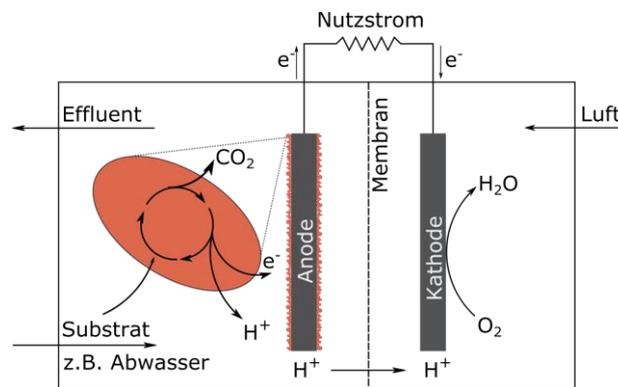


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mikrobiellen Brennstoffzelle (nach [81]). Die MBZ unterteilt sich in den Reaktionsraum der Anode und den der Kathode. Auf der Anode wächst im Verlauf der Kultivierung ein Biofilm. Aufgrund des Metabolismus der Mikroorganismen werden Elektronen generiert und diese an die Anode transferiert.

Bei den Bakterien, welche in der MBZ auf der Anode einen Biofilm bilden, handelt es sich um elektroaktive Organismen, welche in der Lage sind metabolisch entstandene Elektronen an ein elektrisch leitendes Material zu transferieren. Mikroorganismen, die hierzu in der Lage sind und im Abwasser auftreten sind unter anderem *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* und häufig fakultativ anaerob. Somit sind anaerobe Bedingungen für die Effizienz der MBZ von entscheidender Bedeutung [61].

Die mikrobielle Brennstoffzelle wird in kleineren Maßstäben bereits betrieben [76]. Die derzeit größte mikrobielle Brennstoffzelle wurde in der Schweiz entwickelt. Insgesamt sind hier 64 MBZ in Reihe geschaltet und ermöglichen so die bisher effizienteste mikrobielle Stromgenerierung. Das Projekt verfolgt das Ziel, den Stromverbrauch der Kläranlage durch die parallele Abwasseraufreinigung deutlich zu senken. Insgesamt soll die sonst negative Energiebilanz des Klärwerks durch den Betrieb einer MBZ soweit gesteigert werden, dass in der Bilanz Energie produziert wird [24].

3.1.4 Charakterisierung von Biofilmen

Bei Biofilmen handelt es sich um komplexe, dynamische Strukturen. Somit ist die Bandbreite an Analysemethoden groß und reicht von der Analyse der Matrixzusammensetzung bis hin zur Analyse der Mikroorganismen selbst. Die verschiedenen Methoden, welche für die Analyse eines Biofilms zum Einsatz kommen, sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

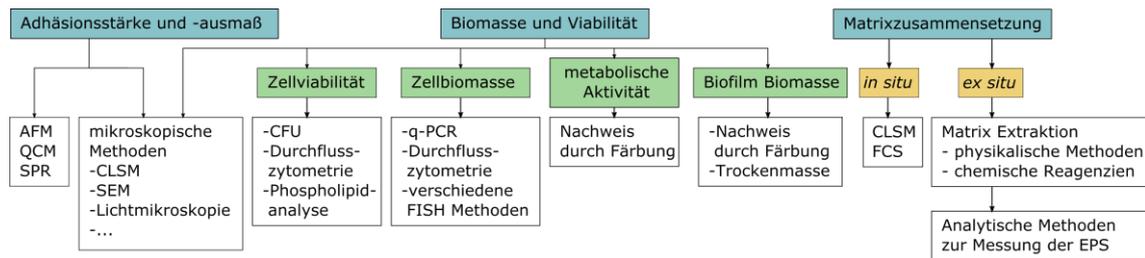


Abbildung 3: Analysemethoden von Biofilmen (nach [84]). Die Analysen können in die Gruppen Adhäsions-Biomassen- und Matrixanalyse unterteilt werden. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeschlüsselt.

Biofilme lassen sich zum einen hinsichtlich ihrer Adhäsion unter anderem mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) analysieren. Durch diese Methode können neben Aussagen über die Adhäsion auch Informationen über die Topographie des Biofilms, die Biofilmdicke sowie die EPS getroffen werden. Da bei dieser Methode die Probe nicht zerstört wird, können weitere Analysen mit derselben Probe folgen. Lediglich eine Immobilisierung der Zellen ist notwendig. Außerdem findet die Analyse bei typischen Laborbedingungen statt, sodass auch die Vorarbeiten minimal sind. Neben diesen Vorteilen ist AFM allerdings hinsichtlich der Probengröße mit maximal $150\ \mu\text{m} \cdot 150\ \mu\text{m}$ limitiert [16].

Ein weiterer wichtiger Bereich der Biofilmanalyse sind die Bestimmung der Biomasse sowie die Viabilität der Mikroorganismen. Hier finden klassische Methoden der Zellzahlbestimmung wie CFU-Analyse (engl.: colony forming units) und Biotrockenmasse- bzw. Biofeuchtmassenbestimmung Anwendung. Ein großer Nachteil dieser Methoden ist allerdings die hohe Anfälligkeit gegenüber Fehlern aufgrund der Biofilmmatrix [101]. Neben der Viabilitätsbestimmung über CFU wird auch Durchflusszytometrie sowohl zur Analyse der Zellviabilität als auch der Biomasse verwendet. Durchflusszytometrie bietet den großen Vorteil, dass im Gegensatz zu CFU zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann. Allerdings ist der Zusatz von Fluorophoren notwendig, sodass

es sich auch bei dieser Methode um eine invasive handelt, bei der eine Probennahme notwendig ist.

Sowohl die Biomasse als auch das Ausmaß der Adhäsion wird bei Biofilmen vorzugsweise über mikroskopische Methoden bestimmt. Die Methode der Wahl im Bereich der Biofilmanalyse ist das konfokale Laserscanning Mikroskop (CLSM) [50]. Es ermöglicht eine präzise Bildgebung unebener Strukturen, da einzelne Präparatbereiche nacheinander analysiert und ein Gesamtbild am Ende der Messung zusammengesetzt wird. Die verschiedenen Fokusebenen können somit hochaufgelöst dargestellt werden und ermöglichen so eine gesamtheitliche bildgebende Analyse [22]. Durch die Kombination mit Anfärbemethoden können mittels CLSM auch verschiedene Komponenten z. B. Polysaccharide oder Lipide betrachtet werden [20; 45].

Neben CLSM Messungen kommen für die Charakterisierung von Biofilmen die klassischen Verfahren aus der Kultivierung und Zellkultur in Betracht. Über Durchflusszytometrie kann die Zellviabilität bestimmt werden. Im Fall von Biofilmen bedeutet dies, dass die Struktur von ihrem möglichen Trägermaterial abgelöst werden muss und so der Prozess der Kultivierung beeinflusst wird [77]. Ein weiterer wichtiger Bereich der Biofilmanalyse ist die Charakterisierung der Biofilmmatrix. Diese ist wie oben beschrieben aus extrapolymere Substanzen zusammengesetzt und je nach Biofilm unterschiedlich. Da es sich bei den EPS sowohl um Kohlenhydrate als auch Proteine und Fette handeln kann, ist eine Analyse komplex. Zum einem kann auch hier CLSM angewendet werden. Über eine Probennahme ist es aber zusätzlich möglich, die Komponenten über physikalische Methoden bzw. unter Einsatz chemischer Reagenzien zu bestimmen. Als Beispiel sei hier als physikalische Methode die Zentrifugation sowie Erhitzen genannt. Zu den chemischen Detergenzien, welche häufig eingesetzt werden, zählen unter anderem EDTA, Ethanol und NaOH [2]. Physikalische und chemische Methoden werden für die Analyse der gewünschten Komponente häufig in Kombination eingesetzt, wobei es hier kein Standardprotokoll gibt [5].

Es zeigt sich, dass die Charakterisierung von Biofilmen hoch komplex ist und mit einer Unterbrechung der Kultivierung oder Probennahme einhergeht. Um eine störungsfreie Kultivierung zu ermöglichen, kann die Fluoreszenzsensorik herangezogen werden. Die

Analyse des Zellzustands kann über online Messungen von NADH und Riboflavin erfolgen. Außerdem kann über eine Streulichtmessung die Zunahme an Biomasse bestimmt werden [79]. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Methoden bietet Fluoreszenz eine non-invasive Möglichkeit der Analyse, welche sowohl Aussagen über den Zellzustand als auch eine Analyse der Mikroumgebung der Zellen ermöglicht.

3.2 Fluoreszenz

Fluoreszenzsensoren zählen zu den optischen Sensoren und ermöglichen eine direkte Messung von Fluorophoren in Lösung. Es handelt sich bei der Fluoreszenzsensorik um eine sehr sensitive Messmethode, welche online und mittels eines einfachen Aufbaus realisiert werden kann. Aufgrund dieser Vorteile sind Fluoreszenzsensoren in Bioprozessen vielfältig genutzt und etabliert [80; 6; 12; 26]. Eine große Anzahl an Analysegeräten basieren auf der Messung der Fluoreszenz. Als Beispiel sei hier die Durchflusszytometrie genannt. Im Bereich der Biotechnologie findet Fluoreszenz in Form von Sensoren für die Kultivierung von Mikroorganismen Anwendung. Hier bietet die Fluoreszenzmessung als online und nicht-invasive Messmethode große Vorteile im Vergleich zu anderen Methoden.

Außerdem findet das Prinzip der Fluoreszenz in optischen Chemosensoren zur Bestimmung des pH- und pO_2 -Werts Anwendung. Hier wird die Fluoreszenz eines immobilisierten Farbstoffs gemessen, welcher mit Komponenten in Lösung reagiert und so seine Fluoreszenzeigenschaften ändert [70].

3.2.1 Grundprinzip

Licht kann reflektiert, transmittiert und absorbiert werden. Bei Absorption von Lichtenergie können Moleküle lumineszieren. Lumineszenz selbst unterteilt sich in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Auf die Fluoreszenz soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Fluoreszenz findet typischerweise bei Molekülen mit konjugierten π -Doppelbindungen statt. Hierbei werden Moleküle mittels einer externen Lichtquelle angeregt und absorbieren die Energie, sodass sich das Energieniveau erhöht. Dieser Zustand ist aufgrund der dann vorliegenden chemischen Struktur der Moleküle nicht stabil und dementsprechend

von kurzer Dauer. Bei der Rückkehr in den energetischen Grundzustand wird Energie frei, welche in Form von Licht emittiert wird [35]. Die Dauer der Rückkehr und somit der Abstrahlung von Energie beträgt durchschnittlich 1 ns und wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet [49; 97; 64]. Die Emissionswellenlänge ist dabei grundsätzlich länger als die der Exzitationswellenlänge. Es handelt sich hierbei um den sogenannten Stoke-Shift [49]. Beschrieben wird der energetische Vorgang der Fluoreszenz durch das Jablonski-Diagramm (Abbildung 4). Es umfasst die möglichen Energiezustände eines Moleküls – den Grundzustand S_0 sowie die angeregten Zustände S_1 und S_2 . Der Zustand S_2 liegt energetisch hoch, hat aber gemäß dem Franck-Condon-Prinzip eine kurze Lebensdauer und fällt dann auf den Zustand S_1 . Aus diesem energetischen Zustand findet die eigentliche Fluoreszenz statt, nach der das Molekül sich wieder im Grundzustand S_0 befindet [41; 42].

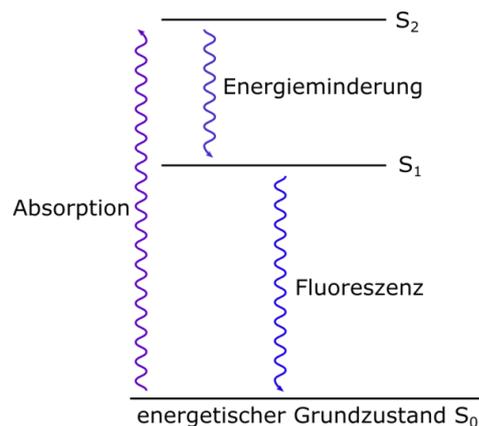


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fluoreszenzprinzips im Jablonski-Diagramm.

Das Jablonski-Diagramm umfasst in Abbildung 4 lediglich den einfachen Vorrang der Fluoreszenz. Allerdings kann Fluoreszenz von sogenannter Fluoreszenzlöschung (engl.: Quenching) und inneren Filtereffekten beeinflusst werden. Der Prozess der Fluoreszenzlöschung tritt auf, wenn sogenannte Quencher-Moleküle vorhanden sind. Diese können auf verschiedene Arten wirken. Zum einen kann Quenching durch Zusammenstoßen der Fluorophore untereinander oder mit anderen Molekülen ausgelöst werden. Der Zusammenstoß senkt das Energieniveau und die Fluoreszenzintensität wird vermindert. Bezeichnet wird dieser Vorgang als dynamische Fluoreszenzlöschung. Im Gegensatz zur dynamischen Fluoreszenzlöschung wird bei der statischen dauerhaft der Energiezustand verändert. Hierbei gehen die sonst fluoreszierenden Moleküle mit dem Quencher nicht-

fluoreszierende oder weniger fluoreszierende Komplexe ein [93; 51; 48]. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung bzw. der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität zur Konzentration des Quenchers wird durch die Stern-Volmer-Gleichung (Formel 1) beschrieben [89].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (1)$$

Die resultierende Fluoreszenzintensität ist hierbei das Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität des Fluorophors ohne Quencher (F_0) und der mit Quencher (F). Dieses berechnet sich aus dem Produkt der Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) und der Konzentration des Quenchers (Q). Die Stern-Volmer-Konstante quantifiziert die Effizienz der Fluoreszenzlöschung und sollte für alle Moleküle gleich sein. Dies bedeutet, dass alle Moleküle für den Quencher in gleicher Weise zugänglich sein müssen. Ist dies nicht der Fall, muss die Gleichung abgewandelt werden. Die hier vorgestellte Stern-Volmer-Gleichung ist nur gültig, wenn alle Moleküle auf dieselbe Art der Fluoreszenzlöschung ausgesetzt sind. Ansonsten muss die Gleichung angepasst werden [99; 49].

Ein weiterer häufig auftretender Effekt bei Fluoreszenz ist der innere Filtereffekt. Dieser tritt auf, wenn die Konzentration an Fluorophoren so hoch ist, dass trotz eigentlich anzunehmender Zunahme der Fluoreszenz die Intensität konstant bleibt. Aufgrund der hohen Dichte an Fluorophoren lenken sich die Emissionswellen ab und die Fluoreszenzintensität wird gemindert [68; 87].

Neben diesen Effekten wird Fluoreszenz zusätzlich von der Temperatur beeinflusst. Da sich mit zunehmender Temperatur Moleküle gemäß der Brownschen Molekularbewegung schneller bewegen, stoßen diese auch häufiger aufeinander und es kommt zur Energieminderung. Dementsprechend sinkt mit zunehmender Temperatur die Fluoreszenzintensität [63; 34]. Da bei Bioprozessen die Temperatur allerdings auf einem konstanten Niveau gehalten wird, ist dieser Effekt bei dem Einsatz von Fluoreszenzmessungen in Bioprozessen zu vernachlässigen.

3.2.2 Intrinsische Fluorophore

Fluoreszenzsensoren ermöglichen neben der Messung von suspendierten Fluorophoren auch eine intrazelluläre Messung von Fluorophoren [9; 55; 78; 86]. Bei diesen sogenannten intrinsischen oder biogenen Fluorophoren handelt es sich um die aromatischen Aminosäuren, Vitamine sowie NADH [60].

Einen großen Anteil der biogenen Fluorophore stellen Proteine dar. Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin sind aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems in der Lage zu fluoreszieren. Der Hauptteil der Fluoreszenz basiert hierbei auf den Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Letztere kommt in den Zellen häufiger vor und hat trotz der schwächeren Fluoreszenz als Tryptophan einen höheren Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Tryptophan selbst quencht allerdings die Fluoreszenz benachbarter Tyrosinmoleküle [83; 94; 54]. Da die Fluoreszenz bei Proteinen von verschiedenen Aminosäuren ausgehen kann, ist auch der Bereich der Exzitation und Emission deutlich breiter als bei anderen Fluorophoren (Tabelle 1).

Zu den intrinsischen Fluorophoren zählen außerdem NAD(P)H und Flavine, welche Rückschlüsse auf den Zellzustand und den Metabolismus ermöglichen. Bei NAD(P)H handelt es sich um ein Coenzym, welches an zahlreichen Redoxreaktionen im Metabolismus beteiligt ist. Sowohl im aeroben Glucosemetabolismus als auch bei anaeroben Stoffwechselwegen nimmt NADH eine zentrale Rolle ein. Unter anderem wird NAD^+ in der Glykolyse und im Citratzyklus zu NADH reduziert. NADH wiederum wird in der Atmungskette als n-terminaler Elektronenakzeptor in der Zelle zu NAD^+ oxidiert und stellt somit Protonen in der Atmungskette zur Verfügung [4; 39; 7; 19]. Entscheidend für die Messung der Fluoreszenz ist, dass nur NAD(P)H als reduzierte Form fluoreszenzaktiv ist. Im Unterschied zu der oxidierten Form NAD^+ besitzt NAD(P)H einen fluoreszierenden Nicotinamidring. Die Fluoreszenzintensität von NADH verändert sich durch die Bindung an Proteine, wobei es proteinabhängig ist, ob diese steigt oder sinkt [49].

Flavine kommen im Zellmetabolismus in der biochemischen Form Riboflavin vor. Riboflavin, auch Vitamin B₂, ist die Vorstufe der Flavin-Coenzyme FAD und FMN, welche als Elektronenüberträger eine wichtige Rolle im Metabolismus vieler Zellen spielen. Flavin Coenzyme sind in der Synthese von Oxidoreduktasen entscheidend für zahlreiche metabolische Prozesse [58; 74]. Im Gegensatz zu NADH ist bei Flavin die oxidierte Form

fluoreszenzaktiv und weist bei Bindung an Proteine, sogenannte Flavoproteine, eine schwache Fluoreszenz auf [33; 59; 3]. Wie auch NADH weisen Flavine eine gequenchete Fluoreszenz bei Bindung an Adenosin auf [100]. In Tabelle 1 sind die Exzitations- sowie Emissionswellenlängen von NADH und Riboflavin gelistet.

Tabelle 1: Exzitations- und Emissionswellenlängen verschiedener intrinsischer Fluorophore [49].

Fluorophor	Exzitation	Emission
Tryptophan	295 nm	353 nm
Tyrosin	275 nm	304 nm
Phenylalanin	260 nm	282 nm
NADH	340 nm	460 nm
Riboflavin	450 nm	525 nm

3.2.3 Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses

Vor allem bei dem Einsatz von Fluoreszenzsensoren in biologischen Kulturen zur Messung intrinsischer Moleküle sind die Messsignale niedrig. Dies liegt zum einen in Streulichtverlusten und Lichtverlusten durch die Glasfasern im Sensor begründet und zum anderen in den Einflüssen verschiedener Komponenten im Prozess aufeinander [88]. Um trotzdem geringe Signale vor einem hohen Rauschhintergrund messen zu können, kann das Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: signal-to-noise-ratio, kurz: SNR) mittels verschiedener Methoden reduziert werden.

Eine dieser Methoden ist der Einsatz eines Lock-In-Verfahrens. Hierbei werden Störgrößen bzw. Rauschen mittels einer Referenzfunktion $r(t)$ aus der Messfunktion $m(t)$ herausgerechnet. Für die Referenzfunktion werden Referenzsignale erzeugt, welche die gleiche Frequenz aufweisen, wie die Signalmodulation [85]. Bei Fluoreszenzsensoren handelt es sich bei der Referenzfunktion im einfachsten Fall um eine Rechteckfunktion, da die Lichtquelle für die Messung an- bzw. ausgeschaltet wird. Im Unterschied zu der Messfunktion, ist die Referenzfunktion frei von Signalrauschen. Aus der Multiplikation der Messfunktion mit der Referenzfunktion wird über einen festen Zeitraum das Integral gebildet (Formel 2). Liegen keine Rauscheinflüsse vor, ist die Messfunktion gleich der Referenzfunktion. Das Lock-In-Verfahren findet vor allem dann Anwendung, wenn das Signalrauschen einen signifikant großen Anteil am Signal hat.

$$\int_{t_1}^{t_2} m(t) \cdot r(t) dt \quad (2)$$

Eine andere Möglichkeit der SNR-Optimierung ist die Mittelwertbildung. Hierbei werden je Messung mehrere Messwerte aufgenommen und aus diesen der Mittelwert gebildet. Zusätzlich kann dies noch um eine Integration über den gemessenen Zeitraum erweitert werden [18]. Die Mittelwertbildung ist im Vergleich zum Lock-In-Verfahren einfacher zu implementieren und bietet bei Messungen ohne Einflüsse durch Umgebungslicht eine einfache Methode der SNR-Reduktion. Bei Messungen, bei denen ein hohes Rauschen erwartet wird, ist das Lock-In-Verfahren der Mittelwertbildung vorzuziehen.

3.3 Einsatz von optischen Sensoren in Biofilmen

Für die Analyse von Biofilmen finden bereits einige optische Sensoren Anwendung. Häufig handelt es sich hier um online-Messverfahren, welche die optische Dichte des Biofilms bestimmen und somit nur Auskunft über die Biomasse geben können oder lediglich eine metabolische Größe bestimmen. Einige optische Sensoren, die für den Einsatz im Biofilm entwickelt wurden, sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Eine dieser Analysemethoden ist die Verwendung von Trübungssensoren, welche für die Analyse der optischen Dichte und der Bestimmung der Biofilmdicke eingesetzt werden können. Die Messung basiert hierbei auf der Streulichtmessung bei Wellenlängen zwischen 600 nm und 1300 nm, da hier die geringste Absorption stattfindet. Über Trübungssensoren kann so z. B. das Wachstum von Biofilmen auf einer durchsichtigen Oberfläche hinsichtlich Biofilmdicke analysiert werden. Hierzu wird gemessen, wie sich die optische Dichte verändert. Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass nicht zwischen adhärenenten und planktonischen Zellen unterschieden werden kann [95; 28].

Beyenal *et al.* haben einen Mikrosensor für die Messung im Biofilm entwickelt. Dieser weist an der Messspitze einen Durchmesser von $<10 \mu\text{m}$ auf und kann so an spezifischen Positionen im Biofilm messen. Durch die Erweiterung um einen Mikromanipulator können so einzelne Positionen im Biofilm angefahren und analysiert werden. Der Sensor basiert auf der Fluoreszenzmessung und wurde erfolgreich in der Anwendung mit YFP

(engl.: yellow fluorescent protein)-produzierendem *Staphylococcus aureus* getestet. Das optische System ist hierfür komplex und vergleichsweise kostenintensiv gestaltet, um trotz des geringen Durchmessers sensitive Messungen zu ermöglichen. Es wurden sowohl Strahlleiter, optische Filter als auch ein Spektrophotometer verbaut [8]. Aufgrund des Spektrophotometers könnte auch eine Messung verschiedener Fluorophore ermöglicht werden. Dies wurde bis zum heutigen Stand nicht publiziert und es ist somit nicht bekannt, ob diese Anwendung getestet wurde.

Strathman *et al.* haben einen fluoreszenzbasierten Sensor entwickelt, der die Analyse des Biofilmwachstums in Rohrleitungen ermöglichen soll. Der Sensor misst hierbei im Durchfluss über die Reflexion eines im Rohr integrierten Spiegels. Es kann sowohl das Biofilmwachstum über eine Streulichtmessung als auch NADH als Referenz für metabolische Aktivität mittels des entwickelten Sensors in Rohrleitungen bestimmt werden [92].

Ein weiterer fluoreszenzbasierter Sensor zur Detektion der Biofilmbildung wurde von Fischer *et al.* entwickelt. Der Sensor basiert auf der Messung der Fluoreszenz von Tryptophan und ist somit für eine feste Exzitations- und Emissionswellenlänge ausgelegt. Durch die Messung von Tryptophan konnte erfolgreich die Biofilmbildung in Gewässern von der Adhäsion erster Zellen bis hin zum ausgereiften Biofilm detektiert werden. Der Sensor misst hierbei durch eine Glasscheibe, auf der der Biofilm aufgrund der Bereitstellung von Substrat vorzugsweise wächst. Eine mobile Messung ist bei diesem Sensoraufbau nicht möglich [29].

Bei den bisher verwendeten optischen und auch fluoreszenzbasierten Messmethoden werden keine Fluoreszenzsensoren verwendet, die mehrere Wellenlängen kombinieren. In der Bioprozesstechnik sind diese Sensoren in vielen Bereichen etabliert und ermöglichen eine online Analyse des Metabolismus. Dementsprechend würde diese Messmethode auch für die Analyse von Biofilmen große Vorteile bieten. Statt der bisher verwendeten offline Analysen könnten Fluoreszenzsensoren eine Analyse ermöglichen, welche die kontinuierlichen Prozesse des Biofilms darstellen kann. Vor allem für Produktionsprozesse, in denen Biofilme zunehmend verwendet werden, würden Fluoreszenzsensoren durch ihre online Analyse zu einem großen Fortschritt beitragen. Die Bestimmung mehrerer Prozessgrößen wie NADH, Flavinen und Proteinen ermöglicht hier einen detaillierten Einblick in den Zellzustand und -metabolismus.

4 Entwicklung und Charakterisierung des Fluoreszenzensors

Die Entwicklung des Sensors gliedert sich in verschiedene Teile. Zunächst werden die Anforderungen an den Sensor aufgezeigt und grundlegende Charakteristika wie die Exzitations- und Emissionswellenlängen festgelegt. Anschließend werden die beiden im Rahmen der Arbeit entwickelten Sensoraufbauten hinsichtlich Entwicklung und Evaluierung vorgestellt. Beide Varianten basieren auf dem gleichen Grundkonzept, unterscheiden sich aber in dem Durchmesser des verwendeten Lichtleiters. Prototyp 1 basiert auf einem 500 μm Lichtleiter und dem Einsatz von optischen Linsen. In Prototyp 2 wurde ein 1000 μm Lichtleiter verwendet, welcher ohne den Einsatz von optischen Linsen auskommt.

Zusätzlich zu der Entwicklung eines neuen Fluoreszenzensors wird im Folgenden auch auf die Übertragung kommerziell erhältlicher pO_2 - und pH-Sensoren auf Biofilme eingegangen.

4.1 Anforderungen

Die Anforderungen an einen Fluoreszenzsensor für den Einsatz in Biofilmen sind vielfältig. Neben den Anforderungen der Sterilisierbarkeit und Biokompatibilität, die für Fluoreszenzsensoren in Rührkesselreaktoren gelten, kommen bei Sensoren für Biofilme noch weitere hinzu. Eine Herausforderung bei der Analyse der Biofilme ist die Heterogenität der Struktur. Dementsprechend soll eine orts aufgelöste Messung erreicht werden, welche die Unterschiede in einem Biofilm detektiert. Der Durchmesser des Sensors sollte somit gering sein. Im Vergleich zu Sensoren für homogen durchmischte Rührkesselreaktoren, welche nur punktuell messen müssen, ist zusätzlich eine Flexibilität des Sensors für Biofilme notwendig. Die Beweglichkeit des Sensors liefert die Möglichkeit neben einer zeit aufgelösten auch eine orts aufgelöste Messung umzusetzen. Dementsprechend soll für den Sensor ein Durchmesser von maximal 1000 μm inklusive Ummantelung realisiert werden. Durch die zu analysierende Struktur des Biofilms ergibt sich eine weitere Anforderung an den Sensor. Da es sich bei Biofilmen um feste Strukturen handelt, welche auf

Oberflächen wachsen, ist eine Durchlichtmessung nicht realisierbar. Auch eine Messung im 90° Winkel, wie sie bei verschiedenen optischen Messmethoden Anwendung findet, kann aufgrund einer möglichen Fluoreszenzmessung direkt in der Biofilmstruktur und der inhomogenen Oberflächenstruktur nicht umgesetzt werden. Für die Messung im Biofilm muss dementsprechend eine Messung im 0° Winkel erfolgen. Dies bedeutet, dass Exzitation und Emission über den gleichen Lichtleiter verlaufen müssen.

Neben den Anforderungen an die Größe des Sensors werden auch Anforderungen an das Material gestellt. Bei optischen Sensoren können je nach Anwendung verschiedene Materialien verwendet werden, welche sich hinsichtlich ihrer Robustheit und dem durchlässigen Wellenlängenbereich unterscheiden. Da für die Messung in Biofilmen der metabolische Zustand der Mikroorganismen analysiert werden soll, muss ein Wellenlängenbereich von 280 nm für Proteine bis 525 nm für die Emissionsmessung von Flavinen abgedeckt werden. Da dementsprechend UV-Licht durch den Sensor geleitet werden soll, kommt als einziges Sensormaterial Glas in Frage. Glasfasern haben den großen Vorteil, dass sowohl UV-, VIS als auch NIR-Strahlen geleitet werden können. Allerdings sind Glasfasern deutlich bruchanfälliger als Polymerfasern, was sich auf die Handhabung auswirkt. Da Glasfasern für einen großen Wellenlängenbereich ausgelegt sind, kann der Sensor zusätzlich um eine Streulichtmessung >830 nm erweitert werden.

Ein Anwendungsbereich des Sensors kann die Analyse von Biofilmen in der mikrobiellen Brennstoffzelle sein. In der MBZ werden Stromflüsse generiert, welche eine zusätzliche elektrische Isolation des Sensors notwendig machen. Dementsprechend muss bei der Konstruktion des Lichtleiters berücksichtigt werden, dass keine elektrisch leitenden Materialien verwendet werden.

4.2 Allgemeiner Aufbau

Für den Aufbau eines Fluoreszenzensors können verschiedene Modelle in Betracht gezogen werden. Grundsätzlich kann zwischen den Aufbauten die einen Lichtleiterstrang verwenden und denen, deren Lichtleiter mehrsträngig sind, unterschieden werden. Fluoreszenzsensoren mit einem einsträngigen Lichtleiter bieten den Vorteil, dass sowohl die Exzitation als auch die Emission über die gleichen Fasern verlaufen und somit weniger Fasern benötigt werden. Bei konstantem Durchmesser ergibt sich bei einem einsträngigen

Lichtleiter somit eine größere Exzitations- als auch Emissionsfläche. Allerdings erfolgt die Trennung zwischen Exzitation und Emission hinter der Faser und wird über den Einsatz von dichroitischen Spiegeln umgesetzt. Hierbei ist ein Verlust sowohl der Exzitations- als auch der Emissionsenergie zu berücksichtigen. Da selbst bei optimaler Positionierung der optischen Komponenten mit einem verhältnismäßig großen Verlust der Emissionsenergie zu rechnen ist, wird – trotz der Möglichkeit dünne Fasern zu verwenden – dieser Aufbau für einen Fluoreszenzsensor für Biofilme nicht verwendet. Die detektierte Emissionsenergie wäre vermutlich so gering, dass kostenintensive Spektrophotometer zur Detektion eingesetzt werden müssten.

Um den Einsatz optischer Komponenten und Spektrometer gering zu halten bzw. zu vermeiden und damit den Aufbau einfacher, unempfindlicher und kostengünstig zu gestalten, wird als Aufbau des Fluoreszenzensors ein mehrsträngiger Lichtleiter eingesetzt. Hierbei teilen sich die Stränge in Emission und Exzitation auf. Das Licht kann somit direkt in den Lichtleiterstrang eingekoppelt und die Emission an der Austrittsfläche des anderen Lichtleiterstrangs gemessen werden. Aufgrund der Biofilmstruktur wird ein Lichtleiter gewählt, der an der Messposition die Fasern der Exzitation und Emission vereint. Um trotz der im Vergleich zu einem einsträngigen Lichtleiter kleineren Faserfläche eine möglichst hohe Lichtausbeute zu erzielen, werden mehrere Fasern verwendet. Je nach Anzahl der verwendeten Fasern können diese stöchiometrisch oder zufällig angeordnet werden. Da für die Anwendung aufgrund des Durchmessers wenig Fasern verwendet werden können, werden die Fasern der Emission radial um die Fasern der Exzitation angeordnet.

Für die Exzitation werden in der Exzitationseinheit lichtemittierende Dioden (kurz: LED) verwendet, da diese bei gleicher Leistung kostengünstiger sind als Xenon- oder Halogenlampen. Des Weiteren weisen LEDs eine höhere Lebensdauer, eine geringere Alterung und eine geringere Wärmeentwicklung auf. Da der Fluoreszenzsensor für eine genaue Analyse verschiedener Fluorophore eingesetzt werden soll, wird je Wellenlänge eine monochromatische LED mit einem engen Wellenlängenbereich verwendet. Aufgrund der geringen Bandbreite ist der Einsatz von zusätzlichen Bandpassfiltern somit nicht notwendig.

Die Fasern der Emission werden mit der Detektionseinheit verbunden. Die Messung der Emission erfolgt über eine Photodiode in Kombination mit Bandpassfiltern. Als Alternative kann hier auch ein Spektrometer verwendet werden. Dies würde Messungen verschiedenster Wellenlängenkombinationen ermöglichen, ist aber deutlich kostenintensiver. Eine hochsensitive Photodiode bietet hier – da die zu messenden Parameter definiert sind – bei gleicher Sensitivität eine deutlich kostengünstigere Alternative. Dementsprechend wird für die Entwicklung des Sensors statt eines Spektrometers oder eines Photomultiplier eine hochsensitive Photodiode verwendet. Licht, welches auf die Detektionsfläche der Photodiode fällt, wird mittels eines Transimpedanzwandlers in eine Spannung umgewandelt. Dieses analoge Signal wird anschließend durch einen Analog-Digital-Wandler in ein digitales Signal umgewandelt. Hierbei handelt es sich um die relative Fluoreszenzintensität (kurz: RFI). Die gewählte Photodiode ist sensitiv für Wellenlängen zwischen 250 nm und 1100 nm und umfasst somit alle zu messenden Wellenlängen. Allerdings ist die Sensitivität linear abhängig zur Wellenlänge und nimmt mit dieser zu. Dies bedeutet, dass für die Messung von Proteinen und NADH ein Verstärkungsfaktor verwendet werden muss. Mittels des Verstärkungsfaktors wird das Signal nachträglich mathematisch vervielfacht, sodass Rauscheffekte minimiert werden. Zusätzlich muss beachtet werden, dass die Photodiode eine signifikante Wärmeabhängigkeit im gewünschten Wellenlängenbereich aufweist. Bis ca. 450 nm ist dieser negativ, zwischen 500 nm und 650 nm ungefähr 0 und bei 830 nm positiv.

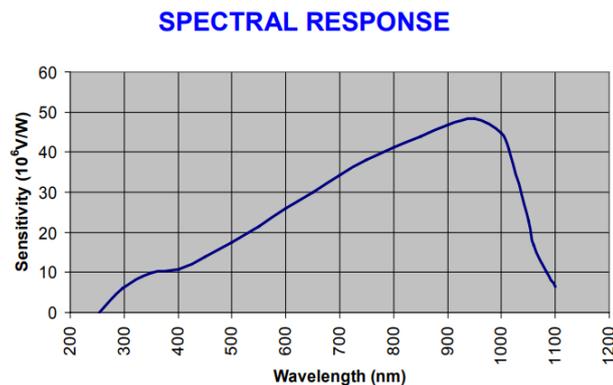


Abbildung 5: Sensitivität der verwendeten Photodiode in Abhängigkeit zur Wellenlänge [57]. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Sensitivität zunächst zu.

Um neben der hohen Sensitivität der Photodiode auch eine hohe Selektivität bei der Messung zu erzielen, werden Bandpassfilter verwendet. Optische Bandpassfilter blocken Licht ungewünschter Wellenlängen und lassen Licht der zu analysierenden Wellenlängen durch. Je nach Fertigung unterscheiden sich die Filter unter anderem in ihrer Bandbreite. Ähnlich zu der Exzitationseinheit wird auch bei der Detektionseinheit eine möglichst schmale Bandbreite angestrebt, um eine selektive Messung zu ermöglichen.

4.2.1 Exzitations- und Emissionswellenlängen

Die Wellenlängen der LEDs und Bandpassfilter wurden in einem ersten Schritt für die gewünschten Fluorophore über Messungen mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt (Versuchsdurchführung siehe Seite 95) und zusätzlich mit Literaturwerten verglichen. Die Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 6 dargestellt.

