

LASERBASIERTE ONLINE ANALYTIK
UMWELTRELEVANTER STOFFE

EINSATZ UND VERGLEICH ZWEIER
METHODEN

Laserinduzierte Fluoreszenzanalytik
zur Identifikation DDT-haltiger Althölzer

Konfokale Ramanmikroskopie
zur nichtinvasiven Analyse von Biofilmen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Phys. Ralf Pätzold

geboren am 9. Januar 1969 in Hildesheim

2004

Referentin Prof. Dr. Angelika Anders-von Ahlften

Korreferent Prof. Dr. Wolfgang Ertmer

Tag der Promotion 2. Juli 2004

(angefertigt am Institut für Biophysik)

Meiner Frau Judith

„Thinking is the hardest work there is,
which is probably the reason why so few engage in it.“

(Henry Ford)

Zusammenfassung

Motivation und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung zweier laserbasierter Spektroskopiemethoden (Fluoreszenz- und Schwingungsspektroskopie) im Bereich der Umweltanalytik. Zentrale Fragestellung war dabei neben praktikablen Gesichtspunkten vor allem die in situ Schnellanalytik, die Meßergebnisse nichtinvasiv und in Echtzeit bereitstellen soll. Die spezifischen Vor- und Nachteile der jeweiligen spektroskopischen Methode wurden anhand konkreter Anwendungen erarbeitet: Zur Anwendung kamen die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie bei der Detektion von DDT-haltigen Holzschutzmitteln sowie die konfokale Ramanmikroskopie bei der Analyse zur Abwasserreinigung eingesetzter Biofilme.

Die vom Gesetzgeber gewünschte Wiederverwertung von Rohstoffen bedingt die Determinierung des Schadstoffgehaltes des zu recycelnden Gutes. Schnellanalysemethoden sollen helfen, den Grad der Schadstoffbelastung kostengünstig, schnell und sicher zu bestimmen. Mit Hilfe eines frequenzvervierfachen, gepulsten Nd:YAG-Lasersystems wurden neben statischen Fluoreszenzspektren auch zeitaufgelöste Messungen durchgeführt. In diesen Untersuchungsreihen ließen sich DDT sowie „Hylotox 59“ aufgrund ihrer charakteristischen Fluoreszenz in anwendungsüblichen Mengen direkt auf Holz nachweisen.

Der nichtinvasive Nachweis von speziellen, am einstufigen Deammonifikationsprozeß beteiligter Bakterien direkt in ihrem Lebensraum - dem Biofilm - gelang mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie. Diese sogenannten anaeroben Ammoniumoxidierer konnten aufgrund spezifischer Schwingungsspektren räumlich aufgelöst im Biofilm aufgezeichnet werden. Neben der Detektion des Bakteriums wurde auch versucht, den Stoffwechsel zu analysieren. Die Verteilung von Ammonium und Nitrit im Biofilm sollte ortsaufgelöst im μm -Maßstab ermittelt werden. Aufgrund eines breiten, undifferenzierten und relativ intensiven Hintergrundsignals sowie eines sehr geringen Probenvolumens (ca. $10 \mu\text{m}^3$) ließen sich die im Biofilm vorhandenen Stoffkonzentrationen (unter 1 mM) nicht detektieren.

Erwähnenswert sowie ein Hinweis auf die Leistungsfähigkeit des Meßsystemes ist die absolute Stoffmenge, die sich mit dem konfokalen Ramanmikroskop noch nachweisen ließ: 1,1 Femtogramm (Nitrat)! Ausschlaggebend für die positiven Ergebnisse sind die Entwicklungen auf dem Gebiet der Laserlichtquellen sowie auf Seiten der Lichtdetektion (inklusive Auswertung durch die Rechenkapazität moderner Computer).

Schlagwörter: Laserbasierte Umweltanalytik, Fluoreszenzspektroskopie, Ramanmikroskopie

Abstract

Motivation and main purpose of the presented dissertation was the application of two different laser-based spectroscopy techniques in the field of environmental analysis. Fluorescence and vibrational spectroscopy were used with particular regard to practical aspects as well as rapid in situ techniques for non-invasive on-line measurements. Specific advantages and drawbacks of these methods were studied on two applications: The wood preservative „Hylotox 59“ and its active agent, the insecticide DDT, were detected directly on wood by means of laser induced fluorescence spectroscopy. Beside this application-oriented investigation basic research was carried out when analyzing biofilms, which were deployed in purification plants, with a confocal Raman microscope.

Material recycling as it is desired by the legislator requires a determination of the degree of pollution of used materials. In order to determine the pollution fast, reliable, and cost-effective, rapid detection methods are necessary. Multidimensional fluorescence spectra in the time domain were recorded by means of a frequency-quadrupled, pulsed Nd:YAG-laser. Due to characteristic fluorescence properties DDT and „Hylotox 59“ were detected directly on wood in normally applied concentrations.

The bacterium which is mainly involved in the onestage deammonification process could be detected in its habitate (biofilm). These non-invasive measurements were performed by a confocal Raman microscope, which detects specific vibrational bands of the ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation) microorganism. In addition to the spatial resolved detection of the bacterium, attempts at analyzing its metabolism were made. Therefore, the distribution of ammonium and nitrite inside the biofilm should be measured in dependence of the position (μm scale). Due to a rather broad and unspecific background signal as well as a very small sample volume (ca. $10 \mu\text{m}^3$), the assumed concentration of the substances (below 1 mM) could not be detected.

However, the achieved absolute amount of substance, which detection was possible, is remarkable: 1,1 femtogram (nitrate)! This is an indication of the potential of the used confocal Raman microscope. Crucial for the achieved positive results are the developments in the field of laser light sources as well as light detection devices (including the evaluation by modern computers).

Keywords: Laser based environmental analysis, fluorescence spectroscopy, Raman microscopy

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie und Hintergrund	7
2.1	Lasert	7
2.2	Lasertinduzierte Fluoreszenzspektroskopie	8
2.2.1	Fluoreszenzintensit	10
2.2.2	Zeitaufgeloste Fluoreszenzspektroskopie	11
2.3	Ramanspektroskopie	11
2.4	Konfokale Mikroskopie	17
2.4.1	Auflsungsvermgen Lichtmikroskop	18
2.4.2	Auflsungsvermgen CRM	18
2.5	Holz	20
2.5.1	Spektroskopische Untersuchungen an Holz	21
2.5.2	Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)	22
2.5.3	“Hylotox 59“	23
2.6	Anaerobe Ammoniumoxidation (ANAMMOX)	23
2.7	Rauschen und Nachweisgrenze	29
3	Material und Methoden	33
3.1	CCD-Kamerasysteme	34
3.1.1	Fluoreszenzmessungen	35

3.1.2	Konfokale Ramanmikroskopie	35
3.1.3	Kalibrierung	36
3.1.4	Spektrale Auflösung	36
3.1.5	Quanteneffizienz und Instrumentenfunktion	37
3.2	Fluoreszenz	39
3.2.1	Experimenteller Aufbau Nd:YAG-Lasersystem	40
3.2.2	Experimenteller Aufbau Stickstoff-Lasersystem	43
3.3	Holz und applizierte Stoffmengen	43
3.4	Konfokales Ramanmikroskop	45
3.4.1	Prinzipieller Meßablauf	48
3.4.1.1	„Fast Imaging“	49
3.4.1.2	„Full Spectral Imaging“	50
3.4.2	Limitierungen	50
3.4.3	Spektrenauswertung	50
3.5	Biofilme	51
3.6	Reproduzierbarkeit	53
4	Ergebnisse und Diskussion: Fluoreszenz	55
4.1	Fluoreszenz (266 nm)	56
4.1.1	Holz	56
4.1.2	DDT in Methanol	57
4.1.3	DDT auf Fichte	57
4.1.4	Holzschutzmittel „Hylotox 59“	59
4.1.4.1	„Hylotox 59“ auf Fichte	59
4.1.4.2	Nachweisgrenze „Hylotox 59“ auf Fichte	60
4.1.5	Wiederholung der Messungen	61
4.2	Fluoreszenz (337 nm)	62
4.3	Zeitaufgelöste LIF	64
4.3.1	Fichte	64

4.3.2	„Hylotox 59“	65
4.3.3	„Hylotox 59“ auf Fichte	65
4.4	Biofilm und Schlamm	69
4.5	2-Photonen-Anregung	70
4.6	Zusammenfassung	72
5	Ergebnisse und Diskussion: Ramanmikroskopie	73
5.1	Geräteparameter	74
5.1.1	Wellenlängenstabilität	76
5.1.2	Intensitätsschwankungen	77
5.1.3	Linearität der Laserintensität	78
5.1.4	Axiales Auflösungsvermögen	79
5.2	Nachweisgrenzen	80
5.2.1	Stoffnachweisgrenzen in Wasser	82
5.2.2	Nachweisgrenzen im Biofilm	84
5.3	Ramanspektren	87
5.3.1	Laserintensität	88
5.3.2	EPS	88
5.3.3	Anorganische Ramansignale	90
5.3.4	Organische Verbindungen	94
5.3.4.1	Anregungswellenlänge 532 nm	94
5.3.4.2	Anregungswellenlänge 784,6 nm	100
5.3.5	ANAMMOX-Bakterium	102
5.4	Zusammenfassung	105
6	Zusammenfassung und Ausblick	107
A	Abkürzungsverzeichnis	131

B Hintergrund	133
B.1 Detektion von Holzschutzmitteln	133
B.2 Biofilme in der Abwasserreinigung	136
C Technische Daten	141
D Curriculum Vitae	147
E Publikationen	149
F Erklärungen	153
G Danke!	155

Kapitel 1

Einleitung

Die Anwendung zweier laserbasierter optischer Spektroskopiemethoden in der Umweltanalytik stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Eine universelle, optische (laserbasierte) Spektroskopiemethode, die alle Meßaufgaben erfüllen kann, existiert nicht. Vielmehr muß die Untersuchungsmethode der Fragestellung und den Anforderungen des Experimentes angepaßt werden. In dieser Arbeit wurden folgende Aufgaben bearbeitet:

- Detektion von DDT und DDT-haltigem Holzschutzmittel auf Holz
- Analyse von Biofilmen eingesetzt bei der einstufigen Stickstoffelimination in Abwässern

Zur erfolgreichen Bearbeitung dieser Aufgabenstellung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Wechselwirkungen des Laserlichtes mit der Probe gezielt eingesetzt: die **Fluoreszenzanregung** sowie die **inelastische Streuung** (Ramanstreuung). Dabei sollten auch unterschiedliche Aspekte bei der stofflichen Analyse berücksichtigt werden. Während im Fall der Detektion von DDT-haltigen Holzschutzmitteln der anwendungsorientierte online Aspekt im Mittelpunkt stand (viele Proben sind möglichst schnell und zuverlässig sowie preisgünstig zu untersuchen), wurde in der zweiten Untersuchungsreihe grundlegende Forschung am und im Biofilm unter dem Gesichtspunkt *nichtinvasiv* vollzogen.

Im folgenden sollen kurz zur Motivation einige allgemeine Aspekte der laserbasierten Umweltanalytik aufgezeigt sowie die dieser Arbeit zugrunde liegende Aufgabenstellung kurz beleuchtet werden. Eine darüber hinaus gehende, spezifische Darstellung dissertationsrelevanter Punkte (Holz bzw. Holzschutzmittel sowie Biofilm) findet sich im Anhang B ab Seite 133.

Das gestiegene Umweltbewußtsein in Politik und Gesellschaft führt neben dem Wunsch nach einem grundlegenden Verständnis der Zusammenhänge in der Natur zu gelangen, auch zu dem Bedürfnis, die anthropogen verursachten Stoffeinträge in die Umwelt zu erfassen – wobei in letzterem Fall die qualitative wie quantitative Messung von Schadstoffen im Blickpunkt stehen. Optische Meßverfahren bieten die Möglichkeit, Schadstoffeinträge schnell zu lokalisieren und einem Verursacher zuzuordnen. Dabei sind die Anforderungen an die Schnellanalytik vielseitig und hängen von der jeweiligen Fragestellung ab. Neben Aggregatzustand der Probe, Meßdauer, Zuverlässigkeit und zu erreichenden Nachweisgrenzen sind es vor allem Kostenaspekte, die die Anforderungen an den technischen Aufwand nach oben hin begrenzen.

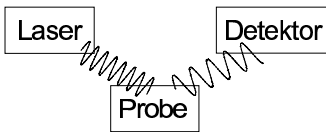


Abbildung 1.1: Berührungsloses Meßprinzip mit Hilfe von Laserlicht

darüberhinaus häufig einen relativ einfachen Aufbau des Meßinstrumentes bestehend aus Lichtquelle, Probe, Detektor (siehe nebenstehende Abbildung). Die kurzen Zeitabläufe bei der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie gestatten es, die Meßergebnisse in Echtzeit¹ zu erhalten. Diese Eigenschaft, bei der das Meßergebnis sofort vorliegt, sind neben dem berührungslosen Verfahren das Hauptargument für die Verwendung optischer Methoden.

Durch den Einsatz der laserbasierten Schnellanalytik in Kombination mit immer effizienteren Detektoren lassen sich mittlerweile auch laboranalytische Fragestellung (Spurenanalytik) bearbeiten. Die rasant fortschreitenden Entwicklungen im Bereich der Lasertechnik sowie der Optoelektronik erlauben es, neue Forschungsfelder zu erschließen und Fragestellungen zu bearbeiten. Die in jüngster Zeit neu- bzw. weiterentwickelten lasergestützten Verfahren besitzen ein breitgefächertes Anwendungsfeld – von der reinen anwendungsbezogenen Analytik bis hin zum Einsatz in der Grundlagenforschung [1]. Auf der anderen Seite finden Instrumente aufgrund erschwinglicher Preise einen größeren Anwenderbereich, so daß auch kleinere Unternehmen an dieser Entwicklung partizipieren: Was einstmals nur teure Spezialgeräte im Labor ermöglichten, kann nun mobil vor Ort gemessen werden. Miniaturspektrometer mit integriertem Zeilen-CCD und fasergestützter Strahlführung seien hier beispielhaft erwähnt. Eine kleine Aus-

¹In dieser Arbeit soll der häufig verwendete Begriff *online* so verstanden werden.

Die Vorteile optischer Analysetechniken zeigen sich deutlich in Experimenten, in denen die Probe nichtinvasiv vermessen werden muß und bei denen vorher keine Probenpräparation stattfinden darf oder soll. Das Untersuchungsobjekt kann somit in seiner natürlichen Umgebung vermessen werden. Diese Art der Untersuchungen lassen sich unter den vielfach verwendeten Schlagworten *in situ*, *in vivo* und *online* zusammenfassen. Das berührungslose Meßprinzip optischer Meßtechniken erlaubt

wahl an jüngsten, beeindruckenden Entwicklungen: Das Electron Multiplying CCD (EMCCD) erreicht Einzelphotonempfindlichkeit, indem es die erzeugten Elektronen bereits auf dem Chip verstärkt und besitzt daher ein exzellentes Signal-/Rauschverhältnis [2, 3]. Die rückseitengedünnten Exemplare – sogenannte back-illuminated EMCCDs – stellen die zur Zeit empfindlichsten CCD-Kameras dar. Die kompakten und gleichzeitig leistungsstarken Laserdioden, die in erster Linie für die Kommunikationstechnik entwickelt werden, stellen mittlerweile Licht sehr kurzer Wellenlänge bereit – bis hinunter zu 230 nm. Damit stehen diese handlichen sowie leistungsfähigen Laserlichtquellen für einen weiten Spektralbereich zur Verfügung. Ultrakurzpulslaser (fs-Bereich), deren Wellenpaket nur noch einige Wellenzüge lang ist, erlauben u. a. Einsichten in extrem kurze zeitliche Abläufe. Darüberhinaus existieren sehr empfindliche Methoden, mit denen einzelne Moleküle nachgewiesen werden können [4].

Mit der Realisierung eines Verstärkers für elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich Anfang der 1960er Jahre [5] kann der Spektroskopiker seitdem auf eine in vielerlei Hinsicht ideale Lichtquelle zurückgreifen. Der Laser gilt als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts. Einen Überblick über Technik und Einsatzmöglichkeiten von Laserlicht zeigt [6]. Einzigartige Merkmale der Laserstrahlung sind spektrale Leistungsdichte, Monochromasie, zeitliche wie räumliche Kohärenz, ultrakurze Pulsdauern und eine hervorragende Fokussierbarkeit. Beispielsweise konnte erst durch den Einsatz des Lasers die bereits 1928 entdeckte Ramanstreuung [7] zu analytischen Zwecken genutzt werden. Mittlerweile besitzt der Laser in der Analytik eine unüberschaubare Fülle an Einsatzmöglichkeiten, aus der sich der Spektroskopiker je nach Anforderungen des Meßproblems bedienen kann. Neben den offensichtlichen Wechselwirkungen des Laserlichtes mit der Probe (Absorption, Reflexion und Streuung) wird der Laser auch zur Probenahme bzw. Probenvorbereitung verwendet (Ablation, Desorption, Ionisation) sowie in spannenden Verfahren als Punktlichtquelle eingesetzt (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie und konfokale Ramanmikroskopie – CLSM bzw. CRM).

Unterdessen existiert eine Fülle laserbasierter Umsetzungen in der Umweltanalytik. Ein nichtrepräsentativer Querschnitt soll den Erfolg dieser Meßtechnik deutlich machen: Eine bereits etablierte Methode ist die LIDAR-Überwachung der Atmosphäre, bei der die Schadstoffverteilung in der Luft über viele Kilometer gemessen werden kann. Ähnlich läßt sich aus einem Flugzeug heraus eine Ölverschmutzung auf dem Meer detektieren. Die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIF) wird u. a. zur großflächigen Detektion bei der Erfassung des Sanierungsbedarfes von PAK-belasteten Böden eingesetzt. Durch den Einsatz einer besonderen schwingungsspektroskopischen Methode (CARS) konnten Verbrennungsvorgänge besser analysiert werden und führten so u. a. zur Entwicklung schadstoffarmer Verbrennungsanlagen sowie in der Automobilindustrie zu entsprechenden Motoren. Die Mitte der 1990er Jahre bemängelten Probleme, die

eine Verbreitung laserbasierter Techniken in der Umweltanalytik aufgrund hoher Kosten der Lasersysteme sowie einer aufwendigen Bedienung (Bedarf an Fachpersonal) verhinderten [8], sind indessen weitestgehend gelöst. Eine aktuelle Übersicht über den Einsatz von Lasern im Umweltbereich sowie den „Life Sciences“ zeigt [9].

Prinzipiell existieren aufgrund der verschiedensten Wechselwirkungen von Licht mit Materie sowie einer Vielzahl an Parametern (u. a. Anregungswellenlänge, Zerfallskonstanten angeregter Zustände) eine recht hohe Anzahl (ca. 20) an laserbasierten Meßmethoden [8]. Neben der Verwendung des Lasers zur Probennahme bzw. -vorbereitung (LIPS, MALDI- und REMPI-TOFMS, RIMS) sind es in erster Linie die berührungslosen Meßverfahren, welche das Meßobjekt nicht verändern, die den Anforderungen der Umweltanalytik gerecht werden (s. o.). Unter diesen Voraussetzungen sind vor allem zwei Methoden zu nennen, die in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzt wurden:

Fluoreszenzanregung Das Aussenden von Lichtteilchen nach elektronischer Anregung kann zu Analysezielen herangezogen werden. Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr empfindliche Nachweismethode (Fluorophorkonzentrationen bis zu $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Eine Reihe von Einschränkungen, wie eine geringe Quantenausbeute zahlreicher Stoffe, breite und undifferenzierte Spektren, Schwierigkeiten der quantifizierenden Stoffbestimmung, Überlagerung mit anderen Stoffen sowie Fluoreszenzlöschung und -verschiebung grenzen die Einsatzgebiete der Fluoreszenzspektroskopie ein.

Ramanspektroskopie Die spezifische Anregung von Molekülschwingungen erzeugt ein sehr spezifisches Spektrum, dessen scharfe Linien sich hervorragend zur Stoffidentifikation heranziehen lassen—gleich einem Fingerabdruck des Moleküls. Die Ramanspektroskopie erlaubt die Untersuchung einer Probe ohne sie vorher aufzubereiten zu müssen—im Gegensatz zu ihrer Schwestertechnik, der IR-Spektroskopie. Dies gilt insbesondere für Proben mit hohem Wasseranteil, deren starke Wasserabsorption eine Untersuchung im IR nicht zuläßt. Der äußerst geringe Wechselwirkungsquerschnitt der Ramanstreuung wurde durch Entwicklungen im Bereich der Lasertechnik und der CCD-Kameras wieder wettgemacht, so daß die Ramanspektroskopie geradezu eine Wiederauferstehung seit den 1990ern erlebt. Sie hat sich als qualitative Methode zur Gemischanalyse und als quantitative Methode zur Reinstoffanalyse mittlerweile etabliert.

Wie bereits oben geschildert, waren die Vorgaben bei der Analytik von DDT-behandelten Hölzern, eine preiswerte Schnellanalysemethode zu etablieren, die kostengünstig eine Vielzahl an Proben untersuchen kann und so als ein einfach zu

bedienendes Meßinstrument auf entsprechenden Sammelhöfen eingesetzt werden kann. Unter diesen Gesichtspunkten wurde als Mittel der Wahl die LIF eingesetzt, da aufgrund der chemischen Struktur des DDT sowie der Fluoreszenzaktivität zahlreicher Holzschutzmittel (HSM) eindeutig zuzuordnende Fluoreszenzspektren zu erwarten waren. Weil viele Stoffe eine Fluoreszenzaktivität bei Anregung im ultravioletten (UV) Strahlungsbereich zeigen, wurde zur Fluoreszenzanregung ein frequenzvervierfaches Nd:YAG-Lasersystem verwendet (Emissionswellenlänge: 266 nm). Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an Holz, DDT sowie dem HSM „Hylotox 59“ werden in Kapitel 4 präsentiert. Es wurde eingehend untersucht, inwieweit mit Hilfe charakteristischer Fluoreszenzspektren eine direkte Detektion der Stoffe auf dem Holz gelingt. Zu bestimmende experimentelle Parameter waren neben der spektralen Lage der Fluoreszenzbanden der einzelnen Stoffe, die Abhängigkeit von der aufgetragenen Stoffkonzentration sowie die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes.

Im zweiten Teil der Dissertation, dem eine anderweitig gelagerte Aufgabenstellung zu Grunde lag, sollten die Stickstoffverbindungen Ammonium, Nitrat und Nitrit im Biofilm orts aufgelöst im μm -Maßstab in alle Raumrichtungen untersucht werden, wobei insbesondere eine tiefenaufgelöste Stoffverteilung ermittelt werden sollte. Die Stickstoffverbindungen bilden für den Mikroorganismus, der für die anaerobe Ammoniumoxidation (ANAMMOX) verantwortlich ist, die Ausgangssubstanzen seines Stoffwechsels. Die Verteilung dieser Stoffe im Biofilm ist bislang noch nicht erforscht. Die Detektion der Stoffe mit Hilfe von Mikrosensoren liefert lediglich ein grobes ($> 10 \mu\text{m}$), eindimensionales Bild der Stoffverteilung, das zudem einen relativ großen Eingriff (bis hin zur Zerstörung des Biofilmes) bedeutet. Darüberhinaus sind die verwendeten Sensoren Spezialanfertigungen, die nur eine geringe Lebensdauer besitzen (einige Tage).

Als Meßinstrument kam ein konfokales Mikroskop zum Einsatz, daß die geforderte hohe Ortsauflösung auch in axialer Beobachtungsrichtung liefert. Da die erwähnten Stoffe nur eine recht geringe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen und dem Umstand Rechnung tragend, daß die Fluoreszenz aufgrund spektral sehr breiter Banden nicht zur Multikomponentenanalyse geeignet ist, ließ sich die LIF nicht gewinnbringend einsetzen. Der Wechselwirkungsprozeß der elektromagnetischen Strahlung mit der Probe beruhte in diesem Fall auf dem oben geschilderten Ramaneffekt. Die Meßaufgabe wurde in diesen Untersuchungsreihen daher von einem konfokalen Ramanmikroskop (CRM) erfüllt, das in der Lage ist, eine stoffspezifische Abbildung des Meßvolumens zu erzeugen.

Neben der Detektion der stickstoffhaltigen Verbindungen wurde versucht, den Mikroorganismus direkt im Biofilm nachzuweisen. Die CRM ist (bislang) die einzige Methode, die eine Beobachtung des Organismus „bei der Arbeit“ gestatten würde, ohne dabei das System Biofilm zu zerstören.

Kapitel 2

Theorie und Hintergrund

Nach einer kurzen Erläuterung des Lasers und seinen Besonderheiten im Hinblick auf die Spektroskopie sollen in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels zunächst die relevanten Grundlagen der beiden verwendeten unterschiedlichen Spektroskopietechniken (laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie und Raman-spektroskopie) erläutert werden. Im Anschluß daran erfolgt eine kurze Skizzierung der konfokalen Mikroskopie, in der die Unterschiede (Auflösungsvermögen) zur konventionellen Lichtmikroskopie dargestellt werden.

In den Abschnitten 2.5 (Holz) und 2.6 (Biofilm) werden die Eigenschaften der beprobten Objekte aufgezeigt. Abschließend wird auf das wichtige Verhältnis von Signalintensität und Rauschen eingegangen (2.7), da dieses in der Analytik (insbesondere bei geringen Stoffkonzentrationen) eine entscheidende Rolle spielt.

2.1 Laser

Aufgrund seiner essentiellen Bedeutung sollen kurz die wichtigsten Punkte der Laserstrahlung vorgestellt werden. Der Laser ist prinzipiell ein Verstärker für Licht¹. Wie bei selbsterregten Verstärkern üblich, wird ein Teil des Ausgangssignales dem Eingang des Verstärkers wieder zugeführt. Diese Aufgabe fällt dem Resonator, gebildet aus zwei Spiegeln, zu. Zwei weitere Hauptkomponenten sind allen Lasern gemein: Die Energiequelle und das aktive Lasermedium. Damit enden allerdings auch bereits die Gemeinsamkeiten. Das aktive Lasermedium kann aus den unterschiedlichsten Materialien bestehen. Auch die Beschaffenheit spielt

¹light amplification by stimulated emission of radiation

keine Rolle: Es existieren Festkörper-, Flüssigkeits-, Gas-, Halbleiter- und Plasmalaser. Die Energiezuführung zur Erzeugung der Besetzungsinversion (s. u.) im Lasermedium kann ebenfalls auf unterschiedlichste Weise erfolgen (Blitzlampen, Laser, chemische Reaktionen, Strom, Gasentladung).

Nachfolgend werden kurz die besonderen Charakteristika der Laserstrahlung, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, genannt:

Monochromasie: Aufgrund des Überganges zwischen zwei Zuständen wird Licht einer sehr geringen spektralen Bandbreite emittiert, so daß gezielt elektronische Molekülübergänge angeregt werden können. Der Einsatz einer äußerst schmalbandigen sowie frequenzstabilen Lichtquelle ist für die Qualität der Ramanspektroskopie von herausragender Bedeutung.

Divergenz: Die Lichtenergie wird nur in einen sehr kleinen Raumwinkel abgestrahlt (im Gegensatz zu herkömmlichen Lichtquellen). Mit Hilfe dieses so erzeugten Strahles kann die Energie des Lichtes ohne große Verluste über große Strecken transportiert werden.

Kohärenz: Die Kohärenz der Wellenzüge erlaubt ferner eine hervorragende Fokussierbarkeit der Strahlungsenergie in einen sehr kleinen Raumbereich. Für das abtasternde Verfahren der CRM stellt diese Punktlichtquelle eine Grundvoraussetzung dar. Der schwache Ramanprozeß kann durch die hohen Leistungsdichten ausgeglichen werden.

2.2 Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

Allgemein versteht man unter Fluoreszenz die Energieabgabe eines (zuvor angeregten) Stoffes in Form von Lichtquanten. Bei der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIF) führt die Absorption von Energie aus dem Strahlungsfeld des Lasers zu elektronisch angeregten Zuständen im Molekül (oder auch Atom). Die diskrete Struktur der Zustände (siehe Abb. 2.1), die durch den Einfluß von Lösungsmitteln, Temperatur, u. ä. sich meist zu spektral breiteren Bandenbereichen ausdehnt, macht den Einsatz spezifischer Wellenlängen zur gezielten Anregung erforderlich. Die Frequenz eines absorbierten oder emittierten Photons ν ist durch die Energiedifferenz der beiden Zustände gegeben: $E = h\nu$

Aufgrund seiner spezifischen Eigenheiten (s. o.) läßt sich der Laser bei der Fluoreszenzspektroskopie äußerst effizient einsetzen: Die geringe spektrale Bandbreite der Laserstrahlung ermöglicht die gezielte Anregung in einen elektronischen Zustand. Die hohe Energiedichte, die sich zudem noch weiter fokussieren läßt,

erlaubt es, selbst Stoffe mit geringer Fluoreszenzquantenausbeute zum Fluoreszieren anzuregen, so daß genügend Photonen zum Nachweis zur Verfügung stehen. All dies macht die LIF zu einem geeigneten Mittel in der Spurenanalytik (bis in den sub-ppm Bereich).

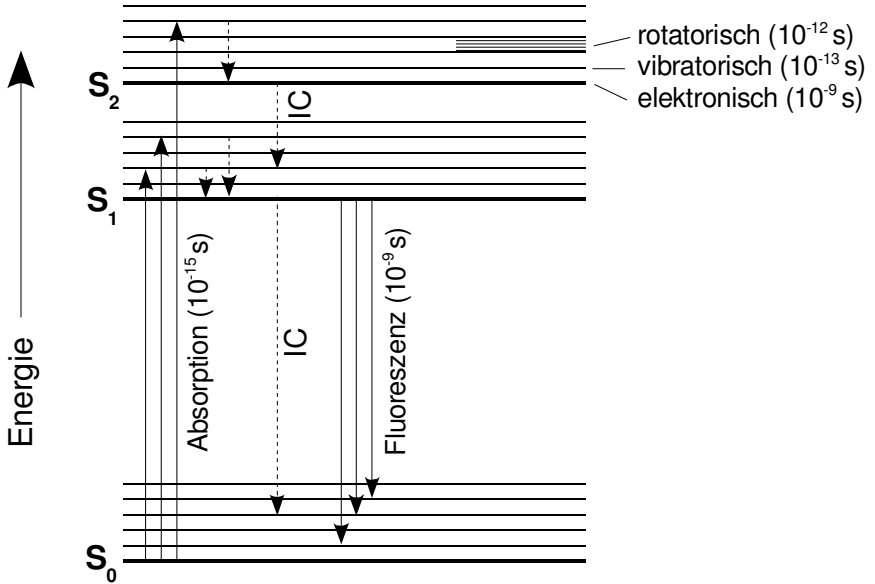


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm (S_0 - S_2 : Singulett-Zustände, T_1 : Triplett-Zustand, IC: interne Konversion. Durchgezogene Pfeile: Strahlungsemission bzw. -absorption, gepunktete Pfeile: strahlungslose Übergänge)

Die elektronische Anregung eines Moleküls erfolgt in einem äußerst kurzen Zeitraum, so daß sich die Kernabstände im beteiligten Molekül nicht ändern (Franck-Condon-Prinzip). Die Anregung erfolgt daher meist in einen höheren Schwingungszustand des angeregten Zustandes, da das Quadrat der Wellenfunktion an den Umkehrpunkten des Potentialtopfes ein Maximum aufweist. Allgemein gilt, daß der Übergang mit einer starken Überlappung der beiden Wellenfunktion sich durch eine entsprechend hohe Übergangswahrscheinlichkeit auszeichnet. Der molare Extinktionskoeffizient ist ein direktes Maß für diese Wahrscheinlichkeit.

Da Vibrationszustände nur sehr kurze mittlere Lebensdauern besitzen, zerfällt dieser Zustand rasch in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand. War die Energie des absorbierten Photons ausreichend, um in höhere elektronische Zustände als dem S_1 -Zustand anzuregen, so erfolgt zunächst der strahlungslose

Prozeß der internen Konversion (IC) bis schließlich der energetisch niedrigste S_1 -Zustand erreicht ist. Erst von hier aus kann das Molekül seine Energie in Form eines Fluoreszenzquantens abgeben. Somit erklärt sich, daß die Fluoreszenz im Vergleich zur Anregungswellenlänge immer in den langwelligeren Bereich verschoben ist.

2.2.1 Fluoreszenzintensität

Rein rechnerisch ergibt sich die Intensität einer Spektrallinie bei einem Übergang zwischen zwei Molekülzuständen aus dem Übergangsmatrixelement sowie dem Franck-Condon- und dem Hönl-London-Faktor (FC bzw. HL) [10]:

$$I \propto |M_{12}|^2 \cdot FC \cdot HL$$

Der erste Term, das Übergangsmatrixelement, beschreibt die Wahrscheinlichkeit für den Elektronenübergang und hängt von den elektronischen Wellenfunktionen der beiden Zustände ab. Der Faktor FC wird durch den Überlapp der zugehörigen Schwingungswellenfunktion bestimmt, während schließlich HL die Rotationsdrehimpulse des Moleküls berücksichtigt. Im allgemeinen ist es nicht möglich, die betreffenden Funktionen analytisch zu lösen. Vielmehr lassen sich aus dem Aufbau des Moleküls Eigenheiten des Fluoreszenzverhaltens ableiten:

Ein ausgedehntes π -Elektronensystem, wie sie in hochkonjugierten Bindungssystemen vorkommen, sind ein starkes Indiz für Strahlungsprozesse. Je geringer die Anzahl der konjugierten Bindungen, desto energiereicher muß die Anregung erfolgen. Entsprechend kurzweilig wird auch die Fluoreszenz abgestrahlt. Typische Fluorophore besitzen daher häufig aromatische Benzolringe (Bsp. Rhodamin B) und/oder lange ungesättigte Ketten (Bsp. Carotinoide).

Die für die Fluoreszenzspektroskopie interessanten Übergänge sind $n \leftarrow \pi^*$ und $\pi \leftarrow \pi^*$. Insbesondere für kleinere Moleküle gilt, daß der $\pi \leftarrow \pi^*$ Übergang energiereicher ist als der $n \leftarrow \pi^*$. Erster liegt meist im UV-B.

Quantitative Messungen erfordern die Linearität (oder zumindest einen eindeutigen Zusammenhang) zwischen eingestrahelter Intensität und Fluoreszenzlicht. Bei hinreichend verdünnten Proben (siehe [11]) ist eine Linearität von Fluoreszenzmeßsignal und der eingestrahelten Laserintensität gegeben. Allerdings läßt sich diese Voraussetzung bei festen Untersuchungsproben relativ schwer erreichen, wodurch eine quantitative Analyse sehr erschwert wird. Diesen Schwierigkeiten der quantitativen Erfassung des Analyten gesellt sich noch die Fluoreszenzlöschung hinzu, bei der dem angeregten Zustand kompetitive Deaktivierungsprozesse (Photochemie, Kollision, Energie- und Resonanztransfer) zur Verfügung stehen.

2.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz eines Moleküles ist mehrdimensional, d. h. die Emission beinhaltet neben der wellenlängenaufgelösten Intensität eine Fülle von weiteren, auswertbaren Informationen (u. a. Stokes Verschiebung, Quantenausbeute, Anregungswellenlänge, Polarisation, Anisotropie, Lebensdauer). Diese lassen eine Aussage über die chemischen Eigenschaften des Fluorophores und seiner Umgebung zu. Beispielsweise können mit dynamischen Methoden wie Lebensdauer- oder Polarisationsmessungen Aussagen über Wechselwirkungen zwischen Oberflächen und Fluoreszenzlösung gewonnen werden. Die Auswertung von eindimensionalen statischen Fluoreszenzspektren erlaubt aufgrund der starken Überlappung der Signale nur im Ausnahmefall eine Mehrkomponentenanalyse. Bei Einsatz dieser Technik läßt sich die Selektivität nur durch Veränderung des Analyten bzw. seiner Umgebung – z.B. durch Derivatisierung – steigern [8].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zusätzlich zu den statischen Fluoreszenzmessungen noch die Lebensdauer als Parameter erfaßt. Wie oben ausführlich erläutert und in der entsprechenden Abb. 2.1 zu sehen, besitzen die einzelnen Übergänge unterschiedliche Lebensdauern. Dieser Umstand kann in der zeitaufgelösten LIF (WTM²) gewinnbringend genutzt werden. Dabei gestattet die WTM eine Unterscheidung von verschiedenen Substanzen anhand ihrer jeweiligen Fluoreszenzlebensdauer (einige 10^{-9} s).

Für die zeitliche Änderung der Besetzung eines angeregten Zustandes gilt $d\dot{N} = -kN$, so daß die Zerfallskinetik durch die exponentielle Abnahme $N(t) = N(0) \cdot e^{-kt}$ beschrieben wird. Für die Lebensdauer τ gilt: $\tau = \frac{1}{k}$.

2.3 Ramanspektroskopie

Die Ramanspektroskopie ist eine inelastische Streulichttechnik, bei der Molekülschwingungen detektiert werden, und zählt somit zur Schwingungsspektroskopie. Im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie zeichnen sich die Raman-spektren durch spektral schmalbandige Linien aus, die eine stoffspezifische Zuordnung sehr erleichtern.

²Wavelength Time Matrix

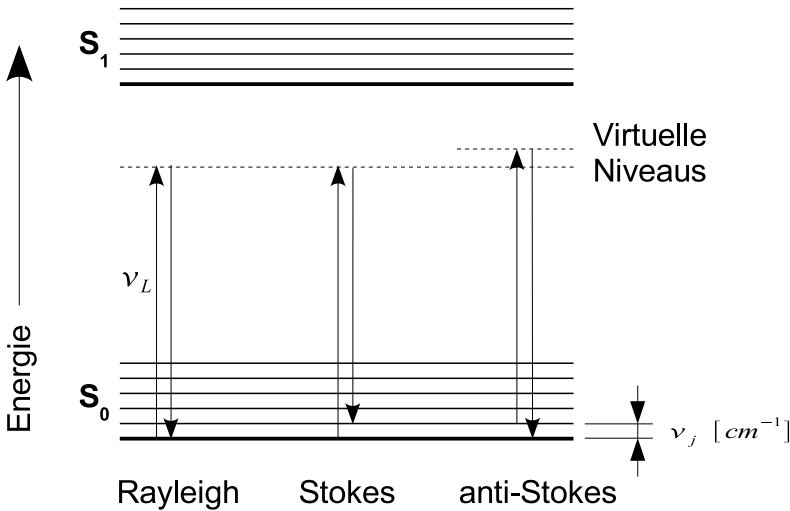


Abbildung 2.2: Elastische und inelastische Streuprozesse

Die am Ramanprozeß beteiligten Zustände liegen energetisch enger beieinander als bei elektronischen Übergängen (ca. eine Größenordnung). Aufgrund ihres wechselwirkungsschwachen Charakters hat die Ramanspektroskopie lange Zeit kaum Verbreitung gefunden. Vielmehr gelangte ihre „Schwestertechnik“, die IR-Spektroskopie, insbesondere durch die Verwendung lichtstarker, interferometrischer Techniken (FT-IR-Spektrometrie) zu einer weiten Verbreitung in der molekulspezifischen Analytik. Während die IR-Spektroskopie eine Form der Absorptionsspektroskopie darstellt, bei der die Schwingungsübergänge im Molekül direkt angeregt werden, liegt der Ramanspektroskopie ein inelastischer Streuprozess zugrunde, an dessen Ende sich das Molekül in einem anderen Schwingungszustand befindet als zuvor (siehe Abb. 2.2). Dabei kann dem eingestrahlenen Photon Energie verloren gehen (Stokes Fall), wenn das Molekül sich zuvor in einem niedrigeren Niveau befand, oder es hat Energie hinzugewonnen (anti-Stokes Fall).

Bereits eine klassische Betrachtung der Ramanstreuung erklärt die wesentlichen Merkmale. Unter dem Einfluß des oszillierenden elektrischen Feldes der Laserstrahlung $E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ wird in einem Molekül ein Dipolmoment P induziert. Dieser induzierte Dipol strahlt seinerseits eine elektromagnetische Welle ab. Induziertes Dipolmoment und äußeres elektrisches Feld sind über die Polarisierbarkeit α (dem Deformationsvermögen der Elektronenhülle) miteinander verknüpft. Die Fähigkeit der Atomkerne, Schwingungen um ihre Gleichgewichts-

lage durchzuführen, verändert die Polarisierbarkeit des Moleküles. Ein Tayloransatz für die Polarisierbarkeit führt zur klassischen Beschreibung des Ramaneffektes [12]:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} E_0 q_j^0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_j} \right) (\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_j)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_j)t) \quad (2.1)$$

Diese Gleichung kennzeichnet einen oszillierenden Dipol, der elektromagnetische Wellen abstrahlt. Betrachtet man die unterschiedlichen Terme, so erkennt man im ersten Teil den elastischen Streuprozess der Rayleigh-Streuung, der das eingestrahlte Licht unverändert wieder abgibt (in irgendeine beliebige Richtung), während die frequenzverschobenen Anteile die Ramanstreuung darstellen: $\nu_{anti-Stokes} = \nu_0 + \nu_j$ und $\nu_{Stokes} = \nu_0 - \nu_j$. Da somit die Lage der Linien im Spektrum unabhängig von der eingestrahnten Wellenlänge ist, werden die Linien in Einheiten relativ zu der Anregungsfrequenz des Lasers (ν_0) angegeben (relative Ramanverschiebung $\bar{\nu}_j$ [cm^{-1}]).

Aus obiger Gleichung kann bereits auf die außerordentliche Stoffspezifität der Ramanstreuung geschlossen werden, da die Polarisierbarkeit vom Aufbau des Moleküls abhängt und somit auch $\frac{\partial \alpha}{\partial q_j}$ molekülabhängig ist. Ferner zeigt Gl. 2.1, daß die Intensitäten der elastischen sowie der inelastischen Streuung linear mit der Laserintensität zusammenhängen.

Aus der klassischen Betrachtung läßt sich desweiteren die Bedingung für eine ramanaktive Schwingung ablesen. Damit die frequenzverschobenen Anteile im Spektrum auftauchen, muß $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_j} \right) \neq 0$ gelten. D.h. eine Schwingung ist also ramanaktiv, wenn sich mit der Schwingung auch die Polarisierbarkeit des Moleküls ändert. Hieraus erklärt sich auch das komplementäre Verhalten zur IR-Absorptionsspektroskopie, deren Auswahlregel eine Änderung des Dipolmomentes verlangt. Ein letzter Aspekt läßt sich aus der Taylorreihenentwicklung ableiten, bei der je nach Betrachtungsweise Terme ab einer bestimmten Ordnung vernachlässigt werden können. Da demnach die Rayleigh-Streuung (0. Ordnung) stärker ausgeprägt sein muß, als die Ramanstreuung (1. Ordnung), läßt sich zumindest qualitativ der wechselwirkungsschwache Charakter der Ramanstreuung erkennen³. Eine genauere Beschreibung der Intensität einer Ramanlinie berücksichtigt die Laserintensität sowie die ν^4 -Gesetzmäßigkeit des Streuprozesses:

$$I_{Raman}(\nu_j) \propto N \cdot I_0 \cdot (\nu_0 - \nu_j)^4 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_j} \right)^2 \quad (2.2)$$

³Zwischen den Intensitäten der Rayleighstreuung bzw. der Ramanstreuung liegen ca. 6 Größenordnungen.

Für eine bestimmte Teilchensorte ist $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_j}\right)$ konstant, so daß bei konstanter Laserleistung aus dem Ramansignal direkt auf die Stoffmenge geschlossen werden kann.

Die Energie eines Schwingungsüberganges läßt sich aus den beteiligten Partnern bestimmen und ist abhängig von deren Masse sowie den Bindungskräften zwischen ihnen. Insbesondere bei größeren Molekülen betrachtet man nicht jede einzelne der zahlreichen möglichen $3N-6$ Schwingungszustände, sondern unterteilt das Molekül vielmehr in ähnliche funktionelle Gruppen und gleichartige Bindungen. Hier helfen gruppentheoretische Überlegungen und Symmetriebetrachtungen eine Vereinfachung zu erzielen. Existieren zahlreiche gleichartige funktionelle Gruppen in einem Molekül, so wird die entsprechende Ramanlinie eine wesentlich größere Intensität aufweisen als die Intensität verursacht von nur einer Gruppe. Gleiches gilt auch für Bindungen. Die exakte Lage einer Ramanbande im Spektrum ist molekülspezifisch und hängt mit dem Einbau des schwingungsfähigen Gebildes im Molekül zusammen, wo unterschiedliche Partner zu unterschiedlichen Kräften der betrachteten Vibration führen können. Mit folgenden zwei Regeln lassen sich Ramanspektren interpretieren (siehe auch Abb. 2.3):

- je stärker die betreffende Bindung desto höher die Schwingungsfrequenz: $\nu(\text{C}\equiv\text{C}) > \nu(\text{C}=\text{C}) > \nu(\text{C}-\text{C})$
- je größer die schwingenden Massen desto niedriger die Frequenz: $\nu(\text{C}-\text{H}) > \nu(\text{C}-\text{O}) > \nu(\text{C}-\text{Cl})$

Da die Schwingungen immer relativ zur Anregungsfrequenz liegen, ist die Aufnahme eines Ramanspektrums zunächst prinzipiell unabhängig von der Anregungswellenlänge des Lasers. Dennoch sollte die Emissionswellenlänge des Lasers mit Bedacht gewählt werden. In erster Linie handelt es sich dabei um die Vermeidung von Fluoreszenzanregung in der Probe. Die Laserlinie sollte demnach möglichst langwellig sein. Allerdings bedeutet dies gleichzeitig einen Verlust an Streuphotonen ($\sim \nu^4$), so daß hier ein Kompromiß einzugehen ist. Bei der Arbeit mit einer CCD-Kamera ist ferner deren QE zu beachten, die im NIR rasch nachläßt.

Die UVRR dagegen nutzt gezielt elektronische Niveaus. Diese bieten aufgrund des reellen Zustandes (im Gegensatz zum virtuellen Niveau des „normalen“ Ramaneffektes) eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit für den Streuprozess (zusätzlich zur ν^4 -Abhängigkeit). Allerdings dringt UV-Licht kaum in die Probe ein (nur einige μm) – im Gegensatz zum NIR, das eine Eindringtiefe von einigen mm aufweist). Desweiteren sind Ausbleicheffekte durch die intensive UV-Bestrahlung zu beobachten.

Eine weitere Möglichkeit, die Schwierigkeiten durch eine Fluoreszenzüberlagerung zu umgehen, wäre die Analyse der kurzwelligeren anti-Stokes Ramanstreuung. Allerdings befinden sich bei Raumtemperatur (bei der auch alle Messungen dieser Arbeit durchgeführt worden sind) nach der Boltzmann-Verteilung der überwiegende Teil der Moleküle im Grundzustand. Die thermische Energie reicht kaum aus, höhere Vibrationsniveaus zu besetzen, so daß die Linienintensität der anti-Stokes Streuung mit höheren Schwingungsenergien ν_j rasch abnimmt. Mit Hilfe eines kohärenten, nichtlinearen Prozesses dritter Ordnung kann das Molekül gezielt in höhere Schwingungszustände überführt werden. Hierzu ist allerdings der Einsatz mindestens zweier Laser (davon einer durchzustimmen) erforderlich [13].

