

**Immobilisierung von Bakterien in Hydrogelen  
und chemische Weiterverarbeitung  
zu wasserstabilen  
lebenden Biohybridsystemen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Christian Peter Knierim**

aus

Baunatal, Hertingshausen

**Marburg (Lahn) 2013**

---

Vom Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer 1180)  
als Dissertation angenommen am: 12 Juli 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Greiner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Seema Agarwal

Tag der mündlichen Prüfung am: 02 August 2013

## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	iii
II.	Abbildungsverzeichnis .....	ix
1.	Einführung .....	1
2.	Grundlagen und Überblick.....	6
2.1	<i>Rückgewinnung anorganischer Werkstoffe durch Mikroorganismen.....</i>	<i>6</i>
2.1.1	Einflussfaktoren auf die Biosorption .....	7
2.1.2	Bakterien als biologisches Material.....	7
2.1.3	Immobilisierung von Mikroorganismen für Bioreaktoren.....	10
2.1.4	Gleichgewichtsmodelle der Biosorption .....	11
2.2	<i>Mikroverkapselung von Bakterien.....</i>	<i>13</i>
2.2.1	Einleitung.....	13
2.2.2	Immobilisierung von Bakterien durch Mikroverkapselung .....	15
2.2.3	Materialien für die Mikroverkapselung.....	15
2.2.4	Techniken der Mikroverkapselung .....	16
2.2.4.1	Extrusion.....	16
2.2.4.2	Sprühtrocknung.....	18
2.2.4.3	Emulsion .....	18
2.2.5	Stabilität der Mikrokapselfn .....	19
2.2.6	Anpassung der Zellphysiologie .....	20
2.2.7	Anwendungen immobilisierter Mikroorganismen in biotechnologischen Prozessen.....	20
2.3	<i>Elektrospinnen.....</i>	<i>21</i>
2.3.1	Konzept.....	21
2.3.2	Immobilisierung von Mikroorganismen in elektrogesponnene Fasern .....	23
2.4	<i>Modifikation von Oberflächen durch kontrollierte radikalische Polymerisation.....</i>	<i>26</i>

2.4.1	Konzepte der Oberflächenmodifikation mittels Polymerbürsten .....	26
2.5	<i>Polymerisation von Poly(p-xylylen)</i> .....	33
2.5.1	Gasphasenabscheidung von PPX.....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussionen .....</b>	<b>35</b>
3.1	<i>Chemische Oberflächenmodifikation von lebenden Kompositen</i> .....	35
3.1.1	Hypothese .....	35
3.1.2	Konzept.....	36
3.1.3	Oberflächenmodifikation mit Octadecylisocyanat.....	37
3.1.4	Oberflächenaktivierung durch 2,4-TDI.....	40
3.1.5	Oberflächenvernetzung von lebenden Kompositen .....	46
3.1.6	Zusammenfassung.....	48
3.2	<i>„Grafting from“ von PMMA auf lebende Komposite</i> .....	50
3.2.1	Hypothese .....	50
3.2.2	Konzept.....	51
3.2.3	Freisetzung der immobilisierten Bakterien nach Kontakt mit Wasser.....	53
3.2.4	Ausrüsten der Partikeloberfläche mit 2-Brom-2-methylpropionbromid .....	55
3.2.5	Kontrollierte Radikalische Polymerisation von PMMA und Retention der Freisetzung der immobilisierten <i>M. luteus</i> .....	65
3.2.6	Retention der Freisetzung in wässriger Lösung.....	73
3.2.7	Charakterisierung der bakterienhaltigen PMMA-PVA-Partikel .....	78
3.2.8	Untersuchung der Architektur der PMMA-PVA-Mikropartikel .....	79
3.2.8.1	Thermogravimetrische Analyse der PMMA-PVA-Partikel und deren Intermediate.....	80
3.2.8.2	Analyse der Kern-Hülle-Struktur mittels konfokalem Lasermikroskop .....	82
3.2.8.3	Charakterisierung der Kern-Hülle-Struktur durch TEM-Aufnahmen .....	86
3.2.9	Freisetzungsverhalten der PVA- und PMMA-PVA-Mikropartikel .....	87
3.2.10	Untersuchung der Wasserstabilität der PMMA-PVA-Partikel .....	92

3.2.11	Zusammenfassung.....	95
3.3	<i>Pfropfpolymerisation von NIPAm auf lebende Komposite</i> .....	98
3.3.1	Hypothese .....	98
3.3.2	Konzept.....	98
3.3.3	Überlebenstest in Aceton-Wasser-Lösungen .....	99
3.3.4	Oberflächeninitiierte ATRP von NIPAm .....	101
3.3.5	Zusammenfassung.....	104
3.4	<i>Immobilisierung von M. luteus in PVA-Mikrofasern</i> .....	106
3.4.1	Hypothese .....	106
3.4.2	Konzept.....	107
3.4.3	Immobilisierung von Bakterien in PVA-Mikrofasern .....	108
3.4.4	Oberflächenmodifikation mit CVD .....	110
3.4.5	Nachweis von lebenden immobilisierten Bakterien nach CVD.....	112
3.4.6	Permeabilität der Kern-Hülle-Fasern.....	114
3.4.7	Nachweis der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Bakterien.....	116
3.4.8	Gold-Sequestrierung von immobilisierten <i>M. luteus</i> .....	123
3.4.9	Lokalisierung und Charakterisierung des Goldes in den Fasern .....	125
3.4.10	Zusammenfassung.....	128
3.5	<i>Immobilisierung von M. luteus in PEO-Nanofasern</i> .....	130
3.5.1	Hypothese .....	130
3.5.2	Konzept.....	131
3.5.3	Immobilisierung von Bakterien in Nanofasern.....	132
3.5.4	Beschichtung der bakterienhaltigen Nanofasern mittels CVD.....	136
3.5.5	Nachweis von lebenden Bakterien in PPX-PEO-Fasern .....	141
3.5.6	Enzymatische Aktivität der immobilisierten Bakterien .....	142
3.5.6.1	Vergleich der Aktivität von in Mikro- und Nanofasern immobilisierten Bakterien	148

3.5.7	Sequestrierung von Gold-Ionen .....	149
3.5.7.1	Vergleich der Sequestrierung von bakterienhaltigen Nano- und Mikrofasern 158	
3.5.8	Nachweis des sequestrierten Goldes in den Fasern .....	158
3.5.9	Zusammenfassung.....	160
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>162</b>
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>165</b>
<b>6.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>167</b>
6.1	<i>Verwendete Materialien.....</i>	<i>167</i>
6.2	<i>Verwendete kommerzielle Polymere .....</i>	<i>168</i>
6.3	<i>Verwendete Bakterienarten .....</i>	<i>168</i>
6.3.1	Micrococcus luteus.....	168
6.3.2	Micrococcus luteus Amber-4.....	169
6.4	<i>Verwendete Geräte.....</i>	<i>170</i>
6.5	<i>Nährmedien und Puffer .....</i>	<i>170</i>
6.5.1	Nährmedien für Micrococcus luteus .....	170
6.5.2	Kaliumphosphat-Puffer .....	171
6.6	<i>Mikrobiologische Methoden .....</i>	<i>171</i>
6.6.1	Sterilisation.....	171
6.6.2	Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung .....	172
6.6.2.1	Kulturen in Flüssigmedium.....	172
6.6.2.2	Kulturen auf Agarplatten .....	172
6.6.3	Bestimmung der Zellzahl .....	173
6.6.3.1	Bestimmung durch optische Dichte .....	173
6.6.3.2	Bestimmung der Lebendzahl durch die Zahl der wachsenden Kolonien ...	173

6.6.4	Färben von Bakterien .....	174
6.6.4.1	Totfärbung mit Kristallviolett.....	174
6.6.4.2	Lebendfärbung durch Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung .....	174
6.7	<i>Charakterisierungsmethoden</i> .....	176
6.7.1	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX).....	176
6.7.2	Infrarot-Spektroskopie (IR) .....	176
6.7.3	Optische Mikroskopie .....	176
6.7.4	Konfokale Lasermikroskopie (KLSM) .....	177
6.7.5	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	177
6.7.6	Dektak Profilometer .....	177
6.7.7	Thermogravimetrische Analysen (TGA).....	177
6.7.8	UV/VIS Spektroskopie .....	178
6.7.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	178
6.7.10	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) .....	178
6.8	<i>Bakterienhaltige Polymerlösungen</i> .....	179
6.8.1	Herstellung bakterienhaltiger PVA-Partikel.....	179
6.8.2	Überlebensfähigkeit der <i>M. luteus</i> in PVA-Partikeln .....	181
6.8.2.1	In Trockensubstanz .....	181
6.8.2.2	In organischen Lösungsmitteln.....	181
6.8.2.3	Nach erfolgter chemischer Oberflächenmodifikation.....	181
6.8.3	Chemische Umsetzungen mit bakterienhaltigen PVA-Partikeln .....	182
6.8.3.1	Umsetzung von PVA-Partikeln mit Oktadecylisocyanat (CK0309201201) .	182
6.8.3.2	Umsetzung mit 2,4-TDI und Nilblau (CK1801201101) .....	183
6.8.3.3	Umsetzung mit Hexamethylen-diisocyanat (CK2610201102).....	184
6.8.3.4	Synthese der Initiator-PVA-Partikel, Makroinitiator.....	184
6.8.3.5	Pfropfung von P(MMA) auf Makroinitiatorpartikel.....	187
6.8.4	Wasserstabilitätstest der PMMA-PVA-Partikel.....	193

6.8.5	Anreicherung der PMMA-Hülle mit Kupfer .....	194
6.8.5.1	Pfropfung von P(NIPAm) auf Makroinitiatorpartikel .....	194
6.8.6	Herstellung PVA-Mikrofasern .....	195
6.8.6.1	Herstellung der PVA-Lösung .....	195
6.8.6.2	Faserherstellung .....	196
6.8.6.3	Überlebenstest in Fasern.....	197
6.8.6.4	Beschichtung der Fasern .....	197
6.8.6.5	Nachweis der biologischen Aktivität der immobilisierten <i>M. luteus</i> .....	198
6.8.6.6	Herstellung der Goldsäure-Lösung .....	198
6.8.7	Herstellung der bakterienhaltigen PEO-Nanofasern .....	199
6.8.7.2	Elektrospinnen der bakterienhaltigen PEO-Lösung .....	199
6.8.7.3	PPX-Beschichtung der Faservliese .....	202
6.8.7.4	Überlebenstest der <i>M. luteus</i> in Fasern .....	204
6.8.7.5	Nachweis der biologischen Aktivität der immobilisierten Bakterien.....	204
6.8.7.6	Sequestrierung von Gold-Ionen .....	204
6.8.7.7	Zuordnung der ICP-MS Messprotokolle .....	204
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>209</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>211</b>
<b>9.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>218</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>220</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>221</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
2,4-TDI	2,4-Toluenediisocyanat
2,6-HDMI	2,6-Hexamethyldiisocyanat
2-Brom-2-methylpropionbromid	2-BMPiB
<i>A. borkumensis</i>	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
a.u.	willkürliche Einheiten (engl. Arbitrary units)
AGET ATRP	engl. Activator Generated by Electron Transfer
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (engl. Attenuated total reflexion)
ATRP	kontrollierte radikalische Polymerisation durch Atomtransfer (engl. Atom Transfer Radical Polymerisation)
Au	Gold
bar	Bar
BSA	Rinderalbumin (engl. Bovine serum albumin)
Bkt.	Bakterien
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration (engl. Concentration)
ca.	circa
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
Cu(I)Br	Kupfer(I)bromid
CVD	chemische Gasphasenabscheidung (engl. Chemical vapour deposition)
d	Durchmesser, Abstand
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-Dimethyl-Aminopyridin
DMEAMA	2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat
DMF	N-N'-Dimethylformamid
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Elektronendispersive Röntgenmikroanalyse (engl. Energy disperse X-ray analysis)
engl.	englisch

## Abbildungsverzeichnis

---

eq	Äquivalente
ESR	Elektronenspinresonanz
et. al.	et aliis
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
gew. %	Gewichtsprozent
GMA	Glycidylmethacrylat
GPa	Gigapascal
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
IR	Infrarot (Spektroskopie)
KBE	Kolonienbildende Einheiten (engl. Colony forming units)
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KLSM	Konfokales Mikroskop (engl. Confocal laser scanning Microscopy)
kV	Kilovolt
L	Liter
LCST	Unter kritische Lösungs-Temperatur (engl. Lower critical solution temperature)
Lit.	Literaturwert
LZ	Lebendzellzahl
m	Meter
m	mittel (IR) (engl. Medium)
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MBZ	Mikrobiologische Brennstoffzelle
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MI	Makroinitiator
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
mmol	Millimol
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel des Molekulargewichtes
mol	Mol
MPa	Megapascal
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel des Molekulargewichtes
n. b.	nicht bestimmt
NIPAm	N-Isopropylacrylamid
nm	Nanometer

## Abbildungsverzeichnis

---

NMP	Nitroxid vermittelte Polymerisation (engl. Nitroxide mediated radical polymerization)
Nr.	Nummer
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
P(4VP)	Poly(4-vinylpyridin)
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PAN	Poly(acrylnitril)
PCL	Poly( $\epsilon$ -caprolacton)
PD	Polydispersität
PDADMAC	Poly-(diallyldimethylammoniumchlorid)
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PEO	Polyethylenoxid
PGMA	Polyglycidylmethacrylat
PLLA	Poly(L-lactid)
PMDETA	Pentamethyldiethylenetriamine
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPX	Poly(p-xylylen)
PS	Polystyrol
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
Q <sub>1733/1438</sub>	Quotient der Integrale der Wellenzahlen bei 1733 cm <sup>-1</sup> und 1438 cm <sup>-1</sup>
Q <sub>1739/1438</sub>	Quotient der Integrale der Wellenzahlen bei 1739 cm <sup>-1</sup> und 1438 cm <sup>-1</sup>
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs-Polymerisation (engl. Reversible Addition Fragmentation Transfer)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	stark (von engl. strong)
SD	Standardabweichung (engl. Standard derivation)
Si-ATRP	Oberflächeninitiierte ATRP (engl. Surface Initiated ATRP)
t	Zeit
T	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TSB	Tryptische Soja Brühe (engl. tryptic soy broth)
u/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbarer Bereich des Spektrums (engl. Visible)

vol.%	Volumenprozent
w	schwach (engl. Weak) (IR)
WAXS	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (engl. Wide angle X-ray)
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. X-ray)
z.B.	zum Beispiel
$\lambda$	Wellenlänge
$\nu$	Wellenzahl (IR), Streckschwingung (IR)

# 1. Einführung

## 1.1 Einleitung

Seit Jahrtausenden werden Enzyme von der Menschheit als Katalysatoren für die Produktion von Zwischen- und Endprodukten verwendet. Die Nutzung biokatalytischer Verfahren beschränkte sich in der Frühzeit meist auf die Veredelung und Herstellung von Lebens- und Genussmitteln, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Essig, im Backhandwerk oder bei der alkoholischen Gärung. Erst zum Ende des 19. Jahrhunderts gelang der Biotechnologie der Sprung in die Anwendung in der industriellen Herstellung.<sup>[1]</sup> Unter den Handelsnamen Oropon<sup>®</sup> und Burnus<sup>®</sup> wurden Enzyme aus der Bauchspeicheldrüse für den Einsatz in der Lederindustrie und in der Waschmittelflotte kommerziell angeboten. In den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts hat die Verwendung von Enzymen in der stereoselektiven Synthese für die kostengünstige Herstellung isomerenreiner Produkte stark zugenommen. Eine frühe Verwendung dieser Methodik war die Herstellung von *R*-Phenylacetylcarbinol. In diesem Prozess erzeugt Hefe eine Zwischenstufe für die Produktion von Ephedrin.<sup>[2]</sup> Der Einzug der Gentechnik in die Biotechnologie schaffte die Voraussetzung für die gezielte Veränderung und das „Maßschneidern“ von Mikroorganismen, was insbesondere für die optimierte Produktion von Fein- und Massenchemikalien von Vorteil ist. Ein Beispiel dieser Methodik, ist die Verwendung von rekombinanten *Escherichia coli* (*E. coli*) durch das US-amerikanische Unternehmen DuPont. Die genetisch veränderten *E. coli* erzeugen aus Zucker Propan-1,3-diol, welches ein wichtiges Monomer für die Synthese verschiedener Polyester ist.<sup>[3]</sup>

Ein weiterer bedeutender Fortschritt in der industriellen Verwendung von Biokatalysatoren ist deren Immobilisierung auf inerte Träger. Der Einsatz dieser Systeme bewirkt eine kostengünstige und schnelle Aufarbeitung der Produkte, da der immobilisierte Katalysator einfach abzutrennen ist. Im Falle einer ausreichenden Stabilität ermöglicht dieser außerdem die Durchführung einer kontinuierlichen Arbeitsweise. Ein weiteres wichtiges Tätigkeitsfeld dieser Systeme ist neben dem Einsatz in der Produktion die Bioremediation. Die immobilisierten Mikroorganismen können für die Beseitigung von anorganischen oder organischen Verunreinigungen in Böden oder Abwässern eingesetzt werden. Das umweltgefährdende Herbizid Atrazin ist bis zu seinem Verbot 1991 in Deutschland unter anderem für die Unkrautbekämpfung im Mais- und Kartoffelanbau genutzt worden. Das Herbizid kann jedoch in der Umwelt bis heute nachgewiesen werden, so zum Beispiel auch während des Elbhochwassers 2002. Eine mögliche Anwendung der immobilisierten

Mikroorganismen gegenüber dieser Kontamination wurde von Klein et al. untersucht. Die Autoren immobilisierten *Pseudomonas* Bakterien in Nanofasern und wiesen den Abbau von Atrazin durch die in Partikeln verkapselten Mikroorganismen nach.<sup>[4]</sup>

Der Erfolg der Biotechnologie ist auf die Nutzung synergetischer Effekte der interdisziplinären Zusammenarbeit der Chemie, der Materialwissenschaften und der Biologie angewiesen. In diesem Rahmen ist die Bereitstellung und Erforschung neuartiger Trägersysteme eine Hauptaufgabe der Chemie und der Materialwissenschaft. Einer von vielen erfolgreichen gemeinsamen Schritten ist die Immobilisierung probiotischer Bakterien in natürlichen und künstlichen Polymeren. Die verkapselten aktiven Milchsäurebakterien werden Produkten wie Joghurt zugegeben und oral aufgenommen. Das Polymer schützt diese gegen die Bedingungen des Verdauungstraktes und die Überlebensrate der Bakterien im Darm ist dementsprechend im Vergleich zu der ihrer freien Form um ein vielfaches höher.<sup>[5]</sup>

In der vorliegenden Dissertationsschrift steht die Erforschung von neuartigen Trägersystemen für Mikroorganismen im Vordergrund. Die Mikroorganismen werden in polymere Materialien wie Mikropartikel und Mikrofasern und mit Hilfe der Verwendung des Elektrosinnens in Nanofasern immobilisiert. Weiterhin wird die Oberfläche der lebenden Komposite mit Hilfe der chemischen Gasphasenabscheidung gezielt modifiziert. Aus dem Bereich der Polymerchemie werden unter anderem Techniken der kontrollierten radikalischen Polymerisation und der Polyaddition im Beisein von lebenden Bakterien verwendet. Die Arbeit vereint die Felder der Polymerchemie, der Materialwissenschaften und der Biologie und liefert daher wichtige Erkenntnisse für das zukünftige Design lebender Komposite.

### 1.2 Motivation und Aufgabenstellung – Konzept und Hypothese

Die Nutzung immobilisierter Bakterien ist sowohl für die industrielle Produktion als auch für die Dekontamination von Abwässern und verunreinigten Böden interessant. Insbesondere die Möglichkeit der stereoselektiven Herstellung von Produkten bei geringen Temperaturen und unter Vermeidung aufwendiger Synthesen gehört zu den Vorteilen dieser Methode. Antibiotika wie Penicilline und Makrolide, pharmazeutische Proteine wie Interferone, Wachstumshormone und auch Biokraftstoffe werden in der heutigen Zeit mit Hilfe der Biotechnologie hergestellt.<sup>[3]</sup>

Die Verwendung von Bioreaktoren mit frei vorliegenden Mikroorganismen kann durch eine Vielzahl von Limitationen beschränkt sein. Zum einen ist die Beladungsdichte begrenzt, da bei zu hoher Beladung keine optimalen Wachstumsbedingungen herrschen und die Organismen eine stark begrenzte Lebensdauer aufweisen.<sup>[6]</sup> Zum anderen kann die Verwendung immobilisierter biologischer Einheiten eine aufwendige Reinigung des Produktes von ausgeschwemmten Mikroorganismen verhindern. Die Immobilisierung von Bakterien in Partikeln ermöglicht es, diesen Herausforderungen zu begegnen. Einige Beispiele zeigen zudem eine erhöhte Produktionsrate von immobilisierten Bakterien im Vergleich zu ihrer frei vorliegenden Form.<sup>[7]</sup> Die Immobilisierung hat eine Mikroumgebung zur Folge, welche unter Umständen die Widerstandskraft der Organismen gegenüber toxischen Stoffen verbessern kann. Das zu verwendende Material muss einen ausreichenden Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und Substraten in den Partikel gewährleisten und gleichzeitig den Abtransport von Stoffwechselendprodukten ermöglichen. Die Stabilität der Immobilisierungsmatrix ist eine weitere kritische Größe, da die Kapseln während des Prozesses externen mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Ein weiteres Problem stellt die Wasserbeständigkeit der Partikel dar. Da die überwiegende Anzahl an Matrices, die den oben genannten Anforderungen entsprechen, in Wasser quellen oder löslich sind, ist eine Freisetzung der Mikroorganismen möglich. Die Beschichtung der Kapseln mit einem zusätzlichen Polymer, meist Chitosan, ist eine weit verbreitete Methode der nachträglichen Modifizierung. Diese weist jedoch mindestens zwei maßgebliche Probleme auf: Erstens wird die Freisetzung der immobilisierten Bakterien nur vermindert und nicht verhindert. Zweitens ist die Beschichtung meist nur durch schwache Wechselwirkungen mit der Kapsel verknüpft. Aufgrund dieser ungenügenden Adhäsion ist eine Ablösung der Beschichtung von der Oberfläche während der Verwendung möglich.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wird aus diesen Gründen Polyvinylalkohol (PVA) als Matrixmaterial ausgewählt. Die Oberfläche der PVA-Partikel mit immobilisierten *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) wird mit einem hydrophoben Polymer, Polymethylmethacrylat (PMMA), ausgerüstet. Die Beschichtung wird über das Prinzip des „grafting from“ und unter Verwendung einer kontrollierten radikalischen Polymerisation durchgeführt. Das Ergebnis ist ein wasserstabiler Kern-Hülle Partikel mit lebenden, immobilisierten Bakterien, deren Hülle kovalent an den Kern gebunden ist. Eine Ablösung der Hülle von dem Kern ist nur durch Spaltung der kovalenten Bindungen möglich. Der Kern aus PVA gestattet den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff und den Abtransport der Stoffwechselendprodukte, zudem ist das Hydrogel nicht toxisch. PVA ist aus diesen Gründen ein ideales Material für die Immobilisierung von Mikroorganismen. Die Kombination von lebenden, immobilisierten Bakterien und einer oberflächeninitiierten kontrollierten radikalischen Polymerisation führt zu einem neuartigen Typus von Biohybridmaterialien.

Der zweite Abschnitt der Schrift behandelt die Immobilisierung von *M. luteus* in Mikro- und Nanofasern. Das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen dieser Strukturen ermöglicht einen optimalen Kontakt des gelösten Substrates mit den Bakterien bei gleichzeitiger Separierung der Mikroorganismen von der umgebenden Lösung. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt benannt, besteht eine zwingende Notwendigkeit in der Verwendung wasserunlöslicher Materialien. Aus diesem Grund werden die im ersten Prozessschritt hergestellten Fasern aus Hydrogel in einem zweiten Schritt mit einem hydrophoben Polymer beschichtet. Durch die Ausrüstung mit Poly(*p*-xylylen) (PPX) entsteht eine wasserbeständige, lebende Membran. Diese kann durch die Immobilisierung von Mikroorganismen mit verschiedenen Fähigkeiten für die gewünschte Anwendung angepasst werden. Im hier vorliegenden Fall wird unter anderem die Fähigkeit von *M. luteus* zur Sequestrierung von Schwermetallen für die Wiedergewinnung von Gold aus einer wässrigen Lösung genutzt. Die vorgestellten wasserstabilen lebenden Membranen sind auf Grund dieses Baukastenprinzips für die Bewältigung verschiedenster Herausforderungen geeignet. Ein weiter Vorteil besteht in deren einfacher Verwendung nach dem Prinzip eines „Teebeutels“. Die lebenden Komposite werden in die gewünschte Substrat- oder Reaktionslösung eingebracht und nach Abschluss des Vorgangs durch Entnahme des Trägers aus der Lösung entfernt. Eine Kontamination der Umgebung findet nicht statt und eine aufwändige Aufbereitung ist somit nicht erforderlich. Insbesondere bei der Rückgewinnung anorganischer Werkstoffe, wie zum Beispiel Kupfer und Eisen und wertvoller Metalle wie Gold und Silber aus Abwässern bietet sich die Verwendung dieses Systems an. Im Falle der Verunreinigung von Abwässern durch

organische Substanzen können Bakterien eingebracht werden, die diese toxischen Schadstoffe zu ungefährlichen Produkten abbauen. An dieser Stelle sei die Wiederaufbereitung von Trinkwasser, wie bereits in Abschnitt 1.1 benannt, und die Reinigung verseuchter Abwässer besonders hervorzuheben. Das Verfahren ermöglicht zusätzlich die Produktion von End- und Zwischenprodukten durch Mikroorganismen.

## 2. Grundlagen und Überblick

### 2.1 Rückgewinnung anorganischer Werkstoffe durch Mikroorganismen

Die Anreicherung von Metallen in Abwässern und Klärschlamm ist unter anderem auf die industrielle Herstellung verschiedener Produkte, wie Farben, Füllstoffe und elektronische Bauteile, wie Platinen zurückzuführen. Die Behandlung kontaminierter Abwässer wurde in der Bundesrepublik Deutschland bereits 1957 in dem Wasserhaushaltsgesetz (WHG) festgelegt. Die Entfernung toxischer Metalle, wie z.B. Kupfer, Nickel, Zink, Cadmium Blei, Mangan, Cäsium und Strontium, ist daher zum einen für den Erhalt einer intakten Umwelt besonders wichtig, und zum anderen wird hierdurch eine kostenintensive Deponierung vermieden. Weiterhin besteht ein großes Interesse an der Rückgewinnung wertvoller Metalle, wie z.B. Gold, Kupfer und Silber, die wiederum für die Herstellung spezieller Produkte benötigt werden. Die aktuellen, angewandten Methoden der Rückgewinnung, wie zum Beispiel die chemische Fällung, Membranprozesse, die Verwendung elektrochemischer Verfahren und die Reinigung mittels Ionentauschern, sind kostenintensiv und insbesondere im Falle geringer Konzentrationen nicht wirtschaftlich. Die Verunreinigung von Gewässern durch geringe Mengen toxischer Metalle tritt unter anderem in den Abwässern von Nuklearkraftwerken auf. Die Anreicherung mit radioaktiven Isotopen wie  $^{90}\text{Sr}$  und  $^{137}\text{Cs}$  ist hierbei besonders hervorzuheben.

Die Verwendung von Mikroorganismen wie Bakterien, Algen und Pilzen stellt eine Möglichkeit dar, die Anforderung der Rückgewinnung von Metallen in Abwässern sowohl in hohen Konzentrationen und auch in Spuren zu erfüllen.

Bei der Verwendung dieser biologischen Materialien kann grundsätzlich zwischen zwei Prozessen, der Biosorption und der Bioakkumulation, differenziert werden.

Der Begriff Biosorption bezeichnet die passive Akkumulation von Metallen durch Mikroorganismen und ist eine Sammelbezeichnung für eine Vielzahl an physikalischen und chemischen Vorgängen. Hierzu zählen zum Beispiel der Ionenaustausch, die Koordination, die Komplexierung, die Adsorption oder die Mikrofällung. Die Biosorption ist unabhängig vom Stoffwechsel des Organismus und hat den Vorteil, auch im Falle von abgestorbener Biomasse stattzufinden. Aus diesem Grund ermöglicht diese den Einsatz in höher konzentrierten Abwasserströmen unter Ausschluss von Nahrung. Zusätzlich können mit Hilfe eines pH

Wechsels die sequestrierten Metalle wiedergewonnen werden und das System ist im Anschluss an die Regenerierung wieder einsetzbar. Für den Prozess verantwortlich sind passive, attraktive Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der Zellwand und dem des betreffenden Metalls. Der Biosorptionsvorgang ist, da es sich um einen reversiblen und schnellen Prozess handelt, für die technische Realisierung besonders interessant.

Der zweite, langsame, ablaufende Prozess ist die Bioakkumulation. Die Schwermetallaufnahme ist in diesem Fall mit einem Energieverbrauch der lebenden Zelle gekoppelt. Es wird angenommen, dass die Aufnahme analog der aktiven Inkorporation essentieller Ionen wie Natrium oder Kalium verläuft. Die Ablagerung der Metalle kann hierbei in der Zellwand und nach ausreichender Kontaktzeit, auch im Zytoplasma nachgewiesen werden.

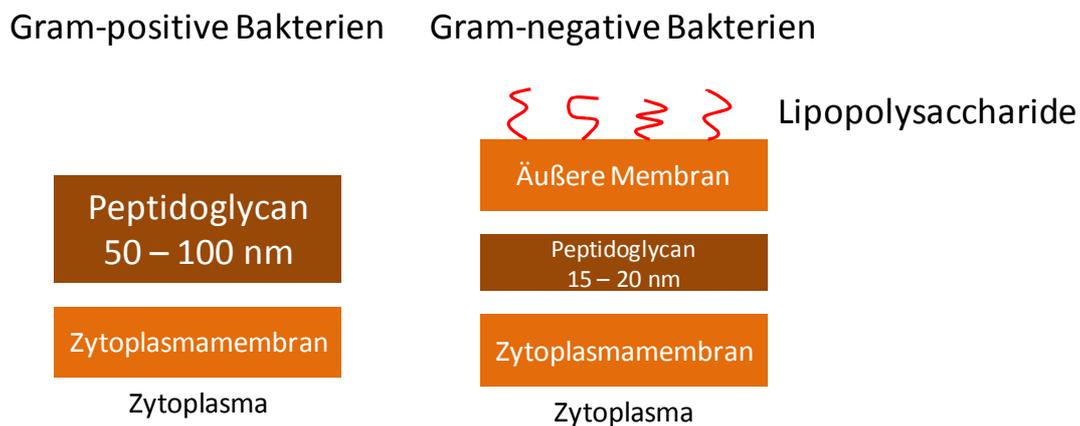
### **2.1.1 Einflussfaktoren auf die Biosorption**

Die Biosorption ist von vier Haupteinflussfaktoren abhängig; Die Initialkonzentration des zu sequestrierenden Metalls, die Temperatur, der pH-Wert und die Konzentration an Biomasse. Der Einfluss des pH-Wertes ist die wichtigste Größe, da dieser die Ionenspezies in Lösung und die Polarität der funktionellen Gruppen an der Zelloberfläche bestimmt.<sup>[8, 9]</sup> Die Konzentration der Biomasse hat, im Falle einer geringen Konzentration des Metalls in Lösung, Einfluss auf die Menge des aufgenommenen Metalls pro Biomasse.<sup>[10]</sup> Der Temperaturfaktor, ist im Allgemeinen unter Normalbedingungen zu vernachlässigen. Aksu et al. wiesen nach, dass eine Änderung der Temperatur im Bereich von 20 – 35 °C keinen Einfluss auf die Biosorption hat.<sup>[11]</sup>

### **2.1.2 Bakterien als biologisches Material**

Bakterien können hinsichtlich des Aufbaus ihrer Zellwand in zwei Gruppen gegliedert werden. Die Gram-positiven Bakterien bestehen aus einer Zellwand mit einer Dicke zwischen 50 und 100 nm, welche hauptsächlich, 40 – 90 %, aus Peptidoglycan besteht. Dieses Material ist aus N-acetylglucosamin- $\beta$ -1,4-N-aceylmuraminsäure aufgebaut und bildet ein amorphes und starres Netzwerk aus. Die angesprochene Fähigkeit der passiven Biosorption wird durch die Anzahl und Art an frei zugänglichen, funktionellen Gruppen determiniert.

Die zweite Gruppe sind die Gram-negativen. Sie besitzen eine Peptidogluanschicht von 15 – 20 nm Dicke. Die übrige Zellwand besteht aus Lipopolysacchariden, Phospholipiden und Proteinen, hierbei ist besonders die negative Oberflächenladung der Lipopolysaccharideschicht für die Biosorption verantwortlich.<sup>[12]</sup> In der folgenden Abbildung 2.1-1 ist der Aufbau der Zellwand für beide Gruppen dargestellt.



**Abbildung 2.1-1 Schematischer Aufbau der Zellwand von gram-positiven und gram-negativen Bakterien.**

Im Falle einiger Bakterienstämme ist die Produktion von Exopolysacchariden für die Fähigkeit der Biosorption zu berücksichtigen, wie zum Beispiel bei *M. luteus*. In der Literatur wurde eine erhöhte Aufnahme von Metallen bei dieser Art der Mikroorganismen beschrieben.<sup>[13]</sup>

Seki et al. untersuchten die Verwendung von *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*) und *Alcaligenes eutrophus* H16 (*A. eutrophus*) für die Sequestrierung von Cd und Pd aus wässrigen Lösungen. Die Autoren stellten heraus, dass die Biosorption der bivalenten Ionen auf die Anwesenheit von Carbonsäure- und Phosphatgruppen zurückzuführen ist.<sup>[14]</sup> Die Sequestrierung von Cr, Pb und Cu aus Abwässern der Industrie wurde von Ilhan et al. unter Verwendung von *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) und unter Variation des pH-Wertes durchgeführt. Der pH-Wert der Lösung hatte einen Einfluss auf die Biosorption der Metalle, im Allgemeinen wurde eine höhere Aufnahme bei pH-Werten zwischen 2 und 4,5 ermittelt.<sup>[15]</sup> Wong et al. untersuchten die Aufnahme und die Rückgewinnung von Cu aus wässrigen Lösungen durch den Einsatz von Bakterien der Gattung *Micrococcus* in freier und immobilisierter Form. Die Biosorption des Kupfers war stark von dem pH-Wert der Lösung abhängig und erreichte bei einem Wert von 6 ihr Maximum. Im Falle einer Konkurrenzsituation zwischen Cu, Pb, Ni und Zn fanden die Autoren eine bevorzugte

Aufnahme von Cu und Pb gegenüber Ni und Zn. Die Aufnahme von Kupfer durch in Polyakrylamid immobilisierte Bakterien wurde zusätzlich durchgeführt. Im Vergleich mit der frei vorliegenden Spezies konnte eine Erhöhung der Aufnahme um 61 % nachgewiesen werden. Die Bakteriengattung *Azotobacter species* (*Azotobacter sp.*) und *M. luteus* wurden von Tornabene et al. auf ihre Sequestrierung von Blei untersucht.<sup>[16]</sup> Die beiden Spezies immobilisierten vergleichbare Menge an Pb, *Azotobacter sp.* immobilisierte 310 mg Pb pro 1 g der getrockneten Zellkultur und *M. luteus* 490 mg pro 1 g getrockneter Zellkultur. Die Verteilung des Metalls innerhalb der Zelle wurde durch eine nachträgliche Analyse der Zellfraktionen bestimmt. In beiden Fällen wurde der überwiegende Anteil, 99 %, in der Zellwand und der Zellmembran nachgewiesen. Der fehlende Anteil wurde im Zytoplasma gefunden. Das Bakterium *M. luteus* wurde ferner von Faison et al. für die Rückgewinnung von gelösten Strontiumionen genutzt.<sup>[17]</sup> Die maximale Masse an Sr von 25 mg pro 1 g trockener Zellmasse wurde bei einem pH-Wert von 7 erreicht. Die Bindung des Sr ist ein reversibler Gleichgewichtsprozess und die gebundenen Metallionen konnten durch eine Absenkung des pH-Wertes oder durch Zugabe von bivalenten Kationen wiedergewonnen werden. Wie auch schon von Tornabene et al. publiziert, wurde der Hauptteil des Metalls an der Zellwand und an der Zellmembran abgeschieden. Die Autoren identifizierten die Aufnahme des Metalls als eine Kombination aus einem passiven Ionenaustausch-Prozess der Carbonsäuregruppen an der Zellwand und der aktiven Aufnahme in das Zellinnere.

Neben der Entfernung der genannten Metalle aus wässriger Lösung und für den Einsatz zur Wiederaufbereitung von verschmutzten Gewässern, wird im Folgenden auf die Rückgewinnung von wertvollen Metallen wie Gold, Silber und Platin eingegangen. Das Interesse an einer Rückgewinnung der genannten Metalle besteht zum einen in ihrem hohen Marktpreis und zum anderen in ihrer wichtigen Funktion bei industriellen Prozessen, wie der Katalyse oder dem Einsatz in elektronischen Bauteilen. Eine Reihe von Mikroorganismen wie Algen, Pilzen, Bakterien oder Hefe wurden bereits erfolgreich auf die Fähigkeit der Biosorption von Edelmetallen getestet.<sup>[18-22]</sup> Marakushev veröffentlichte bereits 1991 seine Beobachtung, der Rekristallisation von Gold im unmittelbaren Kontakt zu *M. luteus*.<sup>[23]</sup> Levchenko et al. wiesen weiterhin eine Aufnahme von gelöstem Gold nach und erarbeiteten dessen Einfluss auf die Oxidation von Methan durch das Bakterium.<sup>[24]</sup>

Die Reduktion von Au (III) zu Au (I) und Au (0) durch Mikroorganismen wurde in der Literatur ausführlich untersucht. Romero-Gonzalez et al. wiesen die Reduktionsfolge an der Oberfläche von Seetang nach und identifizierten vier mögliche Arten der Struktur von

abgeschiedenen Goldpartikeln.<sup>[25]</sup> Die Bildung von Goldnanopartikeln durch die Reduktion von Au(II) wurde zudem bei Bakterien beobachtet. Das Bakterium *Bacillus subtilis* Marburg 168 (*B. subtilis*) schied Goldnanopartikel in einem Größenbereich von 5 – 25 nm in seiner Zellwand nach Inkubation mit einer Goldsalzlösung ab.<sup>[26]</sup>

Die Biosynthese von Goldnanopartikel mit einer Größe von 10 – 20 nm durch *Rhodopseudomonas capsulata* (*R. capsulata*) wurde von He et al. untersucht.<sup>[27]</sup> Die Autoren identifizierten den pH-Wert der Inkubationslösung als den wichtigsten Einflussfaktor auf die Struktur und die Größe der Partikel. Im Falle eines pH-Wertes der HAuCl<sub>4</sub> Lösung von 4 wurden Goldpartikel erhalten und im Falle eines Wertes von 7 wurden Nanoplaten (nanoplates) beobachtet.

Die Biosynthese von Metallnanopartikel stellt im Vergleich zu der allgemeinen Herstellung eine „grüne“ Alternative dar. Eine Verwendung dieser Nanopartikel könnte in Bereichen der Katalyse und der Elektronik von Interesse sein.<sup>[28]</sup>

### **2.1.3 Immobilisierung von Mikroorganismen für Bioreaktoren**

Die frei vorliegenden Mikroorganismen zeigen im Allgemeinen eine niedrige mechanische Belastbarkeit und ihre Größe beschränkt sich auf einige Mikrometer. Bei Versuchen im Labormaßstab und für die Charakterisierung und Untersuchung der prinzipiellen Möglichkeiten einer industriellen Nutzung der Sequestrierung von Metallen, stellen diese Eigenschaften kein Hindernis dar. In der Industrie hingegen werden, um einen kontinuierlichen Prozess zu ermöglichen, immobilisierte Mikroorganismen benötigt. Die Immobilisierung erhöht die mechanische Belastbarkeit und ermöglicht es, die Dimension des Materials einzustellen. Auf Grund ihrer geringen Durchmesser muss bei der Verwendung der freien Spezies in Bioreaktoren mit sehr hoher Drücke gearbeitet werden, um eine effektive Flussraten zu ermöglichen. Der hohe Druck wiederum, kann unter Umständen zu einer Instabilisierung der Biomasse führen, die Nutzung von immobilisierten Mikroorganismen mit einem einstellbaren Durchmesser stellte eine Möglichkeit dar, dieses Problem zu lösen. Diese Methode kann daher einen Verlust an Biomasse, das so genannte ausbluten, verhindern. Zu den weiteren Vorteilen einer Immobilisierung gehört unter anderem, eine höhere Beladungsdichte an Biomasse, eine verringerte Verstopfung bei kontinuierlichen Fließsystemen und eine bessere Wiederverwendbarkeit.

In der Literatur wurden eine Vielzahl von Materialien für die Immobilisierung von Biomasse und deren Verwendung für die Rückgewinnung von Metallen untersucht. Beispielfhaft sei hier die Verwendung von Calcium-Alginat für die Immobilisierung von *Spirulina platensis* (*S. platensis*), *Chlorella salina* (*C. salina*) und *Rhizopus arrhizus* (*R. arrhizus*) genannt. <sup>[29, 30]</sup>

Die genannten Vorteile der Immobilisierung von Biomasse führten zu einigen kommerziell erhältlichen Systemen für eine Sequestrierung von Metallen aus wässriger Lösung. Bio-Fix ist ein Biosorptionsmittel, welches aus einer Mischung der Biomassen von Cyanobakterien, Hefe, Algen und Pflanzen besteht, die weiterhin mit Xanthan und Guarkernmehl versetzt wurden. <sup>[31]</sup> AlgaSORB<sup>®</sup>, ist eine Mischung aus immobilisierten Algen und wird für die Reinigung von Schmutzwasser eingesetzt. <sup>[32]</sup> Ein Verfahren, welches auf der Immobilisierung der Biomasse von Bakterien der Gattung *Bacillus* beruht, ist das von Brierley et al. entwickelten BIOCLAIM. <sup>[33]</sup>

### 2.1.4 Gleichgewichtsmodelle der Biosorption

Die Biosorption von Metallen durch Mikroorganismen wird im Allgemeinen durch Verwendung zweier Modelle beschrieben. Es wird angenommen, dass der Prozess der Sequestrierung einer isothermen Gleichgewichts-Adsorption an Oberflächen entspricht. Ein Modell, welches diesen Vorgang beschreibt, ist die Langmuir Isotherme. Im Folgenden ist die für den Prozess angepasste Form angeführt.

$$q = \frac{q_{max} * b * C_{eq}}{1 + b * C_{eq}} \quad (1)$$

$q$  = Milligramm des Metalls pro Gramm des Biosorper;  $C_{eq}$  = verbleibende Konzentration des Metalls in Lösung;  $q_{max}$  = maximale Beladung der Zelle;  $b$  = Langmuir-Sorptionskoeffizient.

Das zweite Modell erweitert das Modell der Langmuir Isotherme, um die Berücksichtigung des Einflusses einer stärkeren Beladung auf die Fähigkeit des Sorbenten, das Sorbat aufzunehmen.

$$q = K_F * C_{eq}^{1/n} \quad (2)$$

$K_F$  = Freundlich Koeffizient;  $n$  = Freundlich Exponent.

In beiden Modellen werden ein konstanter pH-Wert und die Betrachtung einer Metallspezies in Lösung vorausgesetzt. Die nachfolgende Tabelle, Tabelle 2.1-1, fasst beispielhaft für *M. luteus* die experimentell erhaltenen Werte für  $q_{\max}$  und  $b$  für verschiedene Metalle zusammen.

**Tabelle 2.1-1:** Parameter der Langmuir Isotherme für die Biosorption von Metallen von *M. luteus*.

Metall	pH	$q_{\max}$ / $\mu\text{mol}\cdot(\text{g Zellen})^{-1}$	$b$ / $1\cdot\mu\text{M}^{-1}$	Referenz
Th	3,5	650	0,224	A. Nakajima et al. <sup>[34]</sup>
U	3,5	611	0,0104	A. Nakajima et al. <sup>[34]</sup>
Cu	5,0	365	0,61	Wong et al. <sup>[35]</sup>
Cu	6,0	521	0,66	Wong et al. <sup>[35]</sup>
Cu	5,0	527	0,0110	A. Nakajima et al. <sup>[36]</sup>

Die in der Tabelle 2.1-1 zusammengefassten Werte zeigen, dass der Wert von  $q_{\max}$  unabhängig von der Metallart, stets einen vergleichbaren Wert annimmt.

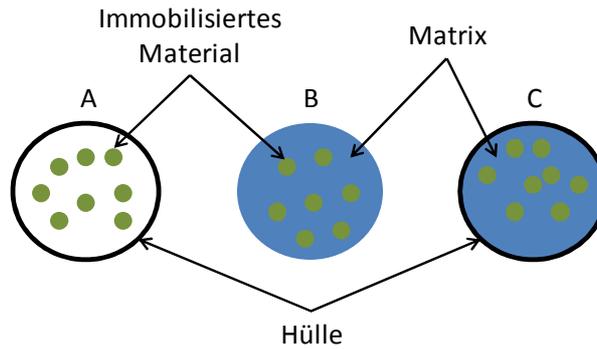
### 2.2 Mikroverkapselung von Bakterien

#### 2.2.1 Einleitung

Bakterien werden in der industriellen Produktion unter anderem im Bereich der Pharmazie, der Herstellung von Biokraftstoffen, im Agrarbereich, in der Wiederaufarbeitung von Schmutzwasser, vgl. Abschnitt 2.1, und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.<sup>[37–39]</sup> Die effiziente Verwendung mikrobiologischen Materials setzt Bedingungen voraus, die ein schnelles Wachstum und die Aufrechterhaltung des Metabolismus ermöglichen. Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die Widerstandsfähigkeit gegenüber negativen Einflussfaktoren, wie zum Beispiel erhöhte Temperatur verbessert wird. Der Einsatz in der Industrie erfordert zudem eine hohe Zelldichte, welche eine erhöhte Produktausbeute zur Folge hat. Zudem wird eine verlängerte Zeitspanne der Aktivität und in einigen Bereichen auch eine einfache Separierung der Bakterien vom Endprodukt benötigt.<sup>[40]</sup> Die geforderten Voraussetzungen können, im Gegensatz zu der freien Form der Mikroorganismen, durch deren Immobilisierung erreicht werden.<sup>[41]</sup>

Eine bis heute gültige Definition der Verkapselung von Mikroorganismen wurde von Karel et al. formuliert. Die Autoren definierten die Immobilisierung als physikalische Einschließung intakter Bakterien in einen definierten Raum unter Beibehaltung ihrer Viabilität.<sup>[42, 43]</sup>

Die zu verkapselnde Substanz, das Kern-Material, ist in der flüssigen oder festen Matrix, welche unter anderem auch Beschichtung oder Hülle genannt wird, dispergiert. Im Allgemeinen wird daher zwischen zwei Gruppen unterschieden. Zum einen wird von einem Reservoir-Typ, zum anderen von einem Matrix-Typ gesprochen. Der Reservoir-Typ zeichnet sich durch eine Hülle aus, welche den Kern, bzw. die Mikroorganismen, einschließt. Im Fall des Matrix-Typ ist das Kern-Material in dem Matrix-Material dispergiert. Zusätzlich zu den bisher besprochenen Fällen ist in der Abbildung 2.2-1 eine Kombination beider Typen abgebildet. In diesem Fall wird von einem beschichteten Matrix-Typ gesprochen. In allen drei genannten Fällen werden die Partikel auch Kapseln genannt.<sup>[5]</sup>



**Abbildung 2.2-1** Schematische Darstellung der Typen: Mikroverkapselung (A), Immobilisierung in eine Matrix (B) und der beschichtete Matrix-Typ (C).

In der nachfolgenden Tabelle 2.2-1 sind verschiedene Methoden der Verkapselung von Mikroorganismen aufgeführt, welche in den anschließenden Abschnitten ausführlich diskutiert werden. Desweiteren wurden die unterschiedlichen Kapsel-Typen den Methoden zugeteilt und es wurde die ungefähre, erhaltende Größenordnung der Partikel angegeben.<sup>[5]</sup>

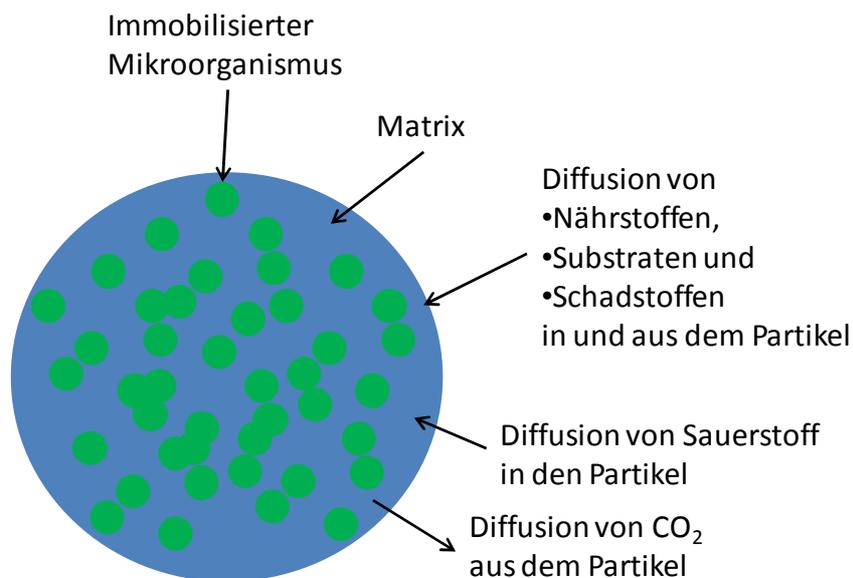
**Tabelle 2.2-1** Zusammenfassung der Verkapselungstechniken, der Größenordnungen und des Kapsel-Typs.

Verkapselungstechnik	Größenordnung / $\mu\text{m}$	Kapsel-Typ
<b>Extrusion</b>	200 – 800	Matrix-Typ
<b>Sprühtrocknung</b>	10 – 300	Matrix-Typ
<b>Emulsion</b>	0,1 – 10.000	Matrix-Typ
<b>Co-Extrusion</b>	200 – 800	Reservoir-Typ
<b>Sprüh-Beschichtung</b>	5 – 700	Reservoir-Typ

Neben den in diesem Abschnitt genannten Möglichkeiten der Verkapselung von Bakterien ist auch deren Immobilisierung durch Adsorption an Oberflächen oder durch eine kovalente Anbindung an ein Substrat möglich. Auf diese Techniken wird im Folgenden nicht eingegangen. Der Übersichtsartikel von Cassidy et al. fasst diese Methoden sehr gut zusammen.<sup>[41]</sup>

## 2.2.2 Immobilisierung von Bakterien durch Mikroverkapselung

Die Verwendung immobilisierter Bakterien ermöglicht es, Nachteile ihrer freien Form wie zum Beispiel einer limitierten Beladung von Bioreaktoren, eine niedrige mechanische Belastbarkeit und die Freisetzung von Bakterien während eines Prozesszyklus zu umgehen.<sup>[44]</sup> Die Verkapselung in Mikropartikeln erzeugt ein großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und ermöglicht daher, eine effiziente Diffusion von Nährstoffen in die Partikel und von Stoffwechselendprodukten aus den Partikeln. Zusätzlich unterstützt die Mikroumgebung das Wachstum und die metabolische Aktivität.<sup>[45]</sup> Weiterhin erhöht die Mikroumgebung die Toleranz der Mikroorganismen gegenüber hohen Konzentrationen an toxischen Substanzen und Substraten.<sup>[44]</sup> (Abbildung 2.2-2) Eine gezielte Auswahl des immobilisierenden Materials ermöglicht zudem eine kontrollierte Freisetzung, als Beispiel sei hier die Freisetzung im Erdreich oder die Freisetzung probiotischer Bakterien im Gastroenteral-Trakt genannt.<sup>[46]</sup>



**Abbildung 2.2-2** Schematische Darstellung eines bakterienhaltigen Partikels. Der Ein- und Austritt von Nährstoffen, Substraten und Gasen ist schematisch dargestellt.

## 2.2.3 Materialien für die Mikroverkapselung

Die Immobilisierung von Bakterien kann durch die Verwendung einer Vielzahl von Materialien erfolgen, beispielhaft seien an dieser Stelle Silica-Gele und Hydrogele genannt. Da Polymere als Immobilisierungsmatrix eine dominante Rolle spielen, werden diese

nachfolgend diskutiert.<sup>[47]</sup> Eine häufig verwendete Materialklasse sind die Hydrogele, da diese eine gute Permeabilität für niedermolekulare Stoffe und Gase aufweisen. Diese Charakteristik ermöglicht die Ausbildung einer vorteilhaften Mikroumgebung für die Bakterien, da die Diffusion von Nährstoffen in und Stoffwechselendprodukten aus dem Partikel gewährleistet ist. Es werden natürliche Hydrogele wie Alginat, Agarose oder K-Carrageen bevorzugt verwendet, da deren Verarbeitung im Allgemeinen mildere Prozessparameter ermöglicht und daher meist weniger schädlich für die Integrität der Zelle ist.<sup>[48]</sup> Im Gegensatz dazu weisen Partikel aus synthetischen Hydrogelen wie PVA und PAA eine höhere mechanische Belastbarkeit und eine bessere chemische Stabilität auf.<sup>[49]</sup> Unabhängig der Herkunft der Hydrogele ist deren Gelierung von ihrem chemischen Aufbau abhängig. Exemplarisch seien hier die ionische und thermische Gelierung, sowie die Härtung durch Polymerisation und mittels Quervernetzung genannt.<sup>[50]</sup> Die Stabilität der Hydrogele wird weiterhin durch deren inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken oder attraktive, elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt.<sup>[51]</sup>

### **2.2.4 Techniken der Mikroverkapselung**

Die Herstellungsmethode der Mikrokapseln hat entscheidenden Einfluss auf wichtige Kenngrößen der Kapseln, wie zum Beispiel Durchmesser oder mechanische Stabilität. Daher ist das gewünschte Einsatzgebiet entscheidend für die Art der Herstellung.<sup>[52]</sup> Im Folgenden werden die wichtigsten Methoden erläutert.

#### **2.2.4.1 Extrusion**

Die gewünschte Polymerlösung wird mit Bakterien versetzt und die Suspension wird in Tropfenform in eine weitere Lösung extrudiert.<sup>[53]</sup> Im Regelfall geliert die Polymerlösung auf Grund eines in der Lösung vorhandenen Vernetzters, wie zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Falle einer Alginatlösung, oder die Lösung wird gekühlt und die Kapseln härten aus. Der Durchmesser der erhaltenen Kapseln kann durch verschiedene Parameter variiert werden. Die Tropfengröße, die Viskosität der Suspension und der Abstand zwischen der Kanüle und der Lösung sind hierbei von Bedeutung.<sup>[54]</sup> Die Vorteile der Methode sind, neben anderen, ihre einfache Handhabung und die milden Prozessparameter, welche sich positiv auf das

Überleben der biologischen Einheiten auswirken. Als Nachteil der Methode muss an dieser Stelle der verhältnismäßig große Durchmesser, meist über 500 µm, und die geringe mechanische Stabilität der Kapseln genannt werden. Auf Grund dieser Einschränkungen wurde der einfache experimentelle Aufbau stetig weiterentwickelt. Zu diesen verbesserten Systemen zählen zum Beispiel die Präzisions-Partikel Herstellung, die Co-Extrusion und die Verwendung einer Multi-Düsen Apparatur.<sup>[55–58]</sup>

In der Literatur findet sich eine Vielzahl verschiedener Hydrogele, die für die Herstellung von Kapseln verwendet wurden. Weiterhin wurde eine große Anzahl an unterschiedlichen Mikroorganismen mit Hilfe dieser Technik immobilisiert. Im Folgenden wird auf einige ausgewählte Beispiele eingegangen.

Graff et al. stellten Kapseln aus Alginat mit immobilisierten *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) über Extrusion her.<sup>[59]</sup> In einem zweiten Schritt wurden die Kapseln zusätzlich mit Chitosan beschichtet. Die immobilisierte Hefe zeigte in *in vivo* Studien in Gastrointestinal Trakten eine gesteigerte Überlebensrate, im Vergleich zu den freivorliegenden Zellen.

Kim et al. immobilisierten *Pantoea agglomerans* E325 (*P. agglomerans*) in Alginatkapseln und nutzen für die Härtung die ionische Vernetzung mit Ca<sup>2+</sup> Ionen.<sup>[60]</sup> Die Verwendung eines koaxialen Kanülen-Systems erlaubte nicht nur die Herstellung von Kern-Hülle Kapseln, sondern auch eine gezielte Variation ihrer Durchmesser. Die Autoren konnten weiterhin einen Einfluss des Durchmessers der Kapseln auf die Dauer der Freisetzung der Zellen nachweisen.

Patel et al. verwendeten den „layer by layer“- Prozess für die Herstellung von hohlen Mikrokapseln mit lebenden immobilisierten *Hirsutella rhossiliensis* (*H. rhossiliensis*).<sup>[61]</sup> Für die Immobilisierung des Pilzes wurde dieser mit einem Nährstoffreservoir versetzt und mit einer Lösung aus Sulfoethyl Zellulose (SEC) gemischt. Die Formulierung wurde anschließend für die Herstellung der Kapseln in Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) extrudiert. Die in den hohlen Mikrokapseln mit einem Nährstoffreservoir immobilisierten Mikroorganismen zeigten unter anderem eine erhöhte Lagerbeständigkeit im Vergleich zu den in reinen Alginatkapseln immobilisierten Pilzen.

### 2.2.4.2 Sprühtrocknung

Die Sprühtrocknung wird unter anderem für die Verkapslung empfindlicher Stoffe wie Proteinen oder ätherische Öle verwendet. Eine Lösung aus dem betreffenden Hydrogel und den Zellen wird mittels Düse, oder Zerstäuberscheibe, in einen Strom aus warmer oder kalter Luft zerstäubt und das feine, trockene Pulver wird anschließend abgetrennt.<sup>[62, 63]</sup> Die Vorteile dieser Methode sind unter anderem, die einfache Herstellung und die Möglichkeit eines kontinuierlichen Arbeitsprozesses. Als Nachteile des Prinzips gelten zum Beispiel die Limitierung auf wenige Polymere und dass, die erhaltenen Kapseln auf Grund der schnellen Trocknung Bruchstellen aufweisen können. Der Durchmesser der Kapseln ist unter anderem von dem Startmaterial, sowie den Prozessparametern abhängig und kann zwischen 10 µm und 3 mm betragen.<sup>[37]</sup>

De Castro-Cislaghi verkapselte durch Verwendung des Prinzips der Sprühtrocknung das probiotische Bakterium *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) in Partikel aus Molkeprotein.<sup>[64]</sup> Im Vergleich mit der freien Spezies zeigte sich eine erhöhte Toleranz der immobilisierten Bakterien gegenüber Gallenflüssigkeit, weiterhin konnte eine verbesserte Lagerungsfähigkeit nachgewiesen werden.

Das Bakterium *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 (*L. paracasei*) wurde von Desmond et al. in Kapseln bestehend aus Gummi arabicum und rekonstituierter Magermilch immobilisiert.<sup>[65]</sup> Die Autoren wiesen unter anderem eine bessere Lagerungsfähigkeit im Gegensatz zu der freien Spezies nach.

### 2.2.4.3 Emulsion

Die Mikroorganismen werden in einer Polymerlösung dispergiert und diese Suspension wird anschließend in eine organische Phase gegeben. Die Homogenisierung der nichtmischbaren Phasen wird durch den Einsatz eines Dispergierwerkzeuges und bei Bedarf durch die Verwendung von Tensiden erreicht. Die Kapseln werden durch Zugabe eines Vernetzter, durch Kühlen oder durch Koagulation mit Hilfe eines Fällungsbades gehärtet.<sup>[66]</sup> Es können Kapseln in einer Größenordnung von wenigen hundert Nanometer bis zu hunderten von Mikrometer hergestellt werden. Die Größenverteilung lässt sich unter anderem durch die Konzentrationen des Polymers, der Rührgeschwindigkeit und der Konzentration etwaiger Tenside einstellen.

Zu den Nachteilen des Systems gehören neben einer relativ großen Dispersität der Kapseln, eine etwaige Toxizität der organischen Phase und eine unter Umständen aufwendige Reinigung der Kapseln.<sup>[5]</sup>

Zamora-Vega et al. immobilisierten *S. boulardii* in Ca-Alginat Kapseln und beschichteten diese mit einer Mischung aus Inulin und Schleimstoffen.<sup>[67]</sup> Mit Hilfe dieses Verfahrens, wurde die Lagerfähigkeit der Zellen um ein vielfaches erhöht.

Lee et al. verwendeten Ca-Alginat für die Verkapselung von *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) und wiesen eine gesteigerte Überlebensrate in einem künstlichen Gastrointestinal-Trakt gegenüber der freien Spezies nach.<sup>[68]</sup>

Shue und Marshall beschrieben eine erhöhte Toleranz von *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) die in Ca-Alginat Kapseln immobilisiert waren. Die Autoren untersuchten weiterhin deren Zugabe auf sensorische Eigenschaften, wie zum Beispiel dem Geruch der Milch.<sup>[69]</sup>

### 2.2.5 Stabilität der Mikro kapseln

Die mechanische und chemische Stabilität sind zwei entscheidende Kenngrößen der Mikro kapseln und werden hauptsächlich durch die Wahl des Hydrogels determiniert. Im Gegensatz zu den Ansprüchen an diese Größen im Laborbetrieb, treten besonders im Falle einer industriellen Nutzung hohe Anforderungen auf. Eine mechanische Beschädigung der Kapseln kann neben einer von außen einwirkenden Kraft, auch auf Grund des Erreichens eines kritischen Drucks durch das Wachstum der immobilisierten Zellen oder durch entstandene Gase bedingt sein.<sup>[37]</sup> Durch Nachbehandlung der Kapseln lässt sich deren Stabilität erhöhen, zu den verwendeten Techniken zählen unter anderem, Vernetzung, das Versetzen mit Stärke oder anderen Additiven und die Beschichtung mit Polymeren. Die Beschichtung mit Polymeren stellt eine weit verbreitete Technik dar.<sup>[70]</sup> Eine Beschichtung mit Chitosan verbessert die chemische und mechanische Widerstandsfähigkeit der Polymerkapseln. Die immobilisierten Zellen zeigten eine verminderte Freisetzung und im Kontakt mit toxischen Substanzen wurde eine höhere Viabilität nachgewiesen.<sup>[71]</sup> Eine weitere Kenngröße von Ca-Alginat Kapseln, welche durch die Beschichtung variiert werden konnte, war deren Porosität.<sup>[72]</sup> Der Abbau von Alginat Kapseln unter Anwesenheit von

Gallensäure wurde weiterhin durch die Beschichtung mit Chitosan verhindert. Ding et al. verglichen die Toleranz von in Ca-Alginat Kapseln immobilisierten Zellen gegenüber sauren Bedingungen. Im Falle der Zugabe von Palmöl und Polylysin wiesen die Autoren eine gesteigerte Überlebensrate im Vergleich zu dem Fehlen dieser Additive nach.<sup>[73]</sup>

### **2.2.6 Anpassung der Zellphysiologie**

Die Immobilisierung von Mikroorganismen hat den Aufbau einer Mikroumgebung für die biologische Einheit zur Folge. Die vorherrschenden Parameter, wie Ionenkonzentration und Konzentration von Nährstoffen in dieser Umgebung kann sich von denen der umgebenden Lösung beträchtlich unterscheiden. Auf Grund dessen, sind unter anderem eine reduzierte Wasseraktivität und eine Änderung des osmotischen Drucks der Zelle möglich. In der Summe können diese Faktoren direkte Auswirkungen auf die Funktion und Physiologie der Zellen haben.<sup>[74]</sup> Ma et al. haben die Beschleunigung des Stoffwechsels von immobilisierten Mikroorganismen im Vergleich zu deren freien Form, durch mikrokolorimetrische Messungen bestätigt. Die verkapselten Organismen produzierten eine höhere Wärmeenergie und die Autoren führten dies auf einen erhöhten Metabolismus zurück.<sup>[7]</sup>

### **2.2.7 Anwendungen immobilisierter Mikroorganismen in biotechnologischen Prozessen**

Immobilisierte Mikroorganismen haben besonders als probiotische Zusätze in der Nahrungsmittelindustrie an Bedeutung gewonnen. Weitere Gebiete, in denen verkapselte Zellen eingesetzt werden, sind neben der Fermentation auch die Umweltsanierung. Im Folgenden werden einige der neueren, publizierten Ergebnisse und ihre mögliche Anwendung in Biotechnologieprozessen aufgeführt.<sup>[37, 75]</sup>

Ivanova et al. immobilisierten über Extrusion das Bakterium *Enterococcus faecium* A 2000 (*E. faecium*) in Ca-Alginatkapseln.<sup>[76]</sup> Die immobilisierten Bakterien zeigten eine um 50 % erhöhte Produktion von Bacteriocine, einem proteinogenen Toxin, welches als Antibiotika verwendet werden kann.

Wang et al. nutzten verschiedene Stämme von *Pseudomonas* Bakterien für den Abbau von Dibutylphthalat (DBP) und verglichen die Abbauraten der freien und immobilisierten Bakterien.<sup>[77]</sup> Im Falle der Verkapselung in vernetzte PVA Kapseln, wurde eine höhere Abbaurate nachgewiesen.

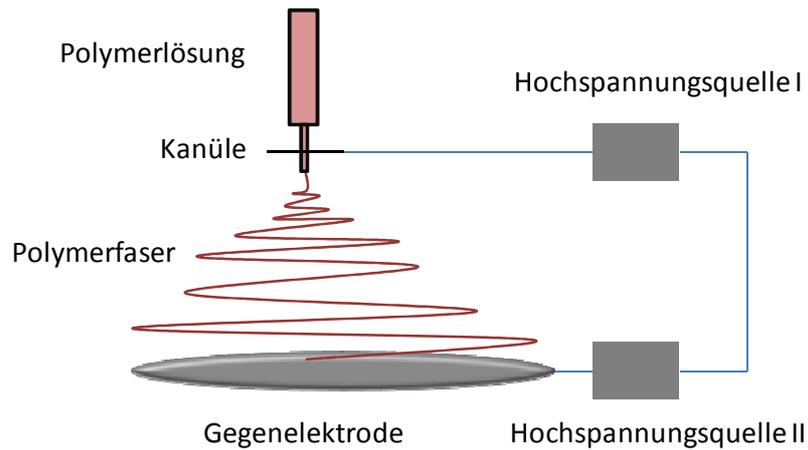
Ding et al. immobilisierten acht verschiedene probiotische Bakterienstämme in eine Alginatmatrix und untersuchten diese auf ihre Toleranz gegenüber sauren Bedingungen und einer Temperatur von über 65 °C.<sup>[78]</sup> Im Vergleich mit den freien Bakterien zeigte sich eine erhöhte Überlebensrate der verkapselten Spezies.

Khalida et al. verwendeten eine Mischung aus Stärke, Glycerin als Gefrierschutzmittel und Ca-Alginat als Immobilisierungsmatrix für *Bifidobacterium pseudolongum* (*B. pseudolongum*) und *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*).<sup>[46]</sup> Die verkapselten Mikroorganismen überlebten eine Lagerung in Joghurt für 8 Wochen bei 4 °C besser als im nicht-immobilisierten Zustand.

## 2.3 Elektrosponnen

### 2.3.1 Konzept

Die Technik des Elektrosponnens, auch unter dem Begriff elektrostatisches Spinnen bekannt, ist die bis zum heutigen Tage einzige Möglichkeit, Fasern mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm bis mehr als 1 µm mittels eines kontinuierlichen Prozesses herzustellen.<sup>[79]</sup> Die zu verspinnende Flüssigkeit kann hierbei sowohl eine Schmelze als auch eine Polymerlösung sein. Die nachfolgende Abbildung 2.3-1 stellt schematisch den Aufbau einer Elektrosponn-Apparatur dar.



**Abbildung 2.3-1 Schematischer Aufbau einer Elektrosynn-Apparatur.**

Die Polymerlösung wird mittels eines konstanten Drucks aus dem Vorratsbehälter, meist einer Spritze, herausgedrückt. Es formt sich an der Edelstahlkanüle ein Flüssigkeitstropfen, welcher durch das Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von in der Regel 5 – 30 keV, elektrostatisch aufgeladen wird. Die Aufladung des Tropfens führt zu einer Konkurrenzsituation zwischen den sich abstoßenden elektrostatischen Kräften auf der Oberfläche des Tropfens und der Oberflächenspannung der Lösung. Aufgrund dessen ändert der Tropfen seine Form von einer sphärischen zu einer konischen Gestalt, dem so genannten Taylor-Konus. Der Winkel des Tropfens wurde von Taylor et al. im Fall Newtonscher Flüssigkeiten auf  $49,3^\circ$  und von Yarin et al. für viskoelastische Polymerlösungen auf  $33,5^\circ$  bestimmt.<sup>[80–82]</sup> Bei Überschreitung eines kritischen Wertes der Spannung, welcher unter anderem von der verwendeten Schmelze bzw. Lösung abhängt, wird ein Materialfluss, der Jet, in Richtung der Gegenelektrode beschleunigt. Die Ausbildung dieses Materialflusses resultiert daraus, dass die elektrostatischen Abstoßungskräfte auf der Oberfläche des Tropfens die Oberflächenspannung des Tropfens übertreffen. Der Jet wird auf dem Weg zur Elektrode aufgrund der elektrostatischen Abstoßungen der Ladungen auf der Oberfläche gedehnt. Die Faser wird gebildet, indem entweder das Lösungsmittel evaporiert oder die Schmelze sich durch Abkühlung verfestigt.