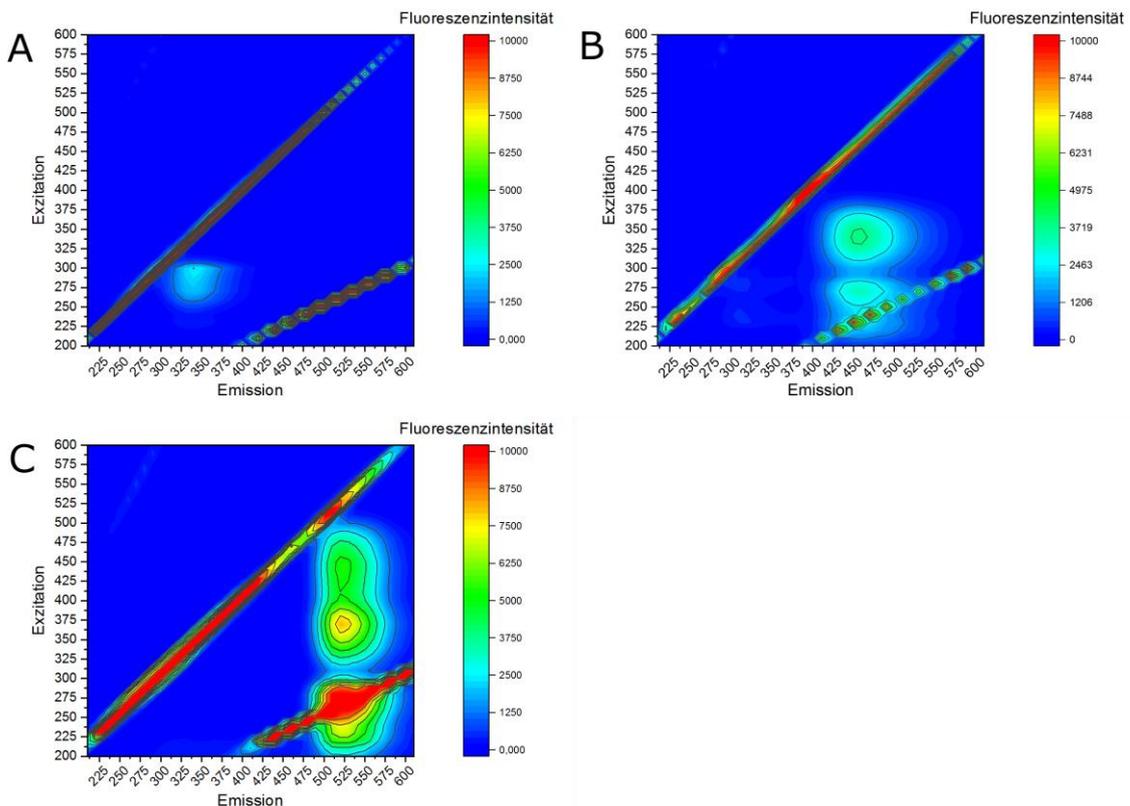


Abbildung 6: Fluoreszenzspektren der zu messenden Fluorophore. A BSA als Protein-Referenz; B NADH; C Riboflavin als Flavin-Referenz.

Für die Bestimmung der Wellenlängenkombination für den Protein-Kanal wird BSA als Referenz für Proteine verwendet. Das Fluoreszenzspektrum von BSA (Abbildung 6, A) weist ein Maximum der Fluoreszenz bei 280 nm/340 nm (EX/EM) auf. Im Vergleich mit den in der Literatur bekannten Wellenlängen für die fluoreszierenden Aminosäuren (Kapitel „3.2.2 Intrinsische Fluorophore“, Tabelle 1) werden diese Werte bestätigt. Als Lichtquelle für die Exzitation wird somit eine Wellenlänge von 280 nm angestrebt. Auf der Seite der Detektion wird eine Emissionswellenlänge von 340 nm gewählt.

Für NADH wurde ebenfalls ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (Abbildung 6, B). Es zeigen sich zwei Maxima für die Fluoreszenz. Diese liegen bei 280 nm/450 nm (EX/EM) sowie bei 350 nm/450 nm (EX/EM). Da Proteine ebenfalls bei 280 nm angeregt werden, wird die zweite Kombination angestrebt, welche sich mit den Literaturwerten deckt.

Als Referenz für den Flavin-Kanal wird Riboflavin verwendet. Das Fluoreszenzspektrum von Riboflavin (Abbildung 6, C) weist ebenfalls zwei Fluoreszenzmaxima auf. Sowohl bei 365 nm/525 nm (EX/EM) als auch bei 450 nm/525 nm (EX/EM) wurde eine hohe Fluoreszenzintensität detektiert. Für die Entwicklung des Sensors und die Messung von Flavinen wird die zweite Kombination angestrebt, da, ähnlich wie bei BSA und NADH, die erste Kombination mit der Exzitationswellenlänge von NADH übereinstimmt. Zusätzlich decken sich die Wellenlängen der zweiten Kombination mit denen der Literatur.

Die angestrebten Wellenlängen sind in Tabelle 2 zusammengefasst und dienen im Folgenden als Grundlage für die Wahl der Lichtquellen und Bandpassfilter.

Tabelle 2: Gewählte Wellenlängen für die einzelnen zu messenden Fluorophore.

Fluorophor	$\lambda_{\text{Exzitation}}$	$\lambda_{\text{Emission}}$
BSA (Proteine)	280	340
NADH	365	450
Flavine	450	525

4.3 Prototyp 1

Mit dem Prototyp 1 des Fluoreszenzensors wurden erste Konzepte für den Sensor getestet. Als Ausgangsaufbau wurde ein Lichtleiter mit einem Durchmesser von $500\ \mu\text{m}$ an der Messposition gewählt. Der Lichtleiter besteht aus insgesamt 11 Glasfasern, welche sich in 10 Fasern für die Detektion und eine Faser für die Exzitation unterteilen. Die Fasern der Detektion mit einem jeweiligen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$ sind radial um die $100\ \mu\text{m}$ dicke Faser der Exzitation angeordnet (Konstruktionszeichnung siehe Seite 89).

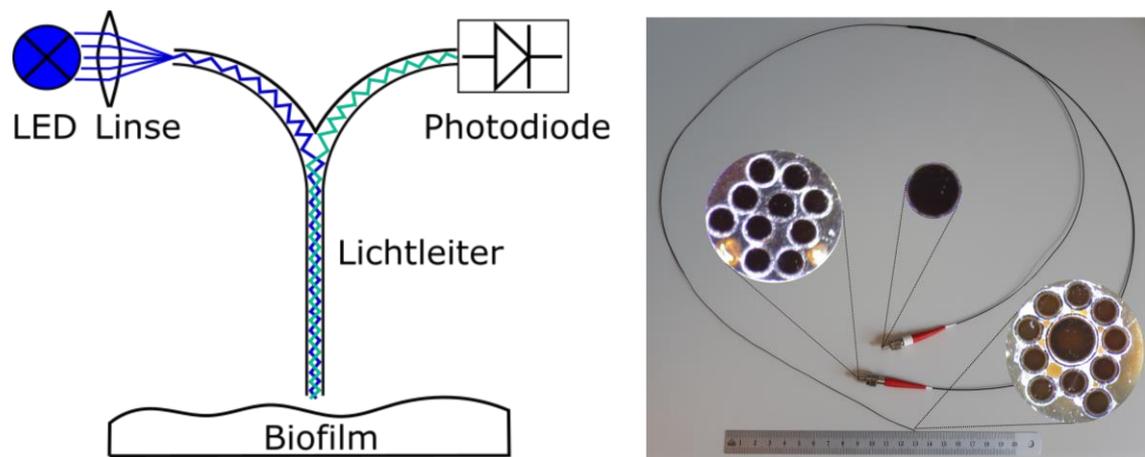


Abbildung 7: Lichtleiter mit einem Durchmesser an der Messspitze von $500\ \mu\text{m}$. Die jeweiligen Enden sind mit einer Vergrößerung von $640\times$ dargestellt.

Alle Fasern haben eine numerische Apertur von $0,22$ und somit einen Öffnungswinkel von $12,71^\circ$ [52]. Der Öffnungswinkel und somit der Messbereich sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

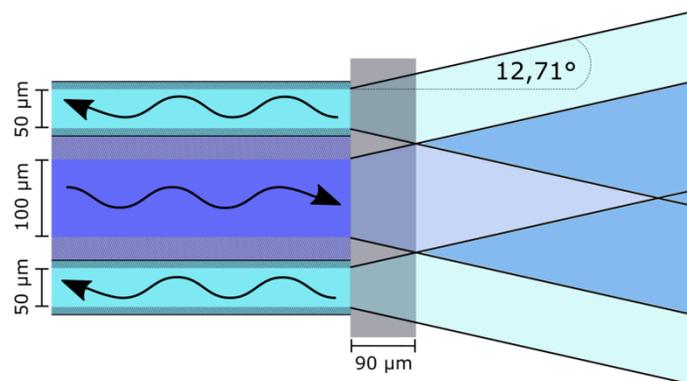


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels des Lichtleiters „Prototyp 1“.

Der Öffnungswinkel charakterisiert den Messbereich des Sensors. Nur Licht, welches in den in Abbildung 8 dunkel-blau markierten Bereich gelangt, kann Fluorophore anregen, deren Emissionsenergie über die Fasern zur Detektionseinheit gelangen und gemessen werden kann. Aufgrund des Öffnungswinkels der Fasern sowie deren Ummantelung ergibt sich für den Lichtleiter ein Bereich, in dem die Bereiche der Exzitation und Emission nicht überlappen. Dieser Bereich kann als Totzone des Sensors betrachtet werden und weist eine Länge von 90 μm auf. Emissionsenergie in diesem Bereich kann nicht in die Fasern zur Detektionseinheit gelangen. Zusammenfassend bedeutet dies auch, dass Messungen mit diesem Lichtleiter in einem Abstand von $>90 \mu\text{m}$ zur Probe durchgeführt werden sollten. Aus der schematischen Darstellung des Öffnungswinkels geht außerdem hervor, dass sich mit Veränderung der Distanz zum Lichtleiter auch der Messbereich verändert. Dies kann sich auf Messungen im Biofilm bei unterschiedlichen Eindringtiefen auswirken.

Neben der Totzone ergibt sich zusätzlich ein Bereich, in welchem Emission gemessen werden kann, allerdings keine Exzitationsenergie hingelangt. Dieser Bereich macht den Sensor somit anfällig für Störgrößen in Form von Umgebungslicht. Da allerdings in Vorversuchen mit dem Lichtleiter eine vertauschte Anordnung der Fasern zu keiner Änderung im Signal geführt hat, wird die Faseranordnung wie bisher beschrieben verwendet.

4.3.1 Optimierung der Lichteinkopplung

In ersten Fluoreszenzmessungen mit dem Lichtleiter hat sich gezeigt, dass die Lichteinkopplung der LEDs ohne zusätzliche optische Komponenten mit Verlusten verbunden ist und Messwerte liefert, die mit Werten <100 RFI im Bereich des Grundrauschens einzuordnen sind. Da die Detektionsfläche im Vergleich zu anderen Fluoreszenzsensoren klein ist, ist eine effiziente Lichteinkopplung auf der Exzitationsseite von besonderer Wichtigkeit. Um dies zu optimieren, werden verschiedene optische Linsen zwischen LED und Lichtleiter eingesetzt und getestet. Optische Linsen erfordern in ihrer Ausrichtung und Fixierung hohe Präzision, da minimale Verschiebungen ausreichen, um den Fokuspunkt zu verlieren. Um einen Sensor zu entwickeln, der nur eine geringe Störungsanfälligkeit hat, soll ein Einlinsensystem in den Sensoraufbau integriert werden.

Bei optischen Linsen wird zwischen konvexen und konkaven Linsen unterschieden. Konkave Linsen streuen Licht und sind somit unter Verwendung nur einer Linse nicht für den Aufbau geeignet. Konvexe Linsen unterscheiden sich zwischen plankonvexen und doppelkonvexen Linsen. Doppelkonvexe Linsen brechen das durchstrahlende Licht doppelt im Gegensatz zu plankonvexen Linsen. Beide sphärischen Linsenarten haben gemein, dass sie Licht auf einen Punkt fokussieren. Dieser Fokuspunkt ist gleichzeitig der Brennpunkt der Linsen und somit der Punkt der optimalen Lichteinkopplung. Zusätzlich zur Testung der plankonvexen und doppelkonvexen Linse wird eine asphärische Linse verwendet. Im Gegensatz zu sphärischen Linsen ändert sich bei asphärischen Linsen der Krümmungsradius mit dem Abstand von der optischen Achse. Dies ermöglicht eine Korrektur der sphärischen Aberration und somit eine deutlich präzisere Fokussierung der Lichtstrahlen (Abbildung 9).

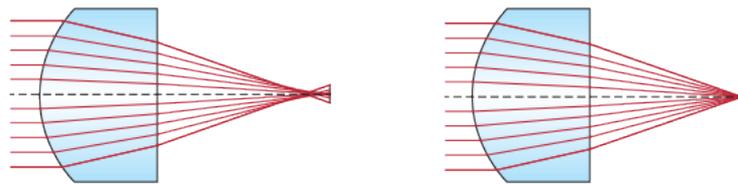


Abbildung 9: Schematische Darstellung der sphärischen Aberration einer sphärischen Linse (links) und einer asphärischen Linse (rechts) [23].

Für die Bestimmung des optimalen Abstands zwischen LED und Linse sowie zwischen Linse und Lichtleiter wird eine optische Bank genutzt (Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung Seite 96). Hier können alle Komponenten flexibel angeordnet und trotzdem präzise verwendet werden. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 10 dargestellt.

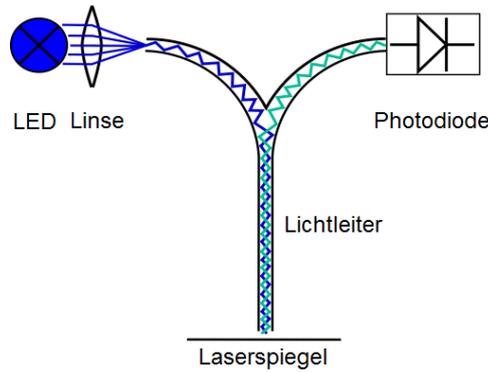


Abbildung 10: Schematischer Versuchsaufbau zur Optimierung der Lichteinkopplung. Der Abstand LED/Linse und Linse/Lichtleiter ist variabel und kann zur Optimierung verändert werden.

Um über den gesamten Lichtleiter zu messen wird an der Messposition ein Laserspiegel zur Reflexion eingesetzt. Dieser ermöglicht durch seine Materialeigenschaften eine verlustfreie Verwendung. Für die Detektion der reflektierten Strahlen, wird auf der Detektionsseite die Photodiode direkt mit dem Lichtleiter verbunden. Der Abstand der Linse zwischen LED und Linse wird variiert. Der Abstand zwischen Linse und Lichtleiter wird auf die vom Hersteller angegebene effektive Brennweite (kurz: EFL) eingestellt. Die ermittelten optimalen Abstände mit den erzielten relativen Signalintensitäten der Reflexionsmessungen mit den verwendeten Linsen sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Optimierter Abstand zwischen LED und Linse mit Signalintensität.

Linse	Abstand zur LED (mm)	Rel. Signalintensität (RSI)
DCX (EFL=9 mm)	11	2759
PCX (EFL=9 mm)	12	3436
Achromat (EFL=7,2 mm)	1	4448

Es zeigt sich, dass zwischen den Linsen große Unterschiede bestehen. Die achromatische Linse liefert unter den gleichen Bedingungen deutlich höhere Signalintensitäten als die konvexen Linsen. Dies kann mit einer besseren Fokussierung aufgrund der geringeren sphärischen Aberration begründet werden.

Zur Integration der achromatischen Linse mit den ermittelten optimalen Abständen in den Sensoraufbau wird mittels Additiver Fertigung eine Halterung gefertigt, in der die Linse mit den ermittelten Abständen fixiert wird (Abbildung 11). Mit diesem Prototyp werden erste Messungen in Referenzlösungen durchgeführt.

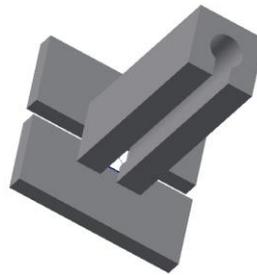


Abbildung 11: CAD-Design der additiv gefertigten Linsenhalterung. Die Halterung wird auf die LED gesetzt und der SMA-Stecker des Lichtleiters am anderen Ende positioniert. Die LED ist in der Halterung fixiert.

4.3.2 Bestimmung des linearen Messbereichs

Der entwickelte Sensor soll in der Endanwendung sowohl NADH als auch Flavine messen können. Dementsprechend werden zur Evaluierung des entwickelten Systems Messungen in Referenzlösungen von NADH und Riboflavin durchgeführt. Zusätzlich wurden die Referenzlösungen verdünnt, um den linearen Messbereich sowie die Grenzen des Systems zu beurteilen (Versuchsdurchführung siehe Seite 96).

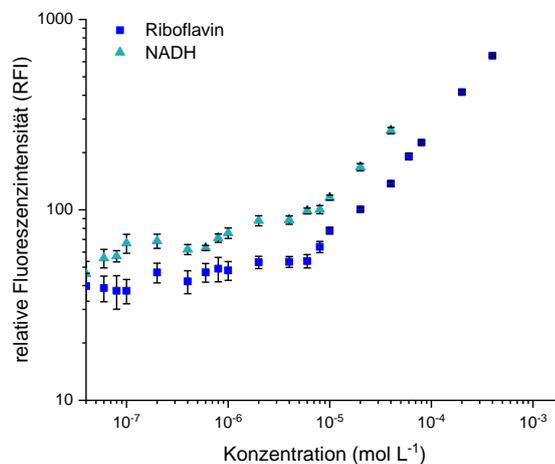


Abbildung 12: Bestimmung der Sensitivität des Sensors „Prototyp 1“. Es sind die relativen Fluoreszenzintensitäten von Riboflavin und NADH gegen die Konzentration aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Konzentration an Fluorophor. Die Signalintensität ist trotz hoher Verstärkung des Signals bei maximal 900 RFI. Da Fluoreszenzintensitäten <100 RFI eher im Grundrauschen liegen, können Konzentrationen <10⁻⁵ mol L⁻¹ nicht signifikant gemessen werden. Dementsprechend

ist die Auflösung der Messungen vergleichsweise gering. Der lineare Messbereich beginnt bei beiden Fluorophoren bei Konzentrationen $>10^{-5}$ mol L⁻¹.

Insgesamt zeigt sich, dass der entwickelte Sensor, welcher an der Messspitze einen Durchmesser von 500 µm aufweist, Messungen von NADH und Riboflavin grundsätzlich ermöglicht. Allerdings ist der lineare Messbereich sehr gering. Für die Anwendung in Bioprocessen bzw. für die Biofilmanalyse soll ein größerer linearer Bereich abgedeckt werden, um auch geringe Konzentrationen an intrinsischen Fluorophoren verlässlich detektieren und metabolische Aktivitäten frühzeitig erkennen zu können.

4.3.3 Schlussfolgerung

Es konnte ein Sensor entwickelt werden, der eine optische Messung der biogenen Fluorophore ermöglicht. Der Sensor erfüllt mit einem Durchmesser von 500 µm die gestellten Anforderungen an einen dünnen Sensor. Die Lichteinkopplung konnte durch den Einsatz von optischen Linsen deutlich optimiert werden. Die Messungen der biogenen Fluorophore verliefen erfolgreich, liefern aber im Vergleich zu bereits entwickelten Sensoren einen kleinen linearen Messbereich [47]. Der Messbereich ist außerdem für Messungen in Bakterien und Biofilmen nicht sensitiv genug, da nur Konzentrationen ab 10^{-5} mol L⁻¹ selektiv gemessen werden können. Geringe Konzentrationen, die zu Beginn von Kultivierungen erwartet werden, können nicht detektiert werden. Eine umfassende und aussagekräftige Analyse einer Kultivierung wäre somit nicht möglich.

Grundsätzlich zeigt sich, dass der Messaufbau aus einem Y-förmigen Lichtleiter mit einem Strang für die Exzitation und einem für die Emission für Fluoreszenzmessungen geeignet ist. In einem weiteren Schritt müssen sowohl die Exzitationseinheit als auch die Detektionseinheit optimiert werden. Da nur ein Strang für vier Wellenlängen zur Verfügung steht, muss ein System entwickelt werden, welches einen Wechsel der LEDs bzw. der Bandpassfilter ermöglicht. Zusätzlich wird der Lichtleiter hinsichtlich des Durchmessers der einzelnen Fasern sowie des Gesamtdurchmessers vergrößert, um sowohl eine effizientere Exzitation als auch Detektion zu erzielen.

4.4 Prototyp 2

Der Aufbau des Sensors aus Kapitel 4.3 wird aufgrund des schmalen Messbereichs weiter optimiert. Hierzu wird sowohl der Lichtleiter als auch die Exzitationseinheit angepasst. Um eine effizientere Lichteinkopplung zu erreichen, werden statt der bisherigen SMD-LEDs high power SMD-LEDs der gleichen Wellenlänge verwendet. Diese haben bei gleichbleibender Größe der LED selbst eine deutlich höhere Intensität und ermöglichen so die Einkopplung von mehr Photonen in den Lichtleiter.

Neben der Exzitationseinheit wird auch der Lichtleiter angepasst. Da weiterhin das Ziel verfolgt wird, orts aufgelöst messen zu können, wird der Durchmesser des Lichtleiters auf 1000 μm erhöht. Im Gegensatz zu „Prototyp 1“ werden die Fasern hinsichtlich ihres Verhältnisses zwischen Exzitations- und Detektionsfasern anders aufgeteilt. Das Faserbündel unterteilt sich in sechs Fasern zur Detektion und einer zur Exzitation (Abbildung 13, Konstruktionszeichnung siehe Seite 89).

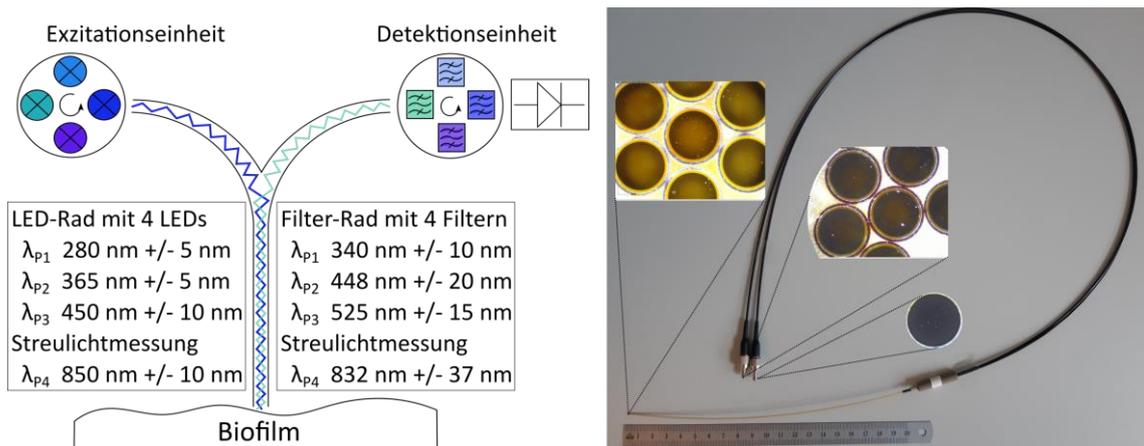


Abbildung 13: Lichtleiter „Prototyp 2“. Links: schematische Darstellung des Sensoraufbaus. Die verwendeten Wellenlängen der LEDs und Bandpassfilter sind ebenfalls gelistet. Rechts: Aufnahme des Lichtleiters. Die Enden wurden zusätzlich mit einer 645x Vergrößerung aufgenommen.

Die Fasern weisen die gleiche numerische Apertur auf wie der Lichtleiter „Prototyp 1“, haben aber jeweils einen Durchmesser von 200 μm . Im Vergleich zu „Prototyp 1“ vervierfacht sich somit die Exzitationsfläche gemäß $A = \pi r^2$. Die Detektionsfläche erhöht sich um den Faktor 9,6. Sowohl der schematische Aufbau des Lichtleiters als auch eine Übersichts- und Detailaufnahme des Lichtleiters sind in Abbildung 13 dargestellt. Da die numerische Apertur der Fasern gleichbleibend zu „Prototyp 1“ ist, bleibt die Totzone von 90 μm ebenfalls gleich (Abbildung 14).

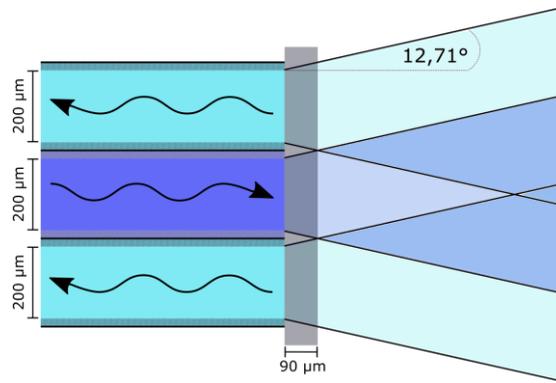


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels des Lichtleiters „Prototyp 2“.

4.4.1 Aufbau der Messeinheit

Die Messeinheit unterteilt sich in die optischen und elektronischen Komponenten des Sensors, welche in einer Messbox installiert sind (Abbildung 15). Bei den optischen Komponenten handelt es sich um die Exzitations- sowie Detektionseinheit. Die elektronische Komponente beinhaltet neben Ethernetanschluss und Spannungsversorgung einen Einplatinencomputer (Linux-Rechner), welcher die optischen Einheiten ansteuert und die Verarbeitung der Messdaten ermöglicht. Über einen zusätzlichen Kondensator wird eine unterbrechungsfreie Spannungsversorgung gewährleistet. Außerdem werden Spannungsspitzen vermieden. Der Einplatinencomputer ermöglicht eine interne Speicherung sowohl der Messdaten sowie des Messskripts. Es handelt sich somit um ein vollständig autarkes Messgerät.

Eine Konstruktionszeichnung mit Bemaßung, der Schaltplan der elektronischen Komponenten sowie die Spezifikationen der elektronischen und optischen Komponenten sind in Kapitel „7.3 Aufbau und Funktion des Sensors „Prototyp 2““ (Seite 89) dargestellt.

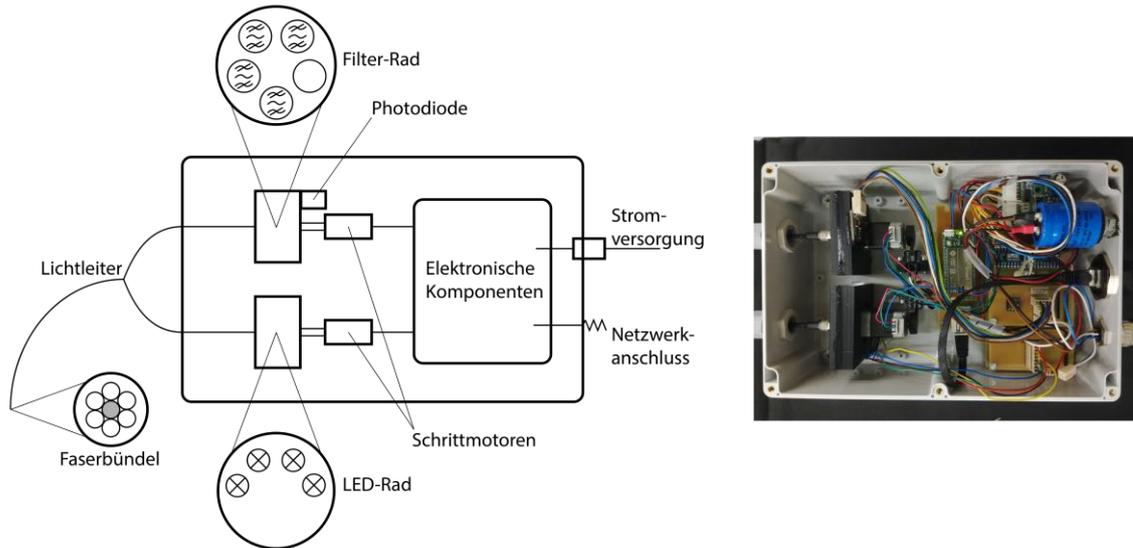


Abbildung 15: Aufbau der Messeinheit. Links: schematische Darstellung des Sensoraufbaus. Rechts: Foto der Messbox zum Vergleich mit der schematischen Darstellung.

Exzitations- und Detektionseinheit

Insgesamt bietet der Sensoraufbau die Möglichkeit 16 LED/Bandpassfilter-Kombinationen anzusteuern. Hiervon sind allerdings nur 4 Kombinationen zielführend, sodass sich im Folgenden auf diese beschränkt wird. Da alle gewünschten Wellenlängen über einen Lichtleiterstrang eingekoppelt sowie detektiert werden, müssen die LEDs sowie die Bandpassfilter beweglich positioniert werden. Hierzu werden die LEDs sowie die Bandpassfilter auf einer runden Scheibe installiert (Abbildung 16, links).

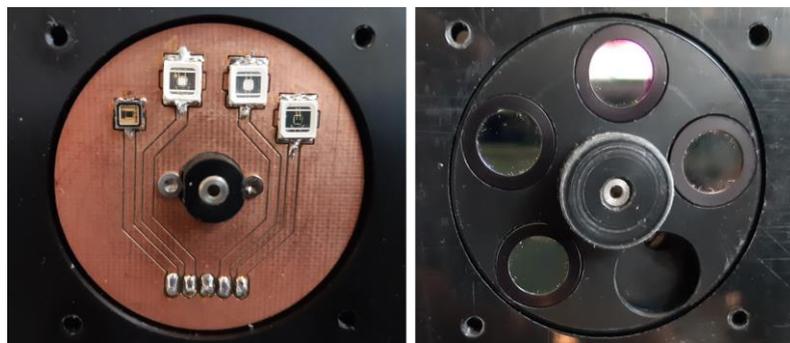


Abbildung 16: Links: LED-Rad mit 4 LEDs. Rechts: Filter-Rad mit 4 Bandpassfiltern und einer zusätzlichen Position.

Das sogenannte LED-Rad wird über einen Schrittmotor, welcher eine Auflösung von $1,7^\circ$ hat, bewegt und ermöglicht die Positionierung der LEDs. Die Spektren der verwendeten LEDs sind in Abbildung 17 (links) dargestellt. Auf bewegliche Komponenten wird in kommerziellen Spektrometern und Sensoren weitestgehend verzichtet, da diese durch mechanische Einflüsse in ihrer Genauigkeit beeinträchtigt werden können. Um diesen Fehler trotz beweglicher Elemente zu minimieren, ist eine Referenz notwendig. Nur so kann gewährleistet werden, dass auch nach mehrmaligen Messungen die Komponenten exakt positioniert werden. Als Referenzkörper wird eine Lichtschranke verwendet, welche durch einen Steg auf dem LED-Rad ausgelöst wird. Von hier aus werden die LEDs angesteuert und regelmäßige Referenzfahrten gemacht, um zu gewährleisten, dass die Positionierung reproduzierbar ist.

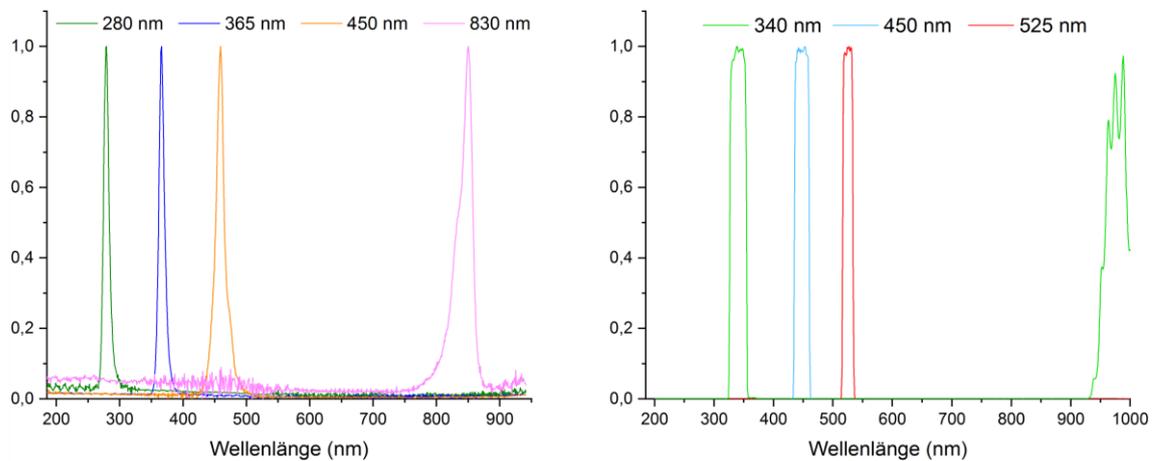


Abbildung 17: Spektren der verwendeten optischen Komponenten. Links: Spektren der LEDs. Rechts: Spektren der Bandpassfilter.

Für die Detektionseinheit wurde ein ähnlicher Aufbau wie bei der Exzitationseinheit gewählt. Sie besteht aus einer Photodiode und optischen Bandpassfiltern. Letztere dienen der selektiven Detektion und sind auf einer radialen Scheibe angeordnet, welche über einen Schrittmotor bewegt wird (Abbildung 16, rechts). Die Spektren der verwendeten Bandpassfilter sind in Abbildung 17 (rechts) dargestellt. Es zeigt sich für alle Bandpassfilter ein schmaler Wellenlängenbereich. Lediglich der 340 nm-Bandpassfilter hat neben dem Peak der Messwellenlänge einen zusätzlich Bereich, in dem Licht durchgelassen wird. Da dieser allerdings bei >900 nm liegt, wird die Messung nicht beeinflusst. Bei Messungen mit Umgebungslicht muss dieser Aspekt allerdings berücksichtigt werden.

Als Referenzkörper dient hier ebenfalls eine Lichtschranke. Neben den Positionen für die vorgesehenen Bandpassfilter wird eine weitere Position integriert. Der Sensor kann somit entweder um weitere Detektionswellenlängen erweitert oder ohne vorgeschalteten Bandpassfilter verwendet werden.

Der Gesamtaufbau des Sensors ist in Abbildung 18 dargestellt. Außerdem verweist der QR-Code auf eine Videoaufnahme, in welcher eine Messung des Sensors von NADH und Riboflavin gezeigt wird. Im Video ist zusehen, wie zunächst eine Referenzfahrt des Filter- und des LED-Rads durchgeführt wird. Anschließend erfolgt die Messung im NADH-Kanal bei 365 nm/450 nm (EX/EM) und im Flavin-Kanal bei 450 nm/525 nm (EX/EM). Nach einer kurzen Pause wird erneut eine Messung je Kanal durchgeführt. Der Ablauf der Messung kann im Konsolenfenster verfolgt werden.

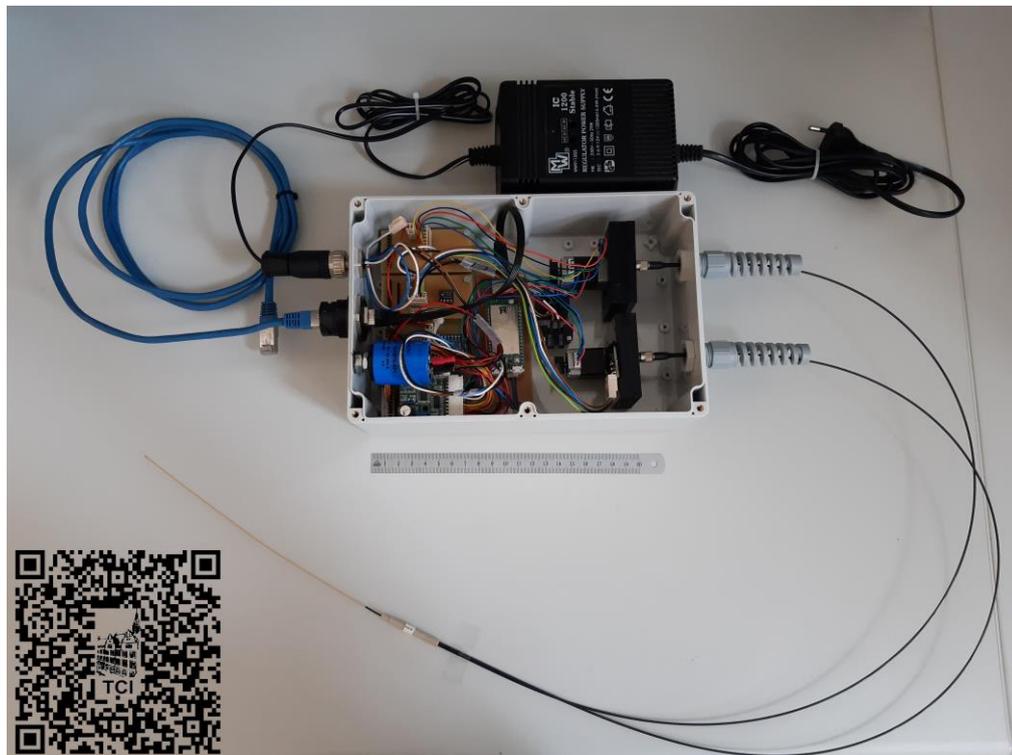


Abbildung 18: Aufbau des Sensors. Der Lichtleiter ist mit der Messbox verbunden. Die Messbox beinhaltet die optischen Komponenten Exzitations- und Detektionseinheit sowie die elektronischen Komponenten. Die Messbox wird mit dem Netzwerk verbunden und ermöglicht eine autarke Messung. Der QR-Code verweist auf eine Videosequenz, in der NADH sowie Riboflavin mit dem Sensor vermessen werden. Die einzelnen Schritte werden im Konsolenfenster im rechten Videorand dargestellt.

