

**Immobilisierung lebender Bakterien in wasserbeständigen
Polymerfasern zur Herstellung einer aktiven Membran**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marco Gensheimer

aus

Ottersheim bei Landau

Marburg / Lahn 2010

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 12.04.2010

Erstgutachter: Professor Dr. Andreas Greiner

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Seema Agarwal

Tag der mündlichen Prüfung am: 21.04.2010

Gewidmet denen, die ich liebe

„Das Höchste, wozu der Mensch gelangen kann, ist das Erstaunen.“

- Johann Wolfgang von Goethe-

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	<i>Einleitung.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Motivation und Aufgabenstellung</i>	<i>3</i>
1.3	<i>Literaturüberblick.....</i>	<i>5</i>
1.3.1	Funktionalisierung elektrogenespinnener Fasern	5
1.3.2	Immobilisierung von Zellen und Wirkstoffen	11
1.4	<i>Nutzung funktionaler Bakterien</i>	<i>19</i>
2	Theoretischer Hintergrund.....	22
2.1	<i>Elektrospinnen</i>	<i>22</i>
2.2	<i>PVA-Cryogele</i>	<i>26</i>
2.3	<i>Gasphasenabscheidung von PPX.....</i>	<i>29</i>
3	Ergebnisse und Diskussion.....	30
3.1	<i>Verarbeitung von Bakterien aus wässrigen PEO-Lösungen.....</i>	<i>30</i>
3.1.1	Konzept	30
3.1.2	Überlebensfähigkeit in Faservliesen.....	30
3.1.3	Zusammenfassung	34
3.2	<i>PPX Beschichtung Bakterien enthaltender PEO Fasern</i>	<i>35</i>
3.2.1	Konzept	35
3.2.2	Beschichtung von PEO Fasermatten	35
3.2.3	Zusammenfassung	42
3.3	<i>Verspinnen bakterienhaltiger Polymerlösungen auf Basis organischer Lösungsmittel.....</i>	<i>43</i>
3.3.1	Konzept	43
3.3.2	PVA Hydrogele zur Immobilisierung von Bakterien	44
3.3.3	Herstellung von PVA Hydrogelpartikeln im Mikrometerbereich	45
3.3.4	Bakterien in PVA Hydrogelpartikeln	48
3.3.5	Lokalisierung der Bakterien in den Partikeln	51
3.3.6	Überlebensfähigkeit der Bakterien in den Partikeln	59
3.3.7	Schutz gegenüber organischen Lösungsmitteln.....	63
3.3.8	Versuche mit Partikeln aus Alginsäure	67
3.3.9	Versuche mit Partikeln aus Agarose.....	69
3.3.10	Immobilisierung von PVA Partikeln in Polymerfasern durch Elektrospinnen	79

Inhaltsverzeichnis

3.3.11	Nachweis der Bakterienaktivität.....	98
3.3.12	Zusammenfassung	112
3.4	<i>Elektrogesponnene Vliese zur Bakterienfiltration.....</i>	<i>114</i>
3.4.1	Konzept	114
3.4.2	Herstellung der Filtervliese	114
3.4.3	Eigenschaften der Filtervliese	116
3.4.4	Bestimmung der Masse der Filtervliese	119
3.4.5	Untersuchung der Filtereigenschaften	124
3.4.6	Praxisbezogene Untersuchungen.....	132
3.4.7	Zusammenfassung	136
4	Experimenteller Teil.....	138
4.1	<i>Verwendete Materialien.....</i>	<i>138</i>
4.2	<i>Eingesetzte kommerzielle Polymere</i>	<i>139</i>
4.2.1	Modifikation von PVA mit FITC.....	139
4.3	<i>Verwendete Bakterienarten.....</i>	<i>139</i>
4.3.1	<i>Escherichia coli.....</i>	<i>139</i>
4.3.2	<i>Micrococcus luteus.....</i>	<i>140</i>
4.4	<i>Verwendete Geräte.....</i>	<i>142</i>
4.5	<i>Nährmedien und Puffer.....</i>	<i>143</i>
4.5.1	Vollmedium für <i>Escherichia coli</i>	143
4.5.2	Nährmedium für <i>Micrococcus luteus</i>	143
4.5.3	Kaliumphosphat-Puffer	143
4.6	<i>Mikrobiologische Methoden.....</i>	<i>144</i>
4.6.1	Sterilisation.....	144
4.6.2	Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung	144
4.6.2.1	Kulturen auf Agarplatten	144
4.6.2.2	Kulturen in flüssigen Medien.....	145
4.6.3	Bestimmung der Zellzahl	145
4.6.3.1	Bestimmung durch optische Dichte	145
4.6.3.2	Bestimmung mit der Helber-Zählkammer	146
4.6.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl durch die Zahl wachsender Kolonien	147
4.6.4	Färben von Bakterien	147
4.6.4.1	Färben mit Kristallviolett.....	147
4.6.4.2	Lebendfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	148
4.6.4.3	Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung	148

Inhaltsverzeichnis

4.7	<i>Bakterienhaltige Polymerlösungen</i>	151
4.7.1	Herstellung PEO-basierter Lösungen	151
4.7.2	Elektrospinnen von mit Bakterien angereicherten PEO-Lösungen	151
4.7.2.1	Verwendeter Aufbau	151
4.7.2.2	Parameter	152
4.7.2.3	Allgemeine Durchführung	152
4.7.3	Überlebensfähigkeit in Faservliesen	153
4.7.4	PPX Beschichtung bakterienhaltiger Faservliese	154
4.7.5	Herstellung bakterienhaltiger PVA-Partikel	155
4.7.6	Überlebensfähigkeit in PVA-Partikeln	158
4.7.6.1	In Trockensubstanz	158
4.7.6.2	In Gegenwart organischer Lösungsmittel	158
4.7.6.3	In Faservliesen	159
4.7.7	Polymerfilme unter sterilen Bedingungen	160
4.8	<i>Charakterisierungsmethoden</i>	162
4.8.1	Rasterelektronenmikroskopie	162
4.8.2	Dektak Profilometer	162
4.8.3	Elektrische Leitfähigkeit	162
4.8.4	Oberflächenspannung	163
4.8.5	Viskosimetrie	163
4.8.6	Optische Mikroskopie	163
4.8.7	Bestimmung des Gelschmelzpunktes	164
4.9	<i>Elektrogesponnene Vliese zur Bakterienfiltration</i>	166
4.9.1	Herstellung der Polymerlösungen	166
4.9.2	Herstellung der Filtervliese	166
4.9.3	Bestimmung der Masse der Filtervliese	167
4.9.4	Untersuchung der Filtereigenschaften	168
5	Schlussfolgerungen	170
6	Ausblick	172
7	Danksagung	174
8	Literatur	176

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µS	Mikrosiemens
<i>A. borkumensis</i>	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
bar	Bar
bzw.	beziehungsweise
CFU	colony Forming Units (siehe KBE)
cm	Zentimeter
CNT	carbon nanotubes (Kohlenstoff Nanoröhrchen)
CVD	chemical vapour deposition (chemische Gasphasenabscheidung)
d	Durchmesser, Abstand
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DSMO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et. al.	et aliis
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
KBE	Kolonien Bildende Einheiten (siehe CFU)
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
L	Liter
LZ	Lebendzellzahl
m	Meter
mm	Millimeter
mmol	Millimol

Abkürzungen

min	Minute
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mL	Milliliter
mol	Mol
M _w	Gewichtsmittel des Molekulargewichtes
MWCNT	multiwalled carbon nanotubes (Mehrwandige Kohlenstoff Nanoröhrchen)
nm	Nanometer
OD ₅₇₈	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PA 6	Polyamid 6
PCL	Poly(ε-caprolacton)
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PLLA	Poly(L-lactid)
PPX	Poly(p-xylylen)
PS	Polystyrol
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
t	Zeit
T	Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Alle Prozentangaben in dieser Arbeit beziehen sich auf Gewichtsprozent. Ausnahmen werden gekennzeichnet.

1 Einführung

1.1 Einleitung

Eine Veränderung, die die naturwissenschaftliche Welt in neuerer Zeit erfahren hat, ist das Verwischen der Grenzen zwischen den einzelnen Disziplinen. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Materialwissenschaften, die beispielsweise Elemente von Chemie und Physik beinhalten. Aber auch in der Chemie existieren heutzutage Überschneidungen mit der Physik, der Pharmazie, der Medizin und in bedeutendem Maße mit der Biologie.

Ein schönes Beispiel, welches zeigt, wie Angehörige verschiedener Fachrichtungen gemeinsam auf ein Ziel hinarbeiten, ist die kontrollierte Freisetzung cytotoxischer Wirkstoffe aus künstlichen Intraokularlinsen.^[1,2] Diese Freisetzung wird durch Zweiphotonenabsorption induziert. Um ein solches Projekt realisieren zu können, bedarf es einer Arbeitsgemeinschaft aus Chemie, Pharmazie und Physik.

Auch die Kombination von Materialien und Methoden aus der Chemie und den Materialwissenschaften mit der Biologie verspricht, ein Feld von großem Interesse zu werden. So gab es vor Kurzem Bestrebungen, Zahnpflegeprodukte wie Kaugummi, Zahncremes und Mundspülungen mit Bakterien der Art *Lactobacillus* zu versetzen.^[3] Hierbei war der Gedanke, dass die *Lactobacilli* eine Reduktion von *Streptococcus mutans*, die wiederum für die Entstehung von Karies verantwortlich sind, bewirken würden. Dabei wurde eine Verringerung der Anzahl der schädlichen Bakterien um bis zu 98 % angestrebt. Weitere Forschungen, die Elemente von Polymerchemie und Biologie beinhalten haben zum Zweck, oral aufgenommene Bakterien vor dem menschlichen Verdauungssystem zu schützen. Verfolgt wurden und werden hierbei beispielsweise der Schutz von probiotisch aktiven Milchsäurebakterien, wie sie in Joghurt vorkommen, um ihre positiven Eigenschaften auf die Gesundheit weiter zu steigern.^[4-6] Auch existieren ähnliche Untersuchungen zum Schutz von modifizierten, Therapeutika produzierenden Bakterien.^[7]

Im medizinischen Bereich war in den letzten Jahrzehnten die Suche nach Materialien von großer Aktualität, die bei guten mechanischen Eigenschaften gleichzeitig biokompatibel

oder auch bioabbaubar waren. Die bereits erwähnte Freisetzung von Wirkstoffen war auch in diesem Zusammenhang von großem Interesse.

Ein weiteres großes Interessensgebiet ist die Entwicklung von Biomaterialien und entsprechenden Technologien für industrielle Zwecke. Immobilisierte, aktive biologische Spezies, wie Enzyme oder ganze Zellen, vermögen als „grüne“ Katalysatoren diverse Reaktionen in wässrigen Medien, mit einem hohen Grad an Selektivität und Spezifität, unter milden Bedingungen zu katalysieren. Des Weiteren sind solche Systeme nicht nur zum Einsatz in der Produktion denkbar, auch in der Beseitigung von organischen oder anorganischen Verunreinigungen aus Abwässern oder kontaminierten Böden wären sie einsetzbar. Zudem existieren Bakterien, die Metalle wie Gold oder Uran in einem Maße anzureichern vermögen, dass diese Metalle einen Großteil ihrer Trockenmasse ausmachen. Daher wäre der Einsatz zur Rohstoff (wieder) Gewinnung denkbar.

Die vorliegende Dissertationsschrift befasst sich mit der Fortführung und Erweiterung von Untersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt worden waren.^[8] Es handelt sich hierbei um die Kombination lebender Organismen, in Form von Bakterien und polymeren Materialien, durch die Technik des elektrostatischen Spinnens. Die Arbeit beinhaltet daher Komponenten aus den Bereichen Polymerchemie, Biologie, Materialwissenschaften und Physik. Sie stellt somit eines der zuvor beschriebenen, interdisziplinären Arbeitsfelder dar.

1.2 Motivation und Aufgabenstellung

Immobilisierte Bakterien sind für die industrielle Produktion von großem Interesse, da mit ihnen die gewünschten Produkte, bei niedrigen Temperaturen, ohne aufwendige Synthesen hergestellt werden können. Sie werden bereits bei der Produktion von Essig, organischen Säuren, Aminosäuren und der Abwasserbehandlung eingesetzt.^[9]

Bei vorausgegangenen Untersuchungen im Rahmen einer Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Verarbeitung Bakterien angereicherter Polymerlösungen und Herstellung einer aktiven biologischen Membran“, wurde gezeigt, dass die Kombination einer aktiven biologischen Spezies und eines widerstandsfähigen Materials, in Form eines Polymeren, durch Elektrospinnen möglich war.^[8] Am Ende der Diplomarbeit standen Faservliese aus Polyethylenoxid und Polyvinylalkohol, die lebende Bakterien enthielten. Gleichzeitig wurden die Vliese durch eine Beschichtung mit einem weiteren Polymeren wasserbeständig gemacht. Erste Schritte in Richtung einer lebenden Membran waren also gelungen.

Für solche biologisch aktiven Membranen ergeben sich breite Felder möglicher Anwendungen. Sie erscheinen als viel versprechende Werkstoffe und Trägersysteme „grüner“ Katalysatoren für den Einsatz in der chemischen oder pharmazeutischen Produktion. Eine Vision wäre hierbei ein System, das analog eines Teebeutels in das Reaktionsmedium gegeben und nach erfolgtem Umsatz, ohne einen Filtrationsschritt zur Entfernung der Mikroorganismen, wieder herausgenommen werden kann. Lebende Membranen aus solchen Bakterien enthaltenden Faservliesen könnten auch in der Umwelttechnik eine Rolle bei der Abwasseraufbereitung spielen. Ein so ausgerüsteter Filter könnte Verschmutzungen nicht nur mechanisch durch Filtration entfernen, sondern auch gelöste Verschmutzungen durch die eingelagerten Bakterien beseitigen. Solche Membranen böten sich auch zum homogenen Ausbringen von Bakterien auf Flächen an, etwa Schadstoff-Abbauende Bakterien zur Dekontamination verseuchter Areale.

Das Hauptziel der Untersuchungen, die der vorliegenden Dissertationsschrift vorausgingen, war vorrangig die Herstellung einer elektrogesponnenen, aktiven

biologischen Membran. Die Bakterien sollten zudem in Fasern aus kommerziell erhältlichen Standardpolymeren eingebracht werden. Dabei sollte vor allem ein Weg gefunden werden, die bisher verwendeten wasserlöslichen Polymere durch wasserbeständige zu ersetzen.

Aus zur Verfügung stehenden Materialien und Apparaturen ergab sich als weiteres, kleineres Themengebiet die Untersuchung elektrogewonnener Faservliese hinsichtlich ihrer Eignung zur Filtration von Bakterien aus Flüssigkeiten.

1.3 Literaturüberblick

1.3.1 Funktionalisierung elektrogesponnener Fasern

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden Untersuchungen zum Verhalten von elektrisch aufgeladenen Flüssigkeiten durchgeführt.^[10] Zudem war bereits seit den ersten Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt, dass das Anlegen einer hohen Spannung an flüssiges Siegelwachs die Bildung von Fasern zur Folge haben konnte.^[11] Aufgrund der Tatsache, dass Siegelwachs sehr spröde und somit brüchig war, sah man in dieser Beobachtung keinen kommerziellen Nutzen und es erfolgte keine Anwendung. Das erste Patent, welches das elektrostatische Spinnen beschreibt wurde an A. Formhals vergeben.^[12] Dies geschah im Jahre 1934. Das Interesse der wissenschaftlichen Gemeinde am elektrostatischen Spinnen blieb zunächst recht überschaubar. So erfolgten Untersuchungen durch Baumgarten zur Herstellung acrylischer Mikrofasern durch Elektrosponnen in den 1970er Jahren.^[13] In den 1980er Jahren führten Larrondo und Manley Untersuchungen zum elektrostatischen Verspinnen von Schmelzen aus verschiedenen Polymeren durch.^[14-16] Ein Punkt, nach dem das Interesse an dieser Thematik stark anstieg, waren die Untersuchungen von D. H. Reneker, die 1995 durchgeführt wurden.^[17] Nachdem er dieses Thema quasi einem Neustart unterzogen hatte, folgten noch weitere grundlegende Untersuchungen zum Elektrosponnen, beispielsweise zur Herstellung von Nanofasern und die Ausbildung von spindelförmigen Verdickungen in den Fasern bei ihrer Herstellung, um nur einige zu nennen.^[11, 18]

Als Folge dieser Untersuchungen, stieg die Zahl der Veröffentlichungen, die das elektrostatische Spinnen zum Thema hatten, bzw. die Technik nutzten, sprunghaft an. Der Grund hierfür ist im relativ geringen und kostengünstigen apparativen Aufwand zu finden, der einen einfachen Zugang zu Fasern mit Durchmessern im Bereich von Mikro- und Nanometern ermöglicht. Dabei ist das Verfahren nicht nur auf die Herstellung von Fasern aus Polymeren limitiert. Beispielsweise können auch Fasern aus Metallen und anorganischen Materialien, wie Keramiken erzeugt werden. Sie bieten zudem, durch den so genannten TUFT (tubes by fiber templates) Prozess auch einen Zugang zu Hohlfasern im Nanometerbereich.^[19, 20] Die möglichen Kombinationen aus Materialien, Faserdicken,

Faserorientierungen und Fasermorphologien ermöglichen die Herstellung von Materialien mit unterschiedlichsten Eigenschaften. Einen breiten Überblick über die Technik des Elektrosplennens, die verwendeten Materialien und ihre Anwendungen bieten die verfügbaren, umfangreichen Übersichtsartikel zum Thema.^[21-23]

Allerdings waren für die vorliegende Arbeit vor allem solche Techniken von großem Interesse, die sich mit einer Ein- bzw. Anlagerung von Partikeln oder Substanzen an elektrosplennene Fasern befassen. Durch diese, eventuell temporäre, Immobilisierung von Partikeln, Enzymen oder Wirkstoffen kann eine Funktionalisierung des Faservlieses erreicht werden.

Grundsätzlich sind vier verschiedene Methoden oder Mechanismen zur Funktionalisierung von Fasern vorstellbar.^[24] Diese sind Adsorption, Einlagerung, Vernetzung und kovalente Bindung der Stoffe, die die Funktionalisierung bewirken.

Partikel aus verschiedensten Materialien können auf mannigfaltige Art und Weise in Fasern eingelagert werden. Von großem Interesse sind beispielsweise Partikel aus Silber, da diese eine toxische Wirkung gegenüber Bakterien aufweisen. Sie bieten also einen Zugang zu antibakteriellen Geweben. Solche Materialien wurden zum Beispiel von Melaiye und Mitarbeitern erzeugt.^[25] Es wurde hierbei ein Silber(I)-Komplex verwendet. Dieser hatte die Zusammensetzung $[\text{Ag}_2\text{C}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_4]^{2+}(x)$ wobei $x = 2\text{OH}^-$ bzw. CO_3^{2-} und wurde zusammen mit einem hydrophilen, Polyether-basierten Polymeren, das als Tecophil bezeichnet wurde, versplenn. Diese Polymere vermögen eine große Menge Wasser aufzunehmen. Die eigentlichen Partikel wurden erst nach dem Splennprozess, aus dem in der Faser homogen verteilten Silber-Komplex gebildet. Der äußere Einfluss, der die Bildung der Partikel auslöste, war der Kontakt der Fasern mit Wasser. Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass die Fasern starke antibakterielle und auch fungizide Eigenschaften aufwiesen. Eine weitere Methode der Immobilisierung von Silber-Partikeln in Fasern zeigten Xu und Mitarbeiter.^[26] Sie verwendeten in Dimethylformamid und Dichlormethan gelöstes Poly(L-lactid). Dieser Lösung wurde vor dem Versplenn Silbernitrat zugesetzt. Die Reduktion des Silbernitrates in den Fasern, in einer Wasserstoff-

Atmosphäre bei 80 °C, führte zur Bildung von Partikeln aus Silber in den Fasern. Auch in diesem Fall konnte eine antibakterielle Aktivität der Fasern nachgewiesen werden.

Auch bei den als CNTs (carbon nanotubes) bekannten Kohlenstoff-Nanoröhrchen handelt es sich um Partikel, die in elektrogesponnenen Fasern immobilisiert wurden. Neben ihren beachtlichen mechanischen Eigenschaften weisen Kohlenstoff-Nanoröhrchen gute elektrische und thermische Leitfähigkeiten auf. Dies macht sie gut geeignet zur Verstärkung polymerer Materialien und interessant für eine Einlagerung in Nanofasern, um deren Eigenschaften weiter zu verbessern. So beschrieben Dror und Mitarbeiter die Einlagerung von so genannten MWCNT (multiwall carbon nanotubes) in Fasern aus Polyethylenoxid.^[27] MWCNTs wurden zudem auch von Hou und Mitarbeitern immobilisiert.^[28] Sie verwendeten orientierte Faservliese aus Polyacrylnitril. Hierbei konnte eine Orientierung der MWCNTs innerhalb der Fasern entlang der Faserachse nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich Zugfestigkeit und Dehnungsmodul deutlich erhöht. Weitere Berichte von Garnen, deren E-Modul deutlich durch das Einbringen von Kohlenstoff-Nanoröhrchen gesteigert werden konnte, stammen von Ko und Mitarbeitern.^[29]

Neben Partikeln aus Silber wurden auch weitere Materialien in Form von Nanopartikeln in Fasern eingebracht. Hier war die Absicht der Funktionalisierung nicht eine Wirkung gegen Mikroben, sondern es wurde beispielsweise versucht, den Fasern katalytische Eigenschaften zu verleihen. So wurden Palladium-Nanopartikel in Fasern aus Polylactid eingebracht. Dies geschah durch Anreicherung der zu verspinnenden Lösung mit einer Vorläufersubstanz, in diesem Fall Palladiumacetat und anschließende Reduktion des Salzes in den Fasern, in einer Wasserstoffumgebung, bei erhöhter Temperatur.^[30] Zusätzlich wurden auch Partikel aus Magnetit, Zinkoxid, Titandioxid und Gold in elektrogesponnene Fasern eingebracht.^[31-34] Der Durchmesser solcher eingelagerter Partikel kann durchaus, wie aus Abbildung 1-1 ersichtlich, ein Mehrfaches des Faserdurchmessers betragen.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind solche Anstrengungen, die das Einlagern von biologischen Materialien in Fasern zum Ziel hatten. So erzeugten beispielsweise Lee und Belcher Nanofasern aus einem Blend von Polyvinylpyrrolidon und M13 Viren.^[35]

Nach ihrer Herstellung wurden die Fasern in einer Pufferlösung aufgelöst, wonach die Viren noch in der Lage waren, Bakterien zu infizieren. Es konnte also gezeigt werden, dass die M13 Viren durch das elektrostatische Verspinnen nicht inaktiviert worden waren. Neben Viren wurden auch Bakterien in wasserlösliche Fasern eingebracht. Die verwendeten Polymere waren hierbei Polyethylenoxid und Polyvinylalkohol.^[36-38] Bei den immobilisierten Bakterien handelte es sich um *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* (siehe Abbildung 1-1) *Staphylococcus albus* und *Bifidobacterium animalis*. Vor kurzem wurden zudem *Pseudomonas fluorescens*, *Zymomonas mobilis* und *Escherichia coli* in wasserunlösliche Fasern eingebracht.^[39] Hierbei wurden Bakterien zusammen mit einem Blend aus dem FDMA genannten Triblockcopolymeren PEO₉₉-PPO₆₇-PEO₉₉ und PEO versponnen. Die Fasern wurden nach dem Verspinnen durch freie radikalische Polymerisation vernetzt und anschließend das PEO herausgelöst. Das Ergebnis war ein Bakterien enthaltendes, wasserunlösliches Vlies aus FDMA. Es wurde nachgewiesen, dass die Integrität der Bakterien während des Prozesses gewahrt blieb. Durch Co-Elektrospinnen wurden zudem tierische Zellen in Faservliese eingebracht.^[40]

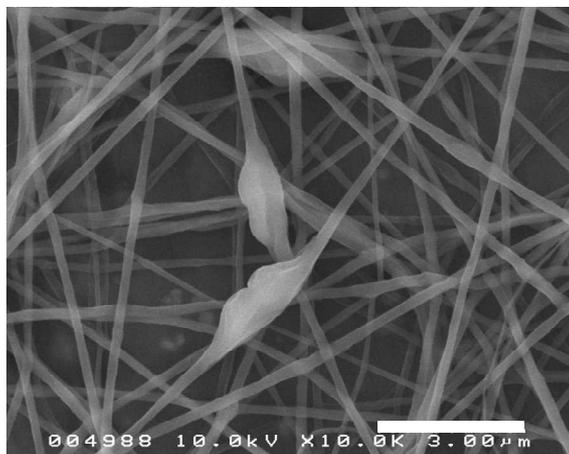


Abbildung 1-1: *M. luteus* Bakterien, eingebettet in Fasern aus Polyethylenoxid.

Neben Bakterien und tierischen Zellen wurden auch Enzyme in elektrogewebenen Fasern immobilisiert. In diesem Zusammenhang wurden erste Untersuchungen, zur kovalenten Bindung von Enzymen an elektrogewebene Polystyrol-Fasern, von Jia und Mitarbeitern durchgeführt.^[41] Die kovalente Bindung des Enzyms an ein polymeres Trägermaterial ist deshalb von großer Bedeutung, weil eine solche Bindung eine große Stabilität aufweist. Es

ist also mit einer deutlich erhöhten Resistenz gegen ein Auswaschen oder Austreten des Enzyms aus der Faser zu rechnen. Zunächst wurde das Polystyrol mit Nitrophenylchloroformiat funktionalisiert und anschließend zu Nanofasern versponnen. Dieses Vlies stellte das Trägermaterial dar. Das verwendete Modellenzym war α -Chymotrypsin. Es wurde durch Eintauchen der Fasern in eine gepufferte Lösung des Enzyms kovalent an diese gebunden. Der Durchmesser der verwendeten Polystyrol-Fasern betrug 120 nm, es wurden 1,4 Gewichtsprozent des Enzyms an die Fasern gebunden. Bei den darauf folgenden Untersuchungen an den Vliesen zeigte die gebundene Form des Enzyms in wässriger Umgebung 65 % der hydrolytischen Aktivität der freien Form. In organischen Lösungsmitteln hingegen zeigte die gebundene Form des Enzyms eine Aktivität, die bis um den Faktor 5670 über der Aktivität der freien Form lag.

Es existiert daneben ein weiteres Verfahren zur kovalenten Bindung, welches von Wang und Mitarbeitern beschrieben wurde.^[24] In dieser Arbeit wurden Enzymproteine an ultradünne Cellulose-Fasern gebunden, die durch Elektrospinnen von Celluloseacetat und anschließende Hydrolyse hergestellt worden waren. An die Fasern, von 100 nm Dicke, wurden die Enzymproteine mit Hilfe eines Abstandshalters aus PEG kovalent gebunden. Der Abstandshalter diente hierbei dazu, Interaktionen zwischen den Enzymproteinen und der Oberfläche der Fasern zu minimieren. Eventuell könnten solche Interaktionen, die enzymatische Aktivität durch Änderungen in der Konformation und Erschweren des Zugangs zum aktiven Zentrum beeinflussen. Untersuchungen, die mit dem Enzym Lipase durchgeführt wurden zeigten, dass die katalytische Aktivität, im Vergleich zur freien Form, um den Faktor acht bis zehn gesteigert war. Es zeigte sich zudem auch, dass die gebundene Form, in Gegenwart organischer Lösungsmittel, besser vor Denaturierung geschützt war.

Die beiden zuvor genannten Verfahren zur nachträglichen, kovalenten Bindung der Enzyme an Fasern weisen jedoch auch Nachteile auf. Es ist offensichtlich, dass nur die Oberfläche der Fasern für eine Immobilisierung der Enzyme genutzt wird. Das interne Volumen der Fasern, das zudem in der Lage ist, die Enzyme vor widrigen Bedingungen zu schützen, wird bei diesen Verfahren nicht genutzt. Xie und Hsieh hingegen beschrieben ein direktes Verfahren zur Herstellung von Faservliesen, die Enzyme enthielten.^[42] Sie verspannen eine wässrige Lösung eines Polymeren, der α -Chymotrypsin zugesetzt worden

war. Jedoch machte die Verwendung eines wasserlöslichen Polymeren einen zusätzlichen Vernetzungsschritt notwendig, so dass wasserbeständige Fasern erhalten wurden. Allerdings war die Nutzbarkeit dieser Fasern in wässriger Umgebung limitiert. Der Grund war die Abgabe von Polymer und Enzym an das wässrige Medium, dem die Fasern ausgesetzt worden waren, was eine instabile enzymatische Aktivität zur Folge hatte.

Um eine stabile enzymatische Aktivität zu erhalten, ersetzten Herricks und Mitarbeiter das wasserlösliche Polymere durch ein solches, das wasserbeständig war.^[43] Lösungen von Polystyrol bzw. Poly(styrol-co-maleinsäureanhydrid) in Toluol wurde vor dem Verspinnen ein Komplex von α -Chymotrypsin und Dioctylsulfosuccinat, einem Tensid, zugesetzt. Auch in diesem Fall blieb die Aktivität des Enzyms, verglichen mit der Aktivität der freien Form, deutlich länger erhalten. Die freie Form des Enzyms zeigte in einer wässrigen Pufferlösung eine Halbwertszeit ihrer Aktivität von einer Stunde. Die immobilisierte Form hingegen, wies unter den gleichen Bedingungen eine Halbwertszeit von 144 Stunden auf. Hierbei wurde erkannt, dass während des Kontaktes mit der Pufferlösung Enzym aus den Fasern austrat. Es zeigte sich also eine Möglichkeit der weiteren Steigerung der Halbwertszeit. Die Proben wurden zudem mit Glutaraldehyd behandelt, einen Stoff der dafür bekannt ist, Enzymaktivität zu stabilisieren. Nach der Behandlung konnte kein Abfallen der enzymatischen Aktivität in einem Zeitraum von 16 Tagen festgestellt werden. Als einer möglichen potentiellen Anwendung in einem industriellen Prozess sehr zuträglich, wurde die hohe Stabilität der bioaktiven Fasern angesehen, da sie hierdurch leicht wieder aus Lösungen zu entfernen waren.

Neben den hier genannten Beispielen für die Immobilisierung von Objekten bzw. Stoffen in, bzw. an Nanofasern, die durch Elektrospinnen hergestellt worden waren, existieren noch viele weitere. Zu nennen wäre hier beispielsweise die kontrollierte Freisetzung von Enzymen aus den Fasern. Es existieren zudem Bestrebungen, solche Fasern zur Wirkstofffreisetzung zu verwenden, was durch einen Abbau der Fasern erreicht werden kann. Auch eine nachträgliche Oberflächenbehandlung der Fasern, zur verzögerten Freisetzung des immobilisierten Wirkstoffes ist denkbar.^[44-50]

1.3.2 Immobilisierung von Zellen und Wirkstoffen

Die Anbindung oder Einbindung von Zellen an bzw. in Trägermaterialien, also ihre Immobilisierung, ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. Durch eine solche Immobilisierung können technisch aufwändige und somit teure Aufreinigungsprozesse vermieden werden, wenn Zellen in der industriellen Produktion eingesetzt werden. Bei solchen Zellen kann es sich zum Beispiel um Bakterien oder Pilze, wie Hefen handeln. Bestünde nun die Möglichkeit zu verhindern, dass diese Zellen im Reaktionsgemisch zurückbleiben, wäre das aus den oben genannten Gründen von großem Vorteil. Auch bei Enzym basierten Prozessen ist ein Nutzen immobilisierter Zellen denkbar. Innerhalb der Zelle befänden sich die Enzyme quasi in ihrer natürlichen Umgebung, wodurch sich ihre Stabilität auch bei wiederholten Einsatzzyklen steigern sollte.

Die technische Nutzung von immobilisierten Zellen begann bereits im 19. Jahrhundert bei der Herstellung von Essigsäure. Damals ließ man auf dem Substrat in einem Rieselfilter einen Biofilm ausbilden, in welchem die Bakterien eingebunden waren.^[51]

In der heutigen Zeit ist eine einfache und daher auch beliebte Methode der Immobilisierung von Zellen die Einlagerung in Gelen aus Polymeren. Bei diesen Polymeren kann es sich sowohl um natürliche, als auch um synthetisch hergestellte handeln. Auch anorganische Gele finden Anwendung. Ein Beispiel für die Verwendung eines solchen anorganischen Polymeren ist die Einlagerung von Zellen in Silica-Gele durch den Sol-Gel-Prozess.

Erste Untersuchungen in diese Richtung wurden im Jahre 1989 von Carturan et al. veröffentlicht.^[52] Die Arbeit behandelte die Immobilisierung von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) in SiO₂. Die durch den Sol-Gel-Prozess eingelagerten Hefezellen folgten dem Michaelis-Menten-Gesetz und wiesen dabei fast die gleiche Aktivität wie Zellen in einer Suspension auf. Gleichzeitig blieb die Bioaktivität über mehrere Monate und Anwendungszyklen erhalten.^[53, 54] Es wurden zudem Pflanzenzellen (*Coronilla vaginalis*) in Silica-Gelen immobilisiert. Auch hier ließ sich Aktivität über einen Zeitraum von mehreren Monaten nachweisen.^[55] Die Immobilisierung von

Pflanzenzellen ist deshalb von großer Bedeutung, da sie eine große Bandbreite chemischer Verbindungen zu synthetisieren in der Lage sind.

Eine in Bezug auf das hier behandelte Thema sehr interessante Arbeit veröffentlichten Nassif et al., da sie die Einlagerung von Bakterien der Art *Escherichia coli* in Silica-Gelen beschrieben.^[56] Es konnte gezeigt werden, dass die äußere Membran, die Zellwand und die Plasmamembran der Bakterien nicht beschädigt wurde. Unter der Voraussetzung, dass das Gel nicht austrocknete, zeigten die immobilisierten *Escherichia coli* Aktivität über mehrere Tage. Gleichzeitig zeigte sich, dass innerhalb des Silica-Gels im gleichen Zeitraum mehr Bakterien kultivierbar, also vermehrungsfähig blieben, als in einer wässrigen Suspension.

Nicht nur Bakterien wie *Escherichia coli* wurden in Silica-Gelen eingeschlossen, sondern auch Langerhans'sche Inseln.^[53, 57] Diese sind im Körper für die Produktion von Insulin verantwortlich. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zellen auch nach der Immobilisierung im Gel noch auf die Zugabe von Glucose reagierten. Zudem konnte bei in vivo Experimenten mit diabetischen Mäusen gezeigt werden, dass diese nach einer Transplantation, von auf diese Weise verkapselten Langerhans'schen Inseln, über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten praktisch keine Glucose mehr über den Urin ausschieden. Aus dieser Beobachtung konnte geschlossen werden, dass die immobilisierten Zellen die Funktion eines natürlichen Organs imitierten. Durchgeführte Untersuchungen erbrachten die Erkenntnis, dass die Konzentrationen von Zucker und Insulin im Blut der Mäuse normal waren. Es war offensichtlich, dass das feinporige Gel die Zellen davor schützte, von den Antikörpern der Mäuse angegriffen zu werden. Gleichzeitig ermöglichte das Gel jedoch den Zellen Zugang zu Nährstoffen und ein Abführen der Stoffwechselprodukte. Neben Langerhans'schen Inseln wurden auch bereits Schweinehepatozyten und Zellen aus Rattenlebern immobilisiert.^[53]

Neben den genannten Silica-Gelen spielen Hydrogele eine bedeutende Rolle bei der Immobilisierung von Zellen, Enzymen und Wirkstoffen.

Um als Medium für die Immobilisierung von Zellen geeignet zu sein, muss ein Hydrogel biokompatibel sein. Das bedeutet, es muss dem Überleben der Zelle und ihrer Funktion

zuträglich sein. Zusätzlich muss es eine Permeabilität aufweisen, die eine ausreichende Diffusion und einen ausreichenden Transport von Nährstoffen, Sauerstoff, Stoffwechselprodukten und ausgeschiedenen Stoffen über das gesamte Netzwerk des Hydrogels ermöglicht.^[58] Prinzipiell existieren drei Hauptmethoden zur Immobilisierung von Zellen in Hydrogelen. Diese sind Adhäsion, Einlagerung in eine Matrix und Mikroverkapselung. Die Adhäsionsmethode findet vor allem Anwendung, wenn es darum geht, Zellen zur Kultivierung bzw. für analytische Zwecke zu stabilisieren. Wie der Name bereits vermuten lässt, basiert diese Methode darauf, dass die zu immobilisierenden Zellen am Trägermaterial haften. Diese Haftung stellt demnach eine Anforderung an das verwendete Polymer dar. Es können auch Polymere so modifiziert werden, dass ihre Eigenschaften in Hinblick auf die Adhäsion optimiert werden, beispielsweise durch geladene Gruppen, Oberflächencharakteristik oder die Funktionalisierung mit Zellen bindenden Proteinen bzw. Oligopeptiden. Polyvinylalkohol, Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) und Poly(glycerolmethacrylat)/Kollagen sind Beispiele für verwendete Polymere. Der Hauptunterschied zwischen der Adhäsionsmethode und der Immobilisierung in einer Matrix ist, wie die Zellen vom Hydrogel gehalten werden. Im Gegensatz zur Adhäsionsmethode, bei der die Zellen an das Polymere gebunden werden, werden die Zellen bei der Matrix-Methode im Netzwerk des Hydrogels eingelagert. Dieser Vorgang könnte auch als Makroverkapselung bezeichnet werden. Gerade Hydrogele sind für diese Art der Immobilisierung sehr gut geeignet. Sie stellen das poröse, dreidimensionale Netzwerk, das dazu benötigt wird, die Zellen am Platz zu halten zur Verfügung. Anforderungen an das Hydrogel sind natürlich Biokompatibilität und eine Möglichkeit, das Hydrogel-Netzwerk unter milden Bedingungen erzeugen zu können, so dass den zu immobilisierenden Zellen kein Schaden zugefügt wird. Sind die Zellen bei der Bildung des Hydrogels zugegen, können Bedingungen, wie organische Lösungsmittel, toxische Monomere, UV-Strahlung und hohe Temperaturen folglich nicht eingesetzt werden. Zum Einsatz kommen stattdessen beispielsweise Collagen, Agarose, Alginat oder Polyvinylalkohol, auf den im weiteren Verlauf noch gesondert eingegangen werden wird. Bei der Mikroverkapselung werden einzelne Zellen oder kleine Zellcluster von einer dünnen, porösen und semipermeablen Membran umschlossen. Insbesondere bei der Verkapselung von Zellen von Säugetieren ist hier die Absicht, Nährstoffen und Sauerstoff, sowie Stoffwechselprodukten ein Durchdringen der Membran zu ermöglichen, nicht jedoch

Zellen des Immunsystems, die für Abstoßungsreaktionen verantwortlich sind. Einige hierzu verwendete Substanzen sind Agarose, Alginat-Polylysin-Alginat und Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-co-methylmethacrylat). Bei den mit diesen drei Methoden immobilisierten Zellen, handelt es sich um eine weite Bandbreite an Säugetierzellen, von Bauchspeicheldrüsenzellen über Tumorzellen bis hin zu Fibroblasten.^[59]

Einen Ansatz, bei dem Hydrogel-Partikel aus Agarose in Mikrosphären aus Poly(lactid-co-glycolid) verkapselt wurden, zeigten Wang und Wu.^[60] Sie brachten Wirkstoffe aus Proteinen in die Partikel aus Agarose ein, die wiederum in die Mikrosphären eingebracht wurden. Eine Mikrosphäre konnte dabei mehrere Partikel aus Agarose enthalten. Hieraus resultierte eine höhere Effizienz der Beladung mit Protein, als bei der alleinigen Verwendung von konventionellen Mikrosphären möglich gewesen wäre.

Neben den zuvor genannten Arbeiten zu den Säugetierzellen wurden auch bereits eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Immobilisierung von Bakterien auf verschiedene Art und Weise befassten. Die Möglichkeit der Immobilisierung von *Escherichia coli* in Silica-Gelen wurde bereits besprochen. So gab es beispielsweise Bestrebungen, Bakterien der Art *Pseudomonas putida* partiell mit Membranen aus Celluloseacetat zu immobilisieren und anschließend den inhibierenden Effekt von Phenol auf das Bakterienwachstum zu untersuchen.^[61] Neben Membranen aus Celluloseacetat wurden für den gleichen Zweck zudem Membranen aus Polysulfon verwendet.^[62]

Eines der beliebtesten Materialien zur Einlagerung von Bakterien ist Alginat. Bringt man eine Lösung von Alginsäure in Wasser mit einer Lösung in Kontakt, die Calcium-Ionen enthält, so führt dies zu einer Vernetzung der Alginsäure und zur Ausbildung eines Hydrogels. In diesem Zusammenhang befassen sich viele Arbeiten mit der Immobilisierung von probiotischen Bakterien wie *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium spp.* Bei diesen Bakterien handelt es sich um solche, wie sie in Yoghurt vorkommen. Die Motivation solcher Arbeiten liegt beispielsweise darin, die Überlebenschancen der Bakterien im Verdauungstrakt des Menschen zu verbessern, um die positiven Wirkungen dieser Bakterien zu steigern.^[4-6] Den Alginat-Partikeln wurde teilweise noch Maisstärke beigemischt, um die Überlebenswahrscheinlichkeit der

Bakterien weiter zu steigern. Alginat-Partikel stellen jedoch nicht die einzige Möglichkeit zur Verkapselung von probiotischen Bakterien dar. Einen Überblick zum Thema liefert beispielsweise der Übersichtsartikel von Kailasapathy.^[63]

Außer probiotischen Bakterien wurden lebende Bakterien enthaltende Mikroapseln hergestellt, die dem Zweck einer oralen Aufnahme zu Therapiezwecken dienen. Ziel hierbei war es, die Überlebenschancen von Bakterien, die im Verdauungstrakt die Aufgabe hatten therapierelevante Stoffe zu produzieren und abzugeben, zu steigern. Bakterien können dahingehend verändert werden, dass sie in der Lage sind, Stoffe wie Antikörper und Impfstoffe zu produzieren. Die verwendeten Mikroapseln waren so genannte APA-Kapseln, bestehend aus Alginat/Poly(L-lysin)/Alginat.^[7]

Young et al. beschrieben die Verkapselung von Bakterien, die das Wachstum von Pflanzen verbessern sollten.^[64] Das Projekt hatte zum Ziel, für das Wachstum von Pflanzen nützliche Bakterien in der Erde anzureichern, indem die Überlebensrate der ausgebrachten Bakterien gesteigert wurde. Bei den verkapselten Bakterien handelte es sich um aus Kompost isolierte *Bacillus subtilis*. Die Bakterien waren in der Lage, Calciumphosphat in Lösung zu bringen, und wiesen Aktivitäten von Nitrogenase, Amylase, Cellulase, Pectinase, Phosphatasen, Esterasen und Glucosidasen auf. Die Alginat-Partikel waren bei ihrer Herstellung zusätzlich mit Huminsäure angereichert worden. Eine mögliche Lagerung der Partikel, mit nur geringem Verlust an Zellen, über fünf Monate wurde nachgewiesen.

Eine weitere Arbeit zur Verkapselung von Milchsäurebakterien wurde von Ivanova et al. durchgeführt.^[65] Bei den verkapselten Bakterien des Stranges *Enterococcus faecium A 200* handelte es sich um Bakterien, die in der Lage waren, Bacteriocine zu produzieren. Bacteriocine sind Proteine oder Peptide, die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen und somit in der Nahrungsmittelproduktion als Konservierungsstoffe verwendet werden können. Diese antimikrobiellen Eigenschaften bestehen auch gegenüber dem produzierenden Bakterium eng verwandten Bakterienarten. Zur Verkapselung wurden Natriumalginat und Calciumchlorid verwendet.

Noch einen Schritt weiter gingen Wen et al., als sie zuerst rote Blutkörperchen von Meerschweinen in Alginat-Partikeln einschlossen und diese Partikel in einem nachfolgenden Schritt mit einem kovalent vernetzten, synthetischen Hydrogel überzogen.^[66] Die Bildung des Hydrogels erfolgte hierbei durch freie radikalische Polymerisation von *N*-Vinylpyrrolidon und einem wasserlöslichen Copolymeren aus 2-Hydroxyethylmethacrylat und Methacrylsäure. Die Idee hinter dieser Vorgehensweise war ein Einsatz solcher Materialien in der Transplantationstechnologie, beispielsweise zur Behandlung von Typ I Diabetes, als eine biokompatible und robustere Alternative zu reinen Alginat-Partikeln. Laut den Autoren könnten solche Partikel zur Behandlung von Menschen auch Zellen tierischer Herkunft beinhalten, da eine Immunreaktion durch das schützende Gel verhindert würde.

Bei dem Hydrogelbildner, der für die vorliegende Arbeit am interessantesten ist, handelt es sich jedoch um Polyvinylalkohol. Eine Lösung von Polyvinylalkohol besitzt die Eigenschaft, bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen zu vernetzen und ein Hydrogel zu bilden. Solche Gele werden auch als Cryogele bezeichnet. Daneben bilden wässrige Lösungen des Polymeren noch durch Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl oder γ -Strahlen Hydrogele aus.^[67, 68] Auch durch eine Zugabe von Farbstoffen, wie Kongorot, bildet sich ein Hydrogel.^[69, 70] Zur chemischen Vernetzung von Polyvinylalkohol können zudem Vernetzungsreagentien wie Glutaraldehyd, Acetaldehyd, Formaldehyd und weitere Monoaldehyde verwendet werden.^[71] Gerade bei pharmazeutischen oder medizinischen Anwendungen sind solche Vernetzer jedoch eher unerwünscht. Im Folgenden werden nur die durch Einfrieren und Auftauen erzeugten, physikalisch vernetzten Hydrogele behandelt.

Solche Gele bestehen typischerweise aus untereinander verbundenen Makroporen oder Supermakroporen. Diese erlauben die ungehinderte Diffusion von gelösten Stoffen, praktisch unabhängig von deren Größe. Auch ein Transport großer Mengen von Nanopartikeln oder sogar Mikropartikeln ist möglich.^[72] Sie zeigen eine höhere mechanische Stärke, als solche Hydrogele, die durch chemische oder strahleninduzierte Vernetzung erzeugt wurden.^[71]

Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen erzeugte Gele wurden in der Vergangenheit hinsichtlich ihrer Eignung für verschiedenste Zwecke untersucht. So wurde beispielsweise ihre Eignung als Material für weiche Kontaktlinsen evaluiert.^[73] Neben einer Verwendung als Kontaktlinsen wurde auch eine Anwendung im Bereich von Elektrodenmaterialien und der Herstellung von Membranen in Betracht gezogen.^[74, 75] Auch eine Anwendung als so genanntes Phantom bei bildgebenden Magnetresonanz-Verfahren wurde untersucht.^[76] Ihre speziellen Eigenschaften, wie ihre chemische und mechanische Stabilität, machen sie zudem auch sehr attraktiv für chromatographische Anwendungen in der Biotechnologie. Denkbar ist ein Einsatz bei der Trennung von Plasmiden, Viren, Zellorganellen oder gar ganzen Zellen.^[72]

Cryogele wurden auch in Hinblick auf die kontrollierte Freisetzung von Proteinen hin untersucht. Beispielsweise wurde die Freisetzung von Rinderserumalbumin als Modellsubstanz näher betrachtet. Von Interesse war hierbei der Einfluss der Anzahl an Einfrier-/Auftau-Zyklen und der Poreneigenschaften des Gels auf die Charakteristik der Freisetzung des Albumins.^[77, 78]

Die Tatsache, dass bei der Herstellung von PVA-Hydrogelen nach der Methode des Einfrierens und Auftauens keine chemischen Vernetzer, toxische Lösungsmittel oder hohe Temperaturen zum Einsatz kommen, macht sie zur Immobilisierung von Bakterien und anderen Zellen geeignet. Da diese Technik seit längerer Zeit bekannt ist, wurde bereits eine Reihe von verschiedenen Bakterien in solche Gele eingelagert. Einen gewissen Überblick vermag der Übersichtsartikel von Lozinsky und Plieva zu geben.^[79] Als Beispiele seien hier die Immobilisierung von *Pseudomonas putida* zur Erzeugung eines Biosensors zur Phenoldetektion und von Aktivschlämmen zur Abwasserbehandlung genannt.^[80-84] Auch Aktivschlämme marinen Ursprunges wurden zur Behandlung von Meerwasser immobilisiert.^[85] Okazaki et al. brachten Bakterien der Art *Bacillus cereus*, die sie zuvor aus Aktivschlamm isoliert hatten, in Partikel aus PVA-Hydrogel von mehreren Millimetern Durchmesser ein. Das Ziel war die Entfernung von *N,N*-Dimethylformamid aus Abwasser.^[86] Noch einen Schritt weiter gingen Song et al., als sie *Ochrobactrum anthropi* in mehrere Millimeter großen PVA-Partikeln immobilisierten und in einem darauf folgenden Schritt die Partikel mit einer Schicht aus Xanthan überzogen.^[87]

Ein weiterer Punkt, der Polyvinylalkohol Cryogele in Bezug auf diese Arbeit interessant macht, ist die Möglichkeit aus ihnen Mikro- und auch Nanopartikel herzustellen. So gelang es Ficek und Peppas, durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer Dispersion von wässriger PVA-Lösung in Pflanzenöl, unter Zugabe von Natriumlaurylsulfat als Tensid, Mikropartikel im Größenbereich von 150 – 1400 μm zu erzeugen.^[88] Li et al. erzeugten auf eine ähnliche Weise Partikel mit einem Durchmesser von $675,5 \pm 42,7$, nm die für Freisetzungsversuche von Wirkstoffen auf der Basis von Proteinen und Peptiden verwendet wurden.^[89] Im Gegensatz zu Pflanzenöl und einem Tensid verwendeten sie jedoch ausschließlich Siliconöl. Das als Modellsubstanz verwendete Rinderserumalbumin erwies sich während der Herstellung der Partikel als stabil.

1.4 Nutzung funktionaler Bakterien

Neben den bereits genannten Anwendungen, wie der Produktion von Essigsäure oder der Entfernung von *N,N*-Dimethylformamid aus Abwasser, existiert noch eine ganze Reihe weiterer Bakterien, die von großem Nutzen für Anwendungen in der Umwelttechnik oder der Produktion bzw. Gewinnung von Rohstoffen sein können. Eine Übersicht über verschiedene Bakterien und die von ihnen abgebauten Stoffe bzw. die von ihnen durchgeführten Reaktionen liefert der Artikel von Cassidy et al.^[90] Er beschreibt Anwendungen immobilisierter Mikroorganismen in der Umwelttechnik. Als Trägermaterialien für die Mikroorganismen dienen Hydrogele wie Alginat, jedoch auch Kunststoffe wie Polyurethan und auch Glas. Bei den von den Bakterien abgebauten Umweltgiften handelt es sich um Stoffe wie chlorierte Phenole und andere Aromaten. Auch problematische Verbindungen können von den immobilisierten Mikroorganismen abgebaut werden. So zum Beispiel DDT mit Hilfe von aus Schlamm isolierten und co-immobilisierten Stämmen von *Enterobacter cloacae* und *Alcaligenes* sp.^[91] Ein weiteres Beispiel stellt Cyanursäure dar, die durch immobilisierte *Pseudomonas* sp. NRRL B-12228 abgebaut werden kann.^[92]

Das Beispiel einer relativ bekannten Bakterienart ist *Pseudomonas putida*. Sie sind in der Lage Phenol, beispielsweise in industriellen Abwässern bis zu einer Konzentration von 100 mg L⁻¹ abzubauen. Um die von den Bakterien tolerierte Konzentration des Schadstoffes weiter zu steigern, können sie verkapselt werden, was von Li und Wang durchgeführt wurde.^[93]

Eine Art von Bakterien, die vor allem in der neueren Literatur zugegen ist, ist *Alcanivorax*. Wie der Name bereits vermuten lässt, handelt es sich dabei um Bakterien, die in der Lage sind Alkane abzubauen. Die Bakterien finden sich in mit Öl belastetem Meerwasser, aus welchem beispielsweise ein bedeutender Vertreter dieser Spezies, *Alcanivorax borkumensis* in der Nähe von Borkum isoliert wurde. Die Bakterien sind in der Lage C₁₅,C₁₆-n-Alkane als ihre primäre Quelle von Kohlenstoff zu nutzen.^[94] Eine andere Gruppe zeigte, dass *Alcanivorax* nicht auf die zuvor genannten n-Alkane als Kohlenstoffquelle limitiert ist und in mit Rohöl verseuchtem Wasser gar zur

vorherrschenden Bakterienart wird.^[95] Die Untersuchungen zeigten, dass *Alcanivorax borkumensis* im Vergleich zu *Alcanivorax venetianus* besser in der Lage war, verzweigte Alkane zu degradieren, was als Erklärung für das Vorherrschen dieser Spezies in Rohöl verseuchtem Wasser gesehen wurde. Andere Arbeiten befassten sich wiederum mit dem an eine breite Auswahl an Alkanen angepassten Metabolismus von *Alcanivorax borkumensis*.^[96] Eine weitere Spezies, die in der Lage ist Alkane von C₅ bis C₃₆ abzubauen, ist *Alcanivorax dieselolei*. Das Bakterium hat einen Wachstumsbereich von 15 bis 45 °C mit einem Optimum bei 28 °C.^[97] Die Bakterien der Gattung *Alcanivorax* sind jedoch nicht nur in der Lage Alkane abzubauen, sondern können zudem aus diesen grenzflächenaktive Stoffe herstellen, wobei es sich um potentiell nutzbare Verbindungen handelt.^[94]

Die Nutzung von Bakterien ist jedoch nicht nur auf den Abbau organischer Kontaminationen im Wasser oder Boden beschränkt. So sind einige Arten von Bakterien in der Lage Metalle anzureichern. Dies kann zum einen prinzipiell für die Dekontamination von verschmutztem Wasser oder Flächen genutzt werden und zum anderen zur Anreicherung von Metallen und somit zur Rohstoffgewinnung. Auch eine Kombination von beidem ist denkbar. So existieren Bakterien, die Hg²⁺ zu Hg reduzieren und so bis zu 98 % aus dem Abwasser entfernen können. Das gleiche gilt zudem für Au³⁺ und Ag⁺. Auch Methoden zur Entfernung von durch Arsen verursachten Kontaminationen können durch die Transformierung von As³⁺ zu As⁵⁺ durch Bakterien verbessert werden. *Enterobacter cloacae* ist in der Lage hohe Konzentrationen an Chromat zu tolerieren und gleichzeitig das Chromat zu Cr³⁺ zu reduzieren, welches bei dem Prozess ausfällt.^[98] Eine Übersicht über die von bestimmten Bakterien aufgenommenen Metalle und deren Gehalt an der Trockenmasse der Bakterien gibt der Artikel von Volesky und Holan.^[99]

Im Hinblick auf die hier durchgeführten Arbeiten sind vor allem auch die Fähigkeiten von *Micrococcus luteus* in diesem Bereich von Interesse. So zeigten Faison et al., dass *Micrococcus luteus* in der Lage war, gelöstes Strontium zu binden. Erstaunlicherweise fand diese Bindung auch in der Abwesenheit von Nährstoffen statt und benötigte zudem keinerlei Stoffwechselaktivität der Bakterien. Die Bindung fand zudem in der relativ kurzen Zeit von einer halben Stunde statt. Hierbei band das Strontium an den für Calcium

vorgesehenen Rezeptor. Daraus ergab sich eine potentielle Eignung von *M. luteus* zur Absorption von Strontium.^[100] Neuere Untersuchungen erbrachten zudem den Nachweis, dass *M. luteus* auch eine Tendenz aufweist, Thorium und Uran aus wässrigen Systemen zu absorbieren. Es wurde dabei vermutet, dass es sich bei den Ionenspezies, die von den Bakterien aufgenommen werden zum einem um UO_2^{2+} und zum anderen um $\text{Th}(\text{OH})_2^{2+}$ handelte. Bei Versuchen, bei denen sowohl Thorium, als auch Uran anwesend waren, zeigte sich eine Bevorzugung von Thorium bei der Absorption durch die Bakterien. Die Ursache hierfür war wahrscheinlich in der schnelleren Absorption und langsameren Desorption von Thorium im Vergleich zu Uran zu suchen.^[101] Diese Fähigkeiten beschränken sich jedoch nicht auf *M. luteus*. Auch weitere Bakterienarten, wie *Arthrobacter nicotianae* und *Bacillus subtilis* zeigten sich in der Lage Uran zu absorbieren. Bei *Arthrobacter nicotianae* fanden sich bis zu 698 mg UO_2^{2+} pro Milligramm trockener Zellen, bei *Bacillus subtilis* bis zu 531 mg.^[102]

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Elektrosinnen

Die Technik des Elektrosinns, auch elektrostatisches Spinnen genannt, nutzt Hochspannung, um aus einem Flüssigkeitstropfen sehr dünne Fasern zu erzeugen. Die Flüssigkeit kann sowohl eine Schmelze, als auch eine Polymerlösung darstellen. Die im Verlauf dieser Arbeit verwendete Anlage ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

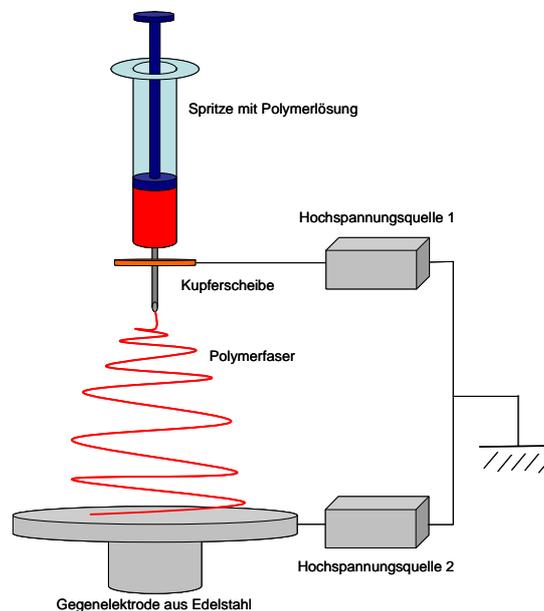


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau der verwendeten Anlage zum elektrostatischen Spinnen

Die Spritze repräsentiert den Vorratsbehälter, der die Polymerlösung bzw. Polymerschmelze enthält. Der Inhalt wird durch eine als Elektrode dienende Edelstahlkanüle kontrolliert aus der Spritze herausgepresst. Dies wurde anfangs durch einen Schrittmotor, später durch ein hydraulisches System realisiert. Unterhalb der Edelstahlkanüle befand sich, in einem Abstand von zehn oder mehr Zentimetern, eine als Gegenallele dienende Metallscheibe. Zeitweilig kamen auch von der Scheibe abweichende Varianten der Gegenallele zum Einsatz.

Der sich an der Kanülenspitze bildende Flüssigkeitstropfen wird im Hochspannungsfeld elektrostatisch aufgeladen. Hierbei wirken die abstoßenden elektrostatischen Kräfte der

Ladungen der Oberflächenspannung des Tropfens entgegen, was eine Änderung der Form des Tropfens, wie in Abbildung 2-2 dargestellt, von sphärisch zu konisch zur Folge hat. Es kommt zur Ausbildung des so genannten Taylor-Konus. Taylor folgerte durch systematische Untersuchungen an verschiedenen viskosen Flüssigkeiten, dass es bei Newtonschen Flüssigkeiten eines Winkels von $\alpha = 49,3^\circ$ bedarf, damit ein Gleichgewicht zwischen den abstoßenden Kräften und der Oberflächenspannung hergestellt werden kann. Später untersuchten Yarin und Mitarbeiter viskoelastische Polymerlösungen und fanden heraus, dass dieser Winkel hier bei $\alpha = 33,5^\circ$ liegt.^[103-105] Überschreitet die Spannung einen Grenzwert, so übertreffen die elektrostatischen Kräfte die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und es kommt zur Ausbildung eines Materialstrahls aus dem Tropfen, der sich auf die Gegenelektrode zu bewegt. Hierbei wird der Strahl durch die elektrostatische Abstoßung der Ladungen auf seiner Oberfläche gedehnt und verfestigt sich entweder durch Verdunstung des Lösungsmittels oder durch Abkühlung. Es kommt zur Bildung von Fasern, die sich auf der Gegenelektrode abscheiden.

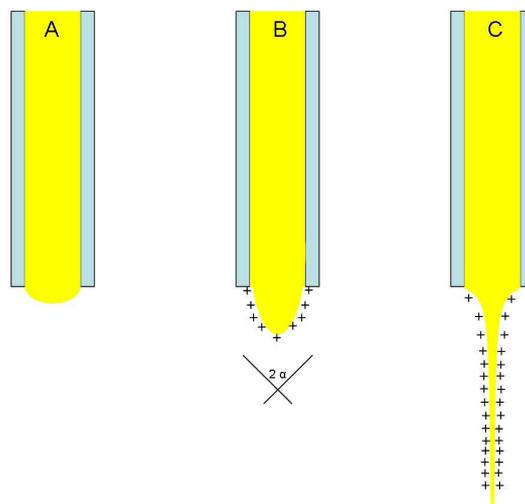


Abbildung 2-2: Schematische Zeichnung der Tropfenform an der Spitze der Kanüle. Ohne elektrisches Feld (A), Taylor-Konus (B) und Ladungsabfluss durch Materialtransport (C).

Auf ein infinitesimales Segment des Materialstrahls wirken dabei sechs Hauptkräfte.^[106, 107]

- Gravitationskräfte.
- Elektrostatische Kräfte, die den geladenen Materialstrahl von der Kanülenspitze zur Gegenelektrode transportieren.
- Coulomb-Abstoßungskräfte, die eine Abstoßung im Segment benachbarter geladener Spezies bewirken. Sie sind für die Dehnung des geladenen Materialstrahls auf seinem Weg zur Gegenelektrode verantwortlich.
- Viskoelastische Kräfte, die einer Dehnung des Materialstrahls entgegen wirken.
- Die Oberflächenspannung. Auch sie wirkt der Dehnung der Oberfläche des geladenen Materialstrahls entgegen.
- Bremskräfte, die aus der Reibung zwischen geladenem Materialstrahl und der umgebenden Luft herrühren.