Die Ramanspektroskopie zeigt deutlich, wie durch die Weiterentwicklung eine zunächst kaum beachtete Technik zu neuer Blüte gelangen kann (siehe auch [12]). Da, wie bereits erwähnt, nur ein geringer Anteil der eingestrahnten Photonen von der Probe inelastisch gestreut werden, ergeben sich zwei Anforderungen: Viel Licht und empfindliche Detektoren. Beides ist durch den Einsatz moderner Laser und äußerst sensitiver CCDs erfüllt. Zusammengefaßt bietet die Ramanspektroskopie bei der chemischen Analyse eine Reihe an Vorteilen – auch im Vergleich zur IR-Spektroskopie:

- keine Probenaufbereitung
- Messungen in der wäßrigen Phase
- äußerst molekülspezifisch
- Linearität des Meßsignales
- (unabhängig von Anregungswellenlänge)⁴

Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die Ramanspektroskopie in der vorliegenden Arbeit gezielt zur Untersuchung biologischen Materials eingesetzt.

⁴Schwingungsenergien sind relativ zur eingestrahnten Wellenlänge. Die Intensität der Ramanbanden kann aber sehr wohl von der Wellenlänge abhängen.

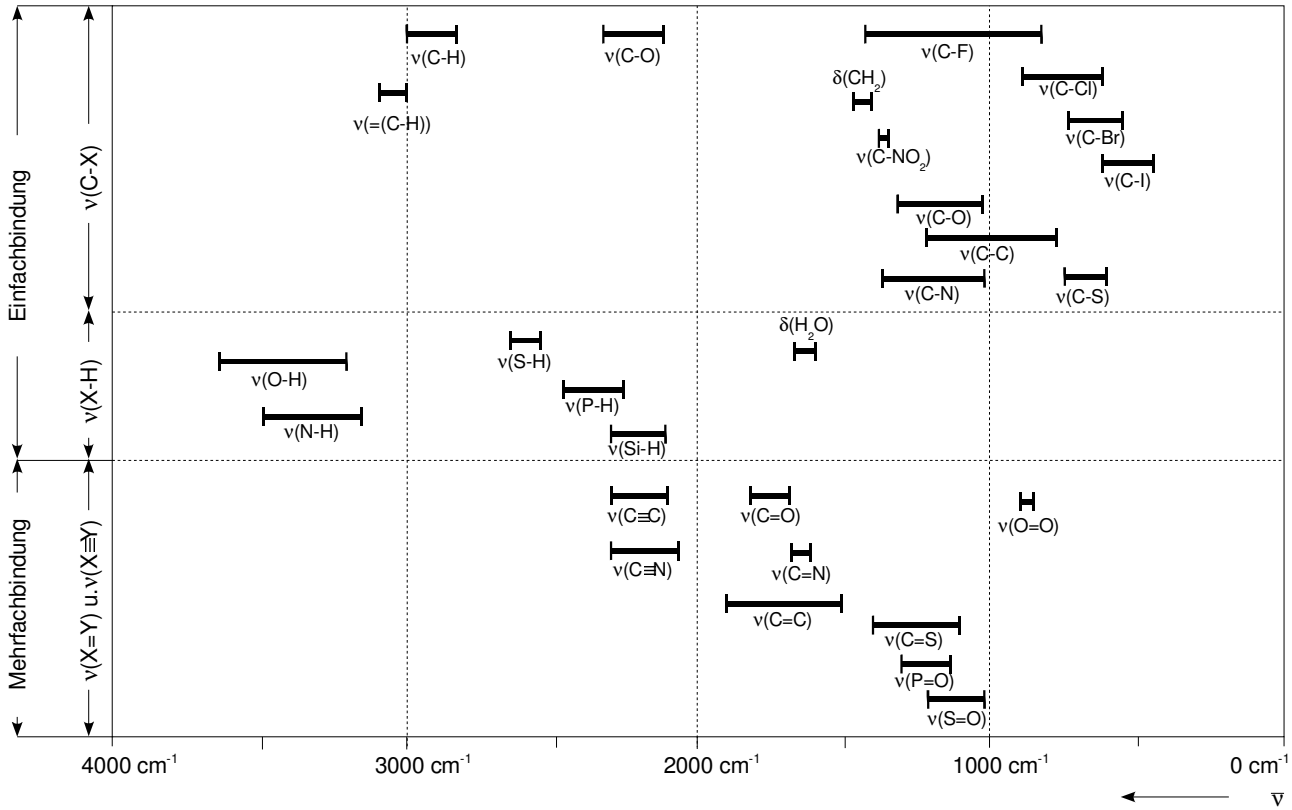


Abbildung 2.3: Lage wichtiger Ramanbanden

2.4 Konfokale Mikroskopie

Die Verwendung des konfokalen Prinzips in der Mikroskopie erlaubt es, die beugungslimitierte Auflösung eines konventionellen, sauber konstruierten Lichtmikroskopes um bis zu 30% zu verbessern. Dies gilt sowohl lateral als auch axial. Der Hauptvorteil eines konfokalen Mikroskopes ist allerdings in erster Linie in der Fähigkeit zu sehen, nur Licht aus der Fokusebene zu detektieren. Wie aus Abb. 2.4 hervorgeht, wird der Strahlengang im Mikroskop wesentlich durch zwei Lochblenden beeinflusst. Diese – idealerweise punktförmigen – Lochblenden sorgen dafür, daß nur das Licht aus einer Ebene zum Detektor gelangt. Die mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes aufgezeichneten Bilder besitzen daher neben der höheren Auflösung einen wesentlich höheren Kontrast, da Streulicht aus anderen Probenbereichen effektiv unterdrückt wird. Somit lassen sich Proben Schicht für Schicht im Mikroskop analysieren und später mit Hilfe eines Rechners zu einem dreidimensionalen, scharf begrenzten Objekt zusammensetzen, in das sich „hineinsehen“ läßt.

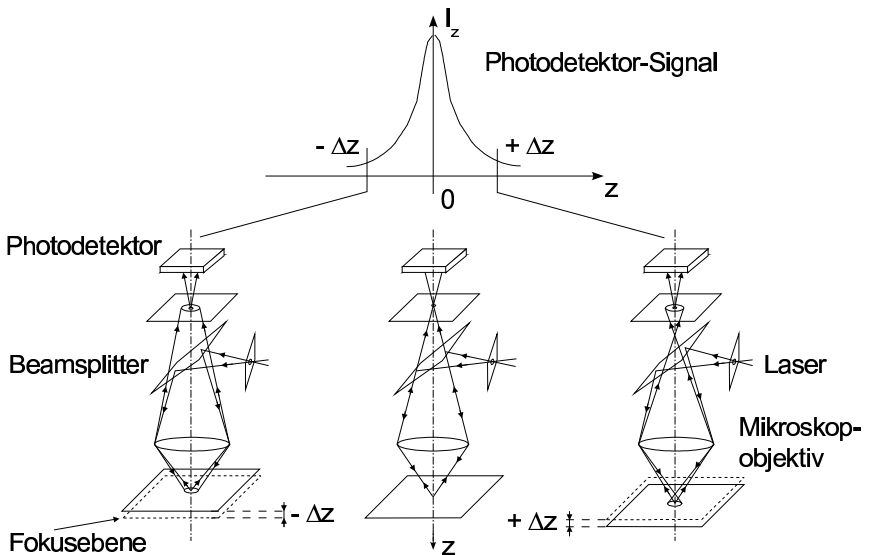


Abbildung 2.4: Konfokales Meßprinzip (aus [14])

Im Unterschied zur Lichtmikroskopie, die das Licht der Probe gleichzeitig (parallel) in den Bildraum abbildet und das Objekt somit als Ganzes erfäßt, bedeutet die konfokale Mikroskopie eine serielle Punktabbildung. Konsequenz dessen ist,

daß für die Bilderzeugung ein abstrahierendes Verfahren eingesetzt werden muß. Die Probe bzw. die Beleuchtungseinheit – meist ein Laser, da dieser einer idealen Punktlichtquelle sehr nahe kommt – werden zu diesem Zweck zeilenweise bewegt. Verschiedene Verfahren (z. B. „Line-Scan“) versuchen den Nachteilen (lange Meßdauern) dieses eindimensionalen Prozesses entgegenzuwirken.

2.4.1 Auflösungsvermögen Lichtmikroskop

Die unterste Grenze des Auflösungsvermögens in der konventionellen Lichtmikroskopie ist limitiert durch Beugungserscheinungen. Nach dem Rayleigh-Kriterium lassen sich zwei benachbarte, inkohärente Lichtquellen gleicher Intensität noch getrennt voneinander wahrnehmen, wenn der Abstand zwischen ihnen gleich dem Radius des Airy-Scheibchens der abgebildeten Punktlichtquelle entspricht. D. h. die laterale Auflösung $res_{lateral}$ beträgt idealerweise⁵

$$res_{lateral} = r_{Airy} = 0,61 \cdot \frac{\lambda_{em}}{NA_{obj}} \quad (2.3)$$

mit λ_{em} für die Wellenlänge des vom Objekt abgestrahlten Lichtes und $NA_{obj} = n \cdot \sin\alpha$ der numerischen Apertur des Objektivs (n = Brechungsindex des Immersionsmediums, α = halber Öffnungswinkel).

Die minimale axiale Auflösung ergibt sich aus ähnlichen Überlegungen, wonach ein punktförmiges Objekt mit Hilfe der sogenannten „Point Spread Function“ in ein 3D Muster abgebildet wird. Dieses Muster stellt bei Verwendung aberationsfreier Linsensysteme ein längliches Rotationsellipsoid dar (xy-Querschnitt in der Fokusebene ergibt obiges Airy-Scheibchen) [15]. Der Abstand des Zentrums zum ersten axialen Minimum ergibt die axiale Auflösung (η = Brechungsindex des Objektes) [16]:

$$res_{axial} = \frac{2\eta\lambda_{em}}{(NA_{obj})^2} \quad (2.4)$$

2.4.2 Auflösungsvermögen CRM

Das Auflösungsvermögen konfokaler Mikroskope wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst⁶:

⁵Eingesetzte Optiken sind fehlerfrei (keine sphärische oder chromatische Aberration), System ist aufeinander abgestimmt, gleichmäßige Beleuchtung, etc.

⁶Aus: „Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie – Grundlagen“ von Zeiss

Pupillenausleuchtung: Eine hohe Überdeckung sowie eine gleichmäßige Pupillenausleuchtung sorgt für eine Airy-förmige-Abbildung, während eine geringe Ausleuchtung der Pupille das Gaußprofil der Laserstrahlung widergibt. Da die Airy-Verteilung (gleichmäßige Pupillenausleuchtung) gleichbedeutend mit der höchsten erzielbaren Auflösung ist, stellt jede Abweichung davon eine Verschlechterung der Auflösung dar. Um den Auflösungsverlust auf 5% zu beschränken, werden lediglich 30% der Beleuchtungsenergie genutzt. So ergibt sich zwangsläufig der Lasereinsatz als intensive Lichtquelle.

Wechselwirkung Licht-Objekt: Die Abbildungseigenschaften ändern sich je nach Art des Objektes (punkt- oder flächenförmig) sowie der Art der Lichtwechselwirkung (Fluoreszenz oder Reflexion)

Lochblendendurchmesser: Für sehr kleine Durchmesser ($< 1/4 \text{ AE}^7$) entspricht die Lochblende in guter Näherung einer punktförmigen Öffnung. Unter diesen Voraussetzungen spricht man von wellenoptischer Konfokalität und die Auflösungen (axial wie lateral) verbessern sich um den Faktor $\sqrt{2}$. Beträgt der Durchmesser der Lochblende mehr als 1 AE so liegen die Bedingungen für die geometrisch-optische Konfokalität vor, bei der das Auflösungsvermögen in guter Näherung der des oben beschriebenen Lichtmikroskopes entspricht (siehe Gleichungen 2.3 + 2.4). Unterschiedlich ist lediglich die in den Gleichungen betrachtete Wellenlänge (Anregungswellenlänge beim konfokalen Mikroskop bzw. Emissionswellenlänge beim Lichtmikroskop), woraus sich Verbesserungen durch Verwendung kurzwelliger Anregungslaser ergeben würden.

In dieser Arbeit wurden die Lochblenden auf der Detektionsseite mit Hilfe von drei Glasfasern unterschiedlichen Durchmessers realisiert ($25 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$). Ein Diodenlaser (Emissionswellenlänge $784,6 \text{ nm}$) wurde zur Vermeidung der Fluoreszenzanregung sowie einer möglichst großen Eindringtiefe in den Biofilm verwendet. Daraus ergibt sich bei den verwendeten Glasfasern der Fall geometrisch-optischer Konfokalität, der nicht zu einer Verbesserung des Auflösungsvermögens führt. Somit dient das konfokale Prinzip in erster Linie der Unterdrückung von Streulicht und ermöglicht so die Analyse der Probe mit hoher Ortsauflösung.

⁷AE = Airy-Einheit: Durchmesser des Airy-Scheibchens

2.5 Holz

Holz ist aufgrund seiner speziellen Eigenschaften ein weit verbreiteter Rohstoff und besitzt als Baustoff eine jahrtausendalte Tradition. Zu seinem Schutz werden und wurden verschiedenste Holzschutzmittel (HSM) eingesetzt, die je nach Verwendungszweck und den Umwelteinflüssen, denen das Holz ausgesetzt ist, variieren. Eine Übersicht zu diesem Thema gibt [17]. Zu unterscheiden sind biologische (Pilzbefall, Insektenfraß) und abiotische (Temperatur, Feuchtigkeit, Sonneneinstrahlung, etc.) Schadwirkungen. Der Einsatz von HSM ist im Rahmen des Hausbaus sogar vorgeschrieben: Nach DIN 68.800 Teil 4 ist die Bekämpfung eines Pilzbefalls oder eines Lebendbefalls durch holzerstörende Insekten vorgeschrieben, wenn tragende und/oder aussteifende Bauteile davon betroffen sind. Dies gilt insbesondere für den Dachstuhlbereich, so daß gerade hier HSM mit insektizider Wirkung vorzufinden sind (s. u.).

Holz besitzt eine äußerst heterogene Struktur und setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Stoffe zusammen (Bestandteile variieren je nach Holzsorte):

Cellulose (ca. 45 %): Die Cellulose ist ein fadenförmiges Makromolekül, aufgebaut aus Kohlehydrateinheiten ($C_6H_{12}O_5$), welche für die faserigen Eigenschaften des Holzes verantwortlich ist. Der hohe Polymerisationsgrad dieses Moleküls bedingt die spezifischen Eigenheiten der (noch) unverholzten Zellwand wie Zugfestigkeit und Elastizität.

Lignin (22-30 %): Lignin verleiht dem pflanzlichen Gewebe den typisch holzartigen Charakter. Lignin tritt nur im Zusammenspiel mit der Cellulose auf. Eine Isolierung des Lignins aus der Zellwand führt zu dessen Veränderung. Innerhalb der Zelle dient es in erster Linie als Füllstoff zwischen den faserartigen, langkettigen Cellulosemolekülen. Ein hoher Ligninanteil bedingt daher eine hohe Druckfestigkeit des Holzes.

Holzpolyosen (18-27 %): Die Holzpolyosen (früher Hemicellulosen genannt) bestehen aus Polysacchariden (ebenfalls Kohlenhydrate) und befinden sich wie die Cellulose in der Zellmembran. Dort sorgen sie für den Zusammenhalt der Zellmembran und stützen das Zellwandgerüst. Desweiteren dienen sie als Reservestoffe. Ihr Polymerisationsgrad ist geringer als der der Cellulose, so daß sie keine Fasereigenschaft besitzen.

Nebenbestandteile: Diese sogenannten akzessorischen Bestandteile sind maßgeblich beteiligt an den unverwechselbaren Eigenschaften der verschiedenen Baumarten. Sie setzen sich aus einer Vielzahl an Stoffen zusammen: Ätherische Öle und Harze, Stärke und Fette, Gerbstoffe sowie weitere Bestandteile (Phenole, Mineralien).

2.5.1 Spektroskopische Untersuchungen an Holz

Mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe und einem sogenannten „Wood Filter“⁸ wurde Holz bereits sehr frühzeitig fluoreszenzspektroskopisch untersucht [18]. Diese ersten Experimente sollten zeigen, daß mit Hilfe des emittierten Fluoreszenzlichtes (bei Anregung im UV-A) eine Identifikation der Holzsorten möglich ist. In Ermangelung entsprechender Nachweissysteme wurde seinerzeit das Fluoreszenzspektrum der Proben (Holz, Holzmehl und Extrakt) über den Farbeindruck bestimmt. Mit Hilfe dieser etwas ungenauen Methode ließ sich zumindest zeigen, daß die Extrakte unterschiedlich fluoreszieren. Weitere Untersuchungen zur Holzbestimmung und -trennung wurden mit Hilfe fluorometrischer Methoden angestellt. Eine sehr ausführliche Studie [19], die das Holz zahlreicher südafrikanische Bäume (108 Gattungen und 179 Arten) fluoreszenzspektroskopisch vermessen hat, kommt zu dem Schluß, daß die Fluoreszenz ein „zulässiges und nützlich“ Verfahren zur Identifikation des Kernholzes darstellt.

Allerdings zeigten weitere Untersuchungen mit Hilfe der LIF (Excimer-Laser: $\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$) an unterschiedlichen Holzarten sowie an unterschiedlichen Meßstellen ein- und derselben Probe teilweise starke Unterschiede im Fluoreszenzspektrum [20]. Der ebenfalls in diesen Untersuchungsreihen beobachtete Effekt des Ausbleichens der Fluoreszenz im UV-A wurde zurückgeführt auf die energiereiche Anregung im UV-B und der dadurch verursachten Photodissoziation der Moleküle. Der verwendete Meßaufbau aus Monochromator und PMT⁹ begünstigte diesen Effekt zusätzlich durch die notwendigen zahlreichen Laserpulse. Eine recht neue Arbeit [21] zum Thema Fluoreszenzspektroskopie an Holz erklärte die teilweise nicht reproduzierbaren Ergebnisse von [20] aufgrund der Verwendung von frisch geschnittenem Holz, welches unter der Wärmeeinwirkung des Lasers Feuchtigkeit verlor und sich daher auch der Beitrag der Nebenbestandteile (s. o.) zum Emissionsspektrum veränderte. Desweiteren fand man (analog zu [19]) in dieser Arbeit, in der neben trockenen Holzproben auch Holzmehl und Holzextrakte (in Methanol) analysiert wurden, daß die Fluoreszenzspektren von trockenem Holz unabhängig von der Anregungswellenlänge sind und somit die Fluoreszenzspektroskopie als Werkzeug zur Holzidentifikation und -trennung genutzt werden kann (s. o.).

Neben den Untersuchungen direkt am Holz beschäftigten sich zahlreiche Arbeiten mit dem Fluoreszenzverhalten holzspezifischer Stoffe (in erster Linie Cellulose und Lignin). Für die papierverarbeitende Industrie ist es von essentieller Bedeutung, die Ursachen für die Papierfärbung (z. B. Vergilbungen) zu kennen. Eine Übersicht der teilweise unterschiedlichen Ergebnisse zu diesem Thema gibt [22].

⁸Benannt nach Robert Williams Wood (1868-1955), Transmissionsfenster des Filters: 300-400 nm

⁹Photomultiplier Tube

2.5.2 Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)

Als DDT wird allgemein ein Stoffgemisch aus folgenden Isomeren

- 4,4'-DDT zu 70%
- 2,4'-DDT zu 15%
- 4,4'-DDD zu 5%

sowie weiteren Substanzen in geringeren Konzentrationen bezeichnet. Der Stoff DDT konnte bereits 1874 synthetisiert werden, wohingegen seine insektizide Wirkung erst 1939 entdeckt wurde. Danach wurde DDT als Insektizid in großem Umfang vor allem zur Malariabekämpfung eingesetzt¹⁰. DDT galt als das Pestizid schlechthin und wurde daher äußerst umfangreich in die Umwelt eingebracht. Seine chemische Beständigkeit führte zu einer weitreichenden, ubiquitären Verteilung. Als Folge ist eine Anreicherung in der Nahrungskette zu beobachten, in der naturgemäß der Mensch am Ende steht. Der orale Weg spielt auch die größte Rolle bei der DDT-Anreicherung im menschlichen Körper. Als weitere Aufnahmepfade kommen noch Haut (dermal) und Lunge (inhalativ) in Betracht, wobei allerdings letzterer Pfad kaum zur DDT-Belastung im Körper beiträgt [23].

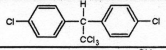
Substanz LM Methanol	Strukturformel	Summenformel	Fluoreszenzbanden (nm)/ - Intensität			
			Anregung 266nm		Anregung 355nm	
p,p'-DDT		C ₁₄ H ₉ Cl ₅	295/365	++	415	++

Tabelle 2.1: Fluoreszenzeigenschaften von DDT (Ausschnitt aus [24])

Da DDT auch im menschlichen Körper kaum abgebaut wird, kommt es hier zu einer Anreicherung – vornehmlich im Fettgewebe, aber auch die Leber und das Nervensystem sind betroffen. Die Toxizität von DDT auf den Organismus besteht weitgehend in der Wirkung als Nervengift. In neueren Untersuchungen wird darüber hinaus über einen Einfluß auf den Hormonhaushalt (östrogene Wirkung) diskutiert. Im Tierversuch konnte auch eine kanzerogene Wirkung von DDT beobachtet werden, während dies beim Menschen noch Gegenstand kontroverser Diskussionen ist. Aufgrund dieses Gefährdungspotentials wurde DDT 1972 in der BRD verboten.

¹⁰Bis zu dem Verbot in der BRD 1972 wurden weltweit bereits mehr als 2 Millionen Tonnen in die Umwelt eingebracht.

Die insektizide Wirkung von DDT wurde auch in HSM zum Schutz vor Holzwürmern u. ä. genutzt. Daher lassen sich besonders im Dachstuhlbereich eines Hauses hohe Mengen an DDT und seinen Metaboliten (DDE und DDD) im Staub wiederfinden. Dies gilt insbesondere in den Neuen Bundesländern, wo DDT bis 1989 in großem Umfang als Holzschutzmittel eingesetzt worden ist (siehe nächster Abschnitt). Aber auch in alten US-Liegenschaften in Oberbayern beispielsweise ließen sich in Baumaterialien und Hausstaub DDT-Nachweise wiederfinden [23].

2.5.3 “Hylotox 59“

DDT-haltige HSM wurden in der DDR unter dem Markennamen „Hylotox“ verkauft. Für die Innen- und Außenbereiche des Hauses wurden zwei unterschiedliche Varianten verwendet. Das für den Außenbereich vorgesehene „Hylotox IP“ (wirksame Stoffe: DDT und PCP) und das für den Innenbereich verwendete „Hylotox 59“ (DDT und Lindan). „Hylotox 59“ wurde in der DDR bis 1989 in Wohnungen und insbesondere in Dachstühlen äußerst umfangreich verarbeitet¹¹. So geht man davon aus, daß beispielsweise allein in dem Bundesland Mecklenburg-Vorpommern fast jedes zweite Haus von einer Verunreinigung mit diesem HSM betroffen ist. Als wirksame Bestandteile enthält es neben DDT (3,5%) noch Lindan zu 0,5%. In dem Staub betroffener Häuser lassen sich teilweise sehr hohe DDT-Konzentrationen von bis zu 1000 mg·kg⁻¹ wiederfinden. Ferner finden sich kristalline DDT-Ausscheidungen auf den Holzbalken. Trotz dieser sehr hohen Konzentrationen liegt die DDT-Belastung in den betroffenen Wohnungen unter den gesetzlichen Grenzwerten für Atemluft bzw. Hausstaub.

Gemäß den Verarbeitungshinweisen des Herstellers sollte knapp ein halber Liter des HSMs auf einem Quadratmeter Holzoberfläche zum Schutz aufgebracht werden. Dies ergibt je kg Holz eine DDT-Menge von ca. 15 g (genauer siehe Kapitel 3.3), wodurch sich die oben erwähnten hohen Konzentrationswerte ergeben.

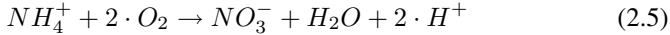
2.6 Anaerobe Ammoniumoxidation (ANAMMOX)

Zur Beseitigung stickstoffhaltiger Komponenten im Abwasser, wie Ammonium, Nitrat oder Nitrit (NH_4^+ , NO_3^- bzw. NO_2^-), werden in kommunalen wie auch industriellen Kläranlagen biologisch-vermittelte Abbauprozesse eingesetzt. Der dort etablierte Prozeß setzt sich zusammen aus zwei Teilprozessen des Stickstoffzyklus – namentlich der Nitrifikation und der Denitrifikation. Während bei der

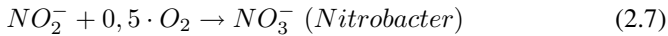
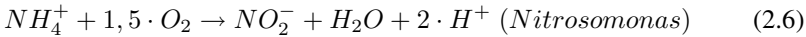
¹¹Jahresproduktion 1988: 1000 Tonnen

Nitrifikation NH_4^+ mit Hilfe von O_2 zu NO_3^- veratmet wird, benutzen die heterotrophen Organismen des Denitrifikationsprozesses (Denitrifikanten) das entstandene NO_3^- für die sogenannte Nitratatmung, bei der organisches Substrat, wie bspw. Methanol, zu Wasser und Kohlendioxid veratmet wird [25].

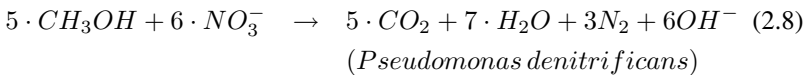
Bei der Nitrifikation



sind folgende Einzelprozesse beteiligt:



Die Umsatzreaktion der Denitrifikation lautet:



Die heterotrophen Denitrifikanten sind in der Lage, ihren Stoffwechsel anzupassen. Den Umsatz organischen Substrates können sie statt mit NO_3^- ebenso mit im Wasser gelöstem Sauerstoff vollziehen. Da dieser letzte Stoffwechselweg mehr Energie zur Verfügung stellt, würde das im Abwasser vorhandene Nitrat nicht abgebaut werden. Zur effizienten Abwasserreinigung benötigen die beteiligten Mikroorganismen spezifische Umgebungsbedingungen (aerob bei der Nitrifikation, anoxisches Milieu bei der Denitrifikation), so daß von den Klärwerksbetreibern zweistufige Anlagen verwendet werden (müssen). Insbesondere hoch stickstoffhaltige Abwässer mit einem niedrigen C/N-Verhältnis, wie Deponiesickerwässer oder Schlammwässer, benötigen zusätzliche externe Sauerstoff- und Kohlenstoffquellen (z.B. Methanol). Neben den Materialkosten bedarf es auch sehr viel Energie, die externen Substanzen in die Anlage einzubringen. Der zweistufige Betrieb zur Stickstoffeliminierung bedeutet somit für den Betreiber der Kläranlage einen hohen Einsatz an verschiedensten Ressourcen und letztlich hoher Betriebskosten.

Unter diesen Aspekten rückt ein erst Ende der 1980er beobachteter Prozeß in den Blickpunkt. Die damaligen Hinweise auf eine biologische Umsetzung von Ammonium abseits des beschriebenen Weges der Nitrifikation/Denitrifikation konnten in den folgenden Jahren entschlüsselt werden [26, 27]. Es zeigte sich, daß ein

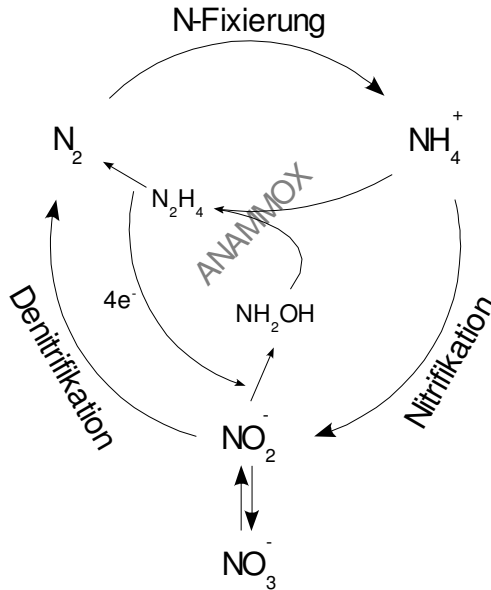
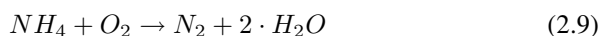


Abbildung 2.5: Stickstoffkreislauf und anaerober Ammoniumoxidation (ANAMMOX) mit Zwischenprodukten

bis dahin unbekanntes Bakterium in der Lage ist, Ammonium ohne Sauerstoff direkt zu molekularem Stickstoff abzubauen. Dieser Prozeß wurde bekannt als anaerobe Ammoniumoxidation (ANAMMOX).

Beispielsweise ist es in der Schweiz immer noch üblich, auf die Denitrifikationsstufe zu verzichten. Die daraus resultierenden hohen Nitratreinträge in den Rhein führen zu einer starken Düngung mit anschließender Eutrophierung des Flusses. Daher hat sich die Schweiz verpflichtet, den Eintrag bis 2005 um 2000 Tonnen zu verringern [28]. Eine Nachrüstung der Kläranlagen mit einer Denitrifikationsstufe würde allerdings sehr hohe Kosten verursachen (s. o.), so daß der ressourcenfreundliche ANAMMOX-Prozeß in diesem Zusammenhang eine interessante Alternative darstellt.

Bei der anaeroben Ammoniumoxidation, die einen Teil des Stickstoffzyklus darstellt (siehe Abb. 2.5), wird NH_4^+ mit NO_2^- unter anaeroben Bedingungen zu molekularem N_2 und H_2O oxidiert:



Mit Hilfe radioaktiv markierten Stickstoffs (^{15}N) konnte der Reaktionsweg mit seinen Zwischenprodukten Hydroxylamin (NH_2OH) und Hydrazin (N_2H_4) Ende der 1990er postuliert werden. Die Energie dieser exothermen Reaktion steht dem autotrophen Mikroorganismus für dessen Stoffwechsel zur Verfügung. Die Verdopplungszeit der ANAMMOX-Bakterien von ca. 2–3 Wochen zeigt, daß der Prozeß nur relativ wenig Energie ($358 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) liefert, die dann u. a. dem Stoffwechsel zur Verfügung steht [29]. Als Kohlenstoffquelle wird von den Bakterien hauptsächlich CO_2 verzehrt. Der Organismus wurde mit Hilfe von Gensonden (16S rDNA-Methode) als ein Vertreter der Gruppe der Planktomyceten identifiziert [30]. Da eine abschließende Einteilung derzeit noch aussteht, wurden die beiden bisher von zwei verschiedenen Forschungsgruppen gefundenen Bakterienarten provisorisch wie folgt benannt:

- Candidatus „*Brocadia anammoxidans*“
- Candidatus „*Kuenenia stuttgartiensis*“

Ein drittes Bakterium (Candidatus „*Scalindua sorokinii*“) wurde erst kürzlich im Schwarzen Meer entdeckt. Die zugrundeliegende Forschungsarbeit deutet darauf hin, daß die ANAMMOX-Reaktion bis zu 70% des Stickstoffkreislaufes in den Weltmeeren ausmacht [31]. Da es bis heute nicht gelungen ist, die am ANAMMOX beteiligten Bakterien zu kultivieren bzw. aufzureinigen [28, 29], können diese nicht großtechnisch in hoher Anzahl produziert werden. Vielmehr ist es notwendig, ihnen ideale Umgebungsbedingungen zur Vermehrung bereitzustellen, um sie anzureichern [32].

Ein weiterer bemerkenswerter Umstand dieser Mikroben findet sich in ihrem Inneren. Ein Großteil des Zellinneren wird von einer Zellorganelle, dem sogenannten Anammoxosom, gebildet. Dieses Anammoxosom wird umgeben von einer in der Natur einzigartigen bizarren Membran, deren Lipide aus mehreren Cyclobutanringen (sogenannten Ladderanen) aufgebaut sind [33]. Die Funktion dieser einzigartigen Membran ist in ihrer ungewöhnlichen Dichte zu sehen, die für Diffusionsprozesse nur sehr undurchlässig ist. Für den Organismus ist dies lebenswichtig, da innerhalb der Zellorganelle toxische Intermediaten (N_2H_4) auftreten und so zurückgehalten werden. In der Abbildung 2.6 ist eine schematische Darstellung des ANAMMOX-Bakteriums gegeben sowie der Stoffwechsel im Organismus und die Diffusionsvorgänge dargestellt (c). Die Teilabbildungen (a+b) zeigen den Aufbau der Membran des Anammoxosoms aus den Lipiden, die sich wiederum aus verschiedenen Ladderanstrukturen und unterschiedlichen hydrophilen Anteilen zusammensetzen. Die Abbildungen wurden aus den hervorragenden Arbeiten zu diesem Thema der Gruppen um Marc Strous (Universität Nijmegen, Niederlande) und Mike Jetten (TU Delft, Niederlande) entnommen.

Ladderane sind als Substanz nicht kommerziell erhältlich. Die künstliche Herstellung von Ladderanen ist daher ein hochaktuelles Forschungsfeld [34]. Aufgrund ihres steifen Grundgerüsts, das durch funktionelle Gruppen vielseitig erweitert werden kann, stellt sich ihr Einsatz als Baukasten in der Optoelektronik als äußerst vielversprechend dar.

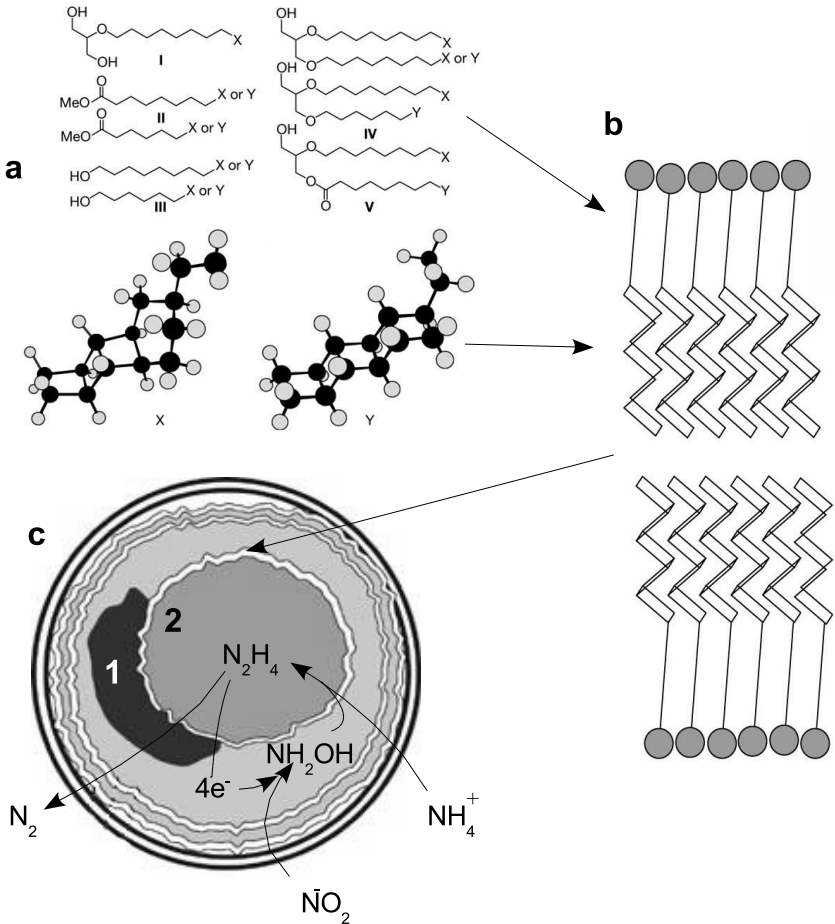
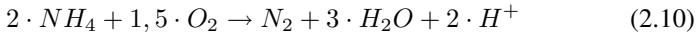


Abbildung 2.6: a – Lipide der Anamnoxsommembran aufgebaut aus Ladderanen (X+Y), b – Dichte der Membran des Anamnoxosoms, c – Stoffwechsel und schematische Darstellung des ANAMMOX-Bakteriums mit: (1) Nukleoid und (2) Anamnoxosom (aus: [33] + [35])

Das für die ANAMMOX notwendige NO_2^- wird von der partiellen Nitrifikation (Nitritation) bereitgestellt, bei der das Nitrit nicht weiter zu Nitrat oxidiert wird (siehe Gl. 2.6). Zusammen mit der Gleichung für den ANAMMOX-Prozeß (Gl. 2.9) ergibt sich für das sogenannte (und seit 1999 patentierte) ANAMMOX-Verfahren:



In Experimenten unter O_2 -limitierten Bedingungen (weniger als 0,5% Luftsättigung) wurde die Ausbildung einer Gemischtkultur von aeroben und anaeroben Ammoniumoxidierern im Biofilm beobachtet [36]. Die O_2 -abhängigen Bakterien sorgen für eine starke O_2 -Zehrung im Biofilm, die zu Sauerstoffgradienten im Biofilm führt. Dadurch kann für die anaerobe Spezies in demselben Biofilm ein geeignetes Milieu für deren Stoffwechsel entstehen. Diese Art der Ammoniumbeseitigung in einer gemeinsamen Stufe wird auch als einstufige Deammonifikation oder CANON-Prozeß bezeichnet (siehe Abb.2.7). Für Klärwerksbetreiber, deren Abwasser durch ein niedriges C/N-Verhältnis dominiert wird, ist das Verfahren von besonderem Interesse, da es folgende Vorteile mit sich bringt ([28] und [35]):

- keine Zugabe externer Kohlenstoffquellen
- 60% weniger Sauerstoff
- keine CO_2 -Emission (im Gegenteil: Prozeß verbraucht CO_2)
- Einsparpotential an Betriebskosten: im Vergleich zu Nitrifikation/Denitrifikation bis zu 90%
- geringere Menge an anfallendem Bioschlamm

Ein erster großtechnisch genutzter Betriebsreaktor entsprechender Größe, der auf dem ANAMMOX-Verfahren beruht, wurde 2002 in einem Klärwerk bei Rotterdam (Niederlande) in Betrieb genommen.

Für den Nachweis der am ANAMMOX-Prozeß beteiligten Bakterien gibt es seit einiger Zeit entsprechende Gensonden, die mit Hilfe der FISH und CLSM eine spezifische Untersuchung des Biofilmes ermöglichen ([30, 36, 37]). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bedeutet diese invasive Methode einen starken Eingriff in die „Wohngemeinschaft Biofilm“. Darüberhinaus ist die Anzahl der Messungen aufgrund des aufwendigen Meßprinzipes limitiert, so daß keine komplette Übersicht über den Biofilm erzielt werden kann, sondern lediglich Ausschnitte. Zudem lassen sich auch nur die tatsächlich markierten Organismen detektieren.

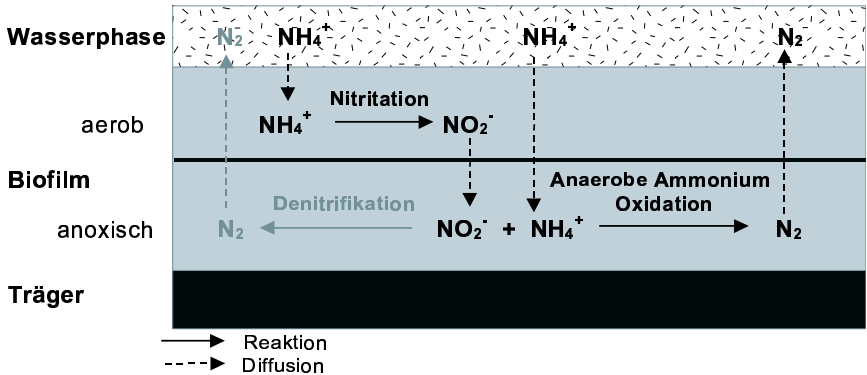


Abbildung 2.7: Einstufige Deammonifikation in einem Biofilm, zusammengesetzt aus zwei Teilprozessen: Nitritation und ANAMMOX

Die Analyse mit Hilfe der CRM bietet dagegen aufgrund des nichtinvasiven Meßprinzipes die Möglichkeit, den Biofilm in seiner natürlichen Umgebung zu untersuchen. Darüberhinaus ließen sich Vergesellschaftungen bestimmen, da große zusammenhängende Bereiche sich räumlich und stoffspezifisch aufzeichnen lassen, wobei es keine Einschränkung des Bakteriennachweises gibt (keine Markierung erforderlich).

2.7 Rauschen und Nachweisgrenze

In der Spektroskopie ist heutzutage der Einsatz von Spektrometern in Kombination mit CCD-Kameras zur spektralen Analyse des Meßlichtes weit verbreitet. Diese Systeme werden häufig auch unter dem Begriff „optical multichannel analyzer“ (OMA) zusammengefaßt. Das Spektrometer als dispersives Element dient zur räumlichen Trennung der Frequenzanteile des Lichtes, während die CCD-Kamera diese auf ihrer lichtempfindlichen Fläche registriert. Wie bereits in der Einleitung geschildert, hat die Entwicklung im Bereich der CCD-Technik in den letzten Jahren diese zu äußerst effizienten und leistungsfähigen Detektoren reifen lassen. Sie besitzen einen sehr hohen Dynamikbereich (besser 1000:1), so daß intensives und schwaches Meßlicht gleichermaßen detektiert werden kann. Das Rauschen bereits thermoelektrisch gekühlter CCDs (bis zu -70°C) wird nur noch von der statistischen Verteilung des Photoeffekts bestimmt (s. u.). CCDs sind empfindlich über einen großen Wellenlängenbereich vom UV (ca. 200 nm – nach Beschichtung) bis ins NIR (ca. 1100 nm). Spezielle CCD-Kameras sind auch für

den Röntgenbereich erhältlich.

Das vom Spektrometer dispergierte Licht wird auf die lichtempfindliche Fläche der CCD-Kamera abgebildet. Die CCD-Fläche stellt einen sogenannten Multikanaldetektor aus einzelnen Untereinheiten (PIXEL) dar, der das einfallende Licht ähnlich einem Fotofilm in einer zweidimensionalen Ebene aufzeichnet. Die Abmessungen eines Pixels bedingen das Auflösungsvermögen (zusammen mit Gitter, Brennweite und Spaltbreite des Spektrometers) sowie das Rauschverhalten (auf der kleineren Fläche werden weniger Photonen absorbiert).

Das Rauschen des von einer CCD-Kamera aufgezeichneten Meßsignales ist für quantitative Messungen von herausragender Bedeutung, da hierdurch die zu erwartende Nachweisgrenze für den jeweiligen Stoff determiniert wird. Die lichtempfindliche Fläche einer CCD-Kamera besteht aus Silizium. Eindringende Photonen können in der Verarmungszone des Siliziums Elektronen-Loch-Paare erzeugen (innerer Photoeffekt). Die Elektronen werden in den Pixeln bis zum Ausleseprozeß aufintegriert. Die Linearität zwischen Ladungsmenge und Lichtfluß erlaubt direkte Rückschlüsse auf die spektrale Strahlungsintensität.

Das Auslesen eines solchen Multikanaldetektors erfolgt durch Verschieben der in den Pixeln gesammelten Ladungsmenge in ein benachbartes Pixel durch Anlegen unterschiedlicher Potentiale. Im ersten Schritt geschieht diese Verschiebung vertikal in eine Auslesezeile, anschließend werden die Elektronen horizontal zum Ausleseregister transportiert. Dort wird die Ladungsmenge verstärkt und als analoges Stromsignal dem A/D-Wandler zugeführt, der zur weiteren Datenverarbeitung durch einen Meßrechner dieses in einen Zahlenwert umwandelt.

Die Quellen für das Gesamttrauschen eines CCD-Meßsystemes sind vielfältig [12] und setzen sich im einzelnen zusammen aus:

Verstärkerrauschen: Analoge Meßwerte unterliegen während der Digitalisierung einem Rundungsfehler.

Quantisierungsrauschen: Bei der Wandlung des analogen Stromwertes in ein digitales Signal treten Rundungsfehler auf.

Wandlerrauschen: Bei der Wandlung analoger Meßwerte kommt es je nach Auslesefrequenz zu einem Rauschen, das mit zunehmender Taktfrequenz größer wird.

Dunkelstromrauschen: Gemäß der Boltzmann-Verteilung können Elektronen im CCD-Chip die Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband des Siliziums überwinden und tragen so zum Meßsignal bei. Eine Kühlung der Kamera ist daher zwingend notwendig (Halbierung des Dunkelstromrauschens alle $6^\circ - 8^\circ$ C). Alle CCD-Chips wurden thermoelektrisch mit Hilfe

eines Peltierelementes gekühlt. Das Rauschen der auf diese Weise gekühlten CCD-Kameras ist zu vernachlässigen (Bsp.: Die Andor DU401-BR-DD erzeugt bei -70°C ein Elektron je Pixel und Sekunde)

Schrotrauschen (oder auch Photonenrauschen): Das Aussenden von Photonen aus einer Lichtquelle erfolgt nicht-deterministisch. Dieser zufällige Strahlungsprozeß tritt insbesondere bei lichtschwachen Quellen in den Vordergrund. Das Meßsignal I folgt einer Poisson-Statistik, für dessen Schwankungsbreite gilt: $\Delta I = \sqrt{N}$ mit N =Photonenanzahl. Für ein rauscharmes Signal sollte die Intensität des Meßsignales somit möglichst groß sein (1000 detektierte Photonen ergeben einen statistischen Fehler von 3%).

Das Meßsignal kann durch Subtraktion einer Dunkelmessung mit gleichen Parametern (Temperatur und Belichtungszeit) vom Dunkelstromrauschen bereinigt werden. Dabei werden auch die auf einem CCD-Chip vorhandenen sogenannten „Hot Pixel“ beseitigt. Der dominante Rauschanteil entfällt dann nur noch auf das Schrotrauschen, welches prinzipbedingt nicht entfernt werden kann.

Das Meßsignal I setzt sich zusammen aus dem nachzuweisenden Signal S sowie einem Hintergrundsignal H . Ist das Schrotrauschen des Hintergrundsignals zu intensiv, so kann das Signal S in dem Rauschen untergehen. Für eine eindeutige Diskriminierung sollte für das Verhältnis mindestens

$$\frac{S}{R} > 2$$

gelten [38]¹². Da das Detektorsignal bei der Lichtmessung, egal ob Nutz- oder Hintergrundsignal, linear mit der Belichtungszeit t zusammenhängt,

$$S \sim t, H \sim t$$

das Rauschen des Hintergrundsignals aber nur mit der Wurzel ansteigt

$$R = \sqrt{H}$$

ist es theoretisch möglich, über entsprechend längere Belichtungszeiten das Verhältnis von Nutz- zu Rauschsignal bis zur Nachweisbarkeit zu vergrößern (liegt bspw. das Signal in der Größenordnung des Schrotrauschens, $S = R$, so müßte die Belichtungsdauer mindestens um den Faktor vier verlängert werden). Bei Belichtungszeiten von einigen Minuten wirkt sich allerdings bereits die kosmische Höhenstrahlung limitierend aus. Ferner tragen stundenlange Belichtungszeiten den Ansprüchen einer Schnellanalytik nicht Rechnung.

¹²In der einschlägigen Literatur ist für das Signal-/Rauschverhältnis häufig auch der Zahlenwert 3 anzutreffen [39].

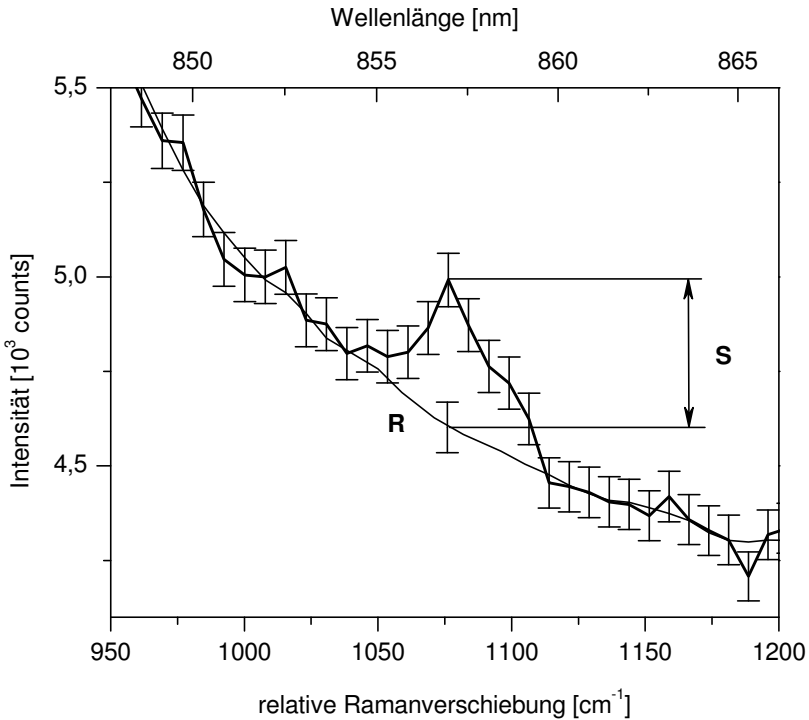


Abbildung 2.8: Zusammenhang zwischen S/R-Verhältnis und Nachweisgrenze am Beispiel der Ramanbande einer 5 mM Natriumnitratlösung. Das Hintergrundsignal wird vom Lösungsmittel (Wasser) verursacht.

Kapitel 3

Material und Methoden

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existiert keine universelle Spektroskopiemethode. Daher stellen die in den beiden Untersuchungsreihen verwendeten Meßsysteme Lösungskompromisse hinsichtlich der jeweiligen Aufgabenstellung dar¹. Die Konfiguration der verwendeten Instrumente in dieser Arbeit wurde daher entsprechend der Meßaufgabe ausgelegt. Eine Übersicht über laserspektroskopische Meßmethoden an Feststoffen unter dem Gesichtspunkt der Umweltanalytik wird u. a. in [41] gegeben.

Die bei der Detektion von DDT bzw. DDT-haltigen Holzschutzmitteln (HSM) verwendete Instrumentierung sollte eine leistungsstarke Anregung im langwelligen UV-C (250–280 nm) ermöglichen. Für die multidimensionale Analyse in der Zeitdomäne (Auflösung 1 ns) mußte eine entsprechend CCD-Kamera mit sehr schnellen Verschußzeiten zur Verfügung stehen. Das entsprechende System wird in 3.2.1 beschrieben. Eine Verwendung in der Vorortanalytik stellt weitere Anforderungen an das System: mobil, netzunabhängig, wettergeschützt, Laserführung mit Hilfe von Glasfasern, robust. Diese Punkte wurden zum Teil in dem am Institut aufgebauten mobilen Laserfluoreszenz-Meßsystem realisiert (siehe 3.2.2).

Die Vorgaben der Biofilmanalyse lassen sich demgegenüber wie folgt zusammenfassen: nichtinvasiv, keine Fluoreszenzanregung, möglichst große Eindringtiefe sowie hohe Ortsauflösung. Letztere Bedingung zwingt zur Verwendung eines konfokalen Mikroskopes, welches nicht nur lateral eine hohe (beugungslimitierte) Auflösung besitzt, sondern auch axial. Somit läßt sich die gewünschte tiefenaufgelöste Analyse realisieren. Die notwendige Lochblende stellt die Begrenzung des

¹Aus [40], S. 77: „Da der Erfolg eines Experimentes oft von der Wahl geeigneter Meß- und Nachweisgeräte abhängt, ist die genaue Kenntnis moderner Techniken für den Spektroskopiker von besonderer Bedeutung.“

Lichtflusses dar und bedingt den Einsatz einer Spektrometer-CCD-Kombination, da diese die Punktlichtquelle effektiver nutzt als die Jacquinot-Blende eines FT-Ramanspektrometers.

	Holz	Biofilm
Wechsel- wirkung	(zeitaufgelöste) Fluoreszenz	inelastische Streuung (Raman)
Laser	266 nm, gepulst	785 nm, cw
Detektor	ICCD	IR-intensivierte CCD
Ort	geringe Ortsauflösung (mm)	hohe Ortsauflösung (μm)

Tabelle 3.1: Angewandte Meßtechnik

3.1 CCD-Kamerasysteme

Die Bedeutung des Bildsensors für spektroskopische Analysen wird häufig übersehen [39]. Wie bereits in der Einleitung dargelegt, stellt der Fortschritt in der CCD-Technik dem Spektroskopiker einen bemerkenswerten Lichtdetektor zur Verfügung. Das CCD besitzt ein sehr gutes Signal-/Rauschverhältnis, das bei entsprechenden Maßnahmen (Kühlung, langsame Ausleserate²) lediglich durch das nicht zu beseitigende Schrotrauschen determiniert werden. Darüberhinaus besitzt das CCD – je nach Ausführungstyp – eine äußerst hohe Quanteneffizienz (QE). Das rückseitiggedünnte, IR-intensivierte Exemplar, welches bei den ramanspektroskopischen Untersuchungen zum Einsatz kam, besitzt eine QE von 94% bei 800 nm. In beiden Untersuchungsreihen (Holz und Biofilm) bestand das Detektorsystem jeweils aus einer Spektrometer-CCD-Kamera-Kombination.

Im Anhang findet sich eine Übersicht über die technischen Daten der Systeme.

²unter 1 MHz

3.1.1 Fluoreszenzmessungen

Die Detektion der in dieser Arbeit präsentierten Fluoreszenzspektren (Kapitel 4) wurden mit Hilfe zweier unterschiedlicher Fluoreszenzmeßsysteme erzielt:

1. einem Laboraufbau mit einer ICCD-Kamera
2. einem mobilen Aufbau mit einer konventionellen CCD-Kamera

Die bildverstärkende ICCD-Kamera (ICCD-576 G/RB, Spectroscopy Instruments, Gilching) ermöglicht aufgrund ihres Verschlusses, der auch als Verstärker fungiert, sehr kurze Belichtungszeiten (5–6 ns). Die hierzu integrierte Multikanalplatte, deren Kanäle mit einer speziellen Beschichtung ausgestattet sind, verstärkt ähnlich einem Photomultiplier die zuvor in einer Photokathode erzeugten Elektronen durch das Anlegen einer Beschleunigungsspannung. Liegt eine entsprechend hohe Gegenspannung an der Kanalplatte an, ist die Kamera praktisch blind.

Der mobile Meßaufbau war mit einer „front-illuminated“ CCD-Kamera (InstaSpec IV von L.O.T.-Oriol GmbH, Darmstadt) ausgestattet, die für den UV-Bereich zusätzlich mit einer entsprechenden Beschichtung versehen wurde.

3.1.2 Konfokale Ramanmikroskopie

An dem modularen CRM 200 der Firma WITec (Ulm, siehe Abschnitt 3.4) kamen drei verschiedene Detektionssysteme (Daten siehe Anhang) zum Einsatz:

1. SPEC-10:100B (TE), Hersteller: Roper Scientific GmbH (Ottobrunn)
2. DU 401-BR-DD, Hersteller: Andor Technology (Belfast, Nordirland)
3. Avalanche Photodiode (APD)

Die beiden CCD-Kameras (Pos. 1+2) besitzen rückseitengedünnte CCD-Chips. Die Schaltungselektronik zum Ladungstransport befindet sich bei diesen Kameras auf der lichtabgewandten Seite, da diese auf dem CCD zu einer Verringerung der Lichtdurchlässigkeit von bis zu 50% führt.

Dieser Aspekt spielt insbesondere bei der Detektion von Licht im NIR eine entscheidende Rolle, da die Effizienz hier mit zunehmender Wellenlänge rasch abnimmt. Rückseitengedünnte CCD-Kameras besitzen allerdings aufgrund des hohen Brechungsindizes des Siliziums sowie der geringen Schichtdicke des Chips

(ca. $30\ \mu\text{m}$) einen Etalon-Effekt. Insbesondere spektral breite Signale zeigen ein ausgeprägtes Interferenzmuster (siehe auch Abb. 5.9 auf Seite 84).

Da die Kamera von Roper Scientific einen ausgesprochen störenden Etalon-Effekt besaß, wurde diese im Laufe der Experimente gegen die DU401-BR-DD von Andor Technology ausgetauscht. Deren CCD besitzt aufgrund der Verwendung von Epitaxial-Silizium eine größere Verarmungszone („Deep Depletion“), so daß der Chip eine größere Dicke aufweisen kann (ca. $60\ \mu\text{m}$). Das „Etaloning“ dieser Kamera wird dadurch auf ein Minimum gesenkt. Der größte Anteil der in Kapitel 5 dargestellten Experimente wurde mit dieser Kamera durchgeführt.

Im Gegensatz zu den beiden CCDs, die Vertreter der Multikanal-detektoren sind, läßt die APD spektral aufgelöste Messungen nur in Zusammenarbeit mit einem Monochromator zu. Das verwendete Spektrometer Acton 308-SP kann zu diesem Zweck mit Hilfe eines umklappbaren Spiegels das spektral zerlegte Licht auf die lichtempfindliche Fläche lenken. Ein einstellbarer Spalt begrenzt die Breite der nutzbaren APD-Fläche ($200\ \mu\text{m}$). Die APD ermöglicht die Einzelphotonendetektion im NIR-Bereich. Ihre Empfindlichkeit ist um ca. eine Größenordnung besser als die der obigen CCDs. Die hohe Quanteneffizienz der APD sorgt dafür, daß jedes einfallende Photon ein Elektron-Loch-Paar erzeugt. Durch die angelegte Verstärkerspannung am Diodenübergang erzeugen die beiden Ladungsträger aufgrund ihrer kinetischen Energie weitere Ladungsträger bei Kollision mit dem Molekülgitter (Lawinendurchbruch).

3.1.3 Kalibrierung

Die Spektrometer-CCD-Detektorsysteme wurden mit Hilfe der atomaren Spektrallinien von Hg und Ar einer entsprechenden Kalibrierlampe (Is-ArHg, Firma omt GmbH, Ulm) kalibriert. Die unterschiedlichen Programme zur Auslesung und Darstellung der Spektren der verschiedenen Detektionssysteme bieten teilweise automatisierte Abläufe („ScanCTRL Spectroscopy Plus“), bei denen vorgegebene markante Linien selbständig mit Hilfe des Spektrometers angefahren und auf verschiedene Bereiche der CCD-Kamera abgebildet werden. In jedem Fall ist eine manuelle Zuordnung der Pixelnummer zur Wellenlänge möglich mit anschließender Interpolation durch Polynome wählbaren Grades. Durch die Kalibrierung mit Hilfe bekannter Spektrallinien ließ sich der mittlere Fehler auf eine Pixelbreite begrenzen.

3.1.4 Spektrale Auflösung

Die Größe der Pixel, deren Anzahl in horizontaler Richtung sowie das lineare Dispersionsvermögen des verwendeten Gitterspektrometers (alle drei in Czerny-

Turner-Anordnung) bestimmen prinzipiell das Auflösungsvermögen, wobei das Herz des dispersiven Systems von einem Reflexionsgitter gebildet wird. Aus der beleuchteten Anzahl der Gitterfurchen sowie der auf dem CCD abgebildeten Ordnung ergibt sich das theoretische Auflösungsvermögen³. Weitere Faktoren, die das Auflösungsvermögen allerdings hauptsächlich bestimmen, sind Eingangsspaltbreite und Abbildungsfehler, wie Koma und Aberration. Die Minimalwerte der in dieser Arbeit verwendeten Systeme sind in der Anlage zu finden. Diese bilden gleichzeitig den Fehler des jeweiligen kalibrierten Spektrums.

3.1.5 Quanteneffizienz und Instrumentenfunktion

Die Quanteneffizienz (QE) beschreibt wellenlängenabhängig, welcher Prozentsatz der einfallenden Photonen vom Detektor registriert wird. Eine andere, eher ergebnisorientiertere Beschreibung ist die Instrumentenfunktion des Nachweisystems, daß für Photonen unterschiedlicher Energie eine unterschiedliche Empfindlichkeit besitzt. Diese Beschreibung berücksichtigt, daß ein aufgenommenes Spektrum mit dieser Funktion verknüpft ist. Die in der vorliegenden Arbeit in den Abbildungen wiedergegebenen Spektren sind allesamt mit einer entsprechenden, dem jeweilig verwendeten Detektorsystem zugehörigen Funktion behaftet.

Prinzipiell lassen sich die Spektren durch das Aufzeichnen eines bekannten Spektrums (beispielsweise einer Lampe oder Referenzsubstanzen) korrigieren [42,43]. Die so gewonnenen Spektren wären dann mit den Spektren anderer Meßgeräte absolut vergleichbar. Dies wäre von herausragendem Interesse, würde man die gemessenen Spektren in einer Datenbank veröffentlichen. Dies gilt aber auch für die Identifikation eines unbekanntes Stoffes mit Hilfe einer online Datenbank, die mittlerweile auch für den Ramanspektroskopiker zahlreiche Stoffe umfaßt⁴. Die Genauigkeit bei diesem Spektrenabgleich steht und fällt mit der Übereinstimmung der Spektren. Aus mehreren Gründen wurde dennoch auf die Korrektur der Spektren durch die Instrumentenfunktion verzichtet:

1. Selbst bei sorgfältigster Kalibrierung mit Hilfe bekannter Emissionskurven (Deuterium- oder Halogenlampe) besitzen die korrigierten Spektren einen Fehler von mindestens 10%. Daher ist es üblich, auf eine Korrektur zu verzichten und stattdessen das technische Equipment ausführlich anzugeben (siehe Abschnitte 3.5 und 3.4), mit dem das Spektrum erzielt wurde [42].
2. Zur Unterdrückung der durch Reflexion und Streuung verursachten intensiven Laserlinie in den Experimenten wurden entsprechende Filter eingesetzt.

³Typ. Werte: 10000 – 100000 (entsprechend 0,05 – 0,005 nm bei 500 nm Wellenlänge).

⁴z.B. SpectraOnline von Thermo Galactic

Eine Korrektur würde diesen Effekt wieder aufheben – abgesehen von dem dann schlechteren Signal-/Rauschverhältnis.

3. Ähnlich einem Zweistrahlphotometer, bei dem sich die Verknüpfung mit der Instrumentenfunktion aufgrund der Verwendung eines zweiten Strahlenganges aufhebt, wurden auch in dieser Arbeit Referenzmessungen angestellt. So sind die Spektren unterschiedlicher Messungen, die aber mit demselben Versuchsaufbau erzielt worden sind, sehr wohl untereinander vergleichbar. D. h. es können quantitative Messungen durchgeführt werden, wie bei den Konzentrationsmessungen in 5.2.1 auf Seite 82 gezeigt.
4. Es wurde (noch) nicht beabsichtigt, die Spektren in eine Datenbank zu stellen.

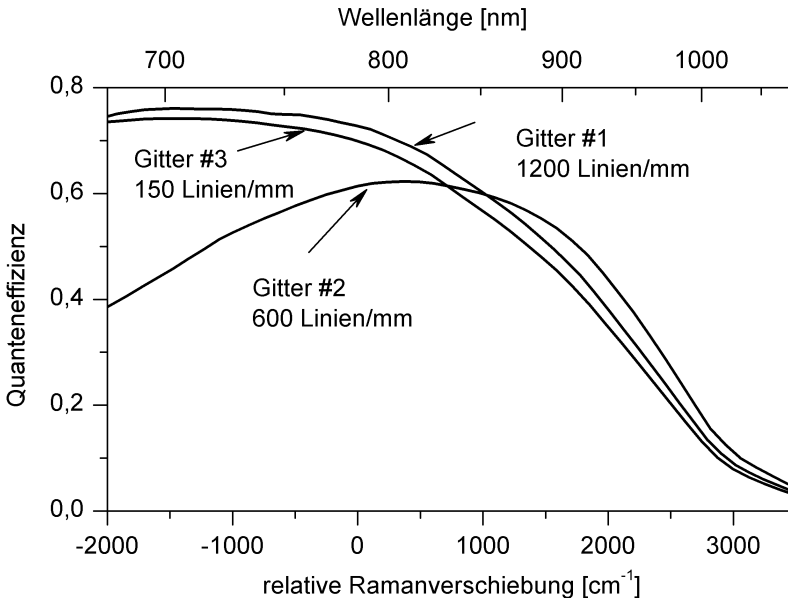


Abbildung 3.2: Gemeinsame Instrumentenfunktion des Spektrometers und der CCD-Kamera des CRM 200

Die drei QE-Kurven für das verwendete Spektrometer (Acton 308-SP) mit seinen drei Gittern sowie angesetzter CCD-Kamera (Andor DU401-Br-DD) sind in Abb. 3.2 dargestellt. Die Kurven sind nach den Herstellerangaben berechnet worden. Deutlich ist zu sehen, daß beispielsweise bei Verwendung des Gitters

Nr. 2 der für die Ramanspektroskopie spektral interessante Bereich mit zahlreichen Schwingungsbanden von ca. $500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (sogenannter „Fingerprint“-Bereich) in guter Näherung konstant ist (zwischen 50% und 60%). Ein starker Abfall der QE ist ab ca. 900 nm zu beobachten, der sich in den Ergebnissen (Kapitel 5) wiederfinden läßt. Eine Detektion der Photonen mit einer Wellenlänge größer als 1050 nm (entsprechend 3200 cm^{-1}) gelingt kaum noch.

Eine in diesem Zusammenhang durchgeführte, interessante Messung ergab sich bei der Referenzsubstanz Cyclohexan (C_6H_{12}). In Abb. 3.3 gibt der Kurvenverlauf A das aus einer online Datenbank (McCreery Raman Library) entnommene Spektrum von Cyclohexan wieder, während das Spektrum B das unkorrigierte, mit dem konfokalen Ramanmikroskop CRM 200 (siehe Seite 45) aufgenommene zeigt. Dargestellt ist der sogenannte „Fingerprint“-Bereich. Ein weiterer Bereich interessanter Schwingungsbanden organischer Verbindungen um ca. 3000 cm^{-1} wurde in der Datenbank nicht wiedergegeben. Dort befinden sich die symmetrischen und anti-symmetrischen Streckschwingungen der CH_2 - und CH_3 -Gruppen. Diese sind allerdings weniger aussagekräftig. Die Kurvenverläufe zeigen sehr gute Übereinstimmungen. Der Abfall der Intensitäten des CRM 200-Spektrums könnte auf die nachlassende QE des CRM 200-Systems in diesem Bereich zurückzuführen sein.

Ein Vergleich mit dem nach [43] korrigiertem Spektrum (rote Kurve C in Abb. 3.3)⁵ von Cyclohexan sowie den Angaben einer weiteren Datenbank⁶ zeigen, daß die Lage der Ramanbanden, die mit Hilfe des konfokalen Ramanmikroskop CRM 200 (mittleres Gitter mit $600\text{ Linien}\cdot\text{mm}^{-1}$) aufgezeichnet wurden, einen maximalen, absoluten Fehler von $\pm 1\text{ cm}^{-1}$ besitzen.

3.2 Fluoreszenz

Zur Fluoreszenzanregung standen für diese Arbeit zwei unterschiedliche Lasersysteme mit verschiedenen Detektionseinheiten für die spektrale Lichtmessung zur Verfügung:

- leistungsstarker Nd:YAG-Laser mit abbildendem Spektrometer und bildverstärkender CCD-Kamera für zeitaufgelöste Messungen
- mobiles Fluoreszenzspektrometer basierend auf einem Stickstoff-Laser und einfachem Spektrometer sowie CCD-Kamera

⁵Spektrum lag nicht in elektronischer Form vor, wurde daher nachträglich digitalisiert

⁶National Institute of Standards and Technology (USA): webbook.nist.gov

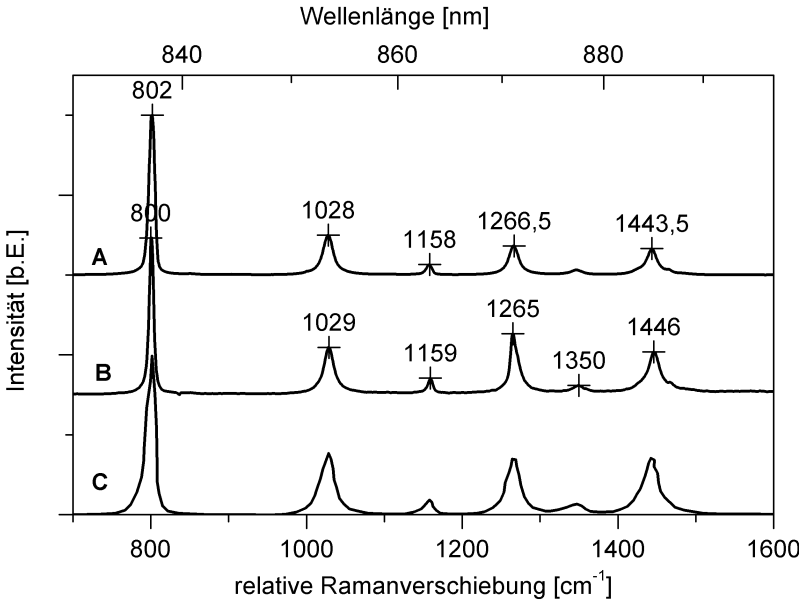


Abbildung 3.3: Absolutvergleich der normierten Ramanspektren von Cyclohexan: mit CRM 200 und Gitter #2 (A, siehe Text), aus McCreery Raman Library (B), aus [43] (C)

3.2.1 Experimenteller Aufbau Nd:YAG-Lasersystem

Mit Blick auf das Absorptionsspektrum von DDT (siehe Abb. 3.4), welches im UV-B stark absorbiert, sowie den Angaben aus Tabelle 2.1 auf Seite 22, die einem Bericht zum Statusseminar der DBU entnommen wurden [24], wurde die Fluoreszenz mit Hilfe von Laserstrahlung der Wellenlänge 266 nm angeregt.

Dazu wurde als Anregungsquelle ein gepulster Nd:YAG-Laser eingesetzt (Compact Laser 501 DNS, BMI, Frankreich). Seine Grundwellenlänge (1064 nm) kann mit Hilfe zweier nichtlinearer KDP⁹-Kristalle intern frequenzverdoppelt bzw. -verdreifacht werden (532 nm bzw. 355 nm). Die Daten der Laserleistung wurden mit einem Energiemeßgerät wie folgt bestimmt: 850 mJ bei 1064 nm, 380 mJ bei 532 nm und 160 mJ bei 355 nm. Für die Messungen der statischen respektive zeitaufgelösten Fluoreszenz wurde der interne KDP-Kristall zur Frequenzverdreifachung entfernt. Das frequenzverdoppelte Laserlicht wurde nach Verlassen des

⁹Kaliumdihydrogenphosphat

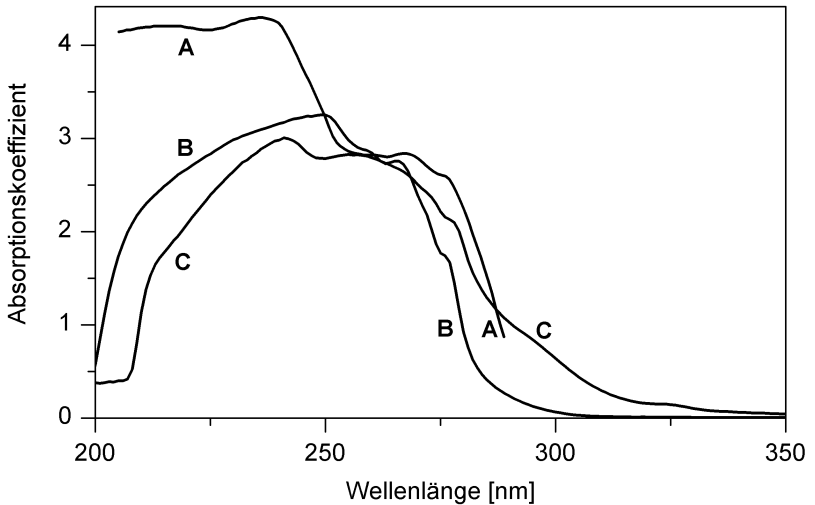


Abbildung 3.4: Absorptionsspektren von DDT: entnommen aus NIST⁸ (A), 0,1% DDT-Methanol-Lösung (B), 0,1% „Hylotox 59“-Tetrahydrofuran-Lösung (C)

Gehäuses mit Hilfe eines Separators von der Grundwellenlänge getrennt und anschließend extern ein weiteres Mal frequenzverdoppelt (266 nm, max. 10 mJ).

Der Durchmesser des Laserstrahles wurde vor dem externen KDP-Kristall mit Hilfe eines Teleskopes von 9 mm auf 2 mm verkleinert. Der Ausdehnung des Kristalls aufgrund von Erwärmung im laufenden Betrieb wurde mit Hilfe von geregelt temperierbaren Heizeinheiten entgegengewirkt und so die Phasenanpassung konstant gehalten. Die Pulslänge dieses gütegeschalteten Lasersystems beträgt 10 ns.

Das Nachweissystem bestand aus einem abbildenden Spektrometer (Chromex 500, Chromex, USA) mit drei wechselbaren Gittern: 150, 600 und 1800 Linien·mm⁻¹. Für die Messungen wurde zumeist das niedrigauflösende Gitter mit 150 Linien·mm⁻¹ benutzt. Dieses bildet auf der Photokathode ein Spektrum von ca. 167 nm Breite ab. Größere Bereiche ließen sich durch sukzessives Verfahren des Spektrometers automatisch aufnehmen. Zur Unterdrückung der Laserlinie wurde ein Schott-Kantenfilter (WG 295) vor dem Spektrometer angebracht. Quarzlinsen bildeten das Fluoreszenzlicht der Probe auf den Spalt des Spektrometers ab.

Die Belichtungszeit ist durch den Verschluß der ICCD-Kamera je einzeltem Puls

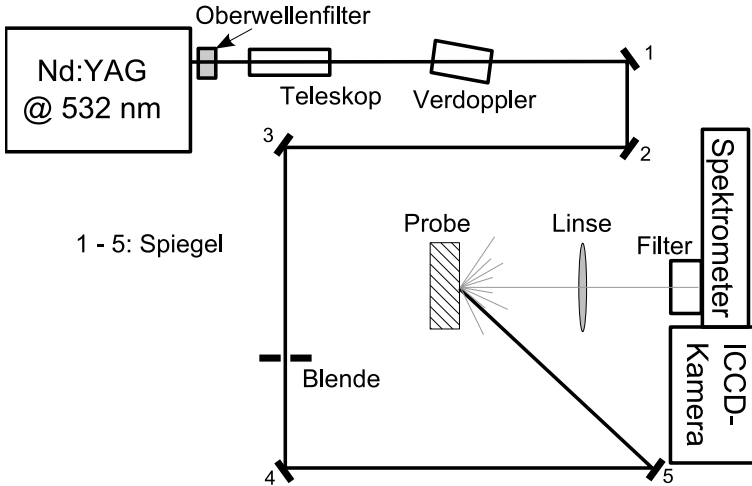


Abbildung 3.5: Versuchsaufbau zur Fluoreszenzanregung mit UV-Laserlicht (266 nm)

im zumeist verwendeten „gate“-Betrieb mit 5 ns starr vorgegeben. Die Fluoreszenz einzelner Anregungspulse können aber auf der Kamera vor dem Ausleseprozeß aufintegriert werden. Eine Belichtung der Kamera von 10 Sekunden bedeutet also eine Integration über 100 Laserpulsen. Eine Akkumulation im Rechner ist desweiteren auch noch möglich. Die Belichtungszeiten wurden meist so eingestellt, daß der Dynamikbereich der Kamera (16 Bit) ausgenutzt wurde, ohne das es zur Sättigung kam. Die Möglichkeit des „Shutter“-Betriebes, bei der die Kamera für einige ms lang geöffnet ist, wurde wegen der Unterdrückung des Umgebungslichtes nicht genutzt.

Da der Laserpuls nur ca. 30 cm lang ist, muß die Kamera rechtzeitig zur Detektion der Fluoreszenz geöffnet werden. Die präzise Ansteuerung des Öffnungs- und Schließzeitpunktes der ICCD-Kamera (s. o.) wird durch Anlegen einer Gegenspannung an die Verstärkereinheit durch einen Verzögerungsgenerator (DG 535, Stanford Research System, Sunnyvale, USA) gewährleistet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3.5 graphisch dargestellt.

Gesteuert wurde der Meßablauf zentral von einem Computer, der auch für die Spektrenaufnahme bzw. -darstellung benutzt wurde. Hierzu wurde die mitgelieferte Software „Winspec 1.6.3“ eingesetzt. In dem Softwarepaket ist eine Programmiersprache integriert, so daß spezielle Meßroutinen programmiert werden konnten (u. a. für die multidimensionalen Aufnahmen).

Zeitdomäne

Mit Hilfe des Verzögerungsgenerators konnte der Öffnungs- und Schließzeitpunkt der CCD-Kamera im ns-Bereich exakt gesteuert werden. Durch Variation dieses Zeitpunktes konnte das Belichtungsfenster der Kamera sukzessive verschoben werden. Die aufgezeichneten Spektren sind somit zeitabhängig und können in einer 3D-Darstellung visualisiert werden. Legt man einen Schnitt entlang der Zeitachse und stellt die Intensität über die Zeit aufgetragen graphisch dar, so läßt sich aus diesen Profilen die Abklingzeit der Fluoreszenz berechnen. Die mit diesem Aufbau erzielbaren Zeitauflösungen liegt im Bereich von 1–2 ns.

3.2.2 Experimenteller Aufbau Stickstoff-Lasersystem

Neben dem leistungsstarken Laboraufbau konnte noch auf ein mobil einsetzbares, kleineres Laserspektrometer [44,45] zurückgegriffen werden (siehe Abb. 3.6). Bei diesem System wird das Laserlicht eines N₂-Lasers (MSG 800, LTB, Berlin) über eine Y-Quarzglasfaser direkt zur Probe geleitet, wodurch eine einfache Handhabung im Feldbetrieb garantiert wird. Das Fluoreszenzlicht konnte ebenfalls über diesen Meßkopf wieder aufgesammelt und über die verzweigte Faser zum Spektrometer (MSI 125, L.O.T.-Oriel, Darmstadt) geleitet werden. Die Laserenergie am Faserende betrug ca. 100 µJ (bei 10 Hz Pulsrate; weitere Daten siehe Anhang).

Das spektral zerlegte Licht wird anschließend auf eine CCD-Kamera (InstaSpec IV, ebenfalls L.O.T.-Oriel) abgebildet. Auch in diesem Aufbau wird ein Rechner zentral zur Steuerung des Versuches und zur Spektrenaufnahme eingesetzt (mitgelieferte Software: „Instaspec“).

3.3 Holz und applizierte Stoffmengen

DDT und das HSM “Hylotox 59“ wurden auf Kanthölzern (10 cm x 5 cm Querschnittsfläche) der Holzsorten Kiefer und Fichte aufgetragen. Die Beschränkung der Untersuchung auf diese beiden Holzsorten geschah mit Blick auf die häufige Verwendung dieser Hölzer beim Hausbau. Während Fichtenholz insbesondere aufgrund seines relativ geringen Gewichtes und seiner hohen Festigkeitseigenschaften bei der Dachstuhlkonstruktion Verwendung findet, wird Kiefernholz u. a. gerne zur Vertäfelung eingesetzt.

Im Hinblick auf die zu ermittelnden Nachweisgrenzen wurden bei den Untersuchungen auftragsübliche Konzentrationen verwendet. In der Literatur werden übliche Einbringmengen von Holzschutzmitteln auf behandelten Flächen von

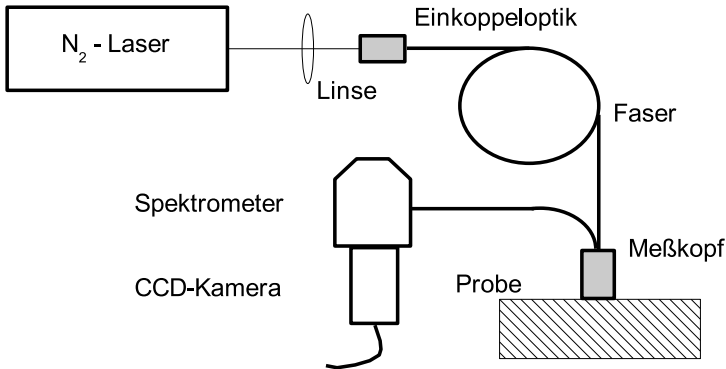


Abbildung 3.6: Mobiles Laserspektrometer (Anregungswellenlänge 337 nm)

200–280 g·m⁻² angegeben [46]. Laut Herstellerhinweis auf der „Hylotox 59“-Flasche sollen auf das zu schützende Holz 412 ml·m⁻² aufgetragen werden. Bei 3,5% DDT-Gehalt sind dies 14,4 g·m⁻² des Wirkstoffes, die auf der Holzoberfläche verstrichen werden. Daher wurden in diesen Meßreihen auf ca. 50 cm² Holzoberfläche ein halber Milliliter einprozentiger DDT-Methanol-Lösung verstrichen. Das entspricht in etwa 5 mg DDT auf der Holzoberfläche bzw. 1000 mg·m⁻².

Die in der konventionellen Rückstandsanalytik ermittelten Werte werden jedoch in mg je kg Trockenholz (mg·kg⁻¹) angegeben. Bei einer Standardbeprobung für diese Laboranalyse werden die Proben mit Hilfe eines Förstnerbohrers entnommen. Die Beprobungstiefe beträgt 3 mm, der Durchmesser des Bohrers 20 mm. Durch die geringe Bohrtiefe wird dem Umstand Rechnung getragen, daß die Wirkstoffe in den obersten Holzschichten verbleiben und nicht tief in das Holz eindringen. Auf einen Quadratmeter umgerechnet ergibt sich bei einer Tiefe von 3 mm demnach für die Holzmasse ein Wert von ca. 3 kg. Setzt man den Grenzwert für DDT von 5 mg·kg⁻¹ an, so erhält man eine aufgetragene Menge je Fläche von 15 mg·m⁻² – also ein Tausendstel der mit dem Anstrich von "Hylotox 59" eingebrachten DDT-Menge.

Für eine erste Abschätzung der Fluoreszenzmaxima von DDT wurden die beiden Isomere (2,4'- und 4,4'-DDT) in Methanol wie folgt gelöst: jeweils 100 mg DDT in 10 ml Methanol. Dieses einprozentige Lösungsverhältnis wurde auch mit Blick auf das später untersuchte DDT-haltige Holzschutzmittel „Hylotox 59“, in welchem DDT zu 3,5% enthalten ist, angesetzt. Das HSM „Hylotox 59“ bzw. die DDT-Methanol-Lösung wurden anschließend mit Hilfe eines Pinsels auf die Holzproben aufgebracht, wobei darauf geachtet wurde, die üblichen Stoffkonzen-

trationen (s. o.) zu erzielen. Darüberhinaus wurden auch mit Methanol verdünnte Lösungen (DDT sowie Hylotox) untersucht.

3.4 Konfokales Ramanmikroskop

Das konfokale Ramanmikroskop CRM 200 (WITec, Ulm) ist ein modular aufgebautes konfokales Ramanmikroskop, dessen Aufbau ein Zeiss-Mikroskop zugrunde liegt (Abb. 3.7). Die einzelnen Komponenten (siehe auch Anhang):

- Diodenlaser XTRA (Toptica, München), Wellenlänge: 784,6 nm
- Objektive: 10x (NA), 20x (NA), 40x (Wasserimmersion, IR-optimiert, NA 0,8), 100x (Ölimmersion, IR-optimiert, NA 0.95)
- Spektrometer Acton 308-SP (mit drei Gittern: 150, 600 und 1200 Linien·mm⁻¹)
- „back-illuminated“ CCD-Kamera: Roper Scientific SPEC10:100(B) , Andor DU401-BR-DD

Der Anregungslaser ist zur Vermeidung von Fluoreszenzanregungen in der Probe ein Diodenlaser (XTRA, Toptica Photonics AG, München) mit interner Wellenlängenstabilisierung (784,6 nm) zur Vermeidung des „Mode Hoppings“. Diesen Laser zeichnen für Ramananwendungen neben seiner Leistungsstärke (200 mW am Faserende) die geringe spektrale Linienbreite (< 10 MHz) und die über einen großen Zeitraum stabile Wellenlänge aus.

Die Wahl der Anregungswellenlänge von 784,6 nm ist als Kompromiß zu sehen. Einerseits stellt der Ramanprozeß wegen seines geringen Wechselwirkungsquerschnittes dem Spektroskopiker nur wenige Photonen zur Analyse bereit, so daß lange Belichtungszeiten die Folgen sind (insbesondere das Abrastern der Probe mit mehreren zehntausend Einzelmessungen wird auf diese Weise unpraktikabel). Aufgrund der ν^4 -Abhängigkeit des Streuprozesses würde der Einsatz des weit verbreiteten Argonlasers (488 nm) ein ca. 7fach stärkeres Streusignal erzielen und dementsprechend die Meßzeiten verkürzen- allerdings um den Preis einer Fluoreszenzanregung in der heterogenen Probe (bspw. Gelbstofffluoreszenz der organischen Abbauprodukte, die im Abwasser reichlich vertreten sind), welche die schwachen Ramanbanden gänzlich überdecken würde.

Zur Vermeidung von Fluoreszenzanregung und trotzdem hoher Quantenausbeute werden seit geraumer Zeit (u. a. auch bei der Identifikation von Mikroorganismen)

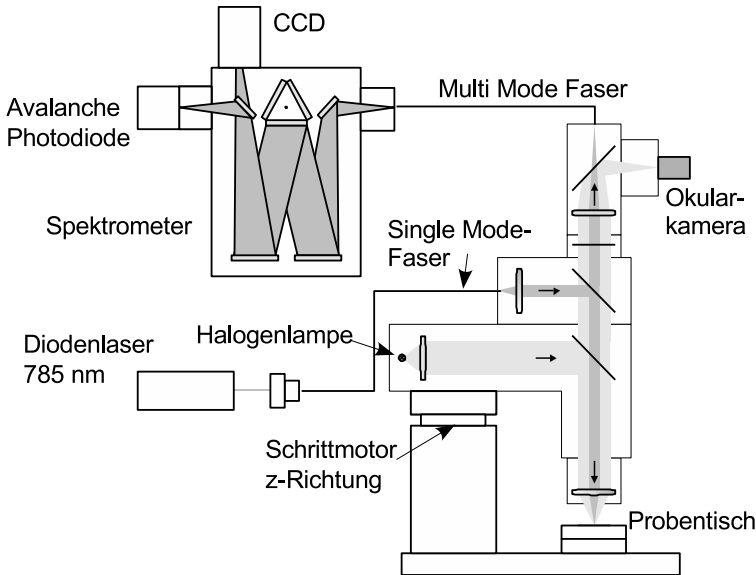


Abbildung 3.7: Konfokales Ramanmikroskop CRM 200 (schematisch)

diodengepumpte Nd:YAG-Lasersysteme in Kombination mit FT/NIR-Ramanmikroskopen eingesetzt. Da wegen des interferometrischen Prinzips keine Spektrometer verwendet werden, wird ein höherer optischer Durchsatz erzielt, so daß mehr Photonen den Detektor erreichen. Allerdings ist die Kombination solcher Instrumente mit einem konfokalen Mikroskop nicht sinnvoll, da der lichtbegrenzende Faktor die Lochblende ist.

Einen anderen Grund für die verwendete Wellenlänge stellt der geringe Absorptionskoeffizient von Wasser in diesem Bereich (784,6- 1050 nm) dar. Da beabsichtigt wird, über einen sehr großen Bereich (bis zu einen Millimeter) den Biofilm im wässrigen Milieu zu vermessen, wird ein spezielles, IR-optimiertes Wasserimmersionsobjektiv (Olympus LUMPlan FL/IR 40x, NA 0,8) mit relativ großem Arbeitsabstand von 3,3 mm verwendet. Auch mit Blick auf die zu erwartende äußerst unebene Oberfläche des Biofilms ist diese Distanz nicht zu hoch. Die daraus resultierende numerische Apertur von 0,8 stellt somit ebenfalls einen Kompromiß zwischen gewünschter hoher axialer Auflösung (Herstellerauskunft: 1,6 μm) und Anwendung dar.

Die Leistungsstärke von 200 mW des Diodenlasers sind für biologische Proben mehr als ausreichend, da diese Leistung in ein sehr kleines Probenvolumen appli-

ziert wird. Im Laufe der in Kapitel 5 geschilderten Versuchsreihen zeigte sich, daß Leistungen oberhalb von ca. 10 mW zur Zerstörung des Biofilmes führen (siehe hierzu auch Literatur).

Das Laserlicht wird über eine „Single Mode“-Faser in das Mikroskop eingekoppelt und über einen Strahlteiler (holographischer Bandpaßfilter mit 2 nm Bandbreite) zum Objektiv gelenkt. Das Mikroskopobjektiv (s. o.) fokussiert den Laserstrahl in die Probe (Durchmesser $< 1 \mu\text{m}$) und sammelt die gleichzeitig das Probenlicht auf. Das Abrastern der Probe erfolgt über den Probenstisch, der piezoelektrisch verfahrbar ist (s. u.). Zur Unterdrückung der starken Laserlinie wird ein holographisches Super-Notch-Filter eingesetzt. Das Probenlicht wird anschließend konfokal in die Multimodefaser abgebildet, deren Durchmesser das Auflösungsvermögen bestimmt.

Die Detektionsfaser leitet das Analyselicht zum Spektrometer (Acton 308-SP), das mit seinem Gitterturm bestehend aus drei Gittern (siehe auch Anhang B) das Licht dispergiert und auf die CCD-Fläche abbildet. Alternativ kann das Licht über einen Spiegel, der in den Strahlengang geschwenkt wird, auch auf die sensitive APD gelenkt werden. Diese beiden Lichtdetektoren wurden bereits in Abschnitt 3.1.2 vorgestellt.

Zusammenfassender Überblick über die systemimmanenten Vorteile:

APD und CCD: Im Gegensatz zu anderen kommerziell erhältlichen CRMs, verfügt das CRM 200 über eine Avalanche Photodiode. Mit Hilfe dieses empfindlichen Detektors können vorhandene spektrale Banden wesentlich schneller erfaßt werden. Somit kann in derselben Zeit ein wesentlich größerer Bereich der Probe untersucht werden.

Modularität und Erweiterbarkeit: Das System bietet aufgrund seiner modularen Bauweise die Möglichkeit, andere Komponenten zu verwenden. So läßt sich beispielsweise die Anregungswellenlänge durch einen Tausch des Lasers relativ einfach wechseln. Eine Umrüstung zu einem konventionellen CLSM ist ebenso möglich.

Piezotisch und Schrittmotor: Die Verwendung eines Schrittmotors für den axialen Hub gestattet einen großen Verfahrbereich. Dieser ist bei den untersuchten Biofilmpollen unbedingt notwendig. Einen Tiefenscan über mehrere $100 \mu\text{m}$ bietet kein anderes System. Das Abrastern der Probe mit Hilfe eines Piezotisches ermöglicht eine hohe Präzision im nm-Bereich. Die geringere Geschwindigkeit trägt dem schwachen Ramanprozeß Rechnung, der längere Belichtungszeiten je Meßpunkt erforderlich macht.

Softwarepaket und Service: Das mitgelieferte Softwarepaket gestattet neben der einfachen Bedienung und Datenerfassung eine Fülle von verschiedenen Betriebsmodi. Die online Auswertung verschiedener Ramanbanden gestattet bereits während des Bildaufbaus dessen Kontrolle. Die Spektren sowie die graphische Auswertung lassen sich mit Hilfe verschiedenster Filterfunktion in vielfältiger Weise manipulieren.

3.4.1 Prinzipieller Meßablauf

Die konfokale Ramanmikroskopie ist ein abrasterndes Verfahren. D. h. die Bildgebung erfolgt durch ein Abtasten der Probe mit einer idealerweise punktförmigen Lichtquelle. Die einzelnen Meßpunkte bezeichnet man auch als PIXEL (im Falle eines flächigen Scans) oder VOXEL (bei dreidimensionaler Messung).

Gegenüber der CLSM wird bei dem verwendeten CRM 200 nicht der Lichtstrahl mit Hilfe von Optiken über die Probe bewegt, sondern die Probe selbst mit Hilfe von Piezoelementen positioniert. Der maximale Stellweg des Probenstisches beträgt $200\ \mu\text{m}$ in lateraler Richtung. Die Positioniergenauigkeit liegt im Bereich weniger Nanometer. Eine Messung in z-Richtung wird mit Hilfe eines Schrittmotors vorgenommen, der den gesamten Mikroskopkörper über einen Bereich von bis zu $30\ \text{mm}$ verfährt (Genauigkeit: $50\ \text{nm}$). Neben den flächigen Aufnahmen in x-y- und x-z-Richtung ist das Meßinstrument in der Lage auch dreidimensionale Messungen aufzunehmen. Eingabeparameter sind neben dem Meßmodus (zwei- oder dreidimensional) und der entsprechenden Fläche (bzw. Volumen) die Anzahl der Meßpunkte in die jeweilige Raumrichtung. Hieraus ergibt sich die Pixel- bzw. Voxel-Auflösung.

Durch das computergesteuerte Anlegen einer Sägezahnspannung an die entsprechende Achse wird die Probe zeilenweise abgetastet. Entsprechend den Eingabeparametern werden entlang dieser Zeile x Messungen vorgenommen, d. h. die CCD-Kamera oder die APD x -mal ausgelesen. Z.B. soll ein $100 \times 100\ \mu\text{m}^2$ großer Meßbereich in 200×200 Pixeln aufgelöst werden. D. h. jedes Spektrum entspricht dann einem Quadrat mit $0,5\ \mu\text{m}$ Kantenlänge. Gemäß dem Abtasttheorem nach Nyquist-Shannon ist es ausreichend, die Probe mit der doppelten optischen Auflösung abzurastern [47]. Eine weitere Steigerung der Auflösung über die Ausleserate würde keine darüberhinaus gehende Detailinformationen über den Biofilm enthalten (Oversampling). Aus Gleichung 2.3 ergibt sich für das verwendete Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,8) eine bestenfalls erreichbare laterale Auflösung von $600\ \text{nm}$. In diesem Fall ist es beim Abrastern somit ausreichend, alle $300\ \text{nm}$ ein neues Spektrum aufzunehmen. Auf diese Weise ergeben sich für jede räumlich aufgelöste Messung eine Vielzahl an Spektren. Im obigen zweidimensionalen Beispiel sind es 40.000.

Aus dem vorherigen geht hervor, daß die Belichtungszeit für jeden einzelnen Meßpunkt immer einen Kompromiß darstellt. Sollen viele Messungen gemacht werden, um beispielsweise einen großen Übersichtsbereich zu untersuchen oder einen kleineren Bereich mit hoher Auflösung, dann ergibt sich die Belichtungszeit aus der Anzahl der Messungen und einer überschaubaren Gesamtmeßdauer. Diese liegt üblicherweise im Bereich von 1–10 Stunden. Typische Belichtungsdauern je Meßpunkt liegen dann zwischen 0,1 und 1 Sekunde. Kleinere Bereiche können später gezielt mit längeren Belichtungszeiten nochmals untersucht werden. Einzelne Meßpunkte lassen sich dementsprechend einige Minuten lang belichten, um eine Ramanbande hervorzuheben. Aufgrund der geringeren spektralen Aufspaltung wird bei Verwendung des niedrigauflösenden Gitters ($150 \text{ Linien} \cdot \text{mm}^{-1}$) mehr Licht auf jedem Pixel des CCD abgebildet, so daß die Belichtungszeiten entsprechend kürzer gehalten werden können. Daher wurde dieses Gitter hauptsächlich eingesetzt.

Allgemein setzt sich eine Messung aus drei Einzelschritten zusammen:

1. Auswahl des Gebietes mit Hilfe der Mikrometerschrauben unter Zuhilfenahme der Okularkamera.
2. Übersicht und Eingrenzung des Meßbereiches durch „Fast Imaging“
3. Abschließend „Full Spectral Imaging“ mit der CCD-Kamera. Evtl. Schritt 3 mit längeren Belichtungszeiten wiederholen, nachdem ein „interessantes“, kleineres Gebiet markiert wurde.

3.4.1.1 „Fast Imaging“

In diesem Modus wird das Meßsignal mit Hilfe der APD aufgenommen. Dabei wird eine (vermutete) spezifische Ramanbande ν in der Probe mit Hilfe des Spektrometers auf die APD abgebildet. Aufgrund der einflächigen Struktur der lichtempfindlichen Fläche ist die APD jedoch nicht in der Lage, die Photonen nach ihrer Wellenlänge zu unterscheiden. Sie detektiert somit einen je nach verwendetem Gitter mehr oder weniger großen Spektralbereich. Die gemessene Intensität wird dem entsprechenden Raumpunkt zugeordnet:

$$I_{\nu}(x, y, z)$$

Vorteil dieser Meßmethode ist deren Geschwindigkeit aufgrund der höheren Sensitivität der Photodiode (ca. 10fach). Zu berücksichtigen ist die Unkenntnis über

die Natur des Meßsignales. Es ist nicht möglich, aus der Aufnahme zu entscheiden, ob es sich tatsächlich um die räumliche Intensitätsverteilung einer Raman-schwingung handelt oder das Meßsignal vielleicht von einer Fluoreszenzanregung verursacht worden ist. Dieser Meßmodus ist dem eines CLSM sehr ähnlich.

3.4.1.2 „Full Spectral Imaging“

Im Gegensatz zum „Fast Imaging“ erhält man durch das Auslesen der CCD zu jedem Raumpunkt ein komplettes Spektrum:

$$I(x, y, z, \nu)$$

Hierdurch ist es möglich, verschiedene Ramanbanden auszuwerten. Die nachträgliche Berechnung der Stoffverteilung unter Verwendung verschiedenster Filtermethoden (Maximum, Schwerpunkt oder integrale Intensität der Ramanbande relativ zu einer Basislinie) ist der entscheidende Vorteil dieser Meßmethode gegenüber dem schnelleren „Fast Imaging“. Die zum CRM 200 gehörige Software erlaubt neben diesen Basisfunktionen weitere mathematische Manipulationen der Bilder wie beispielsweise das gemittelte Spektrum aller Spektren, deren Ramanbande oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes liegt.

3.4.2 Limitierungen

Zentrales Element für die Nachweisgrenze eines Stoffes ist, wie oben bereits angedeutet, die Belichtungsdauer. Wie in Abschnitt 2.7 dargelegt, kann das Meßsignal einer Ramanbande durch hinreichend lange Belichtungszeiten das Rauschen des Hintergrundsignals übersteigen und somit detektiert werden. Allerdings ergeben sich hier massive Einschränkungen durch praktikable Meßzeiten. Wurde ein Stoff am Rande seiner Nachweisgrenze bei einer einminütigen Belichtungszeit an einem Meßpunkt detektiert, so benötigt die räumliche Messung der Stoffverteilung in einem Volumen von $1000 \mu\text{m}^3$ bei einer Auflösung von $1 \mu\text{m}^3$ je Voxel knapp 17 Stunden. Um noch ein Zehntel dieses Stoffes im betreffenden Volumen nachzuweisen, erhöht sich die Meßdauer auf fast 70 Tage!

3.4.3 Spektrenauswertung

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, lassen sich die Ramanlinien aus einem Raman-spektrum funktionellen Molekülgruppen bzw. Molekülbindungen zuordnen. Anhand des Bandenlage (siehe Abb. 2.3 auf Seite 16) können bereits zahlreiche Hin-

weise über den Stoff gesammelt werden. So deutet eine ausgeprägte Ramanlinie bei 2850 cm^{-1} auf das Vorhandensein einer symmetrischen Streckschwingung einer Methylengruppe hin: $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$. Findet sich eine weitere Ramanlinie bei 1460 cm^{-1} so wird dieser Verdacht durch die Deformationsschwingung $\delta(\text{CH}_2)$ erhärtet.

Zahlreiche Spektren in den Biofilmen konnten mit Hilfe rechnergestützter Vergleiche anhand von online Datenbanken¹⁰ identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das von der geräteeigenen Software in einem proprietären Format gespeicherte Spektrum zunächst als ASCII-Textdatei exportiert. Anschließend wurde es mit dem Spektralprogramm „SpekWin32“¹¹ in das entsprechende Format konvertiert und auf die Seite des Datenbankanbieters hochgeladen.

3.5 Biofilme

Die mit Hilfe des CRM 200 untersuchten Biofilme stammten hauptsächlich aus Versuchsreaktoren des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik (ISAH) der Universität Hannover. In den Reaktoren werden unter bekannten bzw. gemessenen Zu- und Ablaufbedingungen die Umsatzleistungen der entsprechenden Biofilme bilanziert. Um eine möglichst hohes Maß an Biomasse in den Reaktoren zu erreichen, werden den Bakterien sogenannte Aufwuchskörper aus Polyethylen (PE) zur Verfügung gestellt in denen sich die Mikroorganismen zu Biofilmen anreichern. Die Aufwuchsträger sind zumeist zylindrisch geformt und können in der Mitte Verbindungsstege zur Oberflächenvergrößerung besitzen (siehe nebenstehende Abbildung). Die zu betrachtenden Biofilme des einstufigen Deammonifikationsprozesses werden in speziellen Reaktoren (Volumen ca. 10 Liter) angezüchtet. Zu diesem Zweck werden die Umgebungsbedingungen (Sauerstoff, pH-Wert, Lichtverhältnisse, Temperatur) sowie die Nährstoffzufuhr künstlich an diese Organismen angepaßt, um deren Entwicklung gezielt voranzutreiben. Diese gewünschte Besiedelung der Aufwuchskörper wird durch ein „Animpfen“ des Reaktors mit den entsprechenden Organismen erreicht. Die hierzu notwendige Bakterienkultur stammten aus Versuchsreaktoren der TU Delft (Niederlande).



Abbildung 3.8: Erster Anwuchs eines Biofilmes im Aufwuchskörper

In erster Linie wurden die Biofilme, die zu einer einstufigen Stickstoffeliminierung

¹⁰SpectraOnline von Thermo Galactic: <http://spectra.galactic.com>

¹¹erhältlich unter: <http://www.agdal.chemie.uni-konstanz.de/menges/spekwin/>

rung in der Lage sind, eingehend untersucht. Dazu wurde in regelmäßigen Abständen aus den Betriebsreaktoren Aufwuchsträger mit Biomasse entnommen und in einem speziellen Nährmedium sowie zur Vermeidung der Besiedlung mit phototrophen Organismen im Dunkeln aufbewahrt. In diesem Nährmedium wurden die Aufwuchsträger, von einer Klammer fixiert, auf den Piezotisch des CRM 200 gelegt und vermessen.

Für Fluoreszenz- und Extinktionsmessungen wurde der Inhalt eines Aufwuchsträgers (ca. 30 mm^3 bzw. 0,1 g) zerkleinert und mit 3 ml Wasser in eine Küvette gefüllt. In einem Ultraschallbad wurde dieses Gemisch weiter homogenisiert. Die so erhaltene Lösung konnte dann in einem Zweistrahlspektrophotometer (Uvikon 932, Kontron) bzw. mit Hilfe des oben (siehe Seite 40) beschriebenen Fluoreszenzsystems analysiert werden.

In den Experimenten wurden folgende Biofilme verwendet:

Hochangereicherte ANAMMOX-Bakterienkulturen: Diese wurden gekühlt von der TU Delft bezogen. Da ANAMMOX-Bakterien nicht zu kultivieren sind, werden sie in Reaktoren mit speziell auf ihren Stoffwechsel zugeschnittenen Nährmedien und Umgebungsbedingungen gezüchtet. Es wurden Biofilme aus drei verschiedenen Reaktoren (1-Liter und 10-Liter-Reaktor mit synthetischem ANAMMOX-Medium sowie Austausch von NH_4^+ gegen Harnstoff) untersucht. Der zu einem hohen Prozentsatz (ca. 80%) angereicherte Mikroorganismus Candidatus „*Brocadia anammoxidans*“ gehört der Gruppe der Planktomyceten an.

Einstufige Deammonifikation: In regelmäßigen Abständen wurden aus zwei am ISAH betriebenen Betriebsanlagen AWTs entnommen und mit dem CRM untersucht. Die beiden Reaktoren wurden mit Biomasse aus der Kläranlage Mechernich (Scheibentauchkörper) angeimpft. In der folgenden, anoxischen Phase wurden die Reaktoren mit synthetischem Nährmedium bestehend aus NH_4^+ und NO_2^- betrieben, um eine Anreicherung der vorhandenen ANAMMOX-Bakterien zu erreichen. In den folgenden Betriebsphasen wurde die O_2 -Konzentration in beiden Betriebsreaktoren (MB1 und MB1) sowie die Durchflußrate und NH_4^+ -Konzentration je Reaktor variiert.

FISH-Proben: Es wurden fixierte Biofilme aus den Betriebsreaktoren des ISAH zu Ultradünnschichtpräparaten verarbeitet, die dann an der TU München mit Hilfe der fluoreszenten *in situ* Hybridisierung analysiert worden sind. Dieses auf einem Objektträger befindliche Material wurde ebenfalls mit dem CRM untersucht, wobei gezielt die angefärbten Bereiche betrachtet wurden.

Zulaufstutzen: Die AWT mit angesiedelter Biofilmmasse wurden aus dem Zulaufstutzen entnommen. Die beiden obigen Betriebsreaktoren wurden zur Vermeidung der Ansiedlung von photosynthetisch-aktiven Mikroorganismen mit Aluminiumfolie ummantelt. Die Zulaufstutzen waren dem Umgebungslicht ausgesetzt, so daß sich hier andere Biofilme in und auf dem AWT ausbildeten (photoautotrophe Mikroorganismen).

Nitrifizierender Biofilm: Dieser Biofilm benötigt für seinen Stoffwechsel Sauerstoff, da er das NH_4^+ und NO_2^- oxidiert. Aufgrund der hohen O_2 -Konzentration sind in diesem Biofilm keine ANAMMOX-Bakterien enthalten, so daß er als Gegenreferenz zur ANAMMOX-Bakterienidentifikation herangezogen wurde.

3.6 Reproduzierbarkeit

Die in den nächsten beiden Kapiteln gezeigten Ergebnisse können nur eine Auswahl der im Laufe der Arbeit aufgezeichneten zahlreichen Spektren darstellen. Diese wurden aber unter dem Gesichtspunkt *repräsentativ* ausgewählt. Die Experimente wurden häufig wiederholt, wobei auf Reproduzierbarkeit der Messungen geachtet wurde. Die Parameter (Laserintensität, Belichtungszeit, spektrales Auflösungsvermögen, etc.) wurden unter folgenden Aspekten optimiert:

- keine Zerstörung der Probe durch zu hohe Laserintensität (Vermeidung von Ausbleicheffekten)
- Ausnutzung des Dynamikbereiches der CCD-Kameras
- hohes Signal-/Rauschverhältnis
- Vermeidung von Fremdlicht

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion: Fluoreszenz

Im Vordergrund stehen in diesem Kapitel die Untersuchungsreihen zur Detektion von DDT und „Hylotox 59“ auf Holz. Wie im Material- und Methodenteil näher beschrieben, wurden zunächst die Spektren der Ausgangsstoffe untersucht (Holz, DDT in Methanol gelöst und „Hylotox 59“). Im Anschluß daran werden die Spektren der behandelten Hölzer analysiert. Diese Untersuchungsreihen werden aufgeteilt nach der Natur der Fluoreszenzdetektion (statisch in Kapitel 4.1 bzw. zeitaufgelöst in 4.2).

Diskutiert werden die Einflüsse des Holzes auf das Meßsignal sowie Ausbleich-Effekte bei Strahlungsanregung im UV-Bereich. Nachweisgrenzen wurden insofern nur kurz erörtert, da davon auszugehen ist, daß bei Anwendung von HSM die Herstellerangaben beachtet worden sind. Die so aufgetragene Stoffmenge (siehe Seite 43) liegt um ca. 3 Größenordnungen über dem Grenzwert für unbelastetes Holz.

Als Beispiel für die Möglichkeiten der LIF sind die fluoreszenzspektroskopischen Messungen an Biofilmen (Kapitel 4.4) zu betrachten.

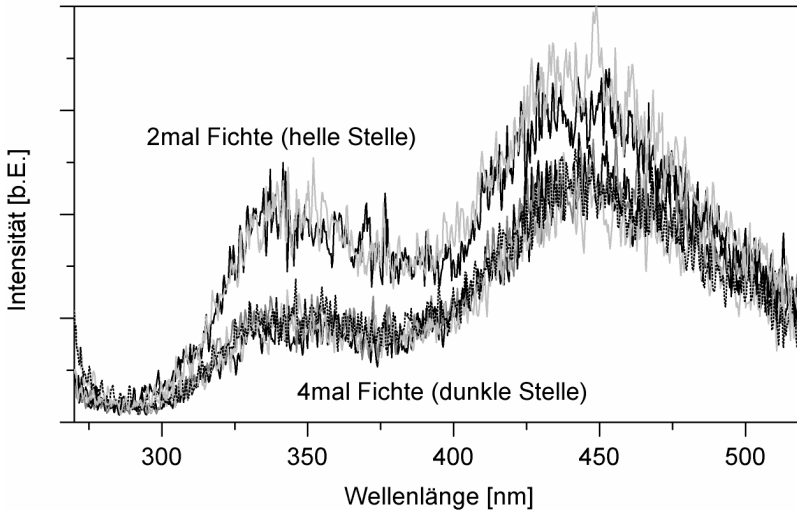


Abbildung 4.1: Fluoreszenzspektren von hellen (beiden oberen Kurven) und dunklen Stellen (unten) des Fichtenholzes, Anregungswellenlänge: 266 nm

4.1 Fluoreszenz (266 nm)

4.1.1 Holz

In ersten vergleichenden Messungen wurde das reine, unbehandelte Holz mit Hilfe der LIF untersucht. Da, wie bereits in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, das HSM „Hylotox 59“ in großen Mengen im Dachstuhlbereich verwendet worden ist, wurden in dieser Arbeit hauptsächlich die dort verarbeiteten Kanthölzer aus Fichten- und Kiefernholz als Trägermaterial für DDT und das HSM verwendet. In den Abb. 4.1 und 4.4 sind die entsprechenden Fluoreszenzspektren bei Anregung mit der Wellenlänge 266 nm zu sehen, die kaum signifikante Unterschiede aufweisen. Die stofflichen Ursachen für die beiden Maxima (342 nm und 440 nm) sind nicht eindeutig zuzuordnen. In der Literatur werden hierfür unterschiedliche Fluorophore verantwortlich gemacht (siehe zusammenfassenden Übersichtsartikel von Olmstead et al. [22]). Für das Maximum im UV-A könnten Proteine (in erster Linie Tryptophan) ursächlich sein, während für das zweite Maximum um 440 nm nach den Arbeiten von Bublitz et al. und Sum et al. [20, 48] Lignin in Frage kommt.

4.1.2 DDT in Methanol

Die Fluoreszenzspektren der ca. einprozentigen DDT-Methanol-Lösungen (Gewichtsprozent) sind in Abb. 4.2 zu sehen. Deutlich erkennbar ist ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 300 nm. Bei einer Anregung mit der Strahlung des frequenzvervierfachen Nd:YAG-Lasers (266 nm) werden nach Untersuchungen des zwei Fluoreszenzbanden angegeben: 295 nm und 365 nm. Die Quantenausbeute dieser Fluoreszenzanregung wird dabei als zufriedenstellend bezeichnet (siehe Tabelle 2.1).

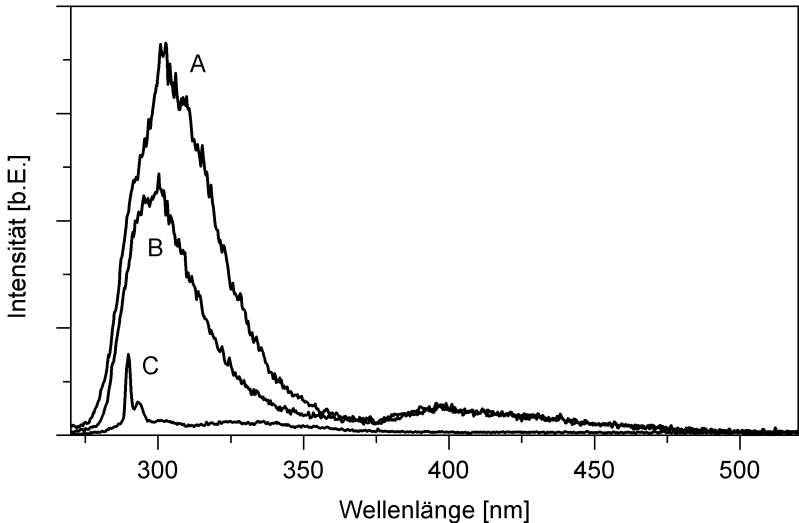


Abbildung 4.2: Vergleich der Fluoreszenzspektren der beiden Isomere des DDTs zu je 1% in Methanol gelöst (A: 2,4'-DDT, B: 4,4'-DDT) und reinem Methanol (C), Anregungswellenlänge: 266 nm

4.1.3 DDT auf Fichte

Im darauffolgenden Experiment wurde die DDT-Methanol-Lösung auf einen Block aus Fichtenholz aufgetragen. Das Methanol verdampfte, und es blieb das kristalline DDT auf der Oberfläche des Holzes übrig. Als interessant bei diesen Messungen ist die Lage des Fluoreszenzmaximums von DDT anzusehen, da das Fluoreszenzspektrum von unbehandeltem Fichtenholz – wie in Abb. 4.1 zu er-

kennen – nicht im Bereich um 300 nm fluoresziert (siehe Abb. 4.2) und so einen leichten Nachweis vermuten läßt.

Tatsächlich konnte das DDT direkt auf dem Fichtenholz aufgrund seiner charakteristischen Signatur detektiert werden (siehe Abb. 4.3). Die verwendeten Stoffmengen entsprachen bei diesen Untersuchungen in etwa den beim Aufstreichen üblichen Konzentrationen von ca. $1-10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$.

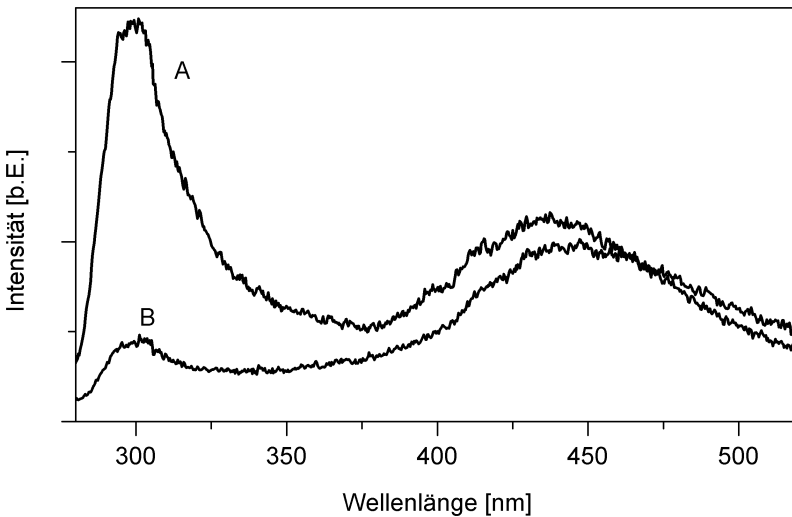


Abbildung 4.3: Fluoreszenzspektrum von DDT auf Fichte (A) und Zerstörung von DDT auf Fichte nach 1000 Laserpulsen (B, Energie pro Puls: 1 mJ), Anregungswellenlänge: 266 nm

Durch die energiereiche Bestrahlung und hohen Intensitäten kommt es zu einem "Ausbleicheffekt". Die Zerstörung des DDTs nach ca. 1000 Laserpulsen (Energie: 1 mJ) auf der Holzoberfläche ist in der Abb. 4.3 deutlich zu erkennen. Dieser Effekt ließ sich auch bei weiteren Substanzen beobachten (Holz und "Hylotox 59" – Abb. 4.4). In der Literatur wurde dieses Ausbleichen ebenfalls gemessen und einer Photodegradation der Fluorophore zugeschrieben, die aufgrund der intensiven Laserbestrahlung im UV dissoziieren [20].

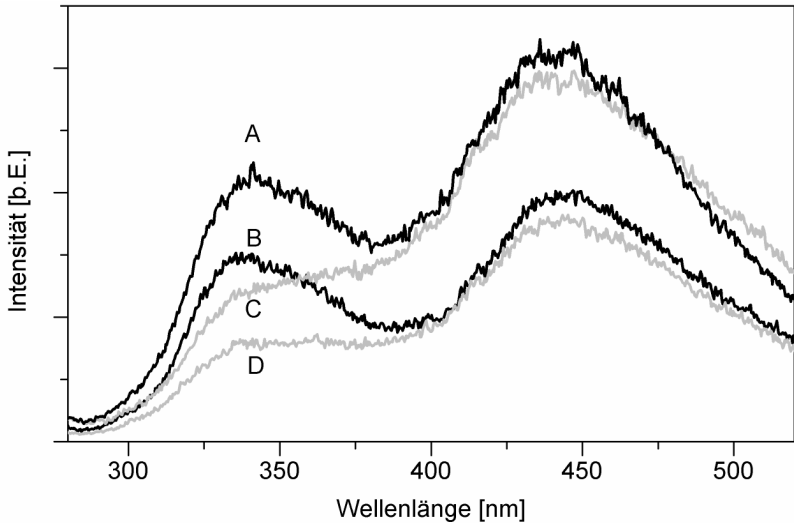


Abbildung 4.4: “Ausbleichen” der UV-Fluoreszenz von unbehandeltem Kiefernholz nach intensiver Laserbestrahlung (A, B: helle bzw. dunkle Stelle; C, D - die entsprechende Stelle nach 1000 Laserpulsen mit 1 mJ). Anregungswellenlänge: 266 nm

4.1.4 Holzschutzmittel „Hylotox 59“

In einer ersten Meßreihe wurde die reine Substanz in einer Küvette untersucht. Das Fluoreszenzlicht wurde in dieser Anordnung senkrecht zum Strahlverlauf des Lasers durch die Küvette gemessen. Wie beim Wirkstoff DDT ist auch in diesen Messungen ein charakteristischer Peak zu erkennen (Abb. 4.5), der aber im Gegensatz zur DDT-Methanol-Lösung eine Verschiebung um ca. 30 nm in den roten Bereich aufweist. Dies ist durch die unterschiedlichen Stoffe (Lösungsmittel, Duft- und Farbstoffe, Öle, Wachse, etc.) in diesem Holzschutzmittel bedingt. Interessant an Abb. 4.5 ist die Superposition der Spektren. Desweiteren ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß Lindan mit Licht der Wellenlänge 266 nm nicht zum Fluoreszieren gebracht werden kann.

4.1.4.1 „Hylotox 59“ auf Fichte

Das Holzschutzmittel "Hylotox 59" wurde mit einem Pinsel auf das Fichtenholz aufgetragen, so daß man von einer üblichen Auftragsmenge des Stoffes ausgehen

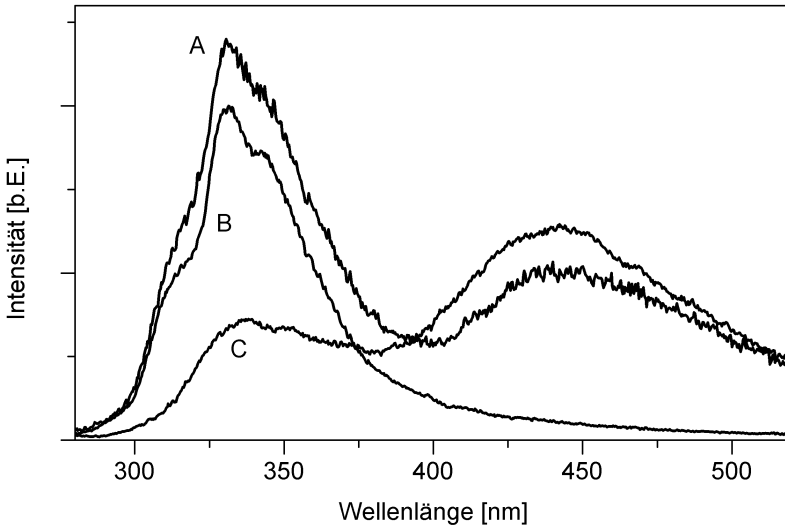


Abbildung 4.5: Vergleich der Fluoreszenzspektren von reinem "Hylotox 59" (B), unbehandeltem Fichtenholz (C) und mit "Hylotox 59" bestrichener Fichte (A), Anregungswellenlänge: 266 nm

kann. Nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden wurde die Probe analysiert. Das aufgezeichnete Fluoreszenzspektrum ist ebenfalls in Abb. 4.5 im direkten Vergleich mit der reinen Substanz sowie unbehandeltem Fichtenholz zu sehen. Die charakteristische Fluoreszenzsignatur von „Hylotox 59“ tritt im Vergleich zu unbehandelter Fichte deutlich hervor.

4.1.4.2 Nachweisgrenze „Hylotox 59“ auf Fichte

Zum Zweck der Abschätzung der Nachweisgrenze wurden Experimente mit verdünntem „Hylotox 59“ durchgeführt. Dabei wurde in etwa dieselbe Menge der verdünnten Flüssigkeit auf dem Holzstück aufgebracht wie in den vorherigen Experimenten (ca. $500 \text{ ml} \cdot \text{m}^{-1}$). In Abb. 4.6 ist deutlich zu sehen, daß eine 2%ige „Hylotox 59“-Lösung sich noch deutlich vom Holzuntergrund abhebt. Jede einzelne der gezeigten Messungen ist das Mittel aus fünf verschiedenen Meßpunkten auf derselben Probe. Die Spektren wurden auf das Fluoreszenzmaximum des Holzuntergrundes bei 440 nm normiert. Die Laserenergie betrug ca. 2 mJ.

Entsprechen dem in Kapitel 3.3 auf Seite 43 dargelegten Umrechnung der Stoffkonzentration ergibt sich als Nachweisgrenze für die fluoreszenzspektroskopie

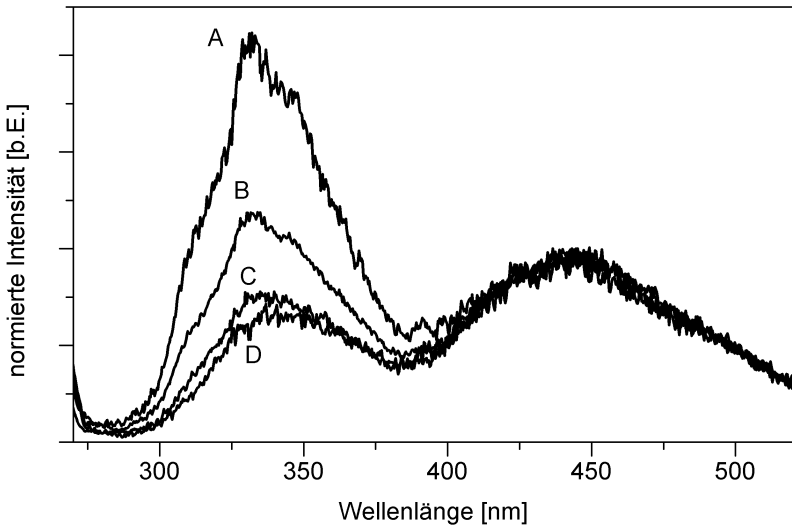


Abbildung 4.6: Fluoreszenzspektren von mit Methanol verdünntem „Hylotox 59“: Verhältnis 1:10 (A), 1:50 (B), 1: 100 (C), unbehandeltes Fichtenholz (D). Die Spektren wurden auf die Intensität der Holzfluoreszenz bei 440 nm normiert. Anregungswellenlänge: 266 nm

sche Detektion des HSM „Hylotox 59“ auf Holz ein Wert von $144 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-1}$ (bzw. $48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Dieser Zahlenwert liegt somit etwa eine Größenordnung oberhalb des Grenzwertes von $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

4.1.5 Wiederholung der Messungen

Die Holzproben aus obigen Untersuchungen wurden ein zweites Mal nach ca. zwei Jahren untersucht. Aufgrund der Langlebigkeit von DDT sowie dem Anspruch eines HSM über mehrere Jahre hinweg einen effektiven Schutz zu bieten, sollten sich eindeutige Fluoreszenzspektren ergeben. Die in Abb. 4.7 dargestellten Spektren von behandeltem Fichtenholz bestätigten diese Vermutung (Spektrum A: 2,4'-DDT, Spektrum B: „Hylotox 59“). In beiden Fällen sind die charakteristischen Emissionsspektrum wiederzufinden. Angenommen, die Proben wären nicht beschriftet worden, so könnte eine Zuordnung der unbekanntenen Probe zu dem aufgetragenen Stoff anhand dieser Spektren ohne weiteres durchgeführt werden.

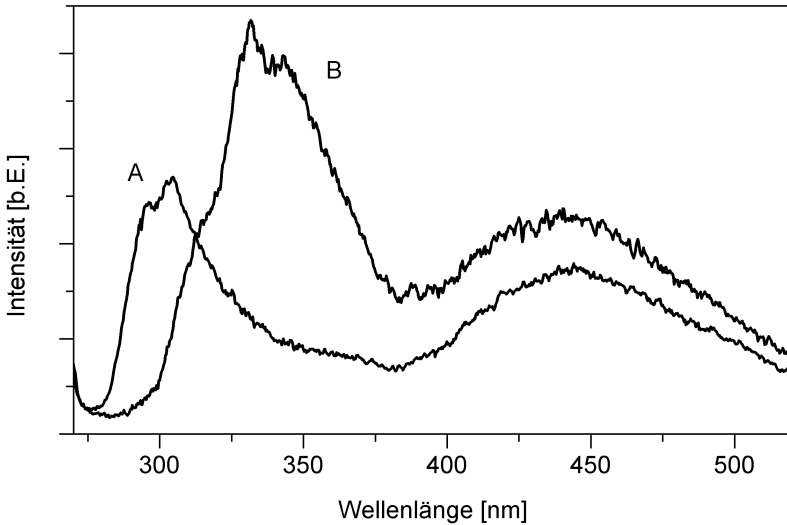


Abbildung 4.7: Fluoreszenzmessung zwei Jahre später an denselben Holzproben. 2,4'-DDT auf Fichtenholz (A), „Hylotox 59“ auf Fichtenholz (B). Anregungswellenlänge: 266 nm

4.2 Fluoreszenz (337 nm)

Neben den Messungen mit Hilfe des Laboraufbaus konnten weitere Messungen mit Hilfe eines mobilen Laserfluoreszenz-Systems durchgeführt werden. Die Wellenlänge des N_2 -Anregungslaser beträgt 337 nm. Die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm liegt in der Größenordnung der oben präsentierten Anregung mit Strahlung der Wellenlänge 266 nm [24], so daß die entsprechende Fluoreszenzbande von DDT bei 415 nm auch bei einer etwas kurzwelligeren Anregung durch den N_2 -Laser zu erwarten sein sollte. Dies konnte bei Messungen mit dem mobilen Laserspektrometer an den DDT-Methanol-Lösungen auch gezeigt werden (Abb. 4.8).

Die ergänzenden Messungen mit Hilfe des mobilen Systems lieferten allerdings keine eindeutige Identifizierung des DDT-Peaks bei 415 nm. Es konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden: Bei einigen Experimenten war ein Peak zu sehen (Abb. 4.8), bei anderen nicht. Dies läßt auf eine ungleichmäßige DDT-Verteilung bzw. -kristallisation bei der Methanolverdampfung schließen. Bei den hier durchgeführten Messungen handelte sich um dieselbe Probe wie bei der Anregung mit dem vervierfachen Nd:YAG-Laser.

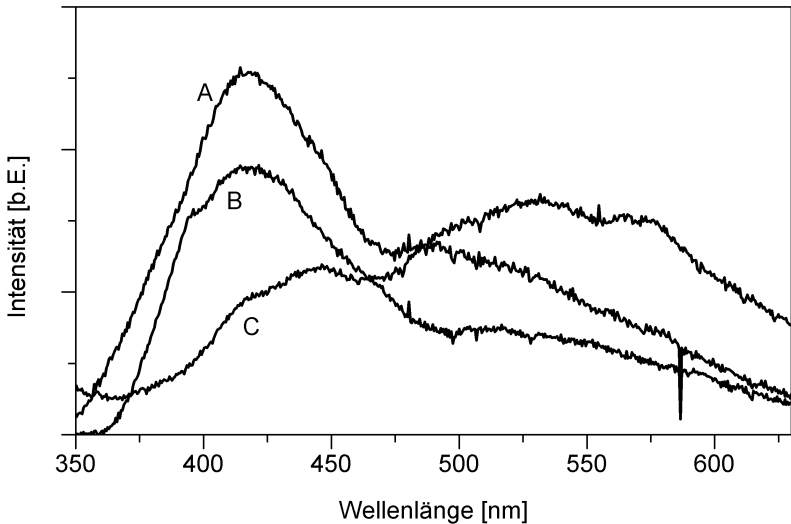


Abbildung 4.8: Fluoreszenzspektrum von DDT in Methanol (B) sowie DDT auf Fichtenholz (A) im Vergleich zu unbehandelter Fichte (C), Anregungswellenlänge: 337 nm

Die hier nicht gezeigten Messungen an Holzproben, die mit „Hylotox 59“ behandelt worden sind, ergaben ebenfalls keine Möglichkeit, das HSM auf dem Holz mit Hilfe der Anregungswellenlänge von 337 nm zu detektieren. Betrachtet man die Absorptionsspektren in der Abb. 3.4 auf Seite 41 so wird deutlich, daß DDT als auch „Hylotox 59“ einen wesentlich geringeren Absorptionskoeffizienten bei dieser Anregungswellenlänge besitzen – ganz im Gegensatz zur Anregung im UV-C. Desweiteren besitzt das verwendete mobile System nur ca. 10% der Laserleistung des Laboraufbaus. Ferner wurden die Spektren mit einer konventionellen CCD-Kamera aufgenommen (im Vergleich zur bildverstärkenden ICCD). Dies erklärt die negative Ergebnisse dieser Meßserie.

Eine weitere Messung mit Hilfe dieses Systems sollte die Variation des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des Feuchtegrades vom Holz abschätzen. Dies geschah in Hinsicht auf die unterschiedlichen Witterungsverhältnissen, die auf einem Betriebshof für Altholz auftreten können. Als Ergebnis zeigte sich, daß keine starken Änderungen im Holzspektrum auftreten (Abb. 4.9).

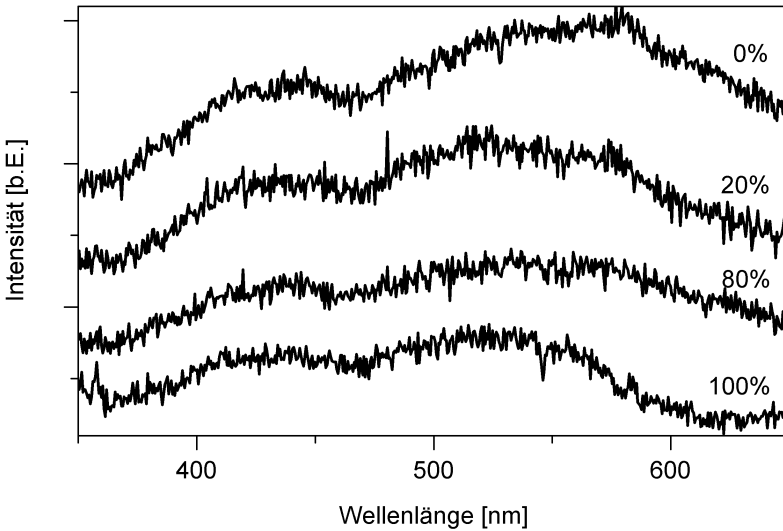


Abbildung 4.9: Fluoreszenzspektren von Fichtenholz unterschiedlichen Feuchtegrades, Anregungswellenlänge: 337 nm

4.3 Zeitaufgelöste LIF

In den folgenden Meßreihen wurde mit Hilfe der kurzen Verschlusszeit der ICCD-Kamera das Fluoreszenzabklingverhalten der unterschiedlichen Stoffe untersucht und gegebenenfalls die Zerfallskonstante bestimmt.

4.3.1 Fichte

Zunächst wurde das zeitliche Fluoreszenzverhalten von Fichtenholz bestimmt. Wie in Abb. 4.10 auf Seite 66 zu sehen, ist dieses durch eine sehr kurze Abklingzeit unterhalb der Meßbarkeitsgrenze des verwendeten Systems gekennzeichnet. Letztere liegt im Bereich von 1–2 ns. Da Tryptophan eine längere Abklingzeit besitzt (3,4 ns, aus: [42]) ist die auf Seite 56 geäußerte Vermutung, daß die Fluoreszenz um 340 nm von Proteinen verursacht wird, nicht haltbar.

4.3.2 „Hylotox 59“

Die Fluoreszenz des in einer Küvette befindlichen Holzschutzmittels wurde senkrecht zur Einstrahlrichtung des Anregungslasers vermessen (im Gegensatz zur Festkörperanordnung, Abb. 3.5 auf Seite 42). Die aus der Abklingkurve bestimmte Abklingzeit der Fluoreszenz liegt bei $5,0 \pm 0,1$ ns. Dieser im Vergleich zu unbehandeltem Fichtenholz höhere Wert ist auch deutlich in den Fluoreszenzprofilen und in der 3D-Darstellung zu erkennen.

4.3.3 „Hylotox 59“ auf Fichte

In dieser Meßreihe wurde die mit dem Holzschutzmittel bestrichene Holzprobe und bereits fluoreszenzspektroskopisch vermessene Probe (siehe Abb. 4.5) nochmal dynamisch, also zeitaufgelöst analysiert. Vergleicht man die 3D-Darstellungen von unbehandelter Fichte (Abb. 4.10) und reinem "Hylotox 59" (Abb. 4.11) so ist eine Addition dieser Spektren erkennbar und der „Hylotox 59“-Peak um 330 nm tritt in Abb. 4.12 auf Seite 68 deutlich hervor. Die aus der exponentiellen Anpassung bestimmte Abklingzeit der Fluoreszenz ist etwas kürzer als die des reinen "Hylotox 59" und liegt bei ca. $4,7 \pm 0,1$ ns.

Als Ergebnis aus diesen Messungen kann man somit einen weiteren Parameter zur Identifizierung der Schadstoffe heranziehen. Allerdings ist damit ein recht hoher instrumenteller Aufwand verbunden, der der Vorgabe einer preisgünstigen Schnellanalytik entgegensteht. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die vor allem ökonomisch arbeitenden Industriebetriebe.

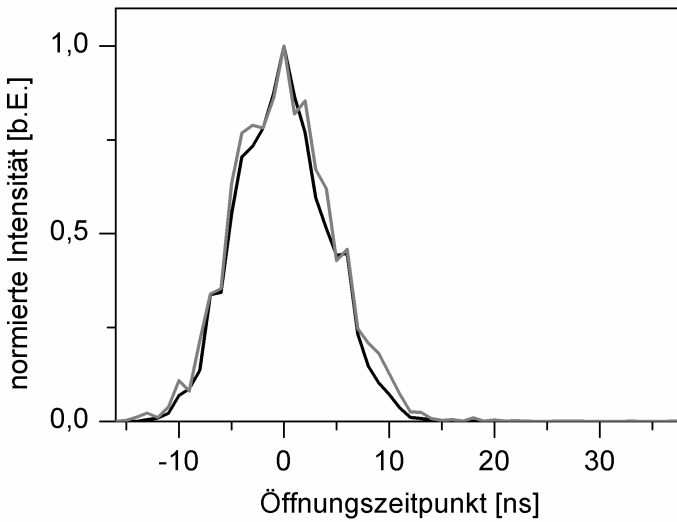
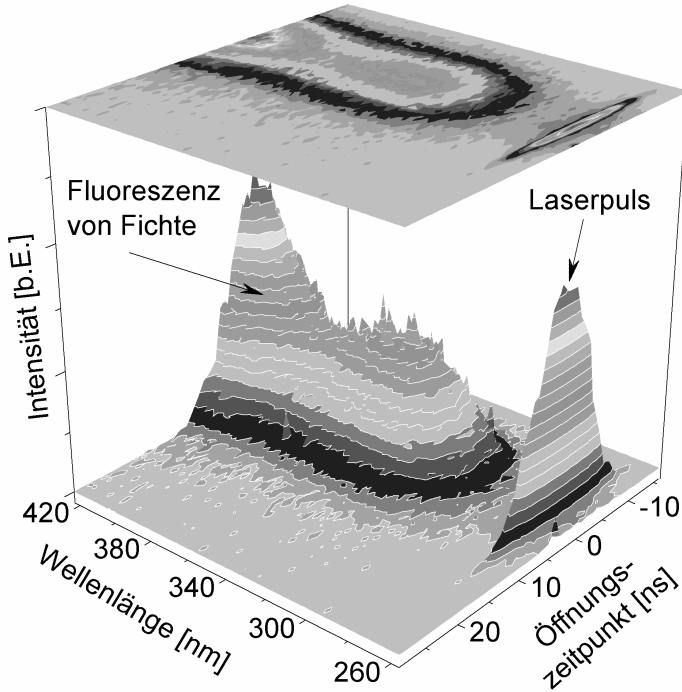


Abbildung 4.10: Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von Fichtenholz. Untere Abb.: Schnitt bei 266 nm (schwarz) sowie bei 340 nm (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm

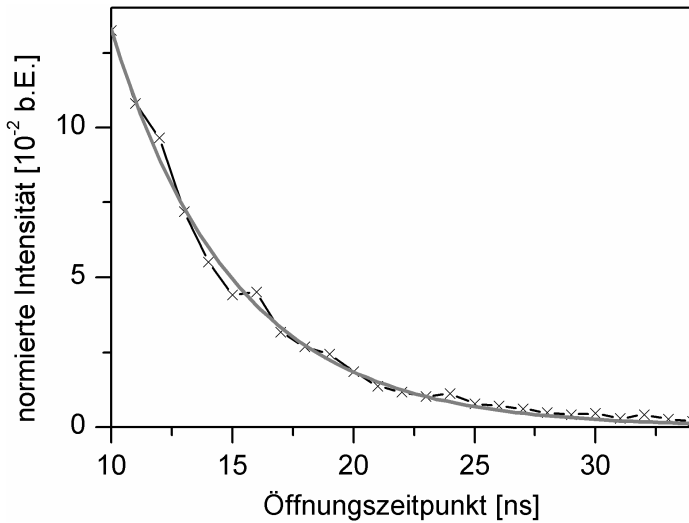
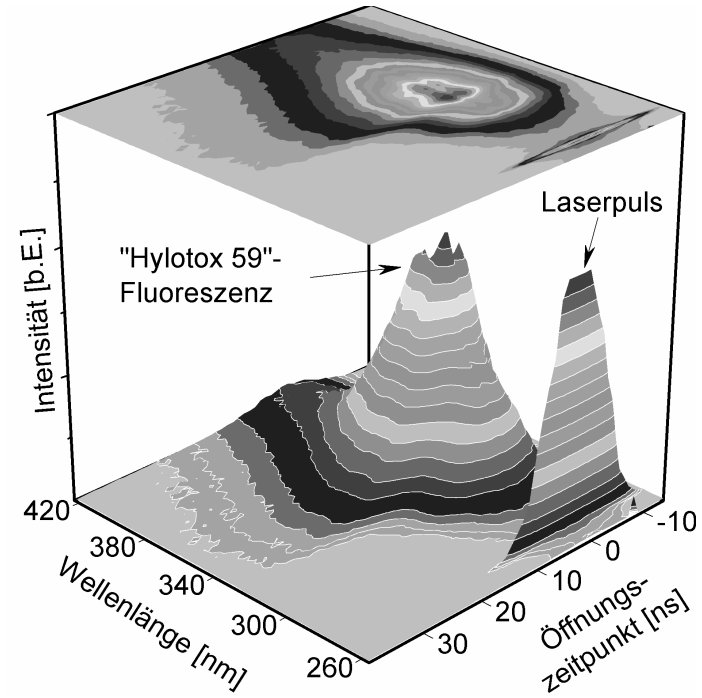


Abbildung 4.11: Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von "Hylotox 59". Untere Abb.: Schnitt bei 343 nm (—X—) sowie exponentielle Anpassung (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm

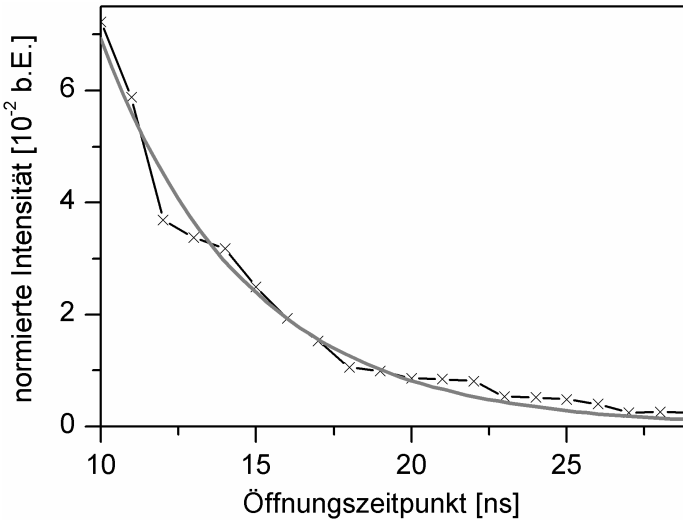
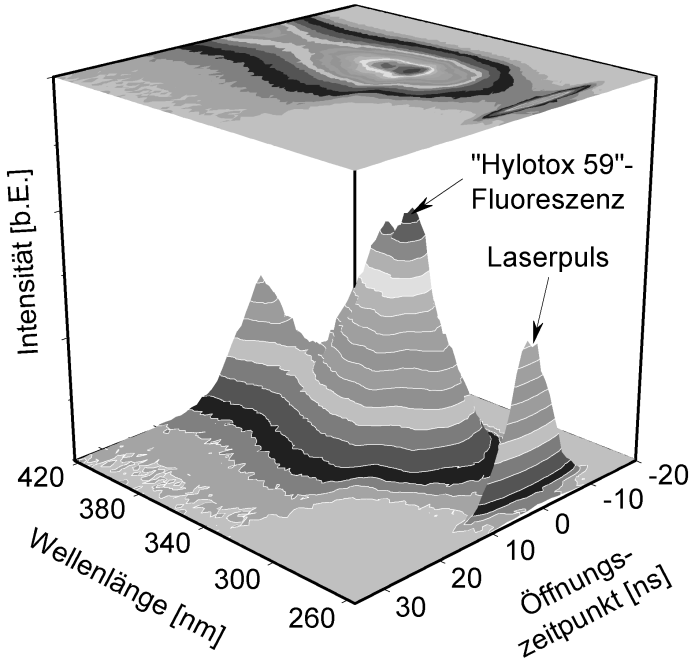


Abbildung 4.12: Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von "Hylotox 59" auf Fichtenholz. Untere Abb.: Schnitt bei 343 nm (—X—) sowie exponentielle Anpassung (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm

4.4 Biofilm und Schlamm

Ergänzend zu den im nächsten Kapitel präsentierten Ergebnissen der konfokalen Ramanmikroskopie an Biofilmen, wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen auch an einigen Proben durchgeführt. In erster Linie geschah dies zur Dokumentation der Schwierigkeit einer stofflichen Zuordnung biologischen Materials bei der Abwasseranalytik mit Hilfe der LIF. In Abb. 4.13 sind die Ergebnisse dreier verschiedener Proben dargestellt:

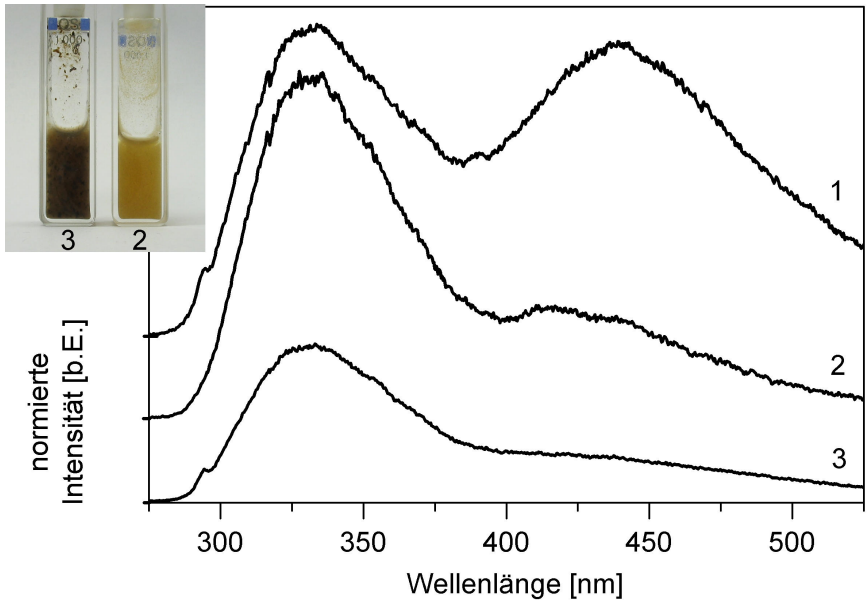


Abbildung 4.13: Fluoreszenzen von: Schlamm aus Versuchsreaktor zur einstufigen Deammonifikation der Kläranlage Herrenhausen (1), Schlamm aus Versuchsanlage der Kläranlage Osnabrück (2), homogenisierter Biofilm aus Versuchsreaktor Kläranlage Herrenhausen (3). Anregungswellenlänge 266 nm. Spektren sind auf Laserintensität normiert.

1. Schlamm aus der Versuchsanlage zur einstufigen Deammonifikation an der Kläranlage in Herrenhausen (Hannover) inklusive Abwasser
2. Schlamm aus der Versuchsanlage zur einstufigen Deammonifikation an der Kläranlage in Osnabrück inklusive Abwasser

3. homogenisierter Biofilm (siehe Seite 52) aus einem Aufwuchsträger von 1.

Da die Schwebstoffe schnell sedimentieren, wurden die Küvetten direkt vor der Messung kräftig geschüttelt. Die Spektren sind auf die Laserintensität normiert, wodurch sich die Fluoreszenzintensitäten untereinander zumindest qualitativ vergleichen lassen. Allerdings muß eine quantitative Aussage unterbleiben, da die vorhandene Stoffmenge im Meßfleck rein willkürlich ist.

Alle drei Kurven zeigen eine ausgeprägte Fluoreszenz im typischen Proteinbereich um 340 nm, die auf die Aminosäure Tryptophan zurückzuführen ist. Je nach Protein kann das Fluoreszenzmaximum des Tryptophans im Bereich um 332–342 nm liegen (reines Tryptophan: 350- 360 nm). Für eine eindeutigere Zuordnung würde die Zerfallskinetik der Fluoreszenz in diesem Bereich weiterhelfen (siehe Seite 64). Ferner erkennt man im Vergleich zu den anderen beiden Spektren eine deutliche Fluoreszenz in der Kurve 1 um 439 nm, die auf einen hohen Anteil an Gelbstoffen (organische Abbauprodukte) im Abwasser schließen läßt. Bei der Schulter in den Kurven 1 und 3 bei ca. 294 nm handelt es sich um die Ramanbande (OH) von Wasser.

4.5 2-Photonen-Anregung

Eine interessante Messung ergab sich durch den Nachweis von photoautotrophen Organismen in einer hochangereicherten ANAMMOX-Kultur von der TU Delft (Kurve 2 in Abb. 4.14). Zur Referenzierung wurde ein Chlorophyllextrakt eines Efeublattes in einer Acetonlösung hergestellt (Kurve 1). Während das Extrakt die typischen Fluoreszenzmaxima von Chlorophyll a bei 680 nm bzw. 730 nm aufweist, ist das Maximum der Algenfluoreszenz um ca. 10 nm in den langwelligen Bereich verschoben. Da Algen unterschiedlichste Pigmente (Carotinoide, Xantophylle, etc.) besitzen, ist diese Verschiebung nicht ungewöhnlich.

Diese Messung ist aus zweierlei Sicht erwähnenswert: Zum einen handelt es sich um eine sogenannte 2-Photonen-Anregung der Fluoreszenz, da sie im Vergleich zur Wellenlänge des anregenden Lasers im kurzwelligeren Bereich auftritt. Zum anderen konnte über die Chlorophyllfluoreszenz gezeigt werden, daß photoautotrophe Organismen auch in den Reaktoren zur Anreicherung der ANAMMOX-Bakterien nachzuweisen sind. Aufgrund des spezifischen Mediums sowie den Betriebsparametern zur spezifischen Anreicherung (eigentlich sollte der Reaktor zur Vermehrung weitestgehend lichtdicht sein, damit das Wachstum photoautotropher Organismen unterbunden wird) ist dieses Ergebnis interessant.

Die 2-Photonen-Anregung bedeutet, daß das Chromophor zwei Photonen zeitgleich aufgenommen hat. Da das Zeitfenster für diesen Prozeß außergewöhnlich

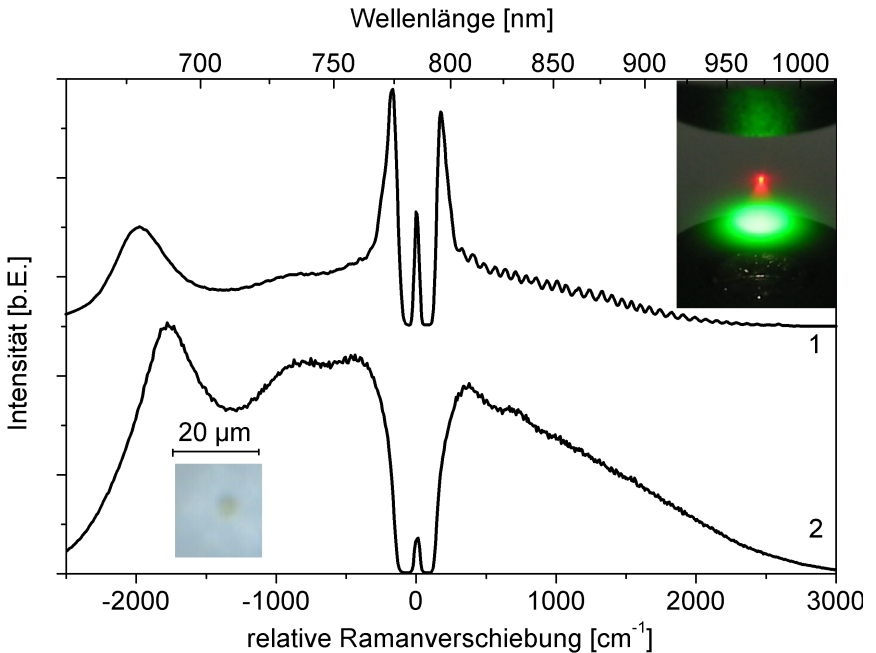


Abbildung 4.14: Chlorophyllfluoreszenz nach 2-Photonen-Anregung: Chlorophyllextrakt (1), Alge in ANAMMOX-Biofilm (2). Anregungswellenlänge 784,6 nm

kurz ist (einige fs) ist dieser äußerst unwahrscheinlich und tritt nur bei sehr hohen Photonenflußdichten auf, wie sie im Fokus (Durchmesser unter $1 \mu\text{m}$) der Laserstrahlung auftreten. Ähnlich der gezielten Anregung in der Anregungs-Emissions-Spektroskopie lassen sich sehr genau Molekülübergänge induzieren (im obigen Beispiel der Übergang $S_0 \rightarrow S_4$ von Chlorophylla). Allerdings bietet die 2-Photonen-Anregung den Vorteil, daß diese nur in einem sehr kleinen Bereich (im Fokus) geschieht, während andere Bereiche der Probe unbehelligt bleiben. Somit können bereits hohe Ortsauflösungen ohne Konfokalität erreicht werden. Desweiteren kommt es auch nicht zu Photodegradationseffekten in weiten Teilen der Probe, da die Photonenenergie dazu nicht ausreicht (siehe Holzergesultate). Farbmoleküle (bspw. bei der FISH+CLSM) bleichen somit wesentlich langsamer aus. Diese Art der Spektroskopie wird daher als ein vielversprechendes Werkzeug bei der Untersuchung der Proteinfluoreszenz eingesetzt, die normalerweise eine Anregung im UV-B (280 nm) erforderlich macht [49].

4.6 Zusammenfassung

Die präsentierten Fluoreszenzuntersuchungen, deren vorrangiges Ziel die Detektion von DDT und DDT-haltigen HSM auf Altholz war, zeigen deutlich, daß bereits mit Hilfe der Fluoreszenzanregung im UV-C (266 nm) der Nachweis der Stoffe direkt auf Holz gelingt. Eine multidimensionale Analyse (zeitaufgelöst oder nach Anregungswellenlänge), die in jedem Fall einen höheren apparativen Aufwand bedeutet, ist dadurch nicht erforderlich. Dieses positive Ergebnis konnte jedoch nur aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzbanden der beteiligten Stoffe (DDT, „Hylotox 59“ und Holz) erzielt werden. Durch die zeitaufgelösten Experimente konnte ein weiterer Parameter zur eindeutigeren Identifizierung von „Hylotox 59“ gewonnen werden.

Die Schwierigkeit der Fluoreszenzspektroskopie bei der stofflichen Identifikation aufgrund spektral breiter Signaturen konnte in den Experimenten am Biofilm gezeigt werden. Zwar lassen sich grob die Bereiche der Proteinfluoreszenz von der der Gelbstoff- und Chlorophyllfluoreszenz unterscheiden. Eine Zuordnung allerdings um welche Alge z.B. es sich handelt, kann ohne Hilfsmittel (Gensonden, Fluoreszenzmarker) nicht erfolgen. Eine vielversprechende Möglichkeit diesbezüglich soll im folgenden näher betrachtet werden.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion: Ramanmikroskopie

Die mit Hilfe des konfokalen Ramanmikroskopes gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse der Experimente an verschiedenen Biofilmen werden in diesem Kapitel dargestellt und diskutiert. Die sich im Verlaufe der Messungen ergebenden Einschränkungen und neuen Möglichkeiten werden präsentiert. Insbesondere gelang der nichtinvasive online Nachweis des ANAMMOX-Bakteriums über dessen spektrale Schwingungssignatur unter Verwendung eines konfokalen Ramanmikroskopes.

Die vorrangige Meßaufgabe bestand in der orts aufgelösten Analyse der Stoffprofile von NH_4^+ und NO_2^- im Biofilm im μm -Maßstab. Von besonderem Interesse waren tiefenaufgelöste Messungen. Die Konzentrationsbestimmung soll helfen, den Stoffwechsel der anaeroben Ammoniumoxidierer besser zu verstehen. Hierzu war es notwendig, zahlreiche Biofilme zu vermessen. Im Laufe der Analysen zeigte sich, daß Biofilme ein über das Volumen verteiltes unspezifisches Spektrum besitzen, welches den Konzentrationsnachweis der gelösten Stoffe erschwerte. Dieses typische Signal besaßen alle untersuchten Biofilme. Die im Laufe der zahlreichen Messungen gefundenen Ramanbanden im Biofilm werden anschließend betrachtet. Neben mineralischen bzw. auskristallisierten Stoffen wurden auch mehrere organische Verbindungen gefunden. Diese Messungen zeigen eindeutig das Potential der konfokalen Ramanmikroskopie hinsichtlich der nichtinvasiven online Detektion von Bakterien. Ein Blick in die Literatur zu diesem Thema zeigt, daß zwar medizinisch relevante Bakterien mit Hilfe der Schwingungsspektroskopie (FT-IR und FT-Raman) identifiziert werden können, die Meßtechnik der konfoka-

len Ramanmikroskopie allerdings bislang noch nicht an abwasserrelevanten Biofilmen eingesetzt worden ist.

Der Begriff „Biofilm“ wird im Folgenden allgemein für Konglomerate aus Mikroorganismen benutzt und bezieht sich nicht ausschließlich auf den Spezialisten der einstufigen Deammonifikation (dieser ist in Abb. 5.1 zu sehen). Wo es für die Messung wichtig ist, wird explizit der Biofilmtyp angegeben.

Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind zum größten Teil mit dem in 3.4 erläuterten konfokalen Ramanmikroskop CRM 200 erzielt worden. Dieses war mit einem Diodenlaser (784,6 nm) als Anregungsquelle ausgestattet. Daher wird auf die Angabe der Anregungswellenlänge weitestgehend verzichtet und nur angegeben, falls Resultate nicht mit diesem System erzielt worden sind.

5.1 Geräteparameter

Das in den Untersuchungsreihen verwendete konfokale Ramanmikroskop CRM 200 ist ein kommerziell erhältliches Instrument (siehe 3.4). Aufgrund seiner Erweiterungsmöglichkeiten (Mikroskopobjektive, Filtereinsätze, Anregungswellenlängen) wurden zunächst die technischen Leistungsangaben (laterales und axiales Auflösungsvermögen, Quanteneffizienz des optischen Systemes, usw.) des Herstellers verifiziert. Bei diesen vorbereitenden Messungen wurden auch die Intensitätsschwankungen und die Wellenlängenstabilität des Lasers bestimmt, die für die quantifizierenden Ramanmessungen wichtig sind.

Das Gerät war zunächst mit einer IR-optimierten CCD-Kamera der Firma Roper Scientific (SPEC-10) bestückt. Zwar besitzt diese Kamera auch im Bereich oberhalb von 1000 nm eine noch ausreichende Quanteneffizienz zur Photonendetektion. Allerdings weist sie aufgrund ihrer Bauweise („Back-Illuminated“) einen ausgeprägten Etalon-Effekt ab ca. 750 nm auf. Insbesondere bei kontinuierlichen Spektren macht sich dieser Effekt äußerst negativ bemerkbar, während Linienspektren, wie sie in der Ramanspektroskopie vorkommen, zumindest qualitativ nicht so stark betroffen sind. Aus diesem Grund wurde im Laufe der Experimente die Kamera ausgetauscht. Der CCD-Chip der neuen Kamera (Andor DU401-BRDD) besitzt eine größere Verarmungszone („Deep Depletion“), so daß auch der Chip eine größere Dicke aufweisen kann und somit den Etalon-Effekt effektiv reduziert.

Neben den bereits vorgestellten Fluoreszenzmessungen (Kapitel 4.4) wurden auch Extinktionsuntersuchungen an verschiedenen Biofilmen vorgenommen. Hierzu wurden die homogenisierten Biofilme im Zweistrahlphotometer analysiert. Als Referenz diente eine wassergefüllte Küvette. Mit Blick auf die späteren tiefenaufgelösten Messungen im Biofilm und der Anforderung, die anaeroben Zonen bis zu

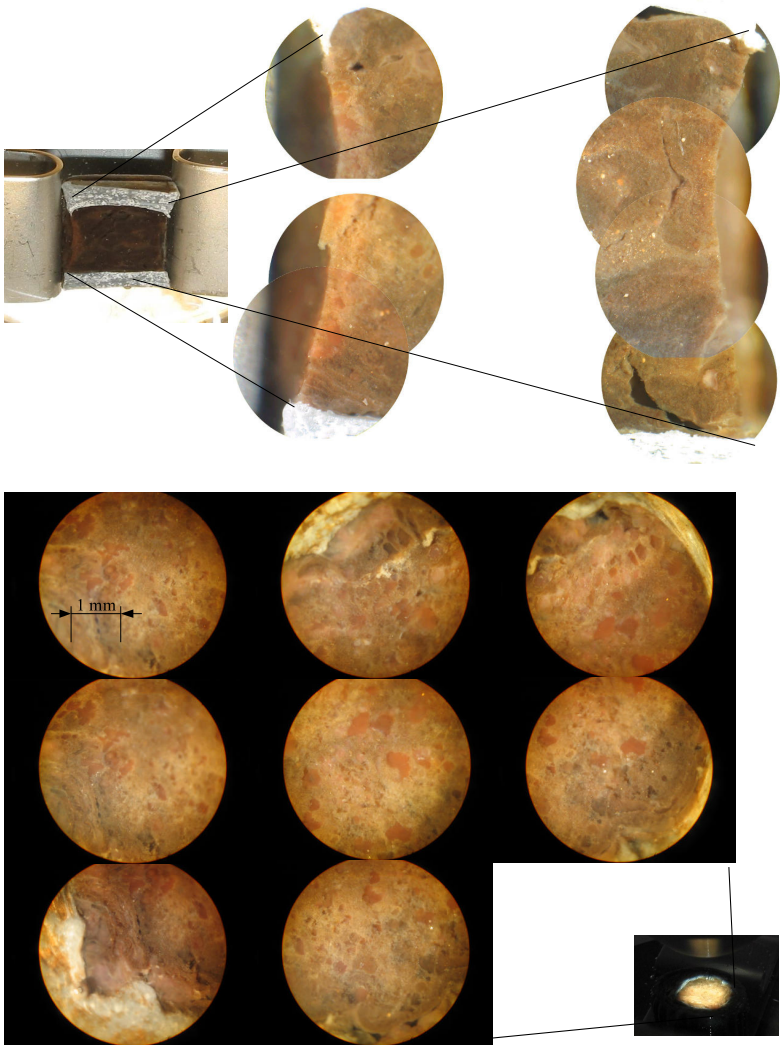


Abbildung 5.1: Oben: Längsschnitt durch Aufwuchsträger (AWT) mit Biofilm und mikroskopische Aufnahme (Biofilmfläche: ca. $7 \times 10 \text{ mm}^2$. Vergrößerung: 63x). Unten: Aufsicht auf die heterogene Biofilmstruktur (AWT aus Versuchsanlage).

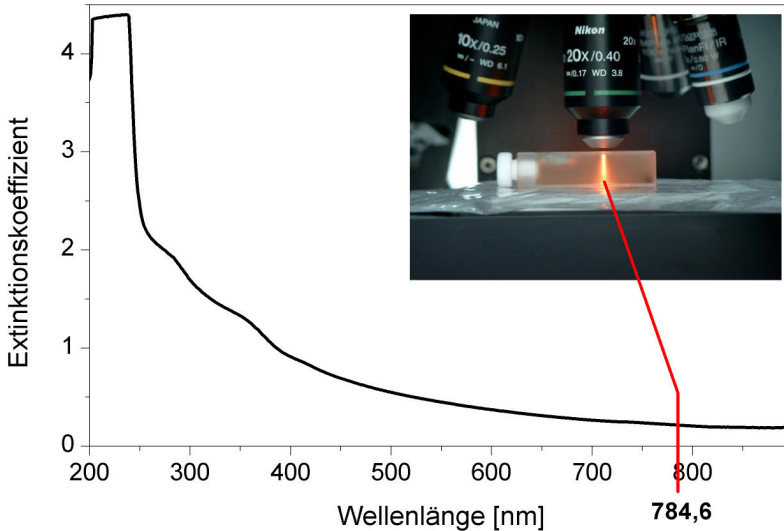


Abbildung 5.2: Extinktionskurve eines in Wasser aufgelösten Biofilmes. Gemessen in Zweistrahlphotometer.

1 mm Tiefe zu untersuchen, wird aus Abbildung 5.2 ersichtlich, daß die gewählte Wellenlänge von 784,6 nm hierfür sehr geeignet ist.

5.1.1 Wellenlängenstabilität

Die Frequenzstabilität eines Lasers ist bei Ramanspektroskopischen Messungen ein entscheidendes Kriterium, da der Meßwert relativ zu der Laserlinie angegeben wird. Ein Springen der Laserlinie würde zu falschen Ergebnissen (Verbreiterung der Ramanbande bei langen Belichtungszeiten, falscher Wert bei kurzen) führen. Laut Herstellerangaben besitzt der verwendete Diodenlaser eine Wellenlängenstabilität von $\pm 0,08 \text{ nm}$ (entsprechend $\pm 1,3 \text{ cm}^{-1}$). Eine Messung über 1000 Einzelspektren (Meßdauer 45 Minuten) der Laserlinie (784,6 nm) bestätigte dies: Ein Abweichen der Emissionswellenlänge des Lasers von diesem Wert konnte in diesem Zeitraum nicht beobachtet werden (das von Diodenlasern bekannte „Mode Hopping“ lag unterhalb der Auflösungsgrenze des verwendeten Gitterspektrometers mit $1200 \text{ Linien} \cdot \text{mm}^{-1}$). Die spektrale Bandbreite der Laserstrahlung beträgt weniger als 10 MHz.

Die Genauigkeit der Angabe der Wellenzahl für eine Ramanlinie ist abhängig von

der durchgeführten Kalibrierung des Gitterspektrometers sowie des verwendeten Gitters. Die Kalibrierung wurde mit Hilfe einer ArHg-Kalibrierlampe vorgenommen. Der absolute Fehler beträgt in den folgenden Messungen maximal $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$.

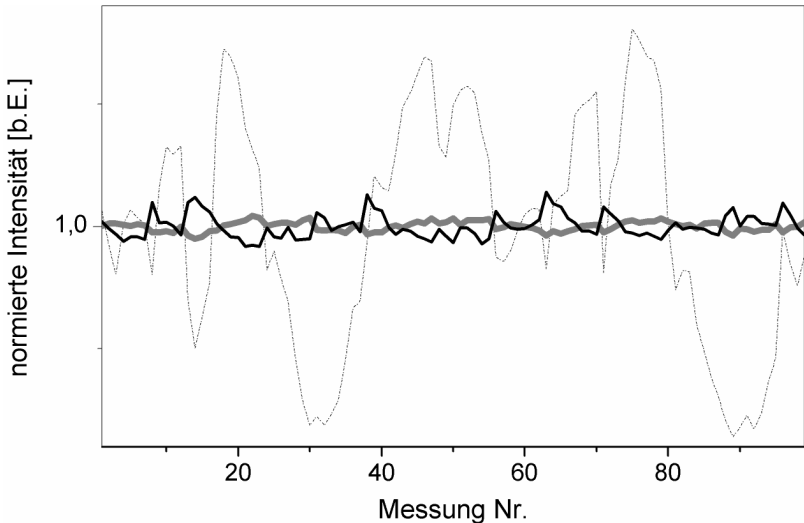


Abbildung 5.3: Gemessene Schwankung der Laserlinie (---), der Laserflanke (graue Kurve) und der Ramanbande (schwarze Kurve) von Kaliumnitrat.

5.1.2 Intensitätsschwankungen

Neben der Stabilität der Wellenlänge ist für die quantitative Bestimmung der Stoffkonzentration die Leistungskonstanz der Laserstrahlung wichtig, da die Anzahl der inelastisch gestreuten Ramanphotonen linear mit der Anzahl der eingestrahlenen Photonen korreliert ist (siehe Gl. 2.2 auf Seite 13). In Abbildung 5.3 wurde eine Meßreihe mit 100 Meßpunkten von Kaliumnitrat aufgenommen (CCD-Kamera: SPEC-10). Die Meßreihe wurde nach ca. 10 Minuten Warmlaufzeit gestartet (Herstellerangabe: 5 Minuten). Jede Messung besteht aus 10 Einzelmessungen mit einer Belichtungszeit von einer Sekunde. Während die von der CCD-Kamera aufgenommene Laserlinie eine Standardabweichung von 23% besitzt, zeigen die beiden Ramanbanden des Probenstoffes (KNO_3) eine wesentlich geringere Schwankungsbreite (1 - 2%). Die Variation der aufgezeichneten Laserintensität kann daher nicht als Maß zur Fehlerabschätzung herangezogen werden. Direkte Messungen der Laserintensität mit Hilfe eines Leistungsmeßkopfes

(PM200, Soliton), in dem die Laserstrahlung direkt nach der Glasfaser eingekoppelt wurde, zeigten dies. Die Standardabweichung betrug hierbei 4,8%. Die starken Schwankungen der Meßergebnisse der von der CCD-Kamera aufgenommenen Laserlinie dürften daher durch das verwendete Super-Notch-Filter verursacht werden. Die Auswirkungen betreffen lediglich die Laserlinie und nicht die eigentlichen Ramanspektren.

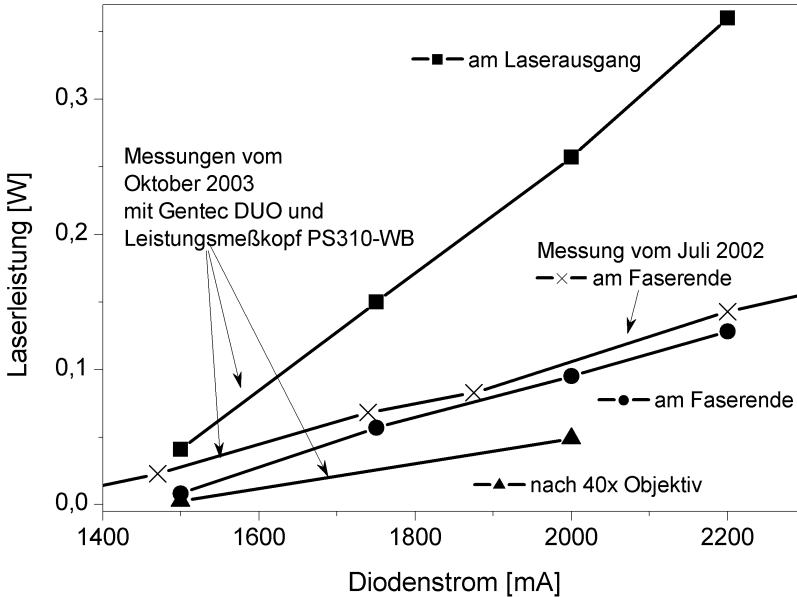


Abbildung 5.4: Laserleistung am Ausgang, am Faserende und auf Probenoberfläche sowie zeitlicher Vergleich (nach ca. 1000 Betriebsstunden).

5.1.3 Linearität der Laserintensität

Die Leistung eines Diodenlasers läßt sich über den Strom einstellen, der über den Diodenübergang fließt. Im konkreten Fall konnte die Stromstärke zum einen über eine am Laser befindliche Madenschraube verstellt oder zum anderen mit Hilfe der seriellen Schnittstelle direkt über ein Terminalprogramm Milliamperegenau eingestellt werden. In Abbildung 5.4 ist der lineare Zusammenhang zwischen Stromstärke und Laserleistung zu sehen. Desweiteren erkennt man in der Abbildung die Lichtverluste in der Faser (37% Transmission) und durch die Mikroskopoptiken (Bandpaßfilter und Linsensysteme des Objektivs zusammen: 54%

Transmission). Dies führt dazu, daß nur ein Fünftel der Laserleistung in die Probe appliziert wird.

5.1.4 Axiales Auflösungsvermögen

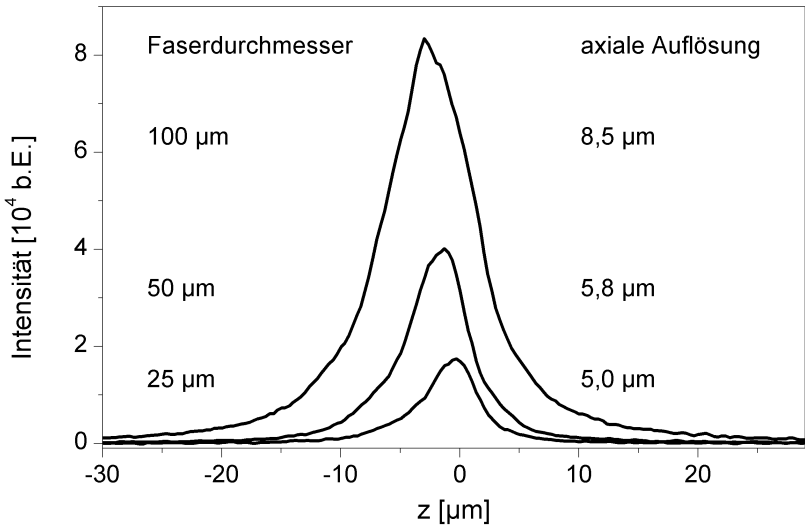


Abbildung 5.5: Axiales Auflösungsvermögen sowie Absolutvergleich der Intensität der Ramanbande von Silizium (520 cm^{-1}) bei verschiedenen Faserdurchmessern

Die für das konfokale Prinzip notwendigen Lochblenden werden beim CRM 200 mit Hilfe von Glasfasern realisiert. An dem zur Verfügung gestellten Gerät konnte zwischen drei verschiedenen Glasfasern (Durchmesser: $25\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$) auf der Detektionsseite gewechselt werden. Die Auswirkungen auf das axiale Auflösungsvermögen wurden mit Hilfe eines Siliziumplättchens gemessen – also in Reflexion. Hierzu wurde mit Hilfe des Schrittmotors das Mikroskop in 50 nm -Schritten nach unten bzw. nach oben bewegt, während gleichzeitig die Intensität des Ramansignales (521 cm^{-1}) aufgezeichnet wurde¹. Die Darstellung der Intensität in Abhängigkeit von der z -Position für das $40\times$ Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,8) ist in nebenstehender Abbildung aufgetragen. Diese Messungen zeigten zum einen, daß bei doppeltem Faserdurchmesser die Signalintensität ebenfalls um den Faktor 2 zunimmt. Dieser Umstand ist von Interesse,

¹Durch dieses Vorgehen konnte der „Spiel“ im axialen Verfahrensweg ermittelt werden. Dieser betrug ca. nm

wenn im nächsten Kapitel die Nachweisgrenzen von gelösten Stoffen bestimmt werden sollen, und es so auf jedes Photon, das zum Signal beiträgt, ankommt. Zum anderen wird aus der Abbildung deutlich, daß eine wesentliche Verbesserung der Auflösung bei Verwendung der 25 μm -Faser nicht mehr erzielt werden kann. Die in der Darstellung angegebenen Werte beziehen sich auf die FWHM. Die verwendeten Fasern sind größer als eine AE^2 , womit der Fall geometrisch-optischer Konfokalität vorliegt (siehe Seite 18). Dies bedeutet für das zu erwartende axiale Auflösungsvermögen gemäß Gl. 2.4 ein Wert von 3,3 μm . Dieser rechnerische Wert gilt für den Fall eines optischen Strahlenganges ohne Abbildungsfehler. Somit ist der gemessene Wert von 5,0 nm ein Hinweis auf die Leistungsfähigkeit des CRM 200.

5.2 Nachweisgrenzen

Um die im Biofilm erwarteten Stoffwechselprodukte (in erster Linie NH_4^+ und NO_2^-) zu quantifizieren, wurden Konzentrationsreihen erstellt, bei denen zum einen die Linearität von Stoffkonzentration und Signalintensität überprüft wurde. Zum anderen konnten so auch die Nachweisgrenzen der einzelnen Stoffe ermittelt werden. Die einschlägige Literatur ist bezüglich der physikalischen Einheitenverwendung bei der Konzentrationsangabe recht vielfältig. Es finden Verwendung: ppm, $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (bezogen auf Molekül, Ion oder Element), mM ($\text{mMol}\cdot\text{l}^{-1}$). Im folgenden soll die zugängliche Einheit „Molar“ (Stoffmenge pro Volumen) Verwendung finden.

Die Nachweisgrenze wird, wie im theoretischen Abschnitt dargelegt ist, durch das Signal-/Rauschverhältnis (S/R-Verhältnis) bestimmt. Um eine vorhandene Ramanbande vom Meßrauschen eindeutig unterscheiden zu können, muß das Verhältnis besser als 2 sein. Das für die Nachweisgrenze limitierende Rauschen ist das Schrotrauschen und wird verursacht durch ein vorhandenes Hintergrundsignal (bspw. von Wasser). Wie in Kapitel 2.7 beschrieben, beträgt das Schrotrauschen \sqrt{H} der Hintergrundintensität H . Geht man davon aus, daß die gemessene Signalintensität linear mit der Belichtungszeit (eine Verdopplung der Belichtungszeit führt auch zu einer doppelten Anzahl an detektierten Photonen), ist es daher offensichtlich immer möglich, über lange Belichtungszeiten $\text{S/R} > 2$ zu erreichen. Um die Nachweisgrenze eine Größenordnung zu verbessern, muß 100fach länger belichtet werden. Belichtungszeiten über mehrere Stunden hinweg sind für Ramananwendungen nicht unüblich. Bei den heutzutage verwendeten CCD-Kameras macht sich hier allerdings die kosmische Hintergrundstrahlung

²Airy-Einheit

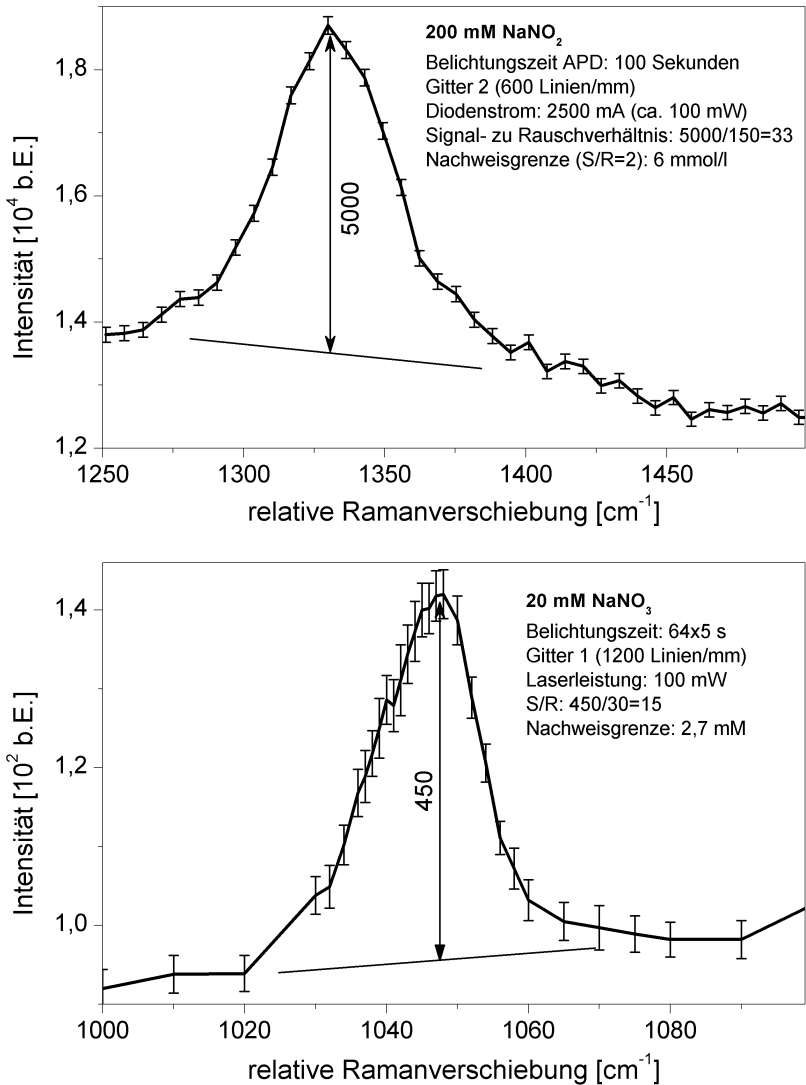


Abbildung 5.6: Ramanbande ν_1 von Nitrit (obere Abb.) bzw. Nitrat (untere Abb.) aufgenommen mit der Avalanche Photodiode (APD).

negativ bemerkbar, so daß typische Belichtungen im Minutenbereich liegen. Mehrere Messungen können aufakkumuliert werden.

Das verwendete konfokale Ramanmikroskop ist ein scannendes System, d. h. es erzeugt Bilder, indem der Laserpunkt das Probenvolumen abrastert. Hierbei kommt es schnell zu einer hohen Anzahl an Einzelmessungen. Solche Messungen in einem vertretbaren Zeitraum zu beenden, ist aus praktischer Sicht ein weiterer, limitierender Faktor (siehe Beispiel auf Seite 50).

5.2.1 Stoffnachweisgrenzen in Wasser

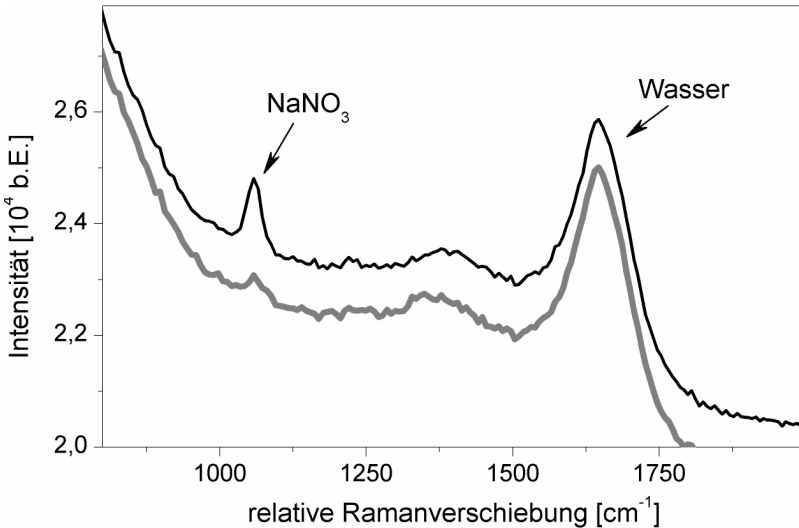


Abbildung 5.7: Ermittlung der Nachweisgrenze für Natriumnitrat mit CCD-Kamera Andor DU 401-BR-DD. Obere Kurve: 20 mM, untere Kurve: 5 mM

Die Stoffe NaNO₃, NaNO₂ und NH₄Cl wurden in Konzentrationsreihen mit destilliertem Wasser verdünnt. Neben der Bestimmung der jeweiligen Nachweisgrenze konnten dabei auch Linearitätsmessungen durchgeführt werden. Der lineare Zusammenhang zwischen gelöster Stoffmenge und Intensität der zugehörigen Ramanbande konnte bestätigt werden (gemessen mit CCD-Kamera, Belichtung: 10 x 10 s):

Konzentration NaNO ₃	Intensität (1048 cm ⁻¹)
200 mM	12380
20 mM	1210

Die benutzte maximale Belichtungszeit in diesen Experimenten zur Bestimmung der Nachweisgrenze von gelösten Stoffen betrug fünf Minuten. Dies geschah im Hinblick auf spätere, praktikable Meßzeiten. Die Laserleistung betrug in diesen Untersuchungsreihen zwischen 50 und 100 mW.

Es wurden Meßreihen sowohl mit den beiden CCD-Kameras (von Roper Scientific bzw. von Andor Technologies) als auch mit der Avalanche Photodiode gemacht. Die Nachweisgrenzen mit Hilfe der Avalanche Photodiode wurden aus höher konzentrierten Proben unter obiger Vorraussetzung ($S/R > 2$, siehe Abbildung 5.6) errechnet.

In Abb. 5.7 sind die Ergebnisse einer 5 mM und 20 mM NaNO_3 -Lösung zu sehen. Deutlich ist die Abnahme der Ramanbande bei 1070 cm^{-1} zu erkennen. Während die 20 mM Lösung noch eine deutlich zu identifizierende Bande aufweist, tritt diese bei der verdünnten Lösung aus dem vom Wasser verursachten Rauschen des Hintergrundes kaum hervor. Aus Abb. 2.8 auf Seite 32 läßt sich das Verhältnis $\frac{S}{R}$ der 5 mM Lösung errechnen. Es beträgt 5,7. Dies würde nach obiger Definition eine Nachweisgrenze für NaNO_3 in Wasser von 1,8 mM erwarten lassen.

In Tabelle 5.1 auf Seite 85 sind die erzielten Nachweisgrenzen zusammengefaßt. Die theoretischen Werte der Avalanche Photodiode sowie der CCD-Kamera (Andor) korrelieren sehr gut miteinander. Der etwas höhere Wert für die SPEC-10 von Roper Scientific erklärt sich durch den Etalon-Effekt dieser Kamera. Die in der Tabelle zusammengefaßten Werte stimmen auch mit den Literaturwerten unter Berücksichtigung der Meßparameter überein. Bereits in den 1970er Jahren wurden die Nachweisgrenzen von verschiedenen anorganischen Stoffen mit Hilfe der Raman-spektroskopie erörtert [50], [51]. In erster Linie wurden Stoffe mit sehr intensiven Ramanbanden untersucht, wie NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . Auch theoretische Überlegungen zu den Nachweisgrenzen wurden angestellt, die als limitierenden Faktor (ebenfalls) das Rauschen des Wasserhintergrundsignales sowie Laserfluktuationen verantwortlich machten [38]. Der dabei theoretisch ermittelte Wert von $64 \mu\text{M}$ für die starke Nitratlinie ließ sich experimentell nochmal halbieren auf $32 \mu\text{M}$ [52]. Dieser unter optimalen Umständen gemessene Wert wurde mit Hilfe eines leistungsstarken Argon-Lasers (400 mW bei 488 nm) und drei Stunden Be-

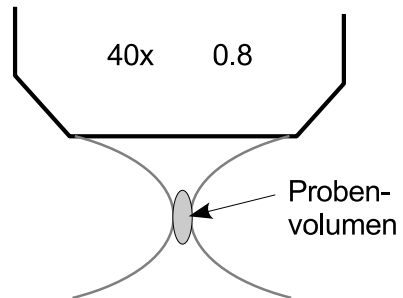


Abbildung 5.8: Meßvolumen im Laserfokus (Wasserimmersionsobjektiv 40x, NA 0,8)

lichtungszeit erzielt. Laserleistung und die ν^4 -Abhängigkeit der Streulichtintensität ergeben bereits ein ca. 20fach stärkeres Meßsignal. Die hundertfach verlängerte Meßdauer sowie ein großes Probenvolumen erklären die restliche Diskrepanz zu den in dieser Arbeit ermittelten Nachweisgrenzen (vgl. Tabelle 5.1).

Bemerkenswert an den während dieser Arbeit erzielten Nachweisgrenzen ist die gemessene absolute Stoffmenge: Laserfokus und konfokales Meßprinzip ergeben ein tatsächliches Meßvolumen von ca. $10 \mu\text{m}^3$. Bei einer Nachweisgrenze von $1,8 \text{ mM}$ (bzw. $112 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) befinden sich im Meßfleck $1,1 \text{ fg}$ Nitrat!

5.2.2 Nachweisgrenzen im Biofilm

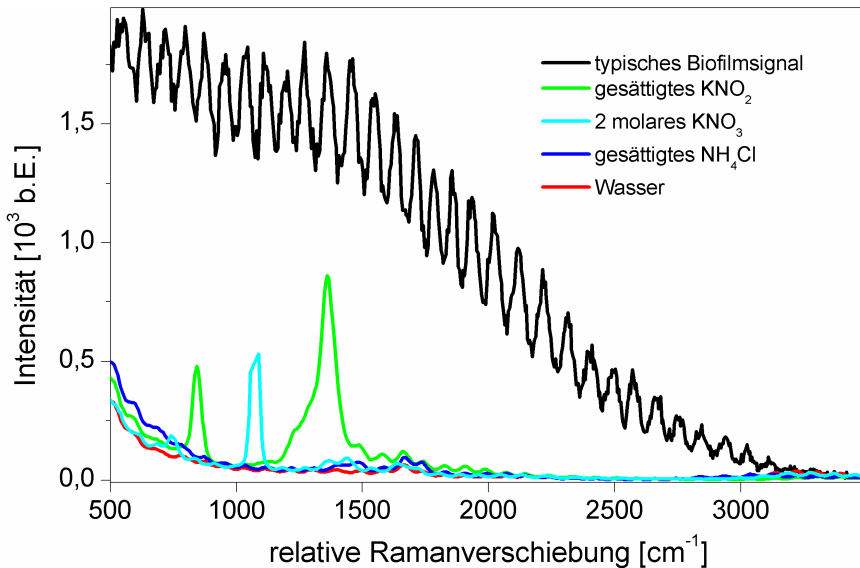


Abbildung 5.9: Vergleich des typischen Biofilmsignales mit den Ramanspektren von hochkonzentriertem Ammonium, Nitrit und Nitrat in Wasser sowie Wasser. Belichtungszeit: 250 ms, Laserleistung: 50 mW

Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich, daß Biofilme ein typisches Signal im rotverschobenen Bereich der Anregungswellenlänge aufweisen. Die Zuordnung des Signales gestaltet sich aufgrund seines undifferenzierten Spektrums recht schwierig. Da dieses Spektrum im gesamten Biofilm gemessen werden kann, wird vermutet, daß es sich bei dem zugehörigen Stoff um EPS handelt, die die

	CCD (Roper)	APD	CCD (Andor)
Nitrat	10 mM	2,7 mM	1,8 mM
	620 mg·l ⁻¹	170 mg·l ⁻¹	112 mg·l ⁻¹
	140 mg·l ⁻¹ (NO ₃ -N)	38 mg·l ⁻¹ (NO ₃ -N)	25 mg·l ⁻¹ (NO ₃ -N)
Nitrit	100 mM	6 mM	-
	4,8 g·l ⁻¹	280 mg·l ⁻¹	
	1,4 g·l ⁻¹ (NO ₂ -N)	84 mg·l ⁻¹ (NO ₂ -N)	
Ammonium	2 M	-	-
	36 g·l ⁻¹		
	28 g·l ⁻¹ (NH ₄ -N)		

Tabelle 5.1: Nachweisgrenzen in Wasser gelöster Stickstoffverbindungen mit CCD-Kameras (Roper Scientific und Andor) und Avalanche Photodiode in äquivalenten Konzentrationsangaben. (Belichtungszeiten: Andor: 100 s, Roper: 120 s, APD: 320 s)

Mikroorganismen im Biofilm zusammenhält (siehe auch 5.3.2). Dieses Signal ist um etwa eine Größenordnung intensiver als das Ramansignal von Wasser, so daß sich für die Nachweisgrenzen der gelösten Stoffe entsprechend höhere Konzentrationen ergeben. In Abbildung 5.9 ist der Absolutvergleich von einem typischen

Biofilmspektrum mit hochkonzentrierten Stickstoffverbindungen zu sehen. Die Oszillationen auf den Spektren werden durch den Etalon-Effekt der verwendeten CCD-Kamera (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 35) verursacht. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, daß selbst die Intensität der Ramanlinien von gesättigtem NH_4Cl und KNO_2 (7 M bzw. 33 M) sowie der 2 molaren KNO_3 -Lösung geringer sind als die Intensität des breiten, undifferenzierten Biofilmspektrums.

Aus diesen Versuchsreihen wird deutlich, daß die in Biofilmen mit Hilfe von Mikrosensoren ermittelten Konzentrationswerte ($< 1 \text{ mM}$ für NH_4^+ und NO_2^- , [53]) durch das konfokale Ramanmikroskop nicht erreicht werden können. Ursächlich hierfür ist neben dem Hintergrundsignal in erster Linie das sehr geringe Probenvolumen. Befindet sich in diesem Meßraum zudem ein Stoff in geringer Konzentration, ergeben sich aus dem schwachen Ramanwechselwirkungsquerschnitt desweiteren nur sehr wenige, nachzuweisende Photonen. Festzuhalten bleibt allerdings, daß die zur Konzentrationsbestimmung benutzten Mikrosensoren zum einen nicht kommerziell erhältlich sind, sondern vielmehr spezielle Einzelanfertigungen sind, die zudem nur einige Tage einsetzbar sind. Zum anderen liefert die invasive Meßmethode nur punktuelle Ergebnisse, ein Abrastern der Probe und eine spätere bildliche Darstellung der Stoffverteilung ist nicht möglich. Auch ist eine axiale Auflösung der Meßpunkte, wie sie das CRM 200 bietet ($2 \mu\text{m}$ mit dem Wasserimmersionsobjektiv), bei Verwendung der Mikrosensoren nicht möglich.

5.3 Ramanspektren

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, ist es wegen des Hintergrundes kaum möglich, die oben genannten Stoffe in geringen Konzentrationen mit Hilfe des konfokalen Ramanmikroskopes nachzuweisen. Es konnten im Biofilm dennoch zahlreiche Ramanspektren gemessen und identifiziert werden. Insbesondere erscheint der Ansatz, die am Metabolismus der einstufigen Deammonifikation beteiligten Organismen direkt über ihre charakteristische Schwingungssignatur nachzuweisen, vielversprechend. In den Meßreihen wurden Biofilme unterschiedlichen Ursprungs untersucht. In erster Linie wurden sie vom ISAH bezogen, das am Klärwerk Herrenhausen verschiedene Forschungsreaktoren betreibt (näheres siehe 3.5). Die benötigte Oberfläche für den Aufwuchs wird den Biofilmen im Reaktor

in Form von Aufwuchsträgern (AWT) gegeben. Ein Längsschnitt durch einen zylindrischen AWT (Durchmesser ca. 8 mm, Höhe ca. 10 mm) ist in Abb. 5.1 dargestellt. Neben der heterogenen Struktur sind deutlich rötliche Bereiche auf der linken Seite zu erkennen. Dieser Umstand erscheint insofern interessant, als daß hochangereicherte ANAMMOX-Bakterienkulturen ebenfalls eine orange-rötliche Färbung besitzen. Diese Bereiche wurden auf Gemeinsamkeiten untersucht.



Abbildung 5.10: rötlicher, hochangereicherter ANAMMOX-Biofilm (Delft, NL)

Wie bereits erwähnt, wird die konfokale Ramanmikroskopie bislang noch nicht zur Untersuchung von Biofilmen im Abwasserbereich eingesetzt. Daher wurden in der ersten Meßphase in umfangreichen Untersuchungsreihen die verschiedenartigen Spektren zusammengetragen. Hierzu wurden die Biofilme mit Hilfe des Piezo-Scantisches sowohl in der Ebene als auch tiefenaufgelöst, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, abgescannt.

5.3.1 Laserintensität

Die Laserleistung in den Experimenten mit organischer Materie lag im Bereich von 5–50 mW. Insbesondere Biofilme im Aufwuchsträger vertrugen nur geringe Laserintensitäten, so daß sich hier entsprechend schwächere Signale bzw. längere Meßzeiten ergaben. Algen, wie sie u. a. in dem Biofilm aus dem Zulaufstutzen zahlreich vorhanden sind, wurden durch Laserleistungen größer als 10 mW sofort zerstört. Auch zeigte sich, daß selbst bei niedriger Laserleistung (wenige mW) nach einigen Minuten Bestrahlung derselben Stelle im Biofilm die Intensität des Meßsignales deutlich nachließ. Sogenannte „Kinetic Series“, in denen über einen längeren Zeitraum zu bestimmten Zeitpunkten Spektren aufgenommen werden, zeigen diesen Ausbleicheffekt deutlich. Hingegen konnte bei Experimenten mit auf dem Objektträger verteilter Biomasse (z.B. hochangereicherte ANAMMOX-Kultur) die Laserleistung bis zu 50 mW während des Abrasterns betragen.

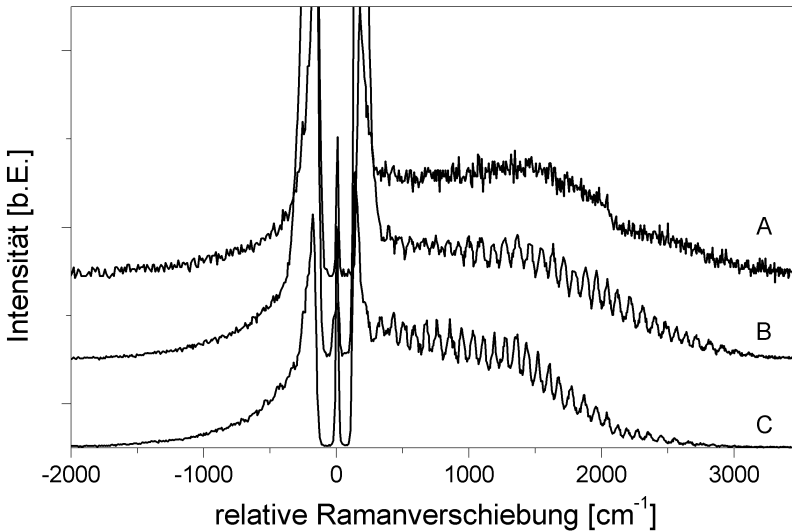


Abbildung 5.11: Undifferenziertes Spektrum verschiedener Proben: Biofilme aus Betriebsreaktor in Herrenhausen (A+B), rauhes Quarzglas (C).

5.3.2 EPS

Wie bereits im Kapitel „Nachweisgrenzen“ angesprochen, zeigte sich bei der Analyse aller Biofilme ein typisches, direkt an der längerwelligen Laserflanke beginn-

nendes, undifferenziertes Spektrum, welches über den gesamten Biofilm nachweisbar war. Der spektrale Kurvenverlauf war immer ähnlich, lediglich die Intensität schwankte in Abhängigkeit vom Meßpunkt. Trägt man die Intensität räumlich auf, so zeigten sich deutliche Strukturen. Die Intensitätsschwankungen dieses Signals sind korreliert mit der Intensität der Laserflanken. Diese lineare Abhängigkeit ist ein Hinweis auf die Natur des Signales: Streuung.

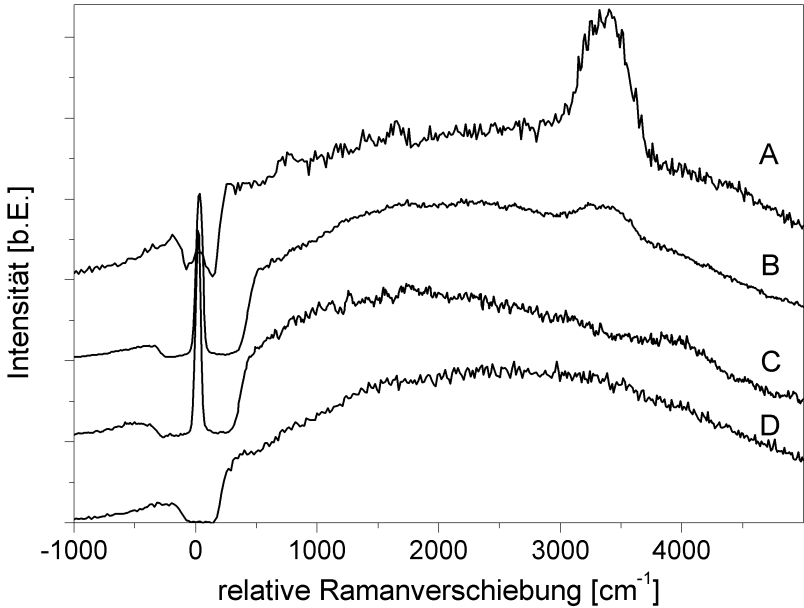


Abbildung 5.12: Undifferenzierte Spektren verschiedener Proben bei Anregung mit 532 nm: ANAMMOX-Biofilm (A), in Wasser aufgelöster Biofilm aus Betriebsreaktor (B), Schlamm aus Anzuchtreaktor (C), Biofilm aus Betriebsreaktor (D).

Für den Nachweis, ob es sich tatsächlich um einen Streuprozess in der Probe handelt, wurden weitere Stoffe untersucht. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Messung an einer aufgerauten Quarzglasröhre. Wie in Abb. 5.11 zu erkennen, zeigt sie ein nahezu identisches Spektrum. Der Abfall im Bereich ab 1500 cm^{-1} ist auf die nachlassende Quanteneffizienz der CCD-Kamera zurückzuführen. Der Etalon-Effekt der zu Beginn der Arbeit verwendeten CCD-Kamera ist deutlich zu erkennen (Spektren B und C).

Das Phänomen dieses breiten Ramanhintergrundes wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen frühzeitig beobachtet und diskutiert [54, 55]. Die darin geäußerte,

naheliegende Vermutung, daß es sich bei diesem Effekt um Fluoreszenz handelt, wurde später widerlegt. Als Ursache für das breite Hintergrundsignal wird die Wechselwirkung niedrigerenergetischer Phononen mit den höherenergetischen Schwingungen der CH-Gruppen genannt [56].

Weitere Experimente zu dieser Fragestellung wurden mit dem unter 3.2.1 erläuterten Lasersystem sowie bei der Firma WITec in Ulm an dem dortigen CRM 200 mit frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laserstrahlung durchgeführt (Anregungswellenlänge: 532 nm). Bei Ramanspektroskopischen Untersuchungen an kalzinierten Hydrotalaciten, die aufgrund ihrer großen Oberfläche und Adsorptionseigenschaften u. a. als Katalysatoren aber auch in der Abwasserbehandlung eingesetzt werden, zeigte sich eine Abhängigkeit des breiten Hintergrundes von der eingestrahlten Laserfrequenz [57].

In Abb. 5.12 sind die Spektren vier verschiedener organischer Proben dargestellt:

- A Spektrum der hochangereicherten ANAMMOX-Kultur aus Delft untersucht mit dem CRM 200
- B in Wasser aufgelöster Biofilm aus einem AWT (siehe Abb. 5.2) gemessen mit Nd:YAG-Lasersystem (IfB)
- C Schlamm aus Anzuchtreaktor (Nd:YAG-Lasersystem am IfB)
- D Biofilm im AWT aus der Betriebsanlage am ISAH (CRM 200)

Aus der Abbildung geht klar hervor, daß auch bei Anregung mit 532 nm ein breiter Hintergrund vorhanden ist. Im Vergleich zu den Experimenten mit dem Diodenlaser ist hier deutlich zu erkennen, daß das Signal sich über einen sehr großen Bereich erstreckt. In A und B läßt sich die breite Schwingungsbande des Wassers um 3400 cm^{-1} deutlich auf dem Hintergrundspektrum erkennen. Ein Vergleich des undifferenzierten, breiten Hintergrundes bei den beiden verwendeten Anregungswellenlängen zeigt lediglich die gerätespezifischen Unterschiede der verwendeten Nachweissysteme, eine effektive Verringerung konnte nicht festgestellt werden.

5.3.3 Anorganische Ramansignale

In Abb. 5.1 auf Seite 75 sind zahlreiche helle, verschiedenfarbige Punkte im bräunlichen Biofilm zu sehen. Im einzelnen lassen sich weiße, blaue, orange- und pinkfarbene Bereiche (Durchmesser wenige $1-10\ \mu\text{m}$) mit Hilfe der Okularkamera identifizieren. Während in letzterem Bereich keine Ramansignale gemessen

werden konnten, besitzen die anderen Bereiche teilweise sehr deutliche Schwingungsbanden. Den Ramanspektren dieser Bereiche fehlen die charakteristischen Schwingungsbanden, u. a. die sehr ramanaktive Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{C})$ organischer Verbindungen, weshalb es sich in diesen Fällen um kristalline Mineralstoffe im Biofilm handelt. Eine spätere Überprüfung der Ramanspektren anhand einer Ramandatenbank³ bestätigte diese Vermutung.

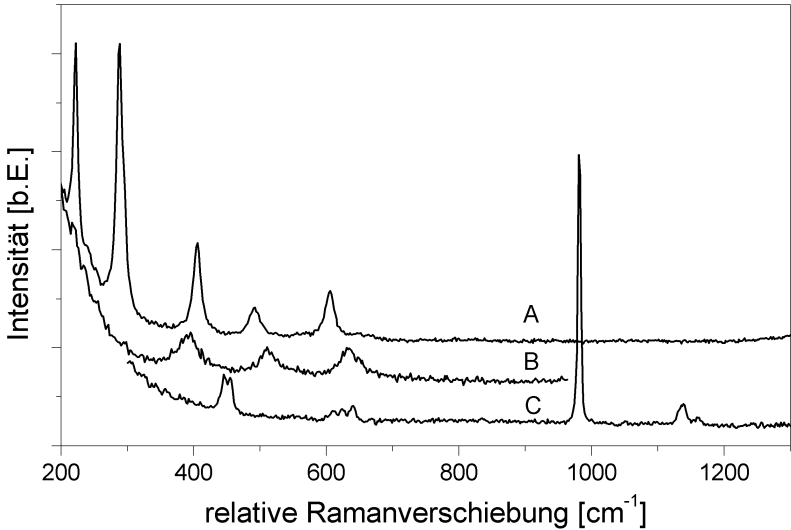


Abbildung 5.13: Ramansignale im Biofilm: (A) pinkfarbener Punkt (Fe_2O_3), (B) heller weißer Punkt (TiO_2), (C) orangefarbener Fleck (BaSO_4).

Im einzelnen sind die im Biofilm gemessenen Spektren in Abb. 5.13 bis 5.15 dargestellt. Auffällig an den Spektren ist das kaum vorhandene EPS-Spektrum (siehe 5.2.2). Da dieses ansonsten über dem gesamten Biofilm nachgewiesen werden kann, ist das ein eindeutiger Hinweis darauf, daß an dieser Stelle lediglich der entsprechende Stoff vorliegt. Im Fall des Spektrums C beispielsweise handelt es sich um SO_4^{2-} . Da dieses an dem Meßfleck nicht gelöst sondern kristallin vorliegt, zeigt ein Vergleich mit Stoffen aus der Ramandatenbank, daß es sich im konkreten Fall um Barit (BaSO_4) handelt. Die honiggelbe Farbe dieses Minerals ist ein weiteres, starkes Indiz, daß der Nachweis dieses Stoffes im Biofilm gelang.

Spektrum A und B sind an einer pinkfarbenen bzw. weißen Stelle des Biofilmes aufgenommen worden. Die Meßergebnisse waren reproduzierbar, d. h. an

³Spectra Online (Thermo Galactic) unter spectra.galactic.com

der entsprechenden Farbstelle wurden immer dieselben Spektren aufgenommen. Die pinkfarbene Substanz (Spektrum A) läßt sich dem Spektrum von Eisenoxid (Fe_2O_3) zuordnen, die helle weiße Stelle wurde als Titandioxid (TiO_2) identifiziert. In beiden Fällen wiederum stimmt die Farbgebung des Meßfleckes mit den Ramanspektren überein. Fe_2O_3 oder auch Rost ist sicherlich nichts ungewöhnliches in einem Biofilm, der mit Abwasser einer Kläranlage in Kontakt steht. TiO_2 ist ein Stoff, der hauptsächlich als Pigment eingesetzt wird. Aufgrund seiner Struktur streut er das Licht sehr stark. Diese Funktion wird nicht nur als Weißmacher u. a. in Zahncremes verwendet, sondern ebenfalls in Sonnencremes als UV-Schutz eingesetzt. Fe_2O_3 konnte ebenfalls in den hochangereicherten ANAMMOX-Bakterienkulturen nachgewiesen werden.

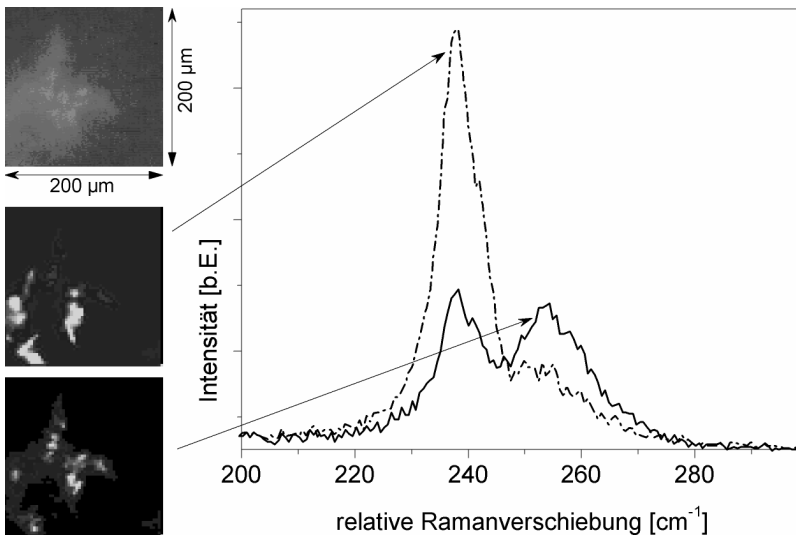


Abbildung 5.14: „Chemical Image“ eines Biofilmbereiches (links oben: Okularkamera; Mitte: Ramanbande bei 238 cm^{-1} ; links unten: Ramanbande bei 254 cm^{-1}).

Ein schönes Beispiel für die Möglichkeiten der stoffspezifischen Analyse mit Hilfe des CRM ist in Abb. 5.14 zu sehen. Die rötliche Färbung des Meßfleckes ließ diesen aufgrund der ebenfalls rötlichen ANAMMOX-Bakterien als interessantes Meßobjekt erscheinen. Die jeweilige computergestützte Auswertung und räumliche Darstellung⁴ der Ramanbande (238 bzw. 254 cm^{-1}) zeigt deutliche Unterschiede in der räumlichen Stoffverteilung, die in der lichtmikroskopischen Auf-

⁴Meßbereich: $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$

nahme nicht zu entdecken sind. Allerdings handelt es sich auch in diesem Fall nicht um organisches Material. Hier hilft wieder ein Blick in die online Datenbank von „Spectra Online“: Zumindest die niederfrequenteren Schwingungsbande läßt sich mit Al_2O_3 in Übereinstimmung bringen.

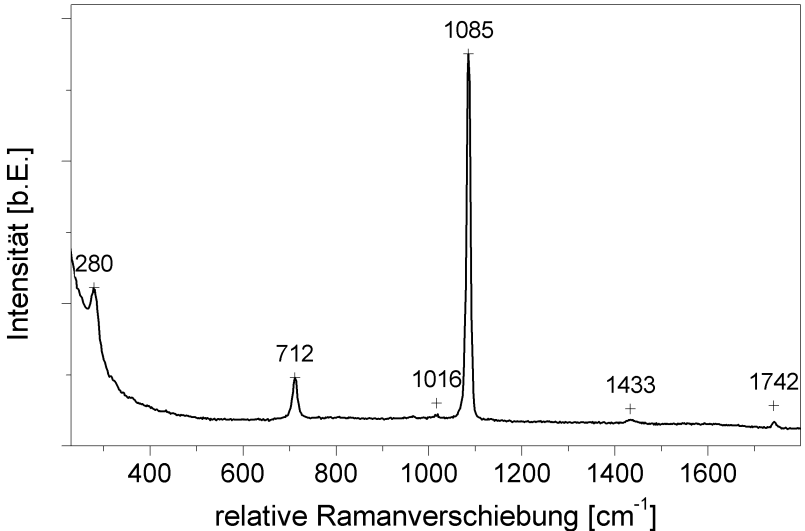


Abbildung 5.15: Ramansignal (CaCO_3) gemessen in hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm sowie im Biofilm aus Zulaufstutzen.

Eine weitere ausgeprägte Ramanschwingung bei 1085 cm^{-1} (siehe Abb. 5.15) konnte in drei verschiedenen Biofilmen nachgewiesen werden. Erstmals wurde das Spektrum im Rahmen dieser Arbeit in dem Biofilm aus dem Zulaufstutzen der Versuchsanlage am ISAH gemessen. Dieser Biofilm unterschied sich durch sein äußeres Erscheinungsbild deutlich von Biofilmen aus der Versuchsanlage, in der die einstufige Deammonifikation studiert wird. Im Gegensatz zu den langsam wachsenden Mikroorganismen des ANAMMOX-Biofilmes sieht man diesem die schneller wachsenden photoautotrophen Organismen aufgrund des äußeren Erscheinungsbildes bereits mit bloßem Auge an. Neben den bereits vorgestellten Fluoreszenzen der Photosynthese betreibenden Organismen wurde hier ein weiteres Signal mineralischen Ursprungs gefunden, das sich ebenfalls in den hochangereicherten ANAMMOX-Kulturen als auch in den aus dem Betriebsreaktor entnommenen Biofilmen gemessen werden konnte. Der zu diesem Spektrum korrelierte Stoff ist Kalk (CaCO_3). Dieser wird in den Biofilmen aus den Anzucht- bzw. Betriebsreaktoren nicht zufällig nachgewiesen. CaCO_3 wird als Spurenelement dem synthetischen Nährmedium beider Biofilme beigemischt und dient als

externe Kohlenstoffquelle, die die Organismen zum Wachsen benötigen.

5.3.4 Organische Verbindungen

Da es aufgrund zu geringer und somit nicht meßbarer Stoffkonzentrationen nicht gelang, den Stoffwechsel des ANAMMOX-Bakteriums zu bestimmen, wurden die Mikroorganismen selbst Ramanspektroskopisch untersucht. Den Beginn dieser Meßreihen (und somit Auslöser für die Suche nach spezifischen Bakterienspektren) machten Experimente mit Hilfe einer zweiten Anregungswellenlänge. Wie bereits in Abschnitt 3.4 auf Seite 45 erläutert, wurde das konfokale Ramanmikroskop mit Blick auf die nachzuweisenden NH_4^+ , NO_2^- - und NO_3^- -Verbindungen sowie eine möglichst große Eindringtiefe in den Biofilm spezifiziert. Aufgrund von letzterem wurde das CRM 200 mit einem Diodenlaser der Wellenlänge 784,6 nm bestückt. Dieses bedingt jedoch eine IR-optimierte CCD-Kamera sowie entsprechende Optiken. Mit diesem System ist der Schwingungsbereich bis 1500 cm^{-1} (entsprechend 890 nm) mit hoher Quanteneffizienz (>90%) nachweisbar. Jedoch im Bereich der symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingung von CH_2 bzw. CH_3 (ca. $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ entsprechend von 1010-1026 nm) detektiert die CCD-Kamera nur noch 20 Prozent der einfallenden Photonen.

Neben diesem für die Ramanspektroskopie interessanten Schwingungsbereich ab 2800 cm^{-1} war insbesondere die Auswirkung auf das Spektrum der EPS durch die Verwendung einer anderen Wellenlänge von Interesse. Wie bereits in 5.3.2 dargelegt, wurde eine Abhängigkeit des breiten Ramanhintergrundes von der Anregungswellenlänge beobachtet [57].

5.3.4.1 Anregungswellenlänge 532 nm

Da kein entsprechendes zweites Lasersystem zur Verfügung stand, wurden die Experimente in Kooperation mit dem Hersteller (Firma WITec, Ulm) in dessen Labor durchgeführt. Der dort verwendete frequenzverdoppelte Nd:YAG-Laser besitzt eine Wellenlänge von 532 nm. Es wurden folgende Proben mit Hilfe dieses konfokalen Ramanmikroskopes untersucht:

- Hochangereicherte ANAMMOX-Bakterienkultur
- Biofilm aus Betriebsreaktor in Herrenhausen (einstufige Deammonifikation)
- FISH-präparierte Biofilme aus Betriebsreaktor

Es wurden zunächst die hochangereicherten ANAMMOX-Bakterienkulturen von der TU Delft untersucht. Hierzu wurde eine geringe Menge zusammen mit Wasser auf einen Objektträger mit Vertiefung (ca. 1 mm tief und 15 mm im Durchmesser) gegeben (Abb. 5.10 auf Seite 87). Zwischen dem Deckglas und dem Mikroskopobjektiv (Wasserimmersionsobjektiv von Nikon, 60x, NA 1,0) befand sich als Immersionsmedium destilliertes Wasser.

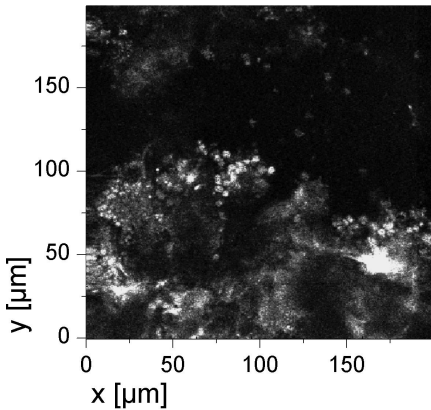


Abbildung 5.16: xy-Übersicht eines ANAMMOX-Biofilmes mit Hilfe der APD aufgenommen („Fast Imaging“). Spektromerkmale: 757 cm^{-1} . Anregungswellenlänge: 532 nm .

Wie üblich wurde zunächst mit Hilfe der APD eine schnelle Übersicht über die Probe erstellt (siehe nebenstehende Abb. 5.16), um anschließend vielversprechende Bereiche spektral aufzunehmen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.17) zusammengefaßt (Gitter mit $600\text{ Linien}\cdot\text{mm}^{-1}$, Belichtungszeit 10 Sekunden). Insgesamt konnten in dem ANAMMOX-Biofilm drei verschiedene Ramanspektren gefunden werden. Die Kurve C zeigt ein Spektrum mit einer intensiven Ramanbande bei 1093 cm^{-1} , das bereits in vorangegangenen Messungen im Biofilm nachgewiesen und CaCO_3 zugeordnet werden konnte (s. o.). Das Spektrum B in Abb. 5.17 wurde ebenfalls in vorherigen Expe-

perimenten mit Biofilmen aufgezeichnet. Insbesondere in dem Biofilm aus dem Zulaufstutzen, der dem Umgebungslicht ausgesetzt war, konnte das Spektrum häufig im Bereich von Braun- bzw. Grünalgen, bei denen über den Prozeß der Zwei-Photonen-Absorption die Chlorophyllfluoreszenz angeregt wurde (siehe 4.4), detektiert werden. Die sich daraus ergebende Schlußfolgerung, daß es sich um Pigmente (Carotinoide) handelt, wurde von der Spektraldatenbank bestätigt: Ein sehr ähnliches Spektrum besitzt das β -Carotin-Molekül, welches zu den Carotinoiden gehört. Das relativ einfache Spektrum erklärt sich aus der Struktur des Moleküles, dessen zentraler Teil aus acht nebeneinander angeordneten Isoprenmolekülen aufgebaut ist. Die drei Ramanbanden (1023 cm^{-1} , 1146 cm^{-1} und 1545 cm^{-1}) lassen sich den drei darin vorkommenden Verbindungen zuordnen: $\nu(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-C})$ und $\nu(\text{C=C})$.

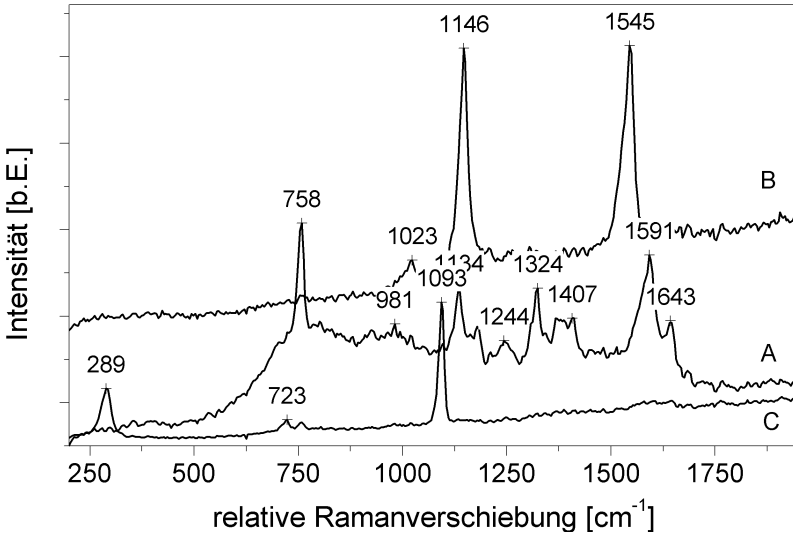


Abbildung 5.17: Verschiedene Ramanspektren in angereichertem ANAMMOX-Biofilm: ANAMMOX-Bakterium (A), Carotinoid (B), CaCO₃ (C). Anregungswellenlänge: 532 nm.

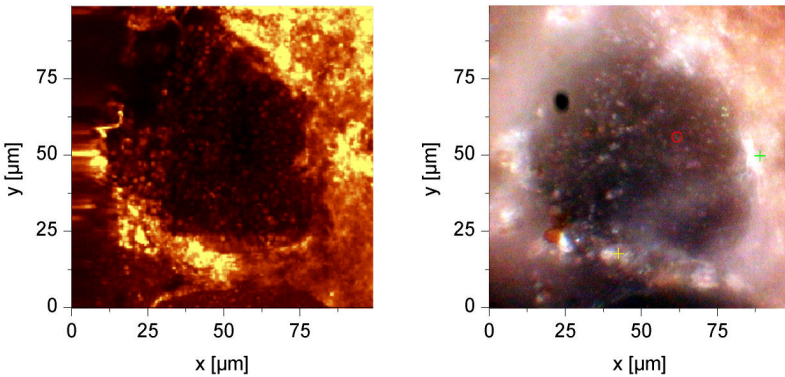


Abbildung 5.18: Okularkameraaufnahme (rechts) von Abb. 5.1. Stelle, an der zahlreiche Ramansignale gefunden werden konnten. Die linke Abbildung zeigt ein $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ großes „Fast Image“ der Ramanlinie 757 cm^{-1} . Anregungswellenlänge: 532 nm.

Das bezüglich eines nichtinvasiven online Nachweises der ANAMMOX-Bakterien direkt im Biofilm interessanteste Spektrum zeigt der Kurvenverlauf A in Abb.5.17. Dieses charakteristische Signal ließ sich bei einem Abgleich mit der online verfügbaren Ramandatenbank nicht wiederfinden. Dies ist zumindest ein erster Hinweis auf eine nichttriviale Natur des gemessenen Spektrums.

Im Anschluß an die Experimente mit der Delfter Kultur wurde Biomasse aus der Versuchsanlage des ISAH untersucht. Eine zusammengesetzte, mikroskopische Aufnahme der äußerst heterogenen Struktur war bereits in Abb. 5.1 auf Seite 75 zu sehen. Aufgrund der kugeligen Struktur der Bakterien erschien der in Abb. 5.18 rechts dargestellte Bereich als Untersuchungsobjekt vielversprechend. Es wurde zunächst ein $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ großer Übersichtsbereich mit Hilfe der APD erstellt (linkes Bild, Spektrometer auf 757 cm^{-1}), in dem dann gezielt nach Signalen gesucht wurde. Dabei zeigte sich, daß ein im Vergleich zu dem oben geschilderten Spektrum der hochangereicherten ANAMMOX-Kultur sehr ähnliches Spektrum gemessen werden konnte (vgl. Spektrum B in Abb. 5.21 auf Seite 99).

Eine orts aufgelöste Analyse dieses Signales (die integrale Intensität der Ramanbande bei 757 cm^{-1} wurde in Abhängigkeit des Meßortes aufgetragen, Abb. 5.19) zeigt genau dieselben kugeligen Strukturen wie sie bereits aus Abb. 5.18 bekannt sind. Die nebenstehende Darstellung zeigt diese Strukturen, deren Durchmesser $1\text{--}2 \mu\text{m}$ betragen. Anhand der guten Korrelation der Spektren (siehe Abb. 5.20) ist somit der Nachweis gelungen, daß sowohl im hochangereicherten ANAMMOX-Biofilm als auch im Biofilm aus dem Betriebsreaktor des ISAH zur Untersuchung des einstufigen Deammonifikationsprozesses dieselben Stoffe vorhanden sind. Die kugelige Form sowie die Größe sind zwei weitere Indizien dafür, daß es sich bei den gemessenen Proben tatsächlich um das ANAMMOX-Bakterium handelt. Den Abschluß der Untersuchungsreihen mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Anregungslaser bildeten Experimente an FISH-Proben des ISAH. Mit Hilfe eines Filtersatzes (Anregungswellenlänge ca. 514 nm , Emissionswellenlänge: 543 nm) konnten die rötlich angefärbten Bereiche (AMX-Gensonde) identifiziert und mit dem CRM 200 auch schwingungsspektroskopisch untersucht werden. Dabei konnte ein weiteres Mal

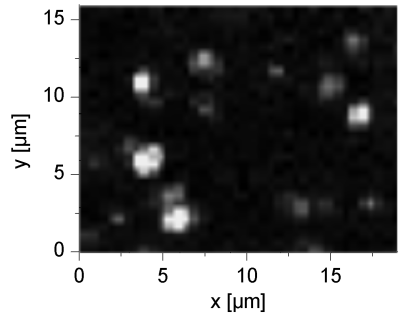


Abbildung 5.19: Darstellung der orts aufgelösten Auswertung der Ramanlinie bei 757 cm^{-1} im Biofilm aus Betriebsreaktor (ISAH). Bereich $19 \times 16 \mu\text{m}^2$. Anregungswellenlänge: 532 nm .

ein sehr ähnliches Spektrum gefunden werden (siehe Spektrum A in Abb. 5.21).

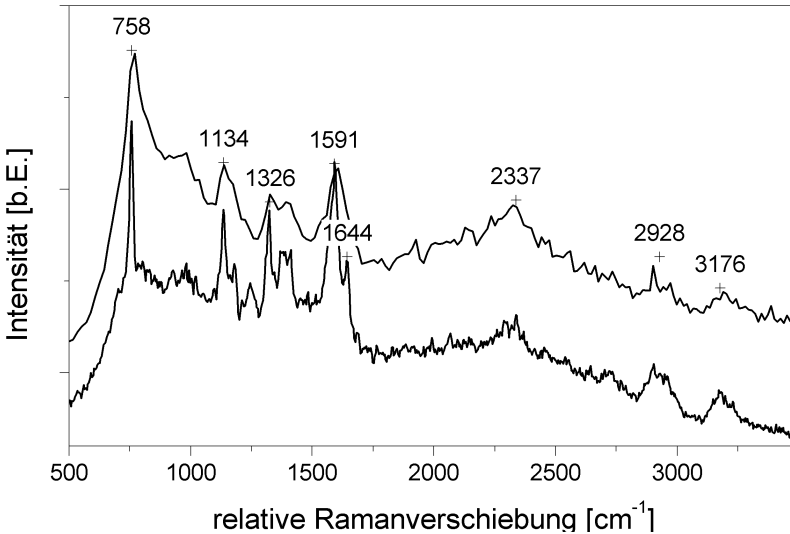


Abbildung 5.20: Vergleich der Spektren aus hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm und Biofilm aus dem Betriebsreaktor am ISAH. Anregungswellenlänge: 532 nm.

Das in den angereicherten ANAMMOX-Bakterienkulturen aufgezeichnete Ramanpektrum ist zweifelsfrei organischen Ursprungs. Ein Vergleich mit der Spektraldatenbank⁵ ergab, wie bereits oben erwähnt, keinen passenden Eintrag, so daß ein gewöhnlicher Stoff ausgeschlossen werden kann. Der hohe Reinheitsgrad der Anreicherung (80%) legt bereits die Vermutung nahe, daß es sich um das ANAMMOX-Bakterium handelt. Das sehr ähnliche Spektrum in den FISH-Proben, das genau an der Gensonden-markierten Stelle gemessen wurde, bestätigt diese Vermutung.

⁵Spectra Online (Thermo Galactic) unter spectra.galactic.com

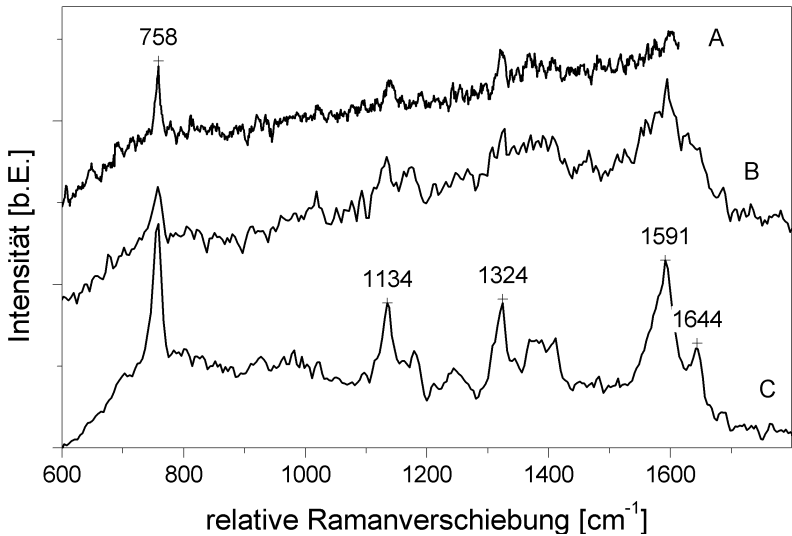


Abbildung 5.21: Drei sehr ähnliche Ramanspektren in drei verschiedenen Proben: FISH-Probe (A), Biofilm aus Betriebsreaktor (B), hochangereicherte ANAMMOX-Kultur (C). Anregungswellenlänge: 532 nm

Ein weiterer Beweis für den Nachweis des ANAMMOX-Bakteriums ist der Aufbau der charakteristischen Zellorganelle, dem sogenannten Anammoxosom, aus linear miteinander verknüpften Cyclobutan-Lipidketten [33]. Diese formen eine äußerst undurchlässige Membran um das Anammoxosom, in dem dann der Stoffwechsel mit seinen teilweise äußerst giftigen Zwischenprodukten stattfinden kann. Eine derartige Membran ist in der Natur einzigartig. Dieser Umstand sowie die Tatsache, daß die zugehörigen Molekülverbindungen sehr ramanaktiv sind, lassen auf ein äußerst spezifisches Ramansignal schließen.

Aufgrund der sehr guten Übereinstimmungen (sowohl spektral als auch ortsaufgelöst) liegt somit abschließend die Schlußfolgerung nahe, daß die nichtinvasive online Detektion des ANAMMOX-Bakterium in seiner natürlichen Umgebung (Biofilm) erstmals mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie gelungen ist.

Ladderane sind zur Zeit (noch) nicht kommerziell erhältlich (siehe Seite 26). So konnten die dem ANAMMOX-Bakterium zugeordneten Spektren nicht auch noch auf diese Weise verifiziert werden. Es wurden Messungen an Stoffen durchgeführt, die aus einem einzelnen Cyclobutanringen bestehen. Diese sind in Abb. 5.22 dargestellt. Auffällig sind eine Vielzahl an Ramanlinien. Dies ist auf den hohen Grad an Unsymmetrie, die die drei Moleküle aufweisen, zurückzuführen. Die

erzielten Spektren ließen sich allerdings nicht mit den Linien des ANAMMOX-Bakteriums (s. o.) korrelieren. Dies auf den unterschiedlichen Aufbau zurückzuführen sein: Die zentrale, ebene Struktur der Ladderane ist aus mehreren Cyclobutadienringen mit Doppelbindungen zusammengesetzt, während die Einfachringe des Cyclobutans andere Bindungsarten aufweisen.

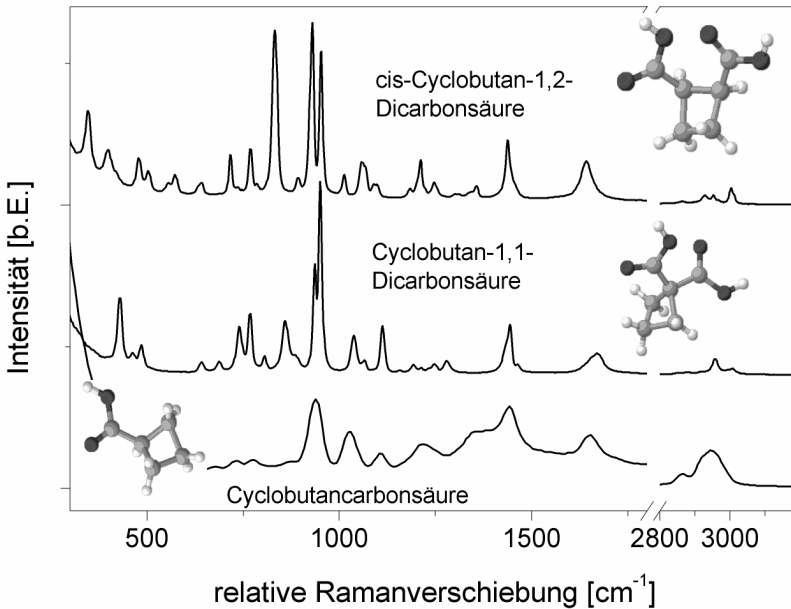


Abbildung 5.22: Ramanspektren dreier Moleküle aufgebaut aus einem Cyclobut- anring.

5.3.4.2 Anregungswellenlänge 784,6 nm

Im Anschluß an die erfolgreichen Versuche mit 532-nm-Anregung wurde das- selbe Probenmaterial (hochangereicherte ANAMMOX-Kultur mit unterschiedlichen Nährmedien, Biofilme aus dem Betriebsreaktor und FISH-Proben) auf Spek- tren organischen Ursprunges hin mit dem Diodenlaser untersucht. Wie bereits er- wähnt, ist die Detektion der Streckschwingung von CH_2 bzw. CH_3 im Bereich von $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ aufgrund der geringen Quanteneffizienz der Silizium-basierten Detektoren schwierig. Nichtsdestotrotz ließen sich auch hier organische Stoffe nachweisen:

Carotinoide

Analog zu den vorgestellten Experimenten mit 532 nm-Anregung, konnte in der angereicherten ANAMMOX-Kultur das von Carotinoiden verursachte Ramanspektrum gemessen werden (Abb. 5.23). Das Spektrum A wurde mit einem höher auflösenden Gitter ($600 \text{ Linien} \cdot \text{mm}^{-1}$) gemessen als das Spektrum B ($150 \text{ Linien} \cdot \text{mm}^{-1}$). Ebenfalls in Spektrum A deutlich zu erkennen ist das Hintergrundsignal der EPS, auf dem die beiden ausgeprägten Ramanlinien noch detektiert werden können. Die eingefügte Grafik zeigt einen tiefaufgelösten (xz-Scan, $45 \times 35 \mu\text{m}^2$) Bereich, der die Intensität der sehr ramanaktiven Schwingungsbande $\nu(\text{C}=\text{C})$ bei 1545 cm^{-1} örtlich darstellt. Deutlich lassen sich Strukturen erkennen. Diese sind allerdings nicht dem ANAMMOX-Bakterium zuzuordnen, sondern sind vielmehr „Verunreinigungen“ in der Biomasse. Hier nicht gezeigt, aber dennoch in den hochangereicherten ANAMMOX-Biofilmen ebenfalls vorhanden, sind Photosynthese betreibende Algen. Es verwundert daher nicht, daß Ramanspektren von Pigmenten gemessen werden konnten.

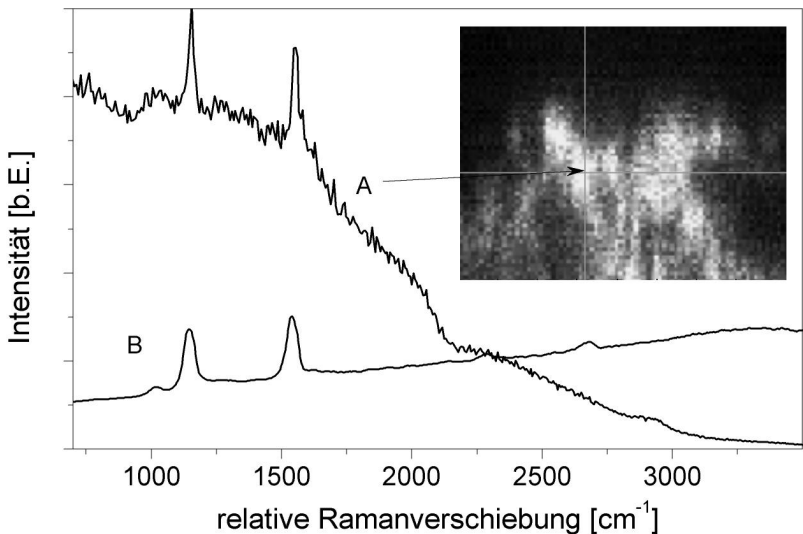


Abbildung 5.23: Ramanspektrum von Carotinoiden im hochangereicherten ANAMMOX-Biofilm. Anregungswellenlängen: 784,6 nm (A) bzw. 532 nm (B).

5.3.5 ANAMMOX-Bakterium

Wie bereits beschrieben, standen zwei verschiedenen, hochangereicherte ANAMMOX-Bakterienkulturen, die sich durch das verwendete Nährmedium unterschieden, zur Verfügung. Eine Kultur wurde mit NH_4^+ und NO_2^- versorgt, während bei der zweiten das Ammonium durch Harnstoff ersetzt wurde. In Abb. 5.24 ist eine Kolonie von kugeligen Bakterien (Durchmesser ca. $4 \mu\text{m}$) zu sehen. Bei dem $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ großen xy-Bereich wurde die Intensität der symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingung von CH_2 und CH_3 im Bereich von $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ räumlich dargestellt, die im abgebildeten Spektrum B auch bei Anregung im NIR noch eine deutlich meßbare Intensität aufweist. Eine hier nicht dargestellte Auswertung der Schwingung $\nu(\text{C}=\text{C})$ von $1520\text{--}1670 \text{ cm}^{-1}$ zeigte ein sehr ähnliches Ergebnis.

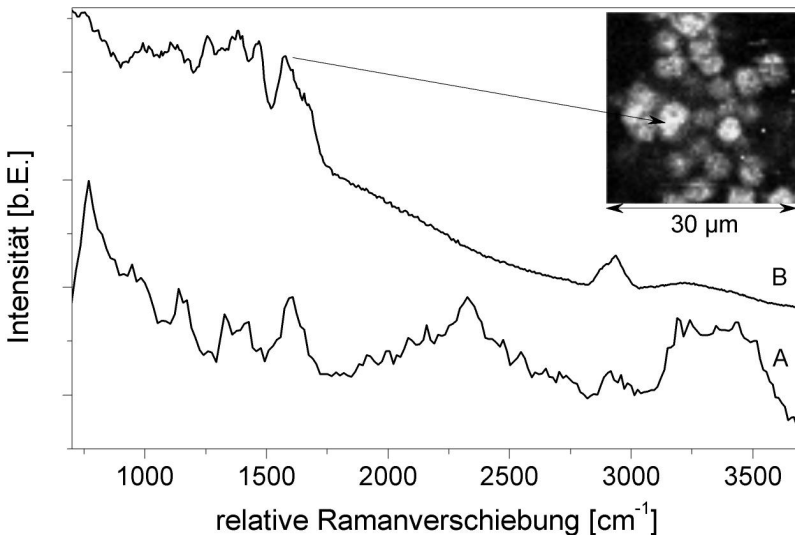


Abbildung 5.24: Ramansignale (B) in hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm (Delft, NL) und räumliche Auswertung der CH_3 -Schwingungsbande und Vergleich mit 532 nm-Anregung (A).

In Abb. 5.24 ist ferner das bereits auf Seite 99 präsentierte, mit Laserlicht der Wellenlänge 532 nm angeregte Spektrum desselben ANAMMOX-Bakterienstammes dargestellt (Spektrum A). Der Vergleich zeigt deutlich die nachlassende Quanteneffizienz der CCD-Kamera (Roper) ab ca. 1600 cm^{-1} . In beiden dargestellten Fällen wurde das niedrigauflösende Gitter mit nur $150 \text{ Linien}\cdot\text{mm}^{-1}$ verwendet.

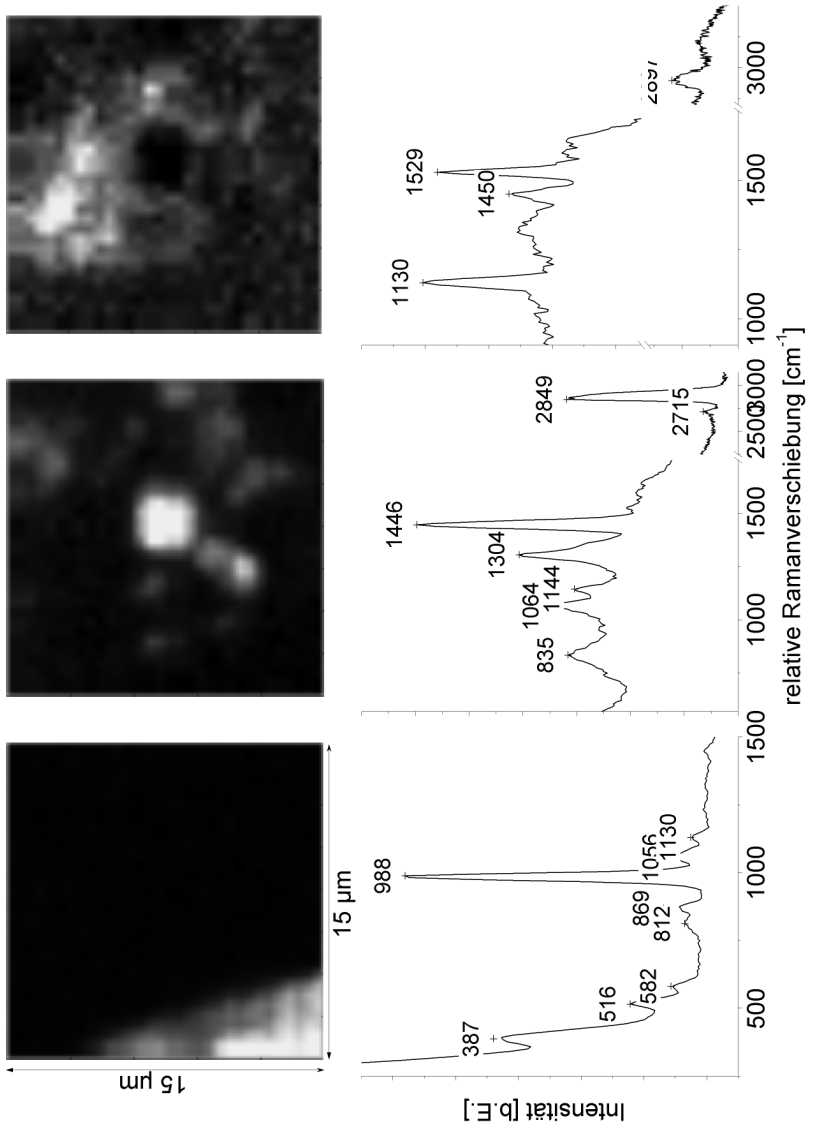


Abbildung 5.25: Verschiedene Spektren in hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm (Medium: Harnstoff). Links – CaPO₄, Mitte - HECAMEG, rechts – Carotinoide. Bild: 15 x 15 μm²

Abb. 5.25 zeigt die stoffspezifischen Bilder (*xy*-Scan mit jeweils $15\ \mu\text{m}$ Scanlänge) des gleichen Meßbereiches. Die Probe stammte aus dem mit Harnstoff betriebenen Anzuchtreaktor in Delft. Die zugehörigen Spektren sind unterhalb der entsprechenden Grafik zu finden. Die linke Aufnahme zeigt einen Ausschnitt aus einer länglichen, kristallinen Struktur, die sich tatsächlich über mehr als $200\ \mu\text{m}$ Länge im Biofilm erstreckt. Aus dem an dieser Stelle gemessenen Ramansignal ließ sich der Stoff identifizieren: CaPO_4 .

Die rechte Aufnahme zeigt das Ramanspektrum der bereits bekannten Carotinoide, während die Auswertung der Ramanbande des mittleren Spektrums bei $1446\ \text{cm}^{-1}$ das mittlere Bild ergibt. Auffällig an dem Spektrum ist die ungewöhnlich ausgeprägte Linie der symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingung von CH_2 und CH_3 im Bereich von $2800\text{--}3000\ \text{cm}^{-1}$ mit ihrem Maximum bei $2849\ \text{cm}^{-1}$. Ein sehr ähnliches Spektrum konnte in der Spektraldatenbank gefunden werden. HECAMEG ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_7$) ist eine Glukose-basierte Detergentie, die zur Extraktion, Reinigung und Stabilisierung von Proteinen im biologischen Bereich eingesetzt wird. Es ist allerdings nicht sicher, ob dieser Stoff durch die Datenbank korrekt identifiziert worden ist.

Interessant an den Untersuchungsreihen der hochangereicherten ANAMMOX-Bakterienkulturen sind die teilweise unterschiedlichen Spektren. Mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie war es hier möglich, Unterschiede zwischen den Biofilmen, die unterschiedlich ernährt worden sind, festzustellen. Der Biofilm aus dem NH_4 -substituierten Reaktor besitzt eine größere Vielfalt an unterschiedlichen Spektren (u. a. auch Chlorophyllfluoreszenz). Es konnten hier zahlreiche Kristalle aus CaPO_4 festgestellt werden. Die Ramanspektren organischen Ursprungs (Carotinoide und HECAMEG-ähnliches Spektrum) konnten im Biofilm aus dem Reaktor, der mit NH_4^+ - und NO_2^- -Zugabe betrieben wurde, nicht festgestellt werden.

In einer Untersuchungsreihe mit nitrifizierender Biomasse, die Ammonium mit Hilfe von Sauerstoff zu Nitrit veratmet, konnte das Ramanspektrum des ANAMMOX-Bakteriums (siehe Abb. 5.21) nicht wiedergefunden werden. Vielmehr zeigten sich—im Gegensatz zum hochangereicherten Biofilm aus ANAMMOX-Bakterien (TU Delft) bzw. dem unter O_2 -limitierten Bedingungen gewachsenen Biofilm (Betriebsreaktor des ISAH)—eine große Anzahl an Fluoreszenzen, die die vorhandenen Ramanschwingungen überdecken. Die spektrale Signatur dieses Biofilmes unterschied sich erheblich von den oben vorgestellten, so daß auch hier mit Hilfe des konfokalen Ramanmikroskopes eine nichtinvasive online Charakterisierung des Biofilmes gelang.

5.4 Zusammenfassung

Als Resümee der Experimente an Biofilmen zur biologischen Abwasserreinigung bleibt als äußerst positives Ergebnis festzuhalten, daß der direkte, nichtinvasive online Nachweis des ANAMMOX-Bakteriums (Candidatus „*Brocadia anammoxidans*“) im Biofilm gelang. Hieraus ergeben sich neue Möglichkeiten, abwasserrelevante Biofilme zu analysieren. Mit Hilfe der CRM lassen sich Fragestellungen wie bspw. der Einfluß der Betriebsparameter auf die Etablierung des Biofilms oder die Ermittlung von Anfahrstrategien bei Prozeßstörungen neu und effektiv bearbeiten.

Wie bereits im medizinischen Bereich gezeigt [58], lassen sich Mikroorganismen aufgrund ihrer spektralen Schwingungssignatur unterscheiden. Dieser Umstand konnte in dieser Arbeit erstmals am Bakterium der anaeroben Ammoniumoxidation ausgenutzt werden. Hilfreich bei der eindeutigen Identifikation ist der in der Natur einzigartige Membranaufbau des Anammoxosoms (der zentralen Zellorganelle des Bakteriums) aus Ladderanen (Ketten von bis zu 5 Cyclobutanringen).

Die Untersuchungen mit Hilfe des CRM 200 zeigen ferner, daß teilweise deutliche Unterschiede in den Biofilmen nachgewiesen werden konnten. Beispielsweise zeigten die hochangereicherten ANAMMOX-Biofilme aus der Delfter Kultur, die mit Harnstoff statt NH_4^+ ernährt wurden, eine größere Fülle an unterschiedlichen Ramanspektren (u. a. CaPO_4 , photoautotrophe Organismen). Es steht daher zu erwarten, daß mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie weitere Mikroorganismen (z.B. *Nitrosomonas*) im Biofilm detektiert und vermessen werden können, woraus die Möglichkeit erwächst Vergesellschaftungen der unterschiedlichen Mikroorganismen gezielt zu untersuchen.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargelegt und bereits diskutiert, ließen sich mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie sowie der konfokalen Ramanmikroskopie die dieser Arbeit zugrunde liegenden Zielsetzungen erfolgreich bearbeiten. Die verwendeten Spektroskopiemethoden sind bereits vielfach eingesetzte Analysemethoden im Bereich der optischen Meßtechnik, deren besonderes Merkmal die Fähigkeit des berührungslosen Messens mit Licht ist. Das Probenmaterial läßt sich so in seinem ursprünglichen Zustand ohne eine Probenaufbereitung untersuchen. Genau diese Potentiale der optischen, laserbasierten Messung wurden in dieser Arbeit ausgenutzt und der Meßaufbau der jeweiligen Problemstellung entsprechend konfiguriert.

DDT und „Hylotox 59“

Der Nachweis des langlebigen Insektizids DDT sowie des DDT-haltigen Holzschutzmittels (HSM) „Hylotox 59“ gelang mit Hilfe der laserinduzierten Fluoreszenzanregung bei Anregung im V-C (266 nm). Von entscheidender Bedeutung für diese positiven Ergebnisse waren die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren der untersuchten Stoffe, die eine eindeutige Zuordnung der jeweiligen Spektren zu Holz, DDT bzw. „Hylotox 59“ erlauben. Während DDT eine ausgeprägte Fluoreszenzbande um 300 nm aufweist, setzt sich das Spektrum des HSM aus einer Überlagerung mehrerer Banden zusammen, dessen Maximum bei 331 nm liegt. Unbehandeltes Fichtenholz wiederum besitzt zwei Fluoreszenzmaxima (342 nm

bzw. 440 nm). Es konnte gezeigt werden, daß die Fluoreszenzspektren behandelter Hölzer sich aus einer Überlagerung der Einzelspektren ergeben.

Neben dem Nachweis über das charakteristische Fluoreszenzspektrum konnte ebenfalls die Abklingzeit als spezifischer Parameter ermittelt werden. Während unbehandeltes Holz eine sehr schnelle Fluoreszenzabklingzeit ($< 1,0$ ns) besitzt, konnte für „Hylotox 59“ eine deutlich verlängerte Abklingdauer (5,0 ns) bestimmt werden. Die zur Bestimmung solcher kurzen Zeiträume notwendige Kameratechnik (ICCDs) ist allerdings aufwendig und teuer. Ferner fehlt dem in dieser Arbeit verwendeten System, das als stationäres Laborsystem aufgebaut wurde, die in situ Fähigkeit. Zwar konnten auch Messungen an einem mobilen Fluoreszenzspektrometer durchgeführt werden. Dessen Anregungswellenlänge von 337 nm (N_2 -Laser) war allerdings nicht kurzweilig genug, um die Fluoreszenz bei ca. 300 nm (DDT) bzw. 330 nm („Hylotox 59“) anzuregen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sind vorrangig qualitativer Natur. Die quantitative Bestimmung der Stoffkonzentration auf einer Probe, die mit einer unbekanntem Menge DDT bzw. „Hylotox 59“ versehen ist, gestaltet sich schwierig (siehe Abschnitt 2.2). Die Nachweisgrenze konnte mit dem verwendeten hochwertigen Aufbau auf $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ für das HSM abgeschätzt werden.

In den präsentierten Experimenten wurden das DDT sowie das HSM gleichmäßig aufgetragen, wie es sicherlich bei sachgerechter Anwendung vor Ort auch geschehen ist. Allerdings können Heterogenitäten nicht ausgeschlossen werden. Dies gilt insbesondere bei der Wiederverwertung des Altholzes, bei der Schädigungen der Holzoberfläche¹ durch Abriß und Transport sowie die Lagerung und Auswaschungen auf dem Betriebshof zu Heterogenitäten in der Stoffverteilung führen. Dies kann zu stark streuenden Meßresultaten führen. Eine Spotmessung ist daher ungenügend. Das Ergebnis sollte über mehrere Meßpunkte gemittelt werden. Hier zeigen sich die Vorteile der optischen Meßmethode, bei der ohne großen Aufwand zahlreiche Messungen vorgenommen werden können. Dies führt zu einem wesentlich präziseren Ergebnis.

Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen DDT- und „Hylotox 59“-Untersuchungsreihen zeigen deutlich, daß bereits mit Hilfe der statischen LIF die Stoffe auf Holz detektiert werden können. Diese weniger aufwendige Technik ist für die Altholz verarbeitende Industrie aus unternehmerischer Sicht von Interesse. Denn kommerziell erhältliche Fluoreszenzspektrometer basierend auf Laseranregung im UV mit entsprechender Leistung liegen immer noch im oberen 5-stelligen Eurobereich. Das System der Firma LTB (Berlin) beinhaltet dafür neben einer ICCD-Kamera auch einen abstimmbaren Farbstofflaser (von 225 nm bis 835 nm je nach verwendetem Farbstoff), so daß multidimensionale Fluoreszenzspektren

¹Die zum Einsatz gekommene LIF im UV ist eine „oberflächliche“ Untersuchungsmethode, da die UV-Strahlung kaum in das Holz eindringt.

aufgezeichnet werden können. Ein solches Gerät stellt ein gutes Beispiel für die Schwierigkeiten und einzugehenden Kompromisse bei der anwendungsorientierten Analytik dar: Auf der einen Seite die „eierlegende Wollmilchsau“ – zu einem entsprechenden Preis, auf der anderen Seite ein speziell für die Meßaufgabe konfektioniertes Gerät. Im vorliegenden konkreten Fall der kostengünstigen in situ Schnellanalytik von DDT-haltigen HSM auf Altholz wurden in dieser Arbeit die Parameter für ein solches Detektionssystem basierend auf der LIF-Spektroskopie erarbeitet: Anregungswellenlänge: 250-280 nm, Leistung > 10 mW, Meßzeit: einige Sekunden, Nachweisgrenze: $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Mittlerweile kostengünstig erhältliche Miniaturspektrometer in Kombination mit fasergestützter Lichtführung und einem UV-Laser würden die gewünschte preiswerte und anwendungsorientierte Schnellbeprobung großer Holzmengen gestatten. Die Verwendung von Laserlicht im UV zur Anregung der Fluoreszenzbande um 300 nm stellt die einzige nichttriviale Anforderung an das Meßinstrument dar. Die Voraussetzungen für ein mobiles, preiswertes Gerät lassen sich zur Zeit allerdings nur recht schwer für den Laser erfüllen. Die Anforderungen an den Laser ergeben sich aus der alltäglichen Routinearbeit. Der Betrieb des Lasers sollte mit geringem Aufwand verbunden sein („turnkey ready“) und er muß zuverlässig und über einen großen Zeitraum (mehrere Jahre) einwandfrei funktionieren. Die Effizienz sollte ausreichend hoch sein, so daß die Gesamtleistungsaufnahme möglichst gering ist. Ebenso sollte die notwendige Kühlung keinen hohen Aufwand erfordern. Anspruchslos erweist sich die Fluoreszenzspektroskopie bei der Strahlqualität. Es muß nicht das TEM₀₀-Profil sein. Multimode-Laser sind zur Fluoreszenzanregung ausreichend. Mittlerweile existieren verschiedene Lasersysteme, die mehr oder weniger diese Ansprüche erfüllen. Gewisse Einschränkungen sind lediglich hinsichtlich der Mobilität hinzunehmen, da zur Zeit noch keine tragbaren, kompakten Laser entsprechender Wellenlänge und Leistung existieren.

Die Effizienz des weitverbreiteten Nd:YAG-Festkörperlaser konnte mit Hilfe von Diodenlasern als Pumpquelle verbessert werden. Auch existieren Systeme mit 12 V-Spannungsversorgung, die erforderliche Frequenzvervierfachung sorgt allerdings für geringe Lichtleistung (ca. 1,5 mW). Die Abmessungen des Laserkopfes sind recht kompakt (BxHxT: $10 \times 5 \times 25 \text{ cm}^3$), die notwendige Stromversorgung sollte allerdings auch bei Verwendung von 12 Volt Betriebsspannung in einer ausreichend dimensionierten Batterie bestehen.

Zuversichtlich stimmt die Entwicklung auf dem Gebiet der Diodenlaser. Die Emissionswellenlänge kommerziell erhältlicher Geräte hat zur Zeit den violetten Bereich um 380 nm erreicht. Wie bereits auf dem Gebiet der CCD-Technik (hier Digitalphotographie) profitiert die Laser(dioden)entwicklung von der rasanten Entwicklung im multimedialen Konsumbereich, wo geeignete kleine Laserdioden zur Speicherung immer größerer Datenmengen auf optischen Disks benötigt

werden. Es existieren mittlerweile Halbleitermaterialien, deren Diodenübergang Licht hinunter bis zu 230 nm emittiert [59, 60]. Hier steht also zu erwarten, daß tragbare Laserdioden (inklusive Stromversorgung) in den nächsten Jahren erhältlich sein werden.

Eine dritte Art von Lasern ist aus mehreren Gesichtspunkten für den Aufbau eines aktuellen Endgerätes vielversprechend: Die neuen Gaslaser zeichnen sich neben ihrer kurzen Wellenlänge (HeAg: 224,3 nm, NeCu: 246,6 nm) durch eine relativ kompakte (vergleichbar mit obigem Nd:YAG-Laser) und stabile Bauweise sowie einen zuverlässigen Betrieb bei geringer Leistungsaufnahme (unter 50 W) aus. Zudem bieten sie ein günstiges Preis-/Leistungsverhältnis. Auf diese Weise ließe sich ein mobiles Gerät realisieren.

Neben dem Preis für ein spezifisches Analysesystem für Altholzproben, welches die aufwendige Laboranalytik ersetzen soll, spielt auch dessen Anwendungsbreite und Benutzerfreundlichkeit eine Rolle. D. h. ein derartiges Meßsystem sollte nicht nur auf einen Stoff beschränkt sein, sondern nach Möglichkeit eine Vielzahl verschiedener Stoffe detektieren können. Auch sollte überdies die Benutzerfreundlichkeit eines solchen Instrumentes von dem Analysierenden möglichst wenig physikalische Vorkenntnisse erfordern, so daß dieser die Spektren nicht mehr einordnen muß. Vielmehr ist es erstrebenswert, daß die Entscheidung, ob das beprobte Stück wiederverwendet werden kann oder entsorgt werden muß, dem Meßgerät zufällt. Hierzu ist eine entsprechende Software, die die Signale auswertet, einzusetzen.

Festzuhalten bleibt, daß ein mobiles, einfach zu handhabendes und preiswertes Detektionssystem zur Analyse von DDT-belasteten Althölzern basierend auf der LIF aufgebaut werden kann. Allerdings ist ein derartiges System aufgrund der geringen Eignung der LIF zur Diskriminierung einzelner Stoffe bei der Multi-komponentenanalyse beschränkt auf den spezifischen Nachweis von DDT.

Biofilmanalyse

Neben dieser sehr anwendungsorientierten Fragestellung konnte im Rahmen dieser Arbeit auch grundlegendere Forschung erfolgreich durchgeführt werden. Es gelang der Nachweis des ANAMMOX-Bakteriums über dessen spektrale Schwingungssignatur. Die hierfür verwendete Ramanspektroskopie zeigt gerade im Bereich der eindeutigen Stoffidentifikation außerordentliche Vorteile gegenüber der Fluoreszenzspektroskopie. Die Anwendung von Datenbanken (auch online möglich), in denen zahlreiche Stoffe katalogisiert sind, bedeutet eine erhebliche Zeitersparnis, so daß auch hier die Auswertung der Meßsignale dem Rechner überlassen werden kann.

Als Referenz diente eine spezielle, hochangereicherte Kultur des Bakterienstammes, in der das Bakterium mehr als 80% der Mikroorganismen ausmacht. Dessen Ramanspektrum ließ sich in den Betriebsreaktoren zur einstufigen Deammonifikation des Kooperationspartners am ISAH wiederfinden, als auch in den speziell präparierten FISH-Proben. Neben der spektralen Übereinstimmung ergibt die räumliche Verteilung des Ramanspektrums, die eine kugelige Struktur mit einem Durchmesser von $1 - 1,3 \mu\text{m}$ aufweist, ebenfalls einen eindeutigen Hinweis auf das ANAMMOX-Bakterium.

Die zunächst ins Auge gefaßte Aufgabenstellung, die Konzentrationsbestimmung von Stickstoffprofilen im Biofilm zur Untersuchung des Metabolismus, ließ sich aus mehreren Gründen nicht verwirklichen. In erster Linie sind es die schwachen Ramansignale von Nitrit und insbesondere von Ammonium, die eine Detektion im gewünschten Konzentrationsbereich ($0,1 - 1 \text{ mM}$) mit Hilfe des verwendeten konfokalen Ramanmikroskopes praktisch unmöglich machten. Zwar konnten andere Arbeitsgruppen wesentlich geringere Konzentrationen mit speziellen Ramantechniken detektieren, allerdings sind diese nicht für die in diesem Projekt gewünschte Schnellanalytik im μm^3 -Bereich anwendbar: keine entsprechende Ortsauflösung, sehr lange Meßdauern im Bereich mehrerer Stunden und zu hohe Laserleistung. In dieser Arbeit konnte die Nachweisgrenze für Nitrat mit $1,8 \text{ mM}$ bestimmt werden. Die so detektierte absolute Stoffmenge im vermessenen Probenvolumen (konservativ abgeschätzt: $10 \mu\text{m}^3$) beträgt somit $1,1 \text{ Femtogramm!}$

Das Verfahren der Mikroorganismenidentifikation mit Hilfe von spezifischen Schwingungssignaturen wird seit einigen Jahren erfolgreich u. a. im medizinischen Bereich angewendet. Die derzeitige Untersuchungspraxis des Biofilms durch die Kombination aus Gensonden, FISH und CLSM gestattet es lediglich, Ausschnitte aus dem Biofilm zu untersuchen. Desweiteren bedeutet dieses gängige Verfahren auf der einen Seite einen empfindlichen Eingriff in die komplexe Wohngemeinschaft der Organismen, auf der anderen Seiten stellt es sich aufwendig, kosten- und zeitintensiv dar. Die konfokale Ramanmikroskopie kann hier entscheidend dazu beitragen, die komplexen Gesellschaften und Vorgänge im (abwasserrelevanten) Biofilm transparent zu gestalten, indem es Nachbarschaften von Organismen analysiert sowie Etablierungs- und Wachstumsprozesse zu optimieren hilft.

Da der schwache Ramanwechselwirkungsprozesses nur wenige Photonen für das Meßsignal liefert, ist es für das Meßinstrument von größter Bedeutung äußerst effizient hinsichtlich des Lichtweges ausgelegt zu sein – zumal die in die Probe applizierte Laserleistung nach oben begrenzt ist (typisch: 10 mW). Zwar ist es theoretisch möglich, auf dem Rauschen eines vorhandenen Hintergrundsignales (\sqrt{H}) ein Meßsignal S bei ausreichend langer Belichtungszeit zu detektieren. Allerdings ist für praktikable ortsaufgelöste zwei- oder gar dreidimensionale

Messungen die Meßzeit je Ort begrenzt². Da die Intensität des Meßsignales somit entscheidend für die Meßdauer ist, wird häufig ein niedrigauflösendes Gitter verwendet, das die Energie des spektral aufgespaltenen Lichtes auf wenige CCD-Pixel verteilt, und so zu einem stärkeren Meßsignal führt. Allerdings werden hier die feinen Strukturen eines Ramanspektrums nicht mehr aufgelöst, so daß Ramanbanden zusammenfallen und ein Stoff eventuell nicht mehr erkannt werden kann.

Wie in Abschnitt 5.3.4 gezeigt, erscheint die nichtinvasive Untersuchung von Biofilmen mit Hilfe eines frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasers (532 nm – im Vergleich zur Emissionswellenlänge des Diodenlasers bei 785 nm) unter diesen Aspekten als sinnvoll. Aufgrund der höheren Quanteneffizienz des Detektionssystemes sowie des stärkeren Streuprozesses ($\sim \nu^4$) läßt sich ein Faktor 20 für die Sensitivität im Vergleich zur Ramananregung mit dem Diodenlaser abschätzen. Zu beachten ist die daraus resultierende, etwas geringere Eindringtiefe in den Biofilm. Somit stellt jede Messung mit Hilfe der konfokalen Ramanmikroskopie einen Kompromiß hinsichtlich der Experimentiervorgaben dar.

Ramanspektroskopie zu betreiben, bedeutet immer noch erhebliche technische Anforderungen an die apparative Ausstattung des Meßsystemes. Der schwache Wechselwirkungsprozeß der Ramanstreuung erzeugt prinzipiell wenige, der Messung zugängliche Photonen und lange Meßzeiten. Dies schlägt sich insbesondere bei dem scannenden Verfahren der konfokalen Ramanmikroskopie nieder, bei der räumliche Bilder durch eine serielle Meßweise entstehen. Auch benötigen CCD-Kameras bei längeren Belichtungszeiten entsprechend aufwendige Kühlmaßnahmen zur Verringerung des thermischen Dunkelstromes. Das System sollte also hinsichtlich des Lichtweges optimal ausgelegt sein. Das bedeutet entsprechend hochwertige Komponenten – wie Objektive, Filter, Spektrometer sowie CCD-Kamera. Zwar stand in der präsentierten Arbeit ein einzelphotonenempfindliches Meßgerät zur Verfügung (APD), das in etwa eine Größenordnung empfindlicher ist als die verwendete IR-optimierte CCD. Aufgrund der eindimensionalen Bauweise der APD ist sie ungeeignet, Spektren aufzunehmen und so Ramanbanden zweifelsfrei zu bestimmen. Ihr Einsatzgebiet ist die Untersuchung bekannter Substanzen mit eindeutigen Ramanbanden, beispielsweise in der Prozeßkontrolle von Halbleitern. Der Fortschritt im Bereich der Multikanaldetektoren (CCDs) ist nach wie vor ungebrochen. Die neueste Entwicklung erlaubt die Elektronenvervielfachung bereits im Silizium, so daß Einzelphotonenempfindlichkeit, wie sie bislang ICCDs vorbehalten war, nun auch für CCDs mit entsprechend hoher Quanteneffizienz und exzellentem Signal-/Rauschverhältnis zur Verfügung steht. Die Verwendung dieser Kamera würde eine Bereicherung hinsichtlich der online Analytik mit (Laser-)licht darstellen.

²max. 1 Sekunde (die Meßdauer eines 3D-Quaders aus 100x100x10 Pixeln würde über einen Tag dauern)

Auch an die Laserlichtquelle werden im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie bei der konfokalen Ramanspektroskopie größere Ansprüche gestellt. Die Linienbreite sollte so gering wie möglich sein, und das Strahlprofil muß für die gewünschte hohe Ortsauflösung gaußförmig (TEM_{00}) sein. Darüberhinaus muß der Laser über einen langen Zeitraum sehr frequenzstabil arbeiten. All diese Anforderungen können durch heute erhältliche Laser zu einem entsprechenden Preis erfüllt werden.

Als Quintessenz der beiden verwendeten unterschiedlichen Spektroskopiemethoden kann man festhalten, daß die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie mittlerweile den Weg aus dem Labor vollzogen hat und auch für einen großen Anwenderbereich erhältlich und erschwinglich ist, während die Ramanspektroskopie neben den hohen Anforderungen an das technische Equipment ebensolche an das Bedienpersonal stellt. Gleichwohl wird die Ramanspektroskopie aufgrund ihrer vielen Vorteile sowie den oben geschilderten Entwicklungen zu Recht ihren rasanten Weg in der Analytik ungebremst fortsetzen.

Literaturverzeichnis

- [1] FOTAKIS, COSTAS: *Applications of Laser Spectroscopy*. Europhysics News, Seiten 151–154, 1998.
- [2] HYNCEK, JAROSLAV und TAKAHIRO NISHIWAKI: *Excess Noise and Other Important Characteristics of Low Light Level Imaging Using Charge Multiplying CCDs*. IEEE Transactions on Electron Devices, 50(1):239–245, 2003.
- [3] ROBBINS, MARK STANFORD und BENJAMIN JAMES HADWEN: *The Noise Performance of Electron Multiplying Charge-Coupled Devices*. IEEE Transactions on Electron Devices, 50(5):1227–1232, 2003.
- [4] MARUYAMA, YOSHIHIRO, MITSURU ISHIKAWA und MASAYUKI FUTAMATA: *Single Molecule Detection with SERS*. Analytical Sciences, 17:1181–1183, 2001.
- [5] MAIMAN, T. H.: *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. Nature, 187(4736):493–494, 1960.
- [6] AHLFTEN, A. ANDERS-VON, B. BRASE und H. LUBATSCHOWSKI: *Laser - das besondere Licht*. In: *Technologien für das 21. Jahrhundert*, Brockhaus - Mensch, Natur, Technik, Seiten 120–201. Brockhaus-Redaktion, 2000.
- [7] RAMAN, C. V. und K. S. KRISHNAN: *A new type of secondary radiation*. Nature, 121(3048):501–502, 1928.
- [8] PANNE, U. und R. NIESSNER: *Laserverfahren in der Umweltanalytik*, Band 16 der Reihe *Analytiker Taschenbuch*, Seiten 157–272. Springer, 1997.
- [9] HERING, PETER, JAN PETER LAY und SANDRA STRY (Herausgeber): *Laser in Environmental and Life Sciences*. Springer, 2004.

- [10] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Experimentalphysik 3 - Atome, Moleküle und Festkörper*. Springer, 1996.
- [11] SCHMIDT, WERNER: *Optische Spektroskopie*. Wiley-VCH, 2000.
- [12] MCCREERY, RICHARD L.: *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, Band 157 der Reihe *A Series of Monographs of Analytical Chemistry and its Application*. Wiley, 2000.
- [13] PAETZOLD, R., E. VOSS, T. DE VRIES, H. DARPEL und A. ANDERS: *Advantages of coherent antistokes Raman scattering (CARS) in environmental monitoring*. In: CARLEER, M., M. HILTON, T. LAMP, R. REUTER, K. SCHÄFER, G. M. RUSSWURM, K. WEBER, K. WEITKAMP, J. P. WOLF und L. WOPPOWA (Herausgeber): *Environmental Sensing and Applications*, Band 3821, Seiten 339–346. SPIE, 1999.
- [14] ADAR, FRAN: *Handbook of Raman Spectroscopy*, Kapitel Evolution and Revolution of Raman Instruments - Application of Available Technologies to Spectroscopy and Microscopy, Seiten 11–40. Dekker, 2001.
- [15] LINFOOT, E. H. und E. WOLF: *Diffraction images in systems with an annular aperture*. Proceedings of the Physical Society of London Section B, 66:145–149, 1953.
- [16] INOUE, SHINYA: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Kapitel Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy, Seiten 1–17. Plenum Press, 2nd Auflage, 1995.
- [17] METZNER, WOLFGANG und HEINZ BELLMANN: *Holzschutz*. In: BARTHOLOME, ERNST und FRITZ ULLMANN (Herausgeber): *Fungizide bis Werkstoffe*, Band 12 der Reihe *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, Seiten 685–702. Verlag Chemie, 4 Auflage, 1976.
- [18] KRISHNA, S. und K. A. CHOWDHURY: *Fluorescence of wood under ultraviolet light*. Indian Forester, 61:221–228, 1935.
- [19] DYER, S. T.: *Wood fluorescence of indigenous South African trees*. IAWA Bulletin, 9(1):75–87, 1988.
- [20] SUM, S. T., D. L. SINGLETON, G. PARASKEVOPOULOS, R. S. IRWIN, R. J. BARBOUR und R. SUTCLIFFE: *Laser-excited fluorescence spectra of eastern SPF wood species. An optical technique for identification and separation of wood species?* Wood Science and Technology, 25:405–413, 1991.

- [21] PANDEY, K. K., N. K. UPRETI und V. V. SRINIVASAN: *A fluorescence spectroscopic study on wood*. Wood Science and Technology, 32:309–315, 1998.
- [22] OLMSTEAD, J. A. und D. G. GRAY: *Fluorescence Spectroscopy of Cellulose, Lignin and Mechanical Pulps: A Review*. Journal of Pulp and Paper Science, 23(12):J571–J581, 1997.
- [23] VIS (VERBRAUCHERSCHUTZINFORMATIONSSYSTEM BAYERN): *DDT in Lebensmitteln und anderen Stoffen*. Internet, 29 März 2004. <http://www.vis-ernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformationen/risiken/stoffe-nonbio/ddt.htm>.
- [24] ZIMMERMANN: *Fluoreszenzbanden und -intensitäten ausgewählter Holzschutzmittel*. Technischer Bericht, Laser Laboratorium Adlershof, 1996. DBU-Seminar.
- [25] MUDRACK, KLAUS und SABINE KUNST: *Biologie der Abwasserreinigung*. Gustav Fischer, 4 Auflage, 1994.
- [26] GRAAF, ASTRID A. VAN DE, ARNOLD MULDER, PETER DE BRUIJN, MIKE S. M. JETTEN, LESLEY A. ROBERTSON und J. GIJS KUENEN: *Anaerobic Oxidation of Ammonium is a Biologically Mediated Process*. Applied and Environmental Microbiology, 61(4):1246–1251, 1995.
- [27] MULDER, A., A. A. VAN DE GRAAF, L. A. ROBERTSON und J. G. KUENEN: *Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor*. FEMS Microbiology Ecology, 16:177–184, 1995.
- [28] FUX, CHRISTIAN, KONRAD EGLI, JAN ROELOEF VAN DER MEER und HANSRUEDI SIEGRIST: *Das Anammox-Verfahren zur Stickstoffentfernung in Kläranlagen*. EAWAG news, 56:20–21, 2003.
- [29] KUENEN, J. G. und M. S. M. JETTEN: *Extraordinary Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria*. ASM news, 67(9):456–463, 2001.
- [30] STROUS, MARC, JOHN A. FUERST, EVELIEN H. M. KRAMER, SUSANNE LOGEMANN, GERARD MUYZER, KATINKA T. VAN DE PAS-SCHOONEN, RICHARD WEBB, J. GIJS KUENEN und MIKE S. M. JETTEN: *Missing lithotroph identified as new plantomycete*. Nature, 400(6743):446–449, 1999.
- [31] THAMDRUP, BO und TAGE DALSGAARD: *Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments*. Applied and Environmental Microbiology, 68(3):1312–1318, 2002.

- [32] EGLI, KONRAD, URS FANGER, PEDRO J. J. ALVAREZ, HANSRUEDI SIEGRIST, JAN R. VAN DER MEER und ALEXANDER J. B. ZEHNDER: *Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate*. Archives of Microbiology, 175:198–207, 2001.
- [33] DAMSTE, JAAP S. SINNINGHE, MARC STROUS, W. IRENE C. RIJPSRA, ELLEN C. HOPMANS, JAN A. J. GEENEVASEN, ADRI C. T. VAN DUIN, LAURA A. VAN NIFTRIK und MIKE S. M. JETTEN: *Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane*. Nature, 419:708–712, 2002.
- [34] GAO, XIUCHUN, TOMISLAV FRISCIC und LEONARD R. MACGILLIVRAY: *Supramolecular Construction of Molecular Ladders in the Solid State*. Angewandte Chemie, 116(2):234–238, 2004.
- [35] STROUS, M.: *the online anammox resource*. Internet, 9 März 2004. <http://www.anammox.com>.
- [36] THIRD, K. A., A. O. SLIEKERS, J. G. KUENEN und M. S. JETTEN: *The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria*. Systematic and Applied Microbiology, 24(4):588–596, 2001.
- [37] PYNART, KRIS, BARTH F. SMETS, STIJN WYFFELS, DAAN BEHEYDT, STEVEN D. SICILIANO und WILLY VERSTRAETE: *Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor*. Applied and Environmental Microbiology, 69(6):3626–3635, 2003.
- [38] CUNNINGHAM, KIRKWOOD M., MARVIN C. GOLDBERG und EUGENE R. WEINER: *Investigation of Detection Limits for Solutes in Water Measured by Laser Raman Spectrometry*. Analytical Chemistry, 49(1):70–75, 1977.
- [39] VLIET, L. J. VAN, F. R. BODDEKE, D. SUDAR und I. T. YOUNG: *Digital Image Analysis of Microbes*, Kapitel Image Detectors for Digital Image Microscopy, Seiten 37–64. John Wiley & Sons, Chichester (UK), 1998.
- [40] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Laserspektroskopie - Grundlagen und Techniken*. Springer, 4 Auflage, 2000.
- [41] PÄTZOLD, RALF und ANGELIKA ANDERS: *Laser in Environmental and Life Sciences*, Kapitel Laser-Based Analysis of Solids with Environmental Impact, Seiten 51–77. Springer, 2004.

- [42] LAKOWICZ, JOSEPH R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic, 2 Auflage, 1999.
- [43] MCCREERY, RICHARD L.: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Kapitel Photometric Standards for Raman Spectroscopy. Wiley, 2002.
- [44] PAETZOLD, R., T. DE VRIES, K. JANTOS, E. VOSS und A. ANDERS: *Mobile multi sensor system for environmental monitoring*. In: VO-DINH, T. und SPELLICY R. L. (Herausgeber): *Environmental Monitoring and Remediation Technologies*, 1999.
- [45] HENNIG, K., T. DE VRIES, R. PAETZOLD, K. JANTOS, E. VOSS und A. ANDERS: *Multi sensor system for fast analyses in environmental monitoring with an application in waste water treatment*. In: *Workshop on Lidar Remote Sensing of Land and Sea*, Band 1 der Reihe *electronic Proceedings*. EARSEL, 2000.
- [46] VOSS, A. und S. BRINGEZU: *Müllhandbuch*, Kapitel Belastungspotentiale von holzschutzmittelbehandeltem Altholz und Auswirkungen auf die Entsorgung. ESV, 1997.
- [47] PAWLEY, JAMES: *Fundamental Limits in Confocal Microscopy*, Seiten 19–37. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, 2 Auflage, 1995.
- [48] BUBLITZ, W. J. und T. Y. MENG: *The fluorometric behavior of pulping waste liquors*. *Tappi*, 61(2):27–30, 1978.
- [49] LIPPITZ, M., W. ERKER, H. DECKER, K. E. VAN HOLDE und T. BASCHE: *Two-photon excitation microscopy of tryptophan-containing proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(5):2772–2777, 2002.
- [50] AHMADIJAN, MARK und CHRIS W. BROWN: *Feasibility of Remote Detection of Water Pollutants and Oil Slicks by Laser-Excited Raman Spectroscopy*. *Environmental Science & Technology*, 7(5):452–453, 1973.
- [51] BALDWIN, STUART F. und CHRIS W. BROWN: *Detection of ionic water pollutants by laser excited Raman spectroscopy*. *Water Research*, 6:1601–1604, 1972. Thilo 4.12.
- [52] FURUYA, N., A. MATSUYUKI, S. HIGUCHI und S. TANAKA: *Determination of nitrate ion in waste and treated waters by laser Raman spectrometry*. *Water Research*, 13:371–374, 1979.

- [53] BEER, DIRK DE, ANDREAS SCHRAMM, CECILIA M. SANTEGOEDS und MICHAEL KÜHL: *A Nitrite Microsensor for Profiling Environmental Biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 63(3):973–977, 1997.
- [54] GILSON, TREVOR ROBERT und PATRICK JOHN HENDRA: *Laser Raman spectroscopy*. Wiley, 1970.
- [55] LOADER, JACK: *Basic Laser Raman Spectroscopy*. Heyden, 1970.
- [56] OSTROVSKII, D. I., A. M. YAREMKO und I. P. VORONA: *Natur of Background Scattering in Raman Spectra of Materials Containing High-Wavenumber Vibrations*. Journal of Raman Spectroscopy, 28:771–778, 1997.
- [57] GLERUP, M., O. F. NIELSEN und D. H. CHRISTENSEN: *Laser frequency dependence of broad backgrounds in Raman spectra of Pd/Mg(Al)O*. Journal of Molecular Structure, 509:165–169, 1999.
- [58] MAQUELIN, K., C. KIRSCHNER, L.-P. CHOO-SMITH, N. VAN DEN BRAAK, H. PH. ENDTZ, D. NAUMANN und G. J. PUPPELS: *Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy*. Journal of Microbiological Methods, 51:255–271, 2002. Review article.
- [59] CARRANO, JOHN, ASIF KHAN, MICHAEL KNEISSL, NOBLE JOHNSON, GEOFFREY WILSON und RICHARD DEFREEZ: *Ultraviolet Light*. SPIE's oemagazine, Seiten 20–23, Juni 2003.
- [60] HIRAYAMA, HIDEKI, YASUSHI ENOMOTO, ATSUHIRO KINOSHITA, AKIRA HIRATA und YOSHINOBU AOYAGI: *Efficient 230-280 nm emission from high-Al-content AlGaN-based multiquantum wells*. Applied Physics Letter, 80(1):37–39, 2002.
- [61] MARUTZKY, R.: *Bestimmung von Holzschutzmitteln in Gebrauchtholz*, Tagungsband Qualitätssicherung bei Recyclingholz - eine Einführung in die Thematik. Nummer 36 in *WKI-Bericht*. 2000.
- [62] UHL, A., K. LOEBE und L. KREUCHWIG: *Fast analysis of wood preservers using laser induced breakdown spectroscopy*. Spectrochimica Acta B, 56(6):795–806, 2001.
- [63] SCHRÖDER, WOLFGANG, GERHARD MATZ und JÜRGEN KÜBLER: *Fast Detection of Preservatives on Waste Wood with GC/MS, GC-ECD and Ion Mobility Spectrometry*. Field Analytical Chemistry and Technology, 2(5):287–297, 1998.

- [64] THURMANN, ULRIKE: *Erfassung und umwelttoxikologische Bewertung von ausgewählten Holzschutzmittelwirkstoffen*. Dissertation, Universität Kiel, 1999.
- [65] FLEMMING, HANS-CURT und JOST WINGENDER: *Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien*. *Biologie in unserer Zeit*, 31(3):169–180, 2001.
- [66] FLEMMING, HANS-CURT und JOST WINGENDER: *Was Biofilme zusammenhält*. *Chemie in unserer Zeit*, 36(1):30–42, 2002.
- [67] LAWRENCE, J. R., D. R. KORBER, B. D. HOYLE, J. W. COSTERTON und D. E. CALDWELL: *Optical sectioning of microbial biofilms*. *Journal of Bacteriology*, 173(20):6558–67, 1991.
- [68] LEWANDOWSKI, Z. und H. BEYENAL: *Biofilm monitoring: a perfect solution in search of a problem*. *Water Science and Technology*, 47(5):9–18, 2003.
- [69] SCHMID, T., U. PANNE, C. HAISCH und R. NIESSNER: *Biofilm monitoring by photoacoustic spectroscopy*. *Water Science and Technology*, 47(5):25–29, 2003.
- [70] IVANOV, V., S. T.-L. TAY und J.-H. TAY: *Monitoring of microbial diversity by fluorescence in situ hybridization and fluorescence spectrometry*. *Water Science and Technology*, 47(5):133–138, 2003.
- [71] STRATHMANN, MARTIN, JOST WINGENDER und HANS-CURT FLEMMING: *Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 50:237–248, 2002.
- [72] PACKROFF, GABRIELE, JOHN R. LAWRENCE und THOMAS R. NEU: *In Situ Confocal Laser Scanning Microscopy of Protozoans in Cultures and Complex Biofilm Communities*. *Acta Protozoologica*, 41:245–253, 2002.
- [73] CASPERS, P.J., G.W. LUCASSEN und G.J. PUPPELS: *Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin*. *Biophysical Journal*, 85(1):572–80, 2003.
- [74] FARQUHARSON, STUART, LAWRENCE GRIGELY, VICTOR KHITROV, WAYNE SMITH, SPERRY. JAY F. und GERARD FENERTY: *Detecting Bacillus cereus spores on a mail sorting system using Raman spectroscopy*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(1):82–86, 2004.

- [75] BRIDGES, TRAVIS E., MICHAEL P. HOULNE und JOEL M. HARRIS: *Spatially Resolved Analysis of Small Particles by Confocal Raman Microscopy: Depth Profiling and Optical Trapping*. Analytical Chemistry, 76(3):576–584, 2004.
- [76] CHAN, J. W., A. P. ESPOSITO, C. E. TALLEY, C. W. HOLLARS, S. M. LANE und T. HUSER: *Reagentless Identification of Single Bacterial Spores in Aqueous Solution by Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 76(3):599–603, 2004.
- [77] LOPEZ-DIEZ, E. CONSUELO und ROYSTON GOODACRE: *Characterization of Microorganisms Using UV Resonance Raman Spectroscopy and Chemometrics*. Analytical Chemistry, 76(3):585–591, 2004.
- [78] ZEIRI, L., B. V. BRONK, Y. SHABTAI, J. EICHLER und S. EFRIMA: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria*. Applied Spectroscopy, 58(1):33–40, 2004.
- [79] JARVIS, ROGER M. und R. GOODACRE: *Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 76(1):40–47, 2004.
- [80] ALEXANDER, TROY A., PAUL M. PELLEGRINO und JAMES B. GILLESPIE: *Near-Infrared Surface-Enhanced-Raman-Scattering-Mediated Detection of Single Optically Trapped Bacterial Spores*. Applied Spectroscopy, 57(11):1340–1345, 2003.
- [81] CHOO-SMITH, L.-P., K. MAQUELIN, T. VAN VREESWIJK, H. A. BRUINING, G. J. PUPPELS, N. A. NGO THI, C. KIRSCHNER, D. NAUMANN, D. AMI, A. M. VILLA, F. ORSINI, P. ALLOUCH und H. P. ENDTZ: *Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy*. Applied and Environmental Microbiology, 67(4):1461–1469, 2001.
- [82] SUCI, PETER A., GILL G. GEESEYA und BONNIE J. TYLERB: *Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in Candida albicans biofilms*. Journal of Microbiological Methods, 46(3):193–208, 2001.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Berührungsloses Meßprinzip mit Hilfe von Laserlicht	2
2.1	Jablonski-Diagramm (S_0 - S_2 : Singulett-Zustände, T_1 : Triplett-Zustand, IC: interne Konversion. Durchgezogene Pfeile: Strahlungsemission bzw. -absorption, gepunktete Pfeile: strahlungslose Übergänge)	9
2.2	Elastische und inelastische Streuprozesse	12
2.3	Lage wichtiger Ramanbanden	16
2.4	Konfokales Meßprinzip (aus [14])	17
2.5	Stickstoffkreislauf und anaerober Ammoniumoxidation (ANAMMOX) mit Zwischenprodukten	25
2.6	a – Lipide der Anammoxsommembran aufgebaut aus Laddern ($X+Y$), b – Dichte der Membran des Anammoxosoms, c – Stoffwechsel und schematische Darstellung des ANAMMOX-Bakteriums mit: (1) Nukleoid und (2) Anammoxosom (aus: [33] + [35])	27
2.7	Einstufige Deammonifikation in einem Biofilm, zusammengesetzt aus zwei Teilprozessen: Nitritation und ANAMMOX	29
2.8	Zusammenhang zwischen S/R-Verhältnis und Nachweisgrenze am Beispiel der Ramanbande einer 5 mM Natriumnitratlösung. Das Hintergrundsignal wird vom Lösungsmittel (Wasser) verursacht.	32
3.2	Gemeinsame Instrumentenfunktion des Spektrometers und der CCD-Kamera des CRM 200	38

- 3.3 Absolutvergleich der normierten Ramanspektren von Cyclohexan: mit CRM 200 und Gitter #2 (A, siehe Text), aus McCreery Raman Library (B), aus [43] (C) 40
- 3.4 Absorptionsspektren von DDT: entnommen aus NIST (A), 0,1% DDT-Methanol-Lösung (B), 0,1% „Hylotox 59“-Tetrahydrofuran-Lösung (C) 41
- 3.5 Versuchsaufbau zur Fluoreszenzanregung mit UV-Laserlicht (266 nm) 42
- 3.6 Mobiles Laserspektrometer (Anregungswellenlänge 337 nm) 44
- 3.7 Konfokales Ramanmikroskop CRM 200 (schematisch) 46
- 3.8 Erster Anwuchs eines Biofilmes im Aufwuchskörper 51
- 4.1 Fluoreszenzspektren von hellen (beiden oberen Kurven) und dunklen Stellen (unten) des Fichtenholzes, Anregungswellenlänge: 266 nm 56
- 4.2 Vergleich der Fluoreszenzspektren der beiden Isomere des DDTs zu je 1% in Methanol gelöst (A: 2,4'-DDT, B: 4,4'-DDT) und reinem Methanol (C), Anregungswellenlänge: 266 nm 57
- 4.3 Fluoreszenzspektrum von DDT auf Fichte (A) und Zerstörung von DDT auf Fichte nach 1000 Laserpulsen (B, Energie pro Puls: 1 mJ), Anregungswellenlänge: 266 nm 58
- 4.4 „Ausbleichen“ der UV-Fluoreszenz von unbehandeltem Kiefernholz nach intensiver Laserbestrahlung (A, B: helle bzw. dunkle Stelle; C, D - die entsprechende Stelle nach 1000 Laserpulsen mit 1 mJ). Anregungswellenlänge: 266 nm 59
- 4.5 Vergleich der Fluoreszenzspektren von reinem "Hylotox 59" (B), unbehandeltem Fichtenholz (C) und mit "Hylotox 59" bestrichener Fichte (A), Anregungswellenlänge: 266 nm 60
- 4.6 Fluoreszenzspektren von mit Methanol verdünntem „Hylotox 59“: Verhältnis 1:10 (A), 1:50 (B), 1: 100 (C), unbehandeltes Fichtenholz (D). Die Spektren wurden auf die Intensität der Holzfluoreszenz bei 440 nm normiert. Anregungswellenlänge: 266 nm . 61
- 4.7 Fluoreszenzmessung zwei Jahre später an denselben Holzproben. 2,4'-DDT auf Fichtenholz (A), „Hylotox 59“ auf Fichtenholz (B). Anregungswellenlänge: 266 nm 62

4.8	Fluoreszenzspektrum von DDT in Methanol (B) sowie DDT auf Fichtenholz (A) im Vergleich zu unbehandelter Fichte (C), Anregungswellenlänge: 337 nm	63
4.9	Fluoreszenzspektren von Fichtenholz unterschiedlichen Feuchtegrades, Anregungswellenlänge: 337 nm	64
4.10	Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von Fichtenholz. Untere Abb.: Schnitt bei 266 nm (schwarz) sowie bei 340 nm (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm	66
4.11	Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von "Hylotox 59". Untere Abb.: Schnitt bei 343 nm (–X–) sowie exponentielle Anpassung (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm	67
4.12	Obere Abb.: Zeitaufgelöstes Emissionsspektrum von "Hylotox 59" auf Fichtenholz. Untere Abb.: Schnitt bei 343 nm (–X–) sowie exponentielle Anpassung (grau). Anregungswellenlänge: 266 nm	68
4.13	Fluoreszenzen von: Schlamm aus Versuchsreaktor zur einstufigen Deammonifikation der Kläranlage Herrenhausen (1), Schlamm aus Versuchsanlage der Kläranlage Osnabrück (2), homogenisierter Biofilm aus Versuchsreaktor Kläranlage Herrenhausen (3). Anregungswellenlänge 266 nm. Spektren sind auf Laserintensität normiert.	69
4.14	Chlorophyllfluoreszenz nach 2-Photonen-Anregung: Chlorophyll-extrakt (1), Alge in ANAMMOX-Biofilm (2). Anregungswellenlänge 784,6 nm	71
5.1	Oben: Längsschnitt durch Aufwuchsträger (AWT) mit Biofilm und mikroskopische Aufnahme (Biofilmfläche: ca. 7 x 10 mm ² . Vergrößerung: 63x). Unten: Aufsicht auf die heterogene Biofilmstruktur (AWT aus Versuchsanlage).	75
5.2	Extinktionskurve eines in Wasser aufgelösten Biofilmes. Gemessen in Zweistrahlphotometer.	76
5.3	Gemessene Schwankung der Laserlinie (– · – · –), der Laserflanke (graue Kurve) und der Ramanbande (schwarze Kurve) von Kaliumnitrat.	77
5.4	Laserleistung am Ausgang, am Faserende und auf Probenoberfläche sowie zeitlicher Vergleich (nach ca. 1000 Betriebsstunden). . .	78

5.5	Axiales Auflösungsvermögen sowie Absolutvergleich der Intensität der Ramanbande von Silizium (520 cm^{-1}) bei verschiedenen Faserdurchmessern	79
5.6	Ramanbande ν_1 von Nitrit (obere Abb.) bzw. Nitrat (untere Abb.) aufgenommen mit der Avalanche Photodiode (APD).	81
5.7	Ermittlung der Nachweisgrenze für Natriumnitrat mit CCD-Kamera Andor DU 401-BR-DD. Obere Kurve: 20 mM, untere Kurve: 5 mM	82
5.8	Meßvolumen im Laserfokus (Wasserimmersionsobjektiv 40x, NA 0,8)	83
5.9	Vergleich des typischen Biofilmsignales mit den Ramanspektren von hochkonzentriertem Ammonium, Nitrit und Nitrat in Wasser sowie Wasser. Belichtungszeit: 250 ms, Laserleistung: 50 mW . .	84
5.10	rötlicher, hochangereicherter ANAMMOX-Biofilm (Delft, NL) . .	87
5.11	Undifferenziertes Spektrum verschiedener Proben: Biofilme aus Betriebsreaktor in Herrenhausen (A+B), rauhes Quarzglas (C). . .	88
5.12	Undifferenzierte Spektren verschiedener Proben bei Anregung mit 532 nm: ANAMMOX-Biofilm (A), in Wasser aufgelöster Biofilm aus Betriebsreaktor (B), Schlamm aus Anzuchtreaktor (C), Biofilm aus Betriebsreaktor (D).	89
5.13	Ramansignale im Biofilm: (A) pinkfarbener Punkt (Fe_2O_3), (B) heller weißer Punkt (TiO_2), (C) orangefarbener Fleck (BaSO_4). . .	91
5.14	„Chemical Image“ eines Biofilmbereiches (links oben: Okularkamera; Mitte: Ramanbande bei 238 cm^{-1} ; links unten: Ramanbande bei 254 cm^{-1}).	92
5.15	Ramansignal (CaCO_3) gemessen in hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm sowie im Biofilm aus Zulaufstutzen.	93
5.16	xy-Übersicht eines ANAMMOX-Biofilmes mit Hilfe der APD aufgenommen („Fast Imaging“). Spektrometermitte: 757 cm^{-1} . Anregungswellenlänge: 532 nm.	95
5.17	Verschiedene Ramanspektren in angereichertem ANAMMOX-Biofilm: ANAMMOX-Bakterium (A), Carotinoid (B), CaCO_3 (C). Anregungswellenlänge: 532 nm.	96
5.18	Okularkameraaufnahme (rechts) von Abb. 5.1. Stelle, an der zahlreiche Ramansignale gefunden werden konnten. Die linke Abbildung zeigt ein $100 \times 100\ \mu\text{m}^2$ großes „Fast Image“ der Ramanlinie 757 cm^{-1} . Anregungswellenlänge: 532 nm.	96

5.19	Darstellung der ortsaufgelösten Auswertung der Ramanlinie bei 757 cm^{-1} im Biofilm aus Betriebsreaktor (ISAH). Bereich $19 \times 16\ \mu\text{m}^2$. Anregungswellenlänge: 532 nm.	97
5.20	Vergleich der Spektren aus hochangereichertem ANAMMOX-Biofilm und Biofilm aus dem Betriebsreaktor am ISAH. Anregungswellenlänge: 532 nm.	98
5.21	Drei sehr ähnliche Ramanspektren in drei verschiedenen Proben: FISH-Probe (A), Biofilm aus Betriebsreaktor (B), hochangereicherte ANAMMOX-Kultur (C). Anregungswellenlänge: 532 nm	99
5.22	Ramanspektren dreier Moleküle aufgebaut aus einem Cyclobutanring.	100
5.23	Ramanspektrum von Carotinoiden im hochangereicherten ANAMMOX-Biofilm. Anregungswellenlängen: 784,6 nm (A) bzw. 532 nm (B).	101
5.24	Ramansignale (B) in hochangereicherten ANAMMOX-Biofilm (Delft, NL) und räumliche Auswertung der CH_3 -Schwingungsbande und Vergleich mit 532 nm-Anregung (A).	102
5.25	Verschiedene Spektren in hochangereicherten ANAMMOX-Biofilm (Medium: Harnstoff). Links – CaPO_4 , Mitte - HECA-MEG, rechts – Carotinoide. Bild: $15 \times 15\ \mu\text{m}^2$	103
C.1	Quanteneffizienz CCD-Kamerasysteme	141

Tabellenverzeichnis

2.1	Fluoreszenzeigenschaften von DDT (Ausschnitt aus [24])	22
3.1	Angewandte Meßtechnik	34
5.1	Nachweisgrenzen in Wasser gelöster Stickstoffverbindungen mit CCD-Kameras (Roper Scientific und Andor) und Avalanche Photo- diode in äquivalenten Konzentrationsangaben. (Belichtungszei- ten: Andor: 100 s, Roper: 120 s, APD: 320 s)	85
C.1	Lasersysteme	142
C.2	Technische Leistungsdaten der verwendeten Spektrometer	143
C.3	Technische Leistungsdaten der für die konfokale Ramanmikro- skopie benutzten CCD-Kamerasysteme	144
C.4	Technische Leistungsdaten der bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen eingesetzten CCD-Kamerasysteme	145

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

- AE** Airy-Einheit (Durchmesser des Airy-Scheibchens)
- ANAMMOX** Anaerobe Ammoniumoxidation
- APD** Avalanche Photodiode
- AWT** Aufwuchsträger
- CCD** Charge coupled device
- CRM** Confocal Raman microscopy (konfokale Ramanmikroskopie)
- CLSM** Confocal laser scanning microscopy (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie)
- DDT** Dichlordiphenyltrichlorethan (Insektizid)
- EPS** Extrazelluläre polymere Substanzen
- FT-IR** Fourier Transform Infrarotspektroskopie
- FWHM** Full width at half maximum (Halbwertsbreite)
- HSM** Holzschutzmittel
- ICCD** Intensified CCD (bildverstärkende CCD-Kamera)
- ISAH** Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Siedlungstechnik
- KrW-/AbfG** Kreislaufwirtschaft- und Abfallgesetz

LIDAR Light detection and ranging

LIPS Laserinduzierte Plasmaspektroskopie

LIF Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

MALDI-TOFMS Matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry

NIR nahes Infrarot(es Licht)

NIST National Institute of Standards and Technology (USA)

PAK polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PCP Pentachlorphenol (HSM)

PCR Polymerase chain reaction

SERS Surface enhanced Raman spectroscopy

UV Ultraviolett(es Licht)

UVRR UV-Resonanz-Ramanspektroskopie

Anhang B

Hintergrund

B.1 Detektion von Holzschutzmitteln

In der heutigen Zeit allgemeiner Ressourcenverknappung wird zum einen das Konzept eines geschlossenen Stoffkreislaufes verfolgt (z.B. Wasserstoff als Energiequelle), zum anderen wird die Wiederverwertung von Wertstoffen der Entsorgung vorangestellt – als Beispiel seien hier Altpapier und der "Grüne Punkt" genannt. Dieser Gedanke des Stoffkreislaufes und des Recyclings zur Schonung der natürlichen Ressourcen wird auch vom Gesetzgeber aufgegriffen. Das Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (KrW-/AbfG) in der Fassung vom 27.09.1994¹ fordert eine Rückführung der nicht vermeidbaren Abfälle in den Stoffkreislauf, um so die Ressourcen zu schonen und dem "Wegwerfprinzip" entgegenzutreten. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Maßgabe der umweltverträglichen Verwertung. Zu beachten ist ferner das Prinzip der Vorrangigkeit. Dies bedeutet, daß einer stofflichen Verwertung der Vorzug gegenüber einer energetischen zu geben ist.

Gerade Holz erfüllt in diesem Sinne alle Voraussetzungen für eine stoffliche oder auch energetische Wiederverwertung. Lange Zeit war allerdings die geforderte Umsetzung des KrW-/AbfG im Bereich des Altholzes (Industrieholz und Gebrauchtholz) unbefriedigend gelöst. Weder gab es klare Vorgaben für die Grenzwerte der Schadstoffbelastung, noch war die Einteilung nach Grad der Belastung und die daraus resultierende Wiederverwertung geregelt. Dieser Zustand wurde mit Inkrafttreten der neuen Altholzverordnung² am 01.03.2003 beseitigt. Hier-

¹BGBI I 1994, 2705 (Sachgebiet: FNA 2129-27-2, GESTA Q9)

²BGBI I 2002, 3302 (Sachgebiet: FNA 2129-27-2-19)

in wird sowohl die Wiederverwertung als auch die Beseitigung vorgeschrieben, wobei letztere nur noch thermisch erfolgen darf. Dementsprechend entfällt die vormals übliche Deponierung.

Die Art der Verwertung richtet sich nach der Schadstoffbelastung. Das Altholz wird hierzu formal je nach Belastungsgrad in vier verschiedene Gruppen (AI – IV) eingeteilt. Unbelastete Hölzer, die nur geringfügig mit Fremdstoffen verunreinigt sind, werden in der ersten Gruppe (AI) zusammengefaßt. Hölzer, die nicht mit Holzschutzmitteln (HSM) oder halogenorganischen Verbindungen, sondern lediglich lackiert oder sonstwie beschichtet bzw. bestrichen wurden, zählen zur Gruppe A II. Die Gruppe A III umfaßt Hölzer, die mit halogenorganischen Verbindungen behandelt worden sind. Alle mit sonstigen HSM behandelten Althölzer sowie die nicht eindeutig in die ersten drei Gruppen zuzuordnenden Althölzer werden schließlich in der Gruppe A IV zusammengefaßt. Demzufolge gehören die in dieser Arbeit untersuchten, mit DDT-behandelten Hölzer der Gruppe A III an.

Somit wird klar, daß der möglichst exakten Trennung, Sortierung und Einteilung des Altholzes entsprechend des Schadstoffgehaltes eine große Bedeutung zukommt. So gilt Altholz als DDT-unbelastet, wenn es den Grenzwert von $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Trockenmasse nicht überschreitet. Holz ist als Rohstoff relativ preiswert (ca. 15,- Euro je Tonne [61]). Demgegenüber stehen für Gebrauchtholz hohe Labor- und Analysekosten, die zudem noch zeitintensiv sind. Für eine Sortierung des Holzes im industriellen Maßstab in den Altholzsammelstellen wird daher eine preiswerte Schnellanalysemethode gesucht, die zuverlässig und in großen Mengen die enthaltenen Schadstoffe vor Ort detektieren kann.

Für anorganische Schadstoffe sowie einige organische Holzschutzmittel existieren bereits Schnellanalyseverfahren (LIPS, Laserinduzierte Plasmaspektroskopie [62] respektive Ionenmobilitätsspektroskopie für PCP [63]), die empfindlich genug sind, um die geforderten Nachweisgrenzen zu erbringen. Für den Nachweis von DDT-haltigen Holzschutzmitteln, die in der DDR noch bis 1989 in großem Umfang eingesetzt wurden (siehe 2.5.3), sind beide Methoden nicht geeignet, so daß zur Zeit noch keine zuverlässige Methode für den DDT-Nachweis existiert. Diese Arbeit möchte zur Entwicklung eines preisgünstigen Schnellanalyse-Systems beitragen und durch vorbereitende Untersuchungen die Möglichkeiten des konzentrationsabhängigen Schadstoffnachweises ausloten.

Die konventionelle Analytik von Umweltproben besteht in der Probennahme vor Ort sowie der Probenaufbereitung und Analyse mit Hilfe empfindlicher Methoden im Labor. Diese Verfahren sind zeit- und kostenintensiv. Eine Verbesserung der beschriebenen Situation wird bereits erreicht, wenn die Analyse vor Ort durchgeführt werden kann. Durch den Einsatz von spektroskopischen in situ Nachweismethoden wird eine weitere Optimierung erzielt. Hier ist die Aufarbeitung der ent-

nommenen Proben nicht notwendig. Diese Methoden haben den zusätzlichen Vorteil, auch zur automatischen Überwachung ausgesuchter Umweltkompartimente eingesetzt werden zu können. Allerdings müssen im Vergleich zur konventionellen Analytik an in situ Meßtechniken aufgrund der komplizierten analytischen Bedingungen i. a. höhere Anforderungen gestellt werden:

- hohe Nachweisempfindlichkeit, da mehrfache Probennahme und Aufarbeitung der Probe nicht möglich sind
- hohe Selektivität und wegen des Verzichtes auf Trennschritte vor der Analyse die Fähigkeit zur Multikomponentenanalyse
- die Möglichkeit, Hintergrundsignale zu diskriminieren und eine weitgehende Verminderung von Matrixinterferenzen
- hohe Analysegeschwindigkeiten mit der Möglichkeit zu automatisierten Langzeitmessungen
- die Möglichkeit nichtinvasiver Messungen mit guter räumlicher Auflösung, ggf. auch aus größerer Entfernung
- die Fähigkeit zur Miniaturisierung der experimentellen Aufbauten für den Einsatz in Feldmeßgeräten

Mit Blick auf das oben Gesagte wurde in dieser Arbeit Wert auf die preisgünstige Schnellanalytik vor Ort gelegt. Zum Nachweis von DDT und anderen Stoffen wurde deshalb die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIF) gewählt. Durch das optische Meßprinzip kann die Probe direkt vor Ort und ohne Aufbereitung vermessen werden.

Da das Laserlicht nicht tief in die Probe eindringt, kann lediglich die Oberfläche analysiert werden. Dies stellt allerdings kein Problem dar, da die Wirkstoffe beim Auftragen auf das Holz nicht tief eindringen. Bei organischen Wirkstoffen in lösemittelbasierten Holzschutzmitteln können je nach Holzart Eindringtiefen von wenigen Millimetern (Fichte, Kiefernern) bis zu maximal 10 mm (Kiefernspint) angenommen werden. Beispielsweise wurden bei einer Beprobung von Leimholzbindern innerhalb der äußeren 5 mm 99% des PCP- und 100% des Lindangehaltes wiedergefunden [64]. Die LIF hat sich als Analysemethode bereits in vielen verschiedenen Meßreihen als leistungsfähiges Werkzeug der in situ Analytik erwiesen und besticht durch ihren recht geringen apparativen Aufwand. Neben der Messung der statischen Fluoreszenz wurde als weiterer Parameter zur Stoffbestimmung die Abklingzeit der Fluoreszenz benutzt (zeitaufgelöste LIF).

B.2 Biofilme in der Abwasserreinigung

Aufgrund seiner existenziellen Bedeutung für den Menschen und die Natur stellt Wasser ein besonders schützenswertes Gut dar. Um Wasser nach der Nutzung möglichst sauber dem Stoffkreislauf wieder zuzuführen, werden hohe Anstrengungen seitens der Klärwerksbetreiber unternommen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der biologischen Seite der Abwasserreinigung zu. Unter Verwendung von Mikroorganismen können zahlreiche umweltgefährdende Stoffe in ihre Bestandteile zersetzt werden.

Biofilme sind „Wohngemeinschaften“ von Bakterien. Es ist ihre bevorzugte Lebensform und repräsentiert den ersten Versuch der Natur zu multizellulärem Leben [65]. Diese Kolonien von Mikroorganismen sind praktisch an allen Grenzschichten zu finden – sofern dort nur genügend Nährstoffe und Wasser vorhanden sind. Aufgrund ihrer hohen Adaptionsfähigkeit gelingt es ihnen, selbst lebensfeindliche Bereiche zu erschließen. Dies kann unter Umständen zu Problemen führen: z.B. Korrosionen in Rohrleitungen oder die Besiedlung von medizinischen Geräten. Der Zusammenhalt der Mikroorganismen untereinander sowie an der Grenzschicht wird durch sogenannte extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) verursacht [66]. Je nach Umgebungsbedingungen siedeln sich die verschiedensten Bakterienarten innerhalb des Biofilmes an. D. h. der Biofilm besitzt neben einer äußerst heterogenen Struktur auch eine außerordentliche Diversifität.

Die Natur stellt eine außergewöhnlich gut funktionierenden Stoffkreislauf dar. Die Stoffe, die unter Energienutzung aufgebaut worden sind, werden von der Natur auch wieder in den Stoffwechsel mit einbezogen. Die freiwerdende Energie bei der Umsetzung wird dann für lebensnotwendige Prozesse genutzt. Ein schöner Nebeneffekt dieses Stoffabbaus ist die daraus resultierende Reinigungsleistung. Mikroorganismen spielen hierbei eine herausragende Rolle. Sie sind, wenn auch teilweise mit geringen Umsatzraten, in der Lage, selbst giftigste Stoffe wie z. B. Dioxin abzubauen. Die mikrobielle Reinigung TNT-belasteter Böden oder die Beseitigung einer Ölverschmutzung wird bereits genutzt. Die Stoffwechselleistungen mikrobieller Lebensgemeinschaften erreichen dabei besonders hohe Umsatzraten, so daß dieses Prinzip der stofflichen Wiederverwertung in der Natur zu einer hohen Reinigungsleistung führt, die im großtechnischen Maßstab u. a. in der biologischen Abwasserreinigung erfolgreich eingesetzt wird [25].

Untersuchungen dieser Gemeinschaft von Mikroorganismen wurden lange Zeit nur äußerst spärlich durchgeführt. Erst in den letzten Jahren ist die Bedeutung von Biofilmen erkannt und die Forschungsaktivitäten in diesem Bereich intensiviert worden. Allerdings stellt die Komplexität des Biofilmaufbaus und die daraus resultierende Unkenntnis der vielfältigen Vorgänge im Biofilm nach wie vor eine entscheidende Hürde sowohl bei der ökologischen als auch bei der ökonomi-

schen Nutzung der biologischen Abwasserreinigung dar. Das System „Biofilm“ wird häufig immer noch als Black-Box betrachtet, bei der Informationen lediglich durch Bilanzierung der ein- und ausgehenden Stoffströme erreicht werden. Eine gezielte und effektive Nutzung der biologischen Abwasserreinigung kann jedoch nur gelingen, wenn das System dahinter verstanden ist. Hierzu müssen die am Klärprozeß beteiligten Bakterien bekannt sein. Allerdings sind mit Hilfe konventioneller Methoden weniger als ein Prozent der im Abwasser vorkommenden Bakterien nachzuweisen³. Mit Hilfe von Gensonden könnte zwar prinzipiell jeder Organismus bestimmt werden. Dazu sind allerdings zum einen organismus-spezifische Sonden notwendig, zum anderen setzt die Methode eine aufwendige Probenpräparation voraus. Eine Ergebnis wird meist erst nach einigen Tagen erzielt.

Besonders geeignet für nichtinvasive in situ Messungen sind optische Analysemethoden, bei denen die Probe berührungslos mit Licht untersucht wird. Hierbei wird das von der Probe mit einer dem Stoff zugehörigen charakteristischen Signatur emittierte respektive gestreute Licht ausgewertet. Zur Untersuchung von Biofilmen werden verschiedene Techniken eingesetzt. Vielversprechend, dies zeigt auch die Anzahl der in letzter Zeit veröffentlichten Artikel zu diesem Thema, ist der Einsatz der CLSM, die prinzipbedingt eine hohe räumliche Auflösung in allen Raumrichtungen erzielt. Mit Hilfe dieser Technik kann der Aufbau von Biofilmen analysiert werden [67]. Daß Struktur- und Morphologiebestimmungen von Biofilmen nicht ganz uninteressant sind, zeigen Lewandowski und Beyenal in ihrer Arbeit, die die Aktivität eines heterogenen Biofilmes bei der Glukoseverwertung im Vergleich zu einem homogen aufgebauten Biofilm mit dem Faktor 10 abschätzen [68]. Demnach läßt der Aufbau eines Biofilmes Rückschlüsse auf den Stoffwechsel zu.

Eine weitere Möglichkeit, den Anwuchs und die Größe eines in einer Durchflußzelle wachsenden Biofilmes zu bestimmen, bietet die Photoakustik, bei der optische Parameter (Absorptions- und Schwächungskoeffizient) Auskunft über dessen Struktur geben [69]. In diesen Experimenten konnte der Einfluß verschiedener Prozeßparameter (pH-Wert und Strömungsbedingungen) untersucht und die Verteilung der Biomasse tiefenaufgelöst gemessen werden.

Ein gezielter Bakteriennachweis im Biofilm kann mit Hilfe der fluoreszenten in situ Hybridisierung (FISH) gelingen. Mit Hilfe von organismusspezifischen Gensonden läßt sich die mikrobielle Vielfalt im Biofilm unterteilen [70]. Auch für die zu der Gruppe der Planktomyceten zählenden ANAMMOX-Mikroorganismen existieren fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidsonden, die bereits in Verbindung mit dem CLSM eingesetzt werden [37]. Allerdings muß der Biofilm hierzu zunächst in Ultradünnschichtpräparate aufbereitet werden.

³Editorial Vermicon: <http://www.vermicon.com/deutsch/general/public/editorial.htm>

Der Zusammenhalt der Mikroorganismen untereinander mit Hilfe der EPS konnte durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Lektinen und der CLSM näher untersucht werden [71]. Ebenfalls mit Hilfe von fluoreszenten Verbindungen und der CLSM konnten Protozoen im Biofilm identifiziert und voneinander unterschieden werden [72].

Keine der oben beschriebenen Techniken bietet die Möglichkeit einer nichtinvasiven online Bestimmung von Mikroorganismen. Eine Probenpräparation und/oder ein zu geringes Auflösungsvermögen stehen den Anforderungen entgegen. Die konfokale Ramanmikroskopie bietet dagegen die Möglichkeit, stoffspezifisch sehr kleine Probenvolumina (μm^3 , je nach Wellenlänge) ohne Probenaufbereitung und in Echtzeit zu analysieren. Da durch das Abrastern der Probe zu jedem Raumpunkt ein Ramanspektrum aufgenommen wird, erhält man durch das Auswerten spezifischer Ramanbanden ein Bild der Stoffverteilung im Raum (sogenanntes "Chemical Imaging"). Der schwache Wechselwirkungsprozeß des Ramaneffektes wird durch die rasante Entwicklung insbesondere im Bereich der CCD-Kameras zunehmend ausgeglichen (s. o.). Das Potential der konfokalen Ramanmikroskopie bei der Stoffbestimmung mit hoher Ortsauflösung zeigt sich u. a. in den in vivo Untersuchungen des molekularen Aufbaus der Humanhaut [73].

Die schnelle Klassifizierung von Mikroorganismen spielt vor allem im medizinischen Bereich eine (lebens)wichtige Rolle, wo akute Infektionen rasch und bakterienspezifisch behandelt werden müssen. Der klassische Weg über Probennahme, Kultivierung, Morphologiebestimmung sowie einer Reihe von chemischen Tests dauert üblicherweise mehrere Tage. Zwar konnte durch die Entwicklung verschiedener Verfahren (Stichworte: DNA-Chip, PCR oder MALDI-TOFMS) diese Zeitspanne mittlerweile verkürzt werden. Allerdings besitzt kaum eine von ihnen das Potential zur nichinvasiven Analyse. Die Möglichkeiten und erfolgreichen Versuche bei der Bakterienidentifikation mit Hilfe schwingungsspektroskopischer Methoden (in erster Linie FT-IR und Ramanmikroskopie) zeigt der Übersichtsartikel von Maquelin et al. [58]. Unter dem Eindruck der Terroranschläge im Jahr 2001 in den USA mit Hilfe von Milzbrandsporen wurde eine Methode entwickelt, die mit Hilfe eines FT-Ramanspektrometers in der Lage ist, den Erreger in den automatischen Postverteilungsanlagen eindeutig zu identifizieren [74].

Aufgrund der Möglichkeit, den Laser auf eine sehr kleine, beugungslimitierte Fläche zu fokussieren, können bereits sehr geringe Mengen – im Idealfall wäre eine Zelle im Brennpunkt ausreichend – mikrobiellen Materials mit Hilfe der Raman-spektroskopie spezifisch analysiert werden. In jüngster Zeit konnte mit Hilfe von optischen Fallen, bei der aufgrund der höheren Brechzahl des Untersuchungsobjektes dieses im Laserfokus eingefangen und festgehalten wird, kleine Partikel schwingungsspektroskopisch in einem CRM analysiert werden [75]. Mit Hilfe einer solchen optischen Pinzette konnten bakteriologische Sporen gänzlich ohne

Aufbereitung mit etwaigen Reagenzien (wie Kolloiden, s. u.) direkt in wäßriger Lösung identifiziert werden [76].

Verschiedene Techniken zur Verstärkung des schwachen Ramaneffektes wurden in erster Linie mit Blick auf die Verkürzung der Meß- bzw. Belichtungszeiten (mehrere Minuten bis zu Stunden sind für Ramanspektroskopiker nichts Ungewöhnliches) realisiert. So besitzt die UV-Resonanz-Ramanspektroskopie (UVR) aufgrund der Beteiligung elektronischer Übergänge am Wechselwirkungsprozeß eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit (eine starke Absorptionsbande kann eine Verstärkung des Ramaneffektes um 3–5 Größenordnungen bewirken). In Kombination mit einer chemometrischen Auswertung der UVR-Spektren, die von Nukleinsäuren und aromatischen Aminosäuren dominiert werden, konnten eng verwandte Bakterienstämme voneinander unterschieden werden [77]. Aufgrund der hohen Absorption im UV dringt Licht dieser Wellenlänge allerdings nicht tief in das Probenvolumen ein, so daß tiefaufgelöste Messungen nicht möglich sind. Desweiteren kommt es bei Verwendung von UV-Lasern zu Photodegradationseffekten in der Probe – zumal das intensive Licht noch fokussiert wird, so daß Leistungsdichten im Bereich von $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ erreicht werden. Eine Lösung dieses Problems bietet die 2-Photonen CLSM, bei der im Fokus des Lasers zwei langwellige Photonen gleichzeitig absorbiert werden (siehe Abschnitt 4.5).

Eine andere, noch nicht im Detail verstandene Ramantechnik ist die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (SERS). Im Unterschied zu der „normalen“ Ramanspektroskopie läßt sich bei Anwendung dieser Methode ebenfalls eine Empfindlichkeitssteigerung um ca. 10^3 – 10^6 erzielen. Für bestimmte chemische Verbindungen sind auch noch wesentlich höhere Verstärkungsfaktoren gefunden worden (bis zu 10^{15}). SERS beruht auf der Wechselwirkung zwischen kleinen, der Probe zugesetzten Metallpartikeln (meist Gold oder Silber) und dem Analyten. Dieses Kolloid muß der Probe zugesetzt werden. Mit Hilfe dieser Technik ließen sich u. a. die biochemischen Komponenten innerhalb von einzelnen Bakterienzellen wie Flavin, DNA und Carboxylate untersuchen [78]. Einer weiteren Arbeitsgruppe gelang es erst kürzlich mit Hilfe der SERS und der computergestützten Hauptkomponentenanalyse, einzelne Bakterienstämme voneinander zu unterscheiden [79]. In Kombination mit der oben bereits erwähnten, optischen Falle können einzelne Bakterien gezielt auch in wäßriger Lösung eingehend studiert werden [80].

Untersuchungen direkt im Biofilm mit Hilfe schwingungsspektroskopischer Methoden wurden bislang kaum vorgenommen. Eine Untersuchung beschäftigte sich mit der Heterogenität mikrobieller Kolonien [81], während eine weitere die Erörterung von Transportvorgängen im Biofilm als Fragestellung hatte [82].

Von allen genannten Untersuchungsmethoden gestattet nur die CRM die zerstö-

rungsfreie, stoffspezifische Untersuchung von Biofilmen im μm -Maßstab in allen Raumrichtungen ohne Zugabe von Hilfsmitteln (Fluoreszenzmarker, SERS-Kolloid). D. h. die Wohngemeinschaft kann in ihrer Gesamtheit ungestört betrachtet werden – sofern die applizierte Laserleistung unterhalb der physiologischen Beeinträchtigung bleibt. Die CRM wurde daher in der vorliegenden Arbeit als spektroskopische Methode bei der Biofilmanalyse etabliert.

Zusammengefaßt sollte in dem Projekt zur einstufigen Deammonifikation (siehe Kapitel 2.6 und 5), das in Zusammenarbeit mit dem Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik (ISAH, Uni Hannover) entstand, der Stoffwechsel der Mikroorganismen aus den vorhandenen, orts aufgelösten Stoffkonzentrationen im Biofilm näher untersucht werden. Am ISAH wurden hierzu entsprechende Reaktoren mit Biofilmen auf Aufwuchsträgern, die zur einstufigen Stickstoffelimination in der Lage sind, betrieben. Dort fanden auch die Messungen zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Biofilm mit Hilfe von Mikrosensoren statt. Aufgrund der ausgeprägten Ramanbanden der stickstoffhaltigen Komponenten (Ammonium, Nitrat und Nitrit) war das Ziel der Untersuchungsreihen am Institut für Biophysik (IfB), die auch Teil der vorliegenden Arbeit sind, die orts aufgelöste Bestimmung dieser Stoffe im μm -Maßstab im Biofilm. Im Verlaufe der Experimente, die in Kapitel 5 ausführlich präsentiert werden, zeigte sich, daß das CRM die Möglichkeit des nichtinvasiven Nachweises der ANAMMOX-Bakterien bietet.

Anhang C

Technische Daten

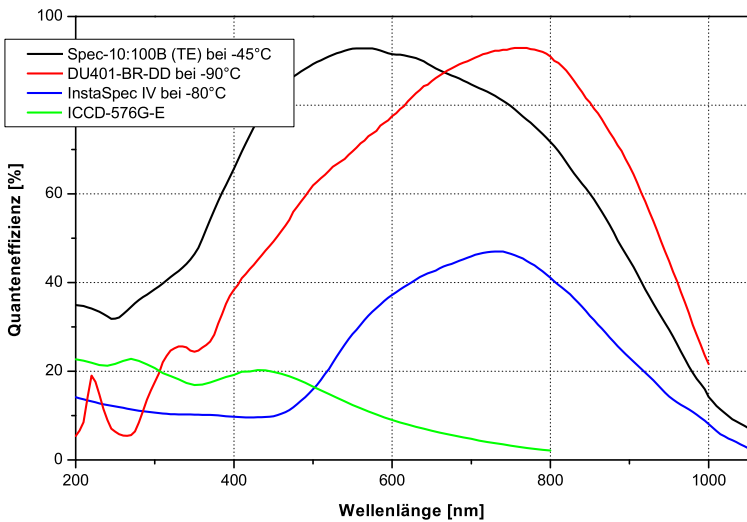


Abbildung C.1: Quanteneffizienz CCD-Kamerasysteme

	XTRA	MSG 801 SD	Compact Laser 501 DNS
	Biofilm (CRM)	Holz (Fluoreszenz)	Holz+Biofilm (Fluoreszenz)
Hersteller	Toptica	LTB (Berlin)	BMI (Frankreich)
Typ	Diodenlaser	Stickstofflaser	Nd:YAG-Festkörperlaser
Wellenlänge	784,6 nm	337,1 nm	1064 / 532 / 355
Mode	TEM00	Superstrahler	TEM00
Strahlquerschnitt		1 x 2 mm ²	9 mm
Divergenz	faserabh.	2 mrad	<0,5 mrad
Leistung / Energie	300 mW	800 kW / 400 μ J	850 / 400 / 200 mJ
spektr. Bandbreite	<10 MHz	12 Ghz	<30 GHz
Wiederholrate	cw	10 Hz	10 Hz
Pulsbreite	-	500 ps	10 ns
Pulsstabilität	1 %	5%	2,5% / 4,5% / 6%
Fokussierbarkeit	< 1 μ m		

Tabelle C.1: Lasersysteme

Tabelle C.2: Technische Leistungsdaten der verwendeten Spektrometer

	Chromex 500IS	MS125	SP-308
Hersteller	Spectroscopy Instruments	L.O.T.-Oriel	Acton
Brennweite	500 mm	125 mm	300 mm
Öffnungsverhältnis	f/8	f/3.7	f/4
Eingangsspalt	10-2000 μm (motorisiert)	100 μm	10-3000 μm (motorisiert)
Gitter (Linien/mm)	1800 (hologr.) 600 (Blaze 250 nm) 150 (Blaze 300 nm)	400 (Blaze 450 nm) - -	1200 (Blaze 750 nm) 600 (Blaze 1 μm) 150 (Blaze 800 nm)
verwendete CCD	ICCD-576B-E	InstaSpec IV	SPEC-10:100B (0,2 / 0,44 / 1,8)
+ Auflösung (nm)	(0,05 / 0,15 / 0,6)	2,7	DU401-BR-DD (0,13 / 0,28 / 1,2)

CCD-Kamera (Typ)	DU401-BR-DD	SPEC-10:100B (TE)
verwendet in	Biofilm (CRM)	Biofilm (CRM)
Hersteller / Vertrieb	Andor Technology (Belfast, Nordirland)	Roper Scientific (Ottobrunn)
CCD-Array	1024x128 (Marconi 40-11)	1340x100 (Princeton Instruments)
Typ	„back illuminated, deep depletion“	„back illuminated“
kürzeste Belichtungszeit	-	-
Pixelgröße	26 μm x 26 μm	20 μm x 20 μm
Pixel sättigung	300.000 e^-	300.000 e^-
Dynamik	16 Bit	16 Bit
Vertikale	16 μs	30 μs
Dunkelstrom	1 $\text{e}^- \cdot \text{Pixel}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (-70°C)	0,1 $\text{e}^- \cdot \text{Pixel}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (-40°C)
Kühlung (TE)	-70°C	-45°C
Systemrauschen (typ/max)	5 / 8 e^- bei 31 kHz	3,5 / 5 e^- bei 100 kHz

Tabelle C.3: Technische Leistungsdaten der für die konfokale Ramanmikroskopie benutzten CCD-Kamerasysteme

CCD-Kamera (Typ)	ICCD-576 G-E	InstaSpec IV
verwendet in	Holz + Biofilm (Fluoreszenz)	Holz (Fluoreszenz)
Hersteller / Vertrieb	Spectroscopy Instruments (Gilching)	L.O.T.-Oriol (Darmstadt)
CCD-Array	576x384	1024x768 (EEV-40-11)
Typ	„intensified“	„front illuminated“
kürzeste Belichtungszeit	5 ns	19 ms
Pixelgröße	23 μm x 23 μm	26 μm x 26 μm
Pixel sättigung		500.000 e^-
Dynamik	16 Bit	16 Bit
Vertikale		16 μs
Dunkelstrom		$1 \text{ e}^- \cdot \text{Pixel}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (-30°C)
Kühlung (TE)	-20°C	-20°C
Systemrauschen (typ/max)	1,2 e^- bei 50 kHz	4 / 8 e^- bei 31 kHz

Tabelle C.4: Technische Leistungsdaten der bei den Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen eingesetzten CCD-Kamerasysteme

Anhang D

Curriculum Vitae

Persönliches

Name	Ralf Pätzold
Geboren	9. Januar 1969 (Hildesheim)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	evangelisch - lutherisch



Schulbildung

1975 – 1979	Grundschule Schellerten
1979 – 1988	Gymnasium Himmelsthür
19. Mai 1988	Hochschulreife

Studien

1989 – 1991	Elektrotechnik (TU Braunschweig)
1991 – 1992	Mathematik (Universität Hannover)
1992 – 2000	Physik (Universität Hannover)
28. Februar 2000	Dipl. - Phys.

Berufliches

1988 – 1989	Anlasserfertigung (Bosch)
1990	Lagerist (VW)
1990 – 1995	Kommutatorfertigung (Bosch)
1993 – 2000	Produktberatung und Moderation (Bosch, Blaupunkt, Thomson)
1995 – 1996	ISO 9000-Zertifizierung (Bosch)
1997 – 2000	Verkäuferschulung (DaimlerChrysler)
1998 –	Photograph der Niedersachsenrundfahrt
2000 –	wissenschaftlicher Mitarbeiter (Institut für Biophysik)

Anhang E

Publikationen

Publikationen

Paetzold R, Anders A, *Noninvasive online analysis of microorganisms in biofilm of a one-stage deammonification process by means of confocal raman spectroscopy*, in: Applied Environmental Microbiology, submission in march 2004

Paetzold R, Hake H, Anders A, *Detection of 'Hylotox 59' and DDT on used wood using LIF spectroscopy*, in: Applied Spectroscopy, submission in march 2004

Paetzold R, *Laserbasierte online Analytik umweltrelevanter Stoffe – Einsatz zweier Methoden*, Dissertation (2004)

Paetzold R, Anders A, *Laser-Based Analysis of Solids with Environmental Impact*, invited review, in: Laser in Environmental and Life Sciences – Modern Analytical Methods, eds.: Lay JP, Hering P, Stry S; Springer Verlag, pp. 51-77, ISBN: 3-540-40260-8 (2003)

Reeck T, Paetzold R, Anders A, *Effects of molecular interactions in liquids on line shapes in coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS)*, J. Raman Spectrosc., to be published (2003)

Hellmer J, Pätzold R, Zeilinger C, *Identification of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter of Methanococcus jannaschii*, FEBS Letters 527, pp. 245-249 (2002)

Hennig K, de Vries T, Paetzold R, Jantos K, Voss E, Anders A, *Multi sensor system for fast analyses in environmental monitoring with an application in waste water treatment*, In: eProceedings No. 1 of the 4th EARSEL Workshop on Lidar Remote Sensing of Land and Sea (2000)

Paetzold R, *Aufbau und Steuerung eines Scanning-CARS-Experimentes zur Analyse von Multikomponentengemischen in Lösung*, Diplomarbeit, Hannover (2000)

de Vries T, Paetzold R, Jantos K, Voß E, Anders A, *Mobile multi sensor system for environmental monitoring*, in: Proceedings of SPIE Vol. 3853, Environmental Monitoring and Remediation Technologies, eds.: Vo-Dinh T, Spellicy RL, pp. 249-253 (1999)

Paetzold R, Voß E, de Vries T, Darpel H, Anders A, *Advantages of coherent anti-stokes Raman scattering (CARS) in environmental monitoring*, in: Proceedings of SPIE Vol. 3821, Environmental Sensing and Applications, eds.: Carleer M, Hilton M, Lamp T, Reuter R, Schäfer K, Russwurm GM, Weber K, Weitkamp K, Wolf JP, Woppowa L, pp. 339-346 (1999)

Vorträge

Konfokale Ramanmikroskopie an Biofilmen zur Abwasserreinigung, DPG-Frühjahrstagung, Hannover (March 28, 2003)

Detection of the Wood Preservative 'Hylotox 59' and its Active Component DDT by Using Laser-Induced Fluorescence (LIF) Spectroscopy, 2nd German-American Biological Sciences Symposium, Hannover, Germany (June 12, 2002)

Einsatz der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie für den DDT-Nachweis auf Holz, DPG Frühjahrstagung, Leipzig, Germany (March 18, 2002)

LIF-Spektroskopie am Beispiel der Holzschutzmittel-Detektion, Seminar, Institute of Biophysics, University Hannover, Germany (July 2, 2001)

Laserphysik, Lecture in the course of the 41st conference of the Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), Charité, Berlin, Germany (May 3, 2001)

Laser induced time resolved fluorescence of the herbicides amizol, ethidimuron, methabenzthiazuron in water and their interactions with Chlorella kessleri, 4th EARSEL Workshop on Lidar Remote Sensing of Land and Sea, Dresden, Germany (June 17, 2000)

Mobile multi sensor system for environmental monitoring, International Conference on Environmental Monitoring and Remediation Technologies II, Photonics East '99, Boston, USA (September 22, 1999)

Advantages of Coherent Antistokes Raman Scattering in Environmental Monitoring, 1st German-American Biological Sciences Symposium, Hannover, Germany (July 2, 1999)

Advantages of Coherent Antistokes Raman Scattering (CARS) in Environmental Monitoring, Conference on In Situ and Remote Measurements of Water Quality, The EOS/SPIE International Symposia on EnviroSense, Munich, Germany (June 16, 1999)

Poster

Reeck T, Paetzold R, Hake H, Anders A, *Detection of the Wood Preservative Hylotox 59 and its Active Component DDT by Using Laser Induced Fluorescence (LIF) Spectroscopy*, Norddeutscher Lasertag, Hannover, Germany (December 4, 2002)

Reeck T, Paetzold R, Hake H, Anders A, *Detection of the Wood Preservative Hylotox 59 and its Active Component DDT by Using Laser Induced Fluorescence (LIF) Spectroscopy*, Analytica Conference 2002, Munich, Germany (April 23-26, 2002)

Verschiedenes

de Vries T, Paetzold R, Reeck T, Voss E, Anders A, *Mobiles Laserfluoreszenzspektrometer für die Umweltanalytik*, Hannover Messe 99, Hannover, Germany (April 19-24, 1999)

Anhang F

Erklärungen

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich erkläre, daß die vorliegende Arbeit noch nicht als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist. Die Kooperationen im Zusammenhang der Experimente am Biofilm sowie die dort durchgeführten Arbeiten werden im Text der Arbeit entsprechend erläutert.

Hannover, den 23. Mai 2004

Anhang G

Danke!

Zunächst gilt mein besonderer und herzlichster Dank Frau Prof. Anders-von Ahlfen, der ich für Ihre sehr engagierte Unterstützung während meiner Arbeit danke sowie für die Möglichkeiten, die sie mir am Institut für Biophysik geboten hat. Herrn Prof. Ertmer gilt in diesem Zusammenhang mein herzlicher Dank für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Thilo Reeck danke ich für die wunderbare Büroatmosphäre und für die vielen hochinteressanten Gespräche abseits des Fachlichen.

Dem sehr schön gelegenen Institut sowie seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die letzten Jahre, in denen ich mich dort sehr wohlfühlt habe.

Herrn Dr. Jörg Müller und Frau Petra Benz von der Firma WITec möchte ich besonders danken. Zum einen für die Nutzung des firmeneigenen CRM 200, das den Durchbruch bei der Bakterienbestimmung ermöglichte. Zum anderen hat mich der herzliche Kontakt sehr gefreut.

Frau Dr. habil. Christine Helmer-Madhok, Frau Meike Packert und Herrn Thobias Gaul vom Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik danke ich für die Kooperation, die immer viel Spaß gemacht hat. Frau Prof. Kunst (ISAH) gilt mein Dank für ihre fach- und projektbezogenen Beiträge.

Danken möchte ich allen, die mich auf meinem Weg begleitet und auf irgendeine Art und Weise unterstützt haben. Dies beinhaltet auch meine Verbundenheit der Deutschen Bundesumweltstiftung (Osnabrück) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn), die durch ihre finanzielle Unterstützung die Projekte erst ermöglichten.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, denen ich so viel zu verdanken habe. Neben der finanziellen Unterstützung über viele Jahre sind es besonders die ideellen Werte, die sie mir durch ihr miteinander vermittelten, die mich geprägt haben.