Messsoftware

Die Messungen mittels des entwickelten Fluoreszenzensors werden über eine im Rahmen der Arbeit entwickelten Software gesteuert. Die Software basiert auf Python-Skripten welche anwendungsspezifisch erstellt und ausgeführt werden können. Die Skripte sind auf dem im Sensor verbauten Einplatinencomputer hinterlegt und können jederzeit verändert werden.

Es sind sowohl Skripte bezüglich der grundlegenden Einstellungen hinterlegt, als auch ein Messskript. Bei den Skripten für allgemeine Einstellungen handelt es sich um Programme, die die Positionen der LEDs und der Bandpassfilter bestimmen. Hierbei werden die Positionen, die in näherer Umgebung um die aktuell hinterlegte Position sind, abgetastet und eine Messung durchgeführt. Die Position, die die höchsten Werte liefert, wird anschließend als Position für die entsprechende LED gespeichert. Dieses Skript ist sowohl für die LEDs als auch für die Bandpassfilter hinterlegt und sollte regelmäßig durchgeführt werden, um jederzeit eine optimale Messung zu gewährleisten.

Das eigentliche Messskript kann jederzeit an die gewünschte Messung angepasst werden. Eine Messung verläuft immer nach dem gleichen Prinzip. Zunächst wird eine Referenzfahrt des LED-Rads und des Filter-Rads durchgeführt, um die Ausgangspositionen der optischen Komponenten anzusteuern. Anschließend erfolgt die eigentliche Messung. Die gewünschten LEDs und Bandpassfilter können frei kombiniert werden. Das Messverfahren bzw. die SNR-Optimierung basiert auf dem in Kapitel 3.2.3 vorgestelltem Verfahren der Mittelung mit anschließender Integration. Die LED wird hierbei zweimal über einen Zeitraum von 100 ms angeschaltet und der Mittelwert aus dem resultierendem Signal gemessen. Insgesamt wird die Messung viermal wiederholt, sodass sich eine Messdauer von 800 ms ergibt. Das an der Photodiode detektierte Signal kann über einen Verstärkungsfaktor erhöht werden, um zusätzlich Rauscheinflüsse zu reduzieren. Der Ablauf einer Messung ist schematisch in Abbildung 19 dargestellt. Zusätzlich ist ein beispielhafter Source-Code in Tabelle 20 (Kapitel „7.3 Aufbau und Funktion des Sensors „Prototyp 2““, Seite 89) aufgeführt.

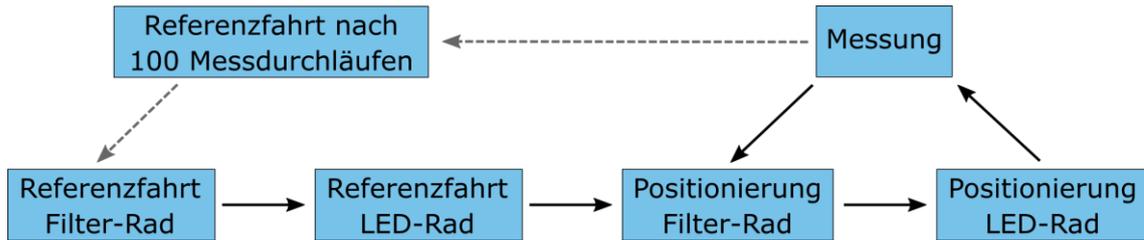


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Messablaufs. Zunächst werden Referenzfahrten durchgeführt. Im Anschluss findet die Messung statt. Nach insgesamt 100 Messdurchläufen erfolgt eine erneute Referenzfahrt des LED- und Filter-Rads. Ein Messdurchlauf besteht aus maximal vier Messungen, da maximal 4 Wellenlängenkombinationen gemessen werden.

Nach erfolgter Messung kann die nächste LED/Filter-Kombination angesteuert werden und eine nächste Messung erfolgen. Ein Messdurchlauf umfasst die Messungen aller gewünschten Wellenlängenkombinationen. Nach insgesamt 100 Messdurchläufen wird eine erneute Referenzfahrt sowohl des LED- als auch des Filter-Rads durchgeführt, um jederzeit eine exakte Positionierung der Komponenten zu gewährleisten. Der Zähler wird anschließend wieder auf 0 gesetzt. Für die Auswertung der aufgenommenen Daten werden diese auf einem Server bereitgestellt, von welchem sie abgerufen und z. B. mit ProfiSignal während der Messung visualisiert werden können.

Zusätzlich werden die Daten auf dem im Sensor verbauten Linux-Rechner gesichert. Der Linux-Rechner in Kombination mit dem Kondensator ermöglicht neben der Speicherung der Messdaten auch eine Speicherung der Skripte und somit eine autarke Messung. In Kapitel „7.3 Aufbau und Funktion des Sensors „Prototyp 2““ (Seite 89) ist der Datenfluss des Sensors sowie die Software graphisch dargestellt.

Optimierung der Lichteinkopplung

Um die Effizienz des Sensors zu steigern, wird die Exzitationseinheit weiter optimiert. Anstelle der in „Prototyp 1“ verwendeten SMD-LED wird eine high-power SMD-LED verwendet. Diese weist eine deutlich höhere Leistung auf als die bisher verwendete. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der optimierten Lichteinkopplung durch den Wechsel der LED sowohl unter Verwendung einer asphärischen Linse als auch ohne zusätzliche optische Komponenten.

Tabelle 4: Relative Signalintensitäten der Lichteinkopplung mit und ohne achromatische Linse im Vergleich.

Linse	Abstand zur LED (mm)	Rel. Signalintensität (RSI)
Achromat (EFL=7,2 mm), alte LED (Prototyp 1)	1	4448
Achromat (EFL=7,2 mm), neue LED (Prototyp 2)	1	~4124*
Ohne Linse, neue LED (Prototyp 2)	-	7236

*der angegebene Wert wurde gerundet, da das Experiment mit einem anderen Abstand zum Spiegel durchgeführt wurde. Die Änderung hat keinen Einfluss auf die Messung.

Mit der SMD-LED mit achromatischer Linse konnte eine relative Signalintensität von 4448 RFI erzielt werden. Für die high-power SMD-LED wurden die gleichen Messungen durchgeführt und ohne Verwendung einer Linse ein um 62 % höheres Signal erzielt werden. Unter zusätzlicher Verwendung einer achromatischen Linse wurde eine geringere Intensität gemessen. Dies kann mit einem Verlust der Lichtenergie aufgrund eines größeren Abstands zwischen LED und Lichtleiter erklärt werden. Da die Intensität der LED so hoch ist, dass ein Maximum an Intensität eingekoppelt werden kann, muss in folgenden Experimenten keine optische Linse verwendet werden. Dies vereinfacht den Sensoraufbau und macht ihn weniger anfällig gegenüber mechanischen Störungen.

Entwicklung einer Führhülse für Schüttelkolbenkultivierungen

Einer der Hauptanwendungsbereiche des entwickelten Sensors soll der Einsatz in der mikrobiellen Brennstoffzelle sein. Da es sich hierbei um ein abwasserbasiertes System handelt, ist eine Sterilisierbarkeit des Sensors nicht notwendig. Allerdings soll der entwickelte Sensor unter anderem auch die Möglichkeit bieten, unter sterilen Bedingungen verwendet zu werden. Aufgrund der Größe des Sensors könnte eine Möglichkeit der Einsatz in Schüttelkolbenkultivierungen sein. Hierfür soll eine Führhülse entwickelt werden, welche in den Kolbendeckel des Schüttelkolbens integriert werden kann. In der Führhülse wird ein Saphirglas verbaut, durch welches Messungen mit dem Sensor gemacht werden können. Zwischen Sensor und Messort befindet sich somit ein Fenster, welches hinsichtlich seines Einflusses auf die Messung analysiert werden muss.

Um zu analysieren, welchen Einfluss diese Konstruktion auf das Messsignal hat, wird die mögliche Dicke des Saphirfensters bestimmt. Hierzu werden Messungen mit zwei hinsichtlich ihrer Dicke unterschiedlichen Saphirgläsern vor dem Lichtleiter in einer Referenzlösung aus Riboflavin durchgeführt.

Tabelle 5: Entwicklung einer Führungshülse für den Fluoreszenzsensor. Es sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen mit verschiedenen Glasdicken vor der Messspitze aufgelistet.

Glasdicke (μm)	Rel. Fluoreszenzintensität
0	1395
500	1332
1000	1194

Es hat sich gezeigt, dass Messungen ohne Saphirglas und mit einem $500 \mu\text{m}$ Glas ähnliche Messergebnisse liefern (Tabelle 5). Der Signalverlust liegt bei <100 RFI, was einer Abweichung von $<5\%$ entspricht. Wird allerdings ein Glas mit einer Dicke von $1000 \mu\text{m}$ verwendet, verschlechtert sich das messbare Signal um $14,5\%$. Hierbei wird die Entfernung zwischen Probe und Lichtleiter so groß, dass sowohl Verluste bei der Exzitation als auch bei der Emission vermutet werden können. Basierend auf den Messungen in einer Referenzlösung, wird in die Führungshülse ein Saphirglas mit einer Dicke von $500 \mu\text{m}$ integriert.

4.4.2 Evaluierung des Sensors

Für eine Evaluierung des entwickelten Sensors werden verschiedene Analysen durchgeführt. Der Sensor wird hinsichtlich seiner optischen sowie der elektronischen Komponenten untersucht. Unter anderem sollen mittels einer Langzeitmessungen zum einen die Stabilität der elektronischen Komponenten analysiert und zum anderen die Präzision der beweglichen Komponenten des Sensors evaluiert werden. Des Weiteren sollen durch Messungen bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten sowie Temperaturen die Funktionalität des Fluoreszenzensors bestätigt werden.

Einfluss der LED Leistung

Im entwickelten Sensor sind high power LEDs verbaut, welche mit maximaler Intensität in den Lichtleiter eingekoppelt werden sollen, um ein Maximum an Exzitation zu erreichen. Es stellt sich allerdings die Frage, ob und in wie weit die LED-Leistung das Fluoreszenzsignal beeinflusst. Erwartet wird, dass das Verhalten linear ist und keinen negativen Einfluss auf das Signal hat (Versuchsdurchführung siehe Seite 97).

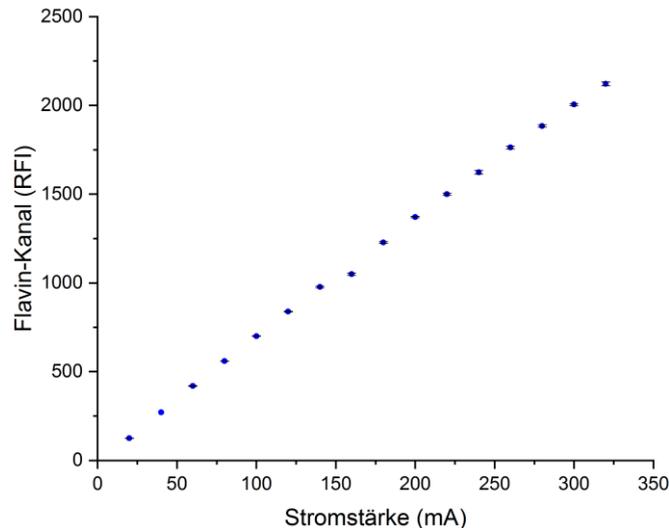


Abbildung 20: Bestimmung des LED-Einflusses auf die Fluoreszenzmessung. Es ist die relative Fluoreszenzintensität gegen die Stromstärke, mit der die LED angesteuert wurde, aufgetragen.

In Abbildung 20 sind die ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Stromstärke der LED aufgetragen. Zwischen der Fluoreszenzintensität und der Stromstärke zeigt sich ein linearer Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,99$. Ein negativer Einfluss der hohen LED-Leistung auf das Fluoreszenzsignal kann somit ausgeschlossen werden, sodass für Fluoreszenzmessungen die maximale LED-Intensität verwendet werden kann.

Einfluss des Umgebungslichts

In dem entwickelten Sensor ist eine hochsensitive Photodiode verbaut. Diese ist notwendig, kann aber aufgrund der hohen Sensitivität zu empfindlich auf Umgebungslicht reagieren. Dementsprechend muss der Einfluss der hohen Sensitivität im Zusammenhang mit dem Umgebungslicht analysiert werden.

Hierzu werden Streulichtmessungen bei 365 nm, 450 nm und 830 nm offen im Labor, welches mit Leuchtstoffröhren ausgestattet ist, bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Umgebungslicht ist somit von den Leuchtstoffröhren und dem täglichen Betrieb im Labor abhängig. Die Messung wird über einen Zeitraum von 45 h durchgeführt, sodass betriebsbedingte Unterschiede reproduzierbar gemessen werden können (Versuchsdurchführung siehe Seite 97).

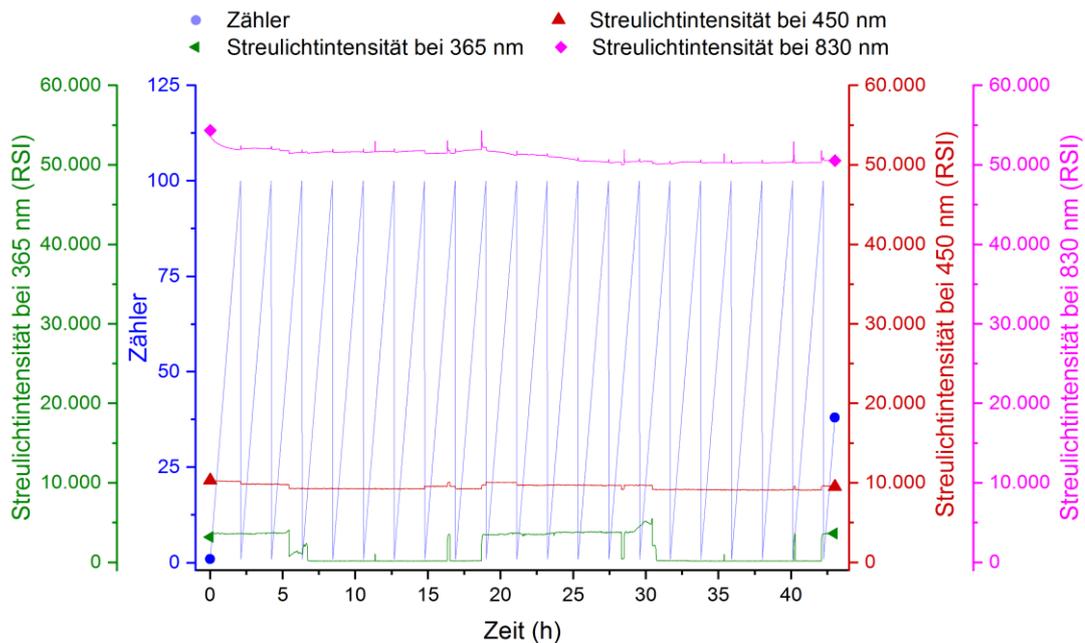


Abbildung 21: Bestimmung des Einflusses des Umgebungslichts auf die Streulichtmessung. Es sind die relativen Streulichtintensitäten (365 nm, unteres Signal; 450 nm, mittlere Linie; 830 nm, obere Linie) gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich zu den Streulichtintensitäten ist der Zähler (blau) aufgetragen, um Referenzfahrtbedingte Abweichungen auszuschließen.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Streulichtmessungen gegen die Zeit dargestellt. Es zeigt sich, dass bei 450 nm und 830 nm der Einfluss des Umgebungslichts auf das Signal vernachlässigbar ist. Bei 450 nm erhöht sich das Streulichtsignal unter Einfluss des Umgebungslichts um 4,4 %. Die Streulichtmessung bei 830 nm liefert eine Abweichung von 2,6 %. Diese ist gemäß der Messung unabhängig vom Umgebungslicht, da das Signal im Laufe der Messung absinkt. Dies kann mit der Betriebsdauer der LED, welche sich negativ auf die LED-Intensität auswirkt, erklärt werden. Bei beiden Streulichtmessungen sind die Abweichungen $<5\%$ und können somit als vernachlässigbar eingestuft werden. Lediglich die Streulichtmessung bei 365 nm weist signifikante Einflüsse durch

das Umgebungslicht auf. Anhand des Signals kann deutlich das Einschalten sowie Ausschalten der Beleuchtung im Labor abgelesen werden. Das Signal erhöht sich beim Einschalten um den Faktor 20. Allerdings bleibt das Signal dann konstant und wird nicht durch weitere Einflüsse beeinträchtigt.

Insgesamt zeigt sich, dass der Einfluss des Umgebungslichts auf den Sensor nicht bei allen Kanälen bzw. Wellenlängen berücksichtigt werden muss. Allerdings wird aufgrund der hohen Abweichung bei 365 nm festgehalten, dass der Einsatz des Sensors in konstant beleuchteten Systemen erfolgen sollte. Für nachfolgende Experimente bedeutet dies, dass die Messumgebung abgedunkelt werden muss.

Langzeitstabilität

In einem weiteren Schritt soll die Stabilität der optischen und elektronischen Komponenten für Langzeitmessungen evaluiert werden. Hierzu werden die LEDs nacheinander in den Lichtleiter eingekoppelt und das zurückgestreute Licht an der Photodiode gemessen. Der Versuch wird unter Ausschluss des Umgebungslichts durchgeführt. Es soll sowohl die Zuverlässigkeit der Positionierung der Komponenten durch die Schrittmotoren als auch die Genauigkeit der Referenzfahrt geprüft werden. Bei der Referenzfahrt handelt es sich um eine Komponente des Systems, die sicherstellen soll, dass die LEDs sowie die Bandpassfilter auch nach mehrmaligen Wechseln noch exakt positioniert werden. Eine Referenzfahrt wird alle 100 Messungen durchgeführt (Versuchsdurchführung siehe Seite 98).

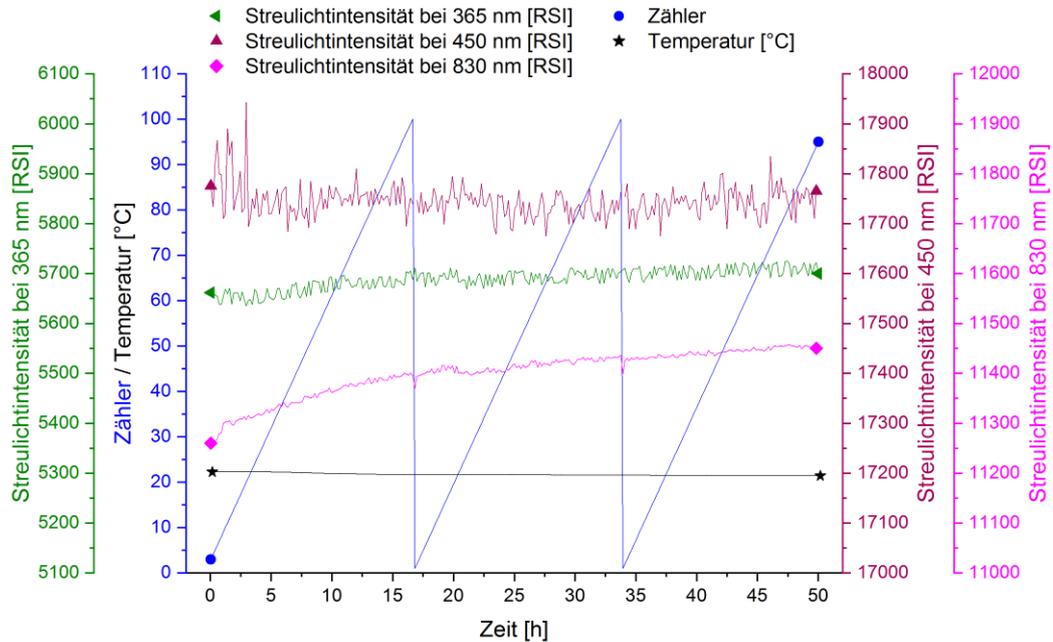


Abbildung 22: Bestimmung der Langzeitstabilität. Auf den linken x-Achsen sind Zähler und Temperatur sowie die Streulichtintensität bei 365 nm gegen die Zeit aufgetragen. Auf den rechten x-Achsen jeweils die Streulichtintensitäten bei 450 nm und 830 nm.

Die Messung der Langzeitstabilität in Abbildung 22 zeigt, dass das System insgesamt sehr stabil funktioniert. Das Messrauschen des Streulichts der 365 nm und der 450 nm LED liegt bei 2 %, das Rauschen der 830 nm LED <1 %. Bei der 830 nm LED steigt das Signal allerdings über den Zeitraum der gesamten Messung um 2 % an. In späteren Versuchen konnte bei gleichem Messaufbau über einen längeren Zeitraum gezeigt werden, dass das Signal nicht weiter ansteigt. Auch die Durchführung der Referenzfahrten verändert das Signal nicht und zeigt somit, dass das System zuverlässig funktioniert.

Strömungsstabilität

Der entwickelte Sensor soll für Messungen in Bioprozessen verwendet werden. Hier sind Strömungen zur Durchmischung und zum Gaseintrag notwendig. Da der Sensor einen geringen Durchmesser hat, muss geprüft werden, ob sich durch Strömung der Lichtleiter bewegt und ob die Strömung einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal hat. Da bei der Kultivierung von Biofilmen mit maximal laminaren Strömungen gearbeitet wird, wird der Einfluss von laminaren Strömungen auf eine Fluoreszenzmessung in einer Durchflusskammer bestimmt (Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung siehe Seite 98).

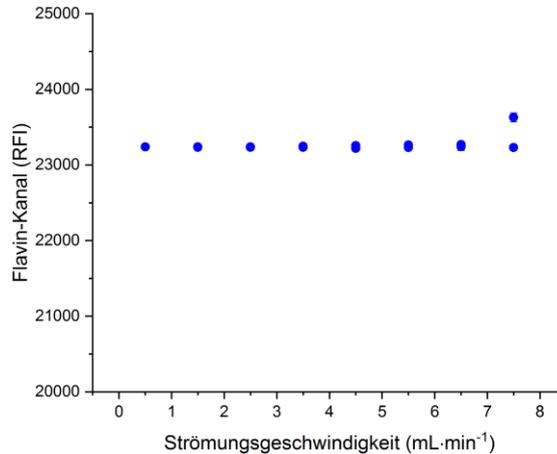


Abbildung 23: Bestimmung des Einflusses der Strömungsgeschwindigkeit auf das Fluoreszenzsignal. Es wurde die relative Fluoreszenzintensität von Riboflavin bei zunehmenden und abnehmenden Strömungsgeschwindigkeiten gemessen.

Abbildung 23 zeigt den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf das Fluoreszenzsignal exemplarisch am Flavin-Kanal. Im Bereich von 0 bis 6,5 mL·min⁻¹ bleibt das Fluoreszenzsignal konstant. Bei 7,5 mL·min⁻¹ kann eine Abweichung von 1,7 % in der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden. Verglichen mit den Abweichungen aus der Langzeitstabilität kann diese Abweichung aufgrund von Signalrauschen entstanden sein und wird nicht weiter analysiert. Es hat sich somit gezeigt, dass Strömungsgeschwindigkeiten im laminaren Bereich keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensitäten haben und der Sensor ohne Berücksichtigung der Strömung in Systemen mit laminaren Strömungen verwendet werden kann.

Temperatursensitivität

Zur weiteren Evaluation des entwickelten Fluoreszenzensors wird die in der Literatur bekannte Abhängigkeit zwischen Temperatur und Fluoreszenz ausgenutzt. Gemäß Literatur nimmt die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Temperatur ab, da durch die schnellere Bewegung der Teilchen diese häufiger kollidieren und es so zu Quenchingeffekten kommt (Kapitel „3.2.1 Grundprinzip“).

Der Effekt soll mit dem entwickelten Sensor detektiert werden. Hierzu wird Riboflavin gelöst und von 10°C auf 60°C erwärmt (Versuchsdurchführung siehe Seite 99). Während des gesamten Prozesses wird die relative Fluoreszenzintensität von Riboflavin mit dem Fluoreszenzsensor bei 450 nm/525 nm (EX/EM) gemessen.

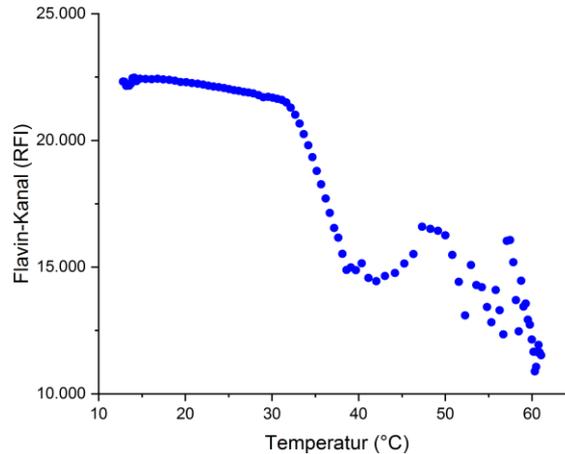


Abbildung 24: Bestimmung des Einflusses der Temperatur. Es ist die relative Fluoreszenzintensität des Flavin-Kanals gegen die Temperatur aufgetragen.

In Abbildung 24 ist die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur aufgetragen. Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit, da das Signal mit zunehmender Temperatur nicht konstant bleibt. Von 12°C bis 35°C nimmt die Fluoreszenzintensität um 4,3 % ab. Anschließend fällt die Fluoreszenzintensität schnell auf ein Niveau von 15.000 RFI. Ab 40°C konnten keine konstanten Signale mehr aufgezeichnet werden. Der in der Literatur bekannte Sachverhalt der geringeren Fluoreszenzintensität bei höheren Temperaturen, konnte erfolgreich mit dem entwickelten Sensor nachgewiesen werden.

Da der Sensor für die Anwendung im Bioprozessbereich entwickelt wird, kann der Einfluss der Temperatur auf das Fluoreszenzsignal vernachlässigt werden. Sollte allerdings ein Temperaturgradient im Bioprozess gefahren werden, muss die Abhängigkeit berücksichtigt werden.

Korrelation der Fluoreszenz mit dem pH-Wert bei Chininsulfat

Zur weiteren Evaluierung wird die Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der pH-Wert-Abhängigkeit von Chininsulfat mittels des Fluoreszenzensors analysiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Fluoreszenzintensität von Chininsulfat bei pH-Werten im sauren Bereich deutlich höher ist als im basischen. Zur Analyse wurde eine Chininsulfatlösung mit verschiedenen pH-Werten im Bereich von pH 2 bis pH 10 angesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 365 nm/450 nm (EX/EM) gemessen.

In Abbildung 25 ist die relative Fluoreszenzintensität von Chininsulfat gegen den pH-Wert aufgetragen. Es konnte eine maximale Fluoreszenzintensität bei pH 3 mit 3290 RFI detektiert werden. Sowohl bei niedrigeren als auch bei höheren pH-Werten sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten geringer. Bei pH 10 konnte die niedrigste Fluoreszenzintensität mit 45 RFI detektiert werden.

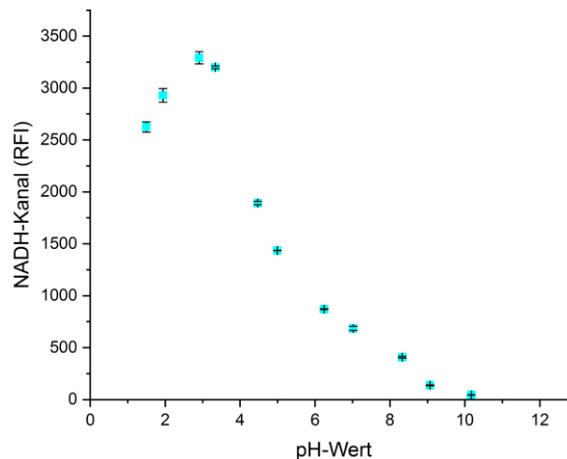


Abbildung 25: Evaluierung des Sensors anhand der Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität von Chininsulfat bei verschiedenen pH-Werten. Es sind die relativen Fluoreszenzintensitäten gegen den pH-Wert aufgetragen.

Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit dem pH-Wert. Die aus der Literatur bekannte pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von Chininsulfat konnte mit dem Fluoreszenzsensor detektiert werden. Dies bestätigt die Funktionalität des entwickelten Sensors.

4.4.3 Bestimmung der Sensitivität

Zur Anwendung des Sensors wird der lineare Messbereich des Sensors für die Fluorophore BSA, NADH und Riboflavin bestimmt. BSA wird als Standard für die Messung von Proteinen verwendet. Ziel des Versuchs ist es, die Anwendbarkeit des Sensors für Bioprozesse zu evaluieren. Geringe Konzentrationen, wie sie in der Zelle vorkommen, müssen mit dem Sensor messbar sein. Dementsprechend wurde die Maximalkonzentration durch die Löslichkeit und die Minimalkonzentration durch das Messsignal des Sensors festgelegt (Versuchsdurchführung siehe Seite 96).

Neben den Messungen mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor werden zusätzliche Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer als Referenz durchgeführt. Die Messungen sowohl des Fluoreszenzspektrometers als auch des Fluoreszenzensors sind in Abbildung 26 dargestellt.

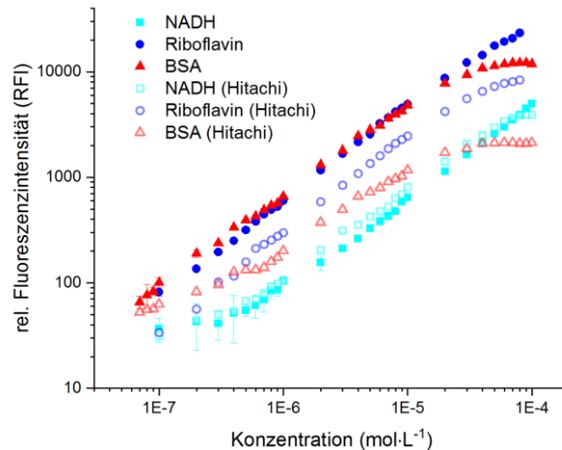


Abbildung 26: Bestimmung der Sensitivität. Es sind die relativen Fluoreszenzergebnisse von NADH, Riboflavin und BSA in Abhängigkeit zur Konzentration dargestellt. Die Messungen wurden sowohl mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor als auch mit dem Fluoreszenzspektrometer (Hitachi) als Referenz durchgeführt.

Die Messungen der einzelnen Fluorophore mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor zeigen deutliche lineare Bereiche mit geringen Messungenauigkeiten (<100 RFI). Für NADH konnte ein linearer Messbereich von $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bis $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt werden. Riboflavin konnte über einen deutlich größeren Bereich bei $450 \text{ nm}/525 \text{ nm}$ (EX/EM) gemessen werden. Es ergibt sich ein linearer Bereich von $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bis $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Mit der BSA-Referenzlösung wurde ein linearer Bereich für Proteine von $7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bis $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt. Neben dem linearen Messbereich konnte für den Protein-Kanal zusätzlich eine Sättigung und somit eine maximal messbare Konzentration ausgemacht werden. Ab einer BSA-Konzentration von $>1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ konnte keine weitere Steigung im Messsignal trotz steigender Konzentration nachgewiesen werden. Dies kann mit einer Sättigung an Fluorophor erklärt werden. Liegen zu viele Fluorophore vor, kommt der innere Filtereffekt zum Tragen (Kapitel „3.2.1 Grundprinzip“).

Die mit dem entwickelten Sensor durchgeführten Fluoreszenzmessungen sind vergleichbar mit denen des Fluoreszenzspektrometers. Es können ähnliche lineare Bereiche bei

konstanter Signalverstärkung aufgewiesen werden. Auch die Sättigung ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA wird mit dem Fluoreszenzspektrometer nachgewiesen. Zusätzlich zu der Vergleichbarkeit der Daten mit denen des Fluoreszenzspektrometers decken sich die Ergebnisse mit denen ähnlicher Sensoren [47]. König *et al.* haben einen Sensor entwickelt, der auf dem gleichen Messprinzip basiert. Allerdings weist der Sensor einen 10x größeren Durchmesser an der Messspitze auf und hat keine mobilen Komponenten verbaut. Die dennoch gute Vergleichbarkeit der Messungen zeigt, dass der entwickelte Sensor trotz des geringen Durchmessers und beweglicher Komponenten für Messungen eingesetzt werden kann.

Vor allem der Vergleich zu den Messungen an Riboflavin und NADH mit dem Sensor „Prototyp 1“ zeigt eine signifikante Verbesserung des Aufbaus. Der lineare Messbereich ist deutlich größer als der mit „Variante 1“ bestimmte. Zusätzlich können deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten gemessen werden, was die Auflösung der Messungen optimiert.

4.4.4 Bestimmung der Spezifität und Selektivität

Nach Bestimmung des linearen Messbereichs des Fluoreszenzensors für Proteine, NADH und Flavine, soll weiterhin analysiert werden, ob der Sensor neben einer hohen Sensitivität auch selektiv misst. Hierzu sind zwei Faktoren von großem Interesse. Zum einen soll analysiert werden, ob das Vorhandensein eines Fluorophors sich auch auf die anderen Messkanäle auswirkt und trotz Abwesenheit des Fluorophores ein Signal gemessen wird. Zum anderen muss analysiert werden, in wie weit sich die verschiedenen Fluorophore aufeinander auswirken. Hier ist der Kaskadeneffekt zu nennen, welcher aufgrund überlappender Fluoreszenzspektren auftritt. Mögliche Beeinflussungen sind die Fluoreszenz von Proteinen, welche bei 340 nm die gleiche Emissionswellenlänge aufweisen, mit welcher NADH angeregt wird. Zusätzlich ist auch die Emissionswellenlänge von NADH die Exzitationswellenlänge von Riboflavin. Liegen alle Komponenten nebeneinander vor kann es zu einem Kaskadeneffekt kommen und das Fluoreszenzsignal beeinflussen. Es wird erwartet, dass dieser Effekt aufgrund der zeitlich versetzten Messung der einzelnen Fluorophore keinen starken Einfluss hat. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einer Messung der Emission diese durch Anregung eines anderen Fluorophors geschwächt ist.

Zunächst wird die Selektivität der Kanäle hinsichtlich der Beeinflussung durch andere Fluorophore getestet. Hierzu wurden erneute Kalibrationsreihen an BSA, NADH und Riboflavin erstellt und jeweils mit allen Messkanälen vermessen (Versuchsdurchführung siehe Seite 99).

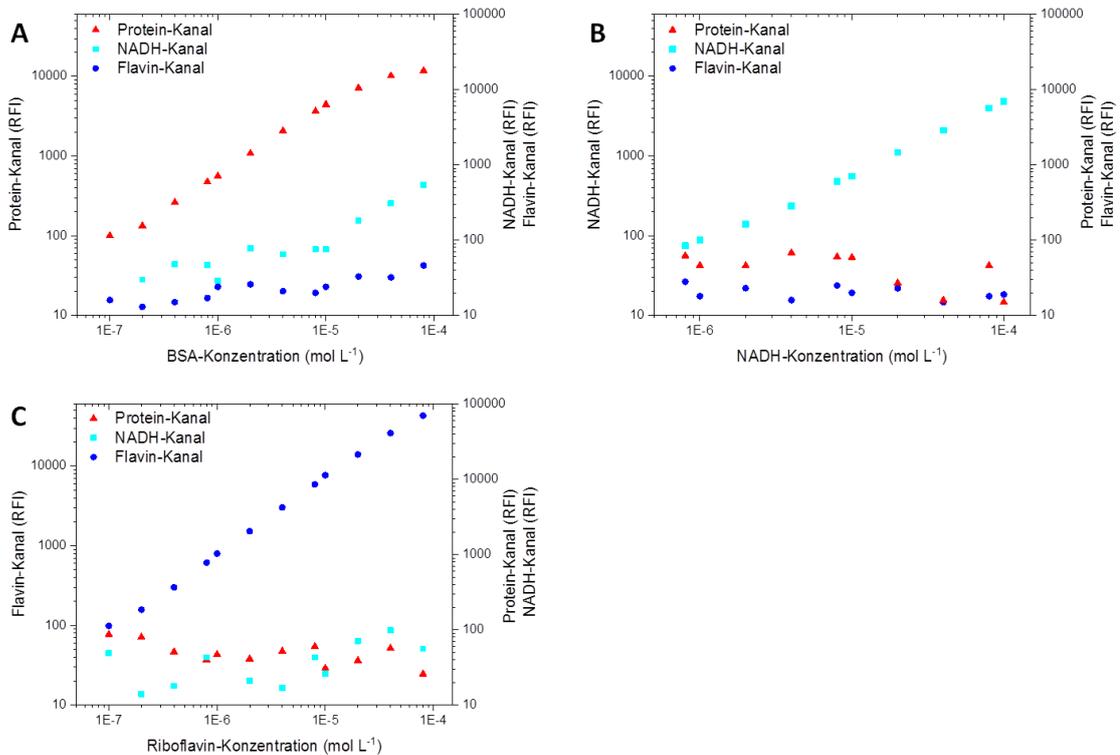


Abbildung 27: Bestimmung der Spezifität. Es sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der drei Fluoreszenzkanäle gegen die Konzentration des entsprechenden Fluorophors aufgetragen. A Protein-Kanal, B NADH-Kanal und C Flavin-Kanal. Zusätzlich zu den Messungen des Fluorophors wurden die Signalintensitäten der anderen Kanäle mitbestimmt.