Betrachtet man Hochgeschwindigkeitsaufnahmen des Materialstrahls, so kann man erkennen, dass sich dieser zunächst in einer direkten Linie auf die Gegenelektrode zu bewegt.^[108] Allerdings wird der Strahl nach kurzer Zeit instabil, wobei er sich auf einem Kegelmantel zur Gegenelektrode hin bewegt. Durch die daraus entstehenden schnellen Bewegungen wird der Materialstrahl stark gedehnt und Fasern mit Durchmessern im Nanometerbereich können entstehen. Diese Instabilitäten werden mit den Begriffen „*bending instabilities*“ und „*whipping instabilities*“ bezeichnet. Allerdings bezeichnen die beiden Begriffe prinzipiell den gleichen Effekt. Der Ausdruck „*bending instabilities*“ wurde von der Gruppe um Reneker geprägt, „*whipping instabilities*“ dagegen von der Gruppe um Rutledge.^[11, 109-113]

Die getrockneten, bzw. verfestigten Fasern scheiden sich anschließend als unorientiertes Vlies auf der Gegenelektrode ab. Dieser Vorgang kann jedoch in gewisser Weise durch die Art der Gegenelektrode beeinflusst werden. Die Abscheidung von parallel orientierten Fasern kann beispielsweise durch schnell rotierende Zylinder, Metallrahmen oder ähnliches erreicht werden.^[114-118]

Das Elektrosponnen und somit die Bildung der Fasern wird von zahlreichen Parametern beeinflusst.^[17, 119-123] Auf der einen Seite stehen dabei die Parameter, die von der verwendeten Apparatur und ihrer Umgebung vorgegeben werden. Diese sind die angelegte Spannung, der Abstand zwischen Kanülenspitze und Gegenelektrode, die Durchflussrate sowie die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit. Auf der anderen Seite stehen die Parameter, welche die verwendete Lösung des Polymeren oder dessen Schmelze vorgeben. Es sind zum einen Konzentration, Molekulargewicht, verwendetes Lösungsmittel und damit verbunden Viskosität und zum anderen Oberflächenspannung und elektrische Leitfähigkeit der Lösung. Auch der Dampfdruck des verwendeten Lösungsmittels zeigt einen nicht unerheblichen Einfluss, beispielsweise in Verbindung mit der herrschenden Luftfeuchtigkeit. So wies Baumgarten nach, dass acrylische Fasern auf ihrem Weg zur Gegenelektrode bei einer Luftfeuchtigkeit von mehr als 60 % nicht mehr trocknen konnten und an der Kollektorelektrode anhafteten.^[13]

Die dominantesten Parameter sind die elektrische Leitfähigkeit, die Viskosität und die Oberflächenspannung.^[124] Bei einer zu niedrigen Viskosität geht das System zum so genannten Electro spraying über und man erhält Tropfen statt Fasern. Hierbei ist auch ein Zusammenhang mit der Oberflächenspannung gegeben, da eine hohe Oberflächenspannung, bei gleichzeitig niedriger Viskosität das Aufbrechen des Materialstrahls zu Tropfen begünstigt. Zwischen dem Entstehen von Fasern und dem Electro spraying liegt ein Bereich, in dem Fasern mit Defekten in Form von spindelförmigen Verdickungen erhalten werden.^[11] Die elektrische Leitfähigkeit des versponnenen Mediums wiederum steht im direkten Zusammenhang mit der Ladungsdichte im Materialstrahl.

2.2 PVA-Cryogele

Wird Polyvinylalkohol zuerst durch Erhitzen in Lösung gebracht und danach wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut, so bildet sich ein hochelastisches, thermoreversibles Gel aus. Die Gele sind bei Raumtemperatur stabil und behalten ihre ursprüngliche Form. Sie können auf das Fünf- bis Sechsfache ihrer ursprünglichen Länge gedehnt werden, was die gummiartige, elastische Beschaffenheit und die hohe mechanische Festigkeit belegt. Die Eigenschaften dieser Gele hängen vom Polymerisationsgrad, der Konzentration der Lösung, der Temperatur, der Zeit des Einfrierens und der Zahl der Wiederholungen des Einfrierens ab.^[125]

Die Vernetzung des Polymeren erfolgt hierbei physikalisch, durch die Bildung von Kristalliten und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in der Lösung. Die Bildung des Cryogels läuft während des wiederholten Einfrierens und Auftauens nach dem in Abbildung 2-3 beschriebenen Schema ab.^[72]

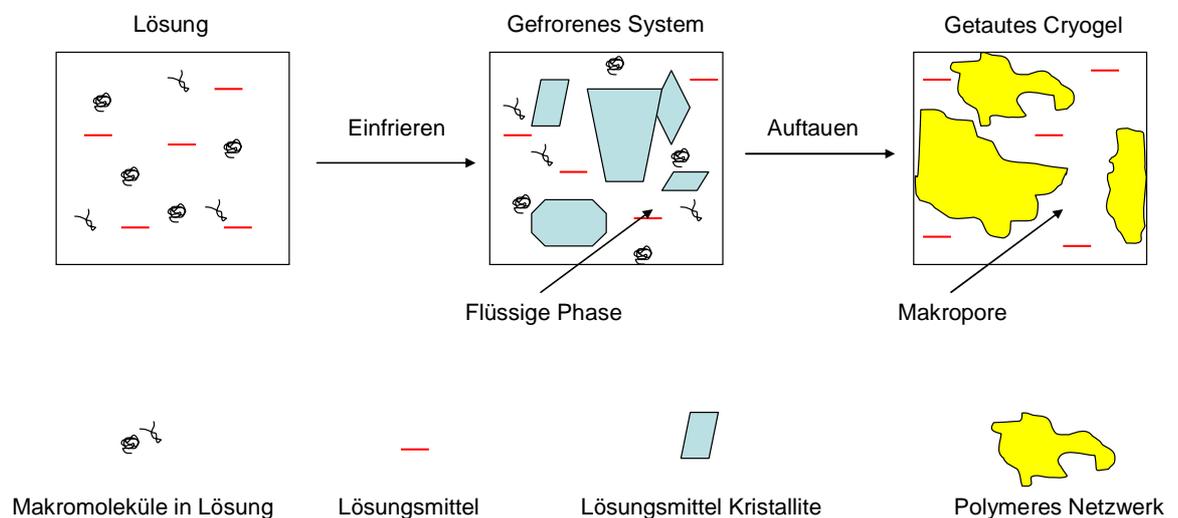


Abbildung 2-3: Schema der Bildung eines Cryogels durch Einfrieren und Auftauen.

Wird die Lösung eingefroren, erscheint sie zwar homogen, ist jedoch in Wirklichkeit heterogen. Der Grund ist die Ausbildung einer nicht gefrorenen, flüssigen Mikrophase, die neben den Kristalliten des gefrorenen Lösungsmittels vorliegt. In dieser flüssigen Mikrophase wird das Polymer quasi aufkonzentriert. Man spricht auch von einer so

genannten Cryokonzentration. Die flüssige Mikrophase repräsentiert jedoch nur einen kleinen Teil des ursprünglichen Volumens, so dass die Konzentration des Polymeren in ihr dramatisch erhöht wird, wodurch die Bildung des Gels vorangetrieben wird. Gleichzeitig wirken die Kristallite des gefrorenen Lösungsmittels als Template für die Ausbildung von Poren. Nach dem Schmelzen lassen sie mit Lösungsmittel gefüllte Makroporen zurück. Bedingt durch die Oberflächenspannung zwischen Lösungsmittel und Gel-Phase, wird die Form der Poren abgerundet. Da die Kristallite des Lösungsmittels beim Einfrieren so lange wachsen, bis sie andere Kristallite berühren, sind die Poren nicht isoliert, sondern miteinander verbunden.

Die Ausbildung, der die Polymerketten miteinander verbindenden und somit für die physikalische Vernetzung zuständigen Kristallite hängt von mehreren Faktoren ab. Dazu gehören die Konzentration der PVA-Lösung, die Zeit des Einfrierens und die Zeit des Auftauens. Allgemein kann gesagt werden, dass die Kristallinität mit steigender Einfrierzeit zunimmt. Sie steigt zudem mit der Konzentration der PVA-Lösung an. Während des Auftauprozesses scheint die Größe der Kristallite zunächst anzuwachsen, um dann wieder abzunehmen, wofür das Zusammenbrechen der Kristallitstruktur verantwortlich gemacht wird.^[71] Einen starken Einfluss auf die Bildung eines Gels hat außerdem der Hydrolysegrad des Polyvinylalkohols. Je höher der Hydrolysegrad ist, desto weniger quellen die Gele, wenn sie mit Wasser in Kontakt kommen.^[126] Zudem wurde herausgefunden, dass die Anzahl der Zyklen aus Einfrieren und Auftauen einen direkten Einfluss auf die Elastizität der Hydrogele hat. So sind die Hydrogele nach einer höheren Anzahl von Zyklen härter und weisen eine höhere Steifigkeit auf. Als Grund wird der Rückgang des Anteils von PVA gesehen, der nicht am Polymeren Netzwerk beteiligt ist. So waren bei einem Versuch nach einem Zyklus 10,6 % der ursprünglichen PVA Menge nicht am Netzwerk beteiligt. Nach vier Zyklen sank dieser Wert auf 7,0 %.^[127]

Hatakeyema et al. gingen in ihrer Arbeit zwar von einem prinzipiell ähnlichen Bildungsmechanismus der PVA Gele aus, vertraten jedoch die Ansicht, dass die dreidimensionale Verknüpfung des Netzwerkes, zumindest bei PVA Konzentrationen von zehn Prozent und weniger, nicht durch Kristallite, sondern einzig durch

Wasserstoffbrücken erfolgt. So konnte mit Hilfe von Röntgendiffraktogrammen keine Kristallinität nachgewiesen werden.^[128]

Yokoyama et. al. führten Untersuchungen an PVA-Lösungen mit einer Konzentration von 15 % durch.^[129] Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Proben nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen eine teilweise Kristallinität aufwiesen.

Durch einen Vergleich der Untersuchungen untereinander kann davon ausgegangen werden, dass die physikalische Vernetzung der Polymerketten sowohl durch Wasserstoffbrücken, als auch durch die Bildung von Kristalliten stattfindet. Die Bedeutung der Verknüpfung durch Kristallite steigt dabei mit der Konzentration der PVA-Lösung, der Anzahl der Einfriervorgänge und dem Hydrolysegrad des verwendeten PVA.

2.3 Gasphasenabscheidung von PPX

Die Gasphasenabscheidung von PPX nach dem in Abbildung 2-4 dargestellten Gorham-Prozess ermöglicht es, Oberflächen mit einem gleichmäßigen, dünnen Film des Polymeren oder seiner Derivate zu versehen.^[130] Im Zuge des Beschichtungsprozesses wird zunächst eine PPX-Vorläuferverbindung, beispielsweise [2,2]-Paracyclophan, im Vakuum bei ca. 170 °C verdampft. Hiernach wird sie in eine Pyrolysezone geleitet, wo sie bei 600–700 °C zum intermediären *p*-Chinodimethan pyrolysiert wird. Das *p*-Chinodimethan steht im Gleichgewicht mit dem Xylylradikal, wobei das Gleichgewicht auf der Seite des *p*-Chinodimethan liegt.^[131, 132] Die Polymerisation erfolgt nach der Kondensation auf der Oberfläche. Hierbei werden kovalente Bindungen zur beschichteten Oberfläche ausgebildet.^[133] Auf diese Weise können Filme mit Dicken bis hinab in den Nanometerbereich hergestellt werden, wodurch Mikrostrukturen auf dem zu beschichtenden Substrat nicht verwischt werden.

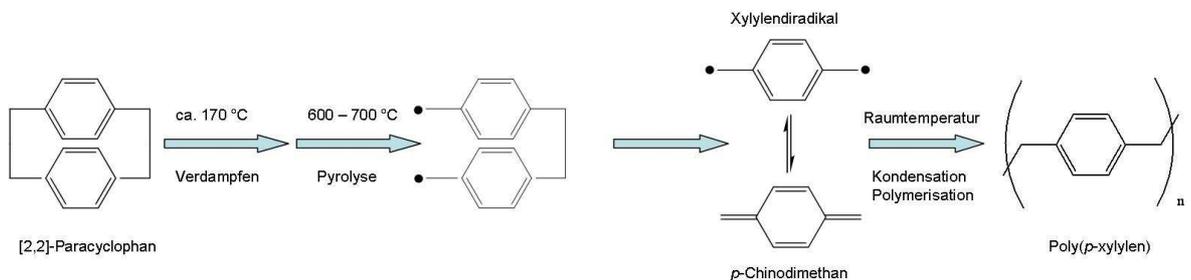


Abbildung 2-4: Gorham-Prozess zur Darstellung von PPX.^[130]

PPX ist chemisch sehr beständig und bei Raumtemperatur unlöslich. Es schmilzt unter Zersetzung erst bei 420 °C.^[134]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Verarbeitung von Bakterien aus wässrigen PEO-Lösungen

3.1.1 Konzept

Durch das Verfahren des Elektrosplinnens ist ein einfacher Zugang zu Fasern im Bereich von Mikrometern bis hinab zu wenigen Nanometern gegeben. Durch die Immobilisierung von Bakterien in solchen Faservliesen sollte es möglich sein, falls ein Kontakt der Bakterien in den Fasern mit dem umgebenden Medium gegeben ist, eine biologisch aktive Membran herzustellen. Auch die Stabilität und das hohe Verhältnis von Oberfläche zum Volumen einer solchen Membran sprechen für eine solche Verwendung.

Im Zuge vorangegangener Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch das Verspinnen mit Bakterien angereicherter, wässriger Lösungen von Polyethylenoxid und Polyvinylalkohol Bakterien enthaltende Faservliese zu erzeugen. Die Untersuchungen zeigten, dass die Bakterien in der Lage waren, den eigentlichen Spinnprozess in großer Zahl zu überstehen. Zumindest im Falle von *M. luteus* konnte auch nachgewiesen werden, dass in den Faservliesen, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wurden, noch nach mehreren Tagen lebende Bakterien vorhanden waren.^[8]

Von diesen Grundlagen ausgehend wurden die Überlebensraten von *E. coli* und *M. luteus* in Faservliesen aus PEO 900.000 näher untersucht.

3.1.2 Überlebensfähigkeit in Faservliesen

Die Experimente wurden analog den vorangegangenen Untersuchungen durchgeführt. Einer wässrigen Lösung von PEO 900.000 wurde direkt vor dem Verspinnen 10 % einer Flüssigkultur von *E. coli* oder *M. luteus* zugegeben, deren OD₅₇₈ zuvor bestimmt worden war (siehe Tabelle 3-1). Da sich *E. coli* auch bei diesem Experiment wieder als äußerst fragil erwies, wurde bei der Probe MG081206 die Konzentration an Bakterien stark erhöht, um eine bessere Auflösung zu erhalten. Die Lösungen wurden unter den in Tabelle 3-2 aufgeführten Bedingungen zu Fasern versponnen.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Bakterien enthaltenden Polymerlösungen.

Probe	Polymerlösung	Zugabe Kultur / %	Bakterienart	OD ₅₇₈
MG151106	5 % PEO in H ₂ O	10	<i>M. luteus</i>	1,0
MG271105a	5 % PEO in H ₂ O	10	<i>M. luteus</i>	0,8
MG271105b	5 % PEO in H ₂ O	10	<i>E. coli</i>	1,0
MG081206	5 % PEO in H ₂ O	10	<i>E. coli</i>	2,7

Tabelle 3-2: Verarbeitungsbedingungen beim Verspinnen der Proben.

Probe	E / kV cm ⁻¹	d / cm	Durchfluss / mL h ⁻¹
MG151106	0,7	20	0,51
MG271105a	0,9	15	0,51
MG271105b	0,9	15	0,51
MG081206	0,9	15	0,51

Gesponnen wurde direkt in sterile Glaspetrischalen. Durch das hohe Gewicht der Glaspetrischalen und das äußerst geringe Gewicht der Faservliese im Bereich von wenigen Milligramm war eine genaue Bestimmung der Masse der erzeugten Proben nicht möglich. Um dennoch eine Vergleichbarkeit der Proben bezüglich der Menge der versponnenen Polymerlösung zu gewährleisten, wurde bei stets gleicher Geschwindigkeit des Schrittmotors der Anlage exakt fünf Minuten in eine Schale gesponnen. Dies entsprach einer Menge an Polymerlösung von 0,04 mL. Während der Präparation der Proben herrschte eine Temperatur von 21 bis 22 °C, die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 55 und 65 %.

Es wurden je rund 30 Proben hergestellt. Die beiden *M. luteus* enthaltenden Proben wurden bei verschiedenen Temperaturen gelagert, MG151106 bei Raumtemperatur und MG271106a bei vier Grad Celsius. Die *E. coli* enthaltenden Proben wurden jeweils in eine bei Raumtemperatur und eine bei vier Grad Celsius gelagerte Fraktion aufgeteilt. Alle Proben wurden in der Dunkelheit gelagert. Zu gegebener Zeit wurden jeweils drei Proben einer Serie in ihren Petrischalen durch Zugabe von sterilem Kaliumphosphatpuffer aufgelöst. Diese Lösungen dienten als Ausgangspunkt von Verdünnungsreihen. Ausplattieren einer definierten Menge der Lösungen auf Agarplatten und anschließendes

Ergebnisse und Diskussion

Inkubieren lieferte die Zahl lebender Zellen in den Fasermatten zum Zeitpunkt des AuflöSENS. Die Resultate werden in Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 sowie in Diagramm 3-1 und Diagramm 3-2 veranschaulicht.

Tabelle 3-3: Lebendzellzahlen und Lagerungszeiten von *M. luteus* bei Raumtemperatur und vier Grad Celsius bezogen auf 0,04 mL Lösung.

MG151106		MG 271106a	
Lagerungszeit / h	LZ	Lagerungszeit / h	LZ
Lösung	137300	Lösung	35300
1,0	86400 ± 5000	4,0	22300 ± 4800
28,5	66500 ± 15500	28,0	9300 ± 6400
53,0	50400 ± 9000	52,0	17300 ± 4700
73,0	20200 ± 4500	73,0	11000 ± 2200
100,0	3200 ± 1900	97,0	12800 ± 4500
124,0	2300 ± 400	121,0	16300 ± 2100
145,0	600 ± 400	169,5	14000 ± 2300
169,5	1000 ± 270	193,5	16600 ± 2700
-	-	217,5	17400 ± 4300
-	-	243,0	10500 ± 4000
-	-	313,0	15500 ± 3500

Tabelle 3-4: Lebendzellzahlen und Lagerungszeiten von *E. coli* bei vier Grad Celsius bezogen auf 0,04 mL Lösung.

MG271106b		MG081206	
Lagerungszeit / h	LZ	Lagerungszeit / h	LZ
Lösung	432300	Lösung	1231500
1,0	1700 ± 800	0,5	1670 ± 812
28,0	0	23,0	0
56,0	0	46,0	0

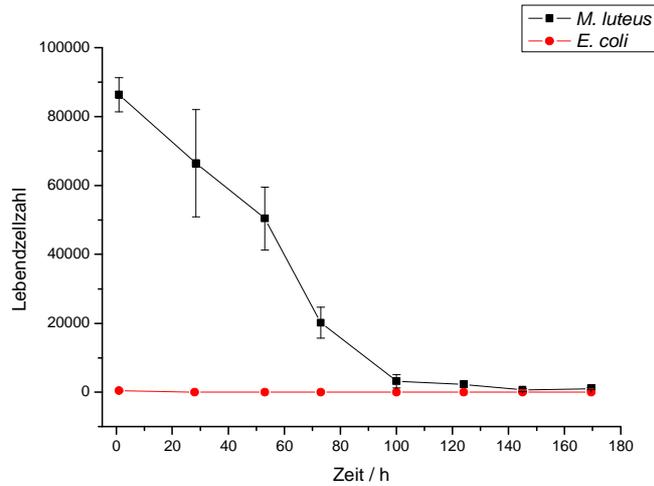


Diagramm 3-1: Auftragung der Lebendzellzahlen gegen die Zeit für die Lagerung bei Raumtemperatur. Die Werte für die Lösungen vor dem Verspinnen sind nicht enthalten.

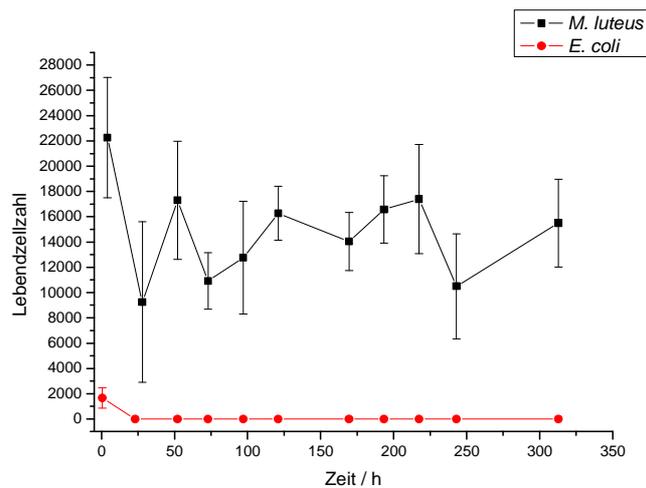


Diagramm 3-2: Auftragung der Lebendzellzahlen gegen die Zeit für die Lagerung bei vier Grad Celsius. Die Werte für die Lösungen vor dem Verspinnen sind nicht enthalten.

Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Arten von Bakterien das Verspinnen sehr unterschiedlich überstanden. Die in einer vorangegangenen Arbeit gemachten Beobachtungen konnten hierbei bestätigt werden.^[8] Die Gram-positiven *M. luteus* überlebten die Bedingungen während des Verspinnens und einer kurzen Lagerungszeit deutlich besser als die Gram-negativen *E. coli*. Die beiden *M. luteus* enthaltenden Proben MG151106 und MG271106a wiesen nach dem Verspinnen und einer Lagerungszeit von einer bzw. vier Stunden noch 63 % der Lebendzellzahl vor dem Verspinnen auf. Im

Gegensatz dazu betrug der Wert der Lebendzellzahl bei *E. coli* nach dem Verspinnen nur noch 0,4 % bei MG271106b und 0,1 % bei MG081206, bezogen auf den ursprünglichen Wert.

M. luteus zeigte auch hier wieder einen ständigen Rückgang der Zahl lebender Zellen in den Proben wenn diese bei Raumtemperatur gelagert wurden. Deutliche Unterschiede weist jedoch Diagramm 3-2 auf. Hier stabilisiert sich die Lebendzellzahl bei einer Lagerung bei vier Grad Celsius. Auch nach einer Lagerungsdauer von mehr als 300 Stunden ist kein signifikantes Abfallen des Wertes zu erkennen.

Auffallend sind in diesem Zusammenhang auch die signifikant hohen Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte in den Diagrammen. Eine mögliche Hauptursache hierfür liegt in der Präparation der einzelnen Proben. Es kann nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die gesamten, während der fünfminütigen Spinnzeit erzeugten Fasern in der Petrischale aufgefangen wurden. Auch kann es besonders im Falle der zur Aggregation neigenden *M. luteus* zur Bildung von Inhomogenitäten innerhalb der Spinnlösung kommen, so dass eine erzeugte Probe, im Vergleich zu einer anderen, trotz gleicher Menge versponnener Polymerlösung eine andere Zahl Bakterien enthalten könnte.

3.1.3 Zusammenfassung

Es kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass die bestehenden Erkenntnisse bezüglich des Verspinnens mit Bakterien angereicherter, wässriger PEO-Lösungen bestätigt und erweitert werden konnten. Sowohl *M. luteus*, als auch *E. coli* überstanden das Verspinnen, wenn auch *E. coli* in weitaus geringerer Zahl. *E. coli* starb in den Fasermatten schnell ab, *M. luteus* überlebte, vor allem bei Lagerung bei vier Grad Celsius, mehr als 300 Stunden.

3.2 PPX Beschichtung Bakterien enthaltender PEO Fasern

3.2.1 Konzept

Die Verwendung von PPX macht es möglich, eine Oberfläche mit einem chemisch inerten Polymerfilm zu versehen. Die Abscheidung des Polymerfilms erfolgt dabei aus der Gasphase durch Pyrolyse einer Vorläuferverbindung. [2,2]-Paracyclophan wird dabei bei erhöhter Temperatur zersetzt, die eigentliche Polymerisation erfolgt bei Raumtemperatur aus der Gasphase an der Oberfläche des zu beschichteten Objektes im Hochvakuum. Durch die Beschichtung von PEO Fasern mit darin eingebundenen Bakterien sollte es möglich sein, wasserfeste Faservliese zu erhalten. Zudem sollte es eventuell möglich sein, nach Herauslösen des PEO Kerns analog dem TUFT Prozess Hohlfasern aus PPX zu erhalten, in deren Innerem die Bakterien eingelagert sind.^[19,20]

Es konnte bereits in vorausgegangenen Experimenten gezeigt werden, dass in PEO Fasern immobilisierte *M. luteus* die Beschichtung unter diesen recht harschen Bedingungen überstanden. Aus diesem Grund wurde die PPX Beschichtung von solchen Substraten im Zuge dieser Arbeit weiter verfolgt.

3.2.2 Beschichtung von PEO Fasermatten

Es wurden zunächst Fasermatten aus PEO mit darin enthaltenen *M. luteus* hergestellt. Im Gegensatz zu der in Abschnitt 3.1.2. beschriebenen Variante wurde hier allerdings keine Flüssigkultur verwendet. Zur Steigerung der Bakterienanzahl in den Fasern wurden die Bakterien zuvor durch Zentrifugation sedimentiert. Verwendet wurde eine 48 Stunden Kultur. Die Zusammensetzung der Spinnlösung, sowie die Verarbeitungsbedingungen sind Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Spinnlösung.

Probe	Menge PEO Lösung / g	Menge Sediment / g	Anteil Sediment / %	Bakterienart
MG260907b	3,0	0,5	14	<i>M. luteus</i>

Tabelle 3-6: Verarbeitungsbedingungen von.

Probe	E / kV	d / cm	Durchfluss / mL h ⁻¹	rel. Luftfeuchte / %	Temperatur / °C
MG260907b	15	20	0,51	55	22

Es wurden drei Proben mit einer Spinnzeit von jeweils 20 Minuten auf Rahmen, sowie eine Probe mit einer Spinnzeit von 30 Minuten auf Aluminiumfolie hergestellt.

Die Proben auf den Rahmen wurden, um eine Beschichtung von beiden Seiten zu gewährleisten, auf der Seite liegend in die Beschichtungskammer gegeben. Die auf Aluminiumfolie gesponnene Probe wurde von der Folie abgenommen und Stücke von ca. 1 cm² auf einen Objektträger aufgeklebt. Die verwendete Menge [2,2]-Paracyclophan (DPX-N) betrug 2,17 g, was in einer Schichtdicke von 1 µm (DEKTAK) resultierte. Abbildung 3-1 stellt die beschichteten Vliese den unbeschichteten gegenüber.

Die Beschichtung der Oberfläche des Vlieses erschien homogen. Vor allem beim Vergleich von A und C zeigt sich sehr deutlich die Zunahme des Faserdurchmessers durch die PPX Beschichtung. Auch scheint die Oberfläche keine Defekte, wie unbeschichtete Stellen aufzuweisen.

Um das Verhalten der Faservliese gegenüber Nährlösung zu untersuchen, wurden Proben der Vliese in Nährlösung eingebracht. Hierbei wurden die auf Rahmen gesponnenen Proben direkt in die Lösung gegeben. Die unter Zuhilfenahme des Objektträgers beschichteten Proben wurden vorsichtig vom Träger abgenommen und zusammen mit dem Klebeband in die Lösung gegeben, um die PPX Schicht nicht zu beschädigen. Die Proben wurden in individuellen Gefäßen inkubiert, wobei die rahmenlosen Proben mit 150 U min⁻¹ geschüttelt wurden.

Alle Proben zeigten ein starkes Wachstum von *M. luteus*, was nahe legt, dass zumindest einige lebende Bakterien in der Lage waren das Faservlies zu verlassen und sich in der Nährlösung zu vermehren. Aus diesem Grund wurden die Faservliese dem Nährmedium entnommen, mit Wasser abgespült und mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Ergebnisse werden in Abbildung 3-2 veranschaulicht.

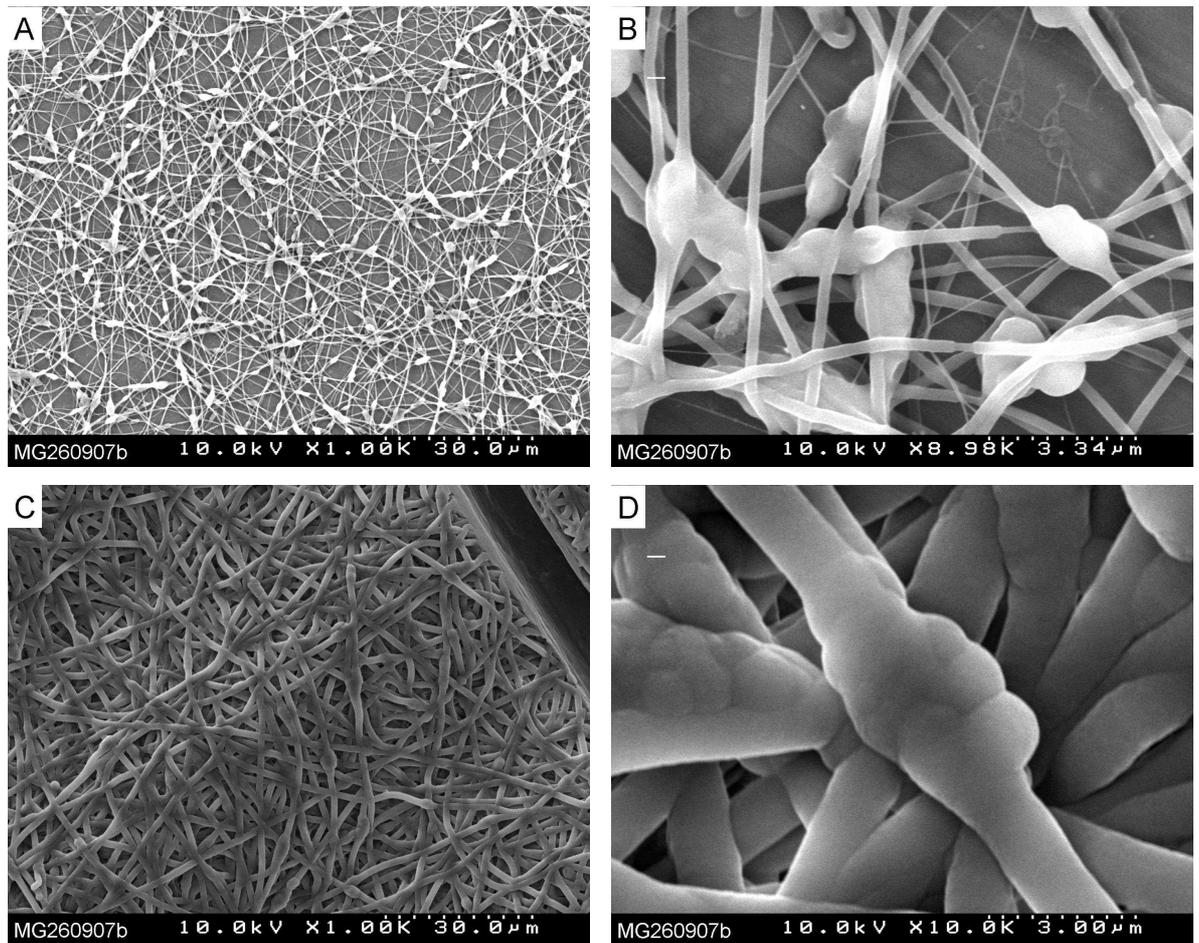


Abbildung 3-1: PEO Faservliese MG260907b vor und nach der Beschichtung mit PPX. Die Abbildungen A und B zeigen das Vlies vor dem Beschichten. Die Abbildungen C und D zeigen das Vlies nach der Beschichtung mit PPX.

Auch nach der Inkubation im Nährmedium und anschließendem Spülen waren keine Beschädigungen der PPX Oberfläche zu erkennen. Die Bakterien enthaltenden Verdickungen in den einzelnen Fasern schienen intakt zu sein. Wie auf den Aufnahmen C und D in Abbildung 3-2 zu erkennen ist, bildete sich offenbar auf Teilen des Vlieses ein Biofilm aus. Bedingt durch das Aussehen der Bakterien in Aufnahme D, sowie durch Ausplattieren und anschließende mikroskopischen Untersuchungen der Nährlösungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Bakterien um *M. luteus* handelte. Eine eventuelle Kontamination im Zuge der Versuchsdurchführung kann somit so gut wie ausgeschlossen werden.

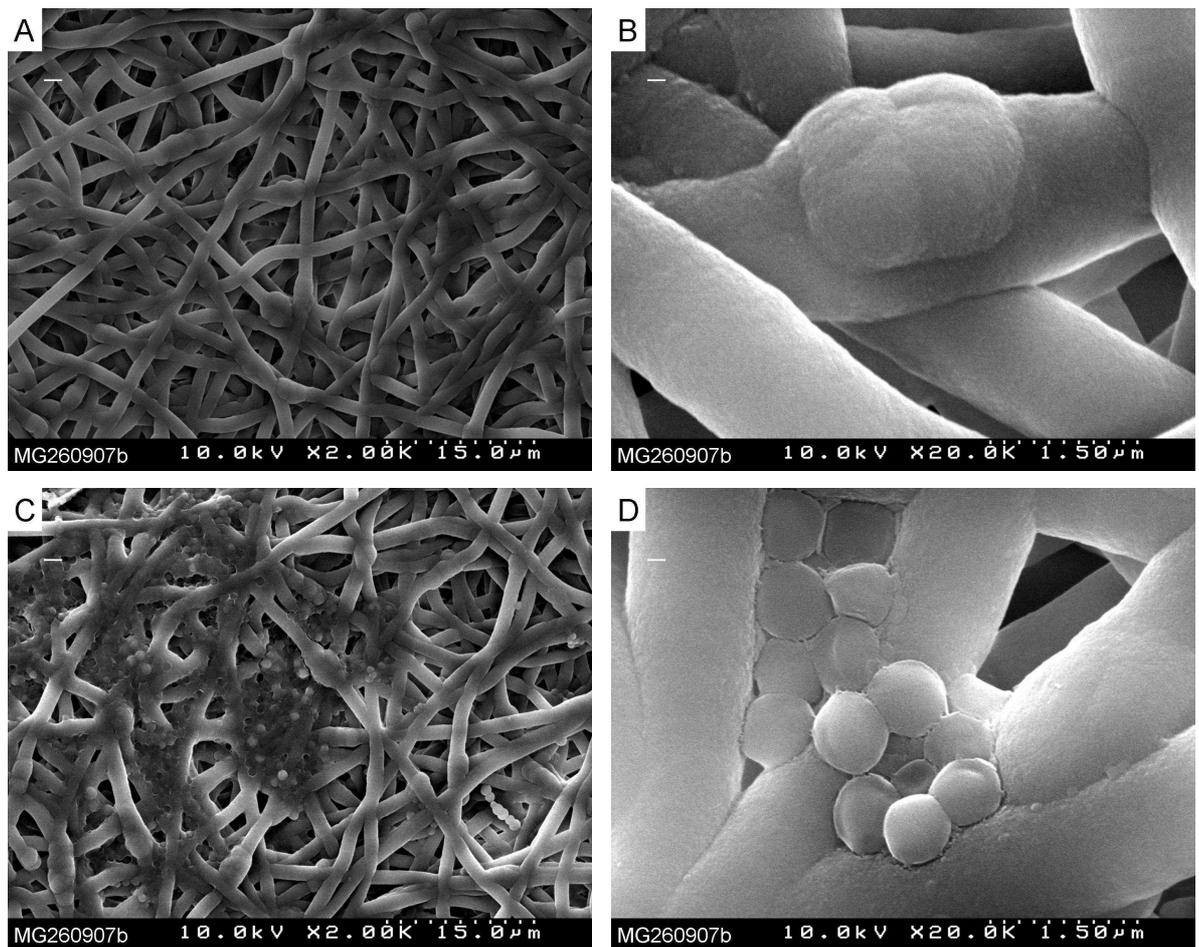


Abbildung 3-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Faservliese MG260907b nach der Inkubation in Nährmedium. A und B zeigen die Verdickungen, C und D Bakterien, die sich auf dem Vlies festgesetzt hatten.

Es wurde ein Experiment entworfen, um die Durchlässigkeit von PPX Filmen gegenüber Bakterien näher zu untersuchen. Hierzu wurde eine Apparatur verwendet, wie sie in Abbildung 3-3 gezeigt wird.

Die Apparatur enthielt zwei Kammern, die durch eine PPX Membran voneinander getrennt werden konnten. In der oberen Kammer befand sich steriles Nährmedium, in der unteren Kammer eine Flüssigkultur von *M. luteus*. Der verwendete PPX Film wurde durch Beschichten eines Glasobjektträgers und anschließendes Ablösen im Wasser hergestellt. Die Dicke betrug $1,1 \mu\text{m}$. Nach dem Befüllen der Apparatur unter sterilen Bedingungen wurde sie verschlossen und bei 37°C mehrere Tage inkubiert. Die obere, das sterile Nährmedium enthaltende Kammer wies zu keinem Zeitpunkt eine Trübung auf. Zudem wiesen auf Agarplatten ausgestrichene Proben des Mediums zu keinem Zeitpunkt

Bakterienwachstum auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass ein durch Gasphasenabscheidung hergestellter PPX Film in unbeschädigtem Zustand keine Durchlässigkeit für Bakterien aufweist.

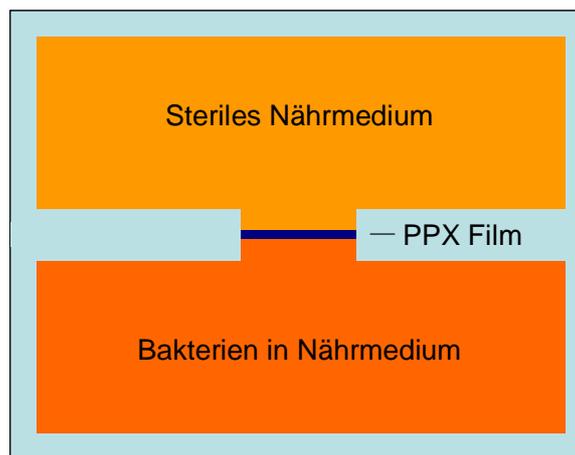


Abbildung 3-3: Experiment zur Untersuchung der Durchlässigkeit von PPX Filmen für Bakterien. Das mit Bakterien versetzte Nährmedium ist vom sterilen durch den PPX-Film getrennt.

Um die Herkunft der in der Nährlösung wachsenden Bakterien näher zu untersuchen, wurden erneut PEO Vliese mit *M. luteus* mit PPX beschichtet. Zur Herstellung der Probe MG281107 wurde das Sediment einer 48 Stunden Kultur von *M. luteus* verwendet, das mit einem 50 mmol L^{-1} Kaliumphosphatpuffer $\text{pH} = 7$ gewaschen worden war. Die verwendete Spinnlösung, sowie die Verarbeitungsbedingungen waren analog MG260907b. Das Faservlies wurde auf einem antihafbeschichteten Papier aufgefangen. Es wurden sechs Proben von MG281107 zur Beschichtung vorbereitet. Hierzu wurden jeweils drei Proben auf einem Objektträger fixiert. In einem ersten Durchgang wurden alle sechs Proben beschichtet. Hierzu wurden $2,1 \text{ g}$ [2,2]-Paracyclophan eingesetzt, was in einer Filmdicke von $1,7 \mu\text{m}$ resultierte (MG281107a). Drei der sechs Proben wurden erneut unter Einsatz von $2,0 \text{ g}$ [2,2]-Paracyclophan beschichtet, wonach die PPX Schicht eine Gesamtdicke von $3,2 \mu\text{m}$ aufwies (MG281107b). Nach der Entfernung einer der Proben auf jedem Objektträger für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen, wurden die verbleibenden Proben samt dem Objektträger in 60 mL steriles Nährmedium gegeben. Dies diente dazu, eventuelle Beschädigungen der PPX Oberfläche während des Ablösens der Proben zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wies das Nährmedium in

beiden Gefäßen eine starke Trübung auf, was auf ein Wachstum von Bakterien hindeutete. Zudem zeigte sich, dass sich der PPX Film zu großen Teilen vom Objektträger abgelöst hatte und sich nun Flüssigkeit zwischen Glas und PPX befand. Die Bakterien, die die Trübung verursachten, konnten mikroskopisch als *M. luteus* identifiziert werden, was als Beleg für ein Austreten von Bakterien aus den beschichteten Faservliesen gewertet werden konnte.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der nicht dem Nährmedium ausgesetzten Proben, wiesen einige Auffälligkeiten auf. Abbildung 3-4 zeigt die die beiden Proben MG281107a und MG281107b gegenübergestellt. Die unterschiedlich starke Beschichtung der Vliese mit PPX ist deutlich zu erkennen. Die Oberfläche erscheint intakt, es sind keine Bakterien auf der Oberfläche zu sehen, die ein Wachstum auslösen könnten. Auf einigen Aufnahmen waren jedoch auch Strukturen, wie sie in Abbildung 3-5 gezeigt werden zu sehen. Sowohl MG281107a, als auch MG281107b wiesen Risse in der PPX Oberfläche auf. Die Aufnahmen A und C zeigen die Defektstellen in niedriger Vergrößerung. Die rot markierten Defektstellen werden in den Abbildungen B und D vergrößert dargestellt. Zudem sind auf der Aufnahme C lochartige Strukturen in der PPX Oberfläche zu erkennen.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die PPX Beschichtung der Vliese mit darin immobilisierten Bakterien nicht ohne Defekte in der Oberfläche ist. Wird ein solches beschichtetes Vlies einer Flüssigkeit, beispielsweise einer Nährlösung ausgesetzt besteht die Möglichkeit, dass sich die bereits vorhandenen Defektstellen erweitern und Bakterien aus dem Inneren freigesetzt werden können. Ein weiteres Problem, das bei einem Aussetzen des Vlieses an ein Medium, das eine genügende Konzentration von Nährstoffen enthält besteht, dürfte das Wachstum der Bakterien im Vlies sein. So belastet eine Vermehrung von *M. luteus* im Vlies dessen Stabilität erheblich. Die Gram-positiven *M. luteus* weisen einen Innendruck von 20 Atmosphären auf, dürften also in der Lage sein, die PPX Beschichtung bei ihrer Vermehrung durch die damit verbundene Volumenzunahme erheblich mechanisch zu belasten.

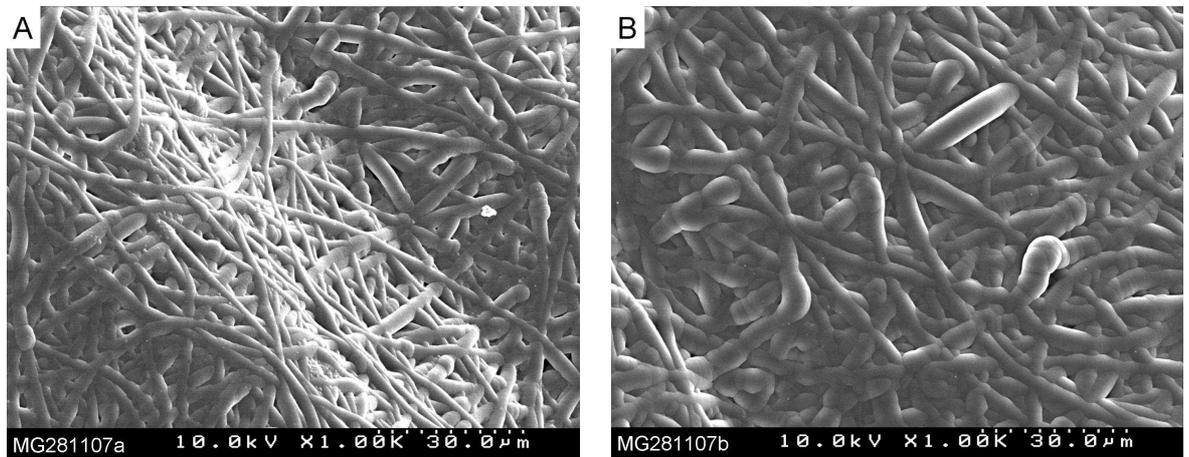


Abbildung 3-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG281107a und MG281107b. A zeigt die mit $1,7 \mu\text{m}$ PPX beschichtete Probe, B die mit $3,2 \mu\text{m}$ beschichtete. Die unterschiedliche Dicke der Beschichtung ist deutlich zu erkennen.

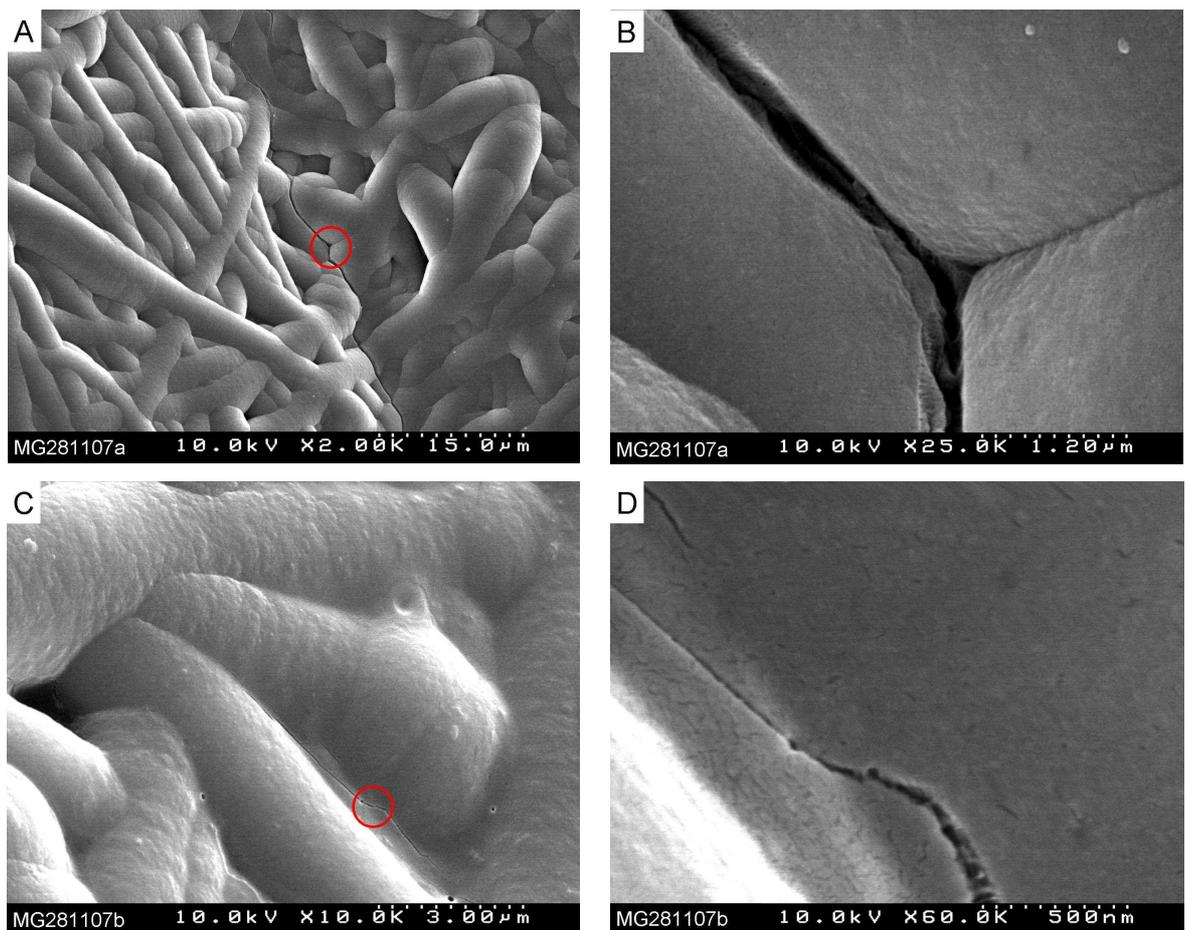


Abbildung 3-5: Defektstellen in der PPX Beschichtung von MG281107a und MG281107b. Die auf den Aufnahmen A und C rot markierten Beschädigungen in der Beschichtung werden auf den Aufnahmen B und D vergrößert dargestellt.

3.2.3 Zusammenfassung

Es war möglich, die Bakterien enthaltenden Vliese mit einer Schicht aus PPX durch Gasphasenabscheidung zu versehen. Es zeigte sich allerdings, dass wenn die Vliese einem Nährmedium ausgesetzt wurden, zumindest einige Bakterien in der Lage waren, die Beschichtung zu durchdringen und ein Bakterienwachstum in der Nährlösung zu induzieren. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die PPX Beschichtung der Oberfläche Risse aufwies, was eine Erklärung für das Austreten von Bakterien sein könnte.

3.3 *Verspinnen bakterienhaltiger Polymerlösungen auf Basis organischer Lösungsmittel*

3.3.1 Konzept

Die Verwendung von Polymerlösungen auf Basis wasserlöslicher Polymere zur Herstellung von Vliesen mit immobilisierten, lebenden Bakterien weist einige Nachteile auf. So sind die resultierenden Vliese in der Regel nicht beständig gegenüber Wasser und wässrigen Lösungen. Um eine Wasserbeständigkeit zu erreichen sind also weitere, zusätzliche Schritte notwendig. Mögliche Schritte sind die nachträgliche Ausrüstung mit einer wasserfesten Beschichtung, wie die zuvor beschriebene Gasphasenabscheidung von PPX oder die Vernetzung des Polymeren nach der Verarbeitung. Eine solche Vernetzung kann durch den Einsatz chemischer Vernetzer oder durch physikalische Vernetzung, beispielsweise durch Kristallitbildung oder Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung erfolgen. Die nachträgliche Beschichtung erwies sich als durchführbar, jedoch nicht ohne Defekte in der Oberfläche. Vernetzungsmethoden, seien es chemische oder physikalische, setzen die immobilisierten Bakterien oft nicht akzeptablen Bedingungen aus. Dazu gehören zum Beispiel im Falle von Annealing Erhitzen, oder bei einer chemischen Vernetzung die Reaktionsbedingungen, sowie toxische Lösungsmittel und Chemikalien.

Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte die Verwendung einer schützenden Hülle oder Sphäre für die Bakterien sein. Falls diese Sphäre die darin enthaltenen Bakterien zuverlässig vor einer möglichst großen Bandbreite von Lösungsmitteln schützt, sollte es möglich sein, die Bakterien zusammen mit vielen unterschiedlichen, wasserbeständigen Polymeren aus der Lösung zu verarbeiten. Als potentiell schützende Umgebung für die Bakterien bieten sich Hydrogele, beispielsweise auf der Basis von Polyvinylalkohol an. Solche Hydrogele werden bereits zur Immobilisierung von Bakterien, zum Beispiel für Bioreaktoren eingesetzt. Zudem beschreibt die Literatur Methoden zur Herstellung von Partikeln aus solchen Hydrogelen. Es liegt also nahe, diese beiden Technologien zu kombinieren und so zu einem Partikel zu kommen, der zum einen die Bakterien enthält und zum anderen aus allen Nicht-Lösungsmitteln von Polyvinylalkohol verarbeitet werden kann.

3.3.2 PVA Hydrogele zur Immobilisierung von Bakterien

Es wurde zunächst untersucht, ob die bisher in dieser Arbeit verwendeten Bakterien für eine Immobilisierung in PVA Hydrogelen verwendet werden können. Es wurde eine Suspension von *M. luteus* in einer PVA Lösung hergestellt. Verwendet wurde eine 48-Stunden Kultur von *M. luteus* mit $OD_{578} = 1,9$, sowie eine acht Stunden Kultur von *E. coli* mit $OD_{578} = 2,1$ und eine 15 % PVA 28-99 Lösung. Die Probenzusammensetzung ist Tabelle 3-7 zu entnehmen.

Tabelle 3-7: Probenzusammensetzung der PVA-Hydrogele.

Probe	PVA-Lsg / g	Bakteriensusp. / g	PVA Konzentration / %
MG220107a	4,9	1,6	11
MG220107b	4,9	1,6	11

Es wurden jeweils zwei Milliliter der Suspension in zwei zehn Milliliter Rollrandgläser gegeben. Die Vernetzung zum Hydrogel erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Hierbei wurden die verschlossenen Gläser dreimal für jeweils 20 Stunden bei -20 °C eingefroren. Zwischen den einzelnen Einfrierphasen lag jeweils eine vierstündige Auftauphase bei Raumtemperatur. Nach dem letzten Auftauen konnten die im Falle von *M. luteus* leicht gelblichen und im Falle von *E. coli* opaken Gele nach Zerstörung des Glases entnommen werden. Die Gele wurden auf einer Agarplatte platziert und bei 37 °C inkubiert, wobei sich bei *M. luteus* die gelbe Färbung deutlich verstärkte. Auch war in beiden Fällen ein Wachstum von Bakterien auf der Agarplatte unter den Gelen zu erkennen. Abbildung 3-6 zeigt die *M. luteus* enthaltenden Gele nach dem Inkubieren.

Wie in diesem Experiment gezeigt werden konnte, waren sowohl *M. luteus*, als auch *E. coli* in der Lage, die bei der Herstellung von PVA-Hydrogelen nach der Einfrier/Auftau-Technik herrschenden Bedingungen zu überstehen. Allerdings stand zu erwarten, dass verglichen mit *M. luteus* ein weit geringerer Prozentsatz von *E. coli* im fertigen Hydrogel noch aktiv war. Allerdings war es an dieser Stelle nicht möglich, die Überlebensraten der beiden Bakterienarten zu bestimmen oder zu vergleichen, da es keinen Weg gab, diese zur Bestimmung der Lebendzellzahl aus dem Hydrogel zu extrahieren, ohne sie dabei abzutöten.

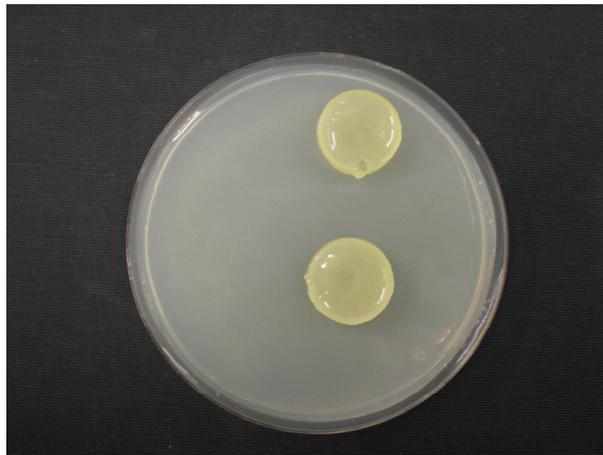


Abbildung 3-6: *M. luteus* enthaltende Hydrogele nach dem Inkubieren. Die gelbe Färbung durch die Bakterien ist deutlich zu erkennen.

3.3.3 Herstellung von PVA Hydrogelpartikeln im Mikrometerbereich

Nachdem bewiesen werden konnte, dass sowohl *M. luteus*, als auch *E. coli* in PVA Hydrogelen immobilisiert werden können, wurden Methoden zur Herstellung von Hydrogelpartikeln aus PVA in der Größenordnung von Mikrometern untersucht. Dabei sollten möglichst keine Tenside verwendet werden, da zu befürchten stand, dass diese einen negativen Einfluss auf die Bakterien haben könnten. Als Öle wurden, wie in verschiedenen Beispielen aus der Literatur Pflanzenöl und Siliconöl verwendet. Als Pflanzenöl kam ein handelsübliches Sonnenblumenöl zum Einsatz. Beim Siliconöl handelte es sich um AP200 der Firma Wacker. Auch wurde schweres Mineralöl getestet. Tabelle 3-8 listet die einzelnen Versuche auf.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Proben zur Partikelherstellung.

Probe	Öl	PVA-Lösung	Menge PVA-Lösung
MG160107a	Pflanzenöl	10 % PVA 28-99	2 mL
MG160107b	Pflanzenöl	10 % PVA 28-99	2 mL
MG160107c	Siliconöl AP200	10 % PVA 28-99	2 mL
MG160107d	Siliconöl AP200	10 % PVA 56-98	4 mL
MG160107e	Schweres Mineralöl	10 % PVA 56-98	4 mL

Eine Dispersion der PVA-Lösung im entsprechenden Öl wurde hergestellt, indem jeweils 40 mL des Öls vorgelegt wurden. Die Zugabe der Polymerlösung erfolgte unter Rühren mit einem Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeug vom Typ UltraTurrax® bei 13500 U min^{-1} . Anschließend wurde zehn Minuten bei der gleichen Rührgeschwindigkeit homogenisiert. Die Proben wurden nach der Homogenisierung analog den Hydrogelen in Abschnitt 3.3.2 drei Zyklen, bestehend aus Einfrieren und Auftauen unterzogen. Nach dem letzten Auftauen wurden die Proben in die vierfache Menge Aceton gegossen, wodurch die gequollenen Hydrogel-Partikel ausgetrocknet und ausgefällt werden sollten. Das Austrocknen diente dem Zweck ein Verkleben der Partikel nach der Trennung vom Öl zu verhindern.

Mit Ausnahme der Probe MG160107b wurden alle Proben gleich behandelt, indem sie direkt nach der Homogenisierung bei -20 °C eingefroren wurden. Die Probe MG160107b wurde nach der Homogenisierung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und dann der Lagerungstemperatur ausgesetzt. Dieses Vorgehen hatte zum Ziel, eine eventuelle Entmischung vor dem Erreichen der Temperatur von -20 °C zu verhindern.

Es zeigte sich, dass weder bei der Verwendung von Pflanzenöl, noch bei der Verwendung von schwerem Mineralöl ohne die Verwendung von Tensiden eine ausreichende Stabilität der Dispersion erreicht werden konnte. Die Proben MG160107a, MG160107b und MG160107e trennten sich im Verlauf der Zyklen aus Einfrieren und Auftauen so weit auf, dass nach dem Ausfällen in Aceton keine Partikel erhalten werden konnten. Die Proben MG160107c und MG160107d zeigten nach dem letzten Auftauen eine schwammartige Schicht aus Hydrogel an ihrer Oberfläche, was auf eine teilweise Entmischung zurückzuführen war. Nach der Entfernung dieser Schicht und Ausfällen in Aceton konnten jedoch Partikel erhalten werden, wie in Abbildung 3-7 zu erkennen ist.

Die Partikel zeigten eine relativ breite Größenverteilung. Zudem waren Agglomerate von Partikeln zu erkennen, deren Anzahl jedoch durch mechanische Behandlung deutlich verringert werden konnte. Wie ein Vergleich mit den Balken in Abbildung 3-7 zeigt, lag die Partikelgröße im Bereich von Mikrometern. Es war also zu erwarten, dass die deutlich

größeren, gequollenen Partikelvorläufer im Öl ausreichend groß waren, um Bakterien aufnehmen zu können.

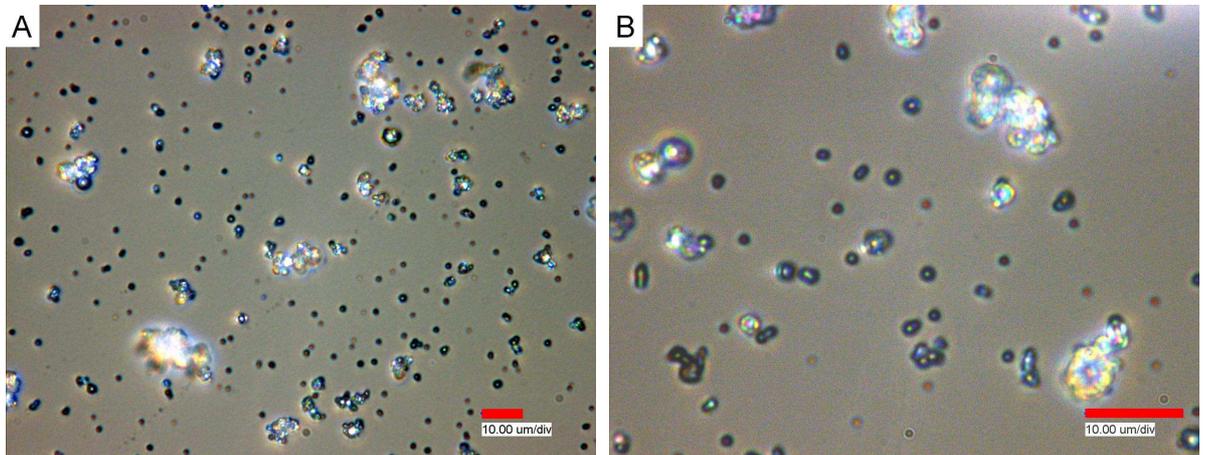


Abbildung 3-7: Digitalmikroskopische Aufnahmen von in Siliconöl hergestellten Partikeln MG160107c nach dem Ausfällen in Aceton bei 2000-facher (A) und 5000-facher (B) Vergrößerung. Die Länge des roten Balkens beträgt jeweils zehn Mikrometer.

Alternativ wurde die Verwendung von Natriumlaurylsulfat als Tensid in Verbindung mit Pflanzenöl untersucht. Das Tensid wurde sowohl dem Öl, als auch der Polymerlösung zugegeben. Die Probenzusammensetzung ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Probenherstellung unter Verwendung von Natriumlaurylsulfat.

Probe	Tensid	PVA-Lsg.	Menge Öl	Menge PVA-Lsg.
MG010207a	6,0 % in Öl	10 % 28-99 in H ₂ O	50 mL	5 mL
MG010207b	1,2 % in PVA-Lsg.	10 % 28-99 in H ₂ O	50 mL	5 mL

In beiden Fällen wurde die Dispersion durch Rühren für fünf Minuten mit dem UltraTurrax[®] bei 13500 U min⁻¹ hergestellt. Bei MG010207a zeigte sich direkt nach dem Abschalten des Rührers eine Phasenseparation mit Verklumpung des PVA. Im Falle von MG010207b konnte eine stabile Dispersion erhalten werden, die drei Zyklen aus einfrieren und auftauen unterzogen wurde. Nach dem Ausfällen in Aceton zeigte sich, dass Partikel erhalten werden konnten. Diese wiesen jedoch, wie in Abbildung 3-8 zu erkennen ist eine deutlich breitere Größenverteilung auf. Zudem waren die enthaltenen, im Vergleich zur Herstellungsvariante mit Siliconöl erhaltenen Agglomerate zahlreicher und größer. Des Weiteren ließen sie sich durch mechanisches Bearbeiten weniger aufbrechen.

