

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an
bakteriellen Biokomponenten für schwermetallbindende
silikatische Sol-Gel-Keramiken**

Von der Fakultät Maschinenwesen
der
Technischen Universität Dresden

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)
angenommene

DISSERTATION

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Sabine Matys

geboren am 27. Juni 1960 in Dresden

Tag der Einreichung: 09. September 2005

Tag der Verteidigung: 14. Dezember 2005

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Pompe
Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Rödel
Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Böttcher

Vorsitzender der
Promotionskommission: Prof. Dr. rer. nat. habil. T. Bley

Die schöpferische Fantasie des Menschen erschöpft sich eher als die Natur.

Blaise Pascal

Inhaltsverzeichnis	I
Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole	V
1 Gegenstand der Arbeit	1
2 Einleitung	3
2.1 Stand des Wissens.....	3
2.1.1 Glas als natürlicher Werkstoff.....	3
2.1.2 Silikatische Sol-Gel-Keramiken.....	5
2.1.3 Biologisierte silikatische Sol-Gel-Keramiken (Biocere).....	8
2.1.4 Anwendungsbeispiele für Biocere.....	9
2.2 Problemstellung und Zielsetzung.....	13
3 Material und Methoden	17
3.1 Verwendete Biokomponenten.....	17
3.1.1 Bakterienkulturen.....	17
3.1.2 Anzucht und Lagerung vegetativer Zellen.....	18
3.1.2.1 Gewinnung von Zellen für Fluoreszenzmessungen und Einbettung in dünne Sol-Gel-Schichten.....	18
3.1.2.2 Gewinnung von Zellen für Schwermetalladaptation....	19
3.1.3 Isolierung und Lagerung von Sporen.....	19
3.1.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle.....	20
3.1.5 Bestimmung von Trockengewichten.....	20
3.2 Verwendete Biocere.....	21
3.2.1 Erzeugung von Bulkprodukten.....	21
3.2.2 Erzeugung von dünnen Schichten.....	22
3.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung von Biokomponenten und Bioceren.....	23
3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	23
3.3.1.1 Fluorophore.....	24
3.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	26
3.3.3 Atomkraftmikroskopie.....	27
3.3.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	28
3.4 Färbung von Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	29
3.4.1 Proteinfärbung.....	29
3.4.2 Lebend/Tot-Färbung.....	30

3.4.3	Ionenspezifische Farbstoffe.....	30
3.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	31
3.5.1	Messungen mit hohem Probendurchsatz.....	31
3.5.2	Einzelzellmessungen mittels Durchflusszytometrie.....	33
3.6	Keimungsversuche dünner Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen.....	35
3.6.1	Apparativer Aufbau.....	35
3.6.2	Aktivierung der Sporen mit Calciumdipicolinat.....	36
3.7	Mechanische Spannungsmessungen.....	37
3.7.1	Apparativer Aufbau.....	37
3.7.2	Durchführung der Messungen.....	38
4	Experimente und Ergebnisse.....	41
4.1	Fluoreszenzfarbstoffe als Werkzeuge zur Charakterisierung von Bioceren.....	41
4.1.1	Kurze Einführung in die Grundlagen der Fluoreszenz.....	41
4.1.1.1	Anregungszustände.....	41
4.1.1.2	Fluoreszenzlebensdauer.....	43
4.1.1.3	Quenching.....	44
4.1.2	3D-Visualisierung der Biokomponente in der Silikatmatrix... ..	45
4.1.3	Charakterisierung der Vitalität der Biokomponente.....	46
4.1.3.1	Prinzip der Lebend/Tot-Färbung.....	46
4.1.3.2	Vitalität der Biokomponente nach der Immobilisierung.....	48
4.2	Wechselwirkungen ionensensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in wässriger Lösung mit Cu^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+}	51
4.3	Färbung lebender Bakterien mit ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen.....	53
4.3.1	Färbetechniken für intrazelluläre Anwendungen.....	53
4.3.2	Messungen mit hohem Probendurchsatz.....	56
4.3.3	Einzelzellmessungen.....	59
4.4	Charakterisierung lagerfähiger dünner Schichten mit immobilisierten Sporen.....	69
4.4.1	Die bakterielle Endospore.....	69
4.4.2	Keimungsverhalten von Sporen in der Durchflusszelle.....	75
4.4.3	Mechanische Spannungsverhältnisse in dünnen Schichten.....	81

4.4.3.1	Charakterisierung von Oberflächenbeschaffenheit und Schichtdicke.....	81
4.4.3.2	Auswertung der Spannungsmessungen.....	82
4.5	Mikrobiell besiedelte Biocere.....	86
5	Diskussion	95
5.1	Wechselwirkungen von Cu ²⁺ und Ni ²⁺ mit Bakterien.....	95
5.1.1	Aufnahme von Kupfer und Nickel.....	98
5.1.2	Intrazelluläres Calcium.....	99
5.2	Dünne Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen von <i>Bacillus sphaericus</i> JG-A12.....	101
5.2.1	Einfluss von Calciumdipicolinat auf die Keimungsfähigkeit.....	102
5.2.2	Mechanische Spannungszustände während der Keimung.....	104
5.3	Biologisch induzierte Schädigung von Bioceren.....	107
6	Zusammenfassung und Ausblick	113
7	Anhang	119
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	119
7.2	Tabellenverzeichnis.....	124
8	Literaturverzeichnis	125

Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

ABC-Transporter	ATP binding cassette transporter
AbwAG	Abwasserabgabengesetz
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomkraftmikroskopie)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
CCD	Charge Coupled Device
CFU	Colony Forming Units (Koloniebildende Einheiten)
cLSM	confocal Laser Scanning Microscope (konfokales Laserscanningmikroskop)
CopA, CopB	Kupfer-transportierende ATPasen
CwlJ, SleB	lytische Enzyme bakterieller Endosporen
<i>D. radiodurans</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DNA-Farbstoff)
DIC	Differential Interference Contrast (Differential-Interferenz-Kontrast)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPA	2,6-Pyridindicarboxylsäure (Dipicolinsäure)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
<i>E</i>	Elastizitätsmodul
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EDX	Energy Dispersive X-ray Analysis (Energiedispersive Röntgenanalyse)
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
EtOH	Ethanol
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G	Gewicht
g	Schleuderziffer
GerP	Sporenpotein mit Einfluss auf die Funktionalität der Sporenhüllen
GMBU	Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e. V.
<i>h</i>	Schichtdicke
IR	Infrarot
JG	Johanngeorgenstadt
K	Kelvin
<i>k</i>	Übergangsrate
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
kDA	KiloDalton
LSM	Laser Scanning Microscope (Laserscanningmikroskop)
MIK	Minimale Inhibierende Konzentration
MOPS	(3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NB-Medium	Nutrient Broth (Nährbouillon)
NCTC	National Collection of Type Cultures, London
OD	Optische Dichte
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
PFA	Paraformaldehyd
PG	Peptidoglycan
rel. LF	relative Luftfeuchte
REM	Rasterelektronenmikroskop
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SASP	Small Acid-Soluble Proteins
S-Layer	Surface-Layer (bakterielles Hüllprotein)
T	Temperatur
t	Zeit
TAMRA-SE	Isomeregemisch aus 5- und 6-Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester
TEOS	Tetraethoxysilan

TO-PRO 3	DNA-Farbstoff
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminosulfonsäure
TRIS-HCL	(Tris-(hydroxymethyl)-aminosulfonsäurehydrochlorid
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
U	elektrische Spannung
UV	Ultraviolett (ultravioletter Spektralbereich)
VIS	Visible (sichtbarer Spektralbereich)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
WHO	World Health Organization
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union
YpeB, GerQ	putative Ankerproteine bakterieller Endosporen
α, β	Proportionalitätskonstanten
ϕ	Quantenausbeute
$e = \frac{E_{\text{Schicht}} (1-\nu_{\text{Si}})}{E_{\text{Si}} (1-\nu_{\text{Schicht}})}$	Verhältnis der elastischen Konstanten
κ	Krümmung
ν	Poissonzahl
$\rho = \frac{h_{\text{Schicht}}}{h_{\text{Si}}}$	Schichtdickenverhältnis
σ	mittlere Schichtspannung
τ	tatsächliche Lebensdauer angeregter Moleküle
τ_{F}	Fluoreszenzlebensdauer

1 Gegenstand der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit strukturellen und funktionellen Untersuchungen an bakteriellen Biokomponenten für schwermetallbindende Sol-Gel-Biokeramiken (Biocere) in Form von eingebetteten vegetativen Zellen und Sporen. Im Einzelnen werden Aussagen zur Vitalität und räumlichen Verteilung der Biokomponente innerhalb der silikatischen Matrix und zur Stabilität sowie Langzeitlagerfähigkeit der Biocere gemacht. Ein Überblick über die Erzeugung biologisierter Sol-Gel-Keramiken und deren vom aktuellen Zeitpunkt aus betrachtetes mögliches Anwendungspotential wird einführend in Kapitel 2 gegeben.

Biologisierte Biokeramiken stellen ein innovatives Hybridmaterial mit neuen Eigenschaften dar, die erheblich von den konkreten Herstellungsbedingungen beeinflusst werden. Im methodischen Teil werden neben notwendigen Angaben zur Kultivierung und Lagerung der Biokomponenten die Herstellung der entsprechenden Biocere, Versuchsabläufe, verwendete Chemikalien und Apparaturen sowie die eingesetzten mikroskopischen und spektroskopischen Verfahren beschrieben.

Im experimentellen Teil der Arbeit (Kapitel 4) wird zunächst die Eignung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur Charakterisierung der erzeugten Biocere hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Biokomponente und deren Vitalität in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen behandelt. Der bisher noch vergleichsweise wenig untersuchte Prozess der Aufnahme von Schwermetallionen in metabolisch aktive Bakterienzellen ist Gegenstand der nächsten zwei Unterpunkte. Unter Verwendung ionensensitiver, membrangängiger Fluoreszenzfarbstoffe wird am Beispiel von Kupfer(II) und Nickel(II) die Entwicklung einer neuen Methode vorgestellt, die auf der fluoreszenzspektroskopischen Messung von Änderungen der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Schwermetallionen besteht. Die ursprünglich für eukaryotische Systeme entwickelte Färbetechnik konnte erfolgreich auf prokaryotische Organismen übertragen werden. Erstmals war es in Kombination von hochaffinen Fluoreszenzfarbstoffen mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden möglich, an Bakterien die Aufnahme von Schwermetallionen und die damit verbundene, für jeden untersuchten Bakterienstamm spezifische Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nachzuweisen. Im Vergleich zwischen Messverfahren mit hohem Probendurchsatz und Einzelzellanalysen werden Vorzüge und Nachteile im Hinblick auf den möglichen Informationsgewinn gegenübergestellt.

Im anschließenden Abschnitt 4.4 wird das Keimungsverhalten von in dünnen Sol-Gel-Schichten immobilisierten bakteriellen Sporen in Anwesenheit von Nährstoffen untersucht. Mit Hilfe einer speziell entwickelten Durchflusskammer kann der Prozess der Sporenkeimung

lichtmikroskopisch erfasst und ausgewertet werden. Es wird der Nachweis erbracht, dass durch einen extern zugesetzten 1:1 Komplex aus Ca^{2+} und 2,6-Pyridindicarboxylsäure (Ca^{2+} -DPA) konzentrationsabhängig eine Modulation der Keimungsrate möglich ist. Ebenfalls untersucht und beschrieben werden mechanische Spannungszustände in der Silikatmatrix während der Keimung. Mit Hilfe einer kapazitiven Messanordnung werden an dünnen Silikatschichten mit immobilisierten Sporen auf goldbeschichteten Siliziumwafern entsprechende Phänomene detektiert und bewertet. Mit Hilfe von Rasterelektronen- (REM) und Atomkraftmikroskopie (AFM) werden Schichtaufbau, -dicke und Rauigkeit charakterisiert.

Die mikroskopische Begutachtung von Biocer-Bulkpartikeln nach Verwendung als Filtermaterial zur Reinigung schwermetallbelasteter Abwässer ist Gegenstand des letzten Unterpunktes von Kapitel 4. Anhand umfangreicher licht- und rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen werden Aussagen zur Partikelbeschaffenheit und –stabilität in Abhängigkeit vom Betriebsregime gemacht und eine Abschätzung möglicher Störfaktoren vorgenommen.

Eine ausführliche Betrachtung und Bewertung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit wird anschließend in Kapitel 5 vorgestellt.

Zuletzt erfolgen in Kapitel 6 eine Zusammenfassung der Ergebnisse und ein Ausblick auf mögliche Anwendungsfelder und weiteres Forschungspotential.

2 Einleitung

2.1 Stand des Wissens

2.1.1 Glas als natürlicher Werkstoff

Im Allgemeinen versteht man unter Glas amorphe, nichtkristalline Festkörper, die durch Unterkühlen von Schmelzen erzeugt werden. Unter den entsprechenden Bedingungen lässt sich praktisch jede geschmolzene Substanz in den Glaszustand überführen. Im landläufigen Sinne bezeichnet man als Glas ein geschmolzenes Produkt aus Quarzsand, das verschiedenste oxidische Beimengungen und Soda oder Pottasche als Fließmittel enthalten kann. Je nach Zusammensetzung können die physikalischen Eigenschaften, wie Schmelzpunkt, Dichte, optische Durchlässigkeit und Zugfestigkeit in einem weiten Bereich variieren, sodass Gläser für die unterschiedlichsten Anwendungen gemäß den Anforderungen hergestellt werden können.

Der klassische Weg der Glaserzeugung ist charakterisiert durch die Aufwendung beträchtlicher Ressourcen im Hinblick auf Material und Energie mit erheblichen Konsequenzen für die Umwelt. Eine völlig andere Strategie verfolgt dagegen die belebte Natur. Kieselsäure als biologisch verfügbare Form von Siliziumdioxid spielt beispielsweise im Pflanzenreich eine bedeutende, wenn auch noch nicht umfassend aufgeklärte Rolle. Einige höhere Pflanzen enthalten Kieselsäuren als Gerüstsubstanz und zum Teil als Phosphorersatz. Ein besonders faszinierendes Beispiel für die Erzeugung von amorphem Glas durch Lebewesen stellen die Kieselalgen (Diatomeen) dar. Diese einzelligen Algen gelten als die häufigsten photoautotrophen Pflanzen der Erde und besiedeln als Phytoplankton die Meere ebenso wie die Süßwasservorkommen und mikroskopisch kleine, feuchte Bereiche im Boden. Wichtigstes Merkmal der etwa 100.000 verschiedenen Arten von Diatomeen ist deren durchsichtige, feste Hülle aus nanostrukturierter, definiert poröser, amorpher Polykieselsäure, die ihnen Stabilität verleiht und Schutz gegen äußere Einflüsse bietet. Die Morphogenese der Diatomeenschale wird dabei kontrolliert durch zelleigene, Silizium-präzipitierende Proteine, wie Silaffine, Frustuline und Pleuraline (Kröger et al. 1994, Kröger et al. 1997, Kröger et al. 1999, Bäuerlein 2003) und speziesspezifische Polyamine (Kröger et al. 2000, Sumper und Kröger 2004).



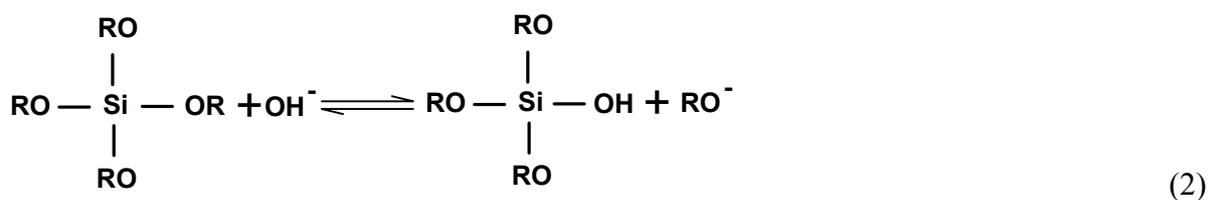
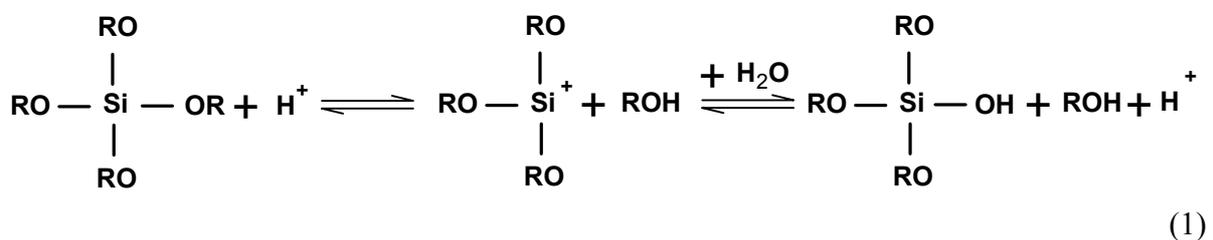
Abb. 2.1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Diatomeen im Sickerwassersediment einer Uranabfallhalde.

Nach dem Absterben der Algen können die Schalen bis zu mehrere hundert Meter dicke Sedimente bilden, wie die fossilen Lager von Kieselgur oder Diatomit beweisen. Obwohl Diatomeen als Gewässergüteindikatoren gelten, trifft man sie nicht selten auch in belasteten Habitaten an (siehe Abb. 2.1.1). Sie sind in der Lage, mit Hilfe von metallbindenden Polypeptiden, den Phytochelatinen, bei Bedarf eine Reihe von toxischen Schwermetallen zu komplexieren und zu binden (Ahner et al. 1994, Morelli und Pratesi 1997, Rijstenbil und Gerringa 2002, Mucha et al. 2003). Mit diesen Eigenschaften und ihrem einzigartigen Aufbau in der Kombination einer fragilen, lebenden Struktur und einer äußerst stabilen, aber porösen gläsernen Hülle liefern Diatomeen ein perfektes Beispiel einer chemischen Fabrik im Mikrometermaßstab. Solcherart natürliche Prozesse, wie sie die Biomineralisation darstellt, im Detail zu verstehen, *in vitro* nachzuvollziehen und zur Erzeugung hochgeordneter, nanoskaliger¹ Strukturen oder innovativer Kompositmaterialien mit einem möglichen Anwendungspotential in Sensorik, Mikroelektronik, Biotechnologie oder medizinischer Diagnostik und Therapie einzusetzen, ist ein Anspruch, der auf dem Gebiet der Nanotechnologie und Mikrofabrikation bereits seit Jahren verfolgt wird (Mann und Ozin 1996, Parkinson und Gordon 1999, Cölfen und Mann 2003, Poulsen et al. 2003, Coffman et al. 2004). Ein besonders breites Anwendungsspektrum wird dabei für biologisierte Sol-Gel-Keramiken erwartet (Böttcher et al. 2004). Mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses als alternative Methode können die harschen Bedingungen der konventionellen Glasherstellung mit Schmelztemperaturen oberhalb 1000 °C umgangen werden, die lange Zeit die Immobilisierung biologischer Spezies von vornherein ausgeschlossen.

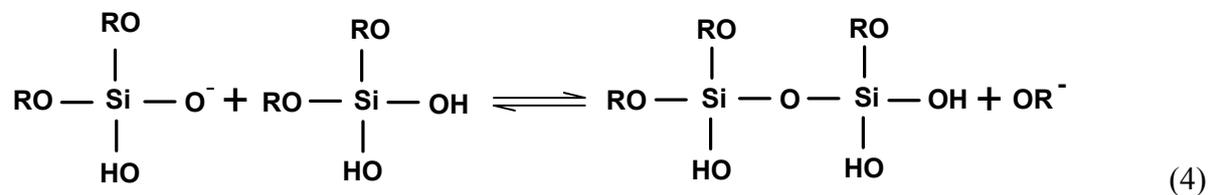
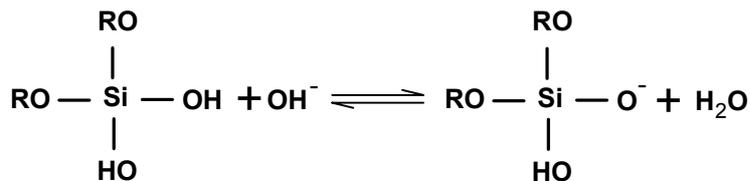
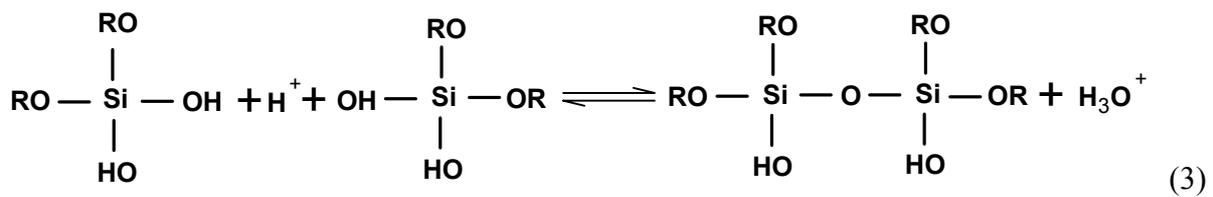
¹ Einer einfachen Definition zufolge werden strukturelle Dimensionen < 1,5 nm als nanoskopisch, zwischen 1,5 und 100 nm als mesoskopisch, zwischen 0,1 und 100 µm als mikroskopisch und > 100 µm als makroskopisch betrachtet (Mann und Ozin 1996).

2.1.2 Silikatische Sol-Gel-Keramiken

Die Erzeugung von silikatischen Gläsern auf chemischem Wege wurde erst in den letzten 20 Jahren unter dem Begriff der „sanften Chemie“ vorangetrieben. Das Prinzip des sogenannten Sol-Gel-Prozesses liegt in der säure- oder basenkatalysierten Hydrolyse von Silizium enthaltenden Alkoxyprecursoren und anschließender Kondensation bei moderaten Temperaturen. Dabei geht die ursprünglich flüssige Vorläufersubstanz über eine stabile flüssige Dispersion nanokristalliner Oxidpartikel in einen gelartigen und nach Trocknung schließlich in den festen Zustand über. Das Endprodukt ist ein Glas, dessen Porosität durch Zugabe verschiedener wasserlöslicher Additive oder über das Trocknungsregime gesteuert werden kann und dessen Morphologie beliebig wählbar ist. Dem jeweiligen Anwendungsprofil entsprechend lassen sich sowohl reine SiO₂-Bulkpartikel in unterschiedlichen Größen (Granulat, Pulver) als auch dünne Schichten auf verschiedenen Trägermaterialien, sowie Aerogele, Sphäroide und Fasern erzeugen (Mehrotra 1992). Der erste Schritt der Umsetzung von Alkoxysilanen ist die Abspaltung einer Alkoxygruppe unter Freisetzung von Alkohol, wie in den Gleichungen (1) und (2) vereinfacht dargestellt.



Hydrolytisch aus Siliziumalkoxiden gebildete Silanole sind wie reine Orthokieselsäure (außer in sehr geringen Konzentrationen und bei neutralem bis schwach basischem pH-Wert) unbeständig und neigen zur Kondensation unter Abspaltung von Alkohol oder Wasser (Gleichungen (3) und (4)). Verlauf und Dynamik des Polymerisationsvorganges sind dabei unter anderem von Art und Konzentration des eingesetzten Precursors, dem molaren Verhältnis von SiO₂, H₂O und Lösungsmittel, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig (Georgi 1998, Coradin und Lopez 2003).



Die gebildeten Siloxane vernetzen je nach Versuchsbedingungen entweder als ausgedehnte, lineare Polymere bei säurekatalysierten Systemen oder als stark verzweigte, dreidimensionale Netzwerke mit größeren Silikatclustern und Poren bei basenkatalysierter Kondensation (Georgi 1998). Die Beschaffenheit der entstehenden Gele wird darüber hinaus durch die Trocknungsgeschwindigkeit moduliert. So unterscheiden sich dünne, schnell trocknende Schichten hinsichtlich Porengröße und -dichte, sowie ihrem Gehalt an Wasser und Lösungsmittel deutlich von langsam gelierenden Bulkpartikeln. Diese Unterschiede in der Mikroumgebung der Poren bedingen wiederum unterschiedliche Wechselwirkungen mit immobilisierten Molekülen (Dunn und Zink 1997). Über die Modifizierung der organischen Restgruppen, die Co-Kondensation mit organisch substituierten Trialkoxysilanen (**organically modified silica** = Ormosile²) und den Einsatz von Hybridmaterial aus silikatischen und nichtsilikatischen Precursoren lassen sich physikalische, chemische und mechanische Eigenschaften zusätzlich beeinflussen (Boilot et al. 1996, Coradin und Lopez 2003). Besondere Relevanz erlangen diese Aspekte bei der Erzeugung dünner, stabiler Schichten (Sakka und Yoko 1992, Schmidt 1992, Georgi 1998, Böttcher 2001). Die Vorteile silikatischer Sol-Gel-Keramiken liegen in ihrer toxikologischen, chemischen und biologischen Inertheit, ihrer optischen Transparenz, ihrer guten mechanischen, thermischen und photochemischen Stabilität sowie der Möglichkeit, Additive, wie zum Beispiel feuchtigkeitsspeichernde oder porenbildende Sub-

² Die Co-Kondensation von Trialkoxysilanen mit nichtsilikatischen Precursoren (bspw. auf der Basis von Al, Ti oder Zn) führt zu sogenannten Ormoceren[®] (**organically modified ceramics**).

stanzen und Nährstoffe zuzumischen und in einem biologisch verträglichen Temperaturbereich zu arbeiten (Böttcher 2001, Livage et al. 2001).

Bedingt durch die zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten bei der Herstellung silikatischer Sol-Gel-Keramiken sind die Anwendungsfelder entsprechend breit. Die Spanne reicht dabei von funktionellen Beschichtungen mit wasser- und schmutzabweisender sowie versiegelnder Funktion (Böttcher 2001) über den Einsatz als Molekularsiebe, Ionenaustauscher und Separatoren bis hin zur Nutzung als Templat zur Adsorption von Molekülen oder Biokomponenten. Sie eignen sich ebenso als Substrat zur Immobilisierung von Farbstoffen, Chemikalien, Antikörpern, Sensormolekülen oder Biokomponenten, darunter Proteine, Zellbestandteile oder sogar ganze Zellen (Tess und Cox 1999, Böttcher 2000).

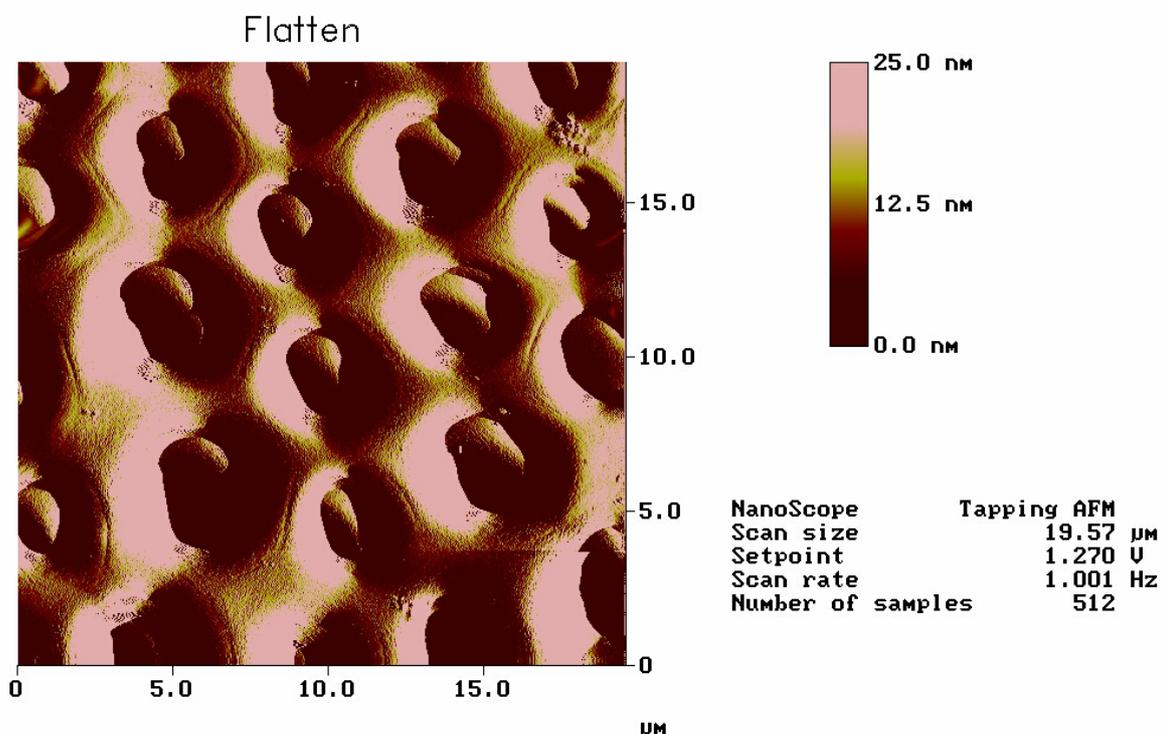


Abb. 2.1.2: Amplitudenbild einer atomkraftmikroskopischen Aufnahme von regulär angeordneten Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, eingebettet in eine dünne Silikatschicht. Die Aufnahme erfolgte im Tapping-Mode an der Luft.

Ein relativ neuer Ansatz ist die Erzeugung hochgeordneter, definierter Strukturen aus SiO_2 . Durch Zugabe von Polymeren, oberflächenaktiven Substanzen, Lipiden/Liposomen (Bégu et al. 2003) oder Proteinen/Polypeptiden (Cha et al. 2000) können so aus der Flüssig- oder Gasphase reguläre Gebilde (Sphäroide mit definiertem Durchmesser, Röhren, Helices, Fasern) abgeschieden werden, die auf keinem anderen Weg zugänglich sind (Soler-Illia et al. 2002, van Bommel et al. 2003). In Abb. 2.1.2 ist ein anschauliches Beispiel einer regulären silikatischen Struktur dargestellt, die durch das Einbetten von Hefezellen in einem wässrig-

sauren Tetraethoxysilan (TEOS)-Sol und anschließender Beschichtung eines Glaträgers mit diesem Gemisch erhalten wurde. Diese Art der Schichtstrukturierung wurde erstmals von Chia et al. (2000) beschrieben. Dort, wo die biologische Komponente lediglich ein strukturbildendes Element darstellt, kann sie durch thermische oder enzymatische Nachbehandlung aus der Matrix entfernt werden. Eine weitere interessante Strategie zur Bildung regulärer Anordnungen ist die Funktionalisierung von SiO₂-Partikeln mit reaktiven Gruppen und deren geordnete Ablage auf den entsprechenden affinen, vorstrukturierten Substraten (Masuda et al. 2002).

2.1.3 Biologisierte silikatische Sol-Gel-Keramiken (Biocere)

Die erste erfolgreiche Einbettung ganzer Zellen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* in mittels Sol-Gel-Prozess erzeugtem Glas gelang G. Carturan und Mitarbeitern im Jahr 1989 (Carturan et al. 1989). Nur ein Jahr später wurde von einer Arbeitsgruppe aus Jerusalem (Braun et al. 1990) ein isoliertes Enzym (Alkalische Phosphatase) unter Beibehaltung seiner katalytischen Aktivität in Silica-Gel immobilisiert. Mit diesen Arbeiten war der Grundstein für die Entwicklung einer neuen Klasse von Funktionswerkstoffen gelegt. Bisher konnten sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen (Bakterien, Pilze, Hefen, Pflanzen- und Säugerzellen), Antikörper sowie Proteine (Metalloproteine, Enzyme, Gerüstproteine) erfolgreich immobilisiert werden (Inama et al. 1993, Avnir et al. 1992, Livage 1996, Livage et al. 2001, Böttcher et al. 2004, Carturan et al. 2004). Durch die Kombination von anorganischem Trägermaterial mit einer organischen Komponente werden mitunter völlig neue Materialeigenschaften erhalten, die teilweise auf synergistische Effekte zwischen Matrix und Immobilisat zurückzuführen sind. Beispielsweise können Proteinstrukturen durch die Immobilisierung stabilisiert und bei Enzymen die Aktivität teilweise gegenüber der in Lösung deutlich länger erhalten werden (Shtelzer et al. 1992). Gleichzeitig wird durch die Variabilität der Biokomponente das Anwendungsspektrum für Sol-Gel-Keramiken potenziert. Einer der Vorzüge der Sol-Gel-Immobilisierung liegt in der Möglichkeit, die Biokomponente unter Beibehaltung ihrer Funktionalität zu immobilisieren. Realisiert wird dies entweder durch die Wahl geeigneter Prozessbedingungen, die eine Denaturierung der Biokomponente verhindern, oder durch speziell adaptierte Methoden. Besonders zur Einbettung ganzer Zellen hat sich das „Biosil“-Verfahren bewährt, wobei die Biokomponente zuerst auf einem Träger fixiert und anschließend mit dem im erhitzten Gasstrom verflüchtigten Alkoxysilan bedampft wird (Carturan et al. 2004). Durch die Kontrolle der Schichtdicke über die Bedampfungszeit und den Alkoxidpartialdruck, die sofortige Entfernung toxischer Beiprodukte und die Gewährleistung einer homogenen Schichtdicke können schädigende Einflüsse auf die Biokomponente auf ein Minimum reduziert werden. Mechanisch besonders stabile Biocere lassen sich durch Beimischen

von Al₂O₃-Fasern (Fiedler et al. 2004) oder den sogenannten „Freeze-Cast“-Prozess erzeugen. Dabei wird ein wässriges Gemisch aus keramischem Pulver (meist Aluminiumoxid), Siliziumdioxid und der Biokomponente erzeugt, durch Schockfrosten verfestigt und einer Gefriertrocknung unterworfen (Soltmann et al. 2003a). Strukturmodifizierende Additive (Glycerol, Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol) oder die Modifizierung der Alkoxyprecursoren mit Polyolen (Gill und Ballesteros 1998) haben Einfluss auf den Kondensationsverlauf und das Schrumpfungsverhalten der Matrix und begünstigen oftmals die biologische Aktivität und die Überlebensfähigkeit der eingebetteten Biokomponente.

2.1.4 Anwendungsbeispiele für Biocere

Obwohl die Entwicklung biologisierter Sol-Gel-Keramiken noch am Anfang steht, sind mögliche Anwendungsfelder in unterschiedlichen technischen, umwelt- und biotechnologischen sowie medizinischen Bereichen bereits erkennbar. Immobilisierte Zellen fungieren beispielsweise in Bioreaktoren als Produktbildner für eine Vielzahl verschiedener Substanzen, wie Enzyme, Antibiotika, organische Säuren, Aminosäuren, Alkohole oder andere Metabolite (Willaert et al. 1996). Die Effizienz der Produktbildung ist dabei oftmals größer als in freien Zellsuspensionen, wie bereits mehrfach bei Pflanzenzellen gezeigt werden konnte (Campostrini et al. 1996, Carturan et al. 1998, Pressi et al. 2003).

Unter dem Begriff „bioaktive Gläser“ sind modifizierte silikatische Sol-Gel-Keramiken zur Anregung des Wachstums von Knochen- und Bindegewebe oder zur kontrollierten Freisetzung pharmazeutisch wirksamer Substanzen seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen (Böttcher et al. 1998, Hench 1998, Hench und Polak 2002, Hench et al. 2004, Saravanapavan et al. 2004). Bereits in naher Zukunft werden Systeme mit immobilisierten funktionellen Säugerzellen zur Therapie von Organdefekten erwartet (Pope et al. 1997, Dal Monte 2000, Carturan et al. 2004).

Im Hinblick auf eine technische Nutzung biologisierter Sol-Gel-Keramiken kommt der Einbettung von Enzymen unter Beibehaltung ihrer Aktivität besondere Bedeutung zu. Während der letzten zehn Jahre wurden dazu umfangreiche Untersuchungen vorgenommen. Durch die Fixierung in der Matrix werden nicht selten Aktivität, Reaktionskinetik und Lebensdauer der immobilisierten Enzyme günstig beeinflusst, was derartiges Kompositmaterial besonders attraktiv für den Einsatz als Katalysator oder Sensor macht (Avnir et al. 1994).

Tab. 2.1.4: Ausgewählte Beispiele Sol-Gel immobilisierter Biokomponenten mit Anwendungspotential in Sensorik und Katalyse.

Biokomponente	Anwendung	Referenz
<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i>	Biosensor	Armon et al. 200
Glucose-Oxidase	Biosensor	Künzelmann und Böttcher 1998
Alkohol-Dehydrogenase	Biosensor	Wolfbeis et al. 2000
Organophosphat-Hydrolase	Biosensor	Pandey et al. 2001
Acetylcholin-Esterase	Biosensor	Flounders et al. 1999
biolumineszente <i>E. coli</i>	Biosensor	Singh et al. 1999
Trypsin, saure Phosphatase	Biosensor, Biokatalyse	Premkumar et al. 2002a
Butyrylcholinesterase	Biokatalyse	Shtelzer et al. 1992
		Luckarift et al. 2004

Jüngste Arbeiten (siehe Luckarift et al. 2004) zeigen beispielsweise eindrucksvoll, dass die biomimetische Prozessführung der Sol-Gel-Transformation mit einem silaffinähnlichen synthetischen Peptid zu einem Material führt, in welchem immobilisierte Butyrylcholinesterase ihre volle Aktivität im Vergleich zum freien Enzym über einen wesentlich längeren Zeitraum beibehält. In Tabelle 2.1.4 sind exemplarisch einige Beispiele für die Fülle an bereits untersuchten Materialien aufgelistet.

Weitere interessante Einsatzgebiete für biologisierte Sol-Gel-Keramiken sind die Reinigung industrieller Abwässer und die Wiedergewinnung von Metallen. Zunehmende gesellschaftliche Restriktionen im Zusammenhang mit umweltrelevanten Fertigungsprozessen und ein gestiegenes Interesse an Wiedergewinnungsverfahren für wertvolle Rohstoffe, bedingt durch die weltweite Verknappung von Ressourcen, erfordern neue technische Lösungsansätze. Durch die immer komplexer gewordene Belastung von Abwässern mit organischen und anorganischen Substanzen, Pharmaka-, Pflanzenschutz- und Düngemittelrückständen, Chemikalien und Schwermetallen einerseits und Neubewertungen von Gefährdungsrisiken bestimmter Wasserinhaltsstoffe aufgrund aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse andererseits steigen die Anforderungen an die zum Einsatz kommenden Reinigungsverfahren. Mit ihrer 2000 erlassenen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL 2000/60/EG) und der Veröffentlichung der Liste prioritärer Stoffe 2001 hat die Europäische Union Standards zur Qualitätssicherung von Oberflächen- und Küstengewässern sowie Grundwasser fixiert, welche die Mitgliedstaaten verpflichten, mit geeigneten Maßnahmen eine Reduktion der Wasserbelastung mit diesen benannten Stoffen bis hin zur vollständigen Vermeidung anzustreben. Auf nationaler Ebene werden die Anforderungen an die Wassergüte unter anderem durch Wasserhaushaltsgesetz (WHG) und Abwasserabgabengesetz (AbwAG) vorgeschrieben. Zu den wassergefährdenden Stoffen zählen neben oxidierbaren Stoffen, Phosphor und Stickstoff auch organische Halogenverbindungen und eine Reihe von Metallen und ihre Verbindungen, darunter Quecksilber, Cadmium, Chrom, Nickel, Blei und Kupfer.

Konventionelle Technologien auf mechanischer, physiko-chemischer und biologischer Basis arbeiten nach dem Prinzip der Aufkonzentrierung, dem Ausbilden von festen oder gas-

förmigen Phasen und deren Abtrennung (Kunz 1995). Anhand der in Abb. 2.1.4 angeführten Zusammenstellung etablierter Verfahren zur Reinigung von Abwässern je nach Art der Wasserinhaltsstoffe wird bereits deutlich, dass ein komplex belastetes Abwasser eine ebenso komplexe Behandlung erfahren muss. Moderne Verfahren zielen deshalb auf die Kombination von physikalisch-chemischen und biologischen Methoden (Hybridverfahren). Erstgenannte entfalten ihre Vorteile bei der Entfernung hoher Schadstoffkonzentrationen in stark belasteten Wässern, die oftmals toxisch auf biologische Systeme wirken. Nachteilig hingegen sind die teilweise hohen Kosten, die Verwendung umweltrelevanter Chemikalien und eine nicht immer ausreichende Abtrennleistung. Dort setzen biologische Reinigungsverfahren an.



Abb. 2.1.4: Übersicht gängiger Abwasserreinigungsverfahren nach Art der jeweiligen Abwasserinhaltsstoffe.

Die Vorteile biologisch arbeitender Verfahren liegen in der leichteren Verfügbarkeit großer Mengen an Biomasse, dem umweltfreundlichen Herstellungsverfahren und der Effizienz (Madrid und Cámara 1997). Mikroorganismen sind in der Lage, mit zellspezifischen „Entgiftungsstrategien“ toxische Elemente, wie zum Beispiel Schwermetalle oder Radionuklide, an der Zelloberfläche zu binden oder zu präzipitieren, in die Zellen aufzunehmen, deren Oxidationsstufe zu ändern und sie wieder auszuschleusen (Gadd 1996, Lovley und Coates 1997, Gadd 2000, Lloyd und Lovley 2001). Speziell Isolate aus kontaminierten Habitaten sind in besonderer Weise an diese Belastungen adaptiert, was sich oftmals in einer erhöhten Metalltoleranz oder Bindungskapazität äußert. Auf diese Weise können bei der Wahl der geeigneten Mikroorganismen sogar aus komplexen Abwässern oder Metallgemischen einzelne Elemente selektiv und vor allem quantitativ entfernt werden. Andere wiederum sind in der Lage, toxische organische Substanzen abzubauen. Werden diese Mikroorganismen zusätzlich immobilisiert, ergeben sich neue Möglichkeiten für die Prozessführung. So können

beispielsweise die Verweilzeiten deutlich erhöht und damit die Abtrennleistung optimiert werden. Alternativ dazu lassen sich auf der Basis poröser, gut diffusibler Trägersubstanzen durchströmbare Filtermaterialien für hohe Mengendurchsätze herstellen. Sol-Gel-immobilisierte Mikroorganismen wurden bereits erfolgreich zur Reinigung phenolbelasteter Wässer (Brányik et al. 1998, Brányik et al. 2000, Fiedler et al. 2004) oder zum Abbau von Herbiziden (Rietti-Shati et al. 1996) eingesetzt. Die Entfernung verschiedener Schwermetalle aus wässrigen Lösungen konnte mit eingebetteten Zellen von *S. cerevisiae* (Al-Saraj et al. 1999, Marseaut et al. 2004) oder deren Zellwänden erreicht werden. Metallbindende Eigenschaften wurden darüber hinaus an Bioceren mit eingebetteten Zellen, Sporen und Zellhüllproteinen von *B. sphaericus* speziell für Uran und Kupfer (Raff et al. 2003, Soltmann et al. 2003b) und *Pseudomonas stutzeri* (Brottka 2003) nachgewiesen. Nach erfolgter Adsorption ließ sich das Material auf einfache Weise durch Spülen mit komplexbildenden Agenzien mehrfach regenerieren. Diese Option der Regenerierbarkeit der Filtermaterialien stellt unter anderem ein wichtiges ökonomisches Kriterium für eine zukünftige kommerzielle Nutzung von Bioceren dar.

Die hier aufgeführten Beispiele können nur andeutungsweise einen Eindruck über das mögliche Anwendungspotential von Bioceren zur Bioremediation oder Dekontamination vermitteln. Das Ziel ist die Entwicklung eines variablen Kompositmaterials, das den jeweiligen konkreten Anforderungen entsprechend aus den dazu passenden Komponenten, die dann nach dem Baukastenprinzip beliebig miteinander kombiniert werden können, zusammengesetzt wird. Als Biokomponente eignen sich verschiedene Arten von Mikroorganismen mit metallbindender Kapazität wie Bakterien, Pilze oder Algen (Volesky und Holan 1995, Malik 2004). Je nach Bedarf sind sie sowohl als Monokulturen als auch gemischt in Mehrkomponentensystemen, aktiv stoffwechselnd oder metabolisch inaktiv, einsetzbar. Eine Materialoptimierung zur Steigerung der Metallbindungskapazität oder -selektivität der Biocere ist auf verschiedenen Wegen denkbar. Aus biologischer Sicht können vor allem bei der Verwendung von Bakterien genetisch modifizierte oder durch Zugabe von subletalen Konzentrationen an Schwermetallen in der Nährlösung stressadaptierte Populationen herangezüchtet werden, die zusätzliche metallbindende Proteine oder Peptide exprimieren. Weiterhin kann die silikatische Matrix durch die Einführung reaktiver, metallbindender Gruppen und Moleküle modifiziert oder imprägniert werden. Die Modifizierung der Gele mit Polyethylenimin (Ghoul et al. 2003) oder Thiolen (Arakaki et al. 2003) führt beispielsweise zur Erhöhung der Bindungskapazität für verschiedene Metalle. Phosphatmodifizierte Gelschichten besitzen wiederum Potential zur gezielten Entfernung von Uran aus wässrigen Lösungen (Coleman et al. 2003). Eine alternative Strategie wurde von Bender und Mitarbeitern verfolgt, welche Silica-Gel-Partikel als Substrat für die Anheftung eines Bakterienrasens verwendeten. Die Entfernung des gelösten Urans erfolgte in diesem System durch Reduktion und anschließende Präzipitierung als mineralische Partikel (Bender et al. 2000). Verfahren zur quantitativen Ent-

fernung von Uran aus Wasser stehen derzeit besonders im Mittelpunkt des gesellschaftlichen Interesses. Vor dem Hintergrund der nierentoxischen Wirkung von Uran empfiehlt die Weltgesundheitsbehörde (WHO) seit Jahren einen Grenzwert von 15 µg/l im Trinkwasser. In Deutschland ist in nächster Zeit ebenfalls mit der Festlegung eines solchen Grenzwertes zu rechnen, der wahrscheinlich im Bereich < 10 µg/l liegen wird.

Aufgrund der noch am Anfang stehenden Entwicklung und der Komplexität der Thematik sind zum jetzigen Zeitpunkt noch keine sicheren Prognosen über tatsächliches Leistungsvermögen und Wirtschaftlichkeit sowie mögliche Nachteile und Anwendungsgrenzen von Bioceren als Filtermaterial im Bereich der Reinigung und Aufbereitung von Wasser ableitbar. Jedoch verdeutlicht das Beispiel Uran im Trinkwasser den Bedarf an Reinigungsverfahren, die besonders in geringen Konzentrationsbereichen effektiv, selektiv und möglichst quantitativ arbeiten. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Aufklärung auftretender Wechselwirkungen zwischen Metallion, Matrix und Biokomponente und die Ermittlung von Zusammenhängen zwischen Struktur und Funktionalität des Materials. Dazu soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

2.2 Problemstellung und Zielsetzung

Im Hinblick auf die strukturelle und funktionelle Charakterisierung dieser neuartigen Kompositmaterialien stehen noch eine Reihe fundamentaler Fragen und ungelöster Probleme im Raum, die sowohl aus materialwissenschaftlicher, biologischer, biotechnologischer als auch chemischer Sicht betrachtet werden können. So können sich charakteristische Materialeigenschaften der Einzelkomponenten erheblich von denen des Kompositmaterials unterscheiden. Außerdem hängt die Funktionalität der immobilisierten Biokomponente entscheidend von den konkreten Bedingungen während der Einbettung ab. Unter Umständen werden durch Wechselwirkungen mit dem Matrixmaterial Zelloberflächeneigenschaften oder strukturelle Konformationen verändert, die zu Vitalitäts- oder Aktivitätsverlust führen. Eine genaue Kenntnis möglicher Einflussfaktoren und deren Auswirkungen sind für Materialoptimierungen unerlässliche Voraussetzung. Bedingt durch die besonderen Materialeigenschaften, die sich aus der Kombination biologischer Objekte mit dem anorganischen Werkstoff Glas ergeben, werden notwendigerweise neue Anforderungen an die Charakterisierungsmethodik gestellt. Etablierte Verfahren müssen teilweise modifiziert oder alternativ neue, geeignetere erschlossen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an verschiedenen Biocerpräparationen mit immobilisierten Bakterien oder deren Endosporen, die für den Einsatz als Filtermaterial zur Reinigung schwermetallbelasteter Abwässer vorgesehen waren, als erstes strukturelle Untersuchungen vorgenommen. Erwartet wurden Aussagen über Verteilung und

Vitalität der Biokomponente innerhalb der Matrix sowie mechanische Stabilität und Lagerfähigkeit dieser Materialien. Aufgrund der Transparenz der Biocere kamen bevorzugt verschiedene lichtmikroskopische Methoden zum Einsatz. In diesem Zusammenhang wurde geprüft, in welchem Umfang geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zur Kontrastierung der Biokomponente genutzt werden können. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen wurden Rückschlüsse auf die Eignung dieser Materialien für den vorgesehenen Verwendungszweck erwartet.

Der Einsatz biologischer Verfahren zur Reinigung mit Schwermetallen und Radionukliden kontaminierter Böden und Wässer als Ergänzung oder Ersatz für konventionelle physiko-chemische Behandlungsmethoden bietet der Umwelttechnologie einen breiten Spielraum durch die unterschiedlichen biologischen Bindungsstrategien mit zum Teil hohen Kapazitäten und einzigartiger Selektivität. Besonderes Interesse kommt dabei bakteriellen Biokomponenten zu, vor allem solchen, die bereits an belastete Umgebungen adaptiert sind. Ein großer Teil des Metallbindungsvermögens von Bakterien wird in der Regel über Adsorptionsvorgänge an der Zellwand realisiert. Diese Mechanismen sind bereits Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. Relativ wenig ist im Verhältnis dazu über aktive Aufnahmeprozesse der Metalle in die Zelle bekannt. Der direkte Nachweis intrazellulär akkumulierter Ionen gelingt bislang nur über aufwendige elektronenmikroskopische Techniken. Deshalb sind im zweiten Teil der Arbeit verschiedene ionensensitive Fluoreszenzfarbstoffe auf ihre Eignung als Detektoren für verschiedene Schwermetallionen in bakteriellen Zellen getestet worden. Neben gängigen Ca^{2+} -Farbstoffen wurde außerdem ein für Ni^{2+} spezifisches Fluorophor ausgewählt. Nach Messungen in zellfreien Systemen zur Ermittlung der effizientesten Farbstoffe kamen deren membrangängige Derivate zur Färbung von Bakteriensuspensionen zum Einsatz. Im Erfolgsfall wurde mittels zweier verschiedener fluoreszenzspektroskopischer Verfahren die Entwicklung einer schnellen und unkomplizierten Methode zum Nachweis intrazellulärer Metallionen angestrebt. Im Zuge dessen galt es, Vorzüge und Grenzen von Messverfahren mit hohem Probendurchsatz (Fluoreszenzplattenreader) und solchen mit Einzelzellatenerfassung (Durchflusszytometrie) zu ermitteln.

Einen weiteren wichtigen Punkt im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nahmen dünne Biocerschichten mit immobilisierten bakteriellen Sporen ein. Durch die Verwendung metabolisch inaktiver bakterieller Dauerformen wurden langzeitlagerfähige, kostengünstige Materialien hergestellt, die ein Überleben der Biokomponente ohne Berücksichtigung spezieller Lagerbedingungen oder Zufuhr von Nährstoffen garantieren. Vor diesem Hintergrund wurde unter besonderer Berücksichtigung der Schichtstabilität geprüft, ob und unter welchen Bedingungen eine Reaktivierung der Sporen erreicht werden kann. Neben dem

lichtmikroskopischen Monitoring waren für Feinstrukturuntersuchungen zusätzlich der Einsatz von Niederspannungs-Rasterelektronenmikroskopie und Atomkraftmikroskopie vorgesehen. Darüber hinaus wurde an einer im Institut für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden entwickelten Apparatur zur Messung von Schichtspannungen abgeklärt, ob eine Quantifizierung von mechanischen Spannungszuständen innerhalb der Silikatschicht während der Sporenkeimung vorgenommen werden kann.

Die Frage der Stabilität der Biocermaterialien erhält besondere Relevanz bei der Prüfung unter realen Bedingungen. Dazu wurden verschiedene Biocere, die unter Feldbedingungen mehrere Tage bis Wochen als Filtermaterial zur Reinigung von Haldensickerwässern eingesetzt waren, mit geeigneten mikroskopischen Methoden charakterisiert und bewertet. Die Resultate dieser Untersuchungen stellen einen Beitrag zur Optimierung der Prozessführung dar.

Zusammengefasst lassen sich die Fragestellungen folgendermaßen formulieren:

- A) Welche Gefügeausbildung wird unter den konkreten Herstellungsbedingungen erreicht (Verteilung der Biokomponente innerhalb der Matrix)?
- B) Welche Aussagen können zur Vitalität der immobilisierten Biokomponente getroffen werden?
- C) Lassen sich die zu untersuchenden Bakterien mit ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen markieren? Sollte dies der Fall sein, kann die Aufnahme von Schwermetallen (am Beispiel von Kupfer(II) und Nickel(II)) nachgewiesen werden?
- D) Können bakterielle Endosporen eine Alternative zu vegetativen Zellen sein, um die Lagerfähigkeit der Biocere zu erhöhen?
- E) Sind in dünnen Biocerschichten auftretende mechanische Spannungszustände quantifizierbar?
- F) Wie stabil sind Biocere mit immobilisierten Bakterien als Filtermaterial unter realen Bedingungen?

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Biokomponenten

Bei der Auswahl der geeigneten Biokomponenten für die hier vorgestellten Untersuchungen konnte bereits auf eine Reihe erfolgreicher Arbeiten zurückgegriffen werden. In der Dissertation von J. Raff 2002 wurden unter anderem verschiedene Gram-positive Bodenbakterien der Gattung *Bacillus*, deren isolierte Hüllproteinschichten (S-Layer = surface layer) und Sporen in Anwesenheit diverser Schwermetalle und Radionuklide getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit diesen Biokomponenten erzeugte Biokeramiken in der Lage sind, selektiv und reversibel Uran und Kupfer aus belasteten Abwässern zu entfernen (Raff et al. 2003, Soltmann et al. 2003b). Als besonders aussichtsreich wurden dabei Bodenisolat aus belasteten Habitaten angesehen, da diese Stämme an hohe Konzentrationen toxischer Substanzen, Schwermetalle und Radionuklide angepasst sind. Unter dem Aspekt der Langzeitlagerfähigkeit von Bioceren war weiterhin die Fähigkeit, unter Laborbedingungen Sporen zu bilden, ein Auswahlkriterium.

3.1.1 Bakterienkulturen

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden nachfolgend aufgelistete Bakterienstämme ausgewählt:

Tab. 3.1.1: Verwendete Bakterienstämme. ¹⁾ National Collection of Type Cultures, Colindale, UK, ²⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Stamm	Bemerkung	Verwendung
<i>Bacillus sphaericus</i> JG-A12	Haldenisolat	Fluoreszenzmessungen Sporengewinnung Erzeugung dünner Biocerschichten Kupferadaptation
<i>Bacillus sphaericus</i> NCTC 9602 ¹⁾	Typusstamm	Fluoreszenzmessungen Kupferadaptation
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSMZ 5190 ²⁾	Typusstamm	Fluoreszenzmessungen

Das Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 wie auch die Typusstämme wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie des Instituts für Radiochemie im Forschungszentrum Rossendorf zur Verfügung gestellt. Das Isolat wurde aus einer Bodenprobe der Uranabfallhalde „Haberland“ in der Nähe von Johanngeorgenstadt (Sachsen) gewonnen. Seine Existenz in einem stark mit Radionukliden und Schwermetallen belasteten Milieu lässt besondere Anpassungsstrategien erwarten. Die Fähigkeit, beträchtliche Mengen Radionuklide und Schwermetalle zu binden, wurde in vergleichenden Untersuchungen mit dem genetisch eng verwandten Typusstamm *B. sphaericus* NCTC 9602 nachgewiesen (Selenska-Pobell et al. 1999).

3.1.2 Anzucht und Lagerung vegetativer Zellen

3.1.2.1 Gewinnung von Zellen für Fluoreszenzmessungen und Einbettung in dünne Sol-Gel-Schichten

Für die Anzucht der Bazillen und Pseudomonaden wurde NB-Medium (Nutrient broth) verwendet, bestehend aus 3 g/l Fleischextrakt (Merck KGaA, Darmstadt) und 5 g/l enzymatisch verdautes Pepton (Bacto™ Peptone, Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.). Bei sporenbildenden Stämmen wurde zusätzlich 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt) zugesetzt.

Für die Herstellung der Medien wurde vollentsalztes Wasser (Seraldest SD, Seral, Ransbach-Baumbach) verwendet. Die Sterilisierung der Medien und Gefäße erfolgte bei 121 °C für mindestens 30 bis 90 Minuten im Autoklaven (HV 25, HV 110, Wolf, Bad Überkingen-Hausen). Kultiviert wurden die Bakterien bei 30 °C unter aeroben Bedingungen. Vorkulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen verschlossen über Nacht unter Schütteln (GFL 3005, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) angezogen. Zur Gewinnung größerer Mengen Biomasse kamen Bioreaktoren mit 6 l Fassungsvermögen (Ochs Glasgeräte, Bovenden) oder Schott-Glasflaschen mit 5 l Volumen zum Einsatz. Nach dem Animpfen mit 10 ml Vorkultur wurden die Bioreaktoren unter Begasung mit Luft bei einer Durchflussrate von 3 l/min und ständigem Rühren bei Raumtemperatur bzw. 30 °C bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase der Organismen inkubiert. Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde über die Zunahme der optischen Dichte kontrolliert. Üblicherweise erfolgte die Messung photometrisch in einem UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 1000

(Pharmacia Biotech, Cambridge) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Geerntet wurden die Bakterien je nach anfallendem Volumen diskontinuierlich in 500 ml Zentrifugenbechern bei 9 000 x g in einer Superspeed-Zentrifuge (Sorvall Evolution RC, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) oder kontinuierlich in einer Tischzentrifuge mit Durchflussrotor (Heraeus Contifuge Stratos, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold.) bei 9699 x g. Nach zweimaligem Waschen mit einer Lösung bestehend aus 50 mMol/l Tris-Puffer (pH 7,4), 1 mMol/l MgCl₂ und 3 mMol/l NaN₃ und anschließendem Zentrifugieren wurden die Bakterienpellets bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.2.2 Gewinnung von Zellen für Schwermetalladaptation

Um zu klären, ob Metallionen als Stressfaktor während des Wachstums ein verändertes Aufnahmeverhalten der Zellen für Schwermetalle induzieren, wurden *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 gemäss oben beschriebener Vorschrift mit jeweils 10 µMol/l CuCl₂ im Medium angezogen und aufgearbeitet. Die Bakterienpellets wurden zwei Mal mit einer Lösung aus 50 mMol/l Tris-Puffer (pH 7,4), 1 mMol/l MgCl₂ und 3 mMol/l NaN₃ gewaschen, fünf Minuten mit einem Ultra-Turrax (IKA T8, IKA Labortechnik, Stauffen) unter Eiskühlung homogenisiert und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden im gleichen Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.1.3 Isolierung und Lagerung von Sporen

Zur Erzeugung dünner Biocerschichten wurden neben vegetativen Bakterienzellen auch Sporenkulturen von *B. sphaericus* JG-A12 verwendet. Die Sporenkultur wurde nach einer von Murrell (Murrell 1969) entwickelten und von Raff (Raff 2002) modifizierten Methode gewonnen. Die Anzucht der Bakterien wurde wie oben beschrieben in einem 6 l Bioreaktor in NB-Medium unter Zugabe von Mangansulfat vorgenommen. Die Sporulation der Bakterienkultur setzt nach etwa 24 h ein. In regelmäßigen Abständen wurde der Sporulationsgrad mikroskopisch kontrolliert. Betrug der Sporenteil in der Suspension 70 – 80 %, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10000 x g für 20 Minuten geerntet und zweimal mit sterilem vollentsalztem Wasser gewaschen. Die restlichen im Pellet enthaltenen vegetativen Zellen wurden durch eine alternierende 24-stündige Behandlung mit dem jeweils 10-fachen Volumen einer 0,02 % -igen Lysozym- (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) bzw.

0,01 %-igen Trypsinlösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in Seralpur-Wasser verdaut. Zwischen den einzelnen Verdaustufen wurde das Sporenpellet jeweils zweifach mit Seralpur-Wasser gewaschen und zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis keine vegetativen Zellen mehr mikroskopisch nachzuweisen waren. Sämtliche Behandlungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, um ein unerwünschtes Auskeimen der Sporen zu verhindern. Die gereinigte Sporensuspension ist in Seralpur-Wasser bei 4 °C über mehrere Monate lagerfähig. Die für die Erzeugung dünner Sol-Gel-Schichten verwendete Sporencharge wurde von Dr. Raff im Forschungszentrum Rossendorf präpariert.

3.1.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Frisch aus langzeitlagerfähigen Glycerolkulturen auf Agarplatten angezogene Bakterienkulturen wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie des Instituts für Radiochemie im Forschungszentrum Rossendorf bereitgestellt. In regelmäßigen Abständen (ca. alle vier Wochen) wurden diese Kulturen auf frisches Festmedium (NB + 10 mg/l MnSO_4 + 1,5 g/l Agar) in Petrischalen überimpft und mikroskopisch auf ihre einheitliche Morphologie kontrolliert. Bei Bedarf wurden die sporenbildenden Kulturen aufgefrischt, indem Flüssigkulturen bis zur Sporulation inkubiert und anschließend bei 80 °C für 15 Minuten pasteurisiert wurden. Bei dieser Prozedur werden vegetative Zellen abgetötet. Die im Medium enthaltenen Sporen wurden auf Agarplatten überimpft und bei 30 °C bebrütet. Von diesen Platten wurden nachfolgend 100 ml Erlenmeyerkolben mit NB-Flüssigmedium beimpft und wiederum bis zur Sporulation inkubiert. Nach Wiederholung der Pasteurisierung wurden die Kulturen wie gewohnt weiter kultiviert.

3.1.5 Bestimmung von Trockengewichten

Zur Gewichtsbestimmung wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße in einem Vakuumtrockenschrank (Vacutherm, Heraeus Instruments) bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz erhitzt und ausgewogen. Jeweils 1 ml Bakteriensuspension wurde in die Gefäße einpipettiert, abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die Restpellets wurden wiederum bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz im Vakuumtrockenschrank erhitzt und ausgewogen.

3.2 Verwendete Biocere

3.2.1 Erzeugung von Bulkprodukten

Für die Herstellung von Bioceren kam ein ethanolisch-wässriges Nanosol zum Einsatz. Dieses Nanosol mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von etwa 5 nm wurde von der Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e.V. (GMBU) zur Verfügung gestellt. Die Gele wurden von U. Soltmann präpariert. Standardmäßig bestand das Sol aus angesäuertem wässrigen Tetraethoxysilan mit einem Siliziumgehalt von 4 % als Precursor. Der Prozess verläuft über die Hydrolyse des Alkoxyprecursors und anschließender Kondensation, wie im folgenden Schema 3.2.1 vereinfacht dargestellt:

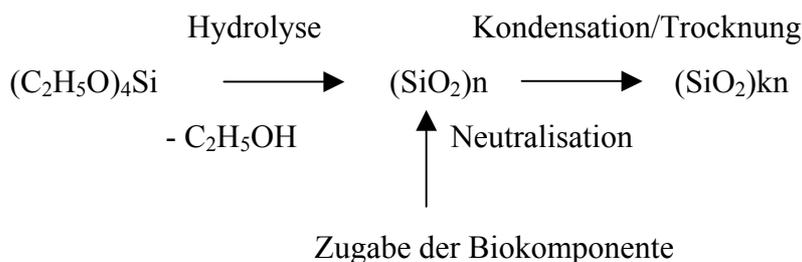


Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der Erzeugung von Biocerbulkpartikeln aus wässrigen TEOS-Solen.

Dabei geht das Sol in einen gelartigen Zustand mit einem relativ hohen Wasseranteil über. Nachfolgend kann dieses sogenannte Lyogel einer Lufttrocknung oder Lyophilisierung unterworfen werden. Zweckmäßigerweise wird das wasserhaltige Lyogel mechanisch zerkleinert, um die nachfolgende Aufarbeitung und Klassierung im getrockneten Zustand zu erleichtern. Die Größe der Partikel lag zwischen 355 und 500 μm . Zur Erhöhung der Porosität wurde dem Sol 20 % Sorbit zugesetzt.

Zur Erzeugung von Bulkprodukten wurde im ersten Schritt der größte Anteil des Ethanolis mittels Hindurchleiten von Druckluft entfernt. Dieser Schritt ist essentiell, wenn lebende Zellen eingebettet werden sollen, da Alkohol toxisch wirkt. Nach der Korrektur des Volumens wurde die Biokomponente mit einem Anteil von 5 % (w/v) unter Rühren zugesetzt und die Kondensation durch Neutralisierung der Lösung mit Ammoniak gestartet. Nach ca. 24 h Trocknung im sterilen Luftstrom waren die Biocerpartikel ausgehärtet. Zur Vereinheitlichung

des Materials wurden diese nachfolgend im Mörser zerkleinert und durch fraktioniertes Sieben klassiert.

3.3.2 Erzeugung von dünnen Schichten

Dünne Biocerschichten wurden für die Langzeitlagerung, Auskeimungsversuche und mechanische Spannungsmessungen hergestellt. Generell wurden zur besseren Benetzbarkeit vor dem Aufziehen der Biocerschicht die Trägermaterialien mindestens 24 h lang in vollentsalztem Wasser bei 70 °C hydrophilisiert. Nach dem Abtrocknen der Träger wurden diese in ein Gefäß mit dem angemischten, die Biokomponente enthaltenden sauren Sol getaucht und mit einer konstanten Zugrate von 30 cm/min gehoben. Beschichtete Glasobjektträger wurden auf der Rückseite mit Ethanol gesäubert und die Schichten entweder an der Luft hängend getrocknet oder sofort in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit feuchtem Zellstoff verbracht. Die Lagerung der Schichten erfolgte bei Raumtemperatur und bei 4 °C. Für mechanische Spannungsmessungen wurden n/Phosphor dotierte, einseitig polierte 3“-Siliziumwafer (Silchem Handelsgesellschaft mbH, Freiberg) mit der Orientierung <100> elektrochemisch mit einer 1 µm dicken Goldschicht versehen (Institut für Halbleiter- und Mikrosystemtechnik, TU Dresden). Die Aufbringung der dünnen Biocerschicht erfolgte analog zum Beschichtungsverfahren von Glasträgern. Um eine gleichmäßige Benetzung der Wafer zu erzielen, wurde dem Sol Silikonöl (Addit 200, Wacker-Chemie GmbH) zugesetzt. Die goldbeschichtete Seite wurde vor der Beschichtungsprozedur mit Haftfolie abgeklebt. Die Lagerung der Wafer erfolgte bei Raumtemperatur.

3.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung von Biokomponenten und Bioceren

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zu den besonderen Vorzügen der silikatischen Biocere zählt deren ausgezeichnete Transparenz, die es ermöglicht, mit lichtmikroskopischen Methoden Aussagen über die Verteilung der Biokomponente innerhalb der Keramik und mit dem entsprechenden Instrumentarium darüber hinaus sogar über deren physiologischen Status zu erhalten. Allerdings sind dem mit ungefärbten Mikroorganismen und der klassischen Hellfeldmikroskopie aufgrund geringer Kontrastunterschiede schnell Grenzen gesetzt. Mit der Einführung von Phasenkontrast- und DIC-Verfahren (**d**ifferential **i**nterference **c**ontrast) stehen ausgezeichnete Werkzeuge zur Beobachtung und Abbildung mikrobiologischer Strukturen in Suspension zur Verfügung, jedoch stellt die Kombination von Biokomponente mit einer keramischen Matrix eine neue Herausforderung dar.

Für zeitsparende und einfache Untersuchungen an Bakteriensuspensionen und dünnen Biocerschichten auf Glaträgern wurde ein aufrechtes Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung Olympus BX 61 (Olympus Optical CO. (Europa) GmbH, Hamburg) mit Phasen- und Differential-Interferenz-Kontrast verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer View12-CCD Kamera, die Bildbearbeitung und Auswertung mit dem Softwarepaket **analySIS**[®] 3.0 (System Imaging Software GmbH, München). Als Lichtquelle diente eine Hg-Lampe, die mit ihrem Spektrum den Bereich von etwa 280 nm bis 800 nm abdeckt. In Abb. 3.3.1 ist das typische Emissionsspektrum einer Hochvakuum-Quecksilberlampe mit seinen charakteristischen Emissionsmaxima zu sehen. In Kombination mit den geeigneten Anregungs- und Sperrfiltern lässt sich eine Vielzahl gängiger Fluorophore mit unterschiedlicher Intensität anregen. Die zur Verfügung stehenden Filter sind in Tab. 3.3.1 aufgelistet.

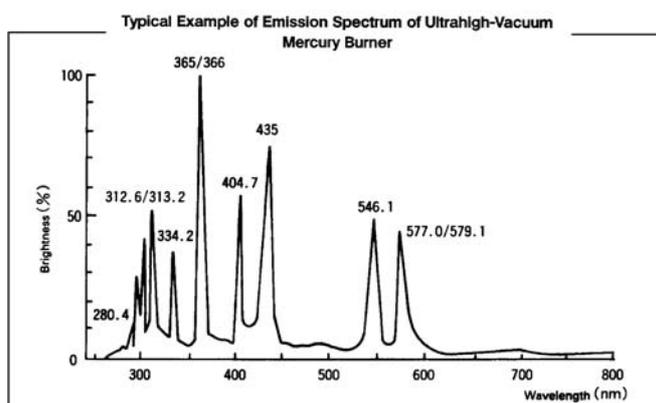


Abb. 3.3.1: Emissionsspektrum einer Ultrahochvakuum-Quecksilberlampe (Olympus Optical GmbH 2000).

Tab. 3.3.1: Spektrale Charakteristika verwendeter Filtersätze (Olympus Optical GmbH).

Filter	Anregung	Dichroidischer Spiegel	Emission	Fluorophor/Anwendung
MNU2	360 – 370 nm	400 nm	420 nm	Autofluoreszenz DAPI Hoechst 33258
MSWG2	480 – 550 nm	570 nm	> 590 nm	Rhodamin(derivate) TRITC Propidiumjodid
Cy3	446 ± 11 nm	557 nm	567 ± 15 nm	FISH
NF2	420 – 480 nm	500 nm	> 520 nm	FITC Acridin Orange

Somit lassen sich auch dynamische Vorgänge wie Stofftransporte, Freisetzung oder Bindung verschiedener Moleküle oder Ionen sowie Änderungen des pH-Wertes innerhalb einzelner Organismen verfolgen. Beim Mikroskopieren fluoreszenzmarkierter biologischer Proben werden diese im Unterschied zum Hellfeldverfahren gezielt mit Licht einer für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht mit Hilfe spezieller Filter sichtbar gemacht. Nicht markierte Zellbestandteile bleiben dabei schwarz.

3.3.1.1 Fluorophore

Fluoreszenzfarbstoffe als Fluorophore im engeren Sinne (siehe dazu auch Kap. 4, Abschnitt 1) lassen sich mit verschiedensten Trägermolekülen verknüpfen oder derivatisieren. Dadurch werden sie zu hoch affinen und selektiv bindenden Detektoren für bestimmte Regionen oder Bestandteile innerhalb einer biologischen Probe, oder sie sind in der Lage, spezifisch auf einen bestimmten Stimulus zu antworten. Durch Veresterung der Carboxylgruppen können darüber hinaus zellimpermeable Farbstoffe membrangängig gemacht und auf diese Weise zellschädigende, invasive Färbetechniken umgangen werden. Auf die verschiedenen Techniken wird später noch ausführlicher eingegangen (Kapitel 4, Abschnitt 3.1). In Tabelle 3.3.1.1 sind exemplarisch aus einem umfangreichen Sortiment der unterschiedlichsten Farbstoffe einige besonders gängige Substanzen und deren Zielstrukturen aufgeführt. Die Palette reicht dabei von relativ einfachen chemischen Derivaten, die an bestimmte funktionelle Gruppen binden (siehe SH- oder NH₂-reaktive Farbstoffe) oder in Molekülstrukturen interkalieren, wie es bei vielen Nukleinsäurefarbstoffen der Fall ist, über Substrate, die von spezifischen, zelleigenen Enzymen in das eigentliche Fluorophor überführt werden bis hin zu konjugierten Systemen oder Farbstoff-markierten Antikörpern zur spezifischen und hochaffinen Färbung von bestimmten zellulären Strukturen oder Organellen.

So eignen sich beispielsweise Fluorescein- und Rhodaminabkömmlinge wie auch die sogenannten Alexa-Farbstoffe sehr gut zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (Lektine, Antikörper) oder Oligonukleotiden. Als Sonden finden diese Konjugate bereits Anwendung in verschiedenen Bereichen. Fluoreszenzmarkierte definierte Nukleinsäuresequenzen werden zur Hybridisierung mit Wirts-DNA (fluorescence in situ hybridization = FISH) eingesetzt und dienen unter anderem in der klinischen Diagnostik zum Nachweis von Chromosomenanomalien oder zur genetischen Analyse und Identifizierung von Mikroorganismen und Viren in Umweltproben. Mit fluoreszierenden Lektinen lassen sich zuckerhaltige Moleküle auf Zelloberflächen, unterschiedliche Aktivitätszustände oder Zellzyklusstadien nachweisen. Antikörper sind eine Klasse von Proteinen, die im Serum des menschlichen und tierischen Organismus zur Erkennung von bakteriellen und viralen Infektionen sowie Tumorzellen gebildet werden. Auf Grund der hohen Affinität zu ihren korrespondierenden Antigenstrukturen der Fremdzellen können fluoreszenzmarkierte Antikörper für viele verschiedene Anwendungen eingesetzt werden. Die als Immunfluoreszenz bekannte Technik ist eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von Antigenen, beispielsweise in der Zelldiagnostik zur Identifizierung entarteter Zellen, zum Monitoring zellulärer Strukturen oder zur Identifizierung und Differenzierung von Viren, Bakterien und Pilzen.

Tab. 3.3.1.1: Auswahl gängiger Fluoreszenzfarbstoffe und deren Zielstrukturen (Haugland 2005).

Farbstoff	Derivate	Zielstruktur
SYTO Familie Propidiumjodid DAPI	-	Nukleinsäuren
Rhodamin Fluorescein TAMRA	Isothiocyanate (NH ₂ -reaktiv) Succinimidylester (NH ₂ -reaktiv) Maleimide (SH-reaktiv)	Proteine Proteinkonjugate Peptide Lipide Nukleinsäuren Oligonukleotide
Alexa Fluor [®] Familie		Avidin-Biotin-Konjugate Antikörper-Hapten-Konjugate Oligonukleotide Lektine
Oregon Green [®] Calcium Orange [™] Fura-2	Acetoxymethylester	Intrazelluläres Calcium u. a. Kationen
Newport Green [™]	Acetat	Intrazelluläres Nickel

3.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Mit der Einführung des ersten kommerziellen konfokalen Laserscanningmikroskops Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts öffnete sich eine neue Dimension in der Lichtmikroskopie, die sich durch eine veränderte Aufnahmestrategie auszeichnet. Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird das gesamte zu untersuchende Präparat mit dem Anregungslicht, z.B. einer Quecksilberhochdrucklampe, bestrahlt. Neben den Vorteilen dieser Untersuchungsmethode im Hinblick auf den relativ geringen apparativen Aufwand gibt es jedoch auch nicht zu vernachlässigende Probleme. Durch die simultane Anregung des Fluorophors in allen Fokusebenen entstehen scharfe und unscharfe Anteile im resultierenden Fluoreszenzbild. Im Fokus liegende Fluoreszenzsignale werden durch Fluoreszenzmissionen aus anderen Ebenen verfälscht oder überstrahlt. Eine dreidimensionale Auflösung mit dieser Methode ist erst seit einigen Jahren eingeschränkt möglich (z.B. Zeiss-Apotome[®]). Besonders bei dickeren Proben wie Biocerbulkmaterial werden diese Einschränkungen relevant. Weiterhin führt das permanente Anregen des gesamten Präparats zum Ausbleichen der Fluorophore und stellt für lebende Objekte eine Belastung dar. Bei der Anregung durch einen Laser wird die Probe punktwise mit einem fokussierten Lichtstrahl abgescannt und kurzzeitig angeregt. Allerdings ist trotz kurzzeitiger Bestrahlung die Laserleistung häufig höher als die der Lampe, so dass z.B. für das Live-Cell-Imaging konfokale Mikroskope mit Lampenanregung eingesetzt werden. Das Scannen erfolgt hier durch sogenannte Nipkow-Scheiben. Generell werden bei der konfokalen Mikroskopie Fluoreszenzmissionen außerhalb der Fokusebene weitestgehend unterdrückt. Das geschieht durch Einfügen einer Lochblende (Pinhole) in den Strahlengang zwischen Probe und Detektor und zwar im konfokalen Abstand. So gelangt nur Licht aus der aktuellen Fokusebene auf den Detektor, alles andere wird ausgeblendet, damit auch die unscharfen Anteile. Die Dicke der Fokusebene wird durch die numerische Apertur des Objektivs und die Größe des Pinholes bestimmt. Um eine dreidimensionale Darstellung zu erhalten, werden nacheinander alle interessierenden Fokusebenen abgebildet, die Probe wird also zusätzlich in z-Richtung gescannt. Der so entstehende z-Stapel wird anschließend zu einem räumlichen Objekt rekonstruiert.

Die konfokale Laserscanningmikroskopie fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der räumlichen Verteilung der Biokomponente innerhalb der Silikatmatrix Anwendung. Biocerpartikel mit der zuvor angefärbten Biokomponente wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop LSM 510 von Carl Zeiss mit einem LS Modul auf einem Axioskop 2 SS untersucht. Mit TAMRA-SE gefärbte Proben wurden bei 543 nm angeregt und

mit Hilfe eines Bandpassfilters (IR) zwischen 565 und 615 nm detektiert. Partikel, die mit SYTO9 und Propidiumjodid markiert waren, konnten bei 488 nm angeregt und auf zwei Kanälen mit Bandpassfiltern zwischen 625 und 655 bzw. 500 und 530 nm (IR) detektiert werden. Die getrockneten Biocerpartikel lassen sich unter Lichtabschluss mehrere Tage aufbewahren und bedürfen zum Mikroskopieren keiner weiteren Vorbehandlung.

3.3.3 Atomkraftmikroskopie

Mit der Atomkraftmikroskopie (**atomic force microscopy**, AFM) steht ein modernes, hochauflösendes Verfahren zur Verfügung, das besonders zur Begutachtung biologischer Strukturen im Nano- und Mikrometerbereich hervorragend geeignet ist. Der besondere Vorzug liegt hierbei in der besonders einfachen Probenpräparation und dem Arbeiten unter physiologischen Bedingungen. Entsprechende Untersuchungen wurden bereits an einer Reihe verschiedener Mikroorganismen, Sporen und einzelner Zellbestandteile, zum Beispiel von *Deinococcus radiodurans*, *B. sphaericus* und *B. coagulans* durchgeführt (Morris et al. 1999). Neben der Aufklärung topographischer, ultrastruktureller Merkmale auf Zelloberflächen (Dufrêne 2002, Kotra et al. 2000) und Zelloberflächen-Layern (Müller et al. 1996, Dufrêne 2001) in Abhängigkeit vom umgebenden Milieu können ebenso direkte Wechselwirkungen zwischen Probenoberfläche und Spitze gemessen werden (Ohnesorge et al. 1992, Fang et al. 2000, Lehenkari et al. 2000, Dufrêne et al. 2001, Dufrêne 2001 und 2002, Györvary et al. 2003). Generell kann beim Betrieb zwischen verschiedenen Aufnahmemodi gewählt werden: dem statischen oder intermittierenden Kontaktmodus oder dem Nichtkontaktmodus. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wurden im intermittierenden Kontakt, dem sogenannten „Tapping-Mode“ aufgenommen. Das Prinzip der Abbildung beruht auf dem Abrastern der Probenoberfläche mit Hilfe einer geätzten, an einem schwingenden Federbalken (Cantilever) sitzenden Siliziumspitze, die einen Spitzenradius von etwa 20 nm besitzt. Diese Spitze wird in Resonanzschwingung versetzt und der Probe so weit angenähert, bis Wechselwirkungen (in erster Linie van-der-Waals-Kräfte sowie elektrostatische, Kapillar- und Adhäsionskräfte) zwischen Spitze und Probenoberfläche eine Verringerung der Resonanzfrequenz und eine Schwingungsdämpfung bewirken, wobei die Spitze leicht die Probe berührt. Die Schwingungsänderungen werden dabei laserinterferometrisch detektiert. Beim punktförmigen Abtasten der Probe wird somit ein Abbild des Oberflächenprofils erzeugt, welches vor allem bei weichen Proben mit geringer Höhengausdehnung detailgenaue Bilder liefert und im Auflösungsvermögen mit elektronenmikroskopischen Verfahren konkurrieren kann.

Das Atomkraftmikroskop wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung der Oberflächentopographie und Rauigkeit von sporenhaltigen Silikatschichten auf Siliziumwafern ein

gesetzt. Die Aufnahmen wurden mit einem Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Veeco Metrology Group, Santa Barbara, California, USA), ausgestattet mit einem J-Scanner, erzeugt. Die Scanrate betrug 0,3 Hz bei einem Setpoint von 0,9 V. Die Auswertung erfolgte mit der Software Nanoscope IIIa 4.22 und WSxM 4.0 Develop 7.71 (Nanotec Electronica S. L., Spanien).

3.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bedingt durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops waren zusätzliche Feinstrukturuntersuchungen der verschiedenen Biocermaterialien vonnöten. Grundsätzlich bieten sich dafür verschiedene elektronenmikroskopische Verfahren an. Auf Grund des spröden Materialcharakters der Biocere scheidet jedoch die Transmissionselektronenmikroskopie aus. Einer erforderlichen Dünnschnittpräparation sind diese Proben nicht zugänglich. Als Alternative kommt zumindest zur Abbildung von Oberflächenstrukturen die Rasterelektronenmikroskopie in Betracht. Für die Untersuchung von Bioceren wurde ein Niederspannungsggerät LEO 982 Gemini (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen) verwendet. Unter Einsatz reduzierter Beschleunigungsspannung lassen sich vor allem biologische Proben, die in der Regel wenig kontrastreich sind, oberflächennah besonders detailreich abbilden. Um Beeinträchtigungen der Probenoberflächen durch die Einwirkung des Elektronenstrahls möglichst gering zu halten, wurde mit einer Beschleunigungsspannung $\leq 1,8$ kV gearbeitet. In den meisten Fällen war außerdem eine Stabilisierung der biologischen Strukturen vor der Untersuchung im Vakuum unerlässlich. Die untersuchten Materialien wurden deshalb mit einer 4 %-igen Glutardialdehydlösung in 25 mMol/l KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,04) mindestens 24 h lang bei 4 °C fixiert, Biocerbulkpartikel zusätzlich 5 Minuten bei 7232 x g und 4 °C abzentrifugiert und anschließend in aufsteigender Ethanolreihe nach folgendem Schema entwässert:

Tab. 3.3.4: Schema zur Entwässerung von Bakteriensuspensionen und Biocerpartikeln in aufsteigender Ethanolreihe.

Schütteldauer [min]	Volumen [ml]	EtOH-Konz. [%]	Zentrifugation
10	1	10	5 Min., 7232 x g
10	1	30	5 Min., 7232 x g
10	1	50	5 Min., 7232 x g
10	1	70	5 Min., 7232 x g
10	1	90	5 Min., 7232 x g
10	1	95	5 Min., 7232 x g
10	1	absolut	5 Min., 7232 x g

Die entwässerten Proben wurden auf Aluminiumprobentellern mit Hilfe eines mit Kohlenstoff befilmten Haftaufklebers fixiert, luftgetrocknet und zur Verbesserung der Leitfähigkeit mit Gold oder mit Kohlenstoff in einer Kleinbeschichtungsanlage MED 010 (Baltec AG, Liechtenstein) besputtert. Zur Identifizierung von Oberflächenablagerungen wurden ausgewählte Proben zusätzlich einer EDX-Analyse (energy dispersive x-ray analysis) mit einem NORAN-Röntgendetektor für energiedispersive Analyse (ThermoNORAN, Bruchsal) unterzogen.

3.4 Färbung von Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen

Sämtliche verwendete Fluoreszenzfarbstoffe wurden von Molecular Probes (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) bezogen. Alle Farbstoffe wurden in einem geeigneten Lösungsmittel, in der Regel Methanol oder DMSO, gelöst und aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers bei 4 °C oder -20 °C.

3.4.1 Proteinfärbung

Als sehr gut geeignet zur Anfärbung von Mikroorganismen hat sich ein Isomerengemisch aus 5-(und 6)-Carboxytetramethylrhodamin, derivatisiert als Succinimidylester, erwiesen.

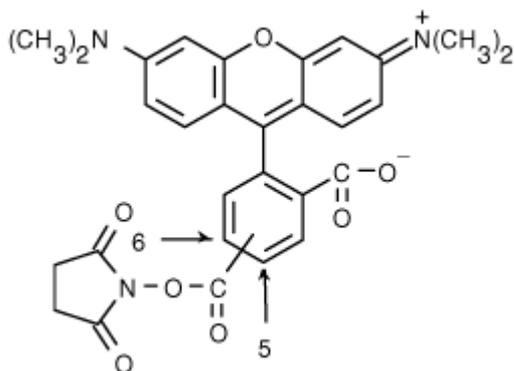


Abb. 3.4.1: Inneres Salz von 5-(und 6)-Carboxytetramethylrhodaminsuccinimidylester (TAMRA-SE).

Dieses Derivat (s. Abb. 3.4.1) reagiert im leicht basischen Bereich mit nicht protonierten aliphatischen Aminogruppen, so auch dem N-Terminus von Proteinen und der ϵ -Aminogruppe von Lysin, unter Ausbildung stabiler Amidbindungen. Seine Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich (555 nm) und seine sehr gute Photostabilität machen es zu einem idealen Färbereagenz für Proteinstrukturen. Der hydrophobe Farbstoff wurde zuerst mit Methanol gelöst, zu je 250 μ g portioniert und nach dem Abdampfen des Al-

kohols bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde ein Aliquot Farbstoff mit $25\text{ }\mu\text{l}$ DMSO gelöst und mit 3 ml Zellsuspension in Bicarbonatpuffer (pH 8,3) gemischt (Endkonzentration $0,16\text{ mMol/l}$). Nach 30 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss wurde das Pellet abzentrifugiert und 30 Minuten mit 1 ml $1,5\text{ Mol/l}$ Hydroxylaminhydrochlorid (pH 8,5) nachinkubiert, um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zellen, wie in Kapitel 3, Abschnitt 2.1 beschrieben, in die Keramik eingebettet und getrocknet.

3.4.2 Lebend/Tot-Färbung

Ein Gemisch zweier verschiedener Nukleinsäure-Farbstoffe, (LIVE/DEAD[®] *Bac Light*[™] Bacterial Viability Kit), bestehend aus SYTO9 und Propidiumjodid in DMSO, wurde zu je $3\text{ }\mu\text{l}$ aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Pro Milliliter Mikroorganismensuspension wurde ein Aliquot zugesetzt und nach einer Inkubationsdauer von fünf Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss beide Färbungen simultan detektiert.

3.4.3 Ionenspezifische Farbstoffe

Der Einfluss verschiedener Übergangsmetalle auf Bakteriensuspensionen wurde mit zwei verschiedenen Ca^{2+} -spezifischen Farbstoffen, Calcium Orange[™] und Oregon Green[®] 488 BAPTA-1, derivatisiert als Acetoxymethylester, und einem spezifischen Ni^{2+} -Farbstoff, Newport Green[™] DCF, derivatisiert als Acetat, untersucht. Durch Auflösen der Aliquots in jeweils $25\text{ }\mu\text{l}$ wasserfreiem DMSO wurden von beiden Ca^{2+} -Farbstoffen jeweils 2 mMol/l und von Newport Green 1 mMol/l Farbstoff enthaltende Stammlösungen hergestellt. Die Bakterien wurden, wie in Kapitel 3, Abschnitt 1.2 beschrieben, in 30 ml NB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben als Vorkulturen über Nacht inkubiert. Jeweils 3 ml davon wurden in frische Kölbchen inokuliert und weitere 4 oder 16 h unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Geerntet wurde die Zellmasse durch Zentrifugation in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bei 7232 x g für 5 Minuten . Um anhaftende Mediumbestandteile zu entfernen, wurden die Pellets anschließend zweifach mit $0,9\text{ }\%$ -iger NaCl-Lösung gewaschen und wiederum zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 10 ml $0,9\text{ }\%$ -iger NaCl-Lösung versetzt. Sofern es die Versuchsdurchführung erforderte, wurden die optischen Dichten der Kulturen mit einem UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech Inc., Cambridge, UK) bestimmt und angeglichen. Durch Zugabe von jeweils $5\text{ }\mu\text{l}$ Calcium Orange und Oregon Green Acetoxymethylester bzw. $10\text{ }\mu\text{l}$ Newport Green Acetat-Stammlösung zur Bakteriensuspension wurde die Endkonzentration

von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Farbstoff eingestellt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 30 °C im Schüttelwasserbad unter Lichtausschluss inkubiert. Bakterienkulturen in der stationären Phase wurden 4 h mit Calcium Orange Acetoxymethylester gefärbt. Eine kürzere Inkubationsdauer war dagegen ausreichend für Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase, für Farbstoff-Efflux-Untersuchungen sowie für Oregon Green und Newport Green. Die Stämme *B. sphaericus* JG-A12 und *P. stutzeri* DSMZ 5190 benötigten 1 h für eine optimale Färbung, *B. sphaericus* NCTC 9602 wurde 2 h inkubiert. Danach wurden die Ansätze bei 7232 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und zweifach mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen. Die gefärbten Pellets wurden je nach Art des Experiments entweder in 6,2 ml (für Calcium Orange-Messungen) oder 10 ml 0,9 %-iger NaClO₄-Lösung unterschiedlicher pH-Werte resuspendiert.

3.5 Fluoreszenzspektroskopie

Das tatsächliche Potential von Fluoreszenzfarbstoffen zur Charakterisierung von dynamischen Systemen erschließt sich beim Einsatz von spektroskopischen Methoden, die es erlauben, Wechselwirkungen von Farbstoff und Zielstruktur zu quantifizieren. Für Mittelwertmessungen in Bulkproben haben sich Spektrofluorometer bewährt. Einen größeren Probendurchsatz bei geringerem Volumen erreicht man mit Mikroplattenreadern. Die Durchflusszytometrie (flow cytometry) zur Detektion von Einzelzellen hat sich in den letzten Jahren vor allem im medizinischen Bereich etabliert. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich verschiedenste Parameter wie Zellmorphologie, -größe, Oberflächenantigene, Nukleinsäuregehalt oder Autofluoreszenz simultan bestimmen und Unterschiede zwischen einzelnen Subpopulationen nachweisen.

3.5.1 Messungen mit hohem Probendurchsatz

Zellfreie Farbstofflösungen

Eine große Anzahl kommerzieller, ursprünglich zur intrazellulären Detektion von Ca²⁺ entwickelter Fluoreszenzfarbstoffe, interferiert mit anderen zwei- und dreiwertigen Kationen unter Änderung ihrer Fluoreszenzintensität (Haugland 2005). Das Ausmaß der Änderung wiederum ist abhängig von einer Reihe Faktoren wie Lösungsmittelpolarität, pH-Wert, Temperatur, Anwesenheit weiterer Ionen oder der Ionenstärke. Vor Untersuchungen an Bakterienkulturen wurden die freien Säuren der ausgewählten Farbstoffe in wässrigen Lösungen mit verschiedenen Metallionen in unterschiedlichen Konzentrationen und bei verschiedenen pH-Werten getestet. Die Lagerung der Farbstoffe und die Herstellung der Stammlösungen erfolgte analog zur im Kapitel 3, Abschnitt 4.3 beschriebenen Prozedur. Zu Versuchsbeginn wurde eine Lösung von 2 $\mu\text{Mol/l}$ Farbstoff in 50 mMol/l 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

(MOPS) bzw. 0,9 %-iger NaClO₄-Lösung mit einem 10-fachen Ca²⁺-Überschuss hergestellt und je 100 µl dieser Lösung mit 100 µl Metallsalzlösung gemäß Tabelle 3.5.1 versetzt. Nach intensivem Mischen mit Hilfe eines Minirüttlerns Vortex (Vortex Genie2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) wurden jeweils 180 µl des Gemisches auf eine 96-Well Platte fluotrac 200 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt und in einem Fluoreszenzplattenreader Flx800 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) mit einem Anregungsfilter von 528/20 nm und einem Emissionsfilter von 590/35 nm bei Calcium Orange und 485/20 nm (Anregung) bzw. 528/20 nm (Emission) bei Oregon Green und Newport Green ausgemessen. Als Referenzprobe dienten jeweils 100 µl Farbstofflösung mit 100 µl 0,9 %-iger NaClO₄-Lösung oder 50 mMol/l MOPS ohne Zusatz von Metallionen.

Konzentration (Mol/l)	Cu ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺
1E-1	■	■	■	■	■
1E-2	■	■	■	■	■
1E-3	■	■	■	■	■
1E-4	■	■	■	■	■
1E-5	■	■	■	■	■
1E-6	■	■	■	■	■
1E-7	■	■	■	■	■
1E-8	■	■	■	■	■

Tab. 3.5.1: Zusammenstellung der verwendeten Metallsalzlösungen und Puffer:

■	0,9 %-ige NaClO ₄ -Lösung
■	50 mMol/l MOPS

Efflux-Messungen

Ein bekanntes Phänomen bei fluoreszenzgefärbten Zellen ist die partielle Freisetzung des Farbstoffes in Abhängigkeit von molekularer Struktur und Ladung, möglicherweise verursacht durch zelleigene Transportsysteme. Um abzuklären, inwieweit dies bei den eigenen Untersuchungen eine Rolle spielte, wurden mit Calcium Orange gefärbte Zellsuspensionen von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase in jeweils 1 ml Aliquots in 0,9 %-iger NaClO₄-Lösung bei pH-Werten von 5 und 6,2 sowie bei Raumtemperatur und unter Eiskühlung bis zu zwei Stunden inkubiert. Da die Bedingungen während dieser Zeit konstant gehalten wurden, war davon auszugehen, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ebenfalls unverändert blieb. Änderungen im Fluoreszenzsignal können unter diesen Bedingungen durch die Ausschleusung von Farbstoff verursacht werden. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde ein Aliquot für 5 Minuten bei 4 °C und 6800 x g abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Pellet mit 1 ml frischer 0,9 %-iger NaClO₄-Lösung versetzt und die Reaktionsgefäße bei 4 °C gelagert. Nach Beendigung des Experiments wurden je 100 µl Ansatz in eine 96-Well-Platte überführt und wie bereits beschrieben vermessen.

Metallaufnahme

Der für Metallionen sensitive Ca^{2+} -Farbstoff Calcium Orange wurde an *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 in Gegenwart von $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt), $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) getestet. Es wurden Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (4 h) mit in der stationären Phase (16 h) befindlichen jeweils bei den pH-Werten 5 und 6,2 verglichen. Ausschlaggebend für die Wahl des pH-Bereiches war die Tatsache, dass im neutralen Bereich besonders im Fall von Kupfer mit dem Auftreten verschiedener Hydroxokomplexe zu rechnen ist (Dr. H. Moll, persönliche Mitteilung). Von den ausgewählten Metallsalzen wurden Lösungen in 0,9 %-igem NaClO_4 in aufsteigenden Konzentrationen von 2, 10, 20, 100 und 200 $\mu\text{Mol/l}$ hergestellt. Da in den vorausgegangenen Efflux-Experimenten bei Raumtemperatur eine partielle Ausschleusung des Farbstoffes aus den Bakterien beobachtet wurde, erfolgten alle Manipulationen bis zur Messung unter Eiskühlung. Jeweils 100 μl der Bakteriensuspension wurden in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 100 μl der entsprechenden Metallsalzlösung versetzt und intensiv gemischt. Anschließend wurden je 180 μl des Ansatzes auf eine 96-Well-Platte überführt und ausgemessen. Als Referenzprobe dienten jeweils 100 μl Bakteriensuspension mit 100 μl 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung.

3.5.2 Einzelzellmessungen mittels Durchflusszytometrie

Neben den Vorteilen eines großen Probendurchsatzes und der damit verbundenen Zeitersparnis bei Messungen im Mikroplattenreader besitzen die damit gewonnenen Aussagen eher „orientierenden“ Charakter, da dabei das Gesamtsignal einer Vielzahl einzelner Zellen innerhalb einer Bakteriensuspension als einheitliches Ganzes gemessen wird. Unterschiede in der zellulären Antwort auf Metallionen innerhalb der bakteriellen Population werden dabei nicht detektiert. Um nähere Aussagen bezüglich der Zusammensetzung der Populationen und deren Antwort auf die Präsenz von Metallionen zu gewinnen, wurden zusätzlich in Zusammenarbeit mit M. Maitz im Institut für Ionenstrahlphysik und Materialforschung des Forschungszentrums Rossendorf Einzelzellmessungen mit Hilfe eines Durchflusszytometers BD FACS Calibur™ (Becton Dickinson Deutschland, Heidelberg), ausgestattet mit einem 488 nm Argon- sowie einem 635 nm Dioden-Laser, vorgenommen. Die Farbstoffe Oregon Green und Newport Green können gut mit dem 488 nm Laser-Licht angeregt werden. Die Detektion erfolgt im FL1-Kanal (grün) des Cytometers. Verglichen wurde die Zellantwort von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 sowie *P. stutzeri* DSMZ 5190 auf die Anwesenheit von Cu^{2+} oder Ni^{2+} in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Bakterienpopulation wurde nach Größe und Oberflächenbeschaffenheit mittels Vorwärts- und Seitstreulicht im Zytometer bei logarithmischer Achsenteilung charakterisiert. Um die Membrintegrität der auszuwertenden Zellen zu kontrollieren, wurden die gefärbten

Bakteriensuspensionen zusätzlich mit 5 nM TO-PRO-3, einem nicht membrangängigen DNA-Farbstoff versetzt und im FL4-Kanal (Anregung mit 635 nm, Emission bei 661 nm) detektiert. Nur TO-PRO-3 negative Zellen mit dem charakteristischen Vorwärts- und Seitstreulicht-Signal wurden ausgewertet. Die Sensitivität des Fluoreszenz-Kanals wurde so eingestellt, dass nur 0,5% einer ungefärbten Zellpopulation durch ihre Autofluoreszenz als positiv fluoreszierend detektiert wurden und Oregon Green gefärbte Zellen ohne Kupfer oder Newport Green gefärbte Zellen mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} ein deutliches Signal lieferten. Die Fluoreszenzsignale von Oregon Green und Newport Green wurden auf einer linearen Skala detektiert und aufgetragen. Bei einer Flussrate von ca. 5000 Zellen/s wurden in jedem einzelnen Experiment 200.000 Individuen ausgemessen. Für die weitere Datenanalyse und Auswertung wurde die Software Summit (DakoCytomation, Dänemark) verwendet. Wegen der häufig sehr geringen Fluoreszenz und breiten Fluoreszenz-Verteilung wurde nicht die absolute Fluoreszenz ausgewertet, sondern es wurde bestimmt, wie viele Zellen oberhalb bzw. unterhalb des oben angegebenen Schwellenwertes liegen. Um Unterschiede zwischen den Messungen zu korrigieren, wurde für Oregon Green die Zahl positiv fluoreszierender Zellen, die ohne Cu^{2+} Zugabe gefunden wurde, als 100% gesetzt und die anderen Werte entsprechend gewichtet. Für Newport Green war der 100% Wert die höchste Zellzahl des jeweiligen Versuchs. Die Verdünnungsreihen wurden mit CuCl_2 und NiCl_2 in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bei einem pH-Wert von 6,1 mit Konzentrationen von 2000, 1000, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 2, 1 und 0,2 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt. Die Bakterien wurden, wie im Kapitel 3, Abschnitt 1.2 und 4.3 beschrieben, kultiviert und gefärbt. Das Pellet wurde in 10 ml 0,9 % NaClO_4 , pH 6,1 resuspendiert und auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der ersten Messung wurde ein Volumenteil Salzlösung mit einem Volumenteil Zellsuspension gemischt und danach bei Raumtemperatur gelagert. Die passiven Diffusionsprozesse, aktive Aufnahme und Ausschleusung der Metallionen bedingen einen zeitabhängigen Verlauf der Fluoreszenz. In einigen Vorversuchen bestanden nach 30 Minuten keine wesentlichen Änderungen im Fluoreszenzsignal mehr, so dass eine zweite Messung der Proben nur zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurde. Um aktive Transportvorgänge von passiven zu unterscheiden, wurden in Parallelansätzen gefärbte Bakteriensuspensionen vor Zugabe der Metallsalzlösungen mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Paraformaldehyd dient zur Quervernetzung und somit zur Inaktivierung von Proteinen. Dadurch können alle aktiven Transport- und Regulationsmechanismen ausgeschlossen werden, und alle Änderungen des Fluoreszenzsignals beruhen auf passiven Diffusionsvorgängen.

3.6 Keimungsversuche dünner Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen

3.6.1 Apparativer Aufbau

Zur Untersuchung der Keimungsrate in Abhängigkeit von Lagerdauer und -bedingungen wurden dünne Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach verschiedenen Zeitabständen den Lagerbehältnissen entnommen und in eine Durchflusszelle montiert. Der Aufbau dieser Zelle ist in Abbildung 3.6.1.1 schematisch dargestellt:

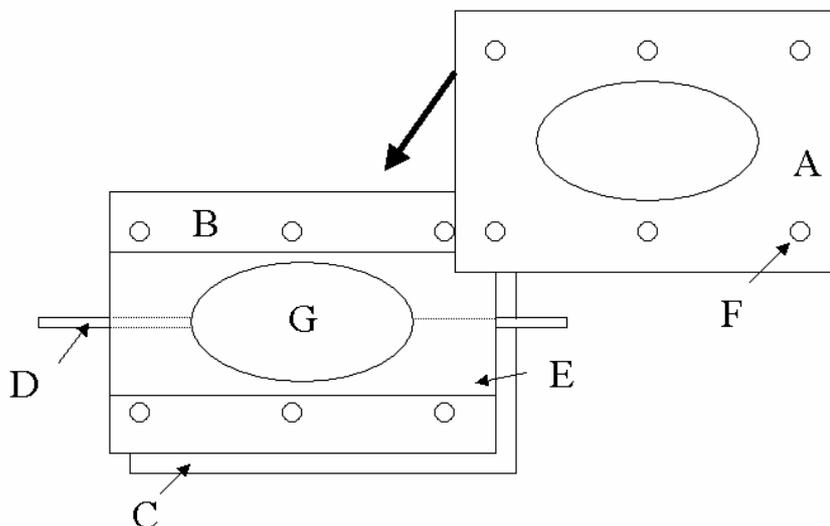


Abb. 3.6.1.1: Schematischer Aufbau einer Durchflusskammer zum lichtmikroskopischen Monitoring auskeimender bakterieller Sporen in dünnen Sol-Gel-Schichten: A, C Edelstahldeckplatten, F Verschraubung, B Teflonspacer, D Zu- und Ablauf für Nährmedium, E Führungsnut für Objektträger. Nicht sichtbar ist die Führungsnut für die beschichteten Deckgläser auf der Rückseite des Spacers. G Monitoringareal.

Vor der Montage wurden die einzelnen Bestandteile der Durchflusszelle autoklaviert. Zum Abdichten wurde Silikonfett mittlerer Viskosität (Baysilon-Paste 35g, Bayer AG, Leverkusen) auf beiden Seiten des Teflonspacers innerhalb der Führungsnuten gleichmäßig aufgetragen und das Sol-Gel beschichtete Deckglas sowie ein sterilisierter Objektträger auf der jeweils dafür vorgesehenen Seite eingepasst. Anschließend wurden die Edelstahlabdeckplatten mit dem Teflonspacer gleichmäßig fest verschraubt. Die komplettierte Zelle wurde äußerlich mit Dentalwachs abgedichtet und auf dem Mikroskoptisch platziert. Die Durchströmung der Durchflusszelle wurde über eine Zweikanal-Peristaltikpumpe (Peristaltikpumpe PGD 2, Institut für Medizintechnik e.V., Dresden) mit einer konstanten Flussrate von 0,4 ml/min realisiert. Im Zulauf wurde das Wechseln von Aktivierungslösungen (s. auch Kap. 3, Abschnitt 6.2) und Nährmedium über entsprechende Schlauchverbinder ermöglicht, die bei Bedarf mit

Hilfe von Arterienklemmen außer Betrieb gesetzt werden konnten. Eine schematische Darstellung der kompletten Einrichtung ist in Abbildung 3.6.1.2 zu sehen.

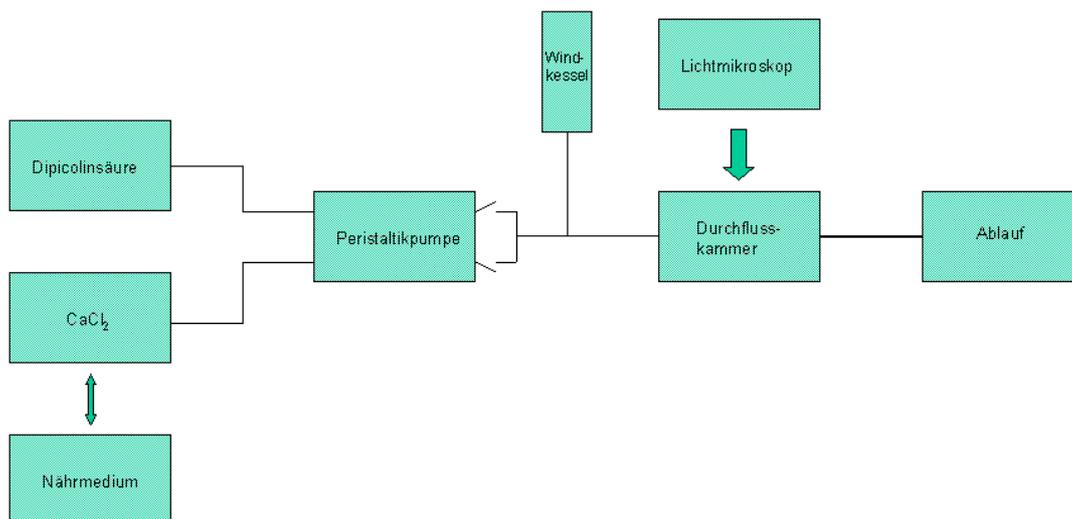


Abb. 3.6.1.2: Schematische Versuchsanordnung zur Durchführung der Keimungsversuche dünner Sporenschichten.

3.6.2 Aktivierung der Sporen mit Calciumdipicolinat

Um den Einfluss von Calciumdipicolinat auf die Keimung von Sol-Gel-immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 in Abhängigkeit von der Konzentration zu bestimmen, wurden getrennte Lösungen von $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt) und 2,6-Pyridindicarboxylsäure (Dipicolinsäure, DPA, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) in 10 mMol/l Tris-Puffer gemäß folgendem Schema für jeden Versuch frisch angesetzt:

Tab. 3.6.2: Zusammenstellung der verwendeten Aktivierungslösungen zur Induktion der Auskeimung von *B. sphaericus* JG-A12 Sporen.

Substanz	Einwaage	Volumen Tris-Puffer	Konzentration
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0735 g	50 ml	10 mMol/l
	0,147 g		20 mMol/l
	0,435 g		60 mMol/l
	0,87 g		120 mMol/l
2,6-Pyridindicarboxylsäure	0,0835 g	50 ml	10 mMol/l
	0,167 g		20 mMol/l
	0,5 g		60 mMol/l
	1 g		120 mMol/l

CaCl₂ wurde direkt in 10 mMol/l Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 aufgelöst. Dipicolinsäure ist nur im neutralen bis leicht basischen Bereich löslich und wurde deshalb in 25 ml 10 mMol/l Tris-Puffer ohne pH-Korrektur aufgeschlämmt und mit 10 N NaOH in 10 mMol/l Tris-Puffer bis zu einem pH-Wert von 8,0 titriert. Nach vollständigem Auflösen des festen Anteils wurde das Volumen auf 50 ml ergänzt. Beide Lösungen wurden möglichst keimarm in sterile 250 ml Schottflaschen mit steriler Belüftung und Saugansatz überführt und mit der Peristaltikpumpe verbunden. Um ein Präzipitieren des sich formierenden Ca²⁺-DPA-Komplexes zu verhindern, wurde die Durchflussskammer zuerst mit der CaCl₂-Lösung befüllt und daran anschließend Dipicolinsäure der gleichen Konzentration zugemischt. Die Aktivierung der Sporenschichten wurde generell für 1 h vorgenommen. Daran anschließend wurden die Aktivierungslösungen durch NB-Medium mit 10 mg/l Mangansulfat ersetzt und die Kammer für mindestens 24 h bei einer konstanten Flussrate von 0,4 ml/min durchströmt. Unmittelbar nach Beendigung der Aktivierung und in festgelegten Abständen während der Fütterung wurden fotografische Aufnahmen der Schichten angefertigt und manuell ausgewertet. Nach Versuchsende wurde die Kammer demontiert, die Sporenschichten mit vollentsalztem Wasser abgespült und in 4 % -iger Glutaraldehydlösung in 25 mMol/l Phosphatpuffer (pH 7) fixiert. Als Ergänzung und Kontrolle der lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden die fixierten Schichten zusätzlich rasterelektronenmikroskopisch ausgewertet.

3.7 Mechanische Spannungsmessungen

Zur Abschätzung der bei der Auskeimung von immobilisierten Sporen in dünnen Sol-Gel-Schichten auftretenden mechanischen Spannungen wurde ein im Institut für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden entwickelter kapazitiver Verformungsmessplatz eingesetzt. Als Substrat wird dabei ein durch eine Goldauflage auf seiner Unterseite leitfähig gemachter Siliziumwafer verwendet. Die zu untersuchende Schicht wird auf der Gegenseite aufgebracht und verursacht beim Auftreten von mechanischen Spannungszuständen eine elastische Verformung des darunter liegenden Wafers. Dieser wiederum bildet zusammen mit einer elektrisch leitfähigen Grundplatte eine Kapazität, die sich in Abhängigkeit von der Substratverformung ändert und mittels zweier Ringelektroden über eine *Wheatstonesche* Messbrücke als Fehlerspannung detektiert wird.

3.7.1 Apparativer Aufbau

Eine schematische Darstellung der kapazitiven Messanordnung ist in Abb. 3.7.1 gegeben. Durch die Dreipunktauflage kann ein definierter Abstand zwischen metallischer Grundplatte und Wafer eingestellt und somit die Messempfindlichkeit reguliert werden. Die Kapazitätsän-

derungen werden mit Hilfe eines RLC-Meters (Unterbrechereinheit PU 1, Forschungsinstitut Meinsberg) erfasst und mit einem PC aufgezeichnet. Um Luftfeuchte und Temperatur während der Messung möglichst konstant zu halten, empfiehlt sich die Integrierung des Messkopfes in eine Klimakammer unter permanenter Kontrolle der entsprechenden Parameter. Über eine Schlauchpumpe können durch eine in den Teflonring reichende Kanüle Wasser, Aktivierungslösung und Nährmedium zudosiert und abgesaugt werden.

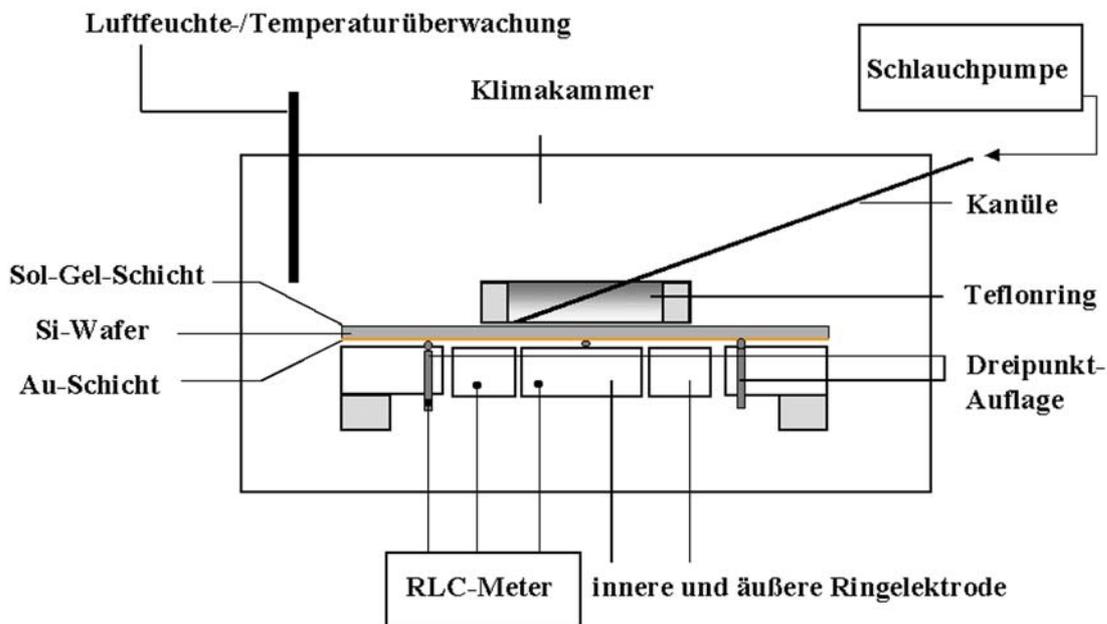


Abb. 3.7.1: Schematische Darstellung des kapazitiven Verformungsmessplatzes in einer Klimakammer zur Gewährleistung konstanter Luftfeuchte- und Temperaturverhältnisse. Mit Hilfe einer extern stationierten Schlauchpumpe können über eine in das Flüssigkeitsreservoir führende Kanüle Wasser, Ca^{2+} -DPA und Nährlösung zudosiert und abgepumpt werden.

3.7.2 Durchführung der Messungen

Der goldbeschichtete Siliziumwafer mit der (gemäß in Kap. 3, Abschnitt 2.2 beschriebenen Vorschrift versehenen) sporenhaltigen Sol-Gel-Schicht erhielt einen Teflonring mit einem Durchmesser von 4,1 cm als Flüssigkeitsreservoir zentrisch aufgesetzt. Nach der Abdichtung mit Silikon (MPG Consulting GmbH, Düsseldorf) und einer Aushärtungszeit von 24 h wurde der Wafer auf den Messkopf aufgesetzt. Die Kalibrierung der Apparatur erfolgte analog zum bereits von Tuckermann (2001) beschriebenen Verfahren durch das Auflegen von verschiedenen Gewichten. Das Flüssigkeitsreservoir wurde mit 9,9 ml entsalztem Wasser gefüllt und das System unter Kontrolle von Luftfeuchte und Temperatur mit einem Multifunktionsmessgerät P 570 (Dostmann Electronic GmbH, Wertheim) 24 h lang äquilibriert. Die Luftfeuchtigkeit lag bei den durchgeführten Messungen bei ca. 77 % (Δ rel. LF < 1 %), die Temperatur bei

23 °C ($\Delta T < 0,3$ K). Das Wasser wurde anschließend über eine Schlauchpumpe (Ismatec Mini S 60, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) abgepumpt und durch das gleiche Volumen 30 mMol/l Ca^{2+} -DPA-Lösung zur Aktivierung der Sporen ersetzt. Nach einer Stunde erfolgte der Austausch gegen 9,9 ml NB-Nährmedium. Die Änderung der elektrischen Spannung wurde über einen Zeitraum von 18 h in Intervallen von 10 Minuten detektiert. Zur Überprüfung von Keimungsverhalten und Schichtstabilität wurden die Wafer nach der Messung rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzfarbstoffe als Werkzeuge zur Charakterisierung von Bioceren

In den Anfängen der Lichtmikroskopie fanden überwiegend basische oder saure Farbstoffe zur Kontrastierung von Mikroorganismen oder einzelner Zellbestandteile Verwendung, die zum Teil bis heute Standardmethoden in der Mikrobiologie sind. Zu den wichtigsten klassischen Farbstoffen zählt zweifellos Kristall- oder auch Gentianaviolett, das in Verbindung mit *Lugolscher* Lösung zur Klassifizierung von Bakterien anhand von Unterschieden im Zellwandaufbau eingesetzt wird. Die als Gram-Färbung bekannte Differenzierungsmethode gilt heute noch weltweit als bedeutendes und fundamentales Hilfsmittel zur schnellen Identifizierung unbekannter Mikroorganismen im bakteriologischen Labor. Neben diesen relativ einfachen Kontrastierungsverfahren, die auf mehr oder weniger unspezifischer Reaktion des Farbstoffes mit funktionellen Gruppen beruhen und letztendlich nur einen stationären Zustand widerspiegeln, bietet eine zunehmend breiter werdende Palette an Fluoreszenzfarbstoffen immer vielfältigere Möglichkeiten zur detaillierten Untersuchung von biologischen Proben. Dabei erlauben die parallele gerätetechnische Weiterentwicklung und Synthese sensitiverer und photoresistenter Fluorophore mit erhöhter Quantenausbeute inzwischen auch die Möglichkeit, neben den originären eukaryotischen Untersuchungsobjekten analoge Experimente mit Prokaryoten vorzunehmen. Gemessen an den Erkenntnissen, die im Laufe der Jahre mit Zellkulturen gewonnen wurden, stehen die Untersuchungen an Mikroorganismen erst am Anfang. Bisherige Ergebnisse sind jedoch äußerst vielversprechend und lassen in den nächsten Jahren auf verstärkte Aktivitäten in diesem Forschungsbereich hoffen.

4.1.1 Kurze Einführung in die Grundlagen der Fluoreszenz

4.1.1.1 Anregungszustände

Fluoreszierende Substanzen, auch Fluorophore genannt, sind in der Natur beispielsweise als Enzymcofaktoren, Chlorophyll oder aromatische Aminosäuren zu finden. Diese werden als intrinsische Fluorophore bezeichnet. Künstlich erzeugte, extrinsische Fluorophore sind überwiegend polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder Heterocyclen mit einem ausgedehnten π -Elektronensystem, welches mit Licht bestimmter Wellenlängen temporär angeregt werden kann. Die Absorption von Photonen führt zur Überführung von π -Elektronen in ein energetisch höher gelegenes, antibindendes Molekülorbital. Nach einer gewissen Zeit kehren die angeregten Elektronen durch Relaxationsprozesse in energetisch niedriger gelegene Schwingungszustände und schließlich in den Grundzustand zurück. Die Energiezustände eines Fluorophores

rophors lassen sich im Jablonski-Diagramm schematisch vereinfacht und anschaulich darstellen (siehe Abbildung 4.1.1.1).

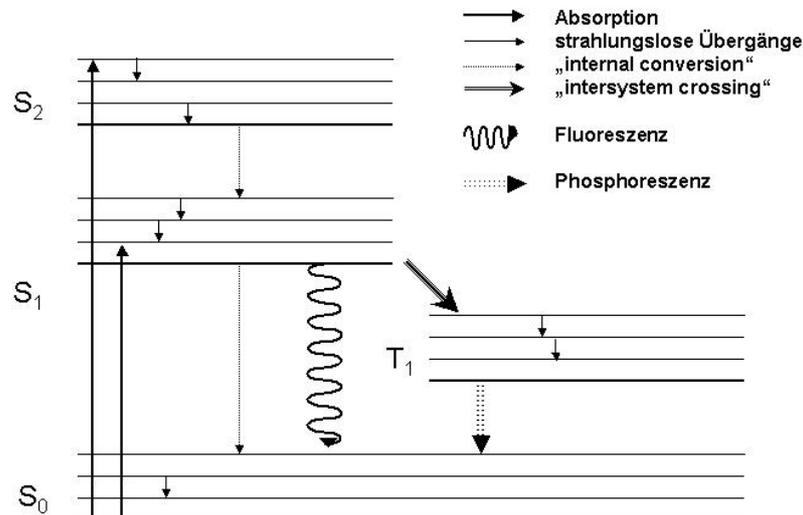


Abb. 4.1.1.1: Jablonski-Diagramm von Energiezuständen anregbarer Elektronen eines Fluorophors.

Durch die Aufnahme von Lichtenergie geeigneter Wellenlänge werden Elektronen aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes S_0 in einen angeregten Singulettzustand S_1 oder einen höheren (S_2 , S_3 ,...) überführt. Dieser Absorptionsprozess verläuft innerhalb von 10^{-15} Sekunden. Bei den anschließenden Relaxationsvorgängen unterscheidet man zwischen strahlungslosen und solchen unter Emission von Photonen. Dieser Effekt wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Einen Teil davon stellt die Fluoreszenz dar. Innerhalb eines energetischen Schwingungszustandes und zwischen den höheren angeregten Singulettzuständen erfolgt eine sehr schnelle Energieverteilung innerhalb eines Moleküls oder zwischen benachbarten Molekülen, sodass nach Temperaturengleich mit der Umgebung innerhalb von 10^{-13} bis 10^{-12} Sekunden der energetisch niedrigste angeregte Schwingungszustand S_1 erreicht wird. Diese Vorgänge werden als Schwingungsrelaxation bzw. innere Umwandlung bezeichnet. Da die Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand S_0 und dem ersten angeregten Zustand S_1 größer ist als die Differenzen zwischen den höheren angeregten Singulettzuständen, erfolgt der Übergang in den Grundzustand unter Abgabe von Photonen. Durch Intersystemübergänge oder „intersystem crossing“ können durch Spinumkehr von Elektronen, was einen quantenmechanisch verbotenen Übergang darstellt,

Singulettzustände und Triplettzustände ineinander überführt werden. Auf Grund energetisch begünstigter Wechselwirkungen der nun parallel ausgerichteten angeregten Elektronen im Triplettzustand liegen deren Energiegehalte etwas unter denen im S_1 -Zustand. Dieses Phänomen wird durch die empirisch gefundene und auch für Moleküle geltende *Hundsche Regel* beschrieben, wonach einzelne Elektronen in nahezu energiegleichen Orbitalen möglichst gleichen Spin annehmen. Die Übergangszeiten von angeregten Singulettzuständen in den Grundzustand liegen im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-5} Sekunden. Der spinverbotene Übergang von T_1 zu S_0 (Phosphoreszenz) erfolgt wesentlich langsamer in einem Bereich $>10^{-5}$ Sekunden und ist deshalb für photochemische Reaktionen von Bedeutung. Da über die Fluoreszenz nur ein Teil der zugeführten Energie abgegeben wird, ist das Fluoreszenzemissionsspektrum gegenüber dem Anregungsspektrum zu höheren Wellenlängen hin verschoben. Die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum ist bekannt als *Stokes-Shift* und beträgt in der Regel wenige Nanometer.

4.1.1.2 Fluoreszenzlebensdauer

Eine der wichtigsten Kenngrößen für die Charakterisierung von fluoreszierenden Molekülen ist die Quantenausbeute Φ . Sie berechnet sich aus

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \quad (5)$$

und kann, zumindest bei einfachen Systemen, maximal den Wert 1 erreichen. Die Zeit, die ein Molekül im Mittel im angeregten Zustand verbleibt bis die Fluoreszenzemission erfolgt und die Zahl der angeregten Moleküle auf N_0/e zurückgegangen ist, wird als die Fluoreszenz-Lebensdauer τ_F bezeichnet. Sie ist stark abhängig vom umgebenden Milieu des angeregten Moleküls. Generell gilt, dass ein angeregtes Molekül mit einer exponentiell verlaufenden Abklingkurve gemäß folgender Gleichung

$$N(t) = N_0 \exp(-k_f \cdot t) \quad (6)$$

unter Auftreten von Fluoreszenz in den Grundzustand zurückkehrt. Es ergibt sich

$$\tau_f = \frac{1}{k_f} \quad (7)$$

In diesem Term wird jedoch lediglich die „Strahlungslebensdauer“ berücksichtigt. Für eine korrekte Bewertung müssen dagegen auch die strahlungslosen Prozesse mit einbezogen werden. Damit ermittelt sich die tatsächliche Lebensdauer τ angeregter Moleküle wie folgt:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_Q} \quad (8)$$

Dabei ist k_f die Übergangsrate für die Fluoreszenz, k_{ic} und k_{isc} die für innere Umwandlung und Interkombinationsübergang und k_Q die Übergangsrate für die Fluoreszenzlöschung oder auch Quenching genannt. Die Löschung von Fluoreszenz durch bestimmte Löschermoleküle oder auch Ionen spielt eine wichtige Rolle bei den hier vorgestellten Ergebnissen. Letztendlich wird τ_f bestimmbar über

$$\tau = \tau_f \cdot \Phi \quad (9)$$

(Galla und Müller 1988).

4.1.1.3 Quenching

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, kann die Quantenausbeute der Fluoreszenz stark durch die Anwesenheit zusätzlicher Ionen beeinflusst werden. Dabei ist zu unterscheiden zwischen einer Verstärkung der Fluoreszenz durch Elektronendichteverchiebungen, wenn Ionen mit dem Fluorophor wechselwirken, und solchen Einflüssen, bei denen ein Teil der Anregungsenergie strahlungslos auf die Löschermoleküle oder Quencher übertragen wird. Dies kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Die sogenannte dynamische Fluoreszenzlöschung wird durch Kollisionsprozesse der Moleküle hervorgerufen, die statische Fluoreszenzlöschung dagegen durch Komplexbildung von Fluorophor und Quencher. Beide Prozesse sind von der Konzentration des Quenchers abhängig. Wird die gesamte Anregungsenergie eines Moleküls unter Rückkehr in den Grundzustand abgegeben, kann das Molekül theoretisch von neuem angeregt werden. Wird der Energieeintrag dagegen so hoch, dass er zu Bindungsbrüchen im Molekül führt, beobachtet man einen irreversiblen Vorgang, der als Photobleaching bezeichnet wird. Dieses Problem wird vor allem bei Farbstoffen relevant, die in der Nähe des UV-Bereiches angeregt werden.

4.1.2 3D-Visualisierung der Biokomponente in der Silikatmatrix

Breite Anwendung für die Untersuchung biologischer Proben finden heutzutage Mikroskope mit Lasermodulen für den sichtbaren und nahen IR-Bereich (Hartmann et al. 1998, Stephens und Allen 2003). In der Regel wird die Exposition mit Licht größerer Wellenlängen aufgrund der geringeren Lichtenergie von lebenden Objekten besser toleriert als die Anregung im UV-Bereich. Inzwischen lassen sich lebende biologische Objekte mit Hilfe im nahen IR-Bereich durchstimmbarer Femtosekundenlaser (z.B. Titan-Saphirlaser Mira 900 der Fa. Coherent) unter Ausnutzung der 2-Photonenanregung unter verringerter Beeinträchtigung der Vitalfunktionen dreidimensional auflösen und darstellen.

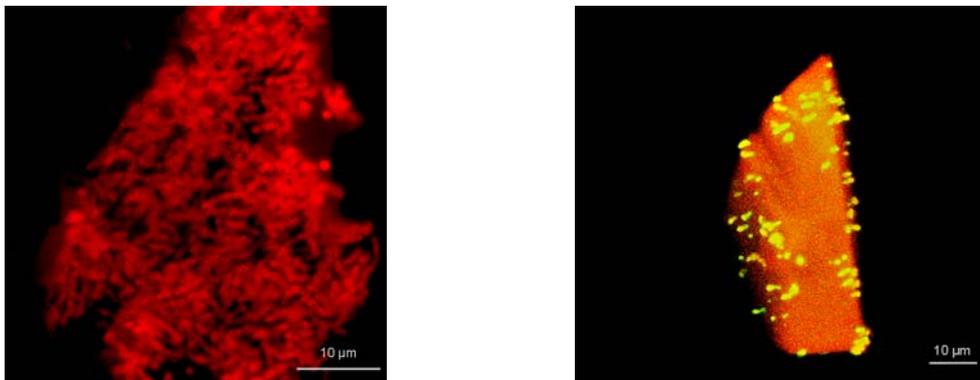


Abb. 4.1.2: Biocer-Bulkpartikel mit immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen. Die Biokomponente wurde mit Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester (TAMRA-SE, links) und SYTO9/Propidiumjodid (rechts) fluoreszenzmarkiert und mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop abgebildet. Die Anregungswellenlänge betrug 543 nm (TAMRA) bzw. 488 nm (SYTO9/Propidiumjodid).

Moderne cLSM erlauben z-Scans, also optische Tiefenschnitte in transparenten Medien von bis zu 200 µm. Die Schrittweiten, d. h. die Dicken der ausgewählten Fokusebenen können im 100 nm-Bereich liegen. Allerdings verringert sich damit die maximal mögliche Tiefe. Hier müssen also Kompromisse gemacht werden. Abb. 4.1.2 zeigt zwei Einzelbilder aus z-Stapeln zweier verschieden gefärbter Biocerpartikel. Wie anhand der Bilder ersichtlich, sind die Bakterien innerhalb der keramischen Matrix homogen verteilt und durch die gleichmäßige Beladung mit Farbstoff gut darstellbar. Bedingt durch die Porosität der Silikatmatrix und das Vorhandensein nicht kondensierter OH-Gruppen verbleibt allerdings in Abhängigkeit von der chemischen Struktur des jeweiligen Farbstoffs mitunter ein erheblicher Anteil in der Keramik, wie die Aufnahme Abb. 4.1.2 rechts am Beispiel der Lebend/Tot-Färbung mit SYTO9 und Propidiumjodid zeigt. Deshalb empfiehlt sich in den meisten Fällen ein Färben der Biokomponente vor dem Einbetten, wie links im Bild am Beispiel der Proteinfärbung mit TAMRA veranschaulicht. Die Fluoreszenzfärbung der Bakterien in Kombination mit der konfokalen Laserscanningmikroskopie zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Biokomponente

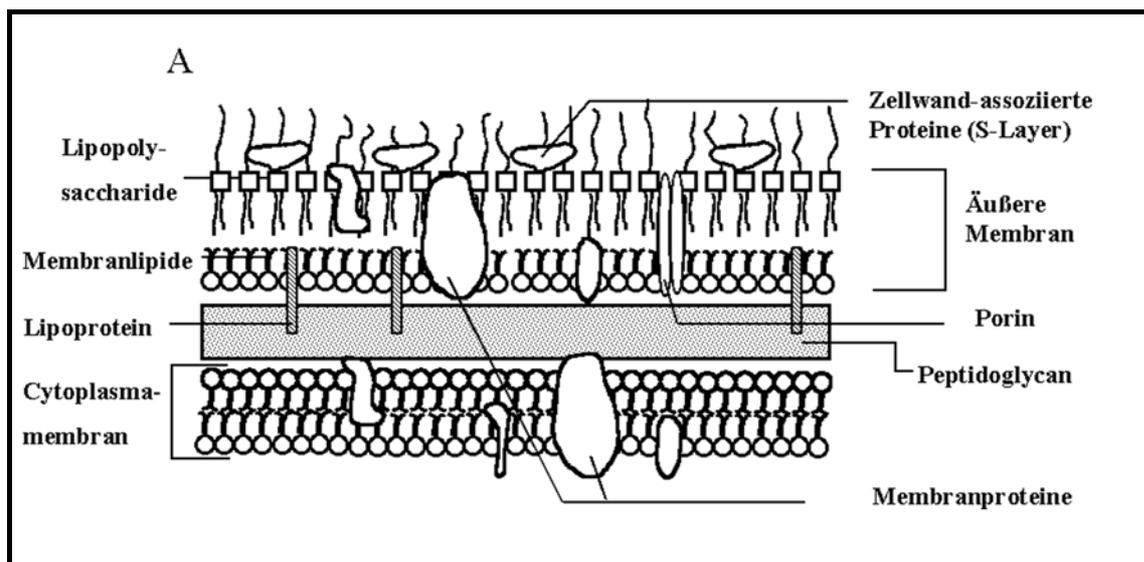
innerhalb von Biocerbulkmaterial hat sich unter den hier beschriebenen Bedingungen als empfehlenswerte und zeitsparende Methode bestens bewährt und bestätigt analoge Ergebnisse, die bei Untersuchungen an rekombinanten, fluoreszierenden *E. coli* Stämmen in dicken Sol-Gel-Schichten beschrieben wurden (Premkumar et al. 2002b). Mit relativ geringem Aufwand lassen sich so Aussagen zur Gefügeausbildung machen, die alternativ nur mit beträchtlichem Zeitaufwand und invasiven Präparationsmethoden über elektronenmikroskopische Aufnahmeverfahren erreichbar wären.

4.1.3 Charakterisierung der Vitalität der Biokomponente

Die bereits im vorigen Abschnitt erwähnte starke unspezifische Färbung der Matrix kann die Anwendbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen nach der Immobilisierung limitieren. Hinzu kommen diffusionsbedingte Ungleichmäßigkeiten bezüglich der Zugänglichkeit der Biokomponente bei größeren Bulkpartikeln, die zum Teil Durchmesser von mehr als 500 µm aufweisen. Deshalb wurden die Untersuchungen zum Einfluss der Immobilisierung auf die Vitalität der Bakterien an dünnen Schichten vorgenommen.

4.1.3.1 Prinzip der Lebend/Tot-Färbung

Intakte Bakterien besitzen eine rigide Zellwand, die aus mehreren Komponenten aufgebaut ist. Dabei unterscheiden sich Gram-positive und Gram-negative Bakterien in der Beschaffenheit und Dicke der einzelnen Schichten, wie in Abbildung 4.1.3.1 deutlich wird.



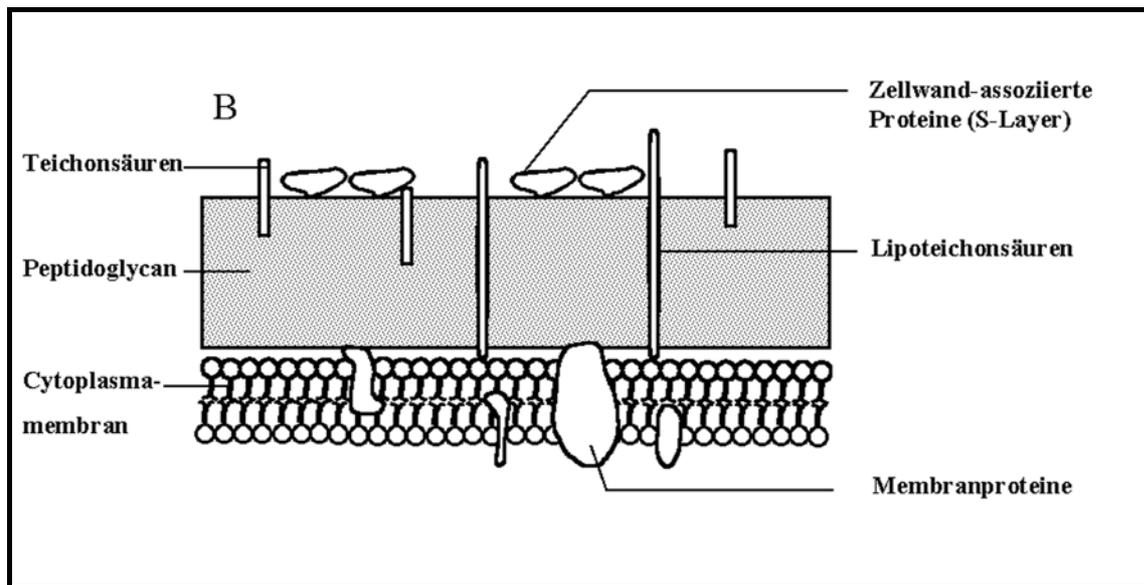


Abb. 4.1.3.1: Aufbau der Zellwand Gram-negativer (A) und Gram-positiver (B) Bakterien.

Neben der Cytoplasmamembran, die aus einer doppellagigen Lipidschicht besteht und das Cytoplasma der Zelle umschließt, enthält die bakterielle Zellwand eine Schicht Peptidoglycan, die bei Gram-positiven Zellen wesentlich dicker ausgeprägt ist und zusätzlich Teichon- und Lipoteichonsäuren sowie zellwandassoziierte Proteine enthält. Bei Gram-negativen Bakterien hingegen ist die Peptidoglycanschicht dünner, was auch für die unterschiedlichen Reaktionen bei der Gram-Färbung (s. Abschnitt 4.1) verantwortlich ist. Dafür weisen die Zellwände von Gram-negativen Bakterien eine Anzahl verschiedener zusätzlicher Schichten auf. Das Peptidoglycan ist dabei nach außen hin durch eine zusätzliche Phospholipidschicht abgeschirmt, die durchsetzt ist von einer Vielzahl verschiedener Ionenkanäle und Transmembranproteine. Die äußerste Lage bilden verschiedene Lipopolysaccharide. Die komplexe Strukturierung der Bakterienzellwand trägt den vielfältigen Funktionen, die diese zu erfüllen hat, Rechnung. Neben der rein mechanischen Aufgabe, der Aufrechterhaltung des Zellurgors und der Abschirmung des Zellinhaltes gegenüber dem umgebenden Milieu, muss die Bakterienzelle in der Lage sein, Stoffaustausch durchzuführen, mit benachbarten Zellen zu kommunizieren, auf Reize zu reagieren und sich zu verteidigen. Eine besondere Rolle bei allen genannten Aspekten kommt dabei den sogenannten S-Layern (surface layer) zu, die bisher bei mehr als 150 eubakteriellen Arten und über 40 Archea gefunden und in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden (Engelhardt 1988, Sára und Sleytr 2000). Diese metabolisch aufwendigen Syntheseprodukte der Zelle bilden als geschlossene Schicht die äußerste Grenze zwischen Bakterium und Umgebung. Obwohl viele Aspekte ihrer tatsächlichen Bedeutung noch hypothetischer Natur sind, wird eine multiple Funktionalität vermutet. Da vor allem bei Mikroorganismen in extremen Habitaten, wie heißen Quellen, stark radioaktiv, schwermetall-

oder salzbelasteten Umgebungen S-Layer nachgewiesen wurden, wird deren Expression als Anpassungsstrategie der Bakterien an besondere ökologische Bedingungen angesehen. Der einzigartige Aufbau dieser Proteinschicht korreliert mit entsprechenden herausragenden Eigenschaften, die sie zunehmend für biotechnologische, medizinische und industrielle Anwendungen interessant macht (Sleytr et al. 1993, Sára und Sleytr 1996, Sleytr et al. 1997, Sleytr et al. 1999). Trotz aller Unterschiede im Zellwandaufbau der verschiedenen Bakterienarten sind ihnen die Schutz- und Regulationsfunktion gemeinsam. Dies bedeutet, dass der In- und Efflux von Ionen und Molekülen strikt kontrolliert und limitiert abläuft. Fluoreszenzfarbstoffe sind deshalb oftmals nur unter bestimmten Bedingungen membrangängig, beispielsweise, wenn sie derivatisiert sind, aktive Aufnahmemechanismen der Zellen nutzen können beziehungsweise lipo- oder auch hydrophile Eigenschaften besitzen. Die Aufnahme rate ist stark abhängig vom Zelltyp und vom Membranpotential. Diesem Umstand liegt in gewisser Weise auch das Prinzip der sogenannten Lebend/Tot-Färbung (Live/Dead) zugrunde. Dabei werden die Mikroorganismen mit einem Gemisch zweier Farbstoffe versetzt, welche an Nukleinsäuren binden und sich in ihrer Membrangängigkeit unterscheiden. SYTO9 (λ_{ex} 480 nm, λ_{em} 500 nm) penetriert intakte Zellwände unter Anlagerung an doppelsträngige RNA oder DNA. Propidiumjodid (λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 635 nm) hingegen kann nur durch geschädigte, poröse Membranen in die Zelle eindringen und verdrängt dort aufgrund größerer Affinität den angelagerten Farbstoff SYTO9. Zellen mit intakter Membran fluoreszieren demzufolge grün, geschädigte rot. So lassen sich deren Anteile in der Population rasch und effektiv ermitteln. Der Begriff Lebend/Tot-Färbung ist hierbei etwas irreführend, da die Zellen nur hinsichtlich ihrer Membranbeschaffenheit unterschieden werden. Eine geschädigte Membran muss jedoch nicht zwangsläufig den Tod der Zelle bedeuten, andererseits können bereits abgestorbene Zellen durchaus für eine gewisse Zeit noch über eine intakte Membran verfügen. Diskutiert und allgemein akzeptiert ist die Verknüpfung der Bezeichnung „vital“ mit der Fähigkeit zur Zellteilung (Kell et al. 1998). Ungeachtet der Definitionsfragen ist die Lebend/Tot-Färbung inzwischen als ein schnelles und simples Mittel zur Charakterisierung von Mikroorganismenpopulationen im medizinisch-technischen Bereich, der Lebensmittelüberwachung oder Umweltmikrobiologie etabliert. Unter diesen Voraussetzungen sollte geprüft werden, inwieweit sich diese für Zellsuspensionen entwickelte Methode für die Einschätzung des Zustandes der Biokomponente nach dem Einbetten in die Silikatmatrix eignet.

4.1.3.2 Vitalität der Biokomponente nach der Immobilisierung

Die Kombination einer robusten keramischen Matrix mit fragilen Biokomponenten eröffnet umfangreiche Möglichkeiten zur Erzeugung innovativer Materialien mit neuen Eigenschaften.

Andererseits wird bei der Herstellung der Biokeramik die Biokomponente in verschiedener Hinsicht stark beansprucht. Beim Einsatz reiner Alkoxy-Precursoren wird bei der Hydrolyse eine erhebliche Menge Alkohol freigesetzt, der auf vegetative Zellen toxisch beziehungsweise auf Proteine denaturierend wirkt. Zusätzlich tritt während der Kondensation und nachfolgenden Trocknung eine in Abhängigkeit von der verwendeten Ausgangskomponente mehr oder weniger ausgeprägte Schrumpfung der Keramik ein, die zu Spannungen und schließlich zu Rissbildungen führen kann. Verschiedene Strategien zur Vermeidung solch unerwünschter Phänomene sind bereits entwickelt worden. Der Gehalt an Alkohol in der Lösung lässt sich durch Verwendung wässriger (verdünnter) Precursoren (Coiffier et al. 2001) und/oder durch Begasung der hydrolysierten Lösung mit Luft oder Stickstoff (Raff et al. 2003, Soltmann et al. 2003b) reduzieren. Alternativ oder begleitend dazu können dem Reaktionsgemisch konservierende Substanzen, wie Glycerol, Polyvinylalkohole oder Polyelektrolyte zugesetzt bzw. die Biokomponente darin eingebettet werden (Gill und Ballesteros 1998, Conroy et al. 2000, Diaspro et al. 2002, Nassif et al. 2002, Nassif et al. 2003). Eine übermäßige Schrumpfung kann einerseits durch Modifikation der alkoxidischen Precursoren über die Variation der organischen Substituenten oder durch Mischung verschiedener Alkoxide verhindert werden (Gill und Ballesteros 1998). Eine weniger praktikable Lösung ist die Einhaltung einer permanent feuchten Atmosphäre. Allerdings wurden damit Überlebensraten von immobilisierten *E. coli* von mehreren Wochen erreicht (Fennough et al. 1999, Fennough et al. 2000, Nassif et al. 2003). Soltmann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Esterase-Aktivität immobilisierter *B. sphaericus* JG-A12 Zellen in Biocer-Bulkpartikeln stark vom Trocknungsgrad abhängt. Mit dem folgenden Experiment sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß der Feuchtegehalt von dünnen Biocerschichten sowie die Lagertemperatur die Membranintaktheit der eingebetteten Bakterien beeinflussen.

Üblicherweise werden die dünnen Biocerschichten nach ihrer Herstellung (Kap. 3, Abschnitt 2.2) für 30 Minuten an der Luft hängend getrocknet. Parallel dazu wurden Schichten erzeugt, die sofort nach dem Aufbringen des Silica-Sols in verschließbare Gefäße mit einem feuchten Zellstoffbausch überführt wurden. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur oder bei 4 °C. In festgelegten Zeitintervallen wurde jeweils ein Exemplar entnommen und nach folgender Vorschrift gefärbt:

3 µl Farbstofflösung (1,67 mMol/l SYTO9; 18,3 mMol/l Propidiumjodid) in DMSO wurden mit 1 ml vollentsalztem Wasser versetzt und 100-200 µl davon auf die dünnen Biocerschichten aufgetropft. Nach fünf Minuten Inkubation unter Lichtabschluss wurden die Schichten kurz mit vollentsalztem Wasser gespült und mikroskopisch begutachtet. Dabei zeigte sich, dass bereits durch die Lufttrocknung für 30 Minuten die Membranen der gesamten Population

geschädigt werden. (Abb. 4.1.3.2 rechts). Wird die Schicht nach dem Aufziehen auf die Glasträger permanent feucht gehalten, entspricht das Verhältnis intakter zu geschädigter Zellen zwei Stunden nach der Immobilisierung in etwa dem der Bakteriensuspension (Abb. 4.1.3.2 links und Mitte).

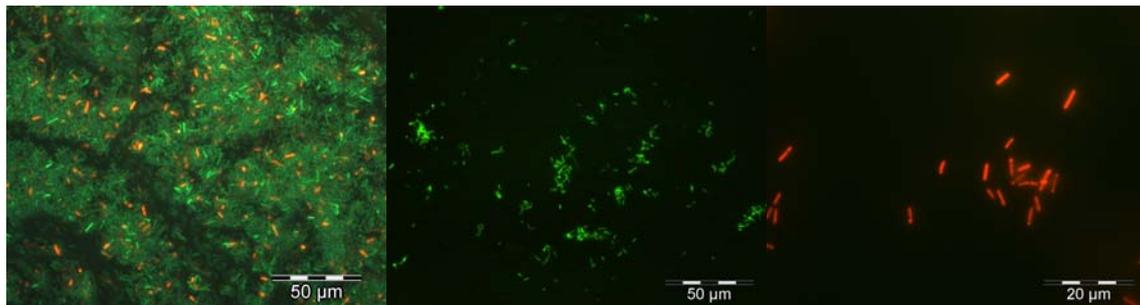


Abb. 4.1.3.2: Einfluss des Feuchtegehaltes dünner Biocerschichten auf die Membranintaktheit von immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen. *Links*: Fluoreszenzaufnahme der Bakteriensuspension vor dem Einbetten. *Mitte*: Fluoreszenzaufnahme einer dünnen, mit SYTO9 und Propidiumjodid gefärbten Biocerschicht nach 2 Stunden feuchter Lagerung bei Raumtemperatur. *Rechts*: Biocer nach 30 Minuten Lufttrocknung und 2 Stunden feuchter Lagerung.

Tab. 4.1.3.2: Einfluss von Feuchtegehalt und Lagertemperatur auf die Membranbeschaffenheit immobilisierter *B. sphaericus* JG-A12 Zellen.

Lagerzeit	Lagerbedingungen	intakte Zellen
frisch präpariert	feucht, Raumtemperatur	100 %
72 h	trocken, 4 °C	18 %
72 h	feucht, 4 °C	32 %
72 h	feucht, Raumtemperatur	17 %

Nach 72 Stunden Lagerung ist der Anteil der Zellen mit intakten Membranen in Abhängigkeit von Lagertemperatur und Feuchte deutlich reduziert (Tab. 4.1.3.2). Am günstigsten wirkte sich die feuchte Lagerung bei 4 °C aus. Hier konnten noch 32 % Zellen mit unversehrter Membran detektiert werden. Wesentlich ungünstiger dagegen erscheinen die trockene Aufbewahrung sowie höhere Temperaturen. Hier waren höchstens 18 % der Zellen noch intakt. Resümierend muss festgestellt werden, dass unter den gewählten Konditionen vegetative Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 in dünnen Biocerschichten für eine Lagerung unter Erhaltung der Vitalfunktionen nur sehr eingeschränkt geeignet sind. Eine interessante Möglichkeit zur Lösung dieses Problems bietet in diesem Fall die Einbettung von Sporen. Das Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 besitzt eine ausgeprägte Tendenz zur Sporulation (Raff 2002). Diese bakteriellen Dauerformen sind nahezu wasserfrei, besitzen eine äußerst widerstandsfähige Hülle und weisen keine Stoffwechselaktivitäten auf. Spektakuläre Untersuchungen zum Keimungsverhalten Jahrmillionen alter Sporen belegen zudem deren

ausgezeichnete Überlebensfähigkeit (Cano und Borucki 1995, Vreeland et al. 2000). Dieser Thematik wird später ein gesondertes Kapitel gewidmet.

4.2 Wechselwirkungen ionensensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in wässriger Lösung mit Cu^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+}

Wie bereits im Kapitel 4, Abschnitt 1.1.2 erwähnt, wird die Fluoreszenzausbeute eines Farbstoffes stark vom umgebenden Milieu beeinflusst. Darunter fallen auch kompetitive Vorgänge, wenn verschiedene in der Lösung vorliegende Ionen um die Bindungsstellen am Farbstoff konkurrieren. Deshalb wurde im ersten Teil abgeklärt, in welchem Maße verschiedene zweiwertige Metallkationen mit ausgewählten Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen in Anwesenheit von Ca^{2+} wechselwirken. Zu diesem Zweck wurden jeweils Farbstofflösungen mit einer Endkonzentration von $1 \mu\text{Mol/l}$ in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten und einem Zusatz von $10 \mu\text{Mol/l}$ CaCl_2 hergestellt. Diese fluoreszierenden Komplexe wurden nachfolgend mit Metallsalzlösungen aufsteigender Konzentrationen versetzt und die Fluoreszenz vermessen. Sowohl bei Calcium Orange als auch bei Oregon Green erwies sich Cu^{2+} als effektivster Quencher. Bereits bei einer Endkonzentration von 500 nMol/l (pH 5) verringerte sich die Fluoreszenzintensität um mindestens 50 % im Fall von Calcium Orange. Vergleicht man die beiden Quenchkurven (Abbildungen 4.2.1 und 4.2.2), wird offensichtlich, dass der Quencheffekt von Cu^{2+} an Oregon Green noch stärker ausgeprägt ist. Hier wurde die Fluoreszenz bei gleicher Kupfer-Konzentration und pH-Wert bis auf etwa 30 % des Ausgangswertes vermindert. Die Wirkung von Ni^{2+} und Co^{2+} auf Calcium Orange hingegen war schwächer. Überraschenderweise zeigte Ni^{2+} in wässriger 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{Mol/l}$ praktisch keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Oregon Green-Komplexes. Diese geringe Interferenz war unter anderem ein Kriterium für die Wahl von Oregon Green für die durchflusszytometrischen Einzelzellmessungen. Die Gründe für das unterschiedliche Quenchverhalten der untersuchten Metallionen an beiden Farbstoffen konnten anhand der Versuchsdurchführung nicht ermittelt werden. Ob als Ursache ein nichtlineares Verhalten zwischen Ionenkonzentration und Fluoreszenzsignal, spektrale Abweichungen im Emissionsmaximum oder andere Phänomene in Frage kommen, müsste in weiterführenden Untersuchungen abgeklärt werden.

In Abbildung 4.2.4 ist anhand der Reaktion von Newport Green mit Ni^{2+} ein Beispiel für die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität dargestellt. Der Farbstoff reagierte bei Anwesenheit von Ni^{2+} mit einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{Mol/l}$, d. h. dem fünffachen Überschuss. Danach trat ein Sättigungseffekt

ein. Deutlich zu sehen sind die geringer ausgeprägten Effekte bei niedrigeren pH-Werten. Weiterhin erbrachten die zellfreien Messungen, dass Newport Green mit Ca^{2+} -Ionen bis zu einer Konzentration von $500 \mu\text{Mol/l}$ nicht interferiert und somit dieser Farbstoff für die vorgesehenen Zellversuche als geeignet eingeschätzt wurde. In welchem Ausmaß die Pufferkapazität und -zusammensetzung eine Rolle im Quenchverhalten spielen, wird beim Vergleich der Kurven in Abbildung 4.2.2 und 4.2.3 vor allem für Nickel deutlich. Während in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung Nickel bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{Mol/l}$ keinerlei Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von Oregon Green zeigte, trat im MOPS-gepufferten System sogar eine signifikante Zunahme auf.

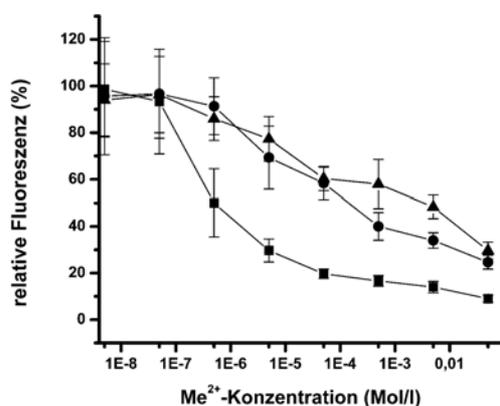


Abb. 4.2.1: Fluoreszenzintensitäten von $1 \mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange in Anwesenheit von $10 \mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■), Ni^{2+} (●) und Co^{2+} (▲) - Konzentration.

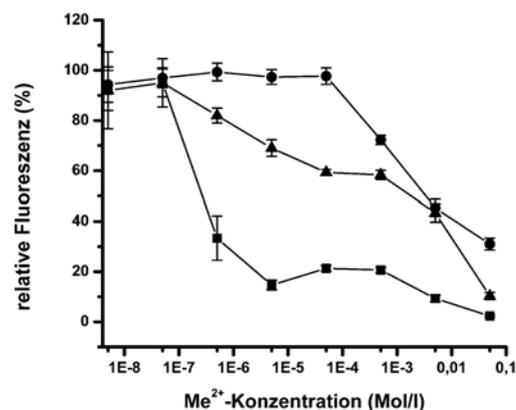


Abb. 4.2.2: Fluoreszenzintensitäten von $1 \mu\text{Mol/l}$ Oregon Green in Anwesenheit von $10 \mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■), Ni^{2+} (●) und Co^{2+} (▲) -Konzentration.

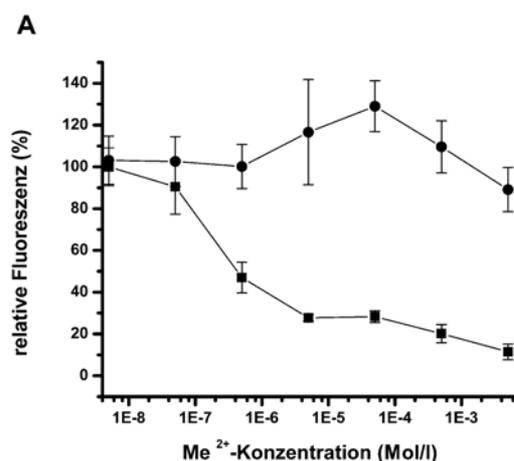


Abb. 4.2.3: Fluoreszenzintensitäten von $1 \mu\text{Mol/l}$ Oregon Green in Anwesenheit von $10 \mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 50 mMol/l MOPS-Puffer bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■) und Ni^{2+} (●) -Konzentration.

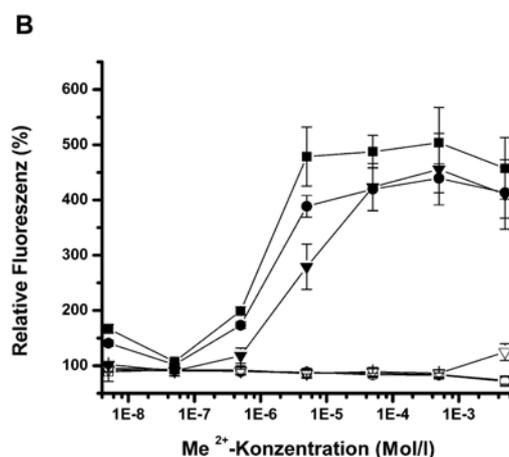


Abb. 4.2.4: pH-Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten von $1 \mu\text{Mol/l}$ Newport Green mit Ni^{2+} (geschlossene Symbole) und Ca^{2+} (offene Symbole) in 50 mMol/l MOPS-Puffer. Aufgenommen wurden die Werte bei pH 5 (▼), 6 (●) und 7 (■).

Die hier vorgestellten Befunde vermitteln einen groben Eindruck über die Variabilität des Systems und mögliche Einflussfaktoren. Es ist demzufolge zum einen unerlässlich, die Reaktion des Farbstoffes unter den jeweiligen konkreten Bedingungen auszutesten, zum anderen muss berücksichtigt werden, dass innerhalb lebender Zellen komplexere Bedingungen herrschen, die Einfluss auf die Fluoreszenzintensität haben können. Der Wert der Dissoziationskonstante als ein Schlüsselparameter für die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Ionenkonzentration ist in biologischen Systemen oft um ein Mehrfaches gegenüber der in zellfreien Lösungen erhöht. Die durchgeführten Tests geben lediglich einen Anhaltspunkt für die generelle Eignung der ausgewählten Farbstoffe zur Detektion von Kupfer und Nickel unter den vorgegebenen Bedingungen ohne nähere Charakterisierung der molekularen Prozesse.

4.3 Färbung lebender Bakterien mit ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen

4.3.1 Färbetechniken für intrazelluläre Anwendungen

Fluoreszenzfarbstoffe für intrazelluläre Anwendungen wurden ursprünglich für Untersuchungen an eukaryotischen Zellen entwickelt. Viele der Farbstoffe sind jedoch aufgrund ihrer molekularen Struktur in ihrer freien Säureform nicht membrangängig. Im Folgenden sollen einige physikalische oder biochemische Methoden zur Beladung lebender Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen benannt werden:

Elektroporation

Hierbei wird das biologische Präparat kurzen elektrischen Impulsen ausgesetzt, die zur Öffnung von Membranporen führen und dem Fluorophor die Diffusion in die Zelle ermöglichen (Bright 1996). Diese Methode wird üblicherweise angewendet, um sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Wirtszellen kompetent für die Aufnahme fremder DNA zu machen.

Mikroinjektion

Bei dieser Methode wird die Zelle mit Hilfe einer Mikrokanüle perforiert und das Fluorophor in die Zelle injiziert (Kass 1994). Diese Methode erfordert neben einem gewissen apparativen Aufwand ebenso präparatives Geschick. Abgesehen von der Tatsache, dass hierbei die Membran für kurze Zeit partiell zerstört wird, lässt diese Verfahrensweise jeweils nur die Beladung einer einzelnen Zelle pro Zeiteinheit zu. Somit erschwert beispielsweise die limitierte Anzahl zur Verfügung stehender gefärbter Zellen biochemische Analysen. Für Bakterienzellen, die in der Regel nur wenige Mikrometer Durchmesser aufweisen, ist diese Art des Farbstoffeintrags schon aufgrund der geringeren Dimensionen nicht anwendbar.

Patch clamp Infusion

Die von Erwin Neher und Bert Sakmann vor 30 Jahren entwickelte patch clamp Technik erlaubte erstmalig die Messung von Ionenströmen an einzelnen Membrankanälen. Mit Hilfe einer mikrofein ausgezogenen, mit Elektrodenflüssigkeit gefüllten Pipette aus Glas wird ein definierter Bereich auf der Zelloberfläche durch Anlegen eines leichten Unterdrucks von seiner Umgebung isoliert (sealing). Durch das Anlegen einer Spannung können so winzige elektrische Ströme gemessen werden, die durch den Transport von Ionen durch die geöffneten Kanäle hervorgerufen werden. Prinzipiell ist es auf diese Weise auch möglich, Fluoreszenzfarbstoffe in die Zelle einzuschleusen (www.iac-usnc.org/Methods/wholecell/). Allerdings gelten hier die gleichen Einschränkungen wie für die Mikroinjektion.

Hypoosmotischer Schock

Durch Erniedrigung der Ionenkonzentration im umgebenden Milieu der Zelle mittels Verdünnen oder Austausch des Mediums durch Wasser wird ein Konzentrationsgradient zwischen dem Zellinneren und der Membranaußenseite erzeugt, der zum Einstrom von Wasser in die Zelle führt. Auf diese Weise kann gelöster Farbstoff in die Zelle transportiert werden. Nachteilig bei dieser Technik ist die Erhöhung des Zellurgors, der durch die Zelle erst nach einer gewissen Zeitspanne zurückreguliert werden kann. Im ungünstigsten Fall kann das einströmende Wasser sogar zum Platzen der Zelle führen.

Einschleusen mit kationischen Liposomen

Eine elegante Variante zum Einschleusen nicht membrangängiger Farbstoffe stellt der Transport mit Liposomen dar. Farbstoffgefüllte Lipidvesikel fusionieren auf relativ simple Weise mit der Zellmembran und transportieren so den Farbstoff in die Zellen (Barber 1996). Allerdings ist die Menge an eingeschleustem Farbstoff oftmals gering. Außerdem wird mit dieser Technik fremdes Lipid in die Targetmembran eingetragen, was eine Änderung der ursprünglichen Membranzusammensetzung zur Folge hat.

Membranpermeabilisierung mit externem ATP

An verschiedenen eukaryotischen Systemen wurde bereits die permeabilisierende Wirkung externen Adenosintriphosphats (ATP) auf Zellmembranen beobachtet (Steinberg 1987). Vermutlich wirkt ATP als Ligand auf spezifische Membranrezeptoren, welche die Öffnung ionenselektiver Kanäle steuern, durch die wiederum verschiedene Farbstoffe in die Zelle eingeschleust werden können. Bedingt durch den geringen Durchmesser der Kanäle ist diese Methode jedoch begrenzt auf eine bestimmte Molekülgröße. Als kritisch bei dieser Art der Farbstoffbeladung ist darüber hinaus die Tatsache anzusehen, dass die Rezeptoren in An-

wesenheit von ATP die Freisetzung verschiedener relevanter Ionen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ oder K^+ , induzieren können, was zu unerwünschten In- und Efflux-Vorgängen führt.

Membranpermeabilisierung mit Säuren oder Chelatoren

Die säureinduzierte Farbstoffbeladung wird hauptsächlich bei Pflanzenzellkulturen angewendet. Dabei macht man sich zunutze, dass die Farbstoff-Moleküle an ihrem isoelektrischen Punkt, meist etwa bei pH 4,5, ungeladen vorliegen und somit die Zellmembran passieren können. Nachteilig dabei ist die sehr lange Färbedauer von mehreren Stunden, die zusammen mit dem unphysiologisch niedrigen pH-Wert diese Technik für viele Zellen ungeeignet macht (Read et al. 1992). Bei Gram-negativen Bakterien kann mitunter die Aufnahme lipophiler Farbstoffe in die Zelle durch externes EDTA ermöglicht werden (Gangola und Rosen 1987, Shapiro 2003).

Ladung mit membranpermeablen Derivaten

Die hier benannten, teilweise sehr drastischen und unphysiologischen Methoden stellen für die zu untersuchenden Objekte einen erheblichen Stress mit Auswirkungen auf die Zellregulation dar, der nicht selten zum Absterben der Zelle führt. Teilweise stehen auch die wesentlich kleineren Dimensionen von Bakterien der Anwendung solcher Techniken entgegen. Eine wesentlich elegantere Variante hingegen ist die Färbung mit nicht oder nur gering fluoreszierenden membrangängigen Farbstoffderivaten (Tsien 1981). Bei diesen liegen die Carboxylgruppen üblicherweise als Acetat oder Acetoxymethylester derivatisiert vor. Nach Durchtritt durch die Membran werden die Esterbindungen, wie in Abbildung 4.3.1 am Beispiel von Calcium Orange dargestellt, durch zelleigene Esterasen aufgebrochen und das eigentliche Fluorophor freigesetzt. Als freie Säure kann es nicht wieder durch die Zellmembran nach außen diffundieren. Diese Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen in einem geeigneten Puffersystem ab, wenn die Zelle über ausreichend Esteraseaktivität verfügt. Der freigesetzte ionensensitive Farbstoff reagiert nun innerhalb der Zelle mit dem jeweiligen Zielion unter Änderung der Fluoreszenzintensität. Bei der Bindung Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe an intrazelluläres Calcium wird in der Regel eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz detektiert. Als nachteilig bei dieser Art der Zellfärbung ist allerdings das Entstehen toxischer Spaltprodukte wie Formaldehyd und Essigsäure anzusehen. Um die schädigenden Auswirkungen auf die Zellen zu minimieren, sollte deshalb die Farbstoffkonzentration so gering wie möglich gewählt werden.

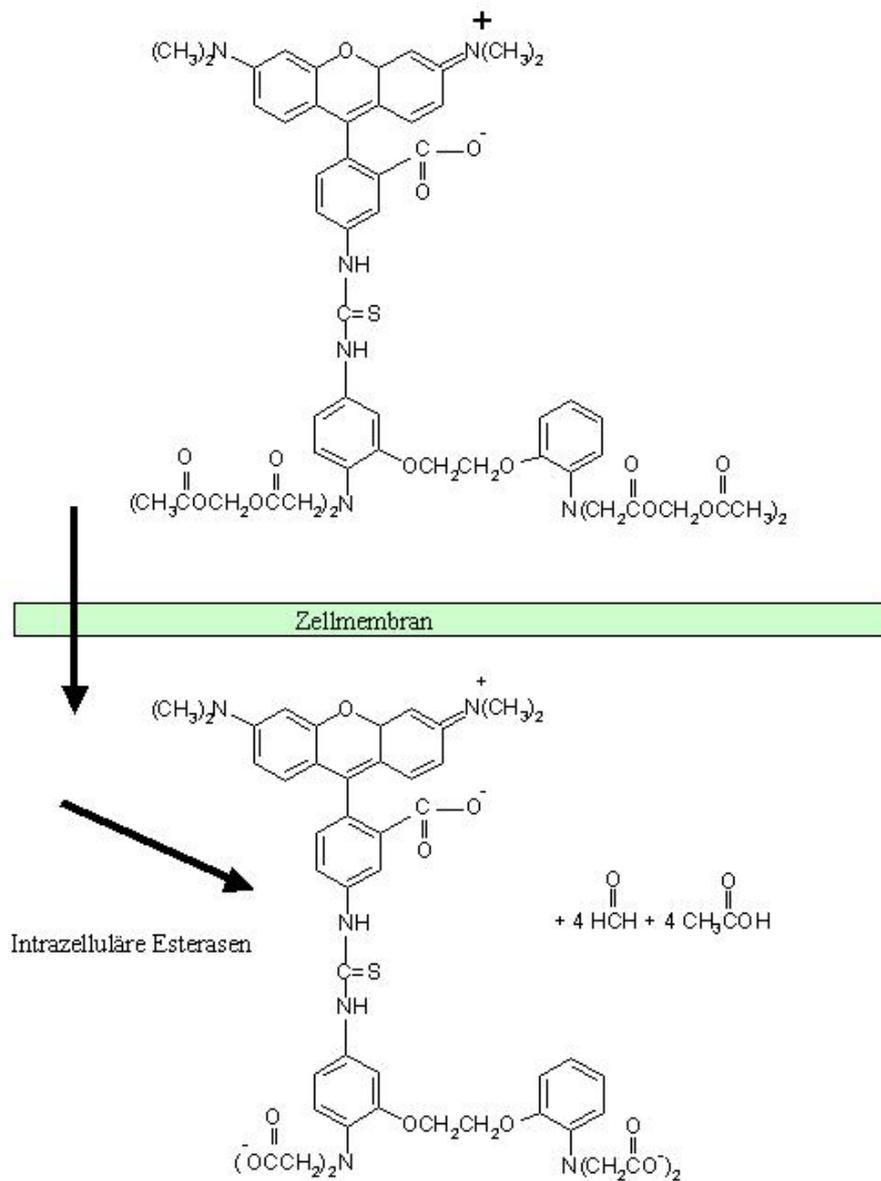


Abb. 4.3.1: Schematische Darstellung der Färbung bakterieller Zellen mit membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen, hier am Beispiel von Calcium Orange™ Acetoxymethylester.

4.3.2 Messungen mit hohem Probendurchsatz

Die Färbung von Bakterien mit membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen wurde bereits wiederholt erfolgreich praktiziert. In den letzten Jahren erschienen dazu eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich beispielsweise mit der Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Olsen et al. 2002, Breeuwer et al. 1996), Archaea (de Poorter und Keltjens 2001) oder Streptomyceten (Corvini et al. 2000) oder auch dem Nachweis reproduktiver Aktivität durch Aufnahme und aktivem Efflux von Carboxyflu-

orescein durch *Lactococcus lactis* befassten (Bunthof et al. 1999). Neu hingegen ist der Ansatz, mit Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen Wechselwirkungen zwischen anderen Metallionen und vitalen Bakterienzellen nachzuweisen. Da diesbezüglich in der Literatur auf keinerlei Erfahrungswerte zurückgegriffen werden konnte, wurde der Schwerpunkt zuerst auf die Auswahl des geeigneten Farbstoffes gelegt. Der ursprünglich zum Nachweis von intrazellulärem Calcium in Säugerzellkulturen entwickelte Farbstoff Calcium Orange erschien hier als besonders geeignet zur Detektion geringer Ca^{2+} -Ströme bei gleichzeitig niedriger Indikatorkonzentration. Calcium Orange formt mit Ca^{2+} einen 1:1-Komplex, wobei die Affinität des Farbstoffes zu Calcium mit steigender Temperatur und erhöhtem pH-Wert zunimmt (Eberhard und Erne 1991). Bereits bei pH 4,5 in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung erhöhte sich die Fluoreszenzintensität von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Farbstoff deutlich mit der Ca^{2+} -Konzentration zwischen 0 und 100 $\mu\text{Mol/l}$ (siehe Abb. 4.3.2).

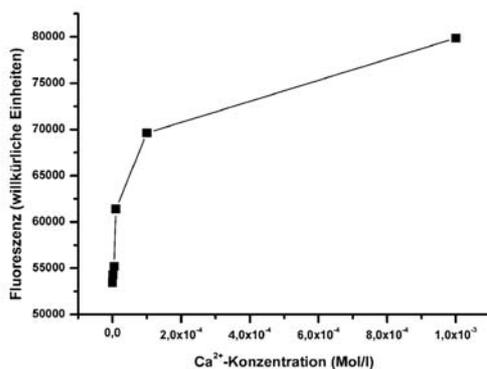


Abb. 4.3.2: Änderung der Fluoreszenzintensität von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium OrangeTM (freie Säure) in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration.

Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Ca^{2+} -Konzentration in diesem Bereich war eine wichtige Voraussetzung, da ausgehend von bekannten Werten für eukaryotische Zellen (etwa 0,1 $\mu\text{Mol/l}$) ein ähnlich geringer Ca^{2+} -Spiegel auch in den hier untersuchten Stämmen vermutet wurde. Darüber hinaus ließ die Anregungswellenlänge mit einem Maximum bei 551 nm im Gegensatz zu anderen Farbstoffen mit niedrigerer Anregungswellenlänge durch den geringeren Energieeintrag weniger nachteilige Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen erwarten.

In einer Serie von Vorversuchen wurde die Farbstoffkonzentration von 1 $\mu\text{Mol/l}$ als ausreichend ermittelt. Sowohl *B. sphaericus* NCTC 9602 als auch JG-A12 wurden jeweils als 4 h und 16 h alte Kulturen nach der Angleichung der optischen Dichte mehrere Stunden in 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange enthaltender 0,9 %-iger NaCl -Lösung gefärbt und in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert. Die 16 h alten Kulturen benötigten aufgrund ihrer geringeren metabolischen Aktivität 4 h für ein zufrieden stellendes Ergebnis, während für die jüngeren Kulturen in der Regel 1 bis 2 h ausreichend waren.

Ein durchaus bekanntes Phänomen stellt die aktive Extrusion von Farbstoffen aus metabolisch aktiven Zellen dar. Oftmals werden anionische Farbstoffe durch organische Ionentransporter und Acetoxymethylester durch den in vielen (vor allem eukaryotischen) Zellen exprimierten P-Glycoprotein-Multidrug-Transporter wieder ausgeschleust. Erste Anhaltspunkte für einen solchen Effekt lieferten im konkreten Fall Unterschiede im Färbeverhalten zwischen den beiden untersuchten Stämmen. Die Fluoreszenzintensität beim Haldenisolat JG-A12 war im Überstand ca. 1,8-fach gegenüber dem Referenzstamm erhöht. Da die Ester im Vergleich zur freien Säure bei den meisten Fluoreszenzfarbstoffen nur gering oder nicht fluoreszierend sind und unter den gegebenen Versuchsbedingungen von einem konstanten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt ausgegangen wurde, musste als mögliche Ursache ein Efflux des hydrolysierten Farbstoffes aus den Zellen in Betracht gezogen werden. Innerhalb der Zellen war die Fluoreszenz beim Referenzstamm um den Faktor 1,5 im Vergleich zum Haldenisolat erhöht. In vielen Fällen lässt sich dieser Efflux durch Zugabe entsprechender Hemmsubstanzen, wie Sulfinpyrazon oder Probenecid unterdrücken (Read et al. 1992, Haugland 2005, Takahashi et al. 1999). Entsprechende Versuche an den untersuchten Bakterienstämmen führten allerdings nicht zum Erfolg. Probenecid besitzt nur im neutralen pH-Bereich eine zufrieden stellende Löslichkeit und wirkt auf die Bakterien toxisch. Alternativ kann ein unerwünschter Farbstoff-Efflux unter Umständen auch durch Kühlung der Probe verhindert werden. Vergleichende Tests (die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3, Abschnitt 5.1 beschrieben) mit den hier aufgeführten Stämmen bei Raumtemperatur ergaben eine Extrusion des Farbstoffes bei beiden Stämmen (Daten nicht dargestellt). Am deutlichsten trat dieser Effekt bei 4 h-Kulturen von *B. sphaericus* NCTC 9602 bei einem pH-Wert von 5 auf, was sich durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen um 30 % innerhalb der ersten 30 Minuten bemerkbar machte. Gleichzeitig nahm die Fluoreszenzintensität im Überstand zu. Etwas geringer fiel dieser Effekt bei pH 6,2 aus (15 %). Das Haldenisolat JG-A12 zeigte in diesem Zeitraum keinen nennenswerten Farbstoff-Efflux. Bei Kulturen in der stationären Phase hingegen reagierte der Referenzstamm schwächer. Hier fiel besonders das Haldenisolat durch einen Efflux von ca. 15 % bei beiden getesteten pH-Werten auf. Unter strikter Kühlung der Proben ließ sich ein Farbstoff-Efflux bei allen Kulturen zumindest innerhalb von 30 Minuten effektiv verhindern. Sämtliche Quenchversuche mit Calcium Orange wurden daraufhin bei 4 °C durchgeführt. Andererseits muss dafür in Kauf genommen werden, dass aktive Aufnahmeprozesse in die Zelle hinein ebenso verhindert werden.

Wie aus Tabelle 4.3.2 ersichtlich, wurde die Calcium Orange-Fluoreszenz am effektivsten in 4 h alten Kulturen des Referenzstammes NCTC 9602 bei pH 5 durch Kupfer-Ionen unterdrückt. Signifikant weniger wurden dagegen die Zellen des Haldenisolats beeinflusst. Insgesamt schwächer fiel die Abnahme der Fluoreszenz bei beiden Stämmen

Tab. 4.3.2: Relative Fluoreszenzen von mit 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange gefärbte *Bacillus sphaericus* Zellen nach Zugabe von 100 $\mu\text{Mol/l}$ Metallchlorid in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung. Die Fluoreszenz von Zellsuspensionen ohne Metallchloridzusatz wurde als 100 % gesetzt.

Stamm	Kultivierungsdauer pH	16 h		4 h	
		NCTC 9602 (%)	JG-A12 (%)	NCTC 9602 (%)	JG-A12 (%)
Cu^{2+}	6.2	90 \pm 4.27	76 \pm 8.94	62 \pm 13.84	71 \pm 11.11
	5	77 \pm 5.18	71 \pm 8.55	46 \pm 7.38	59 \pm 5.71
Ni^{2+}	6.2	99 \pm 2.84	96 \pm 2.41	90 \pm 10.00	93 \pm 6.2
	5	92 \pm 4.91	99 \pm 3.46	93 \pm 5.18	90 \pm 8.63
Co^{2+}	6.2	91 \pm 8.41	91 \pm 2.26	91 \pm 6.53	89 \pm 5.67
	5	85 \pm 8.35	89 \pm 5.94	92 \pm 6.5	85 \pm 6.67

sowohl bei pH 6,2 als auch in der stationären Phase aus. Die Werte für Ni^{2+} und Co^{2+} zeigten erwartungsgemäß lediglich einen schwachen Quencheffekt, was hauptsächlich auf die geringere Affinität zum Farbstoff zurückzuführen ist. Anhand der gewonnenen Daten lässt sich lediglich feststellen, dass es offensichtlich Unterschiede zwischen beiden *Bacillus*-Stämmen im Hinblick auf ihre Reaktion gegen verschiedene Metallionen gibt, die abhängig sind vom Alter der Kultur und vom pH-Wert. Als nachteilig bei dieser Art der Versuchsdurchführung muss ungeachtet des großen Probendurchsatzes angesehen werden, dass es nicht möglich ist, Aussagen über die Membranintegrität der Zellen zu machen. Das Auftreten von Messartefakten kann so nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Schädigung der Zellwände kann zur Freisetzung des cytosolisch akkumulierten Farbstoffes und nachfolgend zu einer Überbestimmung des Quencheffektes durch Kupfer führen. Die Einzelzellmessung mit durchflusszytometrischen Methoden ist aus diesen Gründen unbedingt vorzuziehen.

4.3.3 Einzelzellmessungen

Da die Messungen im Plattenreader, wie bereits zuvor erwähnt, nur Ergebnisse mit orientierendem Charakter liefern, ohne die inhomogene Zusammensetzung bakterieller Populationen zu berücksichtigen, wurden zusätzlich Einzelzellmessungen mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt. Diese optischen Messgeräte wurden kommerziell ursprünglich für die klinische Diagnostik entwickelt, haben sich jedoch im Zuge der technischen Weiterentwicklung als geeignet zur Untersuchung mikrobiologischer Proben erwiesen. Unter Verwendung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe konnten so bereits eine Anzahl verschiedener Bakterien-

stämme und filamentöser Pilze (Bradner und Nevalainen 2003) hinsichtlich ihrer Membranbeschaffenheit oder metabolischen Aktivität (Virta et al. 1998, Hewitt et al. 1999, Suller und Lloyd 1999, Fuller et al. 2000, Novo et al. 2000, DeFlaun et al. 2001, Hornbæk et al. 2002, Hoefel et al. 2003a und b) charakterisiert werden. Die Option, simultan verschiedene strukturelle und funktionelle Parameter, wie beispielsweise Membranintegrität, Nukleinsäuregehalt, intrazellulärer pH-Wert, Zellgröße und –morphologie oder metabolische Aktivität innerhalb kurzer Zeitintervalle an einer großen Anzahl einzelner Individuen zu bestimmen oder auch Populationen nach diesen Kriterien zu sortieren, macht diese Technik gerade für die angewandte Mikrobiologie zunehmend attraktiv. Geringe Teilchengrößen, etwaige Neigung zur Aggregation oder die Komplexität des zu untersuchenden Systems sind allerdings Faktoren, die mitunter für die Versuchsdurchführung problematisch werden können. Mögliche Limitationen und Lösungsansätze sind in einer Reihe von Übersichtsarbeiten (Porter et al. 1996, Porter et al. 1997, Davey et al. 1999, Nebe-von-Caron et al. 2000, Porter und Pickup 2000, Shapiro 2000, Steen 2000, Katsuragi und Tani 2001) dargestellt und diskutiert worden. Insgesamt wird in diesen Arbeiten die Überlegenheit der Durchflusszytometrie für eine Vielzahl mikrobiologischer Fragestellungen im Vergleich zu anderen, konventionellen Methoden belegt.

Das Prinzip der Messung in einem Durchflusszytometer beruht auf der Belichtung eines Einzelzellstroms innerhalb einer dünnen Messzelle durch einen Laser (in Geräten für den Routinebetrieb meistens Argonionenlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$), der zur Messzelle im rechten Winkel steht. Die Vereinzelnung der Zellsuspension wird durch das Zusammenführen des Probenflüssigkeitsstroms mit einem Hüllstrom gewährleistet. Beide besitzen zwar den gleichen Brechungsindex, werden jedoch mit unterschiedlichem Druck geführt. Dabei wird der Probenstrom durch den stärkeren Hüllstrom zu einem dünnen Faden mit voneinander separierten Zellen auseinander gezogen, bevor er die Messzelle passiert. Detektiert werden das Vorwärtsstreulicht (forward scatter), das mit der Partikelgröße und dem Brechungsindex der Zellen korreliert, sowie das Seitwärtsstreulicht (side scatter), das mehr mit der Granularität und Strukturierung der Partikel korreliert. Diese Kombination aus Vorwärts- und Seitstreulicht ist für viele Zellarten in relativ engen Grenzen charakteristisch. Sie kann sowohl zum Abgrenzen verschiedener Zellarten voneinander als auch zur Abgrenzung von geschädigten Zellen verwendet werden. Fluoreszenzsignale werden ebenfalls rechtwinklig erfasst. Die Lichtsignale werden von Photomultipliern gesammelt und in elektrische Impulse umgewandelt, die nach Digitalisierung mit einer entsprechenden Software verarbeitet werden können. Die Schwierigkeit bei den hier vorgestellten Untersuchungen bestand in den geringen detektierbaren Lichtintensitäten. Bei herkömmlichen Geräten, die generell nicht für die Untersuchung solch kleiner Zellen wie Bakterien optimiert sind, liefern die Messungen absoluter Fluoreszenzintensitäten keine zuverlässigen Werte. Eine

Quantifizierung der Fluoreszenzsignale und eine Kalibrierung des Systems waren aus diesem Grund nicht möglich. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde deshalb das Versuchsregime auf die Erfassung relativer Änderungen oberhalb eines für jeden Einzelversuch definierten Schwellenwertes ausgerichtet. Für jedes individuelle Experiment wurde demzufolge die Zellfluoreszenz als Bandbreite zwischen 0 und 100% festgelegt, wobei nicht gefärbte Zellen als Negativwert herangezogen wurden, von denen nur jeweils höchstens 0,5 % bedingt durch Autofluoreszenz als „positiv“ detektierbar waren. In gefärbten Suspensionen mussten mindestens 10% der Zellen als „positiv“ eingeschätzt werden, um in die Auswertung einbezogen zu werden.

Entsprechend der gerätetechnisch zur Verfügung stehenden Laser wurden für die Untersuchungen der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff Oregon Green[®] 488 BAPTA-1 als Acetoxymethylester mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und der Nickel-spezifische Farbstoff Newport Green[™] DCF als membrangängiges Acetat mit einer Anregungswellenlänge von 505 nm verwendet (Abbildung 4.3.3.1).

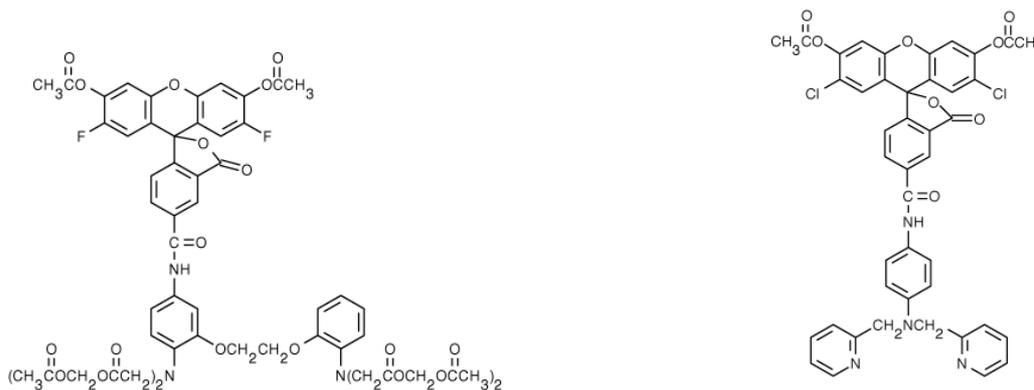


Abb. 4.3.3.1: Chemische Struktur von Oregon Green[®] 488 BAPTA-1 Acetoxymethylester (links) und Newport Green[™] DCF Diacetat (rechts).

Die Effizienz der Färbung mit Oregon Green war mit der für Calcium Orange vergleichbar. Oregon Green wies darüber hinaus ein günstigeres Retentionsverhalten in der Zelle auf. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte kein nennenswerter Efflux des Farbstoffes beobachtet werden. Getestet wurden gefärbte Bakteriensuspensionen von zwei Vertretern Gram-positiver Bakterien, *B. sphaericus* JG-A12 und dessen nächsten Verwandten NCTC 9602 und zum Vergleich ein Gram-negativer Bodenorganismus, *P. stutzeri* DSMZ 5190. Pseudomonaden als ubiquitäre Bodenorganismen sind bekanntermaßen ebenso wie Bazillen in der Lage, teilweise erhebliche Mengen an Schwer- und Übergangsmetallen zu fixieren. Bisherige Untersuchungen jedoch hatten überwiegend das Bindungsvermögen an der Zelloberfläche zum Gegenstand. Weniger dagegen ist über aktive Regulations- oder Abwehrmechanismen von Bakterien in Anwesenheit bestimmter Metallionen bekannt. Neben der Bindung toxischer Ionen an der Zelloberfläche sind verschiedene Bakterien auch in der Lage, Zellaufnahme und

Ausschleusung (Influx und Efflux) dieser Ionen aktiv zu regulieren und deren Gehalt innerhalb der Zelle auf einem tolerierbaren Niveau zu halten. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messungen sollten zwei Fragestellungen beantwortet werden. Zum einen wurde untersucht, ob die ausgewählten Metallionen von lebenden Bakterien aufgenommen werden, andererseits ließen die bisherigen Erkenntnisse vermuten, dass die Mikroorganismen in der Lage sind, auf die Anwesenheit von Schwer- und Übergangsmetallen mit einer Änderung ihres intrazellulären Calciumgehaltes zu reagieren. Dies ist für eukaryotische Zellen ein bekannter und wichtiger Weg der Zellregulation (Beyersmann und Hechtenberg 1997, Valko et al. 2005). Für prokaryotische Zellen ist er bisher noch wenig untersucht worden.

Newport Green als ein für Nickel spezifischer Fluoreszenzfarbstoff reflektiert direkt die Aufnahme von Nickel in die Zelle. Oregon Green hingegen detektiert die Änderung des frei verfügbaren intrazellulären Calciums und wird gleichzeitig durch die Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen gequench, wie durch die Messungen mit zellfreien Lösungen gezeigt wurde. Somit sind zwei gegenläufige Tendenzen zu bewerten.

Die gefärbten Zellsuspensionen wurden jeweils mit dem gleichen Volumen der entsprechenden Metallsalzlösung in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung (pH 6) unmittelbar vor der Messung und 30 Minuten später detektiert. Vergleichende Messungen zu späteren Zeitpunkten ergaben keine signifikanten Änderungen des Fluoreszenzsignals, sodass man nach 30 Minuten von einem stationären Zustand ausgehen kann. Um Messartefakte möglichst weitgehend auszuschließen, wurden aus den gefärbten Zellsuspensionen nur die Zellen analysiert, die die für die Zellart typische Kombination von Vorwärts- und Seitstreulicht aufwiesen. Zusätzlich wurden die gefärbten Zellsuspensionen mit 5 nmol/l TO-PRO-3 versetzt, um die Membranintegrität zu kontrollieren. Wie Propidiumjodid bei der Lebend/Tot-Färbung (siehe auch Kapitel 4, Abschnitt 1.3) dringt dieser DNA-Farbstoff nur durch geschädigte Zellmembranen und identifiziert nicht intakte Zellen durch rote Fluoreszenz. Die spektrale Charakteristik dieses Farbstoffes (642 nm Anregungswellenlänge) ermöglicht die simultane Messung mit Oregon Green und Newport Green ohne störende Interferenzen. Zellen mit positivem TO-PRO-3-Signal wurden bei der Messung nicht erfasst. Mit beiden Verfahren wurde sichergestellt, dass offensichtlich tote Zellen nicht in die Untersuchung von Ionenaufnahme und -ausschleusung einbezogen wurden.

Morphologie der Zellen

Die morphologische Beschaffenheit der Bakterien wurde durch Streulichtmessungen charakterisiert. In der sogenannten Dot-Plot-Darstellung vermittelt die Dichteverteilung der Punktwolke einen Eindruck über die Zusammensetzung der Zellpopulation in Bezug auf die Zellgröße und -oberflächenbeschaffenheit. Bei den untersuchten Suspensionen, die ausschließlich

in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden, zeigte sich die Population von *B. sphaericus* NCTC 9602 homogener in ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit als das Haldenisolat JG-A12. Dessen Zellen sind charakterisiert durch eine stärker ausgeprägte Varianz in Zelllänge und Wandbeschaffenheit.

Gelegentlich wurden in sich mehr oder weniger geschlossene, verhältnismäßig kleine Subpopulationen mit weniger strukturierter Oberfläche bei beiden *Bacillus*-Stämmen beobachtet.

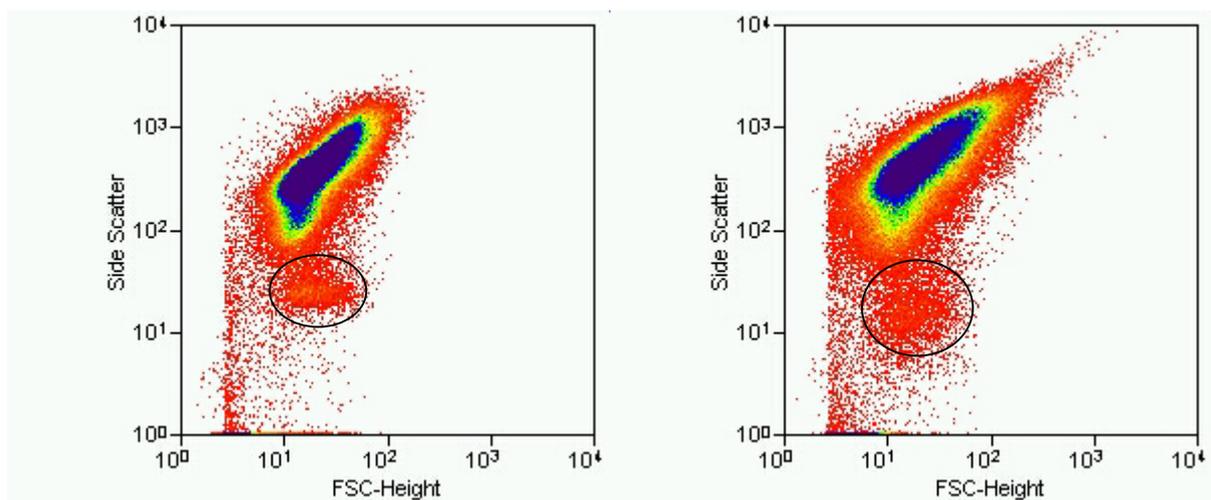


Abb. 4.3.3.2: Dot-Plot-Darstellung von Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-Streulicht (Side Scatter) an Zellsuspensionen von *B. sphaericus* NCTC 9602 (links) und JG-A12 (rechts). Jeder Punkt repräsentiert das Wertepaar für ein Individuum; eine hohe Punktedichte wurde zudem durch Farben kodiert. Deutlich abgesetzt von der Hauptpopulation, die hier blau erscheint, ist jeweils eine kleine Subpopulation (mit einem Kreis markiert) sichtbar.

Die Gründe für die abweichende Oberflächenbeschaffenheit dieser Subpopulation sind noch nicht bekannt und bedürfen einer gesonderten Untersuchung. Auf Grund der Tatsache, dass beide Stämme S-Layer-Proteine als äußerste Zellwandschicht besitzen, erscheint die Vermutung, dass es sich hierbei eventuell um Zellen ohne dieses Protein handelt, als durchaus wahrscheinlich. Da es sich nur um einen vergleichsweise kleinen Anteil der gesamten Zellpopulation handelt, wurden diese auffälligen Zellen bei den Messungen nicht berücksichtigt. In Abb. 4.3.3.2 sind beispielhaft zwei Kulturen der beiden Stämme dargestellt, bei denen die beschriebenen Merkmale besonders deutlich zu Tage traten.

Zusätzlich zu den bereits dargestellten Unterschieden im Habitus der beiden Bakterienstämme konnten auch verschiedene Reaktionen in Anwesenheit von Cu^{2+} und Ni^{2+} zum Teil in Abhängigkeit von deren Konzentration beobachtet werden. In Abbildung 4.3.3.3 sind die Plots für eine Messreihe von *B. sphaericus* JG-A12 mit Cu^{2+} und Ni^{2+} jeweils ohne Metall und im Vergleich dazu mit der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mMol/l dargestellt. Anhand dieser Plots wird deutlich, dass Cu^{2+} offensichtlich toxisch für die Zellen

wirkt, was sich in einer Abnahme der Population intakter Zellen besonders drastisch bei den beiden höchsten Konzentrationen äußert. Die starke Zunahme von kleinen Partikeln im unteren linken Quadranten des Dot-Plots mit einem verringerten side scatter-Signal deutet auf eine komplette Auflösung der Zellen hin. Eine Zunahme TO-PRO-3 positiver Zellen bei hohen Kupferkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden, jedoch eine Verschiebung des entsprechenden Fluoreszenzpeaks zu niedrigeren Werten hin (siehe Abbildung 4.3.3.4). Ob dieser Befund durch Wechselwirkungen des fluoreszierenden TO-PRO-3-DNA-Komplexes mit einströmenden Kupferionen bedingt ist, muss hier spekulativ bleiben, da in Kontrollexperimenten in zellfreien Lösungen dieser Effekt nicht validiert werden konnte.

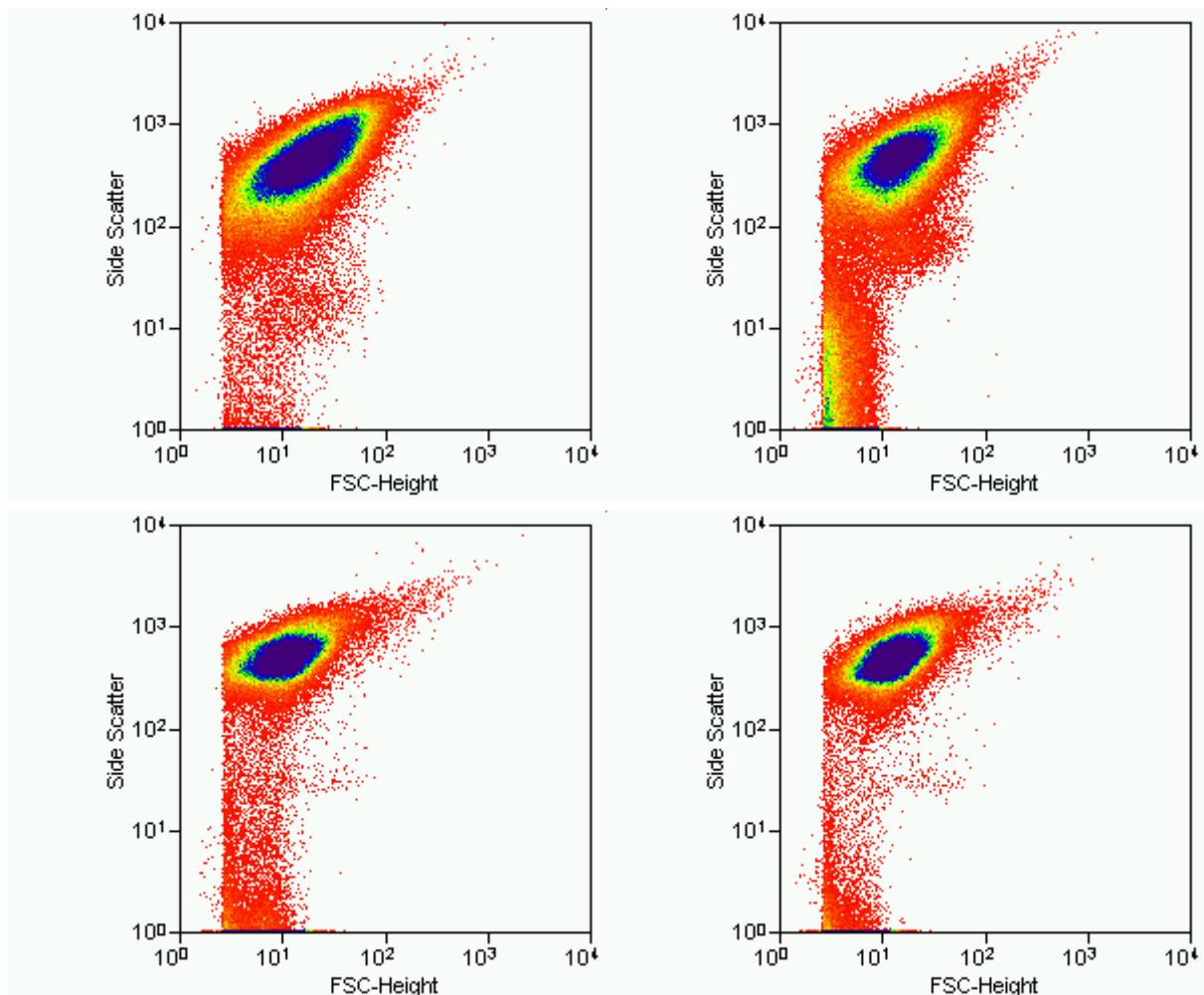


Abb. 4.3.3.3: Repräsentative Plots einer Messung von Vorwärtstreulicht (forward scatter = FSC-Height) und Seitstreulicht (side scatter) von *B. sphaericus* JG-A12 Zellen. Oben links dargestellt ist eine mit Oregon Green gefärbte 4 h alte Kultur ohne Zusatz von Cu^{2+} . Rechts davon ist die Population 30 Minuten lang 1 mMol/l Cu^{2+} ausgesetzt. Die unteren Abbildungen zeigen ebenfalls Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 links ohne und rechts mit 1 mMol/l Ni^{2+} nach 30 Minuten Inkubation.

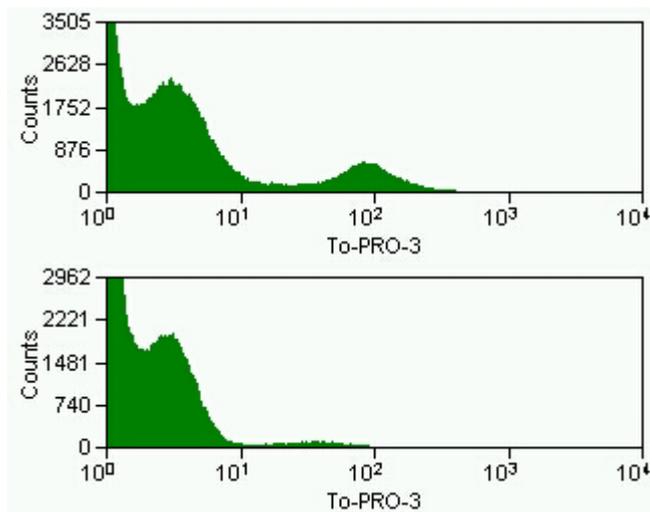


Abb. 4.3.3.4: Histogramm der Fluoreszenzintensitäten einer mit Oregon Green und TO-PRO-3 gefärbten Suspension von *B. sphaericus* JG-A12 ohne (oben) und in Anwesenheit von 1 mMol/l Cu²⁺ (unten).

Die Messergebnisse widerspiegeln somit das Verhalten des gegen Kupfer in den hier eingesetzten Konzentrationen unempfindlichen Anteils der Population. Die Präsenz von Nickel hingegen wurde von beiden *Bacillus*-Stämmen wesentlich besser toleriert. Bis hin zu einer 1 mM Nickellösung wurden keine Unterschiede in der Zellmorphologie festgestellt, was darauf hindeutet, dass Nickel nicht zu derart drastischen Störungen des Zellstoffwechsels führt, wie dies bei Kupfer der Fall ist.

Kupferaufnahme

Bei allen zytometrischen Messungen trat eine erhebliche Schwankungsbreite in der Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen sowohl innerhalb einer Population als auch zwischen den einzelnen Messungen auf. Die Befunde spiegeln zum einen die Heterogenität einer Zellpopulation als auch die Variabilität eines biologischen Systems insgesamt wider und decken sich mit den Beobachtungen an mit Calcium Orange gefärbten Zelle (s. auch Bild 5.1.1). Da die Messwerte nicht statistisch normalverteilt waren, wurden die Messergebnisse als Boxplots mit Medianen und Quartilen dargestellt. Wie in Abbildung 4.3.3.5 zu sehen, reagierten bereits unmittelbar nach Zugabe der Kupferlösung ab einer Cu²⁺-Konzentration von 1000 µMol/l alle Bakterienstämme mit einer Abnahme der fluoreszierenden Zellen auf 30 – 40 % des Anfangswertes. Im Bereich zwischen 0,1 und 500 µMol/l Cu²⁺ unterschieden sich die Stämme in ihrer Sofortreaktion. Bei einer Cu²⁺-Konzentration von 500 µMol/l zeigten beide *Bacillus*-Stämme deutlich geringere Anteile fluoreszierender Zellen gegenüber den Pseudomonaden, bei denen an diesem Punkt eine Zunahme fluoreszierender Zellen detektiert werden konnte. Nach 30 Minuten hingegen waren die Unterschiede zwischen den Bazillen ausgeglichen. Beide Stämme zeigten einen erhöhten Anteil fluoreszierender Zellen bis zu einer Kupferkonzentration von 50 µMol/l. Bei höheren Konzentrationen nahm der Anteil fluoreszierender Zellen stark ab. Einen wesentlich früheren Abfall in der Anzahl fluoreszierender Zellen zeigte

dagegen *P. stutzeri* DSMZ 5190. Nach einem leichten Anstieg in Anwesenheit von 1 und 5 $\mu\text{Mol/l}$ Cu^{2+} setzte bereits bei 10 $\mu\text{Mol/l}$ eine signifikante Verringerung der Fluoreszenzintensität gegenüber den Bazillen ein, was auf einen höheren intrazellulären Gehalt an Kupfer schließen lässt. Die Resultate lassen allerdings keine Rückschlüsse darüber zu, ob dies durch einen effektiveren Aufnahmemechanismus oder schnellere Diffusion durch die Gram-negative Zellwand bedingt ist.

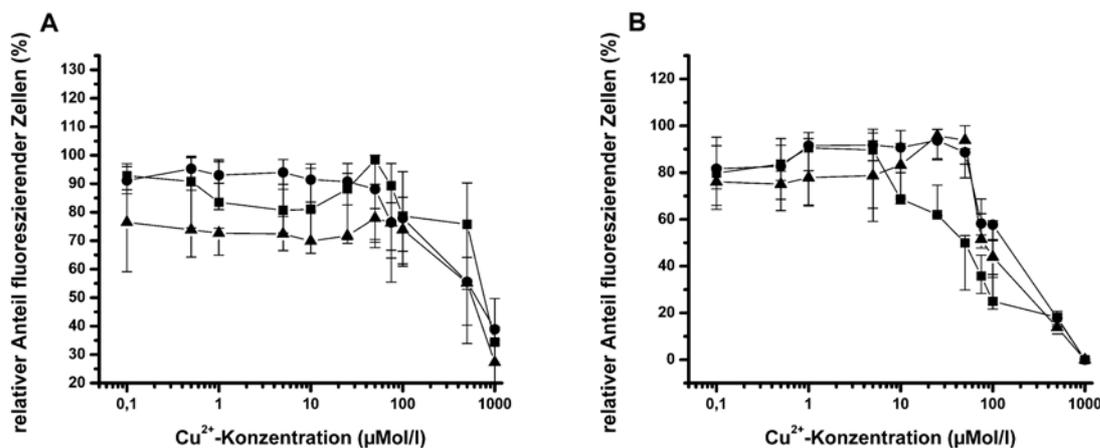


Abb. 4.3.3.5: Relative Fluoreszenzanteile mit Oregon Green gefärbter Zellen von *P. stutzeri* DSMZ 5190 (■), *B. sphaericus* JG-A12 (●) und NCTC9602 (▲) in Anwesenheit ansteigender Cu^{2+} -Konzentrationen in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung (pH 6) unmittelbar nach Zugabe (A) und nach 30 Minuten (B) Inkubation. Als Referenz dienen gefärbte Zellen ohne Zusatz von Kupfer. Dargestellt sind Median und Quartilen der ermittelten Werte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen.

Adaptation an Kupfer

Der Fluoreszenz-Anstieg im unteren Konzentrationsbereich kann nur durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration erklärt werden, da Cu^{2+} , wie bereits gezeigt wurde, als effektiver Quencher für Oregon Green wirkt. Eine weitere Farbstoff-Aufnahme ist unter den Versuchsbedingungen ebenfalls nicht möglich. Die Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels als wichtiger Prozess der Signalübertragung ähnlich wie bei Eukaryoten ist ebenso bei Prokaryoten durchaus denkbar. Dies vorausgesetzt, sollte ein etwaiger aktiver Regulationsprozess bei Bakterien möglicherweise modulierbar sein. Für *B. sphaericus* JG-A12 als Bodenisolat aus einer schwermetallbelasteten Umgebung wurde die Fähigkeit zur Adaptation an durch Kupfer induzierten Stress als durchaus wahrscheinlich angesehen. Vegetative Zellen von *B. sphaericus* und *P. stutzeri* sind in der Lage, verschiedene Schwer- und Übergangsmetalle, sowie Radionuklide in unterschiedlichen Konzentrationen zu tolerieren. So betragen beispielsweise die Minimalen Inhibierenden Konzentrationen (MIK) für Kupfer(II) beim Haldenisolat *B. sphaericus* JG-7B 8 mMol/l und beim Typusstamm *P. stutzeri* DSMZ 5190 sogar 10 mMol/l (Brottka 2003). Anhand der durchflusszytometrischen Experimente konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Stämme Konzentrationen bis zu 50 $\mu\text{Mol/l}$ Kupfer(II)-

Ionen ohne erkennbare morphologische Veränderungen tolerieren. Als Konsequenz dieser Überlegungen wurde nach der Anpassung der Zellen ein verändertes Regulationsverhalten erwartet, was sich durch Unterschiede im Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignal niederschlagen müsste. Für einen exemplarischen Test wurden sowohl das Isolat als auch der Referenzstamm NCTC 9602 in Nährmedium mit einem subletalen Zusatz von $10 \mu\text{Mol/l}$ Cu^{2+} kultiviert und im Vergleich mit kupferfrei kultivierten Zellen analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit Cu^{2+} -Ionen in aufsteigender Konzentration versetzt und ausgemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.3.6 dargestellt. Während der Referenzstamm keine Unterschiede in seiner Reaktion auf Kupfer zeigte, traten signifikante Unterschiede im Regulationsverhalten des Haldenisolats ohne und mit Kupferzusatz während der Kultivierung vor allem im Bereich zwischen 25 und $75 \mu\text{Mol/l}$ auf. Nach der Anzucht in Cu^{2+} -haltigem Nährmedium reagierten diese Zellen dort mit einem deutlich verringerten Fluoreszenzsignal, einem Hinweis auf eine erhöhte Cu^{2+} -Aufnahme. Welcherart zelluläre Veränderungen diesem Befund zugrunde liegen, kann anhand der hier vorgestellten Messungen nicht vorausgesagt werden. Sie liefern jedoch ein Indiz dafür. Ob Veränderungen an der Zellwand, die Expression ionentransportierender und/oder metallbindender Proteine eine Rolle dabei spielen, muss mit molekularbiologischen Methoden abgeklärt werden.

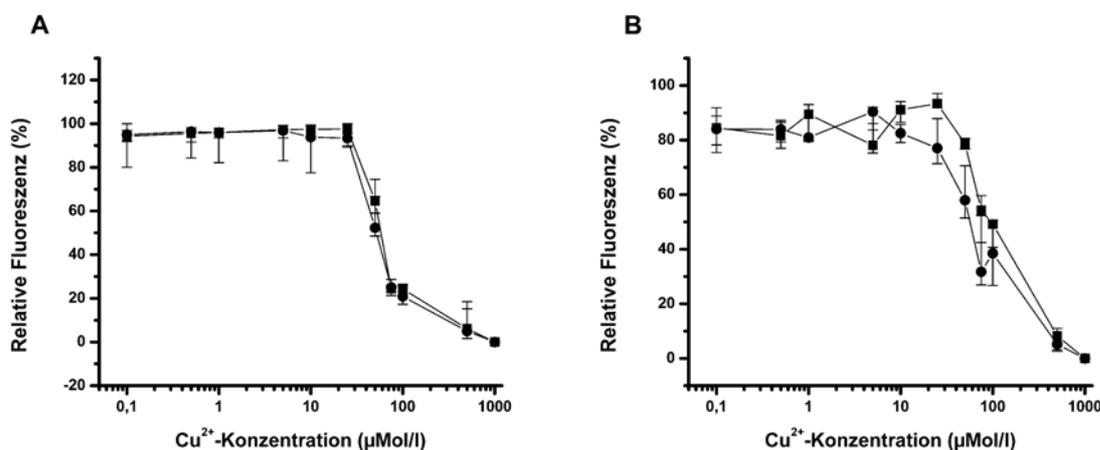


Abb. 4.3.3.6: Relative Fluoreszenzanteile Oregon Green gefärbter Zellen von *B. sphaericus* NCTC 9602 (A) und JG-A12 (B) ohne (■) und mit (●) Zusatz von $10 \mu\text{Mol/l}$ Kupfer im Nährmedium nach 30 Minuten Inkubation mit Cu^{2+} in aufsteigenden Konzentrationen.

Nickelaufnahme

Ein anderes Verhalten der Zellen wurde bei der Inkubation mit Nickel beobachtet. Da Nickel im niedrigen Konzentrationsbereich nicht mit Oregon Green interferiert, stellen die gemessenen Fluoreszenzsignale für diesen Farbstoff direkt die Stressantwort der Zellen auf die Anwesenheit von Nickel dar. Im Gegensatz zu Kupfer konnte die Nickel-Aufnahme mit dem Nickel-Farbstoff Newport Green auch direkt bestimmt werden. Dadurch war hier eine getrennte Untersuchung der beiden Reaktionen möglich. Die in Abbildung 4.3.3.7 dargestellten

Werte zeigen die Zellantwort von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 auf Nickel in steigenden Konzentrationen nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten. Abbildung A veranschaulicht anhand der Zunahme fluoreszierender, mit Newport Green gefärbter Zellen eine intrazelluläre Aufnahme von Ni^{2+} -Ionen. Den höchsten Wert zeigt das Haldenisolat bei

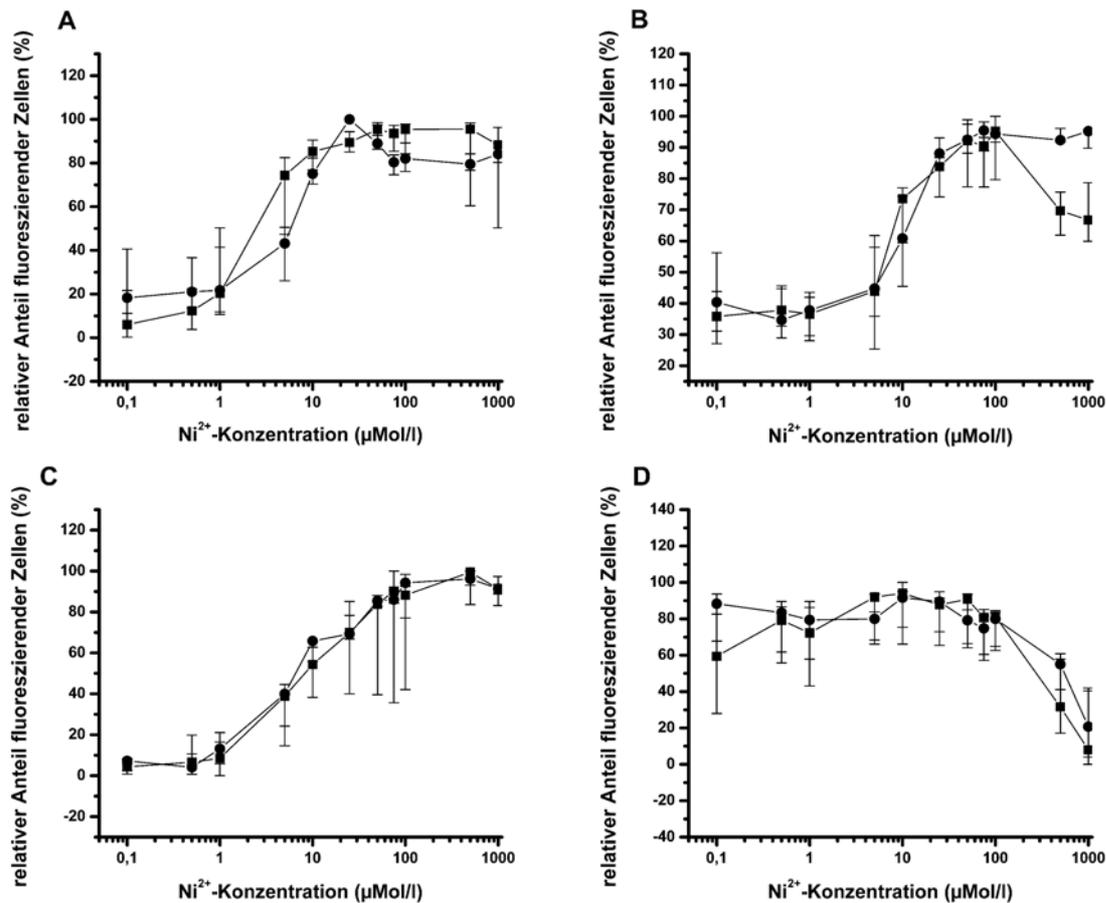


Abb. 4.3.3.7: Relativer Anteil fluoreszierender Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 (●) und NCTC 9602 (■) in der exponentiellen Wachstumsphase in Abhängigkeit von aufsteigenden Konzentrationen an NiCl_2 in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung (pH 6) nach 30 Minuten Inkubation. A) Newport Green, B) Oregon Green, C) Newport Green nach Fixation mit 2 % PFA, D) Oregon Green nach Fixation mit 2 % PFA.

einer Konzentration von 25 $\mu\text{Mol/l}$ Nickel in der Lösung. Steigt die Nickelkonzentration weiter an, ist die relative Anzahl fluoreszierender Zellen wieder geringer, was eine reduzierte Nickelaufnahme widerspiegelt. Die korrespondierende Kurve der Oregon Green gefärbten Zellen zeigt eine deutlich erhöhte Anzahl fluoreszierender Zellen, womit ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel repräsentiert wird. Oberhalb 100 $\mu\text{Mol/l}$ Nickel in der Lösung zeigen beide *Bacillus*-Stämme unterschiedliches Verhalten. Während *B. sphaericus* JG-A12 einen hohen Ca^{2+} -Spiegel beibehält und damit den Influx von Nickel-Ionen reguliert, fällt beim Referenzstamm NCTC 9602 der Ca^{2+} -Gehalt in der Zelle wieder ab, was im Vergleich

zum Isolat JG-A12 von einem erhöhten Einstrom von Nickel-Ionen begleitet wird. Um abzuklären, ob für diesen Nickel-Influx passive Diffusion oder aktive Prozesse verantwortlich sind, wurden in Kontrollversuchen Suspensionen der Bakterien nach der Farbstoff-Beladung mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend ausgemessen. Eine Regulation des Ca^{2+} -Gehaltes, der Nickel-Aufnahme oder Ausschleusung ist bei fixierten Zellen somit ausgeschlossen. Die veränderten Kurvenverläufe für beide Farbstoffe belegen, dass neben der passiven Diffusion von Nickel in die Zellen auch aktive Transportprozesse beteiligt sind.

4.4 Charakterisierung lagerfähiger dünner Schichten mit immobilisierten Sporen

4.4.1 Die bakterielle Endospore

Die Frage, warum einige Bakterien neben ihrem vegetativen Stadium unter bestimmten Bedingungen Endosporen als Dauerformen bilden, konnte bis heute nicht schlüssig geklärt werden. Mikroorganismen sind in diesem Zustand in der Lage, für ihr Überleben ungünstige Zeiträume zu überbrücken. Vor allem in kontaminierten Habitaten oder unter trockenen Bedingungen werden oftmals große Mengen bakterieller Sporen gefunden. Sie sind fast wasserfrei und verfügen kaum über Stoffwechselaktivitäten. Man spricht deshalb auch von einem „schlafenden“ Zustand (dormant state). Jüngste Arbeiten jedoch belegen, dass Sporen durchaus metabolisch aktiv sein können. So wurden zum Beispiel Sporen von marinen Bazillen gefunden, die Mangan oxidieren und präzipitieren (Francis und Tebo 2002). Die Tatsache, dass Endosporen bislang fast ausschließlich bei Gram-positiven Mikroorganismen gefunden wurden, widerlegt zudem die These, es handele sich bei der Fähigkeit zur Sporulation um einen evolutionären Vorteil. Im Gegensatz zu Pilzen, wo Sporen in großer Zahl zur Vermehrung gebildet werden, entsteht pro bakterieller Mutterzelle jeweils nur eine einzige Endospore, deren Aufgabe demzufolge nicht die Vermehrung ist (Williams 1952). Als ein möglicher Vorteil sporenbildender Bakterien kann die Ausbreitung durch die Luft angesehen werden. AFM-Untersuchungen an Pilzsporen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Zunahme an Oberflächen-Polysacchariden und einer drastischen Zunahme der Adhäsionskräfte auf der Oberfläche keimender Sporen, einhergehend mit einer erhöhten Neigung zur Aggregation. Das Fehlen jeglicher Adhäsionskräfte auf der hydrophilen Oberfläche schlafender Sporen begünstigt deren Verbreitung (Dufrêne et al. 2001b).

Trotz speziesspezifischer Unterschiede ist die bakterielle Sporulation eine generelle Stressantwort von Mikroorganismen auf ein bestimmtes Signal (Sonenshein 2000). In der Regel sind eine Limitation des Nährstoffangebotes, die Anwesenheit verschiedener Salze und das Erreichen einer kritischen Zelldichte sporulationsauslösende Faktoren (Williams et al. 1952, Curran und Evans 1954, White und Lotay 1980). Während des Zellwachstums steigt die Kon-

zentration an speziesspezifischen Signalmolekülen im Medium an, mit deren Hilfe Bakterien unter dem Begriff „quorum sensing“ ihre nähere Umgebung kontrollieren und die letztendlich für die Auslösung des Sporulationsprozesses verantwortlich sind (Sonenshein 2000).

Der Sporulationsprozess von Mikroorganismen ist charakterisiert als Abfolge integrierter biochemischer Prozesse, die unabhängig vom vegetativen Wachstum ablaufen und von verschiedenen, miteinander wechselwirkenden zelleigenen sowie Faktoren der Umgebung abhängig sind (Williams et al. 1952, Schmidt 1950, Sonenshein 2000).

Bakterielle Sporen, speziell der Gattung *Bacillus*, zeichnen sich gegenüber Zellen im vegetativen Stadium durch eine wesentlich höhere Resistenz gegen feuchte und trockene Hitze, UV- und radioaktive Strahlung, oxidierende Agenzien und andere Chemikalien, Enzyme, mechanische Zerstörung, Trocknung und hohen Druck aus (Evans und Curran 1960, Setlow 2000). Der Grad der Resistenz sowie auch die Keimungsfähigkeit scheinen dabei in gewissem Maße vom Gehalt an Ca^{2+} und damit konkurrierenden divalenten Metallionen in der Spore beeinflusst zu werden (Slepecky und Foster 1959, Rode und Foster 1966, Rowley und Levinson 1967, Murrell 1969). Unter günstigen Bedingungen können bakterielle Sporen sehr lange Zeiträume überdauern (siehe dazu auch Kap. 4, Abschnitt 1.3.2). Die Widerstandsfähigkeit der Sporen wird gewährleistet durch einen geringen Wassergehalt von 25 bis 35 % des Feuchtgewichts, die Bindung spezieller kleiner, säurelöslicher Proteine (SASP, **s**mall **a**cid-**s**oluble **p**roteins) an die Sporen-DNA (Setlow 2000), den geringen Gehalt an freien, divalenten Kationen und einen gegenüber der Mutterzelle niedrigeren internen pH-Wert von 6,3-6,4 (Setlow und Setlow 1980, Magill et al. 1994). Besonders charakteristisch für bakterielle Endosporen ist der hohe Gehalt an Ca^{2+} und 2,6-Pyridindicarboxylsäure (Dipicolinsäure) im Sporenkern. Üblicherweise enthalten Sporen 2-3 % des Trockengewichts an Ca^{2+} und 5-15 % Dipicolinsäure als 1:1 Komplex (Powell und Strange 1956, Powell und Strange 1957, Murrell 1969, Hogarth und Ellar 1978, Setlow 2000). Sporen bestehen aus verschiedenen Kompartimenten unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion. Wie in Abb. 4.4.1.1 dargestellt, bildet das Exosporium die äußerste Hülle bakterieller Sporen. Diese relativ lose anliegende, lamellare Schicht besteht hauptsächlich aus Polypeptiden, Lipiden und Kohlenhydraten. Bisher gibt es keine Hinweise auf eine Funktion dieser Schicht, die mit der besonderen Widerstandsfähigkeit von Sporen korreliert. Direkt darunter liegen die äußere, mittlere und innere Sporenhülle, die zu 60-80 % aus Proteinen, sowie in geringen Anteilen aus Lipiden und zum Teil phosphorhaltigen Kohlenhydraten bestehen. Dominierende Aminosäuren sind Glycin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Isoleucin, Histidin und Aspartat. Diese Hüllproteine sind sporulationsspezifische Genprodukte, die zu einem definierten Zeitpunkt von der Mutterzelle exprimiert werden. Die Sporenhüllen bilden eine effektive Barriere gegen verschiedene lytische Enzyme und Chemikalien (Kutima und Foegeding 1987, Moir 2003).

Benachbart zur inneren Sporenhülle liegt die äußere Vorsporenmembran. Inwieweit diese eine intakte Membran mit protektiven Eigenschaften ist, konnte noch nicht geklärt werden. Einen Großteil des Sporenvolumens nimmt der Cortex oder die Sporenrinde ein, der größtenteils aus Peptidoglycan (PG) besteht. Im Gegensatz zur vegetativen Zellwand ist das Sporen-PG weniger stark quervernetzt, weist keine Teichonsäuren auf und enthält Muraminsäure-Lactam sowie Muraminsäure-Alanin. Obgleich der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte, scheint der Cortex indirekt durch die Beteiligung an der Dehydratisierung des Sporenkerns zur Resistenz von Sporen beizutragen. Zwischen Cortex und Sporenkern liegen die Keimzellwand und die innere Vorsporenmembran. Die Keimzellwand besteht ebenfalls aus PG, jedoch mit einer Zusammensetzung ähnlich der vegetativer Zellen. Sie wird bei der Sporenkeimung zur eigentlichen Zellwand der entstehenden vegetativen Zelle. Die innere Vorsporenmembran stellt die wichtigste Permeabilitätsbarriere dar. Sie verhindert effektiv das Eindringen hydrophiler Moleküle in den Kern und die Freisetzung intern gespeicherter Substanzen. Den zentralen Teil der Spore nimmt der Kern ein, der die Sporen-DNA, Ribosomen, SASP und die meisten (inaktiven) Enzyme sowie das Depot an Dipicolinsäure und divalenten Kationen (hauptsächlich Ca^{2+}) enthält (Murrell 1969, Holt et al. 1975, Setlow 2000).

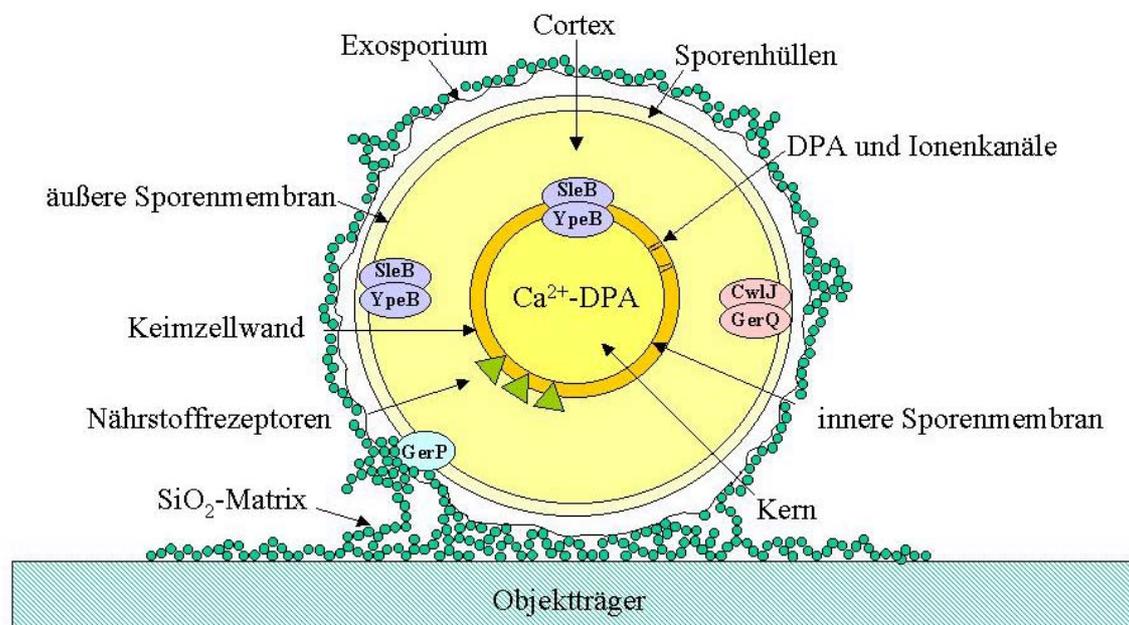


Abb. 4.4.1.1: Schematische Darstellung einer in einer dünnen Sol-Gel-Schicht immobilisierten bakteriellen Endospore (Sporenstruktur modifiziert nach Setlow 2003, mit freundlicher Genehmigung des Autors und Verlags).

Die Rückkehr zum vegetativen Stadium erfolgt durch externe Stimulation in mehreren Schritten. Üblicherweise geschieht dies durch die Anwesenheit von Nährstoffen, wie Amino-

säuren, Zucker oder Purinnukleoside (Iandolo und Ordal 1964, Foerster und Foster 1966, Moir 2003, Setlow 2003). Neben dieser physiologischen Keimungsinduktion können Sporen ebenso durch physikalische Behandlungen, wie erhöhten Druck (Paidhungat et al. 2002), mechanisches Abschleifen der Sporenhüllen (Rode und Foster 1960), Erhitzen (Rode und Foster 1959, Harper et al. 1964), Ultraschallbehandlung (Knaysi und Curran 1961), lytische Enzyme (Brown et al. 1982) oder chemische Induktoren, wie Komplexe aus Dipicolinsäure und divalenten Kationen, in erster Linie Ca^{2+} (Riemann und Ordal 1961, Iandolo und Ordal 1964, Jaye und Ordal 1965, Fields und Frank 1969), n-Dodecylamin (Rode und Foster 1961) und Salze (Foerster und Foster 1966) aktiviert werden.

Während der ersten Phase der Auskeimung steigt der intrazelluläre pH-Wert um ca. eine Einheit an, begleitet von einer Freisetzung von Protonen und monovalenten Kationen, wie K^+ und Na^+ (Swerdlow et al. 1981) und ist somit eines der frühesten nachweisbaren Ereignisse der Auskeimung, unmittelbar vor der Freisetzung von Dipicolinsäure und Ca^{2+} (Powell und Strange 1953, Scott und Ellar 1978).

Die Keimung von bakteriellen Sporen ist allgemein charakterisiert durch folgende Merkmale (Moir 2003, Setlow 2003):

- | | |
|-------------|--|
| Phase I: | Freisetzung von Kationen
Verlust des DPA-Pools, eines großen Teils Calcium und nicht dialysierbaren Polypeptids (Powell und Strange, 1953)
Partielle Rehydratisierung des Kerns
Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen bei Stresseinwirkungen, die Sporen nicht beeinträchtigen (Temperatur, Trocknung, UV- und Röntgenstrahlung, bakterizide Substanzen) |
| Phase II: | Cortexhydrolyse
Weitere Rehydratisierung des Kerns
Beginn enzymatischer Aktivitäten
Volumenzunahme des Kerns
Weiterer Resistenzverlust
Ende des dormant state |
| Auswachsen: | Metabolische Aktivitäten
SASP-Abbau
Synthese von Makromolekülen
Freisetzung aus den Sporenhüllen |

Aktuelle Arbeiten, die überwiegend an *B. subtilis* durchgeführt wurden, beschreiben zwei verschiedene Wege der Keimungsinduktion: einen durch ein 1:1 Chelat aus Ca^{2+} -DPA und einen „physiologischen“ durch Nährstoffe (Paidhungat und Setlow 2000). Der physiologische Weg wird über drei spezielle Nährstoff-Rezeptoren an der inneren Sporenmembran realisiert (Hudson et al. 2001, Setlow 2003). Diese Rezeptoren werden durch multiple Operons einer bestimmten Genfamilie codiert, die bisher bei allen untersuchten Sporenbildnern in mehreren Kopien nachgewiesen wurden (Paidhungat und Setlow 2000, Moir 2003, Setlow 2003). Jeder Rezeptor besteht aus drei verschiedenen Proteinen, jedoch ist bisher nichts über deren Stöchiometrie und Topologie sowie die möglichen Interaktionen der einzelnen Rezeptoren untereinander und der Funktion weiterer Proteine bekannt.

Die Cortexauflösung als wichtiger Teilschritt zu Beginn der zweiten Phase der Sporenkeimung wird durch die Wirkung zweier verschiedener lytischer Enzyme, CwlJ und SleB, gewährleistet. Während beide zusammen für die Hydrolyse des Cortex bei der physiologischen Keimung benötigt werden, kann CwlJ durch externes Ca^{2+} -DPA aktiviert werden und allein zu einer unphysiologischen Keimung führen (Paidhungat et al. 2001). Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen werden die in Abb. 4.4.1.2 skizzierten Abläufe im Prozess der Sporenkeimung angenommen:

Bei Anwesenheit geeigneter Nährstoffe werden nach deren Diffusion durch die Sporenhüllen und den Cortex die zuständigen Rezeptorproteine auf der inneren Membran besetzt und die Freisetzung von endogenem Calcium und DPA durch entsprechende Kanäle in der inneren Sporenmembran induziert. Diese als Stadium I bezeichnete Phase der Keimung führt noch nicht zu vegetativen Zellen. Im weiteren Verlauf wird auf noch nicht vollständig geklärten Weg CwlJ in den Sporenhüllen aktiviert, einhergehend mit anschließender Cortexhydrolyse und einer Rehydratisierung des Kerns. Diese Aktivierung ist alternativ erreichbar durch extern zugefügtes Ca^{2+} -DPA. Denkbar, wenn auch noch nicht schlüssig bewiesen, ist in diesem Fall zusätzlich eine positive Rückkopplung der Cortex-Hydrolyse auf die Freisetzung von endogenem Ca^{2+} -DPA, welches wiederum zu einer weiteren Stimulierung von CwlJ führt. Das zweite lytische Enzym SleB in *B. subtilis* sitzt vermutlich zwischen Sporenhüllen und Cortex sowie in der inneren Sporenmembran. Seine Aktivierung hängt zum einen von der Bindung von Nährstoffen an die entsprechenden Rezeptoren (Membranfraktion) und zum anderen von Stresseinflüssen auf den Cortex im Zusammenhang mit der Rehydratisierung des Kerns (Cortexfraktion) ab (Paidhungat et al. 2001, Moir 2003, Setlow 2003). Beide lytischen Enzyme treten gepaart mit weiteren Proteinen auf, die dem Anschein nach als Ankermoleküle dienen und für die korrekte Positionierung sowie die Funktionalität der Enzyme verantwortlich sind (Ragkousi et al. 2003, Setlow 2003). Die

bisherigen Arbeiten verdeutlichen die sehr komplexe und dynamische Natur des Prozesses der Auskeimung bakterieller Sporen. Viele der beteiligten einzelnen Elemente können aufgrund zu geringer Konzentrationen oder Zeitintervalle nur mit molekularbiologischen Methoden detektiert werden. Es wird vermutet, dass noch weitere Proteine mit unterschiedlicher Funktion (z. B. als Ionenkanäle oder Transporter) involviert sind. Bereits bewiesen ist die Existenz der sogenannten GerP-Proteine, die zumindest teilweise einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Permeabilität der Sporenhülle und somit auf den Transport von Nährstoffen zu den Rezeptoren ausüben (Behravan et al. 2000, Setlow 2003).

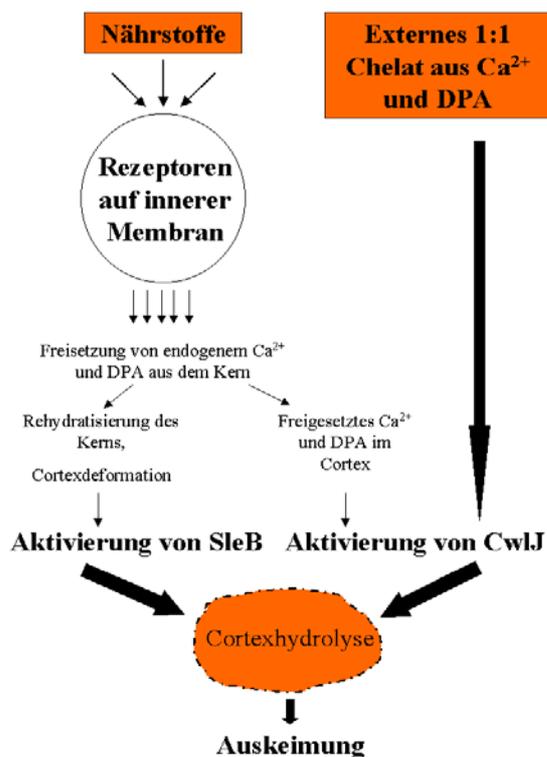


Abb. 4.4.1.2: Schematische Darstellung der Keimungsinduktion von *B. subtilis* Sporen in Anwesenheit von Nährstoffen und Ca^{2+} -DPA (nach Paidhungat et al. 2001, mit freundlicher Genehmigung des Autors und Verlags).

4.4.2 Keimungsverhalten von Sporen in der Durchflusszelle

Inkubation mit NB-Medium

Die im Kapitel 4.1.3.2 bereits beschriebene unzureichende Lagerfähigkeit immobilisierter vegetativer Bakterienzellen in dünnen Sol-Gel-Schichten limitiert von vornherein mögliche technische Anwendungen. Eine vielversprechende Möglichkeit, dieses Problem zu beheben, ist die Einbettung bakterieller Dauerformen, der Endosporen. Da Sporen praktisch kein Wasser mehr enthalten und keinerlei Stoffwechselaktivitäten aufweisen (dormant state), ergibt sich eine interessante Option zur Erzeugung lagerfähiger Schichten ohne Berücksichtigung einer notwendigen Versorgung mit Nährstoffen. Zur Bewertung der Keimfähigkeit immobilisierter Sporen wurden wässrige TEOS Sol-Gel-Schichten ohne Zusätze und Schichten, die zusätzlich 20 % Sorbit zur Erhöhung der Porosität enthielten, erzeugt. Die Lagerung der Schichten erfolgte entweder trocken bei Raumtemperatur oder feucht bei 4 °C. In ersten durchgeführten Untersuchungen mit Inkubation der Schichten in Schüttelkolben mit NB-Medium über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen konnten jedoch keine nennenswerten Keimungsraten und keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen erzeugten Schichten nachgewiesen werden (eigene Untersuchungen und persönl. Mitteilung von U. Soltmann). Zur exakteren Kontrolle wurde deshalb die Inkubation der Schichten mit Nährmedium in einer Durchflusskammer unter permanenter mikroskopischer Kontrolle vorgenommen. Die Keimungsfähigkeit der Sporensuspension wurde zuvor mit Hilfe des sogenannten CFU-Tests (colony forming units) nach Ausstrich eines definierten Volumens mit bekannter Sporenkonzentration auf NB-Agarplatten überprüft. Auf diese Weise lässt sich der Anteil Sporen ermitteln, der in der Lage ist, auf der Agaroberfläche Kolonien zu bilden. Es zeigte sich in zahlreichen Parallelversuchen, dass die Auskeimungsrate immobilisierter Sporen bei 24 h Inkubation mit NB-Medium bei Raumtemperatur im Mittel unter 5 % (Auswertung lichtmikroskopischer Aufnahmen) beziehungsweise 20 % (rasterelektronenmikroskopische Auswertung) lag, obwohl die reine Sporensuspension zu über 90 % keimungsfähig war. Die Beurteilung der Keimungsrate der immobilisierten Sporen gestaltete sich insgesamt schwieriger als bei Sporen in Suspension. Bedingt durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops waren insbesondere Veränderungen der Sporen in der frühen Keimungsphase nur sehr schwer festzustellen. In Untersuchungen an Sporensuspensionen verschiedener *Bacillus* Spezies und Clostridien, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts vorgenommen wurden (Rode und Foster 1960, Riemann und Ordal 1961, Jaye und Ordal 1965), diente die Veränderung des Brechungsindex als Indiz für die Auskeimung. Nach der Immobilisierung in dünnen Schichten hingegen waren Veränderungen in den lichtbrechenden Eigenschaften im

Phasenkontrast kaum zu quantifizieren. Deshalb wurden die Schichten nach der lichtmikroskopischen Untersuchung zusätzlich rasterelektronenmikroskopisch begutachtet. Die Gegenüberstellung der Keimungsraten, die mit Hilfe dieser beiden Methoden ermittelt wurden, macht die Problematik anschaulich (Abb. 4.4.2.3). Die Werte der lichtmikroskopischen Auswertung lagen generell niedriger als die rasterelektronenmikroskopisch ermittelten und sind ein Ausdruck für die Anwendung unterschiedlicher Kriterien. Lichtmikroskopisch erfasst wurden nur die Veränderungen, die mit einer deutlichen Änderung des Brechungsindex der Sporen einhergingen, d. h. bis zum vegetativen Stadium auswachsende sowie sich lösende Zellen. Im Rasterelektronenmikroskop hingegen ließen sich auch sehr frühe Stadien der Auskeimung feststellen. Als erste morphologische Veränderung war eine charakteristische Einstülpung der Sporen ohne Volumenvergrößerung zu beobachten (Abb.4.4.2.1 A). Die daran anschließende Quellung oder Rehydratisierung der Spore ging mit einer Volumenvergrößerung und Änderung der Geometrie einher, die zur partiellen Rissbildung in der Sol-Gel-Schicht führte (B). Die Rissbildung ermöglichte wiederum das freie Auswachsen der entstehenden vegetativen Zelle (C) bis hin zur Ablösung vom Substrat. Die Gelschicht selbst zeichnete sich durch eine respektable Stabilität aus. Nach der Freisetzung der Bakterienzelle verblieb innerhalb der Schicht lediglich ein „Negativabdruck“ der ursprünglichen Spore (D). Diese Stabilität war auch nach Induktion der Keimung durch Ca^{2+} -DPA gewährleistet.

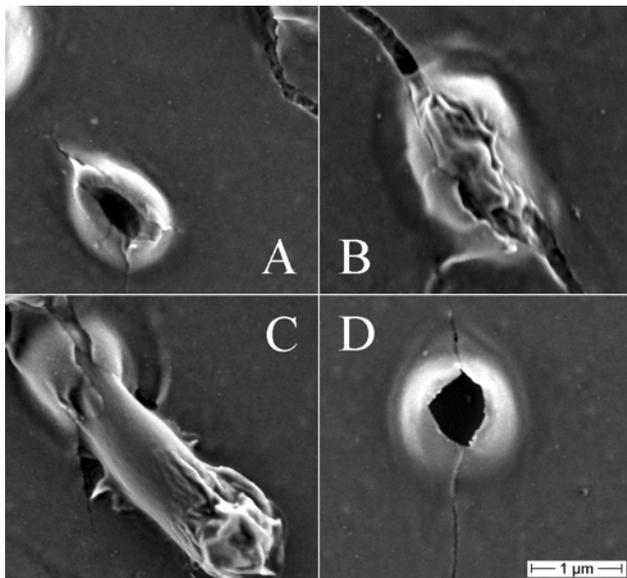


Abb. 4.4.2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Keimungsstadien in dünnen Sol-Gel-Schichten immobilisierter Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach Aktivierung mit Ca^{2+} -DPA. A) Einstülpung in der frühen Keimungsphase, B) quellende Spore, Silica-Layer wird teilweise aufgebrochen, C) auswachsende, vegetative Zelle, D) Silica-Schicht nach Zellfreisetzung (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society).

Vorinkubation mit Ca^{2+} -DPA

Um die Keimungsrate der immobilisierten Sporen zu erhöhen, wurden die Schichten mit einem 1:1 Chelat aus Ca^{2+} und 2,6-Pyridindicarboxylsäure (Dipicolinsäure) 1 h lang vorinkubiert. Dieses Chelat ist ein charakteristischer Zellbestandteil in Sporen. An verschiedenen *Bacillus* und *Clostridium* Spezies wie auch an *Sporosarcina ureae* wurde nachgewiesen, dass der Gehalt an Dipicolinsäure in der Spore zwischen 5 und 15 % der Trockenmasse beträgt und mit 1 bis 3 % Calcium korreliert. Beide Komponenten sind in derselben Sporenregion lokalisiert (Murrell 1969) und werden bei der Auskeimung freigesetzt (Powell und Strange 1953, Scott und Ellar 1978). Umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von Ca^{2+} -DPA bei der Auskeimung von Sporen führten zur Erkenntnis, dass die Freisetzung des Komplexes bereits in einem sehr frühen Stadium geschieht und einen induzierenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Keimung ausübt. Dieser Effekt kann ebenso durch externe Stimulation der Sporen mit einem 1:1 Chelat aus Ca^{2+} und 2,6-Pyridindicarboxylsäure erreicht werden (Riemann und Ordal 1961, Iandolo und Ordal 1964, Jaye und Ordal 1965, Fields und Frank 1969, Brown et al. 1982, Paidhungat und Setlow 2000). Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass diese so genannte Aktivierung der immobilisierten Sporen mit Ca^{2+} -DPA in dünnen Sol-Gel-Schichten die Auskeimungsrate um ein Mehrfaches erhöht und den Prozess signifikant beschleunigt. Die ersten vegetativen Zellen konnten bereits nach 3,5 bis 4 h Fütterung mit NB-Medium beobachtet werden, wie in Abb. 4.4.2.2 zu sehen.

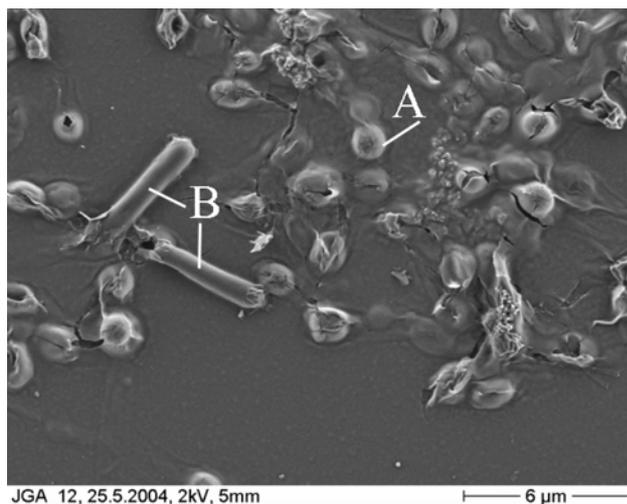


Abb. 4.4.2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Sol-Gel immobilisierter Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach 1 h Aktivierung mit 60 mMol/l Ca^{2+} -DPA und 4 h Inkubation mit NB-Medium: A) nicht ausgekeimte Spore, B) auswachsende vegetative Zellen (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society).

Die Keimungsrate ist dabei von der eingesetzten Konzentration an Ca^{2+} -DPA abhängig, wie in Abb. 4.4.2.3 ersichtlich. Die Zugabe von 5 mMol/l des Komplexes erhöhte bereits die Rate an auskeimenden Sporen um mindestens 28 % (lichtmikroskopische Auswertung). Bei weiterer

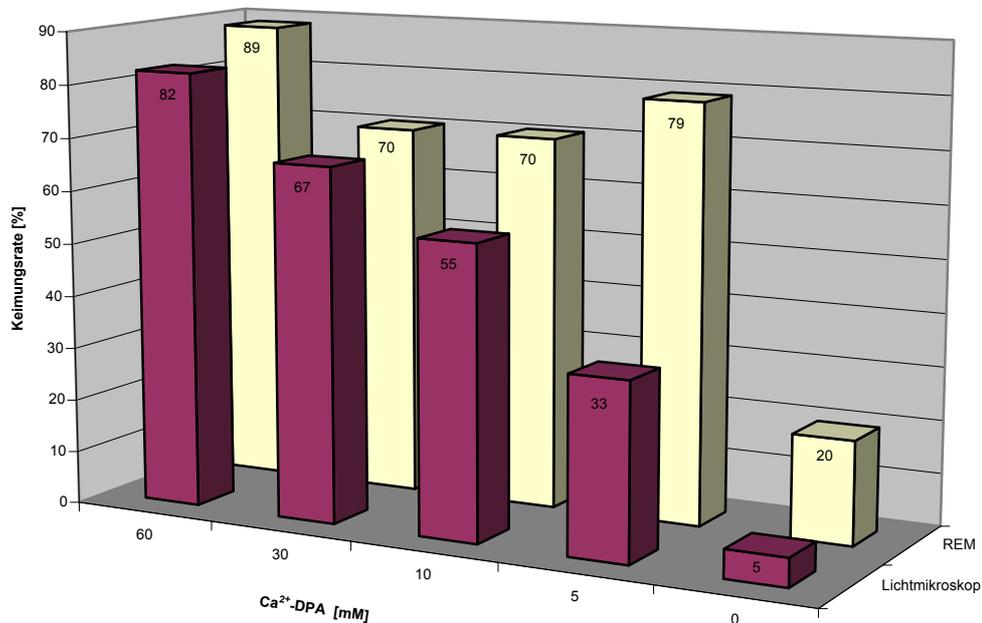


Abb. 4.4.2.3: Prozentuale Anteile der ausgekeimten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 in dünnen Sol-Gel-Schichten in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -DPA-Konzentration. Die Werte wurden durch Auszählung licht- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen nach 24 h Inkubation in der Durchflusszelle ermittelt.

Erhöhung der Konzentration bis zu 60 mMol/l konnte eine Keimungsrate von bis zu 89 % (REM) erreicht werden. Die im Bereich von 5 und 10 mMol/l Ca^{2+} -DPA besonders auffälligen Diskrepanzen zwischen den licht- und rasterelektronenmikroskopisch ermittelten Werten von 33 / 79 % bzw. 55 / 70 % sind durch geringe morphologische Veränderungen der Sporen erklärbar, die durch niedrigere Konzentrationen an Aktivierungskomplex provoziert werden, jedoch nicht bis zum vollständigen vegetativen Stadium führen und demzufolge mit Hilfe des Lichtmikroskops nicht detektierbar sind. Bei höheren Aktivatorkonzentrationen hingegen wird offensichtlich verstärkt eine vollständige Keimung bis hin zum Auswachsen der vegetativen Zellen induziert, was auch durch die bessere Vergleichbarkeit der Werte belegt wird. Bei einer Konzentration von 30 mMol/l Ca^{2+} -DPA wurden lichtmikroskopisch 67 % und rasterelektronenmikroskopisch 70 % ausgekeimte Sporen gezählt. Um eine Präzipitation des Komplexes bei höheren Aktivatorkonzentrationen zu verhindern, sollte das CaCl_2 in einem leichten Überschuss vorliegen. Dies wurde realisiert, indem die beiden Komponenten separat mit der doppelten Konzentration angesetzt und erst unmittelbar vor der mit CaCl_2 gefüllten Kammer gemischt wurden. Beim Mischen von CaCl_2 und Dicipolinsäure können in

Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen zwei verschiedene Komplexe gebildet werden. Bei äquimolaren Verhältnissen bzw einem leichten Überschuss an CaCl_2 wird ein 1:1 Chelat aus 1 Mol CaCl_2 und 1 Mol Dipicolinsäure gebildet, bei Überschuss an DPA verbinden sich 2 Mol DPA mit 1 Mol Ca^{2+} . Dieser Komplex besitzt keinen stimulierenden Effekt auf die Auskeimung der Sporen (Riemann und Ordal 1961).

Langzeitlagerung

Im Hinblick auf mögliche biotechnologische Anwendungen spielt die Lagerfähigkeit der dünnen Sporenschichten eine erhebliche Rolle. Im Idealfall sollten die Schichten bei normalen Umgebungsbedingungen für Jahre verwendungsfähig sein. Um die Lagerfähigkeit zu testen, wurde die Keimungsrate einer 2,5 Jahre bei Raumtemperatur gelagerten Sol-Gel-Schicht mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 ohne Sorbitzusatz untersucht. Analog zu den frisch präparierten und mit Sorbit supplementierten Schichten erfolgte die

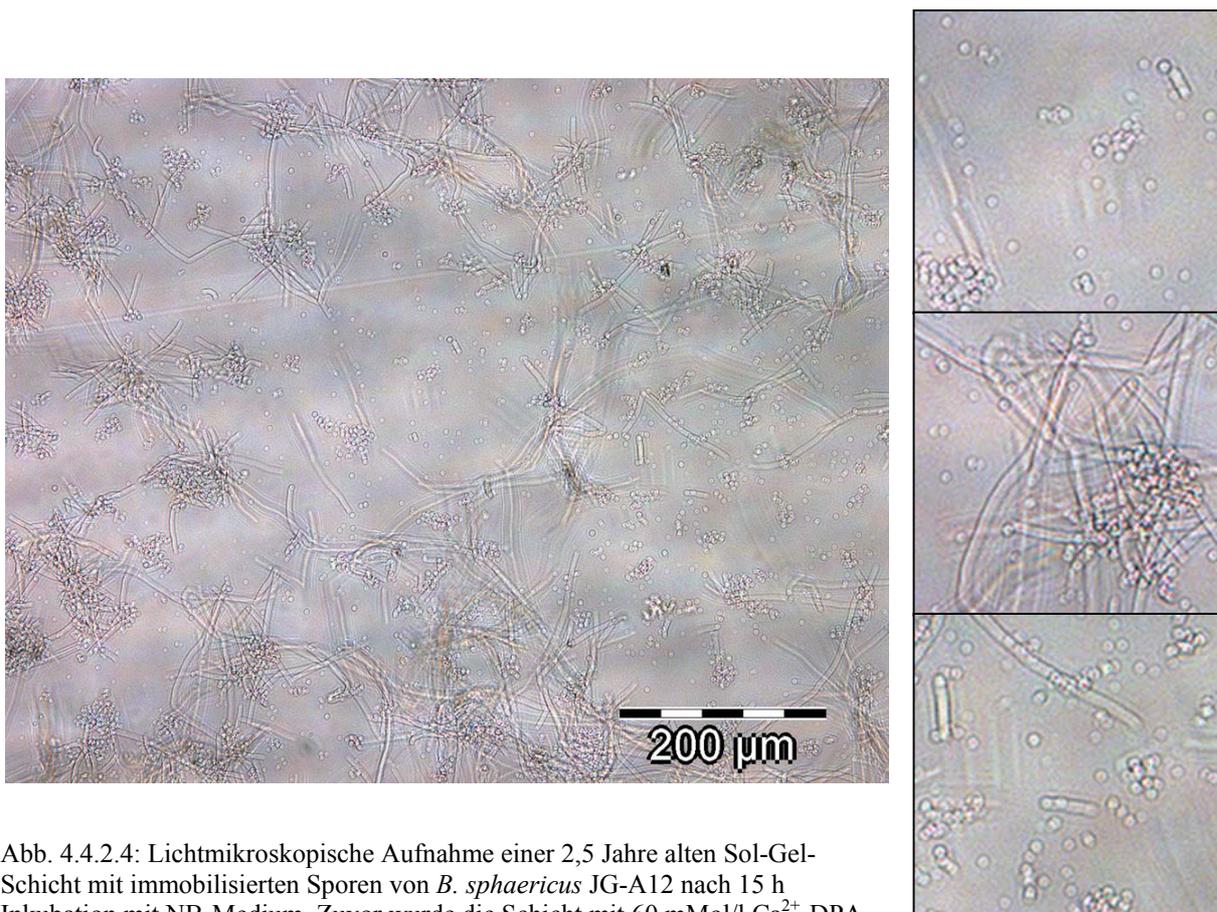


Abb. 4.4.2.4: Lichtmikroskopische Aufnahme einer 2,5 Jahre alten Sol-Gel-Schicht mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach 15 h Inkubation mit NB-Medium. Zuvor wurde die Schicht mit 60 mMol/l Ca^{2+} -DPA 1 h lang aktiviert. (rechts oben) Sporen; (rechts Mitte) verlängerte, früh ausgekeimte vegetative Zellen; (rechts unten) verzögert ausgekeimte vegetative Zellen (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society).

Aktivierung mit 60 mMol/l Ca^{2+} -DPA-Lösung in der Durchflusskammer für die Dauer von einer Stunde. Daran anschließend wurde die Aktivatorlösung durch NB-Medium ersetzt und die Auskeimung lichtmikroskopisch verfolgt. Ähnlich wie bei frisch präparierten Schichten konnten bereits nach ca. 6 h erste auskeimende Zellen beobachtet werden. Nach 15 h Inkubation (Abb. 4.4.2.4) überwogen lange, bewegliche, zum Teil kettenförmig aneinander gereihte vegetative Zellen, die in ihrer Längsausdehnung teilweise 200 μm überschritten. Wie bei frischen Schichten war auch hier eine zeitliche Staffelung des Beginns der Auskeimung der einzelnen Sporen zu beobachten. Nach 24 h Inkubation mit Nährmedium waren 87 % der immobilisierten Sporen ausgekeimt oder morphologisch verändert (rasterelektronenmikroskopische Auswertung, Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigen, dass es problemlos möglich ist, dünne Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen über Jahre ohne signifikante Änderung ihrer Keimungsfähigkeit trocken zu lagern. Die vergleichbaren Keimungsraten zwischen der Sorbit-supplementierten und der reinen TEOS-Schicht belegen zudem, dass die Erhöhung der Porosität in diesem Fall keine positiven Effekte bewirkt. Der Zusatz von Additiven, und besonders von mikrobiell verwertbaren, wie es bei Sorbit der Fall ist, kann sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Feuchtigkeit eher nachteilig im Hinblick auf eine mögliche Fremdbesiedlung durch Mikroorganismen auswirken.

4.4.3 Mechanische Spannungsverhältnisse in dünnen Schichten

4.4.3.1 Charakterisierung von Oberflächenbeschaffenheit und Schichtdicke

Mechanische Spannungszustände in Schichtsystemen werden von verschiedenen physikalischen und materialspezifischen Zustandsgrößen beeinflusst. Bei der Abschätzung der zu erwartenden Einflussfaktoren auf die Spannungsentwicklung spielt unter anderem das Dickenverhältnis der beiden miteinander verbundenen Schichten eine erhebliche Rolle. Aus diesem Grund wurden die als Substrat verwendeten, beschichteten Siliziumwafer bezüglich der Oberflächentopographie und Schichtdicke der dünnen Sol-Gel-Schichten untersucht. In AFM-Aufnahmen erschien die Waferoberfläche regelmäßig und deutlich strukturiert (s. Abb. 4.4.3.1 links). Aus den Höhenaufnahmen wurde $0,39\ \mu\text{m}$ als Wert für die Rauigkeit errechnet. Die starke Strukturierung der Oberfläche erforderte die sehr niedrige Scanrate von $0,3\ \text{Hz}$ zur Minimierung von Abbildungsartefakten. Da anhand dieser Aufnahmen keine Informationen über den Zustand der Sol-Gel-Schicht gewonnen werden konnten, wurden zusätzlich REM-Untersuchungen an Bruchkanten durchgeführt. Wie aus Abb. 4.4.3.1 rechts ersichtlich, bedeckt die Sol-Gel-Schicht der Topographie des Siliziums folgend gleichmäßig die gesamte Oberfläche des Wafers. An diesen Aufnahmen wird außerdem deutlich, dass die Oberflächenrauigkeit ausschließlich durch die Waferoberfläche bestimmt wird und großenteils im Bereich der Sol-Gel-Schichtdicke liegt. Durch das Profil der Oberfläche verursachte geringe Schichtdickenabweichungen wurden bei der Auswertung der Spannungsmessungen vernachlässigt und stattdessen ein mittlerer Wert von $400\ \text{nm}$ verwendet. Hinweise auf kristalline Anteile wurden bei Röntgenbeugungsuntersuchungen nicht gefunden (E. Gutmann, Institut für Strukturphysik, TU Dresden), sodass die Sol-Gel-Schicht als isotrop angesehen werden kann.

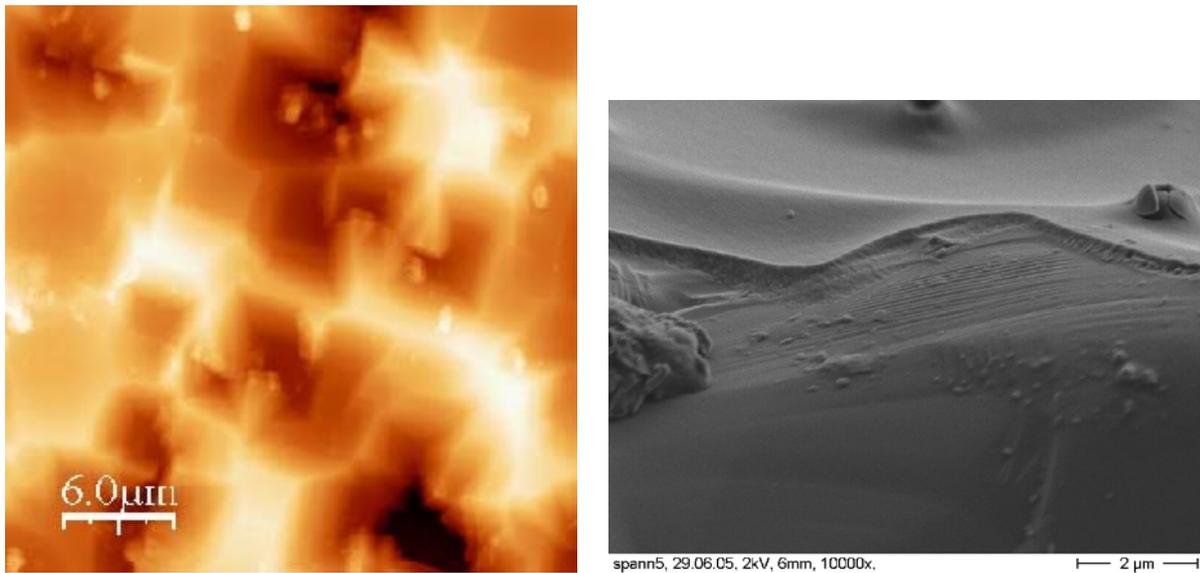


Abb. 4.4.3.1: AFM-Höhenbild einer Sol-Gel-Schicht mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 auf einem unpolierten Siliziumwafer (links). Die Aufnahme erfolgte im Tapping-Mode an der Luft. Deutlich zu erkennen ist die stark strukturierte Oberfläche des Wafers. Das rasterelektronenmikroskopische Bild (rechts) zeigt eine weitgehend unversehrte Bedeckung des Wafers mit der silikatischen Schicht. Im rechten oberen Quadranten ist eine gequollene Spore abgebildet, die eine Rissbildung in der darüber liegenden Schicht verursacht.

4.4.3.2 Auswertung der Spannungsmessungen

Das Prinzip der Messung beruht auf den Aussagen der *Kirchhoffschen* Plattentheorie. Danach treten in zwei miteinander mechanisch fest verbundenen Schichten unter Belastung Schichtspannungen auf, die zu einer Krümmung des Systems führen. Kombiniert man eine zu charakterisierende Schicht mit einem vergleichsweise steifen, elastischen Material mit bekannten Materialkonstanten, lassen sich unter bestimmten Voraussetzungen Rückschlüsse auf die auftretenden mechanischen Spannungen innerhalb dieser Schicht ziehen. Unter Vernachlässigung örtlich auftretender Schwankungen stehen Schichtspannung σ und Krümmung κ nach Lampenscherf (1998) in folgendem Zusammenhang:

$$\sigma = \frac{E_{Si} h_{Schicht} (1 + e \rho^3)}{6 (1 - \nu_{Si}) \rho^2 (1 + \rho)} \kappa \quad (10)$$

Dabei bezeichnet E_{Si} den Elastizitätsmodul von Silizium, der in der Literatur mit 112,8 GPa angegeben wird, $h_{Schicht}$ die Dicke der zu untersuchenden Schicht und ρ das Schichtdickenverhältnis zwischen Sol-Gel-Schicht und Siliziumwafer. Die *Poissonzahl* ν wird für Silizium mit 0,28 angesetzt. Der Quotient $e = \frac{E_{Schicht}(1-\nu_{Si})}{E_{Si}(1-\nu_{Schicht})}$ der elastischen Konstanten ist nicht bestimmbar, da die entsprechenden Parameter der zu untersuchenden Schicht nicht bekannt sind. Aufgrund des günstigen Schichtdickenverhältnisses von $\rho = 0,001$ kann jedoch die *Stoney-Näherung* (Stoney 1909) angewandt werden, womit sich Gleichung (10) vereinfacht:

$$\sigma = \frac{E_{Si} h_{Si}^2}{6 (1-\nu_{Si}) h_{Schicht}} \kappa \quad (11)$$

Zur Bestimmung der Schichtdurchbiegung stehen verschiedene optische Methoden zur Verfügung, die in der Regel relativ aufwendig sind. Die Vorteile des kapazitiven Messverfahrens hingegen liegen in seiner weniger komplizierten Durchführung und seiner außerordentlichen Sensitivität. Es wurde unter anderem bereits erfolgreich zur Charakterisierung von Spannungszuständen in trocknenden ZrO_2 -Schichten (Lampenscherf 1998) und Lederproben (Tuckermann 2001) eingesetzt. Wie von Tuckermann beschrieben, kann man bei kleinen Belastungen für den Zusammenhang zwischen der Änderung der Krümmung des Wafers $\Delta\kappa$ und dem elektrischen Spannungssignal ΔU einen linearen Zusammenhang annehmen. Durch Auflegen unterschiedlicher Gewichte wird zunächst zur Kalibrierung der Apparatur eine Änderung des elektrischen Spannungssignals ΔU erzeugt, die wiederum proportional von der Größe der Gewichtsänderung ΔG abhängt. Die aus der Mechanik bekannte proportionale Beziehung zwischen Krümmungsänderung einer Schicht und der darauf einwirkenden Belastung zugrunde legend, sollte in guter Näherung

$$\Delta\kappa = \beta\Delta G \quad (12)$$

gelten. Auf dieser Grundlage lässt sich β für die gegebene Geometrie aus den gemessenen Krümmungsänderungen für einen unbeschichteten Wafer (β_u) wie folgt berechnen:

$$\beta_u = \frac{\Delta\kappa}{\Delta G} = \frac{0,02 \text{ m}^{-1}}{20 \text{ g}} = 10^{-3} \text{ m}^{-1} \text{ g}^{-1} \quad (13)$$

Die Proportionalitätskonstante α , die das Ausmaß der Änderung des elektrischen Spannungssignals in Abhängigkeit vom aufgelegten Gewicht beschreibt, wird im selben Maße durch Silikatschicht und Teflonring beeinflusst wie β . Anhand von Vergleichsmessungen zwischen beschichteten und unbeschichteten Wafern ließ sich damit ein mittlerer Wert für β_b berechnen, der um den Faktor 0,15 geringer gegenüber β_u ausfällt. Da zugleich $\alpha = \frac{\Delta U}{\Delta G}$ gilt, folgt aus (11) und (12) für die mittlere Schichtspannungsänderung über die Zeit:

$$\Delta\sigma_{Schicht}(t) = \frac{E_{Si} h_{Si}^2}{6 (1-\nu_{Si}) h_{Schicht}} \frac{\beta_b}{\alpha_b} \Delta U(t) = \frac{E_{Si} h_{Si}^2}{6 (1-\nu_{Si}) h_{Schicht}} \frac{0,15 \beta_u}{\alpha_b} \Delta U(t) \quad (14)$$

Die für jeden untersuchten Wafer einzeln bestimmten Werte für α_b , sowie die während der Versuchsdauer aufgetretenen maximalen Änderungen des elektrischen Spannungssignals und die daraus resultierenden mittleren Schichtspannungen sind in Tabelle 4.4.3.2 zusammengestellt.

Tab. 4.4.3.2: Zusammenstellung der gewichtskraftbezogenen Änderungen des elektrischen Spannungssignals, maximaler elektrischer Spannungsänderung und daraus resultierender mechanischer Spannungszustände während der Inkubation von Sol-Gel-beschichteten Siliziumwafern mit immobilisierten Sporen.

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	unbeschichteter Wafer (Tuckermann 2001)
$\alpha_b (10^{-3} \text{ Vg}^{-1})$	1,74	1,2	1,5	7
$\Delta U_{\max} (\text{V})$	0,1	0,028	0,037	
$\Delta\sigma_{\max} (\text{MPa})$	80	34	33	

In Abb. 4.4.3.2 sind die aus den elektrischen Spannungssignalen von drei unabhängigen Experimenten errechneten Werte für die mittleren Schichtspannungen in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Absolutwerte der mechanischen Spannungen sind aus mehreren Gründen, die in Kapitel 5, Abschnitt 2 diskutiert werden, kritisch zu beurteilen. Hingegen ist der Verlauf der Spannungsentwicklung reproduzierbar und dem Entstehen verschiedener Spannungsarten zuzuordnen.

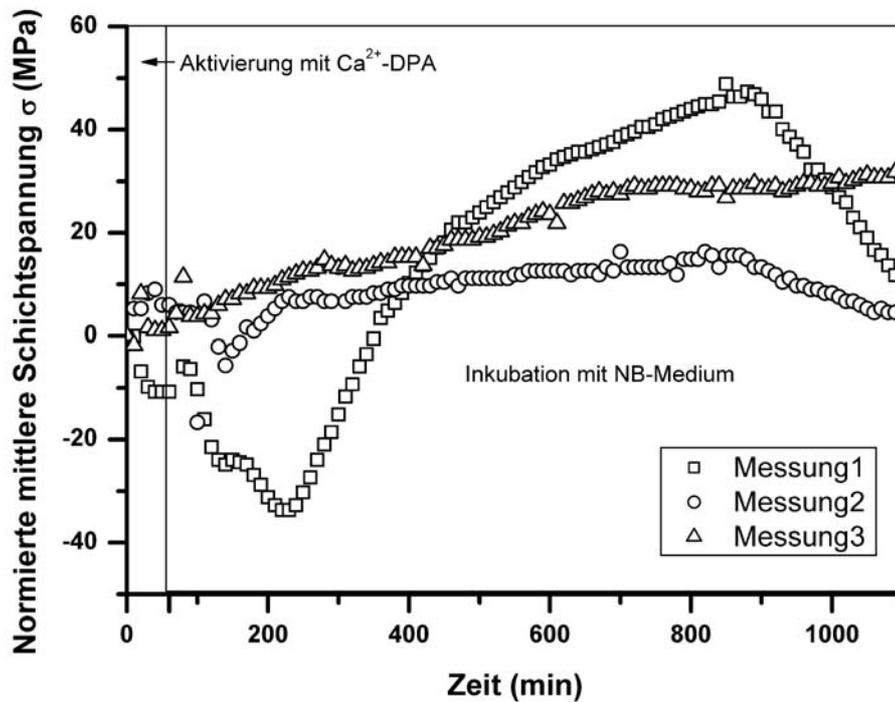


Abb. 4.4.3.2: Spannungsentwicklung in drei individuell vermessenen SiO_2 -Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 während des Keimungsvorganges.

Charakteristisch bei zwei von drei untersuchten Schichten war eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Zunahme von Druckspannung zwischen 0 und 250 Minuten Inkubationsdauer. Innerhalb dieses Zeitfensters erfolgte die Aktivierung der Sporen mit Ca^{2+} -DPA und der Austausch gegen Nährmedium. Für die Sporen bedeutete diese Behandlung die Aufweichung der Sporenrinde (Cortex), Quellung und Übergang zum stoffwechselaktiven Stadium. Durch die in Abschnitt 4.4.2 bereits beschriebenen Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass nach etwa 3 bis 4 Stunden ein beträchtlicher Teil der Sporen das vegetative Stadium erreicht hat. Bei weiterer Inkubation dominieren das Längenwachstum und Ablösen der neugebildeten Bakterienzellen von der Unterlage. Diese Vorgänge laufen weitestgehend außerhalb der Sol-Gel-Schicht ab, was im Kurvenverlauf durch eine Zunahme von Zugspannungen dokumentiert wurde. Abweichungen zwischen den Messungen repräsentieren hierbei individuelle Unterschiede im Keimungsverhalten der einzelnen Sporenschichten und sind für biologische Objekte nicht ungewöhnlich. Als Ursachen kommen verschiedene Faktoren in Betracht, darunter Inhomogenitäten in der Verteilung der Biokomponente und der Schichtdicke, aber auch die lokale Ausbildung von Rissen in der Sol-Gel-Schicht. In Abschnitt 5.2 werden die gewonnenen Messdaten mit den korrespondierenden mikroskopischen Befunden interpretiert und die dabei auf die Schicht wirkenden Kräfte abgeschätzt und diskutiert.

4.5 Mikrobiell besiedelte Biocere

In den vorigen Kapiteln wurden Untersuchungen der direkten Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Metallionen und ausgewählten Bakterien und Aspekte der Lagerfähigkeit sowie der mechanischen Stabilität dünner Biocerschichten erläutert. Im Hinblick auf eine technische Nutzung gehören zur Charakterisierung der Biocere ebenso Aussagen über deren Funktionalität und Stabilität unter realen Bedingungen. Als ein wesentlicher Vorzug von silikatischen Keramiken wird unter anderem deren inertes Verhalten gegen chemische und mikrobiell determinierte degradative Einflüsse angesehen (Böttcher 2000). Diese Widerstandsfähigkeit erhofft man sich ebenso bei Biokeramiken mit eingebetteten Mikroorganismen oder deren funktionellen Untereinheiten. Werden solche Biokeramiken beispielsweise als Filtermaterialien zur Reinigung kontaminierter Abwässer eingesetzt, bildet die mechanische und chemische Stabilität der Biocerpartikel ein entscheidendes Kriterium in Bezug auf die Durchflussfähigkeit und letztendlich die Standzeit von Filtersäulen. Unter realen Bedingungen treten diesbezüglich oftmals Probleme auf, wenn die zu reinigenden Abwässer mikrobiell besiedelt sind (Flemming 1994). Die mikroskopische Untersuchung der Filterpartikel nach Nutzung ist dabei ein wichtiges Instrument zur schnellen Identifizierung möglicher Störeinflüsse. In Kapitel 2, Abschnitt 1.4 wurde bereits erwähnt, dass Biocerpartikel mit immobilisierten Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 für die Entfernung von Uran und Kupfer aus wässriger Lösung unter definierten Laborbedingungen gut geeignet sind. Mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Methoden sollte abgeklärt werden, welche Einflüsse die wesentlich komplexeren Bedingungen in einem realen Wasser auf die Funktionalität der Biocere ausüben. Zur Untersuchung gelangten eine Reihe verschiedener Biocerpartikel, die als Filtermaterial über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis mehreren Wochen komplexen, schwach bis mäßig mit Radionukliden und Schwermetallen belasteten Uranhaldensickerwässern mit neutralem pH-Wert ausgesetzt waren. Die Wässer selbst waren reichlich mikrobiell besiedelt und enthielten im Sediment verschiedene Arten von Kieselalgen (Diatomeen, siehe auch Abb. 2.1.1 und 4.5.6). Folgende Proben wurden begutachtet:

Biocere mit *Bacillus sphaericus* JG-A12

Biocere mit *Pseudomonas stutzeri* DSMZ 5190

Xerogel ohne Biokomponente

Al₂O₃-SiO₂-Mischbiocer

Sickerwassersediment

Die Materialentnahme aus den Säulen erfolgte generell unter sterilen Bedingungen. Unmittelbar nach Erhalt der Proben wurden diese lichtmikroskopisch begutachtet. Ein Teil des Materials wurde anschließend nach vorheriger Fixierung und Entwässerung (wie im Kapitel 3.3.4 beschrieben) zusätzlich rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Da die Standzeiten der Säulen auf Grund ungenügender Stabilität der Schüttung anfangs nicht zufriedenstellend waren, wurde das Betriebsregime verschiedenen physikalischen und chemischen Modifikationen unterworfen. Einerseits wurden dem Sickerwasser biozide Substanzen wie Natriumazid oder Natriumhypochlorit als Desinfektionsmittel beigemischt oder die Säulen durch entsprechende Vorsäulen mit Kupfer, Sand oder Kohlenstofffasern entlastet. Eine weitere Option war die Änderung der Anströmungsrichtung bei Bedarf.



Abb. 4.5.1: Verfärbungen und Kavernenbildung bei einer mit Haldensickerwasser betriebenen Biocersäule mit Kohlenstoff-Vorfilter.

Allen vorliegenden Proben war gemeinsam, dass in Abhängigkeit vom Betriebsregime nach einer gewissen Zeitspanne Versetzungen und Kavernenbildungen (wie in Abb. 4.5.1 ersichtlich) in den Säulen auftraten, teilweise mit einer deutlichen Verfärbung und Geruchsentwicklung. Diese Veränderungen des Filtermaterials weisen auf eine mehr oder weniger stark ausgeprägte mikrobielle Kontamination hin. Die licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Proben gaben im ersten Schritt einen Überblick über die Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulationen. Vor allem bei frisch isoliertem Material wurde sogar eine Besiedlung mit Wimpern- und Glockentierchen (Ciliaten, siehe Abb. 4.5.2) sowie Fadenwürmern (Nematoden, siehe Abb. 4.5.3) und verschiedenen anderen Einzellern (Protisten) festgestellt, was auf einen vollständig ausgebildeten Biofilm schließen lässt. Diese fragilen biologischen Objekte sind einer elektronenmikroskopischen Präparation nur begrenzt zu-

gänglich. Anhand ihrer starken, durch Chlorophyll hervorgerufenen Eigenfluoreszenz wurden nach Anregung mit den entsprechenden Filtern (360 bis 370 nm bzw. 420 bis 480 nm) unterschiedliche Mikroalgen, wie fädige blau-grüne Algen (Cyanobakterien, siehe Abb. 4.5.4), weitere kugelförmige Mikroalgen und Kieselalgen (Diatomeen) gefunden. Des Weiteren waren die Biocerpartikel mit einer Vielzahl verschiedenster Bakterien besetzt, darunter Stäbchen, Kokken und Spirillen, die anhand der Untersuchungsmethodik nicht näher identifiziert werden konnten.

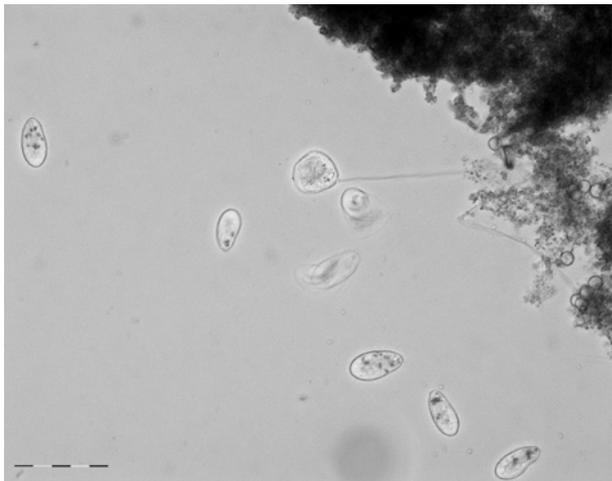


Abb. 4.5.2: Lichtmikroskopische Aufnahme von Ciliaten an Biocerpartikeln. Die Länge des Balkens beträgt 200 μm .

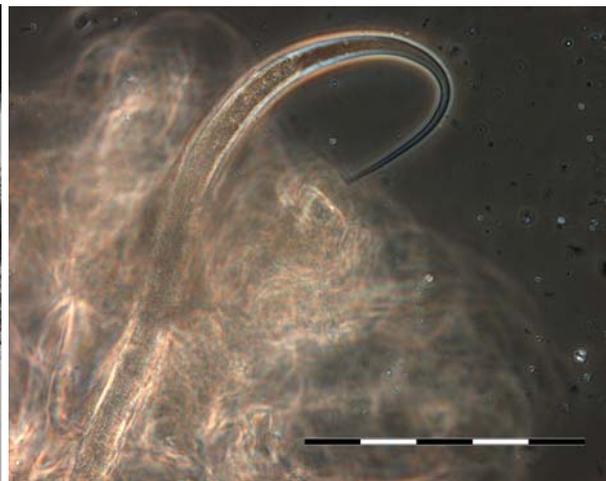


Abb. 4.5.3: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Fadenwurms (Nematode) an einem Biocerpartikel. Die Länge des Balkens beträgt 100 μm .

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie war es möglich, detailliertere Untersuchungen der Oberflächenbeschaffenheit der kontaminierten Partikel vorzunehmen. Bei allen Proben war eine teilweise dichte Besiedlung mit einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen und Algen innerhalb großer Mengen extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) zu finden (siehe Abb. 4.5.5). Bedingt durch die Fixierung der Proben und das notwendige Vakuum in der Mikroskopkammer konnte jedoch die unter nativen Bedingungen stark hydratisierte EPS-Matrix, die das Stützgerüst des Biofilms darstellt, nicht in ursprünglicher Form und Ausdehnung dargestellt werden. Nach Trocknung erscheint sie als faserige Struktur, was zum Teil auf Trocknungsartefakte und auf die Vernetzung mit Glutardialdehyd zurückzuführen ist (Richards und Turner 1984, Flemming 1994, Flemming und Wingender 2002). Die Dicke der Schicht auf den Biocerpartikeln und der Grad der Bedeckung variierten sehr stark, was auf die räumliche Lage innerhalb der Säule, das Betriebsregime (Zusatz biozider Substanzen, Vorschaltung von Grobfiltern), die Art und Weise der Anströmung sowie unterschiedliche Wachstumsstadien des Biofilms zurückzuführen ist.

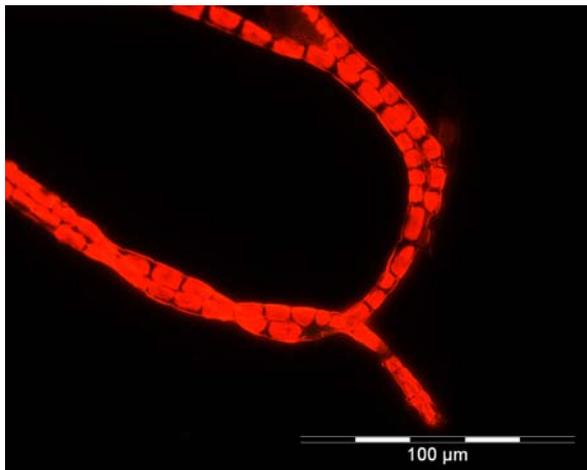


Abb. 4.5.4: Lichtmikroskopische Aufnahme der Eigenfluoreszenz von chlorophyllhaltigen Cyanobakterien an Biocerpartikeln nach Beschickung mit mikrobiell besiedeltem Haldensickerwasser.

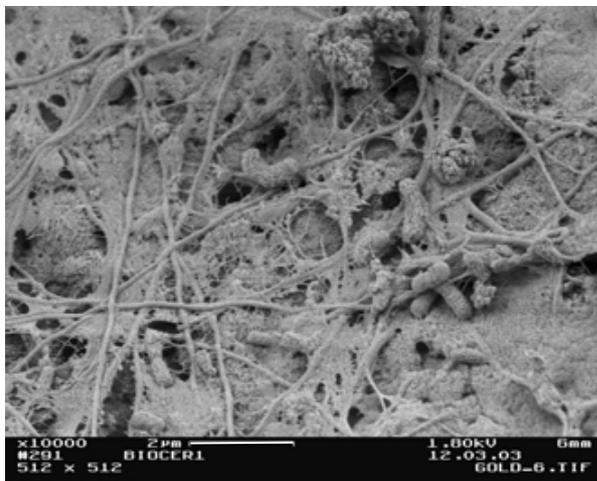


Abb. 4.5.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf einem Biocerpartikel nach Beschickung mit Haldensickerwasser. Erkennbar ist ein dichtes Geflecht aus verschiedenen Bakterien, filamentös wachsenden Mikroorganismen und extrazellulären polymeren Substanzen.

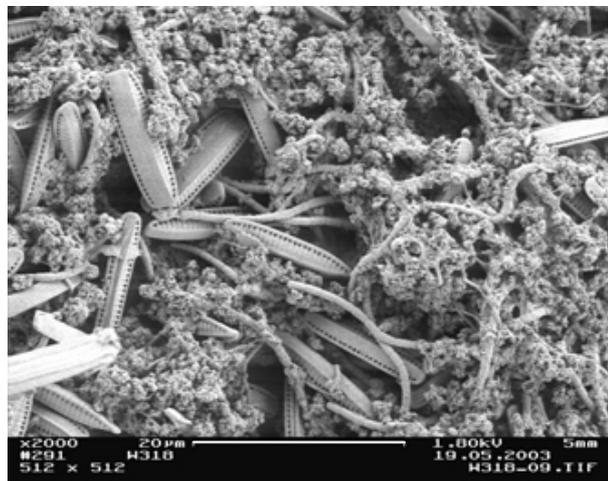


Abb. 4.5.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Anhäufung aus Diatomeen, filamentösen Mikroorganismen und amorphen Ablagerungen im Sediment eines Haldensickerwassers.

Des weiteren war die Zusammensetzung der Konsortien an Mikroorganismen innerhalb der Säulen lokal sehr verschieden. Am Säulenzulauf und in der vorderen Hälfte wurden überwiegend voluminösere Algen, Diatomeen und Protozoen sowie Nematoden gefunden, während am Auslauf unterschiedliche Arten von Bakterien vorherrschten. Die dunklen Verfärbungen und der charakteristische Geruch deuten auf Bereiche mit anaerober Aktivität hin. Eine mikrobielle Besiedlung trat überraschenderweise ebenso bei reinen Xerogelpartikeln ohne eingebettete Biokomponente auf (siehe Abb. 4.5.7). Detaillierte photochemische Untersuchungen an ungetemperten, d. h. thermisch nicht nachbehandelten, Silica-Gelen bewiesen die Existenz von freien vicinalen und geminalen³ OH-Gruppen in Oberflächennähe in ungleich-

³ Damit wird die räumliche Anordnung der bindungsrelevanten OH-Gruppen zueinander beschrieben. Geminale Gruppen sitzen am selben Atom, vicinale hingegen an benachbarten Atomen.

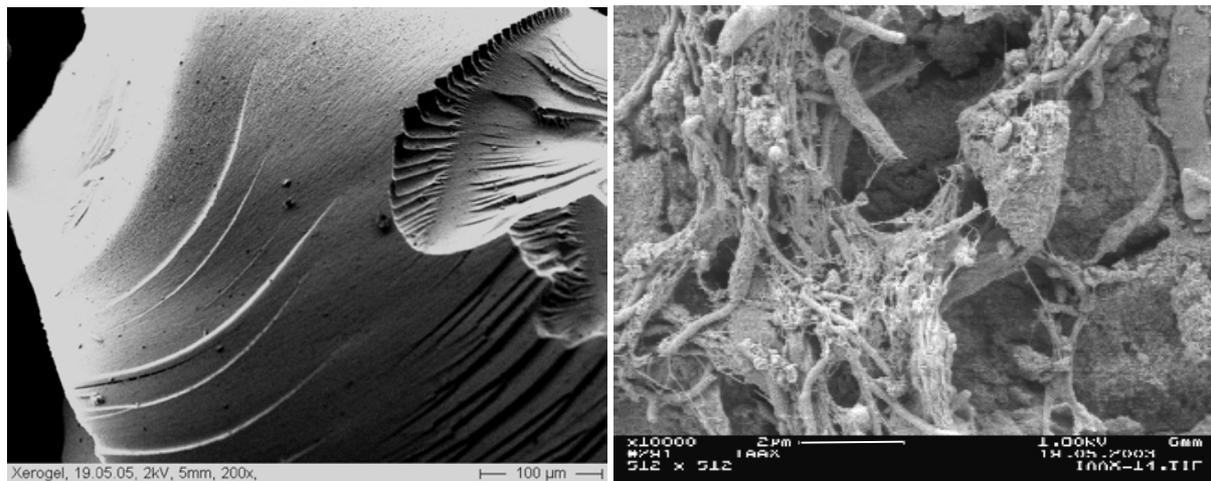


Abb. 4.5.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Xerogelpartikeln (ohne Biokomponente) vor (links) und nach Beschickung mit Haldensickerwasser (rechts).

mäßiger, clusterförmiger Anordnung, die bevorzugte Bindungsplätze für organische Moleküle darstellen. Darüber hinaus bilden Defektstellen im porösen Silica-Netzwerk Elektronenfallen, die zusätzlich Adhäsionsvorgänge begünstigen. Eine Temperung der Gele oberhalb 500 °C führte zu einem Verlust eines Teils dieser OH-Gruppen und einer Änderung der Oberflächenchemie mit Auswirkungen auf das Bindungsverhalten (Thomas und Ellison 2001). Da alle verwendeten Gele zur Erhaltung der Biokomponente lediglich luftgetrocknet waren, muss durch die besonderen chemischen und physikalischen Oberflächencharakteristika der Biocere mit einem begünstigten Adhäsionsverhalten für organische Moleküle, bakterielle Stoffwechselprodukte oder Mikroorganismen gerechnet werden, was durch die Befunde am Xerogel belegt wurde. Auffällig war weiterhin bei allen untersuchten Proben das Fehlen der eingebetteten Bakterien nach Einsatz der Materialien, wie der Vergleich von Abb. 4.5.8 links und rechts zeigt. Dieser Befund lässt sich einerseits durch die mechanische Beanspruchung der Partikel innerhalb der durchströmten Säulen und andererseits durch die Wirkung lytischer Enzyme erklären, die von den Fremdbesiedlern segregiert werden und die organische Substanz der Biokomponente als Nahrungsgrundlage verfügbar machen. Das Herauslösen der Biokomponente führt zu zusätzlichen Poren und Hohlräumen, die zu einer mechanischen Destabilisierung des Biocers beitragen. Außerdem begünstigen die Hohlräume das Eindringen filamentöser Organismen, die ebenfalls auf den Partikeln zu finden waren (Abb. 4.5.9) und diesen Destabilisierungsprozess zusätzlich forcieren.

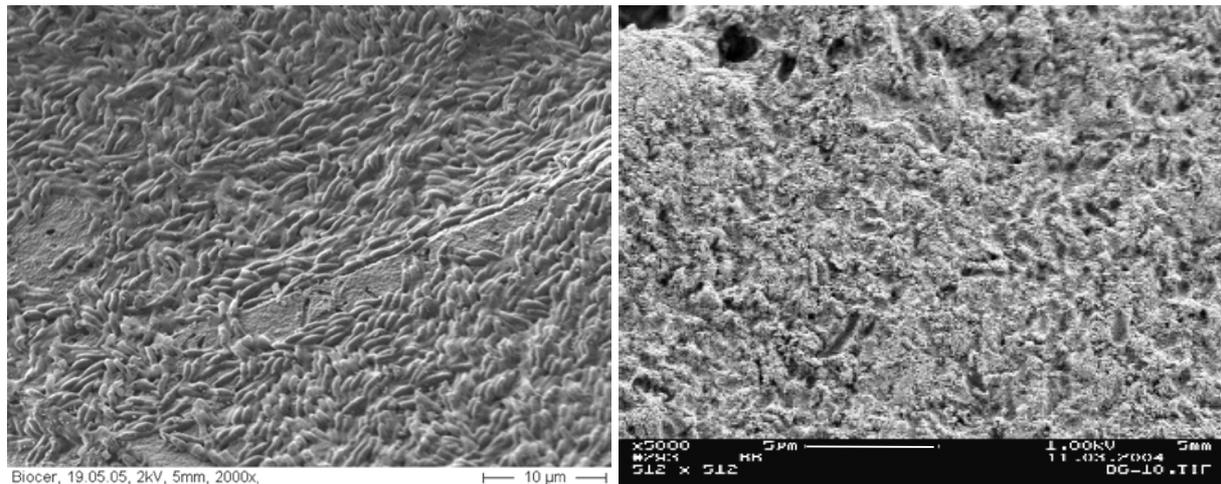


Abb. 4.5.8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biocerpartikeln. Links im Bild ist die Partikeloberfläche mit immobilisierten Bakterienzellen von *B. sphaericus* JG-A12 dargestellt. Auf dem rechten Bild ist ein Partikel aus einer 22 Tage lang mit Haldensickerwasser durchströmten Säule mit teilweise verwitterter Oberfläche abgebildet. Auffällig ist das Fehlen der immobilisierten Bakterien.

Neben den von der ursprünglich immobilisierten Biokomponente verursachten Hohlräumen auf der Partikeloberfläche waren bei einigen Proben außerdem Vertiefungen zu finden, die passgenau von Kolonien ovaler Mikroorganismen besetzt waren. Diese nicht näher identifizierten Organismen zeigten im Lichtmikroskop ähnliche refraktive Eigenschaften wie bakterielle Sporen. Die mit der Geometrie der Fremdbesiedler übereinstimmende räumliche Ausdehnung der Vertiefungen auf der Bioceroberfläche lässt vermuten, dass diese Organismen in der Lage sind, die Silica-Matrix zumindest teilweise aufzulösen (s. Abb. 4.5.10). Entsprechende depolymerisierende Eigenschaften, auf der Ausscheidung von Komplexbildnern, organischen Säuren oder auch Laugen beruhend, wurden bereits an verschiedenen Bakterien, darunter Vertreter der Gattung *Bacillus*, nachgewiesen und beschrieben (Beveridge et al. 2002, Gaylarde und Morton 2002).

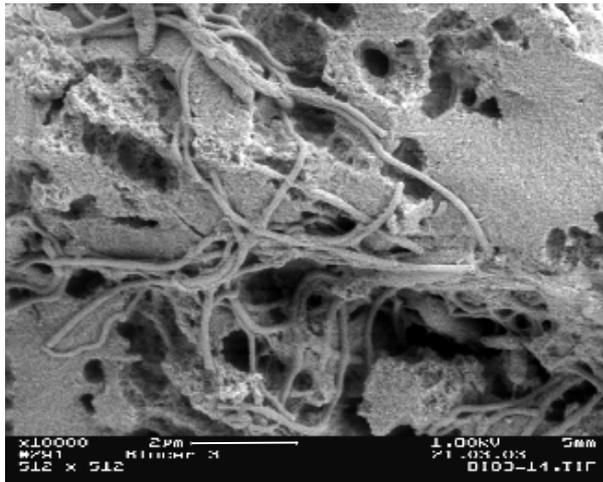


Abb. 4.5.9: Biocerpartikel aus einer mit Haldensickerwasser betriebenen Säule. Filamentös wachsende Mikroorganismen dringen in die durch das Herauslösen der immobilisierten Biomasse freiwerdenden Poren und Hohlräume ein.

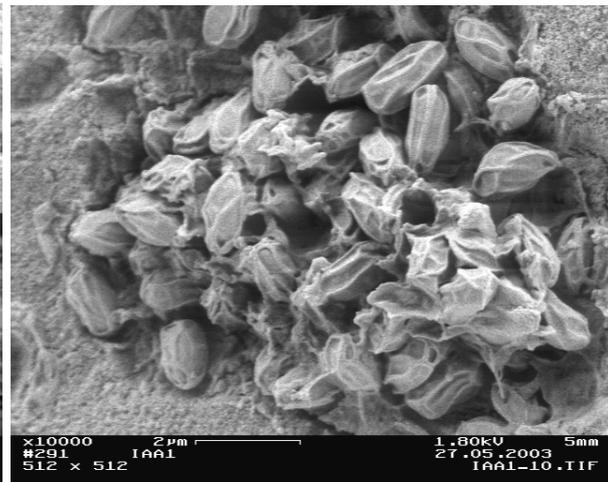


Abb. 4.5.10: Kolonie von Mikroorganismen auf der partiell verwitterten Oberfläche eines Biocerpartikels aus einer mit Haldensickerwasser betriebenen Säule.

Vielfach wurden auf den Bioceroberflächen außerdem sowohl amorphe als auch mikrokristalline Ablagerungen gefunden. Neben dem Direkteintrag durch Sickerwassersedimente kommen in Anbetracht der vielfältigen mikrobiellen Besiedlung ebenso durch Mikroorganismen hervorgerufene chemische Umbauprozesse in Betracht, deren Produkte sich als Sekundärminerale oder –präzipitate auf der Partikeloberfläche niederschlagen. Besonders charakteristisch waren Anhäufungen von Silikatrosetten mit Durchmessern zwischen einem und zwei Mikrometern. Der silikatische Charakter der Kristallite wurde durch eine EDX-Analyse bestätigt (Abb. 4.5.11). Die nadelförmigen kristallinen Ablagerungen in Abb. 4.5.12 bestehen vermutlich aus verschiedenen CaCO_3 -Phasen. Darauf deuten die Befunde der EDX-Analyse hin. Neben den stark ausgeprägten Calcium-Peaks konnten lediglich Kohlenstoff und Sauerstoff in größeren Mengen detektiert werden. Ein gewisser Anteil Kohlenstoff stammt dabei allerdings von der Bedampfung der Proben. Die Bildung verschiedener CaCO_3 -Modifikationen mit kristallinem Charakter (wie Aragonit, Vaterit oder Calcit) und Präzipitationen durch metabolische Aktivitäten von vergesellschafteten Mikroorganismen sind seit längerem bekannt (Flemming und Wingender 2002). Die hier beschriebenen Befunde umfassen alle Komponenten eines Biofilms und belegen damit, wenn auch in diesem Fall unerwünscht, die Eignung von Bioceren als entsprechendes Substrat. Für die praktische Anwendung (speziell als Filtermaterial für die Reinigung von Abwässern) ergeben sich demzufolge Konsequenzen im Hinblick auf die Prozessgestaltung, auf die in Abschnitt 5.3 noch näher eingegangen wird.

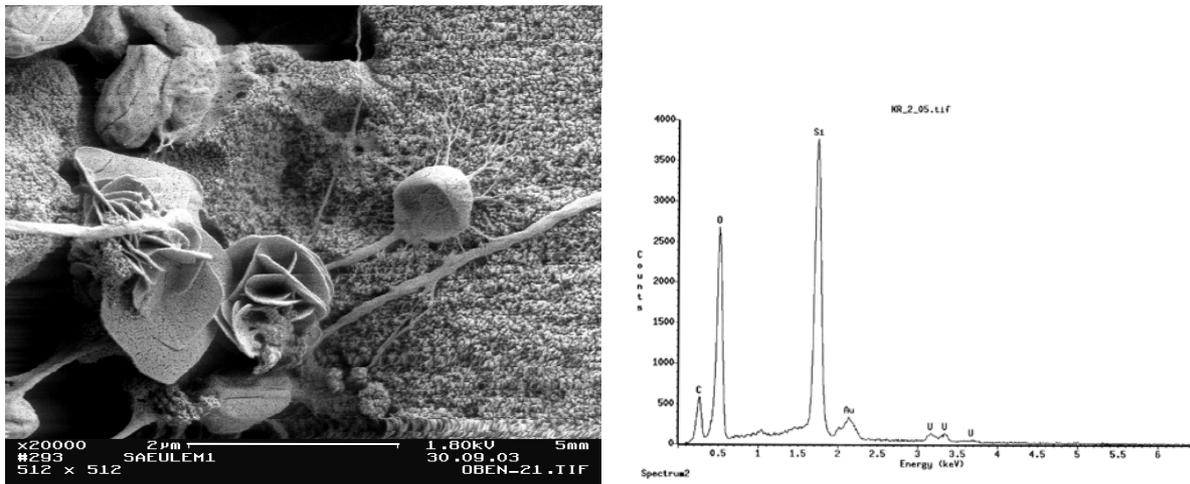


Abb. 4.5.11: Ablagerung von sekundärmineralischen Mikrokrystalliten auf einem Biocerpartikel als Resultat mikrobieller Aktivität. Die EDX-Analyse dieser Kristallite mit der typischen Struktur für Silikatrossetten bestätigte den Befund. Deutlich zu sehen im Spektrum rechts der mit Silizium korrespondierende Peak. Ebenso wurden Spuren von gebundenem Uran detektiert.

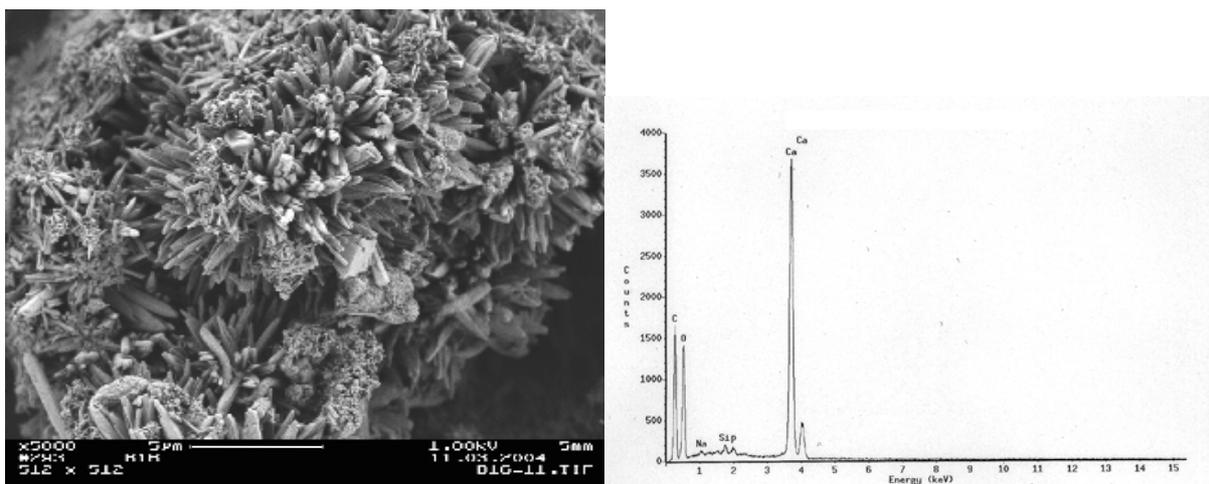


Abb. 4.5.12: Ablagerung von Mikrokrystalliten auf einem Biocerpartikel nach Durchströmung mit Sickerwasser. Die EDX-Analyse dieser Kristallite weist einen beträchtlichen Anteil Calcium sowie Kohlenstoff und Sauerstoff aus, was auf Calciumcarbonat als chemische Struktur hindeutet (EDX-Analyse: B. Schmidt-Brücken).

5 Diskussion

Wie in Kapitel 2 bereits angesprochen, sind Biocere als sehr komplex aufgebaute Materialien anzusehen, deren Eigenschaften in einem weiten Bereich in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen variieren können. Es ist demzufolge unerlässlich, besonderes Augenmerk auf die konkreten Bedingungen bei der Einbettung der Biokomponente zu legen, da diese entscheidenden Einfluss auf die spätere Anwendbarkeit des Materials ausüben. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer, bakterienhaltiger Filtermaterialien mit schwermetallbindenden Eigenschaften ist zudem die Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Biokomponente, Matrix und Schwermetall ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Materialeigenschaften insgesamt. Ein besonderer, bislang in diesem Zusammenhang wenig beachteter Punkt ist die Aufnahme von Metallionen in die Zelle. Zwar wird ein großer Teil der Sorptionsleistung von Bakterien über Bindungsmechanismen an der Oberfläche realisiert, jedoch kann eine intrazelluläre Akkumulation die Bindungskapazität von Bioceren zusätzlich steigern. Der Mangel an einfachen und schnell durchzuführenden Methoden, um solche Aufnahmeprozesse nachzuweisen, war die Motivation für die Experimente mit ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen an Bakteriensuspensionen.

Als weitere wichtige Teilaspekte wurden darüber hinaus die Überlebensfähigkeit der immobilisierten Bakterien und Sporen, die Langzeitlagerfähigkeit der Biocere und die Partikel- bzw. Schichtstabilität unter Belastung angesehen.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser hier genannten Untersuchungen werden nachfolgend ausführlich diskutiert und bewertet.

5.1 Wechselwirkungen von Cu^{2+} und Ni^{2+} mit Bakterien

Bisherige Studien mit membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen hatten überwiegend eukaryotische Systeme zum Gegenstand (Takahashi 1999). Im Vergleich dazu sind die Erfahrungen mit prokaryotischen Zellen eher gering. Bekanntermaßen sind Bakterien durch ihre rigide Zellwand besser und effektiver gegenüber den Einflüssen fremder Moleküle geschützt, als dies die eukaryotische Zellmembran vermag. Außerdem verfügen Bakterien über sehr effiziente Methoden, um fremde Moleküle, darunter auch verschiedene Farbstoffe, wieder auszuscheiden (Sincock und Robinson 2001). Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit verschiedenen membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen konnte jedoch gezeigt werden, dass der Weg der Fluoreszenzmarkierung über die intrazelluläre Esterspaltung mit Hilfe zelleigener Esterasen sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien innerhalb einer

gewissen Schwankungsbreite reproduzierbar funktioniert. Unerwünschte Efflux-Effekte lassen sich durch die Wahl eines Farbstoffes mit günstigerem Retentionsverhalten in der Bakterienzelle verhindern, wie am Beispiel von Oregon Green gezeigt wurde. Die Färbeprozedur selbst kann unter moderaten Bedingungen in einer physiologischen Lösung durchgeführt und somit Stresseinwirkungen auf die Zellen minimiert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die große Anzahl Zellen, die pro Zeiteinheit gefärbt werden können. Darüber hinaus konnten unter den für die durchgeführten Experimente gewählten Parametern keine substantiellen Beeinträchtigungen der Zellen festgestellt werden, sodass mit dem derzeitigen Wissensstand die Fluoreszenzfärbung von Bakterien mit membrangängigen Derivaten als vorteilhafteste Methode einzuschätzen ist.

Funktionelle Fluoreszenzfärbungen, die auf der Komplexbildung des Farbstoffes mit Ionen beruhen, sind, wie bereits mehrfach erwähnt, von einer Reihe von Faktoren abhängig. In einem biologischen System kann die Bindung dieser Ionen an den Farbstoff zusätzlich durch kompetitive Aktionen zelleigener Proteine mit entsprechender Ionen-Bindungsaffinität beeinflusst werden. Sogenannte Carrier- oder Transportproteine gegen toxische Ionen, verschiedene Adhäsionsproteine oder Enzyme, die in ihrem aktiven Zentrum Metallkationen enthalten, sind inzwischen auch an einer Vielzahl von Bakterien nachgewiesen worden. Die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes in einer lebenden Zelle ist somit auch eine Funktion der Konzentration, der Affinität und Vorbeladung dieser Proteine. Solche Vorgänge unterliegen der Feinregulation in der Zelle und sind in den meisten Fällen kaum zu quantifizieren. Deshalb können die Resultate aus den Tests zellfreier Lösungen nur sehr bedingt auf die Verhältnisse in Bakteriensuspensionen übertragen werden.

Unter Berücksichtigung aller hier aufgeführten Aspekte ist es als erstes wichtig, für jeden zu untersuchenden Stamm die optimalen Färbbedingungen zu ermitteln. Mit der unter Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Färbeprozedur mit $1 \mu\text{Mol/l}$ Farbstoff ließen sich Bakteriensuspensionen von *B. sphaericus* JG-A12, NCTC 9602 und *P. stutzeri* DSMZ 5190 problemlos mit verschiedenen derivatisierten ionensensitiven Farbstoffen färben. Dabei traten innerhalb der Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Kultur erwartungsgemäß Unterschiede in der Farbstoffverteilung auf. Während bei proliferierenden Zellen der Gehalt an freiem Calcium innerhalb der Zellen offenbar sehr gering ist (Abbildung 5.1.1 A und B), was anhand einer schwachen Fluoreszenz bei einem Großteil der Zellen sichtbar ist und durch durchflusszytometrische Untersuchungen erhärtet wurde, zeigt sich bei stationären Kulturen ein differenzierteres Bild. Der Typusstamm *B. sphaericus* NCTC 9602, der unter normalen Kulturbedingungen nur äußerst selten sporuliert, weist überwiegend schwach fluoreszierende Zellen mit offensichtlich geringem Calciumgehalt auf (Abbildung 5.1.1 D). Das Haldenisolat JG-A12 hingegen besteht nach 16 Stunden Kulturdauer bereits aus einem großen Anteil stark

fluoreszierender Zellen, wobei die Fluoreszenz teils homogen in der Zelle verteilt, teils in der Polregion lokalisiert war (Abbildung 5.1.1 C). Diese Zellen mit verstärkter Fluoreszenz reflektieren einen erhöhten intrazellulären Gehalt an freiem Calcium, der typischerweise im Sporulationsprozess verzeichnet wird (auf die einzelnen Schritte der Sporulation wurde im Zusammenhang mit dem Keimungsverhalten bakterieller Sporen bereits in Abschnitt 4.4.1 eingegangen). Ein ähnliches Färbeverhalten der Zellen wurde ebenso mit Oregon Green beobachtet. Für bildanalytische Zwecke ist jedoch Calcium Orange aufgrund seiner höheren Photoresistenz besser geeignet. Eine Aussage über die Gründe für das Auftreten einzelner, stark fluoreszierender Zellen besonders beim Referenzstamm NCTC 9602 kann hier nicht getroffen werden, jedoch vermitteln die Aufnahmen einen Eindruck über die Heterogenität bakterieller Populationen.

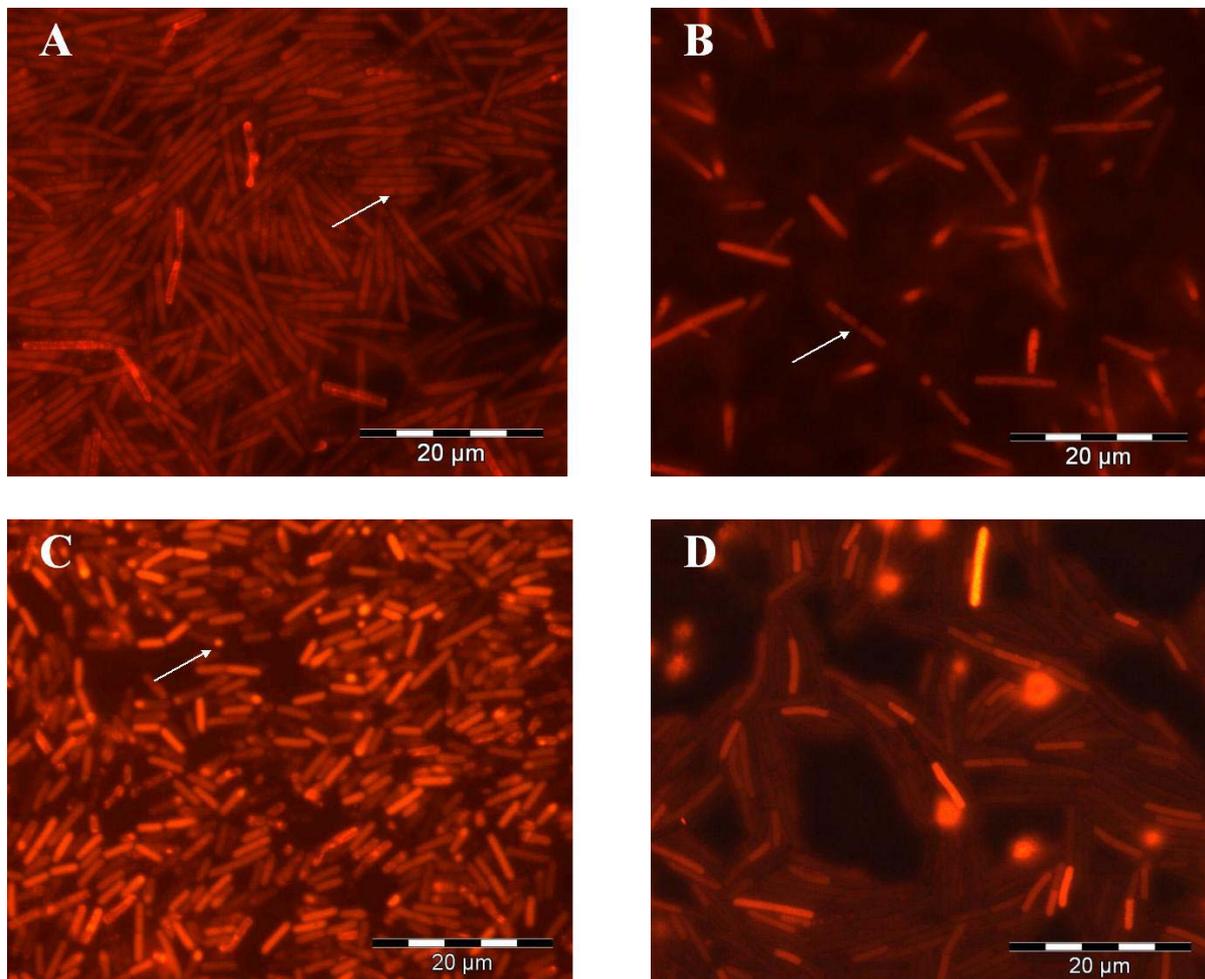


Abb. 5.1.1: Kulturen von *B. sphaericus* JG-A12 (A,C) und NCTC 9602 (B,D) nach Färbung mit 1 µMol/l Calcium Orange Acetoxymethylester (CO AM). Abbildung A und B zeigen 4 h kultivierte Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten ungefärbten Bereiche wurden als Glycogenspeicher identifiziert. In Abbildung C und D sind 16 h kultivierte Bakterien dargestellt. Deutlich zu erkennen sind erhöhte Fluoreszenzen in sporulierenden Zellen. Der Pfeil markiert die Polregion einer Zelle mit erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt, dem Ort der Sporenbildung.

Der spezifisch auf Nickel reagierende Farbstoff Newport Green erwies sich ebenfalls als tauglich zur Färbung von *B. sphaericus* Zellen unter den gewählten Bedingungen. Das für mikroskopische Untersuchungen eher problematische rasche Bleichen spielt bei durchflusszytometrischen Messungen durch die kurze Belichtungszeit der Proben bei der Passage durch den Laserstrahl keine gravierende Rolle. Abbildung 5.1.2 zeigt beispielhaft eine gefärbte Suspension von *B. sphaericus* JG-A12. Die rote Fluoreszenz wird durch den DNA-Farbstoff TO-PRO-3 verursacht und markiert auf diese Weise Bakterien mit geschädigter Membran. Diese Zellen waren für die Aufnahmeuntersuchungen nicht geeignet und wurden demzufolge bei den Messungen nicht berücksichtigt.

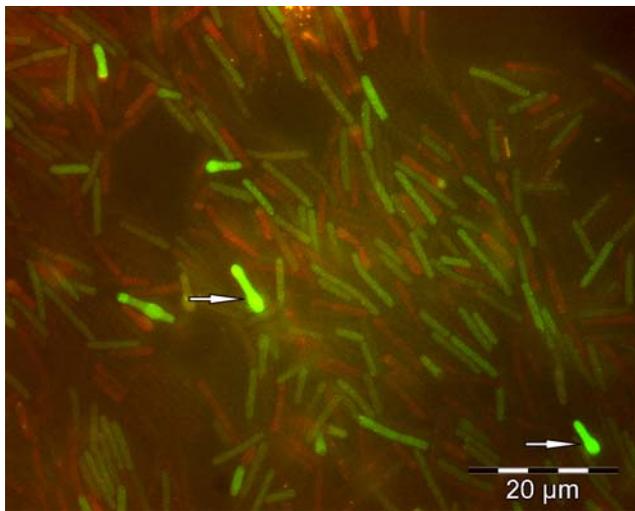


Abb. 5.1.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer 4 h alten Kultur von *B. sphaericus* JG-A12, gefärbt mit $1 \mu\text{Mol/l}$ Oregon Green und 5nMol/l TO-PRO-3. Die Pfeile markieren sporulierende Zellen, zu erkennen an der polaren Verdickung der Zelle und der deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität.

5.1.1 Aufnahme von Kupfer und Nickel

Sowohl Kupfer als auch Nickel spielen in Mikroorganismen eine komplexe Rolle. Beide sind wichtige Spurenelemente und in eine Reihe metabolischer Prozesse involviert. In Bakterien wurden bisher allein neun verschiedene nickelhaltige Enzyme entdeckt (Mobley et al. 1995, Evans und Pickett 2003, Mulrooney und Hausinger 2003). Andererseits kann ein Überschuss dieser Ionen tiefgreifende Störungen des Zellmetabolismus verursachen. Insbesondere Kupfer besitzt toxisches Potential, unter anderem durch die Fähigkeit, Proteine zu denaturieren und die Bildung freier Radikale zu katalysieren. Somit muss die Bakterienzelle den Gehalt dieser Metalle strikt regulieren. Vor allem aus belasteten Habitaten sind verschiedene bakterielle Entgiftungs- oder Resistenzstrategien bekannt (Mobley und Summers 1987, Silver und Phung 1996, Wuertz und Mergeay 1997). Meistens wird der Gehalt an toxischen Ionen in der Zelle über Redoxreaktionen, Komplexbildung durch spezielle Chelatoren oder Transport aus der Zelle durch entsprechende Transportproteine reguliert. Über die Regulation von intrazellulärem Kupfer ist bisher wenig bekannt. Aus früheren Untersuchungen am Gram-positiven Pa-

thogen *Enterococcus hirae* sind zwei verschiedene, Kupfer transportierende ATPasen, CopA und CopB bekannt, die den In- bzw. Efflux von Kupfer regulieren (Odermatt et al. 1993, Solioz und Odermatt 1995, Silver und Phung 1996, Lu et al. 2003, Solioz und Stoyanov 2003). Analoge Metall-transportierende Proteine wurden inzwischen in *E. coli*, *B. subtilis* und *P. syringae* gefunden (Cha und Cooksey 1991, Rensing et al. 1999, Banci et al. 2003, Radfort et al. 2003). Die hier untersuchten Bakterienstämme *B. sphaericus* NCTC 9602, JG-A12 und *P. stutzeri* DSMZ 5190 zeigten alle konzentrationsabhängige Reaktionen sowohl auf Kupfer als auch auf Nickel, wobei Kupfer offensichtlich wesentlich stärker toxisch auf die Zellen wirkt, was sich durch eine Abnahme der Anzahl intakter Zellen vor allem nach Kupfer-Exposition im höheren Konzentrationsbereich bemerkbar machte. Signifikante Unterschiede wurden im Verhalten von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien beobachtet. Zellen von *P. stutzeri* DSMZ 5190 reagieren auf Kupfer bereits bei geringeren Konzentrationen als die beiden *Bacillus*-Stämme. Ob eine schnellere Diffusion durch die Gram-negative Zellwand, ein effektiver Aufnahmemechanismus oder ein Ca^{2+} -Efflux dafür verantwortlich sind, konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden.

Da Nickel für bakterielle enzymatische Aktivitäten eine wichtige Rolle spielt, müssen Bakterien notwendigerweise über entsprechende Mechanismen für dessen Transport verfügen. An einer Reihe unterschiedlicher Mikroorganismen wurden bereits zwei verschiedene Nickel-Transportsysteme beschrieben: Transport durch sogenannte ABC-Transporter oder durch Nickel-spezifische Permeasen (Amoroso et al. 2000, Eitinger und Mandrand-Berthelot 2000, Mulrooney und Hausinger 2003, Hebbeln und Eitinger 2004). In den durchgeführten Untersuchungen an beiden Bazillen lieferte die zelluläre Reaktion auf die Präsenz von Nickel Hinweise auf eine Adaptation des Haldenisolats. Im Gegensatz zum Referenzstamm NCTC 9602, dessen Zellen vor allem im höheren Konzentrationsbereich mehr Nickel aufnehmen, reagieren die Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 verzögert und mit geringeren intrazellulären Gehalten an Nickel. Kontrollexperimente mit fixierten Zellen belegen zwei verschiedene Wege der Nickelaufnahme in die Zellen. Neben einer passiven Diffusion existiert ebenso ein aktiver Aufnahmemechanismus, der durch die Zugabe von Paraformaldehyd ausgeschaltet wird.

Die identischen Kurvenverläufe für beide Stämme nach der Fixierung sprechen darüber hinaus ebenso gegen eine passive Adaptation des Haldenisolats, beispielsweise durch Expression komplexierender Proteine.

5.1.2 Intrazelluläres Calcium

In allen untersuchten Bakterienstämmen provozierten sowohl Kupfer als auch Nickel eine an Ca^{2+} gekoppelte Zellantwort. Alle drei Stämme zeigten in Anwesenheit von Kupfer und Nickel in Abhängigkeit der Konzentration an Metall mehr oder weniger ausgeprägt eine Er-

höhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, was sich bei der Oregon Green Färbung durch eine Zunahme fluoreszierender Zellen bemerkbar machte. Die geringe Fluoreszenz von Oregon Green ohne Präsenz von Metallionen spiegelt hier erwartungsgemäß einen sehr geringen Gehalt an freiem Calcium in den Zellen wider. Die Kenntnisse bezüglich der normalen Calcium-Konzentration und Mechanismen zu dessen Regulation gerade bei den ausgewählten Mikroorganismen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch äußerst begrenzt. Entsprechende Studien am Modellorganismus *E. coli* dokumentieren einen streng regulierten Ca^{2+} -Gehalt von unter 100 nMol/l. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Werten für eukaryotische Zellen. Die strikte Regulation des intrazellulären Gehaltes an Calcium in Mikroorganismen wird dabei offenbar durch zwei verschiedene Transportsysteme realisiert (Ambudkar et al. 1984, Gangola und Rosen 1987). In eukaryotischen Zellen spielt Calcium als sogenannter „second messenger“ eine bedeutsame Rolle bei einer Vielzahl regulatorischer Prozesse (Berridge 1993, Horne und Meyer 1997, Berridge et al. 1998). Aktuelle Untersuchungen lassen vermuten, dass diese multifunktionelle Rolle von Calcium ebenso bei Prokaryoten vorhanden ist (Youatt 1993, Michiels et al. 2002). In Bakterien besitzt es bekanntermaßen eine Triggerfunktion bei der Chemotaxis, ist involviert in die Modulation bestimmter Zellzyklusereignisse oder ist ein strukturelles Element in Zellmembranen, Nukleoiden oder Sporen. Hinweise auf ähnlich komplexe Funktionen von Calcium im zellulären Haushalt von Mikroorganismen lieferten bereits Untersuchungen von Calcium-Kanälen (proteinhaltige und nicht-proteinhaltige), Calcium-bindenden Proteinen (darunter auch von Eukaryoten bekannte, Calmodulin-ähnliche) und Effluxpumpen an einer Vielzahl von Mikroorganismen, darunter Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien, Cyanobakterien oder Archaea (Tsujiibo und Rosen 1983, Lynn and Rosen 1987, Norris et al. 1991, Reusch et al. 1995, Smith 1995, Norris et al. 1996, Das et al. 1997, Herbaud et al. 1998, Kakinuma 1998, Rigden et al. 2003, Waditee et al. 2004). Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte erstmalig mit einer in dieser Kombination neuen Methode gezeigt werden, dass Bodenbakterien wie Bazillen und Pseudomonaden auf die Anwesenheit von Kupfer und Nickel mit einer Änderung ihres intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes reagieren. Die Nutzung eines Nickel-sensitiven Farbstoffes, der keinerlei Interferenz mit intrazellulärem Calcium zeigt und eines Ca^{2+} -spezifischen Farbstoff mit sehr geringer Affinität zu Nickel ermöglichte die Untersuchung der Aufnahme von Ni^{2+} -Ionen in die Zelle und deren Stressantwort. Im Fall von Kupfer gestaltet sich die Interpretation der Daten etwas komplizierter. Anhand der durchgeführten Messungen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit absoluter Sicherheit bestimmt werden, ob die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten durch Quencheffekte am fluoreszierenden intrazellulären Ca^{2+} -Komplex durch die affineren Cu^{2+} -Ionen hervorgerufen werden oder möglicherweise der Efflux von Ca^{2+} -Ionen aus den Zellen eine Rolle spielt. Letzteres erscheint jedoch eher unwahrscheinlich,

betrachtet man die Zunahme der fluoreszierenden Zellen im Konzentrationsbereich $\leq 50 \mu\text{Mol/l}$. Eine plötzliche Umkehr des Effektes bei weiterer Erhöhung der Kupferkonzentration kann vom jetzigen Wissensstand aus nicht einleuchtend begründet werden. Ungeachtet dieser Einschränkungen konnte der Nachweis erbracht werden, dass zum einen ein Ca^{2+} -abhängiger Regulationsmechanismus in den untersuchten Mikroorganismen existiert und andererseits Metallionen wie Nickel von stoffwechselnden Bakterienzellen aufgenommen werden.

Die Durchflusszytometrie in Kombination mit den geeigneten ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen bietet somit die Möglichkeit, eine große Anzahl von bakteriellen Zellen in relativ kurzer Zeit unter Berücksichtigung der Variabilität innerhalb einer Population nach mehreren Kriterien zu untersuchen. Unter dem Aspekt des Informationsgewinns und der Zeitersparnis bietet diese neue Methode eine Alternative zu den etablierten Standardtechniken TEM und EDX-Analyse. Prinzipiell lassen sich auf diese Weise mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen eine Vielzahl verschiedener Ionen und deren Einfluss auf Mikroorganismen untersuchen. Die Aufklärung dieser Wechselwirkungen zwischen Metallionen und Mikroorganismen spielt eine entscheidende Rolle beim Verständnis von Bioremediationsvorgängen und Adaptationsprozessen. Aus den grundlegenden Erkenntnissen über das Aufnahmevermögen von Bakterienzellen für verschiedene Ionen können wiederum Schlussfolgerungen für den ökonomisch sinnvollen Aufwand bei der Herstellung von Bioceren abgeleitet werden. Besitzt ein Bakterienstamm keine Aufnahmemechanismen für ein bestimmtes Ion, müssen die Bedingungen während der Biocererzeugung lediglich die Sorptionskapazität der Bakterienoberfläche garantieren. Im anderen Fall kann der Zugewinn der Bindungskapazität durch aktive Aufnahmeprozesse der Zellen unter Umständen den zusätzlichen Herstellungsaufwand zur Gewährleistung von Zellvitalität und -aktivität rechtfertigen.

5.2 Dünne Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen von *Bacillus sphaericus* JG-A12

Für zukünftige technische Anwendungen verspricht die Verwendung dünner Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Bakterien gegenüber dem Einsatz von Bulkmaterial auf den ersten Blick einige Vorteile. Auf einer Vielzahl verschiedener Substrate lassen sich durch einfache Tauch- (dip coating), Rotations- (spin coating) oder Sprühbeschichtung (spray coating) dünne, gleichmäßige Sol-Gel-Filme erzeugen, deren Dicke über die Zusammensetzung und Viskosität des Sols und die Aufbringungsgeschwindigkeit kontrollierbar ist (Sakka und Yoko 1992, Schmidt 1992). Mit Hilfe dieser Technik können große Flächen unterschiedlicher Geo-

metrie beschichtet und somit eine erhebliche Materialeinsparung erreicht werden. Des Weiteren sind die Diffusionswege von Nährstoffen und gelösten Substanzen im Gegensatz zu Bulkpartikeln wesentlich geringer, was sich in einer erhöhten Effizienz bei der Verwendung des Materials niederschlägt. Als kritische Größe ist jedoch die Überlebensfähigkeit der immobilisierten Bakterien anzusehen. Vitalitätstests an eingebetteten vegetativen Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 zeigten eine unvoreilhaftige Sensitivität der Bakterien gegen Alterung und Trocknung des Gels (Kapitel 4, Abschnitt 1.3.2). Damit sind diese hier untersuchten Materialien zumindest für Anwendungen, die metabolisch aktive Zellen erfordern, nicht geeignet. Als aussichtsreiche Alternative zur Erzeugung lagerfähiger Materialien wird die Verwendung der bakteriellen Endosporen angesehen. Bedingt durch ihre physische Robustheit wird erwartet, dass sich Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen über einen größeren Zeitraum ohne Aufwand und ohne Verlust der Vitalität aufbewahren lassen. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war deshalb, wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, die Untersuchung dünner Schichten mit eingebetteten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 unter dem Aspekt der Keimungsfähigkeit (auch nach längerer Lagerdauer von bis zu 2,5 Jahren) und der Ermittlung der dazu erforderlichen Bedingungen.

5.2.1 Einfluss von Calciumdipicolinat auf die Keimungsfähigkeit

An verschiedenen Sporensuspensionen der Gattung *Bacillus* wurde bereits vor mehr als 40 Jahren die keimungsinduzierende Wirkung von extern zugesetztem Ca^{2+} -DPA nachgewiesen (Kapitel 4, Abschnitt 4.1). Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte dieser Befund eindeutig bestätigt und auf immobilisierte Sporen des Stammes *B. sphaericus* JG-A12 übertragen werden. In Abschnitt 4.4.2 wurde gezeigt, dass die einstündige Aktivierung der Sporen in dünnen Sol-Gel-Schichten mit einem 1:1 Chelat aus Ca^{2+} und 2,6-Pyridindicarboxylsäure (DPA) vor der Inkubation mit Nährlösung (NB-Medium) die Keimungsrate im Vergleich zur Inkubation ohne Aktivierung durchschnittlich um das Fünf- bis Achtfache erhöht. Die signifikante Erhöhung der Keimungsrate konnte weder durch DPA noch durch Ca^{2+} allein erreicht werden. Diese Ergebnisse sind in mehrerer Hinsicht bedeutsam. Ein wichtiger Aspekt für zukünftige biotechnologische Anwendungen ist zweifellos die durch die Immobilisierung in dünnen Sol-Gel-Schichten effektiv unterdrückte spontane Auskeimung bakterieller Sporen. Dafür spricht die niedrige Keimungsrate von $< 5\%$ bei Inkubation in Nährmedium. Durch die Möglichkeit, über einen externen Stimulus wie Ca^{2+} -DPA konzentrationsabhängig die Keimung zu induzieren und die Rate an auswachsenden vegetativen Zellen zu beeinflussen und somit den Anteil metabolisch aktiver Biomasse zu modulieren, eröffnen sich neue Ansätze für die Gestaltung biotechnologischer Verfahren im Hinblick auf Bioreaktorgestaltung und Prozesskontrolle. Zusätzlich stützen die gewonnenen Resultate die These, dass es sich bei der Auskeimung bakterieller Endosporen

um einen nach einem einheitlichen Schema ablaufenden Prozess handelt. Anhand der aktuellen Ergebnisse können für die Vorgänge in den untersuchten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 während der Immobilisierung und Keimung in den Sol-Gel-Schichten folgende Abläufe diskutiert werden:

In der Sol-Phase liegt das Silikat als ca. 6 nm große Partikel dispergiert vor (Soltmann et al. 2003b). Vermutlich passieren diese Partikel während der Immobilisierung das durchlässige Exosporium und lagern sich an den Sporenhüllen an (siehe auch Abschnitt 4.4.1, Abb. 4.4.1.1). Da diese im Gegensatz zum Exosporium über Barriereigenschaften verfügen, ist eine weitergehende Penetration der Sol-Partikel bis zur inneren Sporenmembran mit den Nährstoffrezeptoren unwahrscheinlich, ebenso die Blockade des für den physiologischen Keimungsweg bedeutsamen lytischen Enzyms SleB (Paidhungat et al. 2001, Moir 2003, Setlow 2003). Plausibel hingegen scheint dafür die Inaktivierung von GerP-ähnlichen (Trans-)Membranproteinen, die sich in den Sporenhüllen befinden, Einfluss auf die Struktur der Sporenhüllen nehmen und den Transport von Nährstoffen zu den Rezeptoren ermöglichen sollen (Behravan et al. 2000, Setlow 2003). Die Sensitivität der Sporen gegenüber der Stimulierung mit externem Ca^{2+} -DPA weist darüber hinaus indirekt auf die Präsenz eines funktionsfähigen CwlJ-ähnlichen lytischen Enzyms in *B. sphaericus* JG-A12 hin, wie es von Paidhungat und Mitarbeitern (2001) für die unphysiologische Keimung von *B. subtilis* beschrieben wurde. Allerdings ist dieser hier vorgeschlagene Mechanismus derzeit noch als Hypothese zu betrachten. Zur Absicherung sind weiterführende molekularbiologische Untersuchungen vonnöten.

Das Keimungspotential der immobilisierten Sporen bleibt über Jahre hinweg erhalten, was durch Untersuchungen an 2,5 Jahre alten, trocken gelagerten Schichten bestätigt werden konnte. Diese Tatsache macht dünne Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen auch unter ökonomischen Gesichtspunkten interessant. Ohne Berücksichtigung besonderer Lagerbedingungen oder Versorgung mit Nährstoffen können diese über einen langen Zeitraum aufbewahrt und bei Bedarf mit geringem Aufwand reaktiviert werden. Individuelle Unterschiede in der Keimungsgeschwindigkeit einzelner Sporen können sowohl durch intrinsische Faktoren als auch durch lokale Unterschiede in der Dicke der Sol-Gel-Schicht mit Auswirkungen auf die Diffusionsgeschwindigkeit von Ca^{2+} -DPA und Nährmedium hervorgerufen werden. Die Auswertung von REM-Aufnahmen (siehe dazu Abb. 4.4.2.1) ergibt zudem, dass zum vollständigen Auswachsen der neu entstehenden vegetativen Zellen das lokale Aufbrechen der Silikatschicht erforderlich ist. Je dicker die Schicht, umso größer muss demzufolge die durch die Sporen aufzuwendende Kraft sein, eine weitere mögliche Ursache für die zeitliche Staffelung der Keimung.

Anhand von mikroskopischen Befunden konnte außerdem gezeigt werden, dass für ein vollständiges und quantitatives Auswachsen der Sporen bis zum vegetativen Stadium eine gewisse "Schwellenkonzentration" an Ca^{2+} -DPA von etwa 30 mMol/l benötigt wird. Unterhalb dieser Konzentration sind vermehrt deformierte und gequollene Sporen zu finden, ein Indiz für eine unvollständige Keimung.

Ein weiterer interessanter Aspekt der vorgestellten Ergebnisse ist die Bewertung der Unterdrückung des nährstoffinduzierten Keimungsweges als Resultat der Einbettung unter dem Gesichtspunkt der biologischen Sicherheit. Durch die Sol-Gel-Immobilisierung in dünnen Schichten kann ein unerwünschtes oder unbeabsichtigtes Auswachsen bakterieller Sporen wirkungsvoll verhindert werden. Auf eine mögliche praktische Relevanz wird deshalb in Kapitel 6 noch einmal eingegangen.

5.2.2 Mechanische Spannungszustände während der Keimung

Die im vorigen Kapitel diskutierten Phänomene in dünnen Sol-Gel-Schichten während des Prozesses der Auskeimung bakterieller Sporen beschreiben die auftretenden Effekte auf einer rein qualitativen Ebene. Diese außerdem mit einer geeigneten Methode zu quantifizieren, stellt eine wertvolle und zur Beurteilung von Biocerschichten unter materialwissenschaftlichen Gesichtspunkten unerlässliche Ergänzung dar. Anhand der REM-Aufnahmen (Abb. 4.4.2.1) ist leicht nachzuvollziehen, dass die Quellung der Sporen, verbunden mit einer Volumenzunahme, mechanische Spannungszustände in der Silikatschicht verursacht, die schließlich zur lokalen Rissbildung führt. Zur Erfassung der auftretenden Kräfte während der Keimung wurde erfolgreich eine kapazitive Messanordnung eingesetzt (Abschnitt 4.4.3). Die bei der Keimung auftretenden Spannungszustände in der fixierten Schicht resultieren in einer elastischen Verformung des darunter liegenden steifen Substrates. Auf diese Weise war es möglich, selbst geringe elektrische Spannungsänderungen zu detektieren. Unter Beibehaltung von konstanter Temperatur und Luftfeuchte lassen sich außerdem thermisch und hygroskopisch bedingte Artefakte ausschließen. Dank des günstigen Schichtdickenverhältnisses von Sol-Gel-Schicht und Siliziumwafer konnten daraufhin die maximal auftretenden mechanischen Spannungsänderungen ohne Kenntnis der elastischen Konstanten der zu untersuchenden Schicht mit Hilfe der *Stoney*-Näherung berechnet werden. Sie lagen im Bereich zwischen 33 und 80 MPa. Allerdings ist eine kritische Bewertung der Absolutwerte angebracht. Im Gegensatz zu den von Tuckermann (2001) vorgegebenen Bedingungen wurde das System durch das Aufkleben eines Teflonringes modifiziert. Inwieweit dies möglicherweise zu Änderungen im Krümmungsverhalten des Wafers führt, konnte anhand der Versuchsdurchführung nicht exakt aufgeklärt werden. Tendenziell kommt es zu einer zusätzlichen Versteifung des Wafers, was sich in kleineren Krümmungsänderungen bei gleichen ΔG äußert. Mit Hilfe von Ver-

gleichsmessungen an beschichteten und unbeschichteten Wafern, bei denen der Teflonring nicht aufgeklebt war, konnte die Beeinflussung der Konstante β größenmäßig abgeschätzt werden. Sie fällt bei aufgeklebtem Ring etwa um den Faktor 0,15 geringer aus. Des weiteren spiegeln die Messwerte nur Effekte auf einem Teilbereich des Wafers und nicht auf der gesamten Fläche wider. Insofern müssen die Messwerte als Näherungen angesehen werden. Ungeachtet dessen liefert die Messanordnung reproduzierbare Ergebnisse, die einen Vergleich verschiedener Schichten ermöglichen. Zur exemplarischen Beschreibung der auftretenden Effekte wurden drei beschichtete Wafer ausgewählt (Abb. 4.4.3.2). Charakteristisch bei allen untersuchten Schichten war das Auftreten von zwei bis drei zeitlich verschiedenen Phasen. Im ersten Bereich trat eine mehr oder weniger ausgeprägte Abschwächung des Messsignals auf, die der Entstehung von Druckspannungen in der Schicht zugeordnet werden können (Abb. 5.2.2.1 A). In diesem zeitlichen Rahmen zwischen 0 und maximal 250 Minuten erfolgt die Aktivierung der Sporen mit Ca^{2+} -DPA und der Austausch gegen Nährmedium, einhergehend mit der Rehydratisierung und Quellung der Sporen bis hin zum Beginn des Auswachsens vegetativer Zellen. Ist dieser Zustand erreicht, bewirken Längenwachstum und Herauslösen der vegetativen Zellen aus der Silikatschicht eine Relaxation. Eine Umkehrung des Effektes, wie besonders deutlich an der ersten untersuchten Schicht festzustellen, kann dem Auftreten von Zugspannungen zugeschrieben werden. Dieser Fall ist in Abbildung 5.2.2.1 B schematisch dargestellt.

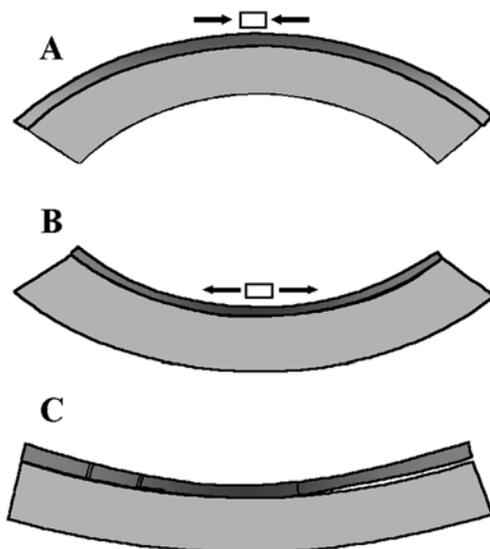


Abb. 5.2.2.1: A) Stadium I: Entstehung von Druckspannungen in dünnen Sol-Gel-Schichten, hervorgerufen durch Quellung, Volumenzunahme und beginnendes vegetatives Wachstum der darin immobilisierten bakteriellen Sporen.

B) Stadium II: Relaxation und nachfolgende Entwicklung von Zugspannungen als Folge des Auswachsens und Ablösens vegetativer Zellen und Schrumpfung in der Matrix verbliebener, nicht vollständig ausgekeimter Sporen.

C) Stadium III: Schichtablösung aufgrund zu hoher Zugspannungen im Zusammenhang mit dem Auswachsen vegetativer Zellen und Schrumpfungerscheinungen kollabierter Sporen.

Als Ursache kommen Schrumpfungseffekte der Matrix nach Herauswachsen der vegetativen Zellen aus der Schicht und/oder Kollabieren nicht vollständig ausgekeimter Sporen in Betracht. Entsprechende Hinweise liefern REM-Aufnahmen, die besonders viele kollabierende

Sporen in auffälligen Clustern mit Durchmessern zwischen 10 und 60 μm (wie in Abb. 5.2.2.2 zu sehen) zeigen. An diesen Clustern sind deutlich Schrumpfungerscheinungen und Risse zu sehen, die vermutlich die Abschwächung des Messsignals im dritten Stadium bewirken und lokale Schichtablösungen aufgrund zu großer Zugspannungen zur Folge haben, wie in Abb. 5.2.2.1 C dargestellt.

Warum im Gegensatz zu den beiden anderen Schichten hier weniger vegetative Zellen zu finden waren, kann nicht schlüssig begründet werden. Überraschend sind die sehr hohen Werte für die beobachteten Spannungsänderungen. Das legt den Schluss nahe, dass die Schichtspannung einen Einfluss auf die Keimungskinetik der Sporen ausüben kann. Wie bereits von Paidhungat et al. (2002) angeführt wurde, kann die interne Ausschüttung von Ca^{2+} -DPA durch äußere Belastung, wie das Anlegen hoher Drücke von 550 MPa, induziert werden. Es ist durchaus nachvollziehbar, dass lokal auftretende hohe Druckspannungen in der Sol-Gel-Schicht eine Freisetzung von sporeneigenem Ca^{2+} -DPA provozieren können. Dieser Effekt würde in Verbindung mit dem Spannungsaufbau beim Auskeimen der Sporen zu einer Art von Selbstverstärkung der Transformation in vegetative Zellen führen. Sollte die darüber liegende Gel-Schicht lokal so dick sein, dass die darunter liegenden aktivierten Sporen nicht in der Lage sind, diese zu durchbrechen, muss der Prozess mit dem Kollaps der Sporen enden, was wiederum zu einer Destabilisierung der Schicht führt. Damit kann der Befund in Abb. 5.2.2.2 erklärt werden.

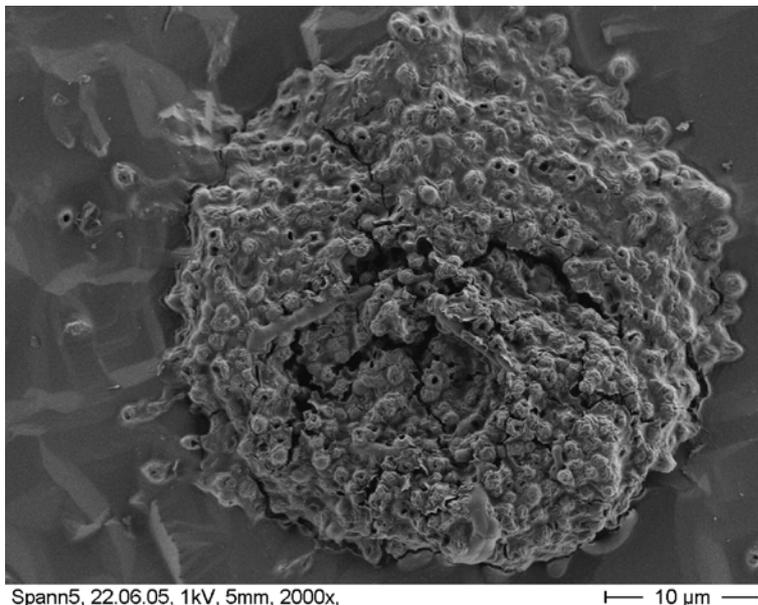


Abb. 5.2.2.2: REM-Aufnahme eines geschrumpften Clusters aus immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12. Auffällig sind die teilweise kollabierten, aufgeweichten Sporen und die lokale Rissbildung in der Sol-Gel-Schicht in und um den Cluster herum.

Prinzipiell kann aus den hier vorgestellten Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass es möglich ist, mechanische Spannungszustände in dünnen Sol-Gel-Schichten mit auskeimenden bakteriellen Sporen kapazitiv zu bestimmen und zu bewerten. Dabei muss selbstverständlich

berücksichtigt werden, dass es sich bei den Messwerten um mittlere, angenäherte Werte handelt, die es jedoch gestatten, die einzelnen Schichten miteinander zu vergleichen. Auch wenn lokale Abweichungen nicht direkt detektierbar sind, lassen die Verläufe der Spannungskurven der einzelnen Schichten und die korrespondierenden mikroskopischen Befunde die Schlussfolgerung zu, dass Inhomogenitäten in der Verteilung der Biokomponente die Schichtstabilität insgesamt ungünstig beeinflussen. Diese Ergebnisse besitzen insofern praktische Relevanz, als sich das vorgestellte Messprinzip unter Einhaltung bestimmter Rahmenbedingungen auf andere Biokeramiken übertragen lässt. Weiterführende systematische Untersuchungen können darüber hinaus Zusammenhänge zwischen Art, Anteil und Verteilung der Biokomponente, dem Einfluss der Schichtdicke, auftretende Spannungsentwicklung und resultierende Schichtbeanspruchung aufzeigen.

5.3 Biologisch induzierte Schädigung von Bioceren

Durch mikrobielle Einwirkungen bedingte Materialschädigungen und –veränderungen sind ein seit langem bekanntes Phänomen und die damit verbundenen ökonomischen Auswirkungen beträchtlich (Flemming 1994). Nicht zuletzt deshalb sind diese Vorgänge Gegenstand intensiver Untersuchungen. Der Begriff Biokorrosion wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der durch Mikroorganismen hervorgerufenen Oxidation von Eisen geprägt. Sie stellt jedoch nur einen Teil der von Mikroorganismen verursachten Materialveränderungen dar. Man unterscheidet zwischen Biofouling, mikrobiell induzierter Verwitterung und Biokorrosion. In allen Fällen wird durch die Anwesenheit verschiedener Mikroben und deren Stoffwechselaktivitäten in außerordentlich komplexer Weise die Oberfläche des Materials (Substrat) beeinflusst.

Unter Biofouling versteht man den Bewuchs einer Materialoberfläche mit einem Konsortium verschiedener Mikroorganismen, dem Biofilm. Seine Entwicklung verläuft als mehrstufiger Prozess, bei welchem als initialer Schritt die Adsorption von Molekülen an einer feuchten Oberfläche stattfindet (Induktionsphase). Die Geschwindigkeit, mit der sich eine adsorbierte Schicht (conditioning layer) ausbildet, hängt entscheidend von den physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche, der Adsorbatkonzentration, der Affinität zur Oberfläche und der hydrodynamischen Umgebung ab (Chamberlain 1992, Mozes und Rouxhet 1992a) und kann in feuchter Umgebung oftmals wenige Minuten betragen. In wässrigen Systemen sind adsorbierende Moleküle oft von komplexer Zusammensetzung, zum Beispiel Huminsäuren oder Polysaccharide, Lipopolysaccharide und Proteine. Dieser Phase der Schichtbildung folgt eine Zeit der Kontaktierung durch Mikroorganismen, die unterteilt wird in reversible und irreversible Adhäsion. Anfänglich sind die Wechselwirkungen zwischen Mikroben und Substrat

gering, sodass sich die Zellen durchaus wieder von der Oberfläche lösen können. Nach und nach erfolgt eine logarithmische Akkumulation, hauptsächlich durch Vermehrung der angehefteten Mikroorganismen. Die Dauer der Akkumulationsphase und somit auch die Dicke des Biofilms hängt dabei entscheidend vom Angebot an Nährstoffen und den einwirkenden Scherkräften ab. Die angehefteten Mikroorganismen segregieren in großer Menge extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), die überwiegend aus Polysacchariden und Proteinen, aber auch aus Nukleinsäuren, (Phospho)Lipiden und anderen polymeren Substanzen bestehen. Sie bilden eine stark wasserhaltige Matrix und geben somit dem Biofilm Form und physikalische Eigenschaften, erleichtern das Anheften weiterer Mikroorganismen, fixieren partikuläres Material, wie Zelldebris, mineralische und wasserlösliche Substanzen sowie Nährstoffe, binden eine Reihe von Schwermetallen, enthalten verschiedene Exoenzyme und dienen als Feuchtigkeitsspeicher (Cooksey 1992a, Flemming 1994, Flemming und Wingender 2001, Flemming und Leis 2002, Flemming und Wingender 2002). Der Existenz der EPS werden die außergewöhnliche Stabilität und Resistenz des Biofilms gegenüber toxischen Substanzen zugeschrieben. Innerhalb eines solchen Biofilms zeigen die immobilisierten (sessilen) Mikroorganismen veränderte metabolische Aktivitäten gegenüber denen in ihrer planktonischen Lebensweise (Cooksey 1992b, Mozes und Rouxhet 1992b, Wimpenny et al. 1993).

Biofilme sind die älteste bekannte Lebensform auf der Erde (Flemming 1994, Beveridge et al. 2002). Sie können jegliche Arten von Grenzflächen besiedeln und gelten als die eigentliche, bevorzugte Lebensform der meisten Mikroorganismen. Demzufolge ist in jedem unsterilen, mikrobiell besiedelten System bei bereits geringem Nährstoffangebot und Feuchte mit der Bildung von Biofilmen zu rechnen. Beim Einsatz von Biocerpartikeln als Filtermaterial zur Reinigung neutraler, relativ schwach mit Schwermetallen und Radionukliden belasteter Haldensickerwässer waren unter den vorliegenden Bedingungen alle Voraussetzungen zur Biofilmentwicklung gegeben: mit Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Blau- und Grünalgen besiedeltes Wasser, ein ausreichendes Nährstoffangebot in Gestalt der immobilisierten Biokomponente und ein mesoporöses Substrat mit geeigneten Oberflächeneigenschaften. Anhand licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen der verschiedenen Biocermaterialien konnten alle Komponenten eines intakten Biofilms (verschiedene Bakterien, in Einzelfällen auch Sprosspilze, Cyanobakterien und andere Mikroalgen) teilweise innerhalb eines dichten Geflechts von EPS nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.5). Das Auftreten von Ein- und Mehrzellern auf den bewachsenen Biocerpartikeln ist ein weiteres, typisches Merkmal für einen komplett ausgeprägten Biofilm. Das reichliche Nährstoffangebot innerhalb des Biofilms bietet unter anderem für Ciliaten und Nematoden ausreichend Überlebensmöglichkeit. Der Bewuchs trat verständlicherweise am Säulenzulauf am stärksten auf, wo offensichtlich eine „Aufkonzentrierung“ der Mikroorganismen stattfand

und das Nähr- und Sauerstoffangebot am größten war. An diesen Stellen wurden auch die meisten verschiedenen Mikroorganismenarten gefunden. Die dichte Packung der Säulen mit den Biocerbulkpartikeln verhinderte vermutlich das weitere Einwandern größerer Organismen wie Algen und Diatomeen in den mittleren und unteren Säulenbereich. An diesen Stellen dominierten Bakterien. Allerdings muss bedacht werden, dass die Probenentnahme der Partikel nach dem Zufallsprinzip erfolgte und die Präparation für die elektronenmikroskopische Untersuchung unter relativ harschen Bedingungen vorgenommen wurde. Demzufolge repräsentieren die Befunde keine nativen Bedingungen mehr. Es ist nicht auszuschließen, dass weniger fest adsorbierte Partikel oder Mikroorganismen auf der Bioceroberfläche bei der Präparation abgelöst wurden. Darüber hinaus konnte an Biocerpartikeln mit einem dichten Bewuchs keine Aussage über die Beschaffenheit der eigentlichen Oberfläche gemacht werden. Trotz dieser Limitationen ist die Rasterelektronenmikroskopie generell als geeignete Methode zur Feinstrukturuntersuchung an Bioceren anzusehen.

Besonders auffällig bei allen Proben war das Fehlen der ursprünglich immobilisierten Biokomponente. Diese wird offenbar nach einer gewissen Zeitspanne während des Betriebs der Filtersäulen komplett aus der Matrix herausgelöst. Bisher ist davon auszugehen, dass lytische Exoenzyme der Fremdbesiedler in erster Linie dafür verantwortlich sind (Wingender und Jaeger 2002). Diese Enzyme, zum Großteil Hydrolasen, bewirken die Spaltung polymerer organischer Substanzen (z. B. fremde Zellen) in kleinere, verwertbare Moleküle. Bedingt durch das Herauslösen der Biokomponente aus der Silikatmatrix und das damit verbundene Freisetzen zusätzlicher Poren und Hohlräume nimmt die mechanische Stabilität der Biocerpartikel ab. Gleichzeitig dringen filamentöse Mikroorganismen in die Hohlräume ein und verstärken den destabilisierenden Effekt. Neben diesen hier beschriebenen materialschädigenden Einflüssen durch mechanische Destabilisierung erbrachten die elektronenmikroskopischen Feinstrukturuntersuchungen zusätzlich Hinweise auf eine biochemisch induzierte Veränderung der Bioceroberfläche durch Mikroorganismen. Die unmittelbare räumliche Nähe und die nahezu identischen Abmessungen von Mikroorganismenkolonien auf Biocerpartikeln und dazu korrespondierende Vertiefungen in der Partikeloberfläche lassen vermuten, dass diese Organismen in der Lage sind, die silikatische Biocermatrix aufzulösen. Eine Identifizierung der Mikroorganismen war unter den gegebenen Bedingungen zwar nicht möglich, jedoch sind in der Literatur Vertreter verschiedener Gattungen Bakterien aber auch Pilze und Algen sowie deren Sporen (Leadbeater und Callow 1992) beschrieben worden, die an degradativen Einflüssen auf silikatische Gesteine (Webley et al. 1960, Banfield et al. 1999, Gaylarde und Morton 2002) und Gläser (Sand et al. 2002, Ullman und Welch 2002) beteiligt sind. In erster Linie sind von den Mikroorganismen ausgeschiedene metallbindende Chelatoren, organische (bspw. Oxal-, Citronen- und Glucon-) wie anorganische (bspw. Schwefel-, Kohlen-, Salpeter- und salpetrige) Säuren oder auch Basen (Ammoniak, Harnstoff) dafür ver-

antwortlich, die bevorzugt Alkali- und Erdalkali-Ionen aus den Mineralien herauslösen und somit die Netzwerkstruktur destabilisieren (Ehrlich 1996, Weissmann und Drewello 1996). Analoge komplexe Mechanismen spielen möglicherweise auch bei der Verwitterung von Bioceren eine Rolle, begünstigt durch die mesoporöse Struktur der Silikatmatrix, eventuell enthaltene Verunreinigungen im Sol, unvollständige Kondensation des Gels oder durch Nährmedienreste, die durch Beimischen der Biokomponente eingetragen werden. Denkbar und auch in vielen Fällen nachgewiesen sind im Hinblick auf die teilweise üppige Besiedlung mit den unterschiedlichsten Organismen das Entstehen saurer und basischer Mikroareale auf der Oberfläche der Partikel, die lokale Verwitterungsprozesse katalysieren. Depolymerisiertes Silikat wiederum wird von Diatomeen, die im Biofilm ebenfalls sehr reichlich vorhanden sind, als Orthosilikat (H_2SiO_4) aufgenommen und stellt die wichtigste strukturelle Komponente der Schale dar (Trevors 1997, Bäuerlein 2003, Brümmer 2003, Perry 2003). Inwieweit und in welchem Umfang Silikat von Bakterien inkorporiert wird, ist noch nicht systematisch untersucht worden, erscheint jedoch durchaus wahrscheinlich. Darauf deuten entsprechende Untersuchungen hin (Heinen 1960, Ehrlich 1996, Trevors 1997). Unbestritten hingegen ist die Rolle, die Bakterien bei der Biomineralisation spielen. Silikatische Mineralien können dabei von ihnen sowohl in amorpher als auch in kristalliner Form abgeschieden werden (Beveridge et al. 2002, Bäuerlein 2003). Das Auftreten von mikrokristallinen Silikatrossetten auf den Biocerpartikeln ist ein Indiz für eine solche mikrobielle Aktivität, ebenso die nadelförmigen CaCO_3 -Deposite (vermutlich Aragonit, s. a. Abschn. 4.5, Abb. 4.5.11 und 4.5.12). Letztgenannte Ablagerungen entstehen durch respiratorische Aktivitäten von Bakterien und blau-grünen Algen (Cyanobakterien) unter Freisetzung von Bicarbonat, welches mit frei verfügbarem Calcium wasserunlösliches Calciumcarbonat bildet und eine typische Biofilmkomponente darstellt (Leadbeater und Callow 1992, Beveridge et al. 2002, Flemming und Wingender 2002, Gaylarde und Morton 2002).

Für den Einsatz von Bioceren als Filtermaterial stellen die hier diskutierten Phänomene ein erhebliches Problem dar. Einerseits muss durch die Biofilmentwicklung und Verwitterung der Biocerpartikel nach einer gewissen Zeit mit der Verblockung der Filtersäulen gerechnet werden, andererseits werden durch die Lyse der Biokomponente spezifische Bindungseigenschaften (Affinität, Selektivität und Kapazität) dramatisch verändert. Obwohl die Fremdbesiedler wie auch der Biofilm als Einheit metallbindende Eigenschaften besitzen, lässt ihr unkontrolliertes Aufwachsen eine Steuerung des Prozesses nicht zu. Der Zusatz biozider Substanzen, zusätzliche Belüftung, die Vorschaltung von Grobfiltern oder gelegentliches Gegenspülen wirken sich positiv auf die Standzeiten der Säulen aus. Denkbar ist ebenso die Verwendung weniger stark abbaubarer Trägermaterialien, wie Zellulose, Kohlenstofffasern oder der Einsatz von Sol-Gel-Keramiken aus einem Al_2O_3 -

SiO₂-Gemisch. Da eine dauerhafte Verhinderung der Biofilmbildung unter realen Betriebsbedingungen nicht gewährleistet werden kann, muss alternativ mit geeigneten Mitteln, wie zum Beispiel Chlorung, die Konzentration an Mikroorganismen im Wasser möglichst niedrig und das Ausmaß des sich entwickelnden Biofilms unter Kontrolle gehalten werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Biocere verkörpern eine neue Klasse von keramischen Funktionswerkstoffen, die sich in ihren Eigenschaften von herkömmlichen Keramiken unterscheidet. Am Beispiel ausgewählter Biocere mit immobilisierten vegetativen Zellen und Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Zusammenhänge zwischen Gefügeausbildung und Funktionalität, besonders unter dem Gesichtspunkt metallbindender Eigenschaften, untersucht. Die spezielle Charakteristik dieser Materialien, resultierend aus der Kombination des spröden, porösen Werkstoffes Glas mit einer in ihrer Zusammensetzung äußerst komplexen Biokomponente machte eine Betrachtung aus verschiedenen Blickwinkeln und auf unterschiedlichen Ebenen notwendig. Grundsätzlich steht hierbei die Frage, ob es möglich ist, wesentliche Funktionen der Biokomponente in einem solchen hybriden Verbundmaterial aufrecht zu erhalten, d. h. letztlich eine "lebende" Keramik zu erzeugen. Modellhaft ist diese Frage am Beispiel von Bioceren untersucht worden, in denen die Biosorptionseigenschaften von Bakterien gezielt zur Entwicklung neuer selektiver Filtermaterialien genutzt werden sollen. Von praktischer Relevanz sind aus materialwissenschaftlicher und biotechnologischer Sicht Aussagen zur Materialstabilität und Lagerfähigkeit sowie Effizienz und Regenerierbarkeit während der Nutzung. Aus mikrobiologischer und biochemischer Sicht hingegen interessieren grundlegende Prozesse und Mechanismen, wie die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Metallionen, die Überlebensfähigkeit der immobilisierten Bakterien oder das Keimungsverhalten immobilisierter bakterieller Endosporen.

Die Komplexität der Fragestellungen bedingt die Anwendung einer umfangreichen Palette verschiedener Werkzeuge und Methoden zu deren Lösung. Hier kommen vor allem bereits gut etablierte licht- und elektronenmikroskopische Verfahren zum Tragen. Dank der ausgezeichneten Transparenz der Biocere hat sich die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als besonders gut geeignet zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Biokomponente in der Matrix und der Überlebensfähigkeit der immobilisierten vegetativen Zellen erwiesen. Mit Hilfe des proteinbindenden Farbstoffes TAMRA konnte nachgewiesen werden, dass die Bakterienzellen innerhalb der Matrix homogen verteilt und vereinzelt vorliegen. Das bedeutet, dass die Herstellungsbedingungen geeignet sind, um ein einheitliches Material zu erzeugen. Vitalitätstests wurden unter Nutzung des LIVE/DEAD[®] *Bac* Light[™] Bacterial Viability Kits durchgeführt. Mit Hilfe der zwei darin enthaltenen Farbstoffe SYTO 9 und Propidiumjodid, die sich in ihrer Membrangängigkeit unterscheiden, konnten die Anteile geschädigter und intakter Zellen in den Bioceren in Abhängigkeit von Lagerbedingungen und Zeit bestimmt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die verwendeten Zellen sehr sensibel auf

Alterung und Trocknung des Silica-Gels reagieren. Für Anwendungen, die metabolisch aktive Zellen erfordern, sind diese Materialien demzufolge als nur bedingt geeignet einzuschätzen. Hier müssen systematische Untersuchungen mit dem Ziel ansetzen, inwieweit über den Zusatz von feuchtigkeitsbindenden oder konservierenden Additiven die Überlebensfähigkeit der Zellen erhöht und somit eine Materialoptimierung vorgenommen werden kann.

Generell nehmen fluoreszenzmikroskopische Verfahren zur Charakterisierung der "lebenden" Keramik einen besonderen Stellenwert ein. Für Untersuchungen an dünnen Biocerschichten sind meist laborübliche Epifluoreszenzmikroskope mit Quecksilberlampen als Lichtquelle ausreichend. Bei Biocerbulkpartikeln hingegen wird eine größere Tiefenauflösung benötigt, die mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop erreicht werden kann. Hier können perspektivisch betrachtet wesentlich umfangreichere und komplexere Untersuchungen an Biocermaterial vorgenommen werden. Gekoppelt mit einer Fluoreszenzspektrometereinheit ist unter Einsatz der geeigneten Fluoreszenzfarbstoffe beispielsweise die Detektion von Diffusionsvorgängen in der Matrix oder Wechselwirkungen zwischen Metalllösung und Biokomponente orts- und zeitaufgelöst denkbar.

Einen weiteren umfangreichen Teil der Arbeit nahmen die Untersuchungen von Bakterienzellen in Gegenwart von verschiedenen Metallionen ein. Da bislang über Aufnahmeprozesse von Metallen in Bakterienzellen noch vergleichsweise wenig bekannt ist, besteht Bedarf an der Entwicklung von Methoden, mit deren Hilfe solche Prozesse rasch und ohne großen präparativen Aufwand nachweisbar sind. Auch für diese Fragestellungen kamen Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. In Form von membrangängigen Derivaten ließen sich Bakteriensuspensionen mit verschiedenen ionensensitiven Farbstoffen unter physiologischen Bedingungen beladen. Außerdem wurden zwei verschiedene spektroskopische Verfahren (Messung im Plattenreader für hohen Probendurchsatz und Durchflusszytometrie für Einzelzelluntersuchungen) im Hinblick auf Vor- und Nachteile verglichen. Während der Einsatz des Plattenreaders als zeitsparende Methode lediglich Ergebnisse mit orientierendem Charakter liefert, stellt die Durchflusszytometrie ein elegantes und effektives Verfahren dar, um in kurzer Zeit eine Reihe verschiedener Parameter an einer großen Anzahl einzelner Zellen unter Berücksichtigung individueller Unterschiede zu bestimmen. Erstmals konnte in dieser Kombination mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes Oregon Green[®] 488 BAPTA-1 und des für Nickel spezifischen Farbstoffes Newport Green[™] DCF die Aufnahme von Kupfer(II) und Nickel(II) in lebende Bakterien unter Kontrolle des physiologischen Status der Zellen verfolgt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Metallionen von der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den Zellen begleitet ist. Vergleichende Tests mit verschiedenen Bakterienstämmen zeigten zudem, dass die Aufnahmeraten für Kupfer und Nickel und die Ca^{2+} -abhängige Zellantwort stammspezifisch und von der Konzentration der Metallsalzlö-

sung abhängig sind. Im Bezug auf Nickel unterscheiden sich die beiden eng verwandten Stämme *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 in der Aufnahmeoberhalb von 100 $\mu\text{Mol/l}$, was als Hinweis auf eine Anpassungsstrategie des Haldenisolats JG-A12 gewertet wird. In Anwesenheit von Kupfer reagiert der Gram-negative Bodenorganismus *P. stutzeri* DSMZ 5190 mit einer deutlich höheren Aufnahmebereits bei geringen Konzentrationen im Vergleich zu beiden Gram-positiven Vertretern *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602. Der große Vorteil dieser Methode wird in ihrer universellen Einsetzbarkeit gesehen. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Färbetechnik mit membrangängigen Farbstoffderivaten sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Mikroorganismen funktioniert. Mit der Weiterentwicklung spezifischer und hochaffiner ionensensitiver Fluoreszenzfarbstoffe kann das System zum Nachweis anderer Ionen beliebig erweitert werden. Entwicklungspotential wird außerdem in der gerätetechnischen Optimierung gesehen. Kommerzielle Durchflusszytometer sind in der Regel für klinische Routineuntersuchungen an eukaryotischen Zellen konzipiert und nicht für die wesentlich kleineren Bakterienzellen ausgelegt. Eine sensitivere Datenerfassung bei kleineren Partikeln könnte es in Zukunft gestatten, die nachgewiesenen Effekte exakt zu quantifizieren, was wiederum einen beträchtlichen zusätzlichen Informationsgewinn darstellt.

Die Entwicklung "lebender" Keramiken legt es nahe, auch nach Konzepten zu suchen, mit denen ein solches Material gezielt aus Ruhephasen in biologisch aktive Zustände geschaltet werden kann. Die Aktivierung von immobilisierten bakteriellen Sporen in dünnen Sol-Gel-Schichten mit einem 1:1 Komplex aus Ca^{2+} und Dipicolinsäure stellte sich als ein im besonderen Maße geeignetes Werkzeug zur Nutzung langzeitlagerfähiger, schaltbarer Biokeramiken heraus. In einer eigens dafür konstruierten Durchflusskammer konnte die keimungsinduzierende Wirkung dieses Chelats und die Keimungskinetik bei anschließender Inkubation der Schichten mit Nährlösung mikroskopisch erfasst und zugleich die Konzentrationsabhängigkeit der Keimungsrate nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden durch detaillierte rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Im Durchschnitt führt die vorherige Aktivierung der Sporen mit Ca^{2+} -DPA zu einer fünf- bis achtfach erhöhten Keimungsrate, sogar bei 2,5 Jahre alten, trocken gelagerten Schichten. Die Resistenz bakterieller Sporen gegen eine Vielzahl degenerativer äußerer Einflüsse bietet in diesem Fall die Möglichkeit, die mangelhafte Überlebensfähigkeit vegetativer Zellen in Biocerschichten zu kompensieren. Es ist davon auszugehen, dass die sporenhaltigen Schichten noch wesentlich länger haltbar sind. Von praktischer Bedeutung ist die Modulierbarkeit der Menge an aktiver Biomasse durch einen chemischen Aktivator beispielsweise in Fermentationsprozessen. Vorstellbar sind hier unter anderem die durch die konzentrationsabhängige und zeitlich beeinflussbare Steuerung des Anteils an stoffwechselaktiven Zellen gezielte Regulierung des Kulturalters und der Pro-

duktbildung. Weiterhin kann die effektive Immobilisierung in Sol-Gel-Schichten und die für ein quantitatives Auskeimen unerlässliche Aktivierung mit Ca^{2+} -DPA als interessanter methodischer Ansatz zur grundlegenden Untersuchung von Keimungsprozessen dienen oder für die Handhabung genetisch veränderter oder pathogener sporenbildender Mikroorganismen Anwendung finden. Hier kann durch die Beschichtung oder Fixierung potentiell gefährlicher bakterieller Sporen mit Sol-Gel-Schichten eine Risikominimierung bei notwendigen Manipulationen erreicht werden.

"Lebende" Keramiken stellen auch den Materialwissenschaftler vor völlig neue Probleme. So ist mit der Transformation der Bakterien aus dem Ruhezustand in die stoffwechselaktive Phase eine extreme Gefügeveränderung verbunden, die auch große Änderungen in der mechanischen Stabilität des Biocers erwarten lässt. Mit Hilfe einer kapazitiven Messanordnung wurden an dünnen Silikatschichten mit immobilisierten Sporen mechanische Spannungszustände nachgewiesen und quantifiziert. Durch das günstige Schichtdickenverhältnis von 0,001 zwischen aktiver Schicht und Substrat konnten auf der Grundlage der *Stoney*-Näherung mit einer vereinfachten Formel ohne Kenntnis der elastischen Konstanten der zu untersuchenden Schicht Maximalwerte für die während der Auskeimung der Sporen auftretenden Zug- und Druckspannungen abgeschätzt werden. Sie liegen zwischen 33 und 80 MPa. Anhand der Spannungsverläufe konnte ein Zusammenhang zwischen mechanischen Spannungszuständen, Verteilung der Biokomponente, Schichthomogenität und -stabilität abgeleitet werden.

Die Stabilität des Biocermaterials war auch im letzten Teil der Arbeit Untersuchungsgegenstand, da dieses Kriterium letztendlich mitentscheidend für dessen Eignung als Filtermaterial unter realen Bedingungen ist. Anhand umfangreicher licht- und rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen an verschiedenen Biocerproben aus Filtersäulen konnte eine qualitative Bewertung des Materials vorgenommen werden. Festgestellt wurden unterschiedliche, überwiegend durch mikrobielle Einflüsse hervorgerufene, Materialveränderungen. Mit diesen Ergebnissen können Rückschlüsse auf mögliche Störfaktoren im Prozessablauf gezogen und gezielt Maßnahmen dagegen ergriffen werden. Solcherart Feinuntersuchungen an Biocerpartikeln sind als Teil eines Monitoring-Systems zur kontinuierlichen Überwachung von Filtersystemen denkbar, deren Notwendigkeit bereits von Flemming (1994) ausführlich diskutiert wurde.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit und anderer Forschungsaktivitäten zur Entwicklung schwermetallbindender keramischer Filtermaterialien mit immobilisierten Mikroorganismen (Raff 2002, Böttcher et al. 2004) lassen bereits in absehbarer Zeit den Einsatz dieser Komposite in größerem Umfang als realistisch erscheinen. Dafür sprechen deren besondere Eigenschaften, wie die einzigartige Selektivität und Bindungseffizienz bei geringen

Metallkonzentrationen. Ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten und den Zusammenhängen zwischen Herstellungsbedingungen, Aktivität und Vitalität der Biokomponente, Lagerfähigkeit sowie Porosität, Partikel- und Schichtstabilität ist dazu unerlässliche Voraussetzung für Maßnahmen zur Materialoptimierung. Es bietet sich an, die hier vorgestellten, neu entwickelten oder modifizierten Methoden zur Beantwortung entsprechender Fragestellungen auch an anderen Systemen anzuwenden.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 2.1.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Diatomeen im Sickerwassersediment einer Uranabfallhalde.	4
Abb. 2.1.2:	Amplitudenbild einer atomkraftmikroskopischen Aufnahme von regulär angeordneten Zellen der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , eingebettet in eine dünne Silikatschicht. Die Aufnahme erfolgte im Tapping-Mode an der Luft.	7
Abb. 2.1.4:	Übersicht gängiger Abwasserreinigungsverfahren nach Art der jeweiligen Abwasserinhaltsstoffe.	11
Abb. 3.2.1:	Schematische Darstellung der Erzeugung von Biocerbulkpartikeln aus wässrigen TEOS-Solen.	21
Abb. 3.3.1:	Emissionsspektrum einer Ultrahochvakuum-Quecksilberlampe (Olympus Optical GmbH 2000).	23
Abb. 3.4.1:	Inneres Salz von 5-(und 6)-Carboxytetramethylrhodaminsuccinimidylester (TAMRA-SE).	29
Abb. 3.6.1.1:	Schematischer Aufbau einer Durchflusskammer zum lichtmikroskopischen Monitoring auskeimender bakterieller Sporen in dünnen Sol-Gel-Schichten: A, C Edelstahldeckplatten, F Verschraubung, B Teflonspacer, D Zu- und Ablauf für Nährmedium, E Führungsnut für Objektträger. Nicht sichtbar ist die Führungsnut für die beschichteten Deckgläser auf der Rückseite des Spacers. G Monitoringareal.	35
Abb. 3.6.1.2:	Schematische Versuchsanordnung zur Durchführung der Keimungsversuche dünner Sporenschichten.	36
Abb. 3.7.1:	Schematische Darstellung des kapazitiven Verformungsmessplatzes in einer Klimakammer zur Gewährleistung konstanter Luftfeuchte- und Temperaturverhältnisse. Mit Hilfe einer extern stationierten Schlauchpumpe können über eine in das Flüssigkeitsreservoir führende Kanüle Wasser, Ca^{2+} -DPA und Nährlösung zudosiert und abgepumpt werden.	38
Abb. 4.1.1.1:	Jablonski-Diagramm von Energiezuständen anregbarer Elektronen eines Fluorophors.	42
Abb. 4.1.2:	Biocer-Bulkpartikel mit immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen. Die Biokomponente wurde mit Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester (TAMRA-SE, links) und SYTO9/Propidiumjodid (rechts) fluoreszenzmarkiert und mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop abgebildet. Die Anregungswellenlänge betrug 543 nm (TAMRA) bzw. 488 nm (SYTO9/Propidiumjodid).	45
Abb. 4.1.3.1:	Aufbau der Zellwand Gram-negativer (A) und Gram-positiver (B) Bakterien.	47

Abb. 4.1.3.2:	Einfluss des Feuchtegehaltes dünner Biocerschichten auf die Membranintaktheit von immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen. <i>Links</i> : Fluoreszenzaufnahme der Bakteriensuspension vor dem Einbetten. <i>Mitte</i> : Fluoreszenzaufnahme einer dünnen, mit SYTO9 und Propidiumjodid gefärbten Biocerschicht nach 2 Stunden feuchter Lagerung bei Raumtemperatur. <i>Rechts</i> : Biocer nach 30 Minuten Lufttrocknung und 2 Stunden feuchter Lagerung.	50
Abb. 4.2.1:	Fluoreszenzintensitäten von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange in Anwesenheit von 10 $\mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■), Ni^{2+} (●) und Co^{2+} (▲) -Konzentration.	52
Abb. 4.2.2:	Fluoreszenzintensitäten von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Oregon Green in Anwesenheit von 10 $\mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■), Ni^{2+} (●) und Co^{2+} (▲) -Konzentration.	52
Abb. 4.2.3:	Fluoreszenzintensitäten von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Oregon Green in Anwesenheit von 10 $\mu\text{Mol/l}$ Ca^{2+} in 50 mMol/l MOPS-Puffer bei pH 5 als Funktion der Cu^{2+} (■) und Ni^{2+} (●) -Konzentration.	52
Abb. 4.2.4:	pH-Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Newport Green mit Ni^{2+} (geschlossene Symbole) und Ca^{2+} (offene Symbole) in 50 mMol/l MOPS-Puffer. Aufgenommen wurden die Werte bei pH 5 (▼), 6 (●) und 7 (■).	52
Abb. 4.3.1:	Schematische Darstellung der Färbung bakterieller Zellen mit membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen, hier am Beispiel von Calcium Orange TM Acetoxymethylester.	56
Abb. 4.3.2:	Änderung der Fluoreszenzintensität von 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange TM (freie Säure) in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration.	57
Abb. 4.3.3.1:	Chemische Struktur von Oregon Green [®] 488 BAPTA-1 Acetoxymethylester (links) und Newport Green TM DCF Diacetat (rechts).	61
Abb. 4.3.3.2:	Dot-Plot-Darstellung von Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-Streulicht (Side Scatter) an Zellsuspensionen von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 (links) und JG-A12 (rechts). Jeder Punkt repräsentiert das Wertepaar für ein Individuum; eine hohe Punktedichte wurde zudem durch Farben kodiert. Deutlich abgesetzt von der Hauptpopulation, die hier blau erscheint, ist jeweils eine kleine Subpopulation (mit einem Kreis markiert) sichtbar.	63
Abb. 4.3.3.3:	Repräsentative Plots einer Messung von Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC-Height) und Seitstreulicht (side scatter) von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen. Oben links dargestellt ist eine mit Oregon Green gefärbte 4 h alte Kultur ohne Zusatz von Cu^{2+} . Rechts davon ist die Population 30 Minuten lang 1 mMol/l Cu^{2+} ausgesetzt. Die unteren Abbildungen zeigen ebenfalls Zellen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 links ohne und rechts mit 1 mMol/l Ni^{2+} nach 30 Minuten Inkubation.	64
Abb. 4.3.3.4:	Histogramm der Fluoreszenzintensitäten einer mit Oregon Green und TO-PRO-3 gefärbten Suspension von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 ohne (oben) und in Anwesenheit von 1 mMol/l Cu^{2+} (unten).	65

- Abb. 4.3.3.5: Relative Fluoreszenzanteile mit Oregon Green gefärbter Zellen von *P. stutzeri* DSMZ 5190 (■), *B. sphaericus* JG-A12 (●) und NCTC9602 (▲) in Anwesenheit ansteigender Cu^{2+} -Konzentrationen in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung (pH 6) unmittelbar nach Zugabe (A) und nach 30 Minuten (B) Inkubation. Als Referenz dienten gefärbte Zellen ohne Zusatz von Kupfer. Dargestellt sind Median und Quartilen der ermittelten Werte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen. 66
- Abb. 4.3.3.6: Relative Fluoreszenzanteile Oregon Green gefärbter Zellen von *B. sphaericus* NCTC 9602 (A) und JG-A12 (B) ohne (■) und mit (●) Zusatz von $10 \mu\text{Mol/l}$ Kupfer im Nährmedium nach 30 Minuten Inkubation mit Cu^{2+} in aufsteigenden Konzentrationen. 67
- Abb. 4.3.3.7: Relativer Anteil fluoreszierender Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 (●) und NCTC 9602 (■) in der exponentiellen Wachstumsphase in Abhängigkeit von aufsteigenden Konzentrationen an NiCl_2 in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung (pH 6) nach 30 Minuten Inkubation. A) Newport Green, B) Oregon Green, C) Newport Green nach Fixation mit 2 % PFA, D) Oregon Green nach Fixation mit 2 % PFA. 68
- Abb. 4.4.1.1: Schematische Darstellung einer in einer dünnen Sol-Gel-Schicht immobilisierten bakteriellen Endospore (Sporenstruktur modifiziert nach Setlow 2003, mit freundlicher Genehmigung des Autors und Verlags). 71
- Abb. 4.4.1.2: Schematische Darstellung der Keimungsinduktion von *B. subtilis* Sporen in Anwesenheit von Nährstoffen und Ca^{2+} -DPA (nach Paidhungat et al. 2001, mit freundlicher Genehmigung des Autors und Verlags). 74
- Abb. 4.4.2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Keimungsstadien in dünnen Sol-Gel-Schichten immobilisierter Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach Aktivierung mit Ca^{2+} -DPA. A) Einstülpung in der frühen Keimungsphase, B) quellende Spore, Silica-Layer wird teilweise aufgebrochen, C) auswachsende, vegetative Zelle, D) Silica-Schicht nach Zellfreisetzung (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society). 76
- Abb. 4.4.2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Sol-Gel immobilisierter Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach 1 h Aktivierung mit 60 mMol/l Ca^{2+} -DPA und 4 h Inkubation mit NB-Medium: A) nicht ausgekeimte Spore, B) auswachsende vegetative Zellen (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society). 77
- Abb. 4.4.2.3: Prozentuale Anteile der ausgekeimten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 in dünnen Sol-Gel-Schichten in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -DPA-Konzentration. Die Werte wurden durch Auszählung licht- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen nach 24 h Inkubation in der Durchflusszelle ermittelt. 78
- Abb. 4.4.2.4: Lichtmikroskopische Aufnahme einer 2,5 Jahre alten Sol-Gel-Schicht mit immobilisierten Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 nach 15 h Inkubation mit NB-Medium. Zuvor wurde die Schicht mit 60 mMol/l Ca^{2+} -DPA 1 h lang aktiviert. (rechts oben) Sporen; (rechts Mitte) verlängerte, früh ausgekeimte vegetative Zellen; (rechts unten) verzögert ausgekeimte vegetative Zellen (Matys et al. 2004, mit freundl. Genehmigung der American Chemical Society). 79

Abb. 4.4.3.1:	AFM-Höhenbild einer Sol-Gel-Schicht mit immobilisierten Sporen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 auf einem unpolierten Siliziumwafer (links). Die Aufnahme erfolgte im Tapping-Mode an der Luft. Deutlich zu erkennen ist die stark strukturierte Oberfläche des Wafers. Das rasterelektronenmikroskopische Bild (rechts) zeigt eine weitgehend unversehrte Bedeckung des Wafers mit der silikatischen Schicht. Im rechten oberen Quadranten ist eine gequollene Spore abgebildet, die eine Rissbildung in der darüber liegenden Schicht verursacht.	82
Abb. 4.4.3.2:	Spannungsentwicklung in drei individuell vermessenen SiO ₂ -Sol-Gel-Schichten mit immobilisierten Sporen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 während des Keimungsvorganges.	85
Abb. 4.5.1:	Verfärbungen und Kavernenbildung bei einer mit Haldensickerwasser betriebenen Biocersäule mit Kohlenstoff-Vorfilter.	87
Abb. 4.5.2:	Lichtmikroskopische Aufnahme von Ciliaten an Biocerpartikeln. Die Länge des Balkens beträgt 200 µm.	88
Abb. 4.5.3:	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Fadenwurms (Nematode) an einem Biocerpartikel. Die Länge des Balkens beträgt 100 µm.	88
Abb. 4.5.4:	Lichtmikroskopische Aufnahme der Eigenfluoreszenz von chlorophyllhaltigen Cyanobakterien an Biocerpartikeln nach Beschickung mit mikrobiell besiedeltem Haldensickerwasser.	89
Abb. 4.5.5:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf einem Biocerpartikel nach Beschickung mit Haldensickerwasser. Erkennbar ist ein dichtes Geflecht aus verschiedenen Bakterien, filamentös wachsenden Mikroorganismen und extrazellulären polymeren Substanzen.	89
Abb. 4.5.6:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Anhäufung aus Diatomeen, filamentösen Mikroorganismen und amorphen Ablagerungen im Sediment eines Haldensickerwassers.	89
Abb. 4.5.7:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Xerogelpartikeln (ohne Biokomponente) vor (links) und nach Beschickung mit Haldensickerwasser (rechts).	90
Abb. 4.5.8:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Biocerpartikeln. Links im Bild ist die Partikeloberfläche mit immobilisierten Bakterienzellen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 dargestellt. Auf dem rechten Bild ist ein Partikel aus einer 22 Tage lang mit Haldensickerwasser durchströmten Säule mit teilweise verwitterter Oberfläche abgebildet. Auffällig ist das Fehlen der immobilisierten Bakterien.	91
Abb. 4.5.9:	Biocerpartikel aus einer mit Haldensickerwasser betriebenen Säule. Filamentös wachsende Mikroorganismen dringen in die durch das Herauslösen der immobilisierten Biomasse freiwerdenden Poren und Hohlräume ein.	92
Abb. 4.5.10:	Kolonie von Mikroorganismen auf der partiell verwitterten Oberfläche eines Biocerpartikels aus einer mit Haldensickerwasser betriebenen Säule.	92
Abb. 4.5.11:	Ablagerung von sekundärmineralischen Mikrokristalliten auf einem Biocerpartikel als Resultat mikrobieller Aktivität. Die EDX-Analyse dieser Kristallite mit der typischen Struktur für Silikatrossetten bestätigte den Befund. Deutlich zu sehen im Spektrum rechts der mit Silizium korrespondierende Peak. Ebenso wurden Spuren von gebundenem Uran detektiert.	93

Abb. 4.5.12:	Ablagerung von Mikrokristalliten auf einem Biocerpartikel nach Durchströmung mit Sickerwasser. Die EDX-Analyse dieser Kristallite weist einen beträchtlichen Anteil Calcium sowie Kohlenstoff und Sauerstoff aus, was auf Calciumcarbonat als chemische Struktur hindeutet (EDX-Analyse: B. Schmidt-Brücken).	93
Abb. 5.1.1:	Kulturen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (A,C) und NCTC 9602 (B,D) nach Färbung mit 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange Acetoxymethylester (CO AM). Abbildung A und B zeigen 4 h kultivierte Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten ungefärbten Bereiche wurden als Glycogenspeicher identifiziert. In Abbildung C und D sind 16 h kultivierte Bakterien dargestellt. Deutlich zu erkennen sind erhöhte Fluoreszenzen in sporulierenden Zellen. Der Pfeil markiert die Polregion einer Zelle mit erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt, dem Ort der Sporenbildung.	97
Abb. 5.1.2:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer 4 h alten Kultur von <i>B. sphaericus</i> JG-A12, gefärbt mit 1 $\mu\text{Mol/l}$ Oregon Green und 5 nMol/l TO-PRO-3. Die Pfeile markieren sporulierende Zellen, zu erkennen an der polaren Verdickung der Zelle und der deutlich erhöhten Fluoreszenzintensität.	98
Abb. 5.2.2.1:	A) Stadium I: Entstehung von Druckspannungen in dünnen Sol-Gel-Schichten, hervorgerufen durch Quellung, Volumenzunahme und beginnendes vegetatives Wachstum der darin immobilisierten bakteriellen Sporen. B) Stadium II: Relaxation und nachfolgende Entwicklung von Zugspannungen als Folge des Auswachsens und Ablösens vegetativer Zellen und Schrumpfung in der Matrix verbliebener, nicht vollständig ausgekeimter Sporen. C) Stadium III: Schichtablösung aufgrund zu hoher Zugspannungen im Zusammenhang mit dem Auswachsen vegetativer Zellen und Schrumpfungerscheinungen kollabierter Sporen.	105
Abb. 5.2.2.2:	REM-Aufnahme eines geschrumpften Clusters aus immobilisierten Sporen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12. Auffällig sind die teilweise kollabierten, aufgeweichten Sporen und die lokale Rissbildung in der Sol-Gel-Schicht in und um den Cluster herum.	106

7.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 2.1.4:	Ausgewählte Beispiele Sol-Gel immobilisierter Biokomponenten mit Anwendungspotential in Sensorik und Katalyse. 10
Tab. 3.1.1:	Verwendete Bakterienstämme. ¹⁾ National Collection of Type Cultures, Colindale, UK, ²⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland 16
Tab. 3.3.1:	Spektrale Charakteristika verwendeter Filtersätze (Olympus Optical GmbH). 24
Tab. 3.3.1.1:	Auswahl gängiger Fluoreszenzfarbstoffe und deren Zielstrukturen (Haugland 2005). 25
Tab. 3.3.4:	Schema zur Entwässerung von Bakteriensuspensionen und Biocerpartikeln in aufsteigender Ethanolreihe. 28
Tab. 3.5.1:	Zusammenstellung der verwendeten Metallsalzlösungen und Puffer: 32 
Tab. 3.6.2:	Zusammenstellung der verwendeten Aktivierungslösungen zur Induktion der Auskeimung von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Sporen. 36
Tab. 4.1.3.2:	Einfluss von Feuchtegehalt und Lagertemperatur auf die Membranbeschaffenheit immobilisierter <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen. 50
Tab. 4.3.2:	Relative Fluoreszenzen von mit 1 $\mu\text{Mol/l}$ Calcium Orange gefärbte <i>Bacillus sphaericus</i> Zellen nach Zugabe von 100 $\mu\text{Mol/l}$ Metallchlorid in 0,9 %-iger NaClO_4 -Lösung. Die Fluoreszenz von Zellsuspensionen ohne Metallchloridzusatz wurde als 100 % gesetzt. 59
Tab. 4.4.3.2:	Zusammenstellung der gewichtskraftbezogenen Änderungen des elektrischen Spannungssignals, maximaler elektrischer Spannungsänderung und daraus resultierender mechanischer Spannungszustände während der Inkubation von Sol-Gel-beschichteten Siliziumwafern mit immobilisierten Sporen. 84

8 Literaturverzeichnis

- Ahner, B.A., Price, N.M., Morel, F.M.M. (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 8433-8436
- Al-Saraj, M., Abdel-Latif, M.S., El-Nahal, I., Baraka, R. (1999) Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. *J. Non-Cryst. Solids* **248**: 137-140
- Ambudkar, S.V., Zlotnick, G.W., Rosen, B.P., (1984) Calcium efflux from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**: 6142-6146
- Amoroso, M.J., Schubert, D., Mitscherlich, P., Schumann, P., Kothe, E. (2000) Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* spec. *J. Basic Microbiol.* **40** (5-6): 295-301
- Arakaki, L.N.H., Augusto Filha, V.L.S., Espinola, J.G.P., da Fonseca, M.G., de Oliveira, S.F., Arakaki, T., Airoldi, C. (2003) New thiol adsorbent grafted on silica gel: synthesis, characterization and employment for heavy metal adsorptions. *J. Environ. Monit.* **5**: 366-370
- Armon, R., Starosvetzky, J., Saad, I. (2000) Sol-gel as reaction matrix for bacterial enzymatic activity. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **19**: 289-292
- Avnir, D., Ottolenghi, M., Braun, S. (1992) Properties of trypsin and of acid phosphatase immobilized in sol-gel glass matrices. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**: 227-235
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. (1994) Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem. Mater.* **6** (10): 1605-1614
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Conte, R.D., Gonnelli, L. (2003) Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **42**: 1939-1949.
- Banfield, J.F., Barker, W.W., Welch, S.A., Taunton, A. (1999) Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 3404-3411
- Barber, K., Mala, R.R., Lambert, M.P., Qiu, R., MacDonald, R.C., Klein, W.L. (1996) Delivery of membrane-impermeant fluorescent probes into living neural cell populations by lipotransfer. *Neurosci. Lett.* **207**: 17-20
- Bäuerlein, E. (2003) Biomineralisation von Einzellern; eine außergewöhnliche Membranbiochemie zur Produktion anorganischer Nano- und Mikrostrukturen. *Angew. Chem.* **115** (6): 636-664
- Bégu, S., Durand, R., Lerner, D.A., Charnay, C., Tourné-Péteilh, C., Devoiselle, J.M. (2003) Preparation and characterization of siliceous material using liposomes as template. *Chem. Commun.* **5**: 640-641
- Behravan, J., Chirakkal, H., Masson, A., Moir, A. (2000) Mutations in the *gerP* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *J. Bacteriol.* **182** (7): 1987-1994
- Bender, J., Duff, M.C., Phillips, P., Hill, M. (2000) Bioremediation and bioreduction of dissolved U(VI) by microbial mat consortium supported on silica gel particles. *Environ. Sci. Technol.* **34** (15): 3235-3241
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P. (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648.
- Beveridge, T.J., Korenevsky, A., Glasauer, S. (2002) Biomineralization by bacteria. pp 670-681. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 2, G. Bitton (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.

- Beyersmann, D., Hechtenberg, S. (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144** (2): 247-261
- Boilot, J.-P., Chaput, F., Gacoïn, T., Malier, L., Canva, M., Brun, A., Lévy, Y., Galaup, J.-P. (1996) Solide organo-minéraux par sol-gel et applications à l'Optique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 322, Série II b: 27-43
- van Bommel, K.J.C., Friggeri, A., Shinkai, S. (2003) Organische Template zur Formgebung anorganischer Materialien. *Angew. Chem.* **115** (9): 1010-1030
- Böttcher, H., Slowik, P., Süß, W. (1998) Sol-gel carrier systems for controlled drug delivery. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **13**: 277-281
- Böttcher, H. (2000) Bioactive Sol-Gel coatings. *J. Prakt. Chem.* **342** (5): 427-436
- Böttcher, H. (2001) Funktionelle Beschichtungen auf Basis anorganischer Nanosole. *Mat.-wiss. U. Werkstofftech.* **32**: 759-766
- Böttcher, H., Soltmann, U., Mertig, M., Pompe, W. (2004) Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development. *J. Mater. Chem.* **14** (14): 2176-2188
- Bradner, J.R., Nevalainen, K.M.H. (2003) Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *J. Microbiol. Meth.* **54** (2): 193-201
- Brányik, T., Kuncová, G., Páca, J., Demnerová, K. (1998) Encapsulation of microbial cells into silica gel. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **13**: 283-287
- Brányik, T., Kuncová, G., Páca, J. (2000) The use of silica gel prepared by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** (2): 168-172
- Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. (1990) Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Mater. Lett.* **10** (1,2): 1-5
- Breeuwer, P., Drocourt, J.-L., Rombouts, F.M., Abee, T. (1996) A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1): 178-183
- Bright, G.R., Kuo, N.-T., Chow, D., Burden, S., Dowe, C., Przybylski, R.J. (1996) Delivery of macromolecules into adherent cells via electroporation for use in fluorescence spectroscopic imaging and metabolic studies. *Cytometry* **24** (3): 226-233
- Brottka, K. (2003) Herstellung von biologisierten Keramiken zur Reinigung schwermetallkontaminierter Abwässer. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen
- Brown, W.C., Vellom, D., Ho, I., Mitchell, N., McVay, P. (1982) Interaction between a *Bacillus cereus* spore hexosaminidase and specific germinants. *J. Bacteriol.* **149** (3): 969-976
- Brümmer, F. (2003) Living inside a glass box – silica in diatoms, pp. 3-10. In: *Silicon Biomineralization*, Müller, W.E.G. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin
- Bunthof, C.J., van den Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F.M., Abee, T. (1999) Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (8): 3681-3689
- Campostrini, R., Carturan, G., Caniato, R., Piovan, A., Filippini, R., Innocenti, G., Cappelletti, E.M. (1996) Immobilization of plant cells in hybrid sol-gel materials. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **7**: 87-97
- Cano, R.J., Borucki, M.K. (1995) Revival and identification of bacterial spores in 25 – 40-million-year-old Dominican amber. *Science* **268** (5213): 1060-1064

- Carturan, G., Campostrini, R., Diré, S., Scardi, V., De Alteriis, E. (1989) Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets. *J. Mol. Catal.* **57**: L13-L16
- Carturan, G., Dal Monte, R., Pressi, G., Secondin, S., Verza, P. (1998) Production of valuable drugs from plant cells immobilized by hybrid sol-gel SiO₂. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **13**: 273-276
- Carturan, G., Dal Toso, R., Boninsegna, S., Dal Monte, R. (2004) Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J. Mater. Chem.* **14** (14): 2087-2098
- Cha, J.-S., Cooksey, D.A. (1991) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 8915-8919.
- Cha, J.N., Stucky, G.D., Morse, D.E., Deming, T.J. (2000) Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature* **403**: 289-292
- Chamberlain, A.H.I. (1992) The role of adsorbed layers in bacterial adhesion, pp. 59-67. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Chia, S., Urano, J., Tamanoi, F., Dunn, B., Zink, J.I. (2000) Patterned hexagonal arrays of living cells in sol-gel silica films. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 6488-6489
- Coffman, E.A., Melechko, A.V., Allison, D.P., Simpson, M.L., Doktycz, M.J. (2004) Surface patterning of silica nanostructures using bio-inspired templates and directed synthesis. *Langmuir* **20** (20): 8431-8436
- Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O.M.M., Livage, J. (2001) Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. *J. Mater. Chem.* **11**: 2039-2044
- Coleman, S.J., Coronado, P.R., Maxwell, R.S., Reynolds, J.G. (2003) Granulated activated carbon modified with hydrophobic silica aerogel-potential composite materials for the removal of uranium from aqueous solutions. *Environ. Sci. Technol.* **37** (10): 2286-2290
- Cölfen, H., Mann, S. (2003) Geordnete mesoskopische Strukturen durch Selbstorganisation und Transformation von Hybrid-Nanostrukturen. *Angew. Chem.* **115**: 2452-2468
- Conroy, J.F.T., Power, M.E., Martin, J., Earp, B., Hosticka, B., Daitch, C.E., Norris, P.M. (2000) Cells in sol-gels I: a cytotocompatible route for the production of macroporous silica gels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **18**: 269-283
- Cooksey, K.E. (1992a) Extracellular polymers in biofilms, pp. 137-147. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Cooksey, K.E. (1992b) Bacterial and algal interactions in biofilms, pp. 163-173. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Coradin, T., Lopez, P.J. (2003) Biogenic silica patterning: simple chemistry or subtle biology? *ChemBioChem* **4**: 251-259
- Corvini, P.F.X., Gautier, H., Rondags, E., Vivier, H., Goergen, J.L., Germain, P. (2000) Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis. *Microbiology* **146**: 2671-2678
- Curran, H.R., Evans, F.R. (1954) The influence of iron or manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media. *J. Bacteriol.* **67** (4): 489-497
- Dal Monte, R. (2000) The biosil membrane: biomedical and industrial applications. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **18**: 287-292

- Das, S., Lengweiler, U.D., Seebach, D., Reusch, R.N. (1997) Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9075-9079.
- Davey, H.M., Jones, A., Shaw, A.D., Kell, D.B. (1999) Variable selection and multivariate methods for the identification of microorganisms by flow cytometry. *Cytometry* **35** (2): 162-168
- DeFlaun, M.F., Fuller, M.E., Zhang, P., Johnson, W.P., Mailloux, B.J., Holben, W.E., Kovacic, W.P., Balkwill, D.L. (2001) Comparison of methods for monitoring bacterial transport in the subsurface. *J. Microbiol. Meth.* **47** (2): 219-231
- Diaspro, A., Silvano, D., Krol, S., Cavalli, O., Gliozzi, A. (2002) Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells. *Langmuir* **18** (13): 5047-5050
- Dufrêne, Y.F. (2001) Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* **32**: 153-165
- Dufrêne, Y.F., Boonaert, C.J.P., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Rouxhet, P.G. (2001) Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **86**: 113-120
- Dufrêne, Y.F. (2002) Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.* **184** (19): 5205-5213
- Dunn, B., Zink, J.I. (1997) Probes of pore environment and molecule-matrix interactions in sol-gel materials. *Chem. Mater.* **9** (11): 2280-2291
- Eberhard, M., Erne, P. (1991) Calcium binding to fluorescent calcium indicators: calcium green, calcium orange and calcium crimson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180** (1): 209-215
- Ehrlich, H.L. (1996) Geomicrobial interactions with silicon, pp. 217-240. In: *Geomicrobiology*, Ehrlich, H.L. (Ed.), Marcel Dekker, New York
- Eitinger, T., Mandrand-Berthelot, M.-A. (2000) Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* **173** (1): 1-9
- Engelhardt, H. (1988) Bakterielle surface-layer. *Forum Mikrobiologie* **3**: 64-73
- Evans, D.J., Pickett, C.J. (2003) Chemistry and the hydrogenases. *Chem. Soc. Rev.* **32** (5): 268-275
- Evans, F.R., Curran, H.R. (1960) Influence of preheating, pH, and holding temperature upon viability of bacterial spores stored for long periods in buffer substrates. *J. Bacteriol.* **79** (3): 361-368
- Fang, H.H.P., Chan, K.-Y., Xu, L.-C. (2000) Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *J. Microbiol. Meth.* **40**: 89-97
- Fennough, S., Guyon, S., Jourdat, C., Livage, J., Roux, C. (1999) Encapsulation of bacteria in silica gels. *C. R. Acad. Sci., Sér. II c: Chim.*: 625-630
- Fennough, S., Guyon, S., Livage, J., Roux, C. (2000) Sol-gel entrapment of *Escherichia coli*. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **19**: 647-649
- Fiedler, D., Thron, A., Soltmann, U., Böttcher, H. (2004) New packing materials for bioreactors based on coated and fiber-reinforced biocers. *Chem. Mater.* **16** (16): 3040-3044
- Fields, M.L., Frank, H.A. (1969) Dipicolinate-induced germination of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Bacteriol.* **97** (1): 464-465

- Flemming, H.-C. (1994) Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, **Bd. 129**. Habilitationsschrift, Stuttgart
- Flemming, H.-C., Wingender, J. (2001) Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* **31** (3): 169-180
- Flemming, H.-C., Leis, A. (2002) Sorption properties of biofilms, pp. 2958-2967. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 5, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Flemming, H.-C., Wingender, J. (2002) Extracellular polymeric substances (EPS): structural, ecological and technical aspects, pp. 1223-1231. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 3, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Flounders, A.W., Singh, A.K., Volponi, J.V., Carichner, S.C., Wally, K., Simonian, A.S., Wild, J.R., Schoeniger, J.S. (1999) Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part II: sol-gel modified field effect transistors with immobilized organophosphate hydrolase. *Biosens. Bioelectron.* **14**: 715-722
- Foerster, H.F., Foster, J.W. (1966) Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *J. Bacteriol.* **91** (3): 1168-1177
- Francis, C.A., Tebo, B.M. (2002) Enzymatic manganese(II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2): 874-880
- Fuller, M.E., Streger, S.H., Rothmel, R.K., Mailloux, B.J., Hall, J.A., Onstott, T.C., Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., DeFlaun, M. F. (2000) Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (10): 4486-4496
- Gadd, G.M. (1996) Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides. *Endeavour* **20** (4): 150-156
- Gadd, G.M. (2000) Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 271-279
- Galla, H.-J., Müller, H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Gangola, P., Rosen, B.P. (1987) Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 12570-12574
- Gaylarde, C., Morton, G. (2002) Bioteterioration of mineral materials, pp. 516-528. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 1, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Georgi, U. (1998) Funktionalisierte Gelschichten aus Tetraethoxysilan und Alkyltriethoxysilanen. Dissertation, Technische Universität Bergakademie Freiberg
- Ghoul, M., Bacquet, M., Morcellet, M. (2003) Uptake of heavy metals from synthetic aqueous solutions using modified PEI-silica gels. *Water Res.* **37**: 729-734
- Gill, I., Ballesteros, A. (1998) Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach. *J. Am. Chem. Soc.* **120** (34): 8587-8598
- Györvary, E.S., Stein, O., Pum, D., Sleytr, U.B. (2003) Self-assembly and recrystallization of bacterial S-Layer proteins at silicon supports imaged in real time by atomic force microscopy. *J. Microsc.* **212**: 300-306
- Harper, M.K., Curran, H.R., Pallansch, M.J. (1964) Properties of electrodyalized bacterial spores. *J. Bacteriol.* **88** (5): 1338-1340
- Hartmann, A., Lawrence, J.R., Aßmus, B., Schloter, M. (1998) Detection of microbes by laser confocal microscopy, pp. 1-34. In: *Molecular Microbial Ecology Manual 4.1.10*, Kluwer Academic Publishers

- Haugland, R.P. (2005) *The Handbook, A Guide of Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10. Ed., Spence, M.T.Z. (Ed.), Invitrogen Corp., USA
- Hebbeln, P., Eitinger, T. (2004) Heterologous production and characterization of bacterial nickel/cobalt permeases. *FEMS Microbiol. Lett.* **230** (1): 129-135
- Heinen, W. (1960) Silicium - Stoffwechsel bei Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* **37**: 199-210
- Hench, L.L. (1998) Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* **41** (4): 511-518
- Hench, L.L., Polak, J.M. (2002) Third-generation biomedical materials. *Science* **295** (5557): 1014-1018
- Hench, L.L., Xynos, I.D., Polak, J.M. (2004) Bioactive glasses for *in situ* tissue regeneration. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **15** (4): 543-562
- Herbaud, M.-L., Guiseppi, A., Denizot, F., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C. (1998) Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1448**: 212-226
- Hewitt, C.J., Nebe-von Caron, G., Nienow, A.W., McFarlane, C.M. (1999) Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **63** (6): 705-711
- Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S., Saint, C.P. (2003a) A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *J. Microbiol. Meth.* **52** (3): 379-388
- Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S., Saint, C.P. (2003b) Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J. Microbiol. Meth.* **55** (3): 585-597
- Hogarth, C., Ellar, D.J. (1978) Calcium accumulation during sporulation of *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. J.* **176**: 197-203
- Holt, S.C., Gauthier, J.J., Tipper, D.J. (1975) Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **122** (3): 1322-1338
- Hornbæk, T., Dynesen, J., Jakobsen, M. (2002) Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **215** (2): 261-265
- Horne, J.H., Meyer, T. (1997) Elementary calcium-release units induced by inositol trisphosphate. *Science* **276**: 1690-1693
- Hudson, K.D., Corfe, B.M., Kemp, E.H., Feavers, I.M., Coote, P.J., Moir, A. (2001) Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. *J. Bacteriol.* **183** (14): 4317-4322
- Iandolo, J.J., Ordal, Z.J. (1964) Germination system for endospores of *Sarcina ureae*. *J. Bacteriol.* **87** (1): 235-236
- Inama, L., Diré, S., Carturan, G., Cavazza, A. (1993) Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol-gel layers on glass surfaces: trapping, catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **30**: 197-210
- Jaye, M., Ordal, Z.J. (1965) Germination of spores of *Bacillus megaterium* with divalent metal-dipicolinate chelates. *J. Bacteriol.* **89** (6): 1617-1618
- Kakinuma, Y. (1998) Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1021-1045

- Kass, G.E., Webb, D.L., Chow, S.C., Llopis, J., Berggren, P.O. (1994) Receptor-mediated Mn^{2+} influx in rat hepatocytes: comparison of cells loaded with Fura-2 ester and cells microinjected with Fura-2 salt. *Biochem. J.* **302**: 5-9
- Katsuragi, T., Tani, Y. (2001) Single-cell sorting of microorganisms by flow or slide-based (including laser scanning) cytometry. *Acta Biotechnol.* **21** (2): 99-115
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichert, D.H., Harwood, C.R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 169-187
- Knaysi, G., Curran, H.R. (1961) Effects of some mechanical factors on the endospores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **82** (5): 691-694
- Kotra, L.P., Amro, N.A., Liu, G.-Y., Mobashery, S. (2000) Visualizing bacteria at high resolution. *ASM News* **66** (11): 675-681
- Kröger, N., Bergsdorf, C., Sumper, M. (1994) A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *EMBO J.* **13** (19): 4676-4683
- Kröger, N., Lehmann, G., Rachel, R., Sumper, M. (1997) Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. *Eur. J. Biochem.* **250**: 99-105
- Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M. (1999) Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* **286**: 1129-1132
- Kröger, N., Deutzmann, R., Bergsdorf, C., Sumper, M. (2000) Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (26): 14133-14138
- Kunz, R. (1995) Behandlung von Abwasser, 4. Auflage, Vogel-Verlag, Würzburg
- Künzelmann, U., Böttcher, H. (1998) Biosensor properties of glucose oxidase immobilized within SiO_2 gels. *Sens. Actuators B* **39** (1-3): 222-228
- Kutima, P.M., Foegeding, P.M. (1987) Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** (1): 47-52
- Lampenscherf, S. (1998) Spannungsentstehung und Defektbildung in keramischen Precursoren. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen
- Leadbeater, B.S.C., Callow, M.E. (1992) Formation, composition and physiology of algal biofilms, pp. 149-162. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Lehenkari, P.P., Charras, G.T., Nykänen, A., Horton, M.A. (2000) Adapting atomic force microscopy for cell biology. *Ultramicroscopy* **82**: 289-295
- Livage, J. (1996) Bioactivity in sol-gel glasses. *C. R. Acad. Sci. t. 322, Sér. II b*: 417-427
- Livage, J., Coradin, T., Roux, C. (2001) Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J. Phys.: Condens. Matter* **13**: R673-R691
- Lloyd, J.R., Lovley, D.R. (2001) Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 248-253
- Lovley, D.R., Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 285-289
- Lu, Z.H., Dameron, C.T., Solioz, M. (2003) The *Enterococcus hirae* paradigm of copper homeostasis: copper chaperone turnover, interactions, and transactions. *BioMetals* **16**: 137-143

- Luckarift, H.R., Spain, J.C., Naik, R.R., Stone, M.O. (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat. Biotechnol.* **22** (2): 211-213
- Lynn, A.R., Rosen, B.P. (1987) Calcium transport in prokaryotes, pp. 181-201. In: *Ion transport in prokaryotes*, Rosen, B.P., Silver, S. (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego
- Madrid, Y., Cámara, C. (1997) Biological substrates for metal preconcentration and speciation. *Trends Anal. Chem.* **16** (1): 36-44
- Magill, N.G., Cowan, A.E., Koppel, D.E., Setlow, P. (1994) The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation. *J. Bacteriol.* **176** (8): 2252-2258
- Malik, A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* **30**: 261-278
- Mann, S., Ozin, G.A. (1996) Synthesis of inorganic materials with complex form. *Nature* **382**: 313-318
- Marseaut, S., Debourg, A., Dostálek, P., Votruba, J., Kuncová, G., Tobin, J.M. (2004) A silica matrix biosorbent of cadmium. *Int. Biodeterior. Biodeg.* **54** (2-3): 209-214
- Masuda, Y., Itoh, M., Yonezawa, T., Koumoto, K. (2002) Low-dimensional arrangement of SiO₂ particles. *Langmuir* **18** (10): 4155-4159
- Matys, S., Raff, J., Soltmann, U., Selenska-Pobell, S., Böttcher, H., Pompe, W. (2004) Calcium dipicolinate induced germination of *Bacillus* spores embedded in thin silica layers: novel perspectives for the usage of biocers. *Chem. Mater.* **16** (26): 5549-5551, DOI: 10.1021/cm040191v
- Mehrotra, R.C. (1992) Present status and future potential of the sol-gel process, pp. 1-36. In: *Monograph Series: Structure and Bonding, Bd. 77*, Springer Verlag, Berlin
- Michiels, J., Xi, C., Verhaert, J., Vanderleyden, J. (2002) The functions of Ca²⁺ in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends Microbiol.* **10** (2): 87-93
- Mobley, H.L.T., Summers, A.O. (1987) Plasmid-encoded ion transport systems, pp 305-326. In: *Ion transport on prokaryotes*, Rosen, B.P., Silver, S. (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., Hausinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59** (3): 451-480
- Moir, A. (2003) Bacterial spore germination and protein mobility. *TRENDS Microbiol.* **11** (10): 452-454
- Morelli, E., Pratesi, E. (1997) Production of phytochelatins in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in response to copper and cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **59**: 657-664
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P. (1999) *Atomic force microscopy for biologists*. Imperial College Press, London, UK
- Mozes, N., Rouxhet, P.G. (1992a) Modification of surfaces for promoting cell immobilization, pp. 69-85. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Mozes, N., Rouxhet, P.G. (1992b) Influence of surfaces on microbial activity, pp. 125-136. In: *Biofilms-Science and Technology*, Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Chapdeville, B. (Eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Mucha, A.P., Leal, M.F., Bordalo, A.A., Vasconcelos, M.T. (2003) Comparison of the response of three microalgae species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (3): 576-585

- Müller, D.J., Baumeister, W., Engel, A. (1996) Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **178** (11): 3025-3030
- Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **27** (2-3): 239-261
- Murrell, W.G. (1969) Chemical composition of spores and spore structure, pp. 215-274. In: *The bacterial spore*, Gould, G.W., Hurst, A. (Eds.), Academic Press, London
- Nassif, N., Bouvet, O., Rager, M.N., Roux, C., Coradin, T., Livage, J. (2002) Living bacteria in silica gels. *Nat. Mater.* **1**: 42-44
- Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M.N., Bouvet, O.M.M., Livage, J. (2003) A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *J. Mater. Chem.* **13** (2): 203-208
- Nebe-von Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R., Badley, R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Meth.* **42** (1): 97-114
- Norris, V., Chen, M., Goldberg, M., Voskuil, J., McGurk, G., Holland, I.B. (1991) Calcium in bacteria: a solution to which problem? *Mol. Microbiol.* **5** (4): 775-778
- Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F.N., Toth, I., Trinei, M., Modha, K., Norman, R.I. (1996) Calcium signalling in bacteria. *J. Bacteriol.* **178** (13): 5891-5897
- Novo, D.J., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., Shapiro, H.M. (2000) Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** (4): 827-834
- Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., Solioz, M. (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 12775-12779
- Ohnesorge, F., Heckl, W.M., Häberle, W., Pum, D., Sára, M., Schindler, H., Schilcher, K., Kinere, A., Smith, D.P.E., Sleytr, U.B., Binnig, G. (1992) Scanning force microscopy studies of the S-layers from *Bacillus coagulans* E38-66, *Bacillus sphaericus* CCM2177 and of an antibody binding process. *Ultramicroscopy* **42-44**: 1236-1242
- Olsen, K.N., Budde, B.B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K.B., Jakobsen, M., Ingmer, H. (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (8): 4145-4147
- Olympus Optical Handbuch* 2000, Olympus Optical CO. (Europa) GmbH, Hamburg
- Paidhungat, M., Setlow, P. (2000) Role of Ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **82** (9): 2513-2519
- Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, P. (2001) Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *J. Bacteriol.* **183** (16): 4886-4893
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W.B., Hoover, D., Papafragkou, E., Setlow, P. (2002) Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **8** (6): 3172-3175
- Pandey, P.C., Upadhyay, S., Tiwari, I., Tripathi, V.S. (2001) An organically modified silicate-based ethanol biosensor. *Anal. Biochem.* **288**: 39-43
- Parkinson, J., Gordon, R. (1999) Beyond micromachining: the potential of diatoms. *TIBTECH* **17**: 190-196
- Perry, C.C. (2003) Silicification: the process by which organisms capture and mineralise silica. *Rev. Mineral. Geochem.* **54**: 291-327

- de Poorter, L.M.I., Keltjens, J.T. (2001) Convenient fluorescence-based methods to measure membrane potential and intracellular pH in the Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Microbiol. Meth.* **47** (2): 233-241
- Pope, E.J.A., Braun, K., Peterson, C.M. (1997) Bioartificial organs I : silica gel encapsulated pancreatic islets for the treatment of diabetes mellitus. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **8**: 635-639
- Porter, J., Deere, D., Pickup, R., Edwards, C. (1996) Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry* **23** (2): 91-96
- Porter, J., Deere, D., Hardman, M., Edwards, C., Pickup, R. (1997) Go with the flow – use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24** (2): 93-101
- Porter, J., Pickup, R.W. (2000) Nucleic-based fluorescent probes in microbial ecology: application of flow cytometry. *J. Microbiol. Meth.* **42** (1): 75-79
- Poulsen, N., Sumper, M., Kröger, N. (2003) Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (21): 12075-12080
- Powell, J.F., Strange, R.E. (1953) Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. *Biochemistry* **54**: 205-209
- Powell, J.F., Strange, R.E. (1956) Biochemical changes occurring during sporulation in *Bacillus* species. *Biochem. J.* **63** (4): 661-668
- Powell, J.F., Strange, R.E. (1957) $\alpha\epsilon$ -diaminopimelic acid metabolism and sporulation in *Bacillus sphaericus*. *Biochem. J.* **65** (4): 700-708
- Premkumar, J.R., Sagi, E., Rozen, R., Belkin, S., Modestov, A.D., Lev, O. (2002a) Sol-gel luminescence biosensors: encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. *Anal. Chim. Acta* **462**: 11-23
- Premkumar, J.R., Sagi, E., Rozen, R., Belkin, S., Modestov, A.D., Lev, O. (2002b) Fluorescent bacteria encapsulated in sol-gel derived silicate films. *Chem. Mater.* **14** (6): 2676-2686
- Pressi, G., Dal Toso, R., Dal Monte, R. (2003) Production of enzymes by plant cells immobilized by sol-gel silica. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **26**: 1189-1193
- Radfort, D.S., Kihlken, M.A., Borrelly, G.P.M., Harwood, C.R., Brun, N.E.L., Cavet, J.S. (2003) CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**: 105-112
- Raff, J. (2002) *Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden mit Schwermetallen*. Dissertation, Forschungszentrum Rossendorf
- Raff, J., Soltmann, U., Matys, S., Selenska-Pobell, S., Böttcher, H., Pompe, W. (2003) Biosorption of uranium and copper by biocers. *Chem. Mater.* **15** (1): 240-244
- Ragkousi, K., Eichenberger, P., van Ooij, C., Setlow, P. (2003) Identification of a new gene essential for germination of *Bacillus subtilis* spores with Ca^{2+} -dipicolinate. *J. Bacteriol.* **185** (7): 2315-2329
- Read, N.D., Allan, W.T.G., Knight, H., Knight, M.R., Malhó, R., Russell, A., Shacklock, P.S., Trewavas, A.J. (1992) Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal cells. *J. Microsc.* **166** (1): 57-86
- Rensing, C., Ghosh, M., Rosen, B.P. (1999) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181**: 5891-5897
- Reusch, R.N., Huang, R., Bramble, L.L. (1995) Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **69**: 754-766

- Richards, S.R., Turner, R.J. (1984) A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. *Water Res.* **18** (6): 767-773
- Riemann, H., Ordal, Z.J. (1961) Germination of bacterial endospores with calcium and dipicolinic acid. *Science* **133**: 1703-1704
- Riitti-Shati, M., Ronen, D., Mandelbaum, R.T. (1996) Atrazine degradation by *Pseudomonas* strain ADP entrapped in sol-gel glass. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **7**: 77-79
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J., Galperin, M.Y. (2003) An extracellular calcium-binding domain in bacteria with a distant relationship to EF-hands. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**: 103-110
- Rijstenbil, J.W., Gerringa, L.J. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.* **56** (2): 115-131
- Rode, L.J., Foster, J.W. (1959) Induced release of dipicolinic acid from spores of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **79** (5): 650-656
- Rode, L.J., Foster, J.W. (1960) Mechanical germination of bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46** (1): 118-128
- Rode, L.J., Foster, J.W. (1961) Germination of bacterial spores with alkyl primary amines. *J. Bacteriol.* **81** (5): 768-779
- Rode, L.J., Foster, J.W. (1966) Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *J. Bacteriol.* **91** (4): 1582-1588
- Rowley, D.B., Levinson, H.S. (1967) Changes in spores of *Bacillus megaterium* treated with thioglycolate at a low pH and restoration of germinability and heat resistance by cations. *J. Bacteriol.* **93** (3): 1017-1022
- Sakka, S., Yoko, T. (1992) Sol-gel derived coating films and applications, pp. 89-118. In: Monograph Series: *Structure and Bonding, Bd. 77*, Springer Verlag, Berlin
- Sand, W., Jozsa, P.-G., Mansch, R. (2002) *Weathering, microbial*, pp. 3364-3375. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 6*, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Sára, M., Sleytr, U.B. (1996) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **65** (1/2): 83-111
- Sára, M., Sleytr, U.B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182** (4): 859-868
- Saravanapavan, P., Jones, J.R., Verrier, S., Beilby, R., Shirliff, V.J., Hench, L.L., Polak, J.M. (2004) Binary CaO-SiO₂ gel-glasses for biomedical applications. *Biomed. Mater. Eng.* **14** (4): 467-486
- Schmidt, C.F. (1950) Spore formation by thermophilic flat sour organisms. *J. Bacteriol.* **60** (2): 205-212
- Schmidt, H. (1992) Thin films, the chemical processing up to gelation, pp. 119-151. In: Monograph Series: *Structure and Bonding, Bd. 77*, Springer Verlag, Berlin
- Scott, I.R., Ellar, D.J. (1978) Study of calcium dipicolinate release during bacterial spore germination by using a new, sensitive assay for dipicolinate. *J. Bacteriol.* **135** (1): 133-137
- Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Nitsche, H. (1999) Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**: 59-67
- Setlow, B., Setlow, P. (1980) Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** (5): 2474-2476

- Setlow, P. (2000) Resistance of Bacterial Spores, pp. 217-230. In: *Bacterial Stress Response*, Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), Academic Press, Washington
- Setlow, P. (2003) Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 550-556
- Shapiro, H.M. (2000) Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J. Microbiol. Meth.* **42** (1): 3-16
- Shapiro, H.M. (2003) *Practical Flow Cytometry*, 4. Ed., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey
- Shtelzer, S., Rappoport, S., Avnir, D., Ottolenghi, M., Braun, S. (1992) Properties of trypsin and of acid phosphatase immobilized in sol-gel glass matrices. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**: 227-235
- Silver, S., Phung, L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789
- Sincock, S.A., Robinson, J.P. (2001) Flow cytometric analysis of microorganisms. *Meth. Cell Biol.* **64**: 511-537
- Singh, A.K., Flounders, A.W., Volponi, J.V., Ashley, C.S., Wally, K., Schoeniger, J.S. (1999) Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports. *Biosens. Bioelectron.* **14**: 703-713
- Slepecky, R.; Foster, J.W. (1959) Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. *J. Bacteriol.* **78** (1): 117-123
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sára, M. (1993) Crystalline bacterial cell surface layers. *Mol. Microbiol.* **10** (5): 911-916
- Sleytr, U.B., Bayley, H., Sára, M., Breitwieser, A., Küpcü, S., Mader, C., Weigert, S., Unger, F.M., Messner, P., Jahn-Schmid, B., Schuster, B., Pum, D., Douglas, K., Clark, N.A., Moore, J.T., Winningham, T.A., Levy, S., Frithsen, I., Pankovc, J., Beale, P., Gillis, H.P., Choutov, D.A., Martin, K.P. (1997) VI. Applications of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 151-175
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., Sára, M. (1999) Kristalline Zelloberflächen-Schichten prokaryotischer Organismen (S-Schichten): von der supramolekularen Zellstruktur zur Biomimetik und Nanotechnologie. *Angew. Chem.* **111**: 1098-1120
- Smith, R.J. (1995) Calcium and bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**: 83-133
- Soler-Illia, G.J. de A.A., Sanchez, C., Lebeau, B., Patarin, J. (2002) Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. *Chem. Rev.* **102** (11): 4093-4138
- Soliz, M., Odermatt, A. (1995) Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 9217-9221
- Soliz, M., Stoyanov, J.V. (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 183-195
- Soltmann, U., Böttcher, H., Koch, D., Grathwohl, G. (2003a) Freeze gelation: a new option for the production of biological ceramic composites (biocers). *Mater. Lett.* **57**: 2861-2865
- Soltmann, U., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Matys, S., Pompe, W., Böttcher, H. (2003b) Biosorption of heavy metals by sol-gel immobilized *Bacillus sphaericus* cells, spores and s-layers. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **26** (1-4): 1209-1212
- Sonenshein, A.L. (2000) Bacterial sporulation, a response to environmental signals, pp. 199-215. In: *Bacterial Stress Response*, Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), Academic Press, Washington

- Steen, H.B. (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J. Microbiol. Meth.* **42** (1): 65-74
- Steinberg, T.H., Newman, A.S., Swanson, J.A., Silverstein, S.C. (1987) ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **262** (18): 8884-8888
- Stephens, D.J., Allan, V.J. (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* **300** (5616): 82-87
- Stoney, G.G. (1909) The tension of metallic films deposited by electrolysis. *Proc. R. Soc. Lon. Ser.-A* **82**: 172-175
- Suller, M.T.E., Lloyd, D. (1999) Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry* **35** (3): 235-241
- Sumper, M., Kröger, N. (2004) Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *J. Mater. Chem.* **14** (14): 2059-2065
- Swerdlow, B.M., Setlow, B., Setlow, P. (1981) Levels of H⁺ and other monovalent cations in dormant and germinating spores of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **148** (1): 20-29
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., Herman, B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79** (4): 1089-1125
- Tess, M.E., Cox, J.A. (1999) Chemical and biochemical sensors based on advances in materials chemistry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**: 55-68
- Thomas, J.K., Ellison, E.H. (2001) Various aspects of the constraints imposed on the photochemistry of systems in porous silica. *Adv. Colloid Interfac.* **89-90**: 195-238
- Trevors, J.T. (1997) Bacterial evolution and silicon. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 271-276
- Tsien, R.Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290** (5806): 527-528
- Tsujibo, H., Rosen, B.P. (1983) Energetics of calcium efflux from cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154** (2): 854-858
- Tuckermann, M. (2001) Struktur-Eigenschafts-Beziehungen in Leder und Kollagen-Modellsystemen. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 17, Nr. 204, VDI Verlag, Düsseldorf
- Ullman, W.J., Welch, S.A. (2002) Weathering: mineral weathering and microbial metabolism, pp. 3375-3389. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 6, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12** (10): 1161-1208
- Virta, M., Lineri, S., Kankaanpää, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J., Lilius, E.-M. (1998) Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (2): 515-519
- Volesky, B., Holan, Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11** (3): 235-250
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**: 897-900
- Waditee, R., Hossain, G.S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, T., Takabe, T. (2004) Isolation and functional characterization of Ca²⁺/H⁺ antiporters from cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **279** (6): 4330-4338

Webley, D.M., Duff, R.B., Mitchell, W.A. (1960) A plate method for studying the breakdown of synthetic and natural silicates by soil bacteria. *Nature* **188** (4752): 766-767

Weissmann, R., Drewello, R. (1996) Attack on glass, pp. 339-353. In: *Microbially influenced corrosion of materials*, Heitz, E., Flemming, H.-C., Sand, W.(Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

White, P.J., Lotay, H.K. (1980) Minimal nutritional requirements of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602 and 26 other strains of this species: the majority grow and sporulate with acetate as sole major source of carbon. *J. Gen. Microbiol.* **118**: 13-19

Willaert, R.G., Baron, G.V., De Backer, L. (Eds.) (1996) *Immobilized living cell systems*, Wiley, Chichester

Williams, O.B., Lamanna, C., Knaysi, G., Schmidt, C.F., Curran, H.R., Levine, M., Sugiyama, H., Reynolds, H., Lichtenstein, H. (1952) Symposium on the biology of bacterial spores. *Bacteriol. Rev.* **16** (2): 89-143

Wimpenny, J.W.T., Kinniment, S.L., Scourfield, M.A. (1993) The physiology and biochemistry of biofilm, pp. 51-94. In: *Microbial biofilms: Formation and Control*, Denyer, D.P., Gorman, S.P., Sussmann, M. (Eds.), Blackwell Scientific Publications

Wingender, J., Jaeger, K.-E. (2002) Extracellular enzymes in biofilms, pp. 1207-1223. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 3*, Bitton, G. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., N.Y.

Wolfbeis, O.S., Oehme, I., Papkovskaja, N., Klimant, I. (2000) Sol-gel based glucose biosensors employing optical oxygen transducers, and a method for compensating for variable oxygen background. *Biosens. Bioelectron.* **15**: 69-76

Wuertz, S., Mergeay, M. (1997) The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities, pp. 607-642. In: *Modern soil microbiology*, v. Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H.(Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

www.iac-usnc.org/Methods/wholecell/

Youatt, J. (1993) Calcium and microorganisms. *Crit Rev. Microbiol.* **19** (2): 83-97

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. W. Pompe
Dr. M. F. Maitz
Dr. J. Raff
Dr. B. Schmidt-Brücken
Dr. T. Hanke
PD Dr. W. Kreher
Dr. M. Bobeth

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Diese Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 09. September 2005

Sabine Matys

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2002 bis 2005 am Institut für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden unter der Leitung von Prof. W. Pompe. Ihm sei an erster Stelle recht herzlich gedankt. Er bestärkte mich immer wieder, mich dieser spannenden Thematik an der Grenze zwischen verschiedenen Wissenschaftsgebieten zu widmen und mir neue Bereiche zu erschließen. Seinem unerschütterlichen Optimismus und seinem freundlichen und beharrlichen Drängen ist es zu verdanken, dass diese Arbeit zustande kam.

Die materielle Unterstützung gewährte in großzügiger Weise die Deutsche Forschungsgemeinschaft durch die Förderung des Forschungsprojektes "Biocere mit spezifischer Metallbindungsaktivität" unter dem Förderkennzeichen DFG PO 392/15-2

Ein großer Teil der experimentellen Arbeiten wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie des Instituts für Radiochemie im Forschungszentrum Rossendorf durchgeführt. Der Leiterin Dr. S. Selenska-Pobell und den Kollegen Dr. J. Raff, K. Flemming, Dr. M. Merroun, Dr. K. Pollmann, Dr. D. Regenhart, A. Geißler, M. Nedelkova und M. Dudek danke ich für die warmherzige und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre und die großzügig gewährten Freiräume. Die vielfältigen fachlichen Diskussionsmöglichkeiten und die tatkräftige Unterstützung bei praktischen Dingen halfen mir, in der faszinierenden Welt der Bakterien heimisch zu werden. Ich denke gern an diese gemeinsame Zeit zurück.

Dr. M. F. Maitz aus dem Institut für Ionenstrahlphysik und Materialforschung des FZR danke ich herzlich für seine große Unterstützung und sein reges Interesse bei den Einzellmessungen an fluoreszenzgefärbten Bakterien. Ich schätze seine Fachkompetenz, die große Hilfsbereitschaft und seine Kollegialität. Dr. M. T. Pham danke ich für sein Einverständnis, die dortigen Laborkapazitäten zu nutzen.

Das Rasterelektronenmikroskop im Institut für Werkstoffwissenschaft nutzen zu dürfen, ist besonders hoch einzuschätzen. Dazu tragen nicht zuletzt die Hilfsbereitschaft und Aufgeschlossenheit der dortigen Kollegen bei. An dieser Stelle sei stellvertretend Dr. C. Blank, A. Mensch und S. Mühle ganz herzlich gedankt. Ein ganz besonderes Dankeschön geht an O. Trommer, die für alle immer ein offenes Ohr, aufmunternde Worte und frisch gekochten Tee sowie diverse Leckereien hat.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. T. Hanke aus der Arbeitsgruppe Biomaterialien für die Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop. Seine Hilfsbereitschaft und die vielen nützlichen Tipps zum Thema Fluoreszenzfärbung waren mir eine große Unterstützung.

Prof. H. Böttcher von der Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e. V. danke ich für sein Interesse an der Arbeit und für seine wertvollen fachlichen und durchaus kritischen Hinweise. Bei Dr. U. Soltmann möchte ich mich ganz herzlich für die Präparation der Biocermaterialien und die vielen gemeinschaftlichen Experimente und Gespräche während unserer gemeinsamen Projektzeit bedanken.

Viele praktische Arbeiten wären überhaupt nicht durchführbar gewesen ohne die goldenen Hände von J. Förster und J. Voigt. Das reibungslose Funktionieren der Durchflusskammer und des Kapazitätsmessplatzes habe ich ausschließlich ihnen zu verdanken, ganz zu schweigen von der ständigen Unterstützung bei kleinen technischen Schwierigkeiten.

Prof. D. Meyer und E. Gutmann vom Institut für Strukturphysik der TU Dresden möchte ich für die rasche und unkomplizierte Durchführung der Röntgenbeugungsuntersuchungen von Biocerschichten danken.

Dr. B. Schmidt-Brücken gebührt besonderer Dank für seine unermüdliche Bereitschaft zuzuhören und bei vielen Fragen und Problemen geduldig mit guten und wertvollen Ratschlägen zur Stelle zu sein.

Allen namentlich nicht genannten Kollegen der Arbeitsgruppe "Nanotechnologie und Strukturbildung" unter der Leitung von Dr. M. Mertig und den Kollegen der Professur Materialwissenschaft und Nanotechnik danke ich ebenfalls für viele interessante und anregende Gespräche und nützliche Tipps.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kindern und meinem Lebensgefährten für ihre unendliche Geduld und Nachsicht bedanken, die sie mit mir in dieser arbeitsreichen Zeit geübt haben. Ihre moralische Unterstützung hat mir viel Kraft gegeben.