In Abbildung 27 sind die Messergebnisse für die jeweiligen Kalibrationsreihen dargestellt. Bei der Kalibration für den Protein-Kanal (Abbildung 27, A) zeigt sich im Konzentrationsbereich $<1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bei Messungen im NADH und Flavin-Kanal lediglich ein Signal im Grundrauschen ($<100 \text{ RFI}$). Bei Konzentrationen $>9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nehmen allerdings die Signalintensitäten zu und übersteigen im Falle des NADH-Kanals den Bereich des Grundrauschens. Ab dieser Konzentration ist für den Protein-Kanal allerdings schon eine Sättigung erreicht, welche im inneren Filtereffekt begründet liegt. Höhere Konzentrationen können somit nicht mehr detektiert werden. Dementsprechend konnte

festgestellt werden, dass der innere Filtereffekt nicht nur zu einer Konstanz im Fluoreszenzsignal für Proteine führt sondern sich auch auf die anderen Fluoreszenz-Kanäle auswirkt.

Für den NADH-Kanal (Abbildung 27, B) und den Flavin-Kanal (Abbildung 27, C) konnten bei Messungen mit den anderen Fluoreszenz-Kanälen keine Einflüsse festgestellt werden. Auch bei hohen Konzentrationen der jeweiligen Fluorophore sind die gemessenen Signalintensitäten im Bereich des Grundrauschens.

Neben der Spezifität hinsichtlich der Messkanäle auf ein Fluorophor soll in einem weiteren Schritt bestimmt werden, welche Auswirkung der Kaskadeneffekt auf eine Messung in Fluorophorgemischen hat. Hierzu wird eine multivariate Datenanalyse durchgeführt, welche sich am Design einer Hauptkomponentenanalyse orientiert und bei Graf *et al.* beschrieben ist [36]. Insgesamt wurden 19 Proben angesetzt, welche die drei Fluorophore in unterschiedlichen Konzentrationen aufweisen. Die Proben werden hinsichtlich der drei Fluorophore vermessen, um den Einfluss der Fluorophore aufeinander zu bestimmen (Versuchsdurchführung siehe Seite 100).

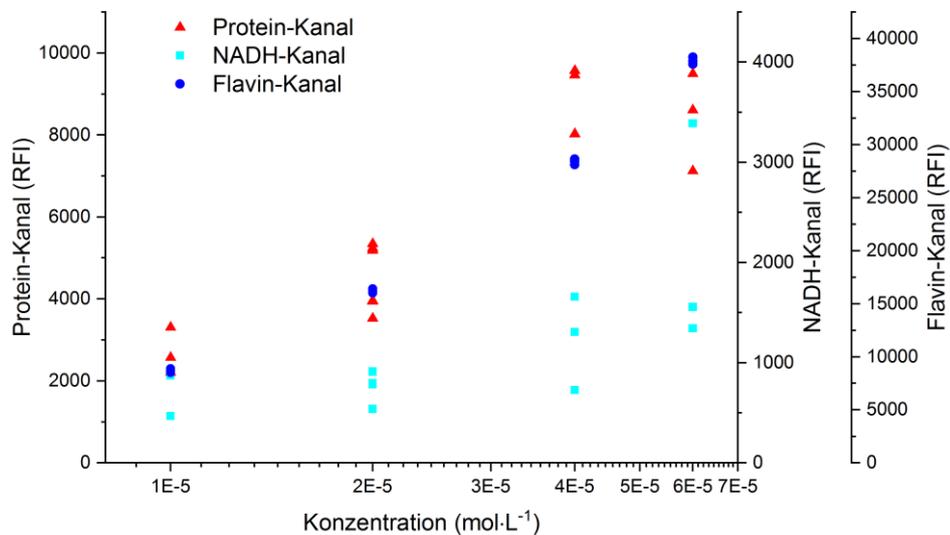


Abbildung 28: Bestimmung der Selektivität. Es sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Kanäle gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Die Messungen wurden in Gemischen aus den drei Fluorophoren durchgeführt.

In Abbildung 28 sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fluorophore gegen die Konzentration aufgetragen. Da es sich bei den Proben um Gemische aus BSA, NADH und Riboflavin handelt und verschiedene Verhältnisse angesetzt wurden, wurden

je Konzentration drei Messwerte bestimmt. Sind die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten für ein Konzentrationsniveau ähnlich und korrelieren, wird die Fluoreszenzmessung des Fluorophors nicht von anderen Fluorophoren beeinflusst. Streuen die Werte allerdings stark, beeinflussen andere Fluorophore die Messung.

Die Auswertung hat ergeben, dass die Messung der Flavine trotz Vorliegen weiterer Fluorophore selektiv ist und nicht beeinflusst wird. Die Werte im Flavin-Kanal korrelieren, sodass eine lineare Regression bestimmt wird, die es ermöglicht, von dem gemessenen Signal direkt auf die Konzentration des Fluorophors in Lösung zu schließen ($R^2 = 0,98$) (Formel 3).

$$y_{c(Flavin)} = 2 \cdot 10^{-9} x_{Flavin} - 4 \cdot 10^{-6} \quad (3)$$

Für den Protein-Kanal kann eine ähnliche Aussage getroffen werden. Hier korrelieren die Werte im unteren Konzentrationsbereich. Bei hohen Konzentrationen zeigt sich eine Streuung der Messwerte. Dies kann auf eine Übersättigung und den daraus resultierenden inneren Filtereffekt zurückgeführt werden. Messungen in diesem Bereich werden für die Korrelation daher nicht weiter betrachtet. Auch für den BSA-Kanal kann somit eine lineare Regression ($R^2 = 0,95$) bestimmt werden, die eine Berechnung der Konzentration ermöglicht (Formel 4).

$$y_{c(Protein)} = 4 \cdot 10^{-9} x_{Protein} - 10^{-7} \quad (4)$$

Die Messung von NADH in Anwesenheit weiterer Fluorophore zeigt keine Korrelation der Messwerte. Dies ist auf eine Beeinflussung der Fluoreszenz durch BSA und Riboflavin zurückzuführen. Dementsprechend wird für den NADH-Kanal zusätzlich eine multilineare Regression mit drei x-Variablen durchgeführt. Diese hat ergeben, dass die Messung negativ von Proteinen und positiv von Riboflavin beeinflusst wird. Aufgrund der sich überlagernden Fluoreszenzspektren war dies zu erwarten (Kapitel „4.2.1 Exzitations- und Emissionswellenlängen“). Für eine Bestimmung der NADH-Konzentration ($y_{c(NADH)}$) müssen somit die relativen Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluorophore ($x_{Fluoreszenz-Kanal}$) gemäß Formel 5 ($R^2=0,95$) berücksichtigt werden:

$$y_{c(NADH)} = -8.55 \cdot 10^{-10} x_{Protein} + 3.52 \cdot 10^{-8} x_{NADH} + 8.56 \cdot 10^{-10} x_{Flavin} - 1.67 \quad (5)$$

Der entwickelte Fluoreszenzsensor kann insgesamt selektiv die gewünschten Fluorophore bestimmen. Bei einer Messung von NADH ist es von großer Relevanz sowohl Proteine als auch Flavine mit zu bestimmen, um selektive Messwerte zu erhalten. In biologischen Prozessen wird das Fluoreszenzsignal allerdings auch noch von u. a. Medienkomponenten beeinflusst. Für ein Modell, welches es ermöglicht aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten direkt die Konzentration zu berechnen, müssen weitere Einflussgrößen bestimmt und im Modell berücksichtigt werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Sensor sensitiv, selektiv und spezifisch die gewünschten Fluorophore misst. Dies konnte durch Messungen in Referenzlösungen sowie an Fluorophorgemischen demonstriert werden.

4.4.5 Vergleich der Fluoreszenz zwischen suspendiertem und immobilisiertem Riboflavin

Für einen ersten Test, ob der entwickelte Sensor nicht nur in Suspensionen sondern auch in Immobilisaten messen kann, wird Riboflavin als Modellfluorophor in Alginat immobilisiert. Es wird sowohl die Fluoreszenz in suspendiertem Riboflavin als auch im Gel gemessen. Es soll die Abweichung zwischen den Messungen bestimmt werden, um den Effekt der Immobilisation auf die Fluoreszenz zu untersuchen (Versuchsdurchführung siehe Seite 101).

In suspendiertem Riboflavin konnte eine relative Fluoreszenzintensität von $11400,7 \pm 78,2$ RFI gemessen werden. Im Vergleich hierzu lieferte die Messung in immobilisiertem Riboflavin 9,1 % geringere Fluoreszenzintensitäten. Die gemessenen Werte waren $10362,7 \pm 74,5$ RFI. Die als gering eingestufte Abweichung in den Messungen kann durch die inhomogene Struktur des Gels erklärt werden.

4.5 pH- und pO₂-Sensoren

Neben der Messung der biogenen Fluorophore kommt der Messung von pH- und pO₂- eine wichtige Rolle zu. Durch die Werte können Kultivierungsbedingungen kontrolliert und geregelt werden. Beide Sensoren sind kommerziell erhältlich und werden als Komplettsysteme bestehend aus Lichtleitern, Fluorophor und Messeinheit von der Firma Pre-Sens GmbH (Regensburg) für Messungen in Flüssigkulturen vertrieben. Es stellt sich somit die Aufgabe, die Systeme auf die Anwendung im Biofilm zu übertragen.

4.5.1 Messprinzip und Aufbau

Das Messprinzip der pH- und pO₂-Messung basiert auf dem Einsatz von chemooptischen Sensoren und ist in Bioprozessen etabliert. Bei den Lichtleitern, die hierbei verwendet werden, handelt es sich um Polymerfasern. An der Messspitze der Fasern werden Fluorophore immobilisiert, die pH- bzw. sauerstoffsensitiv sind und unter Anwesenheit des jeweiligen Analyten ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern (Abbildung 29, links). Im Falle von Sauerstoffmessungen handelt es sich um einen Rutheniumkomplex, dessen Fluoreszenz unter Anwesenheit von Sauerstoff gequencht wird [71]. Die Messmethode ist vor allem auf geringe Sauerstoffkonzentrationen ausgelegt und bietet so hinsichtlich der Spezifikationen großes Potenzial für die Anwendung im Biofilm. Ein potentieller Anwendungsbereich stellt hier vor allem die MBZ dar, welche anaerob betrieben wird. Hier könnten die optischen pO₂-Sensoren als eine Art Warnsystem fungieren, um frühzeitig den Eintrag von Sauerstoff zu detektieren.

Die pH-Sensoren basieren auf einer Dual Lifetime Reference-Methode. Hierbei liegen zwei protonierungssensitive Farbstoffe im Spot vor. Einer reagiert empfindlich auf die Anwesenheit von Oxoniumionen. Der Zweite dient als interner Referenzindikator. Beide Farbstoffe weisen unterschiedliche Luminisenzlebensdauern auf und ermöglichen über den Quotienten der Emissionsenergie eine Berechnung des pH-Werts (Abbildung 29, rechts) [10; 102]. Die Intensität des Signals ist aufgrund des Referenzindikators unter Anwesenheit von Oxoniumionen geringer als unter Abwesenheit dieser. Sowohl die pH- als auch die pO₂-Sensoren müssen vorab kalibriert werden, liefern dann aber in ihrem Messbereich über einen längeren Zeitraum genaue Messergebnisse.

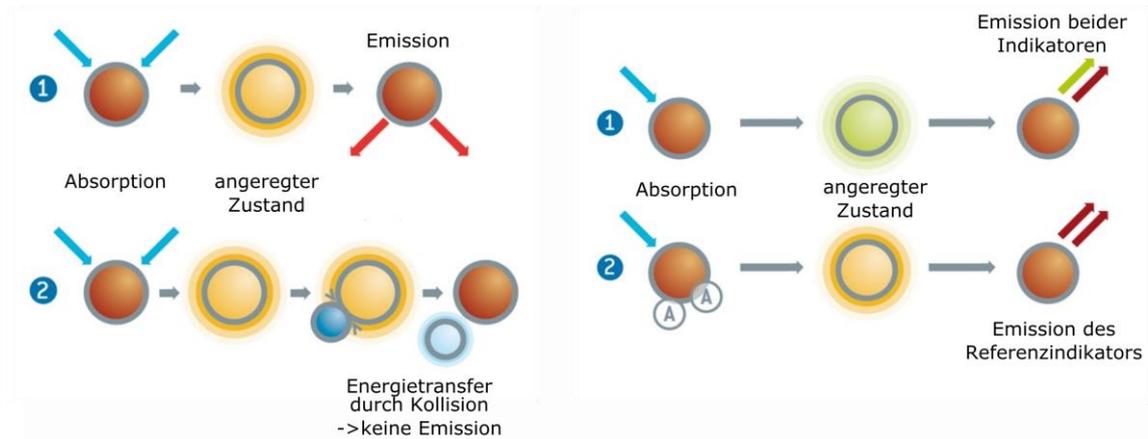


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der pO₂- (links) und pH- (rechts) Sensoren (nach [70]). Links (1): Funktionsprinzip der pO₂-Sensoren unter Abwesenheit von Sauerstoff und links (2) unter Anwesenheit von Sauerstoff. Rechts (1): Funktionsprinzip der pH-Sensoren unter Abwesenheit von Oxoniumionen und rechts (2) Funktionsprinzip unter Anwesenheit von Oxoniumionen (Analyt A).

Die Spots können im Reaktorraum angebracht und von außen mit einem Polymerlichtleiter angeregt werden. Dieser Aufbau kommt für die Anwendung in Biofilmen nur bedingt in Frage. Wenn der Biofilm auf einer Glasoberfläche wächst, ist dieses Messprinzip umsetzbar. Die meisten Biofilme bilden sich allerdings an Grenzflächen und auf porösen Trägermaterialien. Als Beispiel sei hier auch die mikrobielle Brennstoffzelle genannt, in welcher sich der Biofilm auf der Elektrode bildet. Um eine Messung des pH- und pO₂-Werts in Biofilmen umzusetzen, muss der Spot demnach direkt auf der Polymerfaser fixiert werden. Für die Messung wird somit der Lichtleiter mit Spot in den Reaktorraum eingebracht und gewährleistet so eine Messung sowohl in der Flüssigkeit als auch im Biofilm.

4.5.2 Einsatz in Modellbiofilmen

Bei dem Einsatz der pH- und pO₂-Sensoren in Biofilmen wird erwartet, dass die Diffusionslimitierung einen signifikanten Einfluss auf die Messung haben wird [65; 90]. Um diesen Einfluss besser einschätzen zu können, werden die Sensoren zunächst in einem porösen Modellsystem verwendet. Als Biofilmmodell wird 2 % (w/v) Alginategel eingesetzt (9,5cm·3,0cm·0,7cm), in welches die optischen Sensoren platziert werden können (Versuchsdurchführung siehe Seite 101). Als Versuchsaufbau erfolgt die Messung zum einen in einem umströmten und zum anderen in einem überströmten System. Die Ver-

suchsaufbauten sind schematisch in Abbildung 30 dargestellt. Bei dem umströmten System handelt es sich um einen Reaktor, welcher gerührt wird. Für das überströmte System wurde eine Fließkammer entwickelt durch die das Fluid zirkulierend gepumpt wird. Bei beiden Versuchsaufbauten werden die optischen Sensoren sowohl im Alginatgel als auch als Referenz in der Umgebung platziert. Die Versuche werden sowohl für die Messung von pO_2 als auch für die Messung des pH-Werts durchgeführt. Die pO_2 - bzw. pH-Wert-Änderung erfolgt im umströmten System direkt im Reaktor und im Falle des überströmten Systems im Vorratsgefäß (Versuchsdurchführung siehe Seite 107).

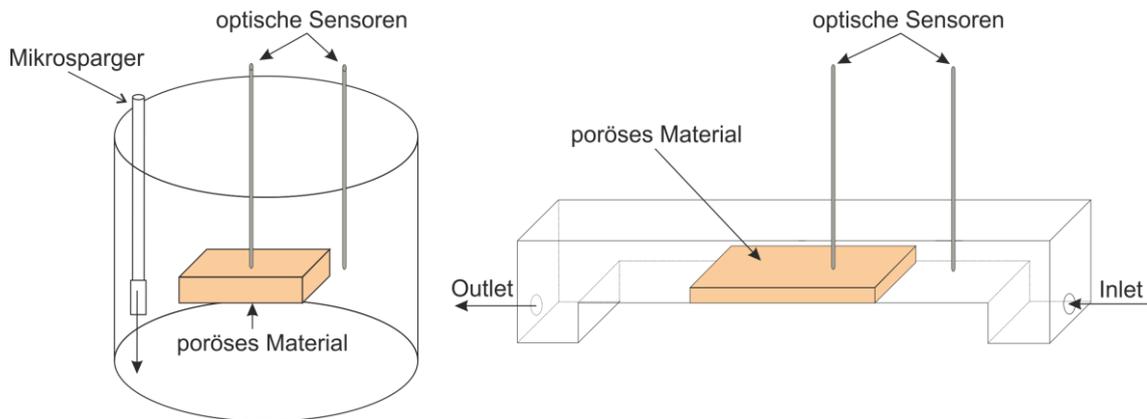


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Versuchsaufbauten für die Analyse der Diffusionslimitierung in porösen Systemen. Links: umströmtes System; Rechts: überströmtes System.

In Tabelle 6 sind die ermittelten Zeitdifferenzen bis zur Detektion der pH- bzw. pO_2 -Änderung zusammengefasst. Für die Detektion des pH-Werts im immobilisierten Alginat konnte eine Zeitdifferenz von 13 min bestimmt werden. Nach dieser Zeit ist der in Lösung neu eingestellte pH-Wert auch im Alginat messbar. Begründet werden kann die Abweichung mit der Diffusionslimitierung der Materialien. Im Gegensatz hierzu konnte für die Bestimmung des pO_2 -Gehalts eine deutlich höhere Zeitdifferenz bestimmt werden. Im umströmten System ist der veränderte pO_2 -Gehalt nach 41,4 min detektierbar und im überströmten System erst nach 465,1 min. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der Sensor maximal tief im Gel platziert wurde. Der große Unterschied zwischen umströmten und überströmten Versuchsaufbau lässt sich mit der besseren Durchmischung im Reaktor erklären. Der zusätzliche konvektive Transport, der durch das Rühren erzeugt wird, reduziert den Einfluss der Diffusionslimitierung. Im überströmten System findet die Begasung im Vorratsgefäß statt und die Einstellung des pO_2 -Werts im Gel erfolgt lediglich durch Diffusion.

Tabelle 6: Einsatz optischer pH- und pO₂-Sensoren in Alginat als Biofilmmodell. Es sind die ermittelten Zeitdifferenzen bis zum Erreichen des umgebenen pH- bzw. pO₂-Werts im Alginat gelistet. Im überströmten System wurde der pH-Sensor nicht eingesetzt.

	Umströmt	Überströmt
pH-Wert	13 min	-
pO ₂ -Wert	41,4 min	491,4 min

Um die signifikante Zeitdifferenz bei der Einstellung des pO₂-Werts zu evaluieren, wird die Messung im überströmten System mit dem Einsatz eines weiteren Sensorsystems wiederholt. Hierbei handelt es sich um ein kommerziell erhältliches System, welches auf dem gleichen Messprinzip wie die bisher verwendeten pO₂-Sensoren basiert. Es ermöglicht eine Messung des pO₂-Gehalts über eine Fläche von 20·20 mm und visualisiert die Messwerte über den gesamten Bereich der Sensorfolie. Somit kann die Veränderung des pO₂-Gehalts über die gesamte Dicke des Alginatgels visuell verfolgt werden.

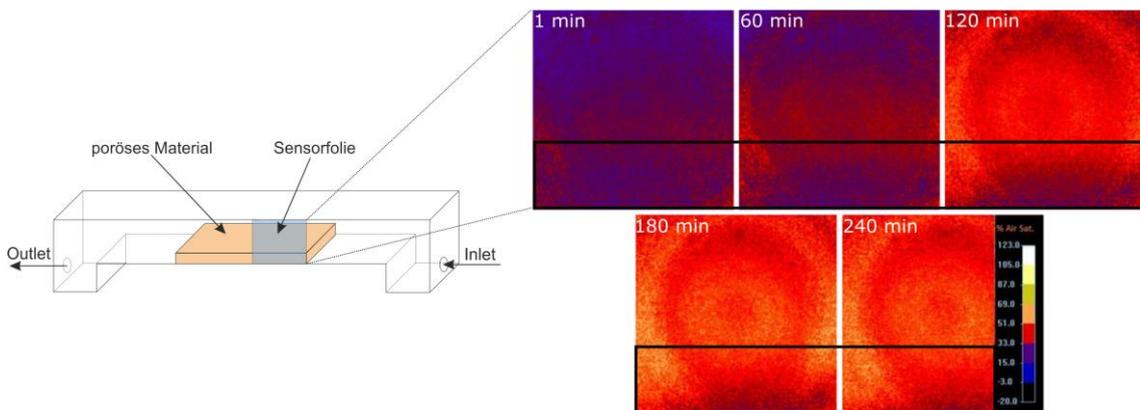


Abbildung 31: Visuelles Messergebnis der pO₂-Messung im Alginat. Links: Versuchsaufbau. Die Sensorfolie wurde seitlich am Alginatgel zwischen Alginatgel und Wandung positioniert. Rechts: Ergebnisse der visuellen pO₂-Messung im Alginatgel zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Das Alginatgel wurde mit einem Fluid überspült, welches in einem Vorratsgefäß begast wurde. Der Bereich des Alginatgels ist umrahmt. Farbcodierung: Eine blaue bis violette Färbung entspricht einer anaeroben Umgebung. Eine rote bis gelbe Färbung entspricht einer aeroben Umgebung.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der visuellen pO₂-Analyse in einem 60 min Intervall dargestellt. Die Ergebnisse des visuellen Sensors stützen die des optischen Sensors. Erst nach 60 min kann eine erste Änderung des pO₂-Werts im oberen Bereich des Alginats und somit nahe der Grenzfläche zwischen Fluid und Gel nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Messtiefe von 1 mm. Nach insgesamt 240 min weißt der Großteil des Gels die gleiche Sauerstoffkonzentration wie im Fluid auf. Mittels der optischen Sensoren im

vorherigen Versuchsansatz wurde allerdings eine signifikant längere Zeitdifferenz bestimmt. Dies kann mit der Positionierung des Sensors (Abbildung 30) begründet werden. Dieser wurde mittig im Gel und 6 mm tief platziert. Die Sensorfolie hingegen wurde zwischen Wandung der Durchflusskammer und Alginatgel positioniert, sodass die Messungen am Rand des Gels erfolgten. Abbildung 31 zeigt, dass auch nach 240 min noch keine vollständige Anpassung des pO_2 -Werts erfolgt ist.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass die optischen Sensoren für pH- und pO_2 -Wert für die Analyse einer biofilmähnlichen Struktur angewendet werden können. Die pH-Sensoren eignen sich hierbei auch für eine zeitnahe Analyse, da durch die vergleichsweise gute Diffusion Änderungen schnell detektiert werden können. Im Rahmen der pO_2 -Bestimmung hat die Diffusionslimitierung einen deutlich größeren Einfluss. Hier hat sich gezeigt, dass die Messung einer Sauerstoffveränderung in Schichttiefen von 0,7 cm mit einer zeitlichen Verzögerung von mehr als 240 min einhergeht. In den oberen Schichten des Alginats kann nach 60 min eine Änderung detektiert werden. In Übertragung an mögliche Anwendungen der Sensoren in Biofilmen bedeutet dies, dass die Sauerstoffsensoren nur dann genutzt werden sollten, wenn die Bestimmung in Schichttiefen bis 1 mm erfolgt. Zusätzlich sollte eine Messung beider Parameter im Medium oder in der Mikroumgebung des Biofilms erfolgen, um trotz Diffusionslimitierung zeitnah auf Veränderungen reagieren zu können.

5 Anwendung der Sensoren in biologischen Systemen

Im zweiten Teil der Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Anwendung des entwickelten Fluoreszenzsensors und der pH- und pO₂-Sensoren. Zunächst wird der Anwendungsbereich der pO₂- und pH-Sensoren in einem biofilmbildenden System verdeutlicht. Der Schwerpunkt liegt allerdings auf dem Einsatz des in dieser Arbeit entwickelten Fluoreszenzsensors zur Messung von biogenen Fluorophoren. Neben der Endanwendung – dem Einsatz zur Analyse der Biofilmentwicklung – wird der Sensor zusätzlich in verschiedenen biologischen Systemen getestet.

5.1 Anwendung der pO₂- und pH-Sensoren in der mikrobiellen Brennstoffzelle

Die in Kapitel „4.5 pH- und pO₂-Sensoren“ vorgestellten Messsysteme sind kommerziell erhältlich und finden im biotechnologischen Bereich große Anwendung für die Analyse des pO₂- und pH-Werts in suspendierten Zellsystemen. In diesem Teil der Arbeit soll aufgezeigt werden, dass die optischen Sensoren ebenfalls für die Analyse von biofilmbildenden Systemen eingesetzt werden können.

Als Versuchsaufbau wird die mikrobielle Brennstoffzelle (Kapitel „3.1.3 Bedeutung von Biofilmen für die mikrobielle Brennstoffzelle“) genutzt, da sich diese als zuverlässiges System zur Biofilmkultivierung erwiesen hat. Außerdem sollen die Sensoren in der Endanwendung in der MBZ verwendet werden. Es ist bekannt, dass die abwasserbasierte MBZ durch das Anlegen einer geringen Spannung von 0,2 V elektroaktive Bakterien anregt sich auf der Anodenoberfläche anzuheften und einen Biofilm zu bilden. Da die mikrobielle Brennstoffzelle ein anaerobes System ist, ist sie für die Testung der hochsensitiven pO₂-Sensoren gut geeignet. Die hier verwendete MBZ ist nicht pH-kontrolliert. Dies bedeutet, dass auch die pH-Sensoren Veränderungen detektieren sollten (Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung siehe Seite 102).

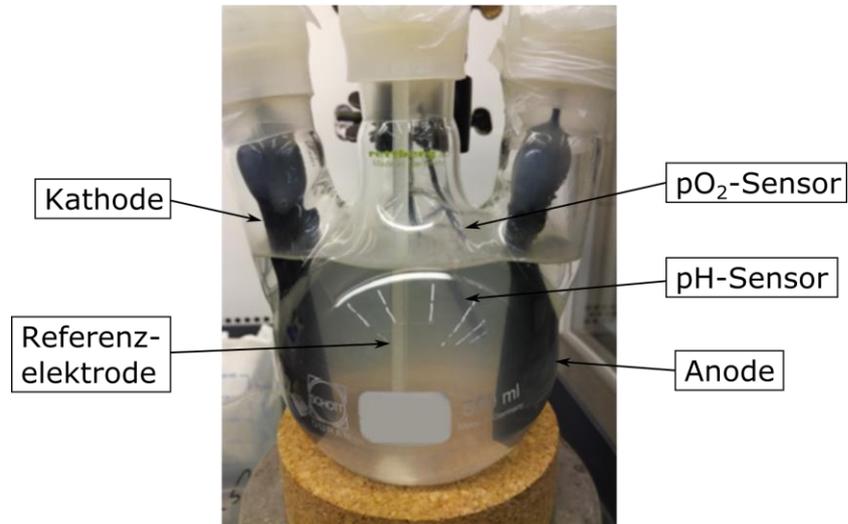


Abbildung 32: Versuchsaufbau der mikrobiellen Brennstoffzelle im Vierhalsrundkolben.

Für die MBZ wird ein am Institut entwickelter Potentiostat verwendet. Dieser bietet die Möglichkeit eine konstante Spannung von 0,2 V anzulegen und die Stromstärke aufzuzeichnen. Die damit verbundene MBZ besteht aus einer Kammer in der sowohl Anode und Kathode als auch die Referenzelektrode platziert werden. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 32 dargestellt. Als Medium wurde synthetisches Abwasser (Kapitel „0

Kulturmedien und Pufferlösungen“), welches mit einer Abwasserprobe aus dem Klärwerk Leinhausen (Hannover) versetzt wurde, verwendet. Auf Grundlage der in Kapitel „4.5.2 Einsatz in Modellbiofilm“ erhaltenen Ergebnisse und dem daraus resultierenden Fazit, dass die Messung in einer immobilisierten Struktur der Diffusionslimitierung unterliegt, wurden die pO_2 - und pH-Sensoren in der Nähe der Anode platziert. Hier wird aufgrund der metabolischen Vorgänge der Zellen am ehesten eine Änderung des pO_2 - und pH-Werts erwartet.

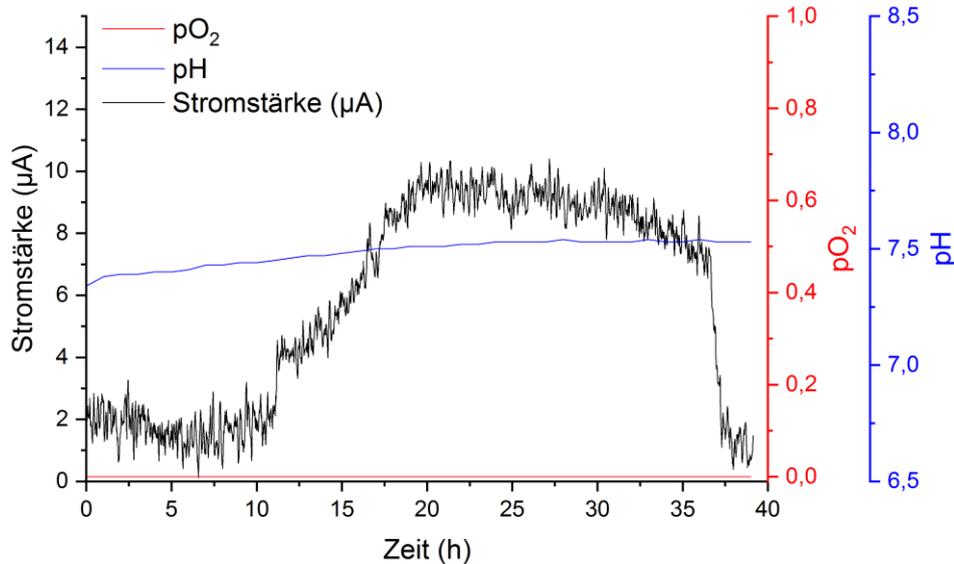


Abbildung 33: Analyse des pH- und pO₂-Werts in der mikrobiellen Brennstoffzelle. Es sind der Verlauf der Stromstärke, des pO₂- und des pH-Werts gegen die Zeit aufgetragen.

In Abbildung 33 ist die Stromstärke während der Kultivierung in der mikrobiellen Brennstoffzelle dargestellt. Es zeigt sich ein typischer Verlauf der MBZ. Zunächst adaptieren sich die Zellen an die Umgebung. Anschließend erfolgt ein Anstieg der Stromstärke, welche auf eine Übertragung von Elektronen auf die Anode zurückzuführen ist. Dies ist nur möglich, wenn sich elektroaktive Bakterien in der Kultur befinden. Die messbare Stromstärke steigt bis auf 10 μA an. Nach 10 h auf einem konstanten Niveau fällt die Stromstärke ab. Dies ist vergleichbar mit der stationären Phase in Suspensionskulturen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Nährstoffgehalt so gering, dass die Mikroorganismen keine Elektronen mehr an die Anode übertragen, sodass die Stromstärke signifikant abnimmt.

Über den gesamten Kultivierungsverlauf wurden der pO₂- und pH-Wert aufgezeichnet. Der pH-Wert verbleibt auf einem konstanten Niveau von 7,5. Auch der pO₂-Gehalt ist mit 0 % konstant und zeigt, dass die MBZ während der gesamten Kultivierung anaerob war.

Für beide kommerziell erhältlichen Sensorsysteme konnte der Einsatz in einem biofilmbildenden System verifiziert werden. Vor allem die Messung des pO₂-Gehalts in der MBZ mittels der getesteten Sensoren bietet die Möglichkeit als eine Art Warnsystem für Probleme in der Prozessführung verwendet zu werden, da durch die hohe Sensitivität der Sensoren schon geringe Veränderungen detektiert werden können.

5.2 Anwendung des Fluoreszenzensors in verschiedenen biologischen Systemen

Der entwickelte Fluoreszenzsensor wurde im Rahmen der Arbeit in verschiedenen biologischen Systemen getestet, um seinen Anwendungsbereich abzugrenzen. Als Anwendungsbereiche wurden eine enzymatische Umsetzung analysiert sowie Messungen in suspendierten und immobilisierten Zellsystemen durchgeführt. Abschließend wurde der Sensor für das Monitoring einer abwasserbasierten Biofilmbildung eingesetzt.

5.2.1 Enzymatische Umsetzung von Pyruvat

Ein weiterer Anwendungsbereich von Fluoreszenzmessungen kann die Analyse einer enzymatischen Umsetzung und daraus resultierend eine mögliche Bestimmung der Enzymaktivität sein. Viele Enzyme katalysieren Reaktionen, in denen unter anderem NADH umgesetzt wird. Hierzu zählt unter anderem die Lactatdehydrogenase. Sie katalysiert die Reaktion von Pyruvat und NADH zu Lactat und NAD^+ (Abbildung 34) [1; 25]. Aufgrund der Reduktion von NADH kann die Reaktion mittels des entwickelten Fluoreszenzensors gemessen werden.

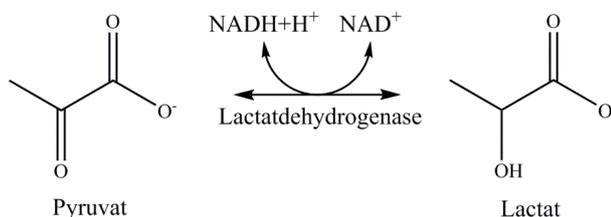


Abbildung 34: Reaktionsgleichung der enzymatischen Umsetzung von Pyruvat zu Lactat.

Um den möglichen Einsatz des entwickelten Sensors für die Analyse der enzymatischen Umsetzung zu testen, werden zwei verschiedene Konzentrationsverhältnisse von NADH zu Lactatdehydrogenase eingesetzt und die Veränderung des NADH-Signals gemessen. Die erste Messung basiert auf dem NADH:Lactatdehydrogenase-Verhältnis von 1:1 (8,3 % NADH:8,3 % Lactatdehydrogenase). Im zweiten Ansatz wird ein NADH:Lactatdehydrogenase-Verhältnis von 1:2 (3,3 % NADH:6,6 % Lactatdehydrogenase) verwendet (Versuchsdurchführung siehe Seite 101). Die Messung verschiedener Konzentrationsverhältnisse soll zeigen, dass der Sensor die gewünschte Reaktion zuverlässig misst.

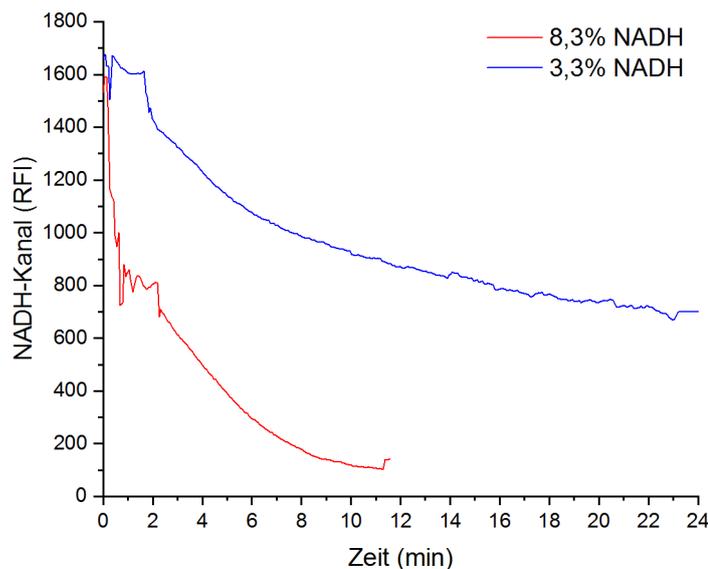


Abbildung 35: Enzymatische Umsetzung von Pyruvat zu Lactat. Es ist die relative Fluoreszenzintensität von NADH gegen die Zeit dargestellt.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung der enzymatischen Umsetzung dargestellt. Diese entsprechen den Erwartungen. Mit Beginn der Messung wurde das Gemisch aus Pyruvat und NADH mit dem Enzym Lactatdehydrogenase versetzt. Durch die Zugabe des Enzyms konnte ein Abfall des NADH-Signals beobachtet werden. Die Steigung ist hierbei abhängig von der Konzentration der Komponenten. Bei gleicher Konzentration von NADH und Lactatdehydrogenase sinkt die Fluoreszenzintensität auf 102 RFI im NADH-Kanal. Dies spricht für eine vollständige Umsetzung von NADH. Im zweiten Versuchsansatz wurde ein NADH-Enzym-Verhältnis von 1:2 verwendet. Hier sinkt die Fluoreszenzintensität auf 699 RFI. Dies bedeutet, dass NADH weiterhin vorliegt und aufgrund der Konzentrationen der Komponenten keine vollständige Umsetzung stattfinden konnte.

Die erhaltenen Ergebnisse evaluieren den Einsatz des Sensors für die Anwendung in enzymatischen Umsetzungen. Diese Anwendung könnte bis hin zur Bestimmung der Enzymaktivität erweitert werden. Hierzu müssten weitere Konzentrationen für die Umsetzung getestet und mittels einer Bestimmung der Kinetik ausgewertet werden.