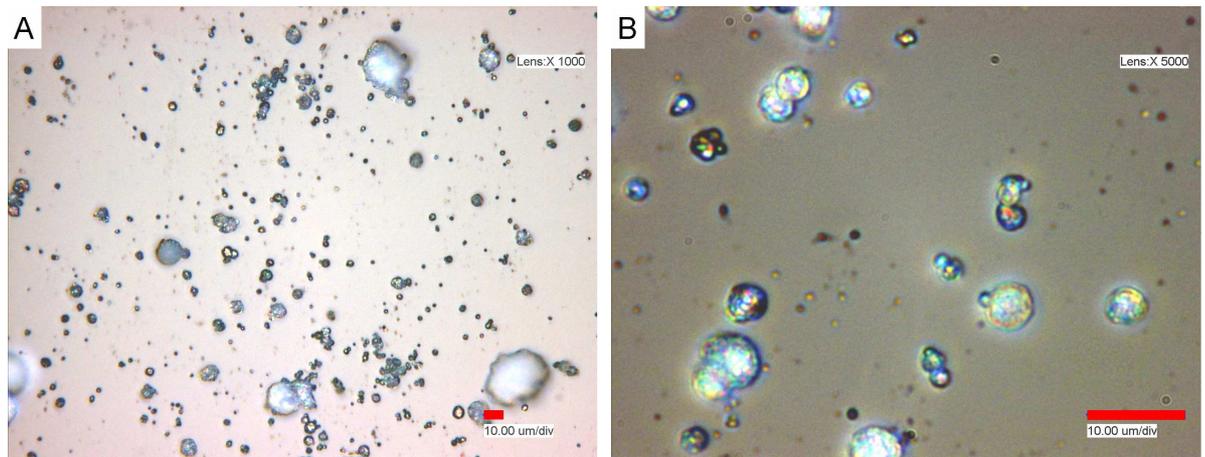


Abbildung 3-8: Digitalmikroskopische Aufnahmen von unter Verwendung von Natriumlaurylsulfat hergestellten Partikeln MG010207b nach dem Ausfällen in Aceton bei 1000-facher (A) und 5000-facher Vergrößerung (B). Die großen Agglomerate sind auf Aufnahme A gut zu erkennen.

Auf Grund dieser Erfahrungen und der zu erwartenden Schädigung der Bakterien durch das sich in der PVA-Lösung befindliche Tensid, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, dass es möglich war, Partikel durch direktes Ausfällen der Dispersion nach der Homogenisierung zu erhalten. Diese Partikel erwiesen sich ebenfalls als für die Immobilisierungsversuche geeignet. Für beide Arten von Partikeln wurden die Gelschmelztemperaturen nach der Falling-Ball-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine Stahlkugel von 3,2 mm Durchmesser auf den gequollenen Hydrogel-Partikeln platziert und das Gel langsam erhitzt. Eine Skala ermöglichte ein Ablesen der Höhe der Kugel. Beim Schmelzen des Gels, welches sich zuvor durch eine Klärung ankündigte, sank die Stahlkugel ins Gel ein. Die genaue Vorgehensweise kann dem experimentellen Teil entnommen werden. Es zeigte sich, dass der Gelschmelzpunkt der direkt ausgefällten Partikel mit 63 °C etwas niedriger war, als bei den anderen Partikeln. Hier lag er bei 69 °C.

3.3.4 Bakterien in PVA Hydrogelpartikeln

Erste Versuche mit PVA Hydrogelen hatten gezeigt, dass sowohl *M. luteus*, als auch *E. coli* erfolgreich in Hydrogele eingebracht werden konnten, die nach der Methode des wiederholten Einfrierens und Auftauens hergestellt worden waren. Der nächste Schritt war

die Untersuchung, ob die zuvor beschriebene Methode der Partikelherstellung ein Überleben der Bakterien zulässt. Es bestand die Möglichkeit, dass bei der Verwendung des UltraTurrax® zum einen die Scherbelastung bei Geschwindigkeiten von mehr als 10.000 U min⁻¹ und zum anderen die damit verbundene Wärmeentwicklung die Bakterien einer erheblichen Belastung aussetzten. Auch bedeuteten die Zyklen aus Einfrieren und Auftauen für die Bakterien eine nicht zu unterschätzende Belastung, da beispielsweise eine ähnliche Methode in der Biologie zum Aufbrechen von Bakterien verwendet wird. Das Ausfällen der gequollenen Partikel mit Aceton als einem Trocknungsmittel verursachte für die in den Partikeln immobilisierten Bakterien eine sehr schnelle und starke Veränderung der Wasseraktivität, was sie ebenfalls erheblichem Stress aussetzte.

Versuche wurden sowohl mit *M. luteus*, als auch den deutlich weniger widerstandsfähigen *E. coli* durchgeführt. In Tabelle 3-10 sind die Bedingungen zweier Versuche aufgelistet. Verwendet wurden sedimentierte Kulturen der beiden Bakterienarten. Die Kulturen wurden zuvor für 48 Stunden bei *M. luteus* und 24 h bei *E. coli* inkubiert. Zur Partikelherstellung wurde in beiden Fällen Siliconöl AP200 verwendet. Um die Möglichkeit einer Schädigung der Bakterien durch Wärmeentwicklung zu minimieren wurde das Öl vor der Verwendung mit Eiswasser auf 0 °C abgekühlt. Das Dispergierwerkzeug wurde jeweils zehn Minuten angewendet, wobei mit Eiswasser gekühlt wurde. Es wurden je drei Einfrier-Auftau-Zyklen angewendet. Ausgefällt wurde in der fünffachen Menge Aceton. Nach jedem Schritt wurden Proben auf Agarplatten gegeben und inkubiert, um auf das Vorhandensein lebender Bakterien zu prüfen.

Tabelle 3-10: Zusammensetzung und Rührgeschwindigkeiten der Proben zur Partikelherstellung.

Probe	Polymerlösung	Zugabe Sediment	PVA Gehalt	Rührgeschwindigkeit
MG240107b	15 % PVA 28-99 in H ₂ O	2,00 g	10 %	13.500 U min ⁻¹
MG310507	10 % PVA 56-98 in H ₂ O	0,55 g	8 %	10.000 U min ⁻¹

Sowohl bei *E. coli*, als auch bei *M. luteus* ist zu erkennen, dass die Bakterien die Prozedur überstanden. Dies ist vor allem im Falle von *E. coli* bemerkenswert, da eigentlich zu

erwarten war, dass diese die harschen Bedingungen der Partikelherstellung weit weniger gut überstehen würden, als *M. luteus*. Abbildung 3-9 zeigt die Ergebnisse der *M. luteus* Versuche. Auf Aufnahme A ist von zwei Proben induziertes Bakterienwachstum zu erkennen. In der Mitte wurde Bakterien enthaltende PVA-Lösung vor dem Dispergieren aufgebracht, im oberen Bereich Silikonöl mit den Partikel-Vorläufern nach dem Dispergieren. Aufnahme B zeigt das von trockenen Partikeln nach dem Ausfällen in Aceton induziertes Wachstum. Diese Aufnahme verdeutlicht zudem ein Problem, das bei Arbeiten mit Mikroorganismen auftritt, da es sich bei den weißen Flächen um Verunreinigungen durch Schimmelpilze handelt. Der Herstellungsprozess der Partikel setzte diese eine längere Zeit der Raumluft aus, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination relativ groß war.

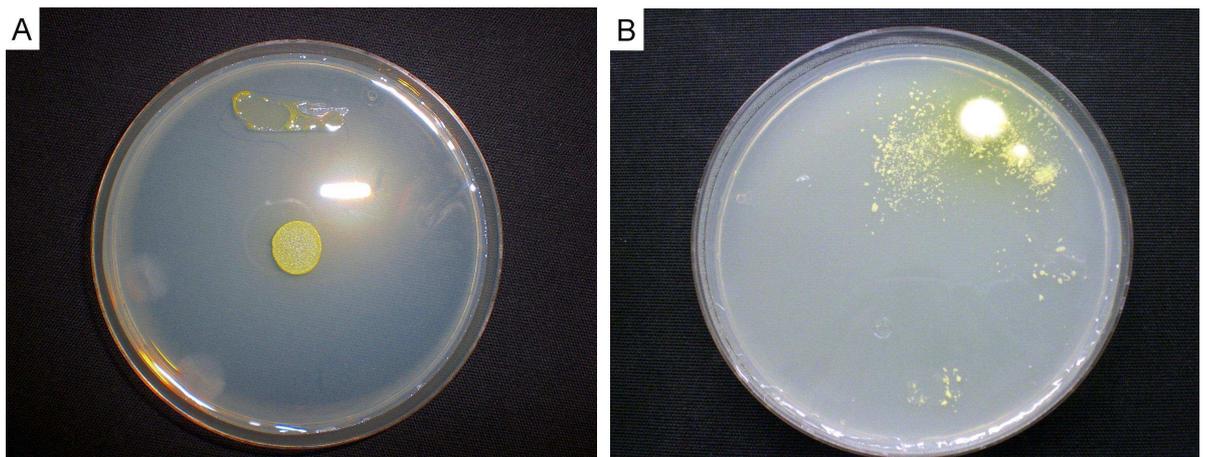


Abbildung 3-9: MG240107b. Auf Aufnahme A ist in der Mitte Bakterienwachstum, induziert durch die Bakterien enthaltende Polymerlösung und im oberen Bereich durch die Partikel-Vorläufer nach dem Dispergieren zu erkennen. Aufnahme B zeigt sowohl durch die trockenen Partikel induziertes Wachstum, als auch eine Verunreinigung durch Schimmelpilze.

Die Ergebnisse für *E. coli* werden in Abbildung 3-10 illustriert. Aufnahme A zeigt auf die Agarplatte aufgebrachtes Siliconöl mit den darin enthaltenen Partikel-Vorläufern nach dem Dispergieren. Die Bakterien bewirken die Bildung von Kolonien auf der Agarplatte. Von trockenen Partikeln nach den Einfrier-Auftau-Zyklen und dem Ausfällen in Aceton induziertes Wachstum ist auf Aufnahme B zu erkennen. In beiden Fällen konnte also das Vorhandensein lebender Bakterien nachgewiesen werden.

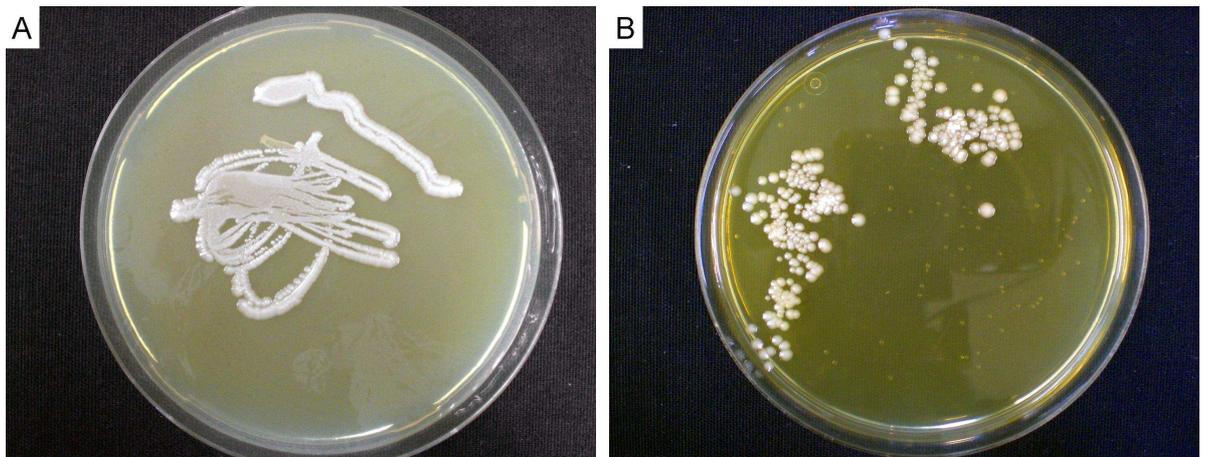


Abbildung 3-10: MG310507. Wachstum auf Aufnahme A, induziert durch Partikel-Vorläufer in Siliconöl nach dem Dispergieren, auf Aufnahme B durch trockene Partikel.

3.3.5 Lokalisierung der Bakterien in den Partikeln

Die Tatsache, dass die Bakterien das Ausfällen in Aceton überstehen war bereits ein starker Hinweis darauf, dass sich zumindest ein Teil der Bakterien im Inneren der PVA-Partikel und nicht auf deren Außenseite befand. Um diese Vermutung zu bestätigen und zu klären, ob sich die Bakterien vollständig innerhalb der Partikel befanden, wurde versucht diese direkt visuell nachzuweisen. Da sowohl *M. luteus*, als auch *E. coli* vor allem in den trockenen Partikeln nicht, oder nur schwer mit dem Mikroskop zu erkennen sind, wurde versucht die Bakterien anzufärben. Zunächst wurde *M. luteus* analog zuvor durchgeführter Färbungen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt.^[8] Bei dem verwendeten Farbstoff handelte es sich um Calcofluor M2R (Fluorescent Brightener 28), der für Lebendfärbungen geeignet ist. Die Bakterien waren also nach dem Anfärben noch am Leben. Dies sollte gewährleisten, dass die gefärbten Bakterien ähnliche Eigenschaften im Vergleich zu den ungefärbten aufwiesen. Ein Nachteil des verwendeten Farbstoffes ist allerdings sein schnelles Ausbleichen unter UV-Licht.

Zur Färbung der Bakterien wurde das gewaschene Sediment einer 48 Stunden Kultur von *M. luteus* mit einer Stammlösung Calcofluor M2R versetzt. Nach Lagerung bei vier Grad Celsius und wiederholtem Durchmischen, wurde sedimentiert und mit entionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde in Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert und die nun gefärbten Bakterien mit PVA-Lösung vermischt. Wie in Abbildung 3-11 zu erkennen ist, war bei den Bakterien nach der Färbung eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen. Durch

ausplattieren wurden lebende Bakterien festgestellt. Die Herstellung der Partikel erfolgte analog der zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Die Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3-11 wiedergegeben.

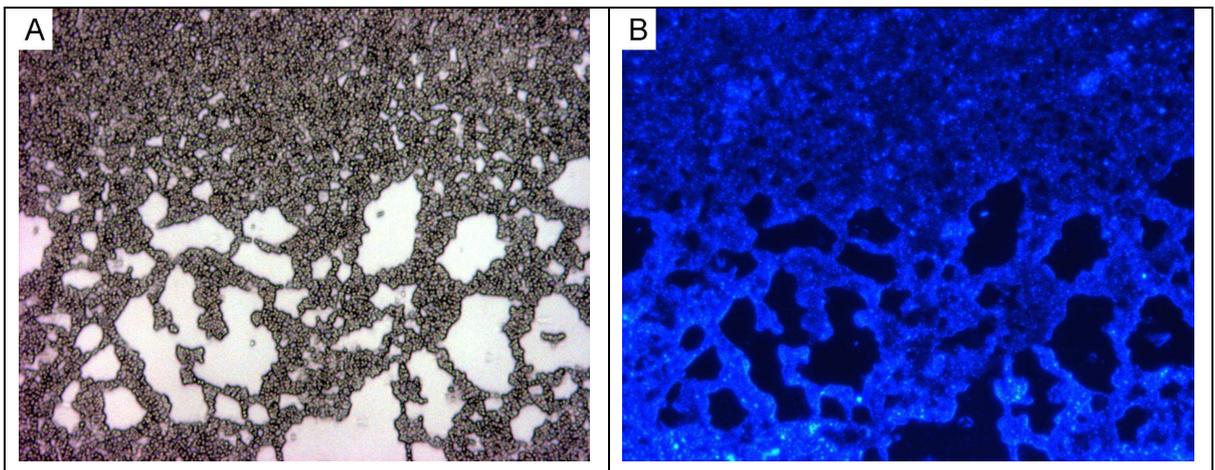


Abbildung 3-11: Calcofluor M2R gefärbte *M. luteus* unter Weißlicht (A) und UV-Licht (B).

Tabelle 3-11: Probenzusammensetzung zur Partikelherstellung.

Probe	Menge Kultur	Menge PVA-Lsg	PVA-Lsg.
MG020407	1,0 g	6 g	10 % PVA 28-99
MG110708a	0,5 g	3 g	10 % PVA 56-98

Nach dem Ausfällen in Aceton, wurden die Partikel mit Hilfe eines Mikroskops sowohl unter Weißlicht, als auch unter UV-Licht untersucht. Hierbei zeigte sich, dass nicht wie erwartet, die Bakterien in den Partikeln, sondern die gesamten Partikel unter UV-Licht blau leuchteten, was auf den Aufnahmen A und B in Abbildung 3-12 gut zu erkennen ist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Bakterien die Partikeln quasi von innen beleuchten und so selbst nicht zu erkennen sind. Auch ein Übergang des Farbstoffes von den Bakterien zum Polymeren ist nicht ausgeschlossen. Aufnahme D zeigt Bakterien in einem Film aus PVA. Hier erscheinen die zuvor angefärbten Bakterien als dunklere Bereiche in einer Matrix aus leuchtendem Polymer. Aufnahme C, die eine Überlagerung der Aufnahmen A und B darstellt, verdeutlicht allerdings, dass viele kleinere Partikel nicht leuchteten. Dies war ein Hinweis darauf, dass keine Bakterien in den Vorläufern dieser Partikel aufgrund ihrer zu geringen Größe vorhanden waren. Zugleich zeigt diese Beobachtung, dass ein Übergang des Farbstoffes auf das Polymer eher unwahrscheinlich

ist, da in diesem Falle auch bei den kleineren Partikeln eine UV-Aktivität erkennbar sein müsste. Ähnliche Strukturen, wie sie auf Aufnahme D von den Bakterien verursacht werden, lassen sich auch in einigen Partikeln auf Aufnahme B erkennen. Es konnte also an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass die immobilisierten Bakterien innerhalb der Partikel lokalisiert waren.

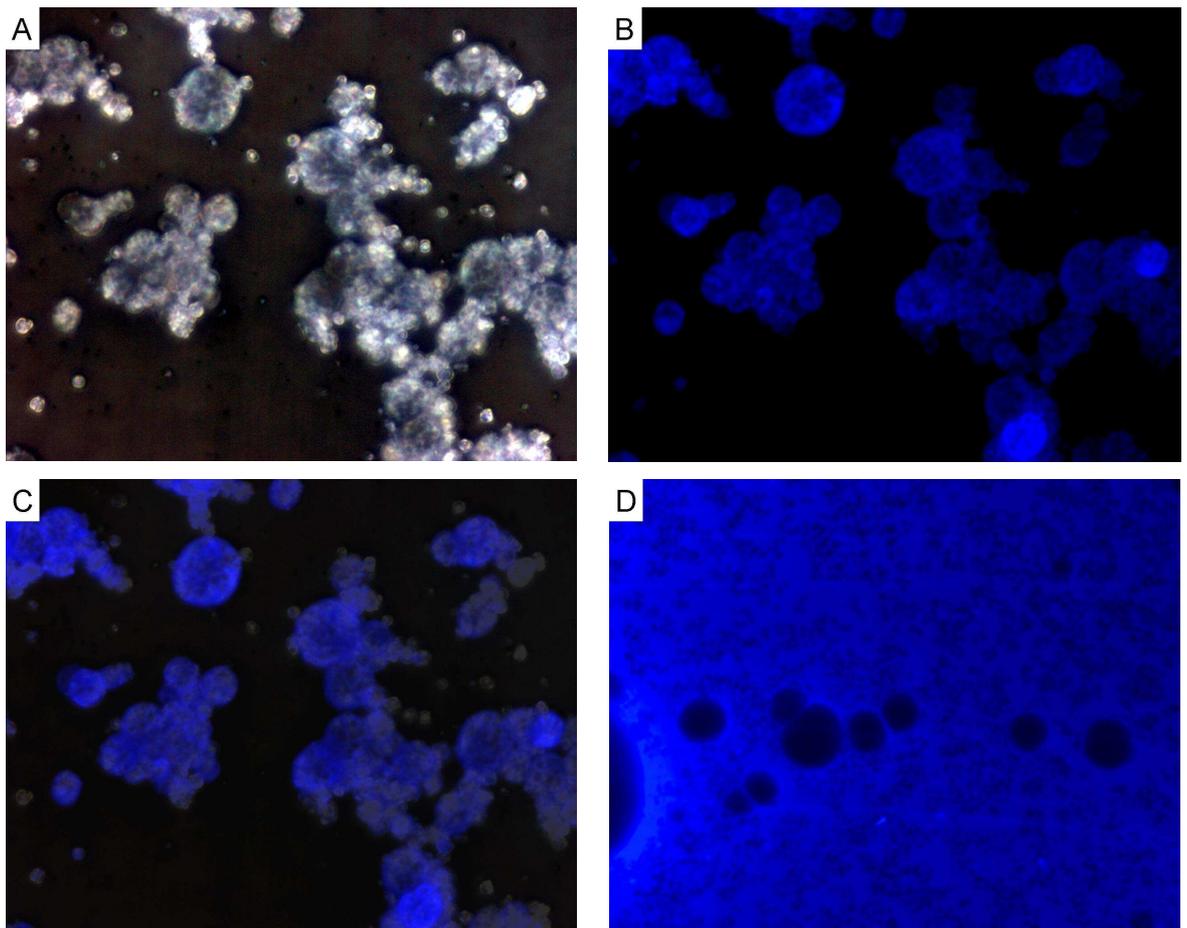


Abbildung 3-12: Mikroskopische Aufnahmen von Partikeln aus Probe MG110708a. Sichtbares Licht (A), Fluoreszenz(B) und Überlagerung von A und B (C). Aufnahme D zeigt Bakterien in PVA-Lösung.

Parallel zu den Färbeversuchen wurde ein Ansatz unternommen, die Bakterien innerhalb der Partikel rasterelektronenmikroskopisch unter Verwendung eines Cryo-Tisches nachzuweisen. Diese Anordnung ermöglicht es, wasserhaltige Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop zu untersuchen, ohne diese vorher trocknen zu müssen und so eventuell ihre Struktur zu zerstören. Hierzu wurden vorhandene Agglomerate der Partikel nach der Herstellung im Achatmörser möglichst reduziert und die Partikel durch Zugabe von entionisiertem Wasser zum Quellen gebracht. Die nun aufgequollenen Partikel wurden

auf einem speziellen Probenträger mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Einführen in das Gerät wurde mit einer Klinge die Oberfläche der gequollenen Partikel aufgebrochen, um das Innere einiger Partikel freizulegen. Nach der Beschichtung mit einer möglichst dünnen Platinschicht konnten die Proben untersucht werden.

Die Herstellung der verwendeten Partikel erfolgte auch hier wieder analog der zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 3-12 wiedergegeben.

Tabelle 3-12: Probenzusammensetzung.

Probe	Bakterium	Menge Kultur	Menge PVA-Lsg	PVA-Lsg.
MG090608a	<i>M. luteus</i>	1,0 g	6 g	10 % PVA 56-98
MG090608b	<i>E. coli</i>	1,0 g	6 g	10 % PVA 56-98

Aufnahmen von MG090608a sind in Abbildung 3-13 zu sehen. Aufnahme A zeigt einen Bereich, in welchem Strukturen zu erkennen sind, die offensichtlich gequollene und beim Bruch zerteilte Partikel repräsentieren. Aufnahme B ist eine Vergrößerung des auf Aufnahme A rot markierten Bereiches. Es dürfte sich hierbei um den Querschnitt durch ein Agglomerat einzelner Partikel handeln. Begreift man die deutlich helleren Linien als Trennlinien zwischen einzelnen Partikeln, so finden sich im Zentrum dieser Partikel oft Strukturen, deren Größe sich im Bereich des möglichen Durchmessers vom *M. luteus* befindet. Die körnige Struktur auf der Probenoberfläche rührt vom in der Probe enthaltenen Wasser her und wird von der verwendeten Untersuchungsmethode verursacht. Aufnahme C zeigt ein weiteres Agglomerat aus Partikeln bei einer leicht höheren Vergrößerung. Der rot markierte Bereich zeigt eine Struktur, die auf Aufnahme D vergrößert wiedergegeben ist und einen deutlichen Beweis für das Vorhandensein von Bakterien der Art *M. luteus* innerhalb der Partikel darstellt.

Wie schon zuvor erwähnt, ist es eine charakteristische Eigenschaft von *M. luteus* Bakterien, sich in Agglomeraten und insbesondere in Tetraden zusammenzulagern. Die auf Aufnahme D zu erkennende Struktur lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit als Querschnitt durch eine solche Tetrade interpretieren. Zum Vergleich kann Abbildung 3-14

herangezogen werden. Auf dieser lichtmikroskopischen Aufnahme von *M. luteus* sind drei tetradische Strukturen, wie sie von diesen Bakterien gebildet werden, deutlich zu erkennen.

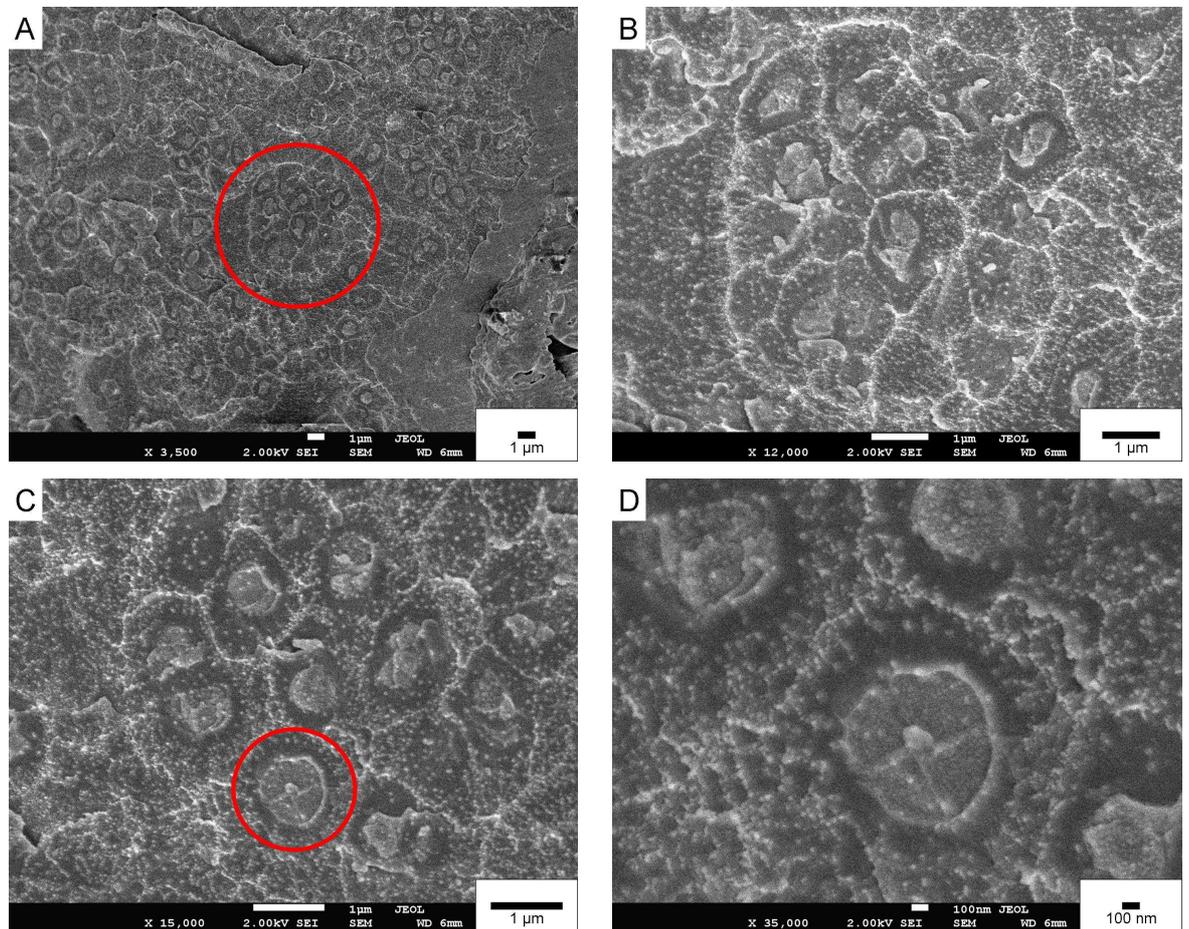


Abbildung 3-13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG090608a unter Verwendung eines Cryo-Tisches. Zu erkennen sind Agglomerate der Partikel und darin enthaltene, bakterienähnliche Strukturen.

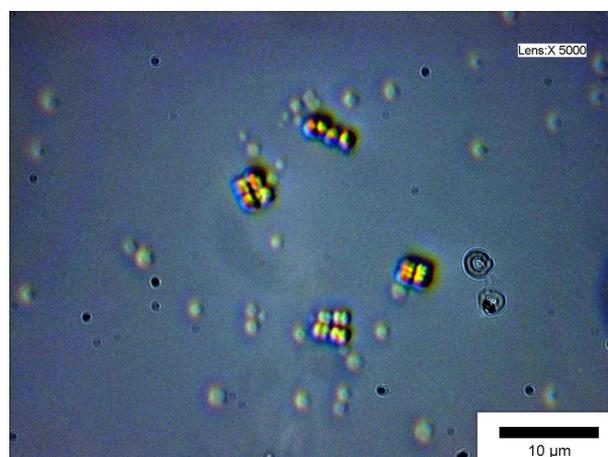


Abbildung 3-14: *M. luteus* Bakterien in Wasser. Drei tetradische Strukturen sind deutlich zu erkennen.

Die Untersuchung der Probe MG090608b ergab weniger eindeutige Ergebnisse. Strukturen, die *E. coli* zugeordnet werden konnten ließen sich nicht finden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass *E. coli* deutlich weniger stabil ist, als *M. luteus*. Beispielsweise ist der Innendruck dieser Bakterienart deutlich geringer, was dazu führen könnte, dass sich ein durch ein solches Bakterium verlaufender Bruch nicht von seiner Umgebung abhebt. Auffällig war, dass die bei Probe MG090608a beobachteten Strukturen nicht wieder auftraten. Dies ist als indirekter Beweis dafür zu werten, dass es sich bei den tetradischen Strukturen der Probe MG090608a um *M. luteus* handelte.

Zur Verifikation dieser Ergebnisse wurde eine weitere Färbemethode getestet. Es wurde in diesem Fall eine an die Gram-Färbung angelehnte Methode, angewandt. Diese ermöglicht eine gute Erkennbarkeit Gram-positiver Bakterien wie *M. luteus* unter Weißlicht. Ein gewisser Nachteil ist allerdings, dass die Bakterien im Gegensatz zur Färbung mit Calcofluor M2R abgetötet werden. Im Gegensatz zur klassischen Gram-Färbung wurden die Bakterien nicht nach dem Fixieren auf einer Glasoberfläche gefärbt. Zur Herstellung einer großen Menge gefärbter Bakterien wurden sedimentierte *M. luteus* dem Färbeprozess unterworfen.

In einem ersten Versuch wurde das Sediment einer 24 Stunden Kultur zunächst mit entionisiertem Wasser gewaschen. Als Reagenzien kamen eine Lösung von Kristallviolett in Aceton, sowie Iod und Kaliumiodid in Wasser zum Einsatz. Das Sediment wurde als erstes mit Kristallviolett Lösung versetzt und danach mit entionisiertem Wasser gewaschen. Nach Zugabe der Iod-Lösung wurde erneut mit entionisiertem Wasser gewaschen. Dabei zeigte sich, dass die Bakterien nach der Zugabe der Iod-Lösung deutlich agglomerierten und sich auch durch die Anwendung von Ultraschall nur schlecht resuspendieren ließen. Die nun deutlich violett gefärbten *M. luteus* (siehe Aufnahme A in Abbildung 3-15) wurden mit PVA-Lösung vermischt, welche nach der Einfrier/Auftau-Methode zu Partikeln verarbeitet wurden.

Es wurden während der Herstellung der Partikel Proben aus verschiedenen Stadien genommen und lichtmikroskopisch bzw. digitalmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse hiervon werden in Abbildung 3-16 veranschaulicht.

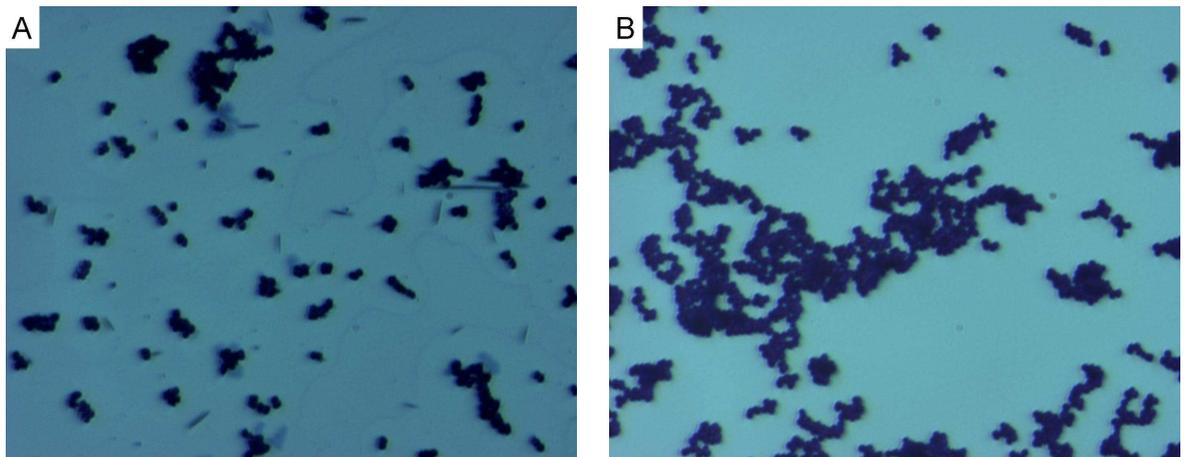


Abbildung 3-15: Mit Kristallviolett gefärbte *M. luteus*. Unter Verwendung von Iod (A) und ohne die Verwendung von Iod (B). Die Agglomerate auf Aufnahme A erwiesen sich als deutlich beständiger.

Auf Aufnahme A ist eine Probe zu sehen, die direkt nach dem Einsatz des Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeuges genommen wurde. Deutlich zu erkennen sind die Tropfen der PVA-Lösung im Siliconöl. Innerhalb der Tropfen sind die eingeschlossenen *M. luteus* als blaue Partikel gut zu erkennen. Auffallend ist auch die Tatsache, dass sich keine Bakterien außerhalb der Tropfen aus PVA-Lösung befinden. Es scheint also keinen Übergang von Bakterien aus der Lösung ins Siliconöl stattgefunden zu haben. Aufnahme B zeigt die Tropfen aus PVA-Lösung nach dem letzten Auftauen. Ihre Form hatte sich gegenüber Aufnahme A nicht verändert. Das Ergebnis des Ausfällens in Aceton ist auf Aufnahme C zu erkennen. Hierbei handelt es sich um nun trockene Partikel aus PVA. Auch hier sind die im Partikel eingeschlossenen Bakterien gut zu erkennen. Aufnahme C schließlich zeigt gequollene Partikel. Hierzu wurden die in Aceton ausgefällten Partikel für eine Stunde in Wasser gegeben und danach auf einen Objektträger überführt. Die in den Partikeln immobilisierten *M. luteus* sind auch hier wieder deutlich zu erkennen. Es zeigte sich auch, dass sich die PVA-Partikel in der Gegenwart von Wasser nicht auflösten und auch ihre Form nicht verloren ging. Neben den Partikeln, die Bakterien enthalten sind auf der Aufnahme auch leere Partikel zu sehen. Die typischen tetradischen Strukturen von *M. luteus* sind in einigen Fällen innerhalb der Partikel deutlich zu erkennen.

In einer Wiederholung des Experimentes wurde die zuvor beschriebene Färbemethode leicht variiert. Das Bakteriensediment wurde ebenfalls mit entionisiertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von Kristallviolett in Wasser versetzt. Nach kurzer

Wartezeit wurde so lange mit entionisiertem Wasser gewaschen, bis die Waschlösung nur noch leicht blau gefärbt war. Auf eine Verwendung von Iod wurde verzichtet. Es zeigte sich, dass das dunkel gefärbte Bakteriensediment deutlich weniger zur Agglomeration neigte und leicht resuspendiert werden konnte. Aufnahme B in Abbildung 3-15 zeigt die so gefärbten *M. luteus* unter dem optischen Mikroskop. Die gefärbten Bakterien wurden analog MG150708c in PVA-Partikel eingebracht und mittels optischer Mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die auf die modifizierte Weise gefärbten Bakterien ebenfalls deutlich erkennbar innerhalb der Partikel befanden. In Abbildung 3-17 sind zwei Aufnahmen dieser Partikel (MG150708f) in gequollenem Zustand zu sehen.

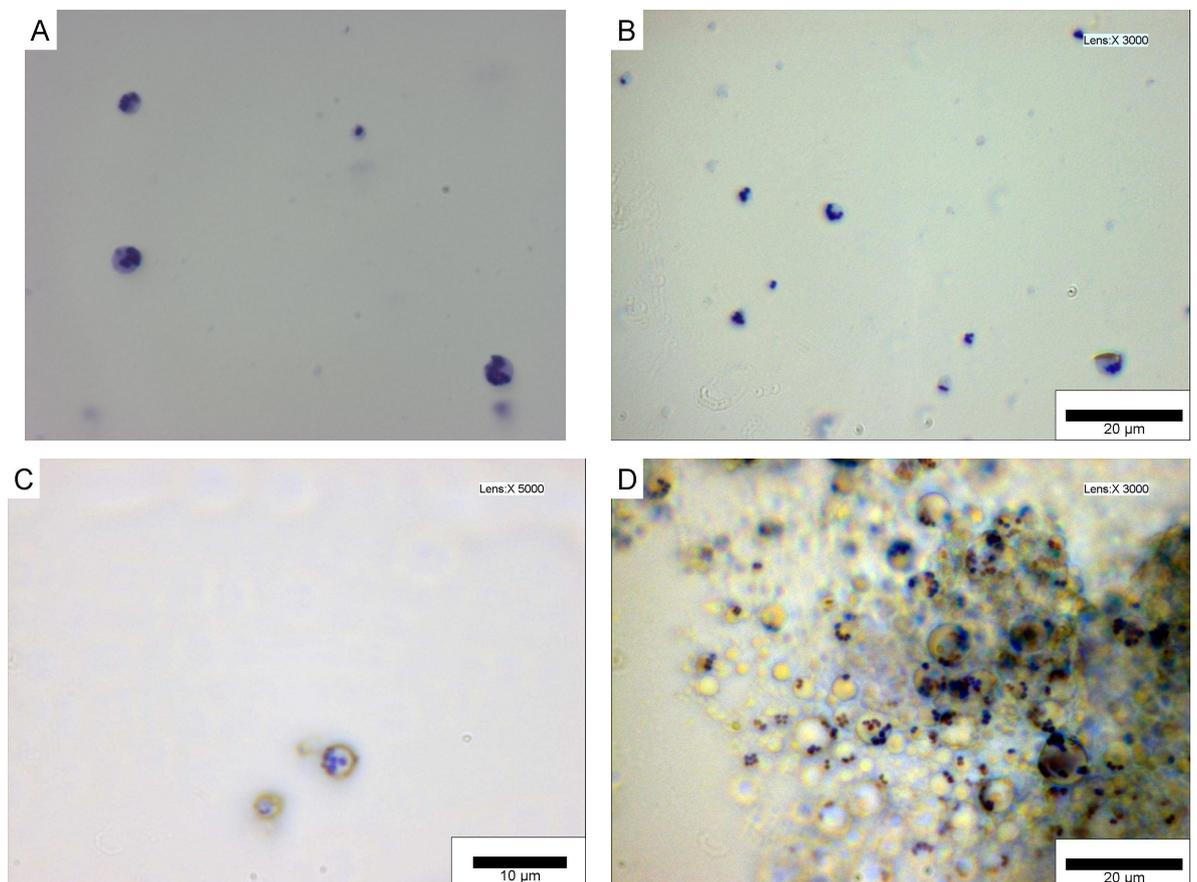


Abbildung 3-16: Mikroskopische (A) bzw. digitalmikroskopische Aufnahmen von MG150708c. A: PVA-Lösung in Siliconöl vor dem Einfrieren. B: PVA-Lösung in Siliconöl nach dem letzten Auftauen. C: Partikel nach dem Ausfällen in Aceton. D: Gequollene Partikel in Wasser.

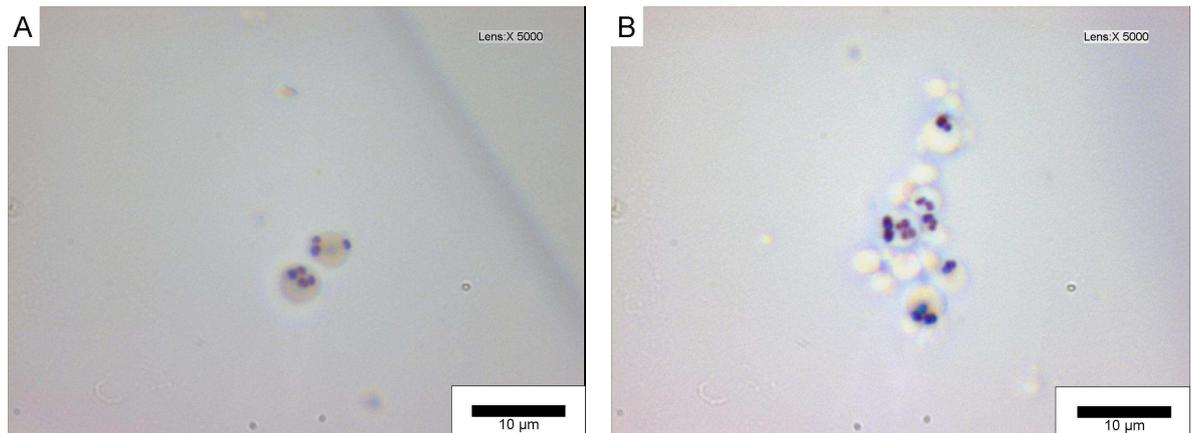


Abbildung 3-17: Digitalmikroskopische Aufnahmen gequollener Partikel von MG150708f.

3.3.6 Überlebensfähigkeit der Bakterien in den Partikeln

Um zu untersuchen, wie lange die in den Partikeln immobilisierten Bakterien lebensfähig, d.h. fähig zur Reproduktion bei Kontakt mit gelösten Nährstoffen waren, wurden Proben von *M. luteus* und *E. coli* bei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt. Kleine Mengen der Partikel wurden zu gegebenen Zeiten auf Agarplatten aufgebracht und nach Inkubation auf das Vorhandensein reproduktionsfähiger Bakterien und deren Identität untersucht. Die hierbei verwendeten Partikel entstammten jeweils einer Charge, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Um eine ausreichende Menge an Partikeln zu erhalten, wurden jeweils drei Ansätze vereinigt. Die Herstellungsbedingungen sind Tabelle 3-13 zu entnehmen. Es konnten nach drei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen 370 mg Partikel im Falle von *M. luteus* und 280 mg Partikel im Falle von *E. coli* erhalten werden. Die Partikel wurden in verschlossenen Röhrchen bei vier Grad Celsius, Raumtemperatur und 37 °C aufbewahrt. Röhrchen, die Partikel bei vier Grad Celsius enthielten, wurden vor dem Öffnen langsam auf Raumtemperatur erwärmt, um ein Einkondensieren von Wasser zu verhindern. Parallel hierzu wurden Proben verschiedenen Alters auf die Anwesenheit lebender Bakterien getestet. Diese Proben waren ausnahmslos bei vier Grad Celsius gelagert worden.

In den bei 37 °C gelagerten Proben konnten noch nach 78 Tagen Lagerungszeit lebende Bakterien beider Arten nachgewiesen werden. Die bei Raumtemperatur und vier Grad Celsius gelagerten Partikel wiesen auch nach 166 Tagen noch Aktivität auf. Die

Ergebnisse entsprechen an dieser Stelle den, aus den Versuchen zur Lebenserwartung von Bakterien in Vliesen aus wasserlöslichen Polymeren resultierenden Erwartungen. Auch hier war wieder deutlich zu erkennen, dass die immobilisierten Bakterien bei höheren Temperaturen eine geringere Lebensspanne hatten. Allerdings schienen die in den Partikeln immobilisierten Bakterien bei Raumtemperatur deutlich besser zu überleben, als in den PEO-Fasern. Hier überlebte *M. luteus* bei Raumtemperatur rund 310 Stunden, *E. coli* nur 170 Stunden. Wiederum war eine genaue Untersuchung der Lebendzellzahlen innerhalb der Partikel nicht möglich. Es konnte also nicht analog den Untersuchungen an den PEO-Fasern, die Entwicklung der Anzahl der lebenden Zellen gegen die Zeit bei den verschiedenen Temperaturen miteinander verglichen werden. Der Grund hierfür lag darin, dass es nicht möglich war, die Bakterien von den Partikeln zu trennen. Enthielt ein Partikel mehrere lebende Bakterien, so erschienen diese als eine Kolonie, weshalb eine Bestimmung der Lebendzellzahl durch Auszählung der Kolonien auf den Agarplatten nicht sinnvoll war.

Tabelle 3-13: Probenzusammensetzung der Überlebensfähigkeitstests.

Probe	Menge Sediment	Menge PVA-Lsg.	PVA-Lsg	Endgehalt PVA
MG240708a	1 g	6 g	10 % PVA 56-98	8,6 %
MG240708b	1 g	6 g	10 % PVA 56-98	8,6 %

Als mögliche alternative Methode zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen in den Partikeln wurde eine selektive Färbemethode verwendet. Diese, Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung genannte Methode, beruht auf einer unterschiedlichen Färbung lebender und toter Zellen. Bei der Verstoffwechselung einer Vorläuferverbindung in lebenden Zellen entsteht ein Farbstoff, der die Zellen grün fluoreszieren lässt. Als zweite Komponente kommt Propidiumiodid zum Einsatz, das jedoch intakte Membranen nicht durchdringen kann. Gelangt es durch eine beschädigte Membran in die Zelle, bindet es an die DNA bzw. RNA und verursacht dort rote Fluoreszenz. Bei diesem Test erscheinen lebende Bakterien also grün und tote Bakterien, die in der Regel eine beschädigte Membran aufweisen, rot. Es sollte also möglich sein, durch Auszählen der grünen und roten Bakterien in einem Partikel den Anteil an lebenden Zellen zu bestimmen. Die

Färbeversuche erfolgten an Partikeln verschiedener Chargen. Beispiele sind in Abbildung 3-18 wiedergegeben.

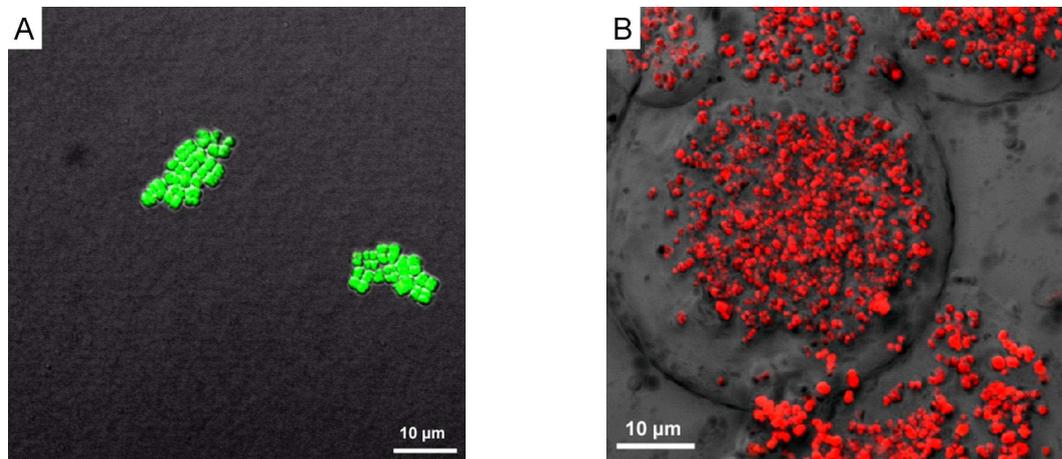


Abbildung 3-18: Aufnahmen von *M. luteus* nach Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung. Aufnahme A zeigt grün fluoreszierende Bakterien aus einer frischen Kultur, Aufnahme B rot fluoreszierende Bakterien in gequollenen Hydrogelpartikeln (Aufnahmen: Greenblatt).

Es wurden sowohl frisch kultivierte *M. luteus*, als auch solche in Partikeln angefärbt. Proben der Partikel wurden hierzu nach wenigen Minuten Kontakt zu einem Nährmedium dem Färbeprozess unterzogen. Auf Aufnahme A in Abbildung 3-18 sind grün fluoreszierende Bakterien aus der frischen Kultur abgebildet. Die grüne Farbe zeigt an, dass diese erwartungsgemäß alle noch am Leben waren. Aufnahme B zeigt Bakterien in einem Partikel, sie fluoreszieren rot, weisen also eine beschädigte Membran auf. Die Ränder des gequollenen Partikels sind deutlich zu erkennen. Die rote Fluoreszenz aller Bakterien in den Partikeln stand im Widerspruch zu den zuvor gemachten Beobachtungen, wonach die Partikel lebende Bakterien enthielten. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Membranen der Bakterien zwar beschädigt war, diese jedoch nicht tot waren. Bei längerem Kontakt mit Nährmedium konnten sie quasi wiederbelebt werden.

Dies würde zum einen die rote Fluoreszenz und zum anderen das von den Partikeln hervorgerufene heftige Wachstum von Bakterien auf den Agarplatten erklären. Aus diesem Grund war die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung ebenfalls nicht zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen in den PVA-Partikeln verwendbar.

Es kann allerdings gesagt werden, dass sich die Immobilisierung von Bakterien in PVA-Partikeln und PEO-Fasern in einigen Punkten unterscheidet. So zeigte sich, dass die Bakterien in den PEO-Fasern nur von wenig Polymer umgeben waren, während sie in den trockenen Partikeln von deutlich mehr Polymer umgeben sind, was sie besser gegen äußere Einflüsse abschirmen sollte. Der Hauptunterschied dürfte allerdings im Schritt des Ausfällens der feuchten Partikel-Vorläufer aus dem Siliconöl mittels Aceton darstellen. Hierbei wird den Partikeln und somit auch den darin eingeschlossenen Bakterien sehr schnell das Wasser entzogen. Dieser Effekt ist mit dem Gefriertrocknen zur Konservierung von Bakterien zu vergleichen. Eine schnelle Reduktion des Wassergehaltes der Bakterien ist bei der Herstellung der PEO-Fasern nicht zu erwarten.

Die Untersuchung der ausnahmslos bei vier Grad gelagerten Proben aus früheren Versuchen ergab, dass in allen noch reaktivierbare Bakterien zu finden waren. Eine Auflistung der untersuchten Proben, der darin immobilisierten Bakterienart und des Alters zum Testzeitpunkt findet sich in Tabelle 3-14. An Hand der Proben MG050607 und MG310507 kann gesagt werden, dass sowohl bei *M. luteus*, als auch bei *E. coli* nach wenigstens 14 Monaten Lagerung der Partikel bei vier Grad Celsius noch lebende Bakterien vorhanden waren. Da dies auch auf die sich in vorher gehenden Versuchen als fragil erwiesenen *E. coli* zutrifft, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest *M. luteus* in der Lage ist die 14 Monate deutlich zu übertreffen.

Tabelle 3-14: Auf lebende Bakterien untersuchte Proben vorangegangener Versuche.

Probe	Bakterienart	Lagerungsdauer	Kolonienbildung
MG 221007a	<i>M. luteus</i>	8 Monate	Ja
MG 260907a	<i>M. luteus</i>	8 Monate	Ja
MG 111207b	<i>M. luteus</i>	7 Monate	Ja
MG 050607	<i>M. luteus</i>	14 Monate	Ja
MG 150108a	<i>M. luteus</i>	7 Monate	Ja
MG 140108a	<i>M. luteus</i>	7 Monate	Ja
MG 111207a	<i>E. coli</i>	8 Monate	Ja
MG 150108b	<i>E. coli</i>	7 Monate	Ja
MG 310507	<i>E. coli</i>	14 Monate	Ja
MG 020408a	<i>E. coli</i>	4 Monate	Ja
MG 020408b	<i>M. luteus</i>	4 Monate	Ja
MG 220408b	<i>M. luteus</i>	4 Monate	Ja

Letztendlich stellen die an dieser Stelle beobachteten Lebensdauern eine deutliche Steigerung gegenüber denen in den PEO-Fasern dar.

3.3.7 Schutz gegenüber organischen Lösungsmitteln

Vor Allem im Hinblick auf ein späteres Verspinnen der Bakterien enthaltenden Partikel, stellte sich die Frage nach den Auswirkungen eines längeren Kontakts der Partikel mit organischen Lösungsmitteln. Da das Ausfällen der Partikel in Aceton erfolgte und die im Aceton ausgefallenen Partikel beim Abfiltrieren teilweise mehrere Stunden Kontakt zum Lösungsmittel hatten, war zu diesem Zeitpunkt eine gewisse Schutzwirkung bereits bekannt. Deshalb wurden in einem Vorversuch bereits vorhandene Partikel mit beiden Bakterienarten verschiedenen Lösungsmitteln ausgesetzt. Es handelte sich dabei um die Proben MG090108a und MG090108b. Bei den Lösungsmitteln handelte es sich um Chloroform, Dichlormethan, Ethanol, Tetrahydrofuran und Toluol. Hier konnten in allen Fällen noch nach 144 Stunden lebende Bakterien nachgewiesen werden

Um die Ergebnisse des Vorversuches zu bestätigen und auszubauen, wurden die Auswirkungen einiger Standard-Lösungsmittel für Polymere, die auch beim Elektrosponnen zum Einsatz kommen, erneut und über einen längeren Zeitraum untersucht. Es wurden ausschließlich Lösungsmittel verwendet, die Polyvinylalkohol nicht lösen. Der Grund war, dass davon ausgegangen wurde, dass Solventien, die in der Lage sind PVA zu quellen oder zu lösen, in die Partikel eindringen und dort die immobilisierten Bakterien schädigen können.

Die and dieser Stelle untersuchten Lösungsmittel waren Aceton, Ethanol, Tetrahydrofuran, Chloroform, Dichlormethan und Toluol. Es wurden vier verschiedene Arten von Partikeln auf ihre Schutzwirkung hin untersucht. Dabei handelte es sich um Partikel, die *M. luteus* bzw. *E. coli* enthielten und vor dem Ausfällen in Aceton drei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen durchlaufen hatten und um solche, die nach der Behandlung mit dem Dispergierwerkzeug direkt ausgefällt worden waren. Die Art der einzelnen Proben kann Tabelle 3-15 entnommen werden. Bei den Proben, die nach dem Dispergieren drei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen unterzogen wurden, war eine deutlich niedrigere Ausbeute im

Vergleich zum direkten Ausfällen zu erwarten. Aus diesem Grund wurden pro Probe zweimal 80 mL Siliconöl verwendet, im Gegensatz zu 80 mL bei den Proben mit dem direkten Ausfällen. Es wurde zu 80 mL Siliconöl jeweils ein Milliliter der Mischung aus PVA-Lösung und Bakteriensediment gegeben.

Tabelle 3-15: Probenzusammensetzung.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Ausfällen
MG090608a	<i>M. luteus</i>	6 g	1 g	nach drei Zyklen
MG090608b	<i>E. coli</i>	6 g	1 g	nach drei Zyklen
MG090608c	<i>E. coli</i>	6 g	1 g	direkt
MG090608d	<i>M. luteus</i>	6 g	1 g	direkt

Die so präparierten Partikel wurden in einem Achatmörser vorsichtig zerrieben, um größere Agglomerate aufzubrechen. Anschließend wurden Proben der Partikel in zuvor sterilisierten Gläsern mit jeweils so viel des betreffenden Lösungsmittels versetzt, dass ein Überstand von wenigstens einem Zentimeter erreicht wurde. Die Gläser wurden verschlossen und unter Ausschluss von Licht bei vier Grad Celsius aufbewahrt. Zu gegebenen Zeiten wurden Proben der Partikel entnommen und zur Überprüfung auf das Vorhandensein lebender Bakterien auf Agarplatten aufgebracht. Hierzu wurden die Probengläser dem Kühlschrank entnommen und langsam auf Raumtemperatur erwärmt, um bei ihrem Öffnen ein Einkondensieren von Wasser in die Lösungsmittel zu verhindern. Anschließend wurde die Probe aufgeschüttelt und mit einer sterilen Pipette ein Volumen der Flüssigkeit entnommen und auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Glasobjektträger mit der die Partikel tragenden Seite nach unten auf eine Agarplatte aufgebracht und leicht angedrückt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da davon ausgegangen werden konnte, dass eine Vermischung des in der Agarplatte gebundenen Wassers mit dem Lösungsmittel zu einem Absterben der Bakterien führen könnte. Nach 20 Minuten wurde der Objektträger wieder abgenommen, wobei die nun gequollenen Partikel auf der Agar-Oberfläche zurückblieben. Die Agarplatten wurden nun bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Vorhandensein lebender Bakterien in den Partikeln führte bei deren Vermehrung zu einem Kolonienwachstum um die einzelnen Partikel. Zum Ausschluss der Möglichkeit von Kontaminationen wurden die auf den

Agarplatten wachsenden Bakterien unter dem Lichtmikroskop untersucht. Die Resultate werden in Tabelle 3-16, Tabelle 3-17 und Tabelle 3-18 zusammengefasst.

Tabelle 3-16: Ergebnisse der Tests nach einer Stunde Lagerungszeit. Bakterienwachstum war bei allem Kombinationen vorhanden.

Lösungsmittel	MG090608a	MG090608b	MG090608c	MG090608d
Aceton	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Ethanol	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Tetrahydrofuran	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Chloroform	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Dichlormethan	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Toluol	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum

Tabelle 3-17: Ergebnisse der Tests nach 50 Stunden Lagerungszeit. Kein Bakterienwachstum bei MG090608b und nur sehr wenig bei MG090608c.

Lösungsmittel	MG090608a	MG090608b	MG090608c	MG090608d
Aceton	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Ethanol	Wachstum	kein Wachstum	wenig Wachstum	Wachstum
Tetrahydrofuran	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Chloroform	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Dichlormethan	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Toluol	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum

Tabelle 3-18: Ergebnisse der Tests nach 340 Stunden Lagerungszeit. Bakterienwachstum war bis auf die Kombination Ethanol und *E. coli* überall vorhanden.

Lösungsmittel	MG090608a	MG090608b	MG090608c	MG090608d
Aceton	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Ethanol	Wachstum	kein Wachstum	kein Wachstum	Wachstum
Tetrahydrofuran	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Chloroform	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Dichlormethan	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Toluol	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum

Die erste Probenentnahme erfolgte nach einer Stunde. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich bei allen Proben Bakterienwachstum auf den Agarplatten feststellen. Auch wenn aus im

vorigen Abschnitt genannten Gründen, keine Quantifizierung der pro Gewichtseinheit an Partikeln noch lebenden Bakterien erfolgen konnte, so erschien doch das Wachstum subjektiv gleich stark. Keines der untersuchten Lösungsmittel schien nach dieser Zeit die Bakterien in den Partikeln stärker zu schädigen als ein anderes.

Bei der nächsten Probennahme nach 22 Stunden, schienen die *E. coli* enthaltenden Partikel in Kombination mit Ethanol im Vergleich mit den anderen Kombinationen weniger Wachstum zu zeigen. Dies bestätigte sich nach 50 Stunden, hier konnten nur noch einzelne Kolonien beobachtet werden. Nach 100 Stunden war kein Wachstum, verursacht durch *E. coli* enthaltende Partikel aus Ethanol mehr nachzuweisen. Alle anderen Kombinationen zeigten auch nach einer Lagerungszeit von mehr als 340 Stunden noch Wachstum nach Inkubation auf Agarplatten. Hierbei wurde zudem keine signifikante Reduktion des Wachstums festgestellt.

Da ein Wasserzusatz zu einigen Lösungsmittel-Polymer Kombinationen die Spinneigenschaften verbessern kann und um die Auswirkungen von Lösungsmitteln mit hohem Wassergehalt zu untersuchen, wurden die Partikel auch in ein Gemisch aus 85 % Aceton und 15 % Wasser gegeben. Hier zeigte sich, dass die Bakterien in den Partikeln schon nach nur einer Stunde komplett abgestorben waren.

Aufgrund der Tatsache, dass die Kombination von *E. coli* und Ethanol im Vorversuch ein Überleben der immobilisierten Bakterien für mehr als 144 Stunden ermöglichte und das bei der Wiederholung des Versuches nur diese Kombination zum Absterben der Bakterien führte, wurde dieser Teil erneut durchgeführt. Verwendet wurden neu hergestellte Partikel, um auszuschließen, dass die zuvor verwendeten Partikel die Ursache für das Absterben der Bakterien waren. Es wurden die Proben MG090608b MG290708b und MG240908b Ethanol ausgesetzt und nach der oben beschriebenen Methode getestet. Die Probe MG090608b wurde zusätzlich noch sieben Tage über Phosphor(V)-oxid getrocknet. Im Falle von MG090608b waren nach 24 Stunden keine reproduktionsfähigen Bakterien mehr zu finden. Die Proben MG290708b und MG240908b zeigten nach 22 bzw. 26 Stunden nach der Inkubation noch relativ schwaches Wachstum. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Resultate des Vorversuches nicht korrekt waren.

Die Versuche bezüglich der Schutzigenschaften der Partikel gegenüber organischen Lösungsmitteln zeigten, dass in solchen Partikeln immobilisierte Bakterien über einen relativ großen Zeitraum diversen Lösungsmitteln ausgesetzt werden konnten. Dabei war auch nach einer Lagerungszeit von 340 Stunden kein signifikanter Rückgang der Zahl sich bildender Kolonien nach der Inkubation zu erkennen. Bei den hier durchgeführten Versuchen bildete die einzige Ausnahme die Kombination von *E. coli* und Ethanol. Hier war nach einer Kontaktzeit von ca. 20 Stunden bereits ein starker Rückgang der Anzahl der reproduktionsfähigen Bakterien zu erkennen. Nach einer Kontaktzeit von mehr als 50 Stunden waren in keinem Fall lebende *E. coli* zu finden. Es konnte jedoch gesagt werden, dass ein gemeinsames Verspinnen von Polymerlösungen mit Bakterien enthaltenden Partikeln möglich war. Dies galt auch für die Kombination *E. coli* und Ethanol, da die Experimente gezeigt hatten, dass eine Schutzwirkung im Bereich von Stunden vorhanden war, was als ausreichend erachtet wurde.

3.3.8 Versuche mit Partikeln aus Alginsäure

Parallel zu den Versuchen mit Hydrogelpartikeln aus Polyvinylalkohol wurden noch weitere Ansätze verfolgt, um Bakterien in wasserbeständigen, durch Elektrosponnen hergestellte Fasern zu immobilisieren.

Einer dieser Ansätze war die Herstellung einer alternativen Art von Hydrogelpartikeln aus Alginsäure. Bei Alginsäure handelt es sich um ein Polysaccharid, welches von Braunalgen und einigen Bakterienarten gebildet wird. In den Braunalgen bildet Alginsäure das strukturgebende Element der Zellewand. Sie besteht aus Einheiten von α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure, die 1,4-glycosidisch miteinander verbunden sind.^[135] Die beiden Uronsäuren bilden im Polysaccharid homopolymere Bereiche. Alginate gelieren in Anwesenheit von Calcium-Ionen, was durch Zugabe von EDTA wieder rückgängig gemacht werden kann. Dieses System bietet sich zur Immobilisierung von Zellen und eine eventuelle spätere Freisetzung an. Für die Versuche zur Partikelherstellung wurde das Natriumsalz der Alginsäure verwendet, dessen Struktur schematisch in Abbildung 3-19 gezeigt wird.

Natriumalginat kann durch Gelierung mit Calcium Ionen bei entsprechender Behandlung zu Mikropartikeln verarbeitet werden. Es wird in der Literatur beispielsweise zur Mikroverkapselung von DNA verwendet.^[136]

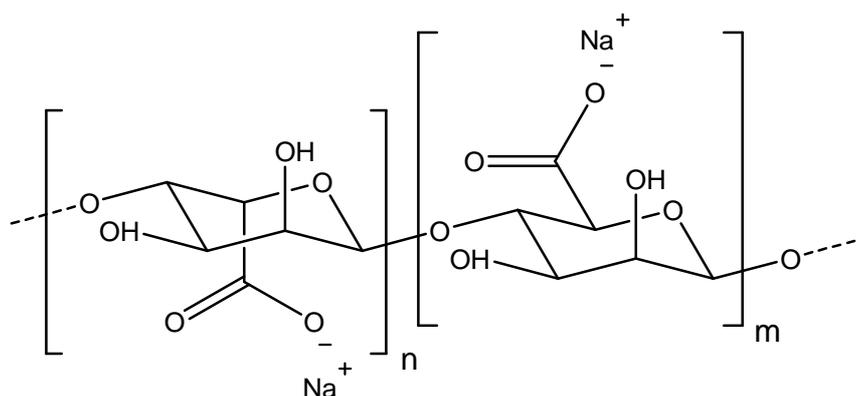


Abbildung 3-19: Natriumsalz der Alginsäure.

Es wurde an die in der Literatur beschriebene Methode angelehnt versucht, Mikrokapseln aus Natriumalginat zum späteren Verspinnen in Polymerlösungen herzustellen. Hierzu wurde eine wässrige Alginat-Lösung mit einem nichtionischen Tensid versetzt. Diese Mischung wurde in Rapsöl gegeben und mit dem Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeug homogenisiert. Nach wenigen Minuten wurde eine Calciumchlorid Lösung hinzu gegeben und für weitere zwei Minuten dispergiert. Die Zusammensetzung kann Tabelle 3-19 entnommen werden. Nach dem Zentrifugieren wurde die sich bildende ölige Phase verworfen und der Rückstand mit Aceton gewaschen um die Partikel zu trocknen und vom restlichen Öl zu befreien.

Tabelle 3-19: Probenzusammensetzung zur Herstellung von Alginat-Partikeln.

Probe	Alginat-Lösung	Tensid	Rapsöl	Gelierungsmittel
MG230607	17 mL 1,5 %	1,6 mL Tween 85	70 mL	17 mL 1,5 % CaCl ₂

Der resultierende Feststoff wurde mittels des Rasterelektronenmikroskops untersucht. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-20 abgebildet. Es zeigte sich, dass zwar Partikel erhalten werden konnten, diese jedoch keine sphärische Form aufwiesen. Die Struktur der Partikel, wie sie vor allem auf Aufnahme B zu erkennen ist lässt vermuten, dass die Strukturen auf den Aufnahmen aus Agglomeraten kleinerer Partikel bestehen. Zudem lässt die Umgebung

der Partikel auf Aufnahme A darauf schließen, dass nicht alle Rückstände des Öls bzw. des Tensides entfernt werden konnten. Die Tatsache, dass trotz des Einsatzes, einer im Verhältnis großen Menge Tensid, keine Partikel erhalten werden konnten, die sich zum Elektrosplennen einsetzen lassen und dass sich das Tensid bei der Partikel Herstellung in der wässrigen Phase befand, ließen die auf diese Weise hergestellten Alginat-Partikel für die Immobilisierung von Bakterien in Polymerfasern als wenig geeignet erscheinen.

Da mit den Partikeln aus PVA-Hydrogelen bereits ein viel versprechendes System vorhanden war, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Untersuchung des Alginat Systems verzichtet. Dennoch stellt die Herstellung Bakterien enthaltender Mikropartikel auf Basis von Alginaten zur Verarbeitung aus Polymerlösungen für zukünftige Arbeiten ein interessantes System dar. Es muss allerdings ein alternativer Weg der Herstellung gewählt werden. Insbesondere die Möglichkeit der erneuten und gezielten Freisetzung der Bakterien aus den Partikeln könnte von großem Interesse sein.

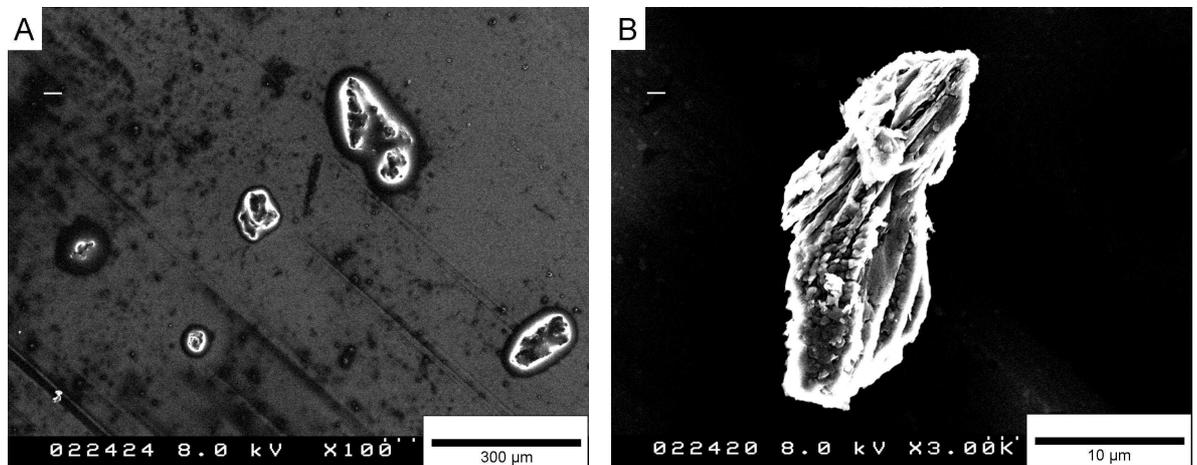


Abbildung 3-20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Alginat-Partikel. Aufnahme A wurde bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen, Aufnahme B bei 3.000-facher.

3.3.9 Versuche mit Partikeln aus Agarose

Ein anderer Ansatz war die Herstellung der die Bakterien enthaltenden Hydrogel-Partikel bzw. Sphären direkt in der später zu versplennenden Lösung. Dies hätte den Vorteil, dass im Vergleich zu den PVA-Hydrogel-Partikeln zwei zeitaufwändige und zum Teil auch problematische Schritte umgangen werden könnten. Zum einen entfielen die langwierige

Prozess des Ausfällens der Partikel und deren Befreiung vom anhaftenden Siliconöl, zum anderen müssten die Partikel nicht wieder resuspendiert werden, um sie in einer Spinnlösung homogen zu verteilen. Sowohl bei der Trennung der PVA-Partikel vom Siliconöl, als auch bei deren Resuspendierung wurde teilweise ein Ultraschallbad eingesetzt, was immobilisierten Bakterien eventuell Schaden zufügen könnte.

Als Material um die Hydrogel-Partikel bzw. Sphären in der zu verspinnenden Lösung zu erzeugen wurde Agarose ausgewählt. Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, welches aus D-Galactopyranose und 3,6-Anhydro-L-Galactopyranose aufgebaut ist. Die beiden Monomere sind glycosidisch miteinander verbunden. Agarose bildet den Hauptbestandteil des Agar und ist ein starker Gelbildner. Die Temperatur, bei der eine Lösung von Agarose in Wasser geliert liegt unter 40 °C. Es ist somit also möglich Bakterien in eine solche Lösung einzubringen und durch Abkühlen im Gel zu immobilisieren.

Es wurde zunächst untersucht, ob es prinzipiell möglich war, Bakterien enthaltende Hydrogel-Partikel direkt in einer Polymerlösung herzustellen, die später versponnen werden sollte. Hierzu wurde eine Lösung von Agarose in Wasser hergestellt und auf eine, für Bakterien tolerierbare Temperatur abgekühlt. Der Agarose-Lösung wurde Fluorescein-Natriumsalz zugesetzt, um sie unter dem Mikroskop von der Polymerlösung unterscheiden zu können. Die Lösung wurde in die ebenfalls temperierte Lösung eines Polymeren in einem nicht wasser-mischbaren Lösungsmittel eingebracht und jeweils eine Minute mit einem Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeug behandelt. In einem ersten Versuch wurde eine Lösung von Polyethylenoxid 900.000 in Chloroform betrachtet. Die Zusammensetzung der Proben kann Tabelle 3-20 entnommen werden.

Zunächst wurden höher konzentrierte PEO-Lösungen ohne die Zugabe eines Tensides bereitet. Die PEO-Lösungen wurden vor der Zugabe der Agarose-Lösung jeweils auf 45 °C vorgewärmt, um ein allzu schnelles Gelieren der Agarose zu verhindern. Es zeigte sich jedoch, dass nach der Zugabe der Agarose-Lösung und der Anwendung des Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeuges eine sehr viskose Mischung erhalten wurde. Auch konnte keine vollständige Durchmischung der Polymerlösung mit der Agarose-

Lösung erhalten werden. Dennoch war, wie in Abbildung 3-21 dargestellt, die Bildung von Agarose-Partikeln innerhalb der Polymerlösung zu erkennen. Allerdings wiesen die Agarose-Partikel eine breite Größenverteilung auf und waren zum Teil sehr groß.

Tabelle 3-20: Zusammensetzung der Proben zur Partikelherstellung in Polymerlösungen. Die Konzentration der verwendeten Agarose-Lösung betrug 2,5 %.

Probe	[PEO] / %	Tensid	Polymerlösung : Agarose-Lösung
MG190407a	4	-	13 : 1
MG190407b	2	-	13 : 1
MG200407	1	2 % Tween [®] 85	13 : 1
MG230407a	1	2 % Tween [®] 85	13 : 1
MG230407b	1	3 % Tween [®] 85	13 : 1
MG240407a	1	3 % Brij 35p	13 : 1
MG240407b	1	3 % Brij 78	13 : 1
MG240407c	1	3 % 1	13 : 1
MG240407d	1	4 % Tween [®] 85	13 : 1

1: Polyethylenglycol-block-Polypropylenglycol-block-Polyethylenglycol

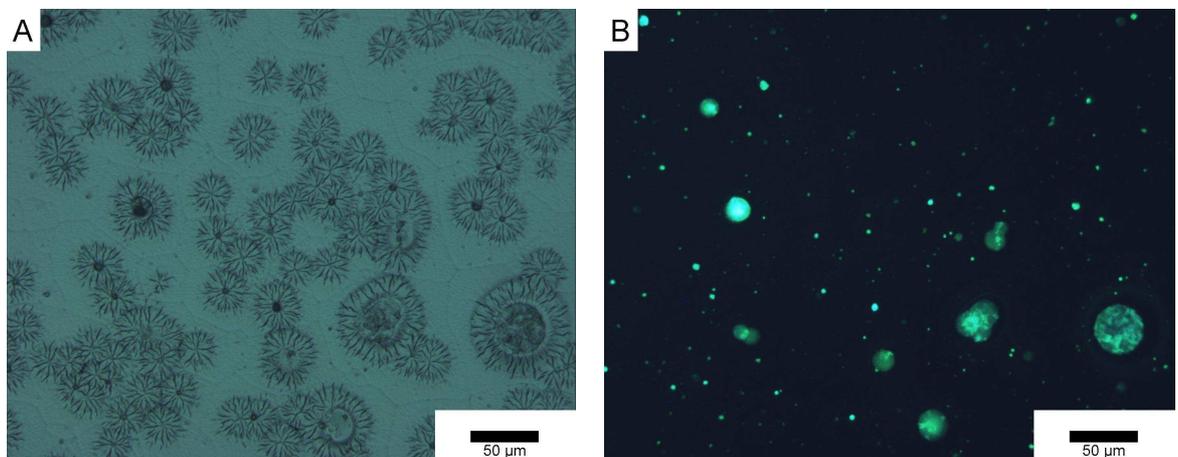


Abbildung 3-21: Agarose-Partikel in einem PEO-Film (MG190407) unter Weißlicht (A) und UV-Licht (B). Beide Aufnahmen zeigen die gleiche Stelle auf der Probe.

Bei einer PEO-Konzentration von 1 % konnte zwar eine Dispersion erzeugt werden, jedoch war diese nicht lange genug stabil, um versponnen werden zu können. Um dieses Problem zu minimieren, wurde die PEO-Konzentration weiter reduziert und verschiedene nicht ionische Tenside in hohen Konzentrationen eingesetzt. Hierbei handelte es sich um Tween[®] 85, Brij 35p, Brij 78 und Polyethylenglycol-block-Polypropylenglycol-block-

Polyethylenglycol. Es zeigte sich, dass sich die Dispersionen mit steigender Konzentration an Tensiden langsamer entmischten. Hierbei zeigte sich Tween[®] 85 den anderen Tensiden deutlich überlegen. Abbildung 3-22 zeigt Aufnahmen eines Films von MG200407 unter dem Mikroskop. Im Vergleich zur tensidlosen Probe MG190401 in Abbildung 3-21 waren die Partikel kleiner und schienen von ihrer Größe her zum Verspinnen geeignet. Auch war die Größenverteilung weniger breit.

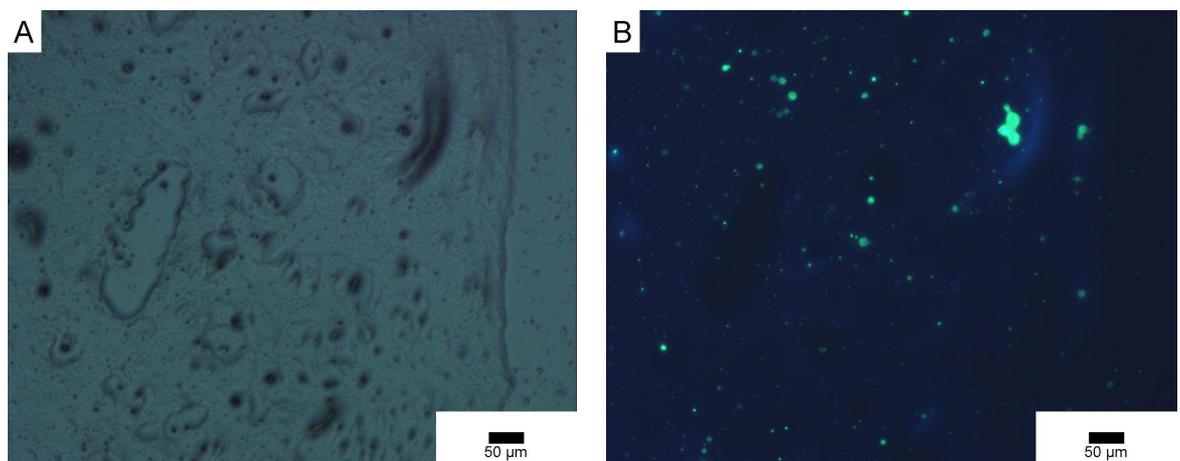


Abbildung 3-22: Agarose-Partikel in einem PEO-Film unter Verwendung eines Tensides (MG200407) unter Weißlicht (A) und UV-Licht (B). Beide Aufnahmen zeigen die gleiche Stelle auf der Probe. Die eingeschlossenen Partikel sind deutlich zu erkennen.

Die Tween[®] 85 enthaltenden Proben MG230407a, MG230407b und MG240407d waren über einen ausreichen langen Zeitraum stabil, um elektroverspinnen werden zu können. Allerdings lieferte nur die Probe mit dem geringsten Tensidgehalt Fasern. Die Ergebnisse werden in Abbildung 3-23 veranschaulicht. Die Aufnahmen A und B zeigen Fasern, die aus MG230407a erhalten wurden. Im Gegensatz zu Fasern aus reinem PEO 900.000 sind die erhaltenen deutlich weniger stabil und scheinen zudem ineinander verlaufen zu sein.

Nach den Versuchen mit dem problemlos zu verspinnenden PEO wurde versucht, das Konzept auf Polymere zu übertragen, die beim Verspinnen zu wasserbeständigen Fasern führen. Als Polymere wurden Polystyrol (PS) und Polycarbonat (PC) ausgewählt, da beide ebenfalls aus nicht wassermischbaren Lösungsmitteln, insbesondere Chloroform verspinnen werden können. Die Vorgehensweise orientierte sich an der zuvor beschriebenen. Die Zusammensetzung der Proben kann Tabelle 3-21 entnommen werden.

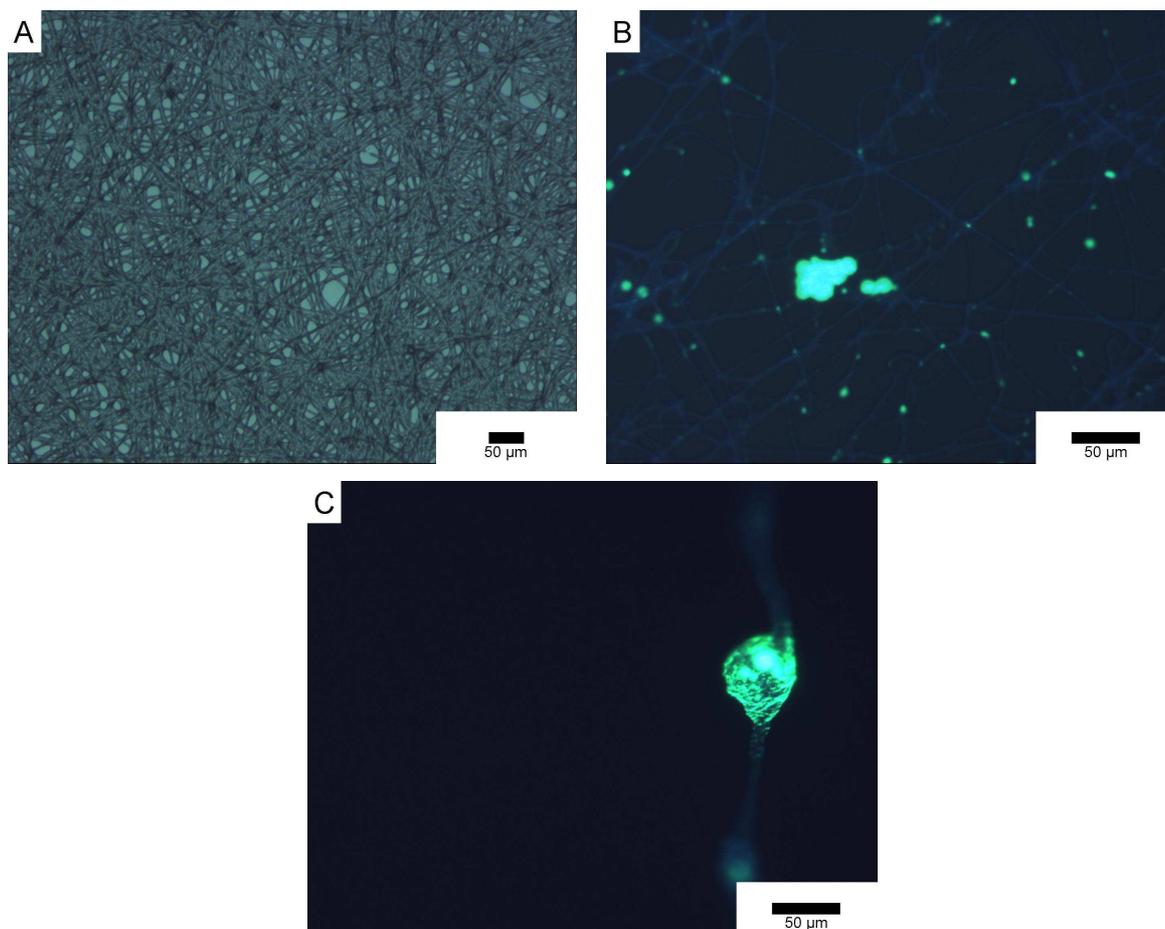


Abbildung 3-23: Fasern von MG230407a unter Weißlicht (A) und UV-Licht (B), sowie MG240407d unter UV-Licht. MG230407a enthält zwei Prozent Tween 85, MG240407d vier Prozent. Die Partikel auf Aufnahme B scheinen sich zumindest teilweise im Inneren der Fasern zu befinden.

Tabelle 3-21: Probenzusammensetzung. Die Konzentration der verwendeten, mit Fluorescein versetzten Agarose-Lösung betrug 2,5 %.

Probe	Polymer	Lösungsmittel	Tween® 85	Polymerlösung : Agarose-
				Lösung
MG260407	15 % PS	CHCl ₃	0 %	13 : 1
MG270407	15 % PS	CHCl ₃	1 %	13 : 1
MG110507a	15 % PC	CHCl ₃	0 %	27 : 1
MG110507b	10 % PC	CHCl ₃	1 %	13 : 1
MG140507a	15 % PC	CH ₂ Cl ₂	1 %	27 : 1

Die Chloroform enthaltenden Polymerlösungen wurden vor der Zugabe der Agarose-Lösung auf 45 °C temperiert. Bei der Dichlormethan enthaltenden Polycarbonat-Lösung wurde auf eine Temperatur knapp unterhalb des Siedepunktes von 40 °C temperiert. Die

Verarbeitung der Dichlormethan enthaltenden Lösung war jedoch durch die Temperatur in der Nähe des Siedepunktes allgemein problematischer. Nach der Zugabe der Agarose-Lösung unter Anwendung des Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeuges konnten in allen Fällen homogene Dispersionen erhalten werden, die erst nach mehreren Stunden Anzeichen einer Phasentrennung aufwiesen. Die Dispersionen waren also für eine Verarbeitung durch Elektrosinnen ausreichend lange stabil. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dispersionen, die Tensid enthielten und Dispersionen ohne Tensid festgestellt werden. Die Proben wurden direkt nach ihrer Herstellung versponnen und so auf ihre generelle Eignung zur Produktion von Fasern hin überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die Polystyrol-Lösungen deutlich bessere Ergebnisse lieferten als die Polycarbonat-Lösungen. Die besten Ergebnisse der fünf getesteten Lösungen zeigte die Polystyrol-Lösung mit einem Prozent Tween[®] 85 während aus den Polycarbonat-Lösungen nur vereinzelt kurze Fasersegmente erhalten werden konnten. Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche mit Polystyrol durchgeführt.

Erste Versuche des Verspinnens einer Polystyrol-basierten Lösung mit MG260407 unter den in Tabelle 3-22 aufgelisteten Bedingungen führten zur Erkenntnis, dass ein Einbringen von Agarose Partikeln in Fasern möglich ist. Dies wird durch Aufnahme A in Abbildung 3-24 verdeutlicht. Zwar sind die erhaltenen Faserdurchmesser im Verhältnis zu den in den Tropfen erkennbaren Agarose Partikeln zu gering um diese gut aufnehmen zu können, dennoch sind vereinzelt in die Faser inkorporierte Partikel zu erkennen. Zur Verdeutlichung dessen wurde vom entsprechenden Ausschnitt der Fasermatte eine Aufnahme unter UV Beleuchtung gemacht (Aufnahme B). Hier sind leuchtende Einschlüsse in den Fasern außerhalb der Tropfen zu erkennen. Dieser Hinweis auf ein mögliches Einbringen von Partikeln in Fasern nach dieser Methode konnte durch das Verspinnen von MG270407 bestätigt werden. Die Ergebnisse des Verspinnens dieser Probe sind in Abbildung 3-25 dargestellt. Die Verarbeitungsparameter können Tabelle 3-22 entnommen werden. Aufnahme A in Abbildung 3-25 zeigt eine digitalmikroskopische Aufnahme der erhaltenen Fasern. Der Durchmesser der Fasern lag bei $1,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Sie wiesen einen Durchmesser auf, der ausreichend groß war, um Bakterien in Partikeln darin einbringen zu können. Zur Bestätigung dessen konnte auch gewertet werden, dass die Fasern auf Aufnahme A Verdickungen aufweisen deren Form sich von der für Beads

üblichen unterschied. Auch wies MG270407 im Gegensatz zu MG260407 keine Tropfen der Spinnlösung auf der Fasermatte auf. Um die Lokalisierung der Agarose-Partikel zu untersuchen, wurden auch bei dieser Probe lichtmikroskopische Aufnahmen unter Weißlicht und UV-Licht gemacht. Es handelt sich hierbei um die Aufnahmen B und C in Abbildung 3-25. Auf Aufnahme B sind wie auf der digitalmikroskopischen Aufnahme A wieder Verdickungen innerhalb der einzelnen Fasern zu erkennen. Dass es sich hierbei um immobilisierte Agarose-Partikel handelte, konnte durch die unter UV-Licht aufgenommene Aufnahme B bestätigt werden. Vergleicht man die beiden Aufnahmen, die den gleichen Ausschnitt der Fasermatte zeigen, so erkennt man, dass es sich bei den Verdickungen um in die Faser inkorporierte Agarose-Partikel handelte. Die Durchmesser der eingeschlossenen Agarose-Partikel waren mit mehreren Mikrometern ebenfalls in einem für das Aufnehmen von Bakterien geeigneten Bereich.

Tabelle 3-22: Verarbeitungsbedingungen des Verspinnens. Die Temperatur betrug 25 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 50 %.

Probe	E / kV	Abstand / cm	Durchfluss / cm ³ h ⁻¹
MG260407	25	25	0,52
MG270407	25	25	0,52

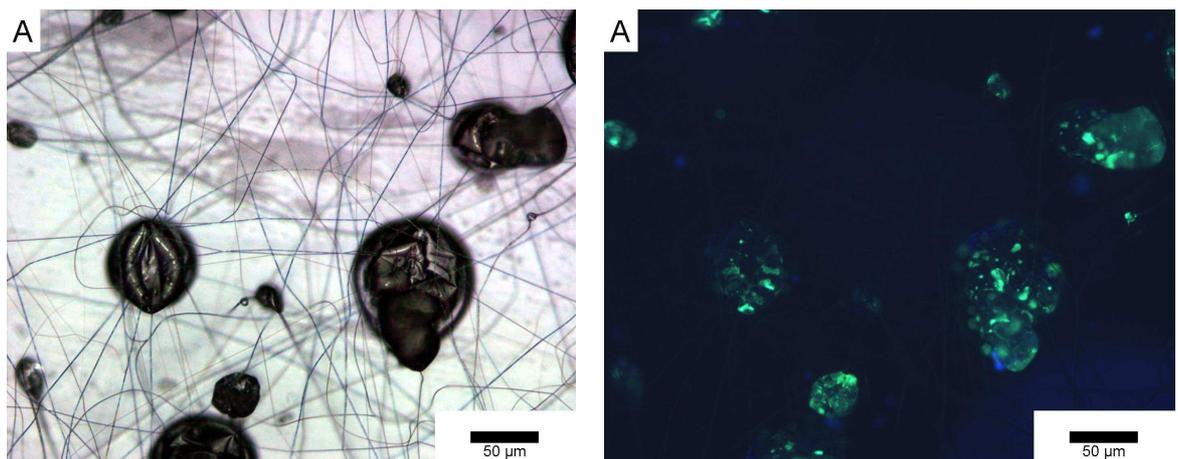


Abbildung 3-24: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Probe MG260407 unter Weißlicht (A) und UV Beleuchtung (B). Die leuchtenden Punkte in den Tropfen auf Aufnahme B verdeutlichen die Partikelbildung. Vereinzelt sind Partikel als leuchtende Verdickungen in den Fasern zu erkennen.

Nach diesen Versuchen wurde in einem nächsten Schritt das direkte Einbringen von Bakterien aus einer Polystyrol-basierten Spinnlösung in Fasern untersucht. Die Herstellung

der Spinnlösung erfolgte analog der zuvor angewandten Methode unter Verwendung des Tensides Tween[®] 85 in der Polymerlösung. Die Bakterien der Art *Micrococcus luteus* wurden vor der Herstellung der zu verspinnenden Dispersion in die Agarose-Lösung eingebracht. Verwendet wurde hierzu eine 48 Stunden Kultur in flüssigem Nährmedium, die zu gleichen Teilen mit zuvor auf 40 °C temperierter Agarose-Lösung versetzt wurde. Die genaue Probenzusammensetzung kann Tabelle 3-23 entnommen werden, die Bedingungen des Elekterspinnens Tabelle 3-24.

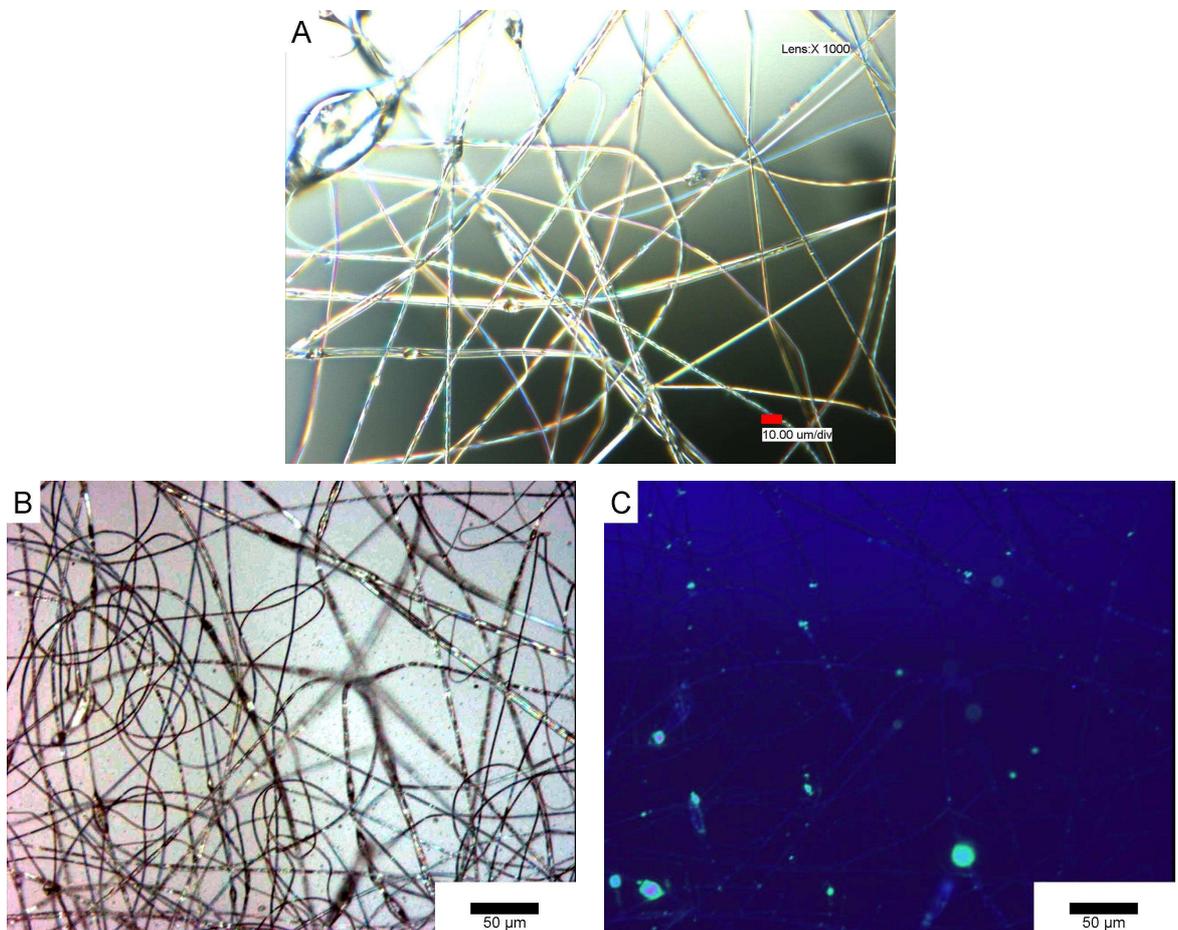


Abbildung 3-25: Aufnahmen der Probe MG270407. Digitalmikroskopisch (A), lichtmikroskopisch unter Weißlicht (B) und unter UV-Beleuchtung (C). Deutlich sind in den im Gegensatz zu MG260407 deutlich dickeren Fasern inkorporierte Partikel zu erkennen. Aufnahme C bestätigt, dass es sich bei den Verdickungen um Agarose-Partikel handelt.

Gesponnen wurde sowohl auf Aluminiumrahmen, als auch auf Objektträger. Die erhaltenen Fasern wurden licht- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-26 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3-23: Probenzusammensetzung. Die Konzentration der verwendeten, mit *M. luteus* versetzten Agarose-Lösung betrug 1,25 %.

Probe	Polymer	Lösungsmittel	Tween® 85	Polymerlösung : Agarose-Lösung
MG140507b	15 % PS	CHCl ₃	1 %	13 : 1

Tabelle 3-24: Bedingungen des Verspinnens von MG140507b. Die Temperatur betrug 24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 53 %.

Probe	E / kV	Abstand / cm	Durchfluss / cm ³ h ⁻¹
MG140507a	25	24	0,52

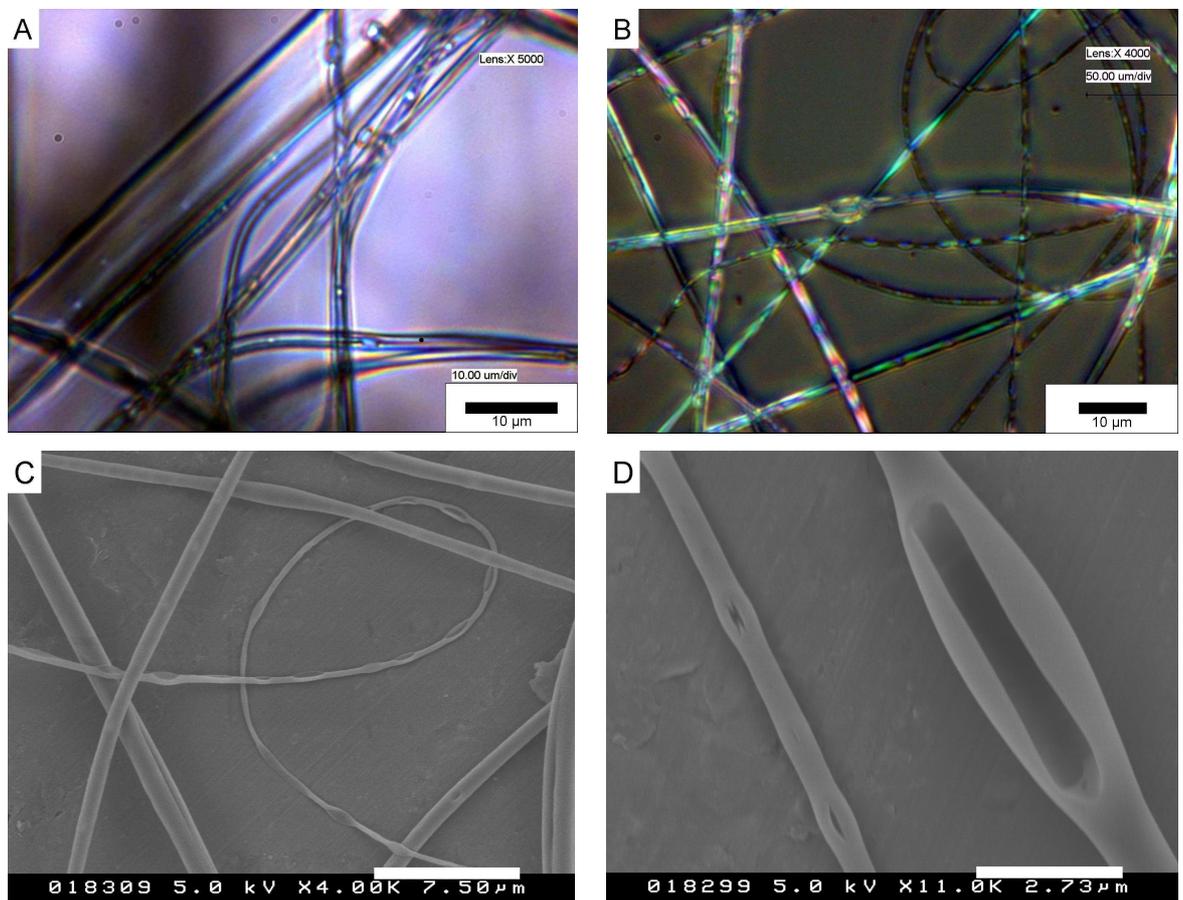


Abbildung 3-26: Digitalmikroskopische (A, B) und rasterelektronenmikroskopische (C, D) Aufnahmen von MG140507a. Auf den Aufnahmen A und B sind in den Fasern eingeschlossene Partikel als Verdickungen zu erkennen. Die Aufnahmen C und D zeigen Defektstellen in den Fasern, bedingt durch ein Austrocknen und Schrumpfen der Partikel im Vakuum.

Der Durchmesser der Fasern lag im Bereich von 1,7 µm. Auf den Aufnahmen A und B sind wie auf der Aufnahme A in Abbildung 3-25 von Probe MG270407 die Verdickungen zu erkennen, die die Agarose-Partikel enthielten. Auf den rasterelektronenmikroskopischen

Aufnahmen C und D sind diese Verdickungen nicht mehr zu erkennen. An ihrer Stelle zeigten die Fasern lochartige Defekte. Diese Defekte konnten auch in den Fasern der Probe MG270407 nachgewiesen werden, die keine Bakterien enthielt. Die Ursache hierfür ist in der Probenvorbereitung der Elektronenmikroskopie zu suchen. Die Proben wurden hierbei einem Vakuum ausgesetzt, das das in den Agarose-Partikeln enthaltene Wasser verdunsten ließ und so zu einer starken Schrumpfung der Partikel führte. Eine Separation der Agarose-Partikel von der Polymerlösung während des Verspinnens kann praktisch ausgeschlossen werden, da auch bei intensiver Suche bei mehreren Proben keine Partikel außerhalb der Fasern nachgewiesen werden konnten.

Um auf ein Vorhandensein lebender Bakterien hin zu testen, wurden Teile der Faservliese auf Agarplatten gegeben und über mehrere Tage inkubiert. Allerdings war bei keiner der Proben ein Wachstum von *M. luteus* festzustellen. Es muss jedoch festgestellt werden, dass dies kein eindeutiger Nachweis für das Absterben der Bakterien innerhalb der Fasern sein kann. Der Grund hierfür ist, dass die Partikel offensichtlich komplett durch eine Schicht aus Polystyrol verdeckt wurden. Würden Teile der Partikel an der Oberfläche der Fasern liegen, so hätte bei den Untersuchungen durch die lichtmikroskopischen Methoden ein Schrumpfen der Partikel durch Verdunstung von Wasser erkennbar sein müssen, was jedoch bei keiner der untersuchten Proben der Fall war. Aus dem Faktum, dass kein Wasser die Partikel verlassen kann, kann geschlossen werden, dass es der Nährstoffe enthaltenden Flüssigkeit aus den Agarplatten ebenfalls nicht möglich war zu den Bakterien in den Partikeln zu gelangen. Da sich die Bakterien jedoch in Abwesenheit von Nährstoffen nicht vermehren konnten, kam es zu keiner Freisetzung und somit auch zu keinem Wachstum auf der Agarplatte. Es stand jedoch leider keine geeignete Methode zur Verfügung, um die Partikel wieder von den Fasern zu trennen, ohne die Bakterien durch die Trennmethode abzutöten. Eine eindeutige Aussage bezüglich des Überlebens oder Absterbens von *M. luteus* in Fasern aus Polystyrol war somit nicht möglich.

Dieser Ansatz wurde im Laufe der weiteren Arbeiten aus mehreren Gründen nicht weiterverfolgt. Eine Ursache war die Verwendung von Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Chloroform, die sich zu geringen Anteilen mit Wasser mischen. So lösen sich beispielsweise 20 g Dichlormethan und 8,2 g Chloroform in einem Liter Wasser bei

20 °C.^[137] Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Konzentration dieser Lösungsmittel in den Agarose-Partikeln eine Konzentration erreicht, die von einigen Mikroorganismen nicht toleriert werden kann. Chloroform gilt als stark Wasser gefährdend, beispielsweise ist bereits eine Konzentration von 125 mg L⁻¹ für das Bakterium *Pseudomonas putida* tödlich, der EC₅₀ Wert für Belebtschlamm beträgt 1010 mg L⁻¹ in drei Stunden.^[138] Auch ist das System der PVA-Partikel im Gegensatz zu den Agarose-Partikeln für Lösungsmittel wie Ethanol geeignet, die beim Verspinnen von Polymeren mit einer gewissen Durchlässigkeit für Wasser zum Einsatz kommen, zu nennen wäre hier beispielsweise Polyvinylbutyral. Ein weiterer eventueller Nachteil ist die Tatsache, dass die in den Fasern inkorporierten Agarose-Partikel immer noch größere Mengen Wasser enthalten, was sich negativ auf die Lebenserwartung auswirken könnte. Der gewichtigste Grund für die Aufgabe dieses Systems und den vollständigen Wechsel zum PVA System war jedoch die festgestellte Schutzwirkung der PVA-Partikel gegen ein breites Spektrum an Lösungsmitteln wie sie beim Elektrosponnen zum Einsatz kommen.

Dennoch bietet auch dieses System einige interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen, da durch die Verwendung wasserhaltiger Partikel beispielsweise kein Quellen der Partikel in den Fasern stattfinden kann.

3.3.10 Immobilisierung von PVA Partikeln in Polymerfasern durch Elektrosponnen

Nachdem sich die Partikel aus PVA Hydrogelen als dazu geeignet erwiesen hatten, verschieden Arten von Bakterien darin einschließen und vor dem Einfluss diverser Lösungsmittel schützen zu können, wurden erste Versuche unternommen diese Partikel durch Elektrosponnen in wasserbeständige Fasern einzubringen.

In einem ersten Versuch wurde getestet, ob PVA-Hydrogel-Partikel in Fasern aus Polyvinylbutyral (PVB), einem Polymeren mit bekannten guten Spinneneigenschaften, eingebracht werden konnten. Die verwendeten Partikel enthielten zunächst noch keine Bakterien. Hierzu wurden zunächst die Partikel zum Aufbrechen größerer Agglomerate in einem Achatmörser vorbehandelt, anschließend mit Ethanol versetzt und mit Hilfe eines

Ultraschallbades aufgeschlämmt. Hiernach erfolgte die Zugabe des Polymeren. Die genaue Zusammensetzung der Probe kann Tabelle 3-25 entnommen werden. Die Verarbeitungsbedingungen finden sich in Tabelle 3-26.

Tabelle 3-25: Zusammensetzung der Probe MG080307 und erwarteter Anteil der PVA-Partikel in den fertigen Fasern.

Probe	Ethanol	PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an Faser
MG080307	0,85 g	0,15 g	18 mg	11 %

Tabelle 3-26: Verarbeitungsbedingungen der Probe MG080307. Die Temperatur betrug 20 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 55 %.

Probe	E / kV	Abstand / cm	Durchfluss / cm ³ h ⁻¹
MG080307	25	20	0,85

Gesponnen wurde auf Glasobjektträger für digitalmikroskopische und Aluminiumfolie für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-27 wiedergegeben. Untersuchungen der Fasern, die nach dem Verspinnen der Probe mittels eines Digitalmikroskopes durchgeführt wurden zeigten Fasern, die auffällige Strukturen aufwiesen, wie auf den Aufnahmen A und B zu erkennen. Die Fasern, deren Durchmesser im Bereich von 160 nm lag, wiesen Verdickungen in unregelmäßigen Abständen auf, die von runden Objekten im Faserinneren herzurühren schienen. Es war somit unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Verdickungen um Beads handelte, da diese eine als spindelförmig zu beschreibende Struktur aufweisen und in regelmäßigeren Abständen auftreten. Zum Vergleich ist in Abbildung 3-28 auf Aufnahme A eine Probe von elektroversponnenem Polyvinylchlorid wiedergegeben, die eine große Anzahl von Beads aufweist. Vergleicht man diese Aufnahme mit MG080307, so ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die Aufnahmen C und D mit dem Rasterelektronenmikroskop angefertigt. Auf Aufnahme C sind bei 2000-facher Vergrößerung, wie bei den optischen Aufnahmen die Verdickungen in den Fasern zu erkennen. Aufnahme D zeigt eine Vergrößerung einer solchen Verdickung. Um die Möglichkeit eines Vergleiches zu bieten, ist auf Aufnahme B in Abbildung 3-28 die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines PVA-Partikels nach dem Ausfällen in Aceton wiedergegeben. Die charakteristische Beschaffenheit der Oberfläche der PVA-

Partikel fand sich in der Verdickung in der Faser aus der Probe MG080307 wieder. Anhand der Mikroskopischen Aufnahmen konnte an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Verdickungen in den Fasern tatsächlich um die eingeschlossenen PVA-Partikel handelte. Ein weiterer Hinweis darauf war die Tatsache, dass bei keiner Probe Partikel außerhalb der Fasern festgestellt werden konnten.

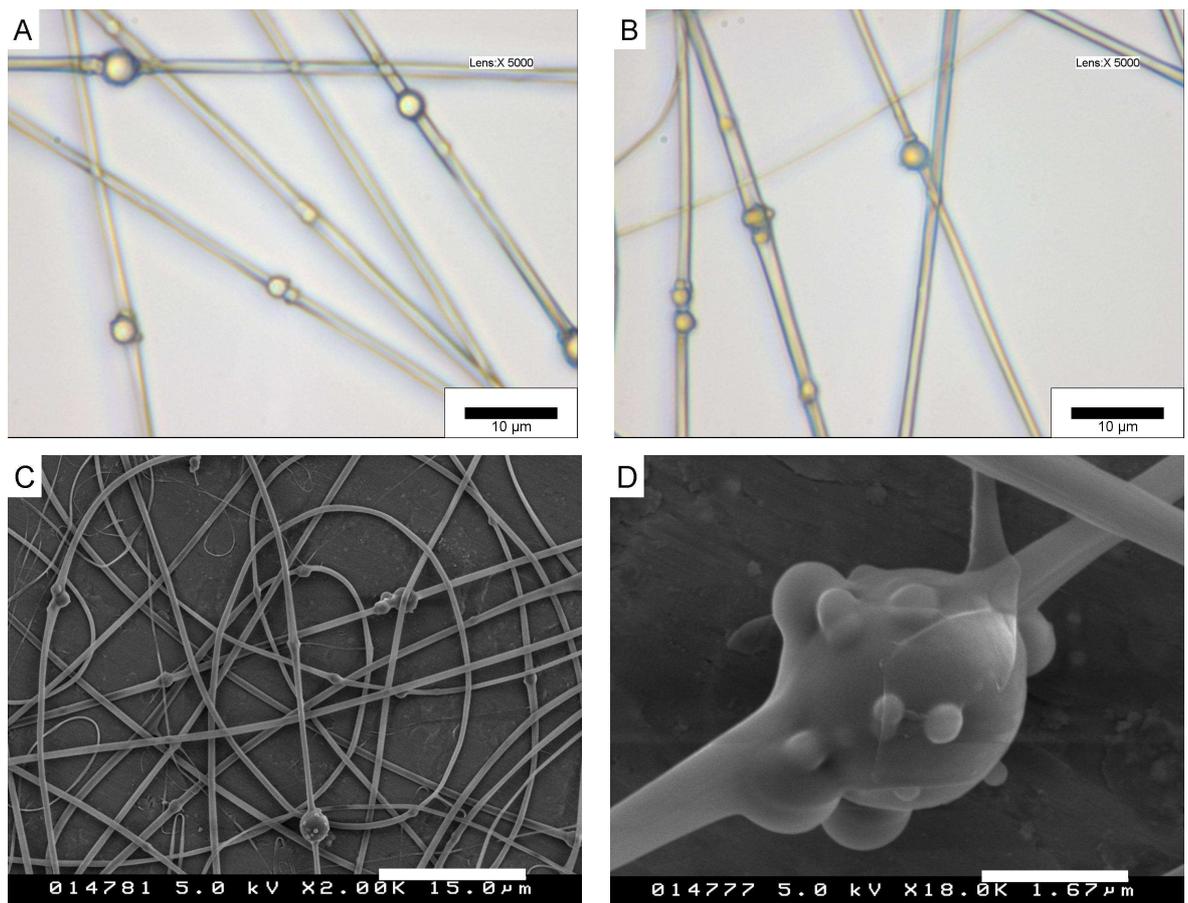


Abbildung 3-27: Digitalmikroskopische (A, B) und rasterelektronenmikroskopische (C, D) Aufnahmen von MG080307. Erkennbar sind die PVA-Partikel in den PVB-Fasern. Es wurden Partikel ohne Bakterien verwendet.

Neben den Untersuchungen mit Polyvinylbutyral wurde versucht die PVA-Partikel in weitere elektroverspinnbare Polymere einzubringen. Als ein biologisch abbaubares Polymer wurde Poly(ϵ -caprolacton) ausgewählt. Hierbei war die Vorgehensweise analog der beim PVB angewandten. Als Lösungsmittel kam ein Gemisch von Methanol mit Chloroform im Verhältnis 1:3 zum Einsatz. Nach dem AufschlÄmmen der Partikel im Lösungsmittelgemisch, wurde die Konzentration der Poly(ϵ -caprolacton)-Lösung auf eine Konzentration von 30 % eingestellt. Die Lösung wurde bei einer Spannung von 15 kV,

einem Elektrodenabstand von 17 cm und einer Durchflussrate von $4,33 \text{ mL h}^{-1}$ versponnen. Die Probe trägt die Bezeichnung MG100408a, das Ergebnis wird in Abbildung 3-29 veranschaulicht.

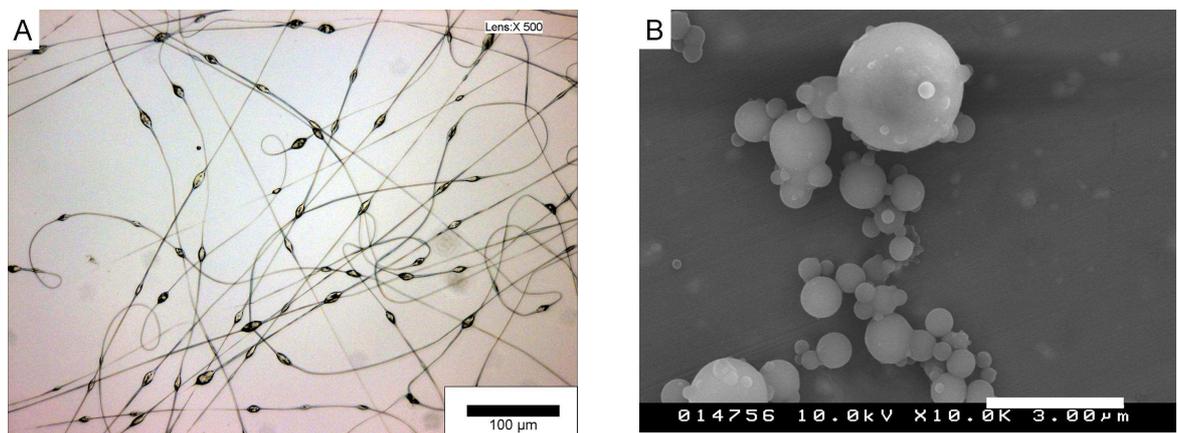


Abbildung 3-28: Digitalmikroskopische Aufnahme zur Verdeutlichung des typischen Aussehens von Beads am Beispiel von Polyvinylchlorid (A). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von PVA-Partikeln und ihrer charakteristischen Oberflächenstruktur (B).

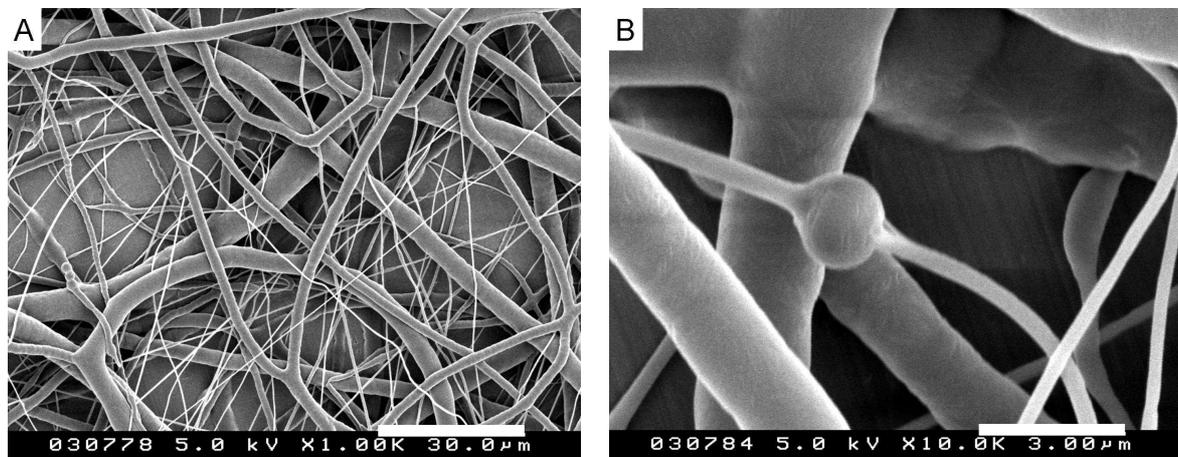


Abbildung 3-29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG100408a. Es handelt sich um PVA-Partikel in PCL-Fasern. Aufnahme A zeigt die Probe bei 1000-facher Vergrößerung, Aufnahme B eine Verdickung in einer Faser bei 10.000-facher Vergrößerung.

Wie auf Aufnahme A in Abbildung 3-29 zu erkennen ist, weisen die erhaltenen Fasern eine große Streuung ihres Durchmessers auf. Auch weist ein überwiegender Teil der Fasern einen Durchmesser im Bereich von mehreren Mikrometern auf, der somit relativ hoch ist. Aufnahme B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Fasermatte. Hier ist eine Verdickung zu erkennen, wie sie einem eingeschlossenen Partikel zugeordnet werden kann. Die Oberflächenstruktur der Verdickungen reflektiert zwar die Struktur der PVA-Partikel nicht

in gleichem Maße wie bei der Verarbeitung aus PVB, dennoch kann auch hier wieder davon ausgegangen werden, dass es sich um eingeschlossene Partikel handelt. Ein weiterer Hinweis ist auch hier wieder das Fehlen von Partikeln außerhalb der Fasern auf allen Aufnahmen.

Das Verspinnen mit Polyvinylbutyral und Poly(ϵ -caprolacton) lieferte starke Hinweise auf den Einschluss der PVA-Partikel innerhalb der Fasern. Dennoch handelte es sich hierbei nicht um einen eindeutigen Beweis. Um diesen zu erbringen wurden Versuche unternommen, die Partikel innerhalb der Fasern eindeutig sichtbar zu machen.

In einem ersten Ansatz wurde hierzu versucht das zur Partikelherstellung verwendete Polymere Polyvinylalkohol vor der Verarbeitung zu PVA-Partikeln mit einer Funktionalität auszustatten, die bei der Beleuchtung mit UV-Licht eine eindeutig vom Material der umgebenden Faser zu unterscheidende Fluoreszenz zeigte. Aus diesem Grund wurde der Polyvinylalkohol mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) modifiziert, um die erwähnte fluoreszierende Eigenschaft einzuführen. FITC emittiert bei Anregung grünes Licht (518 nm). Aus dem so modifizierten PVA wurden unter Anwendung der Methode des Einfrierens und Auftauens Partikel hergestellt und zusammen mit Poly(ϵ -caprolacton) versponnen. Die Probe trägt die Bezeichnung MG220408a. Die Verarbeitungsbedingungen wie Lösungsmittel, Konzentration der Lösung und Parameter des Spinnprozesses entsprachen den im Zusammenhang mit Probe MG100404a beschriebenen. Gesponnen wurde auf Objektträger aus Glas. Die erhaltenen Fasern wurden lichtmikroskopisch bei Beleuchtung mit Weißlicht und UV-Licht untersucht. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-30 zu finden. Aufnahme A zeigt Fasern bei Beleuchtung mit Weißlicht. Etwa in der Mitte des Bildes ist eine Verdickung zu erkennen, wie sie auch auf der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme B in Abbildung 3-29 zu sehen ist. Aufnahme B zeigt den gleichen Ausschnitt aus der Fasermatte, jedoch bei Beleuchtung mit UV-Licht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Verdickung eine starke Fluoreszenz zeigte, nicht jedoch die restliche Faser. Um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen wurde eine Überlagerung der beiden Bilder angefertigt, sie findet sich auf Aufnahme C. Es ist klar zu erkennen, dass es sich bei dem fluoreszierenden Punkt um die Verdickung in der Faser

handelte. Somit kann an dieser Stelle der Beweis als erbracht gesehen werden, dass die Partikel beim Verspinnen tatsächlich in den Fasern immobilisiert wurden.

In den zuvor durchgeführten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die hergestellten PVA-Partikel in der Lage waren Bakterien gegen eine Reihe von Lösungsmitteln zu schützen. Zudem waren die Partikel beim Verspinnen mit Polymerlösungen auf Basis eben dieser Lösungsmittel im Inneren der Fasern lokalisiert. Der nächste Schritt war nun das Verspinnen von Partikeln, die bei ihrer Herstellung mit Bakterien beladen worden waren, um auf diese Weise wasserbeständige Faservliese zu erhalten, die innerhalb der Fasern lebende Bakterien enthielten.

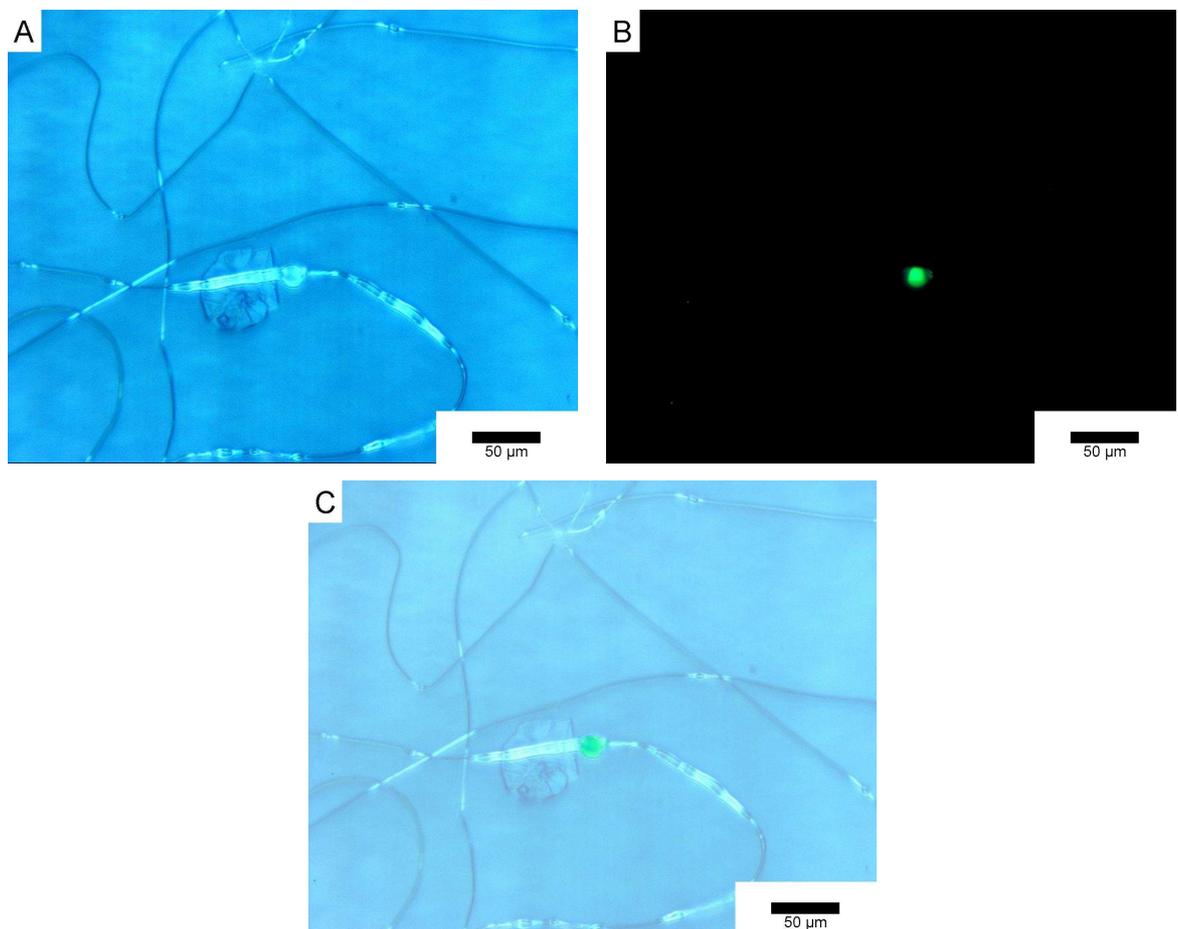


Abbildung 3-30: Lichtmikroskopische Aufnahmen von PVA-Partikeln aus mit FITC modifiziertem PVA in PCL-Fasern (MG220408a). Beleuchtung mit Weißlicht (A), UV-Licht (B) und eine Überlagerung der beiden Aufnahmen (C).

Es wurde zunächst der Versuch unternommen, *M. luteus* beladene PVA-Partikel in Fasern aus Polyvinylbutyral zu immobilisieren. Die verwendeten PVA-Partikel der Probe

MG011007a wurden nach der Methode des wiederholten Einfrierens und Auftauens hergestellt. Die Probenzusammensetzung kann Tabelle 3-27 entnommen werden. Die Partikel wurden direkt nach dem Ausfällen in Aceton und anschließender Trocknung an der Luft zur Präparation der Spinnlösung verwendet. Diese erfolgte durch Aufschlännen der Partikel im Lösungsmittel Ethanol unter Anwendung von Ultraschall und nachfolgender Zugabe einer konzentrierten Lösung von Polyvinylbutyral in Ethanol. Die Zusammensetzung der Probe MG011007b ist in Tabelle 3-28 wiedergegeben. Gesponnen wurde auf Aluminiumfolie und auf Aluminiumrahmen. Die Spannung lag hierbei bei 25 kV bei einem Elektrodenabstand von 20 cm. Die Durchflussrate lag im Falle der Aluminiumrahmen bei 0,34 mL h⁻¹ und beim Spinnen auf die Aluminiumfolie bei 0,85 mL h⁻¹.

Tabelle 3-27: Probenzusammensetzung der Partikel. Verwendet wurde eine PVA 56-98 Lösung mit 10 %.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Dispergieren
MG011007a	<i>M. luteus</i>	3,8 g	0,5 g	10.000 U min ⁻¹ für 15 min

Tabelle 3-28: Probenzusammensetzung der Spinnlösung.

Probe	Ethanol	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an Faser
MG011007b	0,33 g	0,67 g	30 mg	22 %

Unmittelbar nach der Herstellung wurden Proben der erhaltenen Faservliese auf Nährmedium in Form von Agarplatten aufgebracht und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die auf die Aluminiumrahmen aufgesponnenen und somit von beiden Seiten frei zugänglichen Faservliese wurden in flüssiges Nährmedium in 100 mL Schraubdeckelgläsern gegeben und ebenfalls bei 37 °C nicht schüttelnd inkubiert. Nach zwei Tagen war auf den Agarplatten ein deutliches Wachstum von Bakterien zu erkennen. Das flüssige Nährmedium zeigte Bakterienwachstum durch eine starke Trübung der Lösung an. In Abbildung 3-31 ist eine solche Agarplatte abgebildet.

Die Bakterien konnten durch Farbe, Geruch und Aussehen unter dem Mikroskop als *M. luteus* identifiziert werden.

Die Tatsache, dass die Fasermatte in der Lage war, auf der Agarplatte Wachstum von *M. luteus* hervorzurufen zeigte, dass die Bakterien den Prozess der Herstellung des Faservlieses überlebt hatten. Betrachtet man die Oberfläche der Agarplatte in Abbildung 3-31 an der Stelle, an der eine Probe des Vlieses nach der Inkubation abgenommen wurde, so erkennt man, dass das Wachstum der Bakterien unterhalb des Vlieses recht gleichmäßig ist. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass das Bakterienwachstum an vielen Stellen gleichzeitig induziert wurde, was bedeutet, dass viele Bakterien überlebt hatten. Gleichzeitig bedeutet das starke Wachstum jedoch auch, dass die Bakterien anscheinend relativ leicht aus den Fasern austreten konnten. Aus diesem Grund wurde die von der Agarplatte abgenommene Probe rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

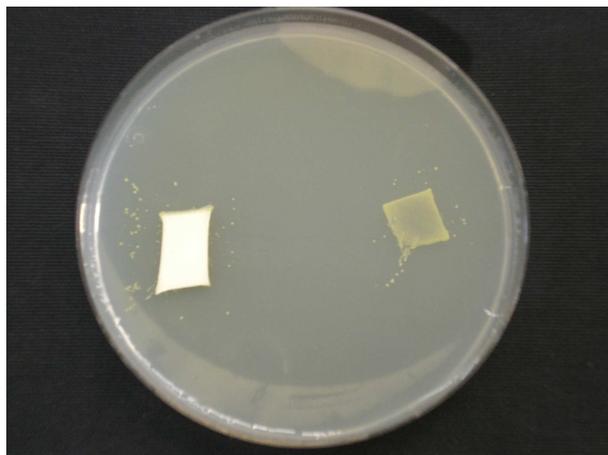


Abbildung 3-31: Auf Agarplatte aufgebrachte Proben von MG011007b nach der Inkubation. Die rechte Probe wurde von der Agar-Oberfläche abgenommen. Wachstum von *M. luteus* ist deutlich zu erkennen.

Aufnahme A in Abbildung 3-32 zeigt einen Ausschnitt des auf Aluminiumfolie gesponnenen Faservlieses vom MG011007b direkt nach der Herstellung. Deutlich sind die in den Fasern immobilisierten PVA Partikel zu erkennen. Die Fasern der Probe wiesen eine relativ breite Verteilung des Durchmessers auf, jedoch waren auf keiner der Aufnahmen Beads zu erkennen. Auch schien die Probe frei von Beschädigungen, wie Löchern oder verklebten Bereichen zu sein, die durch auf bereits hergestellte Fasern auftreffende, nicht getrocknete Spinnlösung verursacht werden können. Auf Aufnahme B ist der dichte Bewuchs des Faservlieses mit Bakterien zu erkennen. Die Bakterien bedeckten die der Agar-Oberfläche zugewandte Seite der Probe nahezu vollständig. Aufgrund des starken

Bewuchses ließ sich an dieser Stelle keine nähere Aussage über den Zustand des Faservlieses machen. Bei genauerer Betrachtung der Bakterien sind Strukturen wie Tetraden zu erkennen, die für die Bakterien der Art *M. luteus* typisch sind. Es lag also neben den lichtmikroskopischen Beweisen und des allgemeinen Erscheinungsbildes auch eine rasterelektronenmikroskopische Bestätigung der Identität der Bakterien vor.

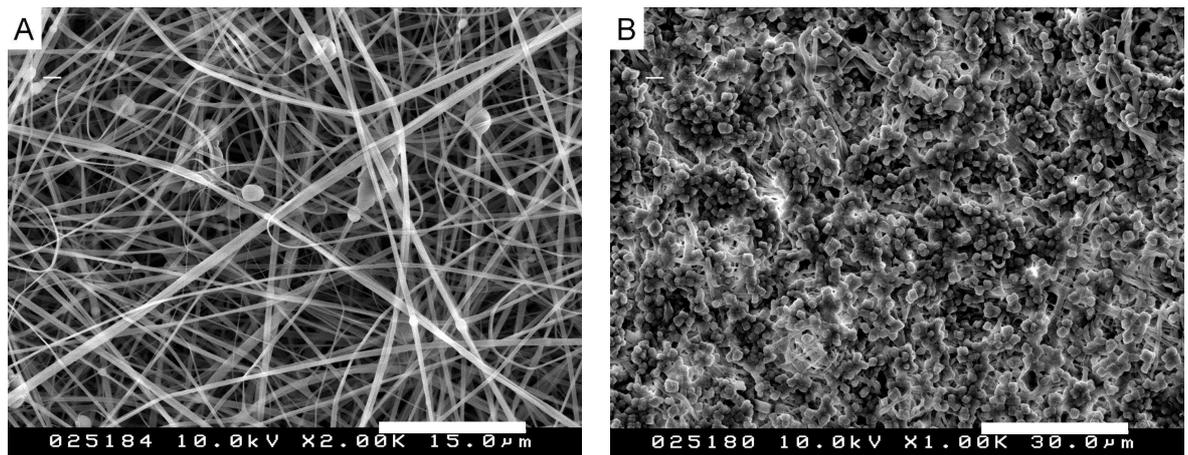


Abbildung 3-32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von MG011007b direkt nach dem Verspinnen (A) und nach der Inkubation auf der Agarplatte (B). Aufnahme B zeigt die der Agarplatte zugewandte Seite der Probe mit anhaftenden Bakterien.

In Abbildung 3-33 sind Aufnahmen zu sehen, die von den auf Aluminiumrahmen gesponnenen Faservliesen nach der Inkubation in flüssigem Nährmedium angefertigt wurden.

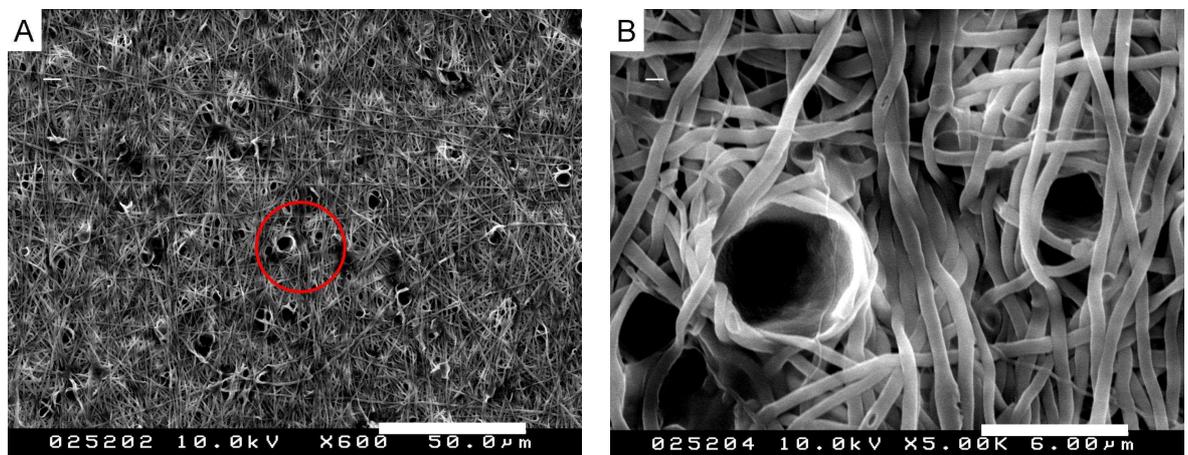


Abbildung 3-33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der auf Aluminiumrahmen gesponnenen Proben von MG011007b nach der Inkubation in flüssigem Nährmedium. Aufnahme A zeigt die Probenoberfläche bei 600-facher Vergrößerung, Löcher in der Oberfläche sind gut zu erkennen, Aufnahme B zeigt den markierten Bereich bei 5000-facher Vergrößerung.

Wie auf Aufnahme A zu erkennen ist, war der Bewuchs der Probenoberfläche mit Bakterien hier weit weniger ausgeprägt. Allerdings ist eine Reihe Loch-artiger Strukturen im Faservlies zu erkennen, die während der Inkubation entstanden sein mussten.

Keine der untersuchten Proben von MG011007b zeigte derartige Strukturen vor der Inkubation. Auf Aufnahme B ist der auf Aufnahme A markierte Bereich nochmals vergrößert abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Strukturen nicht durch eine Zerstörung der Fasern entstanden, diese also nicht abgebaut wurden. Vielmehr scheinen die Fasern auf dem Bild bewegt worden zu sein. Da der Durchmesser der Löcher durchaus in der Größenordnung gequollener PVA-Partikel liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel in den Fasern bei Kontakt mit der Nährlösung quollen und die umgebenden Fasern des Vlieses dabei verdrängten. Das gesamte Vlies erscheint auf Aufnahme B wesentlich kompakter, als auf Aufnahme A in Abbildung 3-32. Dies ist zum einen auf ein leichtes Quellen der Polyvinylbutyral-Fasern und zum anderen auf die Ausdehnung der Partikel innerhalb des Vlieses zurückzuführen. Da die Reste der gequollenen Partikel durch die Messmethoden bedingte Probenpräparation nicht erfasst werden konnten, wurde nach weiteren Hinweisen bezüglich des Einflusses quellender Partikel auf die Faservliese gesucht. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 3-34.

Die Aufnahmen A und B zeigen Details der Fasern von MG011007b direkt nach der Faserherstellung. Deutlich sind die eingeschlossenen Partikel verschiedener Größe zu erkennen. Sowohl Aufnahme C, als auch Aufnahme D zeigen die Fasern, nachdem sie in flüssigem Nährmedium inkubiert worden waren. In den Fasern waren, wie auf den Aufnahmen zu erkennen, Defekte aufgetreten. Die Fasern wiesen teilweise große, nach außen offene Hohlräume auf. Die Struktur der Ränder dieser Hohlräume legt die Vermutung nahe, dass sich die Partikel im Inneren der Fasern ausgedehnt hatten. Gleichzeitig erschien die Oberfläche der Fasern vor dem Kontakt mit dem wasserhaltigen Nährmedium als sehr glatt, während sie nach der Exposition zahlreiche kleine Löcher aufwies. Die wahrscheinlichste Ursache dieser Löcher sind kleinere Partikel, die im Zuge des Verspinnens vollständig in die Faser eingeschlossen wurden und beim Kontakt mit Wasser ebenfalls die Oberfläche durchbrochen hatten.

Nachdem der Beweis erbracht worden war, dass es möglich ist *M. luteus* durch Elektrospinnen einer ethanolbasierten Polyvinylbutyral-Lösung in wasserbeständige Fasern einzubringen, wurde versucht, *E. coli* enthaltende Partikel ebenfalls zu verspinnen. Da die Vorversuche ergeben hatten, dass die Partikel die darin enthaltenen Bakterien gegen Ethanol nur eine begrenzte Zeit schützten, wurde die zu verspinnende Lösung unmittelbar vor dem eigentlichen Spinnvorgang hergestellt, um die Kontaktzeit der PVA-Partikel mit dem Ethanol auf ein Minimum zu beschränken. Bei der Herstellung der Probe MG161007 wurde analog der Probe MG011007b vorgegangen. Beim Verspinnen wurde eine Spannung von 25 kV bei einem Elektrodenabstand von 20 cm angelegt. Als Durchflussrate wurde $0,85 \text{ mL h}^{-1}$ gewählt. Gesponnen wurde auf Aluminiumfolie. Die Zusammensetzung der verwendeten PVA-Partikel MG101007 ist in Tabelle 3-29 wiedergegeben, die der Probe MG161007 in Tabelle 3-30.

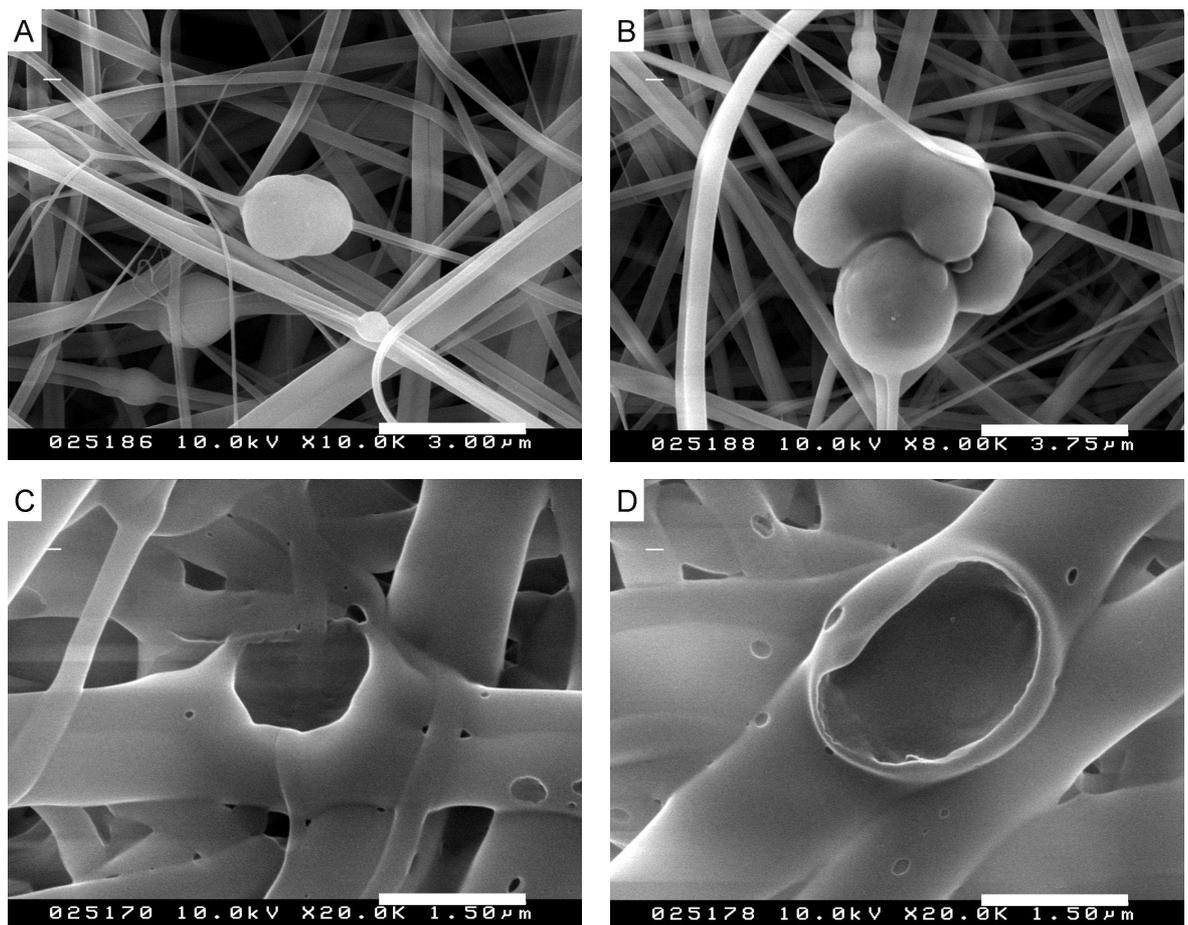


Abbildung 3-34: Detailaufnahmen von Fasern aus MG011007b. Die Aufnahmen A und B wurden vor dem Kontakt mit dem Nährmedium gemacht, die Aufnahmen C und D danach.

Tabelle 3-29: Probenzusammensetzung der Partikel. Verwendet wurde eine wässrige PVA 56-98 Lösung von 10 %.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Dispergieren
MG101007	<i>E. coli</i>	3,5 g	0,5 g	10.000 U min ⁻¹ für 15 min

Tabelle 3-30: Probenzusammensetzung der Spinnlösung.

Probe	Ethanol	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an Faser
MG0161007	0,33 g	0,67 g	30 mg	22 %

Die Probe wurde in zwei Teile aufgeteilt und ein Teil auf einer Agarplatte, der andere Teil in einem flüssigen Nährmedium bei 37 °C inkubiert. Es konnte Bakterienwachstum auf der Agarplatte und eine Trübung des flüssigen Nährmediums festgestellt werden. Die Identität von *E. coli* konnte durch Farbe, Geruch und mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Die Beobachtungen zeigten deutlich, dass *E. coli* wie *M. luteus* in der Probe MG011007b in der Lage war die Fasern zu verlassen.

Beide Bakterienarten konnten durch das gemeinsame Verspinnen Bakterien enthaltender PVA-Partikel mit einer Polyvinylbutyral-Lösung nicht in einer Weise immobilisiert werden, dass sie zwar Zugang zu Nährstoffen hatten, die Fasern jedoch nicht verlassen konnten. Dennoch kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass es möglich war, Bakterien der Arten *Escherichia coli* und *Micrococcus luteus* durch Elektrospinnen in wasserbeständige Fasern einzubringen.

In einem nächsten Schritt sollte nun die Immobilisierung in Polymerfasern aus weiteren Materialien untersucht werden. Es wurden hierzu drei Polymere ausgewählt, die sich aus Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen verspinnen lassen, die Polyvinylalkohol weder quellen noch lösen. Hierbei handelte es sich um Poly(ϵ -caprolacton), Poly(L-lactid) und Polystyrol.

Der erste Versuch bestand im Einbringen von *M. luteus* enthaltenden Partikeln in Polystyrol. Eingesetzt wurden die PVA-Partikel der Charge MG011007a, deren

Eigenschaften Tabelle 3-27 entnommen werden können. In Tabelle 3-31 ist die Zusammensetzung der Probe MG021007 wiedergegeben.

Gesponnen wurde auf Aluminiumfolie und Aluminiumrahmen bei einer Spannung von 25 kV, einem Elektrodenabstand von 20 cm und einer Durchflussrate von 0,51 mL h⁻¹. Es wurden Proben auf Agarplatten aufgebracht, sowie in flüssiges Nährmedium gegeben und bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich Wachstum auf den Agarplatten und eine Trübung des Nährmediums. Die Bakterien konnten als *M. luteus* identifiziert werden. Die Bakterien waren demnach in der Lage die Verarbeitungsbedingungen zu überstehen und aus den Fasern heraus Wachstum zu induzieren. Allerdings zeigte sich auch in diesem Fall wieder, dass die Bakterien in der Lage waren an mehreren Stellen aus dem Faservlies auszutreten, was aus der Bildung von Kolonien unterhalb der gesamten Probe auf der Agarplatte geschlossen werden konnte. Aufnahme A in Abbildung 3-35 zeigt die Kolonien nach dem Abnehmen des Faservlieses. Dies war insofern erstaunlich, als dass erwartet worden war, dass die inkorporierten Partikel vollständig mit einer Schicht aus Wasser abweisendem Polystyrol überzogen waren. Bei dem weißlich erscheinendem Bewuchs am linken Rand des von *M. luteus* bewachsenen Bereiches, sowie am linken Rand der Agarplatte handelte es sich um eine Kontamination, welche bei der Präparation der Agarplatte mit der Probe auf diese gelangte. Es wurden eine Reihe Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop angefertigt, eine Auswahl ist in Abbildung 3-35 dargestellt.

Tabelle 3-31: Zusammensetzung der Probe MG021007a. Die resultierende Polystyrol-Konzentration in der Spinnlösung betrug 12,8 %.

Probe	CHCl ₃	15 % PS	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an Faser
MG021007a	0,33 g	0,67 g	19 mg	4,6 %

Die Aufnahmen B und C zeigen Partikel, die in einer Polystyrol-Faser lokalisiert sind. Betrachtet man die Polystyrol-Schicht auf den Partikeln etwas genauer, so scheint diese kreisrunde Defekte aufzuweisen. Auf Aufnahme C ist zudem ein Riss zu erkennen, der durch den Defekt in der Mitte des Bildes hindurch, bzw. von diesem auszugehen scheint. Aufnahme D zeigt die besonders poröse Oberfläche einer anderen Verdickung in einer Faser als Detailaufnahme. Die gesamte Oberfläche der Verdickung war mit einer großen

Anzahl Löcher in geringem Abstand überzogen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der immobilisierten PVA-Partikel mit Feuchtigkeit aus den Nährmedien in Kontakt kam, wodurch die Partikel quellen und Bakterien freisetzen konnten.

Neben Polystyrol wurden *M. luteus* enthaltende PVA-Partikel auch in Poly(L-lactid) (PLLA), einem bioabbaubaren Polymeren eingebracht. Verwendet wurde das Lösungsmittel Dichlormethan. Die Vorgehensweise entsprach den vorangegangenen Versuchen. Die genaue Zusammensetzung der Probe MG010208 kann Tabelle 3-1 entnommen werden. Gesponnen wurde mit einer Spannung von 25 kV, einem Elektrodenabstand von 20 cm und einer Durchflussrate von $0,85 \text{ mL h}^{-1}$. Gesponnen wurde auf Aluminiumfolie.

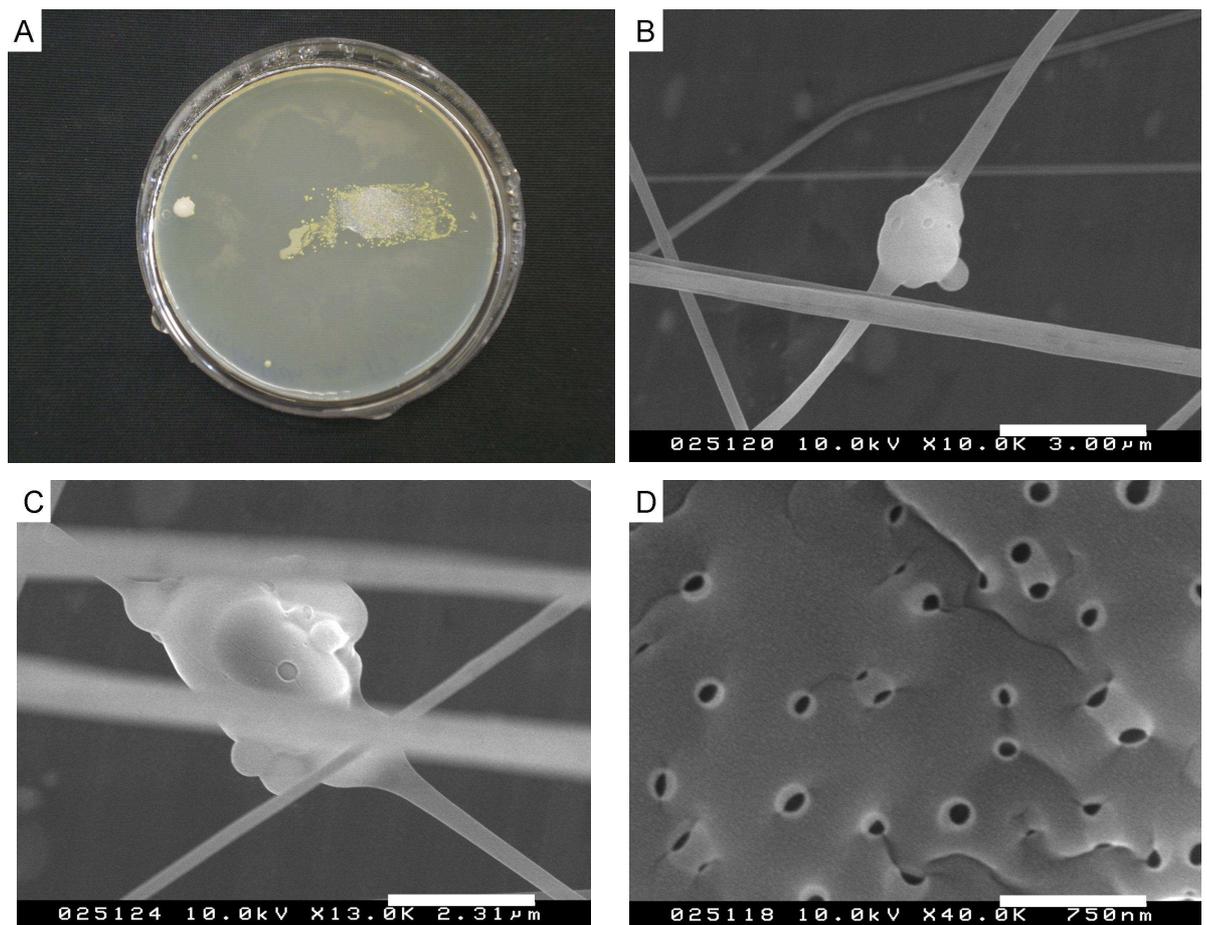


Abbildung 3-35: Von MG021007a auf Agarplatte verursachtes Bakterienwachstum (A), rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von in Polystyrol-Fasern eingeschlossenen Partikeln (B, C) sowie der Struktur einer Partikeloberfläche (D).

Tabelle 3-32: Zusammensetzung von MG010208.

Probe	CH ₂ Cl ₂	PLLA	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an Faser
MG010208	1,84 g	0,16 g	30 mg	16 %

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-36 durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentiert. Aufnahme A zeigt einen Ausschnitt aus dem Faservlies bei 1000-facher Vergrößerung. Deutlich sind die in den Fasern immobilisierten PVA-Partikel als Verdickungen zu erkennen. Die Fasern wiesen einen stark variierenden Durchmesser zwischen mehreren Mikrometern und unterhalb eines Mikrometers auf. Auf Aufnahme B ist eine solche Verdickung bei einer 18.000-fachen Vergrößerung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die erhaltenen Fasern die typische Oberflächenbeschaffenheit von aus Dichlormethan-Lösungen versponnenen Poly(L-lactid)-Fasern aufwiesen. Die Tatsache, dass diese spezielle Oberflächenbeschaffenheit auch auf dem immobilisierten Partikel zu erkennen ist, kann als weiterer Beleg gewertet werden, dass die Partikel nach dem Verspinnen von einer Polymerschicht umschlossen waren. Die poröse Oberfläche des die Partikel bedeckenden Poly(L-lactid), ließ erwarten, dass vorhandene lebende Bakterien in der Lage sein würden, die Fasern in der Gegenwart wässriger Nährmedien zu verlassen. Um auf lebende Bakterien in den Fasern hin zu untersuchen, wurden Proben des Faservlieses auf Agarplatten gelegt und bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich Wachstum von Bakterien zwischen Vlies und Agarplatte, deren Identität als *M. luteus* bestätigt werden konnte.

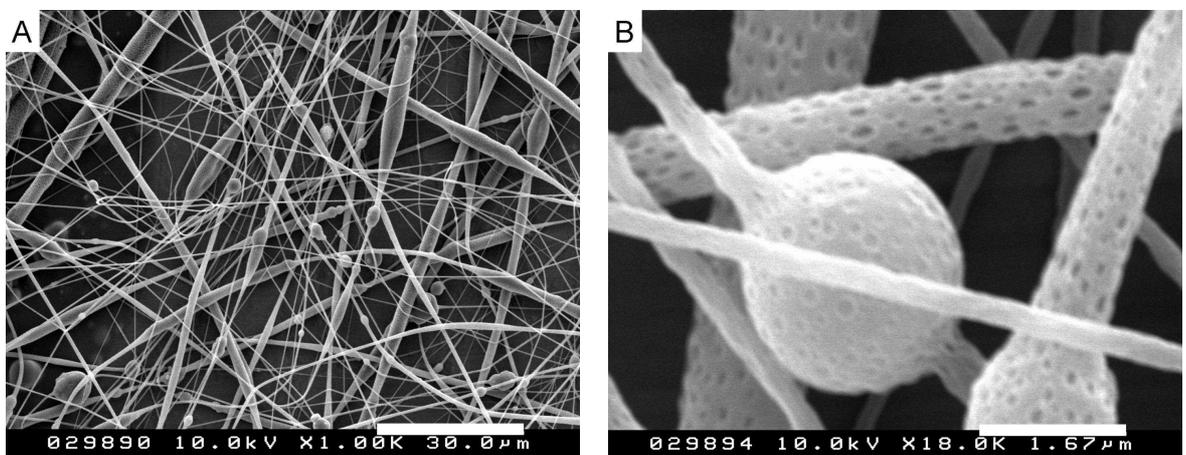


Abbildung 3-36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG010208 bei 1000-facher (A) und 18.000-facher Vergrößerung (B). Das Polymer auf der Partikeloberfläche ist gut zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Technik zum Immobilisieren von Bakterien in Polymerfasern auch auf Poly(L-lactid) anwendbar war. Wie bedingt durch die typische Oberflächenbeschaffenheit der Poly(L-lactid)-Fasern zu erwarten, waren die Bakterien in der Lage die Fasern zu verlassen und Wachstum auf der Agarplatte zu induzieren. Bemerkenswerterweise fanden sich in einem bei vier Grad Celsius gelagerten Teil der Probe auch noch nach 68 Stunden lebende Bakterien. Dies konnte als ein erster Hinweis auf eine längere Lagerungsfähigkeit der Faservliese gewertet werden, was jedoch zu einem späteren Zeitpunkt noch eingehender untersucht werden sollte.

Da bei vorhergehenden Versuchen bereits Erfahrungen mit dem Einbringen von PVA-Partikeln in Fasern aus Poly(ϵ -caprolacton) gemacht worden waren, wurde versucht Bakterien enthaltende Partikel auch in Fasern aus diesem Polymeren einzubringen. Es wurden sowohl Versuche mit *M. luteus*, als auch mit *E. coli* unternommen. Im Falle von *M. luteus* wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 28 % Poly(ϵ -caprolacton) (MG210408a), im Falle von *E. coli* (MG250408b) eine mit 29 % verwendet. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von Methanol und Chloroform im Verhältnis 1:3. Die Herstellung der Spinnlösungen erfolgte analog den vorangegangenen Versuche. Gesponnen wurde in beiden Fällen auf Aluminiumfolie bei einer Spannung von 15 kV, einem Elektrodenabstand von 17 cm und einer Durchflussrate von 0,85 mL h⁻¹. Anschließend wurden Proben der Faservliese auf Agarplatten mit den jeweiligen Nährmedien aufgebracht und bei 37 °C inkubiert. In beiden Fällen zeigte sich Bakterienwachstum, welches als von *M. luteus* bzw. *E. coli* verursacht identifiziert werden konnte. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben finden sich in Abbildung 3-37. Bei den auf Aufnahme A gezeigten Fasern handelt es sich um die Probe MG210408a. In die Fasern eingelagerte Partikel sind zu erkennen. Die Verteilung des Faserdurchmessers war wie bei den vorangegangenen Versuchen mit Poly(ϵ -caprolacton) recht breit. Aufnahme B zeigt Fasern von MG250408b. Im Bildmittelpunkt ist ein größerer eingelagerter Partikel zu erkennen. Auch diese Probe wies eine breite Verteilung des Faserdurchmessers auf.

Nachdem festgestellt worden war, dass Bakterien enthaltende PVA-Partikel in durch Elektrospinnen in Fasern aus verschiedenen Polymeren immobilisiert werden konnten,

sollte ein Blick auf die Art der Freisetzung der Bakterien aus den Fasern geworfen werden. Insbesondere der Einfluss der quellenden Hydrogel-Partikel innerhalb des sie umgebenden Polymeren war von Interesse.

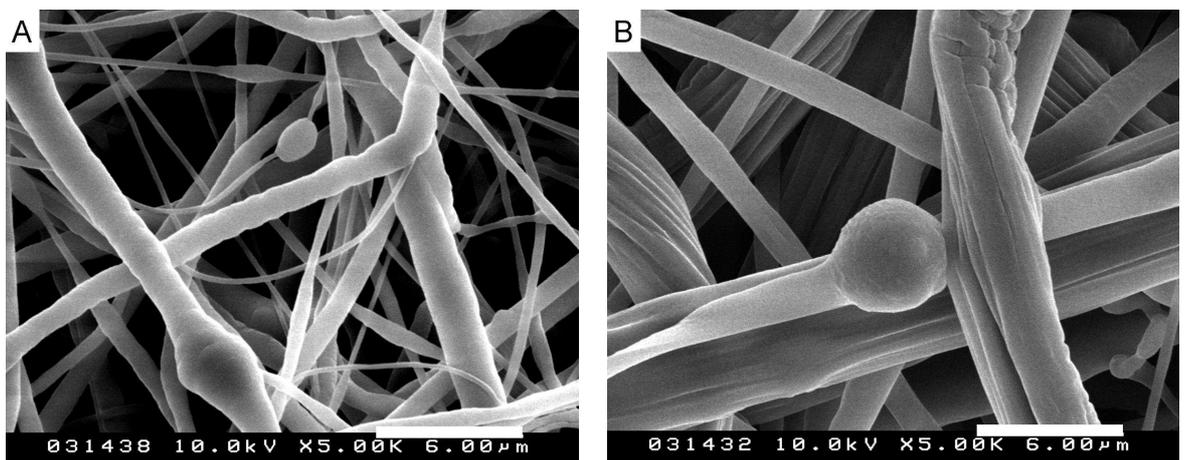


Abbildung 3-37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG210408a (A) und MG250408b (B). Es handelt sich um PVA-Partikel mit *M. luteus* (A) und *E. coli* (B) in PCL-Fasern.

Es wurden Filme aus Hydrogel-Partikel enthaltenden Lösungen der Polymere Polystyrol und Polyvinylbutyral hergestellt. Hierzu wurden PVA-Hydrogel-Partikel der Charge MG290507 im entsprechenden Lösungsmittel dispergiert und mit einer konzentrierten Lösung des Polymeren versetzt. Die Filme wurden mit einer Rakel mit einem Spalt von einem Millimeter auf Glasobjektträgern hergestellt. Probenbezeichnung und Zusammensetzung kann Tabelle 3-33 entnommen werden.

Tabelle 3-33: Zusammensetzung der Lösungen zur Filmherstellung.

Probe	PVA-Partikel	Polymer	Lösungsmittel
MG221007b	MG290507	Polystyrol	Chloroform
MG221007c	MG290507	Polyvinylbutyral	Ethanol

Teile der getrockneten Filme wurden für 24 Stunden in entionisiertes Wasser gegeben, während Vergleichsproben bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Die dem Wasser ausgesetzten Proben wurden nach erneuter Trocknung gemeinsam mit den Vergleichsproben mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. Die Aufnahmen werden in Abbildung 3-38 und Abbildung 3-39 dargestellt.

Die aus Polyvinylbutyral bestehenden Filme MG221007c zeigten deutliche Unterschiede ihrer Oberflächenbeschaffenheiten, wenn sie an Luft bzw. im Wasser gelagert waren. Wie auf Aufnahme A in Abbildung 3-38 zu erkennen ist, waren die an der Luft gelagerten Filme auf ihrer Oberfläche quasi glatt. Auch bei 18.000-facher Vergrößerung waren keine signifikanten Änderungen der Oberflächenstruktur zu erkennen. Aufnahme B zeigt den Vergleichsfilm nach 24 Stunden im Wasser. Die Oberfläche des Films war mit zahlreichen Defekten in Form von Löchern bedeckt. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Beobachtungen aus den Experimenten mit den in Fasern immobilisierten Partikeln. Die Partikel schienen auch in diesem Fall im Polymerfilm unter Verdrängung des Polyvinylbutyral gequollen zu sein. Wo sie die Oberfläche erreichten, entstanden bei der anschließenden Trocknung die beobachteten Löcher.

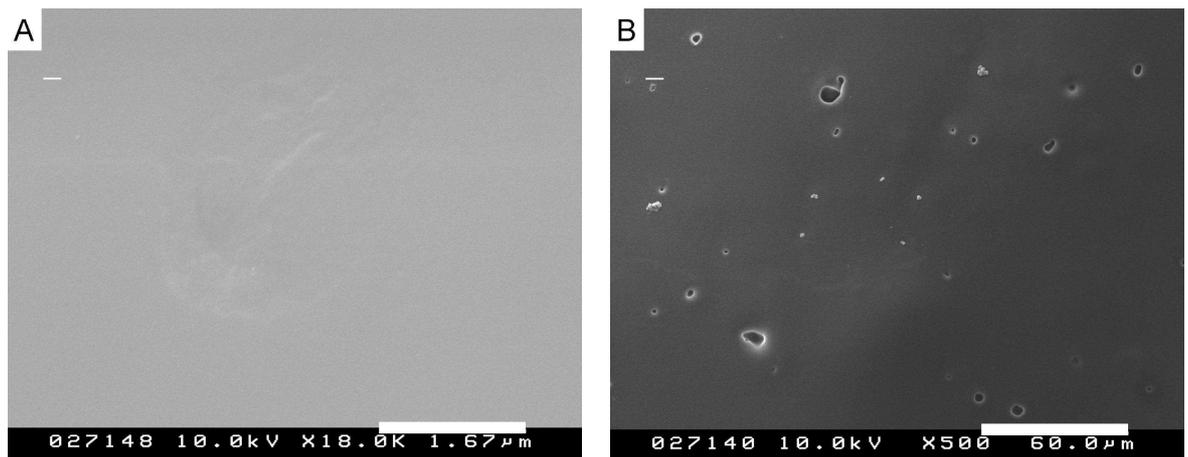


Abbildung 3-38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Filmen aus PVB mit darin eingeschlossenen PVA-Partikeln (MG221007c). Aufnahme A zeigt die an Luft gelagerte Vergleichsprobe, Aufnahme B die 24 Stunden dem Wasser ausgesetzte Probe.

Bei den aus Polystyrol bestehenden Filmen MG221007b waren die Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit vor und nach dem Wasserkontakt weit weniger deutlich ausgeprägt. Auf Aufnahme A ist ein Ausschnitt der Oberfläche der an Luft gelagerten Vergleichsprobe bei 40.000-facher Vergrößerung zu sehen. Die Oberfläche war weitestgehend glatt. Aufnahme B zeigt einen Ausschnitt der Oberfläche nach dem Wasserkontakt. Diese war praktisch unverändert. Es konnte jedoch in einem Fall die auf Aufnahme C abgebildete Struktur beobachtet werden. Die Struktur scheint darauf hinzudeuten, dass sich ein Objekt im Inneren des Filmes ausdehnt und dabei die Oberfläche aufgebrochen hatte. Es ist also wahrscheinlich, dass ein nahe der Oberfläche

liegender Hydrogel-Partikel mit Wasser in Kontakt kam und durch sein Aufquellen die abgebildete Struktur verursachte. Auffällig ist, dass die den Partikel bedeckende Schicht aus Polystyrol nur eine Dicke von wenigen Nanometern besessen zu haben schien, wodurch schon ein kleiner Riss den Kontakt zum Wasser hergestellt haben könnte. Vergleicht man diese Aufnahmen mit den Aufnahmen der in Polystyrol-Fasern immobilisierten PVA-Partikel in Abbildung 3-35, ist einfach zu erkennen, dass die Polystyrol-Schicht auf den Partikeln in den Fasern deutlich mehr Defekte aufwies. Im Fall der Fasern schien die Wahrscheinlichkeit, dass ein Partikel durch Quellung Bakterien freisetze somit deutlich größer. Dies stand im Einklang mit der Erfahrung, dass das Bakterienwachstum bei auf Agarplatten ausgebrachten Proben von Faservliesen an vielen Stellen induziert worden war.

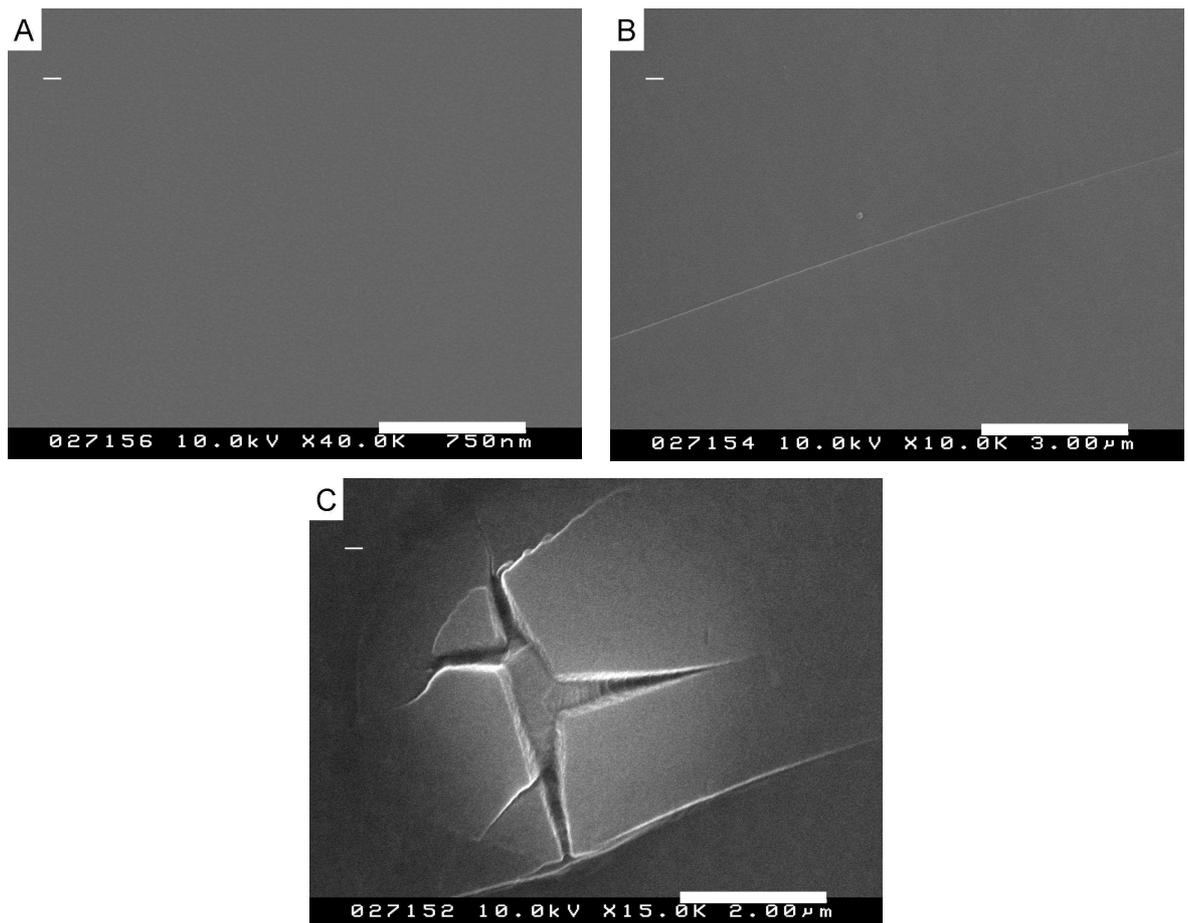


Abbildung 3-39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Filmen aus PS mit darin eingeschlossenen PVA-Partikeln (MG221007b). Aufnahme A zeigt die an Luft gelagerte Vergleichsprobe. Die Aufnahmen B und C zeigen verschiedene Ausschnitte der im Wasser gelagerten Probe. Auf Aufnahme C ist die aufgesprengte Oberfläche des Films zu erkennen.

Es gilt zu erwähnen, dass eventuell auch die Bakterien selbst einen weiteren Beitrag zu ihrer Freisetzung leisteten. Würden, wie im Falle der Faservliese die immobilisierten Bakterien einem Nährmedium ausgesetzt, so setzte sicherlich eine Vermehrung innerhalb der Bakterien innerhalb der gequollenen Partikel ein. Da Bakterien einen Innendruck von mehreren Atmosphären aufweisen, steht zu erwarten, dass durch ihre Vermehrung die Partikel und deren Umgebung einer starken Belastung ausgesetzt werden.

In Proben von MG180808 und MG130808, die in Polyvinylbutyral bzw. Poly(ϵ -caprolacton) immobilisierte PVA-Partikel mit *E. coli* und *M. luteus* enthielten, konnten bei Tests auch nach mehr als 58 Tagen noch lebende Bakterien nachgewiesen werden.

3.3.11 Nachweis der Bakterienaktivität

Im vorigen Abschnitt konnte nachgewiesen werden, dass Bakterien in elektrogesponnene Fasern aus nicht in Wasser löslichen Polymeren eingebracht werden konnten. Nun stellte sich die Frage, ob die immobilisierten Bakterien aus den PVA-Partikeln heraus in der Lage waren, Stoffwechsel zu betreiben.

Im Laufe des Versuches sollten die in Polyvinylbutyral eingebrachten PVA-Partikeln einer wässrigen Umgebung ausgesetzt werden. Die Umsetzung einer Substanz in dieser Umgebung sollte durch geeignete Methoden nachgewiesen und so die Aktivität der Bakterien belegt bzw. verfolgt werden. Es konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass eine Vermehrung der Bakterien in den Partikeln bei Kontakt mit einem Nährmedium zu deren Freisetzung führen würde. Die Folge wäre eine exponentielle Vermehrung der Bakterien im Nährmedium, so dass nicht zwischen der Aktivität der Bakterien in der Polyvinylbutyral-Matrix und der Aktivität der Bakterien im Nährmedium unterschieden werden könnte. Aus diesem Grund wurde nach einer Variante gesucht, die es ermöglichte die Bakterienaktivität nachzuweisen, eine Vermehrung der Bakterien jedoch zu unterdrücken. Bakterienaktivität bedeutete in diesem Fall, das in Kontakt kommen einer Substanz aus dem umgebenden Medium, ihre Umwandlung im Bakterium und dem Nachweis der umgewandelten Substanz im Medium.

Als ein diesen Anforderungen entsprechendes System wurde eine Lösung von Resazurin in Kaliumphosphat-Puffer pH = 7 ausgewählt. Resazurin wird seit längerer Zeit zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von Bakterien verwendet.^[139, 140] Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, dessen gelöste oxidierte Form eine blau-violette Färbung aufweist. Nach der Reduktion zum Resorufin weist die Lösung eine purpurne Färbung auf. Abbildung 3-40 zeigt den Farbstoff in der oxidierten und reduzierten Form. Der Farbunterschied der Lösungen wird in Abbildung 3-41 und Diagramm 3-3 verdeutlicht. Verantwortlich für die Reduktion und den damit verbundenen Farbwechsel sind Enzyme aus der Klasse der Dehydrogenasen in den Bakterien, verbunden mit der Anwesenheit von NADH. Dehydrogenasen sind Enzyme, die eine Bestimmung der gesamten mikrobiologischen Aktivität ermöglichen. Sie sind ein zentraler Bestandteil des bakteriellen Stoffwechsels und katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen. Dehydrogenasen sind auch zum Nachweis geringer mikrobieller Aktivitäten geeignet.^[141] Resazurin kann beispielsweise zur Beurteilung der bakteriologischen Qualität von Milch verwendet werden, hierbei wird der Farbstoff der Milch zugesetzt, die Geschwindigkeit des Farbwechsels gibt Aufschluss über die Kontamination der Milch.^[142] Auch zum Nachweis von Bakterien in Sedimenten und zur Qualitätsbestimmung von Meeresfrüchten kann Resazurin eingesetzt werden.^[143-146] Der Nachweis der Farbänderung kann visuell oder laut Literatur spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 610 nm erfolgen.^[147] In Kaliumphosphat-Puffer wurde das Absorptionsmaximum zu 602 nm bestimmt.

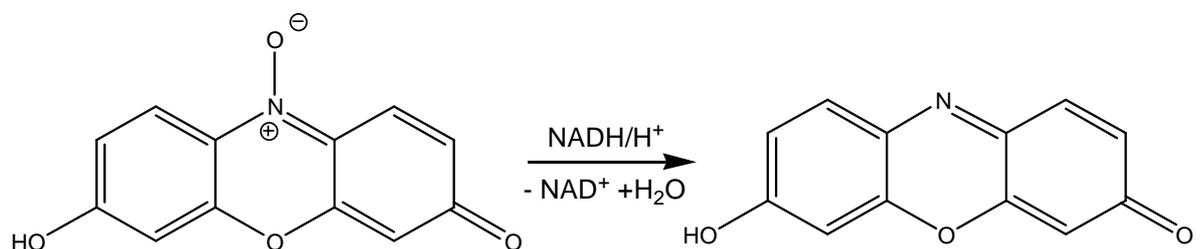


Abbildung 3-40: Der Farbstoff wird in der oxidierten Form als Resazurin (links) und in der reduzierten Form als Resorufin (rechts) bezeichnet.

Die Tatsache, dass Resazurin zum Nachweis auch geringer Bakterienaktivitäten geeignet ist, machte es notwendig, dass die Proben frei von Kontaminationen wie Fremdbakterien und Pilzen waren. Die Anwesenheit dieser Keime hätte zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können, da es unmöglich gewesen wäre zwischen ihrer und der Aktivität der

immobilisierten Bakterien zu unterscheiden. Aus diesem Grunde wurden sowohl Versuche mit Bakterien enthaltenden PVA-Partikeln in Polyvinylbutyral-Filmen als auch in Fasern durchgeführt. Der Grund war die einfachere Herstellung solcher Filme unter sterilen Bedingungen.

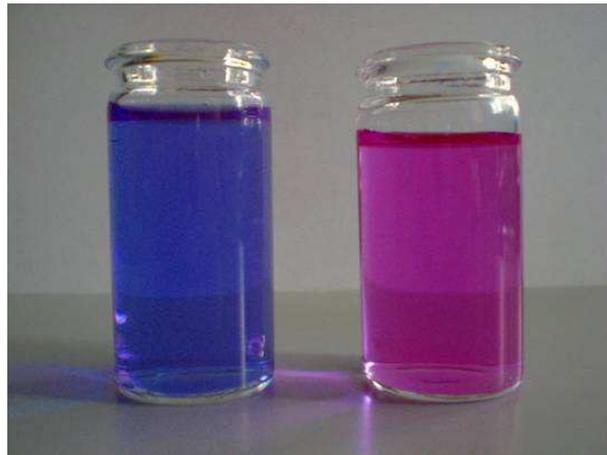


Abbildung 3-41: Lösung von Resazurin in Kaliumphosphat-Puffer pH = 7 vor dem Kontakt mit lebenden Bakterien (links) und danach (rechts).

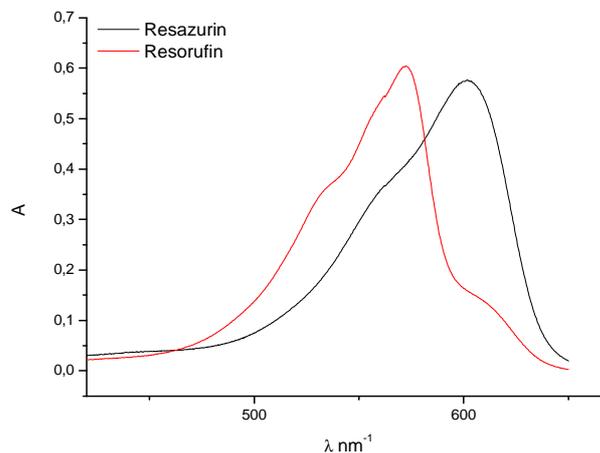


Diagramm 3-3: Absorptionsspektren von Resazurin (schwarz) und Resorufin (rot) in Kaliumphosphat-Puffer pH = 7. Die Absorptionsmaxima liegen bei 602 nm für Resazurin und 573 nm für Resorufin.

Die Zugänglichkeit der im Polyvinylbutyral-Film immobilisierten Bakterien durch das umgebende wässrige Medium wurde durch einen Versuch mit Fluorescein-Natrium überprüft. Hierzu wurden PVA-Partikel hergestellt, die keine Bakterien, jedoch

Fluorescein enthielten. Die verwendeten Partikel entstammten der Charge MG110809a, ihre Zusammensetzung kann Tabelle 3-34 entnommen werden.

Tabelle 3-34: Zusammensetzung der Probe MG110809a. Es wurden keine Zyklen aus Einfrieren und Auftauen angewendet.

Probe	Polymerlösung	Menge Fluo.-Na	Dispergieren
MG110809a	5g 10 % PVA 28-99	7,5 mg	10.000 U min ⁻¹ für 15 min

Die Fluorescein-Natrium enthaltenden Partikel wurden zu Testzwecken unter Zuhilfenahme von Ultraschall in Ethanol dispergiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und nach dem Entfernen der enthaltenen Partikel durch Zentrifugation im Fluoreszenzspektrophotometer untersucht. Obwohl Fluorescein-Natrium in Ethanol gut löslich ist, konnten keine Spuren in der Alkohol-Phase nachgewiesen werden. Dies konnte als weiterer Beweis für die ausgeprägte Schutzwirkung der PVA-Partikel in Bezug auf darin immobilisierte Bakterien gewertet werden.

Die Partikel wurden in Ethanol dispergiert, danach wurde eine Lösung von Polyvinylbutyral zugegeben. Die genaue Probenzusammensetzung ist Tabelle 3-35 zu entnehmen.

Zur Durchführung des Versuches wurde ein 50 mL Einweg-Zentrifugeneinsatz aus Kunststoff auf der Innenseite mit einem Film aus MG140809 beschichtet. Nach dem Evaporieren des Lösungsmittels wurden 50 mL entionisiertes Wasser in das Gefäß gegeben. Die Freisetzung von Fluorescein wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers verfolgt. Dazu wurden zu gegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Stärke der Fluoreszenz bestimmt. Die Ergebnisse werden in Diagramm 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-35: Zusammensetzung der Lösung zur Filmherstellung.

Probe	EtOH	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel am Film
MG140809	1,84 g	1,25 g	27 mg	29 %

Der Graph auf der linken Seite zeigt die Stärke der Fluoreszenz aufgetragen gegen die eingestrahlte Wellenlänge. Das Maximum der Fluoreszenz lag bei einer Anregungswellenlänge von 510 nm. Die verschiedenen Kurven wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Die blaue Kurve repräsentiert das Lösungsmittel. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Stärke der Fluoreszenz mit der Zeit zunimmt. Zur Verdeutlichung dessen wurde auf der rechten Seite die Intensität des Fluoreszenzsignals bei 510 nm gegen die Zeit aufgetragen. Der erste Messpunkt wurde nach fünf Minuten Kontakt zum Wasser aufgenommen, der letzte nach 151 Stunden. Die Freisetzung des Fluoresceins verlief anfangs schnell und erreichte eine Sättigung.

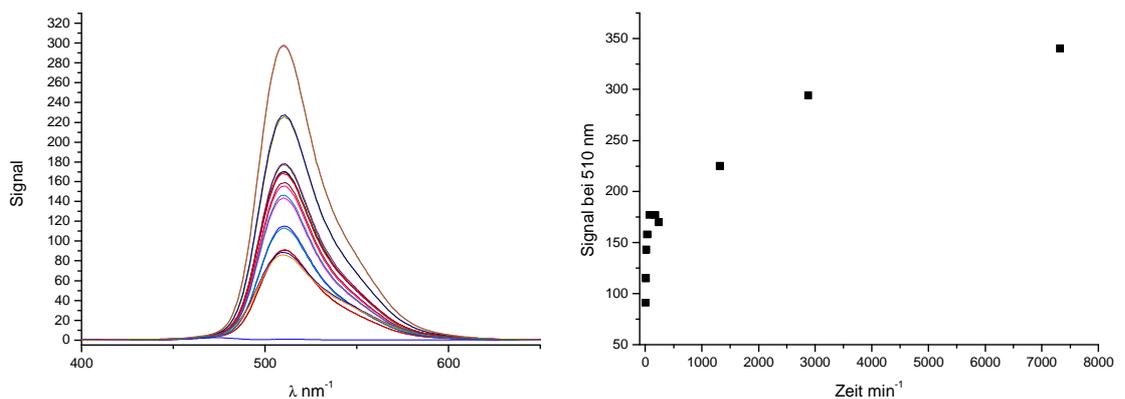


Diagramm 3-4: Ergebnisse der Untersuchungen zur Freisetzung von Fluorescein mit dem Fluoreszenzspektrophotometer. Der linke Graph zeigt die Signalstärke in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Graph auf der rechten Seite zeigt die Signalstärke bei 510 nm in Abhängigkeit von der Dauer des Wasserkontaktes.

Der Versuch bewies, dass die im Polyvinylbutyral-Film immobilisierten Partikel für Wasser zugänglich waren und der darin enthaltene Farbstoff in das wässrige Medium überzutreten in der Lage war. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass Bakterien in Partikeln, die wiederum in einem Film aus Polyvinylbutyral immobilisiert waren in Kontakt mit Resazurin kommen konnten. Auch zeigte dieser Versuch, dass das eventuell entstehende Resorufin anschließend im wässrigen Medium nachzuweisen sein musste. Bedingt durch die wesentlich geringere Dicke von Polyvinylbutyral-Fasern und deren im Verhältnis zur Masse deutlich größere Oberfläche, konnte davon ausgegangen werden, dass diese Erkenntnisse auch auf in Fasern immobilisierte Partikel zutrafen.

Nachdem die Möglichkeit eines Stoffaustausches zwischen immobilisierten Partikeln und dem wässrigen Medium nachgewiesen worden war, wurden weitere Versuche mit Bakterien enthaltenden Partikeln durchgeführt. *M. luteus* enthaltende Partikel wurden hierzu sowohl in Polyvinylbutyral-Fasern, als auch in Filmen aus dem gleichen Material immobilisiert. Der Grund hierfür war die Tatsache, dass es sich als äußerst schwierig herausstellte, Faservliese in ausreichender Menge für einen solchen Test unter absolut sterilen Bedingungen herzustellen.

Vorversuche mit *M. luteus* enthaltenden PVA-Partikeln in Faservliesen aus Polyvinylbutyral hatten ergeben, dass es zwingend notwendig war, die Vliese auf ein Trägermaterial aufzubringen, da sie sich bei Kontakt mit der Resazurin-Lösung zusammenzogen und nach einiger Zeit eine Kugel bildeten. Hierdurch war ein ausreichender Kontakt zwischen dem wässrigen Medium und den immobilisierten Partikeln nicht mehr gegeben. Nachdem Aluminium als Ursache falsch-positiver Testergebnisse identifiziert worden war, wurde als Trägermaterial Filterpapier gewählt. Die verwendeten Filterpapiere wurden vor ihrer Verwendung bei 130 °C für mehrere Stunden sterilisiert.

In einem ersten Versuch wurden *M. luteus* enthaltende PVA-Partikel der Charge MG060409a aus einer Polyvinylbutyral-Lösung versponnen. Die Zusammensetzung der Partikel und der Spinnlösung können Tabelle 3-36 und Tabelle 3-37 entnommen werden.

Tabelle 3-36: Probenzusammensetzung. Verwendet wurde eine Lösung von PVA 28-99 mit 15 %. Die Partikel wurden direkt ausgefällt.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Dispergieren
MG060409a	<i>M. luteus</i>	6,0 g	1,0 g	10.000 U min ⁻¹ für 15 min

Tabelle 3-37: Zusammensetzung der Spinnlösung.

Probe	EtOH	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel an den Fasern
MG070409b	0,4 g	2,0 g	100 mg	22 %

Zur Herstellung des Faservlieses wurde die Spinnanlage zunächst mit 70 vol.% Ethanol gereinigt, um die Keimzahl so niedrig wie möglich zu halten. Gesponnen wurde auf ein Rundfilter mit einem Durchmesser von zwölf Zentimetern, welches direkt auf die Gegenelektrode gelegt worden war. Die angelegte Spannung betrug 25 kV bei einem Elektrodenabstand von 20 cm und einer Durchflussrate von $0,85 \text{ mL h}^{-1}$. Es wurde für 50 Minuten gesponnen. Das Gewicht des Vlieses auf dem Filterpapier wurde nicht bestimmt, um eine weitere mögliche Kontaminationsquelle auszuschließen.

Der Test auf eine vorhandene Aktivität der Bakterien im Vlies wurde in 100 mL Schraubdeckelgläsern durchgeführt. Alle verwendeten Materialien waren zuvor sterilisiert worden. Das Faservlies wurde zusammen mit dem Filterpapier in das Glas gegeben und mit 110 mL der Resazurin-Lösung überschichtet. Diese bestand aus 3,6 mg Resazurin gelöst in 750 mg Kaliumphosphat-Puffer $\text{pH} = 7$ mit einer Konzentration von 50 mmol L^{-1} . Als Vergleichsprobe wurde ein steriles Filterpapier in einem andern Glas ebenfalls mit 110 mL Resazurin-Lösung überschichtet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur in der Dunkelheit aufbewahrt. Die Umwandlung des Farbstoffes wurde am UV/Vis-Spektrophotometer verfolgt. Hierzu wurden über 133,5 Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die erhaltenen Spektren sind in Diagramm 3-5 dargestellt. Die Probenentnahme erfolgte unter halb-sterilen Bedingungen. Zudem wurden von jeder entnommenen Probe nach der Untersuchung im Spektrophotometer $200 \mu\text{L}$ auf einer Agarplatte mit TS-Medium ausgebracht, um aus den Fasern austretende Bakterien bzw. Kontaminationen des wässrigen Mediums erkennen zu können.

Die beiden Auftragungen in Diagramm 3-5 zeigen die in einem Zeitraum von Null bis 135 Stunden aufgenommenen Spektren. Es ist bei der die Bakterien enthaltenden Probe auf der rechten Seite deutlich zu erkennen, dass Resazurin in Resorufin umgewandelt wurde. Allerdings war auch bei der Referenzprobe eine Abnahme der Stärke des Resazurin Signals zu erkennen. Die Agarplattentests zeigten in beiden Gefäßen nach 66 Stunden eine Kontamination mit einem Fremdbakterium an. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um aus den Fasern ausgetretene Bakterien handelte, da die Kolonien auf den Agarplatten eine weiße Färbung aufwiesen. *M. luteus* dagegen bildet gelbe Kolonien. Die Anwesenheit dieses Bakteriums könnte auch den leichten Rückgang der Signalstärke bei

der Referenzprobe erklären, da der Resazurintest zum einen sehr empfindlich ist und zum anderen auch mit einer niedrigen Resazurin Konzentration im Puffer gearbeitet wurde. Auch wurden die Gefäße vor der Probenentnahme nicht geschüttelt, so dass auf dem Boden bzw. dem Filterpapier aufsitzende Bakterien anfangs nicht detektiert wurden. Dennoch war bemerkenswert, dass der Rückgang der Signalintensität bei der die Bakterien enthaltenden Probe deutlich stärker ausfiel, als bei der Referenzprobe. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass die immobilisierten *M. luteus* im Wesentlichen für die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin verantwortlich waren.

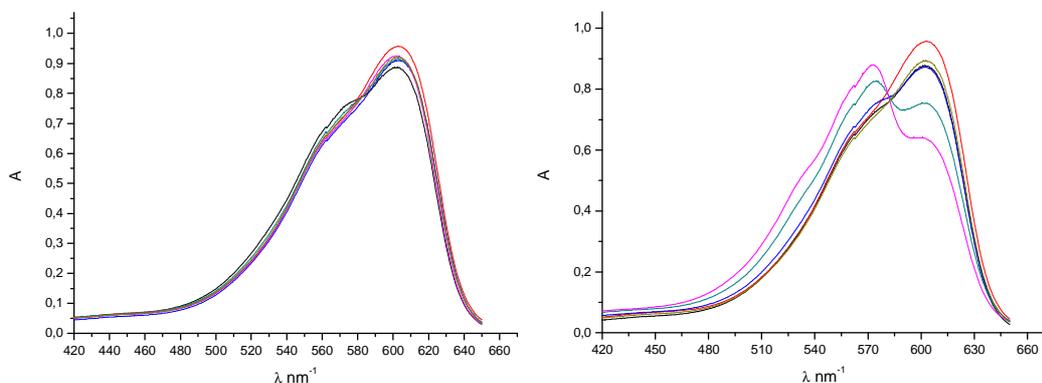


Diagramm 3-5: Absorptionsspektren von MG070409b im Bereich von 420 bis 650 nm. Das linke Spektrum repräsentiert die Referenzprobe, das rechte die Bakterien enthaltende Probe. Die aufgenommenen Kurven decken einen Zeitraum von 133,5 Stunden ab.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Fremdbakterien bereits durch den langwierigen Herstellungsprozess der Probe, bei dem das Faservlies der Raumluft exponiert war auf die Fasern gelangten. Auch stellten Pilzsporen eine bedeutende Quelle möglicher Kontaminationen dar, wie durch das Auftreten von Schimmel bei diversen Vorversuchen festgestellt werden konnte. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente mit Filmen aus dem gleichen Polymeren durchgeführt. Filme hatten den großen Vorteil, dass ihr Herstellungsprozess einen geringeren apparativen Aufbau benötigte und so über die gesamte Herstellung eine sterile Umgebung sichergestellt werden konnte.

Hergestellt wurden Filme aus Polyvinylbutyral sowohl mit *E. coli* als auch *M. luteus* enthaltenden Partikeln. Zur Stabilisierung der Filme und um eine sterile Umgebung während der Herstellung und des Versuches zu gewährleisten, wurde die Innenseite von

sterilisierten 50 mL Zentrifugeneinsätzen beschichtet. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise findet sich im experimentellen Teil. Die verwendeten PVA-Partikel entstammten den Chargen MG200709 und MG210709. Die Partikelzusammensetzung ist in Tabelle 3-38 wiedergegeben. Die Zusammensetzung der Polymerlösungen zur Beschichtung findet sich in Tabelle 3-39.

Tabelle 3-38: Probenzusammensetzung. Verwendet wurde eine Lösung von PVA 28-99 mit 15 %. Die Partikel wurden direkt ausgefällt.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Dispergieren
MG200709	<i>E. coli</i>	5,0 g	1,3 g	10.000 U min ⁻¹ für 15 min
MG210709	<i>M. luteus</i>	10,0 g	2 g	10.000 U min ⁻¹ für 15 min

Tabelle 3-39: Zusammensetzung der Beschichtungslösungen.

Probe	EtOH	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel am Film
MG230709	1,0 g	5,0 g	260 mg MG200709	26 %
MG240709	1,0 g	5,0 g	370 mg MG210709	33 %

Es wurden pro Bakterienart zwei Zentrifugeneinsätze beschichtet. Nach dem Trocknen des Films wurden die Gefäße mit je 50 mL der Resazurin-Lösung befüllt. Die Konzentration von Resazurin im Kaliumphosphat-Puffer pH = 7 betrug 3,6 mg L⁻¹. Aufbewahrt wurden die Proben bei 37 °C im Inkubator. Neben den beschichteten Gefäßen wurden auch ein unbeschichtetes mit der Farbstoff-Lösung befüllt und als Referenz verwendet. Proben wurden über einen Zeitraum von 288 Stunden entnommen und am UV/Vis-Spektrophotometer untersucht. Je 200 µL der Farbstoff Lösung wurden auf Agarplatten ausgebracht um Kontaminationen bzw. austretende Bakterien Detektieren zu können. Die Ergebnisse werden in Diagramm 3-6 für die *E. coli* enthaltenden Partikel, sowie in Diagramm 3-7 für die *M. luteus* enthaltenden Partikel illustriert.

Bei den beiden Proben mit *E. coli* zeigte sich nur eine leichte Umwandlung von Resazurin in Resorufin im Verlauf von 214 Stunden. Die bei Probe II nach 214 Stunden erkennbare stärkere Umwandlung ist auf eine Kontamination mit Fremdbakterien zurückzuführen. Ebenso wies die Referenzprobe nach 143 Stunden eine Kontamination auf, weshalb sie nicht weiter untersucht wurde. Aus den Filmen ausgetretene *E. coli* konnten in keinem Fall

nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu erkennen, dass bei der Referenzprobe keine Umwandlung von Resazurin in Resorufin stattgefunden hatte. Die zu niedrige Absorption für Resazurin nach 24,5 Stunden ist auf einen Messfehler zurückzuführen, erkenntlich an der fehlenden Zunahme der Absorption für Resorufin.

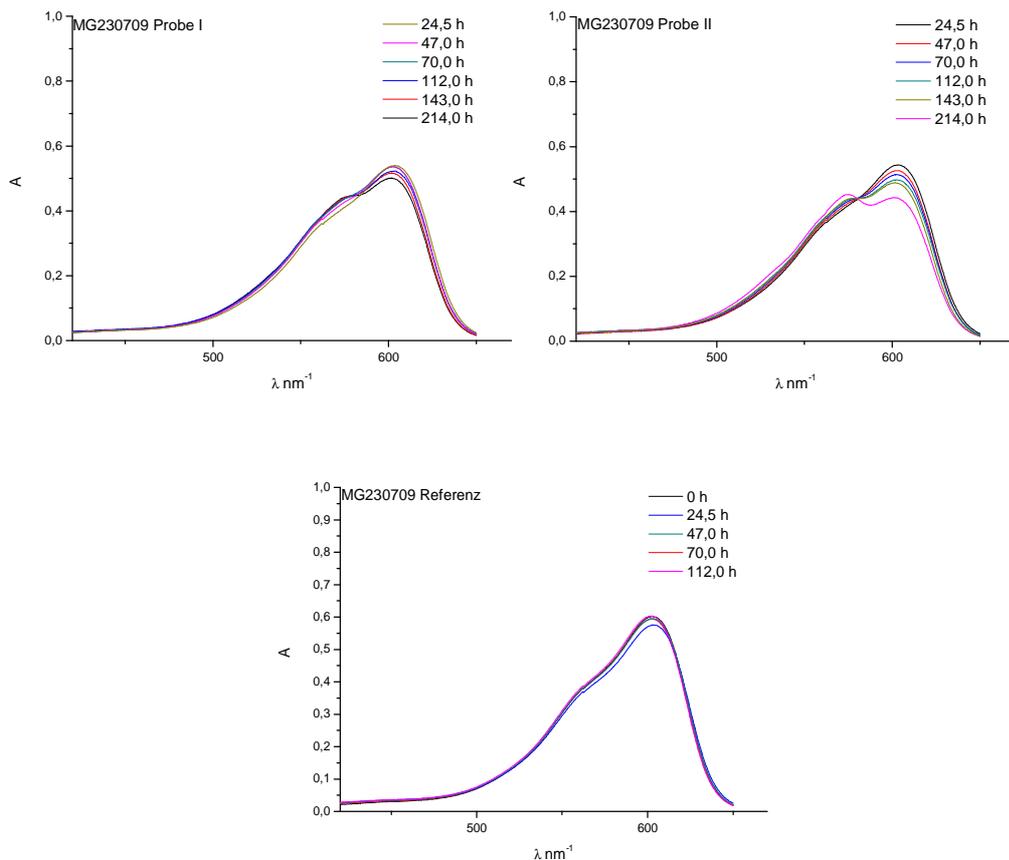


Diagramm 3-6: Absorptionsspektren von MG230709 im Bereich von 420 bis 650 nm. Aufgenommen wurden die Spektren in einem Zeitraum von bis zu 214 Stunden. Die oberen, mit Probe I und Probe II bezeichneten Spektren zeigen die Bakterien enthaltenden Proben, das untere Spektrum zeigt die Referenzprobe. Probe II, sowie die Referenzprobe zeigten bei 214 bzw. 143 Stunden eine Kontamination.

Die *M. luteus* enthaltenden Proben wurden über einen Zeitraum von insgesamt 288 Stunden untersucht. Alle Proben, einschließlich der Referenzprobe blieben über den gesamten Zeitraum kontaminationsfrei. Auch konnten bei den Agarplattentests keine Bakterien nachgewiesen werden, die aus den Filmen ausgetreten waren. Wie aus den beiden Spektren von Probe I und Probe II in Diagramm 3-7 eindeutig zu entnehmen ist, gab es in beiden Fällen eine Umwandlung von Resazurin in Resorufin. Im Gegensatz dazu

zeigte die Referenzprobe praktisch keine Veränderung an. Auffällig ist die deutlich stärkere Abnahme von Resazurin bei Probe II. Dies ließ sich mit der deutlich größeren Masse des in dieser Probe verwendeten Films und der damit verbundenen höheren Anzahl von *M. luteus* in der Probe erklären. Zur Verdeutlichung dieses Umstandes beinhaltet Diagramm 3-7 eine Auftragung der Absorption bei 601 nm gegen die Zeit der beiden Proben. Wie aus der Auftragung hervorgeht, war die Geschwindigkeit der Abnahme des Resazurins zu Beginn des Versuches deutlich höher als gegen Ende. Ein Faktor, der wahrscheinlich zu dieser Abnahme beitrug war die zu erwartende Abnahme der Zahl lebender Bakterien im Film unter den im Versuch herrschenden Bedingungen. Zugleich ist diese Auftragung auch ein starker Hinweis darauf, dass in keiner der beiden Proben eine relevante Kontamination auftrat, da dies zu einer Beschleunigung der Farbstoff-Umwandlung geführt hätte, was durch einen plötzlichen Abfall der Absorption durch das Resazurin in der Auftragung zu erkennen wäre.

Als Resultat des Versuches konnte eine Umwandlung von Resazurin in Resorufin bei beiden Bakterienarten nachgewiesen werden. Die Bakterien scheinen also in Filmen aus Polyvinylbutyral aktiv, d.h. zur Metabolisierung von Stoffen in der Lage zu sein. Es zeigte sich in Falle von *M. luteus* ein Zusammenhang zwischen der Menge an umgesetzten Resazurin und der Anzahl der im Film immobilisierten Bakterien. Auch bei den *E. coli* enthaltenden Partikeln war eine schwache, jedoch im Vergleich zur Referenz deutliche Umwandlung von Resazurin in Resorufin zu erkennen. Diese Tatsache entsprach insofern den Erwartungen, als das in den Vorversuchen festgestellt werden konnte, dass die Lebenserwartung von immobilisierten *E. coli* gegenüber *M. luteus* insbesondere bei erhöhten Temperaturen deutlich niedriger war. Das Faktum, dass der Versuch in wässriger Umgebung durchgeführt worden war, dürfte die Lebensdauer noch zusätzlich verkürzt haben.

Zur Bestätigung dieser Erkenntnisse wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein ähnlicher Versuch durchgeführt. Verwendet wurden *M. luteus* enthaltende Partikel der Charge MG211009 deren Zusammensetzung Tabelle 3-40 zu entnehmen ist. Erneut wurden sterile Zentrifugeneinsätze nach der gleichen Methode wie bei MG230709 und MG240709 von innen beschichtet. Zur Beschichtung wurden jeweils 2,5 g der Lösung in eines der Gefäße

gegeben und komplett darin eingetrocknet. Die genaue Zusammensetzung der Beschichtungslösung kann Tabelle 3-41 entnommen werden. Die Konzentration der Lösung von Resazurin in Kaliumphosphat-Puffer pH = 7 betrug $3,6 \text{ mg L}^{-1}$. Nach der Trocknung des Films wurden 50 mL davon in die Gefäße gegeben. Auf eine Referenz wurde verzichtet. Die Ergebnisse werden in Diagramm 3-8 verdeutlicht.

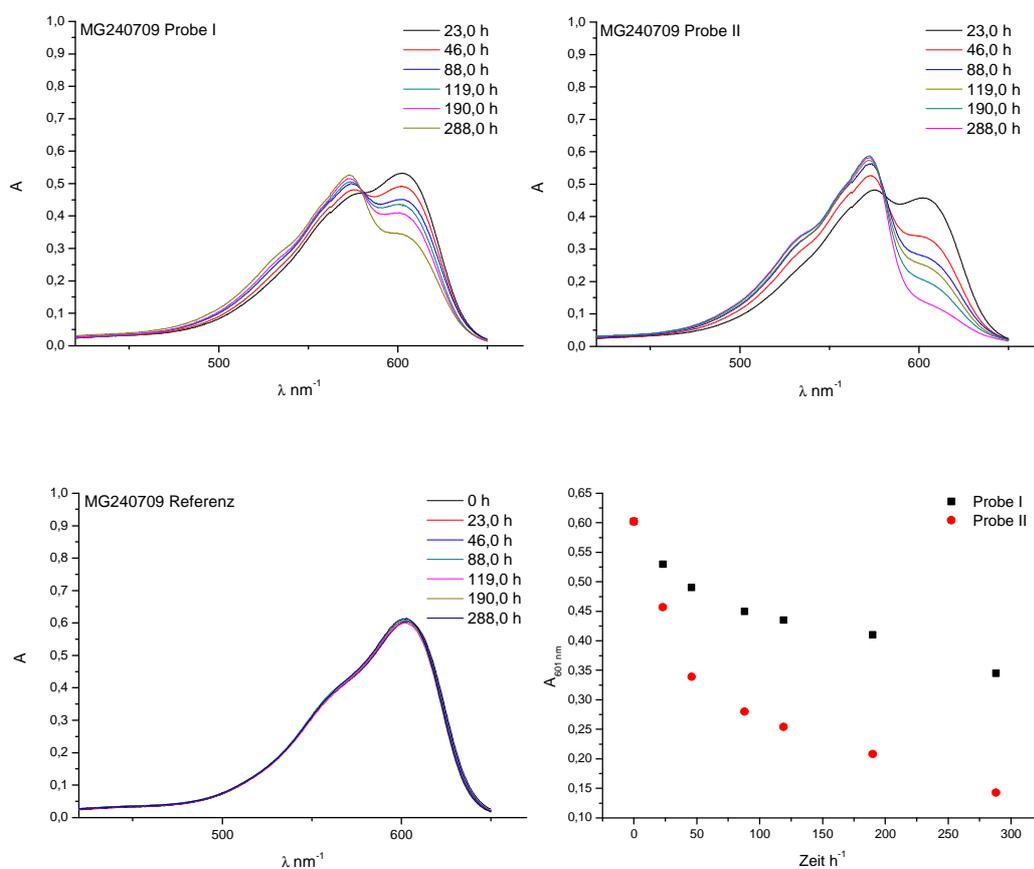


Diagramm 3-7: Die Abbildungen in der oberen Reihe zeigen Absorptionsspektren der Proben I und II von MG240709. Die linke Abbildung in der unteren Reihe zeigt die Absorptionsspektren der Referenzprobe. Die rechte untere Abbildung zeigt eine Auftragung der Absorption bei 601 nm gegen die Zeit für Probe I und II. Kontaminationen traten in keinem Fall auf.

Tabelle 3-40: Probenzusammensetzung. Verwendet wurde eine Lösung von PVA 28-99 mit 15 %. Die Partikel wurden direkt ausgefällt.

Probe	Bakterium	Menge PVA-Lsg.	Menge Sediment	Dispergieren
MG211009	<i>M. luteus</i>	3 g	0,5 g	10.000 U min^{-1} für 15 min

Tabelle 3-41: Zusammensetzung der Beschichtungslösung.

Probe	EtOH	15 % PVB	PVA-Partikel	Anteil PVA-Partikel am Film
MG221009	1,0 g	5,0 g	405 mg MG211009	35 %

Erneut war bei beiden Proben die für die Bakterienaktivität charakteristische Farbstoff-Umwandlung zu erkennen. Wie die beiden Graphen mit den Messkurven in Diagramm 3-8 erkennen lassen, ging die Stärke der dem Resazurin zuzuordnenden Absorption bei 601 nm beständig zurück. Unterschiede in der Umsetzungsrate waren bei Probe I und II zwar erkennbar, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie beim zuvor durchgeführten Versuch MG240709. Der Grund hierfür lag in der Masse der Filme, die durch die leicht modifizierte Herstellungsweise gleich war. Die dennoch erkennbaren, leichten Unterschiede könnten ihre Ursache in einer nicht vollständig homogenen Verteilung der die Bakterien enthaltenden PVA-Partikel in der Beschichtungslösung gehabt haben.

Bei Probe II war nach 328 Stunden auf den als Kontrolle angelegten Kulturen auf Agarplatten eine Kontamination feststellbar, was auch am Verlauf der zugehörigen Messkurve zu erkennen ist. Aus den Filmen austretende Bakterien wurden in keinem Fall festgestellt. Betrachtet man die Auftragung der Stärke der Absorption gegen die Zeit in Diagramm 3-8, so erkennt man bei Probe I, dass wie im vorangegangenen Versuch die Absorption und somit die Konzentration an Resazurin zu Beginn des Versuches schneller zurückging als gegen Ende. Im Gegensatz zu Probe I erscheint die Abnahme an Resazurin bei Probe II linear, was jedoch am deutlich zu niedrigen Absorptionswert bei 328 Stunden aufgrund der Kontamination durch Fremdbakterien in dieser Probe liegt.

Im Zuge der Versuche zum Nachweis der Aktivität, d.h. der Fähigkeit von in PVA-Partikeln immobilisierten Bakterien, die wiederum in einer Matrix aus einem nicht wasserlöslichen Polymeren eingelagert waren, konnten diverse neue Erkenntnisse gewonnen werden. So wurde gezeigt, dass zwischen den in Polyvinylbutyral eingelagerten Partikeln und einem wässrigen Medium, welches die Polyvinylbutyral Matrix umgibt ein Stoffaustausch stattfinden konnte, was durch die Freisetzung von Fluorescein-Natrium verdeutlicht wurde. Die Fähigkeit der immobilisierten Bakterien zur Umwandlung von Stoffen aus dem wässrigen Medium wurde durch die Reduktion von Resazurin aufgezeigt.

Die Fähigkeit der Umwandlung von Resazurin in Resorufin konnte als Bestätigung für die vorhandene Aktivität der Bakterien gewertet werden. Allerdings zeigten sich die fragileren *E. coli* den stabileren *M. luteus* gegenüber bei der Farbstoffumwandlung als unterlegen. Der Abbau von Resazurin konnte sowohl bei Faservliesen mit darin enthaltenen PVA-Partikeln, als auch bei Filmen beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Herstellung von Faservliesen in ausreichender Menge mit den zur Verfügung stehenden Methoden äußerst schwierig war. Kein Versuch mit Vliesen konnte ohne das Auftreten einer Kontamination durchgeführt werden. Die Herstellung kontaminationsfreier Filme konnte realisiert werden, wenn auch die Geschwindigkeit der Farbstoff-Umsetzung aufgrund der kleineren Oberfläche pro Gewichtseinheit geringer war.

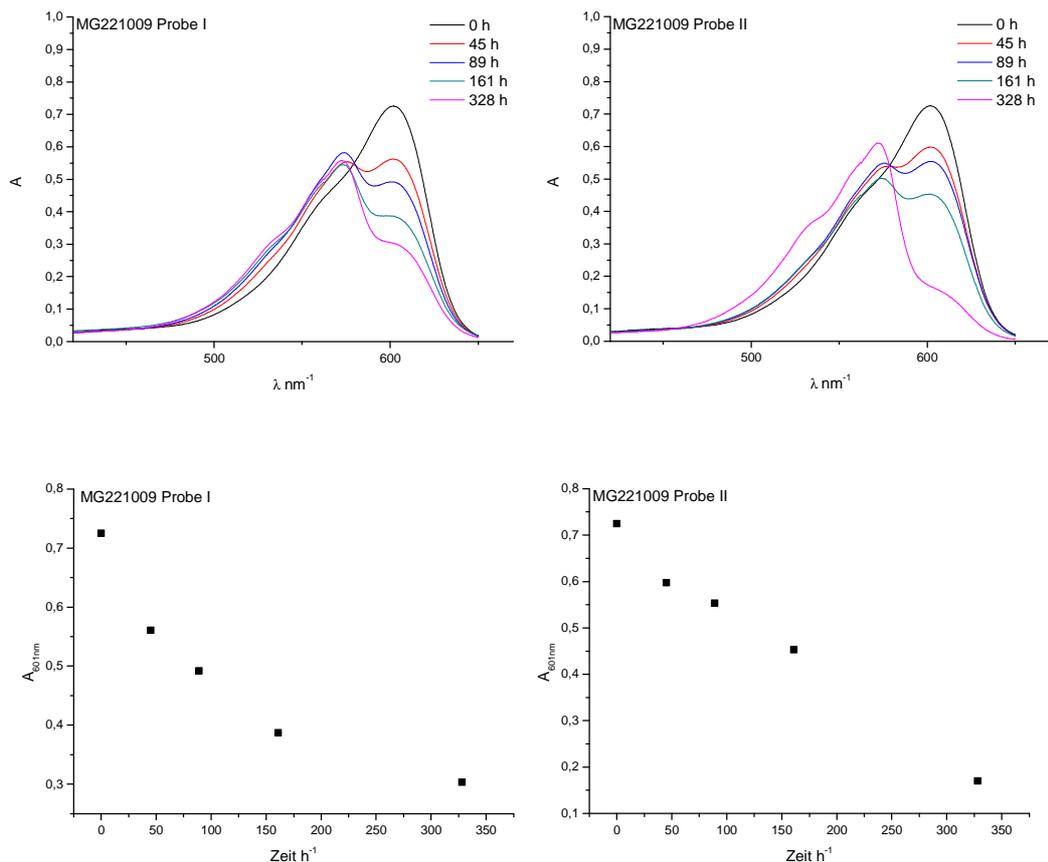


Diagramm 3-8: Die obere Reihe zeigt Absorptionsspektren der Proben I und II von MG221009. Probe I war kontaminationsfrei, bei Probe II wurde bei 328 Stunden eine Kontamination durch fremde Bakterien festgestellt. In der unteren Reihe sind Auftragungen der Absorption der Proben I und II bei 601 nm gegen die Zeit dargestellt. Bei Probe II wurde der Wert des Zeitpunktes bei dem die Kontamination auftrat mit aufgetragen.

3.3.12 Zusammenfassung

Es wurden Bakterien der Arten *E. coli* und *M. luteus* in Partikel aus Polyvinylalkohol eingebracht. Diese Partikel wurden in Aceton ausgefällt, wobei ihnen das Wasser entzogen wurde. Dadurch wurde ein trockenes Pulver erhalten, das aus genannten Partikeln mit einer breiten Verteilung des Durchmessers bestand. Es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien Innerhalb der Partikel lokalisiert waren und nicht auf ihrer Oberfläche. Tests ergaben, dass sich in den Partikeln, insbesondere bei einer Lagerung bei vier Grad Celsius auch noch nach vielen Monaten lebende Bakterien fanden. Dies galt sowohl für *M. luteus*, als auch für *E. coli*.

Da vorgesehen war, diese Partikel in Polymerlösungen auf der Basis organischer Lösungsmittel zu geben und diese dann durch Elektrosponnen zu Faservliesen zu verarbeiten, wurden die Partikel hinsichtlich ihrer schützenden Wirkung auf die eingeschlossenen Bakterien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Bakterien nicht abstarben, auch wenn die Partikel dem Lösungsmittel über mehrere Tage ausgesetzt waren. Hierbei war allerdings die Voraussetzung, dass das Lösungsmittel keines war, das Polyvinylalkohol lösen konnte. Eine Ausnahme bildete die Kombination *E. coli* enthaltender Partikel und Ethanol. Hier starben die Bakterien innerhalb von Stunden ab. Ihre Überlebensdauer war allerdings für eine sofortige Verarbeitung aus ethanolschen Lösungen ausreichend.

Nach der bewiesenen Schutzwirkung der Partikel auf die immobilisierten Bakterien, wurden diese in Lösungen aus verschiedenen Polymeren gegeben und versponnen. Das Resultat waren Faservliese aus wasserbeständigen Polymeren, die lebende Bakterien enthielten.

Des Weiteren konnte durch die Verwendung eines auf die Dehydrogenaseaktivität der Bakterien ansprechenden Farbstoffes gezeigt werden, dass die sich in den Partikeln befindenden Bakterien für einen Stoffaustausch mit einem wässrigen Medium zugänglich sind, auch wenn die Partikel in einen Film aus Polyvinylbutyral eingelagert sind. Es wurde hierbei ein Polymerfilm anstatt eines Faservlieses verwendet, um die Wahrscheinlichkeit durch Kontaminationen induzierter, falsch-positiver Nachweise zu minimieren.

Daneben wurden auch Versuche zur Herstellung von Partikeln aus alternativen Materialien und zur Herstellung feuchter Partikel in der Spinnlösung mit Alginat und Agarose durchgeführt, aufgrund des überlegenen, Polyvinylalkohol basierten Systems jedoch nicht weiter verfolgt.

3.4 Elektrogenesponnene Vliese zur Bakterienfiltration

3.4.1 Konzept

Die Entfernung von Bakterien und anderen Mikroorganismen aus Flüssigkeiten ist von großem Interesse. Denkbar sind hier Anwendungen im Bereich der Filtration von Prozesswasser, Kühlwasser, wassermischbaren Kühlschmierstoffen oder Treibstoffen. Zudem sind viele Pathogene, wie die Erreger von Cholera, Typhus und diverser Durchfallerkrankungen durch Filtration aus Trinkwasser entfernbar. Auch eignen sich solche Filter zur Entfernung unästhetischer Schwebstoffe aus dem Wasser.

Bei den vorangegangenen Arbeiten wurde Wissen und Erfahrung im Bereich der Kultivierung von Mikroorganismen und der Bestimmung ihrer Zahl in flüssigen Medien erworben. Die Technik des Elektrosinnens ermöglicht es, Vliese aus diversen Polymeren mit verschiedensten Eigenschaften wie Faserdurchmesser, Fasermorphologie, Porengröße und Dicke des Vlieses herzustellen. Da elektrogenesponnene Vliese Eigenschaften von Filtern besitzen und bereits Anwendungen in der Filtertechnik finden, war es nahe liegend, ihre Eignung in Bezug auf das Entfernen von Bakterien aus Flüssigkeiten zu untersuchen.

Im Verlaufe dieses kleineren Teils der Arbeit wurde die Eignung von elektrogenesponnenen Vliesen, insbesondere auf der Basis von Polyamid 6 zur Bakterienfiltration untersucht.

3.4.2 Herstellung der Filtervliese

Die Vliese wurden aus Lösungen von Polyamid 6 in reiner Ameisensäure durch Elektrosinnen hergestellt. Es wurde die gleiche Anlage wie bei den Versuchen zur Immobilisierung von Bakterien verwendet. Jedoch kamen zum Teil unterschiedliche Gegenelektroden zum Einsatz. Auch wurde die verwendete Anlage zwischenzeitlich von einem motorgetriebenen zu einem hydraulischen System zum Spritzenvorschub umgerüstet.

Eines der Hauptprobleme, welches überkommen werden musste, stellte die Herstellung von Filtervliesen von ausreichender Homogenität dar. So nahm die Dicke der Schicht aus

abgeschiedenen Fasern zum Rand der vom Polymerstrahl abgedeckten Fläche hin kontinuierlich ab. Eine, aus einem auf diese Weise hergestelltes Filtrervlies entnommene Probe würde also einen Gradienten bezüglich ihrer Dicken beinhalten. Zudem konnte festgestellt werden, dass die von Materialstrahl abgedeckte Fläche bei gleichen Parametern wie Spannung, Elektrodenabstand und Durchflussgeschwindigkeit stark variierte. Auch konnte beobachtet werden, dass sich die Lage der vom Strahl abgedeckten Fläche während des Spinnvorgangs veränderte, so dass die besponnene Fläche die Form mehrerer sich überlagernder Kreise hatte. Aus diesem Grund wurden zur Herstellung der Vliese bewegliche Gegenelektroden eingesetzt, um diesen Effekt so weit als möglich zu kompensieren. Schematische Zeichnungen sind in Abbildung 3-42 wiedergegeben.

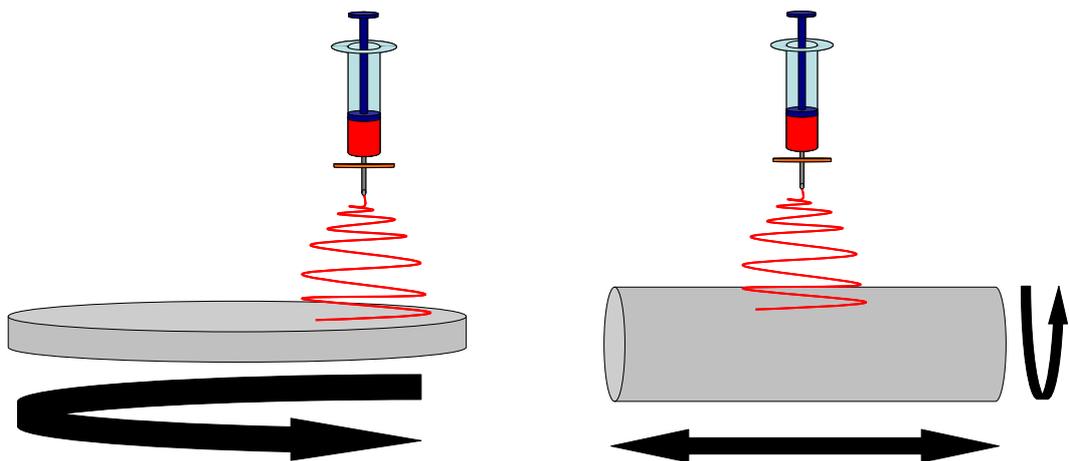


Abbildung 3-42: Schematische Zeichnung der beiden verwendeten Gegenelektroden-Varianten. Die linke Zeichnung zeigt die durch einen Elektromotor in Drehung versetzte Aluminiumscheibe, die rechte Zeichnung die sich drehende und in der Horizontalen bewegbare Walzelektrode.

Eine der verwendeten Gegenelektroden bestand aus einer geerdeten Aluminiumscheibe von zwölf Zentimetern Durchmesser, die durch einen Elektromotor in langsame Drehung versetzt werden konnte. Sie wurde so in der Anlage platziert, dass sich ihr Zentrum nicht unterhalb der Kanüle befand. Beim Spinnen bildete sich auf ihr eine schmale Bahn Vlies von ausreichender Homogenität. Die andere verwendete Gegenelektrode bestand aus einer geerdeten Aluminiumwalze, die ebenfalls durch einen Elektromotor in Rotation versetzt werden konnte. Zudem konnte die Walze durch einen weiteren Elektromotor in der Horizontalen bewegt werden, so dass der Bereich, aus dem ausreichend homogenes Filtrervlies entnommen werden konnte, im Gegensatz zur Aluminiumscheibe deutlich größer war.

Die verwendeten Lösungen von Polyamid 6 in Ameisensäure wiesen Konzentrationen im Bereich von 12 – 19 % auf. Die metallische Oberfläche der verwendeten Gegenelektroden wurde vor dem Spinnen mit einem Trägermaterial belegt. Zum Einsatz kamen Papier, Papierfilter und Polyestergewebe.

An der Kanüle der Spritze wurde eine Spannung von 30 kV angelegt, die Gegenelektrode wurde geerdet. Als Durchflussgeschwindigkeit wurde die niedrigst mögliche Stufe, entsprechend $0,17 \text{ mL h}^{-1}$, ausgewählt. Der Grund hierfür lag in der Beobachtung, dass sich bei höheren Durchflussraten in unregelmäßigen Zeitabständen kleinste Tropfen der Polymerlösung von der Kanüle lösten und noch in flüssigem Zustand auf die Gegenelektrode gelangten. Das enthaltene Lösungsmittel zerstörte dabei die bereits abgeschiedenen Fasern in der Umgebung des Tropfens und machte die Filter in ihrer Wirkung nicht mehr vergleichbar, da diese Fehlstellen in den nachfolgenden Tests eine große Zahl Bakterien passieren ließen.

Es wurden zwei Arten von Filtern hergestellt. Zum einen solche, die aus dünnen Schichten von Fasern auf Trägermaterialien wie Papierfilter oder Polyestergewebe bestanden und zum anderen solche, die komplett aus einem elektrogewebenen Vlies bestanden. Letztere wurden durch Spinnen auf Papier und anschließendes ablösen durch Eintauchen in ein Wasserbad hergestellt. Sie erwiesen sich jedoch aufgrund ihrer niedrigen Masse als sehr schwer handhabbar. Deshalb wurden die Versuche mit Vliesen durchgeführt, die auf Trägermaterialien gesponnen worden waren.

3.4.3 Eigenschaften der Filtervliese

Der Durchmesser der PA 6-Fasern konnte durch Variation der Polymerkonzentration in der zu verspinnenden Lösung beeinflusst werden. Eine höhere Konzentration führte zu vergrößerten Durchmessern. Jedoch war bei einer Zunahme der Konzentration von PA 6 in der Lösung auch eine Zunahme der feinen Netzwerke zwischen den Fasern zu beobachten. Das auftreten dieser Netzwerke konnte beim elektrostatischen Verspinnen von für Polyamid häufig beobachtet werden. Im Gegensatz zu den bei verschiedenen Proben aus Lösungen gleicher Konzentration erhaltenen Faserdurchmessern war jedoch die Häufigkeit

der Netzwerke nicht reproduzierbar. Es musste jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Strukturen, falls sie den mechanischen Belastungen eines Filtrationsprozesses widerstehen konnten, einen erheblichen Einfluss auf die Filterleistungen haben würden. Vergleiche der Proben vor und nach den Filtertests ließen jedoch vermuten, dass die Netzwerke der mechanischen Belastung nicht standhielten. So sind beispielsweise auf den Aufnahmen in Abbildung 3-45 keine Anzeichen der Netzwerke in den Bereichen zu erkennen, in denen Risse im Filterkuchen einen Blick auf das Vlies erlauben. Auch lassen sich auf dem auf Aufnahme D in Abbildung 3-47 abgebildeten Filtervlies, nach der Entfernung des Filterkuchens, keine Netzwerke identifizieren. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Fall die Netzwerke erst beim Abspülen des Filterkuchens zerstört worden waren. Aus diesem Grund ist eine abschließende Aussage an dieser Stelle nicht möglich.

In Abbildung 3-43 sind beispielhafte, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PA 6-Vliesen aus verschiedenen konzentrierten Lösungen abgebildet. Dabei zeigt Aufnahme A Fasern aus einer Lösung von 19 %, Aufnahme B aus 15 % und Aufnahme C aus 12 %. Die Aufnahmen A und B wurden beide bei 25.000-facher Vergrößerung aufgenommen, Aufnahme C bei 80.000-facher Vergrößerung. Deutlich ist die geringere Ausbildung der die Fasern verbindenden Netzwerke bei der niedriger konzentrierten Lösung zu erkennen. Bei der auf Aufnahme C abgebildeten Probe waren die Netzwerke nur noch vereinzelt zu beobachten. Vergleicht man die Aufnahmen untereinander, ist deutlich der mit der Polymerkonzentration sinkende Faserdurchmesser zu erkennen. Ein genauere Vergleich der verschiedenen Faserdurchmesser ist in Tabelle 3-42 gegeben. Die Bestimmung der Faserdurchmesser der Proben erfolgte mit dem Programm ImageJ anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen. Wie schon die Aufnahmen in Abbildung 3-43 erkennen ließen, nahm der Faserdurchmesser mit sinkender Konzentration ab. In der Tabelle ist zudem mit MG301007 der ermittelte Faserdurchmesser einer weiteren Probe angegeben, die wie MG051107 aus einer Polymerlösung mit 19 % hergestellt worden war. Hierbei zeigte sich, dass die bei einer bestimmten Konzentration erhaltenen Faserdurchmesser reproduziert werden konnten.

Neben den Durchmessern der Fasern wurden auch die Durchmesser der durch die Fasern gebildeten Poren untersucht. Hierzu wurden auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen Kreise so in die Poren gelegt, dass sie gleichzeitig zumindest drei Fasern berührten. Auch für diese Untersuchung wurde das Programm ImageJ verwendet. Es wurden als begrenzende Fasern einer Pore möglichst nur Fasern der oberen Lage verwendet. Auch wenn die Auswahl und die Definition der einzelnen Poren sicherlich gewissen subjektiven Einflüssen unterlagen, so waren die Ergebnisse zumindest dennoch für einen relativen Vergleich der Porengrößen der einzelnen Proben untereinander geeignet. Die ermittelten Porendurchmesser, sowie der Durchmesser der jeweils größten und kleinsten gemessenen Pore sind in Tabelle 3-43 aufgelistet.

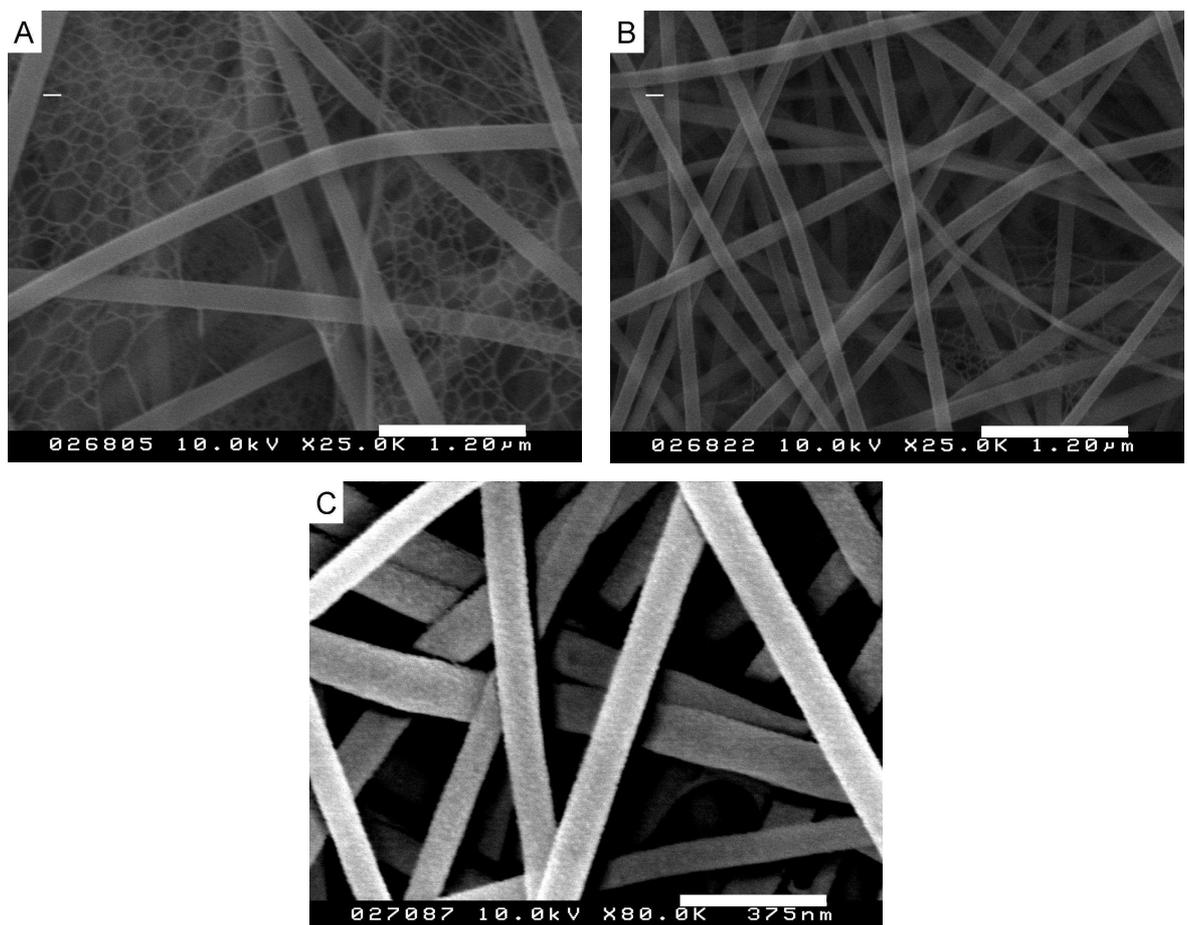


Abbildung 3-43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PA 6-Fasern aus verschiedenen konzentrierten Lösungen. A: MG051107, 19 % PA 6. B: MG061107, 15 % PA 6. C: MG071107 12 % PA 6.

Tabelle 3-42: Vergleich der Polyamid 6-Konzentration in der Spinnlösung mit den resultierenden Faserdurchmessern einiger Proben.

Probe	Konzentration PA 6	Faserdurchmesser / nm
MG301007	19 %	213 ± 45
MG051107	19 %	216 ± 33
MG061107	15 %	131 ± 18
MG071107	12 %	97 ± 15

Tabelle 3-43: Ermittelte durchschnittlicher Durchmesser der Poren, sowie Durchmesser der größten und kleinsten gemessenen Pore.

Probe	Porendurchmesser / nm	größte Pore / nm	kleinste Pore / nm
MG301007	1260 410	1980	690
MG051107	1400 ± 500	2570	650
MG061107	640 ± 290	1330	300
MG071107	270 ± 90	470	170

Es war deutlich zu erkennen, dass der Faserdurchmesser auf die ermittelte Porengröße, also der Durchmesser eines Partikels, der in der Lage wäre durch die Faserzwischenräume einer Lage zu passen, einen großen Einfluss hatte. Auch wenn die ermittelten Werte aus den zuvor genannten Gründen eine subjektive Komponente enthielten, so war der Trend der mit abnehmendem Faserdurchmesser geringer werdenden Porendurchmesser eindeutig erkennbar. Es bestand also folglich die Möglichkeit, über die gewählte Konzentration der Spinnlösung Einfluss auf den Porendurchmesser der hergestellten Vliese zu nehmen.

3.4.4 Bestimmung der Masse der Filtervliese

Die Bestimmung der Masse des Filtervlieses, also der Masse des auf das Trägermaterial aufgetragenen Polyamid 6, erwies sich als problematisch. Der Grund hierfür lag in der Uneinheitlichkeit der mit den beiden Gegenelektrodentypen hergestellten Filtervliese. So nahm die Schichtdicke bei der als horizontale Scheibe ausgebildeten Gegenelektrode zur Mitte hin ab, während sie bei der Walzenelektrode von der Mitte des besponnenen Bereichs nach außen hin abnahm. Ein Wiegen des gesamten Trägermaterials hätte als nur zu einem Durchschnittswert über das gesamte Filtervlies geführt. Dieser Durchschnittswert des Flächengewichtes wäre im Einzelfall weit vom realen Flächengewicht der getesteten

Filtervliese, die nur einen Durchmesser von 30 – 45 mm aufwiesen, entfernt gewesen. Ein Wiegen der zu testenden Filtervliese war jedoch aus mehreren Gründen ebenfalls nicht möglich. So war die Masse des aufgetragenen Polyamides im Verhältnis zu der Masse des Trägermaterials sehr gering. Auch die Aufnahme von Feuchtigkeit durch das Trägermaterial und das Polyamide aus der Luft, hatte einen Einfluss auf die ermittelten Flächengewichte. Dies hatte zur Folge, dass die Flächengewichte durch Wiegen nur äußerst ungenau bestimmt werden konnten.

Aus diesen Gründen wurde eine andere Methode zur Bestimmung des Flächengewichtes ausgewählt. Der zu verspinnenden Polyamid-Lösung wurde eine im Verhältnis zur Polymermasse bekannte Menge eines in Ameisensäure löslichen Farbstoffes zugesetzt. Aus dieser Lösung wurde durch Herstellen einer Verdünnungsreihe und Bestimmung der zu jeder Farbstoffkonzentration gehörenden Stärke der Absorption eine Kalibrationsgerade erstellt. Durch Auflösen eines Filtervlieses mit einer bekannten Fläche in einer bestimmten Menge Ameisensäure, konnte so das exakte Gewicht des aufgetragenen Polymeren berechnet werden. Die einem Test der Filtereffizienz ausgesetzten Vliese waren jedoch auf Grund der Verschmutzung und des Auswaschens von Farbstoff für die Massebestimmung nicht mehr brauchbar. Deshalb wurde die Masse jeweils mit Proben bestimmt, die eigens dafür aus dem von der Gegenelektrode abgenommenen Vlies entnommen worden waren. Hierbei wurde auf eine Vergleichbarkeit der Proben geachtet, d.h. sie wurden Zonen entnommen, die offensichtlich die gleiche Dicke aufwiesen entnommen.

Als Farbstoff wurde Fluorescein-Natriumsalz verwendet. Das Maximum der Absorption lag in der Polymerlösung bei 437,5 nm. Zur Veranschaulichung ist in Diagramm 3-9 das Absorptionsspektrum einer Probe von MG220109a dargestellt. Die typische Konzentration lag bei 130 mg Fluorescein-Natrium auf 40 g Polymerlösung. Dies entsprach 0,3 % bezogen auf die Polymerlösung bzw. zwei Prozent bezogen auf das reine Polymer.

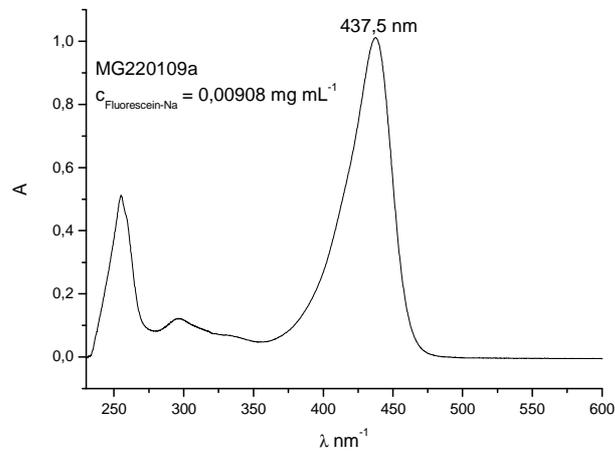


Diagramm 3-9: Absorptionsspektrum einer Verdünnungsstufe von MG220109a im Bereich zwischen 220 und 600 nm. Die Konzentration an Fluorescein-Natrium betrug $9,08 \cdot 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$.

Der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Fluorescein-Natrium und der Absorption bei 437,5 nm wird in Tabelle 3-44 sowie Diagramm 3-10 veranschaulicht. Wie der Auftragung zu entnehmen ist, steigt im untersuchten Bereich die Stärke der Absorption linear mit der Konzentration an.

Tabelle 3-44: Stärke der Absorption bei 437,5 nm und zugehörige Konzentration an Fluorescein-Natrium bei einer Verdünnungsreihe von MG220109a.

$A_{437,5} / \text{nm}^{-1}$	Konzentration / mg mL^{-1}
1,0124	0,00908
0,5225	0,00454
0,2671	0,00227
0,2089	0,00182
0,1030	0,000908
0,0513	0,00045

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Farbstoff Zusatzes zur Polyamid-Lösung auf die Spinneneigenschaften und hierbei vor allem auf den Durchmesser der Fasern, wurde ein Vergleichsexperiment durchgeführt. Es wurde eine Polyamid-Lösung in Ameisensäure der Konzentration 15 % hergestellt. Die Lösung wurde auf zwei Fraktionen aufgeteilt, wovon

eine mit Fluorescein-Natrium versetzt wurde. Die beiden Lösungen wurden unter gleichen Bedingungen versponnen und die Durchmesser der Fasern verglichen. Es wurden 17,0 mg Fluorescein-Natrium zu 5,15 g der Polyamid-Lösung gegeben. Gesponnen wurden beide Lösungen auf die mit Aluminiumfolie belegte Standard-Gegenelektrode. Die Spannung betrug 31 kV bei einem Abstand von 15 cm und einer Durchflussgeschwindigkeit von $0,17 \text{ mL h}^{-1}$. Die Proben wurden mit MG180309c für die ungefärbte und MG180309d für die gefärbte Lösung bezeichnet. In Abbildung 3-44 werden als Vergleich zwei rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nebeneinander gestellt.

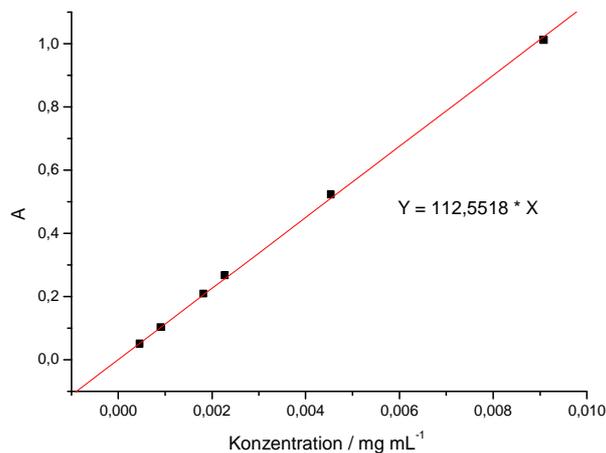


Diagramm 3-10: Auftragung der Stärke der Absorption der Verdünnungsstufen von MG220109a gegen die Konzentration an Fluorescein-Natrium.

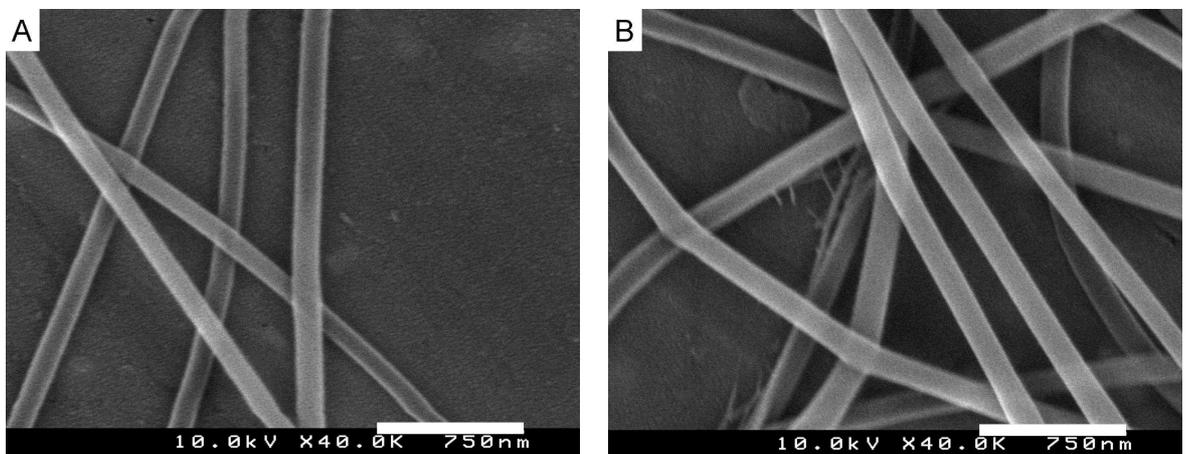


Abbildung 3-44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG180309c (A) und der mit Farbstoff versetzten Probe MG180309d (B).

Die anhand der Bilder ermittelten Durchmesser werden in Tabelle 3-45 angegeben. Wie auf den Aufnahmen A und B in Abbildung 3-44 zu erkennen ist, unterschied sich die Struktur der aus der mit Farbstoff versetzten Lösung erhaltenen Fasern nicht wesentlich von Fasern aus reiner Polyamid 6-Lösung. Die Fasern beider Proben waren glatt und wiesen keine erkennbaren Defekte auf. Auf Aufnahme B sind Zeichen für die Ausbildung eines Netzwerkes aus sehr dünnen Fasern zu erkennen, wie es bereits bei vorangegangenen Versuchen beim Verspinnen von Lösungen einer Konzentration von 15 % zu beobachten war.

Tabelle 3-45: Durchschnittlicher Faserdurchmesser, sowie maximaler und minimaler Durchmesser der gemessenen Fasern.

Probe	Durchmesser / nm	maximaler Durchmesser / nm	minimaler Durchmesser / nm
MG180309c	115 ± 17	143	68
MG180309d	133 ± 16	169	95

Auch die ermittelten Faserdurchmesser unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. So überschneiden sich die Fehlerbereiche der Durchmesser der Fasern beider Proben mit 115 ± 17 und 133 ± 16 deutlich. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der Zusatz von zwei Prozent Farbstoff zum Polymer keinen wesentlichen Einfluss auf die Leistungen der Filter haben würde.

Um einen direkten Vergleich zwischen der Verwendung einer Analysenwaage und der Farbstoff-Methode zu erhalten, wurde von einer Fläche von vier Quadratzentimetern der Probe MG230109c das Faservlies abgelöst, gewogen und anschließend in vier Millilitern Ameisensäure gelöst. Bei dieser Probe handelte es sich um ein auf ein Rundfilter von zwölf Millimeter Durchmesser gesponnenes Vlies. Verwendet wurde die scheibenförmige Gegenelektrode. Die Analysenwaage ermittelte ein Gewicht des Vlieses von $3,73 \text{ g m}^{-2}$ wohingegen die Farbstoff-Methode $2,98 \text{ g m}^{-2}$ ergab. Er lag also nur bei 80 % des mit der Waage ermittelten Wertes. Der Grund könnte beispielsweise in einer eventuellen Wasseraufnahme des Polymers bei Lagerung an der Luft liegen. Hierin lag ein weiterer Vorteil der Farbstoff-Methode, da solche Einflüsse keine Bedeutung für das Messergebnis hatten.

3.4.5 Untersuchung der Filtereigenschaften

Die Eigenschaften der Filtervliese hinsichtlich ihrer Filtrationswirkung bei mikrobiell belasteten Flüssigkeiten wurden mit Suspensionen von *E. coli* und *M. luteus* untersucht.

In ersten Versuchen wurden Suspensionen mit Bakterien-Konzentrationen im Bereich von mehreren Millionen pro Milliliter durch ein Filtervlies gegeben, das auf ein Papierfilter gesponnen worden war. Es wurden Vliese verwendet, die aus Polyamid 6-Lösungen mit 19 % (MG051107), sowie 15 % (MG231007) hergestellt worden waren. Die Vliese wurden danach getrocknet und mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Ausgewählte Aufnahmen sind in Abbildung 3-45 abgebildet.

Die Aufnahmen A und B zeigen die aus der Polyamid 6-Lösung mit einer Konzentration von 19 % hergestellte Probe nach dem Durchlauf einer *M. luteus*-Suspension. Bei der Aufnahme A erkennbaren, körnigen Struktur handelt es sich um den aus Bakterien bestehenden Filterkuchen. In der Mitte der Aufnahme verläuft ein Riss, der bei der Trocknung der Probe entstand. Aufnahme B zeigt einen Ausschnitt dieses Risses als Vergrößerung. Deutlich sind die unter dem Filterkuchen liegenden Polymerfasern zu erkennen. Die Aufnahmen C und D zeigen die aus der Lösung der Konzentration 15 % hergestellte Probe. Auch hier schied sich ein Filterkuchen ab, der bei der Trocknung riss. Eine Vergrößerte Aufnahme eines solchen Bereiches stellt Aufnahme C dar. Es ist bemerkenswert, dass die Bakterien in beiden Fällen nicht in das Faservlies eindringen, sondern auf der Oberfläche zu liegen kamen. Aufgrund dieser Erkenntnisse konnte davon ausgegangen werden, dass elektrogesponnene Polyamid 6-Vliese zu Zwecken der Bakterienfiltration brauchbar waren.

Um Proben von Filtervliesen zu Charakterisieren und untereinander vergleichen zu können, wurde ein Experiment zur Bestimmung der Filtereffizienz entworfen. Hierbei wurde eine bestimmte Menge einer Bakteriensuspension durch die Probe gegeben und anschließend die Zahl lebender Zellen im Filtrat und der ursprünglichen Suspension durch Anfertigen von Verdünnungsreihen und ausbringen auf Agarplatten bestimmt. Dies ermöglichte die Bestimmung der Filtereffizienz nach folgender Formel:

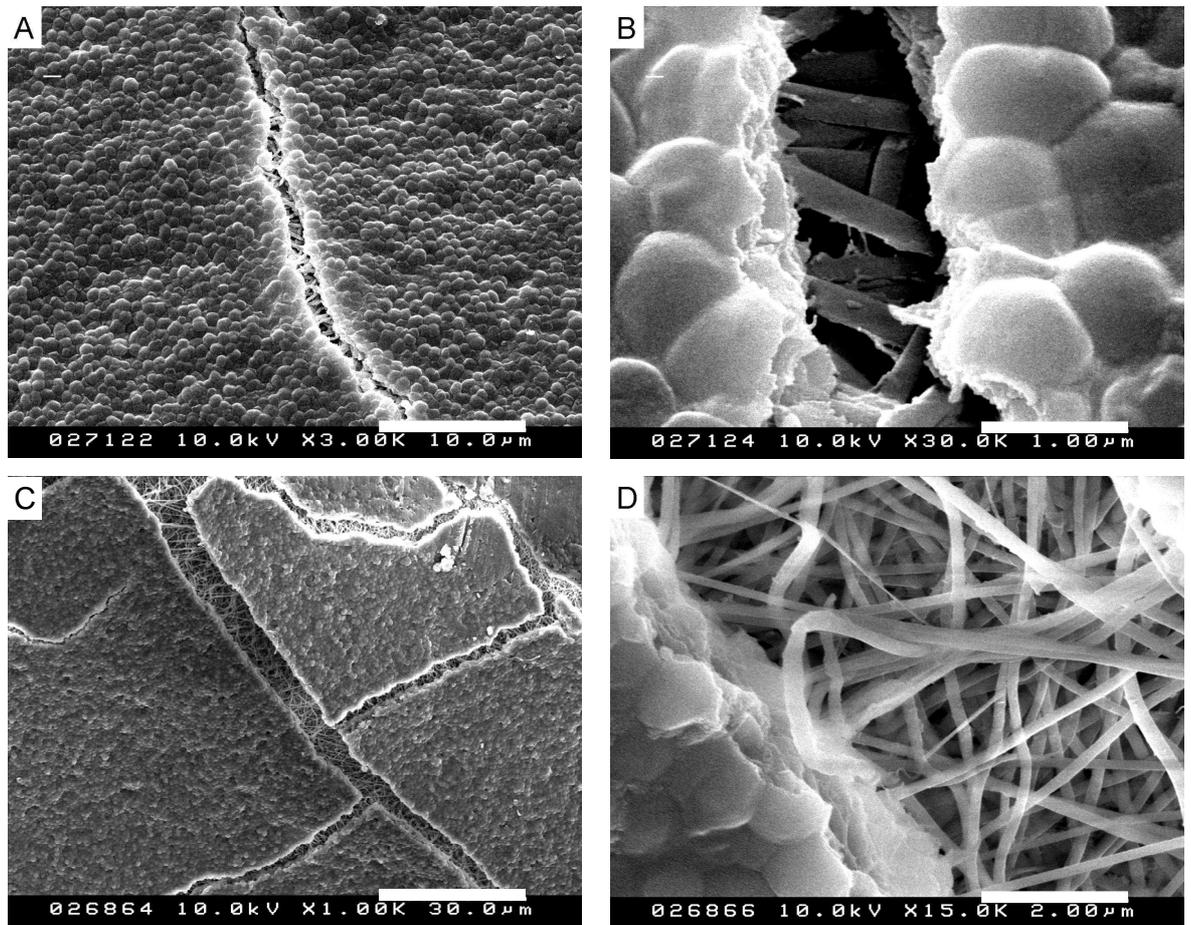


Abbildung 3-45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach einem Filtertest mit *M. luteus* von MG051107 (A, B) und MG231007 (C, D).

$$\eta = \frac{C_1 - C_2}{C_1}$$

Formel 1: Berechnung der Filtereffizienz η . C_1 bezeichnet die Bakterienkonzentration vor der Filtration, C_2 die Bakterienkonzentration nach der Filtration.

Eine Filtereffizienz von $\eta = 1$ bedeutete, dass alle Bakterien durch die Filtration entfernt worden waren. Die Filterprobe kam dabei auf einem Träger aus geschäumtem Glas mit einer Fläche von $3,1 \text{ cm}^2$ zu liegen. Die zu filtrierende Suspension wurde mit einem, durch eine Membranpumpe erzeugten Unterdruck durch die Probe gezogen.

Nachdem sich die Proben MG231007 und MG051107 wie bereits beschrieben als prinzipiell zur Bakterienfiltration geeignet erwiesen hatten, wurden Untersuchungen

durchgeführt, die das Ziel hatten, die Auswirkungen der Dicke der aufgetragenen Polyamid-Schicht auf die Filtrationsleistung zu testen. Die Serien MG231007 und MG051107 umfassten hierbei jeweils mehrere 30 mm Papierfilter, die auf der drehbaren, scheibenförmigen Elektrode verschieden lange besponnen worden waren. Die Bestimmung der Polymermasse erfolgte hierbei noch durch Wiegen. Die Ergebnisse können Tabelle 3-46 entnommen werden.

Tabelle 3-46: Vergleich von Spinnzeit, Polymermasse pro Quadratmeter und Filtereffizienz. Bei MG231007 wurde eine Polyamid 6-Lösung mit 15 % verwendet, bei MG051107 eine Lösung mit 19 %.

Probe	Spinnzeit / min	Polymermasse / g m ²	LZ vor Filter / KBE mL ⁻¹	LZ nach Filter / KBE mL ⁻¹	Filtereffizienz η
MG231007	2,5	0,51	290000	29000	0,90000
	5	0,76	290000	9200	0,96828
	10	1,01	290000	20	0,99993
	15	1,26	290000	0	1
	30	3,29	290000	0	1
	45	3,92	290000	0	1
	60	7,59	290000	0	1
MG051107	2,5	2,15	7600000	5680000	0,22895
	5	1,90	7600000	20600	0,99729
	7	2,02	7600000	9400	0,99876
	10	2,02	7600000	7600	0,99900
	15	3,16	7600000	0	1
	30	4,68	7600000	120	0,99998

Die Daten lassen deutlich erkennen, dass die Effizienz der Filter mit der Spinnzeit und somit mit der Masse des aufgetragenen Polymeren anstieg. Die Polymermassen erschienen im Vergleich mit den später vorgenommenen Experimenten etwas hoch. Diese Vermutung wurde auch durch die mit der Probe MG230109c gemachten Beobachtungen beim Vergleich von Waage und Farbstoff-Methode untermauert. Dennoch konnte den Daten entnommen werden, dass mit beiden Konzentrationen Filtereffizienzen von eins erreicht werden konnte. Bemerkenswert war auch, dass die für 30 Minuten besponnene Probe von MG051107 im Gegensatz zur nur 15 Minuten besponnenen 120 Bakterien pro 100 mL durchließ. Die wahrscheinliche Ursache für diesen, dennoch geringen Wert, war das

Vorhandensein eines Defektes im Vliese, der durch den Abgang eines Tropfens beim Spinnprozess verursacht worden war. Aus diesem Grund wurde beschlossen, den Einfluss von durch Auftreffen von Tropfen aus Polymerlösung verursachten Defekten im Filtervlies näher zu untersuchen.

Um einen Eindruck zu erhalten, wie stark das Auftreffen eines solchen, bereits mehrfach erwähnten Tropfens während des Spinnprozesses die Filtereffizienz beeinflusst, wurden entsprechende Proben hergestellt. Die Spinnbedingungen wurden dabei so gewählt, dass Tropfenabgänge begünstigt waren. Hierzu wurde die Durchflussrate an der Kanüle auf $0,34 \text{ mL h}^{-1}$ gesteigert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3-47 zusammengefasst.

Tabelle 3-47: Untersuchung des Einflusses von Defekten im Filtervlies, die durch das Auftreffen von Polymerlösung während des Spinnens verursacht worden waren. Zusammenhang zwischen Spinnzeit, Polymermasse, Defektzahl und Filtereffizienz bei MG261007.

Spinnzeit / min	Polymermasse / g m^2	Defekte	LZ vor Filter / KBE mL^{-1}	LZ nach Filter / KBE mL^{-1}	Filtereffizienz η
2,5	1,26	1	209000	1400	0,99330
10	2,53	2	209000	1100	0,99474
15	2,78	4	209000	3200	0,98469
30	4,30	10	209000	8500	0,95933
45	6,32	14	209000	8600	0,95885

Auch in diesem Fall konnte eine Zunahme der Menge an aufgetragenem Polyamid bei steigender Spinnzeit beobachtet werden. Da während des Herstellungsprozesses im Abstand weniger Minuten von der Kanüle abgehende Tropfen auf die Filtervliese trafen, nahm auch die Zahl der Defekte pro 30 mm Filterprobe zu. Sie lag zwischen einem Defekt nach 2,5 Minuten und 14 Defekten nach 45 Minuten. Anschließend wurde die Filtereffizienz, wie zuvor beschrieben, mit Bakteriensuspension überprüft. Betrachtet man die Zahl der Kolonien bildenden Einheiten in Tabelle 3-47, so ist zu erkennen, dass die Proben, die nur einen oder zwei Defekte aufwiesen die besten Filtereffizienzen zeigten. So versechsfachte sich die Zahl der Kolonien bildenden Einheiten pro Milliliter Filtrat zwischen einem und 14 Defekten trotz gleichzeitig stark steigender Masse an Polyamid 6 im Filtervlies. Dies verdeutlichte erneut, dass bei der Herstellung der Vliese durch

Auswahl der geeigneten Parameter ein Abgang von Tropfen unbedingt vermieden werden musste.

Zur Verifizierung und Präzisierung der zuvor erhaltenen Ergebnisse, wurde der Versuch zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Polymermasse und Filtereffizienz mit leichten Modifikationen wiederholt. Im Gegensatz zur zuvor verwendeten, scheibenförmigen Gegenelektrode kam die walzenförmige zum Einsatz. Dies erlaubte die Herstellung einer größeren Menge Filterproben mit gleichem Flächengewicht. Zur genauen Ermittlung des Flächengewichtes wurde die Polyamid 6-Lösung mit Fluorescein-Natrium versetzt. Verwendet wurde die Lösung MG220109a, deren Spezifikationen bereits in Abschnitt 3.4.4 beschrieben wurden. Die in Abbildung 3-42 beschriebene, walzenförmige Gegenelektrode wurde mit einer Bahn Filterpapier belegt, geerdet und aus 13 cm Entfernung bei einer Durchflussrate von $0,17 \text{ mL h}^{-1}$ und einer Spannung von 30 kV besponnen. Die resultierenden Proben trugen die Bezeichnung MG280109. In Abbildung 3-46 ist exemplarisch ein mit der walzenförmigen Gegenelektrode hergestelltes Vlies abgebildet. Die Lage der entnommenen Proben ist deutlich zu erkennen.

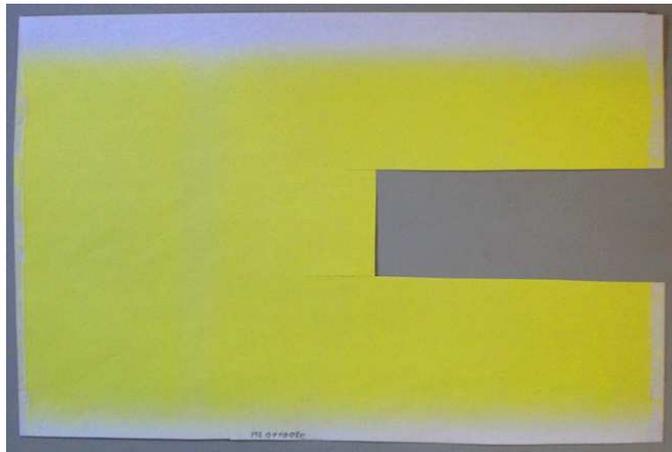


Abbildung 3-46: Vlies von MG011008. Die Entnahme der Proben erfolgte aus einem Streifen in der Mitte des Vlieses. Im linken Drittel des Vlieses ist ein senkrechter Streifen mit einer geringeren Belegung an Polyamid 6 zu erkennen. Die Ursache liegt am an dieser Stelle fehlenden Kontakt zur Elektrode.

Es wurden Proben untersucht, die über verschieden lange Zeiträume besponnen worden waren. Die Bestimmung des Flächengewichtes geschah mit der in Abschnitt 3.4.4

beschriebenen Methode. Es wurden jeweils Stücke mit einer Fläche von vier Quadratzentimetern verwendet und mit zwei Millilitern Ameisensäure versetzt. Die untersuchten Proben, sowie die ermittelten Werte sind in Tabelle 3-48 zusammengefasst.

Tabelle 3-48: Flächengewichtsbestimmung verschiedener Proben von MG280109.

Probe	Spinnzeit / min	A _{437,5nm}	Fluorescein-Na / mg L ⁻¹	Polyamid 6 / g m ²
MG280109a	10	0,0920	0,7968	0,184
	10	0,0946	0,8193	0,190
	10	0,0831	0,7197	0,167
MG280109e	30	0,1749	1,5148	0,351
	30	0,1821	1,5771	0,365
	30	0,167	1,4464	0,335
MG280109g	60	0,5263	4,5582	1,055
	60	0,4394	3,8056	0,881
	60	0,4351	3,7683	0,872
MG280109h	60	0,3728	3,2286	0,747
	60	0,4140	3,5856	0,830
	60	0,3921	3,3959	0,786

Durch die Färbung des Polyamid 6 mit Fluorescein-Natriumsalz fluoreszierten die Fasern nach dem Verspinnen wenn sie mit einer UV-Lampe angestrahlt wurden. Hierbei war bereits zu erkennen, dass die Verteilung der Fasern auf der Filteroberflächen nicht vollständig homogen war. Die nachfolgende Bestimmung der Flächengewichte mehrerer Stücke aus der gleichen Probe bestätigte diese Beobachtung, so betrug beispielsweise das niedrigste bestimmte Flächengewicht der Probe MG280109g nur 83 % des höchsten. Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen mit dem Durchschnittswert aus den jeweils drei bestimmten Flächengewichten gearbeitet.

Zur Bestimmung der Filtereffizienz η wurde eine Suspension von *E. coli* in Nährlösung verwendet. *E. coli* wurde aufgrund seines deutlich schnelleren Wachstums ausgewählt, was eine schnellere Auswertung der Experimente ermöglichte. Zudem weißt *E. coli* keine Tendenz zur Bildung von Agglomeraten wie *M. luteus* auf, wodurch eine mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte, da ein Bakterium auf den Agarplatten auch immer eine Kolonie bildete. Das Nährmedium wurde mit Bakterien versetzt und inkubiert,

hierbei wurde die OD_{578} in regelmäßigen Zeitabständen ermittelt. Nach drei Stunden wurde $OD_{578} = 0,137$ erreicht und die Bakteriensuspension durch Eiswasser gekühlt. Nach Durchführung des Experimentes weitere vier Stunden später wurde $OD_{578} = 0,139$ ermittelt. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Bakterienkonzentration der zu filtrierenden Suspension während der Ausführung der Filtertests konstant geblieben war. Zur Bestimmung der Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten in der zu filtrierenden Suspension wurden Verdünnungsreihen angefertigt und je 100 μL auf Agarplatten verstrichen. Es wurden pro Verdünnungsstufe zwei Agarplatten angelegt.

Es wurden jeweils 30 mL der Bakteriensuspension, mittels eines durch eine Membranpumpe erzeugten Unterdruckes, durch die Probe gezogen. Die Werte für Flächengewicht, Durchlaufzeit für 30 mL, Zahl der KBE vor und nach der Filtration, sowie der Filtereffizienz werden in Tabelle 3-49 zusammengefasst. Die angegebenen Werte für die Probe MG280109h entstammten einem zuvor durchgeführten Test zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der auf diese Weise gewonnenen Werte unter Verwendung einer anderen Bakteriensuspension.

Tabelle 3-49: Daten zu den untersuchten Vliesen, sowie Ergebnisse der Untersuchungen. Die Messungen der Filtereffizienz bei MG280109h wurden zu einem verschiedenen Zeitpunkt mit einer anderen Suspension durchgeführt. Als Vergleich sind die Werte für einen unbeschichteten Papierfilter angegeben.

Probe	Flächengewicht / g m^2	Durchlaufzeit / s	KBE vor Filtration / mL^{-1}	KBE nach Filtration / mL^{-1}	Effizienz η
MG280109a	0,153	15	$3,63 \cdot 10^6$	$1,75 \cdot 10^6$	0,518
MG280109e	0,350	85	$3,63 \cdot 10^6$	$3,32 \cdot 10^5$	0,909
MG280109g	0,936	120	$3,63 \cdot 10^6$	34.800	0,990
MG280109h I	0,788	135	$2,38 \cdot 10^7$	2300	0,999
MG280109h II	0,788	145	$2,38 \cdot 10^7$	3100	0,999
Papierfilter	-	5	$3,63 \cdot 10^6$	$3,45 \cdot 10^6$	0,050

Der Anstieg der Filtereffizienz η mit der Masse des aufgetragenen Polyamides ist anhand der Zahlen deutlich erkennbar. So wurden bereits mit einem Auftrag von $0,153 \text{ g m}^2$ Polyamid 51,8 % der in der Suspension enthaltenen Bakterien entfernt. Ein Auftrag von $0,788$ und $0,936 \text{ g m}^2$ ermöglichte bereits die Entfernung von bis zu 99,9 %. Zur

Veranschaulichung werden η und das Flächengewicht in Diagramm 3-11 gegenübergestellt.

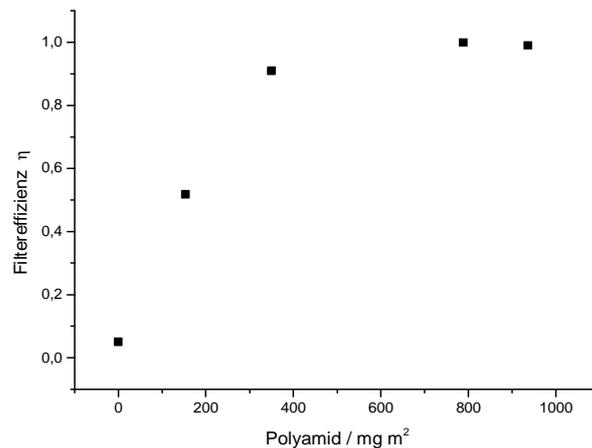


Diagramm 3-11: Auftragung der Filtereffizienz η der Proben von MG280109 gegen das Flächengewicht der Polyamid 6-Vliese.

In die Auftragung wurde auch der η -Wert für ein unbeschichtetes Papierfilter, wie es im Versuch als Trägermaterial für die Polyamid 6-Vliese diente, übernommen. In diesem Falle war im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch keine Filterwirkung erkennbar. Dies wurde auch durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Papierfiltern belegt, durch die zuerst eine Bakteriensuspension gefolgt von Wasser geleitet worden war. Weder bei der Verwendung von *E. coli* noch bei der Verwendung von *M. luteus* konnten Strukturen gefunden werden, die den entsprechenden Bakterien zuzuordnen waren.

Erwartungsgemäß stiegen auch die Zeiten, die 30 mL Bakteriensuspension benötigten, um das Filtrervlies zu passieren deutlich an. Dabei dürfte, insbesondere bei den Proben mit einer hohen Filtereffizienz, die Ausbildung eines Filterkuchens eine nicht unerhebliche Rolle gespielt haben. Nach Ausbau der Vliese aus der Testapparatur, konnten die abgeschiedenen Bakterien mit bloßem Auge als gräuliche Schicht erkannt werden. Da Schwankungen in der Güte des Unterdruckes nicht ausgeschlossen werden konnten, lässt sich aus den Durchlaufzeiten der Proben MG280109g und MG280109h keine eindeutige

Aussage ableiten. Dennoch ist der Trend hin zu längeren Durchlaufzeiten bei stärkeren Polymerschichten eindeutig erkennbar.

Vergleicht man die hier erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Filtereffizienz η mit den Werten von MG231007 in Tabelle 3-46, so sind die Filtrationsleistungen der in beiden Fällen aus einer Polyamid 6-Lösung mit 19 % hergestellten Proben vergleichbar. Allerdings wurde bei MG211007 ein η -Wert von 0,9 erst bei einem Flächengewicht von $0,51 \text{ g m}^2$ erreicht. Dies bestätigte die Erfahrung, dass die durch Wägen bestimmten Flächengewichte ein wenig zu hoch ausfielen.

3.4.6 Praxisbezogene Untersuchungen

Um erste Erkenntnisse hinsichtlich einer eventuellen Verwendbarkeit solcher Filtervliese in der Filtration von Flüssigkeiten zu erhalten, wurden Untersuchungen zu Filtration von Wasser durchgeführt.

In einem ersten Versuch wurden die zuvor verwendete Apparatur über einen Schlauch mit der Wasserleitung verbunden und zehn Liter Wasser durch ein Filtervlies geleitet. Es wurde in diesem Fall kein Unterdruck angewendet. Die Filterfläche betrug $3,14 \text{ cm}^2$. Das verwendete Vlies entstammte der Charge MG010808c und war auf der scheibenförmigen Gegenelektrode unter Verwendung einer Polyamid 6-Lösung mit einer Konzentration von 20 % hergestellt worden.

Wie auf Aufnahme A in Abbildung 3-47 zu erkennen ist, wies die Probe eine geschlossene Oberfläche auf, das darunter liegende Filterpapier war nicht zu erkennen. Der weiße Balken in der Aufnahme repräsentiert eine Länge von einem Mikrometer. Ausgehend von den Durchmesser von *E. coli* und *M. luteus* konnte davon ausgegangen werden, dass das Filtervlies in der Lage war, Bakterien aus dem Wasser zu entfernen. Der Wasserfluss wurde auf einen Liter pro Stunde eingeregelt. Nach Beendigung des Versuches wurde das Vlies getrocknet, wobei sich der Filterkuchen an einer Stelle löste. Es folgte eine Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop. Die Aufnahmen werden ebenfalls in Abbildung 3-47 dargestellt. Auf Aufnahme B ist der Übergang zwischen dem Teil des

Vlieses, durch den das Wasser geflossen war und dem Teil, der unter dem Rand der Apparatur lag abgebildet. Am unteren Rand der Aufnahme ist deutlich zu erkennen, dass Material, das aus dem Wasser stammte, abfiltriert worden war. Aufnahme C wiederum zeigt diese Ablagerungen, also den Filterkuchen, bei einer höheren Vergrößerung. Über die Zusammensetzung des Filterkuchens konnten keine Aussagen gewonnen werden, jedoch legen die Form der Partikel und die rotbraune Färbung des Filterkuchens nahe, dass es sich um mineralische Materialien wie Rost handelte. Bei den auf Aufnahme D erkennbaren Strukturen, die nach dem Entfernen des Filterkuchens sichtbar geworden waren, könnte es sich allerdings um Bakterien handeln. Aufnahme D zeigt zudem auch, dass die Fasern des Vlieses beim Filtrationsprozess offensichtlich nicht beschädigt worden waren.

Dies legte die Vermutung nahe, dass im Betrieb eines solchen Filters der Filterkuchen eventuell durch einen gegenläufigen Druckimpuls weggespült werden und die Einsatzdauer des Filters verlängert werden könnte.

In einem nächsten Schritt sollte die Beständigkeit der Filter untersucht werden. Hierzu sollte eine große Menge Wasser durch die Filter geleitet und anschließend mit Hilfe einer Bakteriensuspension überprüft werden, ob eine Filterwirkung noch gegeben war. Anstelle von Filterpapier wurde die hierbei verwendete Probe MG030809b auf ein Polyestergewebe mit der Bezeichnung Reemay 2214 gesponnen. Es wurde eine Polyamid 6-Lösung der Konzentration 15 % verwendet. Gesponnen wurde auf die mit dem Gewebe belegte, walzenförmige Gegenelektrode. Die Filtereffizienz wurde vor dem Test mit einer *E. coli* Suspension überprüft und zu $\eta = 1$ bestimmt.

Da die bisher verwendete Apparatur den Drücken, die die Filtration einer größeren Menge Wasser in einer akzeptablen Zeit benötigte nicht gewachsen war, wurden speziell zu diesem Zweck entworfene Apparaturen eingesetzt. Diese bestanden im Wesentlichen aus einem zerlegbaren Gehäuse aus Stahl, in das eine Halterung aus PVC eingelegt werden konnte, die das zu testende Filtervlies enthielt.

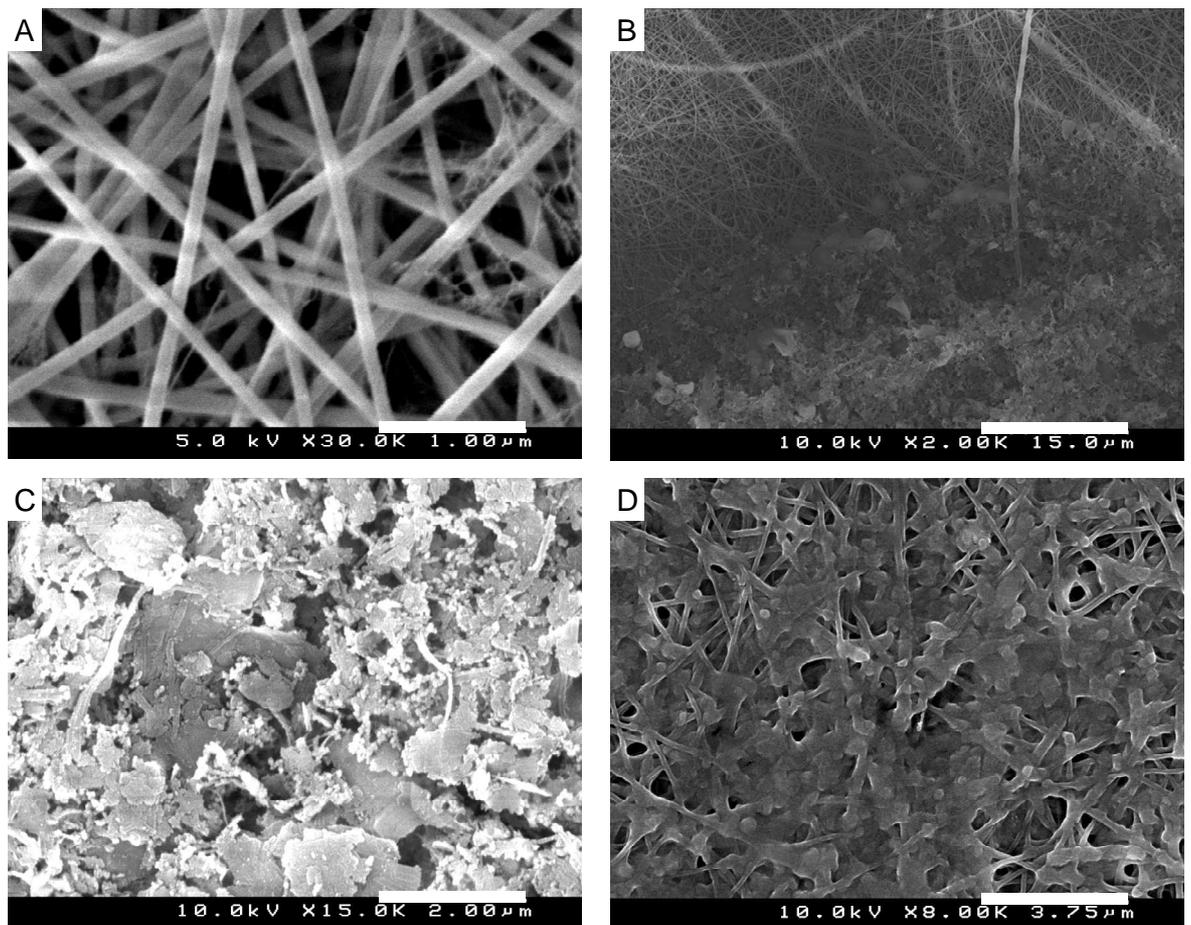


Abbildung 3-47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MG010808c. Dabei zeigt Aufnahme A das Vlies vor dem Filtertest. Aufnahme B zeigt den Bereich des Überganges des vom Wasser durchflossenen Teils, zum nicht durchflossenen Bereich. Aufnahme C zeigt den Filterkuchen, Aufnahme D das Vlies nach dem Entfernen des Filterkuchens.

Als Druckquelle diente das Leitungswasser selbst. Bei dem verwendeten PVC-Einsatz betrug die aktive Filterfläche $12,6 \text{ cm}^2$. Die Apparatur wurde mit der Wasserleitung verbunden und der Druck so gewählt, dass ein steter Wasserfluss aus dem Auslass der Apparatur erkennbar war. Nach sechs Stunden und 940 L Wasser wurde der Versuch beendet die Durchflussrate lag über den gesamten Versuch gemittelt bei $2,6 \text{ L min}^{-1}$. Nach der Entnahme aus der Apparatur war auf der Filtermembran ein dicker, rotbrauner Filterkuchen zu erkennen. Um auf eine noch vorhandene Filterwirkung gegenüber Bakterien und somit die Integrität des Filters zu überprüfen, wurden 20 Milliliter einer *E. coli* Suspension durch die Membran gegeben. Die verwendete Suspension hatte eine Konzentration von mehreren Millionen Zellen pro Milliliter. Hierbei wurde auf die Bestimmung von η verzichtet, da die vollständige Entfernung der Bakterien und somit keine KBE im Filtrat angestrebt wurden. Es kam die bei den Filterversuchen in

Abschnitt 3.4.5 verwendete Apparatur zum Einsatz. Zunächst wurde Versucht, die Integrität ohne die Entnahme des Vlieses aus der PVC-Halterung zu prüfen, da die Möglichkeit diese dabei zu beschädigen ausgeschlossen werden sollte. Es konnte jedoch keine Filtrationsleistung festgestellt werden, was vermuten ließ, dass die zu filtrierende Lösung das Vlies umgangen hatte. Aus diesem Grund wurde das Vlies vorsichtig entnommen und wie in den Versuchen in Abschnitt 3.4.5 auf den Träger gelegt. Es fanden sich 500 KBE in 0,1 mL Filtrat. Dies entsprach zwar bereits einer sehr guten Filtrationsleistung, war jedoch noch nicht die angestrebte Reduktion auf Null. Es Bestand jedoch die Möglichkeit, dass die Zellen von der eventuell beim Versuch, die nicht der PVC-Halterung entnommene Membran zu testen kontaminierten Unterseite des Vlieses stammten. Eine eventuelle größere Beschädigung am Vlies konnte jedoch bereits an dieser Stelle ausgeschlossen werden, das die Zahl der KBE im Filtrat hier wesentlich höher gewesen wäre.

Der Versuch wurde mit einer leicht modifizierten Apparatur wiederholt. Diese bestand ebenfalls aus einem Edelstahlgehäuse. Auch wurde die PVC-Halterung für das Filtervlies leicht modifiziert. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bei der zuvor verwendeten Apparatur Wasser die PVC-Halterung und somit das Filtervlies umgehen konnte, wurde die Apparatur einer Dichtigkeitsprüfung unterzogen. Hierzu wurde eine PVC-Halterung eingesetzt, die statt eines Vlieses eine Barriere enthielt, die Außenseite wurde mit Fluorescein-Natriumsalz beschichtet. An der PVC-Halterung vorbei fließendes Wasser wäre dadurch intensiv gefärbt worden. Die Apparatur wurde mit der Wasserleitung verbunden und dem vollen Leitungsdruck belastet, der mit einem Druckmesser verfolgt wurde. Während des Testes wurde die Apparatur mit maximal 4,5 bar belastet. Es konnte kein austretendes, grün gefärbtes Wasser gefunden werden. Dies war ein Beleg dafür, dass die modifizierte Apparatur alles Wasser durch die PVC-Halterung leitete.

Zur Durchführung des eigentlichen Tests wurde die PVC-Halterung mit einem Filtervlies aus der Charge MG030809a. Das Vlies war aus einer Polyamid 6-Lösung der Konzentration 15 % hergestellt worden. Als Filtereffizienz wurde $\eta = 1$ ermittelt. Die Apparatur wurde mit der Wasserleitung verbunden und mit dem vollen Druck belastet. Der Leitungsdruck wurde mit einem Druckmesser verfolgt und schwankte zwischen 2,5 und

5 bar. Nach 7,5 Stunden hatten rund 1000 L das Vlies durchflossen, was einer durchschnittlichen Flussrate von $2,2 \text{ L min}^{-1}$ entsprach. Eine Verlangsamung der Flussrate mit der Zeit konnte nicht festgestellt werden. Wie bei den vorangegangenen Versuchen hatte sich ein bräunlicher Filterkuchen abgeschieden.

Um zu überprüfen, ob das Filtervlies eventuell beschädigt worden war und seine Filtereffizienz teilweise verloren hatte, wurde das Restwasser aus der Apparatur entfernt und durch eine Suspension von *E. coli* ersetzt. Anschließend wurde die Apparatur erneut mit der Wasserleitung verbunden und die Bakteriensuspension mit Hilfe des Wasserdruckes durch das Vlies gepresst. Im aufgefangenen Filtrat konnten keine *E. coli* Bakterien nachgewiesen werden. Die auf einer Agarplatte ausgestrichene Probe des Filterkuchens hingegen zeigte heftiges Wachstum der Bakterien.

3.4.7 Zusammenfassung

Es wurden Faservliese aus Polyamid 6 hergestellt und auf ihre Eignung als Filtermaterialien zur Entfernung von bakteriellen Verunreinigungen aus wässrigen Medien hin untersucht. Da die Flächengewichte der PA 6 Vliese sehr gering waren, wurden sie bei ihrer Herstellung auf Trägermaterialien aufgebracht, um sie besser handhaben zu können und ihnen die notwendige Stabilität zu verleihen. Um das Flächengewicht der Filtervliese unabhängig vom Wassergehalt der Fasern oder des Trägermaterials exakt bestimmen zu können, wurde der Spinnlösung ein Farbstoff zugesetzt. Die Menge des Farbstoffes in einer Probe und somit die genaue Menge an PA 6 konnte nach dem Auflösen der Probe genau bestimmt werden.

Bei den folgenden Versuchen zur Effizienz der Filter zeigte es sich, dass es möglich war, mit Flächengewichten der Faservliese von knapp unter einem Gramm, die Bakterienzahl in einer Bakteriensuspension quasi auf Null zu reduzieren.

Die Vliese widerstanden zudem auch dem Durchlauf einer Wassermenge im Bereich von 1000 L. Dabei bildete sich auf ihnen ein Filterkuchen, der wieder entfernt werden konnte.

Unterhalb des Filterkuchens erschienen die Fasern unversehrt. Auch nach diesem Test waren die Vliese noch in der Lage ihre ursprüngliche Filtereffizienz zu zeigen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Materialien

<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
Aceton	BASF, destillativ gereinigt
Agar-Agar	Roth, eingesetzt wie erhalten
Alginsäure Natriumsalz	Roth
Calcofluor M2R (Fluorescent Brightener 28)	Sigma
Chloroform	BASF, destillativ gereinigt
Dibutylzinndilaurat	Sigma
Dichlormethan	BASF, destillativ gereinigt
Dimethylsulfoxid	Merck
<i>Escherichia coli</i> K12 Laborstamm	DSMZ No.: 1077
Ethanol	BASF, destillativ gereinigt
Fleischextrakt	Merck
Fluoresceinisothiocyanat	Sigma
Fluorescein-Natriumsalz	Sigma
Hexan	BASF, destillativ gereinigt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck / Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck / Roth
Methanol	BASF, destillativ gereinigt
<i>Micrococcus luteus</i>	DSMZ No.: 1605
Natriumhydroxid	Merck
Pepton	DIFCO
Parylene-N	SCS, eingesetzt wie erhalten
Resazurin Natriumsalz	Acros Organics
Salzsäure	Riedel de Haen
Silikonöl AP200	Wacker
Tetrahydrofuran	BASF, destillativ gereinigt
Toluol	BASF, destillativ gereinigt
Trypton-Soja-Bouillon	DIFCO, Fluka

4.2 Eingesetzte kommerzielle Polymere

Polyamid 6	PA 6 B3	BASF
Polyethylenoxid	PEO 900.000	Sigma
Polyvinylalkohol	Mowiol 10-98, $M_w = 100,000$	Clariant
	Mowiol 28-99, $M_w = 145,000$	Clariant
	Mowiol 56-98, $M_w = 195,000$	Clariant
Polyvinylbutyral	Mowital B60T	KSE
Polystyrol	PS144	BASF
Polycaprolacton	$M_w = 65.000$	Sigma
Poly(L-lactid)	L210	Boehringer

4.2.1 Modifikation von PVA mit FITC

Es wurde eine literaturbekannte Herstellungsmethode verwendet.^[148, 149] Zur Herstellung von mit Fluoresceinisothiocyanat modifiziertem Polyvinylalkohol wurden zunächst 580 mg PVA 56-98 in 8,0 mL DMSO gelöst. Es wurden 50 μL (49.1 mg, 0.62 mmol) Pyridin und 25 mg ($6.42 \cdot 10^{-5}$ mol) Fluoresceinisothiocyanat-Isomer I (FITC) zugegeben. Nach hinzufügen von 19.0 μL (20.0 mg, $3.17 \cdot 10^{-5}$ mol) Dibutylzinn-dilaurat wurde das Reaktionsgemisch für 2 h auf 95 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren in 80 mL Butanol eingetroppt, wobei das Produkt in Form von gelben Flocken ausfiel. Das Produkt wurde durch Filtration vom Butanol getrennt, getrocknet und erneut in DMSO aufgenommen. Nach erneutem Ausfällen in Butanol und zweimaliger Wiederholung des Vorgangs, wurde das Produkt am Vakuum getrocknet. Der modifizierte Polyvinylalkohol zeigte bei UV-Beleuchtung eine starke Fluoreszenz und wurde im Folgenden wie nicht modifizierter behandelt.

4.3 Verwendete Bakterienarten

4.3.1 *Escherichia coli*

Die verwendeten Bakterien entstammten einem K12 Laborstamm, der die DSMZ Nummer 1077 trug.

E. coli Bakterien weisen eine Länge von 1–4 µm und einen Durchmesser von 0,4–0,7 µm auf.^[49] Sie gehören zur Gruppe der Enterobakterien, welche wiederum eine relativ einheitliche Gruppe innerhalb der Gamma-Proteobakterien sind.^[150] Dabei handelt es sich um Gram-negative, nichtsporulierende, fakultativ aerobe Stäbchen, die nichtmotil oder durch peritriche Begeißelung motil sind. Zudem sind die Enterobakterien Oxidase-negativ und besitzen relativ einfache Nährstoffansprüche. So vergären sie Zucker zu einer Vielzahl von Endprodukten. Über *E. coli* ist ohne Zweifel mehr bekannt, als über jede andere Bakterienart. Angehörige der Gattung *Escherichia* sind unter anderem Bewohner des Verdauungstraktes des Menschen und anderer Warmblüter, stellen jedoch bei weitem nicht die dominierende Lebensform dar. *E. coli* dient als Indikatorkeim für eine Belastung von Wasser bzw. Gewässern durch Fäkalien. Sie können insofern eine ernährungsphysiologisch nutzbringende Rolle spielen, als sie beispielsweise Vitamin K für ihren Wirt synthetisieren. Vor allem Wildtypen von *E. coli* weisen relativ einfache Nährstoffansprüche auf und sind befähigt auf einer Vielzahl von Kohlenstoff- und Energiequellen wie Zucker, Aminosäuren und anderen organischen Säuren zu wachsen. Einige *E. coli* Stämme sind pathogen und können bei Kleinkindern Durchfallerkrankungen auslösen. Zudem können einzelne Stämme bei älteren Personen, oder Personen deren Abwehr herabgesetzt ist, Harnwegsinfektionen hervorrufen.

4.3.2 *Micrococcus luteus*

Die DSMZ Nummer des verwendeten Stammes war 1605.

M. luteus gehört zur Gruppe der Actinobacteria und ist morphologisch *Staphylococcus* sehr ähnlich, obwohl diese im Gegensatz zu *M. luteus* einen geringen GC-Gehalt der DNA aufweisen.^[150] Eine Unterscheidung der Gattungen *Micrococcus* und *Staphylococcus* ist jedoch leicht mit Hilfe des Oxidations/Fermentationstests (O/F-Test) möglich. *M. luteus* ist obligat aerob und produziert aus Glucose nur aerob Fettsäuren, während *Staphylococcus* fakultativ aerob ist und sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen aus Glucose Säure erzeugt. *M. luteus* ist ein aerobes, Gram-positives und Katalase-positives Bakterium mit einem typischen Atmungsstoffwechsel. Wie Gram-positive Kokken im Allgemeinen, ist auch *M. luteus* relativ resistent gegen eine geringe Wasseraktivität und toleriert Austrocknung und hohen Salzgehalt recht gut. *M. luteus* ist pigmentiert, die Kolonien

weisen eine charakteristische gelbe Farbe auf. Die Zellen liegen häufig nicht isoliert vor, sondern bilden Paare und Tetraden. Dies ist beispielsweise bei der Bestimmung der Lebendzellzahl zu berücksichtigen. Die Paare und Tetraden lassen sich allerdings durch die Anwendung von Ultraschall zumindest temporär trennen.^[151] In der Natur kommen *Micrococcus*-Arten beispielsweise auf der Haut, sowie auf Staubteilchen und im Erdboden vor.

Der unterschiedliche Aufbau einer Gram-positiven und einer Gram-negativen Membran ist in Abbildung 4-1 und in Abbildung 4-2 dargestellt.

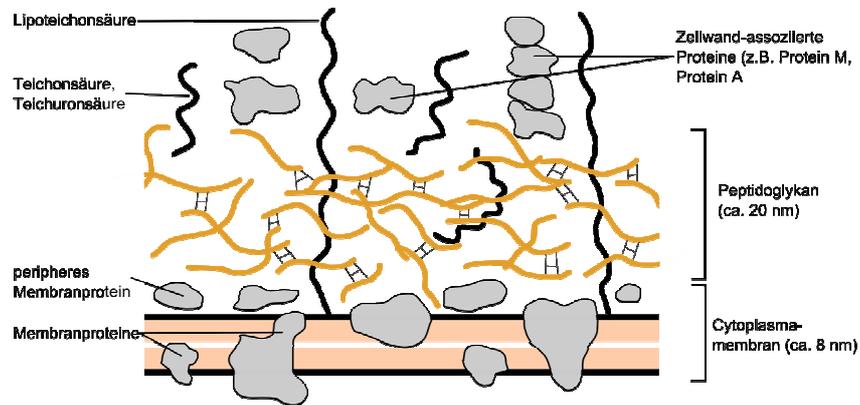


Abbildung 4-1: Aufbau der Membran einer Gram-positiven Zelle.

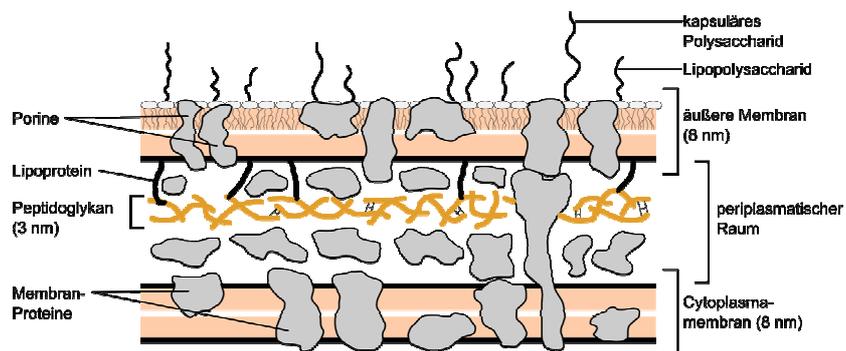


Abbildung 4-2: Aufbau der Membran einer Gram-negativen Zelle. (Quelle: eigene Zeichnung)

4.4 Verwendete Geräte

Autoklav	HMC HiClave HV25L Systec 2540 EL
Dispergierwerkzeug	IKA T18 basic Ultra Turrax® mit S 18 n – 19 G Vorsatz
Inkubator	Aqua Lytic
Mikroskope	Leica DMRX Keyence VHX Digital Microscope
pH-Messgerät	WTW pH526 mit pH Elektrode Schott BlueLine 23 pH
Photometer	Pharmacia LKB Novaspec II Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro
PPX-Beschichter	SCS Coating Systems Labocoater1 PDS 2010
Reinstwasseranlage	Elga Maxima
Schüttelplatte	GFL-3005
Sicherheitswerkbank	Holten LaminAir
Spektrfluorophotometer	SHIMADZU RF-1502
Trockensterilisator	Heraeus Instruments T5050 Heraeus kelvitron®t
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 102 H
UV/Vis Spektrophotometer	Perkin-Elmer Lambda 9
Vakuum-Filtrationsgerät	Sartorius
Waagen	Mettler PM4800 DeltaRange Precisa XB 220A
Wasserbadschüttler	New Brunswick
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5403 Heraeus Multifuge 1S-R

4.5 Nährmedien und Puffer

4.5.1 Vollmedium für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde ein kommerziell erhältliches Nährmedium verwendet. Es handelte sich um eine, auch als TS-Medium bezeichnete Trypton-Soja-Bouillon (DIFCO, Fluka). Zur Herstellung wurden 30 g L⁻¹ des Pulvers in deionisiertem Wasser gelöst. Um feste Medien herzustellen wurden zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar zugegeben.

4.5.2 Nährmedium für *Micrococcus luteus*

Die Kultivierung von *M. luteus* erfolgte in einem von der DSMZ vorgegebenen Medium aus Fleischextrakt und Pepton. Die Grundstoffe wurden in der entsprechenden Menge Wasser gelöst. Anschließend wurde durch Zugabe von Natronlauge ein pH-Wert von sieben eingestellt. Zur Herstellung fester Medien wurden zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar zugegeben.

<i>M. luteus</i> Medium:	Fleischextrakt	5 g
	Pepton:	3 g
	Deionisiertes Wasser:	1000 mL

4.5.3 Kaliumphosphat-Puffer

Es wurde ein Kaliumphosphat-Puffer der Konzentration 50 mmol L⁻¹ mit einem pH-Wert von sieben verwendet. Zur Herstellung des Puffers wurde entionisiertes Wasser verwendet. Die Lösung der Salze wurde bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Aufbewahrung bis zur Verwendung erfolgte in verschlossenen Flaschen bei vier Grad Celsius.

Kaliumphosphat-Puffer	KH ₂ PO ₄ :	2,64 g (19,4 mmol)
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O:	6,98 g (30,6 mmol)
	Deionisiertes Wasser:	1000 mL

4.6 Mikrobiologische Methoden

4.6.1 Sterilisation

Die Sterilisation sämtlicher Nährmedien, Puffer und Kunststoffgeräte zum Einmalgebrauch erfolgte, falls nicht anders angegeben, durch autoklavieren bei 121 °C und einem Bar Überdruck für 20 Minuten. Glasgeräte wie Objektträger und Petrischalen, sowie Metallgeräte wurden für 180 Minuten im Trockensterilisator auf 180 °C erhitzt.

4.6.2 Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung

4.6.2.1 Kulturen auf Agarplatten

Das Anlegen von Kulturen auf Agarplatten diene zwei Zwecken. Zum einen zur Stammhaltung, wobei es von Bedeutung war einzelne Kolonien zu erhalten und zum anderen zur Bestimmung der Lebendzellzahl, wobei jedes Bakterium eine Kolonie ausbilden sollte. In beiden Fällen erfolgte die Inkubation aerob bei 37 °C.

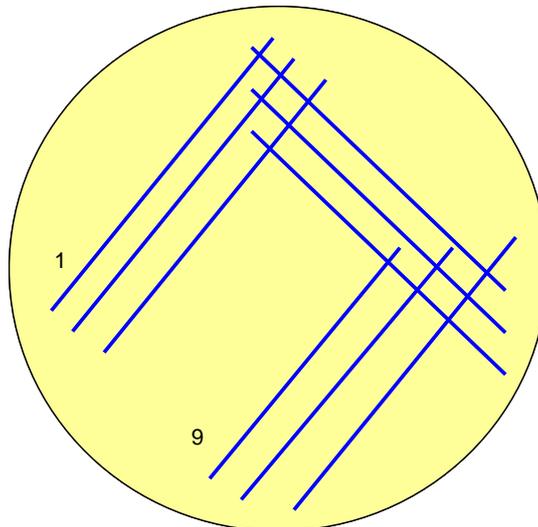


Abbildung 4-3: Vereinzlungstechnik.

Zur Stammhaltung wurde eine Kolonie von einer Agarplatte mit Hilfe einer durch Ausglühen sterilisierten Impföse entnommen und durch eine neun Striche umfassende Vereinzlungstechnik auf eine neue Agarplatte aufgebracht. Das Schema, das dabei

verwendet wurde, wird im Folgenden beschrieben: die mit einer Kolonie beladene Impföse wurde dreimal über die Agarplatte geführt und dann erneut ausgeglüht. Nach dem Abkühlen der Impföse im Medium wurden drei weitere Striche, senkrecht zu den drei bereits vorhandenen, ausgeführt, wobei jeder Strich einen Strich weniger kreuzte (siehe Abbildung 4-3). Dieser Vorgang wurde ein drittes Mal wiederholt, nach dem Inkubieren erhielt man einzelne Kolonien auf der Agarplatte, die sich bequem entnehmen ließen.

Nach der Inkubation bei 37 °C wurden die Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Die Kulturen wurden wöchentlich kontrolliert und auf neue Agarplatten überimpft. Dabei wurden die alten Platten noch mindestens eine Woche aufbewahrt.

4.6.2.2 Kulturen in flüssigen Medien

Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte aerob mit Hilfe von Reagenzglasrollern bzw. im Schikanenkolben oder Erlenmeyerkolben bei 120 bis 200 U/min. Zur Herstellung von Flüssigkulturen im Reagenzglas wurden fünf Milliliter sterile Nährlösung entweder mit einer Einzelkolonie oder mit 0,1 mL einer Flüssigkultur inokuliert. Kulturen von *E. coli* wurden in der Regel bei 37 °C für 16 Stunden, Kulturen von *M. luteus* für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei der Herstellung von Kulturen im Schikanen- bzw. Erlenmeyerkolben wurde mit einer Flüssigkeitsmenge im Bereich von 150 bis 200 mL analog vorgegangen.

4.6.3 Bestimmung der Zellzahl

4.6.3.1 Bestimmung durch optische Dichte

Die Zelldichte in einer Flüssigkultur erfolgte durch Messen der Optischen Dichte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}). Eine Optische Dichte von eins entspricht dabei in etwa einer Zelldichte von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro Milliliter Kultur. Dies kann jedoch bei verschiedenen Bakterienarten stark abweichen und ist somit als grober Richtwert zu verstehen. Als Blindwert diente die OD_{578} des reinen Mediums, gemessen gegen Luft. Anschließend wurde eine Probe der zu untersuchenden Bakteriensuspension vermessen. Falls der Wert für die OD_{578} größer als 0,5 war, wurde mit Medium verdünnt.

Die OD_{578} der Bakteriensuspension errechnete sich aus dem gemessenen Wert abzüglich des Blindwertes, wobei eine eventuelle Verdünnung berücksichtigt wurde.

4.6.3.2 Bestimmung mit der Helber-Zählkammer

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl neben der Bestimmung durch die optische Dichte stellte die Verwendung einer Helber-Zählkammer dar. Die Methode ist genauer, als die Bestimmung der optischen Dichte, unterscheidet jedoch ebenso wie diese nicht zwischen lebenden und toten Zellen.

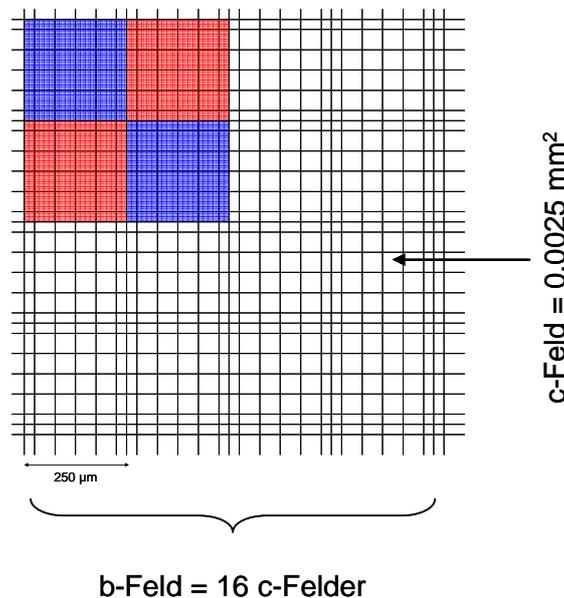


Abbildung 4-4: Darstellung einer Helber-Zählkammer.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Probe, wurde eine Helber-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,02 mm verwendet. In das Glas der Kammer waren Netzgitter eingeztzt. Diese beinhalteten so genannte c- (= Kleinquadrate) und b-Felder (= Großquadrate). Ein c-Feld wies hierbei eine Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ auf. Von der zu untersuchenden Flüssigkultur ausgehend, wurde mit Phosphatpuffer ($c = 50 \text{ mmol / L}$, $\text{pH} = 7,0$) oder Medium eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass ungefähr 5 bis 10 Zellen pro Kleinquadrat zu erwarten waren. Nach dem Befüllen der Kammer erfolgte die Auszählung der Bakterien im Netzgitter unter einem Mikroskop bei Phasenkontrast.

Es wurden jeweils drei unabhängig voneinander hergestellte Verdünnungen ausgezählt, wobei jeweils der Durchschnitt aus den 3 x 16 c-Feldern ermittelt wurde. Die Gesamtzellzahl errechnete sich aus dem Volumen eines c-Feldes und der ermittelten durchschnittlichen Anzahl von Bakterien im c-Feld:

$$V_c = 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,02 \text{ mm} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2 = 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ mL}$$

Formel 2: Volumen eines c-Feldes.

Die Zellzahl in einem mL Suspension ergab sich folglich nach:

$$\text{Zellzahl} = c : 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ mL}^{-1}$$

Formel 3: Zahl der Zellen in einem Milliliter.

4.6.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl durch die Zahl wachsender Kolonien

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl durch Bestimmung der Zahl der Kolonien-Bildenden-Einheiten (KBE), wurde eine definierte Menge der zu untersuchenden Bakterienkultur entnommen und anschließend eine Verdünnungsreihe unter Verwendung eines Kaliumphosphatpuffers ($c = 50 \text{ mmol / L}$, $\text{pH} = 7$) angefertigt. Bakterienhaltige Polymerlösungen, Filme oder Fasermatten wurden vor dem Ausbringen auf die Platten in einer definierten Menge Kaliumphosphatpuffer gelöst. Ausgehend von der erwarteten Zellzahl wurden jeweils 0,1 mL von drei aufeinander folgenden Verdünnungen auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für maximal 24 Stunden (*E. coli*), bzw. 48 Stunden (*M. luteus*) inkubiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien konnte die Lebendzellzahl in einem Milliliter Bakterienkultur bzw. die Zahl lebender Zellen in den Proben errechnet werden.

4.6.4 Färben von Bakterien

4.6.4.1 Färben mit Kristallviolett

Die Färbung mit Kristallviolett ermöglichte es, Bakterien unter dem digitalen Mikroskop, bzw. dem Lichtmikroskop ohne Phasenkontrastbeleuchtung beobachten zu können. Hierzu

wurde eine Probe der zu untersuchenden Suspension auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas verteilt und nach dem Eintrocknen unter Verwendung eines Gasbrenners hitzefixiert. Anschließend wurde eine Lösung von Kristallviolett in Wasser auf den Objektträger aufgebracht und nach einer Minute durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Nach dem Trocknen waren die Bakterien unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen.

4.6.4.2 Lebendfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um die Bakterien zu färben, sie dabei jedoch nicht abzutöten, wurden geeignete Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Bei den beiden verwendeten Farbstoffen handelte es sich um Calcofluor M2R (Flourescent Brightener 28),^[152] sowie Fluoresceinisothiocyanat.^[153] Beide Farbstoffe blichen unter dem Fluoreszenzmikroskop schnell aus. Allerdings zeigte Calcofluor M2R im Vergleich zu Fluoresceinisothiocyanat eine höhere Stabilität. Zudem waren auch die Färbereigenschaften von Calcofluor M2R deutlich überlegen.

Um Bakterien mit Calcofluor M2R anzufärben wurde zunächst aus dem Farbstoffpulver eine Stammlösung bereit. Es wurden 10 mg Calcofluor M2R in 6,7 mL Wasser gelöst und mit Natronlauge ein pH von 7 eingestellt. Die Stammlösung wurde bis zu ihrer Verwendung dunkel im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Färbung wurden gleiche Mengen Stammlösung und Bakteriensuspension vermischt und über 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die Bakterien wurden mit Hilfe einer Zentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit Phosphatpuffer oder physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Im Sediment konnten lebende Bakterien durch Ausplattieren auf Agarplatten nachgewiesen werden.

4.6.4.3 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung bot die Möglichkeit, Bakterien in Lösung bzw. innerhalb der Partikel mit zwei verschiedenen Farbstoffen anzufärben und so Rückschlüsse auf den Zustand der Membran der Bakterien zu erhalten. Bakterien mit einer intakten

Zellwand sollten bei dieser Färbemethode bei Beleuchtung mit UV-Licht grün, solche mit einer beschädigten Zellwand rot erscheinen. Die Färbung wurde unter Verwendung eines LIVE/DEAD[®] BacLight Kits L7012 der Firma Invitrogen durchgeführt. Vorgegangen wurde nach dem in der Produktinformation vom 15. Juli 2004 beschriebenen Verfahren. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt, vor der jeweiligen Verwendung zunächst auf Raumtemperatur gebracht und vor dem Öffnen zunächst bei mäßiger Geschwindigkeit mit Hilfe der Zentrifuge sedimentiert.

Bei allen Handlungen war zu berücksichtigen, dass das in den Stammlösungen verwendete Lösungsmittel DMSO das Eindringen organischer Moleküle in Gewebe begünstigt und die verwendeten Farbstoffe SYTO 9 sowie Propidiumiodid an Nukleinsäuren binden. Propidiumiodid ist ein potentiell Mutagen, bei SYTO 9 fehlen die entsprechenden Daten.

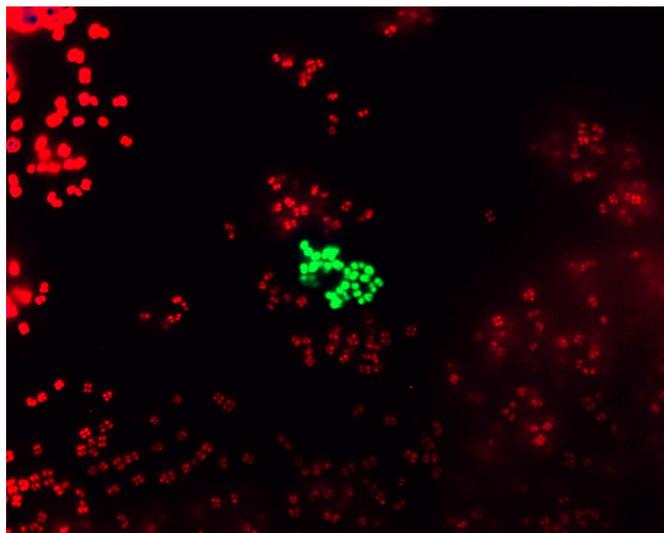


Abbildung 4-5: *M. luteus* Bakterien in Puffer nach Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung. In der Mitte des Bildes ist eine Ansammlung grün fluoreszierender Bakterien, umgeben von rot fluoreszierenden Bakterien zu erkennen.

Zur Färbung der in den PVA-Partikeln immobilisierten Bakterien wurde zunächst aus den beiden Stammlösungen die Farbstoffmischung hergestellt, welche nur eine begrenzte Lagerfähigkeit aufwies. Hierzu wurden gleiche Volumina der Stammlösungen, typischerweise je 5,0 µL mit einer Eppendorf Pipette abgemessen und in einem 1,7 mL Mikrozentrifugeneinsatz vereinigt. Nach ausgiebigem Mischen unter Zuhilfenahme eines Vortex-Mischers war die Farbstoffmischung verwendungsfähig. Es wurden jeweils 3,0 µL dieser Mischung zu einem Milliliter einer Suspension der PVA-Partikel in 50 mmol L⁻¹

Kaliumphosphat-Puffer $\text{pH} = 7$ gegeben. Die Mischung wurde nach erneutem ausgiebigem Mischen mit dem Vortex-Mischer für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Ein Tropfen der Suspension wurde nun auf einen Objektträger aus Glas gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Hilfe eines Lichtmikroskopes des Typs Leica DMRX mit UV-Beleuchtung untersucht.

4.7 Bakterienhaltige Polymerlösungen

4.7.1 Herstellung PEO-basierter Lösungen

Die Herstellung einer mit Bakterien angereicherten Polymerlösung erfolgte durch lösen des verwendeten Polymeren in einer sterilen Laborflasche unter Verwendung sterilisierten Wassers. Das verwendete Polymere wurde zuvor keiner weiteren Behandlung unterzogen. Für die meisten Versuche erwies sich die Keimfreiheit dieser Vorgehensweise als ausreichend, da das PEO-Pulver als steril angesehen werden konnte. Musste eine absolute Freiheit von Keimen sichergestellt werden, wurde die verschlossene Laborflasche nach dem Auflösen des Polymeren im Autoklaven sterilisiert. Anschließend wurde der Polymerlösung in einer Sicherheitswerkbank, oder in unmittelbarer Nähe eines brennenden Gasbrenners, die gewünschte Menge an Bakteriensuspension bzw. Sediment zugegeben und für mindestens 30 Minuten unter Verwendung eines Magnetrührers durchmischt. Im Falle von *M. luteus* wurde die Bakteriensuspension vor der Zugabe drei Minuten mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Agglomerate der Bakterien in Einzelzellen zu trennen.

4.7.2 Elektrosponnen von mit Bakterien angereicherten PEO-Lösungen

4.7.2.1 Verwendeter Aufbau

Das Verspinnen der mit Bakterien versetzten PEO-Lösungen erfolgte in einer geschlossenen Apparatur mit einer Grundfläche von 60 x 60 cm. Der Spinnprozess konnte durch die aus Glas bestehenden Seitenwände verfolgt werden. In der Mitte der Apparatur befand sich eine, an deren Decke angebrachte Vorrichtung, zur Befestigung der mit der zu verspinnenden Polymerlösung gefüllten Spritze. Die verwendeten Spritzen waren sterile 1 mL Spritzen der Firma Henke-Sass-Wolff mit einem Innendurchmesser von 4,7 mm. Die als Elektrode dienende Kanüle wurde auf eine Länge von zwei Zentimeter gekürzt. Es handelte sich um Injektionskanülen Sterican No.17. Die Kanülen hatten einen Außendurchmesser von 0,55 mm und einen Innendurchmesser von 0,3 mm. Die Menge der Polymerlösung, die durch die Kanüle austrat, wurde anfangs durch einen Schrittmotor, später durch ein hydraulisches System reguliert. In beiden Fällen wurde ein Stempel mit

einer einstellbaren Geschwindigkeit auf den Kolben der Spritze gedrückt. Die entstehenden Polymerfasern wurden auf einer Gegenelektrode aufgefangen. Diese bestand aus einer rund zehn Millimeter dicken Scheibe aus Aluminium. Ihr Durchmesser betrug zehn Zentimeter. Die Elektrode war zur Isolierung auf einem Sockel aus PVC montiert. Der Abstand zwischen Kanüle und Gegenelektrode ließ sich durch Verschieben der Spritzenhalterung variieren. Als Quellen für die Hochspannung dienten Hochspannungsnetzteile der Firma Applied Voltage des Typs HP 30. Die positive Spannung lag dabei an der Kanüle, die negative an der scheibenförmigen Elektrode an.

4.7.2.2 Parameter

Durch die variable Höhe der Spritzenhalterung war es möglich den Abstand zwischen den beiden Elektroden in einem weiten Bereich zu variieren. Der Bereich, in dem die Hochspannung gewählt werden konnte, war von 0 kV bis +30 kV an der Kanüle und von 0 kV bis -30 kV an der Gegenelektrode. Die Geschwindigkeit des Schrittmotors und somit auch die Vorschubgeschwindigkeit des Spritzenkolbens, konnte zwischen 1 cm/h und 99 cm/h in 1 cm Schritten frei gewählt werden. Auf Luftfeuchtigkeit und die Raumtemperatur konnte kein Einfluss genommen werden, sie unterlagen einer gewissen Schwankung.

4.7.2.3 Allgemeine Durchführung

Während des Spinnens bestand die Gefahr einer Kontamination der hergestellten Proben durch Fremdbakterien oder Pilzsporen. Deshalb wurden möglichst alle Öffnungen der Apparatur mit Hilfe von Klebeband abgedichtet. Der Boden der Apparatur wurde mit Kunststofffolie ausgelegt und die Keimzahl in der gesamten Apparatur durch intensive Reinigung mit einer 70 Vol. % Ethanol Lösung verringert. Dabei wurde sorgfältigst darauf geachtet, dass sich beim Start des Spinnprozesses kein zündfähiges Alkohol-Luft Gemisch in der Apparatur befand. Nach Einsetzen der gefüllten Spritze wurde der Elektrospinnvorgang durch Wahl eines geeigneten Abstandes zwischen Kanüle und Gegenelektrode, einer geeigneten Spannung zwischen den Elektroden und einer passenden Geschwindigkeit des Schrittmotors gestartet.

Um die erzeugten Fasern aufzufangen, wurde die Gegenelektrode mit verschiedenen Substraten belegt. Dazu gehörten Aluminiumfolie, Objektträger aus Glas, Petrischalen aus Glas und Rahmen aus Aluminiumblech.

4.7.3 Überlebensfähigkeit in Faservliesen

Es wurden mehrere bakterienhaltige Polymerlösungen hergestellt. Als Ausgangspunkt diente eine Lösung von fünf Gewichtsprozent PEO 900.000 in Wasser, zu der zehn Gewichtsprozent Bakteriensuspension gegeben wurden.

Die Polymerlösung wurde im Autoklaven sterilisiert. Als Bakteriensuspensionen wurden 24 Stunden alte Kulturen von *E. coli* und *M. luteus*, die OD_{578} lag zwischen 0,8 und 1,0 für *M. luteus* sowie 1,0 und 2,7 bei *E. coli*. Im Falle von *M. luteus* wurde die Suspension direkt vor der Zugabe zur Polymerlösung für eine Minute im Ultraschallbad behandelt, um vorhandene Agglomerate aufzubrechen. Um bezüglich der Menge an Polymerfasern vergleichbare Proben zu erhalten, wurde auf der Gegenelektrode direkt in sterile Glaspetrischalen gesponnen. Beim Wechsel von *M. luteus* enthaltender zu *E. coli* enthaltender PEO-Lösung wurde die Apparatur gründlich mit 70 Vol. % Ethanol gereinigt. Die Herstellungsbedingungen sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Tabelle 4-1: Parameter bei der Herstellung der Proben.

Parameter	Wert
Spindauer	5 min
Konzentration Polymer	4,5 %
Konzentration Suspension	9,1 %
Spannung Kanüle	15,0 kV
Spannung Edelstahlscheibe	-1,0 kV
Elektrodenabstand	20 cm
Elektrische Feldstärke	0,80 kV/cm
Durchfluss	0,04 cm ³
rel. Luftfeuchtigkeit	65-70 %
Temperatur	20-23 °C

Die hergestellten Proben wurden bei Raumtemperatur und vier Grad Celsius in der Dunkelheit aufbewahrt. Die Bestimmung der Lebendzellzahlen der verwendeten PEO-Lösungen vor dem Verspinnen erfolgte durch Entnahme einer bekannten Menge und Anfertigen einer Verdünnungsreihe. Das Ausbringen definierter Mengen der einzelnen Verdünnungen erlaubte die genaue Bestimmung der Zahl lebender Zellen. Zur Bestimmung der Zahl der noch lebenden Zellen in den Faservliesen, wurden in regelmäßigen Abständen Proben in Kaliumphosphatpuffer aufgelöst. Hierzu wurde das Gewicht der Petrischale vor und nach Zugabe einer Phosphatpuffermenge von rund drei Millilitern bestimmt, um die exakte Puffermenge zu erhalten. Das Auflösen erfolgte durch vorsichtiges Schütteln der verschlossenen Petrischale, um eine vollständige Benetzung des Bodens und somit ein Auflösen des gesamten Vlieses sicherzustellen. Mit einer sterilen Eppendorf Pipette wurden jeweils 0,1 mL der Lösung entnommen und mit Kaliumphosphatpuffer Verdünnungsreihen angefertigt. Die Lösung sowie die Verdünnungen 1:10, 1:50 und 1:100 wurden auf jeweils drei Agarplatten gegeben, verstrichen, inkubiert und die sich bildenden Kolonien ausgezählt, wodurch über die bekannten Mengen an Puffer auf die Zahl lebender Zellen in den Fasermatten geschlossen werden konnte.

4.7.4 PPX Beschichtung bakterienhaltiger Faservliese

Bakterienhaltige Faservliese wurden nach dem gleichen Verfahren hergestellt, wie es in Absatz 4.7.2.3 beschrieben wird. Um eine gleichmäßige Beschichtung der Fasermatten von beiden Seiten erreichen zu können, wurden diese auf Aluminiumrahmen aufgebracht. Die Rahmen bestanden aus fünf Millimeter breiten Streifen aus 0,5 mm starkem Aluminiumblech. Das Aufbringen der Fasermatten auf diese Träger erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Zum einen wurden die Rahmen in der Elektrospinnapparatur direkt besponnen, so dass sich eine frei tragende Fasermatte abschied. Zum anderen wurde eine dicke Fasermatte auf Aluminiumfolie hergestellt. Diese wurde mit dem Trägermaterial zurechtgeschnitten, von der Folie abgezogen und anschließend mit doppelseitigem Klebeband auf einer Halterung befestigt.

Die zu beschichtenden Proben wurden in einem CVD System des Typs Labcoater 1 (PDS 2010) der Firma SCS Coating Systems so auf dem Drehteller befestigt, dass alle Bereiche der Proben für die Gase gleich gut zugänglich waren. Eingesetzt wurde Parylene-N ([2,2]Paracyclophan), wobei als Faustregel pro eingesetztem Gramm eine Schichtdicke des PPX-Filmes von einem Mikrometer erwartet werden konnte. [2,2]Paracyclophan wurde in einer Aluminiumschale bei 175°C verdampft und bei 650 °C pyrolysiert. Das entstehende Chinodimethan kondensierte in der Kammer bei Raumtemperatur, wobei es zu PPX polymerisierte. Um die Dicke der abgeschiedenen Schicht mittels DEKTAK bestimmen zu können stets ein Objektträger mitbeschichtet.

4.7.5 Herstellung bakterienhaltiger PVA-Partikel

Da insbesondere für die Versuche, bei denen Resazurin zum Einsatz kam, eine Kontamination der Partikel durch Fremdbakterien oder Sporen von Pilzen ausgeschlossen werden musste, wurden alle verwendeten Geräte sterilisiert. Das aus Edelstahl bestehende Werkzeug des Ultra Turrax Homogenisierers wurde in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 130 °C für mehrere Stunden im Trockensterilisator behandelt. Das Kunststoffgehäuse wurde sorgfältig mit 70 % vol Ethanol gereinigt. Das verwendete Silikonöl wurde ebenfalls in den später verwendeten Gefäßen bei 130 °C im Trockensterilisator sterilisiert.

Zur Herstellung Bakterien enthaltender PVA-Partikel wurden zunächst Kulturen der zu immobilisierenden Bakterien angesetzt. Dies geschah in der Regel in 250 mL Erlenmeyer-Kolben ohne Schikanen. Die Bakterien wurden noch in der exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe einer Zentrifuge des Typs Heraeus Multifuge bei 5000 U min⁻¹ für fünf Minuten sedimentiert. Hierzu wurden sterile 50 mL Einweg-Zentrifugeneinsätze verwendet. Nach einem Durchlauf wurde der Überstand neben dem laufenden Gasbrenner abgossen und das Gefäß für den nächsten Durchlauf erneut befüllt. Auf diese Weise wurde das gesamte Sediment der Kultur in einem Gefäß gesammelt.

Um die Bakterien von Resten des Nährmediums zu befreien, wurde das Sediment anschließend gewaschen. Dies erfolgte durch Zugabe von destilliertem Wasser oder 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphat-Puffer pH = 7 und Aufschlänmen des Sedimentes in der

Flüssigkeit. Nach erneutem Sedimentieren mit Hilfe der Zentrifuge waren die Bakterien verwendungsfertig. Der Feststoffgehalt des Sedimentes betrug bei *E. coli* und *M. luteus* jeweils rund 20 %.

Parallel zu den Bakterienkulturen wurden die PVA-Lösungen vorbereitet. Hierzu wurden zunächst Wasser und Polyvinylalkohol in fest verschließbare 100 mL Flaschen eingewogen. Die Flaschen wurden mit einem Magnetrührstab versehen und verschlossen. Um das Polymere zu lösen wurden die Flaschen in einem auf 90 °C temperierten Wasserbad platziert, wobei die Polymerlösung ständig gerührt wurde. Nach dem Auflösen des Polymeren wurden die Flaschen in verschlossenem Zustand im Autoklaven bei 121 C für 20 Minuten sterilisiert. Nach der Entnahme aus dem Autoklaven wurden die Flaschen sofort in noch heißem Zustand auf einem Magnetrührer platziert und der Inhalt durchmischt, um der Bildung einer Haut aus getrocknetem Polymeren auf der PVA-Lösung entgegenzuwirken. Die PVA-Lösungen wurden anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach jedem Öffnen erneut im Autoklaven sterilisiert. Die PVA-Lösungen neigten dazu, nach einiger Zeit bei Raumtemperatur zu gelieren, was daran zu erkennen war, dass sie leicht opak wurden. Auch diesem Effekt konnte durch ein erneutes Sterilisieren entgegengewirkt werden.

Im nächsten Schritt wurden die Bakterien in der PVA-Lösung suspendiert. Dies erfolgte in ebenfalls sterilisierten 10 mL Rollrandgläsern. In der Regel wurden 0,5 g Sediment der Bakterien und 3,0 g der Polymerlösung verwendet. Die Polymerlösung wurde mit Hilfe einer Einwegspritze, das Sediment mit einer sterilen Glaspipette in das Rollrandglas überführt. Da die resultierende Mischung insbesondere bei der Verwendung von *E. coli* Bakterien zu viskos wurde, um sie mit einem Magnetrührstab vermischen zu können, erfolgte dies mit einem sterilen Edelstahl-Spatel in der Nähe der rauschenden Brennerflamme.

Das 80 mL Silikonöl enthaltende Gefäß wurde in einem Bad aus Eiswasser platziert. Das Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeug wurde in das Silikonöl eingetaucht, wobei die Aluminiumfolie nur so weit als notwendig entfernt worden war. Während des Herstellungsprozesses diente sie als provisorischer Schutz vor möglichen

Kontaminationen. Es wurde gewartet, bis Dispergierwerkzeug und Silikonöl abgekühlt waren. Das Dispergierwerkzeug wurde auf der niedrigsten Stufe gestartet und die Suspension aus Bakterien mit einer Einwegspritze ohne Kanüle eingebracht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die austretende Suspension direkt vom Dispergierwerkzeug eingesogen wurde, da sie sich sonst auf der Oberfläche gesammelt hätte und vom Dispergierwerkzeug nicht erreicht worden wäre. Nachdem die Suspension im Silikonöl verteilt war, wurde die Geschwindigkeit gesteigert und für 15 Minuten homogenisiert. Mit der hergestellten Dispersion wurde nun auf zwei verschiedenen Wegen verfahren.

Um Partikel unter Anwendung von Einfrier-Auftau-Zyklen herzustellen, wurden die Gefäße mit der Dispersion in verschlossenem Zustand bei -20 °C eingefroren. Nach 20 Stunden wurden die Gefäße entnommen und für vier Stunden der Raumtemperatur ausgesetzt. Hiernach wurden sie erneut bei -20 °C eingefroren. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Auftauen für vier Stunden bei Raumtemperatur wurden die Gefäße geöffnet und der Inhalt langsam und unter heftigem Rühren in 400 mL Aceton gegeben. Zuvor war der sich bei den Zyklen auf der Oberfläche der Dispersion bildende Schwamm aus Hydrogel entfernt worden. Zur Herstellung von PVA-Partikeln ohne die Applikation von Einfrier-Auftau-Zyklen wurde die Dispersion direkt nach der Herstellung in 400 mL Aceton gegeben, wobei die Ausbeute deutlich höher ausfiel. Das Gemisch wurde für weitere zehn Minuten gerührt.

Zur Separation der Partikel vom Aceton wurde das Gemisch durch einen 30 mm Papierfilter oder eine 30 mm Polytetrafluorethylen Filtermembran mit einer Porenweite von 0,45 µm gesaugt. Es wurde im Falle von *M. luteus* ein gelblicher und im Falle von *E. coli* ein grau-brauner Filterkuchen erhalten. Dieser wurde getrocknet und erneut unter Verwendung eines Ultraschallbades in ca. zehn Millilitern Aceton aufgeschlämmt. Auf diese Weise wurden letzte Reste von Silikonöl an den Partikeln entfernt, die sonst die Quelleigenschaften nachteilig beeinflusst hätten. Es wurde erneut filtriert, der Filterkuchen abgedeckt neben der rauschenden Brennerflamme getrocknet und in sterilen Mikroreaktionsgefäßen bei vier Grad Celsius gelagert.

4.7.6 Überlebensfähigkeit in PVA-Partikeln

4.7.6.1 In Trockensubstanz

Die Bestimmung lebender Bakterien in den PVA-Partikeln erfolgte rein qualitativ. Ein Herauslösen der einzelnen Bakterien aus den Partikeln und anschließende Bestimmung der Lebendzellzahl nach der KBE-Methode war nicht möglich.

Es wurden zum einen bereits vorhandene, bei vier Grad Celsius gelagerte Proben und zum anderen speziell zu diesem Zweck hergestellte Proben untersucht. Im letzteren Fall wurden die Partikel in 1,7 µL Mikrozentrifugeneinsätzen bei vier Grad, Raumtemperatur und 37 °C jeweils in der Dunkelheit gelagert. Die hierzu hergestellten Proben wurden auf die Gefäße für die drei Lagerungstemperaturen verteilt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Zum eigentlichen Test wurde die bei vier Grad Celsius gelagerte Probe zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, um ein Einkondensieren von Wasser beim Öffnen zu vermeiden. Die bei den beiden anderen Temperaturen gelagerten Proben wurden direkt verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden in unmittelbarer Nähe der rauschenden Brennerflamme ausgeführt, die Keimzahl am Arbeitsplatz war zuvor mit 70 vol. % Ethanol verringert worden. Nach dem Öffnen der Mikrozentrifugeneinsätze wurde mit einem abgekühlten, zuvor durch Ausglühen sterilisierten Spatel eine Probe entnommen und auf der Oberfläche einer Agarplatte verteilt. Die Platte wurde verschlossen und nach ca. zehn Minuten umgedreht, um während der Inkubation einen Kontakt der nun gequollenen Partikel mit Kondenswasser zu vermeiden. Inkubiert wurde maximal vier Tage bei 37 °C. Partikel, die lebende Bakterien enthielten verursachten Wachstum auf der Platte.

4.7.6.2 In Gegenwart organischer Lösungsmittel

Die Untersuchung auf eine Schutzwirkung der Partikel gegenüber organischen Lösungsmitteln erfolgte ebenfalls qualitativ, wobei aus der Stärke des verursachten Wachstums ein gewisser Trend abgeleitet werden konnte.

Die Durchführung des Versuches erfolgte in Rollrandgläsern. Die Gläser waren zuvor im Trockensterilisator behandelt worden. Gearbeitet wurde neben der rauschenden Brennerflamme. Die für die Versuche vorgesehenen Proben der PVA-Partikel wurden zuvor im sterilen Achat-Mörser behandelt, um größere Aggregate der Partikel aufzubrechen. Hierbei wurde darauf geachtet, die mechanische Belastung der Partikel möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Partikel auf die einzelnen Rollrandgläser gleichmäßig verteilt. Auf ein Wägen wurde verzichtet, um eine mögliche Kontaminationsquelle auszuschließen. Die Partikel wurden mit jeweils 0,5 mL des entsprechenden Lösungsmittels überschichtet, die Rollrandgläser verschlossen und bei vier Grad Celsius gelagert.

Zur Probenentnahme wurden die Gläser zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, um ein Einkondensieren von Feuchtigkeit zu verhindern. Anschließend wurden die Rollrandgläser geöffnet und mit Hilfe einer sterilen Pasteur-Pipette eine Probe des Inhalts entnommen. Die Probenbehälter wurden anschließend verschlossen und erneut kühl gelagert. Um einen Kontakt der Agarplatten mit den Lösungsmitteln zu verhindern, wurden die entnommenen Proben zunächst auf sterilen Objektträgern ausgebracht. Die Objektträger wurden mit Petrischalen abgedeckt, was zwei Zwecken diente. Zum einen wurde dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination vermindert und zum anderen verdunstete das Lösungsmittel dadurch langsamer. Dies war vor allem bei Aceton, Ethanol und Tetrahydrofuran von Bedeutung, da zu starke Abkühlung durch Verdunstung zu einer Anreicherung von Wasser im Lösungsmittel und somit zum Absterben der Bakterien hätte führen können. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurden die Objektträger mit den daran haftenden Partikeln auf eine Agarplatte gelegt und angedrückt. Nach dem Quellen der Partikel wurden die Objektträger abgenommen, die Platten umgedreht und bei 37 °C inkubiert. Lebende Bakterien in den Partikeln verursachten auch hier Wachstum auf den Platten.

4.7.6.3 In Faservliesen

Um zu überprüfen, ob sich in elektrogenesponnenen Faservliesen noch lebenden Bakterien befanden wurden zwei Methoden angewendet.

Die erste bestand darin, Proben der Vliese unter möglichst sterilen Bedingungen auf eine Agarplatte aufzubringen und diese zu inkubieren. Falls sich nach viertägiger Inkubationszeit bei 37 °C kein Wachstum von Bakterien um die Faserprobe herum, bzw. auf der Faserprobe zeigte, wurde sie von der Agar-Oberfläche abgenommen. Zeigte sich auch unterhalb des Vlieses kein Wachstum wurde angenommen, dass keine lebenden Bakterien in der Fasermatte vorhanden waren.

Alternativ dazu wurden Proben der Vliese in steriles Nährmedium eingebracht und schüttelnd bei 150 U min⁻¹ und 37 °C inkubiert. Falls bei diesem Prozess eine Trübung des Nährmediums innerhalb von zwei Tagen zu erkennen war, wurde eine Menge von 100 µL auf einer Agarplatte ausgestrichen, die danach ebenfalls inkubiert wurde. Dies diente dazu, die Identität der die Trübung verursachenden Bakterien festzustellen, da diese Methode Kontaminationen gegenüber deutlich empfindlicher war, als die zuerst beschriebene. Auch diese Methode konnte nur qualitative Ergebnisse liefern.

4.7.7 Polymerfilme unter sterilen Bedingungen

Die Herstellung von Filmen aus Polyvinylbutyral mit darin eingeschlossenen, Bakterien enthaltenden PVA-Partikeln erfolgte in 50 mL Einweg-Zentrifugeneinsätzen. Durch die Beschichtung der Innenseite des Gefäßes bei geschlossenem Deckel konnte sichergestellt werden, dass der Polymerfilm weder mit Fremdbakterien, noch mit Pilzsporen kontaminiert wurde. Um die Evaporation des Lösungsmittels zu ermöglichen, wurden durch die Verschlusskappe des Gefäßes zwei Kanülen geführt und die Durchtrittsstelle anschließend luftdicht mit Heißkleber versiegelt. Dabei wurde eine Kanüle bis fast zum Boden des Gefäßes geführt, während die andere nur wenig in den Innenraum hineinragte. Auf diese Weise sollte die Erzeugung eines Luftstroms im Gefäß ermöglicht werden. Auf die kürzere der beiden Kanülen wurde ein Spritzenfilter aufgesetzt, der Kontaminationen aus der einströmenden Luft entfernen sollte. Die längere der beiden Kanülen wurde mit einer Membranpumpe verbunden, mit der der Luftstrom erzeugt und geregelt werden konnte. In Abbildung 4-6 ist eine schematische Zeichnung des Aufbaus gegeben.

Die typische Vorgehensweise war die Herstellung einer Lösung aus Polyvinylbutyral mit Bakterien enthaltenden PVA-Partikeln wie zuvor bereits beschrieben. Eine abgemessene

Menge der Lösung wurde in den Zentrifugeneinsatz gegeben, der sofort verschlossen wurde. Durch Drehen des Gefäßes wurde eine gleichmäßige Benetzung der Wandung erreicht, wobei dieser Vorgang über die gesamte Zeit des Eintrocknens der Polymerlösung fortgeführt wurde. In Zeitabständen von wenigen Minuten wurde eine Membranpumpe mit der längeren der beiden Kanülen verbunden und so die Luft im Inneren ausgetauscht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Polymerlösung nicht zu weit absank, da ein Einkondensieren von Wasser es dem Lösungsmittel Ethanol erlaubt hätte, in die Partikel einzudringen und die immobilisierten Bakterien zu schädigen.

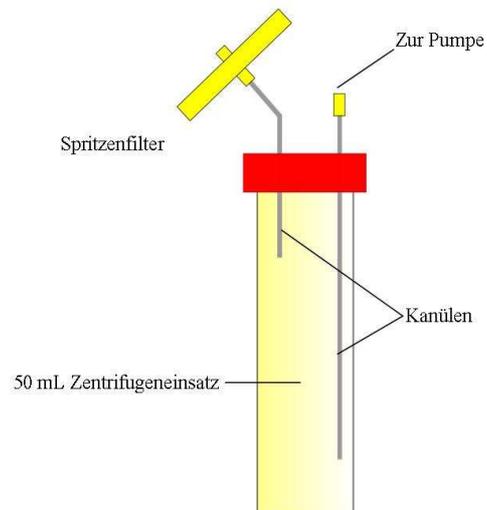


Abbildung 4-6: Schematische Zeichnung des Aufbaus zur Herstellung von Polymerfilmen unter sterilen Bedingungen.

4.8 Charakterisierungsmethoden

4.8.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Untersuchung der Morphologien der Fasern, Partikel und Bakterien erfolgte unter Verwendung von Rasterelektronenmikroskopen der Typen Hitachi S-4100 mit Wolfram-Kathode und JEOL JSM-7500F in der Abteilung Elektronenoptik des Fachbereichs Geologie und des Wissenschaftlichen Zentrums für Materialwissenschaften der Philipps Universität Marburg.

Vor der Untersuchung wurden die Proben bei beiden Mikroskopen mittels eines doppelseitig klebenden Kohlenstoff-Films der Firma EM-Plano auf einem Träger aus Aluminium befestigt. Im Falle des Hitachi S-4100 wurde zuerst eine Schicht Kohlenstoff, dann eine Schicht Gold mittels PVD, unter Verwendung einer Edwards Auto 306 Hochvakuumapparatur, bei einem Vakuum der Güte $< 5 \times 10^{-5}$ mbar aufgebracht. Proben für das JEOL JSM-7500F wurden mit der im Gerät enthaltenen Beschichtungsapparatur vor der Untersuchung mit Platin beschichtet.

4.8.2 Dektak Profilometer

Zur Schichtdickenbestimmung des abgeschiedenen PPX wurde der Film auf einem beschichteten Glasobjektträger eingeschnitten und der Höhenunterschied zwischen der Filmoberfläche und dem Objektträger bestimmt. Das verwendete Analysegerät war vom Typ Dektak 3. Der Stylus hatte eine Dicke von 1 μm , das aufliegende Gewicht betrug 2 mg.

4.8.3 Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit wurde bei Raumtemperatur bestimmt. Es wurde ein Konduktometer InoLab Cond Level 3 mit einem Detektor TetraCon 325 (Wissenschaftlich technische Werkstätten GmbH) für Messungen im Bereich 50 $\mu\text{s/cm}$ bis 500 $\mu\text{s/cm}$ verwendet. Die Messungen im Bereich 2 $\mu\text{s/cm}$ bis 50 $\mu\text{s/cm}$ wurden mit einem LR 325/01 Detektor durchgeführt.

Das Volumen der jeweils untersuchten Probe lag im Bereich von 60 mL, so dass ein vollständiges Eintauchen des Detektors gewährleistet war.

4.8.4 Oberflächenspannung

Die Ermittlung der Oberflächenspannung einer Polymerlösung erfolgte mit Hilfe eines Dynamischen Kontaktwinkelmessers und Tensiometers (Dataphysics DCAT 11). Hierzu wurden rund 40 mL Probe in einem Glasgefäß in die Apparatur eingebracht und dort temperiert. Zur Messung der Oberflächenspannung wurde eine Platte aus Platin mit definierter Größe in die Lösung eingetaucht und wieder herausgezogen. Der dabei auftretende Widerstand wurde mittels einer hochpräzisen Waage verfolgt und durch das Computerprogramm SCAT 12 ausgewertet

4.8.5 Viskosimetrie

Viskosimetrische Messungen wurden an einem Rotationsviskosimeter der Firma Haake, Typ PK 100 in Abhängigkeit von der Scherkraft bei Raumtemperatur bestimmt. Das Gerät war mit einem RV20 Rotavisco gekoppelt und mit einem Rheocontroller RC20 ausgerüstet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte am Computer unter Verwendung des Programmes Rheowin der Firma Haake. Die Viskosität wurde bei 600 Umdrehungen pro Minute angegeben.

4.8.6 Optische Mikroskopie

Die optischen Untersuchungen an Fasern bzw. mit Farbstoffen behandelten Bakterien wurden sowohl mit einem Mikroskop Leica DMRX, als auch an einem digitalen Mikroskop der Firma Keyence Modell VHX-100 durchgeführt. Das Leica DMRX war zusätzlich mit einer DC 200 Kamera, ebenfalls von Leica, ausgestattet. Zur Auswertung wurde die Software ImageJ verwendet.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden am Leica DMRX durchgeführt. Die Proben wurden im Auflichtmodus unter Verwendung einer Quecksilber-Lichtbogenlampe untersucht. Zur Filterung des von den Proben emittierten Lichts dienten im Mikroskop

verbaute Filter der Firma Leica. Bildaufnahmen wurden mit einer Kamera Leica DC 200 gemacht.

Untersuchungen mittels Phasenkontrastmikroskopie, an nicht gefärbten Bakterien wurden zusätzlich mit Mikroskopen der Firmen Leitz und Zeiss, die mit entsprechenden Objektiven ausgerüstet waren, durchgeführt.

4.8.7 Bestimmung des Gelschmelzpunktes

Die Bestimmung des Gelschmelzpunktes erfolgte nach der so genannten Falling-Ball-Methode.^[154, 155] Dabei wurde eine Stahlkugel von 3,2 mm und 136 mg Gewicht auf das zu untersuchende, gequollene Gel gelegt. Da die Stahlkugel ein Gewicht von mehr als 100 mg aufwies, war zu erwarten, dass das Messergebnis in gewissem Maße vom Kugelgewicht abhängig sein würde.^[156] Da jedoch immer die gleiche Kugel verwendet wurde, waren die Ergebnisse untereinander vergleichbar. Die Messungen wurden in Halbmikroreagenzgläsern durchgeführt.

Das Gel im Reagenzglas wurde hergestellt, indem zunächst eine Probe des zu testenden Materials in das Glas überführt wurde. Danach wurden die PVA-Partikel durch Zugabe von Wasser gequollen. Es wurde hierbei sichergestellt, dass das Gel stets mit einer dünnen Schicht aus Wasser überdeckt war. In diesem Zustand wurden die Gele vor der Messung über mehrere Tage gehalten, um ein vollständiges Quellen sicherzustellen. Vor der Messung wurde das überschüssige Wasser entfernt. Nach dem Platzieren der Stahlkugel auf der Oberfläche des Gels, wobei sichergestellt wurde, dass zwischen Stahlkugel und der Wand des Reagenzglases keine Berührung bestand, wurde das Reagenzglas dicht verschlossen. Dies diente dazu, ein Antrocknen der Oberfläche des Gels zu verhindern, da dies sicherlich einen erheblichen Einfluss auf die Messwerte gehabt hätte.

Das verschlossene Reagenzglas, sowie ein Thermometer wurden in einem Bad aus Silikonöl platziert, welches auf einem Heizrührer stand. Dabei wurde sichergestellt, dass sowohl das Thermometer, als auch das Reagenzglas die gleiche Entfernung vom Boden und der Wand des Ölbadens aufwiesen. Zusätzlich wurde eine Skala so platziert, dass die

Höhe der Stahlkugel abgelesen werden konnte. Die Temperatur des Ölbad es wurde nun gesteigert, wobei versucht wurde, eine Heizrate von einem Grad pro Minute zu erreichen. Durch heftiges Rühren wurde eine gleichmäßige Temperaturverteilung im Ölbad sichergestellt. Eine typische Messkurve ist in Diagramm 4-1 dargestellt. Bei der gemessenen Probe handelte es sich um MG100909. Deutlich ist am Diagramm zu erkennen, dass die Kugel bei Erhöhung der Temperatur zunächst unverändert auf der Oberfläche des Gels lag. Ab einer Temperatur von 65 °C begann die Kugel einzusinken, wobei bereits beginnend bei einer Temperatur von 51 °C eine gesteigerte Transparenz des Gels zu beobachten war. Bei 67 °C war die Kugel halb, bei 69 °C vollständig ins Gel eingesunken.

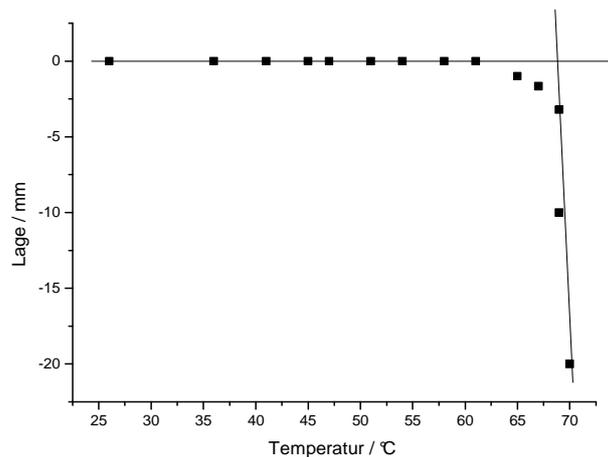


Diagramm 4-1: Bestimmung des Gelschmelzpunktes von MG100909 nach der Falling-Ball-Methode. Aufgetragen ist die Lage der Kugel relativ zur Skala gegen die Temperatur des Ölbad es.

Der Gelschmelzpunkt ergab sich, indem durch die beiden geraden Bereiche, also den Bereich in dem die Kugel auf dem Gel lag und dem Bereich in dem die Kugel zum Boden des Reagenzglas es hinab sank, Geraden gelegt wurden. Die Schnittpunkte der beiden Geraden lieferten den Gelschmelzpunkt. Er lag in diesem Fall um 69 °C. Eine genauere Angabe erschien mit der zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Ausrüstung und der sicherlich nicht über die gesamte Zeit konstanten Heizrate als nicht sinnvoll. Es wurden für jede Probe mehrere Messungen durchgeführt und anschließend die Mittelwerte gebildet.

4.9 Elektrogenessponnene Vliese zur Bakterienfiltration

4.9.1 Herstellung der Polymerlösungen

Zur Herstellung der Polymerlösungen wurde Polyamid 6 verwendet. Das Granulat wurde vor der Verwendung rund 24 Stunden bei 50 °C im Trockenschrank bei vermindertem Druck getrocknet. Die benötigte Menge wurde nach dem Abwiegen in ein 100 mL Schraubglas gegeben und in der entsprechenden Menge reiner Ameisensäure gelöst. Nach dem Auflösen folgte die Zugabe des für die Bestimmung des Flächengewichtes notwendigen Farbstoffes. Hierzu wurde Fluorescein-Dinatriumsalz verwendet. Die typische Menge betrug zwei Prozent bezogen auf das Polymere.

4.9.2 Herstellung der Filtervliese

Die Herstellung der Faservliese erfolgte in der in Abschnitt 4.7.2.1 beschriebenen Apparatur. Allerdings wurde in diesem Fall nicht die scheibenförmige Gegenelektrode verwendet. Zum Einsatz kamen bewegliche Modelle, die in Abbildung 3-42 beschrieben werden.

Kam die rotierende, scheibenförmige Gegenelektrode zum Einsatz, wurde zunächst die mit der Polymerlösung gefüllte Spritze in der Apparatur installiert und an die Hochspannungsquelle angeschlossen. Die Gegenelektrode wurde nun so in der Apparatur platziert, dass sich die Kanüle der Spritze nicht über deren Zentrum, sondern etwas seitlich verschoben befand. Die Gegenelektrode wurde geerdet und mit einem passend zugeschnittenen Papier belegt. Anschließend wurden die Apparatur und der Rotationsmechanismus der Gegenelektrode gestartet. Es wurde im Folgenden für mindestens 30 min gewartet. Dies hatte zwei Gründe: zum einen hatte das System Zeit ins Gleichgewicht zu kommen, was sich positiv auf die unerwünschten Abgänge von Tropfen auswirkte. Zum anderen erlaubte die Tatsache, dass die abgeschiedenen Fasern durch die Verwendung einer gefärbten Polymerlösung gut zu erkennen waren, ein Abschätzen der Charakteristik der Verteilung der abgeschiedenen Fasern auf der Gegenelektrode. Anschließend wurde das zu bespinnende Material auf die Gegenelektrode aufgelegt und über den gewünschten Zeitraum mit Fasern belegt.

Bei Verwendung der Walzenelektrode war die Vorgehensweise geringfügig verschieden. Nach der Installation und Kontaktierung der Spritze wurde die Elektrode in der Apparatur platziert. Bauartbedingt war der Abstand zwischen Kanülenspitze und Gegenelektrode hier geringer. Die Walzenelektrode befand sich zudem nicht unter der Kanüle, sondern neben ihr. Um zu gewährleisten, dass sich die erzeugten Fasern auf der Walzenelektrode abschieden, wurde die Kanüle gebogen und so auf die Gegenelektrode ausgerichtet. Die Aluminiumwalze der Elektrode wurde direkt mit dem zu bespinnenden Material belegt. Nach dem Starten der Walze und der Apparatur wurden die Proben direkt hergestellt, ein Equilibrieren war nicht möglich.

Sollten Faservliese auf einem Trägermaterial hergestellt werden, wurde dieses direkt auf die Elektroden aufgebracht und besponnen. War das gewünschte Produkt ein reines Vlies aus Polyamid 6, wurde auf möglichst glattes, nicht Wasser-Abweisendes Papier gesponnen. Wurde dieses Papier nun nach dem Spinnen in ein Wasserbad gelegt, so saugte sich das Papier voll Wasser und sank zu Boden. Das Polyamid 6 Vlies schwamm auf der Wasseroberfläche und konnte vorsichtig abgenommen und getrocknet werden.

Die an der Kanülenspitze anliegende Spannung betrug in allen Fällen 30 kV. Der Abstand zur Gegenelektrode variierte zwischen 15 und fünf Zentimetern.

4.9.3 Bestimmung der Masse der Filtervliese

Da sich die Bestimmung des Flächengewichtes, der nur in begrenzten Bereichen homogenen Faservliese, mit Hilfe einer Waage als nicht praktikabel erwiesen hatte, wurde eine photometrische Variante gewählt.

Die zum Spinnen eingesetzte Polymerlösung wurde auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und deren Absorption bei 437,5 nm gegen die Konzentration aufgetragen.

Analog zu jeder Probe, die einem Test der Filtrationseigenschaften unterzogen wurde, wurde eine Stück von vier Quadratzentimetern aus dem Bereich gleicher Belegung entnommen, so dass das Flächengewicht einer Probe auf die andere übertragbar war. Diese

Probe wurde in einem luftdichten Gefäß mit einer genau abgemessenen Menge Ameisensäure übergossen und das Polyamid 6 zusammen mit dem Farbstoff vom Trägermaterial gelöst. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Zentrifuge von Schwebstoffen befreit und in einem UV/Vis-Spektrophotometer vermessen. Unter Verwendung der Kalibrationskurve ließ sich das Flächengewicht der Probe genau bestimmen.

4.9.4 Untersuchung der Filtereigenschaften

Um die Filterwirkung der einzelnen Proben bestimmen zu können, wurde zunächst eine Bakteriensuspension hergestellt. Es wurden vorzugsweise *E. coli* verwendet, da diese im Gegensatz zu *M. luteus* keine Aggregate ausbildeten und so verlässlichere Ergebnisse lieferten. Das Nährmedium wurde inokuliert und im Inkubator schüttelnd inkubiert. Die Dichte der Suspension wurde über Photometrie verfolgt und das Wachstum bei der gewünschten Konzentration, noch in der exponentiellen Wachstumsphase gestoppt, indem der Kolben in Eiswasser gestellt wurde. Es wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, deren einzelne Verdünnungen jeweils auf zwei Agarplatten ausgebracht wurden, um die genaue Zahl lebender Zellen in der Suspension zu bestimmen.

Zur Durchführung des eigentlichen Testes wurde die Probe des Vlieses in einer sterilen Apparatur auf einen Träger aus einem porösen Material aufgelegt. Die Apparatur wurde anschließend neben der rauschenden Brennerflamme mit 30 mL der Bakteriensuspension befüllt. Die Apparatur wurde mit steriler Aluminiumfolie verschlossen und auf die Saugflasche aufgesetzt. Jetzt wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe einer Membranpumpe durch das Vlies gesaugt. Das Filtrat wurde hierbei in der sterilen Saugflasche aufgefangen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Da die Filtrationswirkung zuvor nur grob abgeschätzt werden konnte, wurden meist zumindest fünf Verdünnungsstufen und das Filtrat direkt auf jeweils zwei Agarplatten ausgebracht. Pro Agarplatte wurden 100 µL ausgestrichen. Nach der Inkubation der Agarplatten bei 37 °C konnten die Kolonien gezählt und so auf die Zahl lebender Zellen im Filtrat zurückgerechnet werden. Die Effizienz der untersuchten Filterprobe ergab sich aus den Lebendzellzahlen der ursprünglichen Suspension und des Filtrates nach folgender Formel:

$$\eta = \frac{C_1 - C_2}{C_1}$$

C_1 repräsentiert hierbei die Lebendzellzahl in der Suspension, C_2 die Lebendzellzahl im Filtrat. $\eta = 1$ bedeutet hierbei eine Filtrationsleistung von 100 % aller Zellen.

5 Schlussfolgerungen

Im Verlauf der dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Untersuchungen, konnte das Ziel einer wasserbeständigen, aktiven Membran erreicht werden. Die hierzu durchgeführten Versuche erbrachten eine Reihe von Erkenntnissen.

Die Verwendung wasserlöslicher Polymere, mit einer anschließenden Beschichtung mit PPX durch Gasphasenabscheidung, erwies sich als nicht optimal. Zum einen erforderte die nachträgliche Beschichtung einen weiteren Arbeitsschritt und zum anderen erwies sich die aufgetragene Schicht aus PPX als den Belastungen nicht gewachsen. Dies zeigte sich durch deutlich erkennbare Risse in der Beschichtung. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass eine gleichmäßige Schichtdicke auf den Fasern, auch in den tieferen Ebenen eines Vlieses hätte erreicht werden können.

Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass dieses Problem dadurch überkommen werden konnte, dass die Bakterien, bevor sie in die Fasern eingebracht wurden, in Partikel aus Polyvinylalkohol eingeschlossen wurden. Da diese Partikel eine Schutzwirkung vor vielen, beim Elektrosponnen gebräuchlichen Lösungsmitteln aufweisen, steht somit eine weite Bandbreite an wasserbeständigen Polymeren zur Verfügung, die zu Fasern mit darin immobilisierten Bakterien verarbeitet werden können.

Die Bakterien in den Partikeln waren, entsprechende Lagerung vorausgesetzt, auch noch nach vielen Monaten in der Lage, Bakterienwachstum zu erzeugen, wenn sie auf Feuchtigkeit und Nährstoffe trafen. Sie stellen also eine lagerfähige Form der darin immobilisierten Bakterien dar.

Versuche zeigten auch, dass wenn solche Partikel in eine Matrix aus Polyvinylbutyral eingebracht wurden, ein Stoffaustausch mit einem die Matrix umgebenden, wässrigen Medium möglich war. Es konnten also Substanzen aus dem Medium, durch das Matrix Polymere, zu den in den Partikeln immobilisierten Bakterien vordringen, dort verändert werden und wieder zurück ins Medium gelangen. Dies entspricht der Definition der lebenden Membran im Sinne der Aufgabenstellung.

Zusätzlich konnte noch gezeigt werden, dass durch das elektrostatische Spinnen hergestellte Vliese zur Entfernung von Bakterien aus Flüssigkeiten durch Filtration tauglich sind. Die verwendeten Vliese aus Polyamid 6 konnten die Konzentration von Bakterien in einer Suspension von mehreren Millionen pro Milliliter auf nahezu Null senken.

6 Ausblick

Die im Zuge dieser Arbeit weiter verfeinerten und neu entwickelten Verfahren zur Herstellung Bakterien beladener Faservliese aus verschiedenen wasserfesten Polymeren, unter Verwendung von die Bakterien schützenden Partikeln, bieten durchaus noch Ansatzpunkte zur Klärung von Detailfragen und Möglichkeiten der Weiterentwicklung.

Eine zentrale Aufgabe, die im Zentrum weiterführender Untersuchungen stehen könnte, ist die Immobilisierung weiterer Arten von Bakterien. Hierzu könnten in Fasern aus verschiedenen Materialien zum Einsatz kommen. Wie im Literaturteil bereits erwähnt wurde, existieren viele Bakterienarten, die in der Lage sind, Verunreinigungen abzubauen, oder als Rohstoffe anzusehende Substanzen zu produzieren bzw. anzureichern. Die Immobilisierung und Untersuchung solcher Bakterien hinsichtlich ihrer Aktivität in der Membran, wäre ein großer Fortschritt im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem, welches den Farbstoff Resazurin verwendet. Es besteht hierbei durchaus die Möglichkeit, dass die Art der verwendeten Partikel einer Modifizierung bedarf, beispielsweise wenn Bakterien immobilisiert werden, die ihren Ursprung in einer marinen Umgebung haben. Ein Beispiel für solche Bakterien sind die in dieser Arbeit erwähnten *Alcanivorax* Arten.

Des Weiteren ist die Verwendung alternativer Partikel, die zwar in dieser Arbeit kurz gestreift, jedoch nicht weitergeführt wurde, durchaus Erfolg versprechend. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, Wasser enthaltende Kapseln direkt in der zu verspinnenden Lösung zu erzeugen und diese anschließend zu verspinnen. Diese Technik könnte einen Zugang zu Faservliesen bieten, die nicht wie im Falle der PVA-Partikel trockene, sondern wasserhaltige Partikel mit Bakterien enthielten. Die Herstellung und genauere Untersuchung solcher Partikel steht noch aus.

Sicherlich auch von großem Interesse, wären die Herstellung und das Einbringen von so genannten „intelligenten“, Bakterien enthaltenden Hydrogelpartikeln in Fasern. Unter „Intelligent“ ist in diesem Zusammenhang die Eigenschaft der Partikel zu verstehen, auf äußere Reize zu reagieren. Solche Reize könnten beispielsweise Temperatur oder pH-Wert

sein. Eventuell wären auf diese Weise Partikel und Faservliese zugänglich, die quasi erst nachdem sie „eingeschaltet“ wurden ihre Arbeit aufnehmen oder Bakterien an ihre Umgebung abgeben.

Auch bezüglich der untersuchten Vliese zur Filtration von Bakterien besteht noch Bedarf für weitere Untersuchungen. Notwendig wäre hier noch eine Optimierung der Vliese. Eine solche Optimierung könnte das verwendete Material betreffen. Polyamid 6 stellt nur ein Polymer von vielen dar, das durch die Technik des elektrostatischen Spinnens zu dünnen Fasern verarbeitet werden kann. Auch Faserdurchmesser, Porengröße und Flächengewicht bedürfen, im Hinblick auf gute Filtrationsergebnisse bei vertretbaren Drücken, noch der Optimierung.

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Greiner für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas, sowie für seine anregenden Ratschläge, die oftmals neue Herangehensweisen und somit die Möglichkeit Probleme zu umgehen, initiierten.

Zudem gilt mein Dank insbesondere Frau Dr. Astrid Brandis-Heep und Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Thauer vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg und dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie für das Überlassen von Arbeitsmaterialien. Auch die Diskussionsbereitschaft bei aufkommenden Fragen und der Beurteilung von Konzepten waren von großer Hilfe.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen voran meinen Laborkollegen Thorsten Röcker, Aleksandar Stoiljkovic, Ilka Paulus und Christian Knierim danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und viele anregende Gedanken. Auch die Aktivitäten außerhalb der Universität sollen in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben.

Den technischen Mitarbeitern des Arbeitskreises, Martina Gerlach, Lisa Hamel, Johanna Otto, Uwe Justus und Tina Steins gilt mein Dank für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Auch möchte ich den Angehörigen der Feinmechanik- und der Elektronikwerkstatt danken, die zahlreiche meiner Ideen zuerst vereinfachten und dann auf großartige Weise in die Realität umsetzten.

Herrn Michael Hellwig danke ich für die Durchführung von elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die mir persönlich in dieser Qualität nicht möglich gewesen wären, sowie die Beratung zur Probenvorbereitung.

Herrn Professor Charles Greenblatt danke ich für das Überlassen neuer Stämme *Micrococcus luteus*, sowie für die Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop und die Erlaubnis diese für die vorliegende Arbeit zu verwenden.

Danksagung

Ich danke zudem den Mitgliedern der Gruppe von Prof. Dr. Wendorff, insbesondere Daniel Hussain für seine Hilfe bei der Herstellung ausreichend homogener Polyamid-Vliese.

Auch möchte ich Frau Edith Schmidt für die große Hilfsbereitschaft bei zahlreichen administrativen Vorgängen danken.

Am Ende möchte ich meiner Familie für das Vertrauen in mich und die Unterstützung bei der Realisierung meiner Ziele danken, die vieles einfacher machte.

8 Literatur

- [1] H.-C. Kim, S. Kreiling, A. Greiner, N. Hampf, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 372, 899.
- [2] S. Feil, *Chemie in unserer Zeit* **2003**, 37, 231.
- [3] *Der Spiegel* **21.08.2006**, 135.
- [4] V. Chandramouli, K. Kailasapathy, P. Peiris, M. Jones.
- [5] C. Iyer, K. Kailasapathy, *Journal of Food Science* **2005**, 70, M18.
- [6] K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy, *International Journal of Food Microbiology* **2000**, 62, 47.
- [7] W. Ouyang, H. Chen, M. L. Jones, T. Metz, T. Haque, C. Martoni, S. Prakash, *J. Pharmaceut. Sci.* **2004**, 7, 315.
- [8] M. Gensheimer, Philipps-Universität (Marburg), **2006**.
- [9] S. Norton, T. D'Amore, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, 16, 365.
- [10] L. Rayleigh, *Phil. Mag. J.* **1882**, 44.
- [11] H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker, *Polymer* **1999**, 40, 4585.
- [12] A. Formhals, *Vol. 1, 975, 504*, **1934**.
- [13] P. K. Baumgarten, *Journal of Colloid and Interface Science* **1971**, 36, 71.
- [14] L. Larrondo, R. S. J. Manley, *Journal of Polymer Science* **1981**, 19, 909.
- [15] L. Larrondo, R. S. J. Manley, *Journal of Polymer Science* **1981**, 19, 921.
- [16] L. Larrondo, R. S. J. Manley, *Journal of Polymer Science* **1981**, 19, 933.
- [17] J. Doshi, D. H. Reneker, *J. Electrostat.* **1995**, 35, 151.
- [18] D. H. Reneker, I. Chun, *Nanotechnology* **1996**, 7, 216.
- [19] M. Bognitzki, H. Hou, M. Ishaque, T. Frese, M. Hellwig, C. Schwarte, A. Schaper, J. H. Wendorff, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 637.
- [20] H. Hou, Z. Jun, A. Reuning, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner, *Macromol.* **2002**, 35, 2429.
- [21] A. Greiner, J. H. Wendorff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5670.
- [22] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Comp. Sci. Technol.* **2003**, 63, 2223.
- [23] Y. Xia, D. Li, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1151.
- [24] Y. Wang, Y.-L. Hsieh, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2004**, 42.
- [25] A. Melaiye, Z. Sun, K. Hindi, A. Milsted, D. Ely, D. H. Reneker, C. A. Tessier, W. J. Youngs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2285.
- [26] X. Xu, Q. Yang, Y. Wang, H. Yu, X. Chen, X. Jing, *European Polymer Journal*, *in press*.
- [27] Y. Dror, W. Salalha, R. L. Khalfin, Y. Cohen, A. L. Yarin, E. Zussman, *Langmuir* **2003**, 9, 7012.
- [28] H. Hou, J. J. Ge, Z. Jun, Q. Li, D. H. Reneker, A. Greiner, S. Z. D. Cheng, *Chem. Mater.* **2005**, 17, 967.
- [29] F. Ko, Y. Gogotsi, A. Ali, N. Naguib, H. Ye, G. Yang, C. Li, P. Willis, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1161.
- [30] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner, J. H. Wendorff, *Polym. Adv. Technol.* **2005**, 16, 276.

-
- [31] G.-M. Kim, A. Wutzler, H.-J. Radusch, G. H. Michler, P. Simon, R. A. Sperling, W. J. Parak, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4949.
- [32] T. Song, Y. Zhang, T. Zhou, C. T. Lim, S. Ramakrishna, B. Liu, *Chemical Physics Letters* **2005**, *415*, 317.
- [33] Y. Song, D. K. Kim, K. J. Ihn, S. M. Jo, D. Y. Kim, *Nanotechnology* **2004**, *15*, 1861.
- [34] M. Wang, H. Singh, T. A. Hatton, G. C. Rutledge, *Polymer* **2004**, *45*, 5505.
- [35] S.-W. Lee, A. M. Belcher, *Nano Letters* **2004**, *4*, 387.
- [36] M. Gensheimer, M. Becker, A. Brandis-Heep, J. H. Wendorff, R. K. Thauer, A. Greiner, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 2480.
- [37] A. López-Rubio, E. Sanchez, Y. Sanz, J. M. Lagaron, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2823.
- [38] W. Salalha, J. Kuhn, Y. Dror, E. Zussman, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 4675.
- [39] Y. Liu, M. H. Rafailovich, R. Malal, D. Cohn, D. Chidambaram, *PNAS* **2009**, *106*, 14201.
- [40] A. Townsend-Nicholson, S. N. Jayasinghe, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3364.
- [41] H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D. H. Reneker, P. Wang, *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1027.
- [42] J. Xie, Y.-L. Hsieh, *Journal of Materials Science* **2003**, *38*, 2125.
- [43] T. E. Herricks, S.-H. Kim, J. Kim, D. Li, J. H. Kwak, J. W. Grate, S. H. Kim, Y. Xia, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3241.
- [44] S. Y. Chew, J. Wen, E. K. F. Yim, K. W. Leong, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2017.
- [45] A. Greiner, Z. Jun, A. Aigner, F. Czubayko, T. Kissel, J. H. Wendorff, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1484.
- [46] Z.-M. Huang, C.-H. He, A. Yang, Y. Zhang, X.-J. Han, J. Yin, Q. Wu, *Wiley Interscience* **2006**.
- [47] H. F. Jin, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D. H. Reneker, P. Wang, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 1027.
- [48] E. R. Kenway, G. L. Bowlin, K. Mansfield, I. Layman, D. G. Simpson, E. Sanders, G. Wnek, *J. Controlled Release* **2002**, *81*, 57.
- [49] D. T. Smith, N. F. Conant, H. P. Willett, *Zinsser Microbiology*, 4th ed., Meredith Corp., **1968**.
- [50] G. Verreck, I. Cun, J. Peeters, J. Rosenblau, M. E. Brewster, *Pharm. Res.* **2003**, *20*.
- [51] A. R. Pedersen, E. Arvin, *Biodegradation* **1995**, *6*, 109.
- [52] G. Carturan, R. Campostrini, S. Diré, V. Scardi, E. De Alteris, *J. Mol. Catal.* **1989**, *57*, L13.
- [53] J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys.: Condensed Matter* **2001**, *13*, R673.
- [54] E. J. A. Pope, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1995**, *4*, 225.
- [55] R. Campostrini, G. Carturan, R. Caniato, A. Piovan, R. Filippini, G. Innocenti, E. M. Cappelletti, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1996**, *7*, 87.
- [56] N. Nassif, O. Bouver, M. N. Rager, C. Roux, T. Coradin, J. Livage, *Nature materials* **2002**, *1*, 42.
- [57] E. J. A. Pope, K. Braun, C. M. Peterson, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1997**, *8*, 635.
- [58] K. G. Goosen, CRC Press, Boca Raton, Fl, **1993**.
- [59] A. C. Jen, M. C. Wake, A. G. Mikos, *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *50*, 357.
- [60] N. Wang, X. S. Wu, *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *166*, 1.
-

-
- [61] T. S. Chung, K.-C. Loh, S. K. Goh, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *68*, 1677.
- [62] T. S. Chung, K.-C. Loh, H. L. Tay, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70*, 2585.
- [63] K. Kailasapathy, *Curr. Issues Interest. Microbiol.* **2002**, *3*, 39.
- [64] C.-C. Young, P. D. Rekha, W.-A. Lai, A. B. Arun, *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *95*, 76.
- [65] E. Ivanova, V. Chipeva, I. Ivanova, X. Dousset, D. Poncelet, *Journal of culture collections 2000-2002*, *3*, 53.
- [66] S. Wen, W. T. K. Stevenson, *Materials in Medicine* **1993**, *4*, 23.
- [67] T. Hatekeyama, A. Yamauchi, H. Hatakeyama, *European Polymer Journal* **1984**, *25*, 61.
- [68] N. A. Peppas, E. W. Merrill, *J. Pol. Sci. Pol. Chem.* **1976**, *14*, 157.
- [69] M. Shibayama, F. Ikkai, R. Moriwaki, S. Nomura, *Macromol.* **1994**, *27*, 1738.
- [70] M. Shibayama, F. Ikkai, S. Nomura, *Macromol.* **1994**, *27*, 6383.
- [71] C. M. Hassan, N. A. Peppas, *Advances in Polymer Science* **2000**, *153*, 37.
- [72] V. I. Lozinsky, I. Y. Galaev, F. M. Plieva, I. N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, *Trends In Biotechnology* **2003**, *21*, 445.
- [73] M. Kita, Y. Ogura, Y. Honda, S.-H. Hyon, W.-I. Cha, Y. Ikada, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **1990**, *228*, 533.
- [74] T. Hirai, Y. Asada, T. Suzuki, S. Hayashi, M. Nambu, *J. Appl. Polym. Sci.* **1989**, *38*, 491.
- [75] Y. Honda, N. Nao-I, S.-Y. Kim, E. Sakaue, M. Nambu, *Documenta Ophthalmologica* **1986**, *63*, 205.
- [76] I. Mano, H. Goshima, M. Nambu, M. Iio, *Magnetic Resonance In Medicine* **1986**, *3*, 921.
- [77] C. M. Hassan, J. E. Stewart, N. A. Peppas, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *49*, 161.
- [78] N. A. Peppas, R. E. P. Simmons, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2004**, *14*, 285.
- [79] V. I. Lozinsky, F. M. Plieva, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 227.
- [80] O. Ariga, H. Takagi, H. Nishizawa, Y. Sano, *J. Ferment. Technol.* **1987**, *65*, 651.
- [81] H. Asano, H. Myoga, M. Asano, M. Toyao, *Water Sci. Technol.* **1992**, *26*, 1037.
- [82] H. Asano, H. Myoga, M. Asano, M. Toyao, *Water Sci. Technol.* **1992**, *26*, 2397.
- [83] H. Myoga, H. Asano, Y. Nomura, H. Yoshida, *Water Sci. Technol.* **1991**, *23*, 1117.
- [84] E. I. Rainina, I. E. Badalian, O. V. Ignatov, A. B. Fedorov, A. L. Simonian, S. D. Varfolomeev, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *56*, 117.
- [85] K. Furukawa, A. Ike, S. Ryu, M. Fijita, *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, *76*, 515.
- [86] M. Okazaki, T. Hamada, H. Fujii, O. Kusudo, A. Mizobe, S. Matsuzawa, *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *58*, 2243.
- [87] S. H. Song, S. S. Choi, K. Park, Y. J. Yoo, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 567.
- [88] B. Ficek, N. A. Peppas, *J. Controlled Release* **1993**, *27*, 259.
- [89] J. K. Li, N. Wang, X. S. Wu, *J. Controlled Release* **1998**, *56*, 117.
- [90] M. B. Cassidy, H. Lee, J. T. Trevors, *Journal of Industrial Microbiology* **1996**, *16*, 79.
- [91] J. Beunink, H.-J. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *29*, 72.
- [92] C. Ernst, H.-J. Rehm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 150.
- [93] Y. Li, C. Wang, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *75*, 783.
- [94] M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, S. Lang, E. R. B. Moore, W.-R. Abraham, H. Lünsdorf, K. N. Timmis, *International Journal of Systematic Bacteriology* **1998**, *48*, 339.
-

-
- [95] A. Hara, K. Syutsubo, S. Harayama, *Environmental Microbiology* **2003**, *5*, 746.
- [96] J. S. Sabirova, M. Ferrer, D. Regenhardt, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, *Journal of Bacteriology* **2006**, *188*, 3763.
- [97] C. Liu, Z. Shao, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2005**, *55*, 1181.
- [98] G. M. Gadd, C. White, *Tibtech* **1993**, *11*, 353.
- [99] B. Volesky, Z. R. Holan, *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 235.
- [100] B. D. Faison, C. A. Cancel, S. N. Lewis, H. Adler, *Applied And Environmental Microbiology* **1990**, *56*, 3649.
- [101] A. Nakajima, T. Tsuruta, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2004**, *1*, 13.
- [102] T. Tsuruta, *Journal of Bioscience And Bioengineering* **2002**, *94*, 23.
- [103] G. I. Taylor, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1964**, *280*, 383.
- [104] G. I. Taylor, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1969**, *313*, 453.
- [105] A. L. Yarin, S. Koombhongse, D. H. Reneker, *Journal of Applied Physics* **2001**, *90*, 4836.
- [106] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supaphol, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 2327.
- [107] L. Wannatong, A. Sirivat, P. Supaphol, *Polym. Int.* **2004**, *53*, 1851.
- [108] G. C. Rutledge, Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, *Polymer* **2001**, *42*, 9955.
- [109] M. M. Hohman, Y. M. Shin, G. C. Rutledge, *Phys. Fluids.* **2001**, *13*.
- [110] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78*, 1149.
- [111] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge, *Polymer* **2001**, *42*, 9955.
- [112] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge, *Phys. Fluids.* **2001**, *13*, 2201.
- [113] A. L. Yarin, S. Koombhongse, D. H. Reneker, *J. Appl. Phys.* **2001**, *89*, 3018.
- [114] R. Dersch, T. Liu, A. Schaper, A. Greiner, J. H. Wendorff, *J. Pol. Sci. Pol. Chem.* **2003**, *41*, 545.
- [115] P. Katta, M. Alessandro, R. D. Ramsier, G. G. Chase, *Nano Letters* **2004**, *4*, 2215.
- [116] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, *Nano Letters* **2003**, *3*, 1167.
- [117] S. Schlecht, S. Tan, M. Yosef, R. Dersch, J. H. Wendorff, Z. Jia, A. Schaper, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 809.
- [118] A. L. Yarin, E. Zussman, S. A. Theron, *Nanotechnology* **2001**, *12*, 384.
- [119] R. J. Linhardt, G. Viswanathan, S. Murugesan, V. Pushparaj, O. Nalamasu, P. M. Ajayan, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 415.
- [120] Z. Jun, H. Hou, J. H. Wendorff, A. Greiner, *e-polymers* **2005**, *no. 038*.
- [121] S. Shivkumar, K. Yim, A. Koski, *Materials Letters* **2004**, *58*, 493.
- [122] Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner, *e-polymers* **2003**, *no. 009*.
- [123] S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase, J. F. Rabolt, *Macromol.* **2002**, *35*, 8456.
- [124] A. Stoiljkovic, Philipps-Universität (Marburg), **2007**.
- [125] S. R. Stauffer, N. A. Peppas, *Polymer* **1992**, *33*, 3933.
- [126] K. Nishinari, N. Watase, K. Ogino, M. Nambu, *Polym. Commun.* **1983**, *24*, 345.
- [127] F. Urushizaki, H. Yamaguchi, K. Nakamura, S. Numajiri, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *International Journal of Pharmaceutics* **1990**, *58*, 135.
-

- [128] T. Hatakeyema, J. Uno, C. Yamada, A. Kishi, H. Hatakeyama, *Thermochimica Acta* **2005**, *431*, 144.
- [129] F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, T. Ikawa, K. Monobe, *Colloid & Polymer Sci.* **1986**, *264*, 595.
- [130] W. F. Gorham, *J. Polym. Sci. A-1* **1966**, *4*, 3027.
- [131] M. Szwarc, *Discuss. Faraday. Soc.* **1947**, *2*, 46.
- [132] M. Szwarc, *J. Polym. Sci.* **1951**, *6*, 319.
- [133] T. Peng, P. Gibula, K. -de Yao, M. F. A. Goosen, *Biomat.* **1996**, *17*, 685.
- [134] L. A. Errede, *J. Polym. Sci.* **1962**, *60*, 33.
- [135] R. L. Whistler, K. W. Kirby, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1959**, *314*, 46.
- [136] S. K. Mittal, N. Aggarwal, G. Sailaja, A. van Olpen, H. HogenEsch, A. North, J. Hays, S. Moffatt, *Vaccine* **2001**, *19*, 253.
- [137] in *GESTIS Stoffdatenbank, Vol. 2010*, IFA.
- [138] Merck, **2004**.
- [139] T. F. Guerin, M. Mondido, B. McClenn, B. Peasley, *Letters in Applied Microbiology* **2001**, *32*, 340.
- [140] P. G. Nix, M. M. Daykin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 354.
- [141] R. Gumprecht, H. Gerlach, A. Nehrkorn, *Helgoländer Meeresunters.* **1995**, *49*, 189.
- [142] B. W. Hammer, F. J. Babel, *Dairy Bacteriology (4th ed.)*, John Wiley and Sons, **1957**.
- [143] R. Kuemmerlin, *J. Food Technol.* **1982**, *17*, 513.
- [144] D. Liu, W. M. J. Strachan, *Ergebn. Limnol.* **1979**, *12*, 24.
- [145] C. Peroni, G. Rossi, *Chem. Ecol.* **1986**, *2*, 205.
- [146] Y. M. Reddy, I. Karunasagar, K. S. Udupa, *Asian Fish. Sci.* **1990**, *3*, 263.
- [147] D. Liu, W. M. J. Strachan, *Arch. Hydrobiol. Beih.* **1980**, *12*, 24.
- [148] A. N. DeBelder, K. Granath, *Carbohydrate Research* **1973**, *30*, 375.
- [149] Y. Kaneo, S. Hashihama, A. Kakinoki, T. Tanaka, T. Nakano, Y. Ikeda, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2005**, *20*, 435.
- [150] M. T. Madigan, J. M. Martinko, *Brock Mikrobiologie*, 11th ed., Pearson Studium, München, **2006**.
- [151] J. M. Schneiderheinze, D. W. Armstrong, G. Schulte, D. J. Westenberg, *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *189*, 39.
- [152] R. W. Weaver, *Applied Microbiology* **1975**, *29*, 287.
- [153] E. Grundberg, *Journal of Bacteriology* **1966**, *92*, 23.
- [154] H. Matsuda, H. Fujimatsu, M. Imaizumi, S. Kuroiwa, *Polymer Journal* **1981**, *13*, 807.
- [155] M. Okabe, M. Isayama, H. Matsuda, *J. Appl. Polym. Sci.* **1985**, *30*, 4735.
- [156] A. Takahashi, M. Sakai, T. Kato, *Polymer Journal* **1980**, *12*, 335.