Der Weg der Faser in Richtung der Gegenelektrode ist nur zu Anfang eine gerade Bahn. Im Verlauf der Bewegung beschreibt dieser aufgrund von „*bending instabilities*“ eine spiralförmige Bewegung, die einen Kegelmantel ausbildet. Eine weitere Folge dieser Instabilitäten ist der geringe Durchmesser der Nanofasern.<sup>[83]</sup>

Die erhaltenen Fasern scheiden sich auf der Gegenelektrode als unorientiertes Vlies ab und können entnommen werden. Die Orientierung der Fasern kann durch verschiedene Maßnahmen beeinflusst werden, exemplarisch seien hier zum einen die Abscheidung auf einer rotierenden Gegenelektrode und zum anderen auf einem Metallrahmen für die Herstellung paralleler Fasern erwähnt.<sup>[84]</sup>

Der Durchmesser, die Morphologie und die Ausbildung der Fasern sind von einer Vielzahl von Parametern abhängig. Als extrinsische Faktoren seien die angelegte Spannung, der Abstand der Elektroden, die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur genannt. Zudem sind intrinsische Parameter der Polymerlösung bzw. Schmelze von Bedeutung. Zu diesen gehören unter anderem das Molekulargewicht des Polymers, die Konzentration, die Viskosität, die Oberflächenspannung und die Leitfähigkeit der Lösung.<sup>[79]</sup>

### **2.3.2 Immobilisierung von Mikroorganismen in elektrogesponnene Fasern**

Die Herstellung von Biohybridfasern durch die Immobilisierung von biologischem Material wurde durch Einbringen von Bakterien, Zellen, Proteinen, Enzymen, DNA und Viren durchgeführt.<sup>[85–87]</sup> Mögliche Einsatzgebiete dieser Hybridfasern sind neben mikrobiologischen Brennstoffzellen (MBZ) und Bioreaktoren, auch die Nutzung in der Sanierung von kontaminierten Böden, der Wiederaufbereitung von Trinkwasser und zusätzlich ist eine Verwendung in der regenerativen Medizin und der Phagentherapie denkbar.<sup>[88–91]</sup>

Bellan et al. immobilisierten DNS Moleküle des Lampda-Phage Virus ( $\lambda$ ) in PEO-Nanofasern und beobachteten das gestreckte Molekül durch Fluoreszenzmikroskopie direkt in der Faser. Die Autoren wiesen eine Orientierung der DNS entlang der Faserachse nach und vermuteten, dass auf diese Weise neue Erkenntnisse über die Elastizität des Moleküls und den Prozess des Elektrospinnens möglich sind.<sup>[92]</sup>

Gensheimer et al. nutzten die Technik des Elektrospinnens für die Verkapselung von *E. coli* und *M. luteus* in PEO-Nanofasern und wiesen das Überleben der Mikroorganismen im Anschluss nach. Die immobilisierten *M. luteus* überlebten eine Lagerung unter Ausschluss von Nährstoffen bei 20 °C für mindestens 250 Stunden.<sup>[93]</sup>

Salalha et al. beschrieben die Verkapselung von *E. coli* und *Staphylococcus albus* (*S. albus*) sowie von drei Virenarten, T7, T4,  $\lambda$  in aus Wasser gesponnene PVA-Fasern. Die Viren und Bakterien wurden im Anschluss an den Spinnvorgang positiv auf ihre Viabilität untersucht. Im Gegensatz zu *S. albus* zeigte *E. coli* eine verminderte Fähigkeit des Wachstums von Kolonien, durch Zusatz von Glycerin zu der Polymer-Bakterien Suspension vor dem Elektrospinnen, wurde die Zahl an koloniebildende Einheiten signifikant erhöht.<sup>[94]</sup>

Die Immobilisierung von lebenden, probiotischen Bakterien des Stammes *Bifidobacterium animalis* Bb12 (*B. animalis*) in PVA-Nanofasern wurde von Lopez-Rubio et al. durchgeführt. Die verkapselten Bakterien überlebten in den Fasermatten eine Lagerung von 40 Tagen bei Raumtemperatur und bei bis zu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden nach 130 Tagen lebende Bakterien nachgewiesen.<sup>[95]</sup>

Neben der Technik des Elektrospinnens einer Polymerlösung mittels einer Kanüle, wurde weiterhin das Co-Elektrospinnen für die Immobilisierung von biologischem Material in Kern-Hülle-Fasern verwendet.<sup>[96-99]</sup> Dror et al. produzierten durch Verwendung des Co-Elektrospinnens hohle Fasern (Mikroröhrchen) mit einem Durchmesser von  $3\text{ }\mu\text{m}$ . In diese Mikroröhrchen wurden unter anderem Proteine immobilisiert.<sup>[100]</sup>

Mikroröhrchen aus Polycaprolacton (PCL) als Hülle wurden von Klein et al. für die Immobilisierung von *E. coli*, *Pseudomonas ADP* und *Pseudomonas putida* (*P. putida*) verwendet. Die Autoren untersuchten die verkapselten Bakterien auf ihre Fähigkeit zur Denitrifikation und kamen zu dem Ergebnis, dass die Bakterien nach der Immobilisierung enzymatische Aktivität aufweisen.<sup>[4]</sup>

Jiang et al. produzierten bioabbaubare Kern-Hülle-Fasern bestehend aus PCL als Hülle und Polyethylenglycol (PEG) als Kern. Der PEG-Kern wurde mit zwei Arten von Proteinen, dem Rinderalbumin und Lysozym, beladen und deren Freisetzung für verschiedenen Durchmesser der Faser bestimmt. Das freigesetzte Lysozym wurde im Anschluss mit dem Ergebnis charakterisiert, dass die Struktur und die Aktivität des Enzymes während und nach der Immobilisierung erhalten blieben.<sup>[101]</sup>

Nardi et al. immobilisierten das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) in Mikroröhrchen aus Poly(Vinylfluorid-co-hexafluorpropen) (PVDF-HFP) und PEG. Das Hybridmaterial wurde anschließend für die Biodegradation von Phenol in einem Bioreaktor

verwendet. Die Autoren vermuteten, dass das System für den Abbau von Phenolen aus kontaminierten Gewässern geeignet sei.<sup>[102]</sup>

Die Immobilisierung von biologischem Material, insbesondere Bakterien, in Polymer-Nanofasern erfolgte in der überwiegenden Anzahl der Fälle in wasserlösliche Fasermatten. Im Folgenden wird daher auf Konzepte der Immobilisierung von biologischem Material in wasserunlösliche Fasern eingegangen werden. Im Gegensatz zu den wasserlöslichen Fasermatten, können die wasserunlöslichen eine unkontrollierte Freisetzung bei Kontakt mit wässrigem Medium verhindern.

Liu et al. produzierten wasserunlösliche Nanofasern durch die Verwendung eines Blends aus FDMA und PEO. Die Bakterien der Spezies *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*) und *E. coli* wurden mit dem Blend versponnen. Die Fasern wurden anschließend durch freie radikalische Polymerisation vernetzt und das PEO wurde extrahiert. Die Autoren wiesen nach, dass die Integrität der Bakterien gewahrt blieb und diese eine Lagerung von zwei Monaten bei einer Temperatur von -70 °C überlebten.<sup>[103]</sup>

Gensheimer et al. erreichten die Immobilisierung von lebenden Bakterien in wasserunlöslichen Nanofasern mittels der Verwendung von in Partikeln verkapselten Bakterien. Die Bakterien, *E. coli* und *M. luteus*, wurden in physikalisch vernetzten PVA-Partikeln immobilisiert und diese wurden anschließend in eine organische Polymer-Lösung eingebracht. Die Autoren produzierten Nanofasern aus mehreren wasserunlöslichen, hochmolekularen Polymeren mit immobilisierten bakterienhaltigen Partikeln. Folgende Lösungen wurden verwendet: Polyvinylbuterol (PVB) in Ethanol, PCL gelöst in einer Mischung aus Methanol und Dichlormethan (DCM) und Poly(L-lactid) (PLL) in DCM. In allen Fällen wiesen die Autoren ein Überleben der Bakterien im Anschluss an den Spinnprozess nach.<sup>[104]</sup>

Zeng et al. immobilisierten Rinderalbumin (BSA) und Luciferase in PVA Nanofibers und beschichteten diese mittels der chemischen Gasphasenabscheidung (CVD) mit Poly(*p*-xylylen) (PPX). Die Autoren bestimmten die Freisetzung der Proteine unter physiologischen Bedingungen und stellten einen „burst release“ im Falle der unbeschichteten Fasern fest. Im Gegensatz dazu war die Freisetzung im Falle der Kern-Hülle-Fasern stark verzögert, die Autoren wiesen weiterhin einen Einfluss der Schichtdicke auf die Freisetzungsgeschwindigkeit nach. Im Falle der Beladung mit Luciferase wurde deren enzymatische Aktivität im Anschluss an die Freisetzung erfolgreich nachgewiesen.<sup>[105]</sup>

## 2.4 Modifikation von Oberflächen durch kontrollierte radikalische Polymerisation

### 2.4.1 Konzepte der Oberflächenmodifikation mittels Polymerbürsten

Polymerbürsten sind Polymerketten, welche mit mindestens einem Kettenende mit einem, in der Regel festen Substrat, verbunden sind.<sup>[106]</sup> Die Ausrüstung der Substratoberfläche erfolgt im Allgemeinen über zwei Möglichkeiten: Das „*grafting to*“ Prinzip basiert auf der Pfropfung von bestehenden Polymeren auf eine Oberfläche. Das zweite Prinzip ist die „*grafting from*“ Strategie, in diesem Fall werden die Polymerbürsten von der Pfropfstelle auf der Oberfläche ausgehend aufgebaut.<sup>[107]</sup> Im Falle des *grafting to* Verfahrens basiert die Anbindung der vorgefertigten Polymerkette auf eine physikalischen Physisorption oder der kovalenten Anbindung durch die Nutzung reaktiver Gruppen. Neben vielen Vorteilen dieses Verfahrens, wie der einfachen und genauen Charakterisierung der Polymere, ist die Verwendung durch wesentliche Limitierungen eingeschränkt. Die sterische Hinderung der Polymerketten verhindert die Ausbildung hoher Pfropfungsdichten und auf Grund der abnehmenden Reaktivität der Endgruppe des Polymers bei steigendem Molekulargewicht, ist der verwendbare Polymerisationsgrad eingeschränkt. Die nachfolgende Abbildung 2.4-1 stellt das Prinzip der Polymerbürsten schematisch dar.

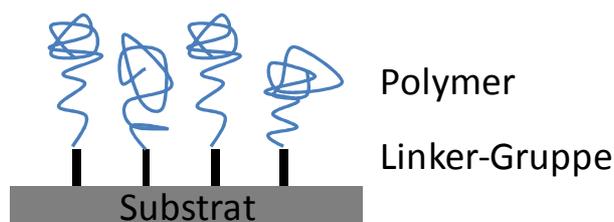


Abbildung 2.4-1 Schematische Abbildung von Polymerbürsten auf einer Oberfläche.

Im Falle der *grafting from* Methode wird die Polymerisation von der Oberfläche des Substrates ausgehend durchgeführt. Die kontrollierten und „lebenden“ Techniken der Polymerisation eignen sich insbesondere für diese Methode, da diese im Idealfall eine sehr gute Kontrolle über die Architektur und die Pfropfungsdichte ermöglichen.<sup>[108]</sup> Im Folgenden wird exklusiv auf die Verwendung der oberflächeninitiierten Atom Transfer Radikal-Polymerisation (SI-ATRP) eingegangen. Die SI-ATRP stellt die bisher am intensivsten bemühte Methode dar, Polymerbürsten zu synthetisieren. Die SI-ATRP, im Vergleich zu

anderen kontrollierten radikalischen Polymerisationen wie NMP oder RAFT, toleriert eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, Monomere und ihre Durchführung ist sowohl in organischen Lösungsmitteln, Wasser und einer Mischung der beiden.<sup>[109]</sup> Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass diese relativ unempfindlich gegenüber der Anwesenheit von Restsauerstoff ist. Dieser wird auf Grund der Oxidation des ATRP Katalysators aus der Reaktionsmischung entfernt.

In der Literatur sind sehr viele Beispiele für die erfolgreiche Pfropfpolymerisation durch Verwendung der SI-ATRP Technik zu finden.<sup>[110]</sup> Die große Verbreitung dieser Technik ist sicherlich auch mit der Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Initiatoren verknüpft. Ungeachtet der großen Vorteile dieser Methode, ist die Verwendung von Übergangsmetall-Katalysatoren insbesondere im Bereich der Medizintechnik problematisch. Erste Schritte für eine Reduzierung der benötigten Menge wurden durch die Entwicklung der Aktivator (Re)genierung durch Elektronen Transfer (A(R)GET ATRP) gemacht.<sup>[111]</sup> Hierbei wird dem System ein Reduktionsmittel, zum Beispiel Ascorbinsäure oder  $\text{Cu}^0$  zugegeben, welches eine kontinuierliche Reduktion von  $\text{Cu}^{\text{II}}$  zu  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ermöglicht und aus diesem Grund kann die eingesetzte Menge an Katalysator reduziert werden.<sup>[112-114]</sup>

Im Folgenden wird auf die Ausrüstung von Polymeroberflächen mit nucleophilen oder elektrophilen Gruppen durch SI-ATRP eingegangen. Die SI-ATRP Initiatoren werden in einem ersten Schritt auf der Oberfläche kovalent angebunden und anschließend für die *grafting from* Polymerisation verwendet. In der Literatur wird häufig Zellulose als Substrat genutzt. Carlmark et al. veresterten die Alkoholgruppen der Zellulose mit 2-Brom-2-methylpropionylbromid (2-BMPiB) und setzen diese in einem zweiten Schritt mit MMA um. Die Pfropfpolymerisation, ausgehend von den kovalent gebundenen Initiatoren, wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und die Synthese von PMMA wurde mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) verifiziert. Der Polymerisationsgrad und die Polydispersität der gepfropften Polymere wurden nicht analysiert, da die Menge an gepfropften Polymer zu gering und eine Abspaltung problematisch war.<sup>[115]</sup> Neben der unbehandelten Zellulose wurden weitere Substrate wie modifizierte Zellulose, Dextran, Polyethylterephthalat (PET), PGMA, Chitosan, Filterpapier aus Zellulose, Polyvinylchlorid (PVC), Stärke und hydroxyliertes Polystyrol umgesetzt.

Im Folgenden werden ausgewählte Charakterisierungsmethoden für die Polymerbürsten vorgestellt und deren Vor- und Nachteile diskutiert.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes und der Molekulargewichtsverteilung der Pfropfpolymeren ist nach dem Abtrennen der Ketten von dem Substrat mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) Analyse möglich.<sup>[116]</sup> Eine solche Bestimmung ist in der Praxis von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die Abspaltung der Polymerketten von dem Substrat von großer Bedeutung, das Linker-Molekül muss dementsprechend gewählt werden, dass eine milde Spaltung möglich ist. Die Verwendung starker Säuren wie etwa HCl, HF oder starker Basen wie NaOH, können neben einer Abtrennung der Polymere auch unerwünschte Nebenreaktionen zur Folge haben.<sup>[117]</sup> Die Verwendung von Polymeren als Substraten, wie zum Beispiel Zellulose oder Dextran ist hierbei hervorzuheben. Die Behandlung dieser Polymere mit den genannten Reagenzien könnte zur Molekülspaltungen der Substrate und Polymerbürsten führen und eine nachfolgende Analyse würde hierdurch gestört werden. In der Literatur wird zur Vermeidung dieser Problematik der Einsatz eines Opfer-Initiators beschrieben.<sup>[117]</sup> Der Initiator liegt frei in der Lösung vor und initiiert eine Lösungspolymerisation des betreffenden Monomers, dieses wird im Anschluss mittels der bekannten Analysemethoden charakterisiert. Der Vergleich der Molekulargewichte von in lösung- und von oberflächeninitiierten Polymeren, muss im Hinblick auf deren unterschiedliche Kinetik diskutiert werden. Bruening et al. berichteten, dass im Falle von oberflächeninitiierte Polymerisationen ein heterogener Prozess vorliegt und daher die Diffusion der Monomere, des Katalysators oder der Liganden einen limitierenden Einfluss auf den Polymerisationsgrad haben.<sup>[118]</sup> Eine weitere entscheidende Einflussgröße ist die Geometrie des Substrates. Gorman et al. wiesen eine drastische Reduzierung des Polymerisationsgrades von PMMA im Falle von konkaven oder flachen Oberflächen im Vergleich zu PMMA nach, welches in Lösung synthetisiert wurde.<sup>[119]</sup> Die Annahme, dass der Polymerisationsgrad von in lösung- und von oberflächeninitiierten Polymeren identisch ist, wurde weiterhin durch theoretische Berechnungen von Turgman-Cohen et al. falsifiziert.<sup>[120]</sup> Die Autoren berichten, dass der Polymerisationsgrad von oberflächeninitiierten Polymeren stets geringer ist und dass die Polydispersität stark von der Pfropfungsdichte abhängt.

Die chemische Zusammensetzung und eine qualitative Aussage über die Pfropfung mit Polymeren kann durch die Verwendung von IR-Spektroskopie erreicht werden. Eine quantitative Aussage ist durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) möglich.<sup>[121]</sup> Ellipsometrie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) können abhängig von dem Substrat und des

Pfropfungspolymeres eine Aussage über die Schichtdicke erbringen, insbesondere bei Partikeln erwies sich zudem die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als praktikabel.<sup>[122–124]</sup>

Im Jahre 1977 wurde von Huang et al. erstmals eine erfolgreiche Pfropfpolymerisation von Polyacrylamid (PAM) auf Silica-Partikel berichtet.<sup>[125]</sup> Die erste erfolgreiche Synthese von PMMA auf selbstorganisierende Monoschichten wurde von Ejaz et al. veröffentlicht.<sup>[126]</sup>

Insbesondere die Verwendung polarer und zum Teil auch wässriger Lösungsmittelsystemen erbrachte einen starken Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit der SI-ATRP. Jones et al. verwendeten die „wasserbeschleunigte“ SI-STRP für die Pfropfung verschiedener Polymere und bestimmten deren Schichtdicke mittels Ellipsometrie und AFM.<sup>[127]</sup> Die Autoren erreichten bei der Verwendung von PMMA eine Dicke von 50 nm und bei Verwendung des Monomers Glycidylmethacrylat (GMA) wurden für Polyglycidylmethacrylat (PGMA) Werte bis zu 120 nm nachgewiesen. Huang et al. synthetisierten über die wasserbeschleunigten SI-ATRP Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PHEMA) auf modifizierten Goldoberflächen.<sup>[128]</sup> Die Schichtdicke wurde für unterschiedliche Reaktionszeiten bestimmt und nach einer 12 stündigen Reaktionsdauer wurden PHEMA-Bürsten mit einer Dicke von bis zu 700 nm nachgewiesen.

Im Folgenden, wird im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Pfropfungen auf flache Oberflächen auf die Verwendung von sphärischen Substraten eingegangen.

Li et al. setzten vernetzte Chitosanpartikel mit einem Durchmesser von 1,5  $\mu\text{m}$  mit 2-BMPiB in THF um. Die Partikel mit reaktiver Oberfläche wurden nachfolgend für die SI-ATRP von Akrylamid verwendet. Die Pfropfpolymerisation von PAM wurde mittels FT-IR und XPS verifiziert und eine Abhängigkeit des Polymerisationsgrades von der Reaktionszeit wurde festgestellt. Die gepfropften Partikel wurden anschließend auf eine selektive Adsorption von Quecksilber in Gegenwart von Blei untersucht.<sup>[129]</sup>

Liu et al. pfropften mittels SI-ATRP Polystyrol auf Chitosanpartikel und verifizierten die erfolgreiche Polymerisation durch FT-IR Spektroskopie und Röntgendiffraktion. Die Autoren beschrieben weiterhin die Verschiebung der Glasübergangstemperatur der gepfropften PS-Ketten von 100 auf 120 °C auf Grund der Anbindung an die Chitosanpartikel.<sup>[130]</sup>

Zheng et al. verwendeten Polydivinylbenzol 80 (P(DVB80)) und Poly(Divinylbenzol-*b*-(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat) (P(DVB-*co*-DMAEMA) Mikropartikel für SI-ATRP von PMMA, PHEMA und PDMAEMA. Die Autoren wiesen im Falle der P(DVB80) Partikel eine Größenzunahme von 3,04 auf 3,14  $\mu\text{m}$  nach und verifizierten die erfolgreiche Pfropfpolymerisation mittels FT-IR und Potentiometrischer Titration. Im Falle der P(DVB-*co*-DMAEMA) Mikropartikel synthetisierten die Autoren gepfropfte Blockcopolymere aus, zum Beispiel PMMA und DMAEMA bzw. PMMA und Poly(Methylmethacrylat-*b*-Trimethylamoniumethylmethacrylat) (PTMAEMA). Die Autoren beschrieben für diese Systeme die Ausbildung von Mikrophasenseparationen und polyelektrolytischen Eigenschaften.<sup>[131]</sup>

Kim et al. stellten thermoresponsive Dextran Partikel mit einer Hülle aus Poly(N-Isopropylacrylamid) (PNIPAm) über SI-ATRP her. Die Autoren pfropften 2-BMPiB kovalent an Dextran Mikropartikel, welche einen Durchmesser von 240  $\mu\text{m}$  besaßen, an. Anschließend wurde über *grafting from* in wässriger Umgebung PNIPAm aufgepfropft und die thermoresponsiven Eigenschaften der Hybridpartikel untersucht. Der mittlere Durchmesser der Hybridpartikel änderte sich abhängig von der Temperatur der Umgebung und betrug im Falle einer Temperatur von 25 °C 273  $\mu\text{m}$ , bei Erhöhung der Temperatur auf 40 °C schrumpfte dieser um 22 % auf 214  $\mu\text{m}$ .<sup>[132]</sup>

Bontempo et al. nutzten SI-ATRP zur Polymerisation unterschiedlicher, wasserlöslicher Monomere wie NIPAM, HEMA und Ethylenglycol (EG). Die Pfropfung wurde ausgehend von vernetzten PS-Partikeln mit unterschiedlichen Anteilen an Polyethylenglycol (PEG) und mit einem Durchmesser zwischen 10 – 200  $\mu\text{m}$  ausgeführt. Die Autoren wiesen nach, dass abhängig von der Polarität des Substrates und des Lösungsmittels die Polymerisation sowohl in dem Partikel initiiert wird, als auch exklusiv von der Oberfläche ausgeht. Im zweiten Falle wurden Schichtdicken von PHEMA von bis zu 60  $\mu\text{m}$  nachgewiesen.<sup>[133]</sup>

Die Vielzahl von verwendbaren Monomeren ermöglicht es, die Substratoberfläche mit responsiven Polymeren zu beschichten. Responsive Oberfläche ändern, im Vergleich zu nicht-responsiven Oberflächen, mit Hilfe eines externen Stimulus, wie zum Beispiel Temperatur oder pH-Wert, ihre Konformation und Struktur beträchtlich.<sup>[106]</sup> Die Konformation von lösungsmittel-responsiven Oberflächen hängt stark von der Art des Lösungsmittel ab. Im Falle eines schlechten Lösungsmittels werden die Polymere sich so anordnen, dass der Kontakt mit dem Lösungsmittel möglichst minimiert und der intra- und intermolekulare Kontakt möglichst

maximiert wird. Im Gegensatz dazu wird im Falle eines guten Lösungsmittels kein Kollabieren der Polymere stattfinden, sondern die Ketten werden die Kontaktfläche mit dem Lösungsmittel maximieren, was einer gestreckten Konformation entspricht. Die Anwendungsgebiete der lösungsmittelresponsiven Oberflächen sind neben dem Einsatz in der Chromatographie und eines gezielten Membrantransport, auch die Beschichtung von Cantilever für die Herstellung hochsensitiver Sensoren im Bereich der chemischen und biologischen Analytik.<sup>[134]</sup> Aoki et al. bestimmten die Dicke von modifizierten PMMA-Bürsten auf einer Quarzoberfläche in guten und schlechten Lösungsmitteln mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation. Bei Benetzung mit dem schlechten Lösungsmitteln, in diesem Fall Acetonitril, wurden für eine hohe Pfropfungsdichte eine Schichtdicke der Polymere von 161 nm und bei einer geringen Pfropfungsdichte wurde eine Schichtdicke von 25 nm bestimmt. Der Wechsel zu einem guten Lösungsmittel, Benzol, erbrachte ungefähr eine Verdoppelung der Dicke, im Falle einer hohen Pfropfungsdichte wurde Werte von 253 nm und bei einer geringen Pfropfungsdichte wurden Werte von 130 nm erreicht. Die Autoren untersuchten auch die Bewegung der Polymerketten und kamen zu dem Ergebnis, dass im Falle einer hohen Pfropfungsdichte die Bewegung der Ketten auf Grund intramolekularer Wechselwirkungen gehindert war. Dieses führten sie als Grund an, weshalb auch im Falle eines schlechten Lösungsmittels die Schichtdicke der PMMA-Ketten einem Wert von 161 nm erreichte.<sup>[135]</sup>

Die Ausrüstung von Oberflächen mit thermoresponsiven Beschichtungen wurde überwiegend mit Polymeren durchgeführt, die eine untere kritische Lösungs-Temperatur (LCST) aufweisen. Der Einsatz von Polymeren mit einer oberen kritischen Lösungs-Temperatur (UCST), wie zum Beispiel Poly(N-Akryloylglycinamid) (PNAGA), ist weit weniger untersucht.<sup>[136]</sup> Als mögliche Einsatzgebiete von thermoresponsiven Oberflächen sind die Verwendung in der Chromatographie, die gezielte Steuerung der Adhäsion von Zellen, der schaltbare Membrantransport und der Einsatz als Träger für Katalysatoren denkbar.<sup>[137]</sup> Das am häufigsten verwendete Polymer, welches eine LCST aufweist, ist PNIPAm. Im Falle einer Temperatur oberhalb der LCST kollabieren die Ketten und bei unterschreiten der LCST verhält sich die Oberfläche hydrophil. Die LCST hängt unter anderem von dem Molekulargewicht und der umgebenden Salzkonzentration ab. In Lösung besitzt PNIPAm eine scharfe Übergangstemperatur, welche im Regelfall bei 32 °C zu finden ist. Im Falle der Anbindung an eine Substratoberfläche zeigen die Ketten einen LCST-Bereich, welcher unter Umständen zwischen 29 und 40 °C liegen kann, hingegen ist der Einfluss der Salzkonzentration bei oberflächen-verankerten Polymeren vernachlässigbar.<sup>[138]</sup> Die

Parameter, welche die LCST von gepfropften PNIPAM beeinflussen, sind unter anderem die Pflropfungsdichte und die Schichtdicke.<sup>[139]</sup> Die Thermoresponsivität der PNIPAM-Oberflächen erlaubt es, zwischen der Ausbildung einer hydrophoben und hydrophilen Oberfläche zu schalten. Die steuerbare Hydrophilie der Oberfläche, wurde von Mizutani et al. für das Wachstum und die Freisetzung von Zellen in Abhängigkeit der Temperatur genutzt. Die Autoren synthetisierten mittels SI-STRP auf eine PS-Oberfläche PNIPAM-Ketten und untersuchten deren responsives Verhalten in Abhängigkeit der Pflropfungsdichte und Schichtdicke. Im Anschluss wurden die gepfropften Oberflächen für das Wachstum von Aorta-Endothel-Zellen des Rinds verwendet. Die Zellen wurden oberhalb der LCST inkubiert und wuchsen auf der Oberfläche zu einer Monolage heran, durch das Absenken der Temperatur auf unterhalb der LCST kam es auf Grund des Konformationswechsel der Polymere zu einem Ablösen der Zellen. Ein solches Verhalten ist nach Aussage der Autoren insbesondere für den Einsatz in der Gewebezüchtung für die Medizin von Interesse.<sup>[140]</sup>

Die Herstellung von pH-responsiven Oberflächen wird durch die Verwendung von gepfropften schwachen Polyelektrolyten erreicht. Im Gegensatz zu den thermoresponsiven Oberflächen ist die Konformation der Pflropfpolymeren von dem umgebenden pH-Wert abhängig, eine weitere Einflussgröße ist die Pflropfungsdichte. Die gezielte Freisetzung von Wirkstoffen im Körper, eine kontrollierte Adhäsion und Benetzung von Oberflächen und der Einsatz in der Chromatographie sind potentielle Anwendungsfelder dieser modifizierten Oberflächen.<sup>[141]</sup>

Polyacrylsäure (PAA) wurde unter anderem von Treat et al. für die Pflropfung auf flache Silica-Oberflächen verwendet und die erfolgreiche Synthese wurde mittels abgeschwächte Totalreflexions Infrarot Spektroskopie (ATR/IR), Ellipsometrie und XPS verifiziert. Die Autoren untersuchten weiterhin die Quellung und das Kollabieren der Ketten in Abhängigkeit des pH-Wertes und stellten einen Anstieg der Schichtdicke von ungefähr 16 nm bei einem pH-Wert von 2 zu einer Dicke von ungefähr 26 nm bei einem pH-Wert von 8 fest.<sup>[142]</sup> Im Gegensatz zu der Polyacrylsäure zeigt die Pflropfung von PDMAEMA auf Oberflächen einen gegenteiligen Effekt. Geoghegan et al. pflropften PDMAEMA mittels SI-ATRP auf eine Siliciumoberfläche und untersuchten deren Quellverhalten in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Änderung der Dicke der Schicht wurde mittels Neutronenreflektometrie bestimmt. Im Falle einer Absenkung des pH-Wertes auf 3 – 4 wurde ein Anschwellen um den Faktor 2 beobachtet.<sup>[143]</sup>

Die Ausrüstung von Oberflächen wurde des Weiteren mit ionenresponsiven Polymeren durchgeführt. Auch wurden Oberflächen erzeugt, die die unerwünschte Anhaftung und den Bewuchs mit sessilen Organismen verhindern, so genannte nicht-fouling Oberflächen.<sup>[144, 145]</sup>

### 2.5 Polymerisation von Poly(*p*-xylylen)

Die Synthese von PPX kann prinzipiell mittels zweier Syntheserouten realisiert werden. Im Falle der nasschemischen Darstellung gehören die Wurtz-Kupplung, die Hoffman-Reaktion und die Gilch-Polymerisation zu den gebräuchlichsten und bekanntesten Verfahren.<sup>[146, 147]</sup>

Die Vorteile dieser Reaktionsführung sind ein einfachere Zugang zur Herstellung von funktionalisierten PPX und eine mögliche Copolymerisation. Zu den Nachteilen gehören das Auftreten von Abbruch- und Übertragungsreaktionen und die damit einhergehende Ausbildung von geringen Molekulargewichten.

Da in der vorliegenden Schrift das CVD-Verfahren für die Synthese von PPX eingesetzt wurde, wird nachfolgend auf die Gasphasenabscheidung eingegangen.

#### 2.5.1 Gasphasenabscheidung von PPX

Szwarc et al. beschrieben 1947 die Gasphasenabscheidung von PPX mittels der Verwendung von [2.2]Paracyclophan als Präkursor.<sup>[148]</sup> Im Jahre 1966 veröffentlichten Gorham et al. eine verbesserte Methode der Herstellung, welche eine nahezu quantitative Ausbeute von PPX-Polymerfilmen auf verschiedenen Substraten ermöglichte.<sup>[149]</sup> Diese Methode wird heutzutage industriell verwendet und wird auch in der vorliegenden Arbeit für die Beschichtung von lebenden Kompositen genutzt. Die beschriebene Methode hat im Gegensatz zu dem im vorherigen Abschnitt besprochenen nasschemischen Verfahren einige Vorteile. Der Prozess benötigt keinen Katalysator oder zusätzlichen Initiator und kommt ohne die Verwendung von Lösungsmitteln aus. Die erhaltenen Polymerisationsgrade sind, begründet durch das Fehlen eines Terminierungsschrittes, sehr hoch und wurde mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) auf ein mittleres Molekulargewicht von 250.000 bis 1.000.000 g·mol<sup>-1</sup> beziffert.<sup>[150]</sup>

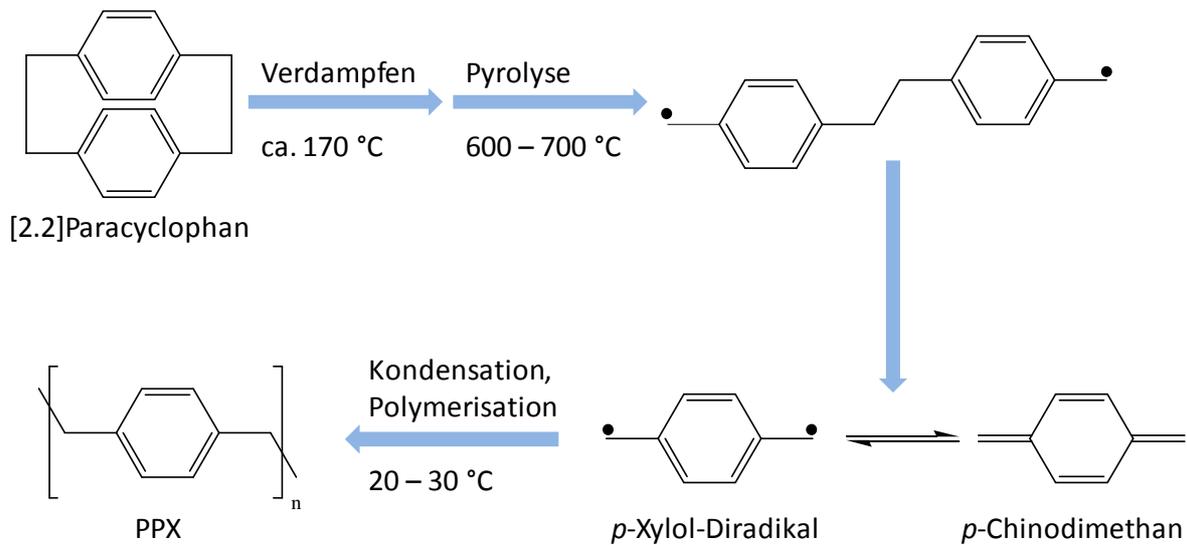


Abbildung 2.5-1 Schematische Darstellung des CVD-Prozess nach Gorham zur Polymerisation von PPX.

Der CVD-Prozess kann in drei aufeinanderfolgende Abschnitte eingeteilt werden. (Abbildung 2.5-1) Der Präkursor, [2.2]Paracyclophan wird im Vakuum bei einer Temperatur von ungefähr 170 °C verdampft und in die Pyrolysezone geleitet. Das Molekül wird in dieser Zone bei einer Temperatur von 600 bis 700 °C gespalten und es bilden sich die reaktiven Intermediate aus. Im Rahmen von experimentellen Untersuchungen und theoretischen Berechnungen wurde das *p*-Xylol-Diradikal als die reaktive Spezies identifiziert. Das Diradikal steht in einem reversiblen Gleichgewicht mit dem stabileren *p*-Chinodimethan und das Gleichgewicht liegt auf Seiten des *p*-Chinodimethan.<sup>[151, 152]</sup> Die Moleküle kondensieren in der Beschichtungskammer, bei einer Temperatur von 20 – 30 °C auf dem Substrat und polymerisieren. Als Substrate wurde bisher eine Vielzahl an Materialien wie zum Beispiel, Kunststoffe, Keramik, Metalle und Glas eingesetzt. Die Oberflächenpolymerisation ermöglicht es, Filme mit einer Schichtdicke von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern zu erzeugen. Die PPX-Filme sind defektfrei, transparent und können auch bei Objekten mit einer anspruchsvollen Oberflächenstrukturierung eingesetzt werden. Das Polymer zeigt weiterhin eine hohe UV-Stabilität und Abriebfestigkeit. PPX ist zudem bei 20 °C unlöslich und ist gegenüber chemischen Einflüssen sehr widerstandsfähig, auch ist es temperaturstabil und schmilzt unter Zersetzung bei 420 °C.<sup>[153]</sup>

### 3. Ergebnisse und Diskussionen

#### 3.1 Chemische Oberflächenmodifikation von lebenden Kompositen

##### 3.1.1 Hypothese

Die Immobilisierung von Bakterien generiert im Gegensatz zu ihrer freien Form eine Vielzahl von Vorteilen. Die Verkapselung von Bakterien in Hydrogele ermöglicht unter anderem, diese unter Ausschluss von Nahrung mehrere Monate zu lagern. Die bakterienhaltigen Partikel sind in diesem Zustand für einen späteren Verwendungszweck direkt verfügbar, ohne dass eine aufwendige Anzucht durchgeführt werden muss. Desweiteren erhöht die Polymerhülle die Resistenz der Bakterien gegen negative Umweltfaktoren wie zum Beispiel einem geänderten pH-Wert oder der Anwesenheit toxischer Substanzen.<sup>[5]</sup> In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass eine PVA-Hülle *M. luteus* gegenüber einer Vielzahl von Lösungsmitteln wie z.B. Aceton, Ethanol und Dichlormethan (DCM), schützt. Hierdurch wurde es möglich, Bakterien aus organischen Lösungsmitteln zu verarbeiten. Gensheimer et al. verwendeten die angesprochenen lebenden Komposite für die Herstellung wasserstabiler Nanofasern. Diese wurden mittels des Verfahrens des Elektrosplennens aus organischen Lösungsmitteln hergestellt.<sup>[104]</sup>

Die Polymerhülle schützt die immobilisierten Bakterien gegenüber nicht-quellenden Lösungsmitteln, da das Hydrogel in diesen Fällen als Sperrschicht zwischen der Umgebung und den immobilisierten Bakterien fungiert. Im Gegensatz dazu werden die Bakterien bei Kontakt mit quellenden Lösungsmitteln, wie z.B. Wasser, unkontrolliert in die Umgebung freigesetzt. Ein solches Verhalten ist nach der Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten zu beobachten. Die Bakterien bilden nach einer Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C Kolonien aus, da sie mit den Nährstoffen durch die Quellung des Partikels in Kontakt gelangen.

In diesem Abschnitt der Schrift wird PVA als Hydrogel für die Immobilisierung verwendet. Das PVA schützt die immobilisierten Bakterien gegenüber nicht-quellenden Lösungsmitteln, daher sollte es möglich sein, die peripheren OH-Gruppen chemisch umzusetzen. Die immobilisierten Bakterien sollten diesen Prozess unter bestimmten Parametern überleben. Zu diesen Parametern zählt unter anderem die Reaktionstemperatur, diese sollte möglichst zwischen 0 und 37 °C betragen, da so der thermische Stress der Bakterien minimiert wird. Eine weitere Vorgabe ist die Verwendung von nicht-quellenden Lösungsmitteln, da dies eine

Quellung des Hydrogels vermeidet. Eine konstante Separation der immobilisierten Bakterien und den toxischen Substanzen sollte somit sichergestellt werden.

### 3.1.2 Konzept

In den nachfolgenden Abschnitten wird die Arbeitshypothese aus Abschnitt 3.1.1 überprüft. Es werden PVA-Mikropartikel mit immobilisierten *M. luteus* in nicht-quellenden Lösungsmitteln bei maximal 20 °C weiterverarbeitet. Das Überleben der Bakterien wird im Anschluss an die Reaktionen durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten getestet. Die erfolgreichen Reaktionen sollen durch ATR/IR-Spektroskopie verifiziert werden, mittels dieser Methode wird die Oberfläche der Substrate analysiert. Die Oberflächenmorphologie der Partikel und ihre Form werden mittels REM-Aufnahmen untersucht. Auf Grund der Verwendung von unpolaren und/oder nicht-protischen Lösungsmitteln sollte die sphärische Gestalt der Partikel erhalten bleiben.

Die peripheren Alkohol-Gruppen sollen mit Isocyanat-Gruppen umgesetzt werden und es wird erwartet, dass Urethan-Gruppen dargestellt werden. In einer Modellreaktion soll Octadecylisocyanat verwendet werden und deren chemische Anbindung soll durch ATR/IR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Die Partikeloberfläche sollte unverändert vorliegen und ihre sphärische Gestalt sollte konserviert werden. Die Anwesenheit von lebenden Bakterien wird im Anschluss an die Umsetzung durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten untersucht. Im Falle von lebenden, immobilisierten *M. luteus* wird erwartet, dass diese das Wachstum von charakteristischen Kolonien bedingen.

Das Diisocyanat, 2,4-Toluenediisocyanat (2,4-TDI), soll für eine sequentielle Reaktion verwendet werden. Die erste Isocyanatgruppe soll mit einer peripheren Alkoholgruppe reagieren und daher sollte sich durch eine Additionsreaktion eine Urethan-Gruppe ausbilden. Die zweite Isocyanatgruppe soll im Anschluss mit Nilblau, einem blauen Farbstoff, umgesetzt werden. Es wird erwartet, dass der Farbstoff kovalent an der Oberfläche angebunden wird. Dies soll durch Versetzen mit Wasser nachgewiesen werden. Im Fall einer chemischen Anbindung, im Gegensatz zu einer physikalischen Absorption, sollte der Farbstoff nicht in die Umgebung migrieren. Die sphärische Struktur und die Viabilität der immobilisierten Bakterien sollen im Anschluss an die Umsetzung verifiziert werden. Es wird erwartet, dass die

Bakterien die Reaktion überleben, da die Partikel nicht quellen und daher kein Kontakt zwischen den Bakterien und den Reaktanten bzw. dem Lösungsmittel zustande kommt.

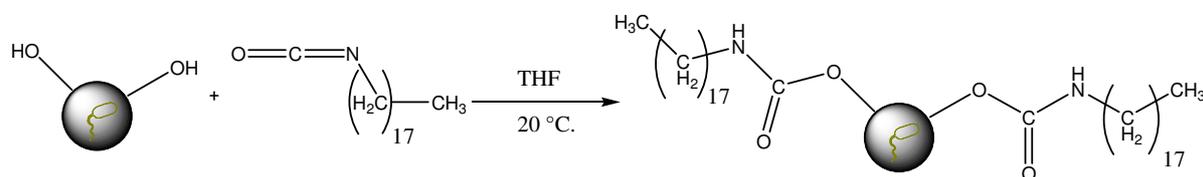
Die unkontrollierte Freisetzung der immobilisierten Bakterien bei Kontakt mit Wasser soll durch eine intramolekulare und intermolekulare Vernetzung des PVA verhindert werden. Hierfür sollen die Partikel mit 2,6-Hexamethyldiisocyanat (2,6-HDMI) umgesetzt werden und die Vernetzung wird mittels ATR/IR-Spektroskopie verfolgt.<sup>[154]</sup> Die Quervernetzung soll die Quellung des Partikels verhindern und daher sollte die Freisetzung der Bakterien unterdrückt werden. Die Retention der Freisetzung der Bakterien wird durch die Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten überprüft. Im Falle einer erfolgreichen Retention sollte die Zeitspanne zwischen der Inokulation und dem Wachstum von Kolonien, im Gegensatz zu den unbehandelten Partikeln, vergrößert sein.

### **3.1.3 Oberflächenmodifikation mit Octadecylisocyanat**

Die unkontrollierte Freisetzung von immobilisierten Materialien, wie zum Beispiel Bakterien, aus PVA-Mikropartikeln durch den Kontakt mit Wasser ist auf die Quellung des Hydrogels zurückzuführen. Die Ausrüstung der Partikel mit einer hydrophoben Hülle sollte eine Möglichkeit darstellen, dieses Verhalten zu verhindern. Die Hülle sollte kovalent an die Oberfläche der Partikel gebunden sein, dies verhindert eine Abtragung der Hülle durch Lösungsmittel.

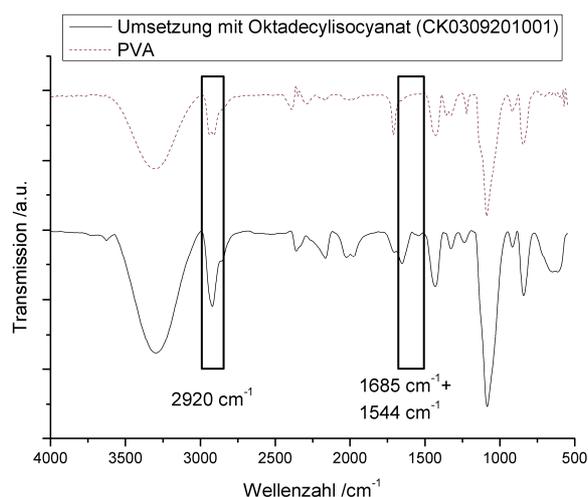
In vorherigen Abschnitten wurde der Schutz der immobilisierten Bakterien gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln benannt. Diese Eigenschaft bei Anwesenheit von nicht-quehlenden Lösungsmitteln soll nachfolgend, durch den Einsatz von Hexan, berücksichtigt werden. Die Oberflächenreaktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt, da sich thermischer Stress negativ auf die Viabilität der Bakterien auswirken kann. Der Einsatz von Hexan sollte zu einer reinen Oberflächenreaktion führen, da die PVA-Partikel nicht quellen und daher kein Eindringen des Octadecylisocyanats in die Partikel stattfindet. Es wird erwartet, dass die immobilisierten *M. luteus* nicht geschädigt werden. Im Anschluss an die Modifikation werden die immobilisierten Bakterien für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Im Falle eines Wachstums von gelben Kolonien von *M. luteus* sollte dies auf immobilisierte lebende Bakterien in den Partikeln zurückzuführen sein. Zusätzlich wird der Zeitraum von der Inkubation bis zu dem Wachstum von Kolonien der modifizierten Partikel

mit denen der unbehandelten Partikel verglichen, dies ermöglicht es die Wachstumszeiten zu vergleichen. Das nachfolgende Schema verdeutlicht die Reaktion.



**Schema 3.1-1 Oberflächenmodifikation von bakterienhaltigen PVA-Partikel durch Octadecylisocyanat, CK03082010.**

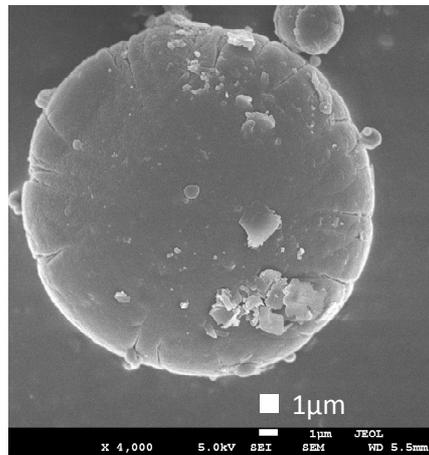
Die Reaktion wurde für 24 Stunden durchgeführt und das erhaltene farblose Pulver wurde mittels ATR/IR-Spektroskopie analysiert.



**Abbildung 3.1-1 ATR/IR-Spektrum der modifizierten PVA-Partikel mit immobilisierten *M. luteus*.**

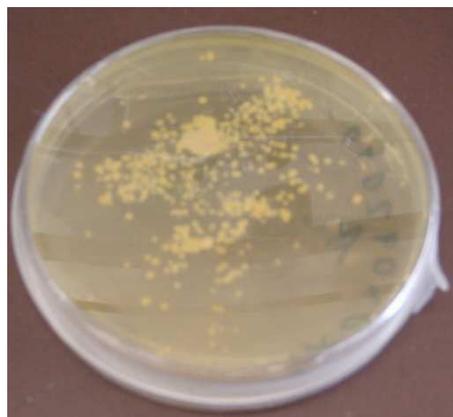
Das abgebildete Spektrum, Abbildung 3.1-1, zeigt für die Umsetzung charakteristische Signale. Die Bande bei einer Wellenzahl von 2920 cm<sup>-1</sup> besaß, im Gegensatz zu dem PVA-Spektrum, eine niedrigere Transmission, dies wurde auf die aliphatische Gruppe der Fettsäure des Octadecylisocyanats zurückgeführt. Die zusätzlichen Banden bei 1658 cm<sup>-1</sup> und 1544 cm<sup>-1</sup> zeigten die Anwesenheit der gebildeten Urethan-Gruppen. Die Bande bei einer Wellenzahl von 1658 cm<sup>-1</sup> wurde durch die Streckschwingung der C=O Gruppe des Amids verursacht. Die Bande bei einer Wellenzahl von 1544 cm<sup>-1</sup> war auf die Deformationsschwingung der N-H Gruppe zurückzuführen. <sup>[155]</sup> Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die Reaktion erfolgreich durchgeführt wurde.

Die Oberfläche und die Form der Partikel wurden im Anschluss an die Umsetzung mittels REM analysiert. (Abbildung 3.1-2)



**Abbildung 3.1-2 REM-Aufnahme eines bakterienhaltigen PVA-Partikels nach Umsetzung mit Octadecylisocyanat.**

Die PVA-Partikel besaßen eine sphärische Form die sich nicht von denen der unbehandelten Partikeln unterschied. Die Oberfläche war glatt und es wurde keine Änderung im Gegensatz zu den reinen PVA-Partikeln erkannt. Die Partikel lagen unbeschädigt vor und es wurde davon ausgegangen, dass die immobilisierten Bakterien die Behandlung überlebten. Aus diesem Grund wurde eine geringe Menge der Partikel für die Inokulation einer nährstoffhaltigen Agarplatte verwendet. 48 Stunden nach der Inkubation der Platten bei 37 °C wurde das Wachstum von charakteristischen, gelben Kolonien von *M. luteus* beobachtet. (Abbildung 3.1-3)



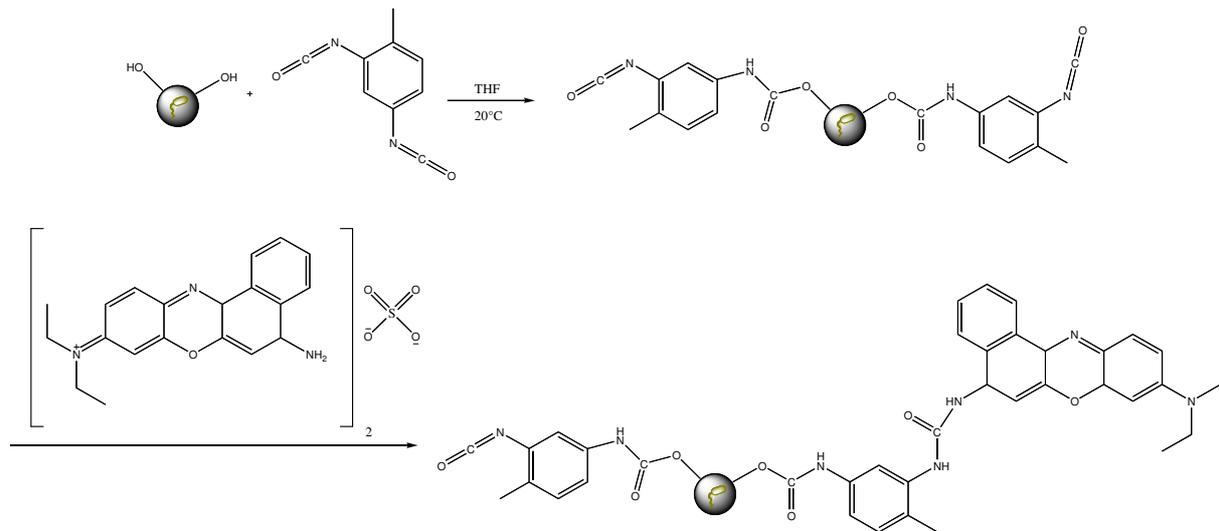
**Abbildung 3.1-3: Lebende *M. luteus* auf nährstoffhaltiger Agarplatte nach Umsetzung der PVA-Partikel mit Octadecylisocyanat (CK0309201201).**

Die Zeitspanne zwischen der Inkubation der Platten im Falle der modifizierten und unmodifizierten Partikeln unterschied sich nicht, folglich trat keine Retention der Freisetzung der Bakterien durch die chemische Anbindung des Octadecylisocyanat ein.

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die chemische Oberflächenmodifikation durch Octadecylisocyanat bei Raumtemperatur erfolgreich war. Die Additionsreaktion wurde durch die Bildung der Urethan-Gruppe und deren Nachweis mittels der ATR/IR-Spektroskopie verifiziert. Die modifizierten Partikel lagen unzerstört vor und zeigten, nach der Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten, ein Wachstum von *M. luteus*. Es wurde erfolgreich nachgewiesen, dass die immobilisierten Bakterien die Reaktion bei Raumtemperatur an der Oberfläche des Partikels überlebten.

### **3.1.4 Oberflächenaktivierung durch 2,4-TDI**

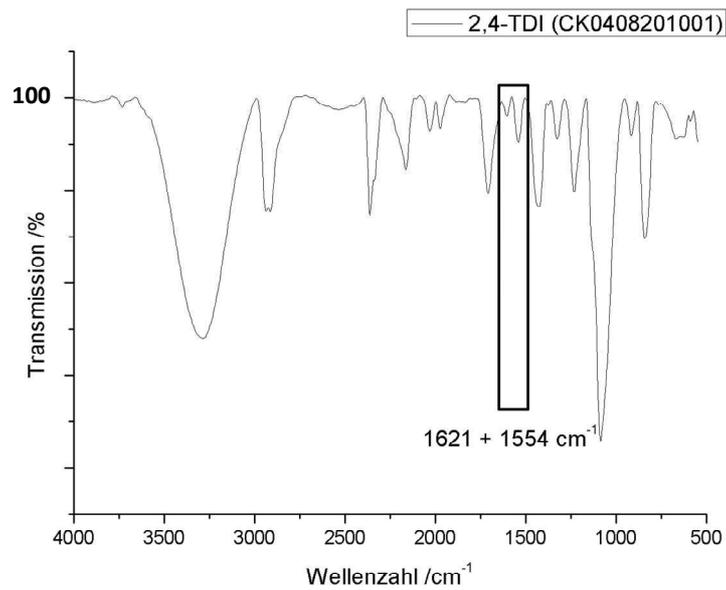
In Abschnitt 3.1.3 wurde die erfolgreiche Modifikation der Oberfläche durch Isocyanate erreicht und die Bakterien überlebten diese Reaktion. Im Folgenden wird 2,4-TDI verwendet. Die erste Cyanogruppe soll mit den OH-Gruppen an der Oberfläche der Partikel eine Additionsreaktion eingehen und die zweite Cyanogruppe sollte als reaktive Komponente für eine weitere Umsetzung zur Verfügung stehen. Die Einführung dieses „Linker“-Moleküls soll es ermöglichen, die Oberfläche auch mit weniger reaktiven Molekülen auszurüsten. In dem folgenden Abschnitt wurde hierfür beispielhaft der Farbstoff Nilblau verwendet. Das Reaktionsschema ist nachfolgend gezeigt. (Schema 3.1-2)



**Schema 3.1-2 Reaktionsschema der Umsetzung von bakterienhaltigen PVA-Partikeln mit 2,4-TDI und Nilblau (CK1801201101).**

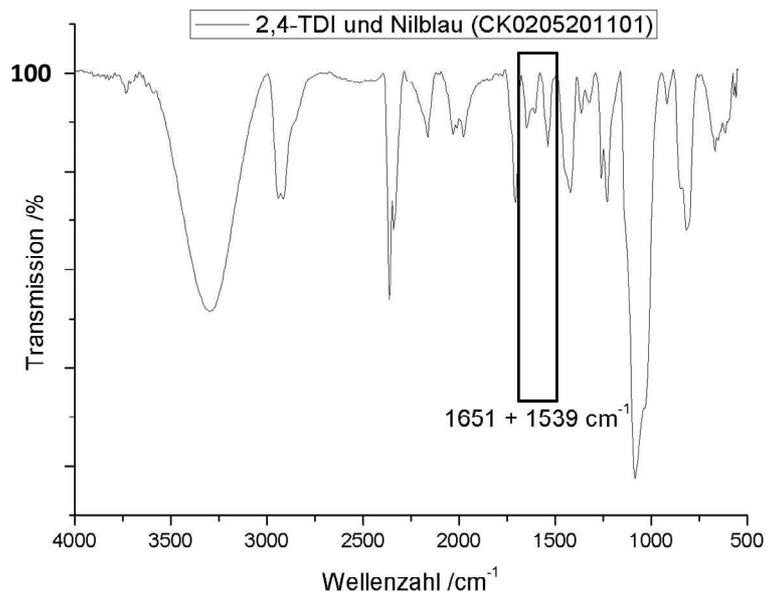
Es wird erwartet, dass die immobilisierten Bakterien die sequentielle Reaktion überleben und dieses wird durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen.

PVA-Partikel ohne Bakterien wurden zunächst mit 2,4-TDI versetzt, nachfolgend ist das erhaltene ATR/IR-Spektrum der Partikel aufgeführt. Der Vergleich des PVA-Spektrums vor und nach der Reaktion ergibt zwei zusätzliche Banden. Eine Bande bei  $1621\text{ cm}^{-1}$  und eine bei  $1554\text{ cm}^{-1}$ . Die Banden wurden durch die C=O bzw. N-H Schwingungen der Urethan-Gruppe bedingt. Die Oberflächenreaktion wurde daher erfolgreich ausgeführt.<sup>[155]</sup> (Abbildung 3.1-4)



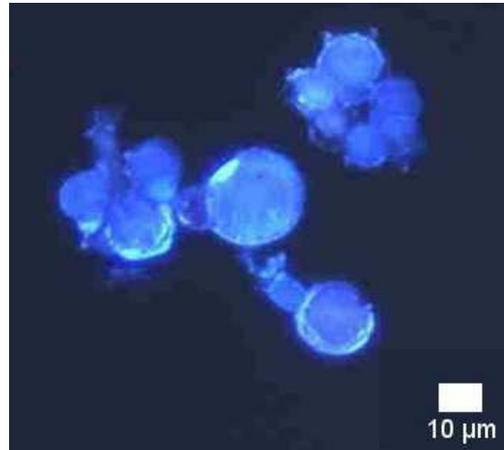
**Abbildung 3.1-4 ATR/IR-Spektrum der PVA-Partikeln nach der Umsetzung mit 2,4-TDI (CK0408201001).**

In einem nächsten Schritt wurde die Lösung anschließend mit Nilblau versetzt. Der blaue Feststoff wurde mittels Soxhletextraktion mit Methanol für 24 Stunden von überschüssigem Farbstoff gereinigt. Das abgebildete IR-Spektrum zeigt deutlich die für die N-H bzw. C=O Schwingungen charakteristischen Signale bei einer Wellenzahl von  $1651 \text{ cm}^{-1}$  und  $1539 \text{ cm}^{-1}$ . (Abbildung 3.1-5)



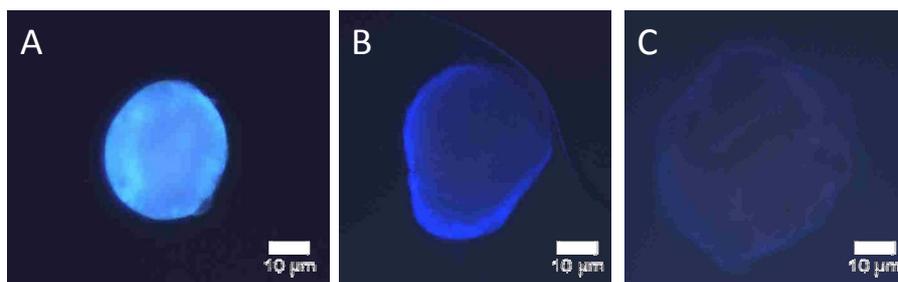
**Abbildung 3.1-5 ATR/IR-Spektrum der PVA-Partikeln nach Umsetzung mit 2,4-TDI und Nilblau (CK0205201101).**

Die Partikel wurden mit einem optischen Mikroskop und einem Anregungswellenlängenbereich von 450 – 490 nm untersucht. Die Fluoreszenz des Nilblau war deutlich auf der Oberfläche der Partikel zu erkennen, weiterhin besaßen die Partikel eine sphärische Form. (Abbildung 3.1-6)



**Abbildung 3.1-6 Aufnahme von PVA-Partikeln mit angebondenem Nilblau mit einem optischen Mikroskop und einem Anregungswellenbereich von 450 – 490 nm (CK1801201101).**

Die kovalente Anbindung des Farbstoffes wurde durch die Zugabe von Wasser geprüft. Im Falle einer physischen Absorption sollte der Farbstoff in die Umgebung freigesetzt werden und die Fluoreszenz sollte daher in der umgebenden Lösung zu beobachten sein. Im Falle einer chemischen Anbindung sollte dieses Verhalten nicht beobachtet werden und die Fluoreszenz sollte sich auf den Partikel beschränken. (Abbildung 3.1-7)

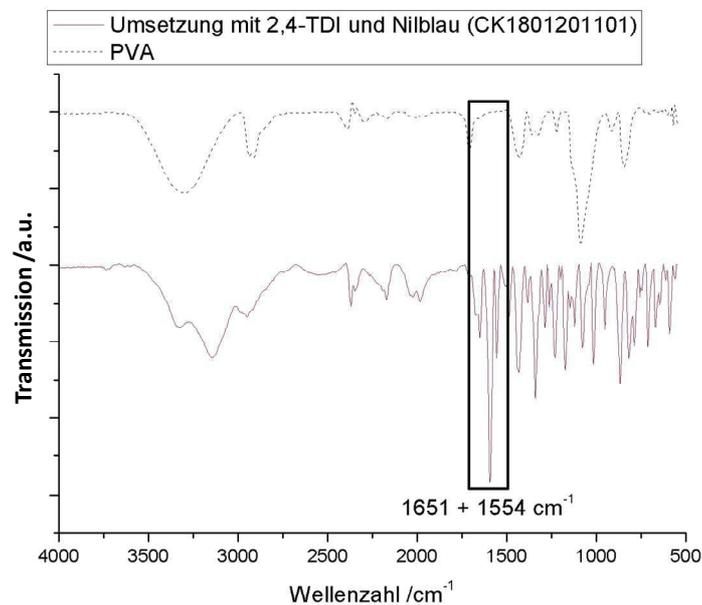


**Abbildung 3.1-7 Zeitlich aufgelöste Aufnahmen von einem PVA-Partikel nach Umsetzung mit 2,4-TDI und Nilblau mit einem optischen Mikroskop und einem Anregungswellenlängenbereich von 450 – 490 nm. Modifizierter Partikel vor Wasserzugabe (A), modifizierter Partikel nach Wasserzugabe nach 1 Minute (B) und Partikel nach 6 Minuten nach Wasserzugabe (C) (CK0205201102).**

Die Fluoreszenz des Farbstoffes auf der Oberfläche des Partikels war, vor der Zugabe von Wasser, deutlich zu erkennen (A). Eine Minute nach der Zugabe des Wassers hatte sich die

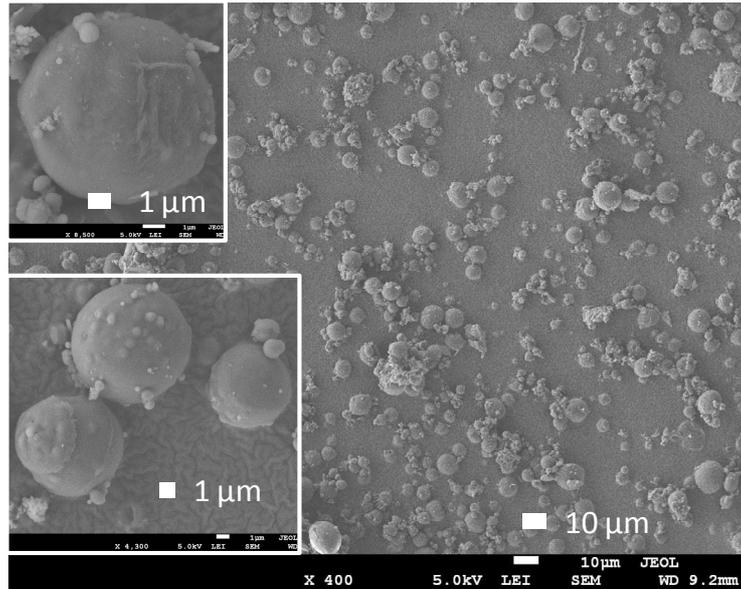
Form des sphärischen Partikels aufgrund seiner Quellung verändert (B). Die Fluoreszenz des Farbstoffes war nach sechs Minuten weiterhin auf den Partikel beschränkt, dieser lag gequollen vor und konnte in nachfolgenden Aufnahmen nicht mehr erkannt werden (C). Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die Fluoreszenz des Nilblaus auf den Partikel beschränkt war und nicht in der umgebende Lösung detektiert wurde. Der Farbstoff war daher an die Oberfläche des Partikels angebunden.

Die sequentielle Reaktion wurde im Folgenden auf PVA-Partikel mit immobilisierten Bakterien übertragen. Das ATR/IR-Spektrum zeigte die erfolgreiche Anbindung des Diisocyanat und des Nilblau an die Oberfläche. (Abbildung 3.1-8)



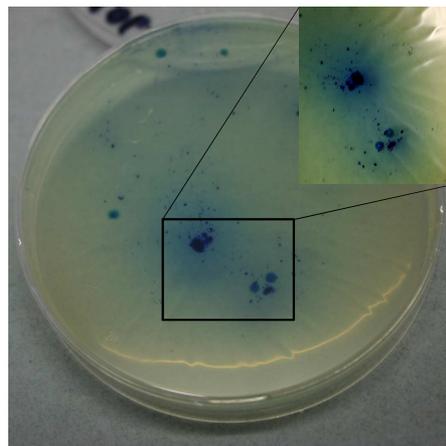
**Abbildung 3.1-8 ATR/IR-Spektrum der bakterienhaltiger PVA-Partikel nach einer Umsetzung mit 2,4-TDI und Nilblau (CK1801201101).**

Die Oberfläche der PVA-Partikel und ihre Struktur wurden nachfolgend durch REM-Aufnahmen analysiert. (Abbildung 3.1-9)



**Abbildung 3.1-9 REM-Aufnahmen der mit Nilblau und 2,4-TDI umgesetzten PVA-Partikeln.**

Die Partikel lagen unzerstört vor und ihre sphärische Gestalt wurde konserviert, dementsprechend waren die Partikel während der Reaktion nicht gequollen. Dies war ein starker Hinweis darauf, dass die immobilisierten Bakterien nicht mit dem Lösungsmittel und nicht mit den Reaktanten in Kontakt gekommen sind. Der blaue Feststoff wurde nachfolgend für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet, im Anschluss wurden diese bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. (Abbildung 3.1-10)



**Abbildung 3.1-10 Koloniebildung von *M. luteus*. Die Bakterien überlebten die Umsetzung der PVA-Partikel mit 2,4-TDI und Nilblau im Inneren des Partikels. Es wurden nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C lebende Bakterien nachgewiesen.**

Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte, dass die immobilisierten Bakterien die beiden Reaktionen überlebt haben. Die Zeitspanne

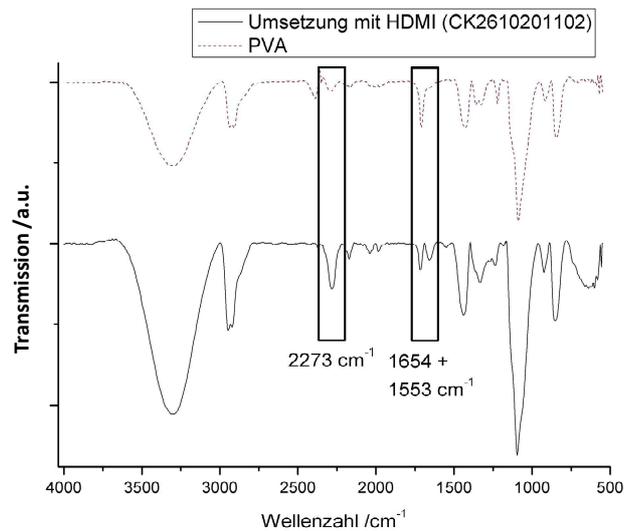
zwischen der Inkubation und dem Wachstum der Bakterien unterschied sich nicht von der der unbehandelten Partikeln mit immobilisierten Bakterien.

In dem hier genannten Abschnitt wurde erfolgreich eine sequentielle Reaktion an der Oberfläche der PVA-Partikel bei Raumtemperatur und in einem nicht-quellenden Lösungsmittel durchgeführt. Die Bildung der Urethan-Gruppe wurde durch IR-Spektren und die chemische Anbindung des Nilblau wurde durch Wasserstabilitätstest verifiziert. Im Anschluss an die Reaktionskaskade wurden lebende Bakterien im Inneren der Partikel, durch das Wachstum von Kolonien auf nährstoffhaltigen Agarplatten, nachgewiesen.

### **3.1.5 Oberflächenvernetzung von lebenden Kompositen**

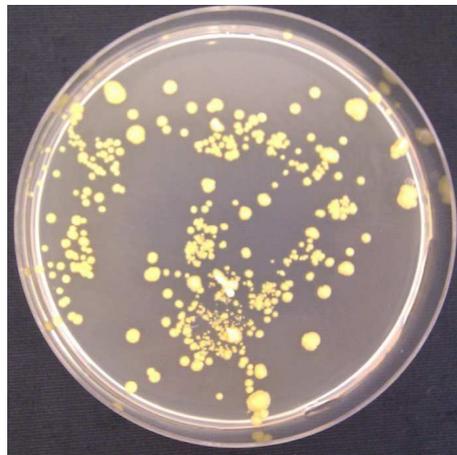
Die unkontrollierte Freisetzung der immobilisierten Bakterien aus PVA-Mikropartikeln aufgrund des Kontaktes mit Wasser ist auf die Quellung des Hydrogels zurückzuführen. In den vorherigen Abschnitten, wurde erfolgreich die Oberfläche der Partikel durch Grenzflächenreaktionen modifiziert. Die immobilisierten Bakterien in den Partikeln überlebten diese Modifikationen unter bestimmten Voraussetzungen. In dem nachfolgenden Abschnitt wird daher, aufbauend auf diesen Erkenntnissen ein Diisocyanat für die Vernetzung der Oberfläche verwendet werden. Es wird erwartet, dass die Verwendung von 2,6-HDMI zu einer intramolekularen und intermolekularen Vernetzung des PVAs führt. Dies soll die sphärische Struktur des Partikels gegenüber dem Quellprozess erhalten und aufgrund dessen sollte die Freisetzung der Bakterien gehindert werden. Die immobilisierten Bakterien sollten den Prozess überleben, da erwartet wird, dass die Reaktion ausschließlich an der Oberfläche des Partikels stattfindet. Der Nachweis des Überlebens der Bakterien und die Retention der Freisetzung der Bakterien werden durch die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten durchgeführt. Die Zeitspanne zwischen Inokulation und Wachstum der Kolonien wird mit der der unmodifizierten Partikeln verglichen.

Die Reaktion wurde bei 0 °C durchgeführt und die modifizierten Partikel wurden mittels ATR/IR-Spektroskopie untersucht. (Abbildung 3.1-11)



**Abbildung 3.1-11 ATR/IR-Spektrum der Umsetzung von PVA-Partikeln mit 2,6-HDMI (CK2610201102).**

Die Banden bei einer Wellenzahl von 2273, 1654 und 1553 cm<sup>-1</sup> zeigten die erfolgreiche Vernetzung des PVAs. Diese wurden von der N-H bzw. der C=O Schwingung der gebildeten Urethan-Gruppe bedingt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde im Anschluss für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet, diese wurden bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. (Abbildung 3.1-12)



**Abbildung 3.1-12 Wachstum von lebenden, in PVA-Partikeln, immobilisierte *M. luteus*. Die Partikel wurden mit 2,6-HDMI im Vorfeld umgesetzt (CK2610201102).**

Die immobilisierten Bakterien überlebten die Reaktion mit 2,6-HDMI und aus diesem Grund wurden 48 Stunden nach der Inkubation charakteristische Kolonien von *M.luteus* auf den Agarplatten beobachtet. Im Vergleich mit den unmodifizierten PVA-Mikropartikeln mit immobilisierten Bakterien ergab sich keine Änderung der Zeitspanne zwischen der

Inokulation und dem Wachstum von Kolonien von *M. luteus*. Die Oberflächenvernetzung des Partikels erbrachte keine Retention der Freisetzung der Bakterien.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Reaktion der PVA-Partikel in DCM bei 0 °C mit 2,6-HDMI erfolgreich durchgeführt wurde. Die Bakterien überlebten die 24-stündige Umsetzung und bildeten Kolonien nach 48 Stunden Inkubationszeit aus. Die Vernetzung der Partikel führte zu keiner Retention der Freisetzung der Bakterien auf Agarplatten. Es ist jedoch anzunehmen, dass stärker vernetzte Partikel, zu einer verzögerten Freisetzung führen sollten. Diese Quervernetzung könnte zum Beispiel in weiterführenden Experimenten durch den Einsatz von Glutaraldehyd oder Borsäure erhalten werden.<sup>[156–158]</sup>

### 3.1.6 Zusammenfassung

Die PVA-Mikropartikel schützten die immobilisierten *M. luteus*, unter Einhaltung bestimmter Parameter gegenüber chemischen Oberflächenreaktionen. Zu den Reaktionsbedingungen gehörte, neben einer Reaktionstemperatur von möglichst unter 37 °C, auch die Verwendung von nicht-quellenden Lösungsmitteln wie z.B. DCM und Hexan.

Die Umsetzung der Partikel mit Octadecylisocyanat in Hexan, als Modellreaktion, wurde erfolgreich durchgeführt. Im Anschluss an die Umsetzung wurde die Struktur der Mikropartikel durch REM-Aufnahmen analysiert. Die sphärische Gestalt blieb erhalten und die Oberflächenstruktur der Partikel lag unverändert vor. Lebende, immobilisierte Bakterien nach der Reaktion, wurden durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen.

Die OH-Gruppen des Partikels wurden durch die Umsetzung mit 2,4-TDI in Urethan-Gruppen überführt und anschließend wurde Nilblau auf der reaktiven Oberfläche kovalent angebunden. Die erfolgreiche chemische Anbindung des Farbstoffes wurde über Qualexperimente nachgewiesen. Hierbei trat keine Migration des Farbstoffes in die umgebende Lösung ein. Die intakte sphärische Struktur der Partikel wurde durch REM-Aufnahmen verifiziert. Im Anschluss an die sequentielle Reaktion wurde, durch Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten, lebende immobilisierte Bakterien in den Partikel nachgewiesen.

Die unkontrollierte Freisetzung der Bakterien, durch die Quellung des Partikels nach Kontakt mit Wasser, sollte durch die Verwendung von 2,6-HDMI verhindert werden. Das 2,6-HDMI

wurde für eine intramolekulare und intermolekulare Vernetzung der Oberfläche des PVA-Mikropartikels genutzt. Die Reaktion wurde mittels ATR/IR-Spektroskopie verfolgt und die modifizierten Partikel wurden anschließend für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die PVA-Partikel schirmten die immobilisierten Bakterien erfolgreich während der Umsetzung ab und lebende *M. luteus* wurden durch das Wachstum von Kolonien nachgewiesen. Es wurde durch die Oberflächenvernetzung der Partikel keine Retention der Freisetzung der Bakterien erreicht. Aus diesem Grund sollen die Partikel in den nachfolgenden Abschnitten, aufbauend auf diesen Ergebnissen, mit einer hydrophoben Polymerhülle ausgerüstet werden. Die Hülle soll das Eindringen des Wassers und infolgedessen die Quellung der Partikel verhindern, hierdurch sollte eine Retention der Freisetzung der immobilisierten *M. luteus* eintreten.

## 3.2 „Grafting from“ von PMMA auf lebende Komposite

### 3.2.1 Hypothese

Die Immobilisierung von biologischen Einheiten ist in einer Vielzahl von Anwendungsfeldern von hohem Interesse. Hierzu zählen neben den industrierelevanten, wie z.B. Fermentationsreaktoren oder der Herstellung von Aminosäuren, auch die Bioremediation von kontaminierten Trinkwasser oder Böden. Die Immobilisierung der Mikroorganismen führt zu einer Reihe von Vorteilen. Die Matrix erzeugt eine Mikroumgebung, welche die biologischen Einheiten gegenüber verschiedenen negativen Einflussfaktoren abschirmt. Zu diesen Faktoren gehört eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber Änderungen des pH-Wertes oder einer erhöhten Konzentration an toxischen Substanzen. Die immobilisierten Bakterien können mehrere Monate in den Kompositen unter Ausschluss von Nahrung und Wasser überleben. Das Design der Hülle der Bakterien sollte unter anderen folgenden Kriterien erfüllen. Das Material muss durchlässig gegenüber Gasen wie Sauerstoff sein und den Transport von Nährstoffen in den Komposit und den Abtransport von Metaboliten ermöglichen. Zusätzlich sollte es biokompatibel und widerstandsfähig gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen sein. Das Hydrogel, PVA, erfüllt diese Voraussetzung und ist eines der am meist verwendeten Materialien für die Immobilisierung von biologischen Einheiten. In früheren veröffentlichten Arbeiten konnte zudem der Schutz der immobilisierten Bakterien gegenüber einer Vielzahl von Lösungsmitteln und der damit verbundenen Möglichkeit der Weiterverarbeitung von Bakterien aus organischen Lösungsmitteln demonstriert werden. Ein limitierender Faktor der benannten Verfahrensweise ist die unkontrollierte Freisetzung der Bakterien bei Kontakt mit Wasser. Es wurde unter anderem durch eine nachträgliche Vernetzung des Hydrogels versucht bakterienhaltige wasserstabile Systeme zu erhalten. Ein Beispiel für dieses Verfahren ist die Vernetzung von Alginat mit Calcium-Ionen, die Wasserstabilität dieses Materials erwies sich jedoch als ungenügend.

In den folgenden Abschnitten soll die Herstellung von wasserstabilen Kern-Hülle-Partikeln aufbauend auf PVA-Mikropartikeln durchgeführt werden. Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Ergebnisse der Oberflächenmodifikation der Partikel, bei gleichzeitigem Überleben der immobilisierten *M. luteus*, dienen hierbei als Grundlage. Die aufzubauende hydrophobe Hülle soll den PVA-Kern gegenüber der umgebenden wässrigen Lösung abschirmen und soll daher eine Quellung des Partikels verhindern. Es wird vermutete, dass die Hemmung der Quellung

die Freisetzung von immobilisierten Bakterien in die Umgebung unterdrückt. Im Folgenden wurde für den Aufbau einer hydrophoben Hülle PMMA gewählt. Die PMMA-Hülle soll den gesamten Partikel umgeben und aufgrund der oberflächeninitiierten Pfpolymerisation ausschließlich an der Oberfläche des Partikels lokalisiert sein. Das Überleben der immobilisierten *M. luteus* soll durch die Einhaltung der kritischen Prozessparameter, wie die Limitierung der Temperatur auf 37 °C und Ausschluss von quellenden Lösungsmitteln, sichergestellt werden.

Es wird erwartet, dass die wasserstabilen PMMA-PVA-Partikel die Freisetzung der Bakterien je nach Schichtdicke der Hülle verzögern und daher eine Weiterverarbeitung der bakterienhaltigen Partikel aus Wasser ermöglichen. Ein solches System ist unter anderem für die Anwendung in Bioreaktoren interessant.

### 3.2.2 Konzept

Die Herstellung wasserstabiler PMMA-PVA-Partikel mit lebenden immobilisierten *M. luteus* soll ausgehend von den bakterienhaltigen PVA-Partikeln durchgeführt werden. Die peripheren Alkoholgruppen der Partikel sollen in nicht-quellendem Lösungsmitteln bei 20 °C mit dem Säurebromid des 2-Brom-2-methylpropionbromid (2-BMPiB) umgesetzt werden (2). Die erfolgreiche Reaktion und der zeitabhängige Umsatz werden mittels ATR/IR-Spektroskopie analysiert. Das Überleben der Bakterien wird durch die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen, zusätzlich wird die Zeitspanne zwischen der Inokulation und dem Wachstum von Kolonien ermittelt. Im Falle der Ausrüstung der Partikeloberfläche mit dem ATRP-Initiator sollte sich keine Retention der Freisetzung der Bakterien einstellen, da die Quelleigenschaften der Partikel nicht geändert werden.

Der Aufbau der hydrophoben PMMA-Hülle soll über eine oberflächeninitiierte kontrollierte, radikalische ATRP erfolgen (3). Es wird erwartet, dass die Menge an aufgepfropftem Polymer insbesondere von der Anfangsmenge an Initiator abhängt. Die Anwesenheit und das Überleben der immobilisierten Bakterien werden sowohl über die Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten, als auch durch die Inkubation und Inokulation von nährstoffhaltiger Lösung nachgewiesen. Es wird erwartet, dass die Retention der Freisetzung der Bakterien direkt von der Menge an aufgepfropften PMMA abhängig sein wird.

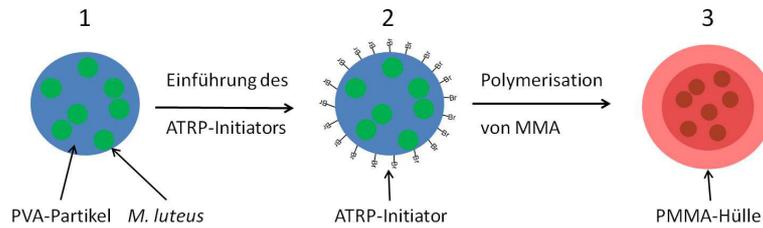
Die Polymerisation von PMMA wird zum einen durch ATR/IR-Spektren und zum anderen durch TGA verfolgt. Der thermische Abbau von PMMA, welches über ATRP polymerisiert wurde, zeigt einen charakteristischen „*unzipping*“ Mechanismus. Die Abbaustufe dieses Mechanismus sollte daher in den Thermogrammen der PMMA-PVA-Partikeln zu beobachten sein. Der Nachweis der Kern-Hülle-Architektur der Komposit-Partikel wird über zwei Verfahren durchgeführt. Das erste Verfahren basiert auf der Synthese eines fluoreszenzaktiven Copolymers aus MMA und Fluorescein O-methacrylat (FMA). Es wird erwartet, dass das Copolymer ausschließlich an der Oberfläche des Partikels lokalisiert sein wird und dies wird über den Einsatz eines konfokalen Lasermikroskops (KLSM) detektiert. Weiterhin soll mit Hilfe dieser Analyse die Schichtdicke in Abhängigkeit der Polymerisationsdauer bestimmt werden.

Die PMMA-Hülle soll im zweiten Verfahren mit Kupfer angereichert werden und die PMMA-PVA-Partikel werden mittels TEM-Aufnahmen analysiert. Es wird erwartet, dass in den Mikrotomschnitten der Partikel das Kupfer ausschließlich in der Hülle und nicht im Kern lokalisiert sein wird. Die Aufnahmen sollen weiterhin für die Ermittlung der Schichtdicke des Partikels verwendet werden und der erhaltene Wert wird mit der Schichtdicke, welche mit Hilfe des KLSM bestimmt wurde, verglichen.

Das geänderte Freisetzungsverhalten von immobilisierten Materialien aus PMMA-PVA-Partikeln im Vergleich mit dem Verhalten der PVA-Partikel wird analysiert. Die Freisetzung von verkapseltem Fluorescein bei Kontakt mit Wasser wird durch UV/VIS-Spektroskopie detektiert und quantifiziert. Das Verhalten des Hydrogels sollte abhängig von der Temperatur und dem umgebenden pH-Wert sein, aus diesen Gründen wird die Analyse bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten durchgeführt. Die Freisetzung des Farbstoffes aus PMMA-PVA-Partikeln sollte im Gegensatz zu den PVA-Partikeln stark vermindert sein, da die PMMA-Hülle die Quellung unterdrücken sollte.

Die Kern-Hülle-Partikel werden zusätzlich auf ihre Wasserstabilität untersucht, indem diese mit Wasser versetzt und mit Ultraschall behandelt werden. Die Formulierung wird im Anschluss schockgefroren, geschnitten und mittels Cryo-REM analysiert. Die sphärische Gestalt der PMMA-PVA-Partikel sollte aufgrund der hydrophoben Hülle konserviert bleiben und daher sollten individuelle Partikel zu beobachten sein. Im Gegensatz dazu, sollten die reinen PVA-Partikel bei Kontakt mit Wasser ihre sphärische Form verlieren und es sollten keine individuellen, defektfreien Partikel mehr zu erkennen sein.

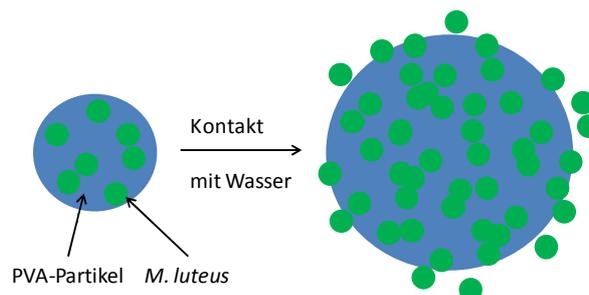
Das nachfolgende Schema verdeutlicht das Konzept und den Aufbau der Partikel. (Schema 3.2-1)



**Schema 3.2-1 Konzept der Herstellung der PMMA-PVA-Kern-Hülle-Partikel.**

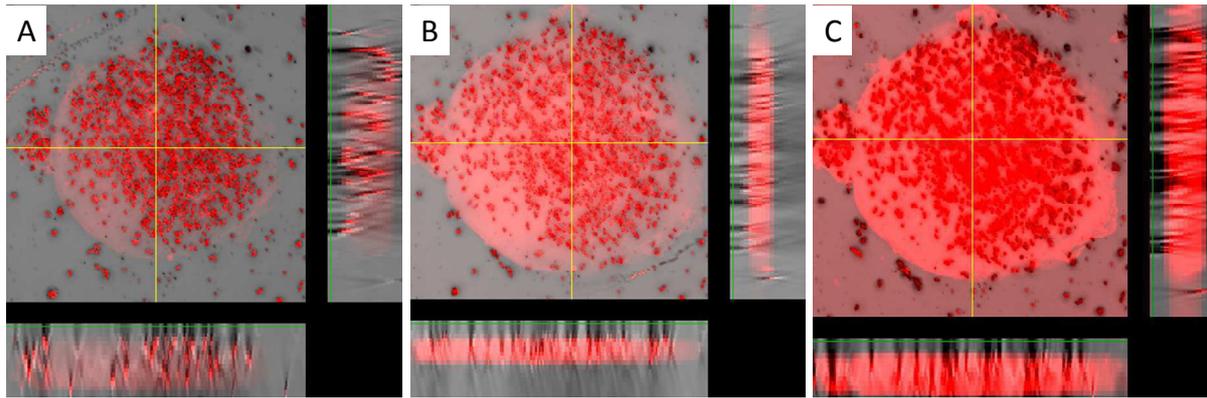
### 3.2.3 Freisetzung der immobilisierten Bakterien nach Kontakt mit Wasser

Im folgenden Abschnitt soll die Freisetzung der in PVA-Partikeln immobilisierten Bakterien mittels KLSM untersucht werden. Die *M. luteus* wurden mit Hilfe des LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight Kits angefärbt. Die gefärbten Bakterien werden im Fall einer intakten Membran als grüne, und bei einer beschädigten Membran als rote Objekte im Inneren des Partikels vorliegen. Durch Zugabe von Wasser sollte der Partikel quellen und die Bakterien, welche zuerst im Inneren des Partikels lokalisiert sind, sollten mit fortschreitender Versuchsdauer in die umgebende Lösung migrieren. Die nachfolgende Abbildung stellt die Quellung des PVA-Partikels und die Freisetzung der Bakterien schematisch dar. (Abbildung 3.2-1)



**Abbildung 3.2-1 Schematische Darstellung der Quellung eines bakterienhaltigen PVA-Partikels nach der Zugabe von Wasser, weiterhin ist die Freisetzung der Bakterien dargestellt.**

Im Folgenden ist ein einzelner bakterienhaltiger PVA-Partikel nach Anfärben der immobilisierten *M. luteus* dargestellt. Der Partikel wurde mit Wasser versetzt und nach 20, 40 und 80 Minuten untersucht.



**Abbildung 3.2-2** KLSM-Aufnahme eines bakterienhaltigen PVA-Partikels nach Anfärben der *M. luteus* nach der Wasserzugabe, 20 Minuten, (A). Der Partikel nach 40 Minuten nach der Zugabe (B) und nach 80 Minuten (C).

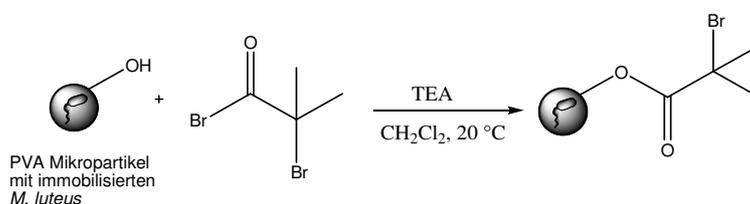
Die Bakterien waren nach weniger als 20 Minuten nach der Wasserzugabe in dem Partikel immobilisiert. Nach weiteren 20 Minuten waren die klaren Grenzflächen des Partikels und der umgebenden Lösung nicht mehr eindeutig zu beobachten. Die Bakterien waren zunehmend im Partikel verteilt und befanden sich zum Teil direkt an der Grenzfläche bzw. außerhalb des Partikels. Die Aufnahme nach einer Kontaktzeit mit Wasser von 80 Minuten zeigte deutlich die Quellung des Partikels. Die Bakterien waren, im Vergleich mit der Aufnahme nach 40 Minuten, noch stärker verteilt und befanden sich zunehmend außerhalb des Partikels.

Das Anfärben der Bakterien mit der genannten Farbstoffkombination sollte, im Fall lebender Bakterien, zu einer Grünfärbung führen. Da die vorliegenden Bakterien lebten und auch nach Inkubation nährstoffhaltiger Medien Wachstum zeigten, war die Rotfärbung auf die Beschädigung ihrer Membran und nicht auf ihr Absterben zurückzuführen.<sup>[159]</sup>

Es lässt sich zusammenfassen, dass die unkontrollierte Freisetzung der Bakterien nach Kontakt mit Wasser nachgewiesen werden konnte. Die KLSM-Aufnahmen der in PVA-Partikeln immobilisierten und gefärbten *M. luteus* zeigten deutlich deren Migration mit fortschreitender Versuchsdauer in die umgebende Lösung. Weiterhin konnte die Quellung des Partikels beobachtet werden. Die Rotfärbung der lebenden Bakterien wurde durch die Beschädigung der Membran, vermutlich durch den Immobilisierungsprozess, verursacht.

### 3.2.4 Ausrüsten der Partikeloberfläche mit 2-Brom-2-methylpropionbromid

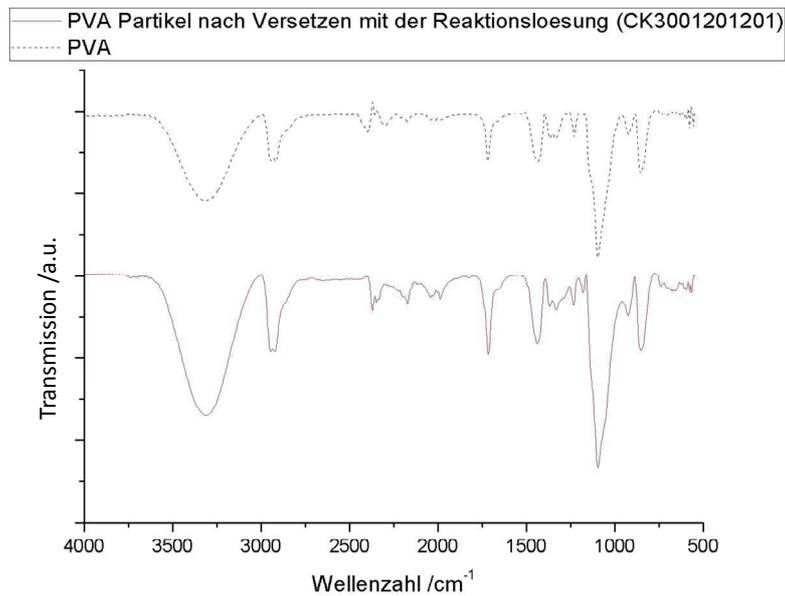
Die unkontrollierte Freisetzung der immobilisierten Bakterien aus PVA-Mikropartikeln, wie in dem vorherigen Abschnitt aufgeführt, war auf die Quellung des Hydrogels durch die Aufnahme von Wasser zurückzuführen. In Abschnitt 3.1 wurde die Möglichkeit der chemischen Modifizierung der Oberfläche des Partikels demonstriert. Die immobilisierten Bakterien überlebten diesen Prozess unter bestimmten Umständen, welche in dem angesprochenen Abschnitt zusätzlich aufgeführt wurden. Aufbauend auf den in diesem Abschnitt gewonnen Erkenntnissen, sollen die Partikel in dem folgenden Abschnitt mit einem ATRP-Initiator, 2-BMPiB, modifiziert werden. Die peripheren Alkoholgruppen sollen mit dem Säurebromid des Initiators umgesetzt werden und die immobilisierten Bakterien sollten die Modifikation überleben. Die kovalente Anbindung des Initiators wird durch ATR/IR-Spektroskopie analysiert und die Gestalt und Struktur der Partikel wird mittels REM-Aufnahmen charakterisiert. Das Überleben der Bakterien in den Partikeln, im Anschluss an die Umsetzung, wird überprüft, indem nährstoffhaltiges Medium mit den modifizierten Partikeln inokuliert wird. Das Medium wird nachfolgend bei 37 °C inkubiert und das Wachstum von gelben, charakteristischen Kolonien sollte die Anwesenheit von lebenden Bakterien in den Partikeln beweisen. (Schema 3.2-2)



**Schema 3.2-2 Umsetzung der bakterienhaltigen PVA-Partikel mit 2-BMPiB.**

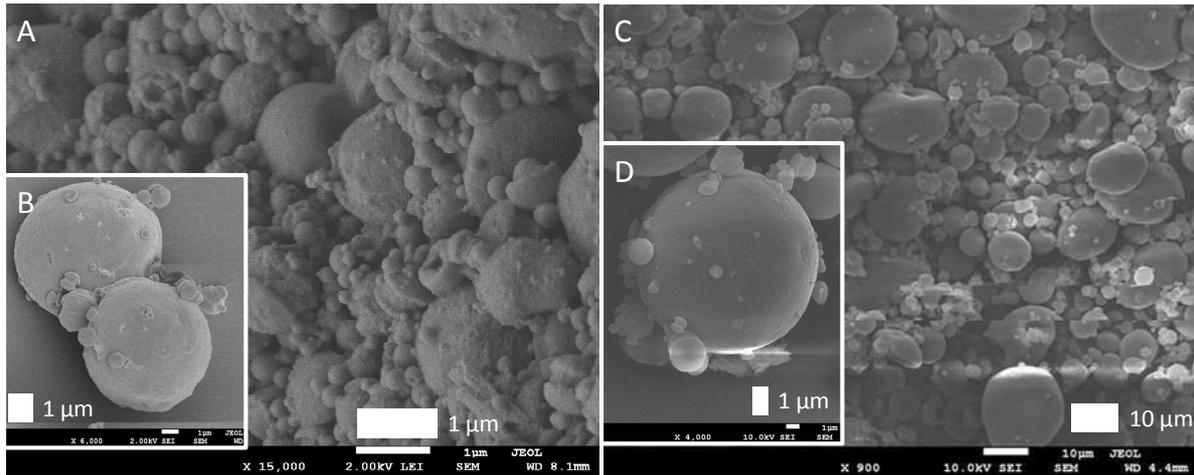
Die PVA-Mikropartikel mit immobilisierten *M. luteus* wurden zu Anfang auf ihre Schutzwirkung gegenüber der Reaktionslösung kontrolliert. Hierfür wurde die Lösung mit den lebenden Kompositen versetzt und im Anschluss daran wurden die Partikel mit Bakterien für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Wachstumszeit, diese war die Zeitspanne zwischen der Inokulation der Agarplatte und dem Wachstum von Kolonien, wurde bestimmt und diente für den nachfolgenden Verlauf als Referenz. Es wurde erwartet, dass die Partikel die Bakterien gegenüber den Reaktanten abschirmen, vgl. Abschnitt 3.1.3, und sich die Wachstumszeit nicht verändert.

Die PVA-Mikropartikel mit immobilisierten Bakterien wurden drei Stunden bei Raumtemperatur in einer Dichlormethan-Lösung (DCM) ohne Initiator gerührt und nachfolgend analysiert. Das folgende ATR/IR-Spektrum zeigt das Spektrum der unbehandelten und behandelten PVA-Mikropartikel. (Abbildung 3.2-3)



**Abbildung 3.2-3 ATR/IR-Spektrum von PVA-Partikeln vor und nach dem Versetzen mit einer nicht reaktiven Reaktionslösung (CK3001201201).**

Das Spektrum der behandelten Partikel unterschied sich nicht von denen der unbehandelten Partikel. Im Falle einer kovalenten Anbindung des Initiators wurde eine zusätzliche Bande bei einer Wellenzahl von 1739 cm<sup>-1</sup> erwartet.<sup>[133]</sup> Die nachfolgende REM-Aufnahme zeigt die behandelten und unbehandelten Partikel. (Abbildung 3.2-4)



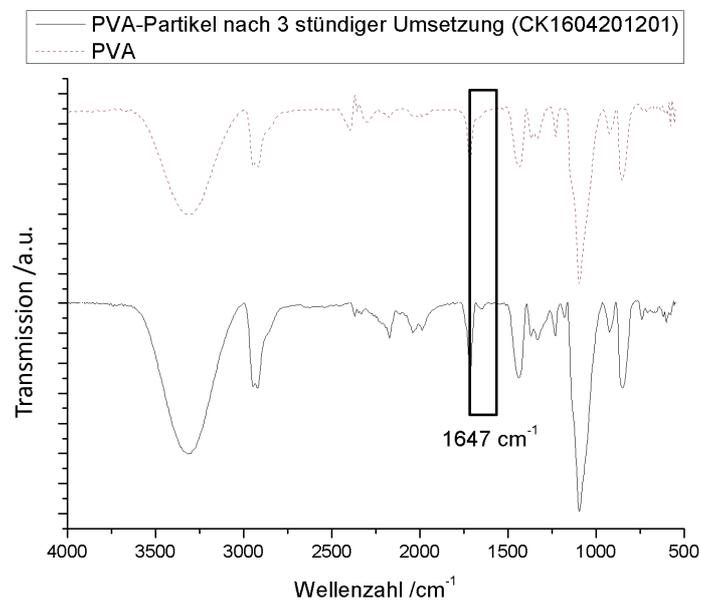
**Abbildung 3.2-4 REM Übersichtsaufnahme sphärischer bakterienhaltiger PVA-Partikel vor der Versetzung mit der Lösung (A). In der Vergrößerung war die glatte Oberfläche und die sphärische Gestalt der Partikel deutlich zu beobachten (B). Die Übersichtsaufnahme zeigt die Gestalt der bakterienhaltigen PVA-Partikel im Anschluss an die Umsetzung mit der Lösung (C). Die Nahaufnahme eines PVA-Partikels im Anschluss an die Umsetzung zeigt, dass die Partikel unzerstört und nicht gequollen vorlagen und ihre sphärische Gestalt konserviert wurde (D).**

Die behandelten Partikel besaßen eine sphärische Gestalt und lagen nicht gequollenen vor, dies war ein starker Hinweis auf die erfolgreiche Abschirmung der immobilisierten Bakterien gegenüber den Reaktanten. Die Morphologie der Partikeloberfläche lag unverändert vor und war defektfrei. Das Überleben der immobilisierten Bakterien wurde verifiziert, indem die Partikel für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet wurden. Die Platten wurden nachfolgend für 48 Stunden inkubiert. Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* wurde auf den Platten beobachtet, das PVA hatte folgedessen die Bakterien erfolgreich gegenüber der Lösung abgeschirmt. (Abbildung 3.2-5)



**Abbildung 3.2-5** Wachstum von lebenden, immobilisierten *M. luteus* auf einer nährstoffhaltigen Agarplatte nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C.

Die PVA-Partikel wurden nachfolgend mit einer Initiator-Lösung für drei Stunden versetzt und im Anschluss daran mittels ATR/IR-Spektroskopie charakterisiert. Im Falle einer erfolgreichen Reaktion sollte sich das Spektrum von dem des reinen PVAs unterscheiden. (Abbildung 3.2-6)



**Abbildung 3.2-6** ATR/IR-Spektrum von bakterienhaltigen PVA-Partikeln nach einer 3 stündigen Umsetzung (CK1604201201).

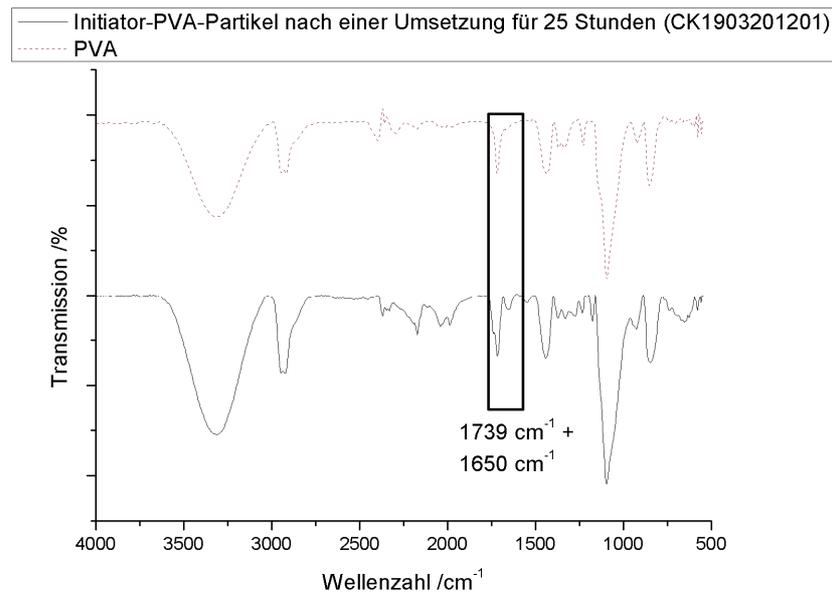
Das ATR/IR-Spektrum der modifizierten Partikel beinhaltet eine zusätzliche Bande bei einer Wellenzahl von  $1647\text{ cm}^{-1}$ , diese war auf die Carbonylgruppe des 2-BMPiB zurückzuführen. Im Anschluss an die Umsetzung wurden die umgesetzten PVA-Mikropartikel mit

immobilisierten *M. luteus* für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Agarplatten wurden bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden charakteristische, gelbe Kolonien von *M. luteus* auf den Agarplatten beobachtet. (Abbildung 3.2-7) Die immobilisierten Bakterien überlebten die Reaktion und im Vergleich mit der Freisetzung der Bakterien aus PVA-Partikeln, ergab sich keine Retention der Freisetzung.



**Abbildung 3.2-7 Wachstum von Kolonien von immobilisierten *M. luteus* in Initiator-PVA-Partikeln. Die Reaktion wurde nach drei Stunden abgebrochen und die bakterienhaltigen Komposite wurden für die Inokulation und Inkubation einer nährstoffhaltigen Agarplatte verwendet (CK1604201201).**

Die Reaktionszeit der Partikel mit dem Initiator wurde aufgrund der geringen Intensität des Signals bei  $1647\text{ cm}^{-1}$  auf 25 Stunden erhöht. Es wird erwartet, dass eine vergrößerte Reaktionsdauer einen erhöhten Umsatz zur Folge hat. Im Folgenden, ist das erhaltene ATR/IR-Spektrum der umgesetzten Partikel aufgeführt.

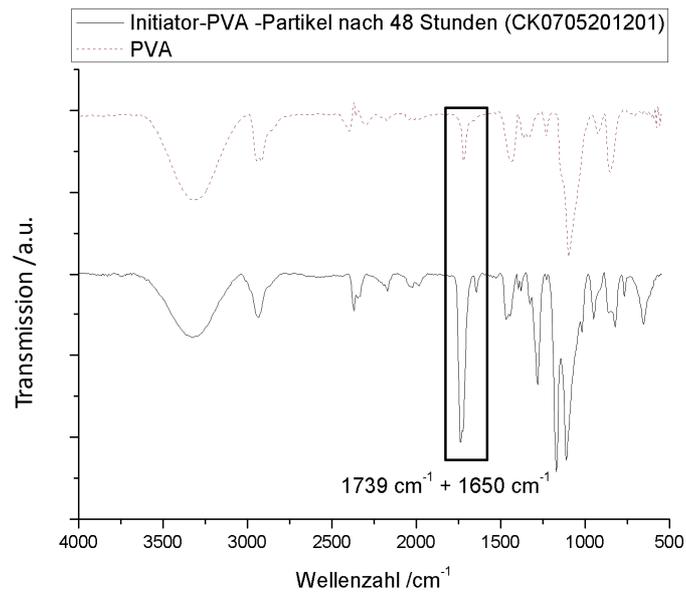


**Abbildung 3.2-8 ATR/IR-Spektrum von Initiator-PVA-Partikeln nach einer Umsetzung für 25 Stunden (CK1903201201).**

Die Erhöhung der Reaktionszeit auf 25 Stunden führte zu der Ausbildung einer Schulter bei einer Wellenzahl von  $1739\text{ cm}^{-1}$ , zudem konnte eine deutliche Steigerung der Intensität des Signals bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden. Die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten ergab ein Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei einer Temperatur von  $37\text{ °C}$ .

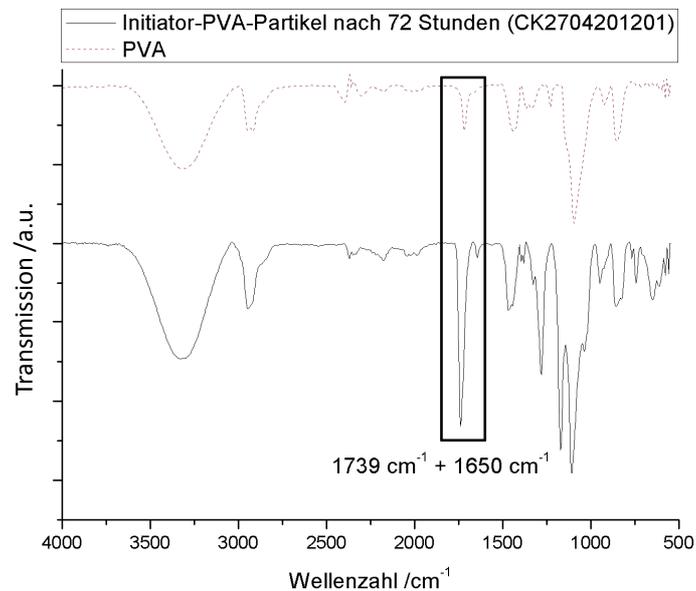
Eine Erhöhung der Reaktionsdauer hatte, wie gezeigt, einen erhöhten Umsatz zur Folge. Die Reaktionszeit wurde nachfolgend aufgrund der deutlichen Zunahme der Intensität für die Signale der Carbonylgruppe auf 48 Stunden, respektive auf 72 Stunden, erhöht. Es wird erwartet, dass sich der Umsatz durch die Maßnahme weiter steigern lässt.

Im Folgenden ist das ATR/IR-Spektrum der Initiator-PVA-Partikel nach einer 48 stündigen Umsetzung gezeigt. (Abbildung 3.2-9)



**Abbildung 3.2-9 ATR/IR-Spektrum von Initiator-PVA-Partikeln nach einer Umsetzung von 45 Stunden (CK0705201202).**

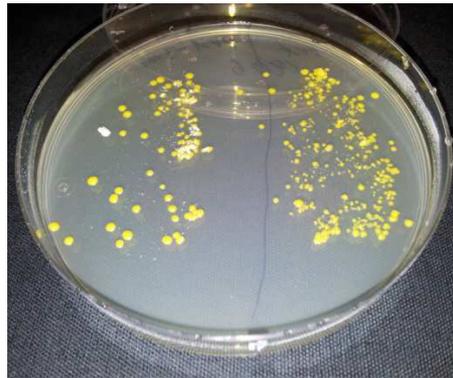
Die Spektren der PVA-Partikel nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden zeigten eine sehr starke Carbonylbande bei  $1739\text{ cm}^{-1}$  und eine weitere Bande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Zusätzlich wurden die modifizierten Partikel nach einer Reaktionszeit von 72 Stunden analysiert. (Abbildung 3.2-10)



**Abbildung 3.2-10 ATR/IR-Spektrum der Initiator-PVA-Partikel nach einer Umsetzung von 72 Stunden (CK2704201201).**

Die Carbonylbande des 2-BMPiB bei einer Wellenzahl von  $1739\text{ cm}^{-1}$  war deutlich zu erkennen, die kovalente Anbindung des Initiators an die Partikeloberfläche wurde erfolgreich durchgeführt.

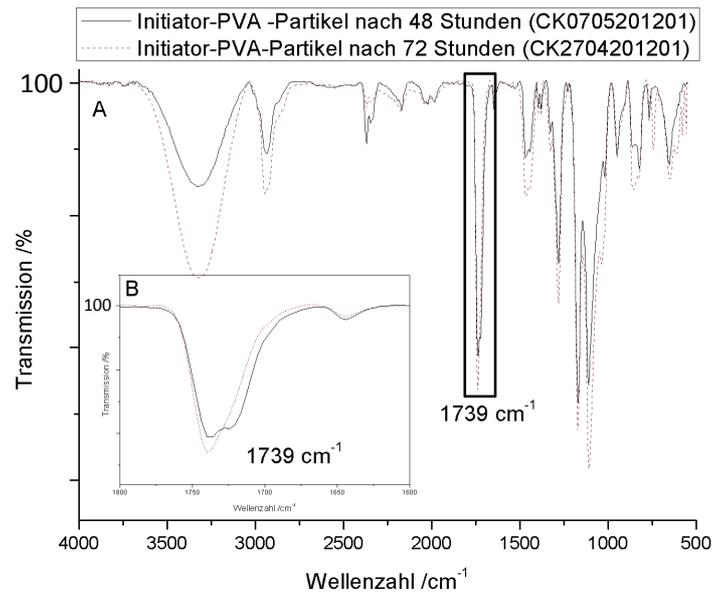
Der Nachweis der immobilisierten, lebenden Bakterien in den Initiator-PVA-Partikeln wurde sowohl nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden, als auch von 72 Stunden, erfolgreich durchgeführt. In der folgenden Abbildung ist das Wachstum der Kolonien von *M. luteus* gezeigt. (Abbildung 3.2-11)



**Abbildung 3.2-11 Wachstum von lebenden immobilisierten *M. luteus* in Initiator-PVA-Partikeln. Die Kolonien auf der linken Seite stammten von Partikeln die 48 Stunden und die Kolonien auf der rechten Seiten waren von bakterienhaltigen Partikel die 72 Stunden umgesetzt wurden (CK0705201201 (links) und CK2704201201 (rechts)).**

Das Wachstum der Kolonien wurde für beide Reaktionszeiten nach 48 Stunden beobachtet. Im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln zeigte sich, dass die Wachstumsdauer der Bakterien durch die kovalente Anbindung des Initiators nicht beeinflusst wurde.

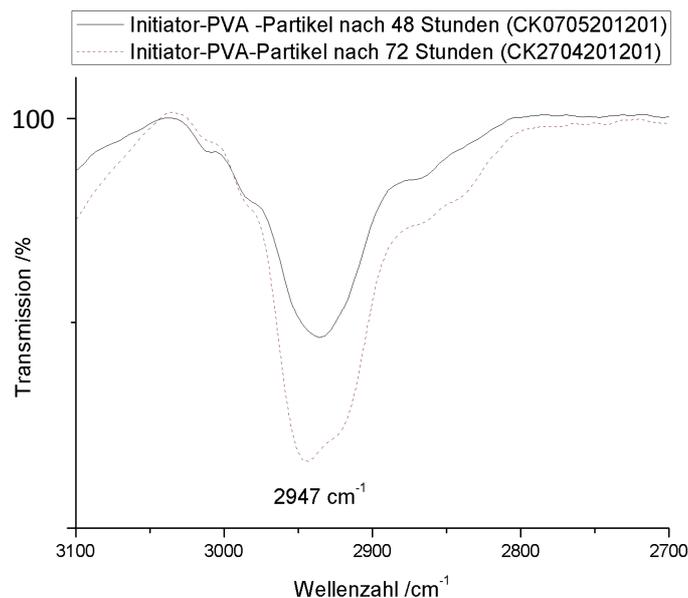
Die ATR/IR-Spektren der Initiator-Partikel nach 48 und 72 Stunden wurden nachfolgend im Hinblick auf ihre Intensität verglichen. (Abbildung 3.2-12)



**Abbildung 3.2-12 Überlagerung der ATR/IR-Spektren der Initiator-PVA-Partikel nach 48 und 72 Stunden (A). Vergrößerung des Ausschnitts der Überlagerung im Bereich der Carbonyl-Schwingung (B).**

Die Überlagerung der Spektren der modifizierten Partikel nach einer Reaktionszeit von 48 und 72 Stunden zeigte, dass die Intensitäten der Transmission in einem Wellenzahlenbereich von 1650 und 1750  $\text{cm}^{-1}$  vergleichbar waren.

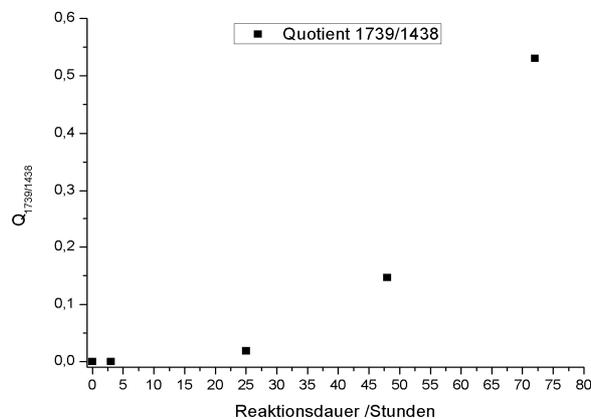
Der Vergleich der Intensitäten in einem Wellenzahlenbereich von 2800 bis 3000  $\text{cm}^{-1}$  ist nachfolgend aufgeführt. (Abbildung 3.2-13)



**Abbildung 3.2-13 Ausschnitt der Überlagerung der ATR/IR-Spektren der Initiator-PVA-Partikel nach 48 und 72 stündiger Umsetzung.**

Die beiden Banden des PVA bei  $2943\text{ cm}^{-1}$  und bei  $2920\text{ cm}^{-1}$  wurden durch C-H-Streckschwingungen verursacht. Die ATR/IR-Spektren der Initiator-PVA-Partikel besaßen eine charakteristische Bande bei einer Wellenzahl von  $2947\text{ cm}^{-1}$ , diese war auf die C-H-Streckschwingung des Initiators zurückzuführen. Der Vergleich der ATR/IR-Spektren ergab, dass die Intensitäten der Banden der Initiator-C-H-Streckschwingungen sich nur minimal unterschieden. Im Hinblick auf die immobilisierten Bakterien und deren Viabilität empfiehlt es sich, die Reaktion nach einer Dauer von 48 Stunden abzubrechen.

Der folgende Abschnitt beschreibt die Zunahme der Intensität der Carbonyl-Bande des Initiators für verschiedene Reaktionszeiten. Hierfür wurde der Quotient<sub>1739/1438</sub> ( $Q_{1739/1438}$ ) der Integrale der Wellenzahl  $1739\text{ cm}^{-1}$  und  $1438\text{ cm}^{-1}$  berücksichtigt. Die Bande bei  $1739\text{ cm}^{-1}$  war direkt von dem Umsatz des Initiators abhängig, das Integral der Bande bei  $1438\text{ cm}^{-1}$ , die Deformationsschwingung der  $\text{CH}_2$ -Gruppe zeigte keine Abhängigkeit von der Reaktion. In der folgenden Abbildung wurde  $Q_{1739/1438}$  gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Eine Zunahme der Intensität der Carbonyl-Bande des Initiators bei einer steigenden Reaktionsdauer war deutlich zu beobachten. (Abbildung 3.2-14)

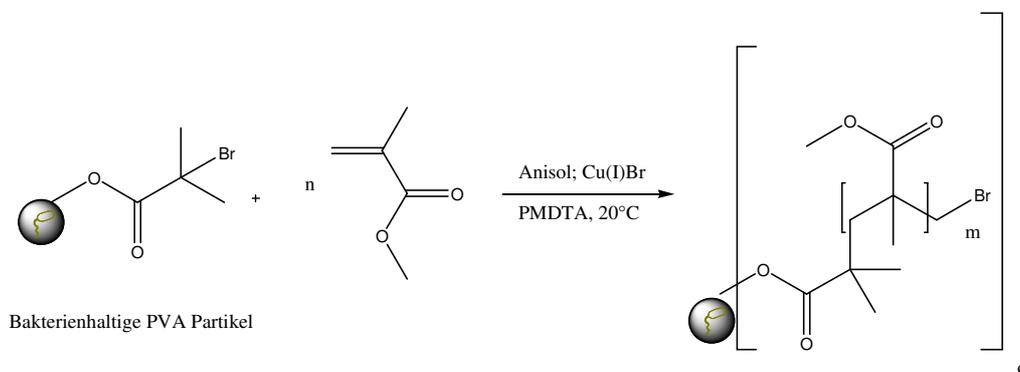


**Abbildung 3.2-14** Quotient der Integrale bei einer Wellenzahl von  $1739$  und  $1438\text{ cm}^{-1}$ .

Es lässt sich zusammenfassen, dass die immobilisierten Bakterien die Umsetzung mit dem Initiator überlebten. Weiterhin wurde eine Zeitabhängigkeit der Reaktion zwischen dem Initiator und den PVA-Partikel nachgewiesen.

### 3.2.5 Kontrollierte Radikalische Polymerisation von PMMA und Retention der Freisetzung der immobilisierten *M. luteus*

In Abschnitt 3.2.4 wurden die PVA-Mikropartikel mit immobilisierten Bakterien durch die kovalente Anbindung eines ATRP-Initiators modifiziert. Die immobilisierten *M. luteus* überlebten diese Umsetzung und es wurden Kolonien nach Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten mit den Partikeln erhalten. Die Zeit zwischen der Inokulation und dem Wachstum der Kolonien war im Vergleich mit den unbehandelten Partikeln unverändert und betrug 48 Stunden. Die unkontrollierte Freisetzung der Bakterien nach Kontakt mit einem wässrigen Medium beruht auf der Quellung des Partikels. Aus diesem Grund soll in dem folgenden Abschnitt das Quellungsverhalten bei Kontakt mit Wasser modifiziert werden. Die in Abschnitt 3.2.4 aufgeführten Partikel sollen nachfolgend als Makroinitiatoren einer kontrollierten radikalischen Polymerisation verwendet werden. Die auf der Oberfläche des Partikels angebondenen Initiatoren sollten die Polymerisation von MMA initiieren und es sollte sich daher eine PMMA-Hülle bilden. Die hydrophobe PMMA-Hülle sollte den Kontakt des PVA mit Wasser verhindern. Die Quellung des Partikels sollte daher gehemmt werden und die Freisetzung der Bakterien sollte unterdrückt werden. (Schema 3.2-3)

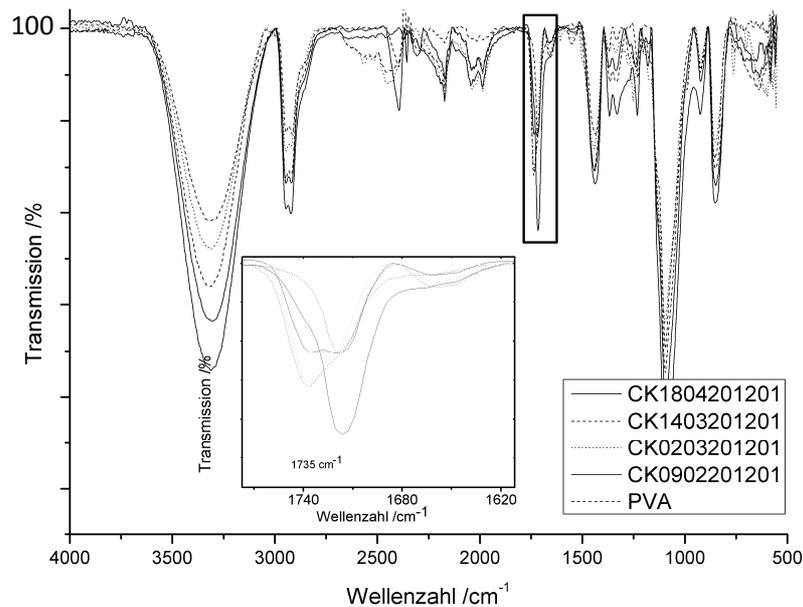


Schema 3.2-3 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel zu Kern-Hülle-Partikel.

Die Menge an aufgetragenen PMMA soll in dem folgenden Abschnitt variiert werden. Die in Abschnitt 3.2.4 vorgestellten Initiator-PVA-Mikropartikel mit unterschiedlichem Anteil an Initiator sollen verwendet werden. Die Menge an PMMA sollte direkt mit der Menge an Initiator korreliert sein, weiterhin wurde die Dauer der Polymerisation variiert. Die Menge an aufgetragenen PMMA wird über ATR/IR-Spektroskopie ermittelt. Die Gestalt und die Oberflächenmorphologie der Kompositpartikel werden mittels REM-Aufnahmen analysiert. Es wird erwartet, dass die sphärische Form der Mikropartikel erhalten bleibt, da in der

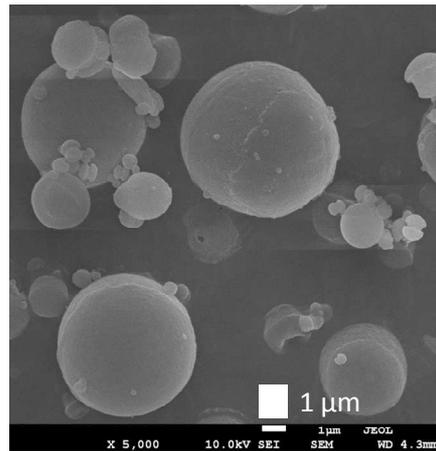
Reaktionslösung keine quellenden Lösungsmittel verwendet werden. Die immobilisierten *M. luteus* sollten die Polymerisation überleben da erwartet wird, dass die Reaktion ausschließlich an der Oberfläche der Partikel stattfindet. Der Nachweis von immobilisierten, lebenden Bakterien wird durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Medien durchgeführt. Im Falle von flüssigem Medium wird die überstehende Lösung für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Platten werden inkubiert und das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* sollte anzeigen, dass die immobilisierten Bakterien die Polymerisation überlebt haben.

Es wurden Initiator-PVA-Partikel aus Abschnitt 3.2.4 verwendet, welche ein  $Q_{1739/1438}$  von  $2,8 \cdot 10^{-9}$  besaßen. Diese lebenden Komposite wurden für 19, 45, 120 respektive 167 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus Cu(I)Br, PMDETA, MMA in Anisol behandelt. Die nachfolgende Abbildung 3.2-15 fasst die erhaltenen ATR/IR-Spektren der PVA-Mikropartikel zusammen.



**Abbildung 3.2-15 Überlagerung der ATR/IR-Spektren nach einer Umsetzung der Makroinitiator-Partikel mit einem Quotienten von  $2,8 \cdot 10^{-09}$ .**

In den hier aufgeführten Spektren war keine signifikante Bande bei einer Wellenzahl von  $1732 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Es wurde folglich keine Polymerisation von MMA ausgehend von der Oberfläche der Partikel initiiert. Die Partikel wurden nachfolgend mittels REM analysiert, die sphärische Gestalt blieb auch nach einer Reaktionsdauer von bis zu 167 Stunden erhalten und die Partikel zeigten keine Deformationen. (Abbildung 3.2-16)

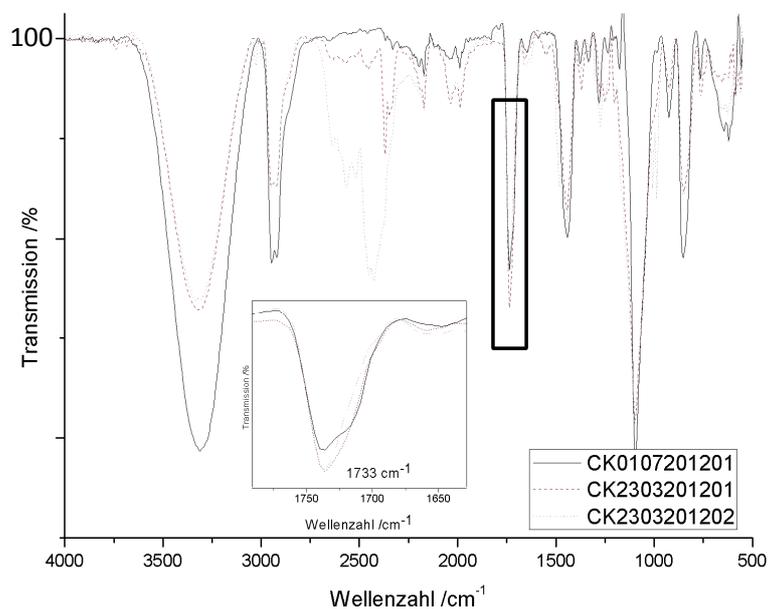


**Abbildung 3.2-16 REM Aufnahme der PVA-Partikel ohne PMMA Hülle.**

Die intakten Partikel dienten als Nachweis, dass die Initiator-PVA-Partikel nicht in der Reaktionslösung quollen. Die Methode war daher für die oberflächeninitiierte Polymerisation geeignet. Da weiterhin keine Lösungs-Polymerisation von MMA beobachtet wurde, war davon auszugehen, dass die Initiator-PVA-Partikel nicht mit freiem Initiator verunreinigt waren.

Im Anschluss an die Behandlung wurden die Partikel mit immobilisierten Bakterien für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Platten wurden bei 37 °C für bis zu 72 Stunden inkubiert und auf das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* untersucht. Im Falle einer Reaktionszeit von 19 Stunden wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden Kolonien der Bakterien beobachtet. Bei einer Reaktionszeit von 45, 120 und 167 Stunden wurde nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden das Wachstum von *M. luteus* beobachtet. In allen Experimenten wurde das Wachstum von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen. Die immobilisierten Bakterien überlebten eine Reaktionszeit von mindestens 167 Stunden bei Raumtemperatur unter Nahrungsausschluss. Die größere Zeitspanne zwischen der Inokulation und dem Wachstum von Kolonien auf Agarplatten im Falle einer Reaktionszeit von 19 Stunden, war vermutlich auf das erhöhte Alter der verwendeten Komposite zurückzuführen. Diese Vermutung wurde unterstützt durch die Wachstumszeit im Falle einer Reaktionszeit von 167 Stunden. diese lag im Bereich der unbehandelten Partikeln. Es lässt sich daher zusammenfassen, dass eine Behandlung von 167 Stunden, ohne die Polymerisation von PMMA, keinen Effekt auf die Freisetzungsgeschwindigkeit der Bakterien auf Agarplatten hatte.

Nachfolgend wurden die in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Initiator-PVA-Partikel nach einer Reaktionszeit von drei Stunden und einem  $Q_{1739/1438}$  von 0,018 für die Polymerisation von MMA verwendet. Die Partikel wurden analog zu den vorherbeschriebenen Bedingungen für 45 Stunden respektive für 168 Stunden behandelt. Im Anschluss an die Umsetzung wurden die lebenden Komposite mittels ATR/IR-Spektroskopie auf die Polymerisation von PMMA untersucht. In allen Proben wurde die, für die Streckschwingung von PMMA charakteristische C=O-Bande bei einer Wellenzahl von  $1733\text{ cm}^{-1}$  erhalten. Im Falle einer Reaktionszeit von 45 Stunden war die Intensität der Schwingungsbande ähnlich der Intensität nach einer Reaktionszeit von 167 Stunden. (Abbildung 3.2-17)



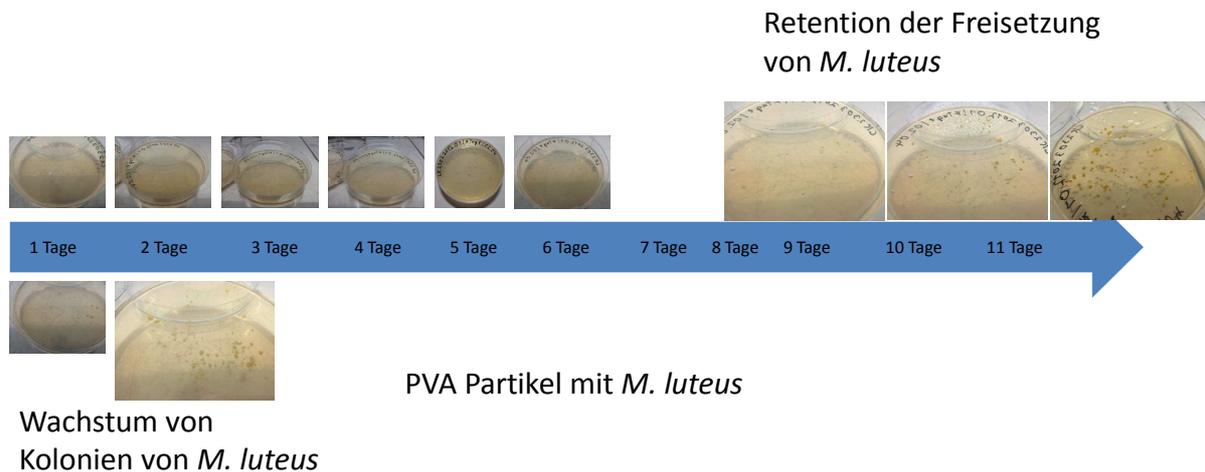
**Abbildung 3.2-17 Überlagerung der ATR/IR-Spektren nach einer Umsetzung der Makroinitiator-Partikel mit einem Quotienten von 0,018.**

Im Anschluss an die Umsetzung wurden die bakterienhaltigen PMMA-PVA-Mikropartikel für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Im Falle der PMMA-PVA-Partikel wurde nach einer Polymerisationszeit von 45 Stunden das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach 120 Stunden, 5 Tagen, beobachtet. Nach einer Reaktionszeit von 167 Stunden wurden nach einer Inokulationsdauer von 192 bzw. 216 Stunden, 8 bzw. 9 Tagen Kolonien von *M. luteus* auf den nährstoffhaltigen Agarplatten beobachtet. (Abbildung 3.2-18)



**Abbildung 3.2-18** Das Wachstum von Kolonien von lebenden *M. luteus* war zu beobachten. Die bakterienhaltigen PMMA-PVA-Partikel zeigten nach einer Inkubationsdauer von 8 Tagen das Wachstum von Kolonien.

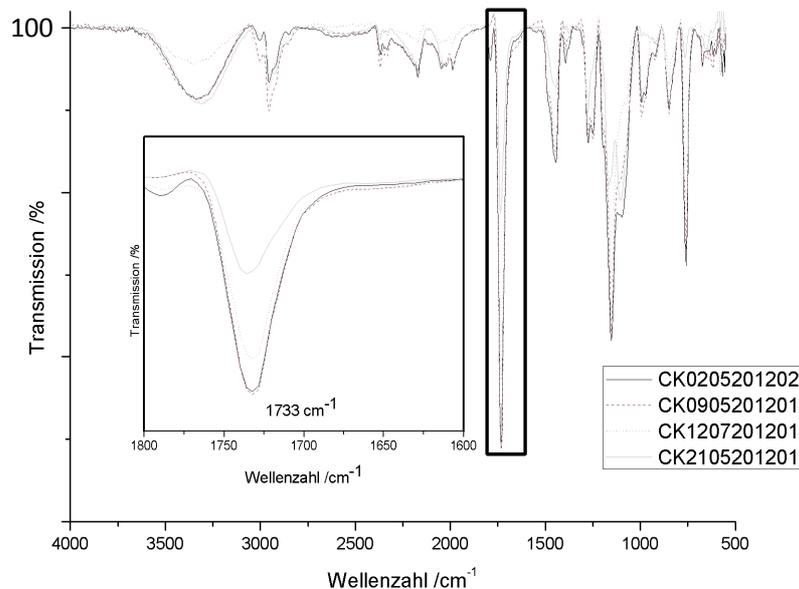
Die nachfolgenden Aufnahmen zeigen die mit den PMMA-PVA-Mikropartikeln inokulierten nährstoffhaltigen Agarplatten in einem Zeitraum von 0 bis 11 Tagen. Im Gegensatz zu der retardierten Freisetzung der Bakterien aus PMMA-PVA-Partikel wurden im Fall von bakterienhaltigen PVA-Mikropartikeln nach einer Inkubationsdauer von zwei Tagen Kolonien beobachtet. Die Probe der PMMA-PVA-Mikropartikeln mit immobilisierten Bakterien zeigte nach einer Inkubationsdauer von 9 Tagen bei einem Teil der Partikel die Bildung von Kolonien. Im weiteren Verlauf der Inokulation bildeten die übrigen Partikel auch Kolonien von *M. luteus* aus. (Abbildung 3.2-19)



**Abbildung 3.2-19** Vergleich der Freisetzung von Bakterien aus PVA- und PMMA-PVA-Partikeln auf nährstoffhaltigen Agarplatten. Die den PMMA-PVA-Partikeln zugrunde liegenden Initiator-PVA-Partikeln besaßen einen  $Q_{1739/1438}$  von 0,018.

Die Initiator-PVA-Partikel nach einer Reaktionszeit von 47 Stunden.  $Q_{1739/1438} = 0,15$ , und nach 72 Stunden,  $Q_{1739/1438} = 0,53$  wurden für die „grafting from“ Polymerisation von MMA

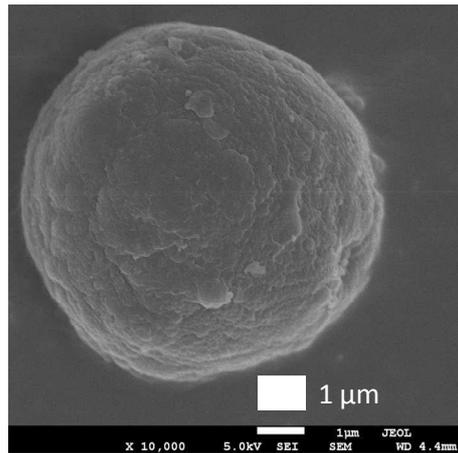
verwendet. Die Polymerisationen wurden für zwei Stunden, drei Stunden bzw. für 45 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Komposite wurden anschließend mittels ATR/IR-Spektroskopie analysiert. Die Überlagerung der IR-Spektren der Mikropartikel ergab deutlich eine Bande bei einer Wellenzahl von  $1733\text{ cm}^{-1}$ , diese wurde durch die Streckschwingung der C=O-Gruppe des PMMA verursacht. (Abbildung 3.2-20)



**Abbildung 3.2-20 Überlagerung der ATR/IR-Spektren nach einer Umsetzung der Makroinitiator-Partikel mit einem Quotienten von 0,15 und 0,53.**

Die Intensitäten der Banden im Falle einer Reaktionszeit von zwei und drei Stunden lagen im Bereich der Proben mit einer Reaktionszeit von 45 Stunden. Die Ausbildung einer starken aliphatischen Bande, bedingt durch C-H-Streckschwingungen, bei einer Wellenzahl von  $2954\text{ cm}^{-1}$ , unterstützte die Aussage der Polymerisation von PMMA.

Die PMMA-PVA-Partikel wurden mittels REM auf ihre Gestalt und Oberflächenstruktur analysiert. Die lebenden Komposite hatten eine sphärische Struktur und lagen unzerstört und nicht gequollen vor. Im Vergleich mit den unbehandelten PVA-Mikropartikeln wiesen die PMMA-PVA-Partikel eine strukturierte Oberfläche auf, welche auf die Polymerisation von MMA zurückzuführen war. (Abbildung 3.2-21)



**Abbildung 3.2-21 REM Aufnahme eines PMMA-PVA-Partikels nach einer Reaktionsdauer von 45 Stunden (CK0905201201).**

Im Anschluss an die Polymerisation wurden die Komposite für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet und diese anschließend für bis zu 42 Tage bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgende Tabelle 3.2-1 fasst die Ergebnisse des Wachstums der Kolonien zusammen.

**Tabelle 3.2-1 Zusammenfassung der Reaktionsdauer und der Freisetzungsdauer der Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten.**

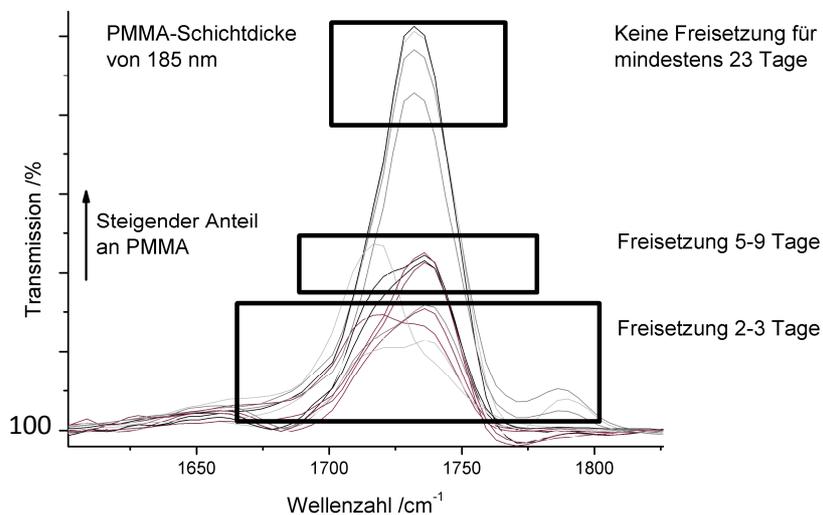
Experiment	Reaktionsdauer	Retention des Wachstums von Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten <sup>a)</sup>
CK2105201201	2 Stunden	25 Tage
CK1207201201	3 Stunden	27 Tage
CK0905201201	45 Stunden	30 Tagen
CK0205201202	45 Stunden	23 Tage

<sup>a)</sup>Die PMMA-PVA-Partikel auf den Agarplatten wurden nach der angegebenen Dauer entnommen und mit Nährlösung versetzt. Die Suspension wurde im Anschluss ausplattiert und die Agarplatten inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von maximal 72 Stunden wurden lebende *M. luteus* nachgewiesen.

Die nährstoffhaltigen Agarplatten zeigten, mit Ausnahmen von isolierten Freisetzungen, kein Wachstum von Kolonien von *M. luteus* für mindestens 23 Tage. Damit ein Absterben der

immobilisierten Bakterien in den Partikeln auszuschließen war, wurden die Kern-Hülle-Partikel mit nährstoffhaltigen Medium versetzt und wiederum inkubiert. Nach Ablauf von 72 Stunden wurde das Wachstum von Kolonien auf den Agarplatten beobachtet. Die in den Kern-Hülle-Partikeln immobilisierten Bakterien überlebten die Lagerung unter Ausschluss von Nahrung bei 37 °C für mindestens 23 Tage. Die Retention des Wachstums der Bakterien war daher ausschließlich auf die hydrophobe PMMA-Hülle zurückzuführen.

Im Folgenden ist eine Überlagerung der ATR/IR-Spektren der lebenden Komposite abgebildet, zusätzlich wurden die jeweiligen Spektren mit der Wachstumsdauer der Bakterien auf den nährstoffhaltigen Agarplatten verknüpft. (Abbildung 3.2-22)



**Abbildung 3.2-22 Überlagerung der ATR/IR-Spektren der bakterienhaltigen PMMA-PVA-Partikel mit Kennzeichnung der Dauer der Freisetzung auf nährstoffhaltigen Agarplatten. Die Angabe der Schichtdicke wurde aus Abschnitt 3.2.8.3 vorgezogen.**

In der Überlagerung der Spektren war die Zunahme der Intensität der C=O Streckschwingung bei der Wellenzahl  $1733\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Im Falle der Spektren, die die geringste Intensität der Carbonylbande zeigten, wurden die Initiatorpartikel mit einem  $Q_{1739/1438}$  von  $2,8 \cdot 10^{-9}$  verwendet. Die Inkubation dieser Proben zeigte das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach 48 bis 72 Stunden. Diese Freisetzungsdauer entspricht der Freisetzungsdauer der unbehandelten Partikel. Die zweite Gruppe fasste die jeweiligen Spektren zusammen, welche eine Polymerisationsdauer von 48 respektive 168 Stunden durchlaufen haben. Hierbei wurden Initiator-PVA-Partikel mit einem  $Q_{1739/1438}$  von 0,018 verwendet. Im Vergleich mit der ersten Gruppe ergab sich, dass die C=O-Streckschwingung deutlich ausgeprägter und daher auch die Intensität der Transmission höher war. Die Inkubation dieser Proben zeigte das

Wachstum von *M. luteus* nach 120 bzw. 192 Stunden, dies entsprach einer Retention der Freisetzung von mindestens 48 Stunden, 2 Tagen.

Die Spektren, welche die höchste Intensität der C=O Streckschwingung der Carbonylgruppe des PMMAs aufwiesen, wurden in eine weitere Gruppe eingeteilt. Die in dieser Gruppe zusammengefassten PMMA-PVA-Partikel wurden ausgehend von Initiator-PVA-Partikel mit einem  $Q_{1739/1438}$  von 0,15 und 0,53 synthetisiert. Die Dauer der Polymerisation dieser Partikel lag bei zwei, drei respektive bei 45 Stunden. Es wurden nährstoffhaltige Agarplatten mit diesen inokuliert und die Platten wurden anschließend inkubiert. Die Kompositpartikel verhinderten, unter Vernachlässigung von isolierten Freisetzungen, das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* für mindestens 432 Stunden, 23 Tage. Weiterhin wurde das Vorhandensein von lebenden immobilisierten Bakterien durch die Benetzung der Partikel mit nährstoffhaltigen Medium nachgewiesen. Im Vergleich zu der Freisetzungsdauer der unbehandelten Partikel entsprach dies einer Retention von mindestens 360 Stunden, 20 Tagen.

### 3.2.6 Retention der Freisetzung in wässriger Lösung

Die Immobilisierung von Bakterien in Hydrogelpartikel ermöglicht die Verarbeitung der Mikroorganismen aus organischen Lösungsmitteln. Die immobilisierten Bakterien sind gegenüber den toxischen Lösungsmitteln durch das kollabierte Hydrogel geschützt und überleben daher den Prozess. Die Verarbeitung aus organischen Lösungsmitteln und deren Verwendung für das Elektrosponnen, wurde bereits von Gensheimer et al. nachgewiesen.<sup>[159]</sup> Eine Limitierung der Verarbeitung dieser lebenden Komposite stellt deren Verhalten gegenüber wässrigen Medien dar. Die Mikroorganismen werden aufgrund der Quellung der Partikel unkontrolliert freigesetzt. Es besteht daher die Notwendigkeit, die Partikel so zu modifizieren, dass eine Verarbeitung der lebenden Komposite auch in Anwesenheit von Wasser sichergestellt ist. Die Retention der Freisetzung auf nährstoffhaltigen Agarplatten und deren Korrelation zu der oberflächeninitiierten Polymerisation von MMA wurde bereits in Abschnitt 3.2.5 aufgeführt. Im Folgenden wird dieses Verhalten in wässrigem Medium, Phosphatpuffer, untersucht. Die Freisetzung der immobilisierten Bakterien beruht auf der Quellung des PVA-Mikropartikels. Es wird vermutete, dass die Ausrüstung der Hydrogel-Partikel mit einer hydrophoben PMMA-Hülle diese Quellung verhindert. Aufgrund dessen sollte die Freisetzung der Bakterien aus Kern-Hülle-Partikeln in wässrigem Medium verzögert sein.

Die lebenden Komposite werden mit Phosphatpuffer, pH 7, versetzt und unter ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Freisetzung von Bakterien wird kontrolliert, indem die überstehende Lösung für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet wird. Die Agarplatten werden nachfolgend bei 37 °C für mindestens 48 Stunden inkubiert. Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf den Agarplatten sollte die Freisetzung von immobilisierten Bakterien nachweisen.

Die nachfolgende Tabelle fasst die Namen der Proben zusammen.

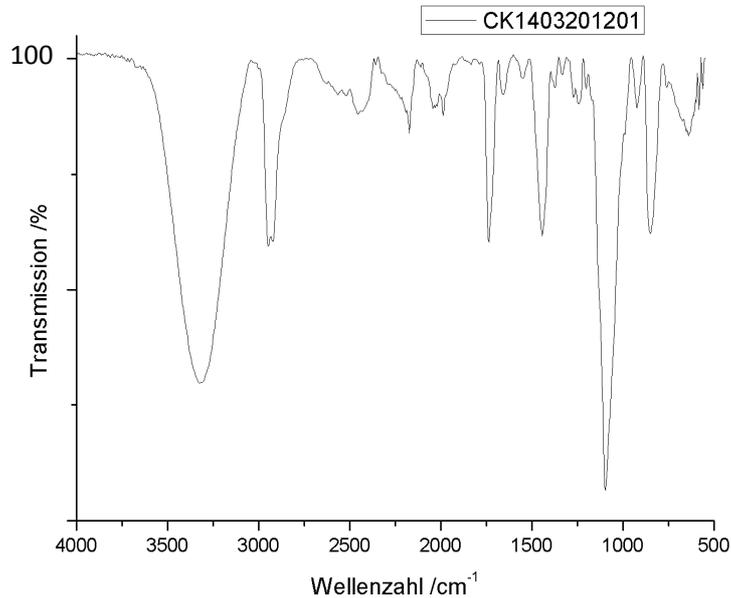
**Tabelle 3.2-2 Zusammenfassung der Probenbezeichnung, der Art der Probe und des  $Q_{1733/1438}$ . Die aufgeführten bakterienhaltigen Partikel wurden auf die Retention der Freisetzung der Bakterien in wässriger Lösung untersucht.**

Probenbezeichnung	Art der Probe	Intensität der Carbonylbande	$Q_{1733/1438}$ <sup>a)</sup>
<b>PVA-Partikel</b>	PVA-Partikel mit immobilisierten Bakterien	keine	0
<b>CK1403201201</b>	bakterienhaltige PMMA-PVA-Partikel	geringe	0,07
<b>CK0905201201</b>	bakterienhaltige PMMA-PVA-Partikel	höchste	2,62
<b>CK1207201201</b>	bakterienhaltige PMMA-PVA-Partikel	höchste	2,63

<sup>a)</sup>Der Quotient 1733/1438 ( $Q_{1733/1438}$ ) wird in dem Abschnitt 3.2.7 eingeführt. In der vorliegenden Tabelle wurde dieser Wert jedoch aufgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit und Übersicht der Proben zu gewährleisten.

Es wurden PVA-Mikropartikel mit immobilisierten Bakterien verwendet. In der überstehenden Lösung wurde nach einem Tag der Inkubation die Freisetzung von *M. luteus* beobachtet. Die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten erbrachte nach einer Inkubation von 48 Stunden das Wachstum von Kolonien von *M. luteus*. Die Freisetzungsdauer der unbehandelten PVA-Mikropartikel wurde für die nachfolgenden Proben als Referenzwert verwendet.

Die Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* aus PVA-Partikeln nach der Polymerisation von MMA soll im Folgenden untersucht werden. Im ersten Fall wurden PMMA-PVA-Partikel mit einer geringen Intensität der Carbonylbande des PMMA untersucht. (Abbildung 3.2-23)



**Abbildung 3.2-23 ATR/IR-Spektrum von PMMA-PVA-Partikeln (CK1403201201).**

Die lebenden Komposite wurden mit Puffer versetzt und die überstehende Lösung wurde für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Nach einem Tag der Inkubation der wässrigen Lösung wurden freigesetzte *M. luteus* nachgewiesen. Im Vergleich mit der Referenzprobe ergab sich, dass die geringe Oberflächenpolymerisation des PMMAs keinen Einfluss auf die Freisetzung ausübte.

Im Folgenden wurden PMMA-PVA-Partikel, die Proben trugen die Bezeichnung CK0905201201 bzw. CK1207201201, mit der höchsten Intensität der Carbonylbande des PMMA aus Abschnitt 3.2.5 eingesetzt. Die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten mit der überstehenden Lösung für einen Zeitraum von 485 Stunden, 20 Tage, erbrachte kein Wachstum von Kolonien. Nach 24 Tagen wurde die Freisetzung von *M. luteus* durch die Inokulation von Agarplatten beobachtet.

Ein Teil der PMMA-PVA-Partikel der gleichen Charge wurde zum Vergleich der Retention der Freisetzung für die Inkubation von Nährlösung verwendet. Die Suspension wurde bei 37 °C inkubiert und die überstehende Lösung wurde ausplattiert. Im Gegensatz zu der Inkubation des Kaliumphosphatpuffers, wurde nach drei Tagen die Freisetzung von Bakterien nachgewiesen.

Die hydrophobe Hülle der PMMA-PVA-Partikel verhinderte eine Freisetzung der Bakterien bei Kontakt mit Phosphatpuffer für eine Dauer von mindestens 20 Tage. Im Gegensatz hierzu, wurden die immobilisierten *M. luteus* bei Kontakt mit Nährlösung bereits nach 3 Tagen freigesetzt. Es ist daher zu vermuten, dass die schnellere Freisetzung bei Kontakt mit der Nährlösung, auf das Wachstum der Bakterien zurückzuführen war. Der Durchtritt der Nährlösung und damit der Eintritt und die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Inneren des Partikels, hatten eine Zellteilung der Bakterien zur Folge. Diese Zellteilung kann bei den hier verwendeten *M. luteus* einen Druck von bis zu 20 bar erzeugen und dadurch den Partikel beschädigen. Ein solcher Defekt hätte die Freisetzung der Bakterien zur Folge. Zusätzlich zu diesem Fall war es möglich, dass einige Bakterien direkten Kontakt zu dem Medium hatten. Im Falle einer nicht vollständigen Umschließung des PVA-Partikels durch die PMMA-Hülle, könnten Bakterien unmittelbar nach der Zugabe von Nährlösung mit dieser in Kontakt gekommen sein. Diese Bakterien vermehrten sich durch Zellteilung und verursachten so einen positiven Nachweis.

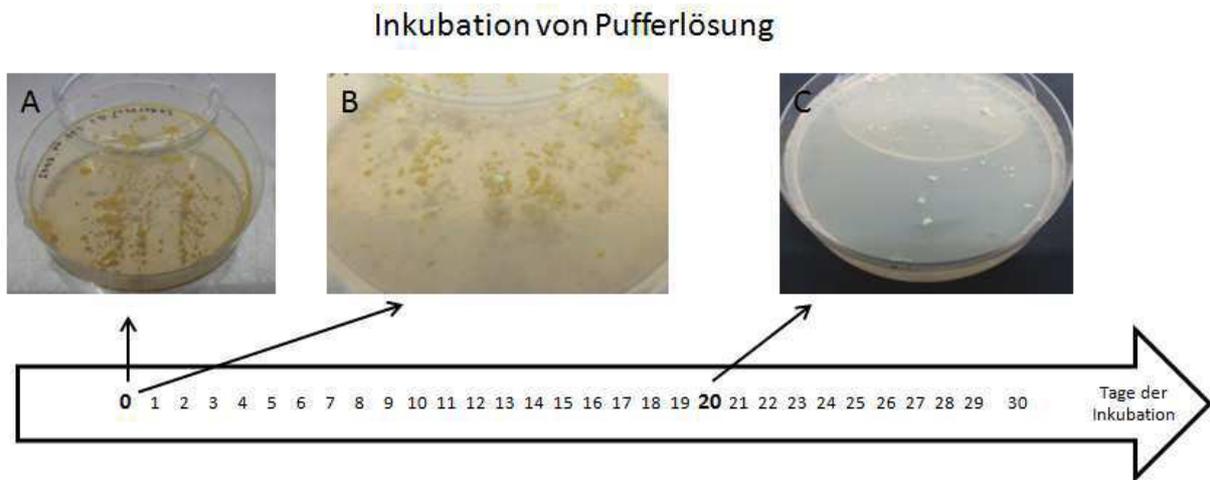
Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen. (Tabelle 3.2-3)

**Tabelle 3.2-3 Freisetzung von in PMMA-PVA-Partikel immobilisierten *M. luteus* in Kaliumphosphatpuffer.**

<b>Retentionsdauer</b>	<b>CK0905201201<sup>(a)</sup></b>	<b>CK1207201201<sup>(a)</sup></b>
<b>/Tage</b>	<b>/KBE</b>	<b>/KBE</b>
<b>0</b>	0	0
<b>1</b>	0	0
<b>4</b>	0	0
<b>5</b>	0	0
<b>6</b>	0	0
<b>7</b>	0	0
<b>8</b>	0	0
<b>11</b>	0	1
<b>15</b>	0	0
<b>20</b>	0	0
<b>26</b>	61	180

<sup>a)</sup>Ein Teil der Partikel wurde im Vorfeld des Experimentes für die Inokulation einer Nährlösung verwendet. Hierbei wurden 72 Stunden nach der Inkubation lebende Bakterien nachgewiesen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* in PMMA-PVA-Kern-Hülle-Partikeln in Phosphatpuffer im Gegensatz zu reinen PVA-Mikropartikeln stark verzögert war. Die Freisetzung im Falle von unbehandelten Hydrogelmikropartikeln wurde nach einer Inokulationsdauer von einem Tag festgestellt. Im Falle der Kern-Hülle-Partikel wurde, aufgrund der hydrophoben PMMA-Hülle, erst nach Ablauf von 20 Tagen eine Freisetzung beobachtet. Die nachfolgende Abbildung fasst die Ergebnisse der Freisetzung in Kaliumphosphatpuffer in Form eines Zeitstrahls zusammen.



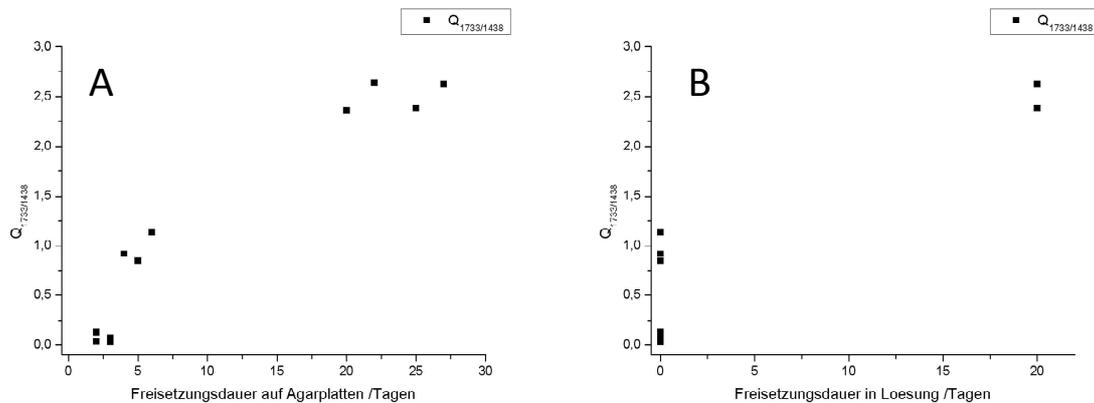
**Abbildung 3.2-24** Auftragung der Retentionszeit von bakterienhaltigen Hydrogelpartikeln in Pufferlösung. Im Falle von PVA-Partikeln wurde unmittelbar nach dem Einbringen Bakterien nachgewiesen (A). Im Falle von PMMA-PVA-Partikeln mit einer geringen Intensität der Carbonylbande wurde ebenfalls eine sofortige Freisetzung beobachtet (B). PMMA-PVA-Partikel mit der höchsten Intensität der Carbonylbande verhinderten die Freisetzung von Bakterien für mindestens 20 Tage (C).

### 3.2.7 Charakterisierung der bakterienhaltigen PMMA-PVA-Partikel

Die Freisetzung der immobilisierten Bakterien aus PMMA-PVA-Partikeln wurde sowohl auf nährstoffhaltigen Agarplatten, als auch in Puffer-Lösung bestimmt. Im Folgenden werden die Integrale der Carbonyl-Schwingung des PMMAs der PMMA-PVA-Partikel bestimmt. Es wird erwartet, dass der Wert als Maß für die aufgepfropfte Menge an PMMA dient. Weiterhin soll das Integral der Bande bei einer Wellenzahl von  $1438\text{ cm}^{-1}$  bestimmt werden, da dieses unabhängig von der Modifikation der Partikel stets einen vergleichbaren Wert annahm. Zum Vergleich der Menge an aufgepfropften PMMA zwischen den Partikeln wurde der Quotient beider Integrale gebildet,  $Q_{1733/1438}$ , und im Hinblick auf die Freisetzungsdauer der Bakterien diskutiert.

Es war zu erkennen, dass bei einem  $Q_{1733/1438} < 0,13$  keine Retention der Freisetzung der Bakterien, weder in Lösung, noch auf Agarplatten, beobachtet wurde. Eine Retention der Freisetzung auf Agarplatten von mindestens zwei Tagen im Vergleich zur Referenzdauer, wurde bei einem  $Q_{1733/1438}$  von mindestens 0,84 nachgewiesen. Die größte Menge an aufgepfropften PMMA entsprach einem Quotienten von 2,50. In diesem Bereich wurde eine Retention der Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten von 18 Tagen und in Pufferlösung

von 20 Tagen beobachtet. Die folgenden Abbildungen bilden die Korrelation von  $Q_{1739/1438}$  und der Freisetzung der Bakterien ab.



**Abbildung 3.2-25 Auftragung von  $Q_{1733/1438}$  gegen die Freisetzungsdauer von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten (A) und in Kaliumphosphatpuffer (B).**

### 3.2.8 Untersuchung der Architektur der PMMA-PVA-Mikropartikel

Die oberflächeninitiierte, kontrollierte radikalische Polymerisation von MMA bei Raumtemperatur wurde in den vorherigen Abschnitten für die Herstellung von PMMA-PVA-Mikropartikeln mit immobilisierten *M. luteus* verwendet. Die Ausrüstung der Hydrogelpartikel mit einer hydrophoben Hülle, hatte eine Retention der Freisetzung der immobilisierten Bakterien gegenüber wässrigem Medium zur Folge. Die PMMA-Hülle verhinderte die Quellung des Partikels und dadurch blieben die *M. luteus* in dem Partikel lokalisiert. Die Verwendung der ATRP für den Aufbau diskreter Überstrukturen von Polymeren ist literaturbekannt und wurde in einer Vielzahl von Veröffentlichungen verwendet.<sup>[160]</sup> In den in dieser Arbeit verwendeten Systemen wurde die Partikeloberfläche durch die kovalente Anbindung von 2-BMPiB ausgerüstet. Der immobilisierte Initiator wurde in einem zweiten Reaktionsschritt für die kontrollierte radikalische Polymerisation von MMA verwendet. Die Initiierung der Polymerisation erfolgte ausschließlich an der Oberfläche. Es wird daher erwartet, dass die Partikel aus einem PVA-Kern und einer PMMA-Hülle bestehen. Die Architektur dieser Kern-Hülle-Partikel soll im Folgenden durch thermogravimetrische Analyse (TGA), durch konfokale Lasermikroskopie und mittels TEM-Aufnahmen verifiziert werden.

### 3.2.8.1 Thermogravimetrische Analyse der PMMA-PVA-Partikel und deren Intermediate

Es wurden PVA-Mikropartikel, Initiator-PVA-Partikel und PMMA-PVA-Partikel mittels TGA untersucht. Hierfür wurden die Proben mit einer Aufheizrate von  $10 \text{ K} \cdot \text{Minute}^{-1}$  bis auf  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Die erhaltenen Analysen wurden ausgewertet und miteinander verglichen. Der thermische Abbau des reinen PVAs sollte sich gegenüber dem Abbau der PMMA-PVA-Partikel unterscheiden.

Die unbehandelten PVA-Mikropartikel zeigten bei einer Temperatur von  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  eine erste Abbaustufe, die durch die intermolekulare Freisetzung von Wasser verursacht wurde. Der folgende überlagerte, zweistufige Abbau des Kohlenstoffgerüsts des PVAs bei  $360$  und  $440 \text{ }^\circ\text{C}$  war deutlich zu erkennen.<sup>[161]</sup> (Abbildung 3.2-26)

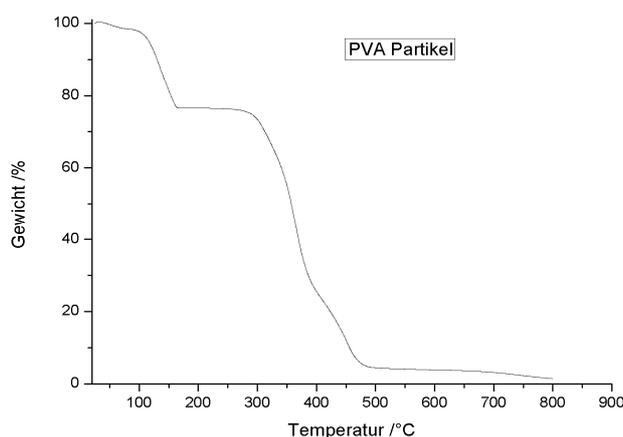
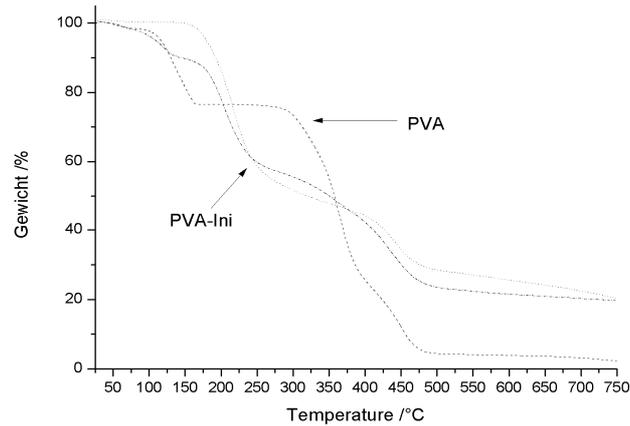


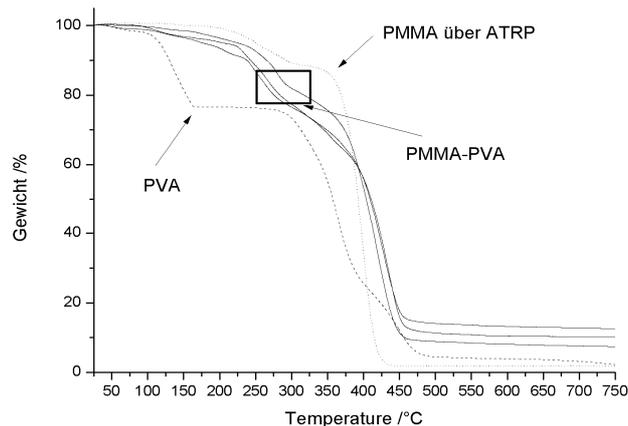
Abbildung 3.2-26 Thermogravimetrische Analyse von PVA-Partikeln.

Der thermische Abbau der PVA-Partikel, nach der Umsetzung mit dem ATRP-Initiator, ist nachfolgend gezeigt. Das Thermogramm zeigte einen geänderten thermischen Abbau im Vergleich zum reinen PVA-Partikel, welcher zusätzlich angegeben ist. Eine Abbaustufe der Initiator-PVA-Partikel wurde bei einer Temperatur von ungefähr  $210 \text{ }^\circ\text{C}$  beobachtet. Es war zu vermuten, dass die Abspaltung des Initiators diese Stufe verursacht.<sup>[162]</sup> Eine zweite Stufe, die überlagert war durch weitere Stufen, wurde im Bereich von  $440 \text{ }^\circ\text{C}$  beobachtet. Diese zweite Stufe entsprach dem Abbau des Kohlenstoffgerüsts, wie im Falle des reinen PVA. (Abbildung 3.2-27)



**Abbildung 3.2-27 Thermogravimetrische Analyse von Initiator-PVA-Partikeln.**

Die nachfolgende Abbildung fasst die TGA für PMMA-PVA-Partikel mit einem  $Q_{1739/1438}$  Wert von mindestens 2,5 zusammen. Zusätzlich wurde der Masseverlauf von über ATRP synthetisiertem reinem PMMA eingefügt. (Abbildung 3.2-28)



**Abbildung 3.2-28 Überlagerung der TGA von PVA, PMMA-PVA-Partikeln und über ATRP synthetisiertes PMMA.**

Das Thermogramm der PMMA-PVA-Partikel zeigte in einem Temperaturbereich von 250 – 280 °C eine Abbaustufe, die auch im Falle des reinen PMMAs zu beobachten war. Diese Stufe ist charakteristisch für den „*unzipping*“ Mechanismus des über ATRP hergestellten PMMAs. Im Bereich von 350 C bis 430 °C, war bei den Proben der mehrstufige Abbau des Kohlenstoffgerüsts zu beobachten.<sup>[161]</sup>

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Anbindung des ATRP-Initiators eine zusätzliche Abbaustufe im Vergleich zu dem PVA hervorrief. Die durch oberflächeninitiierte Polymerisation synthetisierten PMMA-PVA-Partikel, wiesen eine charakteristische Abbaustufe im Temperaturbereich von 260 °C auf. Dieser Abbau beruhte auf dem

„unzipping“ Mechanismus des durch ATRP hergestellten PMMAs und war daher ein starker Hinweis auf eine erfolgreiche Polymerisation.

### **3.2.8.2 Analyse der Kern-Hülle-Struktur mittels konfokalem Lasermikroskop**

Die Kern-Hülle-Struktur der PMMA-PVA-Partikel wird im folgenden Abschnitt mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht werden.

Als Ausgangspunkt der Untersuchung dienten die Initiator-PVA-Partikel. Ausgehend von deren Oberfläche, soll über ATRP ein Copolymer von MMA und FMA synthetisiert werden. Im Falle einer reinen, oberflächeninitiierten Polymerisation sollte dieses Copolymer ausschließlich an der Oberfläche des Partikels lokalisiert sein. Die Lokalisation der Hülle wird durch die Verwendung des konfokalen Lasermikroskops untersucht. Das Copolymer wird durch Einstrahlung einer geeigneten Energie, in dem hier vorliegenden Fall mit einer Wellenlänge von 488 nm, angeregt. Die Fluoreszenz des Copolymers kann durch das konfokale Lasermikroskop detektiert werden, und bildet dieses räumlich ab. Es wird erwartet, dass ausschließlich die Hülle des Partikels angeregt und daher detektiert wird. Als Vergleich der auf die Hülle beschränkten Fluoreszenz, wurden PVA-Mikropartikel mit immobilisiertem Fluorescein verwendet. Bei diesen sollte das immobilisierte Chromophor im Kern angeregt werden.

Die Mikropartikel mit immobilisiertem Fluorescein wurden hergestellt, indem eine wässrige PVA-Lösung mit Fluorescein versetzt wurde. Im Anschluss wurde diese Lösung für die Herstellung der Partikel analog zu den Mikropartikeln mit immobilisierten Bakterien weiterverarbeitet. Die Lokalisation des Fluoresceins im Inneren der Partikel wurde nachfolgend mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt. (Abbildung 3.2-29)

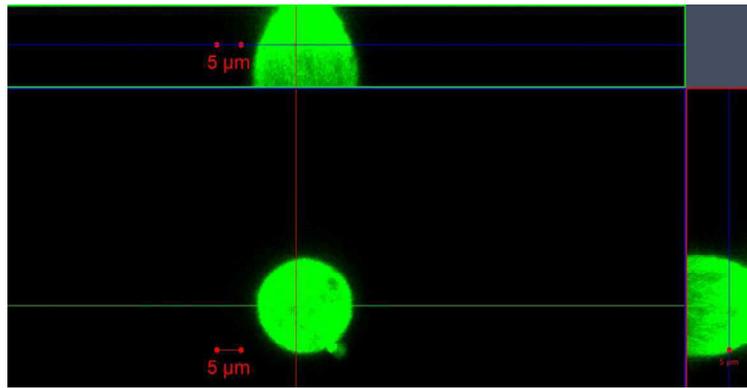


Abbildung 3.2-29 KLSM Aufnahme eines PVA-Partikels mit immobilisiertem Fluorescein.

Die Analyse des Partikels ergab, dass das Fluorescein homogen im Inneren des Partikels verteilt war.

Im Folgenden wurden PVA-Partikel mit einer Hülle aus P(MMA-FMA) untersucht. Die oberflächeninitiierte Polymerisation, ausgehend von Initiator-PVA-Partikeln mit einem  $Q_{1739/1438}$  von 0,15, wurde nach einer Stunde bzw. 24 Stunden abgebrochen. Die nachfolgenden ATR/IR-Spektren der erhaltenen Komposite zeigten deutlich die unterschiedlichen Intensitäten der Carbonyl-Streckschwingung bei einer Wellenzahl von  $1733 \text{ cm}^{-1}$ . (Abbildung 3.2-30)

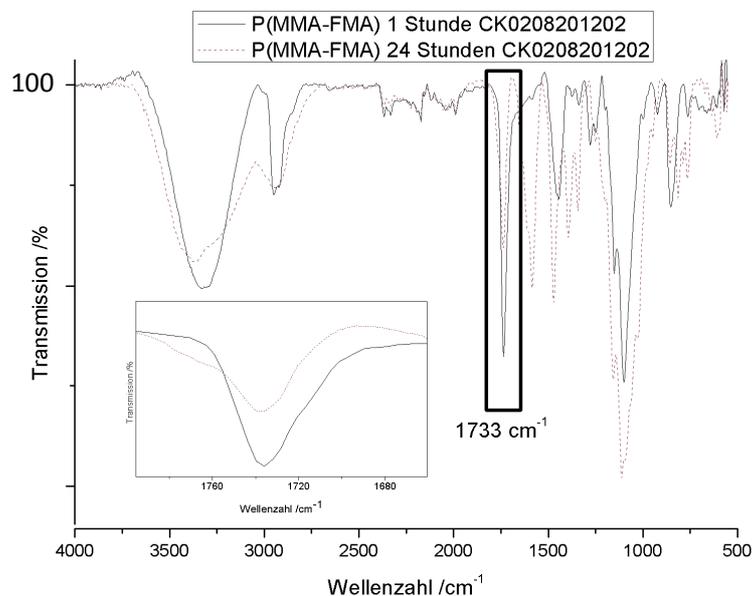
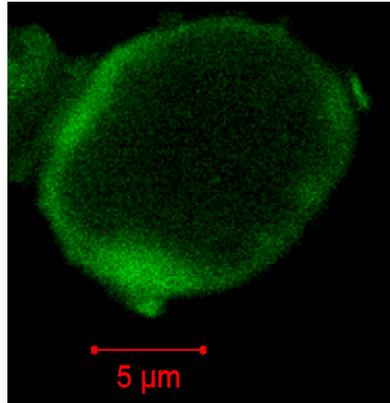


Abbildung 3.2-30 Überlagerung der ATR/IR-Spektren von P(MMA-FMA)-PVA-Partikeln.

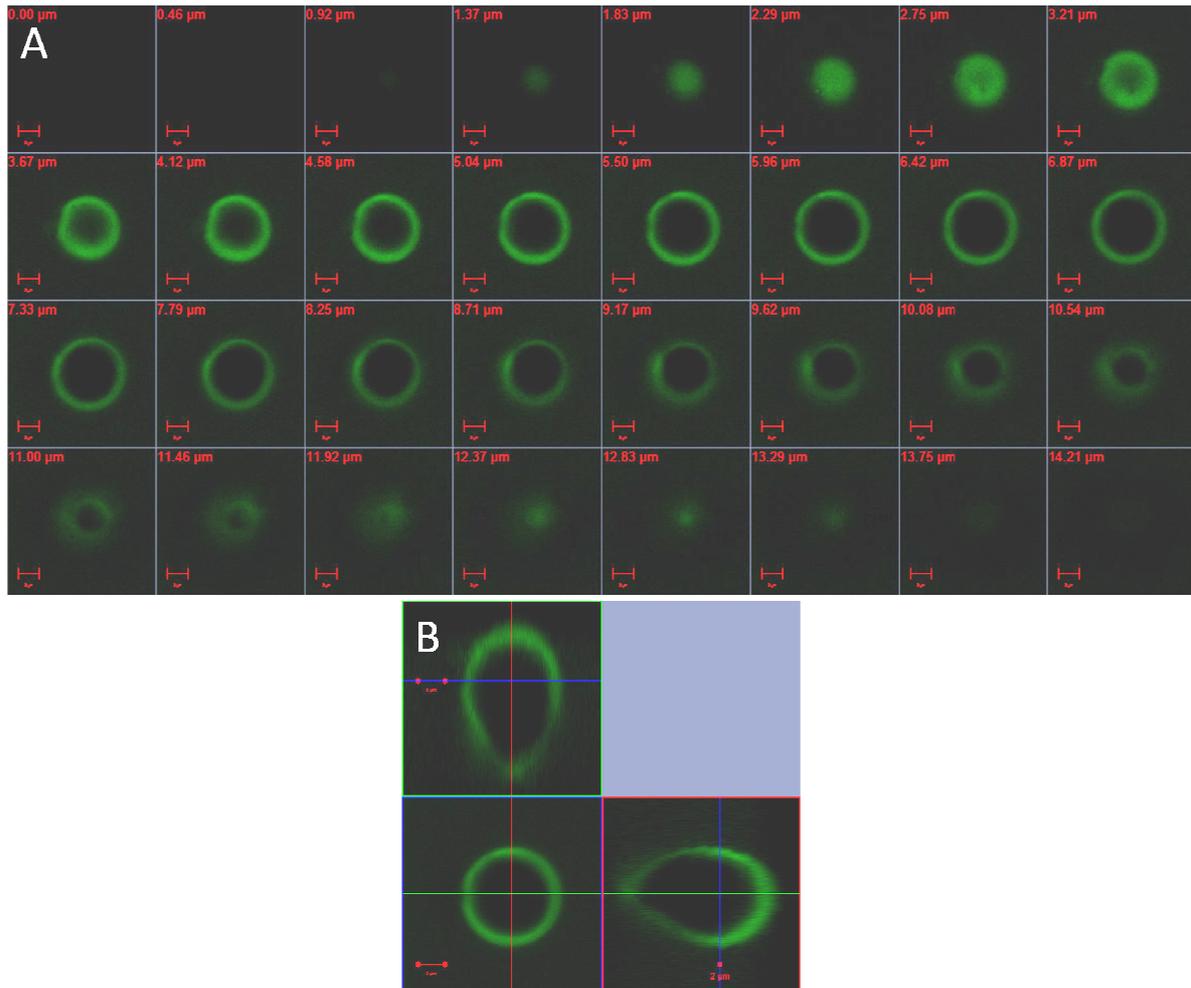
Die Kern-Hülle-Partikel mit einer Polymerisationsdauer von einer Stunde wurden nachfolgend auf ihre Architektur untersucht. Das fluoreszierende Copolymer war deutlich als

Korona des Partikels zu erkennen. Die Längsschnitte des Kern-Hülle-Partikels zeigten weiterhin, dass die Korona und damit die Hülle den kompletten Partikel umgab. Im Gegensatz dazu wurde im Kern keine Fluoreszenz beobachtet. Die Schichtdicke des hier präsentierten Kern-Hülle-Partikels betrug ca. 300 nm, bei einem Durchmesser von 10,6  $\mu\text{m}$ . (Abbildung 3.2-31)



**Abbildung 3.2-31 KLSM Aufnahme eines P(MMA-FMA)-PVA-Partikels nach einer Reaktionsdauer von einer Stunde.**

Es wurden weiterhin Kern-Hülle-Partikel nach einer Polymerisationsdauer von 24 Stunden analysiert. In den Aufnahmen der Längsschnitte des Kern-Hülle-Partikels war das Copolymer als Hülle zu erkennen. Die fluoreszierende Korona schloss den gesamten Partikel ein und der Kern, war wie im Falle des Komposits, nach einer Polymerisationsdauer von einer Stunde, frei von Fluoreszenz. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Analyse des Partikels mittels KLSM. (Abbildung 3.2-32)



**Abbildung 3.2-32 Zusammenfassung der KLSM Aufnahmen des P(MMA-FMA)-PVA-Partikels. Abgebildet ist die Abfolge in Z-Richtung (A). KLSM Aufnahme des Kern-Hülle-Partikels in die drei Raumrichtungen (B).**

Die Auflagefläche des Partikels auf dem Objektträger ab einer Höhe von 1,8 μm zeigte eine geschlossene Fluoreszenz, die auf die geschlossene Partikelhülle zurückzuführen war. Die Längsschnitte zwischen einer Höhe von 3,2 und 10,1 μm zeigten deutlich die fluoreszierende Hülle des Partikels. Diese war homogen verteilt und umschloss den Partikel vollständig. Ab einer Höhe von 11 μm zeigten die Abbildungen die obere Peripherie des Partikels. Analog zu seiner Auflagefläche war die Hülle geschlossen und eine fluoreszierende, durchgehende Fläche wurde beobachtet. Die Schichtdicke der hier abgebildeten Hülle betrug ca. 600 nm bei einem Durchmesser von 11,8 μm. Im Vergleich mit der Schichtdicke nach einer Reaktionszeit von einer Stunde ergab sich, dass die Hülle nach 24 Stunden ca. doppelt so stark war.

Basierend auf den in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die Polymerisation des Copolymers aus MMA und FMA erfolgreich durchgeführt wurde.

Die Lokalisierung des Copolymers mittels des konfokalen Lasermikroskops zeigte, dass dieses ausschließlich an der Außenseite des Partikels vorhanden war. Die postulierte Kern-Hülle-Struktur wurde aufgrund der angeführten Ergebnisse bewiesen.

### 3.2.8.3 Charakterisierung der Kern-Hülle-Struktur durch TEM-Aufnahmen

In Abschnitt 3.2.8.2 wurde die Kern-Hülle-Struktur der Partikel mittels konfokaler Lasermikroskopie verifiziert. Die PMMA-PVA-Partikel mit immobilisierten Bakterien sollen im folgenden Abschnitt mittels TEM-Aufnahmen zum einen, auf ihre Kern-Hülle-Struktur und zum anderen, auf die Schichtdicke des PMMAs untersucht werden. Das PMMA der Hülle soll mit Kupfer angereichert werden, indem die Partikel mit einer Chloroform-Kupfer-Lösung versetzt werden. Das Kupfer sollte sich in der Hülle anlagern und wird aufgrund der Streuung der Elektronen im TEM zu detektieren sein. Die PVA und PMMA Moleküle streuen die durchtretenden Elektronen aufgrund der geringen Ordnungszahl ihre Atome nicht und werden nicht detektiert. Für die Untersuchung der Schichtdicke der Hülle wurden Mikrotomschnitte der Partikel hergestellt und analysiert werden.

Die folgende Abbildung zeigt einen PMMA-PVA-Partikel nach einer Polymerisationsdauer von 48 Stunden und einem  $Q_{1733/1438}$  von 2,5. Die PMMA-Hülle wurde zudem mit Kupfer angereichert. (Abbildung 3.2-33)

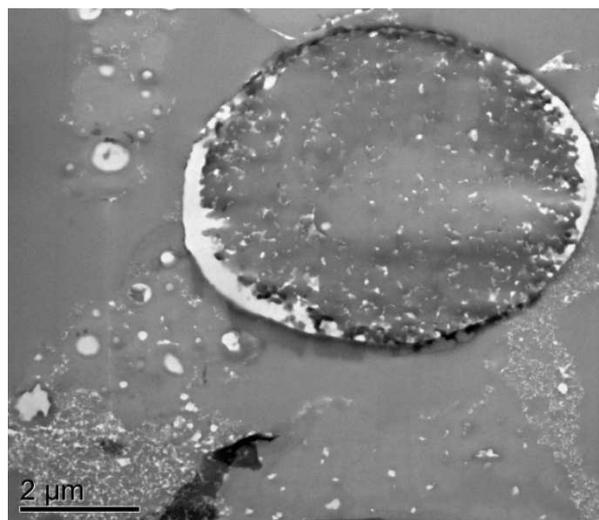


Abbildung 3.2-33 TEM Aufnahme eines PMMA-PVA-Partikels.

Der in der Abbildung dargestellte PMMA-PVA-Partikel hatte eine kreisförmige Gestalt und besaß einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$ . An der Außenseite des Partikels war eine dunkle Färbung zu beobachten, welche durch das immobilisierte Kupfer verursacht wurde. Im Inneren des Partikels wurden keine Ablagerungen festgestellt. Dies ließ den Schluss zu, dass die Behandlung mit der Chloroform-Kupfer-Lösung nicht zu einer Quellung des Partikels geführt hatte und dass daher das Kupfer nur in der PMMA-Hülle angereichert wurde. Im Falle einer Quellung des Partikels, lägen diese nicht mehr als sphärische Partikel vor und die immobilisierten *M. luteus* hätten das Kupfer sequestriert und damit im Inneren der Partikel eine Streuung der Elektronen verursacht, vgl. Abschnitt 3.4.9.

Die PMMA-Schichtdicke dieses Partikels betrug 185 nm. Im Vergleich mit der Schichtdicke aus Abschnitt 3.2.8.2 (ca. 600  $\mu\text{m}$ ) zeigte sich, dass die aus TEM-Aufnahmen bestimmte Schichtdicke deutlich geringer war.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Kern-Hülle-Struktur der PMMA-PVA-Partikel durch die TEM-Aufnahmen bestätigt wurde. Die Anreicherung der PMMA-Hülle durch Kupfer wurde erfolgreich durchgeführt und für die Schichtdicke der PMMA-Hülle wurde in dem vorliegenden Partikel ein Wert von 185 nm gemessen.

### **3.2.9 Freisetungsverhalten der PVA- und PMMA-PVA-Mikropartikel**

Die Freisetzung von verkapseltem Fluorescein aus PVA- und PMMA-PVA-Mikropartikeln wird im folgenden Abschnitt analysiert und quantifiziert. Die retardierte Freisetzung der Bakterien aus PMMA-PVA-Partikeln wurde in Abschnitt 3.2.6 bereits beschrieben. Das Fluorescein wird, anstatt der Bakterien, in den Partikeln immobilisiert und diese Partikel werden mittels ATRP von MMA mit einer PMMA-Hülle ausgerüstet. Die Freisetzung des Farbstoffes soll zum einen in Abhängigkeit der Temperatur und zum anderen in Abhängigkeit des pH-Wertes der wässrigen Umgebung charakterisiert werden. Die Quantifizierung der Freisetzung wird mittels UV/VIS-Spektroskopie durchgeführt. Das PVA-Hydrogel sollte im Falle einer Temperaturerhöhung von 20  $^{\circ}\text{C}$  auf 37  $^{\circ}\text{C}$  und auf 60  $^{\circ}\text{C}$  eine schnellere Freisetzung des Farbstoffes aufweisen. Die Freisetzung von immobilisierten Materialien aus Hydrogelen, insbesondere PVA, ist zudem abhängig von dem umgebenden pH-Wert. Die Seitengruppen des PVAs bilden intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus und erzeugen bei einem pH-Wert von 7 ein Netzwerk mit einer Porengröße von ungefähr 0,68  $\mu\text{m}$ .

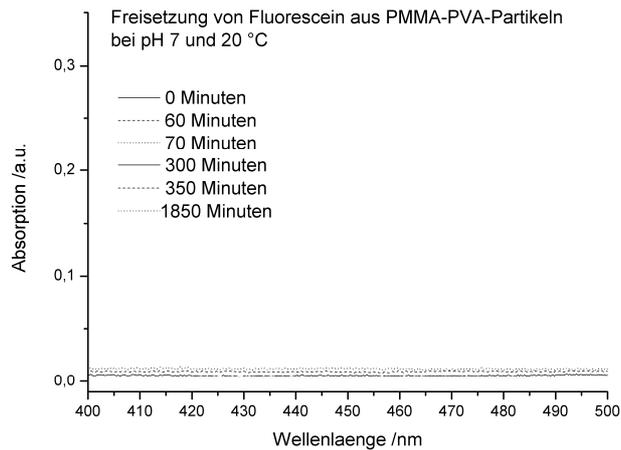
Bei einer Verschiebung des pH-Wertes zu einem Wert von 6,5 vergrößern sich diese Poren und haben einen Durchmesser von ungefähr 0,94  $\mu\text{m}$ . Die Vergrößerung des Durchmessers basiert auf der Konkurrenz der Ausbildung von intermolekularen H-Brücken und der H-Brücken zwischen Polymer und Lösungsmittel. Dies hat direkte Auswirkung auf die Freisetzungsgeschwindigkeit.<sup>[163]</sup> Aus den genannten Gründen sollte die maximale Freisetzung von Fluorescein bei einem pH-Wert von pH 5 im Gegensatz zu einem pH-Wert von 7 nach einer geringeren Dauer detektiert werden.

Das Freisetzungsverhalten der PMMA-PVA-Partikel mit immobilisiertem Fluorescein wird bei verschiedenen Temperaturen, 20, 37 und 60 °C, und bei pH-Werten von 5 und 7 ermittelt. Wie aus Abschnitt 3.2.6 bekannt, verhindert die hydrophobe PMMA-Hülle die Freisetzung von immobilisierten Bakterien. Es wird erwartet, dass aus diesem Grund die Freisetzung des Fluoresceins stark vermindert sein wird.

Die Freisetzung von Fluorescein aus PVA und PMMA-PVA-Mikropartikeln in Phosphatpuffer bei pH 7 wurde quantifiziert. Das Absorptionsmaximum des Fluoresceins ist pH-abhängig und lag im Falle eines pH von 7 bei einer Wellenlänge von 492 nm. Aus diesem Grund wurde dieser Wert für die Quantifizierung des Fluoresceins in Lösung verwendet.

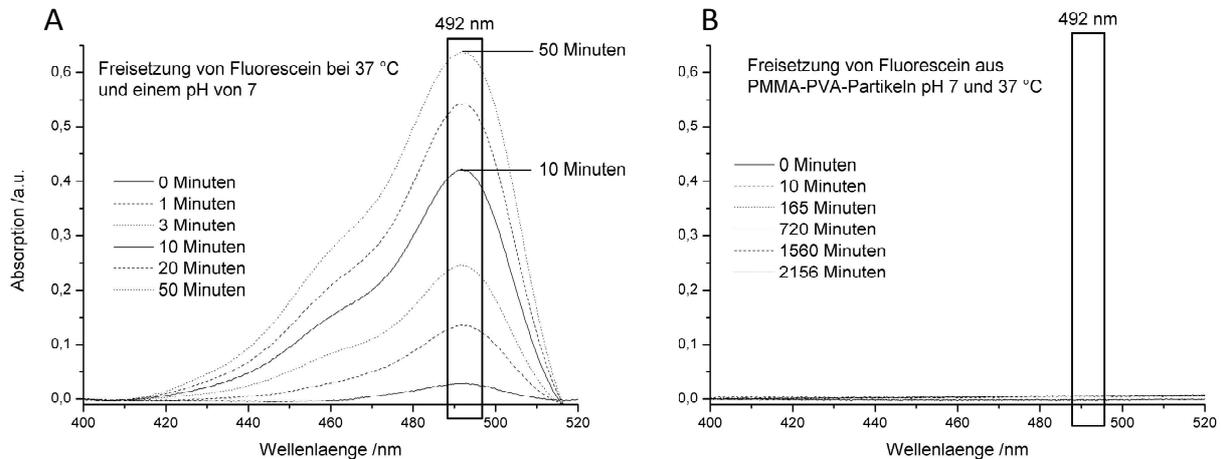
Im Falle der PVA-Partikel trat eine Freisetzung des Fluoresceins, unmittelbar nach der Zugabe der Partikel zu Wasser, ein. Die genaue Charakterisierung der Freisetzung des Fluoresceins aus PVA-Partikeln bei pH 7 und 20 °C wurde bereits durchgeführt.<sup>[159]</sup>

Die Freisetzung des Fluoresceins aus PMMA-PVA-Partikeln unterschied sich von der der PVA-Partikel. Es wurde keine Absorptionsänderung der Pufferlösung für 31 Stunden detektiert. Die PMMA-PVA-Partikel verhinderten für diesen Zeitraum die Freisetzung des Farbstoffes. (Abbildung 3.2-34)



**Abbildung 3.2-34 Freisetzung von Fluorescein aus PMMA-PVA-Partikeln bei pH 7 und 20 °C.**

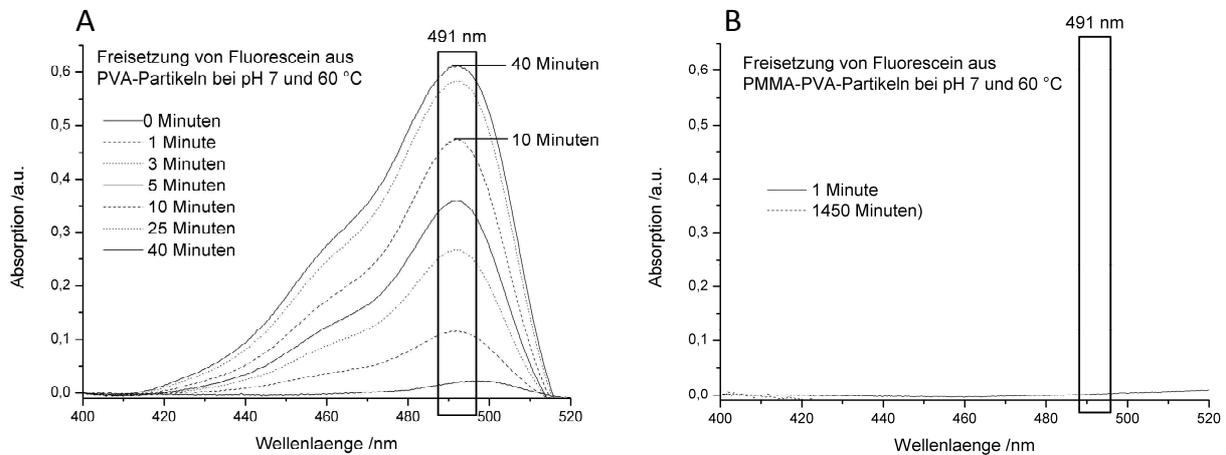
Im Folgenden wurde die Freisetzung des Fluoresceins aus PVA- und PMMA-PVA-Partikeln bei einem pH Wert von 7 und einer Temperatur von 37 °C analysiert. Die Temperatur von 37 °C entspricht der Inkubationstemperatur von nährstoffhaltigem Medium und ist daher von großer Bedeutung für die Freisetzung von Bakterien aus Partikeln. (Abbildung 3.2-35)



**Abbildung 3.2-35 Freisetzung von Fluorescein aus PVA-Partikeln (A) und PMMA-PVA-Partikeln (B) bei pH 7 und 37 °C.**

Das Spektrum der PVA-Partikel zeigte nach 1 Minute eine deutliche Absorption ( $c = 0,0020 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) bei einer Welllänge von 492 nm und nach 10 Minuten wurde  $0,0059 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Fluorescein freigesetzt. Das Maximum der Konzentration von Fluorescein von  $0,0088 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  wurde nach 50 Minuten erreicht. Im Gegensatz dazu, wurde über einen Zeitraum von über 2100 Minuten keine Freisetzung von Fluorescein aus den PMMA-PVA-Partikeln detektiert.

Die Freisetzung des Farbstoffes wurde im Folgenden bei einer Temperatur von 60 °C analysiert. (Abbildung 3.2-36)



**Abbildung 3.2-36 Freisetzung von Fluorescein aus PVA-Partikeln (A) und PMMA-PVA-Partikeln (B) bei pH 7 und 60 °C.**

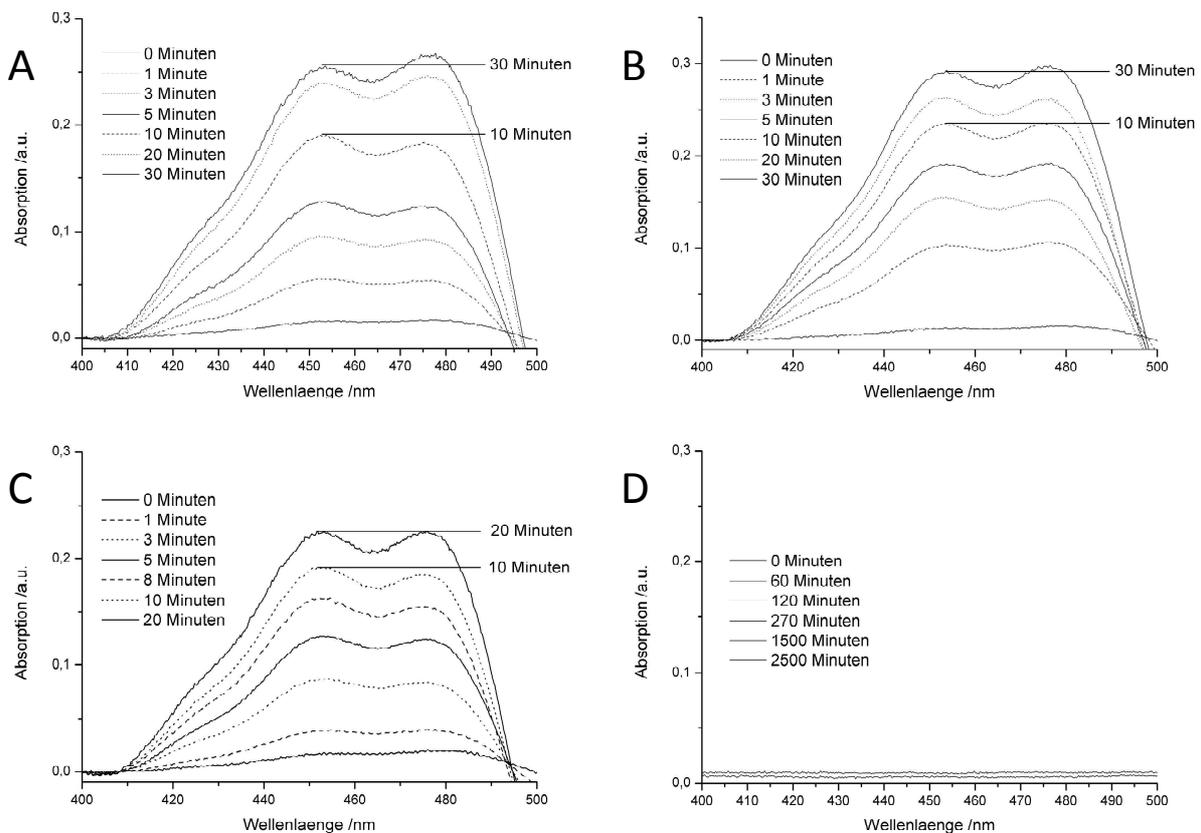
Die Absorption des Fluoresceins nach der Zugabe der PVA-Partikel betrug nach 1 Minute 0,12 a.u., dies entsprach einer Konzentration von  $0,0018 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nach 10 Minuten wurde eine Konzentration von  $0,0065 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  detektiert. Das Maximum wurde nach 40 Minuten erreicht, dies entsprach einer Konzentration von Fluorescein in Lösung von  $0,0084 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Im Gegensatz zu einer Temperatur von 37 °C, wurde das Maximum der Konzentration 10 Minuten früher nach der Versetzung mit Puffer erreicht. Die Freisetzung des Fluorescein im Falle der PMMA-PVA-Partikel wurde weiterhin untersucht. Es wurde nach 1400 Minuten, 23 Stunden, keine Konzentration des Farbstoffes oberhalb der Detektionsschwelle des UV/VIS-Spektroskops ermittelt.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Freisetzung des immobilisierten Fluorescein aus PVA-Partikeln temperaturabhängig war. Im Falle einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 60 °C wurde das Maximum der Konzentration 10 Minuten früher detektiert.

Im Folgenden wurde die Freisetzung des Fluorescein aus PVA- und PMMA-PVA-Partikeln bei einem pH von 5 und bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert. Das UV/VIS-Spektrum des Fluoresceins hatte bei einem pH-Wert von 5 zwei relative Maxima, für die Quantifizierung wurde nachfolgend das Maximum bei einer Wellenlänge von 453 nm verwendet.

Im Falle der PVA-Partikel mit immobilisiertem Fluorescein wurde eine Änderung der Absorption nach 1 Minute beobachtet. Die Konzentration an Fluorescein nach einer Minute betrug  $0,0025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und nach 10 Minuten wurde eine Konzentration von  $0,0070 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  beobachtet. Das Maximum der Konzentration des Fluoresceins in Lösung betrug nach 30 Minuten  $0,0093 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . (Abbildung 3.2-35)

Die Analyse der PMMA-PVA-Partikel zeigte, dass nach über 4200 Minuten, 70 Stunden, keine Freisetzung des Fluoresceins detektiert wurde. (Abbildung 3.2-37)



**Abbildung 3.2-37 Zusammenfassung der UV/VIS Absorptionsmessungen der Freisetzung von Fluorescein aus PVA-Partikeln bei pH 5 und 20 °C (A), 37 °C (B) und 60 °C (C). Freisetzung von Fluorescein aus PMMA-PVA-Partikeln bei pH 5 und 20 °C (D).**

Die Absorptionsmessung der PVA-Partikel wurde weiterhin bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Konzentration von Fluorescein in Lösung betrug nach einer Minute  $0,0041 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und nach 10 Minuten wurden  $0,0086 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  detektiert. Das Absorptionsmaximum wurde nach 30 Minuten erreicht und die maximale Konzentration betrug  $0,0106 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu, wurde für mindestens 4300 Minuten (71 Stunden) keine Absorption des Fluoresceins im Falle der PMMA-PVA-Partikel oberhalb der Detektionsschwelle beobachtet. (Abbildung 3.2-35)

Die Erhöhung der Temperatur auf 60 °C erbrachte nach einer Minute, im Falle der PVA-Partikel, eine Konzentration des Fluoresceins in Lösung von 0,0012 mmol·L<sup>-1</sup> und nach 10 Minuten wurde eine Konzentration von 0,0028 mmol·L<sup>-1</sup> ermittelt. Das Maximum der Konzentration wurde nach 20 Minuten erreicht und betrug 0,0059 mmol·L<sup>-1</sup>. (Abbildung 3.2-35)

Im Falle der PMMA-PVA-Partikel wurde keine Freisetzung oberhalb der Detektionsschwelle für mindestens 4300 Minuten beobachtet. (Abbildung 3.2-35)

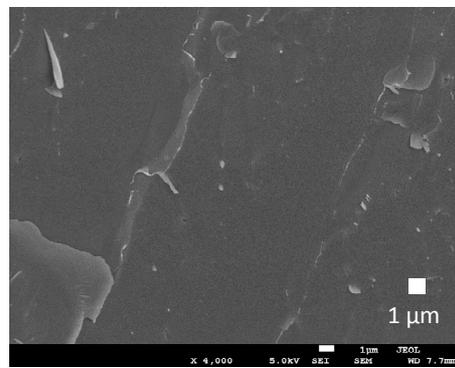
Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die Freisetzung von immobilisiertem Fluorescein aus PVA-Mikropartikeln temperaturabhängig war. Eine Erhöhung der Temperatur hatte eine erhöhte Freisetzungsgeschwindigkeit zur Folge. Die Freisetzung des immobilisierten Fluoresceins war weiterhin abhängig von dem pH-Wert der umgebenen Lösung. Eine Absenkung des pH von 7 auf 5 führte vermutlich zu einer Vergrößerung der Porengröße des PVA-Netzwerkes. Dies führte wiederum zu einer beschleunigten Freisetzung des Farbstoffes. Im Vergleich von Änderung der Temperatur und des pH-Wertes auf die Freisetzungsgeschwindigkeit, wurde in den durchgeführten Experimenten ein stärkerer Einfluss im Falle der Variierung des pH-Wertes beobachtet. Die PMMA-PVA-Partikel zeigten keine Freisetzung des immobilisierten Fluoresceins, sowohl bei einer Änderung des pH-Wertes, als auch bei einer Erhöhung der Temperatur von 20 auf 60 °C. Die hydrophobe PMMA-Hülle verhinderte die Quellung des Partikels für mindestens 71 Stunden bei 60 °C. Dieses Ergebnis unterstützt die in Abschnitt 3.2.6 beschriebene Retention der Freisetzung von Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten und in Puffer.

### **3.2.10 Untersuchung der Wasserstabilität der PMMA-PVA-Partikel**

Die PVA-Mikropartikel quellen bei Kontakt mit einem geeigneten Lösungsmittel und setzen immobilisierte Materialien frei. Dieses Verhalten wurde bereits ausführlich in den Abschnitten 3.2.6 und 3.2.9 beschrieben. Das Ausrüsten der Partikel mit einer hydrophoben PMMA-Hülle - über eine oberflächeninitiierte Pfropfpolymerisation durchgeführt - veränderte die Freisetzungseigenschaft der Hydrogelpartikel in wässrigem Medium. Die Freisetzung von Fluorescein aus den Partikeln, vgl. Abschnitt 3.2.9, wurde durch die PMMA-Hülle verhindert. Weiterhin wurde eine Retention der Migration von Bakterien beobachtet. Im Folgenden wird die Stabilität der PMMA-PVA-Partikel gegenüber Wasser mittels REM untersucht. Die PVA-

und PMMA-PVA-Partikel wurden für 5 Minuten in einem Ultraschallbad mit Wasser versetzt und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Die Struktur der tiefgefrorenen Formulierung wurde anschließend untersucht, indem die Probe geschnitten und mittels REM analysiert wurde. Im Falle der PVA-Partikel sollten diese gequollen vorliegen und es sollten keine sphärischen Partikel zu beobachten sein. Im Gegensatz dazu sollten die PMMA-PVA-Partikel unverändert in ihrer Gestalt vorliegen, da diese aufgrund der PMMA-Hülle nicht quellen.

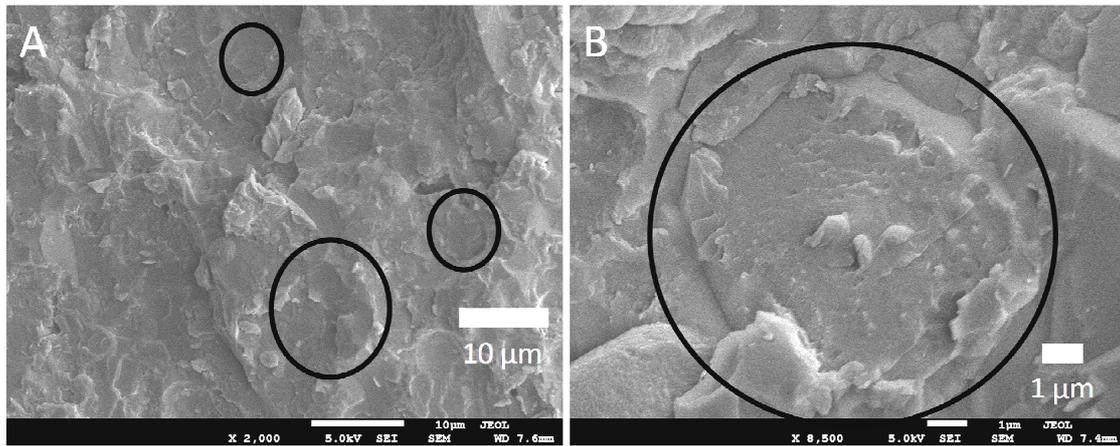
Die nachfolgende Abbildung zeigt die REM-Analyse der PVA-Mikropartikel, CK0905201201. (Abbildung 3.2-38)



**Abbildung 3.2-38 REM Aufnahme der Schnittkante von PVA-Partikeln.**

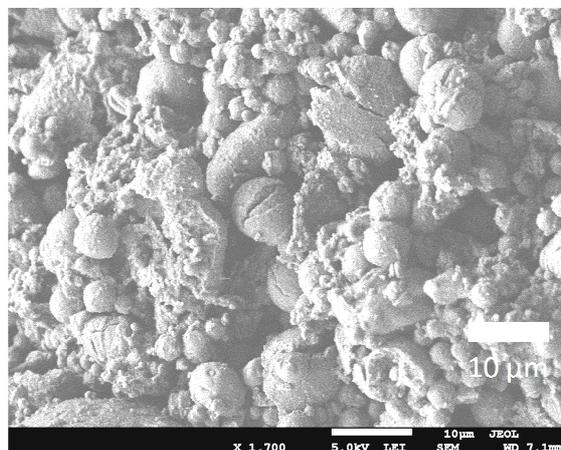
Die abgebildete Schnittkante zeigte die Wasser-PVA-Formulierung nach einer fünfminütigen Wasserbehandlung. Die Fläche der Schnittkante erschien glatt und es wurden keine sphärischen Partikel beobachtet. Die PVA-Partikel quollen bei Kontakt mit Wasser und das PVA verteilte sich homogen in der Lösung.

Im Folgenden wurden die PMMA-PVA-Partikel analysiert. (Abbildung 3.2-39).



**Abbildung 3.2-39 REM Aufnahme der Schnittkante der PMMA-PVA-Partikel (A) sowie mit einer höheren Vergrößerung (B). Die schwarzen Ellipsen rahmen einige der Umrise der Partikel ein.**

Die erhaltene Schnittkante der Kern-Hülle-Formulierung zeigte deutlich die Anwesenheit von sphärischen Strukturen, diese wurden exemplarisch markiert. Der Durchmesser der abgebildeten Struktur betrug 5 µm. Dies entsprach dem Durchmesser der Kompositpartikel. Die sphärischen Strukturen stellten die Querschnitte der PMMA-PVA-Partikel dar. Im Folgenden sind REM-Aufnahmen der PMMA-PVA-Partikel nach einer fünfminütigen Wasserbehandlung abgebildet, ohne diese zu schneiden. (Abbildung 3.2-40).



**Abbildung 3.2-40 REM Aufnahme der PMMA-PVA-Partikel nach Wasserbehandlung.**

Die Form der Partikel war deutlich zu erkennen. Weiterhin zeigten einige Partikel an ihrer Oberfläche Defekte, die vermutlich auf die Präparationsmethode zurückzuführen waren.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Stabilität der PMMA-PVA-Partikel gegenüber Wasser erfolgreich mittels Cryo-REM Aufnahmen nachgewiesen wurde. Im Vergleich mit den

unbehandelten PVA-Partikeln ergab sich, dass die sphärische Gestalt der Kern-Hülle-Partikel nach der Wasserbehandlung erhalten blieb.

### 3.2.11 Zusammenfassung

Es wurden erfolgreich PMMA-PVA-Partikel mit lebenden, immobilisierten *M. luteus* über eine kontrollierte radikalische Pffropfpolymerisation von MMA hergestellt und deren retardierender Einfluss auf die Freisetzung der Bakterien nachgewiesen.

Die Oberfläche der PVA-Partikel wurde mit einem ATRP-Initiator ausgerüstet, indem die Alkoholgruppen des PVAs mit 2-BMPiB umgesetzt wurden. Die Umsetzung wurde mittels ATR/IR-Spektroskopie verfolgt und charakterisiert. Durch Variation der Reaktionsdauer wurde der Wert des Integrals der, für den Initiator charakteristischen, IR-Bande maximiert. Das Überleben der immobilisierten *M. luteus* wurde im Anschluss an die Reaktion durch die Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen. Die Zeitspanne zwischen der Inokulation und dem Wachstum der Kolonien von *M. luteus* war unverändert und betrug, wie auch im Falle von bakterienhaltigen PVA-Partikeln, zwei Tage.

Ausgehend von den mit ATRP-Initiatoren ausgerüsteten bakterienhaltigen Hydrogelpartikeln wurde eine oberflächeninitiierte, kontrollierte, radikalische Polymerisation von MMA durchgeführt. Die erfolgreiche Polymerisation wurde durch ATR/IR-Spektroskopie nachgewiesen. Das Überleben der Bakterien während der Reaktion wurde durch die Verwendung nicht quellender Lösungsmittel und der Durchführung bei Raumtemperatur sichergestellt. Die lebenden *M. luteus* wurden anschließend sowohl in nährstoffhaltiger Lösung, als auch auf nährstoffhaltigen Agarplatten, nachgewiesen.

Die aufgepfropfte Menge an PMMA wurde variiert, indem zum einen die Reaktionsdauer und zum anderen die Menge an Initiator auf den Partikeln verändert wurden. Die Stärke der Bande der Carbonylgruppe des PMMA in den ATR/IR-Spektren korrelierte mit der Retention der Freisetzung der Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten und in Phosphatpuffer. Im Falle eines geringen Anteils an PMMA ( $Q_{1733/1438} = 0,13$ ) betrug die Freisetzungsdauer, wie auch bei Partikeln ohne PMMA, zwei Tage. Ein gesteigerter Anteil von PMMA ( $Q_{1733/1438} = 0,84$ ) führte zu einem Wachstum von Kolonien auf nährstoffhaltigen Agarplatten nach mindestens fünf Tagen. Dies entspricht einer Retention aufgrund der Polymer-Hülle von zwei Tagen. Im

Falle des höchsten Anteils des PMMAs ( $Q_{1733/1438} = 2,5$ ) wurde die Freisetzung der *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten für mindestens 23 Tage verhindert. Dies entspricht einer Retention von mindestens 21 Tagen, im Vergleich zu den PVA-Mikropartikeln. Der Nachweis von lebenden Bakterien im Inneren der Partikel wurde durch das Benetzen dieser mit nährstoffhaltigem Medium und der nachfolgenden Inokulation erbracht. Die Retention der Freisetzung der Bakterien bei Kontakt mit Phosphatpuffer betrug für diese PMMA-PVA-Partikel, unter Berücksichtigung von isolierten Freisetzungen, mindestens 20 Tage. Die Freisetzung von Bakterien aus reinen PVA-Partikeln bei Kontakt mit Phosphat-Puffer wurde nach einem Tag beobachtet.

Die PMMA-PVA-Partikel wurden mittels TGA auf ihren thermischen Abbau untersucht. In dieser Analyse wurde eine charakteristische Abbaustufe für PMMA beobachtet. Die Stufe verifiziert die ATRP Polymerisation von PMMA, da diese in einem Temperaturbereich lag, welcher charakteristisch für den „unzipping“ Mechanismus ist. Die Kern-Hülle-Struktur der PMMA-PVA-Partikel wurde erfolgreich über das MMA-FMA-Copolymer nachgewiesen. Die Fluoreszenz und die Lokalisierung des Copolymers ausschließlich an der Außenseite des Partikels, wurden mittels der Verwendung eines konfokalen Lasermikroskops bewiesen. Die Hülle umschloss den gesamten Partikel und zeigte keine Defekte. Im Falle einer Polymerisationsdauer von einer Stunde, wurde an dem abgebildeten Partikel eine Schichtdicke von ca. 300 nm und bei einer Dauer von 24 Stunden eine Dicke von ca. 600 nm gemessen.

Der Kern-Hülle-Aufbau wurde weiterhin erfolgreich durch TEM-Aufnahmen nachgewiesen. Die Hülle wurde mit Kupfer angereichert und von den Kompositen wurden Mikrotomschnitte angefertigt. In den TEM-Aufnahmen waren die Kupferablagerungen auf die Außenseite des Partikels beschränkt und bildeten dessen Hülle ab. Die Schichtdicke betrug 185 nm. Die Wasserstabilität der PMMA-PVA-Kern-Hülle-Partikel und der PVA-Mikropartikel wurde durch Cryo-REM untersucht. Die PVA-Partikel quollen bei Kontakt mit Wasser und verloren ihre Struktur. Aus diesem Grund waren keine individuellen Partikel zu beobachten. Im Gegensatz dazu behielten die PMMA-PVA-Partikel ihre sphärische Gestalt und zeigten keinen Hinweis auf eine Quellung. An der Schnittkante der REM-Aufnahmen waren die Umrisse der wasserstabilen Komposit-Partikel zu beobachten. Die Wasserstabilität der PMMA-PVA-Partikel wurde zusätzlich durch die Freisetzung von Fluorescein in wässrigem Medium verifiziert. Die Kern-Hülle-Partikel verhinderten, im Gegensatz zu den PVA-Partikeln, die Freisetzung des immobilisierten Farbstoffes. Im Vergleich hierzu wurde bei

PVA-Partikeln eine pH- und temperaturabhängige Freisetzung des Chromophors detektiert und quantifiziert.

### 3.3 Pfpfropfpolymerisation von NIPAm auf lebende Komposite

#### 3.3.1 Hypothese

Die Immobilisierung lebender Mikroorganismen mittels einer polymeren Matrix hat eine Vielzahl von positiven Effekten zur Folge. Die erhöhte Lebensdauer unter Ausschluss von Nahrung und die gesteigerte Überlebensfähigkeit gegenüber einer hohen Konzentration an toxischen Substanzen seien hier erwähnt.<sup>[75]</sup> Die Verkapselung in Hydrogele führt bei Kontakt mit Wasser zu einer unkontrollierten Freisetzung der Bakterien und verhindert eine effiziente Weiterverarbeitung der lebenden Komposite. In Abschnitt 3.2 wurde dieser Nachteil durch die oberflächeninitiierte Polymerisation von MMA neutralisiert. Die Kern-Hülle-Partikel hatten eine Retention der Freisetzung von Bakterien bei Kontakt mit Wasser zur Folge. Die verkapselten *M. luteus* überlebten die Umsetzung und bildeten bei Kontakt mit Nährstoffen Kolonien aus. In dem folgenden Abschnitt soll der Aufbau einer Polymer-Hülle analog zu dem besprochenen Verfahren durchgeführt werden. Die Verwendung von *N*-Isopropylacrylamid (NIPAm) als Monomer sollte zu dem Aufbau einer temperaturresponsiven PNIPAm Hülle führen. Der Einsatz einer responsiven Hülle sollte die zielgenaue Freisetzung der Bakterien durch einen externen Stimulus ermöglichen.

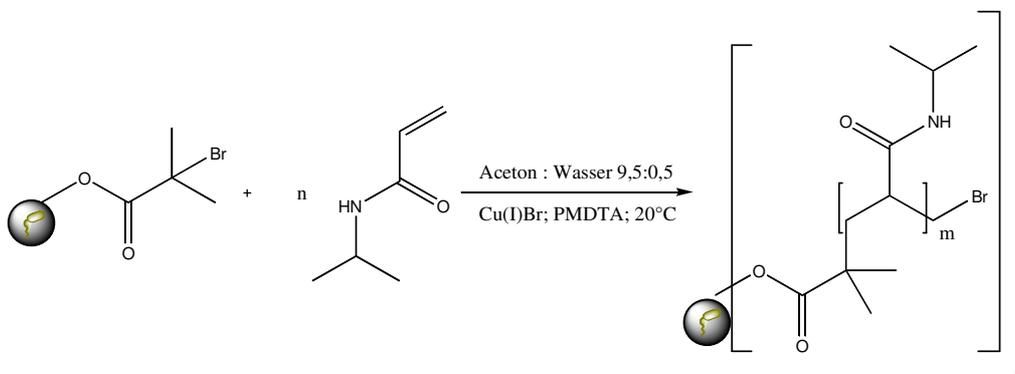
#### 3.3.2 Konzept

Analog zu den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Ergebnissen, werden die bakterienhaltigen PVA-Partikel mit dem Säurebromid des ATRP-Initiators umgesetzt und die Reaktion wird mittels ATR/IR-Spektroskopie verfolgt. Die oberflächeninitiierte kontrollierte radikalische Polymerisation soll in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Wasser durchgeführt werden.

Das Wasser beschleunigt die Polymerisation des NIPAm, kann im Gegenzug jedoch zu einer Quellung der PVA-Partikel führen. Aus diesem Grund soll das maximale Wasser-Aceton-Verhältnis bestimmt werden. Die PVA-Partikel sollen in der Lösung dispergierbar sein und die Bakterien müssen eine Lagerung in dem Gemisch für mindestens 24 Stunden überleben.

Im Anschluss an die Bestimmung des maximalen Anteils an Wasser, werden die Initiator-PVA-Partikel für die Polymerisation von NIPAm verwendet. Die Reaktionsprodukte werden mittels ATR/IR-Spektroskopie charakterisiert. Es wird erwartet, dass die Intensität der Amid-Doppelbande des PNIPAm bei einer Wellenzahl von 1650 und 1543  $\text{cm}^{-1}$  von der Reaktionsdauer abhängig ist.<sup>[155]</sup> Das Überleben der immobilisierten *M. luteus* wird durch die Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten verifiziert. Das Wachstum von charakteristischen, gelben Kolonien von *M. luteus* soll das Überleben der Bakterien im Inneren der Partikel beweisen.

Das nachfolgende Schema fasst die beschriebene Vorgehensweise zusammen. (Schema 3.3-1)



Schema 3.3-1 Reaktionsschema der Pfropfung mit PNIPAm.

### 3.3.3 Überlebenstest in Aceton-Wasser-Lösungen

In dem folgenden Abschnitt wird die Überlebensfähigkeit von in PVA-Mikropartikeln immobilisierten *M. luteus* in einer Aceton-Wasser-Lösung untersucht. Da die Zugabe von Wasser zu einer Beschleunigung der ATRP von NIPAm führt, wird dieses ausgenutzt. Hierfür wurde als erster Schritt das optimale Aceton: Wasser-Volumen Verhältnis bestimmt. Die PVA-Mikropartikel quellen bei Kontakt mit Aceton nicht und die verkapselten Bakterien sind gegenüber dem Lösungsmittel geschützt. Der Kontakt mit Wasser führt zu einer Quellung des Partikels und dies führt zu einer Freisetzung der Bakterien, vgl. Abschnitt 3.2. Das optimale Verhältnis der Lösungsmittel soll daher zum einen die Reaktion beschleunigen und zum anderen das Quellen der Partikel verhindern.

Die bakterienhaltigen Partikel wurden in Aceton-Wasser-Lösungen mit einem steigenden Anteil an Aceton für 24 Stunden gelagert und die Suspensionen wurden auf ihre

Dispergierbarkeit getestet. Der Verlust dieser Eigenschaft wurde als Hinweis auf eine Quellung gedeutet. Im Anschluss an die Lagerung wurden die Partikel für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Es wird erwartet, dass im Falle des Überlebens der Bakterien diese nach Inkubation charakteristische gelbe Kolonien ausbilden.

Die Zugabe der Partikel zu einer Aceton-Wasser-Mischung mit einem Verhältnis von über 7: 3 führte zu einem Verlust der Dispergierbarkeit. Die anschließende Inokulation der nährstoffhaltigen Agarplatten erbrachte, nach einer Inkubation von über 72 Stunden bei 37 °C, kein Wachstum von Kolonien.

Die Erhöhung des Anteils an Aceton auf ein Verhältnis von 8: 2 und 9: 1, führte zu einer Dispergierbarkeit der Partikel, die anschließende Inokulation und Inkubation von Agarplatten führte zu keinem Wachstum von Bakterien.

Im Falle eines Verhältnisses von Aceton zu Wasser von 9,5: 0,5 und 10: 0 war die Dispergierbarkeit der Partikel mit verkapselten Bakterien vorhanden. Die PVA-Mikropartikel wurden für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet und in beiden Fällen wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen. (Tabelle 3.3-1)

**Tabelle 3.3-1 Test auf das Überleben von immobilisierten Bakterien in PVA-Partikeln gegenüber Aceton-Wasser Mischungen.**

Aceton /mL	Wasser /mL	Dispergierbarkeit	Lebende <i>M. luteus</i>
6	4	- <sup>a)</sup>	- <sup>c)</sup>
7	3	-	-
8	2	+ <sup>b)</sup>	-
9	1	+	-
9,5	0,5	+	+ <sup>d)</sup>
10	0	+	+

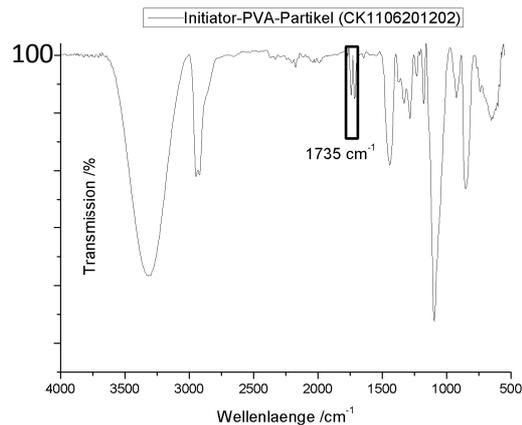
<sup>a)</sup>Es wurde keine Dispersion erhalten; <sup>b)</sup>Es wurde eine Dispersion erhalten, <sup>c)</sup>Es wurde kein Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten beobachtet; <sup>d)</sup>Es wurden lebende, immobilisierte Bakterien nachgewiesen.

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die PVA-Partikel die immobilisierten Bakterien bis zu einem Aceton-Wasser-Verhältnis von 9,5:0,5 von der Lösung abschirmten. Die nachfolgenden Reaktionslösungen werden daher dieses Verhältnis nicht überschreiten.

### 3.3.4 Oberflächeninitiierte ATRP von NIPAm

Die Ausrüstung bakterienhaltiger PVA-Partikel mit einer, über ATRP synthetisierten, hydrophoben PMMA-Hülle wurde bereits in Abschnitt 3.2 ausführlich diskutiert. Die Umsetzung der peripheren Alkoholgruppen der PVA-Partikel mit 2-Brom-2-methylpropionbromid (2-BMPiB) und der anschließenden „grafting from“ Polymerisation wird nachfolgend analog durchgeführt. Es wird erwartet, dass die Verwendung von NIPAm als Monomer zu einer PNIPAm-Hülle führt. Die Architektur der PNIPAm-PVA-Partikel sollte dem Aufbau der PMMA-PVA-Partikel entsprechen. Das Polymer PNIPAm als Hüllkomponente wurde aufgrund seiner Eigenschaft als LCST-Polymer gewählt, da es eine temperaturabhängige Schaltung der Hülle ermöglichen sollte. Dies sollte unterhalb der LCST zu hydrophoben und oberhalb der LCST zu hydrophilen Partikeln führen. Im Falle einer Temperatur unterhalb der LCST sollten die Polymerketten kollabieren und eine hydrophobe Sperrschicht an der Partikeloberfläche ausbilden. Die Überschreitung der LCST sollte eine Änderung der Konformation der Ketten zur Folge haben. Die Ketten sollten eine maximale Benetzung mit Wasser anstreben und als Folge dessen sollte dies in einer Konformationsänderung resultieren. Dies wiederum sollte eine Quellung des PVA-Kerns bedingen und daher zu einer Freisetzung des immobilisierten Materials führen.

Die PVA-Partikel mit immobilisierten *M. luteus* wurden bei Raumtemperatur mit dem Initiator versetzt. Das nachfolgende ATR/IR-Spektrum zeigt das Reaktionsprodukt einer 47 stündigen Umsetzung. (Abbildung 3.3-1)

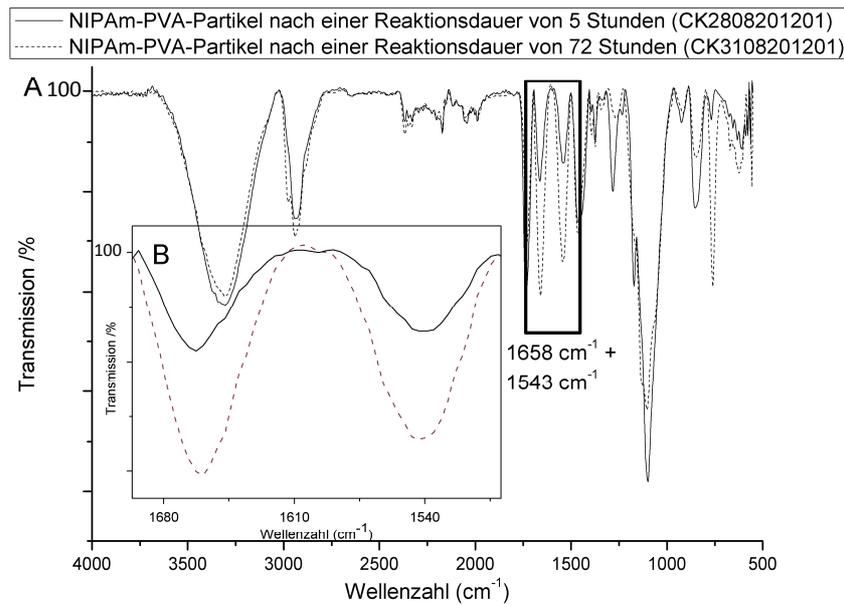


**Abbildung 3.3-1 ATR/IR Spektrum von Initiator-PVA-Partikel (CK1106201202).**

Die Umsetzung der Alkoholgruppen wurde erfolgreich durchgeführt, die Streckschwingung der Carboxygruppe des Initiators bei einer Wellenzahl von  $1735\text{ cm}^{-1}$  war deutlich zu beobachten. Die Initiator-PVA-Partikel wurden für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Nach einer Inkubationsdauer der Agarplatten von 48 Stunden, wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet. Die immobilisierten Bakterien überlebten die Umsetzung und die Dauer des Wachstums war im Vergleich mit den unbehandelten Partikeln nicht verlängert.

Die Initiator-Partikel wurden im Folgenden für die oberflächeninitiierte Polymerisation von NIPAm verwendet. Das Aceton-Wasser Verhältnis der Reaktionslösung wurde, unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.3, auf einen Volumen-Anteil von 9,5 zu 0,5 eingestellt.

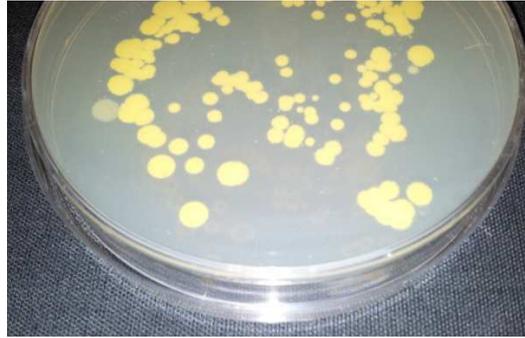
Die Polymerisation wurde zum einen nach fünf Stunden (CK2808201201) und zum anderen nach 72 Stunden, (CK3108201201) abgebrochen. Das nachfolgende ATR/IR-Spektrum fasst die erhaltenen Spektren zusammen. (Abbildung 3.3-2).



**Abbildung 3.3-2 Überlagerung der ATR/IR Spektren von NIPAm-PVA-Partikeln nach einer Reaktionsdauer von 5 und 72 Stunden (A). Der Bereich der Amid-Doppelschwingung wurde vergrößert und die unterschiedlichen Intensitäten der Proben sind deutlich zu beobachten (B).**

Die charakteristische Doppelbande der Amid Streckschwingung des PNIPAm bei einer Wellenzahl von  $1658\text{ cm}^{-1}$  und  $1543\text{ cm}^{-1}$  war in beiden Proben deutlich zu erkennen. Die Bande bei einer Wellenzahl von  $1658\text{ cm}^{-1}$  wurde durch die Streckschwingung der sekundären Amid C=O Gruppe und die Bande bei  $1543\text{ cm}^{-1}$  wurde durch die N-H Deformationsschwingung verursacht.<sup>[155]</sup> Im Vergleich der Spektren wurde beobachtet, dass im Falle einer 72 Stunden Polymerisationsdauer die Absorption der Amid-Doppelschwingung höher war.

Im Anschluss an die Umsetzung wurden die Partikel für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Agarplatten wurden bei einer Temperatur von  $37\text{ °C}$  für 11 Tage inkubiert. Im Falle einer Polymerisationsdauer von fünf Stunden wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach 10 Tagen beobachtet. (Abbildung 3.3-3)



**Abbildung 3.3-3** Wachstum von Kolonien von in PNIPAm-PVA-Partikeln immobilisierten *M. luteus*.

Die PNIPAm-PVA-Partikel mit einer Reaktionsdauer von 72 Stunden brachten nach einer Inkubationsdauer von 18 Tagen kein Wachstum von *M. luteus* hervor, aus diesem Grund wurden die Partikel mit nährstoffhaltiger Lösung versetzt. Im Anschluss an die Benetzung wurden die Partikel für die Inokulation von weiteren nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Es wurde nach einer 72 stündigen Inkubation der Agarplatten das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die oberflächeninitiierte Polymerisation von NIPAm erfolgreich durchgeführt wurde. Die Reaktion wurde mittels ATR/IR-Spektroskopie verifiziert und eine Zeitabhängigkeit der Intensität der Amid-Doppelschwingung wurde festgestellt. Die immobilisierten *M. luteus* überlebten die Umsetzung und es wurden lebende Bakterien auf nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen.

### **3.3.5 Zusammenfassung**

Es lässt sich zusammenfassen, dass die oberflächeninitiierte kontrollierte radikalische Polymerisation von NIPAm bei Anwesenheit von Wasser erfolgreich durchgeführt wurde und dass die immobilisierten Bakterien diesen Prozess überlebt haben. Die PVA-Mikropartikel schützen die immobilisierten *M. luteus* vor einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln. Dieser Schutz beruht auf dem Kollabieren des Polymers und der damit verbundenen Ausbildung einer durchgehenden Sperrschicht. In dem vorliegenden Abschnitt wurde der maximale Anteil an Wasser in einer Acetonlösung evaluiert bei dem die PVA-Partikel die verkapselten Bakterien abschirmen. Der Volumen-Anteil an Wasser in Aceton betrug 0,5 zu 9,5. Im Anschluss an die erfolgreich durchgeführte Umsetzung des 2-BMPiB mit den Partikeln wurden diese für eine ATRP von NIPAm verwendet. Die Polymerisation in

Anwesenheit von Wasser wurde mittels ATR/IR-Spektroskopie analysiert. Die Auswertung der ATR/IR-Spektren verifizierte die erfolgreiche Reaktion und bestätigte die Zeitabhängigkeit der Intensität der Amid-Doppelbande des PNIPAm. Im Anschluss an die Umsetzung wurden lebende Bakterien im Inneren der Partikel durch Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Charakterisierungen von bakterienhaltigen, responsiven Polymer-PVA-Partikeln. Das Polymer PNIPAm besitzt eine LCST und dieses Verhalten sollte sicherlich in weiteren Analysen der Hülle auch nachvollzogen werden können. Es sollte weiterhin möglich sein, durch die Verwendung maßgeschneiderter Monomere, die Responsivität der Hülle gezielt einzustellen. Als Beispiel sei hier die Verwendung von Acrylsäure für den Aufbau einer pH-responsiven Hülle erwähnt. Weiterhin wurde die Verwendung von Wasser als Bestandteil der Reaktionslösung erörtert, dies ermöglicht es in weiteren Experimenten die Bibliothek auf wasserlösliche Monomere auszuweiten.

### 3.4 Immobilisierung von *M. luteus* in PVA-Mikrofasern

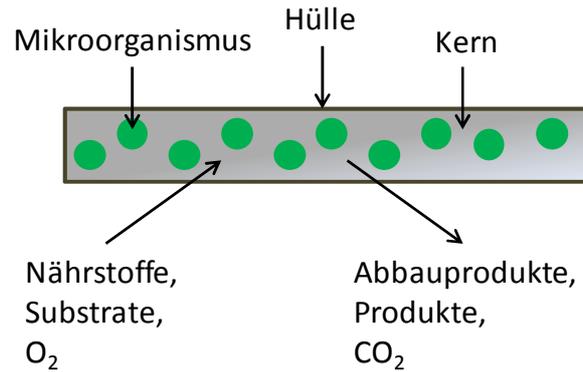
#### 3.4.1 Hypothese

Der Einsatz von funktionalen, immobilisierten biologischen Einheiten ist für verschiedene Anwendungen von großem Interesse. Stellvertretend seien der Agrarbereich, die Bioremediation von Trinkwasser, die Biokonversion und die Optimierung von MBZ erwähnt. Die Trennung der verkapselten Mikroorganismen von dem Substrate während des Einsatzes dieser Bioreaktoren ist von großer Bedeutung, da die Endprodukte möglichst nicht kontaminiert werden sollen. Insbesondere in der Behandlung von Trinkwasser ist diese Separation von entscheidender Bedeutung.<sup>[47]</sup>

Die Verkapselung von Mikroorganismen in Hydrogelen ist Gegenstand aktueller Forschung.<sup>[164, 47]</sup> Die Immobilisierung erhält, unter Berücksichtigung verschiedener Parameter, deren Viabilität und Funktionalität. Einer der Nachteile dieser Methode ist die Freisetzung der Mikroorganismen bei Kontakt der Komposite mit Wasser. Es ist daher notwendig, wasserstabile Komposite durch Nachbehandlung zu erhalten.

Die Wasserbeständigkeit des Komposits soll durch eine hydrophobe Beschichtung erreicht werden. Ein solches Kern-Hülle-System vereint die Möglichkeit, lebende funktionale Bakterien zu verwenden, ohne dass eine Kontamination der wässrigen Umgebung eintritt. Eine Modifikation der Schichtdicke ermöglicht es zudem die Permeabilität des Systems den erforderlichen Parametern anzupassen. Im Folgenden wird daher ein Kern-Hülle-System auf Basis von PVA-Fasern und einer hydrophoben PPX-Hülle verwendet. Als funktionales Bakterium wurde *Micrococcus luteus* gewählt, da dieses in der Lage ist, Metallionen aus wässriger Umgebung zu sequestrieren. Ein möglicher Einsatz in der Bioremediation ist daher vorstellbar.

Die nachfolgende Abbildung stellt schematisch die Mikroumgebung der immobilisierten Bakterien dar. (Abbildung 3.4-1)

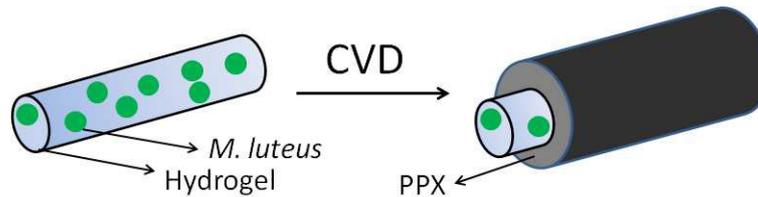


**Abbildung 3.4-1** Schematische Abbildung der bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern. Der prinzipielle Eintritt von Nährstoffen und Substraten und der Austritt von Stoffwechselendprodukten und Produkten ist dargestellt.

### 3.4.2 Konzept

Im folgenden Kapitel wird die Immobilisierung von *M. luteus* in PVA-Mikrofasern und deren Weiterverarbeitung zu wasserstabilen, funktionalen Kern-Hülle-Fasern untersucht. Die verwendeten Bakterien werden die Faserherstellung durch das Nassspinnverfahren überleben. Ihre Viabilität wird durch Inkubation und Inokulation von Agarplatten mit Nährstoffen getestet.

Die in den PVA-Mikrofasern immobilisierten Bakterien werden nach Kontakt mit Wasser auf Grund der Quellung der Faser freigesetzt. Für die Herstellung eines wasserstabilen Komposits soll daher eine zusätzliche hydrophobe Hülle aufgebracht werden. Die Modifizierung wird mittels der chemischen Gasphasenabscheidung von PPX erreicht. Das PVA soll die Bakterien gegenüber dem CVD Prozess abschirmen und so die Lebensfähigkeit der Bakterien erhalten. Die PPX-Schicht wird durch Pyrolyse von [2,2]Paracyclophan auf die Oberfläche aufgebracht und die Variation der Schichtdicke erfolgt über die eingesetzte Menge des Vorläufer-Moleküls. Die Kern-Hülle-Fasern sollten gegenüber Wasser stabil sein und eine Freisetzung der immobilisierten Bakterien in wässriger Umgebung verhindert. Die Funktionalität der verkapselten Bakterien wird durch die reduktive Umsetzung von Resazurin überprüft, dessen Umsatz wird mittels UV/VIS-Spektroskopie verfolgt. Zusätzlich wird der Einfluss der PPX-Schichtdicke untersucht. Die nachfolgende Abbildung stellt die Ausrüstung der Hydrogel-Fasern mit PPX schematisch dar. (Abbildung 3.4-2)



**Abbildung 3.4-2 Schematische Darstellung der Ausrüstung der Hydrogel-Fasern mit PPX.**

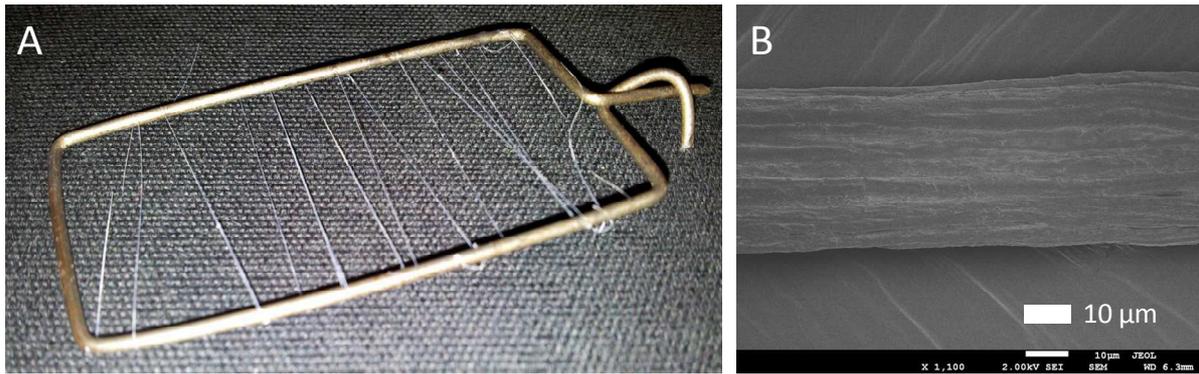
*M. luteus* ist in der Lage Metallionen aus einer wässrigen Lösung zu sequestrieren. Die Aufrechterhaltung dieser Funktion im immobilisierten Zustand soll im Folgenden am Beispiel von Gold-Ionen demonstriert werden.

Die Abnahme des Goldgehaltes der Lösung aufgrund der Inokulation mit dem Komposit, wird durch ICP-MS bestimmt. Der Nachweis des Goldes in den Fasern wird über eine EDX-Analyse erbracht. Das abgeschiedene Gold in den Fasern wird mittels TEM lokalisiert und deren Gestalt charakterisiert. Es wird erwartet, dass die Sequestrierung des Goldes auf die Bakterien zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass das Metall unmittelbar an und in den Bakterien detektiert wird.

Das Konzept der Immobilisierung von Bakterien in Hydrogel-Mikrofasern und der Beschichtung mit PPX wurde bereits in Vorversuchen in unserer Gruppe erarbeitet.<sup>[165, 166]</sup>

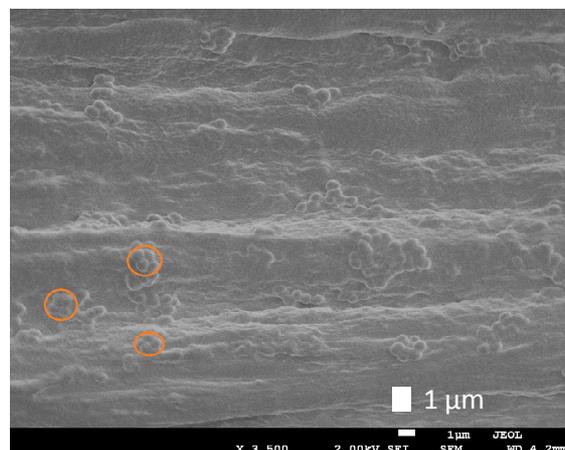
### 3.4.3 Immobilisierung von Bakterien in PVA-Mikrofasern

Die Mikrofasern mit immobilisierten Bakterien wurden hergestellt, indem 5 mL einer sterilen, wässrigen 7,5 gew.% Lösung PVA mit 800 mg *M. luteus* homogen gemischt und anschließend in eine Pasteurpipette gefüllt wurden. Die Pipette wurde mit der Spitze in ein Fällungsbad aus Aceton eingebracht und das ausgefallene Polymer wurde mit einer konstanten Kraft durch das Fällungsbad gezogen. Die entstandenen Fäden wurden auf einen Metallträger parallel und isoliert voneinander aufgebracht und unter sterilen Bedingungen bei 4 °C bis zur weiteren Nutzung gelagert. (Abbildung 3.4-3)



**Abbildung 3.4-3** Abbildung des Trägers mit PVA-Mikrofasern (A). REM-Aufnahme einer PVA-Mikrofaser (B).

Die Gestalt der Fasern wurde mittels REM untersucht. Die Fasern besaßen eine zylindrische Form und ihr Durchmesser betrug im Mittel  $50\ \mu\text{m}$  (SD  $15\ \mu\text{m}$ ).<sup>[166]</sup> Es wurden auf der Faseroberfläche sphärische Verdickungen mit einem Durchmesser im Bereich von  $1\ \mu\text{m}$  gefunden. Diese waren immobilisierte *M. luteus*, da unter anderem Tetraden der Verdickungen beobachtet wurden. Die Bildung von Tetraden ist ein charakteristisches Merkmal für *M. luteus*, zudem entspricht ein Durchmesser von  $1\ \mu\text{m}$  den in der Literatur bekannten Dimensionen.<sup>[167]</sup> Die Lokalisation von Bakterien in den Mikrofasern durch Färbeversuche wurde an anderer Stelle durchgeführt.<sup>[166]</sup> (Abbildung 3.4-4)



**Abbildung 3.4-4** REM-Aufnahme einer bakterienhaltigen PVA-Mikrofaser; es wurden einige der sphärischen Strukturen gekennzeichnet.

Die immobilisierten Bakterien wurden auf ihre Überlebensfähigkeit in den PVA-Mikrofasern untersucht. Hierfür wurden Agarplatten mit Nahrung mit den immobilisierten *M. luteus* inokuliert. Die Fasern wurden von den Trägern entnommen und auf die Platten aufgebracht, anschließend wurden die Platten für 72 Stunden bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Bildung von

charakteristischen gelben Kolonien von *M. luteus* wurde ausschließlich entlang der Faserachse beobachtet. Die PVA-Fasern quollen durch den Wasserfilm auf den Platten auf und die Bakterien wurden freigesetzt. Das Wachstum der Bakterien auf den Agarplatten war auf die verfügbaren Nährstoffe in der Platte zurückzuführen. Das Wachstum der Kolonien bewies, dass die Bakterien die Immobilisierung durch das Nassspinnen überlebten und für die weitere Verarbeitung geeignet waren. (Abbildung 3.4-5)



**Abbildung 3.4-5** Wachstum von in PVA-Mikrofasern immobilisierten Bakterien nach Inkubation einer nährstoffhaltigen Agarplatte.

### 3.4.4 Oberflächenmodifikation mit CVD

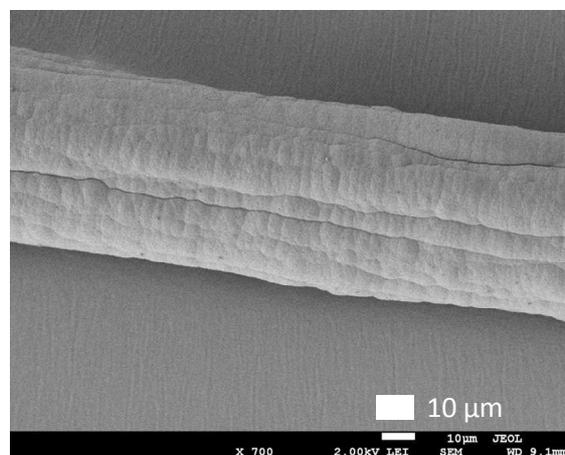
Die erfolgreiche Verkapselung von lebenden Bakterien in PVA-Mikrofasern wurde im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Die Immobilisierung von *M. luteus* in PVA-Mikrofasern ermöglicht die Integration der lebenden Komposite in hierarchische Strukturen. Im vorliegenden Fall war dies die parallele Anordnung der Fasern auf einem Träger. Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben ist eine strikte Trennung der immobilisierten Mikroorganismen vom umgebenden Medium in bestimmten Bereichen notwendig. Die PVA-Mikrofasern sind gegen Wasser labil, da sie quellen und die verkapselten Bakterien somit freigesetzt werden. Für die Herstellung eines wasserbeständigen Komposits sollte mittels der chemischen Gasphasenabscheidung eine PPX-Schicht auf den PVA-Fasern abgeschieden werden. PPX zeichnet sich unter anderem durch seine Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln und Wasser aus.<sup>[149]</sup> Die Beschichtung wurde aufgebracht, indem die Träger mit PVA-Fasern und verkapselten Bakterien in die Abscheidungskammer eingebracht und der CVD-Prozess nach Gorham durchgeführt wurde.<sup>[149]</sup> Die Permeabilität der PPX-Schicht ist von ihrer Dicke

abhängig. Durch die Variation der Menge an [2,2]Paracyclophan wurden unterschiedliche Schichtdicken hergestellt.<sup>[168]</sup> Die Schichtdicken wurden mit einem Profilometer ermittelt und sind in Tabelle 3.4-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.4-1 Auflistung der Mikrofasern nach PPX Schichtdicke und nach Verwendung.**

Probe	Gesamtdicke der Beschichtung / $\mu\text{m}$	Verwendung
PVA	0	Umsetzung von Resazurin
PPX1	1,2	Umsetzung von Resazurin
PPX2	4,3	Umsetzung von Resazurin
PPX3	5,4	Umsetzung von Resazurin, REM
PPX4	4,5	Sequestrierung von Gold
PPX5	5,4	Sequestrierung von Gold
PPX6	4,2	Freisetzung von Fluorescein

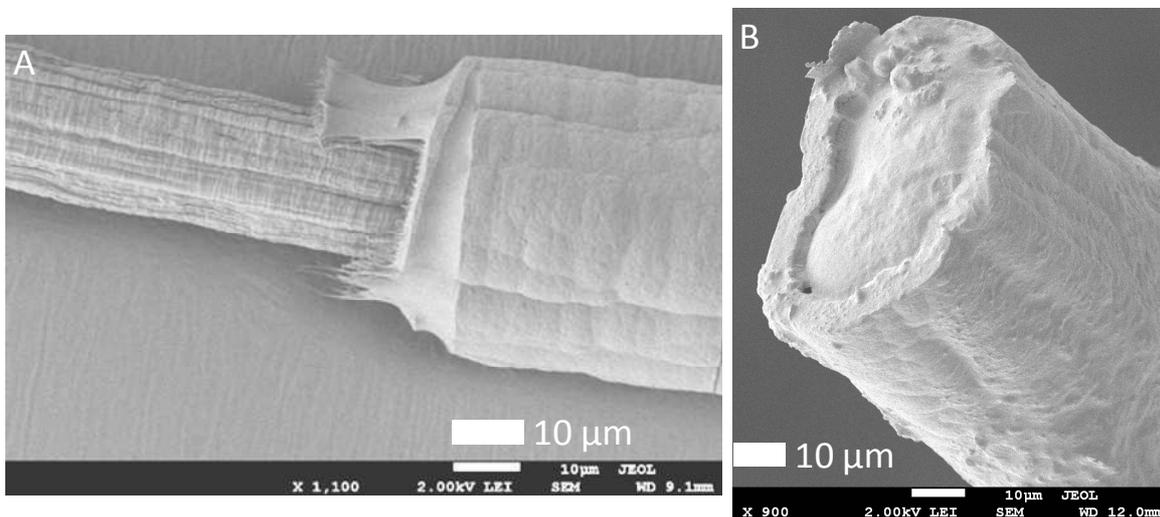
Die Kern-Hülle-Fasern wurden im Anschluss an die Beschichtung durch REM charakterisiert. Die Fasern lagen nach der Beschichtung intakt vor und zeigten keine Deformationen, weiterhin zeigte sich eine gleichmäßige und die Oberflächenstruktur der Faser abbildende PPX-Schicht. (Abbildung 3.4-6)



**Abbildung 3.4-6 REM-Aufnahme einer PPX-PVA-Mikrofaser.**

Die auf der Oberfläche der Fasern angeordneten Bakterien waren nach der Beschichtung nicht mehr zu identifizieren. Die sphärischen Verdickungen waren zudem durch die Beschichtung verursacht worden.<sup>[169, 170]</sup>

Der Durchmesser der Kern-Hülle-Fasern betrug 51  $\mu\text{m}$  und lag damit nur gering über dem Durchmesser der unbeschichteten Fasern. Die Kern-Hülle-Struktur wurde mittels eines Faserquerschnitts charakterisiert. Die Abbildung 3.4-7 zeigt diese Struktur. Der Faserkern war vollständig von der PPX-Hülle umgeben. Zusätzlich wurden die Kern-Hülle-Fasern für 24 Stunden in Wasser eingebracht und anschließend verstreckt. Der PVA-Kern und die PPX-Hülle waren deutlich zu erkennen. Die PPX-Schicht lag nach der Wasserbehandlung unbeschädigt vor.



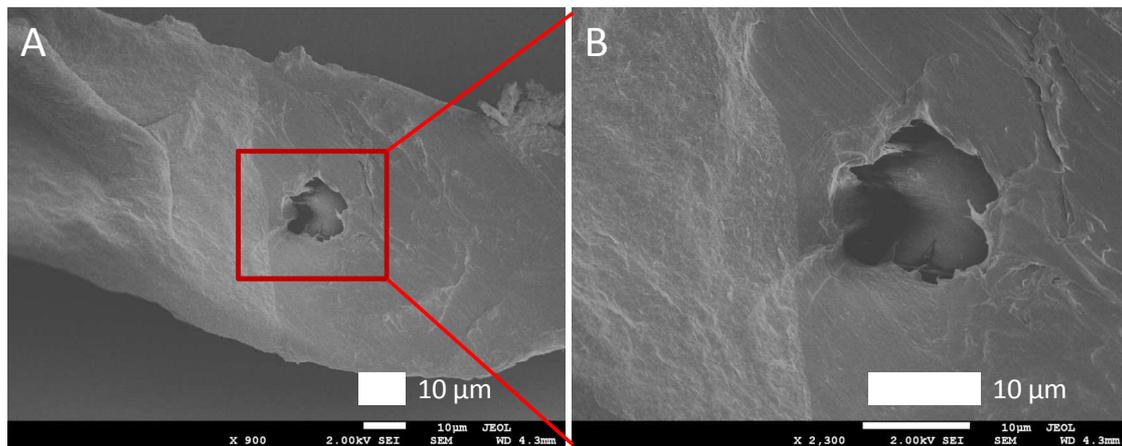
**Abbildung 3.4-7 REM-Aufnahme einer PPX-PVA-Faser nach Einlegen in Wasser und Ausübung eines Zugs in Richtung der Faserachse (A). Querschnittsaufnahme einer PPX-PVA-Faser (B).**

### 3.4.5 Nachweis von lebenden immobilisierten Bakterien nach CVD

Im Anschluss an die Herstellung der Kern-Hülle-Fasern wurden die immobilisierten Bakterien auf ihre Viabilität getestet. Die Fasern wurden nach der Beschichtung in eine Nährlösung eingebracht und diese bei 37 °C für 72 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die überstehende Lösung zur Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten genutzt. Bei allen Schichtdicken, d.h. 1,2, 4,3 und 5,4  $\mu\text{m}$ , wurden lebende *M. luteus* durch das Wachstum von Kolonien nachgewiesen.

Die PVA-Mikrofasern schützten die Bakterien gegenüber den Bedingungen des Prozesses, unter anderem den Unterdruck von ca. 65 mbar und die Anwesenheit von radikalischen Intermediaten, und erhielten dadurch deren Lebensfähigkeit.

Im Anschluss an das Einbringen der Kern-Hülle-Fasern in die Nährlösung wurden die Fasern mittels REM untersucht. Die Fasern lagen nach der Wasserbehandlung unverändert vor, jedoch wurden Risse in der Beschichtung beobachtet und es wurde eine kreisförmige Beschädigung mit einem Durchmesser von 10 µm in einer Faser erkannt. (Abbildung 3.4-8)



**Abbildung 3.4-8 REM-Aufnahme einer PPX-PVA-Mikrofaser mit immobilisierten Bakterien nach Inkubation einer Nährlösung (A). Vergrößerung eines Ausschnitts der Aufnahme, es wurde ein Defekt in der Faseroberfläche beobachtet (B).**

Aufgrund der Ergebnisse war davon auszugehen, dass der Nachweis der Bakterien in Lösung auf die Freisetzung von Bakterien aus der Faser zurückzuführen war. Die Freisetzung könnte auf zwei Wegen geschehen sein. Zum einen könnte die Beschichtung nicht vollständig gewesen sein, wodurch nicht eingeschlossene Bakterien freigesetzt wurden. Da diese in der Lage sind sich in Anwesenheit von Nährstoffen zu vermehren, kann dies und dies zu einem positiven Nachweis führen.

Zum anderen könnte das Einbringen der Fasern in die Nährlösung dazu geführt haben, dass sowohl Wasser als auch Nährstoffe in die Faser migriert sind. Dies erzeugte eine Quellung der Fasern und ermöglichte eine Reproduktion der immobilisierten Bakterien. Der Innendruck der Bakterien, der sogenannte Turgordruck, beträgt bis zu 20 bar. Dieser Druck während der Zellteilung reichte aus, um die Fasern zu zerstören.<sup>[159]</sup> Nach der Zerstörung der Fasern könnten die Bakterien in die umgebende Lösung freigesetzt worden sein und somit zu einen

positiven Nachweis geführt haben. Die im Vorhinein beschriebene kreisrunde Beschädigung könnte hierdurch verursacht worden sein.

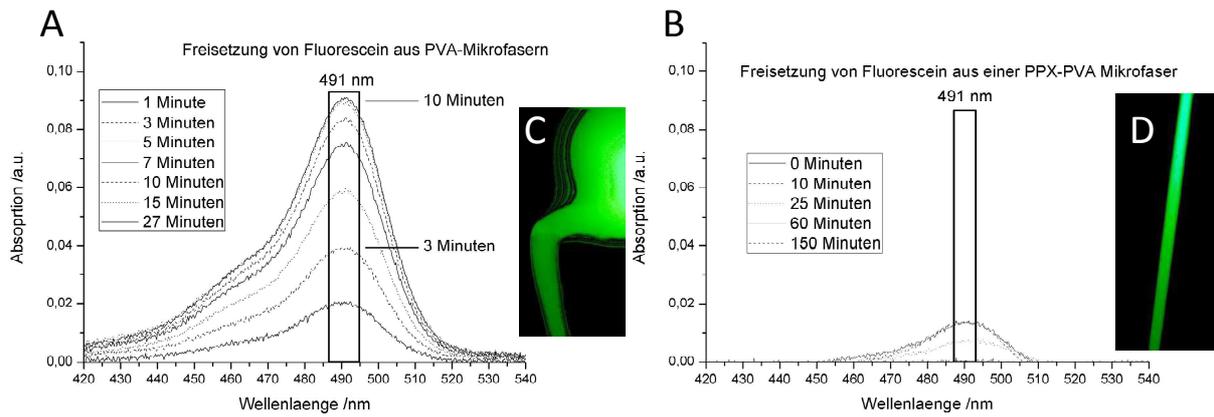
### 3.4.6 Permeabilität der Kern-Hülle-Fasern

Die Permeabilität der Kern-Hülle-Fasern in wässrigem Medium bei pH 7 wurde mittels der Freisetzung von verkapseltem Fluorescein untersucht. Das Fluorescein wurde in PVA-PPX-Mikrofasern eingebracht und diese im Anschluss mit PPX beschichtet. Die Freisetzung des Farbstoffes wurde im Falle einzelner Fasern mittels eines optischen Mikroskops mit einem Anregungswellenlängenbereich von  $\lambda = 450 - 490$  nm untersucht. Die unbeschichteten PVA-Fasern wird wasserlabil sein und das Fluorescein sollte bei Kontakt mit Wasser freigesetzt werden, als Konsequenz wäre der Farbstoff außerhalb der Faser detektierbar. Im Falle der PPX-PVA-Fasern sollte die hydrophobe PPX-Schicht die Faserstruktur gegenüber Wasserzugabe erhalten und die Freisetzung des Fluorescein wäre gehindert.

Die PVA-Fasern mit verkapseltem Fluorescein wurden vor der Zugabe von Wasser analysiert. Der Farbstoff war ausschließlich im Inneren der Faser lokalisiert. Nach der Zugabe von Wasser verlor die Faser ihre Struktur und das Fluorescein wurde freigesetzt. (Abbildung 3.4-9)

Das verkapselte Fluorescein in der PPX-PVA-Faser wurde vor Wasserzugabe nur im Inneren detektiert. Die Faser zeigte nach der Zugabe von Wasser keine Auflösung und die isolierte Faser war im Wasser deutlich zu erkennen. Weiterhin wurde das Fluorescein ausschließlich entlang der Faserachse detektiert. (Abbildung 3.4-9) Die PPX-Beschichtung mit einer Schichtdicke von  $4,2 \mu\text{m}$  verhinderte den Eintritt von Wasser in die Faser und das Fluorescein wurde nicht freigesetzt.

Die Freisetzung des Fluorescein wurde zusätzlich mittels UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert. Hierdurch war es möglich, Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Freisetzung bei beschichteten und unbeschichteten Fasern zu erhalten. Die Fasern wurden in eine Phosphatpufferlösung eingebracht und die Änderung der Absorption der Lösung wurde detektiert. Das Absorptionsmaximum des Fluorescein lag im Falle einer Lösung von pH 7 bei  $\lambda = 491$  nm.



**Abbildung 3.4-9** Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Freisetzung von Fluorescein in wässriger Lösung aus PVA Mikrofasern (A). Überlagerung der UV/VIS Spektren der Freisetzung von Fluorescein aus PPX-PVA-Mikrofasern in wässriger Lösung (B). Lichtmikroskopische Aufnahmen einer PVA-Mikrofaser mit immobilisiertem Fluorescein nach Wasserzugabe (C). Lichtmikroskopische Aufnahmen einer PPX-PVA-Mikrofaser mit immobilisiertem Fluorescein nach Wasserzugabe mit einem Anregungswellenlängenbereich von 450 – 490 nm (D).

Im Falle der PVA-Fasern wurde nach einer Minute eine deutliche Freisetzung des Farbstoffes in die Lösung beobachtet. Nach fünf Minuten wurde bereits die Hälfte der maximalen Absorption erreicht und nach zehn Minuten wurde die maximale Konzentration von Fluorescein in Lösung ermittelt. (Abbildung 3.4-9) Das Freisetzungsverhalten der Faser entsprach einem „burst release“, d.h. einer unkontrollierten und schnellen Freisetzung. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die Freisetzung von Materialien, die gleichförmig in einer Matrix verteilt sind.<sup>[171]</sup> Die maximale Konzentration von Fluorescein in Lösung wurde auf  $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  bestimmt.

Das Freisetzungsverhalten im Falle der PPX-PVA-Fasern mit einer Schichtdicke von  $4,2 \mu\text{m}$  unterschied sich stark von dem der PVA-Fasern. Der Farbstoff wurde nach 10 Minuten nur in geringer Konzentration freigesetzt und nach 150 Minuten wurde ein Maximum von  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  detektiert. (Abbildung 3.4-9)

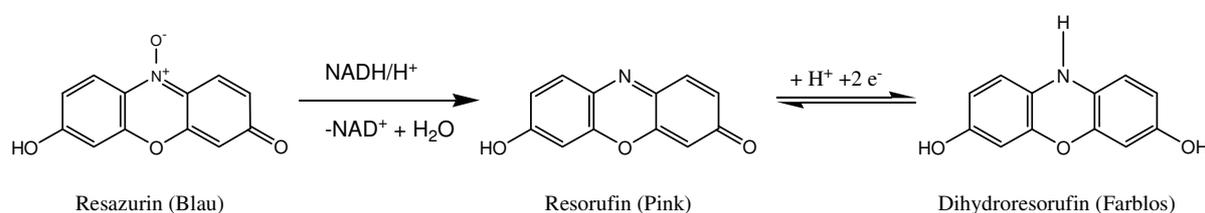
Die zusätzliche PPX-Schicht hatte direkten Einfluss auf das Freisetzungsverhalten der PVA-Faser. Die hydrophobe Hülle verminderte die Freisetzungsgeschwindigkeit des Systems in wässriger Umgebung und die Faserstruktur blieb, im Gegensatz zu der PVA-Faser, nach der Wasserbehandlung erhalten.

### 3.4.7 Nachweis der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Bakterien

Die Funktionalität der lebenden Komposite hängt von der Erhaltung der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Bakterien ab. Im vorherigen Abschnitt wurde erfolgreich das Überleben der Bakterien nach der Verkapselung in Kern-Hülle-Fasern bewiesen. Einige potentielle Anwendungsgebiete der Bioreaktoren, z.B. die Trinkwasserbehandlung, setzen zwingend eine strikte Trennung zwischen den biologischen Systemen vom umgebenden Medium voraus.<sup>[86]</sup> Aus diesem Grund soll nachfolgend zum einen die enzymatische Aktivität der verkapselten Bakterien getestet, zum anderen wird die Freisetzung der Mikroorganismen aus den Kompositen überprüft werden.

Die Überprüfung der Aktivität von *M. luteus* wird durch die Umsetzung von Resazurin, blau, zu Resorufin, rosa, verfolgt. Resazurin ist eine literaturbekannte Testsubstanz zur Bestimmung der Zellviabilität und der enzymatischen Aktivität biologischer Systeme.<sup>[172–175]</sup>

Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin ist nicht der letztmögliche Reaktionsschritt, die weitere Reduktion von Resorufin führt zu Dihydroresorufin. Dieses ist farblos und wurde in nachfolgenden Experimenten nicht detektiert. Im Folgenden ist die Reduktion von Resazurin zu Resorufin zu Dihydroresorufin schematisch dargestellt. (Schema 3.4-1)

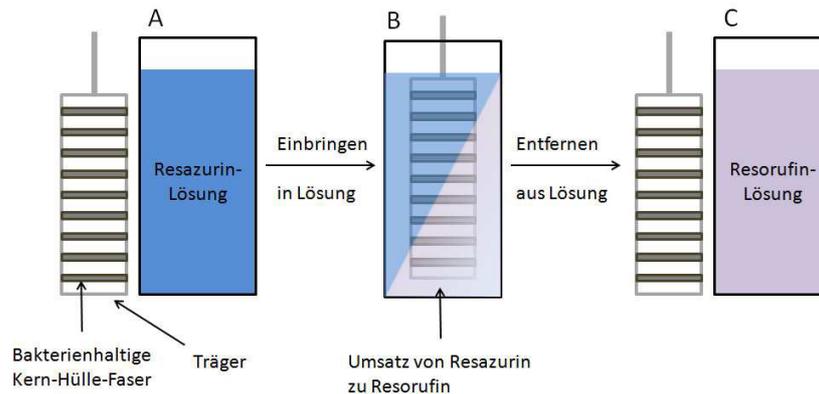


**Schema 3.4-1 Reaktionsschema der irreversiblen Reduktion von Resazurin zu Resorufin und der Gleichgewichtsreaktion zu Dihydroresorufin.**<sup>[176]</sup>

Die Umsetzung wurde durch die Abnahme des Absorptionsmaximums des Resazurin bei 601 nm und eine Zunahme der Absorption des Resorufin bei 572 nm über UV/VIS Spektroskopie verfolgt. Zusätzlich wurde die Absorptionsänderung einer nicht inokulierten Resazurin-Lösung als Vergleichsprobe bestimmt.

Die wässrige Resazurin-Lösung wurde mit immobilisierten Bakterien in PVA-Fasern und in PPX-PVA-Fasern inkubiert. Die PVA-Fasern und die Kern-Hülle-Fasern unterscheiden sich in ihrem Verhalten nach dem Kontakt mit Wasser, vgl. Abschnitt 3.4.6. Im Falle der PVA-Fasern setzte eine Quellung des Materials ein und dies führte zu einer Freisetzung der Bakterien. Die

freigesetzten Bakterien sollten einen Umsatz des Resazurin zur Folge haben, welcher detektierbar ist. Im Gegensatz dazu sollte die hydrophobe PPX-Schicht in der Lage sein, die Freisetzung der Bakterien zu unterdrücken. Zusätzlich wurde der Einfluss von unterschiedlichen Schichtdicken des PPX überprüft. Die nachfolgende Abbildung stellt die Umsetzung des Resazurins durch die immobilisierten Bakterien schematisch dar. (Abbildung 3.4-10)



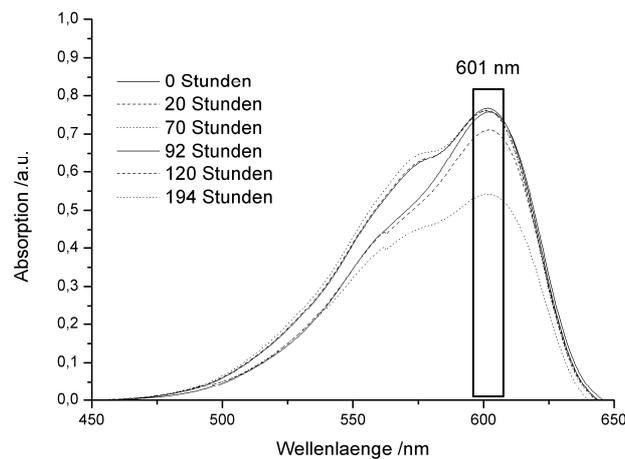
**Abbildung 3.4-10 Schematische Darstellung der bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern vor der Inokulation der Resazurin-Lösung (A). Inokulation der Resazurin-Lösung durch die bakterienhaltigen Fasern und Umsatz von Resazurin (B). Entfernung der Kern-Hülle-Fasern (C).**

Es wurden Kern-Hülle-Fasern mit 1,2  $\mu\text{m}$ , 4,3  $\mu\text{m}$  und 5,4  $\mu\text{m}$  verwendet. Es ist zu vermuten, dass im Falle einer höheren Schichtdicke der Eintritt des Resazurin in die Faser und der Austritt des Resorufin aus der Faser deutlich gehemmt ist. Bei Kompositen mit geringeren Schichtdicken sollte der Umsatz folglich nach einer kürzeren Inkubationsdauer detektiert werden.

Für die Bestimmung des Umsatzes der immobilisierten Bakterien wurde eine Resazurin-Lösung ohne die Zugabe von Nährstoffen verwendet. Im Abschnitt 3.4.5 wurde gezeigt, dass verfügbare Nährstoffe zur Freisetzung von Bakterien und zu deren Wachstum in der Lösung führen. Die Anwesenheit von Bakterien in der Lösung könnte demzufolge ein fälschlicherweise positives Ergebnis der Umsetzung zur Folge haben. Die Freisetzung der Bakterien aus den Kompositen wurde daher während des gesamten Experimentes überprüft. In bestimmten zeitlichen Abständen wurde die Resazurin-Lösung für die Inokulation von Agarplatten mit Nährstoffen genutzt. Diese Platten wurden bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert und eine mögliche Freisetzung der Bakterien sollte zu einem Wachstum von Kolonien führen.

Nach Ablauf des Experiments wurden die in den Kompositen immobilisierten Bakterien auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Durch dieses Verfahren wurde ausgeschlossen, dass die verkapselten Bakterien abgestorben waren und dies der Grund für ein Ausbleiben des Umsatzes war. Hierfür wurden flüssige Medien mit den verwendeten Kompositen inokuliert und inkubiert. Die Lösung wurde danach für die Inokulation von Agarplatten mit Nahrung genutzt und diese wurden ebenfalls inkubiert. Im Falle der Anwesenheit lebender Bakterien in den Kompositen sollten Kolonien von *M. luteus* auf der Agarplatte zu erkennen sein.

Zuerst wurden Komposite aus PVA-Fasern und verkapselten Bakterien für die Inokulation einer Resazurin-Lösung verwendet. Die UV/VIS-Messungen wurden jeweils über 194 Stunden durchgeführt und in dieser Meßzeit wurde kein Umsatz des Resazurin zu Resorufin detektiert. Die Abnahme der Intensität des Resazurin-Signals während dieser Messung bei  $\lambda = 601 \text{ nm}$  war vergleichbar mit der Abnahme des Signals bei der Referenzmessung einer nicht inokulierten Resazurin-Lösung. (Abbildung 3.4-11)



**Abbildung 3.4-11 Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Resazurin-Lösung nach Inokulation mit bakterienhaltigen PVA-Mikrofasern.**

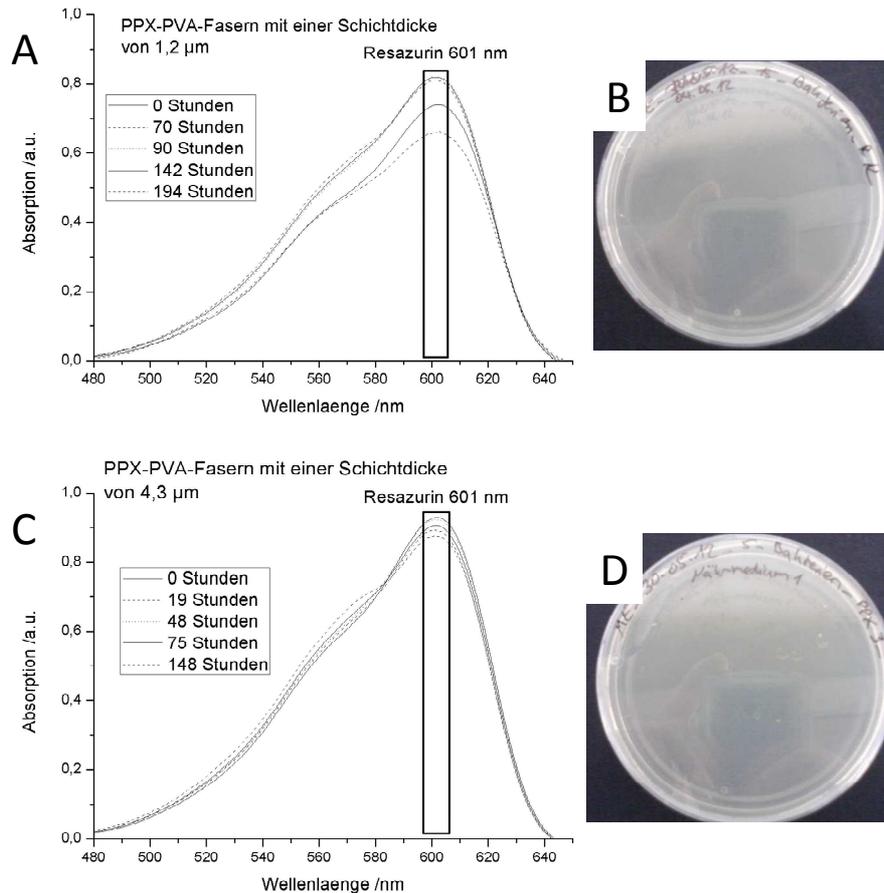
Nach dem Einbringen der Probe in die Resazurin Lösung wurde die Freisetzung der Bakterien ermittelt. Direkt nach dem Einbringen der PVA-Fasern wurden freigesetzte Bakterien nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist durch die Quellung der Fasern und die damit verursachte Freisetzung der Bakterien zu erklären. Es wurden lebende Bakterien in der Lösung bis zu 70 Stunden nach dem Inokulieren festgestellt (Tabelle 3.4-2), mit fortschreitender Versuchsdauer verringerte sich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutete, dass die Verringerung der KBE mit fortschreitender Versuchsdauer in der abnehmenden Konzentration der Nährstoffe begründet war, weshalb die

Bakterien in der Lösung abstarben. Der ausbleibende Umsatz des Resazurins war demnach an der zu geringen Konzentration der Bakterien über einen bestimmten Zeitraum begründet.

**Tabelle 3.4-2 Freisetzung von *M. luteus* aus PVA-Mikrofasern nach Einbringen in eine Resazurin-Lösung.**

<b>Inkubationsdauer /Stunden</b>	<b>KBE</b>
<b>0</b>	912
<b>2</b>	792
<b>19,5</b>	708
<b>24,5</b>	488
<b>46,5</b>	28
<b>50</b>	7
<b>70</b>	3

Es wurden PPX-PVA-Komposite mit verkapselten Bakterien und Schichtdicken von 1,2 µm und 4,3 µm für die Inokulation von Resazurin-Lösungen genutzt. Im Falle der Schichtdicke von 1,2 µm wurde die Lösung für 194 Stunden inkubiert. Es wurde keine Umsetzung von Resazurin zu Resorufin detektiert und die Abnahme der Absorption des Resazurin lag im Bereich der Vergleichsprobe. (Abbildung 3.4-12)

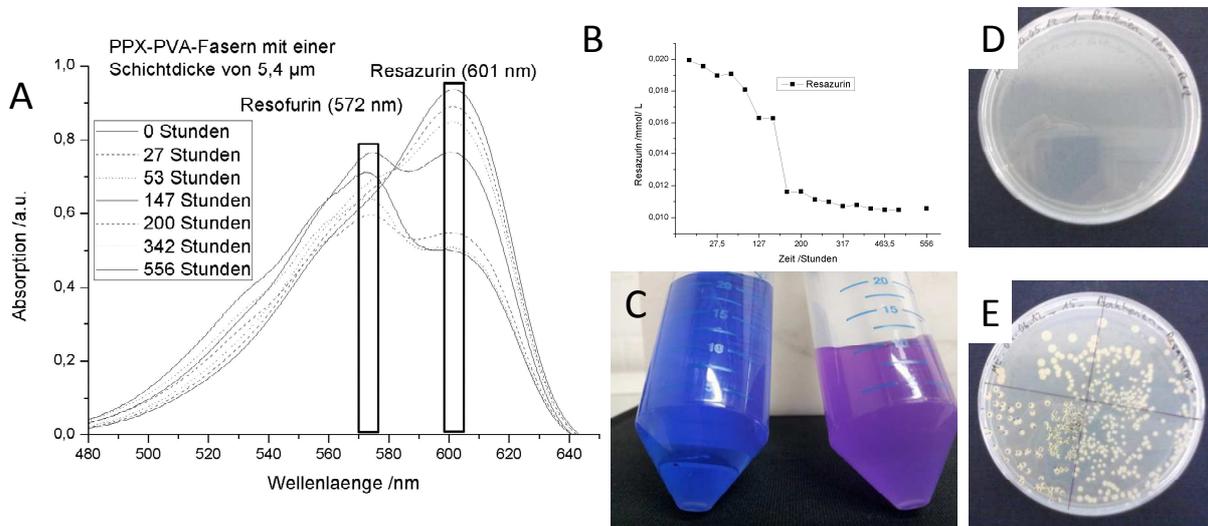


**Abbildung 3.4-12 Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Resazurin-Lösung nach Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PVA-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,2 µm (A). Es wurde kein Austreten der Bakterien aus den Fasern in die Lösung beobachtet (B). Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Resazurin-Lösung nach Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PVA-Fasern mit einer Schichtdicke von 4,3 µm (C). Es wurde kein Austreten der Bakterien aus den Fasern in die Lösung beobachtet (D).**

Das Komposit mit einer Schichtdicke von 4,3 µm zeigte ebenfalls nach 148 Stunden keine Umsetzung. (Abbildung 3.4-12) In beiden Fällen wurden keine freigesetzten Bakterien festgestellt. Im Anschluss an die Absorptionsmessungen wurden die Komposite für die Inokulation flüssiger Nährmedien genutzt. In beiden Fällen wurden lebende Bakterien nachgewiesen. Die immobilisierten Bakterien in den Kompositen überlebten die Lagerung bei 37 °C bei einer Schichtdicke von 1,2 µm für mindestens 194 Stunden und bei einer Schichtdicke von 4,3 µm für mindestens 148 Stunden.

Die enzymatische Aktivität immobilisierter *M. luteus* in Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 5,4 µm wurde ebenfalls getestet. Nach einer Inkubationszeit von 55 Stunden wurde der erste Umsatz von Resazurin zu Resorufin detektiert. Die Intensität des Absorptionsmaximums des Resazurin bei 601 nm verringerte sich und das Absorptionsmaximum des Resorufin bei 572 nm nahm an Intensität zu. Die Umsetzung des

Resazurin wurde 556 Stunden lang bis zur Konstanz der Intensität des Resazurin-Signals bei 601 nm durchgeführt. (Abbildung 3.4-13)



**Abbildung 3.4-13** Überlagerung der UV/VIS-Spektren einer Resazurin-Lösung während der Inkubation mit bakterienhaltigen PPX-PVA-Fasern (A). Auftragung der Absorptionsänderung des Maximums des Resazurins gegen die Inkubationsdauer (B). Resazurin-Lösung (C, links) vor und nach der Umsetzung zu Resorufin (C, rechts) auf Grund der Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PVA-Fasern. Es wurde keine Freisetzung von *M. luteus* während der Inkubation der Resazurin-Lösung beobachtet (D). Nachweis der lebenden immobilisierten Bakterien in PPX-PVA-Fasern auf nährstoffhaltigen Agarplatten im Anschluss an die Inokulation der Resazurin-Lösung (E).

Die Konzentration des Resazurin betrug zu Beginn der Messung  $0,002 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; nach 556 Stunden wurde eine Endkonzentration von  $0,001 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  detektiert.

Es wurde für 556 Stunden keine Freisetzung der Bakterien ermittelt, daher war der Umsatz des Resazurin ausschließlich auf die immobilisierten Bakterien zurückzuführen. Das verwendete Komposit wurde nach der Messung auf lebende, immobilisierte Bakterien untersucht und es wurden nach Inokulation und Inkubation der Nährlösung lebende Bakterien nachgewiesen. Die Überlebenszeit der verkapselten Bakterien in den Kern-Hülle-Fasern unter Ausschluss von Nahrung und einer Temperatur von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  betrug mindestens 556 Stunden.

Die Umsetzung des Resazurin mittels immobilisierter Bakterien in Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von  $5,4 \mu\text{m}$  wurde erfolgreich reproduziert. Der Anfangsumsatz von Resazurin wurde nach 170 Stunden detektiert und nach 378 Stunden betrug die Konzentration von Resazurin  $0,001 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Es wurden keine freigesetzten Bakterien nachgewiesen und

die Bakterien überlebten in den Fasern mindestens 378 Stunden. Die nachfolgende Tabelle 3.4-3 fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 3.4-3 Zusammenfassung der Umsetzung von Resazurin in Abhängigkeit der Schichtdicke und Freisetzung von Bakterien.**

<b>Kern-Hülle Faser</b>	<b>Schichtdicke /<math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Umsetzung von Resazurin<sup>a)b)</sup></b>	<b>Freisetzung von <i>M. luteus</i><sup>c)d)</sup></b>
<b>PVA</b>	0	-	+
<b>PPX1</b>	1,2	-	-
<b>PPX2</b>	4,3	-	-
<b>PPX3</b>	5,4	+	-

<sup>a)</sup>-:Es wurde kein Umsatz von Resazurin detektiert; <sup>b)</sup>+:Es wurde Umsatz von Resazurin zu Resorufin nachgewiesen; <sup>c)</sup>+:Sofortige Freisetzung der Bakterien nach Kontakt mit Wasser; <sup>d)</sup>-:Es wurde keine Freisetzung von *M. luteus* im Verlauf der Inokulation nachgewiesen.

Die hier beschriebenen Kern-Hülle-Fasern separierten die immobilisierten Bakterien gegenüber der wässrigen Umgebung für mindestens 556 Stunden. Die verkapselten *M. luteus* überlebten die Lagerung in den Kern-Hülle Fasern unter Ausschluss von Nahrung für mindestens 556 Stunden. Es wurde bei Schichtdicken von 4,3  $\mu\text{m}$  und geringer kein Umsatz des Resazurin detektiert. Es ist zu vermuten, dass die Konzentration an lebenden Bakterien in den Fasern war zu gering war um eine detektierbare Umsetzung des Resazurin durchzuführen. Dieses Ergebnis falsifiziert die im Vorfeld getroffene Hypothese, im Folgenden wird daher dieses Verhalten diskutiert.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass die PPX-Schicht eine semipermeable Membran darstellte. Zum einen konnten immobilisierte *M. luteus* die Kern-Hülle-Faser nicht verlassen, zum anderen war der Durchtritt von niedermolekularen Stoffen gehemmt, aber nicht ausgeschlossen. Dies führte zu einer Diffusion vorhandener Nahrung aus den Fasern in die wässrige Umgebung. Die Konzentration an Nahrung im Inneren der Faser wurde vermindert und die Vermehrung der Bakterien war verlangsamt. Im

Falle einer Schichtdicke von 5,4  $\mu\text{m}$  war die Diffusion von niedermolekularen Stoffen stärker gehemmt. Die Konzentration an verfügbarer Nahrung in der Faser genügte für das Wachstum der Bakterien. Die Konzentration der immobilisierten Bakterien war ausreichend für einen detektierbaren Umsatz des Resazurin.

### 3.4.8 Gold-Sequestrierung von immobilisierten *M. luteus*

*Micrococcus luteus* ist in der Lage, Metallionen aus einer wässrigen Lösung zu sequestrieren. Die Biosorption von Strontium, Kupfer und Gold im Speziellen wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[177–179]</sup> Die Aufnahme der Metalle ist von dem pH-Wert der Lösung abhängig und die maximale Aufnahme an Gold wurde bei einem pH-Wert von 3 nachgewiesen.<sup>[180]</sup> Im Folgenden sollen die immobilisierten Bakterien in Kern-Hülle-Fasern für die Sequestrierung von Gold-Ionen aus wässriger Lösung genutzt werden. Die Sequestrierung wird mittels ICP-MS quantifiziert. Die Lösung der Goldsäure wird aufgrund der Literaturergebnisse auf pH 3 eingestellt und mit den Kompositen für eine Stunde bei 37 °C inokuliert. Anschließend wird die Konzentration an Gold in der Lösung durch ICP-MS bestimmt. Die Differenz der Initialkonzentration und der Endkonzentration sollte die Masse an Gold darstellen, welche durch die Komposite sequestriert wurde. Die Sequestrierung des Goldes sollte durch die verkapselten *M. luteus* erfolgen, wobei der Einfluss des PVA, des PPX und des Trägers in Vorversuchen bestimmt und bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt wird. Hierbei entspricht  $S_G$  der gesamten Sequestrierung,  $M_G$  der Gold-Menge vor der Sequestrierung,  $S_B$  der Sequestrierung der Bakterien,  $S_P$  der Sequestrierung des Polymers und  $S_T$  der Sequestrierung des Trägers.

$$S_G = M_G - S_B - S_P - S_T \quad (3)$$

Daraus folgt für die Menge an Gold, die ausschließlich von den immobilisierten Bakterien sequestriert wurde:

$$S_B = S_G - S_P - S_T. \quad (4)$$

Die Sequestrierung von Gold ist im Falle der Freisetzung von Bakterien nicht auf die immobilisierte Spezies beschränkt. Daher musste der Einfluss freigesetzter Bakterien zusätzlich evaluiert werden. In Abschnitt 3.4.7 wurde die erfolgreiche Separation der

immobilisierten Bakterien und der umgebenden Lösung für mindestens 556 Stunden nachgewiesen. Aus diesem Ergebnis folgte für den im Folgenden besprochenen Versuch, dass die Sequestrierung des Golds ausschließlich auf die immobilisierte Bakterien zurückzuführen war.

Anschließend an die Sequestrierung von Gold werden die immobilisierten Bakterien auf ihre Lebensfähigkeit untersucht.<sup>[181]</sup>

Die Initialkonzentration der Goldlösung wurde mittels ICP-MS bestimmt und betrug  $132,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Die Inokulation mit immobilisierten *M. luteus* in Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von  $4,5 \mu\text{m}$  ergab eine Sequestrierung von  $24,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $3,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). (Tabelle 3.4-4)

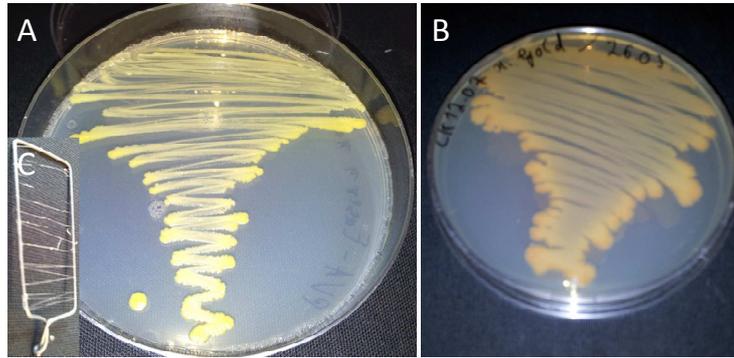
**Tabelle 3.4-4 Zusammenfassung der Resultate der Sequestrierung von Gold-Ionen aus wässriger Lösung.**

<b>Kern-Hülle Faser</b>	<b>Schichtdicke /<math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Sequestrierung von Gold /<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math> <sup>a) b)</sup></b>	<b>Nachweis von lebenden <i>M. luteus</i> nach Sequestrierung<sup>c)</sup></b>
<b>PPX4</b>	4,5	24,0	+
<b>PPX5</b>	5,4	21,0	+

<sup>a)</sup>Die PPX-PVA-Fasern ohne Bakterien verminderten die Konzentration an Gold um  $4,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; <sup>b)</sup>Die Anfangskonzentration an Gold betrug  $132,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; <sup>c)</sup>+:Die bakterienhaltigen Komposite wurde im Anschluss an die Umsetzung für die Inokulation von Flüssigmedium verwendet. Das Medium wurde für 72 Stunden inkubiert und die überstehende Lösung wurde auf nährstoffhaltige Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationsdauer von 96 Stunden wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

Die Komposite wurden im Anschluss für die Inokulation und Inkubation von flüssigem Nährmedium verwendet. Es wurden lebende Bakterien nachgewiesen, indem die Nährlösung für die Inokulation von Agarplatten verwendet wurde. Da Wachstum charakteristischer gelber

Kolonien wurde nach einer Inkubation bei 37 °C für 72 Stunden beobachtet. (Abbildung 3.4-14)



**Abbildung 3.4-14** Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach der Sequestrierung von Gold bei einer Schichtdicke von PPX von 4,5 µm (A) und 5,4 µm (B). Ein mit PPX-PVA-Fasern belegter Rahmen nach der Sequestrierung von Gold ist abgebildet (C).

Es wurden weiterhin Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 5,4 µm für die Goldsequestrierung verwendet. Hierbei wurde nach 1 Stunde Inkubationszeit der Gold-Lösung eine Sequestrierung von  $21,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $6,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) nachgewiesen. (Tabelle 3.4-4) Das Komposit wurde für die Inokulation von flüssiger Nährlösung verwendet und diese wurde anschließend inkubiert. Die Lösung wurde für die Inokulation von Agarplatten genutzt und nach der Inkubation der Platten wurden gelbe Kolonien von *M. luteus* erhalten. Das Wachstum charakteristischer Kolonien demonstrierte die Anwesenheit lebender Bakterien. (Abbildung 3.4-14)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sequestrierung von Gold aus einer wässrigen Lösung durch immobilisierte *M. luteus* in Kern-Hülle-Fasern erfolgreich war. Es wurden lebende Bakterien im Inneren der Fasern im Anschluss an die Sequestrierung nachgewiesen. Die Kern-Hülle-Struktur schützte die verkapselten Bakterien während der Sequestrierung von Gold. Die Abnahme des Goldgehaltes wurde durch die Spurenelementanalyse ICP-MS nachgewiesen.

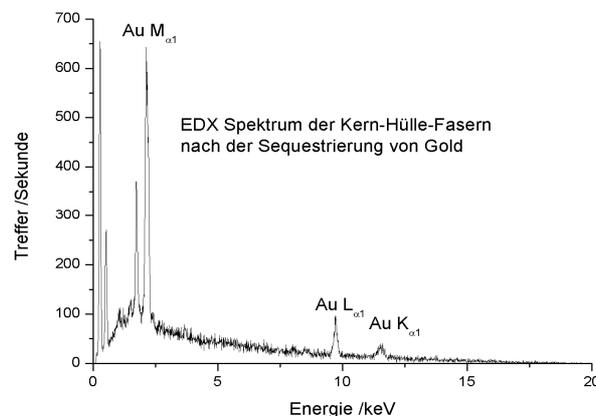
### 3.4.9 Lokalisierung und Charakterisierung des Goldes in den Fasern

Die Lokalisierung von akkumulierten Metallen, insbesondere von Gold, in Mikroorganismen war bereits Gegenstand der Forschung und wurde von einigen Autoren detailliert untersucht.

Die Reduktion von  $\text{Au}^{3+}$  zu Goldnanopartikeln wurde von Beveridge et al. publiziert. Die Autoren beschrieben die Abscheidung von Nanopartikeln in der Zellwand des Mikroorganismus.<sup>[26]</sup> Die Anreicherung von Uran an der Zelloberfläche des ebenfalls grampositiven *Bacillus sphaericus* wurde von Merroun et al. berichtet.<sup>[182]</sup> Die Lokalisierung von Eisen im Inneren der Zellwand von *Acidithiobacillus ferrooxidans* unter Verwendung von EDX wurde von Klingl et al. publiziert.<sup>[183]</sup>

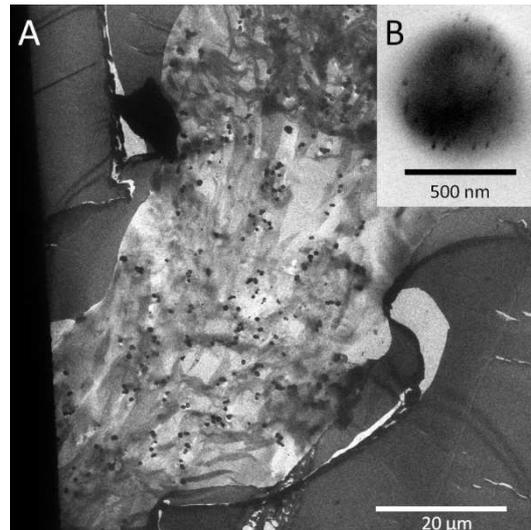
In Abschnitt 3.4.8 wurden Gold-Ionen aus einer wässrigen Lösung durch immobilisierte *M. luteus* sequestriert. Im Folgenden wird der Nachweis von Gold in den verwendeten Kern-Hülle-Fasern erläutert. Die Verifizierung der Anwesenheit von Gold wird über eine EDX-Analyse erfolgen. Hierbei werden die Fasern thermisch behandelt und anschließend analysiert. Die exakte Lokalisierung von Gold innerhalb der Fasern wird durch Mikrotomschnitte und anschließende Analyse durch TEM durchgeführt. Es wird vermutete, dass die Bakterien das Gold sequestrierten, daher sollten sich die Goldablagerungen in und an den Bakterien befinden. Aus diesem Grund sollten die Bakterien in den elektromikroskopischen Aufnahmen erkennbar sein, da Gold die Elektronen streut. Die Goldablagerungen sollten, basierend auf den Erkenntnissen von Beveridge et al., einen Durchmesser im Nanometerbereich haben und sollten in sphärischer Gestalt vorliegen.

Das Komposit mit einer Schichtdicke von  $4,5 \mu\text{m}$  wurde auf  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend mittels EDX untersucht. Die charakteristischen Linien für das Element Gold wurden in dem Spektrum identifiziert. Die  $\text{M}_{\alpha 1}$ -Linie bei  $2,14 \text{ keV}$ , die  $\text{L}_{\alpha 1}$ -Linie bei  $9,73 \text{ keV}$  und die  $\text{K}_{\alpha 1}$ -Linie bei  $11,51 \text{ keV}$  wurden bestimmt. Die Abbildung 3.4-15 zeigt das EDX-Spektrum.



**Abbildung 3.4-15 EDX-Spektrum der Kern-Hülle Fasern nach der Sequestrierung von Gold.**

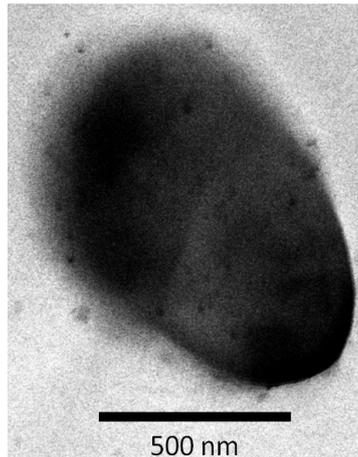
Die TEM-Aufnahmen zeigten die immobilisierten Bakterien und das sequestrierte Gold im Inneren der Faser. Die Bakterien waren in der gesamten Kern-Hülle-Faser ungleich verteilt und lagen als sphärische Objekte vor; weiterhin war die Abscheidung von Gold um und in den Bakterien zu erkennen. Die übrige Faserfläche war frei von Goldabscheidungen. Aus diesen Gründen, wurde die Sequestrierung des Goldes ausschließlich von den verkapselten Bakterien durchgeführt. (Abbildung 3.4-16)



**Abbildung 3.4-16 TEM Aufnahme einer bakterienhaltiger PPX-PVA-Faser nach Sequestrierung von Gold-Ionen aus einer wässrigen Lösung. Die dunklen Objekte in der Faser waren *M. luteus* (A). Vergrößerung eines *M. luteus* Bakterium, welches von sphärischen Goldablagerungen umgeben war (B).**

Die Goldablagerungen hatten eine sphärische Gestalt und einen Durchmesser von ungefähr 16 nm.

Im Abschnitt 3.4.8 wurden lebende Bakterien im Inneren der Fasern nach der Sequestrierung nachgewiesen. Die Komposite wurden für die Inokulation von Nährlösungen genutzt und nach der Inkubation wurden lebende Bakterien nachgewiesen. Die Vermehrung der Bakterien basierte auf ihrer Vervielfältigung durch Zellteilung. Im Inneren der analysierten Kern-Hülle-Faser wurde ein Hinweis auf dieses Verhalten identifiziert. Die nachfolgende Aufnahme zeigt ein Bakterium, welches von Goldnanopartikeln umgeben war. Eine vertikale Teilungsfurche war deutlich zu erkennen. Das Bakterium durchlief hier eine Zellteilung.<sup>[184]</sup> (Abbildung 3.4-17)



**Abbildung 3.4-17 TEM-Aufnahme eines in einer PPX-PVA-Faser immobilisierten *M. luteus* nach der Sequestrierung von Gold-Ionen. Die vertikale Teilungsfurche war deutlich zu erkennen und es waren sphärische Goldablagerungen im und in der Nähe des Bakteriums zu beobachten.**

Als Ergebnis lässt sich zusammenfassen, dass das sequestrierte Gold im Inneren der Kern-Hülle-Fasern mittels EDX verifiziert worden war. Die charakteristischen Linien für Gold wurden identifiziert und zugeordnet. Das abgeschiedene Gold wurde ausschließlich bei den verkapselten Bakterien lokalisiert und der Durchmesser der Abscheidungen betrug 16 nm. Die Bakterien waren ungleichmäßig über die gesamte Faser verteilt und es wurde im Inneren der Faser ein Bakterium während seiner Zellteilung beobachtet.

### **3.4.10 Zusammenfassung**

Die Immobilisierung von *M. luteus* in Kern-Hülle-Fasern bestehend aus einem PVA-Kern und einer PPX-Hülle wurde erfolgreich durchgeführt. Es wurden lebende Bakterien nach der Verkapselung in PVA-Mikrofasern in flüssiger Nährlösung und auf Agarplatten mit Nährstoffen nachgewiesen. Der Durchmesser der Fasern wurde mittels REM auf 50  $\mu\text{m}$  bestimmt und es wurden verkapselte Bakterien, welche sich auf der Faseroberfläche befanden, nachgewiesen. Die PPX-Hülle wurde durch das CVD-Verfahren aufgebracht und die Schichtdicke wurde durch die Variierung der Ausgangsmenge von [2,2]Paracyclophan gesteuert. Die Kern-Hülle-Fasern wurden mittels REM analysiert und eine gleichmäßige Beschichtung der Faser wurde beobachtet. Die in den PVA-Fasern immobilisierten Bakterien überlebten den Prozess und wurden mittels Inokulation und Inkubation von Nährmedium nachgewiesen. Im Gegensatz zu den PVA-Fasern waren die PPX-PVA-Fasern wasserstabil und besaßen eine stark veränderte Permeabilität für niedermolekulare Stoffe in wässriger

Umgebung. Die Freisetzungsprofile von Fluorescein aus PVA- und PPX-PVA-Fasern wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie ermittelt und der retardierende Einfluss der hydrophoben PPX-Schicht wurde bestimmt. Es wurde erfolgreich die enzymatische Aktivität von immobilisierten *M. luteus* durch den reduktiven Umsatz von Resazurin nachgewiesen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Schichtdicke untersucht. Im Falle der Komposite mit einer PPX-Schichtdicke von unter 5,4  $\mu\text{m}$  wurde über die Dauer der Bestimmung keine Aktivität der Bakterien detektiert. Die Freisetzung der verkapselten Bakterien in wässriger Lösung wurde für PVA-Fasern und PPX-PVA-Fasern mit unterschiedlichen Schichtdicken bestimmt. Im Falle der PVA-Fasern wurde eine sofortige Freisetzung der Bakterien bei Wasserkontakt detektiert. Die PPX-PVA-Fasern mit Schichtdicken zwischen 1,2 und 5,4  $\mu\text{m}$  setzten im Gegensatz dazu für mindestens 22 Tage keine Bakterien frei. Nach 22 Tagen wurden lebende Bakterien im Inneren der Fasern nachgewiesen. Die Überlebenszeit der immobilisierten *M. luteus* überstieg, unter Ausschluss von Nährstoffen und bei einer Temperatur von 37 °C, 22 Tage.

Es wurden Komposite unterschiedlicher Schichtdicke mit immobilisierten Bakterien für die Sequestrierung von Gold-Ionen aus einer wässrigen Lösung genutzt. Die Abnahme des Goldgehaltes der Lösung wurde über ICP-MS nachgewiesen. Das Gold im Inneren der Fasern wurde durch EDX verifiziert und das erhaltene Spektrum beinhaltet die charakteristischen Linien für Gold. Mittels Inkubation und Inokulation nährstoffhaltiger Lösung durch die Kern-Hülle-Fasern nach der Gold-Sequestration wurden lebende Bakterien erhalten. Die exakte Lokalisierung des Goldes wurde mittels TEM durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass das Gold ausschließlich von den Bakterien sequestriert worden ist. Zusätzlich wurde ein *M. luteus* während seiner Zellteilung identifiziert.

### 3.5 Immobilisierung von *M. luteus* in PEO-Nanofasern

#### 3.5.1 Hypothese

Bakterien, Zellen, Viren und Proteine werden in einer Vielzahl technischer Anwendungen wie zum Beispiel in der Chromatographie, der optischen Informationstechnologie und der Katalyse eingesetzt. Die Immobilisierung der biologischen Einheiten ermöglicht es dieses Einsatzspektrum zu erweitern, stellvertretend seien hier der Einsatz in Bioreaktoren, MBZ und der Umweltsanierung genannt.<sup>[22]</sup>

Der Erhalt der Viabilität der Mikroorganismen nach der Immobilisierung und während ihrer Verwendung ist eine wichtige Voraussetzung für ihren Einsatz. Die Immobilisierungsmatrix sollte daher den Eintritt von Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten ermöglichen. Die Verkapselung in mesoporöse Silikagele und Polymere erfüllt diese Voraussetzungen und wird bereits in der Literatur beschrieben. Ein gravierender Nachteil dieser Methoden ist die unkontrollierte Freisetzung der immobilisierten Einheiten bei Kontakt mit Wasser. Ein solches Verhalten hat eine Kontamination der Umgebung und des herzustellenden Produktes zur Folge.

Die Freisetzung der verkapselten Einheiten sollte durch die Ausrüstung der Komposite mit einer hydrophoben Sperrschicht verhindert werden. Diese zusätzliche Hülle sollte semipermeable sein und den Ein- und Austritt von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ermöglichen, gleichzeitig sollte die Freisetzung der biologischen Einheit gehindert werden. Die Permeabilität der Kern-Hülle-Komposite soll zudem durch eine Variierung der Schichtdicke möglich sein.<sup>[185]</sup>

In den folgenden Abschnitten soll daher ein System basierend auf der Immobilisierung von *M. luteus* in Hydrogelnanofasern und deren Ausrüstung mit einer PPX-Hülle untersucht werden. Dieses Kern-Hülle-System soll die Freisetzung der Bakterien in wässriger Umgebung verhindern und ihre enzymatische Aktivität erhalten. Die bakterienhaltigen Komposite sollten weiterhin in der Lage sein Metallionen aus einer wässrigen Umgebung zu sequestrieren.

Die Immobilisierung von *M. luteus* in PEO-Nanofasern und die nachfolgende Beschichtung der Vliese mit PPX wurde bereits in ähnlicher Form in Vorversuchen durchgeführt.<sup>[159]</sup>

In Abschnitt 3.4 wurde bereits ein analoges Konzept der Immobilisierung von *M. luteus* in Hydrogelmikrofasern diskutiert. In dem folgenden Teil der Schrift wird auf Nanofasern eingegangen, dieses System ermöglicht im Vergleich ein höheres Oberfläche-Volumen-Verhältnis. Es ist daher zu vermuten, dass dies einen erhöhten Kontakt zwischen dem Substrat und den immobilisierten Bakterien bewirkt. Ausgehend davon wurden die Ergebnisse der enzymatischen Aktivität und der Sequestrierung von Gold-Ionen für beide Systeme verglichen und diskutiert.

### 3.5.2 Konzept

Das Bakterium *M. luteus* wird in PEO-Nanofasern immobilisiert, welche mittels des Elektrospleinverfahrens hergestellt werden. Die Abscheidung der Fasern wird, aufgrund von elektrostatischen Effekten, parallel zueinander auf einem Metallträger erfolgen.<sup>[186]</sup> Der Nachweis der Viabilität der verkapselten Bakterien soll durch die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten durchgeführt werden. Im Falle von lebenden Bakterien, sollten sich Kolonien von *M. luteus* entlang des Metallträgers ausbilden. Die hydrophobe Ausrüstung der Fasern wird über das CVD-Verfahren mit [2,2]Paracyclophan erfolgen.<sup>[149]</sup> Die Methode erfordert keinen Einsatz von Initiatoren oder Lösungsmitteln und ist daher bestens für die Verwendung mit biologischen Einheiten geeignet. Es wird davon ausgegangen, dass die immobilisierten Bakterien die Beschichtung überleben und dies soll durch die Inokulation von Nährlösung demonstriert werden. Die Variation der Schichtdicke erfolgt über die eingesetzte Menge des Präkursors und wird mittels eines Profilometers bestimmt. Die Oberflächenmorphologie wird durch REM-Aufnahmen analysiert. Die Wasserstabilität der Kern-Hülle-Fasern soll nachgewiesen werden, indem Fluorescein anstelle der Bakterien immobilisiert wird. Eine etwaige Strukturänderung der Fasern nach der Zugabe von Wasser wird mit der UV/VIS-Mikroskopie charakterisiert. Die Freisetzung des Farbstoffes aus den PEO-Fasern und den PPX-PEO-Fasern soll durch UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert werden. Im Falle der Kern-Hülle-Fasern sollte die Freisetzung des Farbstoffes stark gemindert sein.

Die PPX-PEO-Fasern mit Bakterien sollen für die Inokulation von wässriger Lösung verwendet werden. Die Freisetzung der Bakterien wird überprüft, indem die überstehende Lösung für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten genutzt wird. Die Kern-Hülle-

Komposite sollten, im Gegensatz zu den PEO-Fasern, die Bakterien gegenüber der Umgebung separieren und es sollten keine Kolonien auf den Agarplatten zu beobachten sein.

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der lebenden immobilisierten Bakterien wird durch den reduktiven Umsatz von Resazurin durchgeführt. Die Resazurin-Lösungen werden mit Kompositen mit unterschiedlichen Schichtdicken inokuliert und der Umsatz des Resazurin zu Resorufin wird durch UV/VIS-Spektroskopie verfolgt. Der Umsatz der Proben mit geringen Schichtdicken sollte im Vergleich zu den Kompositen mit höheren Schichtdicken nach einer kürzeren Inokulationszeit zu detektieren sein. Dieses Verhalten sollte in dem gehemmten Ein- und Austritt von niedermolekularen Stoffen durch die PPX-Schicht begründet sein. *M. luteus* ist in der Lage Metallionen aus wässrigen Lösungen zu sequestrieren. Diese Fähigkeit sollte auch im Falle der immobilisierten Bakterien zu beobachten sein, aus diesem Grund sollen die lebenden Komposite für die Sequestrierung von Gold-Ionen genutzt werden. Die Aufnahme des Goldes sollte von der Inokulationszeit abhängig sein und der Nachweis des Goldes in den Fasern wird zum einen durch REM- und TEM-Aufnahmen und zum anderen durch EDX-Spektroskopie erfolgen.

### 3.5.3 Immobilisierung von Bakterien in Nanofasern

Die Immobilisierung von *M. luteus* in PEO-Nanofasern durch Elektrospinnen einer Formulierung aus Bakterien und wässriger PEO-Lösung wird im Folgenden beschrieben. Die relative Anordnung der Fasern zueinander und deren Abscheiden auf einem Metallträger im Elektrospinnprozess sind für die in den weiteren Kapiteln beschriebenen Arbeiten von großem Interesse. Die parallele Anordnung der Fasern ist notwendig, da sie eine individuelle und defektfreie Beschichtung mittels des CVD Verfahrens ermöglicht. Daher wird die Abscheidung auf einem Metallträger vorgenommen, dessen Seiten parallel zueinander verlaufen, dies erzeugt wiederum parallel verlaufende Nanofasern.<sup>[187]</sup> Weiterhin werden die immobilisierten Bakterien auf ihr Überleben nach dem Elektrospinnprozess untersucht. Dies wird durch die Inkubation einer mit Nährstoffen versetzten Agarplatte getestet.

Die PEO-Nanofasern sollen in den nachfolgenden Abschnitten weiterverarbeitet werden, daher wurde im ersten Arbeitsschritt ein Screening der Konzentration des Polymers in wässriger Lösung durchgeführt. Die Fasern mussten gegenüber einer Lagerung bei 4 °C für

24 Stunden stabil sein, da ansonsten keine Weiterverarbeitung möglich war. Im Folgenden sind die Parameter der Faserherstellung zusammengefasst. (Tabelle 3.5-1)

**Tabelle 3.5-1 Stabilität der PEO-Nanofasern.**

PEO /gew. %	Stabilität der Fasern nach 24 Stunden bei 4 °C
4	Keine Fasern vorhanden
5	Keine Fasern vorhanden
6	Stabile Fasern

Die Nanofasern, welche aus einer 6 gew.% Lösung, hergestellt wurden wiesen die höchste Stabilität auf und wurden im Folgenden für die weitere Verarbeitung verwendet. Aufgrund der Abscheidung der Fasern auf eine Gegenelektrode, deren Seiten parallel zu einander verlaufen, wurden parallele Fasern erhalten.<sup>[186]</sup> Die nachfolgende mikroskopische Aufnahme der Fasern stellt diese Anordnung dar. (Abbildung 3.5-1)



**Abbildung 3.5-1 Mikroskopische Aufnahme der parallelen PEO-Nanofasern.**

Im Folgenden wurde das optimale Masseverhältnis von Bakterien und dem eingesetzten Polymer bestimmt. Hierbei sollten bakterienhaltige PEO-Nanofasern erhalten werden, die eine Lagerung von mindestens 24 Stunden bei 4 °C überstehen. (Tabelle 3.5-2)

**Tabelle 3.5-2 Stabilität der bakterienhaltigen PEO-Fasern in Abhängigkeit des Polymeranteils.**

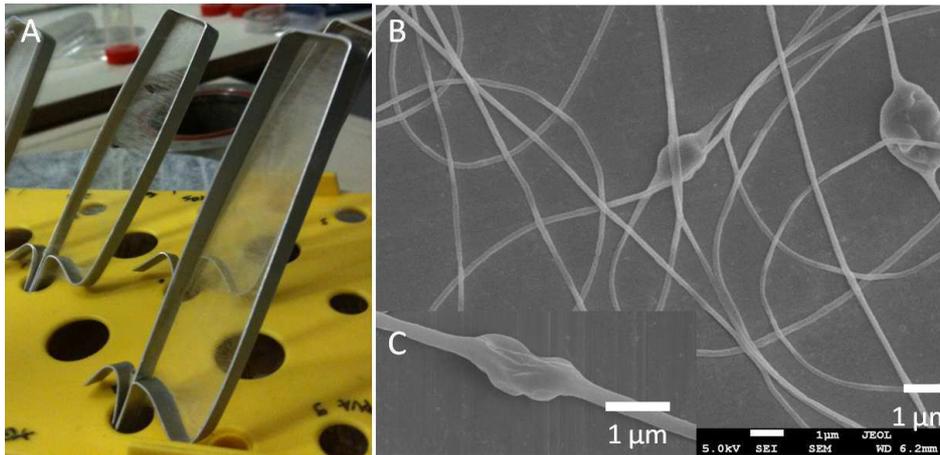
Verhältnis PEO-Lösung: Bakterien /gew. %	Stabilität der Fasern <sup>a)</sup>
<b>6:1</b>	--
<b>8:1</b>	-
<b>10:1</b>	+

<sup>a)</sup>--: Es wurden keine Nanofasern zwischen den parallelen Seiten des Trägers erhalten. <sup>b)</sup>--: Es wurden Nanofasern erhalten, diese waren nicht gegenüber einer 24-stündigen Lagerung bei 4 °C stabil. <sup>c)</sup>+: Es wurden stabile bakterienhaltige PEO-Fasern erhalten, weiterhin waren diese Fasern gegenüber einer 24-stündigen Lagerung bei 4 °C stabil.

Das Einbringen der Bakterien in die Spinnlösung zeigte einen massiven Einfluss auf die Herstellung der Kompositfasern. Bei einem Anteil der Polymer-Lösung zu den Bakterien von 6:1 wurden keine freihängenden Fasern erhalten. Im Falle eines Verhältnisses von 8:1 wurden freihängende Fasern auf dem Träger erhalten. Die Fasern wurden anschließend für 24 Stunden bei 4 °C gelagert, nach dieser Lagerung konnten keine Fasern mehr beobachtet werden.

Desweiteren wurde ein Verhältnis von 10:1 für das Elektrospinnen verwendet, hierbei wurden freischwebende, parallele Fasern auf einem Träger erhalten und diese überstanden die Lagerung für 24 Stunden bei 4 °C. (Abbildung 3.5-2)

Die erhaltenen Fasern wurden auf ihre Struktur und auf die Verkapselung der Bakterien mittels REM untersucht. Es wurden zylindrische Fasern mit einem Durchmesser von 552 nm (SD: 160 nm) erhalten. Die Fasern hatten keine Defekte und lagen frei von „beads“ vor. Die immobilisierten *M. luteus* wurden entlang der Faserachse als Verdickungen erkannt, eine vollständige Charakterisierung der Bakterien und deren Nachweis in den Fasern durch die Verwendung eines Farbstoffes wurden in früheren Arbeiten durchgeführt.<sup>[159]</sup> (Abbildung 3.5-2)



**Abbildung 3.5-2** Die Aufnahme zeigt Metallträger welche parallel orientierte PEO-Nanofasern mit *M. luteus* trugen (A). REM Aufnahme der PEO-Fasern mit immobilisierten *M. luteus*, Verdickungen, entlang der Faserachse (B). Vergrößerung einer Verdickung der PEO Nanofaser.

Der Nachweis der Überlebensfähigkeit der Bakterien nach dem Spinnprozess wurde durch die Inokulation einer nährstoffhaltigen Agarplatte mit einem belegten Träger durchgeführt. Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* wurde ausschließlich entlang des Trägers beobachtet. Die Bakterien überlebten den Spinnprozess und es wurde das Wachstum der immobilisierten Bakterien durch die Auflagefläche des Trägers auf den Agarplatten vorgegeben. (Abbildung 3.5-3)



**Abbildung 3.5-3** Inokulation einer nährstoffhaltigen Agarplatte mit einem Träger der mit bakterienhaltigen PEO-Nanofasern belegt war. Die Kolonien, welche nicht entlang der gezeigten Position des Trägers wuchsen, wurden durch eine Neupositionierung verursacht.

Es lässt sich zusammenfassen, dass eine Mischung einer 6 gew.% PEO Lösung und ein Gewichtsverhältnis von 10:1 von Polymer-Lösung zu Bakterien, optimal für die Herstellung von Nanofasern mit immobilisierten Bakterien war. Die *M. luteus* überlebten den

Spinnprozess und produzierten, nach Inokulation und Inkubation einer nährstoffhaltigen Agarplatte, Kolonien.

### 3.5.4 Beschichtung der bakterienhaltigen Nanofasern mittels CVD

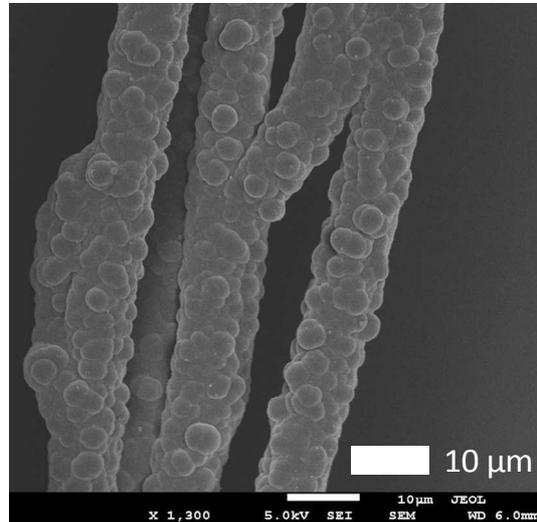
Eine wichtige Voraussetzung für das Design lebender Komposite ist die Separation der immobilisierten biologischen Einheiten von ihrer Umgebung. Im Falle eines Einsatzes der Komposite in wässriger Umgebung ist es daher notwendig die Freisetzung der Mikroorganismen in Wasser zu verhindern und gleichzeitig den Stoffaustausch zwischen der Umgebung und dem Inneren des Komposite zu ermöglichen. In Abschnitt 3.5.3 wurden lebende Bakterien in PEO-Nanofasern immobilisiert, bei Kontakt mit Wasser trat jedoch eine Freisetzung der immobilisierten *M. luteus* ein. Die Ausrüstung der Fasern mit einer hydrophoben Schicht sollte eine Möglichkeit darstellen, die Freisetzung der Bakterien zu vermeiden. Der Einsatz des CVD-Prozesses sollte eine ideale Methode sein diese Anforderungen zu erfüllen, da eine genaue Einstellung der Schichtdicke und damit die Einstellung der Permeabilität möglich ist.<sup>[168]</sup>

Als hydrophobe Schicht wurde PPX gewählt, da diese gegenüber den meisten Lösungsmitteln stabil ist und die Filme defektfrei aufgebracht werden können. Die PPX-Schicht wurde über das von Gorham beschriebene CVD Verfahren hergestellt und die Variation der Schichtdicke geschah über die eingesetzte Menge von [2,2]Paracyclophan.<sup>[149]</sup>

Die Fasern sollen mittels ihres Querschnittes auf ihre Kern-Hülle-Struktur untersucht werden. Weiterhin wird die Wasserstabilität der Fasern getestet, hierfür wird anstelle der Bakterien der Farbstoff Fluorescein eingesetzt und das Verhalten der beschichteten und unbeschichteten Fasern verglichen. Die Permeabilität der behandelten und unbehandelten Fasern wird weiterhin durch die Quantifizierung der Freisetzung des Farbstoffes mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Im Falle der Kern-Hülle-Fasern sollte eine retardierte Freisetzung beobachtet werden und die Faserstruktur sollte nach Kontakt mit Wasser auf Grund der hydrophoben Schicht erhalten bleiben.

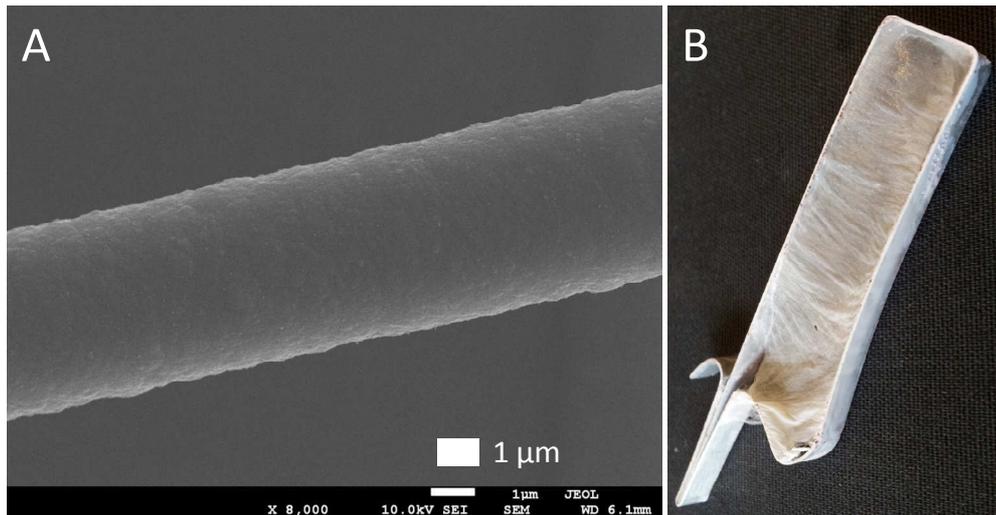
Die Menge an abgeschiedenem Polymer wurde durch Bestimmung der Masse des Trägers vor und nach der Beschichtung durchgeführt. Im Falle einer Menge von 2,5 g [2,2]Paracyclophan wurden ca. 7 mg PPX auf dem Träger erhalten.

Die PPX-PEO-Fasern wurden im Anschluss an die Beschichtung mittels REM analysiert. Die PPX-Beschichtung wurde in allen Proben bestätigt. Es wurde im Falle einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  eine strukturierte Oberflächenstruktur erhalten. (Abbildung 3.5-4)



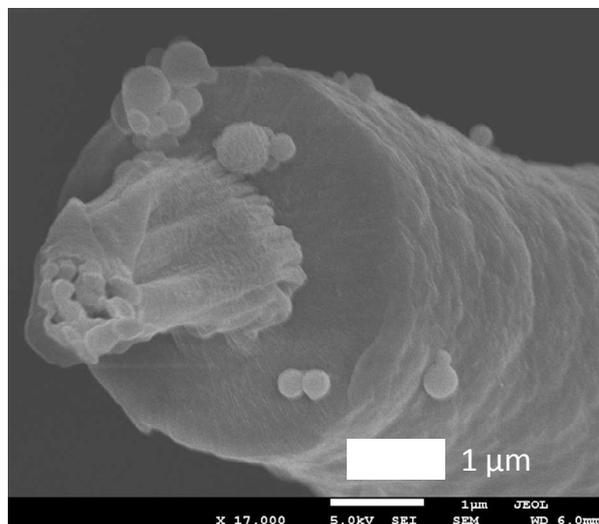
**Abbildung 3.5-4 REM-Aufnahme von PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$ .**

Eine ähnlich Mikrostrukturierung ist aus der „*oblique angle deposition*“-Technik (OAD) bekannt, hierbei wird der Präkursor in einem Winkel von 10 – 15° zwischen Monomerstrom und dem Target abgeschieden.<sup>[170]</sup> Es ist zu vermuten, dass dieses Phänomen bei den hier erhaltenen Proben auf die Anordnung der Träger in der Beschichtungskammer zurückzuführen war. Bei weiteren Proben wurde das Verhalten nicht beobachtet. Im Folgenden sind ein beschichteter Träger und Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,6  $\mu\text{m}$  dargestellt. Die Beschichtung zeigte keine Mikrostrukturierung und erstreckte sich gleichmäßig über die Faser. (Abbildung 3.5-5)



**Abbildung 3.5-5 REM Aufnahme einer PPX-PEO Faser mit einer Schichtdicke von 1,6 µm (A). Aufnahme eines Trägers mit bakterienhaltigen PEO-Fasern mit einer PPX Beschichtung (B).**

Der Querschnitt einer PPX-PEO-Faser mit einer Schichtdicke von 1,5 µm ist in Abbildung 3.5-6 gezeigt. Der PEO-Kern war vollständig von der PPX-Hülle umgeben und befand sich im Inneren. Die PPX-Schicht wies eine gleichmäßige Oberflächenstruktur auf und zeigte eine glatte Schnittkante.

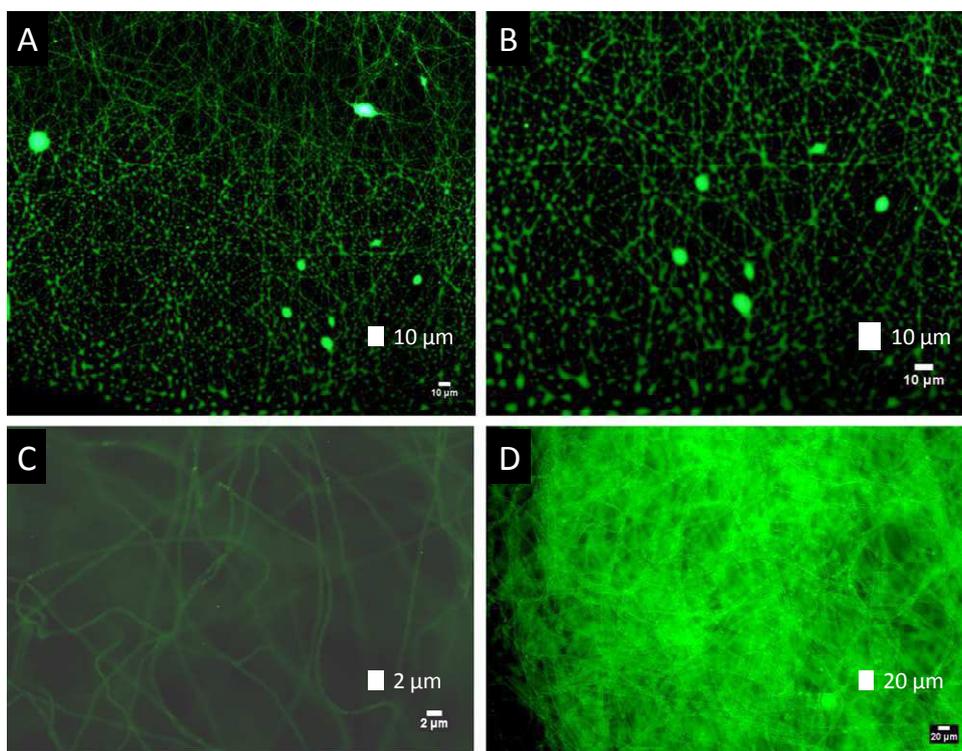


**Abbildung 3.5-6 REM Aufnahme des Querschnittes einer PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5 µm.**

Der Einfluss der PPX-Schicht auf die Wasserbeständigkeit der PEO-Faser wurde im Folgenden ermittelt. Das verkapselte Fluorescein wurde mittels eines optischen Mikroskops mit einer Anregungswellenlänge von 450 – 490 nm innerhalb der Fasern detektiert. Die Faserstruktur war vor der Zugabe von Wasser eindeutig zu identifizieren, nach dem Kontakt

mit Wasser war das Fluorescein auch außerhalb der Fasern zu erkennen. Die Freisetzung des Fluorescein beruhte auf der Aufnahme des Wassers durch das PEO und dessen Quellung. Dies führte unter anderem zu dem Verlust der Faserstruktur.

Im Falle der PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  musste eine starke Farbverstärkung genutzt werden, damit das immobilisierte Fluorescein in den Fasern identifiziert werden konnte. Nach Zugabe des Wassers, wurde keine Freisetzung des Fluorescein festgestellt und die Faserstruktur lag unverändert vor. Das Fluorescein wurde erst nach mechanischer Beschädigung der Fasern freigesetzt. (Abbildung 3.5-7)

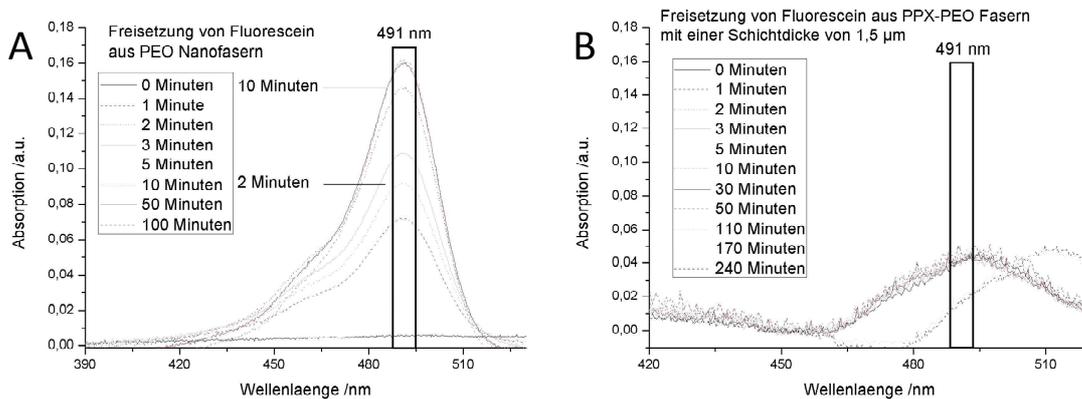


**Abbildung 3.5-7 Mikroskopische Aufnahme von PEO-Nanofasern mit immobilisiertem Fluorescein vor (A) und nach dem Kontakt mit Wasser (B). Mikroskopische Aufnahmen von PPX-PEO-Fasern mit immobilisiertem Fluorescein nach Kontakt mit Wasser (C) und nach mechanischer Beschädigung der Fasermatte (D).**

Die geänderte Freisetzung des Farbstoffes wurde nachfolgend per UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert. Hierfür wurde die Freisetzung von immobilisiertem Fluorescein aus einer unbeschichteten PEO-Fasermatte mit der Freisetzung aus einer PPX-PEO-Fasermatte mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  verglichen.

Im Falle der PEO-Fasern wurde direkt nach dem Einbringen in die Phosphatpufferlösung mit einem pH Wert von 7 eine Absorption bei 491 nm detektiert und nach 10 Minuten in Lösung

wurde annähernd die maximale Freisetzung erreicht. Das Maximum der Absorption wurde nach 100 Minuten beobachtet und die Konzentration des Fluorescein in der Lösung betrug  $1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Die Absorption der Puffer-Lösung nach einer Inkubation mit den PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von  $1,5 \mu\text{m}$  zeigte über einen Zeitraum von 240 Minuten keine Änderung. (Abbildung 3.5-8)



**Abbildung 3.5-8 Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Freisetzung von Fluorescein aus PEO-Nanofasern (A) und PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von  $1,5 \mu\text{m}$  (B).**

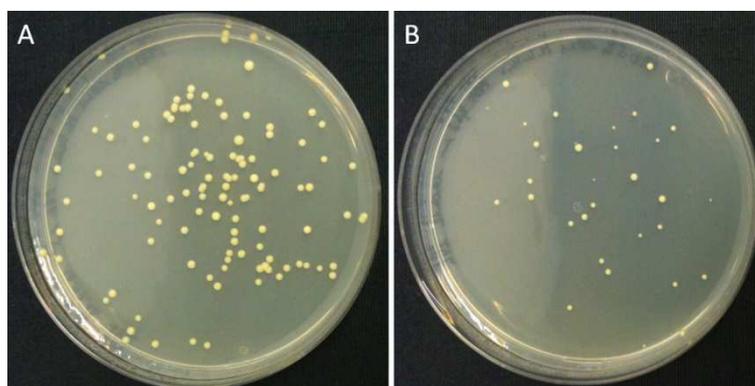
Die Freisetzung des Farbstoffes aus der PEO-Faser entsprach einem „burst release“, einer schnellen und unkontrollierten Freisetzung. Dieses Verhalten ist typisch für Systeme in denen die immobilisierte Substanz gleichmäßig in der Matrix verteilt ist. Im Falle der PPX-PEO-Fasern war die Freisetzung des Farbstoffes stark verändert. Die hydrophobe PPX-Schicht verhinderte die Freisetzung des Farbstoffes für mehr als 240 Minuten. Diese Ergebnisse unterstützten die Erkenntnisse, welche durch die Analyse der Fasern mit einem optischen Mikroskop erhalten wurden.

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass die Ausrüstung der PEO-Fasern mit einer PPX-Schicht durch das CVD-Verfahren erfolgreich durchgeführt wurde. Mit Hilfe von REM-Aufnahmen wurde die Kern-Hülle-Struktur der Fasern und die Oberflächenmorphologie der PPX-Schicht verifiziert und charakterisiert. Der überwiegende Teil der Fasern zeigte eine glatte Oberflächenstruktur, es wurde in wenigen Fällen eine Mikrostrukturierung beobachtet. Die Kern-Hülle-Fasern waren im Gegensatz zu den PEO-Fasern gegen Wasser stabil und die Permeabilität der PPX-PEO-Fasern gegenüber niedermolekularen Stoffen wurde stark vermindert.

### 3.5.5 Nachweis von lebenden Bakterien in PPX-PEO-Fasern

Der erfolgreiche Einsatz von lebenden Kompositen setzt die Erhaltung der Viabilität und in noch stärkerem Masse, die Erhaltung der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Mikroorganismen voraus. In Abschnitt 3.5.3 wurde *M. luteus* erfolgreich in PEO-Fasern durch die Technik des Elektrosplennens verkapselt, weiterhin wurde deren Fähigkeit die Immobilisierung zu überleben demonstriert. Die PEO-Nanofasern waren wasserlabil und setzen das immobilisierte Material z.B. Bakterien, Farbstoff, in die Umgebung frei, daher wurden die Fasern mit einer PPX-Hülle ausgerüstet. Die PPX-PEO-Fasern waren wasserstabil und zeigten eine stark verminderte Freisetzung von verkapseltem Material bei Kontakt mit Wasser. In dem folgenden Abschnitt soll die Viabilität der immobilisierten Bakterien nach dem CVD-Prozess ermittelt werden. Das Beschichtungsverfahren ist frei von Lösungsmitteln und daher sollte keine Quellung der Fasern einsetzen. Es wird erwartet, dass die PEO-Fasern die Bakterien während des Prozesses abschirmen. Der Nachweis lebender Bakterien in PPX-PEO-Fasern wurde mittels der Inokulation von Nährlösungen durchgeführt. Die Lösungen wurden für mindestens 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und die überstehende Flüssigkeit wurde für die Inokulation von Agarplatten genutzt. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C für 48 Stunden wurden diese auf das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* überprüft. Im Falle von lebenden Bakterien in den Fasern sollte ein Wachstum der Kolonien zu beobachten sein.

Es wurden PPX-PEO-Fasern mit Schichtdicken von 1,6 µm und von 4,6 µm als repräsentative Beispiele für den Nachweis verwendet. In beiden Fällen wurden nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in der überstehenden Lösung lebende Bakterien gefunden. Der Nachweis von lebenden *M. luteus* wurde, nach der Inokulation von Agarplatten, durch das Wachstum von Kolonien erbracht. (Abbildung 3.5-9)



**Abbildung 3.5-9** Wachstum von Kolonien von lebenden *M. luteus* nach Inokulation einer Nährlösung mit PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,6 µm (A) und 4,6 µm (B).

Aufgrund der Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Anwesenheit und das Wachstum von *M. luteus* in Lösung, unter Ausschluss einer Kontamination der Nährlösung, auf zwei Möglichkeiten beruhen könnte. Im ersten Fall wurden die immobilisierten Bakterien nicht vollständig durch die PPX-Beschichtung umschlossen und bei Kontakt mit der Nährlösung wurden diese ungehindert freigesetzt. Da die PPX-Beschichtung eine Dicke von über 1,6 bzw. 4,6  $\mu\text{m}$  aufwies und der Beschichtungsprozess mehrfach durchgeführt wurde, wurde davon ausgegangen, dass kein Bakterium an der Außenseite der Kern-Hülle-Fasern vorhanden war. Im zweiten Fall war der Durchtritt der Nährstoffe in die Faser gehemmt, aber möglich. Die Konzentration der Nährstoffe in der Faser nahm zu und die Bakterien vermehrten sich. Die zunehmende Anzahl an *M. luteus* nahm den verfügbaren Platz in der Faser ein, bis kein Freiraum mehr vorhanden war. In dieser Ausgangslage waren zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen nahmen sie die veränderten Verhältnisse wahr und regulierten ihren Metabolismus herunter, dies hätte zu einem Stopp des Wachstums geführt. Die zweite Möglichkeit war, die Bakterien vermehrten sich weiter und es entstand eine Konkurrenzsituation zwischen der physischen Belastbarkeit der Fasern und dem Innendruck, dem Turgordruck, der *M. luteus*. *M. luteus* ist osmotisch stabil und können als gram-positive Bakterien einen Turgordruck von über 20 bar aufbauen. <sup>[184, 159]</sup> Dieser Druck reichte aus, die hydrophobe PPX-Schicht zu beschädigen und eine Freisetzung der Bakterien zu ermöglichen. Die in Lösung befindlichen Bakterien vermehrten sich und wurden nachfolgend für die Inokulation einer nährstoffhaltigen Agarplatte genutzt. Das Wachstum der Kolonien von *M. luteus* auf der Platte war daher der Nachweis von lebenden Bakterien in dem Inneren der Kern-Hülle-Fasern.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die in den PEO-Nanofasern immobilisierten Bakterien den CVD-Prozess überlebten und bei Anwesenheit von Nährstoffen ihr Wachstum wieder aufnahmen.

### **3.5.6 Enzymatische Aktivität der immobilisierten Bakterien**

Die wasserlabilen PEO-Nanofasern mit immobilisierten Bakterien wurden in Abschnitt 3.5.4 mittels des CVD-Prozess in PPX-PEO-Kern-Hülle-Fasern überführt. Im Anschluss an die Herstellung der wasserstabilen Komposite, wurde deren Viabilität und Fähigkeit zur Vermehrung demonstriert, vgl. Abschnitt 3.5.5. Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz dieser Art von lebenden Kompositen ist neben ihrer Viabilität, die Erhaltung ihrer enzymatischen Funktionalität. Im Folgenden soll dieses Verhalten mittels des Umsatzes von

Resazurin in einer wässrigen Phosphatpufferlösung untersucht werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Einsatz dieser Kern-Hülle-Fasern, ist die Separation der immobilisierten Mikroorganismen und der umgebenden Lösung. Dies stellt sicher, dass die Umgebung und damit zugleich das Produkt nicht kontaminiert werden. In Abschnitt 3.5.5 wurde die Freisetzung der Bakterien nach dem Inokulieren einer Nährstofflösung demonstriert. Die Freisetzung wurde auf die Vermehrung und die damit einhergehende physische Beschädigung der PPX-Schicht zurückgeführt. Aus diesem Grund sollen nachfolgende Untersuchungen unter Nährstoffausschluss durchgeführt werden, die Vermehrung der immobilisierten *M. luteus* sollte nicht gefördert werden. Zusätzlich sollten Bakterien, die sich in Lösung befinden, daran gehindert zu wachsen und damit einen falsch positiven Nachweis zu erbringen. Diese zusätzliche Freisetzung kann z.B. durch einen Bruch einer Faser während der Handhabung begründet sein.

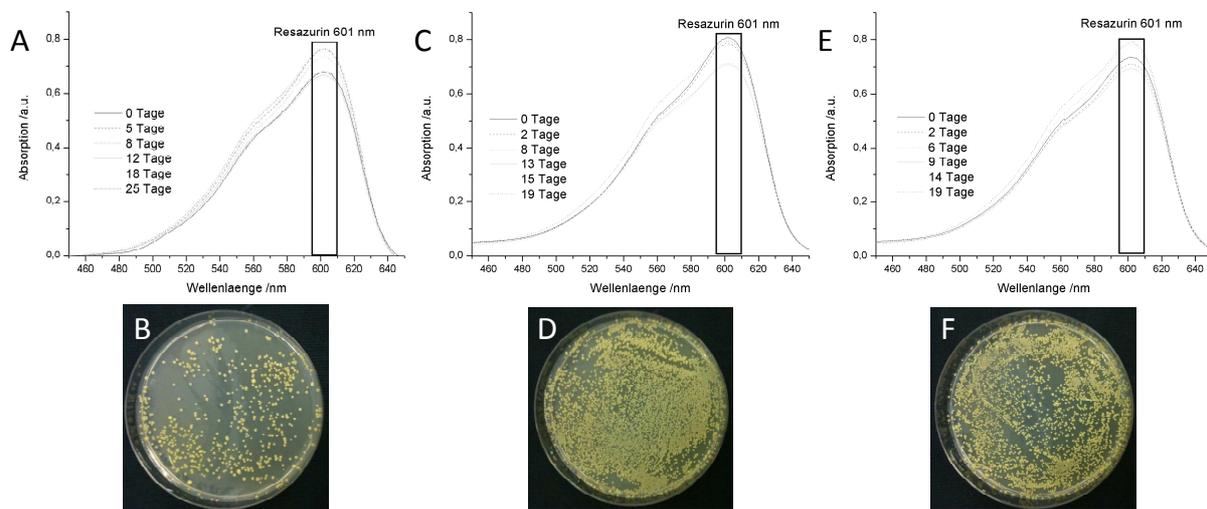
Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Bakterien soll mittels Resazurin, einer in der Literatur bekannten Testsubstanz, durchgeführt werden, vgl. Abschnitt 3.4.7.<sup>[175]</sup> Der reduktive Umsatz soll mittels UV/VIS-Spektroskopie verfolgt werden, Resazurin besitzt bei pH 7 das Absorptionsmaximum bei 601 nm und Resorufin bei pH 7 bei 572 nm. Die quantitative Auswertung der irreversiblen Reduktion von Resazurin zu Resorufin soll ausschließlich über die Abnahme der Intensität des Maximums von Resazurin erfolgen. Die Intensität des Maximums von Resorufin war auf Grund der reversiblen Reduktion zu Dihydroresorufin nicht repräsentativ. Die schematische Umsetzung von Resazurin wurde bereits in Abschnitt 3.4 diskutiert.

Die Freisetzung von *M. luteus* aus den Kern-Hülle-Fasern in die Resazurin-Lösung wurde im gesamten Verlauf des Experimentes überprüft. Hierfür wurde ein Teil der überstehenden Lösung nach der Inokulation mit den PPX-PEO-Fasern mit immobilisierten Bakterien, für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten genutzt. Diese Platten wurden im Anschluss inkubiert und im Falle des Wachstums von Kolonien, sollte deren Anzahl bestimmt werden. Da die Ausrüstung der PEO-Nanofasern mit einer hydrophoben PPX-Schicht zu wasserstabilen Kompositen führte, vgl. Abschnitt 3.5.4, wird eine Freisetzung der immobilisierten Bakterien nicht erwartet.

Im folgenden Abschnitt sollen Kern-Hülle-Fasern mit Schichtdicken von 1,5, 2,0, 3,1 und 4,6 µm verwendet werden. Es wird vermutete, dass der Zeitraum zwischen der Inokulation und dem detektierbaren Umsatz von Resazurin abhängig von der vorhandenen Schichtdicke

sein sollte. Die PPX-Schicht sollte den Eintritt des Resazurin in die Faser und den Austritt des Resorufin hemmen. Aus diesem Grund wird erwartet, dass im Falle einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  die charakteristische Absorptionsbande des Resorufin nach der geringsten Inkubationsdauer detektiert wird. Die Freisetzung der Bakterien in die Lösung sollte in allen Fällen gehindert sein, da bereits eine Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  ausreicht die Freisetzung von Fluorescein zu vermeiden, vgl. Abschnitt 3.5.4.

Die Proben mit einer Schichtdicke von 2,0, 3,1 und 4,6  $\mu\text{m}$  PPX werden nachfolgend diskutiert. In allen Fällen wurde während des untersuchten Zeitraumes, 19 Tagen bzw. 25 Tage, kein Umsatz des Resazurin detektiert. (Abbildung 3.5-10)

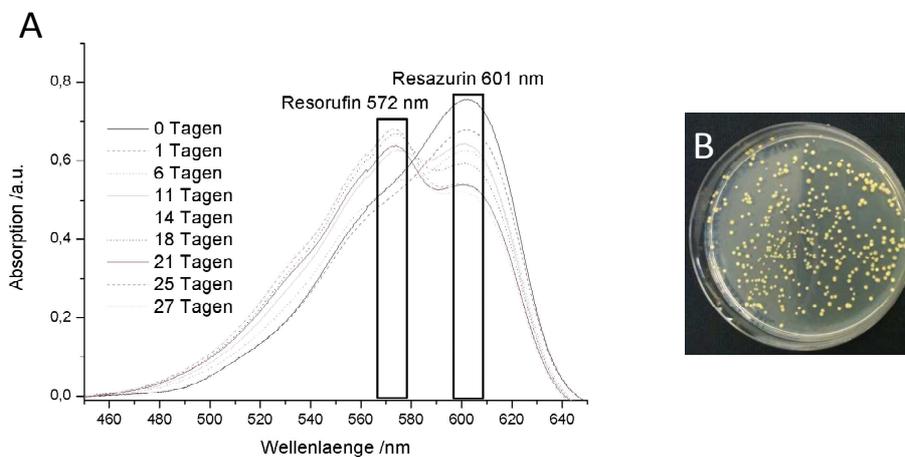


**Abbildung 3.5-10 Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Resazurin-Lösung nach Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 2,0  $\mu\text{m}$  (A), 3,1  $\mu\text{m}$  (C) und 4,6  $\mu\text{m}$  (E). Wachstum von Kolonien von *M. luteus* nach Inokulation und Inkubation einer Nährlösung mit bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 2,0  $\mu\text{m}$  (B), 3,1  $\mu\text{m}$  (D) und 4,6  $\mu\text{m}$  (F) im Anschluss an die Umsetzung von Resazurin.**

Die Freisetzung der Bakterien in die Lösung wurde in allen Fällen verhindert, das aufgetretene isolierte Wachstum von Kolonien wurde durch die physische Beschädigung einzelner Fasern erklärt. Die immobilisierten *M. luteus* in der jeweiligen Faser wurden freigesetzt und verursachten die Kolonien auf den Agarplatten. Die verbleibenden Bakterien in der Lösung konnten auf Grund des Nährstoffmangels nicht wachsen und starben mit fortschreitender Versuchsdauer ab. Das Fehlen von Kolonien in der anschließenden Probenentnahme war darauf zurückzuführen.

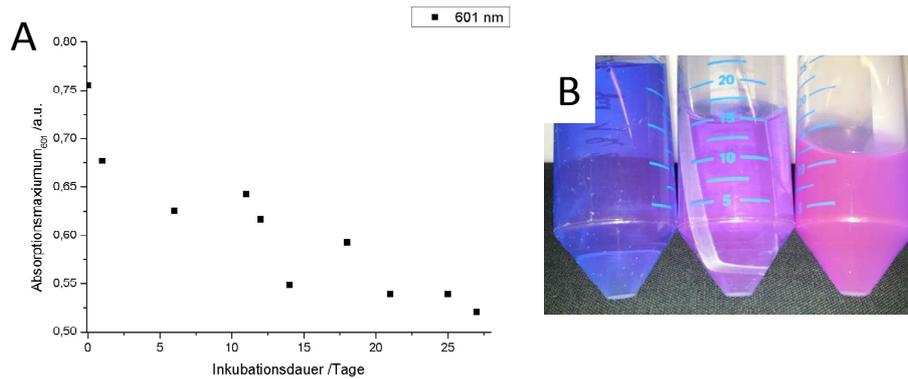
Der ausbleibende Umsatz des Resazurin kann durch das Absterben der Bakterien in den Fasern begründet gewesen sein, um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Proben im Anschluss für die Inokulation einer nährstoffhaltigen Lösung genutzt. Die Nährstofflösungen wurden nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden für die Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet und diese Platten wurden wiederum für 48 Stunden inkubiert. In allen Fällen wurde durch das Wachstum von Kolonien die Anwesenheit von lebenden, verkapselten *M. luteus* in den Fasern bewiesen. (Abbildung 3.5-10)

Es wurden weiterhin PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von  $1,5\ \mu\text{m}$  verwendet, die Anfangskonzentration des Resazurin betrug  $1,6 \cdot 10^{-3}\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Der Erstumsatz des Resazurin zu Resorufin wurde nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen detektiert. (Abbildung 3.5-11)



**Abbildung 3.5-11 Überlagerung der UV/VIS-Spektren der Resazurin-Lösung nach der Inkubation mit bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von  $1,5\ \mu\text{m}$  (A). Wachstum von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten nach Inkubation der Resazurin-Lösung (B).**

Die Intensität des Absorptionsmaximums bei 601 nm nahm mit fortschreitender Zeit ab und die Intensität der Absorption des Resorufin stieg an. (Abbildung 3.5-12)



**Abbildung 3.5-12** Auftragung der Absorption der Resazurin-Lösung gegen die Inkubationsdauer (A). Aufnahme der Umsetzung von Resazurin (links) zu Resorufin (rechts) durch die Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  (B).

Die enzymatische Aktivität der immobilisierten Bakterien wurde für 22 Tage bis zur Konstanz der Intensität des Signals des Resazurins verfolgt und die Endkonzentration betrug  $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Die Freisetzung der Bakterien in die Pufferlösung wurde während des Experimentes kontrolliert. Es wurde außer einer einmaligen und isolierten Freisetzung nach zwölf Tagen, keine Bakterien nachgewiesen. Im Anschluss an die Umsetzung des Resazurins, wurden die Kern-Hülle-Fasern auf die Anwesenheit von lebenden Bakterien untersucht. Hierfür wurden die Komposite für die Inokulation einer nährstoffhaltigen Lösung verwendet und diese wurde für 72 Stunden inkubiert. Die Lösung wurde anschließend für die Inkubation von Agarplatten mit Nährstoffen verwendet und es wurden Kolonien von *M. luteus* nach 48 Stunden erhalten.

Die Ergebnisse der Versuche wurden in weiteren Experimenten bestätigt. Es wurde sowohl bei Fasern mit einer Schichtdicke von 1,6  $\mu\text{m}$  als auch 1,7  $\mu\text{m}$  der Umsatz von Resazurin durch immobilisierte Bakterien nachgewiesen.

Es ist bekannt, dass die Umsetzung von Resazurin von der Anzahl der Bakterien in den Fasern abhängt.<sup>[159]</sup> Da keine Aussage über diese Zahl getroffen werden konnte, wurden die Träger für die selbe Zeit dem Elektrospinn-Vorgang unterzogen. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Anzahl an Bakterien in den Kompositen vergleichbar war. Es wurde jedoch in einigen Proben die Freisetzung von Bakterien vor Ablauf von 22 Tage festgestellt. Diese Freisetzung war zum einen isoliert, d.h. es wurde davon ausgegangen, dass einzelne Fasern gebrochen waren. Zum anderen wurde in einigen Fällen auch eine Freisetzung über die gesamte Meßzeit beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass die Zellteilung der immobilisierten Bakterien für dieses Verhalten verantwortlich war. Es wurde daher vermutet,

dass die Behandlung der bakterienhaltigen Komposite im Anschluss an das Elektrosponnen von großer Bedeutung war. Aus diesem Grund wurden die Träger mit den bakterienhaltigen Fasern direkt nach dem Elektrosponnprozess bei 4 °C gelagert. Die Träger wurden zudem erst unmittelbar vor dem CVD-Prozess entnommen und anschließend sofort wieder bei 4°C gekühlt. Es ist zu anzunehmen, dass dieses Verfahren die Aktivität und die Vermehrung der Bakterien reduzierte.

Die folgenden Tabelle fasst die Freisetzung von *M. luteus* während der Umsetzung des Resazurins in Abhängigkeit der Schichtdicke zusammen. (Tabelle 3.5-3)

**Tabelle 3.5-3 Zusammenfassung der Freisetzung von *M. luteus* aus PPX-PEO-Fasern während der Umsetzung von Resazurin.**

Inkubationsdauer /Tage	0	1	2	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	
Schichtdicke / $\mu\text{m}$																					
1.5	0 <sup>a)</sup>	0	x <sup>b)</sup>	0	0	0	0	0	x	0	47	x	0	0	x	0	0	0	0	0	
2.0	0	0	x	0	0	0	0	0	x	0	0	x	6	0	x	0	0	0	0	0	
3.1	0	0	94	x	0	13	x	0	9	x	0	0	0	0	0	x	6	x	x	x	
4.6	0	0	0	x	0	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	x	3	x	x	x	

<sup>a)</sup>Zahl: Anzahl an beobachteten Kolonien von *M. luteus* nach der Inokulation und Inkubation von nährstoffhaltigen Agarplatten bei 37 °C für 72 Stunden; <sup>b)</sup>x: Die Probe wurde nicht für die Inokulation verwendet.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die PPX-Hülle mit einer Schichtdicke von mindestens 1,5  $\mu\text{m}$  ausreichte, die Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* in eine wässrige Umgebung für mehr als 22 Tage zu verhindern. Es wurde gezeigt, dass immobilisierte *M. luteus* eine Lagerung in PPX-PEO-Fasern unter Ausschluss von Nährstoffen bei einer Temperatur von 37 °C für mindestens 25 Tage überlebten. Der Umsatz von Resazurin durch die enzymatische Aktivität der Bakterien war bei den hier verwendeten Kern-Hülle-Fasern von der Schichtdicke des PPX abhängig. Im Falle einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  wurde ein Erstumsatz nach 8 Tagen Inkubationszeit detektiert, bei Schichtdicken von 2,0  $\mu\text{m}$  und darüber wurde auch nach 19 bzw. 25 Tagen kein Umsatz ermittelt. Es wurde jedoch in allen Fällen lebende

immobilisierte Bakterien nachgewiesen, daher korrelierte der Umsatz mit der Schichtdicke. Die PPX-Schicht stellte eine hydrophobe Barriere da, welche als semipermeable Membran fungierte. Die Schicht verhinderte den Durchtritt der Bakterien, da diese einen Durchmesser zwischen 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$  aufwiesen. Das Resazurin war im Gegensatz dazu, in der Lage in die Fasern zu diffundieren. Es kam zu einem Stoffaustausch zwischen der Pufferlösung und den Fasern und damit traten die immobilisierten Bakterien mit dem Resazurin in Kontakt. Im Falle einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  war der Durchtritt des Resazurins und der Austritt des Resorufins für eine Detektion genügend schnell. Die hydrophobe Barriere bei Dicken von 2,0  $\mu\text{m}$  und mehr stellte eine so große Hinderung da, dass der Eintritt des Resazurins und der Austritt des Resorufins in der Meßzeit nicht detektiert werden konnte.

### **3.5.6.1 Vergleich der Aktivität von in Mikro- und Nanofasern immobilisierten Bakterien**

In beiden Fasersystemen wurde der Umsatz von Resazurin erfolgreich detektiert. Im Falle der PPX-PVA-Mikrofasern wurde der Umsatz bei einer Schichtdicke von 5,4  $\mu\text{m}$  beobachtet. Aufgrund der in Abschnitt 5.4 diskutierten Ergebnisse wurde vermutet, dass dies mit der Diffusion der Nahrung aus den Fasern in Verbindung steht. In dem vorliegenden Falle wurde der Umsatz des Resazurins bei einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  detektiert, dieses Verhalten wurde bereits in Abschnitt 3.5.6 diskutiert. Basierend auf den Ergebnissen der Hydrogelmikrofasern war zu vermuten, dass die Vermehrung der Bakterien und damit die Erhöhung der Anzahl an Bakterien pro Faser für den erfolgreichen Umsatz verantwortlich war. Im Falle der Nanofasern ergaben sich für die immobilisierten Bakterien andere Grenzbedingungen. Die Vermehrung der Bakterien könnte aufgrund des geringen Durchmessers der Faser verlangsamt worden sein. Weiterhin würde eine Zellteilung zu einem stärkeren Druck innerhalb der Nanofasern führen und diese im Extremfall zerstören. In diesem Fall wären der Durchtritt des Resazurins in die Faser, der Umsatz zu Resorufin und der Austritt aus der Faser stärkere Einflussgrößen als eine Vermehrung der Bakterien in den Fasern. Es wäre daher von großem Interesse, die Anzahl der Bakterien, sowohl in Nano- als auch in Mikrofasern, vor und nach der Inokulation zu bestimmen und diese mit dem Umsatz von Resazurin in Beziehung zu setzen.

### 3.5.7 Sequestrierung von Gold-Ionen

Die Separation der biologischen Einheiten und der umgebenden Lösung ist ein Kriterium für den möglichen Einsatz von lebenden Kompositen. In Abschnitt 3.5.6 wurde die erfolgreiche Trennung der verkapselten Bakterien und der umgebenden Pufferlösung demonstriert. Die Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5, 2,0, 3,1 und 4,6  $\mu\text{m}$  verhinderten eine Freisetzung der Bakterien für mindestens 19 Tage. Aus diesem Grund sollen die Komposite im folgenden Abschnitt für die Sequestrierung eines bestimmten Metalls, i.e. Gold, aus einer wässrigen Lösung verwendet werden. Das immobilisierte Bakterium *M. luteus* besitzt die Fähigkeit Metallionen aus einer wässrigen Lösung zu sequestrieren und dieses Verhalten wurde bereits in der Literatur für verschiedene Metallionen, z.B. Strontium, Kupfer und Gold, beschrieben.<sup>[177-179]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass die Biosorption des Goldes von dem vorliegenden pH-Wert abhängig ist, die maximale Aufnahme wurde bei einem pH-Wert von 3 ermittelt.<sup>[180]</sup>

Der der pH-Wert der Lösung wurde daher auf 3 eingestellt. Der Goldgehalt der Lösung soll vor und nach der Inokulation mit den Kompositen mittels ICP-MS bestimmt werden. Die Differenz der beiden Werte entspricht der absoluten Sequestrierung des Goldes durch das Komposit. Die Sequestrierung des Goldes der verkapselten Bakterien ist daher durch folgende Formel zu ermitteln

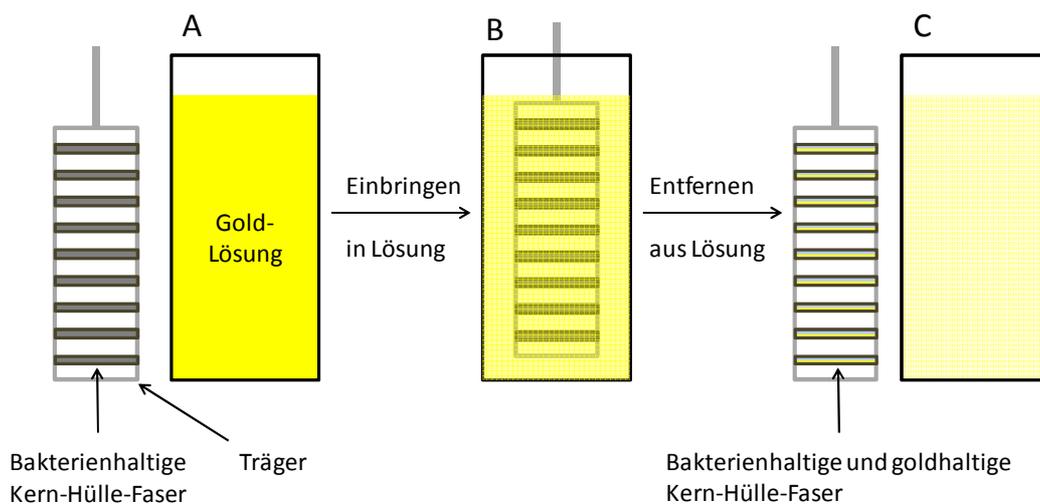
$$S_B = S_G - S_P - S_T. \quad (4)$$

Die Herleitung der Formel wurde bereits in Abschnitt 3.4.8 durchgeführt. Die Werte für  $S_B$ ,  $S_G$  und  $S_T$  sind in Tabelle 3.5-4 gelistet.

Es wurden Fasern ohne PPX-Hülle und Kern-Hülle-Fasern mit Schichtdicken von 1,5, 3,5 und 4,5  $\mu\text{m}$  für die Sequestrierung verwendet werden. Die Komposite wurden für 1 Stunde und im Falle der Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  weiterhin für 24 Stunden, für die Inokulation einer Goldlösung bei 37 °C genutzt. Es wurde angenommen, dass die Biosorption des Goldes weitgehend auf dem Einfluss der Bakterien basiert. Daher sollten die PEO-Fasern mit Bakterien aber ohne PPX-Beschichtung nach 1 Stunde die größte Menge an Gold aus der Lösung sequestrieren. Die *M. luteus* wurden nach dem Einbringen der Fasern in die Lösung freigesetzt, vgl. Abschnitt 3.5.4, und sollten daher direkt mit den Gold-Ionen in Kontakt kommen. Die Kern-Hülle-Fasern sollten die Freisetzung der Bakterien verhindern und die

PPX-Schicht sollte eine Barriere für den Eintritt der Gold-Ionen in die Faser darstellen. Die sequestrierte Menge an Gold sollte aus diesem Grund nach 1 Stunde geringer sein. Die Erhöhung der Inokulationszeit auf 24 Stunden sollte eine Erhöhung der sequestrierten Masse des Goldes zur Folge haben.

Im Anschluss an die Sequestrierung werden die immobilisierten Bakterien für die Inokulation von nährstoffhaltigen Lösungen verwendet und diese werden für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Nährstofflösung wird anschließend für die Inokulation von Agarplatten mit Nährstoffen verwendet und diese werden für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* sollte die Anwesenheit von lebenden Bakterien im Inneren der Fasern nach der Behandlung mit der Goldlösung beweisen. Das Wachstum der Kolonie wird erwartet, da die Kern-Hülle-Fasern eine Mikroumgebung erzeugen und die Viabilität der Bakterien bewahren. Die nachfolgende Abbildung fasst die Sequestrierung des Goldes durch die bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern schematisch zusammen. (Abbildung 3.5-13)



**Abbildung 3.5-13** Schematische Abbildung der bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern auf dem Träger vor dem Einbringen in die Goldlösung (A). Die goldhaltige Lösung wurde mit dem Träger inokuliert (B) und das Entfernen des Trägers nach dem Einbringen (C).

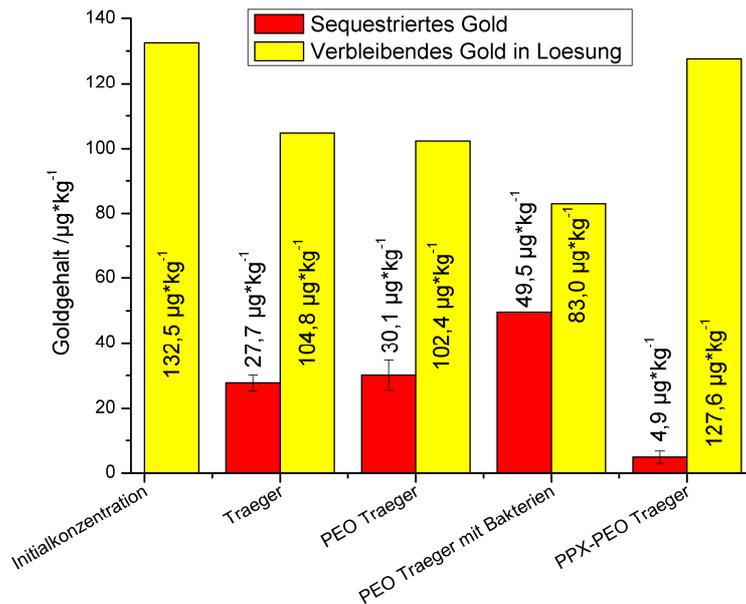
Die Goldkonzentration der verwendeten Lösung wurde vor Beginn der Inokulationen bestimmt und betrug  $132,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , dieser Wert wurde nachfolgend als Referenz verwendet. Im ersten Fall wurden die Werte für einen Träger ohne Fasern und ohne Beschichtung und denen eines Trägers mit einer PPX-Beschichtung von  $1,5 \mu\text{m}$  bestimmt. Nach einer Stunde, zeigte der unbeschichtete Träger eine Aufnahme von  $24,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Gold und

der beschichtete Träger eine Aufnahme von  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Die Beschichtung des Trägers mit einer Schichtdicke von  $1,5 \mu\text{m}$  reduzierte die Abnahme des Goldgehaltes nach einer Inokulationszeit von einer Stunde um bis zu 80 %.

Die Abnahme des Goldgehaltes der Lösung im Falle des Einbringens des Edelstahlträgers betrug  $24,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Dieses war auf die Oxidation der Eisen-Ionen und die daraus resultierende Reduktion der Gold-Ionen zurückzuführen. Das Gold schied sich auf dem Träger ab und dieser zeigte im Anschluss einen goldenen Glanz. Im Gegensatz dazu wurde die Abnahme des Goldgehaltes durch die Beschichtung des Trägers mit PPX stark gesenkt. Die PPX-Schicht verhinderte den Durchtritt der Metall-Ionen und demzufolge wurde nur eine geringe Abnahme des Goldgehaltes beobachtet. Die Permeabilität von Eisen-Ionen durch eine PPX-Schicht wurde in der Literatur bereits beschrieben. Es wurde festgestellt, dass eine Schichtdicke von mindestens  $700 \text{ nm}$  ausreichte den Durchtritt von Eisen-Ionen zu verhindern.<sup>[168]</sup>

Im Folgenden wurden mit PEO-Nanofasern beladene Träger und Träger mit in PEO-Fasern verkapselten Bakterien verwendet. Die Goldlösung nach der Inokulation mit dem Träger mit den PEO-Fasern zeigte eine Abnahme von  $30,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $4,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), dies entsprach einer Aufnahme von Gold durch die Fasern von  $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu betrug die Abnahme des Goldgehaltes, nach einer Inokulation mit den PEO-Fasern mit verkapselten Bakterien,  $49,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (SD:  $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dies entsprach einer Sequestrierung durch die Bakterien von  $19,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Die Freisetzung der Bakterien aus den Fasern hatte eine Vervierfachung der Abnahme des Goldgehaltes, im Gegensatz zu dem Polymer, zur Folge.

Die Abbildung 3.5-14 fasst die Ergebnisse der Vorversuche zusammen.



**Abbildung 3.5-14 Grafische Zusammenfassung der Sequestrierung von Gold in Vorversuchen durch Edelstahlträger, Träger mit PEO-Nanofasern, Träger mit bakterienhaltigen PEO-Nanofasern und PPX beschichteter Träger mit PPX-PEO-Fasern.**

In Abschnitt 3.5.6 wurde nachgewiesen, dass die Kern-Hülle-Fasern eine Freisetzung der Bakterien in wässriger Umgebung für mindestens 19 Tage verhinderten. Die folgenden Werte berücksichtigen diese Ergebnisse und stellen daher ausschließlich die Menge an Gold dar, die durch die immobilisierten Bakterien sequestriert worden ist. Es wurden Kern-Hülle-Fasern mit immobilisierten Bakterien und einer Schichtdicke von 1,5 µm für die Sequestrierung verwendet. Die Bakterien sequestrierten nach einer Stunde eine Gold Menge von 2,5 µg·kg<sup>-1</sup> (SD: 2,0 µg·kg<sup>-1</sup>). Im Falle einer Schichtdicke von 3,5 µm wurde eine Sequestrierung von 0,6 µg·kg<sup>-1</sup> (SD: 1,7 µg·kg<sup>-1</sup>) erreicht und bei den Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 4,5 µm wurde eine Abnahme des Goldgehaltes um 4,5 µg·kg<sup>-1</sup> (SD: 8,8 µg·kg<sup>-1</sup>) detektiert. Im Vergleich zu der Sequestrierung der Bakterien, welche in PEO-Fasern eingebracht wurden, war die Abnahme stark verringert.

Die Inokulationszeit der Goldlösung wurde im Folgenden auf 24 Stunden erhöht und es wurden PPX-PEO-Fasern ohne und mit immobilisierten *M. luteus* und einer Schichtdicke von 1,5 µm verwendet. Das Komposit ohne Bakterien führte zu einer Sequestrierung von 4,9 µg·kg<sup>-1</sup>. Die immobilisierten Bakterien sequestrierten 126,3 µg·kg<sup>-1</sup> (SD: 0,1 µg·kg<sup>-1</sup>) Gold aus der Lösung, dies entspricht einer Abnahme des Goldgehaltes um 95 %. (Tabelle 3.5-4)

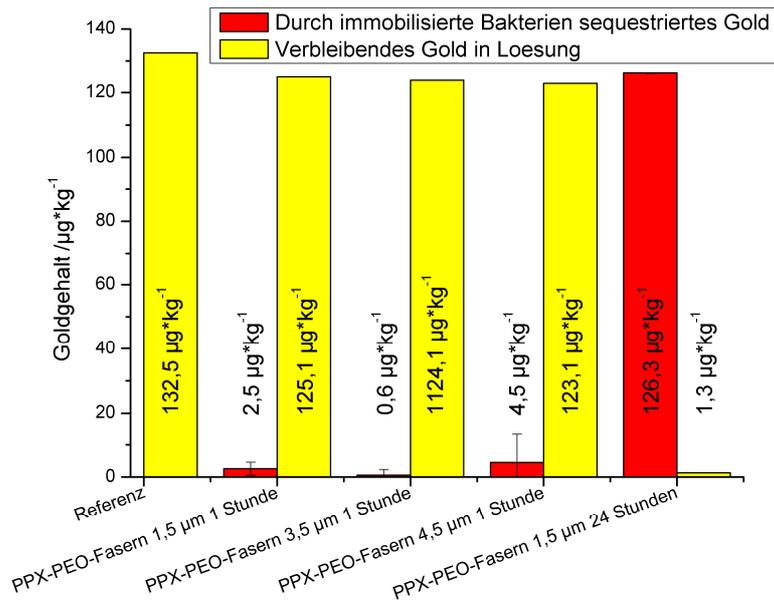
Tabelle 3.5-4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequestrierung von Gold-Ionen aus einer wässrigen Lösung.

Biohybrid-Fasern	Schichtdicke / $\mu\text{m}$	Dauer der Sequestrierung /Stunde	Sequestriertes Gold durch die Bakterien / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Sequestriertes Gold <sup>a)</sup> /%
PEO mit <i>M luteus</i>	0	1	19,4 <sup>b)</sup> (SD: 0,0)	15
PPX-PEO 1,5 $\mu\text{m}$	1,5	1	2,5 <sup>c)</sup> (SD: 2,0)	1.9
PPX-PEO 3,5 $\mu\text{m}$	3,5	1	0,6 <sup>c)</sup> (SD: 1,7)	0.5
PPX-PEO 4,5 $\mu\text{m}$	4,5	1	4,5 <sup>c)</sup> (SD: 8,8)	3.4
PPX-PEO 1,5 $\mu\text{m}$	1,5	24	126,3 <sup>c)</sup> (SD: 0,1)	95

<sup>a)</sup>Anfangskonzentration des Goldes war  $132,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; <sup>b)</sup>Der mit PEO behängte Rahmen sequestrierte  $30,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Gold; <sup>c)</sup>Der mit PPX beschichtete und mit PEO-Fasern behängte Rahmen sequestrierte  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  sowohl nach einer als auch 24 Stunden;

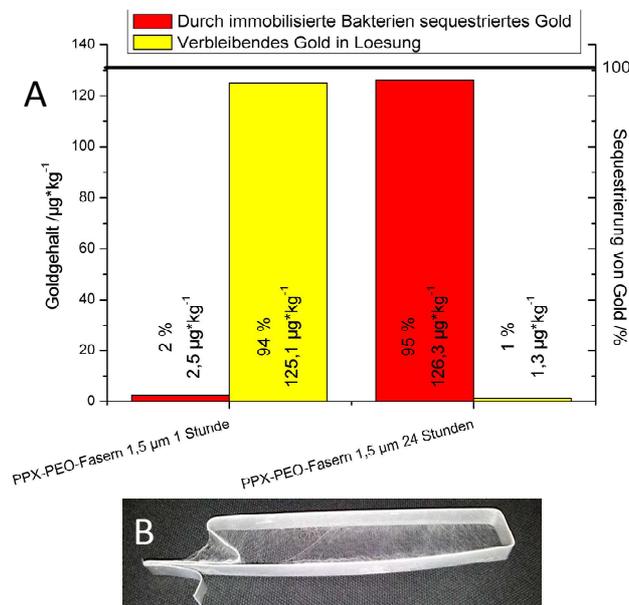
Die nachfolgende Abbildung stellt das Ergebnis grafisch dar. (Abbildung 3.5-15)

## Ergebnisse und Diskussionen



**Abbildung 3.5-15 Übersicht der Gold Aufnahme der bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit unterschiedlichen Schichtdicken und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.**

Weiterhin wurde die Gold Aufnahme der bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5 µm für unterschiedliche Zeiten angeführt. Ein behängter Träger nach der Sequestrierung des Goldes ist zudem abgebildet. (Abbildung 3.5-16)



**Abbildung 3.5-16 Diagramm der Sequestrierung von Gold-Ionen nach einer ein und 24 stündigen Inokulation mit bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5 µm (A). Abbildung eines Trägers mit PPX-PEO-Fasern, 1,5 µm, im Anschluss an die Sequestrierung (B).**

Im Folgenden wurde die Masse an sequestriertem Gold pro Gramm der eingesetzten Bakterien berechnet. Da die genaue Angabe der Masse der immobilisierten Bakterien nicht bekannt war, wurde basierend auf der Durchflussgeschwindigkeit der Formulierung während des Elektrospleinprozesses, dem Gewichtsanteil von Polymer zu Lösungsmittel bzw. von Polymer zu Bakterien und der Dauer des Bespleinens des Trägers ein Wert von 0,4 mg an Bakterien pro Probe berechnet. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen. (Tabelle 3.5-5)

**Tabelle 3.5-5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequestrierung von Gold-Ionen durch freie und immobilisierte Bakterien.**

<b>Bakterienhaltige Probe</b>	<b>Immobilisierten Bakterien /mg<sup>a)</sup></b>	<b>Sequestriertes Gold /mg<sup>a)</sup></b>	<b>Gold pro Bakterien /mg Au·(g Bkt.)<sup>-1a)b)</sup></b>	<b>Gold pro Bakterien /μmol Au·(g Bkt.)<sup>-1 a)</sup></b>
<b>PEO-Fasern</b>	0,4	4,95·10 <sup>-2</sup>	120	600
<b>PPX-PEO-Fasern mit 1,5 μm nach 1 Stunde</b>	0,4	2,5·10 <sup>-3</sup>	6	30
<b>PPX-PEO-Fasern mit 3,5 μm nach 1 Stunde</b>	0,4	6·10 <sup>-4</sup>	1	7
<b>PPX-PEO-Fasern mit 4,5 μm nach 1 Stunde</b>	0,4	4,5·10 <sup>-3</sup>	11	57
<b>PPX-PEO-Fasern mit 1,5 μm nach 24 Stunden</b>	0,4	1,26·10 <sup>-1</sup>	320	1600

<sup>a)</sup>Nass-Masse der Bakterien; <sup>b)</sup>Bakterien (Bkt.)

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Bakterien in den PEO-Fasern ca. 600 μmol Au·(g Bkt.)<sup>-1</sup> sequestrierten. Im Gegensatz dazu zeigten die bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern mit einer Inkubationszeit von einer Stunde eine deutlich geminderte Aufnahme. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Abschirmung der PPX-Schicht dominierte. Die in den PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5 μm immobilisierten Bakterien sequestrierten nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ca.

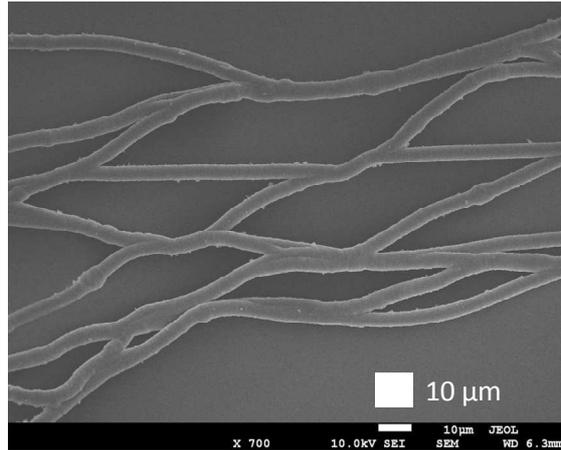
1600  $\mu\text{mol Au}\cdot(\text{g Bkt.})^{-1}$ . Im Vergleich mit den Proben nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde ergab sich, dass die Aufnahme von Gold pro Masse an Mikroorganismen stark gesteigert war. Die an dieser Stelle aufgeführten Werte stellen eine Schätzung dar, aus diesem Grund wurde von einer Diskussion mit Literaturwerten abgesehen.

Im Anschluss an die Sequestrierung des Goldes wurden die verwendeten Komposite für die Inokulation von nährstoffhaltiger Lösung genutzt. Diese wurde für 96 Stunden bei 37 °C inkubiert und die überstehende Lösung wurde für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert und das Wachstum von charakteristischen Kolonien von *M. luteus* bewies die Anwesenheit von lebenden Bakterien nach der Sequestrierung in den Fasern. (Abbildung 3.5-17)



**Abbildung 3.5-17 Nachweis von lebenden, immobilisierten *M. luteus* in PPX-PEO-Fasern nach der Sequestrierung von Gold aus wässriger Lösung.**

Die PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  PPX wurden weiterhin im Anschluss an die Sequestrierung des Goldes mittels REM untersucht. (Abbildung 3.5-18)



**Abbildung 3.5-18 REM-Aufnahme von bakterienhaltigen PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5 µm nach der Sequestrierung von Gold.**

Die Fasern lagen unzerstört vor und es wurden keine Defekte in der Beschichtung erkannt. Die bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern überstanden daher die Behandlung mit der Gold-Lösung, dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass die Bakterien während der Sequestrierung nicht ausgetreten sind.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Reduktion des Goldes in der Lösung durch die PPX-Schicht um 80 % gesenkt wurde, dies war auf die nahezu vollständige Beschichtung des Trägers durch das CVD-Verfahren zurückzuführen. Im Falle des freien Edelstahl-Trägers wurden die Eisen-Ionen oxidiert und elementares Gold schied sich an dem Träger ab. Die PPX-Sperrschicht verhinderte dies und verringerte daher die Reduktion des Edelmetalls.<sup>[168]</sup> Im Falle einer Inokulation von einer Stunde wurden bei den PEO-Fasern mit Bakterien die höchste Sequestrierung detektiert. Die Freisetzung der Bakterien hatte einen direkten und ungehinderten Kontakt der Bakterien mit den Ionen zur Folge, dies führte zu der maximalen Sequestrierung. Im Falle der immobilisierten Bakterien wirkte die PPX-Hülle als schwach permeable Membran und der Eintritt der Ionen in die Faser war gehindert. Aus diesem Grund ist die Masse des Goldes, welche in Kontakt mit den Bakterien steht, stark verringert und dies führte zu einer Abnahme der Sequestrierung. Die Erhöhung der Inkubationszeit auf 24 Stunden, führte zu einer 95 % Sequestrierung des Goldes aus der Lösung. Der Eintritt der Gold-Ionen in die Faser war zeitabhängig und aufgrund der erhöhten Zeitspanne, wurde die Goldmasse, die den Bakterien für die Sequestrierung zur Verfügung stand, maximiert.

Die in den Kern-Hülle-Fasern immobilisierten Bakterien überlebten mindestens eine Stunde in einer wässrigen pH 3 Lösung bei 37 °C bei der Anwesenheit von Gold-Ionen.

### 3.5.7.1 Vergleich der Sequestrierung von bakterienhaltigen Nano- und Mikrofasern

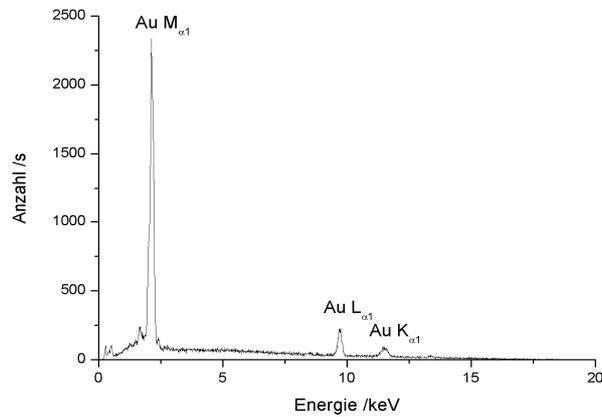
Der Vergleich bakterienhaltiger Komposite mit Nano- und Mikrofasern ergab, dass, unabhängig von der Schichtdicke des PPX, ähnliche Mengen an Gold nach einer Stunde sequestriert wurden. In beiden Fällen kann daher davon ausgegangen werden, dass der PPX-Mantel einen entscheidenden Einfluss auf die Sequestrierung hatte. Die immobilisierten Bakterien wurden weitgehend von den Gold-Ionen abgeschirmt und die aufgenommene Menge war demnach, im Fall der beschichteten Nano- und Mikrofasern, ähnlich. Eine Erhöhung der Innokulationszeit der Gold-Lösung im Fall der Hydrogelnanofasern führte zu einer stark erhöhten Sequestrierung des Goldes durch die immobilisierten Bakterien. Es ist daher zu vermuten, dass bei einer Erhöhung der Dauer der Sequestrierung der Einfluss der PPX-Schicht abnimmt, vgl. Abschnitt 3.5.7. In weiteren Experimenten wäre es demzufolge von Interesse, die beiden Systeme hinsichtlich der zeitabhängigen Aufnahme von Gold-Ionen zu vergleichen.

### 3.5.8 Nachweis des sequestrierten Goldes in den Fasern

Die Biosorption von Metallionen durch den Einsatz von Bakterien wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[177, 178, 187]</sup> Im Anschluss an die Sequestrierung wurden die Bakterien analysiert, hierbei wurden Metallablagerungen in der Zellwand bzw. in der Zellwand und den Membranen der Mikroorganismen detektiert, eine ausführlichere Diskussion wurde bereits in Abschnitt 3.4 durchgeführt.<sup>[182, 183, 26, 30]</sup>

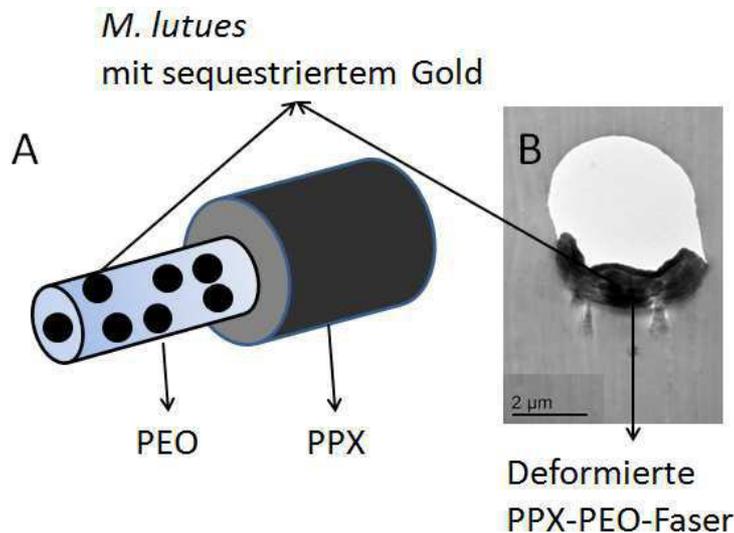
In Abschnitt 3.5.7 wurden PPX-PEO-Komposite mit *M. luteus* für die Sequestrierung von Gold-Ionen aus einer wässrigen Lösung genutzt. Die Abnahme des Goldgehaltes der Lösung nach dem Einbringen dieser Komposite wurde mittels ICP-MS ermittelt. Im Folgenden, sollen die lebenden Komposite mittels EDX auf ihren Goldgehalt untersucht werden. Da die Kern-Hülle-Fasern die Freisetzung der Bakterien in wässriger Umgebung für mindestens 19 Tage verhinderten, wie in Abschnitt 3.5.6 demonstriert, wurden die Gold-Ionen ausschließlich durch die immobilisierten Bakterien sequestriert. Basierend auf diesen und auf den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, sollten die Fasern im Folgenden positiv auf Gold untersucht werden.

Die PPX-PEO-Fasern mit immobilisierten Bakterien nach einer Sequestrierung von 24 Stunden wurden mittels EDX-Spektroskopie untersucht. Das erhaltene EDX-Spektrum zeigte die charakteristischen Linien des Elements, die  $M_{\alpha 1}$  (2,1 keV), die  $L_{\alpha 1}$  (9,7 keV) und die  $K_{\alpha 1}$  (11,4 keV).



**Abbildung 3.5-19 EDX Spektrum der bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  nach der Sequestrierung von Gold.**

Die verwendeten PPX-PEO-Fasern wurden weiterhin mittels TEM untersucht, hierfür wurden die Komposite in Harz eingebettet und geschnitten.



**Abbildung 3.5-20 Schematische Darstellung einer bakterienhaltigen PPX-PEO-Faser nach der Sequestrierung von Gold-Ionen. Die immobilisierten *M. luteus* beinhalten das abgeschiedene Gold und sollten daher, im Gegensatz zu der übrigen Faserstruktur, als dunkle Objekte vorliegen (A). TEM-Aufnahme eines Mikrotomschnittes einer bakterienhaltigen PPX-PEO-Faser nach der Sequestrierung von Gold-Ionen. Die Faser wurde aufgrund des Schneidens verformt und befand sich am unteren Ende des Ausschnittes. Die dunklen Ablagerungen stammten von sequestriertem Gold (B).**

Die schematische Darstellung der bakterienhaltigen PPX-PEO-Faser stellt die erwartete Beobachtung dar. Die immobilisierten *M. luteus* sollten aufgrund der Sequestrierung der Gold-Ionen als dunkle Objekte in der Kern-Hülle-Faser vorliegen, vgl. Abbildung 3.4-16. Im Gegensatz dazu wurde in der TEM-Aufnahme eine deformierte Kern-Hülle-Faser beobachtet. Der helle, kreisförmige Ausschnitt hatte einen Durchmesser von 3,8  $\mu\text{m}$ . Die Größenordnung entspricht dem Durchmesser der PPX-PEO-Fasern mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$ . Der helle Ausschnitt war jedoch nicht die Faser, sondern diese wurde aufgrund des Schneidens gequetscht und befand sich am unteren Rand des kreisförmigen Ausschnittes. Die dunkle Fläche am unteren Rand stellte einen Teil der Faser dar, es ist anzunehmen, dass die Faser auf Grund des Schneidens mechanisch verformt wurde und daher wurde keine intakte Faserstruktur beobachtet. Die Färbung wurde durch das sequestrierte Gold verursacht, das Gold befand sich in der Faser.

Es lässt sich zusammenfassen, dass das Gold in den Fasern abgeschieden wurde. Dieses Ergebnis wird durch die Literaturergebnisse, die sich im oberen Abschnitt befinden, unterstützt. Die Sequestrierung durch immobilisierte *M. luteus* in Kern-Hülle-Fasern wurde erfolgreich durchgeführt.

### 3.5.9 Zusammenfassung

Die Immobilisierung von *M. luteus* in PEO-Nanofasern mit dem Elektrosprin-Verfahren und deren Weiterverarbeitung zu wasserstabilen PPX-PEO-Fasern wurde erfolgreich durchgeführt. Die bakterienhaltigen PEO-Fasern wurden parallel zueinander auf einem Metallträger abgeschieden und lebende Bakterien wurden im Anschluss an den Spinnprozess nachgewiesen. Das hydrophobe PPX-Polymer wurde in unterschiedlichen Schichtdicken mittels des CVD-Prozesses auf den Fasern abgeschieden und führte zu wasserstabilen Kern-Hülle-Fasern. Die geänderte Stabilität und Permeabilität der Komposite wurde durch den Einsatz von UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert. Das Freisetungsverhalten wurde von einem „burst release“, im Falle der PEO-Nanofasern, zu einer stark verminderten Freisetzung, im Falle der Kern-Hülle-Fasern, verschoben. Die in PEO-Nanofasern immobilisierten Bakterien überlebten den CVD-Prozess und es wurden lebende *M. luteus* im Anschluss an diesen durch Inokulation von Nährlösung und Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten nachgewiesen. Die Freisetzung der verkapselten *M. luteus* in wässrigem Medium wurde für unterschiedliche Schichtdicken überprüft. Alle verwendeten Kern-Hülle-Fasern separierten die

Mikroorganismen, abgesehen von einer isolierten Freisetzung bei einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  nach 12 Tagen, für mindestens 19 Tage gegenüber dem wässrigen Medium. Zudem überlebten die verkapselten Bakterien die Lagerung in den Fasern unter Nahrungsausschluss bei 37 °C für mindestens 19 Tage. Die immobilisierten Bakterien wurden erfolgreich auf den Erhalt ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Es wurden Resazurin-Lösungen mit Kompositen unterschiedlicher Schichtdicke inokuliert und deren Absorptionsänderung durch UV/VIS-Spektroskopie verfolgt. Im Falle einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  wurde nach einer achttägigen Inkubation der reduktive Umsatz zu Resorufin detektiert.

Die Komposite wurden für die Sequestrierung von Gold-Ionen aus wässrigen Lösungen genutzt, da *M. luteus* die Fähigkeit zur Akkumulation von Metallen besitzt. Die Abnahme des Goldgehaltes wurde durch ICP-MS bestimmt. Nach 24 Stunden wurden im Falle der Komposite mit einer Schichtdicke von 1,5  $\mu\text{m}$ , 95 % des verfügbaren Goldes durch die immobilisierten Bakterien sequestriert. Der Nachweis des Goldes in den Fasern wurde durch REM-, TEM-Aufnahmen und EDX-Spektroskopie durchgeführt. Die Bakterien in den Komposit-Fasern überlebten die Behandlung mit einer wässrigen Goldlösung und lebende Bakterien wurden nach Inokulation und Inkubation einer nährstoffhaltigen Lösung erhalten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Herstellung wasserstabiler Komposite mit immobilisierten *M. luteus* erfolgreich war. Ein möglicher Einsatz für die Verwendung in enzymatischen Prozessen ohne Kontamination der Umgebung wurde dargestellt. Die Fähigkeit zur Sequestrierung von Metallen, in diesem speziellen Fall von Gold, aus wässriger Umgebung wurde bewiesen. Die hier vorgestellten Komposite sind für Anwendungen in der Trinkwasseraufbereitung, der Katalyse und für den Einsatz als Elektrodenmaterial für MBZs von Interesse.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift und der ihr zugrunde liegenden Untersuchungen wurden erfolgreich neue Methoden der Verarbeitung und Anwendungen von lebenden Kompositen auf Basis von Polymeren und Bakterien erforscht.

Die Retention der Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* aus PVA-Partikeln bei Kontakt mit wässrigen Lösungen und auf nährstoffhaltigen Agarplatten wurde durch die oberflächeninitiierte kontrollierte radikalische Polymerisation von MMA erreicht. Als Ausgangspunkt der Untersuchung wurden in PVA-Partikeln immobilisierte Bakterien verwendet. Diese Bakterien sind aufgrund des kollabierten Hydrogels unter Ausschluss von Nahrung und Feuchtigkeit mehrere Monate lagerfähig. Ein weiteres Charakteristikum der Komposite ist die Überlebensfähigkeit der verkapselten Bakterien in organischen Lösungsmitteln. Ausgehend hiervon wurde nachgewiesen, dass die immobilisierten *M. luteus* eine chemische Oberflächenmodifizierung der Partikel überleben. Die kovalente Anbindung eines ATRP-Initiators an die Oberfläche der Komposite stellte die erste Stufe der Herstellung von Kern-Hülle-Partikeln mit lebenden Bakterien dar. Aufgrund der Notwendigkeit der Synthese einer hydrophoben Hülle wurde als zu polymerisierendes Monomer MMA gewählt. Die Schichtdicke von aufgepfropftem PMMA korrelierte direkt mit der Retention der Freisetzung der Bakterien und konnte durch gezielte Wahl der Reaktionszeit variiert werden. Im Falle einer Dicke der PMMA-Schicht von 185 nm wurde die Freisetzung lebender *M. luteus* bei Kontakt mit wässrigen Lösungen um mindestens 20 Tage verzögert, die Retention bei Kontakt mit nährstoffhaltigen Agarplatten betrug mindestens 21 Tage. Die Verwendung dieser neuartigen lebenden Kern-Hülle-Partikel ermöglicht die gezielte Verarbeitung von Bakterien aus wässrigem Medium. Denkbare Methoden sind hierbei unter anderem die Einbettung in Faservliese durch Elektrospinnen. Zusätzlich zu der Synthese von PMMA wurde die Vielseitigkeit der oberflächeninitiierte ATRP durch die Polymerisation von NIPAm präsentiert. Im Rahmen dieser Schrift wurden lebende, in PNIPAm-PVA-Partikel immobilisierte Bakterien nachgewiesen.

In der vorliegenden Schrift wurde außerdem die hydrophobe Ausrüstung bakterienhaltiger Fasern durch die Beschichtung mit PPX unter Verwendung der chemischen Gasphasenabscheidung nach Gorham untersucht. Die Immobilisierung von *M. luteus* in PEO-Nanofasern durch Elektrospinnen einer bakterienhaltigen PEO-Lösung resultierte in der Herstellung einer lebenden Membran. Die Nanofasern wurden parallel zueinander

abgeschieden und die Schichtdicke des PPX wurde mittels des CVD-Prozesses gezielt variiert. Die Kern-Hülle-Architektur wurde mittels REM-Aufnahmen bestätigt und deren Wasserstabilität wurde erfolgreich nachgewiesen. Das Überleben der *M. luteus* wurde durch Verwendung von Nährmedien verifiziert. Die biologische Aktivität der lebenden immobilisierten Bakterien wurde erfolgreich durch den Umsatz von Resazurin bestätigt. Während dieser Umsetzung verhinderten die PPX-PEO-Fasern die Freisetzung der Bakterien für mindestens 22 Tagen und es trat innerhalb dieser Zeitspanne, abgesehen von isolierten Freisetzungen, keine Kontamination der Lösung auf. Eine solche Verwendung immobilisierter Bakterien ohne den Nachteil der Kontamination des umgebenden Mediums ist im Hinblick auf die Verwendung als Bioreaktoren von großem Interesse. Die PPX-PEO-Fasern mit immobilisierten *M. luteus* wurden weiterhin auf ihr Potential der Sequestrierung von Metallen aus wässrigen Lösungen untersucht. Der Goldgehalt der Lösungen wurde vor und nach der Inokulation mittels ICP-MS bestimmt. Bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurden 95 % des Goldes ausschließlich durch die immobilisierten Bakterien sequestriert. Der Nachweis der Abscheidung des Goldes in den Fasern wurde mittels TEM durchgeführt.

Das Konzept der Immobilisierung von *M. luteus* in Hydrogelfasern und nachfolgender hydrophober Ausrüstung durch eine variiere Schichtdicke von PPX wurde in der vorliegenden Schrift durch die Verwendung von PVA-Mikrofasern untersucht. Die Herstellung der Fasern erfolgte über den Nassspinn-Prozess, ihre hydrophobe Ausrüstung wurde mittels CVD-Prozess mit PPX realisiert. Der Kern-Hülle-Aufbau der Komposite wurde mittels SEM-Aufnahmen bestätigt und es wurden wasserstabile Fasern mit lebenden Bakterien gewonnen. Das Überleben der verkapselten Bakterien wurde durch die Inokulation und Inkubation geeigneter Nährmedien nachgewiesen. Die biologische Aktivität der immobilisierten Bakterien, eine notwendige Voraussetzung für eine spätere Verwendung, wurde in Abhängigkeit der Schichtdicke des PPX-Mantels mittels des Umsatzes von Resazurin zu Resorufin erfolgreich verfolgt. Eine weitere Voraussetzung für den möglichen Einsatz immobilisierter Mikroorganismen ist deren Separation vom umgebenden Medium zur Vermeidung einer Kontamination. Die hier vorgestellten lebenden Komposite erfüllen beide Voraussetzungen und verhindern die Migration der Bakterien in die Lösung für mindestens 22 Tage. Die Fähigkeit von *M. luteus*, Metallionen aus wässrigen Lösungen zu sequestrieren, wurde bereits in diesem Abschnitt benannt. Die in PPX-PVA-Mikrofasern verkapselten Bakterien wurden für die Sequestrierung von Gold-Ionen aus einer sauren Goldsäure Lösung verwendet. Die Abnahme des Goldgehaltes der Lösung wurde mittels ICP-MS Messungen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Bakterien im immobilisierten Zustand Gold-Ionen

aufnehmen und diese abscheiden. Die Analyse des Goldes in den Fasern und deren exakte Lokalisierung in den Bakterien wurden mittels TEM-Aufnahmen durchgeführt. Die Ablagerung des Goldes erfolgte in Form von diskreten, nanometergroßen Strukturen.

Die in dieser Schrift vorgestellten bakterienhaltigen Kern-Hülle-Fasern sind daher für einen Einsatz in der Trinkwasseraufbereitung, der Bioremediation, der Biokonversion und als Material für MBZ von Interesse.

## 5. Ausblick

Die in dieser Dissertationsschrift vorgestellten Erkenntnisse über biohybride Komposite auf Basis lebender Mikroorganismen und Polymere können als Ausgangspunkt weiterführender Forschung dienen. Die Besonderheit der engen Verzahnung von Chemie, Materialwissenschaften und Mikrobiologie beschränkt mögliche zukünftige Arbeiten nicht auf eine der Disziplinen, sondern lädt zu einer interdisziplinären Fortführung ein.

Die Ausrüstung bakterienhaltiger PVA-Partikel stellt einen hohen modularen Ausgangspunkt dar. Die Verwendung der kontrollierten radikalischen Polymerisation für den Aufbau der Hülle ermöglicht es, das Spektrum der über ATRP zugänglichen Polymere zu nutzen. Die Retention der Freisetzung von Bakterien wurde in dieser Arbeit bereits diskutiert, außerdem wurden erste Ergebnisse hinsichtlich der Ausrüstung der Partikel mit einer responsiven Hülle gewonnen. Im Gegensatz zu einer starren Hülle ermöglichen responsive Polymere eine Konformationsänderung durch einen externen Einfluss. Die Verwendung von pH- oder temperaturresponsiven Hüllen sollte eine gezielte Freisetzung des Materials zur Folge haben. Als Beispiele seien hier das Monomer Akrylsäure für eine pH-responsive Hülle und *N*-Acrylglycinamid für eine temperaturresponsiven Hülle genannt. Die Immobilisierung und der Aufbau der Hülle kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dies ermöglicht es, auch andere empfindliche Substanzen einzubringen. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Schrift wurden erste Erfolge in der Verkapselung von PEI/DNA-Komplexen in PVA-Partikeln und deren Verwendung für die Transkription bei Zellen erzielt.

In der vorliegenden Schrift wurden die Immobilisierung von lebenden Bakterien in Nano- und Mikro-Fasern und deren Beschichtung mit PPX in gewünschter Schichtdicke untersucht. Die lebenden Komposite zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Freisetzung der Bakterien für über 20 Tage verhindern, gleichzeitig jedoch eine Metabolisierung von Substraten im umgebenden Medium durch die Bakterien ermöglichen. Diese Kombination legt eine Verwendung in Bioreaktoren nahe. Der Einsatz von *M. luteus* könnte im Falle der Sequestrierung von Metallen, wie Gold, Kupfer oder Strontium, aus wässriger Umgebung erfolgen. Eine Kontamination durch die Bakterien kann über einen bestimmten Zeitraum hinweg ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Schrift wurde erfolgreich das Prinzip der Sequestrierung von Metallen am Beispiel von Gold angewendet und dessen Abscheidung charakterisiert. Im Hinblick auf die genannten Fähigkeit von *M. luteus*, Metalle aufzunehmen, lohnt sich die Durchführung weiterer Studien zur Rückgewinnung metallischer Werkstoffe

wie z.B. Kupfer und Eisen. Aus diesen Gründen ist der Einsatz im Bereich der Trinkwasseraufbereitung von großem Interesse. Die Bioremediation von Wasser kann zudem durch die gezielte Immobilisierung von Bakterien, welche auf den Abbau weiterer Substanzen wie zum Beispiel Phenole, spezialisiert sind, erweitert werden. Der steigende Energieverbrauch und die daraus resultierende Herausforderung, Energie aus erneuerbaren Quellen zu erzeugen, führte unter anderem zu der Entwicklung von MBZ. Eine wichtige Anforderung an diese Systeme ist die gleichbleibende Effizienz der Zellen. Im Falle der MBZs tritt jedoch eine Abnahme in der Stromgenerierung ein. Diese ist auf die fortschreitende Isolierung der Elektroden durch einen Bakterienfilm zurückzuführen. Da Bakterien in unmittelbarem Kontakt zur Elektrode absterben und die nächste Generation weiter von der Elektrode entfernt ist, nimmt die Leistung der Brennstoffzelle ab. In der Literatur wurde erfolgreich die Leitfähigkeit durch Einbringen von Goldnanopartikeln erhöht. Basierend auf dieser Ausgangslage können die in dieser Arbeit vorgestellten Kern-Hülle-Fasern als Ausgangspunkt für neuartige Elektrodenmaterialien eingesetzt werden. Zusätzlich ist die Biosynthese von Metallnanopartikeln für den Bereich der Katalyse von großer Bedeutung. Die Komposite ermöglichen es, gezielt Nanopartikel in die Lösung einzubringen. Nach Abschluss der Reaktion können die Fasern mit den Partikeln auf einfache Weise wieder entnommen werden.

Die in dieser Schrift vorgestellten Komposite basieren auf der Immobilisierung von *M. luteus*. Durch Einsatz von Bakterien mit bestimmten Funktionen ist es zudem möglich, die Komposite mit weiteren Funktionen auszustatten und so gezielt und flexibel auf Herausforderungen zu reagieren. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Immobilisierung von *Alcanivorax borkumensis* (*A. borkumensis*) genannt. Die Gattung ist in der Lage, Erdöl abzubauen und daher für eine Dekontaminierung verseuchter Böden oder Gewässer geeignet. Es ist daher von großem Interesse, die Immobilisierung weiterer Bakterienarten zu erforschen.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Verwendete Materialien

Tabelle 6.1-1: Verwendete Materialien.

Beschreibung	Herkunft
Aceton	BASF, destillativ gereinigt
Agar-Agar	Roth, eingesetzt wie erhalten
Chloroform	BASF, destillativ gereinigt
Dichlormethan	BASF, destillativ gereinigt
Ethanol	BASF, destillativ gereinigt
Fleischextrakt	Merck
Fluorescein-Natriumsalz	Sigma
Hexan	BASF, destillativ gereinigt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth/ Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth/ Merck
Methanol	BASF, destillativ gereinigt
<i>Micrococcus luteus</i>	DSMZ Nr.: 1605
<i>Micrococcus luteus</i> , Amber 4	Prof. Dr. Charles Greenblatt, Hebrew University of Jerusalem
Natriumhydroxid	Merck
Pepton	DIFCO
Parylene-N	SCS, eingesetzt wie erhalten
Resazurin-Natriumsalz	Acros Organics
Salzsäure	Sigma
Silikonöl AP200	Wacker
Tetrahydrofuran	BASF, destillativ gereinigt
Toluol	BASF, destillativ gereinigt
Trypton-Soja-Bouillon	Fluka
Calciumhydrid	Aldrich, eingesetzt wie erhalten
Methylmethacrylat	BASF, entstabilisiert und gereinigt durch Umkondensation über CaH <sub>2</sub>
Nilblau A	Sigma, eingesetzt wie erhalten
Gold(III)-chlorid Hydrat	Sigma, eingesetzt wie erhalten
Triethylamin	BASF, destillativ gereinigt
Anisol	BASF, destillativ gereinigt

<b><math>\alpha</math>-Bromisobutyrylbromid</b>	<b>Aldrich, destillativ gereinigt</b>
<b>Kupfer(I)-bromid</b>	<b>Aldrich, eingesetzt wie erhalten</b>
<b>1,1,4,7,7-Pentamethyldiethyltriamin</b>	<b>Acros, eingesetzt wie erhalten</b>
<b>Fluorescein-O-methacrylat</b>	<b>Aldrich, eingesetzt wie erhalten</b>
<b>N-Isopropylacrylamid</b>	<b>Aldrich, umkondensiert und unter Argon gelagert</b>
<b>Octadecyldiisocyanat</b>	<b>Sigma</b>
<b>2,4-Toluylendiisocyanat</b>	<b>Sigma, destillativ gereinigt</b>
<b>Hexamethyldiisocyanat</b>	<b>Sigma</b>

## 6.2 Verwendete kommerzielle Polymere

Tabelle 6.2-1: Verwendete kommerzielle Polymere.

<b>Beschreibung</b>	<b>Benennung</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Polyethylenoxid</b>	PEO 900.000	BASF, eingesetzt wie erhalten
<b>Polyvinylalkohol</b>	Mowiol 28-99, $M_w = 145.000$	Clariant, eingesetzt wie erhalten

## 6.3 Verwendete Bakterienarten

### 6.3.1 *Micrococcus luteus*

Der Stamm wurde über das DSMZ bezogen und besaß die Nummer 1605.

*M. luteus* gehört der Gruppe der Actinobacteria und weist einen geringen G/C-Gehalt der DNS auf. Das Bakterium ist aerobe, Gram-positiv und Katalase-positiv und besitzt einen typischen Atmungsstoffwechsel. *M. luteus* ist, wie Kokken im Allgemeinen, relativ resistent gegenüber einer hohen Salzkonzentration und geringer Wasseraktivität zudem toleriert es Austrocknung sehr gut. Das Bakterium besitzt einen Durchmesser von 0,5 – 3,5  $\mu\text{m}$ , ist pigmentiert und die Kolonien weisen eine charakteristische, gelbe Farbe auf. *M. luteus* bildet häufig Paare und Tetraden aus und kann daher durch mikroskopische Analysen bestimmt werden. Die Aggregation der Bakterien kann mittels Ultraschall temporär gelöst werden, dieses Verfahren wurde im Vorfeld der Herstellung der Partikel mit Bakterien angewendet. *M. luteus* zeichnet sich durch Sequestrierung von diversen Metallen aus, zu diesen gehören unter anderem Gold, Kupfer, und Strontium. Die Biosorption von Gold wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt. Das Bakterium findet sich in der Natur auf der Haut, auf Staubteilchen und im Erdboden wieder.

### **6.3.2 *Micrococcus luteus* Amber-4**

Der Bakterienstamm *Micrococcus luteus* Amber-4 wurde von Herrn Prof. Dr. Charles Greenblatt von der Hebrew University of Jerusalem bezogen.

Der Stamm wurde in der Ruinenstätte Khirbet Qumran im Westjordanland entdeckt. Das Bakterium entspricht dem Stamm der von der DSMZ erhalten wurde.

## 6.4 Verwendete Geräte

Tabelle 6.4-1: Verwendete Geräte.

Typ	Hersteller
<b>Autoklav</b>	Systec 2540 EL Systec D-65
<b>Dispergierwerkzeug</b>	IKA T18 basic Ultra Turrax® mit S 18 n – 19 G Vorsatz
<b>Inkubator</b>	Aqua Lytic
<b>Mikroskop</b>	Leica DMRX Keyence VHX Digital Microscope
<b>pH-Messgerät</b>	WTW pH526 mit pH Elektrode Schott BlueLine 23 pH
<b>Photometer</b>	Pharmacia LKB Novaspec II
<b>PPX-Beschichter</b>	SCS Coating Systems Labocoater1 PDS 2010
<b>Reinstwasseranlage</b>	Elga Maxima
<b>Schüttelplatte</b>	GFL-3005
<b>Sicherheitswerkbank</b>	Holten LaminAir Esco Airstream Class II Biological Safety Cabinet
<b>Trockensterilisator</b>	Heraeus Instruments T5050 Heraeus kelvitron®t
<b>Ultraschallbad</b>	Bandelin Sonorex RK 102 H
<b>UV/VIS-Spektrophotometer</b>	Perkin-Elmer Lambda 9
<b>Vakuum-Filtrationsgerät</b>	Sartorius
<b>Waagen</b>	Mettler PM4800 DeltaRange Precisa XB 220A
<b>Wasserbadschüttler</b>	New Brunswick
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf Centrifuge 5403 Heraeus Multifuge 1S-R

## 6.5 Nährmedien und Puffer

### 6.5.1 Nährmedien für *Micrococcus luteus*

Das Nährmedium zur Kultivierung von *M. luteus* wurde nach einer von der DSMZ vorgeschlagenen Vorschrift aus Pepton und Fleischextrakt zubereitet. Die Grundsubstanzen

wurden in der entsprechenden Menge in Wasser gelöst und durch die Zugabe von Natronlauge wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Zur Verwendung als festes Medium wurde zusätzlich  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Agar-Agar hinzugegeben. Die Mischung wurde anschließend bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 21 Minuten autoklaviert.

**Tabelle 6.5-1: Nährmedium für *M. luteus*.**

<i>M. luteus</i> Medium	Fleischextrakt	5 g
	Pepton	3 g
	Deionisiertes Wasser	1000 mL
	Agar-Agar (optional)	15 g

### 6.5.2 Kaliumphosphat-Puffer

Der verwendete Kaliumphosphat-Puffer besaß eine Konzentration von  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  mit einem pH-Wert von 7. Die Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst und bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 Minuten autoklaviert. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung in geschlossenen Behältern bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**Tabelle 6.5-2: Bestandteile des Kaliumphosphat-Puffer.**

Kaliumphosphat-Puffer	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,64 g (19,4 mmol)
	$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	6,98 g (30,6 mmol)
	Deionisiertes Wasser	1000mL

## 6.6 Mikrobiologische Methoden

### 6.6.1 Sterilisation

Nährmedien, Puffer, Kunststoff- und Glasgeräte zum Einmalgebrauch wurden bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 bar Überdruck für 20 Minuten durch autoklavieren sterilisiert. Objektträger, Petrischalen und Metallgeräte wurden bei  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  für mindestens 180 Minuten im Trockensterilisator erhitzt. Abweichungen zu den Standardmethoden sind für die entsprechenden Prozeduren angegeben.

## 6.6.2 Kultivierung von Bakterien und Stammhaltung

### 6.6.2.1 Kulturen in Flüssigmedium

Die flüssigen Medien wurden nach Inokulation mit der Bakterienkultur unter aeroben Bedingungen, in Schikane-, Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern bei 120 bis 200 U·min<sup>-1</sup>, kultiviert. Flüssigkulturen in Reagenzgläsern wurden durch die Inokulation von 5 mL steriler Nährlösung mit einer Einzelkolonie oder 0,1 mL einer Flüssigkultur inokuliert. Die Herstellung in Schikanen- bzw. Erlenmeyerkolben geschah mit einer Flüssigkeitsmenge von 150 – 200 mL. Die Kulturen von *M. luteus* wurden für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 6.6.2.2 Kulturen auf Agarplatten

Die Kultivierung von *M. luteus* auf Agarplatten wurde auf Grund zweier Zwecke durchgeführt. Der Erste war die Stammerhaltung des reinen Bakterienstammes durch Vereinzelung der Kolonien. Zum anderen diente dies der Bestimmung der Lebendzahl, hierbei wurde vorausgesetzt dass jedes Bakterium eine Kolonie verursacht. Die nährstoffhaltigen Agarplatten wurden immer aerob bei 37 °C inkubiert.

Die Stammerhaltung wurde durch die Verwendung der Neun-Strich-Vereinzelungstechnik durchgeführt. Hierbei wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mittels einer sterilen Impföse entnommen und diese auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen. Das verwendete Schema dieser Strichtechnik ist in der folgenden Abbildung gezeigt und im Weiteren beschrieben. (Abbildung 6-1)

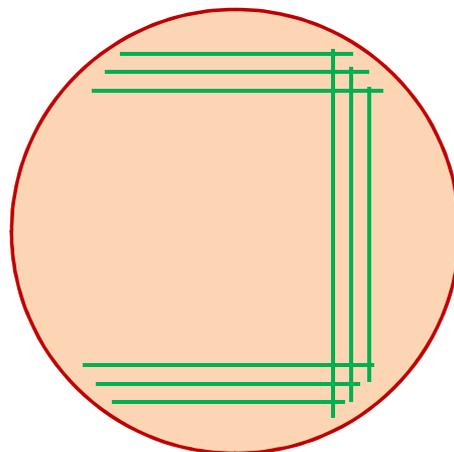


Abbildung 6-1: 9-Strich-Vereinzelungstechnik

Die mit der Kolonie beladene Impföse wird in drei parallel zueinander angeordneten Strichen über die Agarplatte gezogen und anschließend wurde die Impföse zur Rotglut erhitzt. Die heiße Impföse wurde auf der Agarplatte abgekühlt und es wurden drei parallel verlaufende Striche senkrecht zu den drei vorhandenen Strichen auf der Agarplatte gezogen. Hierbei schnitt der erste Strich drei der vorherigen Striche und jeder Folgende einen weniger. Das Verfahren wurde noch einmal wiederholt und die inokulierte Agarplatte wurde bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten wurden nach dem Wachstum der Kolonien, hierbei war es unumgänglich, dass isolierte Einzelkolonien vorlagen, bei 4 °C gelagert. Die Überimpfung der Kulturen wurde wöchentlich wiederholt, wobei die vorherigen Agarplatten mindestens eine Woche aufbewahrt wurden. Die Entnahme der Kolonien für die Inokulation von flüssigen oder festen Medium geschah stets von der vorletzten Agarplatte.

### **6.6.3 Bestimmung der Zellzahl**

#### **6.6.3.1 Bestimmung durch optische Dichte**

Im Falle einer Flüssigkultur wurde die Zelldichte mittels der Messung der optischen Dichte mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm ( $OD_{578}$ ) durchgeführt. Die Bestimmung muss als grober Richtwert verstanden werden, da sie bei verschiedenen Bakterienarten stark abweichen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde bei einer optischen Dichte von 1 eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen pro Milliliter Kultur angenommen. Die Bestimmung des Blindwertes wurde über die  $OD_{578}$  des reinen Mediums gegen Luft durchgeführt und die zu untersuchende Bakteriensuspension wurde nachfolgend bestimmt. Im Falle einer  $OD_{578}$  von größer als 0,5 musste von einer starken Abweichung ausgegangen werden, daher wurde die Flüssigkultur mit einem Medium verdünnt. Die  $OD_{578}$  der Bakterienkultur errechnet sich demnach aus dem bestimmten Wert, abzüglich des Blindwertes und unter Berücksichtigung der Verdünnung.

#### **6.6.3.2 Bestimmung der Lebendzahl durch die Zahl der wachsenden Kolonien**

Im Gegensatz zu der Bestimmung der optischen Dichte, welche nicht zwischen lebenden und toten Bakterien diskriminiert, dient die nachfolgende Methode der Bestimmung der reinen lebenden Bakterien. Die Lebendzahl wurde durch die Bestimmung der koloniebildenden-

Einheiten (KBE) einer definierten Menge der zu untersuchenden Bakteriensuspension durchgeführt. Die betreffende Menge an Bakterienkultur wurde entnommen und unter Verwendung eines Kaliumphosphatpuffers ( $c = 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Im Hinblick auf die zu erwartende Zelldichte, wurden drei aufeinanderfolgende Verdünnungen durchgeführt und jeweils 0,1 mL dieser auf nährstoffhaltige Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der nährstoffhaltigen Agarplatten erfolgte bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 48 Stunden. Es wurde davon ausgegangen, dass das Wachstum einer Kolonie durch ein Bakterium bedingt wurde. Die Bestimmung der Lebendzahl in einem Milliliter bzw. in der gesamten Flüssigkultur geschah durch Auszählen der Kolonien und anschließendem Errechnen der Gesamtzahl.

### **6.6.4 Färben von Bakterien**

#### **6.6.4.1 Totfärbung mit Kristallviolett**

Die Färbung mit Kristallviolett wurde angewendet um *M. luteus* unter einem Lichtmikroskop ohne weitere Hilfsmittel zu identifizieren. Die zu untersuchende Probe wurde mittels Impföse auf einem sterilen Objektträger verstrichen und anschließend unter Verwendung eines Bunsenbrenners vorsichtig bis zur Trocknung erhitzt. Die so hitzefixierte Probe wurde mit wässriger Kristallviolettlösung mindestens eine Minute versetzt und anschließend mit entionisiertem Wasser mehrere Minuten bis zur Entfärbung des Waschwassers gespült. Die gefärbten Bakterien konnten nach dem Trocknen analysiert werden.

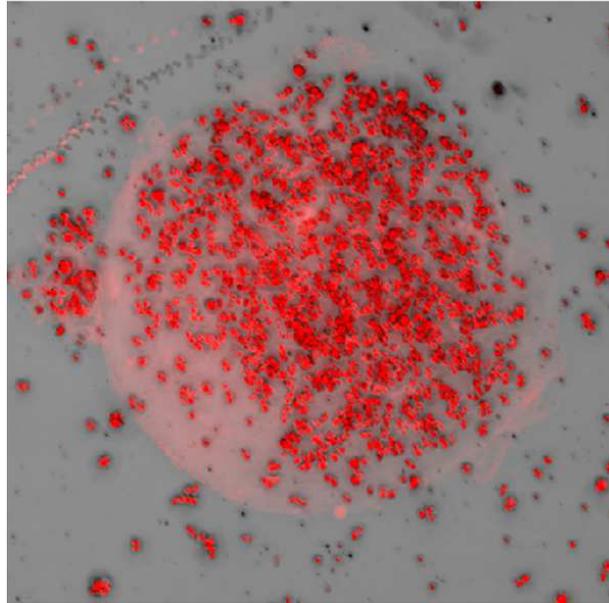
#### **6.6.4.2 Lebendfärbung durch Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung**

Die Lebendfärbung der Bakterien mit der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung ermöglichte es, *M. luteus* in freier Form und in immobilisierter Form mit zwei verschiedenen Farbstoffen zu versetzen und damit Rückschlüsse auf die Integrität deren Membran zuziehen. Bakterien mit einer intakten Zellmembran erscheinen unter Verwendung einer UV-Quelle grün und Bakterien mit einer beschädigten Membran zeichnen sich durch eine Rotfärbung aus.

Die verwendete Farbmischung wurde von der Firma Invitrogen bezogen und war unter dem Namen LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight Kits L7012 kommerziell zu erwerben. Das verwendete Verfahren wurde in der beiliegenden Produktinformation vom 15. Juli 2004 beschrieben. Die

Stammlösungen wurden bis zur unmittelbaren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt und vor der Benutzung auf  $20\text{ °C}$  gebracht. Im Anschluss wurden die Caps der Stammlösungen mittels Zentrifuge bei mäßiger Geschwindigkeit sedimentiert und dann geöffnet.

Die Handhabung der Lösungen geschah mit großer Sorgfalt, da die Farbstoffe SYTO 9 sowie Propidiumiodid an Nukleinsäuren binden und durch die Lösung in DMSO besonders Gewebegängig sind; Propidiumiodid ist als potentielles Mutagen eingestuft, bei SYTO 9 liegen bisher keine entsprechende Befunde vor. (Abbildung 6-2)



**Abbildung 6-2:** Aufnahme eines PVA-Partikels nach Rehydrierung mit KLSM. Die lebenden, aber mit beschädigter Zellwand vorliegenden, *M. luteus* sind rot gefärbt.

Die Mischung der Stammlösungen, nach der beigelegten Vorschrift, wurde unmittelbar im Voraus der Verwendung hergestellt. Je  $5,0\text{ }\mu\text{L}$  der Stammlösungen wurden in einem  $1,7\text{ mL}$  Mikrozentrifugeneinsatz gemischt und mittels der Verwendung eines Vortex-Mischer homogenisiert. Von der Lösung wurde jeweils  $3,0\text{ }\mu\text{L}$  zu einem Milliliter einer Suspension von frei vorliegenden Bakterien bzw. von immobilisierten Bakterien in  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Kaliumphosphatpuffer pH 7 gegeben. Die Formulierung wurde nach 10 Minuten Homogenisierung mittels eines Vortex-Mischers für 15 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Suspension wurde auf einen Objektträger aus Glas aufgebracht mit einem Deckglas abgedeckt und mittels einem Lichtmikroskop des Typs Leica DMRX mit UV-Beleuchtung oder einem konfokalen Lasermikroskop des Typs CSLM 510 META der Firma Zeiss unter Verwendung eines Ar/Kr Laser mit einer Wellenlänge von  $488$  untersucht.

## **6.7 Charakterisierungsmethoden**

### **6.7.1 *Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX)***

Die EDX-Messungen wurden an einem CamScan Rasterelektronenmikroskop durchgeführt, welches mit einem Voyager EDX-Mikronanalyse-System der Firma Thermo Noran Company ausgerüstet war. Die verwendete Beschleunigungsspannung betrug 20 kV und die Messungen wurden von Herrn Michael Hellwig durchgeführt.

### **6.7.2 *Infrarot-Spektroskopie (IR)***

Die in dieser Arbeit aufgeführten IR-Spektren wurden an einem FT-IR Spektrometer der Firma Digilab vom Typ Excalibur Series mit angeschlossenem IR-Mikroskop vom Typ UMA 600 aufgenommen. Die ATR-Messungen wurden an einer Pike Miracle ATR-Einheit mit einem Fenster aus Diamant/ZnSe und einer Hochdruckklemme durchgeführt. Die Proben wurden nach vorheriger Trocknung direkt analysiert, eine weitere Vorbereitung war nicht nötig.

### **6.7.3 *Optische Mikroskopie***

Die optische Untersuchung an Bakterien, Partikeln und Fasern mit und ohne Farbstoffe wurde sowohl an einem digitalen Mikroskop der Firma Keyence vom Typ VHX-100 als auch an einem Mikroskop der Firma Leica vom Typ DMRX mit einer zusätzlichen DC 200 Kamera von Leica durchgeführt.

Die Durchführung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde an einem Leica DMRX im Auflichtmodus unter Verwendung einer Quecksilber Lichtbogenlampe durchgeführt. Die Filterung des von der Probe emittierten Lichtes wurde durch in dem Mikroskop von Leica verbaute Filtereinheit sichergestellt. Die Aufnahmen wurden mittels einer Kamera DC 200 von Leica angefertigt.

Die Phasenkontrastmikroskopie von nicht gefärbten Bakterien wurde mit den Mikroskopen der Firma Zeiss und Zeiss unter Verwendung der entsprechenden Objektive durchgeführt.

#### **6.7.4 Konfokale Lasermikroskopie (KLSM)**

Die KLM Aufnahmen von gelabelten PMMA-FMA-PVA-Partikeln und lebendgefärbten Bakterien wurde mit einem KLSM der Firma Zeiss vom TYP CSLM 510 META oder LSM 410 durchgeführt. Das KLM war mit einem 100/1,45 Öl-Immersions-Objektiv ausgerüstet. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und wurde durch einen Ar/Kr-Laser emittiert. Die Auswertung der Aufnahmen wurde mit der Software Carl Zeiss ZEN 2011 durchgeführt.

#### **6.7.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die REM-Aufnahmen wurden mit einem JSM-7500 F Rasterelektronenmikroskop der Firma JEOL in der Abteilung der Elektronenoptik des Wissenschaftlichen Zentrums für Materialwissenschaften der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Alle Proben wurden vor der Untersuchung 120 Sekunden im Hochvakuum mit Platin bedampft. Die Durchmesser der Partikel und Fasern wurden mit der Software ImageJ bestimmt.

#### **6.7.6 Dektak Profilometer**

Die Bestimmung der Schichtdicke des abgeschiedenen PPX erfolgte über das Instrument Dektak 3 ST Surface Profiler der Firma Veeco. Die Proben wurden auf einem Glasobjektträger abgeschieden und mit einem Skalpell eingeritzt, die Bestimmung der Stufenhöhe geschah an neun verschiedenen Positionen und das arithmetische Mittel wurde als Schichtdicke verwendet.

#### **6.7.7 Thermogravimetrische Analysen (TGA)**

Der thermogravimetrische Abbau der Probe wurde an einem 851 TG Modul der Firma Mettler vorgenommen. Die Messung wurde unter einem stetigen Strom,  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , von Stickstoff vermessen. Mindestens  $10 \mu\text{g}$  der Probe wurde in einen Aluminiumoxidtiegel ( $70 \mu\text{L}$ ) von 25 auf  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einer Heizrate von  $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$  erhitzt. Die Messkurven wurden mit der Software STARE SW 9.20 der Firma Mettler Toledo ausgewertet.

### 6.7.8 UV/VIS Spektroskopie

Die UV/VIS Messungen wurden an einem UV/VIS/NIR Spektrometer der Firma Perkin Elmer vom Typ Lambda 35 durchgeführt.

### 6.7.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Fasern und Partikel wurden an einem JEOL JEM 2100 TEM der Firma JEOL mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV oder an einem LEO 922 Omega der Firma Zeiss mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Das TEM war ausgerüstet mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode und einer 2k x 2k CCD Kamera F214, als Software diente EM-Menu4 der Firma TVIPS. Die Mikrotomschnitte der Partikel und Fasern wurde durchgeführt, indem die Proben mit frischem EPON<sup>®</sup> 812 überschichtet wurden, das Harz wurde anschließend bei 60 °C für 72 Stunden auspolymerisiert. Die Schnitte besaßen einen Durchmesser von 50 bis 70 nm und wurden mit einem Ultramikrotom EM UC7rt von der Firma Leica Mikrosysteme hergestellt. Die Proben wurden auf unbeschichteten Kupferplättchen des Typs 400 square mesh der Firma Plano fixiert.

**Tabelle 6.7-1:** Bestandteile Epon<sup>®</sup> 812.

<b>Epon<sup>®</sup> 812</b>	<b>Epoxyharz</b>	<b>46 % (v/v)</b>
	DDSA	28.5 % (v/v)
	MNA	25.3 % (w/v)
	DMP-30	0.2 % (w/v)

### 6.7.10 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Die Bestimmung der Menge an Gold in den Proben erfolgte über ein ICP-MS Spektrometer der Firma Agilent von Typ 7500ce. Die Proben wurden über einen PFA Micro Flow Zerstäuber in eine Scott-type Sprühkammer eingebracht. Die Messungen wurden alle im no-gas-Modus durchgeführt.

Die Kalibration des Gerätes erfolgte jeweils unmittelbar vor den Messungen, als Standard wurde der ICP Goldstandard (1000 mg·L<sup>-1</sup>) der Firma Merck verwendet. Die Kalibrierungsstandards wurden über eine serielle Verdünnungsreihe in 3% Salzsäure und ultrapurem Wasser hergestellt, die Kalibration umfasste eine Spanne von 1 bis 100 µg·L<sup>-1</sup> Au.

Als interner Standard wurden  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Yttrium(Y) verwendet, dies wurde über Verdünnung einer Menge von  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Y, bezogen von Bernd Kraft GmbH, gewonnen. Alle Proben wurden mit  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Y versetzt und die erhaltenen Werte wurden unter Berücksichtigung des internen Standards berechnet. Die Kalibration, Messung und Berechnung der Konzentrationen an Gold wurden von Herrn David Nette durchgeführt.

### 6.8 Bakterienhaltige Polymerlösungen

#### 6.8.1 Herstellung bakterienhaltiger PVA-Partikel

Alle für die Herstellung verwendeten Geräte, Substanzen und Zubehör wurden sorgfältig sterilisiert und unter möglichst sterilen Bedingungen verwendet um eine Kontamination der Partikel durch Fremdbakterien oder Pilzsporen zu vermeiden. Die aus Edelstahl bestehenden Komponenten des Ultra Turrax<sup>®</sup> Homogenisierers wurden bei  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  für mindestens 3 Stunden eingeschlagen in Aluminiumfolie im Trockensterilisator gelagert. Die Komponenten aus Kunststoff wurden sorgfältig mit 70 vol.% Ethanol oder Isopropanol gereinigt. Das Silikonöl AP 200 wurde in den für den späteren Gebrauch vorgesehenen Gefäßen mehrere Stunden bei  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockensterilisator sterilisiert.

Die Anzucht der *M. luteus* geschah in Flüssigkultur, im Normalfall mit 250 mL Medium. Die Ernte der Bakterien in der noch exponentiellen Wachstumsphase wurde mittels einer Zentrifuge des Typs Heraeus Multifuge bei einer Rotationsgeschwindigkeit von  $5000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  für 5 Minuten durchgeführt. Der Überstand in den sterilen 50 mL Zentrifugeneinsätzen wurde in der Nähe eines Bunsenbrenners abgegossen und das Gefäß wurde für einen weiteren Durchlauf wieder befüllt. Als Folge dessen, wurde das gesamte Sediment einer Kultur geerntet.

Die Waschung des Sedimentes erfolgte durch Aufschlämmen mit Kaliumphosphatpuffer, pH Wert 7, und erneutem Sedimentieren durch Verwendung der Zentrifuge. Im Anschluss an das erneute Dekantieren des Sedimentes wurden die Bakterien verwendet.

Die PVA-Lösungen wurden hergestellt, indem Wasser und Polyvinylalkohol in fest verschließbaren 50 mL Gefäßen gemischt wurden. In die Gefäße wurde je ein Magnetrührstab eingebracht und diese wurden verschlossen. Die Lösung wurde anschließend in verschlossenem Zustand in einem Autoklaven platziert und für 20 Minuten bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem bar Überdrucks autoklaviert. Nach der Entnahme der Gefäße wurden diese sofort auf

einen Magnetrührer platziert und die Lösung wurde bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur gerührt. Die PVA-Lösungen wurden verschlossen bei Raumtemperatur gelagert und nach einmaliger Entnahme wiederum autoklaviert. In wöchentlichen Abständen wurden die Lösungen optisch überprüft und bei einer Gelierung, erkennbar durch eine leicht opake Farbe, erneut autoklaviert.

Die Herstellung der PVA-Bakterien-Suspension erfolgte in sterilisierten 50 mL Kunststoffröhrchen. Dabei wurde in der Regel 2,5 g Bakterien-Sediment und 15 g einer 15 gew.% PVA-Lösung verwendet. Die Suspension wurde anschließend mehrere Minuten mit Hilfe eines Vortex-Mischer gemischt und für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad eingebracht. Das Glasgefäß mit 80 mL Silikonöl wurde dem Trockensterilisator entnommen und in ein Eisbad eingebracht. Das Hochgeschwindigkeits-Dispergierwerkzeug, UltraTurrax<sup>®</sup>, wurde ebenfalls aus dem Trockensterilisator entnommen und wurde in das Silikonöl eingetaucht. Nachdem das Silikonöl und das Dispergierwerkzeug auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Rotationsgeschwindigkeit des UltraTurrax<sup>®</sup> sukzessive auf ungefähr 10000 U·min<sup>-1</sup> erhöht. Die Bakterien-PVA-Suspension wurde mit einer Einmalspritze zu dem Silikonöl gegeben. Dabei war zu beachten, dass die Suspension möglichst in unmittelbarer Nähe zu dem Rotator des Dispergierwerkzeugs hinzugegeben wurde. Es wurde auf diese Weise ein Volumen von ungefähr 5 mL der Suspension in einem Arbeitsgang verwendet. Die Silikonöl-Bakterien-PVA-Suspension wurde für 15 Minuten homogenisiert. Im Anschluss wurde die Suspension unter Rühren in mindestens 400 mL Aceton gegeben, für mindestens 30 Minuten gerührt und anschließend wurde die Suspension für 1 Stunde ruhen gelassen. Die Separation der bakterienhaltigen Partikel wurde über Filtration des Gemisches durch einen 30 mm Papierfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm vorgenommen. Der erhaltene leicht gelbliche Filterkuchen wurde erneut mit Aceton und unter Verwendung des Ultraschallbades aufgeschlämmt und erneut wie beschrieben separiert. Dieses Verfahren stellte die vollständige Entfernung des Silikonöls sicher. Der Filterkuchen wurde abgedeckt und in der Nähe der rauschenden Bunsenbrennerflamme für 3 Stunden getrocknet und anschließend in sterile Glaspetrischalen überführt. Die Lagerung der bakterienhaltigen Partikel geschah bei einer Luftfeuchtigkeit von 4,6 % und einer Temperatur von 4 °C.

## **6.8.2 Überlebensfähigkeit der *M. luteus* in PVA-Partikeln**

### **6.8.2.1 In Trockensubstanz**

Eine Probe der bakterienhaltigen PVA-Partikel wurde im Vorfeld jedes Versuches qualitativ auf das Vorhandensein von lebenden immobilisierten Bakterien untersucht. Dieses Verfahren stellte sicher, dass die Bakterien nicht im Vorfeld des Versuches abgestorben sind.

Die bei 4 °C gelagerten Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht, um ein Einkondensieren von Wasser zu vermeiden. Die Entnahme der Partikel wurde mittels eines sterilen Spatels in einer sterilen Clean-Bench durchgeführt und diese wurden für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Inkubation der, auf Grund des sich bildenden Kondenswassers, auf dem Deckel gelagerten Agarplatten, wurde für 4 Tage bei 37 °C durchgeführt. Das eigentliche Experiment wurde nur durchgeführt, wenn dieser Test positiv ausfiel.

### **6.8.2.2 In organischen Lösungsmitteln**

Im Falle der Behandlung der bakterienhaltigen PVA-Partikel mit organischen Lösungsmitteln, wurde ein Teil der PVA-Partikel mit diesem versetzt. Der Versuch wurde in der sterilen Clean-Bench mit sterilen 10 mL Rollrandgläsern durchgeführt indem 5 ml des betreffenden Lösungsmittels mit den PVA-Partikeln versetzt wurden. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur unter gelegentlichem schütteln für 24 Stunden gelagert. Im Anschluss wurden die Partikel mit Hilfe eines Filters von der Lösung separiert und in der Nähe einer rauschenden Gasflamme für 2 Stunden getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Partikel für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet, diese wurden wiederum bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Im Falle des Wachstums von Kolonien von *M. luteus* wurde dies als Nachweis des Überlebens der immobilisierten Bakterien gewertet. Der Versuch wurde nur im Falle von lebenden Bakterien durchgeführt.

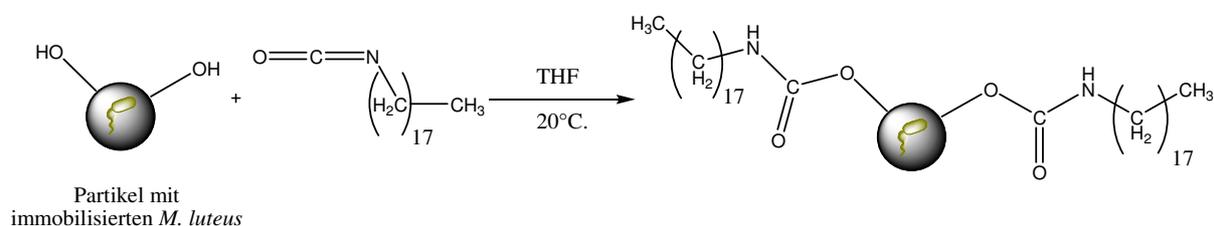
### **6.8.2.3 Nach erfolgter chemischer Oberflächenmodifikation**

Das Überleben der Bakterien in PVA-Partikeln im Anschluss an eine chemische Oberflächenmodifikation oder oberflächeninitiierte Polymerisation wurde stets wie folgt

überprüft. Die Partikel wurden mittels Filtration von der Reaktionslösung separiert, mit den angegebenen Lösungsmitteln und stets zuletzt mit Aceton gewaschen. Nachfolgend wurden die Partikel abgedeckt in der Nähe einer rauschenden Gasflamme für 3 Stunden getrocknet und in einer Clean-Bench für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet. Die Inkubation erfolgte stets bei 37 °C, die Dauer der Inkubation variierte und ist stets in der betreffenden Synthesevorschrift angegeben. Im Falle eines Ausbleibens des Wachstums für mindestens 18 Tage, wurden die Partikel den Agarplatten entnommen und in einem sterilen 10 mL Rollrandglasgefäß mit 5 mL Nährlösung für 5 Stunden versetzt. Die Suspension wurde ruhen lassen und die Partikel wurden im Anschluss mit einer sterilen Eppendorf Pipette entnommen und für die Inokulation einer frischen, nährstoffhaltigen Agarplatte verwendet. Die Agarplatte wurde bei 37 °C für 4 Tage inkubiert und im Falle des Wachstums von Kolonien von *M. luteus* wurde dies als Nachweis des Überlebens und der Retardierung der Freisetzung der Bakterien gewertet.

### 6.8.3 Chemische Umsetzungen mit bakterienhaltigen PVA-Partikeln

#### 6.8.3.1 Umsetzung von PVA-Partikeln mit Oktadecylisocyanat (CK0309201201)



#### Reaktionsschema 6-1 Reaktionsschema der Umsetzung von bakterienhaltigen PVA-Partikeln mit Oktadecylisocyanat (CK0309201201).

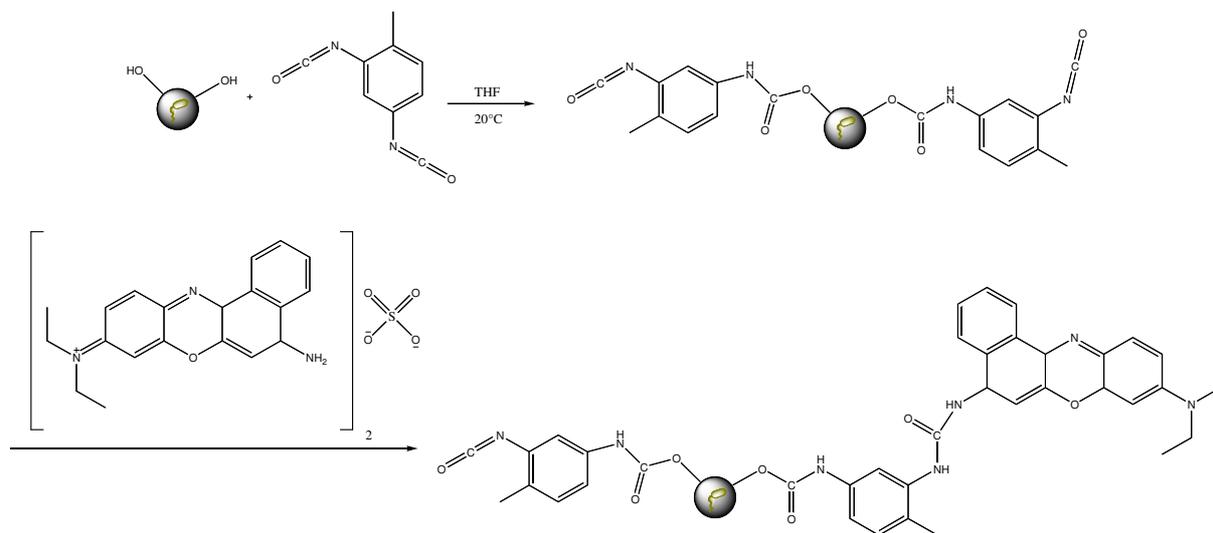
0,4 g bakterienhaltiger PVA-Partikel wurden 15 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend mit 10 mL Tetrahydrofuran (THF) abs. versetzt. Die Suspension wurde unter Rühren mit 1,28 g (4,33 mmol) Oktadecylisocyanat versetzt und für 24 Stunden gerührt. Der farblose Rückstand wurde filtriert und mehrfach mit THF und abschließend mit Aceton gewaschen. Es wurden 0,036 g (90 %) Produkt erhalten.

Die immobilisierten Bakterien wurden auf ihr Überleben überprüft und nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurden charakteristische, gelbe Kolonien von *M. luteus* erhalten.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK03092010):**  $\nu = 2920$  (s), 1658 (m), 1544 (w).

(Weiteres Spektrum ähnliche Banden aber nicht aufgeführt, CK0308201001)

### 6.8.3.2 Umsetzung mit 2,4-TDI und Nilblau (CK1801201101)



**Reaktionsschema 6-2 Reaktionsschema der Umsetzung von bakterienhaltigen PVA-Partikeln mit 2,4-TDI und Nilblau (CK1801201101).**

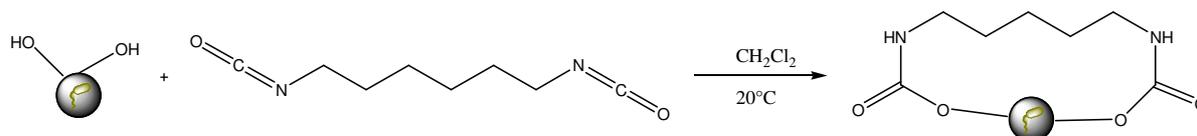
0,039 g PVA-Partikel wurden mit 10 mL THF abs., mit 0,197 g (1,13 mmol, 2 eq) 2,4-Toluylendiisocyanat (2,4-TDI) unterrühren bei 20 °C versetzt und für 24 Stunden gerührt. 0,0202g (0,57 mmol, 1,00 eq) Nilblau wurde hinzugegeben und bei 20 °C für 24 gerührt. Der tiefblaue Feststoff wurde filtriert und 48 Stunden mit Ethanol in einer Soxhlet Extraktion gereinigt. Der tiefblaue Rückstand wurde filtriert und getrocknet. Es wurden 0,02 g (51 %) Produkt erhalten.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK18012011):**  $\nu = 2952$  (w), 1651 (m), 1593 (s), 1554 (m).

(Ähnliche Spektren: CK2601201101, CK0205201101)

In einem weiteren Experiment, CK2601201101, wurden nach einer Inkubationsdauer von 2 Tagen lebende Bakterien erhalten.

### 6.8.3.3 Umsetzung mit Hexamethylendiisocyanat (CK2610201102)



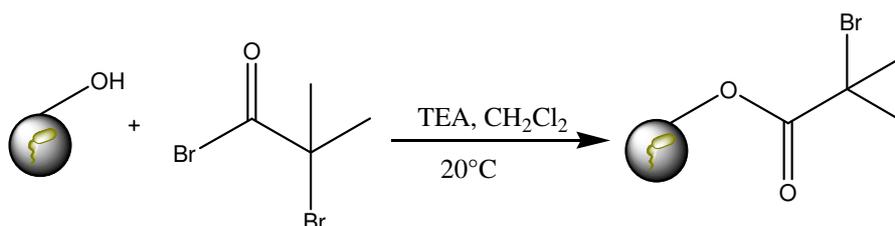
**Reaktionsschema 6-3** Reaktionsschemata der Umsetzung bakterienhaltiger PVA-Partikel mit HDMI (CK2610201102).

0,046 g PVA-Partikel wurden mit 10 mL Dichlormethan (DCM) für 10 Minuten bei 0 °C unter rühren versetzt. 2 mL (12,4 mmol) Hexamethylendiisocyanat (HDMI) wurden zugetropft und die Suspension wurde für 27 Stunden gerührt und auf Raumtemperatur gebracht. Der farblose Niederschlag wurde filtriert, mit DCM und Aceton gewaschen und getrocknet. Es wurde 0,04 g (87 %) Produkt erhalten. Die HDMI-PVA-Partikel wurden ausplattiert und es wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden lebende Bakterien beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK18012011):**  $\nu = 2279$  (m), 1654 (m), 1593 (s), 1554 (m).

(Ähnliche Spektren: CK0111201101, CK0111201102, CK0111201103)

### 6.8.3.4 Synthese der Initiator-PVA-Partikel, Makroinitiator



**Reaktionsschema 6-4** Ausrüstung bakterienhaltiger PVA-Partikel mit ATRP-Initiator (CK1604201201, CK1903201201, CK1505201202)

#### 6.8.3.4.1 Umsetzung für 3 Stunden (CK1604201201)

0,11 g PVA-Partikel wurden mit 25 mL DCM und 1,5 mL (10,76 mmol, 1,00 eq) Triethylamin (TEA) versetzt und bei 20 °C für 10 Minuten gerührt. 1,6 mL (13,06 mmol, 1,10 eq) 2-Brom-2-methylpropionylbromid (2-BMPiB) wurden langsam zugetropft und die Suspension wurde für 3 Stunden bei 20 C gerührt. Der bräunliche Feststoff wurde mittels Zentrifuge

sedimentiert, die überstehende Lösung wurde dekantiert und der bräunliche Rückstand mit Aceton aufgenommen und filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit DCM, Ethanol und Aceton gewaschen und neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Es wurden 0,09 g (82 %) Produkt erhalten.

Es wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK1604201201):**  $\nu = 1647$  (s).

(Ähnliche Spektren: CK1302201201, CK0103201201, CK1303201201)

### **6.8.3.4.2 Umsetzung für 25 Stunden (CK1903201201)**

0,11 g PVA-Partikel wurden mit 25 mL DCM und 1,5 mL (10,76 mmol, 1,00 eq) TEA versetzt und bei 20 °C für 10 Minuten gerührt. 1,6 mL (13,06 mmol, 1,10 eq) 2-BMPiB wurden langsam zugetropft und die Suspension wurde für 25 Stunden bei 20 °C gerührt. Der bräunliche Feststoff wurde mittels Zentrifuge sedimentiert, die überstehende Lösung wurde dekantiert und der bräunliche Rückstand mit Aceton aufgenommen und filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit DCM, Ethanol und Aceton gewaschen und neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Es wurden 0,089 g (80 %) Produkt erhalten.

Es wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK1903201201):**  $\nu = 1739$  (w), 1650 (w).

(Ähnliche Spektren: CK1903201202, CK1106501201)

### **6.8.3.4.3 Umsetzung für 48 Stunden (CK0705201201)**

0,15 g PVA-Partikel wurden mit 25 mL DCM und 1,5 mL (10,76 mmol, 1,00 eq) TEA versetzt und bei 20 °C für 10 Minuten gerührt. 1,6 mL (13,06 mmol, 1,10 eq) 2-BMPiB wurden langsam zugetropft und die Suspension wurde für 48 Stunden bei 20 °C gerührt. Der bräunliche Feststoff wurde mittels Zentrifuge sedimentiert, die überstehende Lösung wurde dekantiert und der bräunliche Rückstand mit Aceton aufgenommen und filtriert. Der

Filterkuchen wurde mehrfach mit DCM, Ethanol und Aceton gewaschen und neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Es wurden 0,012 g (80 %) Produkt erhalten.

Es wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK1505201202):**  $\nu = 2951$  (w), 1739 (s), 1655 (w).

(Ähnliche Spektren:CK0705201201, CK2205201201)

#### **6.8.3.4.4 Umsetzung für 72 Stunden (CK2704201201)**

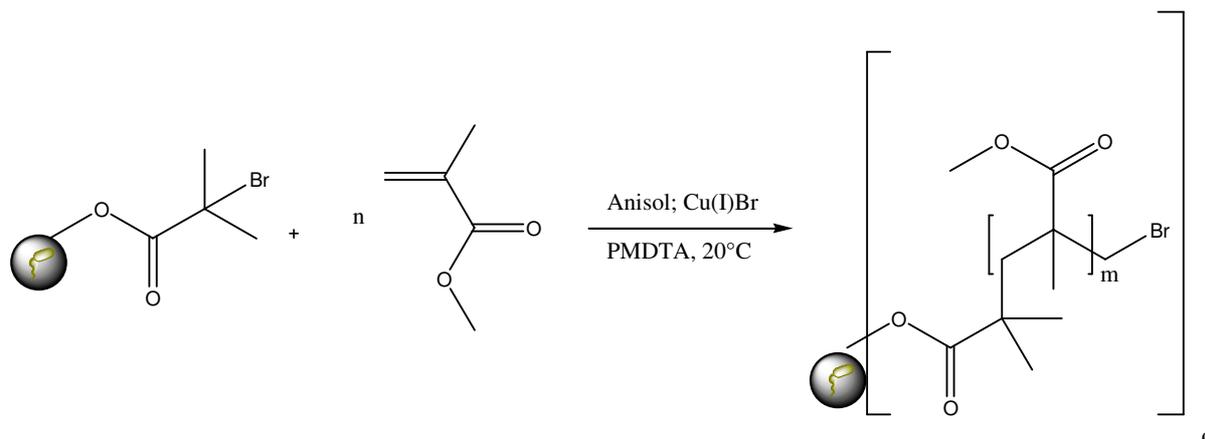
0,11 g PVA-Partikel wurden mit 25 mL DCM und 1,5 mL (10,76 mmol, 1,00 eq) TEA versetzt und bei 20 °C für 10 Minuten gerührt. 1,6 mL (13,06 mmol, 1.10 eq) 2-BMPiB wurden langsam zugetropft und die Suspension wurde für 72 Stunden bei 20 °C gerührt. Der bräunliche Feststoff wurde mittels Zentrifuge sedimentiert, die überstehende Lösung wurde dekantiert und der bräunliche Rückstand mit Aceton aufgenommen und filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit DCM, Ethanol und Aceton gewaschen und neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Es wurden 0,09 g (82 %) Produkt erhalten.

Es wurde nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37 °C das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK2704201201):**  $\nu = 2951$  (w), 1739 (s), 1655 (w).

(Ähnliche Spektren:CK0705201201, CK2205201201)

### 6.8.3.5 Pffropfung von P(MMA) auf Makroinitiatorpartikel



Reaktionsschema 6-5 Propfpolymerisation von MMA an Makroinitiator-Partikel (CK150201201, CK0107201201, CK0905201201)

#### 6.8.3.5.1 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel aus 6.8.3.4.1 (CK1502201201)

10 mL Anisol wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) 1,1,4,7,7-Pentamethyldiethyldiethyltriamin (PMDETA) und 1,0 mL (9,0 mmol, 1,00 eq) Methylmethacrylat (MMA) unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,086 g Initiator-PVA-Partikel, CK1302201201, und 0,051 g (0,36 mmol, 0,04 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 44 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Anisol, Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein farbloser Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,071 g (82 %) Produkt erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten beobachtet.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ , CK1505201201):  $\nu = 1735$  (s).

(Ähnliche Spektren: CK3101201201, CK0902201201, CK0203201202)

#### 6.8.3.5.2 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel aus 6.8.3.4.2 (CK0107201201)

10 mL Anisol wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA und 1,0 mL (9,0 mmol, 1,00 eq) MMA unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,25 g Initiator-PVA-Partikel, CK1106201201, und 0,061 g (0,43 mmol, 0,05 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 45 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Anisol, Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein farbloser Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,22 g (89 %) Produkt erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK0107201201):**  $\nu = 1735$  (s).

**(Ähnliche Spektren: CK2303201201, CK2303201202)**

**Tabelle 6.8-1:** Dauer der Inkubation von PMMA-PVA-Partikeln mit immobilisierten *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten.

<b>Experiment</b>	<b>Reaktionsdauer</b>	<b>Wachstumsdauer der <i>M. luteus</i> auf nährstoffhaltigen Agarplatten</b>
<b>CK2303201201</b>	168 Stunden	216 Stunden
<b>CK2303201202</b>	168 Stunden	192 Stunden

#### **6.8.3.5.3 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel aus 6.8.3.4.3 (CK0905201201)**

10 mL Anisol wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA und 1,0 (9,0 mmol, 1,00 eq) MMA unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,11 g Initiator-PVA-Partikel, CK0705201201, und 0,056 g (0,39 mmol, 0,04 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 45 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Anisol, Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein farbloser Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,09 g (86 %) Produkt erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen wurde das Wachstum einer Kolonie von *M. luteus* auf einer Agarplatte beobachtet, nach 11 Tagen wurde die Hälfte der Partikel mit Nährlösung behandelt und ausgestrichen, diese Partikel zeigten nach 96 Stunden das Wachstum von Kolonien von *M. luteus*. Die übrigen, nicht benetzten Partikel zeigten nach 42 Tagen kein Wachstum von Kolonien auf der Agarplatte, diese wurden wiederum benetzt und ausgestrichen. Die Partikel die nach 42 Tagen keine Bildung von Kolonie gezeigt haben verursachten 72 Stunden nach ihrer Benetzung das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf Agarplatten.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK0905201201):**  $\nu = 2951$  (m), 1732 (s), 1442 (m), 1276 (m), 759 (w).

(Ähnliche Spektren: CK0205201202, CK2105201201, CK1207201201)

**TGA (CK0905201201):**  $T_1 = 260$  °C,  $T_2 = 427$  °C.

**TGA (CK0205201202):**  $T_1 = 238$  °C,  $T_2 = 269$  °C,  $T_3 = 438$  °C.

**TGA (CK2105201201):**  $T_1 = 248$  °C,  $T_2 = 342$  °C,  $T_3 = 381$  °C.

Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten

**Tabelle 6.8-2:** Dauer der Inkubation von PMMA-PVA-Partikeln mit immobilisierten *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten.

Experiment	Reaktionsdauer	Wachstumsdauer der <i>M. luteus</i> auf nährstoffhaltigen Agarplatten nach benetzten der Partikel	
CK0205201202	45 Stunden		23 Tage
CK2105201201	2 Stunden		25 Tage
CK1207201201	3 Stunden		27 Tage

Freisetzung von immobilisierten *M. luteus* in Kaliumphosphatpuffer pH = 7.

## Experimenteller Teil

**Tabelle 6.8-3:** Freisetzung von in PMMA-PVA immobilisierten *M. luteus* in Kaliumphosphatpuffer.

<b>Datum</b>	<b>Retentionsdauer/ Stunden</b>	<b>CK0905201201<sup>(a)</sup></b>	<b>CK1207201201<sup>(a)</sup></b>
<b>07.02.2012</b>	0	0	0
<b>07.02.2012</b>	3	0	0
<b>08.02.2012</b>	24	0	0
<b>11.02.2012</b>	94,5	0	0
<b>12.02.2012</b>	124	0	0
<b>13.02.2012</b>	150	0	0
<b>14.02.2012</b>	170	0	0
<b>15.02.2012</b>	195	0	0
<b>18.02.2012</b>	270	0	1
<b>22.02.2012</b>	366	0	0
<b>27.02.2012</b>	485	0	0
<b>05.03.2012</b>	624	61	180

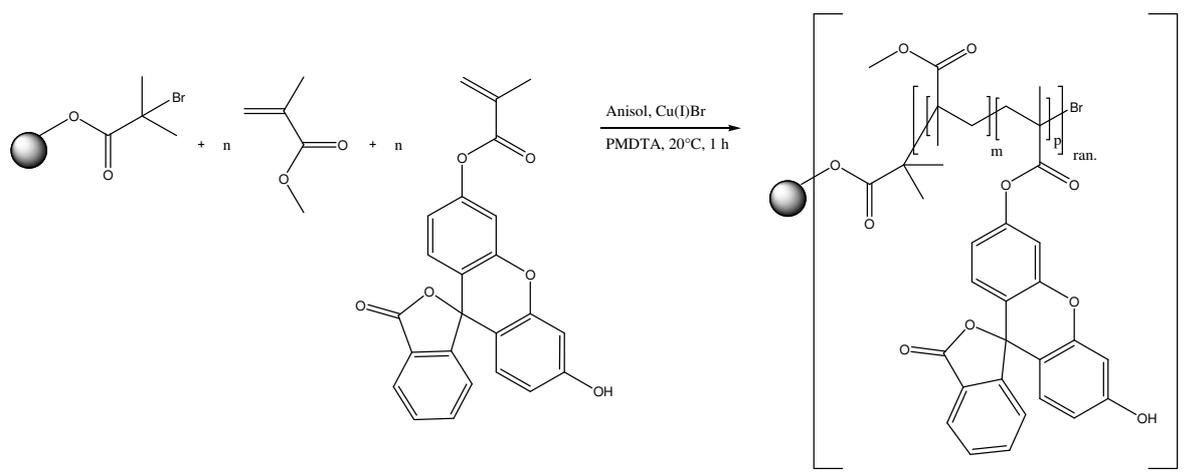
<sup>(a)</sup>: Ein Teil der Partikel wurde im Vorfeld des Experimentes für die Inokulation von Nährlösung verwendet. In diesem Fall wurden 95 Stunden nach der Inkubation lebende Bakterien nachgewiesen. Im Anschluss an den Versuch, wurden Partikel der gleichen Charge, gelagert bei 20 °C, für die Inokulation von Nährlösung verwendet. Die immobilisierten Bakterien überlebten die Lagerung bei 20 °C für mindestens 26 Tage.

**6.8.3.5.4 Korrelation von  $Q_{1733/1438}$  mit der Freisetzung von Bakterien**

**Tabelle 6.8-4 Freisetzung immobilisierter Bakterien auf Agarplatten und in Nährlösung in Abhängigkeit von  $Q_{1733/1438}$ .**

Spektrum	$Q_{1733/1438}$	Mittelwert von $Q_{1733/1438}$	Retention Agarplatte / Tagen	Retention Lösung <sup>a)</sup> /Tagen
CK1502201201	0,030	0,066	0	0
CK0203201202	0,130		0	0
CK1403201201	0,073		0	0
CK1804201201	0,033		0	0
CK2303201201	1,138	0,967	6	0
CK2303201202	0,844		5	0
CK0107201201	0,920		4	0
CK0205201202	2,359		20	X
CK0905201201	2,626	2,500	27	20
CK2105201201	2,637		22	X
CK1207201201	2,379		25	20

<sup>a)</sup>X: Wurde nicht bestimmt

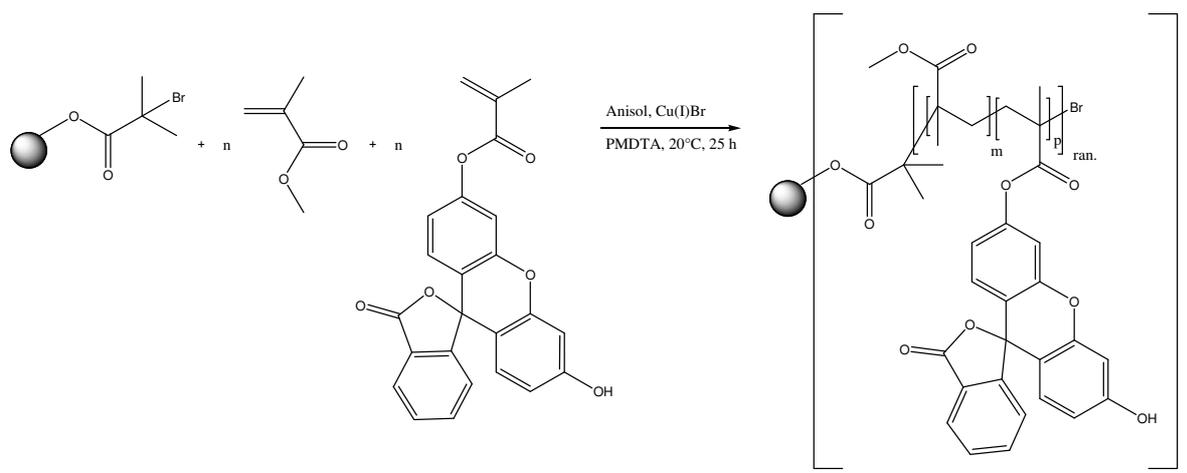
**6.8.3.5.5 Pfcopolymerisation von P(MMA)-*co*-P(FMA) (CK0208201201)**

**Reaktionsschema 6-6 Pfcopolymerisierung von MMA und FMA an Makroinitiator-Partikel (CK0208201201).**

10 mL Anisol wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA, 0,054 g (0,13 mmol, 0,01 eq) Fluorescein O-Methacrylat (FMA) und 1,0 mL (9,0 mmol, 1,00 eq) MMA unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,15 g Initiator-PVA-Partikel, CK0705201201, und 0,071 g (0,49 mmol, 0,04 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Anisol, Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein rötlicher Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,14 g (90 %) Produkt erhalten.

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ , CK0208201201):**  $\nu = 2951$  (m), 1734 (s), 1442 (m), 759 (w).

Schichtdicke (KLSM): 357 nm (SD = 126 nm)

**6.8.3.5.6 Pfcopolymerisation von P(MMA)-*co*-P(FMA) (CK0208201203)**



**Reaktionsschema 6-7 Pfcopolymerisierung von MMA und FMA an Makroinitiator-Partikel (CK0208201203).**

10 mL Anisol wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA, 0,056 g (0,14 mmol, 0,01 eq) Fluorescein O-Methacrylat (FMA) und 1,0 ml (9,00 mmol, 1,00 eq) MMA unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,15 g Initiator-PVA-Partikel, CK0705201201, und 0,063 g (0,44 mmol, 0,04 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Anisol, Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein rötlicher Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,14 g (92 %) Produkt erhalten.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK0208201203):**  $\nu = 2952$  (b, m), 1733 (s), 1442 (m), 763 (w).

**Schichtdicke (KLSM):** 634 nm (SD = 156 nm)

**Schichtdicke (TEM):** 185 nm (SD = 59 nm)

**6.8.4 Wasserstabilitätstest der PMMA-PVA-Partikel**

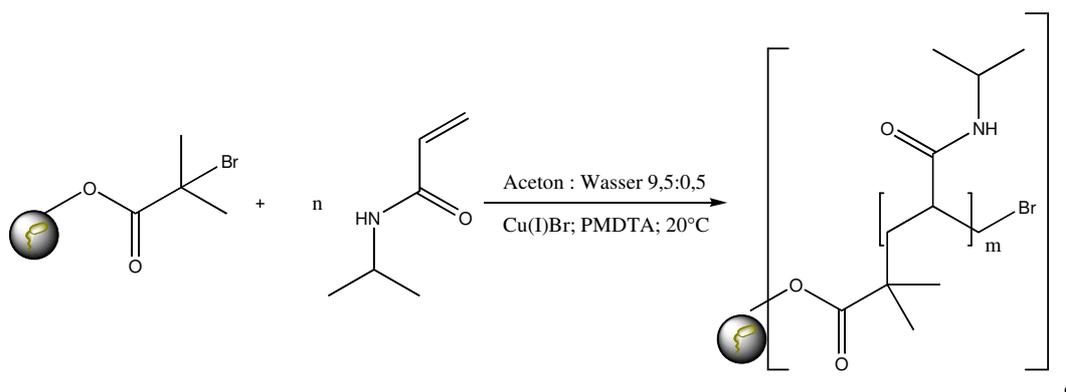
Der Stabilitätstest wurde mit PMMA-PVA-Partikeln, CK0905201201, durchgeführt, indem die Partikel in einem 10 mL Zentrifugengefäß mit 5 mL entionisierten Wasser überschichtet

wurden. Die Dispersion wurde 5 Minuten in ein Ultraschallbad eingebracht und anschließend mittels flüssigen Stickstoffs gefroren. Im Anschluss wurde die Probe in die Probenvorkammer des mit Stickstoff gekühlten JSM-7500 F eingebracht und mittels im Gerät installierten Messers geschnitten. Im Falle der PVA-Mikropartikel wurde analog verfahren. Die Messungen wurden von Herrn Michael Hellwig durchgeführt.

### 6.8.5 Anreicherung der PMMA-Hülle mit Kupfer

Es wurden PMMA-Partikel, CK1207201201, in Dichlormethan suspendiert und mit 0,07 g Kupfer(I)bromid unter Rühren für 4 Stunden bei Raumtemperatur versetzt. Die Partikel wurden filtriert und mit Aceton gewaschen.

#### 6.8.5.1 Pfropfung von P(NIPAm) auf Makroinitiatorpartikel



**Reaktionsschema 6-8 Propfpolymerisierung von NIPAm an Makroinitiator-Partikel (CK2808201201, CK3108201201).**

##### 6.8.5.1.1 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel (CK2808201201) (CK2205201201)

9,5 mL Aceton, 0,5 mL H<sub>2</sub>O wurden mit 80 µL (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA und 1,0 g (8,80 mmol, 1,00 eq) N-Isopropylacrylamid (NIPAm) unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,21 g Initiator-PVA-Partikel, CK2205201201, und 0,076 g (0,51 mmol, 0,05 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein farbloser Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde

neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,17 g (82 %) Produkt erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurde das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf nährstoffhaltigen Agarplatten beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK2808201201):**  $\nu = 1735$  (s), 1662 (m), 1543 (m).

(Ähnliche Spektren: CK1207201101, CK2607201101)

### 6.8.5.1.2 Umsetzung der Makroinitiatorpartikel (CK3108201201) (CK2205201201)

9,5 mL Aceton, 0,5 mL H<sub>2</sub>O wurden mit 80  $\mu$ L (0,18 mmol, 0,02 eq) PMDETA und 1,0 g (8,80 mmol, 1,00 eq) N-Isopropylacrylamid (NIPAm) unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde dreimal durch Einfrieren, Auftauen und mit Argon Fluten von Sauerstoff befreit. 0,21 g Initiator-PVA-Partikel, CK2205201201, und 0,069 g (0,48 mmol, 0,05 eq) Kupfer(I)bromid wurden im Argonstrom hinzugegeben und die Suspension wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der bläuliche Feststoff wurde filtriert und mehrfach mit Ethanol, DCM und Aceton gewaschen, bis ein farbloser Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde neben einer rauschenden Gasbrennerflamme 3 Stunden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 6,0 % gelagert. Es wurden 0,19 g (90 %) Produkt erhalten.

Nach einer Inkubationszeit von 18 Tagen wurden die Partikel mit Nährlösung versetzt und auf eine frische nährstoffhaltige Agarplatte aufgebracht. Das Wachstum von Kolonien von *M. luteus* auf diesen Platten wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden beobachtet.

**IR (cm<sup>-1</sup>, CK3108201201):**  $\nu = 2978$  (m), 1732 (m), 1662 (s), 1543 (s).

(Ähnliche Spektren: CK1207201101, CK2607201101)

## 6.8.6 Herstellung PVA-Mikrofasern

### 6.8.6.1 Herstellung der PVA-Lösung

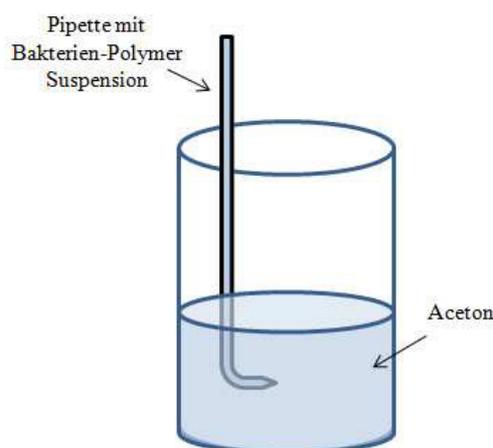
Das PVA wurde in sterilem, entionisiertem Wasser gelöst und das festverschlossene Gefäß wurde bei 121 °C und 1 bar Überdrucks für 20 Minuten autoklaviert, die verwendete Lösung

enthielt stets 7,5 gew.% PVA. Im Falle der Herstellung von bakterienhaltigen Fäden, wurde 7,5 mL der PVA-Lösung mit 870 mg *M. luteus* in der Nähe einer rauschenden Gasbrennerflamme versetzt und das verschlossene Gefäß wurde 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und anschließend mindestens 15 Minuten mit Hilfe eines Vortex-Mischers durchmischt.

Die Herstellung von Fasern mit immobilisierten Fluorescein geschah durch die Zugabe einer Spatelspitze des Natrium-Salz des Fluorescein zu 7,5 mL der Lösung.

### 6.8.6.2 Faserherstellung

Die Fasern mit immobilisiertem Material wurden wie folgt hergestellt. 500 mL Aceton wurden in eine Kristallisierschale gegeben. Eine Pasteurpipette mit abgeknickter Spitze wurde in das Koagulationsbad getaucht bis die Pipette mindestens 2 cm unter der Flüssigkeitsoberfläche war, anschließend wurde die Polymerlösung in die Pipette gegeben. Mit einer Pinzette wurde das koagulierte PVA von der Spitze der Pipette durch das Aceton-Bad gezogen. Die entstandenen Fasern wurden auf einem Metallträger gewickelt und für 3 Stunden abgedeckt in der Nähe einer rauschenden Gasbrennerflamme getrocknet. Die Metallrahmen hatten eine Größe von 6 cm x 2 cm. Die Träger mit den Fasern wurden anschließend in sterilen 50 mL Zentrifugeneinsätzen bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Dieses wurde gewählt, damit ein weiteres Wachstum der Bakterien soweit wie möglich unterdrückt wurde. (Abbildung 6-3)



**Abbildung 6-3:** Koagulationsbad zur Herstellung von PVA Mikrofasern.

### 6.8.6.3 Überlebenstest in Fasern

Die in PVA-Mikrofasern immobilisierten *M. luteus* wurden auf ihr Überleben überprüft, indem einzelne Fasern von dem Metallträger in der Clean-Bench entfernt wurden. Diese Fasern wurden auf nährstoffhaltige Agarplatten platziert und diese Platten inkubiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden ausschließlich entlang der Faser.

Im Falle der PPX beschichteten Fasern, wurden die Fasern mit Rahmen in eine Nährlösung eingebracht und für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die überstehende Lösung für die Inokulation von nährstoffhaltigen Agarplatten verwendet, diese wurden wiederum inkubiert.

### 6.8.6.4 Beschichtung der Fasern

Die Rahmen mit den PVA-Fasern wurden in einem CVD System des Typs Labcoater 1 (PDS2012) der Firma SCS Coating Systems auf einen Drehteller platziert und mit PPX beschichtet. Die Temperatur des Ofen zum Verdampfen des Präkursor [2,2]-*p*-Cyclophan wurde auf 150 °C eingestellt. Die Pyrolyse zum Diradikal erfolgte bei 650 °C, die Kammer mit den Trägern, in der die Beschichtung stattfand wurde auf 20 °C temperiert.

Die Träger wurden in die Apparatur gegeben, wobei beachtet wurde, dass die Träger möglichst wenig Auflagefläche aufwiesen. Nach Einbringen des eingewogenen Monomers wurde die Apparatur evakuiert. Bei einem Druck von 60-70 mbar wurden der Ofen und die Beschichtung gestartet. Die Dauer der Beschichtung betrug im Mittel 7 Stunden, wobei die Temperatur 20 Minuten vor Ende in 5 °C-Schritten alle 5 Minuten erhöht wurde, bis sie 170 °C erreichte, um eine maximale Beschichtung zu gewährleisten. Je nach gewünschter Schichtdicke wurden mehrere Durchläufe vorgenommen und die Monomermenge zwischen 1 und 2.5 g variiert. Die Schichtdicke ist neben der eingesetzten Menge an Monomer von weiteren Prozessparametern abhängig, die Schichtdicke wurde daher wie folgt ermittelt. Es wurde jeweils zusätzlich ein Objektträger beschichtet und die Schichtdicke durch Messungen am *Dektak* bestimmt. Die beschichteten Fasern wurden ebenso wie die unbeschichteten im Kühlschrank gelagert.

### 6.8.6.5 Nachweis der biologischen Aktivität der immobilisierten *M. luteus*

Zum Ansetzen der Resazurinlösung wurde das Natriumsalz des Farbstoffes verwendet. Es wurde in sterilen Phosphatpuffer gelöst und anschließend im Kühlschrank und unter Ausschluss von Licht gelagert. Da der Farbstoff empfindlich auf Kontaminationen reagiert, war in diesem Verfahren eine sterile Arbeitsweise von großer Bedeutung. Der Phosphatpuffer wurde verwendet, um bei den Bakterien in den eingelegten Fasern einen überhöhten osmotischen Druck und somit ein Absterben der Bakterien zu verhindern.

**Tabelle 6.8-5:** Resazurinlösung zum Nachweis der biologischen Aktivität.

Substanz	Menge
Resazurin (Natriumsalz)	4,01 mg
Phosphatpuffer	750 mL

Der Rahmen mit den zu testenden Fasern wurde in 40 mL Resazurinlösung eingebracht und im Inkubator bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Direkt nach Einbringen des Trägers wurde eine Probe zur Aufnahme entnommen und mittels UV/VIS Spektroskopie analysiert. Außerdem wurden 150 µL der Resazurinlösung auf eine Agarplatte gegeben und mit einem Trigalski-Spatel ausplattiert. Dieses Vorgehen wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt, um zu verfolgen, ob eine Umwandlung von Resazurin zu Resorufin stattfindet und ob dabei Bakterien aus den Fäden in die Lösung austreten.

Es wurden unbeschichtete PVA-Fasern mit und ohne Bakterien getestet, außerdem beschichtete Fasern mit Bakterien und unterschiedlichen Schichtdicken PPX.

Um Kontaminationen und einen nicht durch Bakterien verursachten Abbau auszuschließen, wurde als Referenz zusätzlich eine unbehandelte Resazurinlösung inkubiert und wie beschrieben analysiert.

### 6.8.6.6 Herstellung der Goldsäure-Lösung

Es wurden 13,514 mg (0,00051 mmol,  $\text{HAuCl}_3$ ) Goldsäure in 1000 mL entionisierten Wasser gelöst, dies ergab eine Konzentration von  $131,1 \mu\text{g}(\text{Gold}) \cdot \text{kg}(\text{Wasser})^{-1}$ . Diese wurde durch Zugabe von 2 M HCl auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Anschließend wurden die Träger mit den bakterienhaltigen Fasern in die Lösung gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wurden Proben von 0,2 mL entnommen und mit 20 mL destilliertem Wasser verdünnt. Die

entnommenen Proben wurden mit Hilfe von ICP-MS Messung auf ihren Goldgehalt untersucht und die Ergebnisse mit einer Referenzprobe verglichen.

Zusätzlich wurde ein beschichteter Träger ohne Fasern eingesetzt um den Anteil an Gold, der reduktiv auf der PPX-Metall Oberfläche abgeschieden wurde zu bestimmen.

### **6.8.7 Herstellung der bakterienhaltigen PEO-Nanofasern**

#### **6.8.7.1.1 Herstellung der PEO-Lösungen**

Die Herstellung einer 5 gew.% PEO Lösung erfolgte durch die Versetzung von sterilen entionisierten Wasser mit dem betreffenden Menge an Polymer. Das Glasgebinde wurde anschließend verschlossen bei 121 °C bei 1 bar Überdrucks für 20 Minuten autoklaviert und anschließend mindestens 24 Stunden bei 50 °C bis zur homogenen Lösung gerührt.

Das Versetzen der PEO Lösung mit *M. luteus* wurde stets nahe einer rauschenden Gasbrennerflamme durchgeführt, um eine Kontamination der Suspension zu vermeiden. Die Herstellung einer 10 : 1 gew.% Polymer-Bakterien-Suspension wurde wie folgt durchgeführt, die erforderliche Menge an Bakterien wurde wie in Abschnitt 6.8.1 erläuterte geerntet und in ein 1,5 mL Eppendorf-Cap überführt. Die Menge an PEO-Lösung wurde hinzugefügt, die Suspension wurde 15 Minuten mit einem Vortex-Mischer gemischt und anschließend 30 Sekunden in ein Ultraschallbad platziert. Nach einem erneuten Mischen war die Suspension zur Verwendung bereit.

#### **6.8.7.2 Elektrosponnen der bakterienhaltigen PEO-Lösung**

##### **6.8.7.2.1 Aufbau der Apparatur**

Die geschlossene Spinnapparatur hatte eine Grundfläche von ungefähr 60 x 60 cm und der Spinnprozess konnte durch Glasscheiben verfolgt werden. An der Decke in der Mitte der Apparatur war eine Halterung für die verwendeten Einmalspritzen angebracht, diese hatte weiterhin einen Hubkolben mit Stempel. Dieser wurde über einen hydraulischen Motor angetrieben, damit ein konstanter Druck auf die mit der Suspension gefüllte Spritze ausgeübt wurde. Als Spritzen wurden sterile 1 mL Spritzen der Firma Henke-Sass-Wolf mit einem Innendurchmesser von 4,7 mm verwendet. Die angebrachte Kanüle diente als Elektrode, diese war eine Injektionskanüle Sterican No. 17 welche auf eine Länge von etwa 2 cm gekürzt

wurde. Der Innendurchmesser der Kanüle betrug 0,3 mm und der Außendurchmesser 0,55 mm. Die Hochspannungsquelle war ein Hochspannungsnetzteil der Firma Applied Voltage des Typs HP 30, die Spannung wurde so justiert, dass an der Kanüle positive Spannung und an der Gegenelektrode negative Spannung angelegt werden konnte. Die Gegenelektrode bestand aus einer 10 mm starken Aluminiumscheibe, welche an einem isolierenden PVC-Block angebracht war. Der Abstand der Elektroden war durch Verschiebung der Elektrode einstellbar.

### **6.8.7.2.2 Parameter der Spinnapparatur**

Neben der Einstellung des Abstandes der Elektroden war es zusätzlich möglich, die angelegte Hochspannung zu variieren. Im Falle der Kanüle lag dieser Bereich zwischen 0 und +30 kV und an der Gegenelektrode 0 bis -30 kV. Die Geschwindigkeit des Schrittmotors der die Vorschubgeschwindigkeit des Stempels bestimmte lag zwischen  $1 \text{ cm} \cdot \text{Stunde}^{-1}$  und  $99 \text{ cm} \cdot \text{Stunde}^{-1}$ . Die Luftfeuchtigkeit konnte mit Hilfe eines Luftentfeuchters reguliert werden, auf die Raumtemperatur hingegen war keine Einflussnahme möglich.

### **6.8.7.2.3 Durchführung**

Der Spinnvorgang stellte eine Gefahr der Kontamination der Bakterien-Polymer Lösung und der bakterienhaltigen Nanofasern dar, aus diesem Grund wurde möglichst alle Öffnung mit Klebeband abgedichtet. Die Spinnapparatur wurde anschließend gründlich mit einer 70 Vol.% Ethanol Lösung gereinigt um die herrschende Keimdichte zu minimieren. Die Einstellung des Abstandes der Elektroden wurde vor dem Einsetzen der gefüllten und präparierten Spritze durchgeführt. Die Zeitspanne in der die Apparatur geöffnet war wurde möglichst gering gehalten um eine Gefahr der Kontamination zu verringern. Im Anschluss wurde der Elektrospinnvorgang nach Einstellung der geeigneten Spannung und des optimalen Vorschubes gestartet und der Spinnvorgang wurde ständig kontrolliert. Die erzeugten Fasern wurden je nach Bedarf auf verschiedenen Substraten abgeschieden, wie zum Beispiel Aluminiumfolie, Glasobjekträger und Rahmen aus Aluminium.

#### 6.8.7.2.4 Herstellung der parallel orientierten bakterienhaltigen Faservliesen

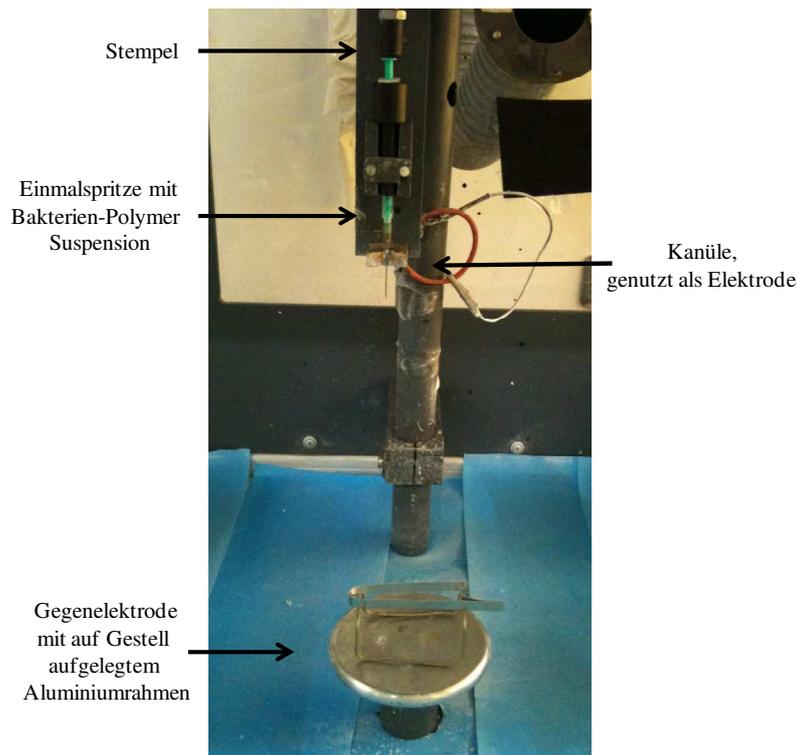
Die in Abschnitt 6.8.7.1.1 beschriebenen Bakterien-Polymer Lösungen wurden für die Herstellung der parallel orientierten bakterienhaltigen Nanofasern verwendet. Die Abscheidung der Fasern erfolgte stets auf einem Aluminiumrahmen mit einer Länge und Breite von 8 x 2 cm um eine vergleichbarere Menge der Proben zu erhalten, wurde der Spinnprozess immer für 60 Sekunden durchgeführt. Im Anschluss an den Spinnprozess wurde die auf den Fasern lastende Zugspannung, durch Verkürzen des Abstandes der 8 cm langen, parallel zueinander orientierten Seiten gemindert. Die hergestellten Proben wurden unmittelbar danach in sterilen 50 mL Zentrifugeneinsätzen bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Eine ähnliche Methode wurde bereits von Herr Dr. Gensheimer entwickelt, die hier vorgestellte Durchführung wurde für die herrschenden Bedingungen optimiert.<sup>[159]</sup>

Die nachfolgende Tabelle fasst die Herstellungsbedingungen zusammen.

**Tabelle 6.8-6 Prozessparameter der Elektrospinn-Apparatur.**

Parameter	Wert
Spannung Kanüle	+ 15 kV
Spannung Gegenelektrode	- 1 kV
Abstand	20 cm
elektrische Feld	0.8 kV/cm
Flussrate	4 mL /Stunde
Temperatur	22-27 °C
Luftfeuchtigkeit	20 %
Dauer	60 Sekunden

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Aufbau. (Abbildung 6-4)



**Abbildung 6-4:** Aufbau der Elektrospinnapparatur mit einem Aluminiumrahmen als Gegenelektrode.

### 6.8.7.3 PPX-Beschichtung der Faservliese

Die Beschichtung der Vliese wurde analog zu der Arbeitsweise aus Abschnitt 6.8.6.4 durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle fasst die eingesetzte Menge an [2,2]-Paracyclophan und die erhaltenen Schichtdicken zusammen.

Tabelle 6.8-7 Zusammenfassung der PPX-Schichtdicke.

[2,2]- Paracyclophan / g	d <sub>1</sub> / μm	d <sub>2</sub> / μm	d <sub>3</sub> / μm	Mittelwert d / μm
1.00	0.52	0.50	0.48	0.50
2.50	1.54	1.51	1.45	1.50
2.50	1.58	1.60	1.62	1.60
2.50	1.55	1.51	1.52	1.53
2.50	1.62	1.63	1.58	1.61
2.50	1.70	1.73	1.71	1.71
1.10	0.48	0.47	0.45	0.46
2.50	2.17	2.20	2.18	2.18
2.50	1.12	1.12	1.11	1.12
2.50	1.80	1.81	1.78	1.80
2.50	1.81	1.80	(2.06)	1.81

Die abgeschiedene Masse an PPX auf den mit Nanofasern besponnenen Aluminiumträger betrug bei einer eingesetzten Menge von 2,5 g [2,2]Paracyclophan 7,72 mg PPX. Die nachfolgende Tabelle fasst die Werte zusammen.

Tabelle 6.8-8 Masse von Polymer auf Träger.

Aluträger/Fasern unbesch. / mg	Aluträger/Fasern besch. / mg	Differenz / mg
1575.60	1583.29	7.69
1561.65	1569.22	7.75
1581.88	1599.97	18.09 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>Wert wurde nicht berücksichtigt, da Ausreißer.

#### **6.8.7.4 Überlebenstest der *M. luteus* in Fasern**

Der Nachweis der lebenden immobilisierten Bakterien in PEO-Nanofasern und in PPX-PEO-Fasern wurde analog der Vorgehensweise in Abschnitt 6.8.6.3 durchgeführt. Im Falle der Inokulation der nährstoffhaltigen Agarplatten wurde im Gegensatz zu einzelnen Fasern der gesamte Träger verwendet. Das Wachstum der Kolonien wurde entlang des Aluminiumrahmens und zwischen dem Rahmen beobachtet.

#### **6.8.7.5 Nachweis der biologischen Aktivität der immobilisierten Bakterien**

Der Nachweis der biologischen Aktivität der Bakterien wurde wie in Abschnitt 6.8.6.5 beschrieben durchgeführt.

#### **6.8.7.6 Sequestrierung von Gold-Ionen**

Die Sequestrierung von Gold-Ionen, deren Nachweis und deren Lokalisierung wurden wie in Abschnitt 6.8.6.6 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde die Goldsäurelösung für 24 Stunden mit bakterienhaltigen und nicht-bakterienhaltigen Trägern inkubiert und ausgewertet.

#### **6.8.7.7 Zuordnung der ICP-MS Messprotokolle**

Die nachfolgende Tabelle ordnet die Probenbezeichnungen in den Protokollen den Probenbezeichnungen in der Dissertationsschrift zu.

Tabelle 6.8-9 Zuordnung der Probenbezeichnungen der Dissertationsschrift zu den Probenbezeichnungen der ICP-MS Messprotokolle.

Typ	Probenbezeichnung	ICP-MS Bezeichnung	Bemerkung	Referenzwert / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Mikrofasern	PVA-Bakterien-PPX 4,5	B3	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PVA-Bakterien-PPX 4,5	B4	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PVA-Bakterien-PPX 4,5	B6	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
Nanofasern	PEO ohne PPX	C1	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO ohne PPX	C2	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> ohne PPX	C3	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> ohne PPX	C4	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 1.50 $\mu\text{m}$ PPX	C5	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 1.50 $\mu\text{m}$ PPX	C6	Testdauer eine Stunde,	132,5

## Experimenteller Teil

Referenz: Ref 2				
	PEO/ <i>M.luteus</i> 4.63 µm PPX	C10	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 5.10 µm PPX	C12	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 3.10 µm PPX	C14	Testdauer eine Stunde, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 1.50 µm PPX 24 Stunden	C20	Testdauer 24 Stunden, Referenz: Ref 2	132,5
	PEO/ <i>M.luteus</i> 1.50 µm PPX 24 Stunden	C21	Testdauer 24 Stunden, Referenz: Ref 2	132,5
<b>Träger</b>	Träger mit 1.50 µm PPX	D4	Testdauer eine Stunde, Referenz: $\frac{Ref5+Ref6}{2}$	92,4
	Träger mit 1.50 µm PPX	D5	Testdauer eine Stunde, Referenz: $\frac{Ref5+Ref6}{2}$	92,4
	Träger mit 1.50 µm PPX 24 Stunden	D9	Testdauer 24 Stunden, Referenz: Ref 8	93,3
	Träger mit 1.50 µm PPX 24 Stunden	D10	Testdauer 24 Stunden, Referenz: Ref 8	93,3

Im Folgenden sind die Originalprotokolle der ICP-MS Messungen aufgeführt.

## Experimenteller Teil

**Tabelle 6.8-10 Zusammenfassung der Werte der ICP-MS Protokolle.**

Probenname	Element	Konzentration		Wiederholungen
			Relative Standardabweichung /%	
		/ppb		
<b>b3</b>	Au	106,7	1,91	3
<b>b4</b>	Au	100,6	6,34	3
<b>b6</b>	Au	107,8	1,41	3
<b>c1</b>	Au	125,3	1,37	3
<b>c2</b>	Au	128,3	1,10	3
<b>c3</b>	Au	82,9	1,75	3
<b>c4</b>	Au	82,7	1,07	3
<b>c5</b>	Au	122,8	8,81	3
<b>c6</b>	Au	125,7	1,75	3
<b>c10</b>	Au	114,6	8,84	3
<b>c12</b>	Au	125,0	2,09	3
<b>c14</b>	Au	128,9	1,76	3
<b>c20</b>	Au	0,5	8,15	3
<b>c21</b>	Au	0,6	4,84	3
<b>d4</b>	Au	94,2	1,23	3
<b>d5</b>	Au	91,4	1,73	3
<b>d9</b>	Au	87,2	0,99	3
<b>d10</b>	Au	88,4	1,24	3
<b>Ref2</b>	Au	132,5	2,74	3
<b>Ref5</b>	Au	90,7	2,55	3

## Experimenteller Teil

---

<b>Ref6</b>	Au	97,8	1,00	3
<b>Ref8</b>	Au	93,3	1,37	3

---

## 7. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andreas Greiner, danke ich für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas, für die Unterstützung und die vielen Ratschläge, die mir neue Blickpunkte eröffnet haben. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts an der Hebrew University of Jerusalem und die Chance der Teilnahme an vielen Konferenzen, an denen ich zum Teil meine Forschungen präsentieren durfte.

Frau Prof. Dr. Seema Agarwal danke ich für die Übernahme des Koreferats und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Charles Greenblatt und Jo-Anne Greenblatt danke ich für die Möglichkeit meines Forschungsaufenthalts und die sehr herzliche und intensive Betreuung in Jerusalem. Mein Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Kobi Golenser für die interessanten Diskussionen und seine Gastfreundschaft. Danke auch an Alon Nardi, der mir stets eine große Hilfe war. Ich möchte mich auch bei Herrn PhD Amer Al-Jawabreh für die wissenschaftlichen Diskussionen und seine Gastfreundschaft bedanken.

Frau Edith Schmidt und Herrn Rigobert Donner danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei administrativen Fragestellungen.

Herrn Michael Hellwig danke ich für die Unterstützung bei Fragestellungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Durchführung der TEM- und Cryo-REM-Aufnahmen und der EDX-Analysen. Dank gebührt auch Herrn Dr. Andreas Klingl und Frau Melanie Förtsch für die Präparation und Durchführung der TEM-Aufnahmen der Mikrotomschnitte. Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert danke ich für die Möglichkeit der Realisierung der ICP-MS-Analysen und Herrn David Nette danke ich für die experimentelle Durchführung und die wissenschaftlichen Diskussionen. Herrn Raimo Hartmann danke ich für seine Hilfe bei der Aufnahme der KLSM-Bilder

Herrn Dr. Roland Dersch möchte ich für die professionelle Beratung und Hilfe bei allen Fragen zum Thema der Mikroskopie danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Laborkollegin Ilka Elisabeth Paulus für die schönen Jahre, in der Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich werde die Zeit im Labor 4415

## Danksagung

---

niemals vergessen und wünsche dir auf diesem Wege weiterhin viel Erfolg bei deiner Doktorarbeit.

Meinen ehemaligen Laborkollegen Herrn Dr. Thorsten Röcker, Herrn Dr. Marco Gensheimer und Frau Dr. Claudia Mattheis danke ich für Ihre Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft und viele anregenden Gedanken. Marco hat mich großartig in das Themenfeld der bakteriellen Komposite eingeführt und viele der vorgestellten Arbeiten basieren auf seinen Vorarbeiten.

Auch meinen ehemaligen und aktuellen „Mitdoktoranden“ sowie allen anderen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Arbeitskreises Greiner und Agarwal danke ich für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfe in praktischen und organisatorischen Fragestellungen, auch die Erlebnisse außerhalb der Labore sollen hier erwähnt sein. Besonders möchte ich mich auch bei Frau Kathrin Becker für die Unterstützung im „Bio-Labor“ und Herrn Dr. Michael Bognitzki für die Unterstützung bei synthetischen Fragen bedanken. Mein Dank geht auch an alle Mitglieder der feinmechanischen Werkstatt, die mir eine große Hilfe bei der Umsetzung von Ideen waren.

Meinen „Vertiefern“ Lena Kuhne, Nicholas Rau und Michaela Enzeroth, sowie dem Bachelorstudent Christian Dams danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei meiner Dissertation.

Für das Korrekturlesen meiner Schrift danke ich Ilka Elisabeth Paulus, Sebastian Paulig, Peter Ohlendorf, Oliver Hauenstein, Melissa Koehn, Holger Pletsch, Fabian Mitschang, Jana May und Heike Knierim.

Herrn Arno Steffen danke ich für seinen großartigen Chemieunterricht, durch den ich die Faszination der Chemie kennenlernte.

Schließlich möchte ich noch meiner Freundin Jana May, meinen Eltern Heike und Volker Knierim, meiner Großmutter Christa Rohde und meinen Freunden sehr herzlich danken. Sie waren mir zu jeder Zeit eine große Unterstützung und eine unschätzbare Hilfe.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] H. Wieland, R. Sonderhoff, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1932**, 499, 213.
- [2] G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf Und Wirkung Von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH. **2009**.
- [3] M. Breuer, R. Stürmer, *Chemie in unserer Zeit.* **2006**, 40, 104.
- [4] S. Klein, J. Kuhn, R. Avrahami, S. Tarre, M. Beliaevski, M. Green, E. Zussman, *Biomacromolecules.* **2009**, 10, 1751.
- [5] J. Burgain, C. Gaiani, M. Linder, J. Scher, *Journal of Food Engineering.* **2011**, 104, 467.
- [6] *Bioremediation Protocols*, Humana Press. **1997**.
- [7] J. Ma, W. T. Qi, L. N. Yang, W. T. Yu, Y. B. Xie, W. Wang, X. J. Ma, F. Xu, L. X. Sun, *Journal of Microbiological Methods.* **2007**, 68, 172.
- [8] N. Friis, P. Myers-Keith, *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, 28, 21.
- [9] M. Galun, E. Galun, B. Z. Siegel, P. Keller, H. Lehr, S. M. Siegel, *Water Air Soil Pollut.* **1987**, 33, 359-371.
- [10] E. Fourest, J.-C. Roux, *Appl Microbiol Biotechnol.* **1992**, 37, 399-403.
- [11] Z. Aksu, Y. Sag, T. Kutsal, *Environmental Technology.* **1992**, 13, 579.
- [12] R. Gourdon, S. Bhende, E. Rus, S. Sofer, *Biotechnol Lett.* **1990**, 12, 839-842.
- [13] C. White, G. M. Gadd, *FEMS Microbiology Letters.* **2000**, 183, 313.
- [14] H. Seki, A. Suzuki, S.-I. Mitsueda, *Journal of Colloid and Interface Science.* **1998**, 197, 185.
- [15] S. Ilhan, M. N. Nourbakhsh, S. Kiliçarslan, H. Ozdag, *Turkish Electronic Journal of Biotechnology.* **2004**, 2, 50.
- [16] T. G. Tornabene, H. W. Edwards, *Science.* **1972**, 176, 1334.
- [17] B. D. Faison, C. A. Cancel, S. N. Lewis, H. I. Adler, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 3649.
- [18] M. Hosea, B. Greene, R. Mcpherson, M. Henzl, M. Dale Alexander, D. W. Darnall, *Inorganica Chimica Acta.* **1986**, 123, 161.
- [19] N. Gomes, E. Camargos, J. Dias, V. Linardi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **1997**, 14, 149.
- [20] V. Karamushka, G. Gadd, *Biometals.* **1999**, 12, 289-294.
- [21] T. Tsuruta, *The Journal of General and Applied Microbiology.* **2004**, 50, 221.
- [22] N. Das, *Hydrometallurgy.* **2010**, 103, 180.
- [23] S. Marakushev, "Nauka" Publishers. **1991**.
- [24] L. A. Levchenko, A. P. Sadkov, N. V. Lariontseva, E. M. Koldasheva, A. K. Shilova, A. E. Shilov, *Doklady Biochemistry and Biophysics.* **2001**, 377, 123-124.
- [25] M. E. Romero-González, C. J. Williams, P. H. E. Gardiner, S. J. Gurman, S. Habesh, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 4163.
- [26] T. J. Beveridge, R. G. Murray, *J. Bacteriol.* **1980**, 141, 876.
- [27] S. He, Z. Guo, Y. Zhang, S. Zhang, J. Wang, N. Gu, *Materials Letters.* **2007**, 61, 3984.
- [28] P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Ramani, R. Parischa, P. V. Ajayakumar, M. Alam, M. Sastry, R. Kumar, *Angewandte Chemie International Edition.* **2001**, 40, 3585.

- [29] D. J. Wase, C. F. Forster, *Biosorbents for metal ions*, CRC Press. **1997**.
- [30] T. J. Beveridge, W. S. Fyfe, *Can. J. Earth Sci.* **1985**, *22*, 1893.
- [31] R. P. Tengerdy, J. E. Johnson, J. Holló, J. Tóth, *Appl Biochem Biotechnol.* **1981**, *6*, 3-13.
- [32] D. W. Darnall, B. Greene, M. T. Henzl, J. M. Hosea, R. A. McPherson, J. Sneddon, M. D. Alexander, *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 206.
- [33] B. Volesky, Ed., *Biosorption of Heavy Metals: Production and application of a Bacillus-based product for use in metals biosorption*, Boca Raton, CRC Press. **1990**.
- [34] A. Nakajima, T. Tsuruta, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* **2004**, *260*, 13-18.
- [35] M. F. Wong, H. Chua, W. Lo, C. K. Leung, P. H. Yu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *91-93*, 447.
- [36] A. Nakajima, M. Yasuda, H. Yokoyama, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada, *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **2001**, *17*, 343-347.
- [37] S. Rathore, P. M. Desai, C. V. Liew, L. W. Chan, P. W. S. Heng, *Journal of Food Engineering.* **2013**, *116*, 369.
- [38] L. Häggström, N. Molin, *Biotechnol Lett.* **1980**, *2*, 241-246.
- [39] M. Rubilar, E. Morales, R. Sáez, F. Acevedo, B. Palma, M. Villarroel, C. Shene, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 760.
- [40] Ying Zhu, "Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels.", in *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier B.V. **2007**, p. 373 ff.
- [41] M. B. Cassidy, H. Lee, J. T. Trevors, *Journal of Industrial Microbiology.* **1996**, *16*, 79-101.
- [42] S. F. Karel, S. B. Libicki, C. R. Robertson, *Chemical Engineering Science.* **1985**, *40*, 1321.
- [43] I. CHIBATA, "Immobilized Microbial Cells with Polyacrylamide Gel and Carrageenan and Their Industrial Applications", in *Immobilized Microbial Cells*. American Chemical Society, WASHINGTON, D. C. **1979**, p. 187 ff.
- [44] J. K. Park, H. N. Chang, *Biotechnology Advances.* **2000**, *18*, 303.
- [45] S. M. Tan, P. W. S. Heng, L. W. Chan, *Pharmaceutics.* **2011**, *3*, 731.
- [46] K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy, *International Journal of Food Microbiology.* **2000**, *62*, 47.
- [47] A. C. Jen, M. C. Wake, A. G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 357.
- [48] A. Groboillot, D. K. Boadi, D. Poncelet, R. J. Neufeld, *Critical Reviews in Biotechnology.* **1994**, *14*, 75.
- [49] A. Rosevear, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1984**, *34*, 127.
- [50] V. A. P. Martins dos Santos, J. Tramper, R. H. Wijffels, "Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms: new-generation bioreactors", in *Biotechnology Annual Review : Biotechnolgy Annual Review*. Elsevier. **1998**, p. 323 ff.
- [51] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7686.
- [52] P. de Vos, M. Bučko, P. Gemeiner, M. Navrátil, J. Švitel, M. Faas, B. L. Strand, G. Skjak-Braek, Y. A. Morch, A. Vikartovská, I. Lacić, G. Kolláriková, G. Orive, D. Poncelet, J. L. Pedraz, M. B. Ansorge-Schumacher, *Biomaterials.* **2009**, *30*, 2559.
- [53] K. D. Green, I. S. Gill, J. A. Khan, E. N. Vulfson, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 535.

- [54] A. K. A. S. Brun-Graepi, C. Richard, M. Bessodes, D. Scherman, O.-W. Merten, *Journal of Controlled Release*. **2011**, 149, 209.
- [55] A. Wyss, U. von Stockar, I. Marison, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 86, 563.
- [56] H. Brandenberger, F. Widmer, *Journal of Biotechnology*. **1998**, 63, 73.
- [57] L. Piazza, T. Roversi, *11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)*. **2011**, 1, 1374.
- [58] A. M. SUN, *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1997**, 831, 271.
- [59] S. Graff, S. Hussain, J.-C. Chaumeil, C. Charrueau, *Pharm Res.* **2008**, 25, 1290-1296.
- [60] I.-Y. Kim, P. L. Pusey, Y. Zhao, S. S. Korban, H. Choi, K. K. Kim, *Journal of Controlled Release*. **2012**, 161, 109.
- [61] A. Patel, D. Jakobs-Schönwandt, T. Rose, K.-D. Vorlop, *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**, 89, 1751-1760.
- [62] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, *Food Research International*. **2007**, 40, 1107.
- [63] C. P. Champagne, P. Fustier, *Plant biotechnology / Food biotechnology*. **2007**, 18, 184.
- [64] F. P. de Castro-Cislaghi, C. D. R. E. Silva, C. B. Fritzen-Freire, J. G. Lorenz, E. S. Sant'Anna, *Journal of Food Engineering*. **2012**, 113, 186.
- [65] C. Desmond, R. Ross, E. O'Callaghan, G. Fitzgerald, C. Stanton, *J Appl Microbiol.* **2002**, 93, 1003.
- [66] A. F. Groboillot, C. P. Champagne, G. D. Darling, D. Poncelet, R. J. Neufeld, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 1157.
- [67] R. Zamora-Vega, J. L. Montañez-Soto, H. E. Martínez-Flores, R. Flores-Magallón, C. V. Muñoz-Ruiz, J. Venegas-González, T. D. J. Ariza Ortega, *Int J Food Sci Nutr.* **2012**, 63, 930.
- [68] K.-Y. Lee, T.-R. Heo, *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 869.
- [69] T.-Y. Sheu, R. T. Marshall, H. Heymann, *Journal of Dairy Science*. **1993**, 76, 1902.
- [70] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, *International Dairy Journal*. **2004**, 14, 737.
- [71] D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. von Stockar, I. W. Marison, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 70, 41.
- [72] M. Chávarri, I. Marañón, R. Ares, F. C. Ibáñez, F. Marzo, M. d. C. Villarán, *International Journal of Food Microbiology*. **2010**, 142, 185.
- [73] W. Ding, N. Shah, *Journal of Food Science*. **2009**, 74, M53.
- [74] Z.-J. Sun, G.-J. Lv, S.-Y. Li, Y.-B. Xie, W.-T. Yu, W. Wang, X.-J. Ma, *Journal of Biotechnology*. **2007**, 128, 150.
- [75] K. Kailasapathy, *Curr Issues Intest Microbiol.* **2002**, 3, 39.
- [76] E. Ivanova, V. Chipeva, I. Ivanova, X. Dousset, D. Poncelet, *JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS*. **2000 - 2002**, 53.
- [77] J. Wang, P. Liu, Y. Qian, *Environment International*. **1997**, 23, 775.
- [78] W. Ding, N. Shah, *J Food Science*. **2007**, 72, M446.
- [79] A. Greiner, J. H. Wendorff, *Angewandte Chemie International Edition*. **2007**, 46, 5670.
- [80] G. Taylor, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. **1964**, 280, 383.
- [81] G. Taylor, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. **1969**, 313, 453.
- [82] A. L. Yarin, W. Kataphinan, D. H. Reneker, *J. Appl. Phys.* **2005**, 98, 64501.

- [83] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge, *Polymer*. **2001**, *42*, 9955.
- [84] R. Dersch, T. Liu, A. K. Schaper, A. Greiner, J. H. Wendorff, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2003**, *41*, 545.
- [85] A. Greiner, J. H. Wendorff, A. L. Yarin, E. Zussman, *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**, *71*, 387-393.
- [86] E. Zussman, *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 366.
- [87] S. Agarwal, J. H. Wendorff, A. Greiner, *Polymer*. **2008**, *49*, 5603.
- [88] O. Bretschger, J. Osterstock, W. Pinchak, S. Ishii, K. Nelson, *Microb Ecol.* **2010**, *59*, 415-427.
- [89] J. G. Crespo, S. Velizarov, M. A. Reis, *Current Opinion in Biotechnology.* **2004**, *15*, 463.
- [90] B. Rosche, X. Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler, *Trends in Biotechnology.* **2009**, *27*, 636.
- [91] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R. M. Hernández, M. de Castro, J. L. Pedraz, *Journal of Controlled Release.* **2008**, *132*, 76.
- [92] L. M. Bellan, J. D. Cross, E. A. Strychalski, J. Moran-Mirabal, H. G. Craighead, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2526.
- [93] M. Gensheimer, M. Becker, A. Brandis-Heep, J. H. Wendorff, R. K. Thauer, A. Greiner, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2480.
- [94] W. Salalha, J. Kuhn, Y. Dror, E. Zussman, *Nanotechnology.* **2006**, *17*, 4675.
- [95] A. López-Rubio, E. Sanchez, Y. Sanz, J. M. Lagaron, *Biomacromolecules.* **2009**, *10*, 2823.
- [96] J. H. Yu, S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1562.
- [97] Z. Sun, E. Zussman, A. Yarin, J. Wendorff, A. Greiner, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1929.
- [98] Z.-M. Huang, C.-L. He, A. Yang, Y. Zhang, X.-J. Han, J. Yin, Q. Wu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *77*, 169.
- [99] Y. Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C. T. Lim, S. Ramakrishna, *Biomacromolecules.* **2006**, *7*, 1049.
- [100] Y. Dror, W. Salalha, R. Avrahami, E. Zussman, A. L. Yarin, R. Dersch, A. Greiner, J. H. Wendorff, *Small.* **2007**, *3*, 1064.
- [101] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, W. Chen, *Journal of Controlled Release.* **2005**, *108*, 237.
- [102] A. Nardi, *JEP.* **2012**, *03*, 164.
- [103] Y. Liu, M. H. Rafailovich, R. Malal, D. Cohn, D. Chidambaram, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2009**, *106*, 14201.
- [104] M. Gensheimer, A. Brandis-Heep, S. Agarwal, R. K. Thauer, A. Greiner, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 333.
- [105] J. Zeng, A. Aigner, F. Czubyko, T. Kissel, J. H. Wendorff, A. Greiner, *Biomacromolecules.* **2005**, *6*, 1484.
- [106] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.-A. Klok, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5437.
- [107] S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 14.
- [108] M. Husseman, E. E. Malmström, M. McNamara, M. Mate, D. Mecerreyes, D. G. Benoit, J. L. Hedrick, P. Mansky, E. Huang, T. P. Russell, C. J. Hawker, *Macromolecules.* **1999**, *32*, 1424.

- [109] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614.
- [110] T. E. Patten, K. Matyjaszewski, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 901.
- [111] N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2270.
- [112] H. Zhao, X. Kang, L. Liu, *Macromolecules.* **2005**, *38*, 10619.
- [113] J. He, Y. Wu, J. Wu, X. Mao, L. Fu, T. Qian, J. Fang, C. Xiong, J. Xie, H. Ma, *Macromolecules.* **2007**, *40*, 3090.
- [114] G. O. Okelo, L. He, *Biosensors and Bioelectronics.* **2007**, *23*, 588.
- [115] A. Carlmark, E. Malmström, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 900.
- [116] O. Prucker, J. Rühle, *Macromolecules.* **1998**, *31*, 592.
- [117] E. Marutani, S. Yamamoto, T. Ninjbadgar, Y. Tsujii, T. Fukuda, M. Takano, *Polymer.* **2004**, *45*, 2231.
- [118] J.-B. Kim, W. Huang, M. D. Miller, G. L. Baker, M. L. Bruening, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2003**, *41*, 386.
- [119] C. B. Gorman, R. J. Petrie, J. Genzer, *Macromolecules.* **2008**, *41*, 4856.
- [120] S. Turgman-Cohen, J. Genzer, *Macromolecules.* **2012**, *45*, 2128.
- [121] F. Zhou, Z. Zheng, B. Yu, W. Liu, W. T. S. Huck, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16253.
- [122] J. N. Kizhakkedathu, K. R. Kumar, D. Goodman, D. E. Brooks, *Polymer.* **2004**, *45*, 7471.
- [123] S. Wan, J. Huang, H. Yan, K. Liu, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 298.
- [124] S.-W. Zhang, S.-X. Zhou, Y.-M. Weng, L.-M. Wu, *Langmuir.* **2005**, *21*, 2124.
- [125] X. Huang, M. J. Wirth, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4577.
- [126] M. Ejaz, S. Yamamoto, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules.* **1998**, *31*, 5934.
- [127] D. M. Jones, W. T. S. Huck, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1256.
- [128] W. Huang, J.-B. Kim, M. L. Bruening, G. L. Baker, *Macromolecules.* **2002**, *35*, 1175.
- [129] N. Li, R. Bai, C. Liu, *Langmuir.* **2005**, *21*, 11780.
- [130] P. Liu, Z. Su, *Materials Letters.* **2006**, *60*, 1137.
- [131] G. Zheng, H. D. H. Stöver, *Macromolecules.* **2003**, *36*, 1808.
- [132] D. J. Kim, J.-y. Heo, K. S. Kim, I. S. Choi, *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, *24*, 517.
- [133] D. Bontempo, N. Tirelli, G. Masci, V. Crescenzi, J. A. Hubbell, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 417.
- [134] S. Minko, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews.* **2006**, *46*, 397.
- [135] H. Aoki, M. Kitamura, S. Ito, *Macromolecules.* **2007**, *41*, 285.
- [136] J. Seuring, S. Agarwal, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1898.
- [137] A. M. Jonas, K. Glinel, R. Oren, B. Nysten, W. T. S. Huck, *Macromolecules.* **2007**, *40*, 4403.
- [138] S. B. Rahane, J. A. Floyd, A. T. Metters, S. M. Kilbey, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1232.
- [139] H. Yim, M. S. Kent, S. Satija, S. Mendez, S. S. Balamurugan, S. Balamurugan, G. P. Lopez, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2004**, *42*, 3302.
- [140] A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano, *Biomaterials.* **2008**, *29*, 2073.
- [141] J. N. Kizhakkedathu, R. Norris-Jones, D. E. Brooks, *Macromolecules.* **2004**, *37*, 734.
- [142] N. D. Treat, N. Ayres, S. G. Boyes, W. J. Brittain, *Macromolecules.* **2006**, *39*, 26.

- [143] M. Geoghegan, L. Ruiz-Perez, C. C. Dang, A. J. Parnell, S. J. Martin, J. R. Howse, R. A. L. Jones, R. Golestanian, P. D. Topham, C. J. Crook, A. J. Ryan, D. S. Sivia, J. R. P. Webster, A. Menelle, *Soft Matter*. **2006**, 2, 1076.
- [144] S. Moya, O. Azzaroni, T. Farhan, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Angewandte Chemie International Edition*. **2005**, 44, 4578.
- [145] S. Krishnan, C. J. Weinman, C. K. Ober, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3405.
- [146] A. Greiner, S. Mang, O. Schäfer, P. Simon, *Acta Polym.* **1997**, 48, 1.
- [147] H. G. Gilch, *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* **1966**, 4, 1351.
- [148] M. SZWARC, *Nature*. **1947**, 160, 403.
- [149] W. F. Gorham, *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* **1966**, 4, 3027.
- [150] M. Gazicki, W. J. James, H. K. Yasuda, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett. Ed.* **1985**, 23, 639.
- [151] M. SZWARC, *Discuss. Faraday Soc.* **1947**, 2, 46.
- [152] M. SZWARC, *J. Polym. Sci.* **1951**, 6, 319.
- [153] L. A. Errede, R. S. Gregorian, *J. Polym. Sci.* **1962**, 60, 21.
- [154] V. Giménez, A. Mantecón, V. Cádiz, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **1996**, 34, 925.
- [155] Q. Wei, J. Ji, J. Shen, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 645.
- [156] C.-K. Yeom, K.-H. Lee, *Journal of Membrane Science*. **1996**, 109, 257.
- [157] Y. Zhang, P. Zhu, D. Edgren, *J Polym Res.* **2010**, 17, 725-730.
- [158] K.-Y. A. Wu, K. D. Wisecarver, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 39, 447.
- [159] M. Gensheimer, *Immobilisierung lebender Bakterien in wasserbeständigen Polymerfasern zur Herstellung einer aktiven Membran*. **2010**.
- [160] K. Matyjaszewski, *Macromolecules*. **2012**, 45, 4015.
- [161] P. S. Thomas, J.-P. Guerbois, G. F. Russell, B. J. Briscoe, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2001**, 64, 501-508.
- [162] K. Babu, R. Dhamodharan, *Nanoscale Res Lett.* **2008**, 3, 109.
- [163] S. Horiike, S. Matsuzawa, *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, 58, 1335.
- [164] W. H. Scouten, J. H. T. Luong, R. Stephen Brown, *Trends in Biotechnology*. **1995**, 13, 178.
- [165] Marco Gensheimer, *Untersuchungen zur Verarbeitung Bakterien angereicherter Polymerlösungen und Herstellung einer aktiven, biologischen Membran*, Marburg. **2006**.
- [166] Christian Dams, „Living Composites“ - *Micrococcus luteus in Poly(p-xylylen)-Hohlfasern*, Marburg. **2012**.
- [167] C. L. Greenblatt, J. Baum, B. Y. Klein, S. Nachshon, V. Koltunov, R. J. Cano, *Microb Ecol.* **2004**, 48, 120-127.
- [168] F. Sittner, W. Ensigner, A. Greiner, Phillip Hanefeld, *e-Polymers*. **2006**.
- [169] S. Boduroglu, M. Cetinkaya, W. J. Dressick, A. Singh, M. C. Demirel, *Langmuir*. **2007**, 23, 11391.
- [170] M. Cetinkaya, S. Boduroglu, M. C. Demirel, *Polymer*. **2007**, 48, 4130.
- [171] A. Greiner, J. H. Wendorff, A. L. Yarin, E. Zussman, *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**, 71, 387.
- [172] D. M. Magni, A. C. Olivieri, A. L. Bonivardi, *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 528, 275.
- [173] A. Afkhami, A. Safavi, A. Massoumi, *Analytical Letters*. **1991**, 24, 1643.
- [174] Guerin, Mondido, McClenn, Peasley, *Lett Appl Microbiol.* **2001**, 32, 340.

- [175] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *European Journal of Biochemistry*. **2000**, 267, 5421.
- [176] B. Zhao, K. Ranguelova, J. Jiang, R. P. Mason, *Free Radical Biology and Medicine*. **2011**, 51, 153.
- [177] B. D. Faison, C. A. Cancel, S. N. Lewis, H. I. Adler, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 3649.
- [178] A. Nakajima, M. Yasuda, H. Yokoyama, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2001**, 17, 343.
- [179] F. Reith, *Science*. **2006**, 313, 233.
- [180] A. Nakajima, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2003**, 19, 369-374.
- [181] E. N. Efremenko, N. Y. Tatarinova, *Microbiology*. **2007**, 76, 336-341.
- [182] M. L. Merroun, J. Raff, A. Rossberg, C. Hennig, T. Reich, S. Selenska-Pobell, *Applied and Environmental Microbiology*. **2005**, 71, 5532.
- [183] A. Klingl, C. Moissl-Eichinger, G. Wanner, J. Zweck, H. Huber, M. Thomm, R. Rachel, *Arch Microbiol.* **2011**, 193, 867.
- [184] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, T. D. Brock, W. Goebel, *Mikrobiologie*, Berlin [u.a.], Spektrum Akad. Verl. **2001**.
- [185] M. Stasiak, A. Studer, A. Greiner, J. H. Wendorff, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 6150.
- [186] R. Dersch, T. Liu, A. K. Schaper, A. Greiner, J. H. Wendorff, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2003**, 41, 545.
- [187] G. M. Gadd, *Microbiology*. **2010**, 156, 609.

## 9. Summary

This publication describes in detail the immobilization of *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) in various hydrogels and the following processing into water-stable living composites.

One part of the publication deals with the immobilization of bacteria into poly(vinyl alcohol) (PVA) microparticles with a diameter of about 5  $\mu\text{m}$ . The bacteria are entrapped by utilizing an aqueous solution of PVA and a high velocity stirrer. Afterwards, the particles are formed through the addition of acetone. The immobilized bacteria survived the storage in various organic solvents and endured chemical surface reaction under different conditions, as shown by using hexamethylene diisocyanate (HDMI), toluene diisocyanate (TDI) and octadecyl isocyanat. After the surface reactions, living immobilized bacteria were proven by inoculating and incubating agar plates containing nutrient.

One major drawback of the living composite is its behavior in presence of water. The PVA-particles swell and hence the bacteria are released into the surrounding medium. We have overcome this disadvantage by polymerizing various amounts of poly(methyl methacrylate) (PMMA) onto the PVA-particles in presence of the living bacteria inside the particles. In a first step, we introduced an ATRP-initiator by a chemical surface reaction between the OH-groups and the acid bromid of the initiator. In a second step, the grafting from polymerization of methyl methacrylate (MMA) was carried out, leading to exactly one PMMA shell around each PVA particle. We were able to control the amount of the initiator as well as the amount of the PMMA. The core-shell structure was proven by utilizing TEM and confocal microscopy. Furthermore, we demonstrated the hydrophobic behavior of the core-shell particles in terms of the release of immobilized fluorescein. In addition, the retardation of the release of bacteria was verified by inoculating agar plates containing nutrition and buffer solution. The water stability of the living composite was shown by using SEM and Cryo-SEM.

As a result, we received water-stable PMMA-PVA-core-shell particles with immobilized living bacteria. We also proved the survival of the bacteria during the complete process.

Moreover, the free bacteria were immobilized in nano- and microfibers consisting of poly(ethylene oxide) (PEO) and PVA. The nanofibers were produced through the electrospinning technique whereas the microfibers were created by wet spinning. The hydrogel fibers were coated with poly(*p*-xylylene) (PPX) via chemical vapor deposition (CVD). The bacteria hence were immobilized in core-shell fibers with an adjustable

## Summary

thickness. The fibers were water-stable and prevented the release of bacteria into the surrounding medium. The bacteria survived the process and we demonstrated their metabolic activity by the reduction of resazurin. Moreover, we utilized the living fiber composites for the sequestration of gold ions from aqueous solution. The decrease of the amount of gold in the solution was demonstrated by ICP-MS. The deposition of gold inside the fibers was verified by TEM and EDX.

Concluding, we were able to immobilize bacteria in hydrogel particles and hydrogel fibers. Furthermore, we proved the feasibility of chemical surface reactions for creating water-stable living composites. The immobilized bacteria survived these reactions. Moreover, we demonstrated their metabolic activity as well as their ability to sequester heavy metal ions from aqueous solutions. The water-stable composites are of interest for the bioremediation of polluted water and for biotransformation.

## Erklärung

Christian Knierim  
Pilgrimstein 25  
35037 Marburg

### 10. Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

**Immobilisierung von Bakterien in Hydrogelen und chemische Weiterverarbeitung zu wasserstabilen lebenden Biohybridsystemen**

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, den 04.07.2013

*Christian Knierim*

---

Ort/Datum

Unterschrift

## Lebenslauf

**Name:** Knierim  
**Vorname:** Christian Peter  
**Geburtsdatum:** 28.03.1985  
**Geburtsort:** Kassel  
**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

### Studium und Schulausbildung

08/2013 Disputation

01/2010 - 07/2013 Promotion an der Philipps-Universität Marburg, in der makromolekularen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Greiner

01/2009 – 09/2009 Diplomarbeit in der makromolekularen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Greiner, an der Phillips-Universität Marburg

10/2006 – 09/2009 Hauptstudium Chemie an der Philipps-Universität Marburg, *Diplom Chemiker*

10/2004 – 10/2006 Grundstudium Chemie an der Philipps-Universität Marburg, *Vordiplom*

06/2004 Georg-Christoph-Lichtenberg Gymnasium, Kassel, *Abitur*

Marburg, 07.08.2013