5.2.2 Einsatz des Sensors in einer Schüttelkolbenkultivierung

Um einen weiteren Anwendungsbereich des entwickelten Fluoreszenzensors zu testen, wurde der Sensor für die Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung genutzt. Hierzu wurde zunächst eine Führung für einen Schüttelkolben entwickelt. Am Ende der Führung wurde ein Saphirglas integriert, so dass gewährleistet wird, dass der Lichtleiter in der Kultur messen kann, diese dabei aber nicht kontaminiert wird. Der Einsatz eines Saphirglas wurde zuvor evaluiert (Kapitel „Entwicklung einer Führung für Schüttelkolbenkultivierungen“).

Als zu kultivierender Organismus wurde *S. cerevisiae* gewählt. *S. cerevisiae* bietet den Vorteil, dass es ein sehr schnell wachsender Organismus und bei geringen pH-Werten unanfällig gegenüber Kontaminationen ist. Außerdem kann *S. cerevisiae* bei geringen Schüttelgeschwindigkeiten kultiviert werden. Da der Sensor ursprünglich nicht für Schüttelkolbenkultivierungen entwickelt wurde, kann er aus Stabilitätsgründen nicht bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten verwendet werden. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 36 dargestellt. Um Reflexionen des Kolbenbodens zu vermeiden, wird dieser an der Außenseite geschwärzt (Versuchsdurchführung siehe Seite 102).

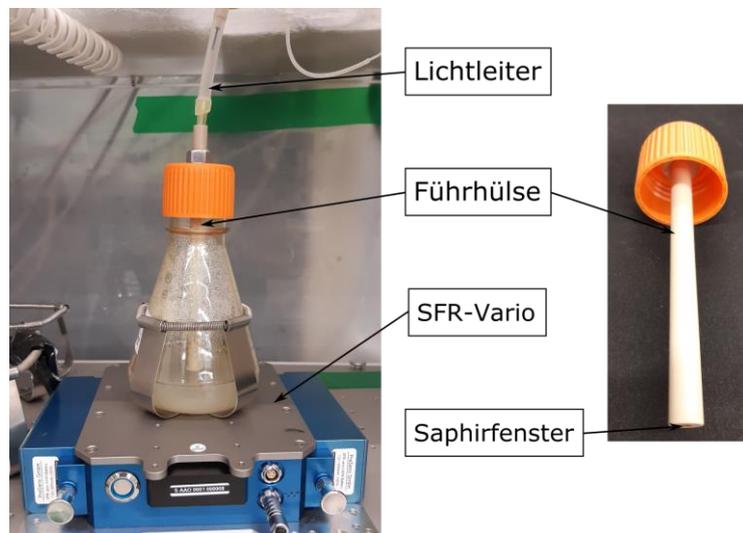


Abbildung 36: Versuchsaufbau für die Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung von *S. cerevisiae* mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor.

Die Kultivierung erfolgte bei 100 rpm und 30°C. Neben der Messung mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor wird zusätzlich der SFR vario (PreSens GmbH, Regensburg) als Referenz zur Analyse der Kultivierung verwendet. Bei dem SFR vario handelt es sich um ein kommerzielles Gerät, welches für die online Überwachung von Schüttelkolbenkultivierungen ausgelegt ist und optisch die Prozessgrößen pO₂-Gehalt, pH-Wert sowie die optische Dichte bestimmt.

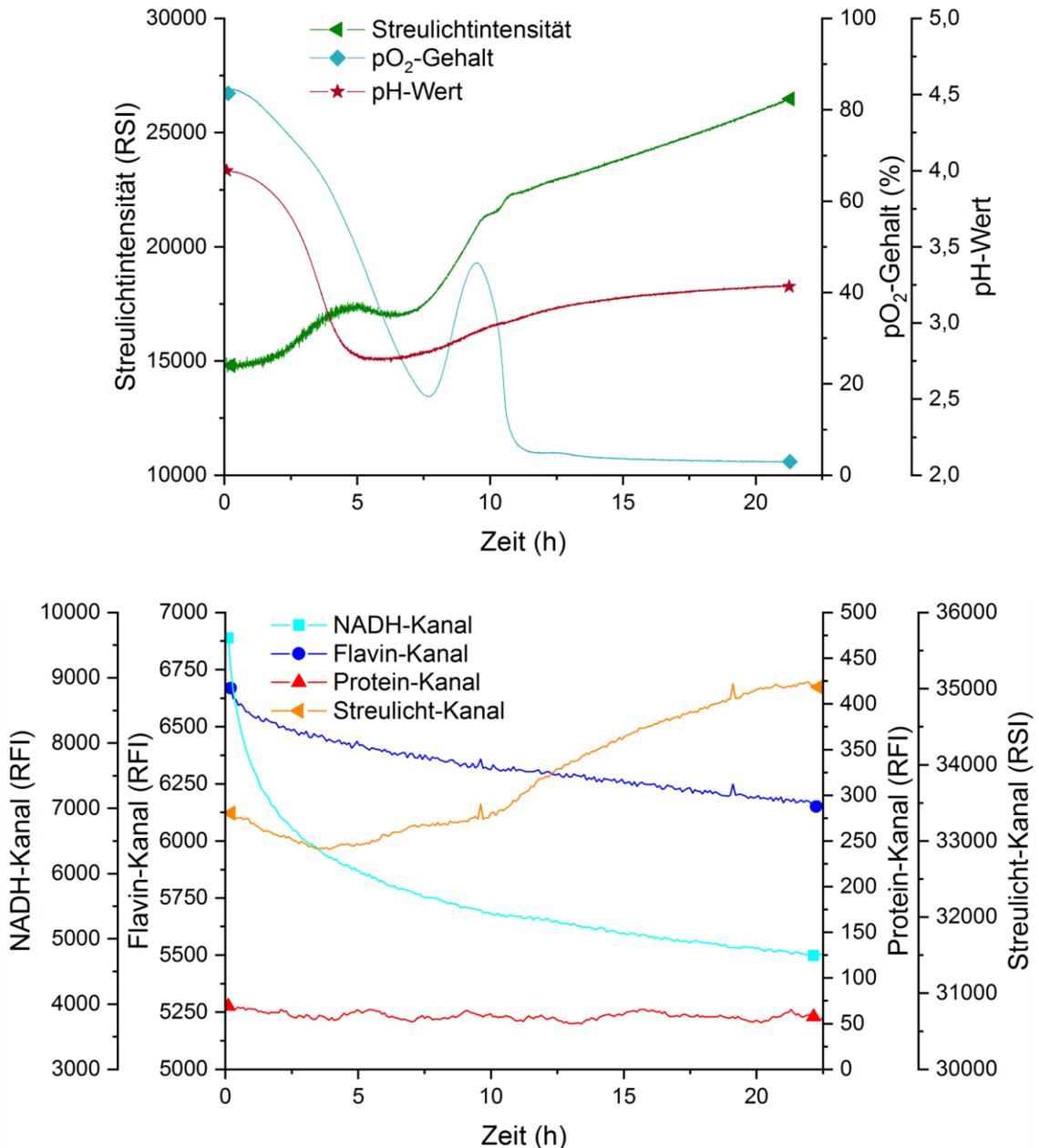


Abbildung 37: Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung von *S. cerevisiae*. Oben: Referenzmessungen der Schüttelkolbenkultivierung mittels des SFR vario. Es sind die Streulichtintensität sowie pO₂- und pH-Wert gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen. Unten: Messung der Fluoreszenzintensität mittels des entwickelten Fluoreszenzensors. Es sind die mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten des NADH-, Flavin-, Protein- und des Streulichtkanals gegen die Zeit aufgetragen.

Abbildung 37 (oben) zeigt die Messergebnisse, die während der Kultivierung mit dem SFR vario aufgezeichnet werden konnten. Anhand der zunehmenden Biomasse kann gezeigt werden, dass *S. cerevisiae* im Schüttelkolben gewachsen ist. In Zusammenhang mit den gemessenen pO_2 - und pH-Werten zeigt sich, dass es sich um einen typischen Wachstumsverlauf handelt. Nach einer kurzen log-Phase in den ersten 2 h folgt die exponentielle Wachstumsphase, in welcher der pO_2 -Gehalt abnimmt. Der pH-Wert sinkt zunächst auf pH 2,7. Während der stationären Phase zwischen 4,3 h und 6,75 h bleibt der pH-Wert konstant. Der pO_2 -Wert sinkt bis zum Ende der stationären Phase auf einen Wert von 17,1 %. An die erste stationäre Phase schließt sich eine weitere Phase, ähnlich der exponentiellen Phase, an, in welcher der pO_2 -Wert auf 46,5 % zunimmt. Sowohl die Streulichtintensität als auch der pH-Wert nehmen in dieser Phase zu. Dies kann auf Diauxie und somit auf eine Umstellung im Metabolismus zurückgeführt werden. Gemäß Literatur ist Glucose zu diesem Zeitpunkt verbraucht, sodass die Zellen auf Ethanol weiter wachsen [98; 27; 32]. Nach 10,3 h nimmt die Streulichtintensität weiterhin zu, allerdings nicht so stark wie in der ersten stationären Phase. Der pO_2 -Wert fällt auf ein Minimum ab und der pH-Wert bleibt konstant.

Die Kultivierung wurde zusätzlich mit dem Fluoreszenzsensor vermessen. Es konnten Signale für alle Kanäle aufgezeichnet werden, die in Abbildung 37 (unten) dargestellt sind. Der Verlauf der detektierten Fluoreszenzintensität im Streulichtkanal ist ähnlich zu dem mit dem SFR vario aufgezeichnetem Verlauf. Lediglich in den ersten 5 h der Kultivierung wurde ein gegensätzlicher Verlauf zu dem des SFR vario detektiert. Anschließend kann ein ähnlicher Trend der Messsignale ausgemacht werden. Allerdings ist der Anstieg im Streulichtsignal bei der Messung mit dem Fluoreszenzsensor signifikant stärker als mit dem SFR vario. Ein Grund hierfür kann die unterschiedliche Messposition der Sensoren sein. Der SFR vario misst durch den Kolbenboden wohingegen der Fluoreszenzsensor im oberen Bereich der Kultur misst. Insgesamt konnte mit dem Fluoreszenzsensor somit Wachstum detektiert werden.

Der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten in den anderen Kanälen ist anders als erwartet. Da mit dem SFR vario und dem Streulichtkanal des Fluoreszenzsensors Wachstum detektiert wurde, wurde auch in den anderen Kanälen eine Veränderung der Signale erwartet. NADH als Coenzym für zahlreiche Redoxreaktionen im Metabolismus, Flavine als

Sekundärmetabolite und Proteine hätten den Verlauf des Wachstums ebenfalls widerspiegeln müssen. Die relativen Fluoreszenzintensitäten des Protein-Kanals sind trotz einer zusätzlichen Verstärkung des Signals <100 RFI und damit im Bereich des Messrauschens. Für den NADH-Kanal und den Flavin-Kanal ergibt sich ein stetig abnehmendes Signal. Dieser Signalverlauf kann im Vergleich zu den Referenzmessungen nicht mit der Kultivierung und dem nachgewiesenen Zellwachstum im Streulichtkanal des Fluoreszenzensors in Zusammenhang gebracht werden. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Messung nicht störungsfrei verläuft und ein Problem mit dem Versuchsaufbau bestehen muss.

Im Weiteren wurden verschiedene mögliche Fehlerquellen, die sich auf das Fluoreszenzsignal auswirken können, analysiert und ausgeschlossen. Diese sind zusammengefasst in Tabelle 7 dargestellt. Unter anderem wurde das Messintervall auf 5 min gesetzt, um einen Temperatureinfluss auf die optischen und elektronischen Komponenten in der Messbox auszuschließen. Außerdem wurde der Einfluss der LED-Leistung auf das Fluoreszenzsignal im NADH-Kanal bestimmt. Hierzu wurden zusätzliche Messwerte bei halber LED-Intensität aufgezeichnet, welche mit denen bei voller LED-Leistung korrelieren. Die LED-Leistung konnte somit auch als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde der Versuchsaufbau hinsichtlich Reflexionseinflüssen und Einflüssen der Umgebung optimiert.

Tabelle 7: Mögliche Fehlerquellen, die die Messung der Schüttelkolbenkultivierung beeinflussen. Es sind die Maßnahmen, die zur Analyse getroffen wurden, und deren Fazit gelistet.

Mögliche Fehlerquelle	Maßnahme	Fazit
Temperatur	Das Messintervall wird auf 5 min gesetzt.	Eine ausreichend lange Abkühlphase für die optischen und elektronischen Komponenten ist gewährleistet. Ein Einfluss kann ausgeschlossen werden.
LED-Leistung	Die Messung im NADH-Kanal wird zusätzlich bei halber LED-Leistung durchgeführt.	Die Messwerte bei halber und voller LED-Leistung korrelieren. Ein Einfluss kann ausgeschlossen werden.
Umgebungslicht	Der Kolben wird vollständig verdunkelt.	Die detektierten Signale sind rauschärmer.
Reflexion des Kolbenbodens	Um Reflexionseinflüsse durch den geschwärzten Kolbenboden auszuschließen, wurde im Messbereich eine schwarze, nicht reflektierende Folie als Referenz eingesetzt.	Die Messergebnisse mit und ohne Folie sind gleich. Der geschwärzte Boden reflektiert nicht.
Reflexion des Mediums	Es wurden Streulichtmessungen sowohl ohne Fluid als auch mit Wasser als Fluid durchgeführt.	Die detektierten Signale sind ähnlich, sodass Reflexionseinflüsse durch das Medium ausgeschlossen werden können.
Schüttelgeschwindigkeit	Messungen wurden sowohl mit als auch ohne Schüttelgeschwindigkeit durchgeführt.	Die detektierten Werte bleiben konstant.

Der Grund für die abweichenden Ergebnisse mit dem Fluoreszenzsensor muss durch den Ausschluss der anderen Fehlerquellen in der Konstruktion der Führungshülse liegen. Gegebenenfalls reflektiert das in der Führungshülse integrierte Saphirglas das Licht der anderen Fluoreszenzkanäle. Um dies zu optimieren, kann das Saphirglas in einem 45° Winkel in der Hülse installiert werden. Dies wurde bereits in einigen Sensoraufbauten für Reaktoren erfolgreich getestet [11; 46].

Da sich in diesem Versuch gezeigt hat, dass der Fluoreszenzsensor in Kombination mit der Führungshülse keine verlässlichen Ergebnisse liefert, wird die Führungshülse im weiteren Verlauf der Arbeit nicht verwendet.

5.2.3 Induzierte Metabolismusänderung bei Bäckerhefe

Die metabolischen Prozesse der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind gut erforscht. Ein hauptsächlich metabolischer Weg des Organismus ist die Verstoffwechslung von Glucose. Die Glykolyse mit anschließendem Citratzyklus und Atmungskette ist in den meisten Organismen von entscheidender Bedeutung. Für das Experiment ist vor allem die Atmungskette interessant. NADH stellt in der Atmungskette den terminalen Elektronenakzeptor dar und wird hier zu NAD^+ reduziert. Da die genannten Stoffwechselwege nur unter aeroben Bedingungen ablaufen können, würde sich unter anaeroben Bedingungen NADH^+ aufgrund des Fehlens von O_2 in den Zellen anreichern [39; 62; 37; 78]. Diese Anreicherung sollte mit dem entwickelten Fluoreszenzsensor messbar sein.

Suspendierte Bäckerhefe

Für den Versuch wurde handelsübliche Bäckerhefe verwendet, da diese *S. cerevisiae* in großen Konzentrationen beinhaltet. Die Bäckerhefe wurde nach Waschen in Schatzmann-Medium suspendiert und mit Glukose versetzt. Um den gewünschten Effekt hervorzurufen, wird die Zell-Medium-Suspension im Wechsel mit reinem O_2 bzw. N_2 begast, sodass sich aerobe bzw. anaerobe Bedingungen einstellen.

Der Fluoreszenzsensor wird auf die Messung von NADH eingestellt. Es erfolgt keine zusätzliche Verstärkung des Signals an der Photodiode. Das Messintervall wird auf 60 s

gesetzt. Neben dem Fluoreszenzsensor werden auch optische Sauerstoffsensoren im Aufbau integriert, um den pO_2 -Gehalt zu messen (Versuchsdurchführung siehe Seite 103).

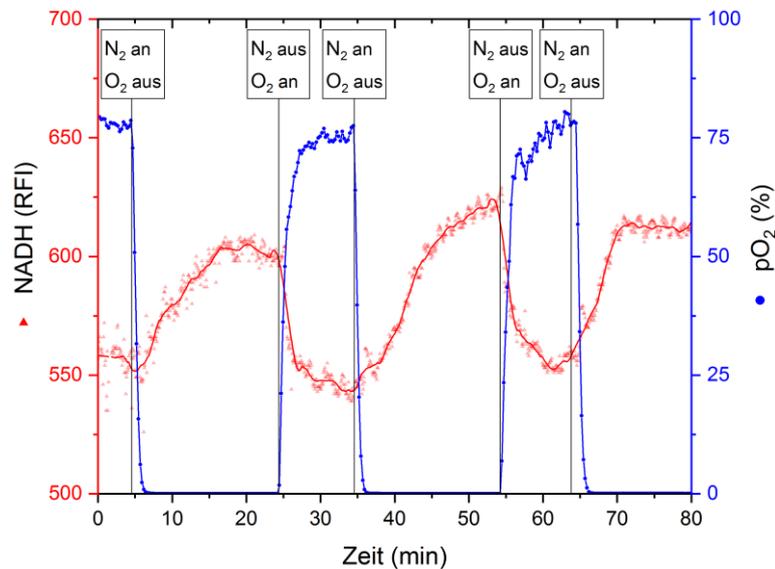


Abbildung 38: Induzierte Metabolismusänderung bei suspendierter Bäckerhefe. Es sind die relative Fluoreszenzintensität (rot) und der pO_2 -Wert (blau) gegen die Zeit aufgetragen. Die Zeitpunkte der Begasungsänderung sind markiert.

In Abbildung 38 sind die relative Fluoreszenzintensität und der pO_2 -Gehalt gegen die Zeit aufgetragen. Zu Beginn des Versuchs liegen aerobe Bedingungen vor. Das Fluoreszenzsignal im NADH-Kanal liegt bei 550 RFI. Nach 5 min erfolgt der erste Begasungswechsel. Der Wechsel ist wie erwartet direkt im Fluoreszenz-Signal messbar. Nach Erreichen anaerober Bedingungen nimmt die Fluoreszenzintensität im NADH-Kanal bis auf 600 RFI zu. Die Zunahme kann, wie beschrieben, mit der Änderung des Metabolismus begründet werden. Dieser Wechsel konnte dreimal reproduzierbar beobachtet werden und deckt sich mit den Erwartungen.

Immobilisierte Bäckerhefe

Die Endanwendung des entwickelten Sensors ist die Messung im Biofilm. Dementsprechend ist es von großer Relevanz, dass der Sensor in der Lage ist, in gelartigen Strukturen zu messen. Da gezeigt werden konnte, dass der Sensor die induzierte Metabolismusänderung in einer *S. cerevisiae* Suspension hinsichtlich des NADH-Signals detektieren kann, wird in einem nächsten Schritt *S. cerevisiae* in Alginat immobilisiert und der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt. Hierbei ist die immobilisierte Hefe von Medium umspült

(Versuchsdurchführung siehe Seite 104). Der Versuchsaufbau sowie die Halterung des Gels sind in Abbildung 39 dargestellt.

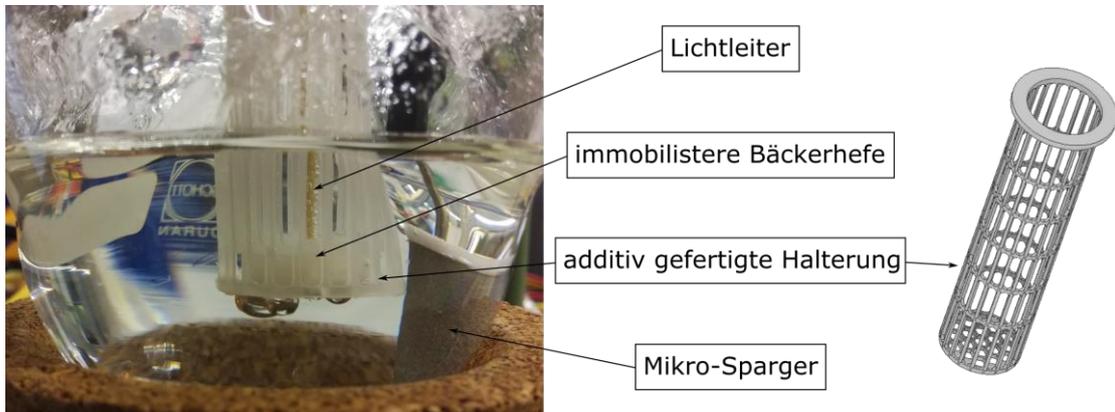


Abbildung 39: Versuchsaufbau zur Analyse einer induzierten Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe (links). Die immobilisierte Bäckerhefe wird in einer additiv gefertigten Halterung fixiert (Rechts: CAD-Design der Halterung).

Im Vergleich zur der Versuchsdurchführung mit suspendierter Bäckerhefe werden zusätzlich zum NADH-Kanal der Protein- und Flavin-Kanal für die Messung verwendet. Hinsichtlich des Flavin-Kanals wird erwartet, dass entweder die Intensität unter anaeroben Bedingungen sinkt (Kapitel „3.2.2 Intrinsische Fluorophore“) oder aufgrund der einsetzenden Gärung der Hefezellen und des damit verbundenen Zellwachstums steigt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten des NADH-, Protein- und Flavin-Kanals der ersten 4,5 h des Experiments sind in Abbildung 40 dargestellt. Zusätzlich wurde der pO_2 -Gehalt in der Mikroumgebung des Gels gemessen, um die Ergebnisse in einen metabolischen Zusammenhang einordnen zu können.

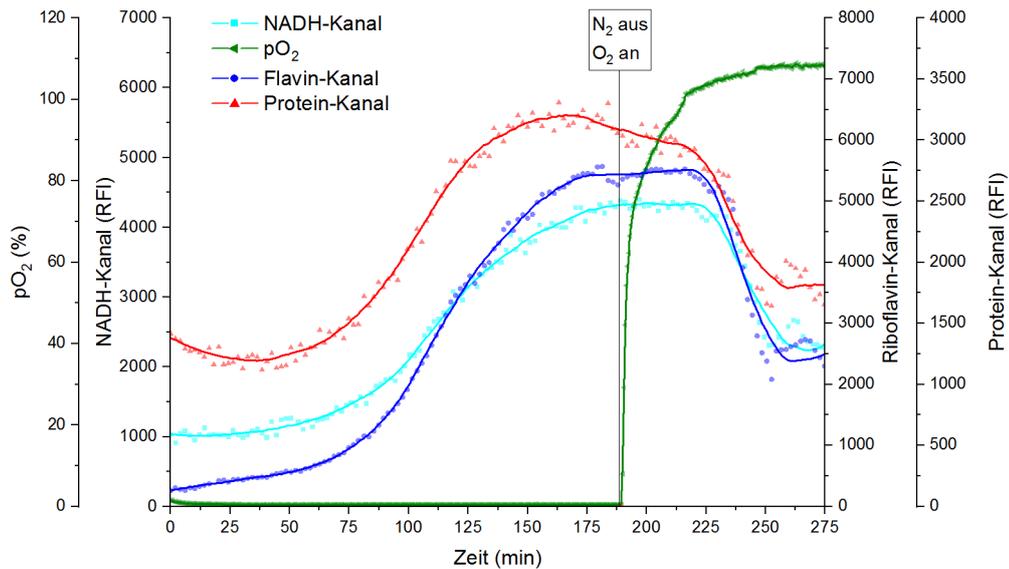


Abbildung 40: Fluoreszenzsignal von NADH, Proteinen und Flavinen gegen die Zeit bei immobilisierter Bäckerhefe. Zusätzlich zu den Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Kanälen ist der pO_2 -Gehalt gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt der Begasungsänderung ist markiert.

Es zeigt sich, dass nach 40 min ein erster Anstieg der Fluoreszenzintensität im Protein-Kanal gemessen werden konnte. Des Weiteren nimmt auch die Fluoreszenzintensität im NADH- und Flavin-Kanal zu. Die Protein-Fluoreszenzintensität hat sich innerhalb von 100 min verdoppelt, das NADH-Signal vervierfacht und die Fluoreszenzintensität im Flavin-Kanal ist auf eine Signalintensität von 6000 RFI angestiegen. Nachdem eine Signal Konstanz in den Kanälen verzeichnet werden konnte, wurde die Begasung von reiner Stickstoffbegasung auf eine Begasung mit reinem Sauerstoff gewechselt. Durch diese Veränderung sollte eine induzierte Metabolismusänderung ähnlich der in suspensierter Hefe erzielt werden. Ab dem Moment der Sauerstoffsättigung sinken die Fluoreszenzintensitäten sowohl im NADH-Kanal als auch in den anderen Fluoreszenz-Kanälen. Nach 220 min und somit 30 min nach der Änderung der Begasung bleiben die Fluoreszenzintensitäten konstant. Dies zeigt, dass die im Gel immobilisierten Zellen auf die Veränderung des Sauerstoffgehalts reagiert haben.

Im Vergleich zu dem erwarteten Ergebnis, in dem unter anaeroben Bedingungen das Flavin-Signal sinkt und NADH steigt, wie es in Suspensionskulturen beobachtet werden konnte [46], steigen in diesem Versuch die Signalintensitäten in allen Kanälen an. Dieses Verhalten weist auf Zellwachstum hin, da Flavine als Sekundärmetaboliten erst hier ausgebildet werden. Außerdem nimmt der Proteingehalt im Gel, was ebenfalls für ein

Wachstum der Zellen spricht, zu. Die Abweichung zu den Erwartungen kann mit der langen Zeitspanne zwischen Beginn der Immobilisierung und Beginn des Versuchs begründet werden. Die Zellen waren zur Immobilisierung bereits 1 h im Medium und während dieser Zeit nicht optimal mit Sauerstoff versorgt, da Sauerstoff diffusionslimitiert ist (Kapitel „4.5.2 Einsatz in Modellbiofilm“). Somit konnten die Zellen ihren Metabolismus vor Beginn des Versuchs an die Bedingungen anpassen. Um den Effekt möglichst gering zu halten, wurde die Immobilisierung bei 4°C durchgeführt. Nach Versuchsbeginn, welcher unter anaeroben Bedingungen stattfand, kann vermutet werden, dass Zellwachstum gemäß anaerober Gärung erfolgte. Diese Hypothese wird zusätzlich durch einen Glucose-Schnelltest, der nach 250 min durchgeführt wurde, gestützt. Der Test zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt $>600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose im Medium vorliegt.

Für eine genauere Analyse des vermuteten Zellwachstums durch Gärung wurde der Versuch weitergeführt (Abbildung 41). Bei 275 min konnte zunächst ein sprunghafter Anstieg in allen Fluoreszenz-Kanälen verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Gel begonnen aufzulösen. Dies konnte visuell beobachtet werden und hat aufgrund der daraus resultierenden Veränderung der Messumgebung einen Einfluss auf die Fluoreszenzmessung.

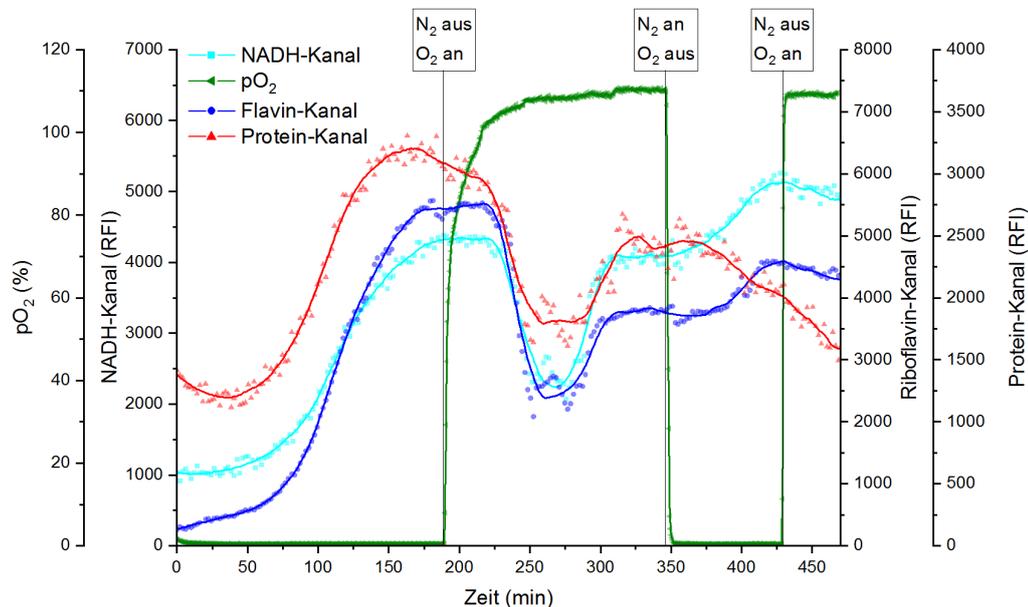


Abbildung 41: Analyse der induzierten Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe. Es ist der gesamte Verlauf des Experiments dargestellt. Die Zeitpunkte der Begasungsänderung sind gekennzeichnet.

Nach Änderung der Begasung auf Stickstoff kann direkt ein Anstieg im NADH-Kanal verzeichnet werden, da NADH aufgrund des anaeroben Milieus wieder in der reduzierten Form vorliegt. Die Signalintensität im Flavin-Kanal nimmt ebenfalls zu. Die Intensität der Protein-Fluoreszenz sinkt. In diesem Zyklus der Begasungsänderung sind die Änderungen deutlich schneller messbar als im ersten. Dies kann mit der aufgrund der beginnenden Auflösung des Gels anderen Messumgebung begründet werden. Da auch eine Signalkonstanz deutlich eher erreicht wurde, wird die Begasung erneut auf Sauerstoffbegasung gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt läuft der Versuch seit 6,5 h und die Zellen befinden sich inklusive der Immobilisierungszeit 7,5 h im Gel. Dies erklärt, dass trotz Änderung der Begasung keine Veränderungen in der Fluoreszenzintensitäten gemessen werden konnten. Aufgrund der zusätzlichen starken Abnahme der Protein-Fluoreszenzintensität wird davon ausgegangen, dass die Zellen absterben.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzmessungen wurden im Verlauf des Versuchs Proben aus dem Medium genommen. Diese wurden chromatographisch hinsichtlich Acetat und Ethanol analysiert (siehe Seite 104), um die Vermutung der einsetzenden Gärung weiter zu stützen. Die Proben wurden nach 250 min, 375 min sowie 475 min entnommen, da zu diesen Zeitpunkten unerwartete Änderungen in den Fluoreszenzintensitäten auftraten.

Mittels Gaschromatographie konnte kein Ethanol nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Gärung zu Ethanol nicht stattfindet. Allerdings konnte mittels HPLC Acetat im Medium nachgewiesen werden, welches zu Beginn des Versuchs nicht im Medium detektiert werden konnte. Nach 250 min liegt eine Acetatkonzentration von $0,028 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ im Medium vor. Zum Zeitpunkt des Wechsels zur Stickstoffbegasung ist die Konzentration an Acetat auf $0,032 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gestiegen und nimmt bis zum Ende des Versuchs auf $0,047 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ zu. Die Bildung von Acetat im Metabolismus von *S. cerevisiae* ist bekannt, hier jedoch ungewöhnlich. Das gebildete Acetat kann in einem weiteren Schritt zu Acetyl-CoA umgewandelt werden und geht so wieder in den Citratzyklus und die Atmungskette ein.

Die Analyse der induzierten Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe verlief nicht wie in suspensierter Bäckerhefe. Der Verlauf der gemessenen Fluoreszenzin-

tensitäten konnte allerdings in einen metabolischen Zusammenhang gebracht werden. Somit zeigt sich, dass der entwickelte Sensor in einem immobilisierten biologischen System eingesetzt werden kann.

5.2.4 Einsatz des entwickelten Sensors in der Biofilmmessung

Zur Testung des entwickelten Fluoreszenzsensors für die Endanwendung der Messung in einem Biofilm wurde ein abwasserbasierter Biofilm kultiviert. Da der Schwerpunkt in diesem Versuch auf der Testung in einem realen System lag und nicht auf der Evaluierung des Sensors für die Anwendung im biologischen System, wurde aufgrund der einfacheren Handhabung eine Mischkultur verwendet.

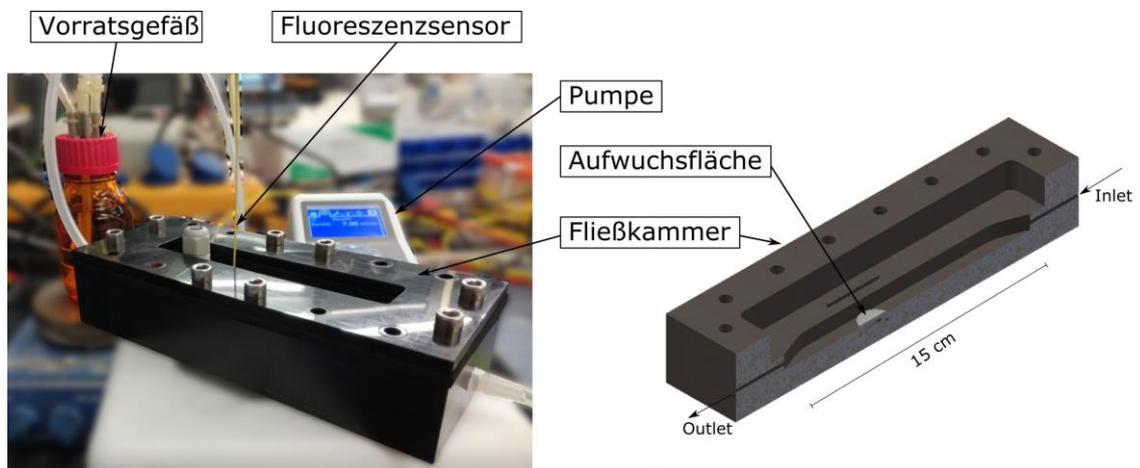


Abbildung 42: Einsatz des Fluoreszenzsensors zur Analyse eines Biofilms. Links: Versuchsaufbau. Rechts: CAD-Design der Fließkammer.

Der Versuchsaufbau sowie ein Querschnitt der Fließkammer sind in Abbildung 42 dargestellt. Die Kultivierung erfolgt bei laminarer Strömung in einer Fließkammer, welche am Institut für Chemische und Thermische Verfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig entwickelt wurde. In der Fließkammer wird als Aufwuchsfläche eine Graphitplatte integriert, welche überströmt wird. Graphit bietet hier den Vorteil, dass es sich um eine Kohlenstoff Verbindung handelt, welche durch seine hohe Porosität eine große Aufwuchsfläche aufweist. Das Material wird ebenfalls als Aufwuchsfläche und Elektrode für die mikrobielle Brennstoffzelle verwendet (Kapitel „5.1 Anwendung der pO_2 - und pH-Sensoren in der mikrobiellen Brennstoffzelle“). Der Fluoreszenzsensor

kann durch einen Zugang im Deckel der Fließkammer senkrecht in einem geringen Abstand von ca. 1 mm über der Aufwuchsfläche bzw. der Graphitplatte positioniert werden. Für die Analyse des Biofilmwachstums werden Protein-, Flavin und NADH-Fluoreszenz in einem Zeitintervall von 5 min gemessen. Das Medium wird in einem Vorratsgefäß vorgelegt und im Kreislauf durch die Fließkammer gepumpt (Versuchsdurchführung siehe Seite 105).

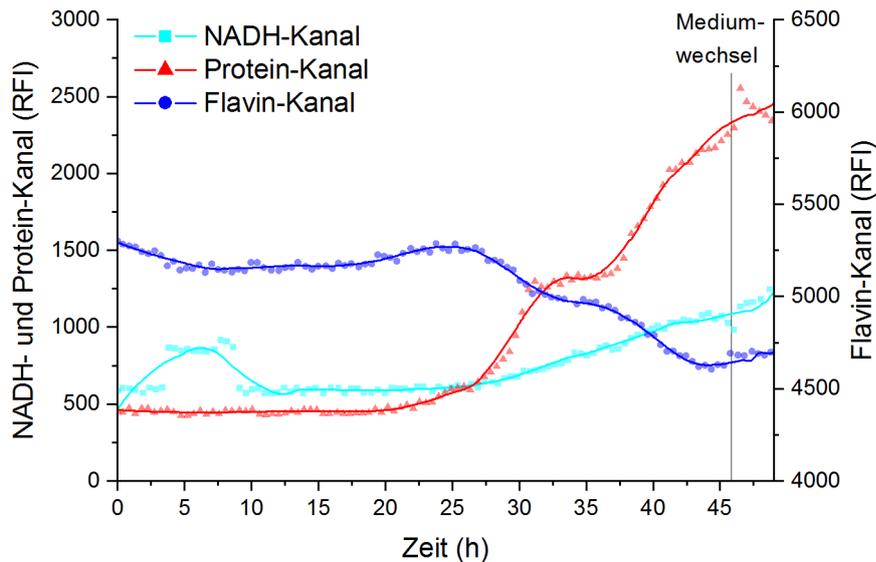


Abbildung 43: Kultivierung eines abwasserbasierten Biofilms. Es sind die Fluoreszenzintensitäten des NADH-, Protein- und Flavin-Kanals gegen die Zeit aufgetragen.

In Abbildung 43 sind die Verläufe der einzelnen Fluoreszenzmessungen dargestellt. Insgesamt weist die Messung auf die Bildung eines Biofilms hin. Zu Beginn der Messung sind die Fluoreszenzwerte auf einem konstanten Wert. In dieser Zeit sind noch keine Zellen auf der Graphitplatte angehaftet. Zwischen 5 und 10 h zeigt sich im NADH-Kanal allerdings ein Sprung im Signal, welcher nach 10 h wieder auf das Ausgangsniveau fällt. Der Sprung tritt nach durchgeführter Referenzfahrt auf. Da nach weiteren 100 Messungen das Signal wieder auf dem vorherigen Wert fällt, zeigt sich hier die Bedeutung der Referenzfahrt. Der Signalsprung liegt begründet in einer Fehlpositionierung der LED oder des entsprechenden Filters, welche nach erneuter Referenzfahrt korrigiert wurde. Um solche Fehlmessungen zu vermeiden, sollte in einem weiteren Schritt eine Kontrolle der Referenzfahrt integriert werden, welche ab einer zu großen Abweichung zwischen Messsignal vor und nach der Referenzfahrt eine erneute Referenzfahrt durchführt.

Im weiteren Verlauf des Experiments zeigt sich nach 22 h eine Veränderung in allen Fluoreszenz-Kanälen. Das Messsignal im Flavin-Kanal sinkt während das Fluoreszenzsignal im NADH- und Protein-Kanal steigen. Dieser Verlauf lässt sich mit der Bildung des Biofilms im Messbereich erklären. Aufgrund der Ausbildung von Mono- bzw. Multilayer Strukturen (Kapitel „3.1.2 Entstehung und Entwicklung“) nimmt der Proteinanteil stark zu, da sowohl die Matrix aufgebaut wird als auch mikrobielles Wachstum vorliegt. Letzteres erklärt auch die Zunahme im NADH-Kanal. Flavine hingegen sinken in ihrem Fluoreszenzsignal, da während der Phase des Wachstums Sekundärmetabolite nicht gebildet und stattdessen die im Medium vorliegenden verbraucht werden.

Um zu überprüfen, ob das gemessene Fluoreszenzsignal auf der Bildung eines Biofilms basiert, wird das gesamte Medium bei laufender Messung aus der Kammer gepumpt. Würde die gemessene Fluoreszenz von planktonischen Zellen ausgehen, sollte sich das Signal nach dem Ablassen des Mediums verändern. Stattdessen bleibt das Signal auf einem konstanten Niveau. Nach 10 min wurde frisches Medium in die Fließkammer gepumpt. Auch hier blieb das Signal konstant. Dies bestätigt, dass das Signal nicht von planktonischen Zellen stammen kann, da diese spätestens bei Einlassen des neuen Mediums weggespült worden wären.

Die Messung wurde weitere 4 h nach Medienwechsel weitergeführt. In dieser Zeit konnte ein erneuter beginnender Anstieg des Protein- und NADH-Signals beobachtet werden. Auch die Fluoreszenz im Flavin-Kanal steigt zunächst an. Dies kann mit den im Medium enthaltenen Flavinen begründet werden.

Im Fluoreszenzsignal zeigte sich bereits deutlich eine Biofilm Bildung. Um dies weiter zu verifizieren, wird die Graphitplatte nach der Kultivierung aus der Fließkammer entnommen. Auf der Graphitplatte konnte eine schleimähnliche Struktur beobachtet werden. Für eine genauere Betrachtung wurde zum einen die Graphitplatte direkt unter dem 3D-Mikroskop analysiert und zum anderen eine Probe der aufgewachsenen Struktur entnommen und mikroskopisch betrachtet. In Abbildung 44 sind die Aufnahmen mittels 3D Mikroskop dargestellt. Es wurde sowohl eine Aufnahme nach der Kultivierung als auch davor gemacht. Im Vergleich zeigt sich nach der Kultivierung eine gräuliche, dreidimensionale Struktur, welche in Kombination mit den gemessenen Fluoreszenzwerten auf eine Biofilmstruktur hindeutet.

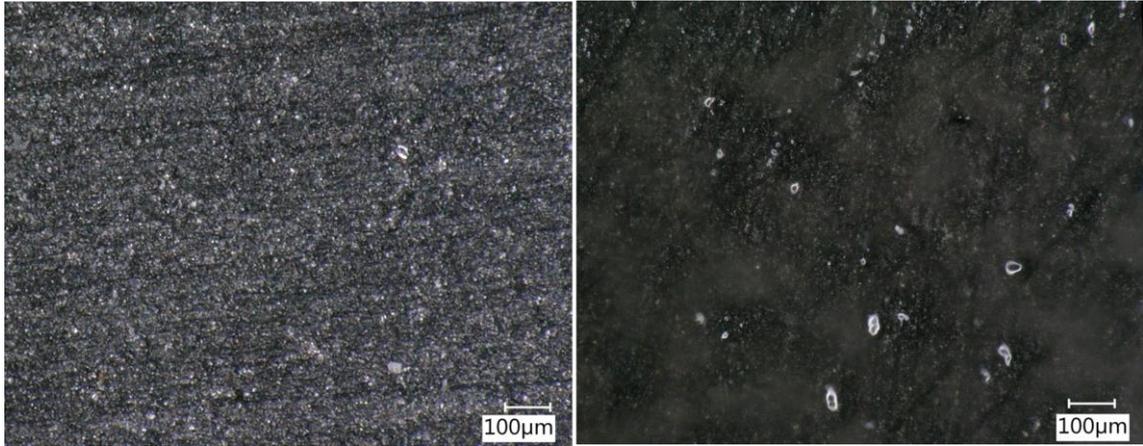


Abbildung 44: Mikroskopische Aufnahmen der Graphitplatte vor (links) und nach (rechts) der Biofilmkultivierung. Nach der Kultivierung konnte eine 3D-Struktur mittels des 3D-Mikroskops ausgemacht werden. Vergrößerung: 150x; Winkel zur Fokussierung: 22°

Von der Graphitplatte wurde zusätzlich ein Abstrich genommen und mittels Durchlichtmikroskopie betrachtet. In Abbildung 45 sind die Aufnahmen in zwei Vergrößerungen dargestellt. Es konnten verschiedene Bakterienformen beobachtet werden. Hierzu zählen unter anderem Stäbchen und Kokken. Aufgrund der Menge an Bakterien waren fokussierter Aufnahmen nicht möglich.

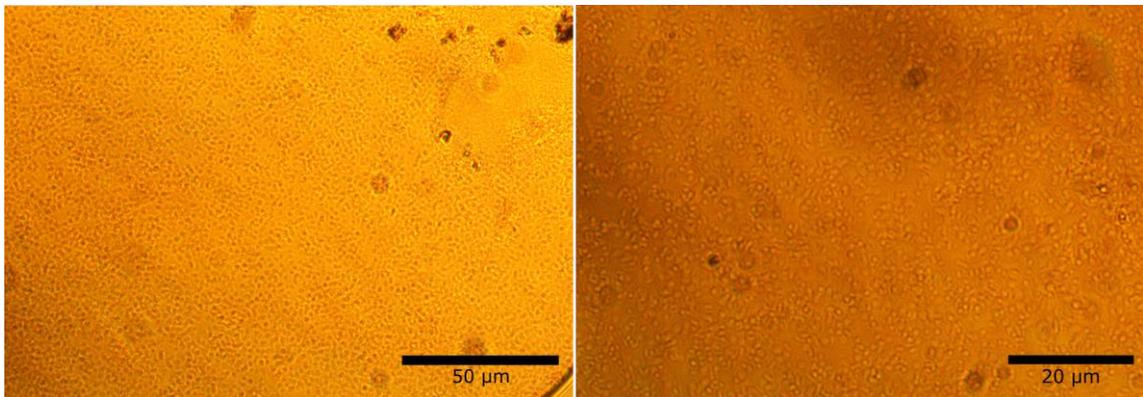


Abbildung 45: Mikroskopische Aufnahmen des kultivierten Biofilms. Links: 20x Vergrößerung. Rechts: 40x Vergrößerung.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit entwickelte Fluoreszenzsensor für den Einsatz des Biofilmmonitoring geeignet ist. Es konnte ein Biofilmwachstum auf Grundlage der Fluoreszenz von Proteinen, Flavinen und NADH analysiert werden. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass der Sensor trotz beweglicher Komponenten zuverlässig funktioniert, da Positionierungsfehler aufgrund regelmäßiger Referenzfahrten ausgeglichen werden können.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit konnte ein neuer, kompakter Sensor entwickelt werden, welcher fluoreszenzbasiert biogene Fluorophore in Biofilmen und deren Mikroumgebung messen kann. Das Ziel der Arbeit lag auf der Entwicklung eines Sensors, welcher durch seinen geringen Durchmesser an der Messspitze und durch die Möglichkeit sowohl orts- als auch zeitaufgelöst in Biofilmen messen zu können, charakterisiert sein sollte. Zusätzlich zu der Entwicklung eines Fluoreszenzsensors sollte ein kommerziell erhältliches pH- sowie pO_2 -Messsystem auf die Anwendung in Biofilmen übertragen werden.

In ersten Arbeiten wurde zunächst ein Sensor mit einem Durchmesser an der Messspitze von 500 μm konzipiert. Aufgrund des geringen Durchmessers war allerdings die Lichteinkopplung in den Lichtleiter für die gewünschten Messungen nicht ausreichend, sodass zusätzlich optische Linsen in den Aufbau integriert werden mussten. Die Optimierung der Lichteinkopplung durch den Einsatz einer asphärischen Linse erhöhte die Signalintensitäten signifikant. Allerdings konnte trotzdem nur ein geringer linearer Bereich für Messungen von NADH und Riboflavin bestimmt werden. Da mit dem Sensor auch die Entwicklung von Biofilmen detektiert werden soll, müssen schon geringe Konzentrationen der biogenen Fluorophore messbar sein. Somit wurde der Aufbau des ersten Prototypen überarbeitet.

In Anlehnung an „Prototyp 1“ wurde ein neuer Lichtleiter entwickelt. Zum einen wurde der Durchmesser des Lichtleiters an der Messspitze auf 1000 μm verändert. In diesem Zusammenhang wurde auch das Verhältnis zwischen Exzitations- und Detektionsfasern angepasst. Insgesamt konnte durch diese Veränderung die Exzitations- sowie Emissionsfläche soweit vergrößert werden, dass deutlich höhere Signalintensitäten erreicht werden konnten. Zusätzlich wurde die Lichtquelle durch eine effizientere high-power SMD-LED ersetzt. Diese war zum Zeitpunkt der Entwicklung von „Prototyp 1“ des Sensors noch nicht auf dem Markt erhältlich. Die „Prototyp 2“ des Sensors wurde nach vielversprechenden ersten Messungen in verschiedenen Experimenten evaluiert.

Für die Analyse von biologischen Systemen wurde der Sensor auf die Messung von Proteinen, NADH und Flavinen ausgelegt. Zusätzlich wurde ein Streulichtkanal integriert, welcher in Kombination mit den anderen Kanälen eine Analyse des Zellwachstums in Zusammenhang mit dem metabolischen Zustand der Zellen ermöglicht. Um den Durchmesser des Sensors gering zu halten, wurden ein LED- und ein Filter-Rad entwickelt. Diese sind in der Messbox integriert und ermöglichen die zeitversetzte Messung der Analyten. Die Fluoreszenz-Kanäle werden hierzu nacheinander mit einer hohen Genauigkeit angesteuert und können durch vorherige Programmierung beliebig und spezifisch auf die gewünschte Anwendung kombiniert werden. Des Weiteren ist das Messintervall frei wählbar, sodass der Sensor flexibel eingesetzt werden kann. Da die LEDs und Filter separat angesteuert werden, bietet der Sensor die Möglichkeit um zusätzliche Wellenlängenkombinationen erweitert zu werden.

In Experimenten zur Charakterisierung des Sensors wurden sowohl Einflüsse der Umgebung bestimmt, als auch Langzeitmessungen durchgeführt. Insgesamt konnte der entwickelte Sensor hinsichtlich der optischen und elektronischen Komponenten als stabil eingestuft werden. Selbst die mobilen Komponenten haben keinen negativen Einfluss auf die Messungen, da ebenfalls ein Referenzelement in den Aufbau integriert wurde. Dieses wird während der Messungen regelmäßig eingesetzt, um die exakte Positionierung der LEDs und Filter sicherzustellen. Somit konnte durch die verschiedenen Evaluierungs- und Charakterisierungsexperimente gezeigt werden, dass der „Prototyp 2“ trotz des geringen Durchmessers an der Messspitze verschiedene Fluorophore zuverlässig messen kann. Dies macht den Sensor konkurrenzfähig zu bisher entwickelten Sensoren, die mit einem größeren Durchmesser für Messungen in Suspensionskulturen verwendet werden.

Um den entwickelten Sensor für die Analyse von Biofilmen zuverlässig einzusetzen, wurde sich der Endanwendung schrittweise angenähert. Zunächst wurde der Sensor in Suspensionskulturen verwendet, um hier induzierte metabolische Änderungen zu detektieren. Die Messungen des Sensors sind mit denen anderer, in der Literatur bekannter Fluoreszenzsensoren vergleichbar und zeigen, dass der Sensor in biologischen Systemen eingesetzt werden kann. Nach erfolgreicher Evaluierung des Sensors in Suspensionskulturen wurde ein Modell für einen Biofilm entwickelt, in welchem Bäckerhefe in Alginate immobilisiert wurde. Auch hier konnten metabolische Veränderungen der Bäckerhefe mit

dem Sensor detektiert werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Biofilmmodell sich nur bedingt mit der Struktur eines realen Biofilms vergleichen lässt. Da sich das Alginat nicht an das Wachstum der Hefe anpassen kann, zersetzt sich das Hefe-Alginat-Gel im Verlauf der Messungen. Außerdem ist zum einen *S. cerevisiae* als Organismus kein natürlicher Biofilmbildner und zum anderen hatte die Immobilisierung im Alginat große Auswirkungen auf den Metabolismus der Zellen, der durch Diffusionslimitierung von Nährstoffen und Sauerstoff beeinflusst wurde. Trotz dieser Limitierungen im Versuchsaufbau konnte der Sensor erfolgreich in immobilisierten Strukturen eingesetzt werden. Es konnten alle drei Fluorophore im Gel gemessen und die Messwerte in einen schlüssigen metabolischen Zusammenhang gebracht werden.

Im Zusammenhang mit den Messungen in immobilisierter Bäckerhefe konnte ebenfalls der Einfluss der Messtiefe aufgezeigt werden. Da sich während des Versuchs das Hefe-Alginat-Gel zersetzt hat, hat sich auch die Messumgebung und somit die Messtiefe des Sensors verändert. Dies führte zu einer abrupten Veränderung der Signale in allen Fluoreszenzkanälen. In weiteren Arbeiten muss der Einfluss der Messtiefe auf die Fluoreszenzintensität in allen Kanälen bestimmt werden.

Der letzte Schritt der Sensorentwicklung war der Einsatz des Sensors zum Nachweis einer Biofilmbildung. Hierzu wurde ein abwasserbasierter Biofilm in einer Fließkammer kultiviert und hinsichtlich Proteinen, NADH und Flavinen analysiert. Im Verlauf des Experiments konnte eindeutiges Zellwachstum detektiert werden. Zusätzlich konnte die Bildung eines Biofilms mittels mikroskopischer Methoden offline nachgewiesen werden. In Rahmen dieses Proof-of-Principle-Experiments konnte der entwickelte Sensor erfolgreich für die als Ziel gesetzte Endanwendung verwendet werden und zeigt die einwandfreie Funktionalität des Sensors. Im Gegensatz zu anderen Messmethoden ermöglicht der Sensor eine online Analyse von Biofilmen, die neue Einblicke in die Biofilmentwicklung bietet. Es wird empfohlen, weitere Biofilmkultivierungen mit dem Fluoreszenzsensor zu analysieren und die Ergebnisse durch zusätzliche ex-situ und offline Messungen mit den in Kapitel „3.1.4 Charakterisierung von Biofilmen“ vorgestellten Methoden zu vergleichen. Neben abwasserbasierten Kultivierungen sollten außerdem Kultivierungen von Reinkulturen mit dem Sensor analysiert werden, um den Sensor in einem kontrollierten Versuch weiter zu evaluieren. Mögliche Organismen, die biofilmbildend sind – und als Reinkulturen in Frage kommen – sind unter anderem *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie

Geobacter sulfurreducens und *Shewanella oneidensis*. Letztere kommen als Organismen in der MBZ vor, für welche der Sensor entwickelt wurde. Die Messungen mit dem Fluoreszenzsensor sollten über den gesamten Verlauf der Kultivierung durchgeführt werden, um alle Stadien der Biofilmentwicklung nachweisen zu können. In diesem Zusammenhang muss der Sensor um die Möglichkeit der orts aufgelösten Messung erweitert werden, um sowohl in den einzelnen Schichten als auch an unterschiedlichen Positionen des Biofilms eingesetzt werden zu können. Hier bietet sich die Integration eines Mikromanipulators an. Falls der Sensor für MBZ Anwendungen eingesetzt wird, muss in diesem Zusammenhang auch eine Beweglichkeit des Sensors unter Sauerstoffausschluss gewährleistet werden. Für die Arbeiten mit Reinkulturen muss zusätzlich eine Möglichkeit der sterilen Sensorführung entwickelt werden. Der Lichtleiter selbst bietet hier schon die Möglichkeit der Sterilisierbarkeit.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden kommerziell erhältliche pH- und pO₂-Sensoren für die Anwendung in Biofilmen charakterisiert. Auch hier wurde Alginatgel als Biofilm-Modell verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des pH- bzw. pO₂-Werts in der Umgebung des Alginats diffusionsbedingt erst mit einer großen Zeitverzögerung im Gel nachweisbar sind. Somit wird empfohlen neben Messungen des pH- und pO₂-Werts im Biofilm auch in der Umgebung Messungen durchzuführen. Die pH- und pO₂-Sensoren wurden auch für die Analyse einer abwasserbasierten MBZ eingesetzt. Da es sich bei der MBZ um ein anaerobes System handelt, ist vor allem der Einsatz des pO₂-Sensors als Frühwarnsystems des Sauerstoffeintritts von großem Interesse. Die Sensoren wurden hierzu in der Nähe der Anode – der Aufwuchsfläche des Biofilms – positioniert und zeichneten über den gesamten Prozessverlauf der MBZ konstante Werte auf. Der Einsatz der Sensoren im biofilmbildenden System verlief somit erfolgreich und lieferte entscheidende Informationen über die Prozessumgebung der MBZ.

Insgesamt konnten nicht nur die kommerziell erhältlichen pH- und pO₂-Sensoren auf die Anwendung in Biofilmen übertragen werden, sondern auch ein neuer Fluoreszenzsensor erfolgreich entwickelt werden. Hier wurden alle Komponenten des Sensors – Lichtleiter, LEDs, Bandpassfilter und elektronische Komponenten – optimal aufeinander abgestimmt, um trotz der Anforderung an einen dünnen Sensor, aussagekräftige Messungen zu ermöglichen. Der Fluoreszenzsensor eignet sich im besonderen Maße für die Biofilm-

analyse und bietet Einblicke in den Zellmetabolismus. Als letzter Schritt in weiteren Arbeiten mit dem Fluoreszenzsensor sowie den pH- und pO₂-Sensoren müssen diese miteinander kombiniert werden. Hierdurch kann ein Biofilm nicht nur hinsichtlich Wachstum sondern auch hinsichtlich der Prozessumgebung analysiert werden. Es wird empfohlen, die Messsysteme miteinander zu kombinieren und in einem kompakten Gerät zu vereinen. Um weiterhin den Vorteil des dünnen Fluoreszenzsensors ausnutzen zu können, sollten die elektronischen und optischen Komponenten der pH- und pO₂-Sensoren und des Fluoreszenzsensors in einer Messbox kombiniert werden. Die Lichtleiter sollten dabei weiterhin separat genutzt werden, um den geringen Durchmesser des Fluoreszenzsensors beibehalten zu können. Nur dadurch ist eine hoch aufgelöste Messung im Biofilm möglich.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Daten

7.1.1 Einfluss der LED-Leistung auf die Fluoreszenz in der Schüttelkolbenkultivierung

Abbildung 46 zeigt das Messsignal bei voller LED-Leistung gegen das Messsignal bei halber LED-Leistung. Es konnte ein linearer Zusammenhang mit einer Steigung von 2,18 und $R^2=0,998$ zwischen den Messwerten festgestellt werden. Dies bedeutet, dass bei doppelter LED-Leistung sich die relative Fluoreszenzintensität verdoppelt.

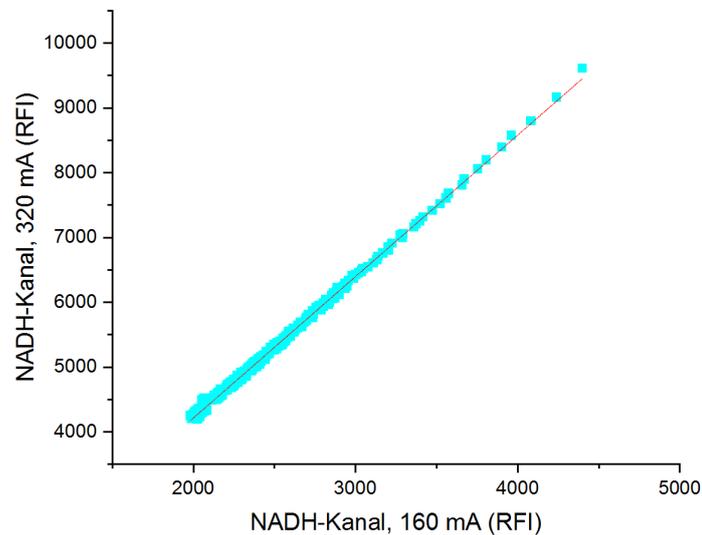


Abbildung 46: Bestimmung der LED-Leistung auf das Fluoreszenz-Signal. Es sind die relativen Fluoreszenzintensitäten des NADH-Kanals bei 160 mA und 320 mA gegeneinander aufgetragen.

7.2 Materialien

7.2.1 Chemikalienliste

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
4-Methylumbelliferon	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Agarose	Geniesserdepot, <i>Werdohl</i>
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck KGaA, <i>Darmstadt</i>
Ammoniumchlorid	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Ammoniumhydrogensulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Biotin	AppliChem GmbH, <i>Darmstadt</i>
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Chininsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Cobalt(II) Dichlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Diammoniumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
DL-Calciumpantothonat	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Fleischextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Folsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Kaliumchlorid	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Kupfersulfat Pentahydrat	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Lactat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Lactatdehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Liponsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck KGaA, <i>Darmstadt</i>
Mangansulfat Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
NADH	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Natriumchlorid	VWR International GmbH, <i>Darmstadt</i>

Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Natriumdihydrogensulfat Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>
Natriumhydroxid	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Natriumsulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Nikotinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Nitrilotriessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
p-Aminobenzoessäure	AppliChem GmbH, <i>Darmstadt</i>
Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
pH Buffer solution (pH 4, 7, 9)	Merck KGaA, <i>Darmstadt</i>
Pyridoxinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Riboflavin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Sauerstoff	Linde AG, <i>Pullach</i>
Silikonkleber	RS Components GmbH, <i>Mörfelden-Walldorf</i>
Stickstoff	Linde AG, <i>Pullach</i>
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Vitamin B12	Honeywell Fluka, <i>New Jersey</i>
Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>
Zinksulfat Heptahydrat	AppliChem GmbH, <i>Darmstadt</i>
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, <i>St. Louis</i>

7.2.2 Liste verwendeter Software

Tabelle 9: Verwendete Software.

Software	Entwickler
Autodesk Inventor 2019	Autodesk, <i>San Rafael</i>
DinoCapture2.0	AnMo Electronics Corporation, <i>Neu-Taipeh</i>
Inkscape 0.92	Open Source Software
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, <i>Redmond</i>
OriginPro 2018	OriginLab, <i>Northhampton</i>
Oxy-4 mini version 2.30FB	PreSens Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
pH-4 mini version 1.07	PreSens Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
ProfiSignal	Delphin Technology AG, <i>Bergisch Gladbach</i>

7.2.3 Material- und Geräteliste

1. 3D Drucker, ProJet MJP 2500 Plus, Kisters AG, *Aachen*
2. 3D-Mikroskop, VHX-6000, Keyence Corporation, *Osaka*
3. 96-Well Mikrotiterplatten, schwarz, Greiner Bio-One International GmbH, *Kremsmünster*
4. Achromat, 3,99 mm, Brennweite: 7,2 mm, Präzisionsoptiken.eu, *Wandlitz*
5. Analog-Digital-Wandler, MCP 3426, Microchip Technology Inc., *Chandler*
6. Autoklav, Systec V-150, Systec GmbH Labor Systemtechnik, *Wettenberg*
7. Digitales Mikroskop, Dino-Lite Edge series AM4000 series, ANMO Electronics Corporation, *Neu-Taipeh*
8. Doppelkonvexe Linse, UV-AR beschichtet, 6 mm Durchmesser, 9 mm Brennweite, Edmund Optics Inc., *Barrington*
9. Einkanal-Kolbenhubpipetten, Transferpette® S, Brand GmbH & Co. KG, *Wertheim*
10. Embedded Linux-Rechner, Linkit™ Smart 7688, Seeed Technology Co.,Ltd, *Shen Zhen*
11. Feinwaage, AC 211 S, Sartorius Stedim Biotech S.A, *Göttingen*
12. Feinwaage, MC1 AC 210 S, Sartorius Stedim Biotech S. A, *Göttingen*
13. Fluoreszenz-Bandpassfilter, 340, 448, 525 und 832 nm, *Edmund Optics Inc., Barrington*
14. Fluoreszenzspektrometer, Hitachi F-7000, Hitachi, *Tokio*
15. Gaschromatographie, GC-2010 Plus, Shimadzu Corporation, *Kyoto*
16. Gasmischer, Institut für Technische Chemie, *Hannover*
17. GC-Säule, Petrocol® DH Capillary GC Column, Merck KGaA, *Darmstadt*
18. Glasflasche mit Schraubdeckel, Duran®, Schott AG, *Mainz*
19. Glucose-Test, Glucose MQuant®, Merck KGaA, *Darmstadt*
20. Graphit-Block, CP 2200, 300x300x5 mm), CP-Handels GmbH, *Wachtberg*
21. HPLC, HPLC Chromaster, Hitachi High-Technologies Corporation, *Tokio*
22. HPLC-Säule, Aminex HPX-87H column, Bio-Rad Laboratories GmbH, *Feldkirchen*
23. Inkubationsschüttler, KS 4000 ic control, IKA® Werke GmbH & Co. KG, *Staufen*
24. Kondensator, 4700 µF AL-ELKO, FTCAP GmbH, *Husum*
25. Laborwaage, CP8201, Sartorius Stedim Biotech S.A, *Göttingen*
26. Lapping film, 3M™ Diamond Lapping Film, 3M GmbH, *Neuss*
27. Laserspiegel, 12,7 mm Durchmesser, präzise breitbandig, *Edmund Optics Inc., Barrington*
28. LED, DUV280-SD356, Roithner Lasertechnik, *Wien*
29. LED, DUV340-SMD, Roithner Lasertechnik, *Wien*
30. LED, SMB1N-365V, Roithner Lasertechnik, *Wien*
31. LED, SMB1N-830N, Roithner Lasertechnik, *Wien*
32. LED, SMB1N-D450, Roithner Lasertechnik, *Wien*
33. Lichtleiter Prototyp 1, Sonderanfertigung, art photonics GmbH, *Berlin*

34. Lichtleiter Prototyp 2, Sonderanfertigung, art photonics GmbH, *Berlin*
35. Lichtschranke, TCST2000, Vishay Semiconductor GmbH, *Heilbronn*
36. Magnetrührer, MR2002, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, *Schwabach*
37. Microcontroller, P8X32A, Parallax Inc., *Rocklin*
38. O₂-Sensorfolie, SF-RPSu4-L4/W4-OIW, PreSens GmbH, *Regensburg*
39. Optische Bank, Institut für Technische Chemie, *Hannover*
40. Parafilm® M, American National Can Group, *Chicago*
41. pH Elektrode, EasyFerm, Hamilton Company, Reno, *Nevada*
42. pH Messgerät, pH-4 mini v2, 4-channel fiber optic pH Transmitter, PreSens GmbH, *Regensburg*
43. pH Meter, HI 211, Hanna Instruments, *Kehl am Rhein*
44. pH Spots, SP-HP5-D3-US, PreSens GmbH, *Regensburg*
45. Phasenkontrastmikroskop, BX41, Olympus, *Hamburg*
46. Photodiode, SD 112-45-11-221, Luna Optoelectronics, *Camarillo*
47. Photometerküvetten, , 1000 µl, 1 cm Dicke, Kunststoff, Sarstedt AG & Co., *Nürnbrecht*
48. Pipettenspitzen, 0,5-10 µL, 2-200 µL und 50-1000 µL, Brand GmbH & Co. KG, *Wertheim*
49. Plankonvexe Linse, UV-AR beschichtet, 6 mm Durchmesser, 9 mm Brennweite, Edmund Optics Inc., *Barrington*
50. pO₂ mini presens, OXY-4, 4-channel Oxygen Meter, PreSens GmbH, *Regensburg*
51. pO₂ Spots, SP-PSt3-NAU-D3-YOP, PreSens GmbH, *Regensburg*
52. Polymeroptische Fasern, POF-L2.5-1SMA, PreSens GmbH, *Regensburg*
53. Potentiostat, Institut für Technische Chemie, *Hannover*
54. Potentiostat, Iviumstat, Ivium Technologies B.V., *Eindhoven*
55. Power Schalter, BTS 716, Infineon Technologies AG, *München*
56. Pumpe, IPC, ISM 931C, Ismatec®, Cole-Parmer GmbH, *Wertheim*
57. Reaktionsgefäße, 1 ml und 2 ml, Sarstedt AG & Co., *Nürnbrecht*
58. Reaktionsgefäße, 10 ml und 50 ml, Greiner Bio-One GmbH, *Frickenhausen*
59. Referenzelektrode, Ag/AgCl, SE11, Sensortechnik Meinsberg GmbH, *Waldheim*
60. Reinstwasser-System, Arium® 661, Sartorius Stedim Biotech S.A., *Göttingen*
61. Rundfilter, Ø 125 mm, Schleicher & Schuell, *Dassel*
62. Saphirfenster, 2,5 mm Durchmesser, unbeschichtet, Edmund Optics Inc., *Barrington*
63. Schrittmotor, SMC11, Nanotec Electronic GmbH & Co KG, *Feldkirchen*
64. Schüttelkolben ohne Schikanen, Polycarbonat, Corning Inc., *Corning*
65. Schüttelkolben-Sensor-Plattform, Shake Flask Reader, PreSens GmbH, *Regensburg*
66. Spektrophotometer, Biochrom Libra S50 UV/Vis, Harvard Bioscience, Inc., *Holliston*
67. Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm, Sartorius Stedim Biotech S. A., *Göttingen*

-
- 68. Sterilbank, Herasafe®, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, *Bonn*
 - 69. Stromquelle, LT3080, Linear Technology Corporation, *Milpitas*
 - 70. Vierhalskolben, 250 mL und 500 mL, Gebr. Rettberg GmbH, *Göttingen*
 - 71. Visuelles pO₂ Messgerät, VisiSens A1 + Detector Unit DU01, PreSens GmbH, *Regensburg*
 - 72. Vortexer, Genius 3, IKA® Werke GmbH & Co. KG, *Staufen*
 - 73. Zentrifuge, Heraeus Pico, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, *Bonn*
 - 74. Zentrifuge, Megafuge® 1.0 RS, Heraeus Instruments GmbH, *Osterode*

7.2.4 Kulturmedien und Pufferlösungen

In den folgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Medien aufgelistet. Wenn nicht anders vermerkt, werden alle Puffer und Medien mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf den angegebenen pH-Wert eingestellt. Sofern eine Sterilität der Lösungen notwendig ist, werden diese entweder bei 121°C für 30 min autoklaviert oder sterilfiltriert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des artifiziellen Abwassers.

Komponente	Menge
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.69 g
Na ₂ HPO ₄	4.33 g
NH ₄ Cl	0.31 g
KCl	0.13 g
Mineralstofflösung	12,5 mL
Vitaminlösung	12,5 mL
Natriumacetat	10 mM
ddH ₂ O	ad 1 L

Tabelle 11: Zusammensetzung der Mineralstoff- (links) und Vitaminlösung (rechts).

Komponente	Menge	Komponente	Menge
Nitrilotriessigsäure	1,5 g	Biotin	2,0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,0 g	Folsäure	2,0 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,45 g	Pyridoxinhydrochlorid	10,0 mg
NaCl	1,0 g	Thiaminhydrochlorid	5,0 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	Riboflavin	5,0 mg
CaCl ₂	0,075 g	DL-Calciumpantothonat	5,0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,178 g	Vitamin B12	0,1 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g	p-Aminobenzoesäure	5,0 mg
AlK(SO ₄) ₂	0,01 g	Liponsäure	5,0 mg
H ₃ BO ₃	0,01 g	ddH ₂ O	ad 1 L
ddH ₂ O	ad 1 L		

Zum Ansetzen der Mineralstofflösung: Zuerst die Nitrilotriessigsäure in 750 mL Reinstwasser lösen und den pH-Wert mit KOH auf 6.5 einstellen, ggf. mit HCl korrigieren.

Tabelle 12: Zusammensetzung des SD-Mediums zur Kultivierung von *S. cerevisiae*.

Komponente	Menge
YNB	1,7 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,13 g
Glucose	20,0 g
ddH ₂ O	ad 1 L
pH	6

Tabelle 13: Zusammensetzung des Schatzmann-Puffers.

Komponente	Menge
Glucose	15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9 g
KCl	0,9 g
ddH ₂ O	ad 1 L
pH	4

Tabelle 14: Zusammensetzung des NB-Mediums.

Komponente	Menge
Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
Glucose	10 g
ddH ₂ O	ad 1 L
pH	6,5

Tabelle 15: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Komponente	Menge
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ HPO ₄	0,27 g
ddH ₂ O	ad 1 L

7.2.5 Verwendete Stämme

S. cerevisiae Stamm H1024 (National Collection of Yeast Cultures)

7.3 Aufbau und Funktion des Sensors „Prototyp 2“

Im Folgenden werden sowohl die optischen Komponenten des Sensors als auch der Aufbau und die Funktionsweise beschrieben. Der Fluoreszenzsensor „Prototyp 2“ weist im Rahmen dieser Arbeit 4 Messkanäle auf. Die Messeinstellungen der Kanäle sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Kanäle werden nacheinander angesteuert. Es besteht weiterhin die Möglichkeit für eine Messung nicht alle Kanäle zu verwenden. Nach 100 durchgeführten Messungen erfolgt eine Referenzfahrt.

Tabelle 16: Spezifikationen der Messkanäle.

Kanal	Wellenlängen (EX/EM)	LED-Leistung	Verstärkungsfaktor
Protein-Kanal	280/340	320 mA	8
NADH-Kanal	365/450	320 mA	variiert je nach Experiment
Flavin-Kanal	450/525	320 mA	1
Streulicht-Kanal	830/830	320 mA	1

In Abbildung 47 ist die Messbox des Sensors mit Bemaßungen dargestellt. Es sind sowohl die optischen als auch die elektronischen Komponenten eingezeichnet. Für eine bessere Übersicht wurde auf die Darstellung des Kondensators und des gesamten Lichtleiters verzichtet. Eine Konstruktionszeichnung des Lichtleiters „Prototyp 2“ ist in Abbildung 49 abgebildet und die Spezifikationen sind in Tabelle 17 gelistet. Die LEDs und Bandpassfilter sind in der Konstruktionszeichnung nummeriert und deren Spezifikationen in Tabelle 18 und Tabelle 19 zusammengefasst.

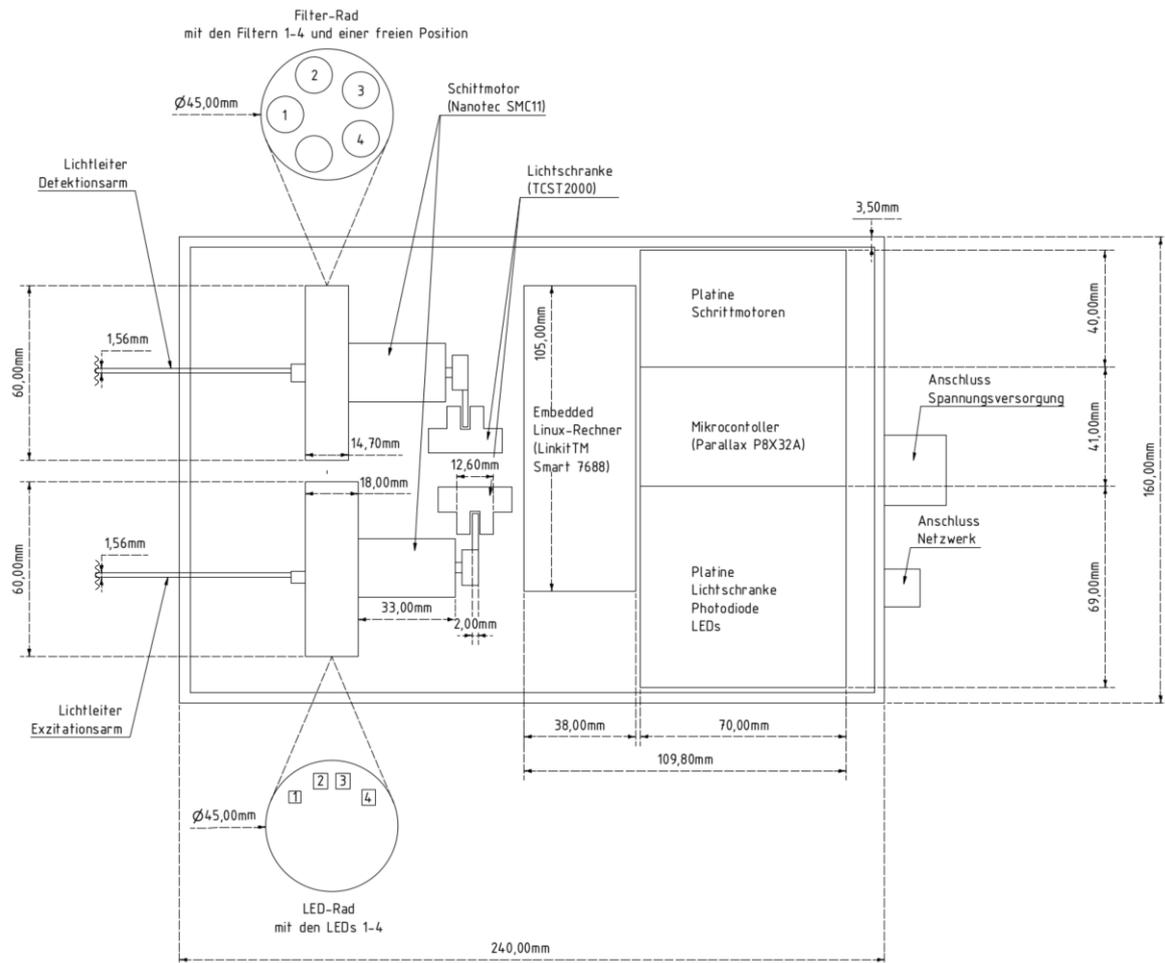


Abbildung 47: Maßstabgetreue Konstruktionszeichnung des entwickelten Sensors. Es sind die optischen und elektronischen Komponenten dargestellt. Der Lichtleiter ist für eine bessere Übersicht nicht vollständig und der Kondensator nicht dargestellt. Die der Nummerierung entsprechenden LEDs und Bandpassfilter sind Tabelle 18 und Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 17: Spezifikationen der Lichtleiter „Prototyp 1“ und „Prototyp 2“

	Prototyp 1	Prototyp 2
Faserbündel	1xUV100/110/160 Al + 10xUV50/60/70P	1xUV200/220/245P + 6xUV200/220/245P
Länge	1,75 ±0,1 m Leiterarme: 0,8 m Bündel: 0,95 m	1,0 ±0,1 m Leiterarme: 0,8 m Bündel: 0,2 m
Material	Quarzglasfasern	Quarzglasfasern
Numerische Apertur	0,22 ±0,02	0,22 ±0,02
Messende	poliertes Ende	poliertes Ende
Ummantelung	PEEK	PEEK
Konnektoren	SMA-Stecker	SMA-Stecker

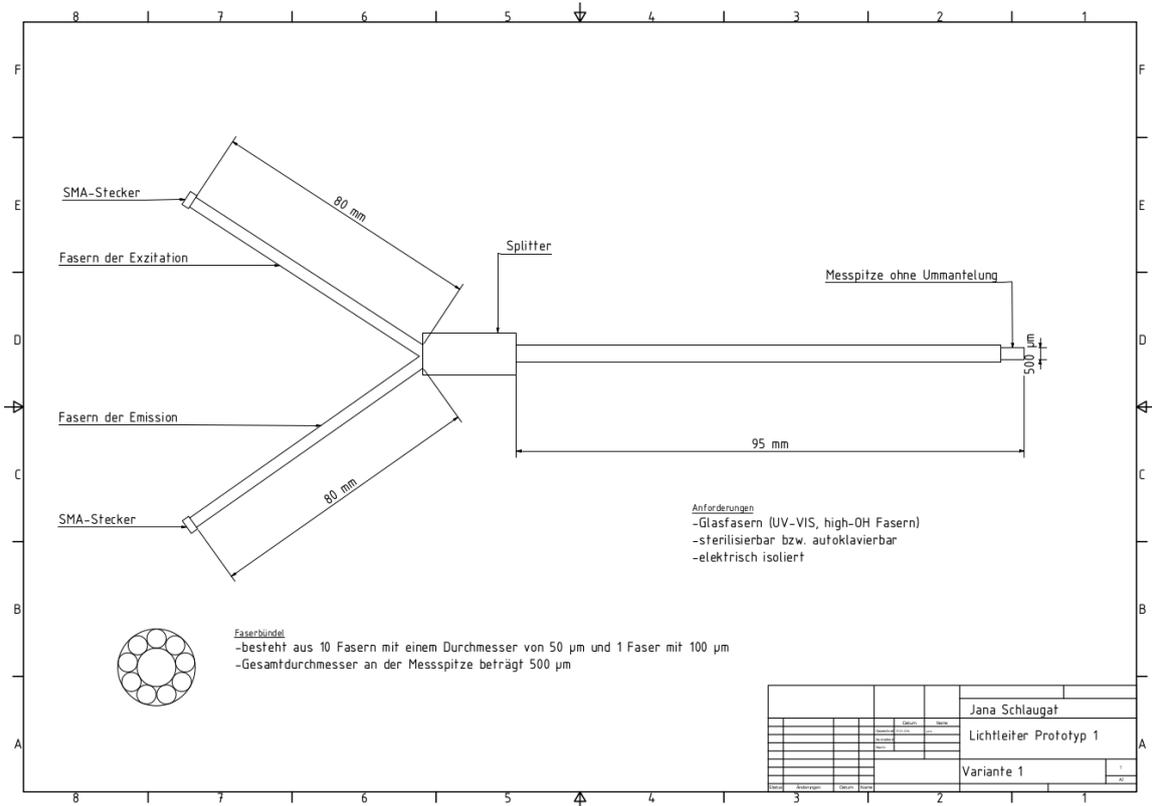


Abbildung 48: Konstruktionszeichnung des Lichtleiters „Prototyp 1“. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu.

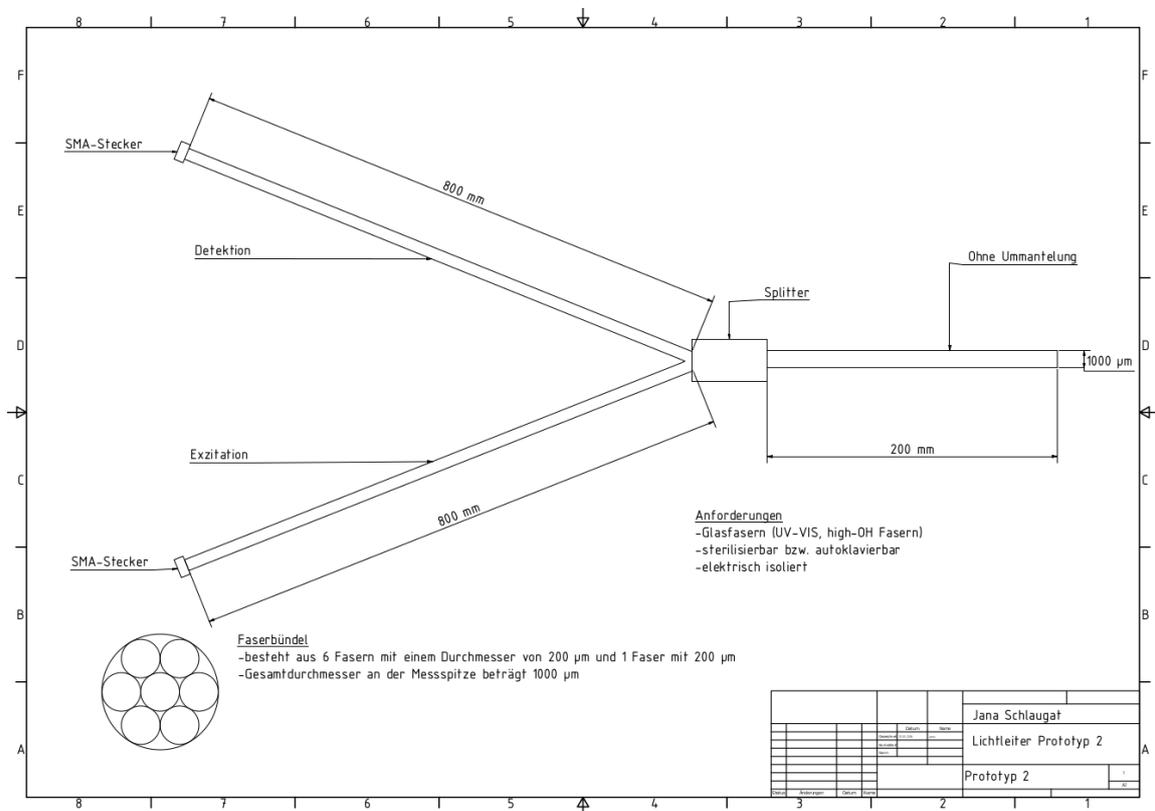


Abbildung 49: Konstruktionszeichnung des Lichtleiters „Prototyp 2“. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu.

Tabelle 18: Spezifikationen der LEDs des entwickelten Fluoreszenzensors. Alle LEDs sind von der Firma Roithner Lasertechnik GmbH (Wien) hergestellt.

Nummer	Wellenlänge	Bezeichnung	Po	Io	Abstrahlwinkel
1	280 nm \pm 5 nm	DUV280-SD356	45 mW	600 mA	120°
2	365 nm \pm 5 nm	SMB1N-365V	500 mW	500 mA	126°
3	450 nm \pm 10 nm	SMB1N-D450	480 mW	350 mA	130°
4	830 nm \pm 10 nm	SMB1N-830N	280 mW	800 mA	128°

Tabelle 19: Spezifikationen der optischen Bandpassfilter des entwickelten Fluoreszenzensors. Alle Bandpassfilter sind von der Firma Edmund Optics Inc. (Barrington) hergestellt.

Nummer	Wellenlänge	Bandbreite	Blockung	Durchmesser
1	340 nm	\pm 26 nm	OD6	12,5 mm
2	448 nm	\pm 20 nm	OD6	12,5 mm
3	525 nm	\pm 15 nm	OD6	12,5 mm
4	832 nm	\pm 37 nm	OD6	12,5 mm

In Abbildung 50 sind die elektronischen Komponenten dargestellt. Gesteuert werden diese durch einen Mikrocontroller. Mit diesem sind die Photodiode mit integriertem Transimpedanzwandler (kurz: TIA) sowie vorgeschaltetem Analog-Digital-Wandler (kurz: ADC) verbunden. Außerdem werden die LEDs auf dem LED-Rad, die Lichtschranken und die Motorsteuerung vom Mikrocontroller angesteuert. Für eine sequentielle Ansteuerung der LEDs ist diesen ein Schalter vorgeschaltet. Der Mikrocontroller selbst bekommt seine Befehle von einem integrierten Linux-Rechner.

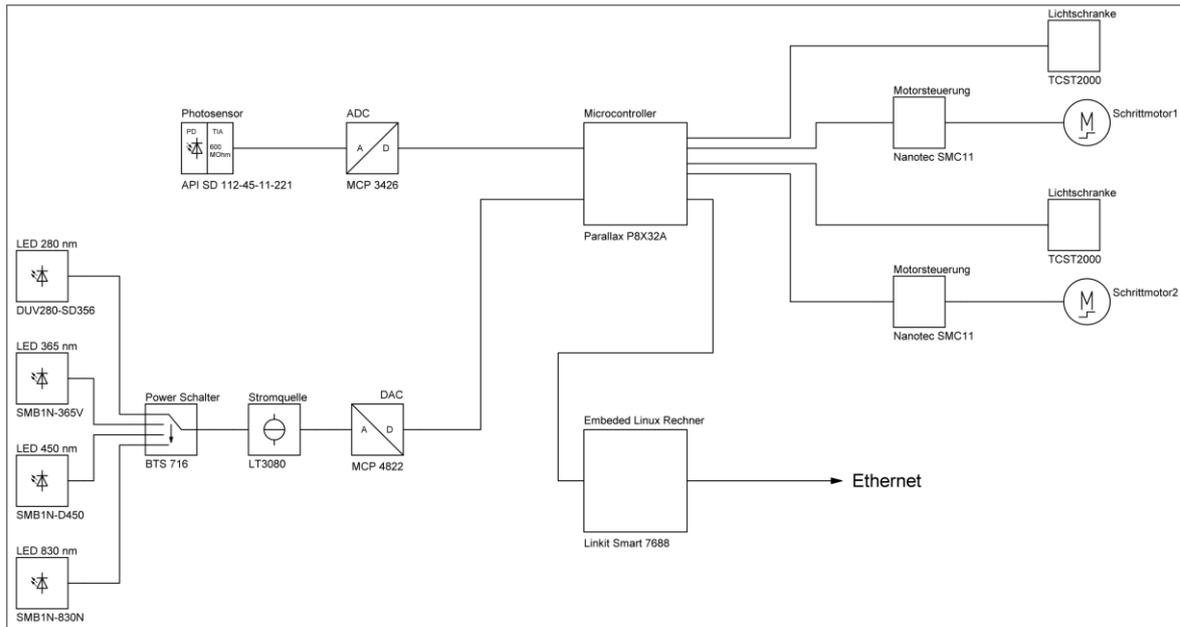


Abbildung 50: Übersicht der elektronischen Komponenten des Sensors.

Auf dem Linux-Rechner ist die Software zur Steuerung des Sensors hinterlegt. Unter anderem ist hier die Klasse Photoprop definiert. Diese umfasst die Befehle, die an den Mikrocontroller mittels serieller Kommunikation zur Ausführung weitergegeben werden. Instanziiert wird diese Klasse in dem Messprogramm. Hier kann der Benutzer unter Verwendung der in Photoprop hinterlegten Befehle eine Messung planen. Wird das Messprogramm ausgeführt, steuert dieses über den Mikrocontroller die einzelnen Komponenten an. Werte, die während einer Messung generiert werden, werden von dem Linux-Rechner aus dem Mikrocontroller ausgelesen. Der Rechner hinterlegt die Messwerte auf einem Modbus-Server, von wo aus sie zur weiteren Datenverarbeitung abgerufen werden können. Schematisch ist dieser Ablauf in Abbildung 51 dargestellt.

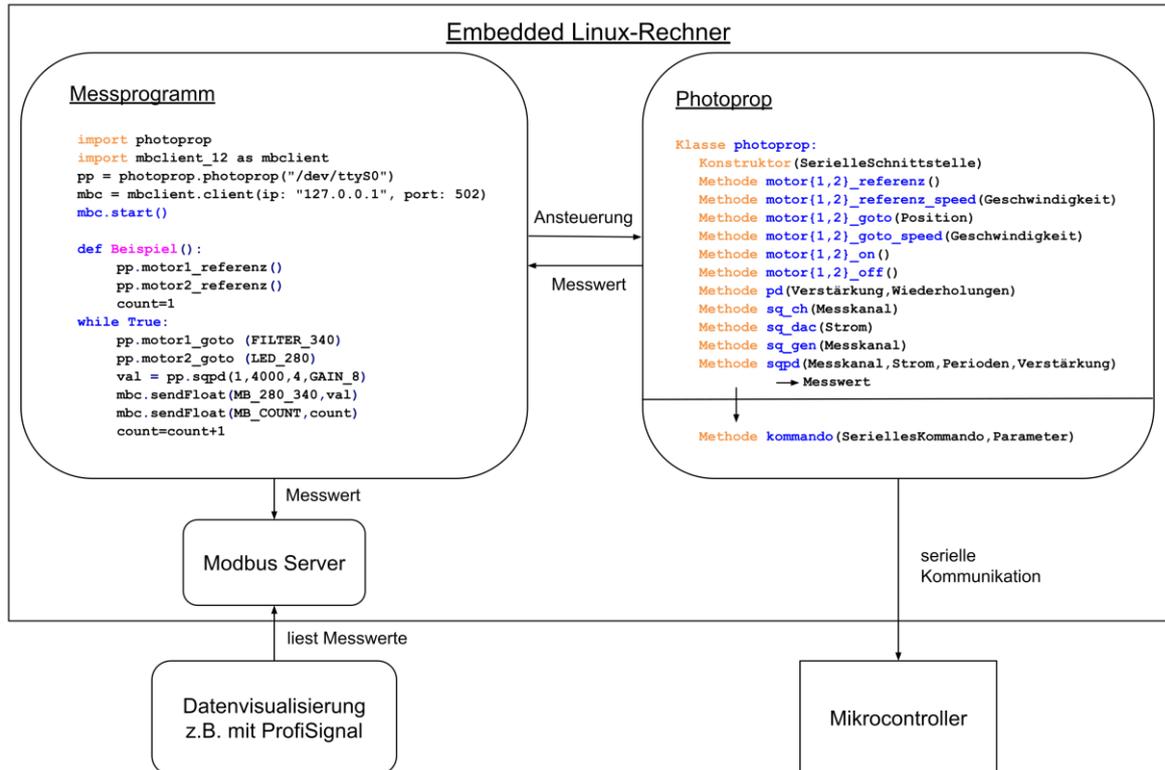


Abbildung 51: Prinzipskizze der Software des Sensors. Sowohl der Linux-Rechner als auch der Mikrocontroller finden sich in der Übersicht der elektronischen Komponenten wieder (Abbildung 50).

In Tabelle 20 ist ein Beispiel des Source-Codes dargestellt. Das Beispiel bezieht sich auf das in Abbildung 51 dargestellt Messprogramm. Zunächst wird eine Referenzfahrt des Filter- und LED-Rads durchgeführt. Anschließend erfolgt in einer Schleife die eigentliche Messung. Hierbei werden die Motoren auf die jeweiligen optischen Komponenten eingestellt und eine Messung durchgeführt. Der gemessene Wert wird an den Server übermittelt und der Zähler anschließend hochgesetzt.

Tabelle 20: Beispiel eines Source-Codes zur Ansteuerung des Sensors. Im Beispiel wird eine Messung bei 280 nm/340 nm (EX/EM) durchgeführt.

<code>def Beispiel():</code>	Bezeichnung des Programms
<code> logging.info("beispiel")</code>	
<code> logging.info("Motor 1 Referenzfahrt")</code>	Referenzfahrt Filter-Rad
<code> pp.motor1_referenz()</code>	
<code> logging.info("Motor 2 Referenzfahrt")</code>	Referenzfahrt LED-Rad
<code> pp.motor2_referenz()</code>	
<code> count=1</code>	Zähler wird gestartet
<code>while True:</code>	
<code> logging.info("Photodiode Filter 340")</code>	Filter-Rad steuert den 340 nm Filter an und gibt den
<code> pp.motor1_goto (FILTER_340)</code>	Text Photodiode Filter 340 aus
<code> logging.info("LED 280")</code>	LED-Rad steuert die 280 nm LED an und gibt den
<code> pp.motor2_goto (LED_280)</code>	Text LED 280 aus
<code> val = pp.sqpd(1,4000,4,GAIN_8)</code>	Messbefehl: LED 1 (280 nm) wird mit einer Inten-
	sität von 4000 (330 mA) 4mal angesteuert. Das Sig-
	nal wird 8fach verstärkt
<code> logging.info(str(val))</code>	Gemessener Wert wird als Text wiedergegeben
<code> mbc.sendFloat(MB_280_340, val)</code>	Der gemessene Wert und der Zähler werden an den
<code> mbc.sendFloat(MB_COUNT,count)</code>	Server übertragen
<code> count=count+1</code>	Der Zähler wird hochgesetzt

7.4 Methoden

7.4.1 Bestimmung der Exzitations- und Emissionswellenlängen

Für die Wahl der LEDs und Bandpassfilter werden mittels eines 3D Fluoreszenzspektrums die Wellenlängen der zu messenden Fluorophore bestimmt. Hierzu wird BSA als Referenz für den Protein-Kanal und Riboflavin als Referenz für den Flavin-Kanal verwendet. Sowohl BSA und Riboflavin als auch NADH werden in 1x PBS Puffer gelöst und mit den in Tabelle 22 gelisteten Konzentrationen mit dem Fluoreszenzspektrometer nacheinander vermessen. Die Gewählten Parameter sind in Tabelle 21 gelistet. Über die Bestimmung des Maximums des Spektrums wird die Wellenlänge für die LEDs und Bandpassfilter ermittelt.

Tabelle 21: Bestimmung der Exzitations- und Emissionswellenlängen. Spezifikationen der Messungen.

	BSA	NADH	Riboflavin
Konzentration	$4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
PMT-Spannung	700 V	900 V	700 V
Abtastrate	$12.000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$	$12.000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$	$12.000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$
Exzitations-Slit	5 nm	5 nm	5 nm
Emissions-Slit	5 nm	5 nm	5 nm

7.4.2 Linsenpositionierung

Die Linsenpositionierung erfolgt auf einer optischen Bank (Abbildung 52). Hier werden Lichtleiter, Linse und LED fixiert und können sowohl in Höhe sowie in Entfernung zueinander exakt eingestellt werden. Zur Ermittlung des idealen Abstands werden diese zwischen den Komponenten variiert. Die Signalmessung erfolgt gegen einen Laserspiegel. Hierzu wird der Lichtleiter im 90° Winkel auf den Spiegel gerichtet und die Reflexion an der Photodiode gemessen. Die Messungen finden abgedunkelt statt, um den Einfluss von Umgebungslicht auszuschließen.

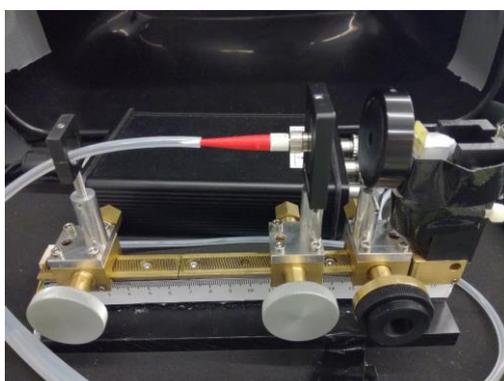


Abbildung 52: Aufnahme der optischen Bank zur Optimierung der Lichteinkopplung in den Lichtleiter. Alle Komponenten können exakt ausgerichtet werden und sind fixiert.

7.4.3 Kalibrationen

Für die Kalibration des Sensors wurden Stammlösungen an Riboflavin, NADH, BSA und Chininsulfat in den jeweiligen Konzentrationen angesetzt (Tabelle 22). Hierzu wurde die entsprechende Menge in 1xPBS Puffer suspendiert und gegebenenfalls der pH-Wert mit NaOH oder HCl eingestellt.

Tabelle 22: Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen.

Fluorophor	Konzentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Einwaage g pro 100ml
Riboflavin	$8\cdot 10^{-5}$	0,003
NADH	$1\cdot 10^{-4}$	0,007
BSA	$5\cdot 10^{-4}$	3,32
Chininsulfat	$8\cdot 10^{-4}$	0,03

Für die Kalibrationsreihe wurden aus den Stammlösungen die Verdünnungen erstellt und 300 μl der einzelnen Verdünnungen in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert. Die Proben wurden in absteigender Konzentration nacheinander mit dem Sensor vermessen. Die Messungen wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Messergebnisse wurden anschließend gegen die Konzentration in einer doppellogarithmischen Skalierung aufgetragen.

7.4.4 Einfluss der LED Leistung

Zur Bestimmung des Einflusses der LED-Intensität auf die Fluoreszenz wird eine Riboflavin-Lösung ($4\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) angesetzt. Die Exzitation erfolgt bei 450 nm und die Emission bei 525 nm. Die Intensität der LED wird zwischen 10 mA bis 320 mA variiert und die Fluoreszenzintensität gemessen. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden gegen die LED-Intensität aufgetragen.

7.4.5 Einfluss des Umgebungslicht

Um den Einfluss des Umgebungslichts zu testen wird über 24 Stunden gemessen. Folgende Kombinationen werden abgefahren: 365 nm/340 nm, 450 nm/450 nm, 830 nm/830 nm (EX/EM). Die LED Intensität wurde um 75% gesenkt. Der Lichtleiter wurde auf ein Filterpapier gerichtet mit einem Abstand von 5 cm, um ein Übersteuern der Photodiode zu vermeiden. Das Messintervall wird auf 40 s eingestellt. Die gemessenen Intensitäten werden gegen die Zeit aufgetragen.

7.4.6 Langzeitstabilität

Zur Überprüfung der Langzeitstabilität der Sensorelektronik und der Software wird der Lichtleiter in einem lichtundurchlässigen Referenzkörper positioniert und eine Messung über 48 h gestartet. Bei der Messung handelt es sich um eine Messung des Streulichts. Dementsprechend wird kein Bandpassfilter vor der Photodiode eingesetzt. Auf der LED Seite werden alle vier LEDs pro Messzeitpunkt angesteuert. Nach 100 Messungen erfolgt sowohl für die Photodiode als auch für die LEDs eine Referenzfahrt. Während der Messung des Streulichts wird zusätzlich die Temperatur mit einem Temperatursensor gemessen, um auszuschließen, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Messung hat. Die gemessenen Werte werden gegen die Zeit aufgetragen und mit einem Savitzky-Golay-Filter der Fensterbreite 50 geglättet.

7.4.7 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit

Um den Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf den Sensor zu testen, wird der Sensor in einer Durchflusskammer eingeführt. Die Kammer wird mit $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Riboflavin gefüllt und mit einem Vorratsgefäß verbunden. Es werden Volumenströme von 0 bis $7,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ getestet und ein Flavinsignal über 5 min nach Einstellung des Volumenstroms aufgenommen. Der Versuch wird sowohl mit zunehmenden als auch mit abnehmenden Volumenstrom durchgeführt und die ermittelten Intensitäten gegen den Volumenstrom aufgetragen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 53 dargestellt. Der Sensor wird so in der Fließkammer fixiert, dass dieser nicht mit dem Boden der Kammer in Kontakt kommt.

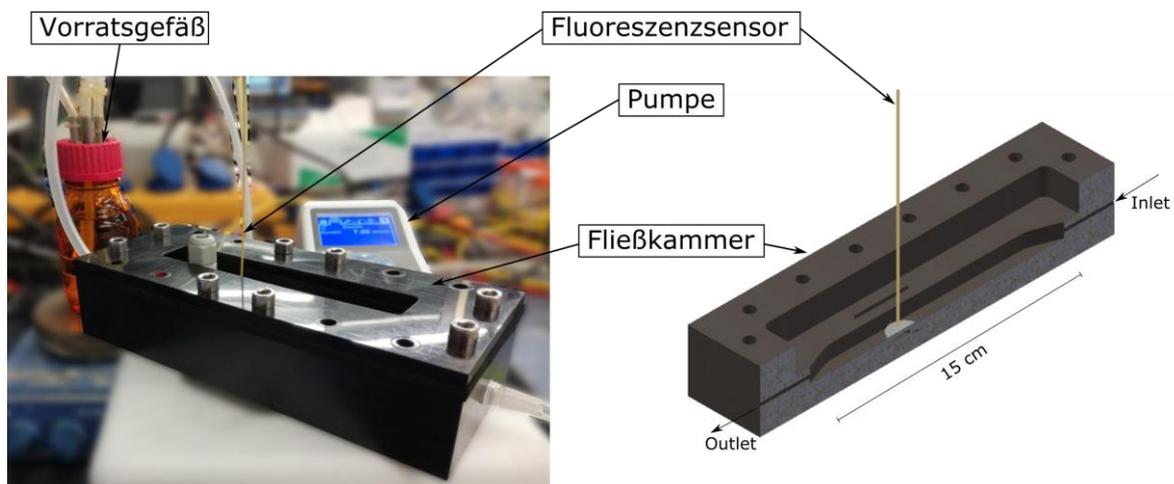


Abbildung 53: Versuchsaufbau für die Bestimmung der Strömungsstabilität des Fluoreszenzsensors. Links: Fließkammer mit angeschlossenem Vorratsgefäß und Pumpe. Das gelöste Fluorophor wird von rechts nach links durch die Fließkammer gepumpt. Rechts: Schematische Darstellung der Fließkammer mit Positionierung des Fluoreszenzsensors.

7.4.8 Einfluss der Temperatur

Für die Bestimmung des Temperatureinflusses auf die Fluoreszenz wird Riboflavin der Konzentration $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Gefrierschrank runtergekühlt. Anschließend wird der Fluoreszenzsensor sowie eine Temperatursonde in der Lösung platziert und diese auf einem Magnetrührer langsam hochgeheizt. Die Messung der Fluoreszenz wird bei 450/525 (EX/EM) durchgeführt. Die ermittelten Werte werden im Anschluss an die Messung gegen die Temperatur aufgetragen.

7.4.9 Spezifität der Messkanäle

Um die Spezifität der Messkanäle zu testen werden erneut Kalibrationsmessungen durchgeführt. Hierbei werden alle Kanäle für die Messung verwendet. Die Messungen erfolgen in BSA, NADH und Riboflavin. Die einzelnen Konzentrationen werden in einer schwarzen Mikrotiterplatte vermessen, um den Einfluss des Umgebungslichts zu minimieren. Um einen möglichen Pipettierfehler gering zu halten, werden die Proben auf 10 mL angesetzt. Die Messung der Proben erfolgt in einer schwarzen Mikrotiterplatte mit allen Kanälen. Für die Auswertung wird zusätzlich die Korrelation der Daten zwischen relativer Fluoreszenzintensität und Konzentration ausgewertet. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf den Einfluss der Fluorophore aufeinander.

7.4.10 Selektivität der Messkanäle

Der Einfluss der Fluorophore aufeinander wird in Anlehnung an eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Mittels eines Design of experiments werden die Mischverhältnisse für die Fluorophore BSA, NADH und Riboflavin basierend auf dem zuvor bestimmten linearen Messbereich berechnet. Das Schema der Mischverhältnisse ist Tabelle 23 zu entnehmen. Insgesamt wurden 19 Proben in PBS-Buffer angesetzt und mit dem Fluoreszenzsensor vermessen. Der Protein- sowie der NADH-Kanal wurden mit einem Verstärkungsfaktor von 8 und der Flavin-Kanal mit einem Verstärkungsfaktor von 1 verwendet.

Tabelle 23: Konzentrationen der einzelnen Fluorophore für die Bestimmung der Selektivität des Sensors.

Probennummer	BSA (mol·L ⁻¹)	NADH (mol·L ⁻¹)	Riboflavin (mol·L ⁻¹)
1	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
2	1·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁵
3	2·10 ⁻⁵	0	6·10 ⁻⁵
4	4·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵	0
5	6·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
6	0	2·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵
7	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
8	4·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁵	0
9	2·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁵
10	1·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁵
11	0	1·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵
12	6·10 ⁻⁵	0	2·10 ⁻⁵
13	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
14	4·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵	0
15	6·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁵
16	2·10 ⁻⁵	0	6·10 ⁻⁵
17	0	4·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
18	1·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵
19	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt über die Korrelation der Messwerte sowie im Falle des NADH-Kanals unter Aufstellung einer Regression. Hierzu wurde der Solver (Microsoft Office Excel) verwendet.

7.4.11 Immobilisierung Alginat

Für die Erstellung eines Modellbiofilms wird zunächst eine 2,1 - 4 % (w/v) Alginat-Lösung hergestellt. Hierzu wird Alginat in ddH₂O unter Rühren gelöst. Die Lösung wird über Nacht bei 4°C gelagert, um die Luftblasen zu entfernen. Die Immobilisierung des Alginats erfolgt mittels 100 mM CaCl₂. Hierzu wird Filterpapier mit CaCl₂ getränkt und die Alginatlösung aufgegossen. Ein weiteres getränktes Filterpapier überschichtet die Alginatlösung. Die Immobilisierung wird für 60 min bei 4°C durchgeführt.

7.4.12 Vergleich der Fluoreszenz zwischen suspendiertem und immobilisiertem Riboflavin

Für die Bestimmung der Möglichkeit des Fluoreszenzensors in der Tiefe zu messen, wurde $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Riboflavin mit 2 % (w/v) Alginat im Verhältnis 1:3 gemischt und auf CaCl₂ getränktes Filterpapier auf eine Schichtdicke von 1 cm ausgegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, wird es abgedunkelt bei 450/525 nm (EX/EM) mit dem Fluoreszenzsensor vermessen. Die Messung wird 0,5 cm tief im Gel, direkt an der Geloberfläche sowie in einer Riboflavin-1x PBS-Lösung (Mischverhältnis 1:3) durchgeführt.

7.4.13 Enzymatische Umsetzung von Pyruvat

Für den Einsatz des Sensors während der enzymatischen Umsetzung von Pyruvat zu Lactat werden $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pyruvat, $0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH sowie $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Lactatdehydrogenase angesetzt. In einer schwarzen Mikrotiterplatte werden zunächst in einem Well 250 µL Pyruvat und 25 µL NADH sowie in einem weiteren Well 270 µL Pyruvat und 10 µL NADH vorgelegt. Es wird ein Grundsignal mit dem NADH-Kanal des Fluoreszenzensors aufgenommen. 25 µL bzw. 20 µL Lactatdehydrogenase werden zu der Mischung gegeben und das NADH Signal bis zum Ende der Reaktion aufgezeichnet. Die gemessenen Werte werden im Anschluss an die Messung gegen die Zeit aufgetragen.

7.4.14 Biofilmkultivierung in der mikrobiellen Brennstoffzelle

Für die Kultivierung eines abwasserbasierten Biofilms wird zunächst artifizielles Abwasser hergestellt. Das artifizielle Abwasser wird nach Tabelle 10 angesetzt und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Die Natriumacetat Lösung wird separat hergestellt. Artifizielles Abwasser sowie Natriumacetat werden autoklaviert Die Vitaminlösung und die Minerallösung werden separat angesetzt und steriltrifriert.

Die Kultivierung wird in einem 500 mL Vierhals-Rundkolben durchgeführt. Hierzu werden zunächst die Graphitelektroden und die Referenzelektrode in den Rundkolben positioniert und die Hälse mit Silikonstopfen verschlossen. Über den vierten Hals werden 50 mL Abwasser mit den restlichen Komponenten gegeben. Für die Anaerobisierung wird die Kultur eine Stunde mit Stickstoff unter Rühren begast. Anschließend wird der Hals mit einem Silikonstopfen verschlossen und alle Hälse zusätzlich mit Silikonkleber abgedichtet. Die Kultivierung findet bei 37°C und 150 rpm statt. Die Spannung wird mittels eines Potentiostaten angelegt und die aktuelle Stromspannung und Stromstärke gemessen.

Nachdem ein Zyklus durchlaufen ist, wird das Medium gewechselt. Hierzu werden 50 mL der Kultur als Animpfmaterial verwendet. Es wird erneut mit Stickstoff für eine Stunde begast und alles luftdicht verschlossen.

7.4.15 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt bei 600 nm im Spektrophotometer. Hierzu wird 1 mL der Probe direkt nach der Entnahme in einer Küvette vermessen. Gemessen wird gegen 0,9 % NaCl-Lösung (w/v). Die Messung erfolgt im linearen Messbereich von 0 AU bis 0,6 AU. Übersteigt die gemessene Probe diesen Wert, wird die Probe mit 0,9 % NaCl Lösung verdünnt.

7.4.16 Kultivierung von *S. cerevisiae* im Schüttelkolben

Für die Kultivierung im Schüttelkolben wird zunächst eine Vorkultur über Nacht angesetzt. Alle Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen. Die Vorkultur wird in einem Schüttelkolben ohne Schikanen mit SD Medium angesetzt. Der Kolben wird mit *S. cerevisiae* aus einer Cryokultur angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur wird in einem 250 mL Kolben ohne Schikanen angesetzt. 100 mL SD-Medium werden vorgelegt und der Kolben mit einer $OD_{600}=0,2$ aus der Vorkultur angeimpft. Um den Fluoreszenzsensor für die Analyse der Kultivierung einzusetzen, wird durch den Kolbendeckel eine Hülse geführt, in welche am Ende ein 500 μm Quarzglasscheibe eingelassen ist. Der Hülse ragt an ihrem Enden in das Medium. Der Lichtleiter wird in dieser Hülse fixiert und der Kolben im Schüttelinkubator auf dem SFR vario platziert. Die Kultivierung wird bei 100 rpm und 30°C durchgeführt. Der Fluoreszenzsensor wird auf ein Messintervall von 20 s eingestellt. Zusätzlich zu den Fluoreszenzmessungen von NADH, Flavin und Proteinen werden der pO_2 - und pH-Wert über Spots im Boden des Kolbens gemessen. Hier ist zu berücksichtigen, dass sich die Messintervalle nicht überlagern, damit die Messungen des Fluoreszenzsensors nicht gestört werden. Sowohl die Messwerte des SFR vario als auch die des Fluoreszenzsensors werden gegen die Zeit aufgetragen. Außerdem werden die Messwerte des Fluoreszenzsensors mittels eines Savitzky-Golay-Filters der Fensterbreite 50 geglättet.

7.4.17 Induzierte Änderung des Metabolismus von suspendierter Bäckerhefe

Bäckerhefe wird in 1xPBS Puffer suspendiert und zweimal gewaschen (5 min, 10.000 rpm). Als Medium wird Schatzmann-Puffer mit $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose verwendet. Das Hefepellet wird in 200 mL Schatzmann-Medium resuspendiert und eine $OD_{600}= 15$ eingestellt. Als Versuchsaufbau wird ein 250 mL Vierhalskolben verwendet. Über die Hälse des Kolbens werden der Fluoreszenzsensor und die pO_2 -Sensoren in der Lösung positioniert. Des Weiteren wird ein Mikrosparger für die Begasung eingeführt. Der Mikrosparger ist mit einem Gasmischer verbunden, mit welchem zwischen Stickstoff und Sauerstoff Begasung gewechselt werden kann. Die Flussrate wird auf $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt. Für eine störungsfreie Messung wird der Kolben vollständig abgedunkelt. Das Medium wird dauerhaft mit einem Rührwal gerührt. Die gemessenen Werte werden gegen die Zeit aufgetragen und die Fluoreszenzmesswerte zusätzlich mit einem Savitzky-Golay-Filter der Fensterbreite 50 geglättet.

7.4.18 Induzierte Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe

Für das Immobilisat der Bäckerhefe wird diese zunächst in 1x PBS Puffer zweimal gewaschen (5 min, 10.000 rpm) und das Pellet anschließend in Citratpuffer auf eine $OD_{600}=30$ eingestellt. Die Puffer-Hefesuspension wird im Verhältnis 1:2 mit 3% (w/v) Alginate gemischt und die Mischung auf ein in $CaCl_2$ getränktem Filterpapier gegossen (Höhe: ca. 2 cm). Es wird mit 100mM $CaCl_2$ überschichtet. Das Gel wird 1 h bei 4°C ausgehärtet.

Der Kolben wird vorbereitet. Zitronensäurepuffer wird mit $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose in einen 250ml Vierhalskolben gegeben (Volumen=200 mL). Die Begasung erfolgt über einen Mikrosparger mit $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, welche an Sauerstoff und Stickstoff angeschlossen ist. Zwischen den Gasen kann mittels eines Dreiwegeventils gewechselt werden. Die kalibrierten pO_2 -Sensoren werden in den Kolben eingeführt.

Aus dem Gel wird eine kreisrunde Fläche ausgestanzt und im additiv gefertigten Halter fixiert. Der Halter mit Gel wird im Vierhalsrundkolben positioniert und der Fluoreszenzsensor im Gel fixiert. Der Kolben wird vollständig abgedunkelt. Das Messintervall des Fluoreszenzsensors wird auf 60 s eingestellt. Die Messung erfolgt mit allen vier Kanälen. Die gemessenen Werte werden gegen die Zeit aufgetragen und die Fluoreszenzmesswerte zusätzlich mit einem Savitzky-Golay-Filter der Fensterbreite 50 geglättet.

7.4.19 HPLC-Methode

Zur Bestimmung der Acetat-Konzentration wird eine HPLC-Analyse durchgeführt. Die Einstellungen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Einstellungen der HPLC zur Bestimmung von Acetat.

Parameter	Einstellung
Säule	Animex HPX-87H, 300 · 7,8 mm
Eluent	0,005 M H_2SO_4
Flussrate	$0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Temperatur	55°C
Detektion	210 nm (UV)
Injektionsvolumen	100 μL
Zeit	25 min

7.4.20 GC-Methode

Die Bestimmung der Ethanol-Konzentration erfolgt mittels GC. Die Säule Petrocol DH (100 m · 0,25 mm) wird in einem split-ratio Verfahren verwendet. Es werden zweimal je 0,1 µL auf die Säule injiziert (Injektionstemperatur 180°C). Es wird ein Temperaturgradient gefahren. Die Starttemperatur der Säule beträgt 50°C (Haltezeit 5 min) und die Heizrate auf eine Endtemperatur von 200°C beträgt 10°C/min. Die Endtemperatur wird 5 min gehalten. Als Detektor wird ein Flammenionisationsdetektor mit einer Detektionstemperatur von 250°C verwendet. Die Flussrate beträgt 60 cm·s⁻¹.

7.4.21 Kultivierung eines abwasserbasierten Biofilms

Die Kultivierung des Biofilms erfolgt in einer Durchflusskammer. Als Aufwuchsfläche wird in der Durchflusskammer eine Graphitplatte positioniert. Der Sensor wird auf diese Fläche in einem Abstand von 2 mm gerichtet und fixiert. SD-Medium wird im Vorratsgefäß vorgelegt und die Flussrate auf 7 mL·min⁻¹ eingestellt. Mit Beginn des Versuchs wird die Fluoreszenzmessung gestartet und mit allen vier Kanälen gemessen.

Nach Signalkonstanz wird das Medium gewechselt. Hierzu wird zunächst das Medium abgepumpt und anschließend frisches Medium im Vorratsgefäß vorgelegt. Die Flussrate wird wieder auf 7 mL·min⁻¹ eingestellt. Nach 240 min wird das Medium erneut abgepumpt und die Graphitplatte aus der Durchflusskammer genommen. Die Graphitplatte wird unter dem 3D-Mikroskop betrachtet. Zusätzlich wird ein Teil der aufgewachsenen Schicht mit einem Spatel von der Graphitplatte gekratzt und unterm Mikroskop analysiert. Für die Auswertung werden die gemessenen Werte gegen die Zeit aufgetragen und die Fluoreszenzmesswerte zusätzlich mit einem Savitzky-Golay-Filter der Fensterbreite 50 geglättet.

7.4.22 Vorbereitung der Polymerfasern

Die Polymerfasern, welche sowohl für die Messung des pH-Werts als auch des pO_2 verwendet werden, werden im Vorfeld der Messungen vorbereitet. Hierzu wird die Endfläche der Fasern zunächst mit Feinstschleifpapier poliert. Der Prozess wird mehrfach mit zunehmend kleineren Schleifpaieren durchgeführt, um eine plane Fläche zu erhalten. Nach dem Schleifen der Fasern, werden die Spots auf der Endfläche fixiert. Hierzu wird die Endfläche mit Silikonkleber benetzt und der Spot angedrückt. Die Trockenzeit für die beklebten Sensoren beträgt 48 h und wird aufgrund der Lichtempfindlichkeit im Dunklen durchgeführt.

7.4.23 Kalibration der pO_2 -Sensoren

Für die Kalibration der Sensorspots wird eine Zwei-Punkt-Kalibration durchgeführt. Hierzu wird zum einem 1 g Natriumsulfit in 100 mL ddH₂O gelöst, mit 50 μ L Cobaltnitrat versetzt und bis zur Verwendung luftdicht verschlossen. Zum anderen wird eine 100 % gesättigte Lösung angesetzt. Hierzu werden 100 mL ddH₂O 15 min mit reinem Sauerstoff begast. Die Kalibration der Sensorspots erfolgt mit der Software Oxy-4 mini (PreSens GmbH, Regensburg). Zunächst wird der 100 % Wert bestimmt. Der Lichtleiter mit fixiertem Sensor spot wird für 5 min in die Lösung getaucht und eine Messung durchgeführt. Sobald die Amplitude konstant ist, wird der 100 % Wert aufgenommen. Gleiches erfolgt mit der sauerstofffreien Lösung für den Nullwert.

7.4.24 Kalibration der pH-Sensoren

Für die Kalibration der pH-Sensorspots werden 5 Referenzlösungen unterschiedlicher pH Werte angesetzt. Hierzu werden pH Pufferlösungen mit pH 4, pH 7 und pH 9 verwendet. Für zwei weitere Werte werden die Lösungen gemischt und der pH Wert mittels des pH-Meters ermittelt. Anschließend werden alle Lösungen mit dem zu kalibrierenden Sensor bis zur Amplitudenkonstanz gemessen und aus den ermittelten Werten mittels der herstellereigenen Software die Kalibrationskurve erstellt.

7.4.25 Messungen des pH- und pO₂-Werts in einem Modellbiofilm

Für die Testung der optischen pH- und pO₂-Sensoren wird als Modellbiofilm 2 % (w/v) Alginate immobilisiert. Das Gel wird im Reaktor bzw. in der Durchflussskammer fixiert und die Sensoren sowohl im Gel als auch in der Umgebung platziert (Abbildung 54). Als Fluid wird 1xPBS-Puffer verwendet, welches mit 7,5 mL·min⁻¹ durch die Durchflussskammer gepumpt wird. Für die pO₂-Messung findet die Begasung über einen Mikrosparger statt, welcher an einen Gasmischer (Flussrate=100 ml·min⁻¹) angeschlossen ist. Bei der Durchflussskammer findet die Begasung in einem externen Vorratsgefäß statt. Die pH Wert Änderung erfolgt durch Zugabe von 1 M NaOH bzw. 1 M HCl.

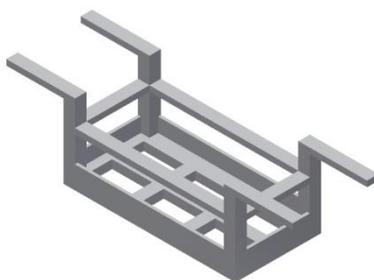


Abbildung 54: CAD Design der additiv gefertigten Halterung für den Reaktor.

8 Publikationsliste

Publikationen in begutachteten Zeitschriften

Schlaugat *et al.*: Development and characterization of a fiber optical fluorescence sensor for online monitoring of biofilms and the microenvironment; eingereicht (2019)

Weitere Publikationen & Tagungspräsentationen

Tagungspräsentationen:

Posterbeitrag: Jana Schlaugat, Dr. Iliyana Pepelanova, Prof. Dr. Thomas Scheper: Entwicklung eines Fluoreszenzsensors für die Analyse von Biofilmen und deren Mikroumgebung in der mikrobiellen Brennstoffzelle (Posterbeitrag, mit Abstract in der CIT) ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 10. – 13.09.2018, Aachen

Posterbeitrag: Jana Schlaugat, Dr. Iliyana Pepelanova, Prof. Dr. Thomas Scheper: Entwicklung eines Fluoreszenzsensors für die Charakterisierung von Biofilmen, 4. Workshop der Plattforminitiative Mikrobielle Bioelektrotechnologie 22./23.11.2016, Braunschweig

9 Unterstützende Arbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

- Dana Möhlmann: Bestimmung des pO₂- und pH-Wertes in porösen Systemen und Biofilmen, Bachelorarbeit, 20. Mai 2017
- Christa Louisa Schaar: Optimierung der Optiken eines Fluoreszenzensors für den Einsatz in der mikrobiellen Brennstoffzelle, Bachelorarbeit, 19. Dezember 2017

In Tabelle 25 sind die Personen aufgeführt, die im Rahmen der Arbeit unterstützend tätig waren.

Tabelle 25: Unterstützende Tätigkeiten im Rahmen der Arbeit.

Unterstützende Tätigkeit	Name
DoE zur Bestimmung der Selektivität des Sensors	Dr. Dörte Solle
Durchführung der HPLC und GC	Martina Weiß
Elektrischer Aufbau des Sensors und Softwareentwicklung	Dipl.-Ing. Thorleif Hentrop und Kai Patzer
Konstruktion der Fließkammer und mechanischer Aufbau des Sensors	Thorsten Stempel
Konstruktion der Führungshülse	Friedbert Gellermann

10 Literaturverzeichnis

- [1] M. J. Adams, M. Buehner, K. Chandrasekhar, G. C. Ford, M. L. Hackert, A. Liljas, M. G. Rossmann, I. E. Smiley, W. S. Allison, J. Everse, N. O. Kaplan und S. S. Taylor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, *70*, 1968–1972, DOI: 10.1073/pnas.70.7.1968.
- [2] S. S. Adav und D.-J. Lee, *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *154*, 1120–1126, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.058.
- [3] J. R. Albani, A. Sillen, Y. Engelborghs und M. Gervais, *Photochem Photobiol* **1999**, *69*, 22–26, DOI: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb05301.x.
- [4] K. B. Andersen und K. von Meyenburg, *The Journal of biological chemistry* **1977**, *252*, 4151–4156.
- [5] J. Azeredo, N. F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hébraud, Z. Jaglic, M. Kačániová, S. Knöchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R. L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse und C. Sternberg, *Critical reviews in microbiology* **2017**, *43*, 313–351, DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146.
- [6] T. Becker, B. Hitzmann, K. Muffler, R. Pörtner, K. F. Reardon, F. Stahl und R. Ulber, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2007**, *105*, 249–293, DOI: 10.1007/10_2006_036.
- [7] T. P. Begley, C. Kinsland, R. A. Mehl, A. Osterman und P. Dorrestein, *Vitamins and hormones* **2001**, *61*, 103–119.
- [8] H. Beyenal, C. Yakymyshyn, J. Hyungnak, C. C. Davis und Z. Lewandowski, *Journal of microbiological methods* **2004**, *58*, 367–374, DOI: 10.1016/j.mimet.2004.05.003.
- [9] P. Biechele, C. Busse, D. Solle, T. Scheper und K. Reardon, *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 469–488, DOI: 10.1002/elsc.201500014.
- [10] C. Boniello, T. Mayr, J. M. Bolivar und B. Nidetzky, *BMC biotechnology* **2012**, *12*, 11, DOI: 10.1186/1472-6750-12-11.
- [11] C. Busse, *Entwicklung eines in situ Sensors zur Messung der metabolischen Aktivität in Bioprocessen*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2017**.
- [12] C. Busse, P. Biechele, I. d. Vries, K. F. Reardon, D. Solle und T. Scheper, *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 940–952, DOI: 10.1002/elsc.201700049.

- [13] C. S. Butler und J. P. Boltz, in: *Comprehensive water quality and purification* (Hrsg.: S. Ahuja, M. C. Larsen, J. L. Eimers, C. L. Patterson, S. Sengupta and J. L. Schnoor), Elsevier, Waltham, MA, **2014**, 90–107.
- [14] R. Chandki, P. Banthia und R. Banthia, *Journal of Indian Society of Periodontology* **2011**, *15*, 111–114, DOI: 10.4103/0972-124X.84377.
- [15] W. G. Characklis, *Biotechnology and bioengineering* **1981**, *23*, 1923–1960, DOI: 10.1002/bit.260230902.
- [16] S. Chatterjee, N. Biswas, A. Datta, R. Dey und P. Maiti, *Microscopy (Oxford, England)* **2014**, *63*, 269–278, DOI: 10.1093/jmicro/dfu013.
- [17] J. W. Costerton, P. S. Stewart und E. P. Greenberg, *Science* **1999**, *284*, 1318–1322, DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- [18] J. Detlefsen und U. Siart, *Grundlagen der Hochfrequenztechnik*, 2. Aufl., Oldenbourg, München, **2006**.
- [19] J. P. Dijken und W.A. Scheffers, *FEMS Microbiology Letters* **1986**, *32*, 199–224, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x.
- [20] S. Dobretsov, R. M.M. Abed, K. Sharp, O. Skalli, L. G. Boykins und L. Coons, in: *Biofouling methods* (Hrsg.: D. N. Williams, J. Thomason and S. Dobretsov), John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, **2014**, 1–43.
- [21] R. M. Donlan, *Emerging infectious diseases* **2002**, *8*, 881–890, DOI: 10.3201/eid0809.020063.
- [22] M. B. Dürrenberger, S. Handschin, B. Conde-Petit und F. Escher, *LWT - Food Science and Technology* **2001**, *34*, 11–17, DOI: 10.1006/fstl.2000.0739.
- [23] Edmund Optics GmbH, *Alles über Asphären*, www.edmundoptics.de/resources/application-notes/optics/all-about-aspheric-lenses/.
- [24] ee-news.ch, *HES-SO: Mikrobielle Brennstoffzelle erzeugt Strom aus Abwasser – werden Kläranlagen damit zu Nettostromerzeugern?*, <https://www.ee-news.ch/de/article/40649/hes-so-mikrobielle-brennstoffzelle-erzeugt-strom-aus-abwasser-werden-damit-klaranlagen-zu-nettostrom-erzeugern>, **2019**.
- [25] J. Everse und N. O. Kaplan, in: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Hrsg.: A. Meister), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **1973**, 61–133.
- [26] S. M. Faassen, B. Hitzmann und S. Faassen, *Sensors* **2015**, *15*, 10271–10291, DOI: 10.3390/s150510271.

- [27] A. Fiechter und W. Seghezzi, *Journal of Biotechnology* **1992**, 27, 27–45, DOI: 10.1016/0168-1656(92)90028-8.
- [28] M. Fischer, G. J. Triggs und T. F. Krauss, *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, 82, 1362–1371, DOI: 10.1128/AEM.03001-15.
- [29] M. Fischer, M. Wahl und G. Friedrichs, *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, 33, 172–178, DOI: 10.1016/j.bios.2011.12.048.
- [30] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice und S. Kjelleberg, *Nature reviews. Microbiology* **2016**, 14, 563–575, DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- [31] H.-C. Flemming und J. Wingender, *Biologie in unserer Zeit* **2001**, 31, 169–180, DOI: 10.1002/1521-415X(200105)31:3<169::AID-BIUZ169>3.0.CO;2-U.
- [32] K. Furukawa, E. Heinzle und I. J. Dunn, *Biotechnology and bioengineering* **1983**, 25, 2293–2317, DOI: 10.1002/bit.260251003.
- [33] S. Ghisla, V. Massey, J. M. Lhoste und S. G. Mayhew, *Biochemistry* **1974**, 13, 589–597, DOI: 10.1021/bi00700a029.
- [34] R. Giri, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1992**, 48, 843–848, DOI: 10.1016/0584-8539(92)80080-G.
- [35] W. T. Godbey, *An introduction to biotechnology*, Woodhead Publishing, Oxford, **2016**.
- [36] A. Graf, J. Claßen, D. Solle, B. Hitzmann, K. Rebner und M. Hoehse, *Eng. Life Sci.* **2019**, 19, 352–362, DOI: 10.1002/elsc.201800149.
- [37] K. Hantelmann, M. Kollecker, D. Hull, B. Hitzmann und T. Scheper, *Journal of Biotechnology* **2006**, 121, 410–417, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.07.016.
- [38] B. Hollmann, M. Perkins und D. Walsh, *Biofilms and their role in pathogenesis*.
- [39] J. Hou, G. Scalcinati, M. Oldiges und G. N. Vemuri, *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, 76, 851–859, DOI: 10.1128/AEM.02040-09.
- [40] Ikuma, K., Decho, A. W. & Lau, B. L.T., *The Extracellular Bastions of Bacteria — A Biofilm Way of Life*, **2013**.
- [41] A. Jablonski, *Nature* **1933**, 131, 839–840, DOI: 10.1038/131839b0.
- [42] A. Jabłoński, *Z. Physik* **1935**, 94, 38–46, DOI: 10.1007/BF01330795.
- [43] K. K. Jefferson, *FEMS Microbiology Letters* **2004**, 236, 163–173, DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.005.

- [44] L. R. Johnson, *Journal of theoretical biology* **2008**, *251*, 24–34, DOI: 10.1016/j.jtbi.2007.10.039.
- [45] M. Kerstens, G. Boulet, M. van Kerckhoven, S. Clais, E. Lanckacker, P. Delputte, L. Maes und P. Cos, *Folia microbiologica* **2015**, *60*, 335–342, DOI: 10.1007/s12223-015-0400-4.
- [46] J. C. König, *Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Fluoreszenzsensors für die online-Überwachung von Bioprozessen*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2019**.
- [47] J. C. König, T. Steinwedel, D. Solle, P. Lindner, I. d. Vries, T. Hentrop, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper und S. Beutel, *Journal of Sensors and Sensor Systems* **2018**, *7*, 461–467, DOI: 10.5194/jsss-7-461-2018.
- [48] J. R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, **2002**.
- [49] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 4. Aufl., Springer, New York, NY, **2010**.
- [50] J. R. Lawrence, D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton und D. E. Caldwell, *Journal of Bacteriology* **1991**, *173*, 6558–6567, DOI: 10.1128/jb.173.20.6558-6567.1991.
- [51] S. S. Lehrer, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, *29*, 767–772, DOI: 10.1016/0006-291X(67)90284-7.
- [52] LEONI Fiber Optics GmbH.
- [53] Z. Lewandowski und H. Beyenal, *Fundamentals of biofilm research*, CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2014**.
- [54] H. Ley und K. Englehardt, *Z. phys. Chem.* **1910**, *74*, 1–64.
- [55] C. Lindemann, S. Marose, T. Scheper, H. O. Nielsen und K. F. Reardon, in: *Encyclopedia of bioprocess technology* (Hrsg.: M. C. Flickinger), Wiley, New York, NY, **1999**.
- [56] D. López, H. Vlamakis und R. Kolter, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2010**, *2*, a000398, DOI: 10.1101/cshperspect.a000398.
- [57] Luna Optoelectronics, *Detector/Amplifier Hybrids with Feedback Resistor SD 112-45-11-221*, <https://lunainc.com/wp-content/uploads/2016/06/1124511221.pdf>, **2016**.
- [58] W. Manson und V. V. Modi, *Biochimica et Biophysica Acta* **1957**, *24*, 423–425, DOI: 10.1016/0006-3002(57)90214-7.
- [59] N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, F. Tanaka, N. Kido und M. Kitamura, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8917–8920, DOI: 10.1021/jp020574l.

- [60] A. W. Munro und M. A. Noble, in: *Flavoprotein Protocols* (Hrsg.: S. K. Chapman and G. A. Reid), Humana Press, Totowa, NJ, **1999**, 25–48.
- [61] G. Najafpour, M. Rahimnejad und A. Ghoreshi, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* **2011**, 33, 2239–2248, DOI: 10.1080/15567036.2010.518223.
- [62] E. Nevoigt, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2008**, 72, 379–412, DOI: 10.1128/MMBR.00025-07.
- [63] E. L. Nichols, *Proceedings of the American Philosophical Society* **1910**, 49, 267–280.
- [64] U. Noomnarm und R. M. Clegg, *Photosynthesis research* **2009**, 101, 181–194, DOI: 10.1007/s11120-009-9457-8.
- [65] S. Omar, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, 40, DOI: 10.1007/BF00170362.
- [66] G. O'Toole, H. B. Kaplan und R. Kolter, *Annual review of microbiology* **2000**, 54, 49–79, DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- [67] Pamp SJ, Gjermansen M und Tolker-Nielsen T **2007**, 37–69.
- [68] C. A. Parker und W. T. Rees, *Analyst* **1962**, 87, 83, DOI: 10.1039/AN9628700083.
- [69] C. Potera, *Science* **1996**, 273, 1795–1797, DOI: 10.1126/science.273.5283.1795.
- [70] PreSens Precision Sensing GmbH, *Messprinzip chemisch-optischer Sensoren*, <https://www.pre-sens.de/de/wissen/grundlagen/detail/messprinzip-chemisch-optischer-sensoren-1554.html>.
- [71] M. Quaranta, S. M. Borisov und I. Klimant, *Bioanalytical reviews* **2012**, 4, 115–157, DOI: 10.1007/s12566-012-0032-y.
- [72] M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour und S.-E. Oh, *Alexandria Engineering Journal* **2015**, 54, 745–756, DOI: 10.1016/j.aej.2015.03.031.
- [73] L. D. Renner und D. B. Weibel, *MRS bulletin / Materials Research Society* **2011**, 36, 347–355, DOI: 10.1557/mrs.2011.65.
- [74] R. S. Rivlin, *The New England journal of medicine* **1970**, 283, 463–472, DOI: 10.1056/NEJM197008272830906.
- [75] D. B. Roszak und R. R. Colwell, *Microbiological Reviews* **1987**, 51, 365–379.
- [76] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable und I. Ieropoulos, *Journal of power sources* **2017**, 356, 225–244, DOI: 10.1016/j.jpowsour.2017.03.109.
- [77] T. Scheper, *Bioanalytik*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **1991**.

- [78] T. Scheper, B. Hitzmann, E. Stärk, R. Ulber, R. Faurie, P. Sosnitza und K. F. Reardon, *Analytica Chimica Acta* **1999**, *400*, 121–134, DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00612-1.
- [79] T. Scheper, T. Lorenz, W. Schmidt und K. Schügerl, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, *506*, 431–445, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb23839.x.
- [80] T. Scheper und K. Reardon, *Bioprocess analysis. Encyclopedia of Analytical Science*, Acad. Press Ltd., **1995**.
- [81] U. Schröder, *ChemSusChem* **2012**, *5*, 959–961, DOI: 10.1002/cssc.201200319.
- [82] U. Schröder, *ChemTexts* **2018**, *4*, 19, DOI: 10.1007/s40828-018-0072-1.
- [83] D. R. Sellers und C. A. Ghiron, *Photochem Photobiol* **1973**, *18*, 393–402, DOI: 10.1111/j.1751-1097.1973.tb06439.x.
- [84] M. Simões, L. C. Simões und M. J. Vieira, *LWT - Food Science and Technology* **2010**, *43*, 573–583, DOI: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- [85] Stanford Research System, *About Lock-In Amplifiers*, <https://www.thinksrs.com/downloads/pdfs/applicationnotes/AboutLIAs.pdf>, **2005**.
- [86] E. Stärk, B. Hitzmann, K. Schügerl, T. Scheper, C. Fuchs, D. Köster und H. Märkl, in: *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (Hrsg.: K. Schügerl, A.-P. Zeng, J. G. Aunins, A. Bader, W. Bell, H. Biebl, M. Biselli, M. J. T. Carrondo, L. R. Castilho, H. N. Chang, P. E. Cruz, C. Fuchs, S. J. Han, M.-R. Han, E. Heinzle, B. Hitzmann, D. Köster, I. Jasmund, N. Jelinek, S. Lang, H. Laatsch, J. Lee, H. Miirkl, L. Maranga, R. A. Medronho, M. Meiners, S. Nath, T. Noll, T. Scheper, S. Schmidt, K. Schügerl, E. Stärk, A. Tholey, I. Wagner-Döbler, C. Wandrey, C. Wittmann and S.-C. Yim), Springer, Berlin, **2002**, 21–38.
- [87] H. Stegemeyer, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 1007–1008, DOI: 10.1002/ange.19690812320.
- [88] Stelzer, *Journal of Microscopy* **1998**, *189*, 15–24, DOI: 10.1046/j.1365-2818.1998.00290.x.
- [89] O. Stern und M. Volmer, *Physikalische Zeitschrift* **1919**, 183–188.
- [90] P. S. Stewart, *Journal of Bacteriology* **2003**, *185*, 1485–1491, DOI: 10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003.
- [91] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies und J. W. Costerton, *Annual review of microbiology* **2002**, *56*, 187–209, DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- [92] M. Strathmann, K.-H. Mittenzwey, G. Sinn, W. Papadakis und H.-C. Flemming, *Biofouling* **2013**, *29*, 573–583, DOI: 10.1080/08927014.2013.791287.

- [93] F. W. Teale und R. A. Badley, *The Biochemical journal* **1970**, *116*, 341–348, DOI: 10.1042/bj1160341.
- [94] F. W. Teale und G. WEBER, *The Biochemical journal* **1957**, *65*, 476–482, DOI: 10.1042/bj0650476.
- [95] P. Tinham und T. R. Bott, *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2003**, *47*, 39–43.
- [96] T. Tolker-Nielsen, U. C. Brinch, P. C. Ragas, J. B. Andersen, C. S. Jacobsen und S. Molin, *Journal of Bacteriology* **2000**, *182*, 6482–6489.
- [97] B. Valeur, *Molecular fluorescence*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [98] C. Verduyn, T. P. L. Zomerdijk, J. P. van Dijken und W. A. Scheffers, *Appl Microbiol Biotechnol* **1984**, *19*, 181–185, DOI: 10.1007/BF00256451.
- [99] J. W. Verhoeven, *Pure and Applied Chemistry* **1996**, *68*, 2223–2286, DOI: 10.1351/pac199668122223.
- [100] Visser, A. J. W. G., *Photochemistry and Photobiology* **1984**, *40*, 703–706, DOI: 10.1111/j.1751-1097.1984.tb04640.x.
- [101] K. Welch, Y. Cai und M. Strømme, *Journal of Functional Biomaterials* **2012**, *3*, 418–431, DOI: 10.3390/jfb3020418.
- [102] D. Wencel, T. Abel und C. McDonagh, *Analytical chemistry* **2014**, *86*, 15–29, DOI: 10.1021/ac4035168.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Biofilms.	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der mikrobiellen Brennstoffzelle (nach [81]).	7
Abbildung 3: Analysemethoden von Biofilmen (nach [84]).	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fluoreszenzprinzips im Jablonski-Diagramm.	11
Abbildung 5: Sensitivität der verwendeten Photodiode in Abhängigkeit zur Wellenlänge [57].	20
Abbildung 6: Fluoreszenzspektren der zu messenden Fluorophore.	21
Abbildung 7: Lichtleiter mit einem Durchmesser an der Messspitze von 500 µm.	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels des Lichtleiters „Prototyp 1“.	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der sphärischen Aberration.	25
Abbildung 10: Schematischer Versuchsaufbau zur Optimierung der Lichteinkopplung.	26
Abbildung 11: CAD-Design der additiv gefertigten Linsenhalterung.	27
Abbildung 12: Bestimmung der Sensitivität des Sensors „Prototyp 1“.	27
Abbildung 13: Lichtleiter „Prototyp 2“.	29
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels des Lichtleiters „Prototyp 2“.	30
Abbildung 15: Aufbau der Messeinheit.	31
Abbildung 16: Links: LED-Rad mit 4 LEDs. Rechts: Filter-Rad.	31
Abbildung 17: Spektren der verwendeten optischen Komponenten.	32
Abbildung 18: Aufbau des Sensors.	33
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Messablaufs.	35
Abbildung 20: Bestimmung des LED-Einflusses auf die Fluoreszenzmessung.	38
Abbildung 21: Bestimmung des Einflusses des Umgebungslichts auf die Streulichtmessung.	39
Abbildung 22: Bestimmung der Langzeitstabilität.	41
Abbildung 23: Bestimmung des Einflusses der Strömungsgeschwindigkeit auf das Fluoreszenzsignal.	42
Abbildung 24: Bestimmung des Einflusses der Temperatur.	43
Abbildung 25: Evaluierung des Sensors anhand der Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität von Chininsulfat bei verschiedenen pH-Werten.	44
Abbildung 26: Bestimmung der Sensitivität.	45
Abbildung 27: Bestimmung der Spezifität.	47
Abbildung 28: Bestimmung der Selektivität.	48
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der pO ₂ - (links) und pH- (rechts) Sensoren.	52

Abbildung 30: Schematische Darstellung der Versuchsaufbauten für die Analyse der Diffusionslimitierung in porösen Systemen.....	53
Abbildung 31: Visuelles Messergebnis der pO ₂ -Messung im Alginat.....	54
Abbildung 32: Versuchsaufbau der mikrobiellen Brennstoffzelle im Vierhalsrundkolben.	57
Abbildung 33: Analyse des pH- und pO ₂ -Werts in der mikrobiellen Brennstoffzelle.	58
Abbildung 34: Reaktionsgleichung der enzymatischen Umsetzung von Pyruvat zu Lactat.	59
Abbildung 35: Enzymatische Umsetzung von Pyruvat zu Lactat.	60
Abbildung 36: Versuchsaufbau für die Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung.....	61
Abbildung 37: Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	62
Abbildung 38: Induzierte Metabolismusänderung bei suspendierter Bäckerhefe.....	67
Abbildung 39: Versuchsaufbau zur Analyse einer induzierten Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe.....	68
Abbildung 40: Fluoreszenzsignal von NADH, Proteinen und Flavinen gegen die Zeit bei immobilisierter Bäckerhefe.	69
Abbildung 41: Analyse der induzierten Metabolismusänderung bei immobilisierter Bäckerhefe...	70
Abbildung 42: Einsatz des Fluoreszenzensors zur Analyse eines Biofilms.	72
Abbildung 43: Kultivierung eines abwasserbasierten Biofilms.	73
Abbildung 44: Mikroskopische Aufnahmen der Grafitplatte vor (links) und nach (rechts) der Biofilmkultivierung.....	75
Abbildung 45: Mikroskopische Aufnahmen des kultivierten Biofilms.	75
Abbildung 46: Bestimmung der LED-Leistung auf das Fluoreszenz-Signal.....	81
Abbildung 47: Maßstabsgetreue Konstruktionszeichnung des entwickelten Sensors.	90
Abbildung 48: Konstruktionszeichnung des Lichtleiters „Prototyp 1“.....	91
Abbildung 49: Konstruktionszeichnung des Lichtleiters „Prototyp 2“.....	91
Abbildung 50: Übersicht der elektronischen Komponenten des Sensors.	93
Abbildung 51: Prinzipskizze der Software des Sensors.....	94
Abbildung 52: Aufnahme der optischen Bank zur Optimierung der Lichteinkopplung in den Lichtleiter.....	96
Abbildung 53: Versuchsaufbau für die Bestimmung der Strömungsstabilität.....	99
Abbildung 54: CAD Design der additiv gefertigten Halterung für den Reaktor.....	107

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exzitations- und Emissionswellenlängen verschiedener intrinsischer Fluorophore [49].	14
Tabelle 2: Gewählte Wellenlängen für die einzelnen zu messenden Fluorophore.....	22
Tabelle 3: Optimierter Abstand zwischen LED und Linse mit Signalintensität.	26
Tabelle 4: Relative Signalintensitäten der Lichteinkopplung mit und ohne achromatische Linse im Vergleich.	36
Tabelle 5: Entwicklung einer Führungshülse für den Fluoreszenzsensor.....	37
Tabelle 6: Einsatz optischer pH- und pO ₂ -Sensoren in Alginat als Biofilmmodell.	54
Tabelle 7: Mögliche Fehlerquellen, die die Messung der Schüttelkolbenkultivierung beeinflussen.	65
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.	82
Tabelle 9: Verwendete Software.	83
Tabelle 10: Zusammensetzung des artifiziellen Abwassers.	86
Tabelle 11: Zusammensetzung der Mineralstoff- (links) und Vitaminlösung (rechts).	87
Tabelle 12: Zusammensetzung des SD-Mediums zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	87
Tabelle 13: Zusammensetzung des Schatzmann-Puffers.	88
Tabelle 14: Zusammensetzung des NB-Mediums.....	88
Tabelle 15: Zusammensetzung des PBS-Puffers.....	88
Tabelle 16: Spezifikationen der Messkanäle.....	89
Tabelle 17: Spezifikationen der Lichtleiter „Prototyp 1“ und „Prototyp 2“	90
Tabelle 18: Spezifikationen der LEDs des entwickelten Fluoreszenzensors.....	92
Tabelle 19: Spezifikationen der optischen Bandpassfilter des entwickelten Fluoreszenzensors....	92
Tabelle 20: Beispiel eines Source-Codes zur Ansteuerung des Sensors.	95
Tabelle 21: Bestimmung der Exzitations- und Emissionswellenlängen.	96
Tabelle 22: Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen.	97
Tabelle 23: Konzentrationen der einzelnen Fluorophore für die Bestimmung der Selektivität des Sensors.	100
Tabelle 24: Einstellungen der HPLC zur Bestimmung von Acetat.....	104
Tabelle 25: Unterstützende Tätigkeiten im Rahmen der Arbeit.....	109

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jana Schlaugat
Geburtsdatum /-ort 26.10.1990, Eckernförde

Akademischer Werdegang

02/2016 – 12/2019 **Promotion**, Leibniz Universität Hannover
Institut für Technische Chemie
Promotionsthema: Entwicklung von faseroptischen Fluoreszenzsensoren für die Analyse von Biofilmen und deren Mikroumgebung

10/2013 – 12/2015 **Master of Science Life Science**, Leibniz Universität Hannover
Masterarbeitsthema: Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Rührers für Bioprozesse mittels des Additive Manufacturing
Vertiefungsfächer: Bioprosesstechnik, Bioinformatik

10/2010 – 09/2013 **Bachelor of Science Life Science**, Leibniz Universität Hannover
Bachelorarbeitsthema: Optimierung der Biomassekonzentration von *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces marxianus* mittels einer Multisensorplattform

08/2003 – 07/2010 **Abitur**, Gymnasium am Mühlenweg, Wilhelmshaven

Beruflicher Werdegang

03/2019 – 05/2019 **Mitarbeit im Projekt „smartLAB“**
Deutsche Messe AG, Hannover

02/2016 – 02/2019 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

09/2014 – 01/2015 **Auslandspraktikum**
Institut für Biotechnologie der Universität Lund, Schweden
Thema: Production of Polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas mendocina*

04/2014 – 09/2014 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover