

Schwingungsspektroskopische Untersuchungen zur Biomineralisation

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

Vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden**

von

**Diplomchemiker Martin Kammer
geboren am 13.06.1980 in Dresden**

Eingereicht am 02.04.2012

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2008 bis
März 2012 an der Professur für Bioanalytische Chemie angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Eike Brunner

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wolff

Tag der Verteidigung:

09.10.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Ziel der Arbeit	3
1.3	Stand der Forschung	4
2	Grundlagen	7
2.1	Biominalisation	7
2.2	Schwämme.....	9
2.3	Chitin	10
2.4	Diatomeen	11
2.5	Schwingungsspektroskopische Überlegungen.....	13
2.6	SERS-Effekt	14
2.7	Vergleich von zwei Medianen mittels Boxplots	15
3	Experimentelle Durchführung	18
3.1	Schwämme.....	18
3.2	Biomimetische Silifizierung	19
3.3	Diatomeen	19
3.4	Nanopartikel.....	21
3.5	Mikroskopie	22
3.6	IR-Messaufbau.....	22
3.7	Raman-Messaufbau Kaiser	23
3.8	Raman-Messungen Witec Spektrometer	23
3.9	Spektrenauswertung	24
3.10	Einfluss des Laserfokus bei Raman-Messungen.....	24
3.11	Anpassung der Raman-Messungen an die Zellwandoberfläche.....	26
4	Auswertung	28
4.1	Schwingungsspektroskopie von Biomineralien und biomimetischen Kompositen	28
4.1.1	Schwammskelette	28
4.1.2	Biomimetische Silifizierung.....	34
4.2	Ortsaufgelöste IR-Messungen	38
4.3	Ortsaufgelöste Raman-Messungen	43
4.3.1	Überblick.....	43

4.3.2	Datenvorbereitung und Auswertung der örtlichen Verteilung.....	49
4.3.3	<i>S. turris</i> : Verteilung des organischen Materials	53
4.3.4	<i>S. turris</i> : Hochortsaufgelöste Messungen	58
4.3.5	<i>S. turris</i> : Einfluss der Behandlung mit Wasserstoffperoxid.....	61
4.3.6	<i>C. asteromphalus</i> : Verteilung des organischen Materials	65
4.3.7	<i>C. wailesii</i> : Verteilung des organischen Materials.....	69
4.4	SERS-Messungen an <i>S. turris</i>	71
5	Zusammenfassung	79
6	Danksagung.....	82
7	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	83
8	Literaturverzeichnis	85
9	Versicherung	94

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Stephen Mann definiert Biomineralisation als die selektive Extraktion und Aufnahme von Elementen aus der lokalen Umgebung und deren Einbau in funktionale Strukturen unter strikter biologischer Kontrolle [1]. Ohne diesen Prozess würden Wirbeltiere nicht existieren, denn Knochen sind eines der prominentesten Beispiele für Biomineralisation. Aber Biomineralisation wird nicht nur von Wirbeltieren genutzt, sondern ist sehr weit verbreitet, sogar Pflanzen wie zum Beispiel Reis weisen Biomineralisationsphänomene auf.

Die am häufigsten anzutreffenden Biominerale basieren auf Calciumphosphat, Calciumcarbonat, Siliziumdioxid (Silikat) und Eisenoxiden. Während der Wachstumsphase erfolgt die Kontrolle des Prozesses durch organische Verbindungen, die spezifisch für die entsprechenden Arten und in den Genen kodiert sind. Durch Biomineralisation entstehen Kompositmaterialien, die organische Bestandteile mit anorganischen Bestandteilen kombinieren. Der Prozess erfolgt dabei unter biologischen Bedingungen, die im Vergleich zu typischen anorganischen Synthesen mild sind. Diese Materialien erfüllen verschiedenste Funktionen von Schutz (Schalen von Muscheln, Kieselalgen) über Strukturgebung (Knochen) bis hin zu magnetischen Sinnesorganen (magnetotaktische Bakterien).

Die genauen Prozesse, welche zum endgültigen Biomineral führen, sind noch nicht hinreichend bekannt und bieten daher ein sehr interessantes Forschungsgebiet. Selbst die Biominerale an sich sind längst noch nicht vollständig charakterisiert und haben oft interessante Eigenschaften.

Bei Hornkieselschwämmen (Demospongiae) wurde davon ausgegangen, dass die Skelette nur aus dem Protein Spongin und sogenannten Spiculen (Nadeln) aus Silikat bestehen. Skelette einiger Arten, deren Mineralbestandteile entfernt wurden, hinterließen aber Rückstände (Fasern), die eindeutig keine Proteine waren und sich als Chitin

erwiesen. Das gab Anlass zur systematischen Erforschung des Vorkommens von Chitin in Schwämmen.

Diatomeen (Kieselalgen) sind einzellige Lebewesen, deren Zellwände aus amorphem Silikat bestehen und die überall im Salz- sowie Süßwasser anzutreffen sind. Die Zellwände zeichnen sich durch ihre Strukturierung im Mikro- bis Nanometermaßstab aus. Der Prozess der Zellwandbildung führt zur Einlagerung von organischem Material in die fertige Zellwand.

Die Schwingungsspektroskopie kann wertvolle Informationen über die Zusammensetzung von Biomineralien liefern. Durch die Verwendung von orts aufgelösten Verfahren ist es möglich die Verteilungen zu untersuchen und so weitere Aussagen über den Aufbau von Biomineralien zu gewinnen.

1.2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten vorrangig mit Hilfe von Raman- und IR-Spektroskopie sowie deren orts aufgelöster Verfahren Informationen über die Art und Verteilung der organischen Matrix in Biomineralien gewonnen werden.

Bei der Untersuchung von extrahierten Schwammskeletten wurde die Raman-Spektroskopie als ergänzende Methode zur Charakterisierung, besonders zum Nachweis von Chitin, eingesetzt.

Die Erforschung der Wechselwirkungen in biomimetisch synthetisierten Chitin-Silikat-Kompositen wurde durch Raman-spektroskopische Messungen unterstützt.

Durch den Einsatz von orts aufgelöster IR- und Raman-Spektroskopie sollte die Verteilung des organischen Materials in extrahierten Diatomeen-Zellwänden, welche von äußerem, nur physikalisch gebundenem organischem Material befreit sind, untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Diatomeen-Arten (*Stephanopyxis turris* (*S. turris*), *Coscinodiscus wailesii* (*C. wailesii*) und *Coscinodiscus asteromphalus* (*C. asteromphalus*)) durchgeführt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Spezies festzustellen.

Die orts aufgelösten Raman-Messverfahren wurden für die entsprechenden Formen der extrahierten Diatomeen-Zellwände optimiert, um den höchstmöglichen Informationsgewinn zu erzielen. Unterschiedliche Extraktionsmethoden wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zusammensetzung der Zellwände untersucht.

Orts aufgelöste Messungen an mit Silber-Nanopartikeln beschichteten Diatomeen-Zellwänden wurden zum Nachweis des SERS-Effektes in Verbindung mit dem organischen Material in den Zellwänden durchgeführt.

1.3 Stand der Forschung

Zwei Klassen von Schwämmen, die Kiesel- und Hornkiesel Schwämme, verwenden wie die Diatomeen Silikat-Biomineralisation. Die Skelette der Schwämme der Klasse Demospongiae (Hornkiesel Schwämme) wurden lange aus nur dem Protein Spongin und Spiculen (Silikatnadeln) bestehend betrachtet. Arbeiten von Ehrlich et al. [2] zeigten aber auf, dass in einigen Arten der Ordnung *Verongida* α -Chitin-Fasern in den Skeletten vorkommen. Bei Chitin handelt es sich um das nach Zellulose häufigste Polysaccharid. Zum Nachweis wurden die Schwämme mittels 2,5 M Natronlauge demineralisiert und von Proteinen befreit. Die zurückbleibenden Fasern wurden unter anderem durch Raman-Spektroskopie als α -Chitin identifiziert.

Die Wechselwirkungen zwischen Chitin und Silikat sind noch weitestgehend unerforscht. Es ist aber bekannt, dass β -Chitin ein quellfähiges Material ist [3], und sich daher gut zur biomimetischen Silifizierung eignen sollte. β -Chitin wurde auch eingelagert in das Biosilikat der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* entdeckt [4]. Das erhöht das Interesse an den Wechselwirkungen zwischen Silikat und Chitin.

Die Raman-Spektroskopie in Verbindung mit leistungsstarken Mikroskopen ermöglicht die Untersuchung sehr kleiner Probenmengen (Mikrometer-Maßstab) und ist daher gut geeignet Schwammskelettfasern und biomimetisch synthetisierte Proben zu untersuchen.

Die einzelligen Diatomeen kommen sowohl in Süß- als auch Salzwasser fast überall auf der Erde vor. Es sind über 100000 Arten bekannt, die aufgrund der Morphologie ihrer Schalen (Zellwände) unterschieden werden [5]. In den Ozeanen bilden sie einen entscheidenden Anteil am Phytoplankton und sind ein wesentlicher Bestandteil der Nahrungskette.

Diatomeen sind seit Erfindung der Mikroskopie aufgrund ihrer fein strukturierten Zellwände aus amorphem Silikat ein beliebtes Untersuchungsobjekt. Seit den 1990er Jahren rückten die Mechanismen des Zellwandaufbaus und die daran beteiligten Stoffe in das Blickfeld der Forschung. Besonders die Arbeitsgruppe um Professor Sumper (Universität Regensburg) hat mit der Entdeckung der Silaffine [6], spezieller Polyamine

[7] und der Silacidine [8] entscheidende Beiträge zum Wissen über die am Zellwandaufbau beteiligten Stoffe geleistet (siehe Kapitel 2.4).

Zur Identifizierung der beteiligten Stoffe werden die im bzw. fest am Biosilikat gebundenen Stoffe untersucht, nachdem äußeres organisches Material mit einem Lysepuffer abgetrennt wurde [9]. Auf die gebundenen Stoffe kann prinzipiell auf zwei Arten zugegriffen werden: Durch Auflösen des Biosilikates oder durch Untersuchung der intakten Zellwände.

Um posttranslationale Modifikationen an Molekülen unverändert zu erhalten, empfiehlt es sich für das Auflösen des Biosilikates nicht Flußsäure sondern eine Ammoniumfluoridlösung zu verwenden [10]. Der Rückstand wird anschließend über chromatographische Methoden aufgetrennt und die entsprechenden Fraktionen weiter untersucht. Typischerweise wird SDS-PAGE als erster Schritt eingesetzt, bei Proteinen gefolgt von Abbau-Verfahren. Zur Charakterisierung werden dann im letzten Schritt Massen- und NMR-Spektrometrie eingesetzt.

Zur Untersuchung der intakten Zellwände bietet sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie an [11].

Sowohl IR- als auch Raman-Spektroskopie wurden bisher vor allem zur Charakterisierung ganzer, nicht extrahierter Diatomeen eingesetzt.

IR-Spektroskopie wurde zur Untersuchung von Phytoplankton-Produktivität, Artenvielfalt und chemischer Zusammensetzung [12], zur Untersuchung der Interaktion zwischen Silikat und organischen Bestandteilen während des Wachstums [13], stressbedingten Änderungen in der Zusammensetzung [14] und zur Unterscheidung von Arten eingesetzt [15].

Raman-Spektroskopie wurde zur Detektion von Domoisäure [16] und zur Unterscheidung von Arten eingesetzt [17].

Ortsaufgelöste schwingungsspektroskopische Untersuchungen an extrahierten Zellwänden oder lebenden Diatomeen wurden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Grundsätzlich kommen sowohl IR- als auch Raman-Spektroskopie in Frage. Mit der Entwicklung von Array-Detektoren für IR-Spektrometer wurden ortsaufgelöste Messungen einfach möglich. Ein derartiger Detektor besteht aus einzelnen Pixeln

wie in einem Sensor für eine digitale Kamera und ist an ein IR-Mikroskop gekoppelt. Die Messtechnik wird als Imaging bezeichnet und ergibt in einer Aufnahme ein ortsaufgelöstes Ergebnis aus mehreren Spektren. Ortsaufgelöste Raman-Messungen werden typischerweise als Mapping durchgeführt. Dabei wird der Laser über ein Mikroskop oder eine Fasersonde auf die Probe fokussiert und die Probe auf einem motorisierten Tisch bewegt. An jedem Messpunkt wird ein einzelnes Spektrum aufgenommen und die Messung am Ende zu einer sogenannten Raman-Map zusammengesetzt.

Damit sinnvolle Aussagen über die Verteilung von organischem Material in den extrahierten Zellwänden getroffen werden können, müssen die Zellwände so groß sein, dass genügend viele Spektren aufgenommen werden können, um einen Verlauf zu erkennen. Daher wurden Arten mit einem Durchmesser zwischen 40 und 300 μm gewählt.

Die größte Herausforderung ist die geringe Menge an organischem Material, die in das Biosilikat mancher Spezies eingelagert ist [18], verbunden mit der geringen Dicke der Zellwände. Daher sind bei ortsaufgelösten Messungen die Signale schwach, was hohe Anforderungen an die Optimierung der Messverfahren stellt.

Da einzelne extrahierte Zellwände gemessen werden, ist es außerdem notwendig mehrere Zellwände zu messen, um eine statistische Einordnung der Ergebnisse zu erhalten.

2 Grundlagen

2.1 Biomineralisation

Biomineralisation, die Abscheidung von anorganischen Stoffen unter biologischer Kontrolle, ist ein sehr wichtiger Prozess in der Natur. Durch die Kombination von organischen und anorganischen Stoffen entstehen neue Kompositmaterialien, welche die verschiedensten Funktionen erfüllen können (Tab. 1)

Diese Komposite sind in ihren Eigenschaften rein organischen oder anorganischen Substanzen überlegen und vereinen häufig die mechanische Härte des anorganischen Materials mit der Flexibilität (Zähigkeit) des organischen.

Formel (Name)	Beispiel für Organismen	Ort / Funktion
Calciumcarbonat basiert		
CaCO_3 (Aragonit)	Fische	Kopf / Gravitationssinn
CaCO_3 (Calzit)	Weichtiere	Schale / Exoskelett
CaCO_3 (Vaterit)	Schnecken	Schale / Exoskelett
Calciumphosphat basiert		
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Hydroxylapatit)	Wirbeltiere	Knochen / Endoskelett
Silikat basiert		
$\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$	Diatomeen	Zellwand / Exoskelett
Eisenoxid basiert		
Fe_3O_4 (Magnetit)	Bakterien	Intrazellulär / Magnetotaxis
$\alpha\text{-FeOOH}$ (Goethit)	Wasserschnecken	Zähne / Zerkleinerung
$5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (Ferrihydrit)	Biber/Ratten/Fische	Zahnoberfläche / Mechanische Stärke

Tab. 1: Beispiele für in der Biomineralisation verwendete Mineralien (nach [1])

Nach der Art des Aufbaus sind grundsätzlich biologisch induzierte und biologisch kontrollierte Biomineralisation zu unterscheiden. Der Fall der biologisch induzierten Biomineralisation ist für die Materialforschung weniger interessant, da hierbei durch den Organismus lediglich günstige Bedingungen für die Abscheidung des Minerals geschaffen werden. Die Bildung des Minerals hingegen erfolgt ohne weitergehende Kon-

trolle durch den Organismus, was zu heterogenen Materialien führt die nicht weiter strukturiert sind.

Wesentlich imposanter und vom materialwissenschaftlichen Standpunkt interessanter ist die biologisch kontrollierte Biomineralisation. Hierbei wird der gesamte Prozess von dem Beginn der Abscheidung über die Formgebung bis zum Ende vom Organismus kontrolliert, was zu für jede Spezies einzigartigen Biomineralien führt. Die so produzierten Materialien haben komplexe Strukturen, eine definierte Zusammensetzung und sind hierarchisch organisiert. Biologisch kontrollierte Biomineralisation ist unter Einzellern (z. B. Algen) weit verbreitet und kommt bei mehrzelligen Organismen fast selbstverständlich vor.

Die Biomineralisation wird hierbei in bestimmten abgegrenzten Bereichen durchgeführt. Dafür werden Vesikel oder makromolekulare Gerüste (Frameworks) verwendet.

Bei Vesikeln handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Zellkompartimente, die speziell für bestimmte Aufgaben, in diesem Fall Biomineralisation, gebildet werden. Vesikel werden gegenüber dem restlichen Zellinhalt durch eine Lipid-Doppelschicht abgeschirmt und sind typisch für intrazelluläre Biomineralisation.

Um größere Strukturen aufzubauen sind makromolekulare Frameworks notwendig. Dabei wird ein Bereich für die Biomineralisation durch spezialisierte Zellen abgetrennt und eine organische Matrix eingebracht, zum Beispiel aus Chitin. Die Abscheidung des Minerals erfolgt dann an der organischen Matrix.

Die Kontrollmechanismen für die Ausbildung des Biominerals können nach Mann [1] in vier Arten eingeteilt werden: Chemische, räumliche, strukturelle und morphologische Kontrolle.

Für chemische Kontrolle sind vier Parameter wichtig: Löslichkeit, Übersättigung, Keimbildung und Keimwachstum. Sie alle sind durch den Organismus beeinflussbar, vom Transport der Ionen bis zur gezielten Beschleunigung oder Hemmung der Bildung des Minerals.

Räumliche Kontrolle erfolgt über die Kontrolle des für die Mineralbildung zur Verfügung stehenden Raumes durch organische Moleküle. Dadurch werden Größe und Form des entstehenden Biominerals bestimmt. Hierzu werden Vesikel oder organische

Netzwerke gebildet. Dabei spielen Strukturen, die sich durch Selbstorganisation der Moleküle bilden, eine wichtige Rolle. Unter Selbstorganisation kann im allgemeinen die spontane aber kontrollierte Bildung supramolekularer Strukturen aus den Einzelmolekülen auf der Grundlage von molekularen Erkennungsmechanismen verstanden werden [19].

Strukturelle Kontrolle wird vermutlich über die Oberflächeneigenschaften von organischen Matrices ausgeübt und führt zu bevorzugtem Kristallwachstum in bestimmte Richtungen. Dabei dient die organische Matrix als Templat für die Biomineralisation.

Morphologische Kontrolle umfasst das Ausbilden von Mustern, die nicht natürlich aus den Mineralstrukturen erwachsen. So besteht z. B. die Zellwand von Diatomeen aus amorphem Silikat, ist aber je nach Art einzigartig strukturiert. Diese Musterbildung wird während der Abscheidung gezielt durch den Organismus unter Einsatz von Biomolekülen gesteuert.

Der Aufbau von großen geordneten Strukturen, wie z. B. den menschlichen Knochen, erfolgt durch Ausnutzung verschiedener der genannten Kontrollmechanismen und der Verwendung von kleineren erzeugten Elementen als Bauelement für den nächsten Prozess.

Die genauen Mechanismen für diese Modellschritte sind bis jetzt noch immer nicht vollständig bekannt und bieten noch viel Anreiz für weitere Forschung.

2.2 Schwämme

Schwämme sind vielzellige Tiere, die in allen Meeren der Erde und auch im Süßwasser vorkommen. Schwämme können sich nicht von selbst fortbewegen und leben an Oberflächen angehaftet. Vom Standpunkt des Skelettaufbaus können drei Klassen unterschieden werden: Hexactinellidae (Glasschwämme), Calcarea (Kalkschwämme) und Demospongiae (Hornkieselschwämme). Die Unterscheidung erfolgt nach den mineralischen Bestandteilen in den Spiculen (Nadelartige Skelettelemente) der Schwämme: amorphes Silikat, Calciumcarbonat (Calzit) und amorphes Silikat gemischt mit Proteinen. Die Klasse der Demospongiae enthält außerdem als Unterklasse die reinen Hornschwämme, welche keine Biomineralien aufbauen.



Abb. 1: Unterwasseraufnahme von *Lanthella basta*, eine der auf Chitin untersuchten Schwammspezies

Um zu untersuchen ob bei dem Aufbau der Schwammskelette organische Matrizes beteiligt sind, ist es notwendig die mineralischen Bestandteile zu entfernen. Für die vorgenommenen Untersuchungen an Spezies der Klasse Demospongiae wurde ein Protokoll von Ehrlich [2] angewandt. Durch mehrtägige Behandlungen mit 20% Essigsäure und 2,5 M Natronlauge lässt sich nicht nur Silikat

entfernen, auch die nicht laugestabilen organischen Komponenten werden entfernt (siehe 3.1).

Falls eine laugestabile organische Matrix, z. B. aus α -Chitin, vorliegt verbleibt diese nach der Laugebehandlung und steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Erst nachdem es 2007 Ehrlich [2] gelungen war α -Chitin erstmalig in Schwämmen nachzuweisen ergab sich weiterer Forschungsbedarf. Davor war man davon ausgegangen, dass Schwämme kein Chitin in ihren Skeletten selber synthetisieren können.

Die Untersuchung von Schwämmen auf das Vorkommen von Chitin als integraler, vom Schwamm synthetisierter Bestandteil der Skelettfasern bietet die Möglichkeit die biologische Einordnung zu unterstützen.

2.3 Chitin

Chitin ist ein Polysaccharid. Dieses Biopolymer kommt nach der Zellulose am zweithäufigsten in der Natur vor. Das Monomer von Chitin ist N-Acetyl-Glucosamin, die Monomere werden über β -1-4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Chitin ist wasserunlöslich und in schwachen Säuren und Laugen stabil. Intensive Behandlungen mit Lauge führen zur Deacetylierung und Umwandlung in das wasserlösliche Chitosan. Bei einem Deacetylierungsgrad von über 50% wird von Chitosan gesprochen. Es

sind drei Formen von Chitin bekannt, die sich in der Orientierung der Moleküle zueinander unterscheiden.

Bei α -Chitin sind die Moleküle antiparallel zueinander ausgerichtet, bei β -Chitin parallel und bei γ -Chitin liegt eine Mischform vor. Im Falle von α -Chitin liegen mehr Wasserstoffbrücken zwischen den Molekülen vor als in β -Chitin, welche zur Stabilität beitragen. α -Chitin ist kristallin.

β -Chitin ist instabiler als α -Chitin und im Gegensatz zu α -Chitin quellfähig aber ebenfalls kristallin. β -Chitin kann in das stabile α -Chitin umgewandelt werden. Bei γ -Chitin ist nicht klar, ob es sich überhaupt um eine eigenständige Modifikation handelt, es könnte sich auch um teilweise in α -Chitin umgewandeltes β -Chitin handeln.

α -Chitin kommt zum Beispiel in Krabbenpanzern sowie in Pilzen vor und wurde durch Ehrlich et. al. [2] erstmalig in einem Schwamm der Spezies *Verongula gigantea* nachgewiesen.

β -Chitin kommt zum Beispiel in den extrazellulären Fasern von Diatomeen sowie in Tintenfischen vor. Chitin konnte auch als Strukturelement in Verbindung mit Diatomeenzellwänden nachgewiesen werden [4].

2.4 Diatomeen

Die einzelligen Diatomeen umfassen über 100.000 Spezies, die sowohl in Salz- als auch in Süßwasser vorkommen. Sie bilden einen bedeutenden Anteil des Phytoplanktons und spielen aufgrund ihrer Photosynthese eine wichtige Rolle im CO_2 -Haushalt. Aufgrund ihrer vielfältig strukturierten aus amorphem Silikat bestehenden Zellwände stellen sie ein beliebtes Untersuchungsobjekt der Mikroskopie dar.



Abb. 2: Lebende Kolonien von *S. turris* (Links), lebende Einzelzellen von *C. walesii* (Mitte) und extrahierte Zellwände von *C. asteromphalus* (Rechts, es standen nur extrahierte Zellwände zur Verfügung)

Die Unterschiede in der Morphologie der Zellwände sind auch die Grundlage der Einteilung der Diatomeen in unterschiedliche Spezies [5]. Die einzigartigen Muster in den Zellwänden, sowohl mikro- als auch nanostrukturiert, werden von Diatomeen von Generation zu Generation reproduziert, was die genetische Kontrolle der Strukturierung der Zellwände zeigt. Nach der Symmetrie der Zellwände werden zwei große Gruppen unterschieden: Die radialsymmetrischen Centrales und die axialsymmetrischen Pennales.

Die silifizierte Zellwände von Diatomeen (Frusteln) bestehen aus zwei Valven, der größeren Epivalva und der kleineren Hypovalva, die wie zwei übereinander gelegte Petrischalen überlappen (Abb. 3). Aufgrund der festen Silikatzellwände erfolgt das Wachstum der Zelle über Ringe aus Biosilikat, den Gürtelbändern, die zwischen den Valven neu gebildet werden.

Die Vermehrung erfolgt am häufigsten über Zellteilung, wobei jede Valve die Epivalva der neuen Zelle wird. Die Hypovalva wird während der Zellteilung neu gebildet. Durch diesen Prozess schrumpfen die Zellen von Generation zu Generation, bis eine sexuelle Vermehrung einsetzen muss, die neue, große Zellen erzeugt.

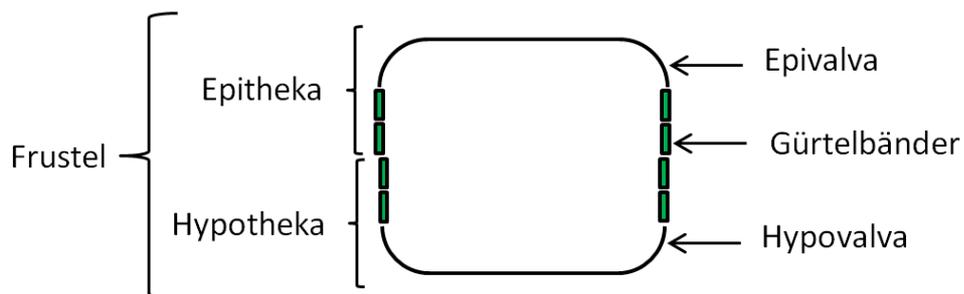


Abb. 3: Typischer Aufbau einer Diatomeenzelle

Das für die Bildung der Valven und Gürtelbänder benötigte Silikat wird aktiv aus dem umgebenden Wasser über spezielle Transportproteine als Monokieselsäure aufgenommen. Diatomeen sind in der Lage, in der Zelle, bis zu einem gewissen Grad, Kieselsäure zu speichern [20], wobei die Menge von Spezies zu Spezies schwankt.

Die Bildung neuen Biosilikats erfolgt in den SDVs (Silica Deposition Vesicles), wobei es noch nicht gelungen ist diese Vesikel zu isolieren. Während der Biosilikatbildung werden organische Moleküle mit in die Zellwand eingelagert, die an der Synthese beteiligt sind. Diese Moleküle können durch Auflösen des Biosilikates mit Flusssäure (HF) oder Ammoniumfluorid (NH_4F) zugänglich gemacht werden, wobei die Verwendung von Ammoniumfluoridlösungen die schonendere Methode ist [10]. Vor dem Auflösen des Biosilikates sind jedoch die nicht fest an das Biosilikat gebundenen Stoffe zu entfernen. Hierzu wird üblicherweise ein Lysepuffer aus Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Natriumdodecylsulfat (SDS) nach einem Protokoll von Kröger eingesetzt [9].

Durch diese Methode wurden verschiedene an der Biosilikatbildung in Diatomeen beteiligte Stoffe entdeckt: Die zwitterionigen Silaffine (posttranslational stark modifizierte Proteine) [6, 21, 22], langkettige Polyamine [7, 23] und die sauren Silacidine [8]. Durch Untersuchungen an den isolierten langkettigen Polyaminen konnte ein Modell für die Strukturbildung im Silikat formuliert werden, das auf der Phasenseparation durch die Polyamine während der Silikatabscheidung beruht [24].

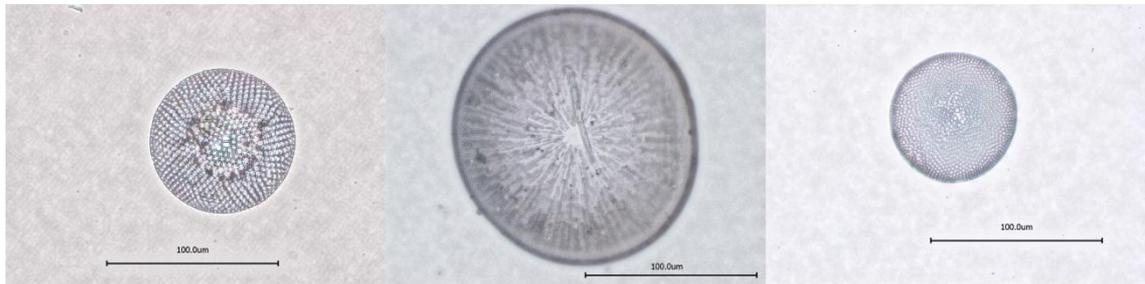


Abb. 4: Mit Lysepuffer extrahierte Zellwände von *S. turris* (Links), *C. walesii* (Mitte) und *C. asteromphalus* (Rechts), Maßstab 100 μm . Die Position der Zellwände ist für ortsaufgelöste Messungen geeignet: Die Valven liegen plan auf dem Objektträger mit der Wölbung nach oben.

2.5 Schwingungsspektroskopische Überlegungen

Sowohl IR- als auch Raman-Spektroskopie sind für ortsaufgelöste Messungen an Diatomeen geeignet. Da extrahierte Diatomeenzellwände nur geringe Anteile an organischem Material beinhalten (1-15 Masseprozent [18]) sind als Hauptsignale im Spektrum die Signale des amorphen Silikates zu erwarten. Diese sind im IR-Spektrum wesentlich deutlicher als im Raman-Spektrum, da Silikat ein sehr guter IR-Absorber ist.

Banden für amorphe Silikate können in vier Bereichen erwartet werden: 300–430 cm^{-1} (Sauerstoff-Streckschwingung im Silikatnetzwerk), 450–600 cm^{-1} (Deformationsschwingungen, Atmungsschwingungen von drei bis viergliedrige Ringen als Defekte in der amorphen Struktur), 750–830 cm^{-1} (Silikat-Netzwerkschwingung überlagert mit Deformationsschwingung) und 800–1100 cm^{-1} (Si-O-Si Streckschwingung) [25, 26, 27].

Von organischen Molekülen sind die besten Signale von CH_x -Gruppen zu erwarten, da viele organische Moleküle CH_x -Gruppen aufweisen. Die Banden sind im Bereich der CH-Valenzschwingungen um 2900 cm^{-1} und im Bereich der CH-Deformationsschwingungen um 1460 cm^{-1} zu erwarten.

Für orts aufgelöste Messungen hat IR-Imaging den großen Vorteil, dass sofort die gesamte Zellwand erfasst werden kann. Das bedeutet gegenüber Raman-Mapping, bei dem die Spektren einzeln hintereinander aufgenommen werden, einen enormen Zeitvorteil. In Bezug auf die Ortsauflösung ist hingegen die Raman-Spektroskopie durch Verwendung kleinerer Wellenlängen im Vergleich zur IR-Spektroskopie überlegen.

Die extrahierten Fasern der demineralisierten Schwammspiculen lassen sich durch beide Arten der Schwingungsspektroskopie untersuchen. Die Raman-spektroskopische Messung kann jedoch durch Fluoreszenz behindert werden.

2.6 SERS-Effekt

SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) wurde zuerst an rauen metallischen Oberflächen beobachtet. Durch Wechselwirkung der Probe mit der Oberfläche traten um Größenordnungen verstärkte Raman-Signale auf. Der Verstärkungsfaktor kann bis zu 10^{10} betragen. Üblicherweise wird ab einem Verstärkungsfaktor von 10^4 von SERS gesprochen. Statt angerauten metallischen Oberflächen werden inzwischen häufig metallische Nanopartikel verwendet. Für die Nanopartikel werden, wegen ihrer Stabilität, Gold und Silber am häufigsten verwendet.

Zur Erklärung des Verstärkungseffektes gibt es zwei Ansätze: Einen elektromagnetischen [28] und einen chemischen [29].

Die elektromagnetische Erklärung geht davon aus, dass das elektrische Feld durch die Oberfläche verstärkt wird. Wenn das Licht für die Anregung des Raman-Signals auf

die Oberfläche trifft werden lokal Oberflächenplasmonen angeregt, welche sowohl die Intensität des einfallenden Lichtes als auch die Intensität des Raman-gestreuten Lichtes verstärken.

Die chemische Erklärung trifft nur auf bestimmte Moleküle zu und geht von der Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes zwischen chemisorbierten Molekülen an der Oberfläche und der Metalloberfläche selbst aus. In diesem Komplex werden Elektronen von der Oberfläche auf das chemisorbierte Molekül übertragen und so Schwingungszustände angeregt.

2.7 Vergleich von zwei Medianen mittels Boxplots

Bei biologischen Proben, wie den hier untersuchten Diatomeenzellwänden, folgen die Messwerte, z. B. der Gehalt an organischem Material, im Allgemeinen nicht der Normalverteilung. Wenn keine Normalverteilung vorliegt, können Konfidenzintervalle und die üblichen statistischen Tests der Normalverteilung auf Gleichheit der Werte nicht verwendet werden.

Um Aussagen über die Verteilung der Messwerte treffen zu können, werden Median und Quartile verwendet. Der Median einer Stichprobe berechnet sich wie folgt: Man ordnet alle Messwerte der Stichprobe in aufsteigender Reihenfolge an. Der Median ist bei ungerader Anzahl von Messwerten der Wert, welcher genau in der Mitte der geordneten Messwerte steht. Bei gerader Anzahl ist es der Mittelwert der beiden in der Mitte stehenden Messwerte.

Als Ausmaß für die Streuung der Werte werden 25% und 75% Quartil angegeben. Das 25% Quartil ist der Wert unter dem 25% aller Messwerte liegen und das 75% Quartil der Wert über dem 25% aller Messwerte liegen.

Zur Veranschaulichung werden sogenannte Boxplots (Abb. 5) eingesetzt. In einem Boxplot wird der Median in der Mitte als Linie markiert, die beiden Quartile bilden die oberen Begrenzungen der Box.

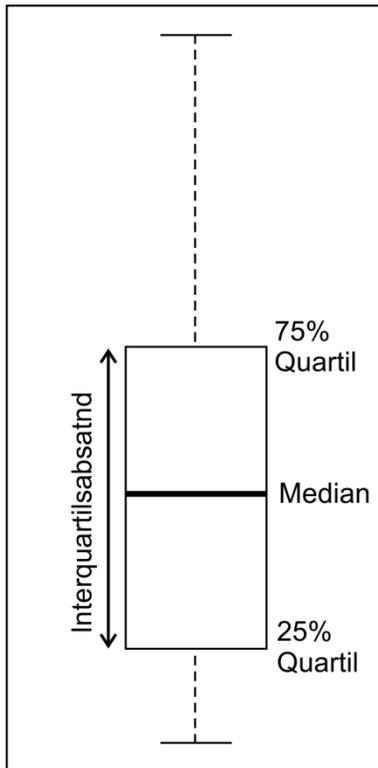


Abb. 5: Beispiel eines Boxplots

Die gestrichelten Fortsätze erstrecken sich maximal bis zum 1,5-fachen des Interquartilsabstands oder bis zum am weitesten außen liegenden Messwert, falls dieser eher auftritt. Der Interquartilsabstand ist definiert als der Abstand zwischen dem 25% Quartil und dem 75% Quartil, das entspricht in einem Boxplot der Länge der Box.

Werte die außerhalb der Fortsätze liegen können als Punkte dargestellt und als Ausreißer eingeordnet werden.

Als graphischer Test auf die Gleichheit zweier Mediane können Boxplots mit Einkerbungen, sogenannten Notches [30] verwendet werden. Die oberen und unteren Grenzen der Einkerbungen werden nach der Formel $M \pm 1,58 \times IQA/\sqrt{n}$

berechnet. M steht für den Median, IQA für den Interquartilsabstand und n für die Anzahl der Beobachtungen.

Die Einkerbungen können als Test auf die Gleichheit der zwei Mediane bei einem Signifikanzniveau von ungefähr 95 % verstanden werden. Wenn sich die Einkerbungen der zwei Boxplots überlappen, wird die Nullhypothese, dass die zwei Mediane unterschiedlich sind, mit einem Signifikanzniveau von ungefähr 95 % zurückgewiesen.

Die Verwendung dieser Methode wird im weiteren Text als Notch-Kriterium bezeichnet.

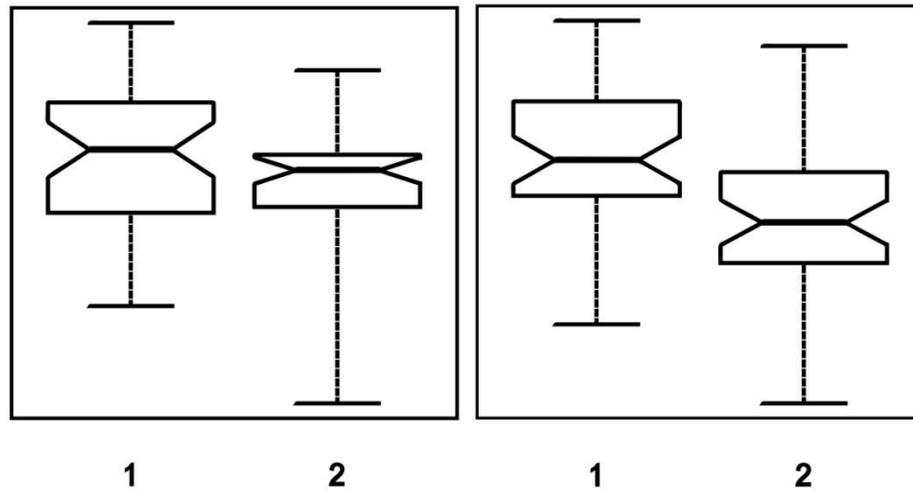


Abb. 6: Beispiel für den Test auf Gleichheit zweier Mediane durch Notches (Einkerbungen) in Boxplots. Überlappenden Einkerbungen (Links) zeigen an, dass die beiden Mediane nicht voneinander unterschieden werden können, nicht überlappende Einkerbungen (Rechts) zeigen unterschiedliche Mediane.

3 Experimentelle Durchführung

3.1 Schwämme

Zur Charakterisierung von Hornkieselschwämmen (Demospongiae) wurden Raman-Messungen durchgeführt. Untersucht wurden Skelettfasern [2] der Spezies *Ianthella basta*, *Aplysina cauliformis* und *Aplysina cavernicola*, die alle zur Ordnung der Verongiden gehören. Die Fasern wurden von Dr. Ehrlich zur Verfügung gestellt.

Um die reinen Skelettfasern zu erhalten wurde ein von Dr. Ehrlich etabliertes Extraktionsverfahren angewandt [31], welches im Überblick in Abb. 7 dargestellt ist.

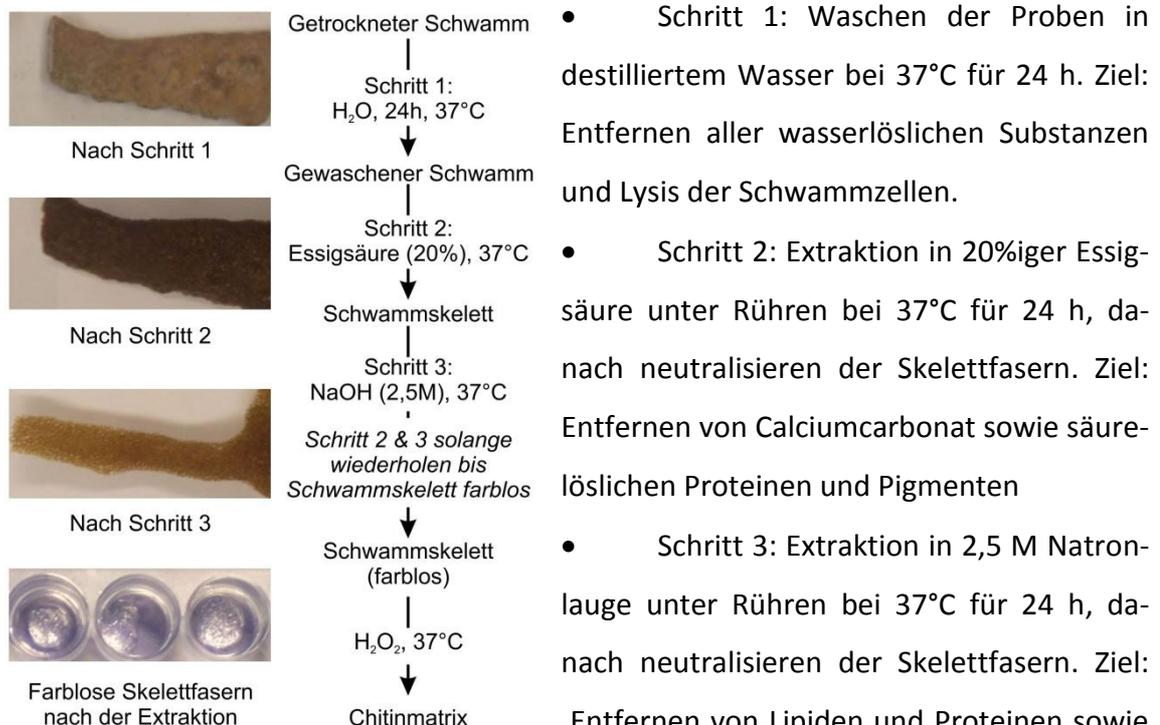


Abb. 7: Übersicht über das Demineralisierungs-/Extraktionsverfahren für Schwammskelettfasern am Beispiel von *Aplysina cauliformis* (nach [39])

Die Schritte 2 und 3 wurden solange wiederholt, bis die Skelettfasern farblos waren. Optional wurde eine Behandlung mit 35% Wasserstoffperoxidlösung unter Rühren bei Raumtemperatur für 15 min angeschlossen um Pigmente zu entfernen.

Die extrahierten Skelettfasern wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

Skelettfasern der Spezies *Verongula gigantea*, die nur Schritt 1 des Extraktionsverfahrens (Waschen mit Wasser), unterzogen wurden wurden auf ihre Mineralbestandteile untersucht.

3.2 Biomimetische Silifizierung

Die Silifizierung der Proben wurde von DC Katrin Spinde nach dem folgenden Verfahren durchgeführt.

Aus Diatomeen extrahiertes β -Chitin wurde nach einem patentierten Verfahren aufbereitet [32, 33]. Diese Fasern werden unter dem Namen poly-N-Acteyl-Glucosamin (poly-NAG) vertrieben. Zur Silifizierung wurden 3 mg PNAG in 5 ml 100 mM Natriummetasilikatlösung suspendiert und mit 2,4 M Salzsäure auf pH 5,5 eingestellt. Die Proben wurden gerührt bis sich ein Gel formte. Nach 24 h wurde das Gel abzentrifugiert (9000 U/min, 15 min) und über Nacht bei 318 K getrocknet [34].

Als Blindprobe wurde Silikatpräzipitate nach dem oben beschriebenen Verfahren unter Weglassung der poly-NAG Fasern hergestellt.

Die Proben wurden für die Ramanmessungen auf Calciumfluoridträger überführt.

3.3 Diatomeen

Für die Untersuchungen standen drei Diatomeenspezies zur Verfügung: *Stephanopyxis turris* (*S. turris*), *Coscinodiscus asteromphalus* (*C. asteromphalus*) und *Coscinodiscus wailesii* (*C. wailesii*). Alle sind Salzwasserdiatomeen, gehören zur Klasse Coscinodiscophyceae und sind radialsymmetrisch. Die Diatomeen wurden in künstlichem Meerwasser (ASW: Artificial Sea Water) nach einer an der Universität Regensburg erprobten Zusammensetzung gezüchtet. Diese ASW-Zusammensetzung beruht auf einem Vorschlag der North East Pacific Culture Collection [35]. Die Zusammensetzung der Stammlösungen ist in Tab. 2 aufgeführt.

Zur Herstellung von einem Liter ASW werden je 100 ml der Basislösungen B1 und B2, 2 ml der Zusatzlösung Z1, je 1 ml der Zusatzlösungen Z2 bis Z7, sowie 800 μ l der Vitaminlösung V1 und je 40 μ l der Vitaminlösungen V2 und V3 benötigt.

Stoff	Einwaage in g
Basislösung B1	Auf 1 l mit entionisiertem Wasser auffüllen
NaCl	207,600
Na ₂ SO ₄	34,770
KCl	5,870
NaHCO ₃	1,700
KBr	0,845
H ₃ BO ₃	0,225
NaF	0,027
Basislösung B2	Auf 1 l mit entionisiertem Wasser auffüllen
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	93,950
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	13,160
SrCl ₂ × 6 H ₂ O	0,214
Zusatzlösung Z1	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Na ₂ SiO ₃ × 9 H ₂ O	3,000
Zusatzlösung Z2	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
NaNO ₃	9,334
Zusatzlösung Z3	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Na ₂ -Glycerolphosphat	1,334
Zusatzlösung Z4	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O (Titrplex III)	0,728
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,354
Hinweis: Zuerst EDTA lösen, dann FeCl ₃ . Eventuell erwärmen.	
Zusatzlösung Z5	Auf 1 l mit entionisiertem Wasser auffüllen
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,4770
ZnCl ₂	0,0346
CoSO ₄ × 7 H ₂ O	0,0160
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,1260
Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O (Titrplex III)	1,8900
Hinweis: EDTA vorher lösen, für die fertige Lösung pH einstellen auf 6 mit NaHCO ₃ (ca. 0,6 g)	
Zusatzlösung Z6	Auf 1 l mit entionisiertem Wasser auffüllen
Na ₂ SeO ₃ × 5 H ₂ O	0,00263
Zusatzlösung Z7	Auf 1 l mit entionisiertem Wasser auffüllen
CuCl ₂	0,134
Vitaminlösung V1	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Thiamin-Hydrochlorid	0,056
Hinweis: Einwaage entspricht 50 mg Thiamin.	
Vitaminlösung V2	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Vitamin B12	0,020
Vitaminlösung V3	Auf 200 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen
Biotin	0,010

Tab. 2: Stammlösungen für die Herstellung des ASW, Basis und Zusatzlösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt, die Vitaminlösungen im Tiefkühlschrank bei -18°C

Nach Zugabe aller Stammlösungen wird das Volumen mit entionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH-Wert mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf 8,0 bis 8,2 eingestellt und anschließend steriltriftriert. Danach ist das ASW einsatzbereit.

Nachdem eine genügend hohe Zelldichte erreicht war, je nach Art nach 4–6 Wochen, wurden die Diatomeen mittels Filtration unter Verwendung von Nylonsiebgewebe mit 11 µm Maschenweite von dem ASW getrennt. Für die Messungen wurden die Zellwände der Diatomeen mittels einer Lysepufferbehandlung extrahiert, die von Kröger et al. [9] vorgeschlagen wurde. Der Lysepuffer besteht aus 0,1 M EDTA und 2% SDS. Die abfiltrierten Diatomeen wurden mit dem Lysepuffer versetzt und 5 min bei 95°C behandelt. Danach wurden die Diatomeen von dem Überstand abzentrifugiert, mit entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend noch zweimal extrahiert, zentrifugiert und gewaschen. Zurück blieben die weiß bis gelblichen extrahierten Zellwände welche getrocknet wurden. Die Herkunft und die Anzahl der untersuchten Ansätze sind in Tab. 3 aufgeführt. Die extrahierten Zellwände wurden für die spektroskopischen Untersuchungen auf CaF₂ Objektträger überführt.

Art	Quelle	# Ansätze	# Messungen
<i>S. turris</i>	Prof. M. Sumper	1	15
	DC R. Hedrich	6	60
	DC P. Richthammer	1	3
<i>C. asteromphalus</i>	Prof. M. Sumper	1	29
<i>C. wailesii</i>	Prof. M. Sumper	1	3
	DC J. Stukert	1	7
	M. sc. A. Jantschke	3	18
SERS <i>S. turris</i>	M. sc. A. Jantschke	1	5

Tab. 3: Übersicht über Arten, Herkunft Ansätze und Messungen

3.4 Nanopartikel

Von M. sc. A. Jantschke wurden extrahierte Zellwände von *S. turris*, an die Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel kovalent gekoppelt waren [36, 37] zur Verfügung gestellt, um den SERS-Effekt an den Zellwänden zu untersuchen. Als Kopplungsreagenz wurde 3-(Aminopropyl)trimethoxysilan (3-APTES) verwendet.

Nach der Extraktion der *S. turris* Zellwände mit Lysepuffer wurden 1 mg Zellwände 15 min unter Schütteln mit Methanol gewaschen. Nach Abzentrifugieren wurden die

Zellwände in eine 3-APTES Lösung (3 vol% 3-APTES in 95% Methanol) überführt und unter 15 min in der Lösung mit Ultraschall behandelt. Danach wurden die Zellwände abzentrifugiert und mit Methanol gewaschen. Die in Methanol suspendierten Zellwände wurden anschließend für eine Stunde in Methanol gekocht.

Nach Trennung der Zellwände von Methanol wurden die Zellwände in einem 2-(*N*-morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer) (0,5 ml, 0,1 mM, Sigma) suspendiert. Anschließend wurde die wässrige Nanopartikellösung (0,175; 0,375 bzw. 1,143 ml) und eine 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimidhydrochlorid (EDC)/*N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Lösung (0,5 ml, 0,025 M EDC (Sigma) / 0,025 M NHS (Aldrich)) unter intensivem Schütteln zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 15 min geschüttelt. Danach wurden die Zellwände dreimal mit Reinstwasser gewaschen.

Die mit den Nanopartikeln gekoppelten Zellwände wurden in Wasser aufbewahrt. Für die Messungen wurden die Zellwände mittels einer Pipette auf den CaF₂-Objektträger überführt und an der Luft getrocknet.

3.5 Mikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden an einem Olympus IX70 Mikroskop sowie einem Keyence BZ-8000 Mikroskop durchgeführt. Das Keyence BZ-8000 Mikroskop verfügt über die Möglichkeit fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchzuführen. Für die Detektion der Eigenfluoreszenz von Chitin wurde ein Filter mit einer Anregungswellenlänge von 360 ± 40 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 ± 50 nm verwendet.

3.6 IR-Messaufbau

Alle IR-Messungen wurden an einem Bruker IFS66/S Spektrometer mit Hyperion™ System (Bruker, Deutschland) vorgenommen. Das Spektrometer verfügt sowohl über einen Einkanal MCT als auch über einen 64×64 Pixel FPA Detektor, die mit flüssigem Stickstoff gekühlt sind. Das System verfügt über einen xy-Tisch und ein 15fach vergrößerndes Cassegrain-Objektiv (NA (Numerische Apertur) 0,4).

Alle Spektren wurden mit dem FPA-Detektor und der Gerätesoftware OPUS 5.0 aufgenommen. Der gemessene spektrale Bereich betrug 3900 bis 950 cm^{-1} , wobei das

untere Ende durch die Undurchlässigkeit der CaF₂ Objektträger und die beginnende Unempfindlichkeit des FPA Detektors begründet ist. Die spektrale Auflösung betrug 4 cm⁻¹.

Der Detektor bietet eine maximale Ortsauflösung von 4,2 µm (Kantenlänge der Pixel). Praktisch ist die Ortsauflösung aber durch die Wellenlänge der IR-Strahlung begrenzt, was im gemessenen Spektralbereich – abgeschätzt nach der Abbe'schen Gleichung: $d = 0.612 \lambda / NA$ – 5,1 bis 16,1 µm ergibt. Jedes gemessene Image besteht aus 4096 Spektren und umfasst eine Fläche von ca. 270×270 µm.

3.7 Raman-Messaufbau Kaiser

Raman-Spektren wurden an einem Hololab Series 5000 Mikroskop (Kaiser Optical Systems, USA) aufgenommen, das über Glasfasern an einen Holopec f/1.8 Spektrograph (Kaiser Optical Systems, USA) ausgestattet mit einem CCD Detektor (Roper Scientific, USA) gekoppelt war. Es wurde ein 785 nm Single Mode Laser zur Anregung der Spektren verwendet. Das Mikroskop war mit einem xyz-Tisch ausgestattet, der eine Abrasterung in 1 µm Schritten in allen drei Dimensionen ermöglichte. Für alle ortsaufgelösten Messungen wurde ein 100fach Objektiv (NA 0,9) verwendet. Extrahierte Zellwände wurden ortsaufgelöst mit einer Leistung von 70 mW auf der Probe bei einer Messzeit von 10 s und einer Akkumulation gemessen. Für die Messung des SERS-Effektes wurde die Leistung auf 30 mW reduziert und eine Messzeit von 3 s bei 3 Akkumulationen verwendet.

Die Spektren wurden mit einem Spektralbereich von 300 bis 3100 cm⁻¹ und einer mittleren spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹ unter Verwendung der Herstellersoftware HoloGRAMS 4.0 aufgenommen.

Alle Diatomeen wurden auf Raman geeigneten CaF₂ Objektträgern gemessen.

3.8 Raman-Messungen Witec Spektrometer

Einige extrahierte Zellwände wurden im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Krafft in Jena am Institut für Photonische Technologie gemessen. Für diese Messungen stand ein Witec Raman-Mikroskop mit einem piezo-kontrollierten motorisierten Tisch zur Verfügung. Verwendet wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und

einer Leistung ca. 10 mW. Der verwendete motorisierte Tisch und die kürzere Wellenlänge ermöglichen eine bessere Ortsauflösung als das Kaiser Gerät. Es wurde mit einer Schrittweite von $0,2 \mu\text{m}$ gearbeitet, bei einer Messzeit von 2 s pro aufgenommenem Spektrum.

3.9 Spektrenauswertung

Alle Spektren wurden aus den Formaten, in denen sie aufgenommen wurden, über Importfunktionen nach R Version 2.13.1 (© 2011 The R Foundation For Statistical Computing) überführt.

R ist sowohl ein Programm als auch eine Programmiersprache. Es wurde speziell für statistische Auswertungen entwickelt und kann durch zahlreiche Pakete erweitert werden. R wird als Freeware von The R Foundation For Statistical Computing entwickelt und zur Verfügung gestellt.

Für die Spektrenauswertung wurden die noch nicht vorhandenen Funktionen geschrieben sowie ein geeignetes Datenformat entwickelt.

3.10 Einfluss des Laserfokus bei Raman-Messungen

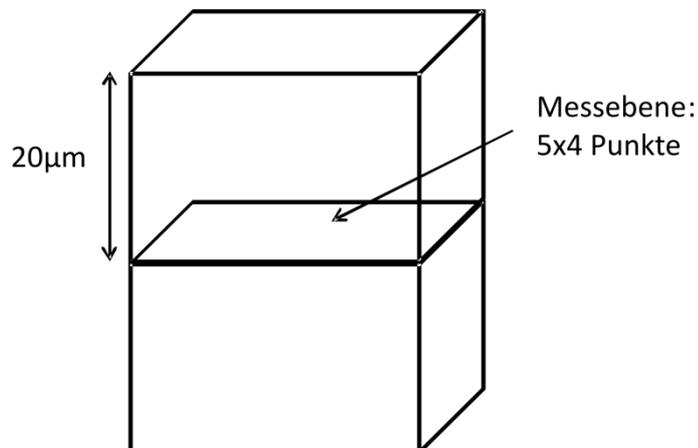


Abb. 8: Schema für die Aufnahme der Intensitäts-Abstandsprofile in z-Richtung

Um die Abhängigkeit der Intensität des Ramansignals vom Abstand in z-Richtung (Höhe) von der extrahierten Diatomeenzellwand zu ermitteln wurde wie folgt verfahren: Von zwei extrahierten Zellwänden für die Arten *S. turris* und *C. asteromphalus* wurden kleine Maps mit 20 xy-Messpunkten aufgenommen. Die Maps wurden in einem möglichst planen Bereich aufgenommen und an jedem Messpunkt wurde die

Höhe von 20 μm über der Ebene (z-Koordinate -20) bis 20 μm unter der Ebene (z-Koordinate +20) abgerastert, resultierend in 41 Spektren an jeder xy-Koordinate (Abb. 8) die jeweils ein z-Intensitätsprofil ergeben.

Für die Auswertung wurde das Integral der Silikatbande bei 800 cm^{-1} verwendet, da diese Bande immer auftritt. Ein Vergleich mit aufgenommenen Hintergrundspektren zeigte, dass der Wert bei dem Maximalabstand von 20 μm dem Hintergrundwert entspricht, daher wurde von jedem z-Profil das Minimum subtrahiert und anschließend auf das Maximum normiert. Anschließend wurden die z-Profile auf das Maximum zentriert (alle z-Profile Maximum bei z-Koordinate 0), auf die gleiche Länge gekürzt und gemittelt.

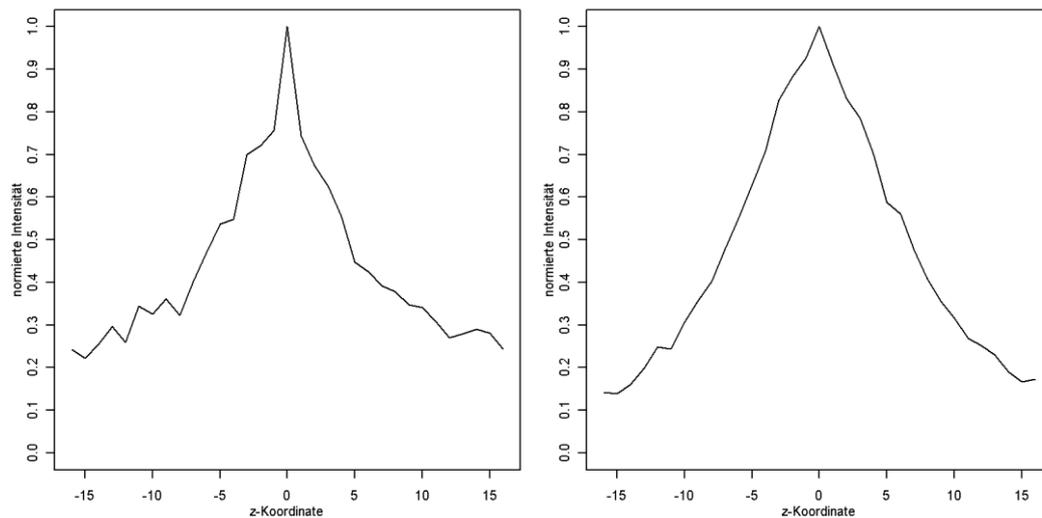


Abb. 9: Intensitäts-Abstandsprofile (z-Profile) für *S. turris* (Links) und *C. asteromphalus* (Rechts)

Die Intensität sinkt für *S. turris* wesentlich stärker als für *C. asteromphalus* (Abb. 9), nämlich um ca. 25% statt um ca. 8% bei einem Abstand von einem Mikrometer vom Maximum welches der Zellwand entspricht. Das ist vermutlich auf dünnere Zellwände zurückzuführen. Da *S. turris* wesentlich stärker gekrümmte Zellwände als *C. wailesii* und *C. asteromphalus* hat, ist es für diese Art notwendig, ein an die Krümmung der Zellwand angepasstes Messverfahren zu verwenden, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

3.11 Anpassung der Raman-Messungen an die Zellwandoberfläche

Die Zellwände von *S. turris* sind radialsymmetrisch und können annähernd als Rotationsellipsoid beschrieben werden. Um einen derartigen Körper zu beschreiben sind grundsätzlich nur zwei Parameter notwendig: Die große und die kleine Halbachse der Ellipse. Diese Parameter ließen sich über den kalibrierten xyz-Tisch des Raman-Mikroskops ermitteln. Dafür mussten die Zellwände an den Gürtelbändern in Hälften zerfallen sein und die Hälften möglichst plan auf dem Objektträger mit der Rundung nach oben liegen (Abb. 10).

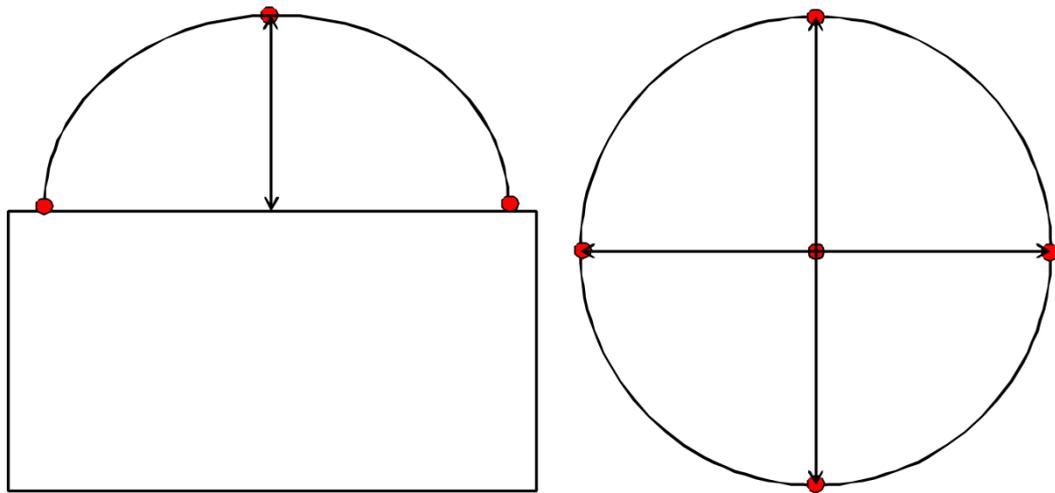


Abb. 10: Seitenansicht (Links) und Aufsicht (Rechts) einer ideal liegenden *S. turris* Zellwand. Die Pfeile kennzeichnen die Halbachsen des Rotationsellipsoiden, die roten Punkte die gemessenen Punkte auf der Zellwand.

Für die Ermittlung der Halbachse, die der Höhe entspricht, wurde der höchste Punkt in der Mitte der Zellwand verwendet. Auf der Kreisfläche wurden vier Messpunkte ermittelt und aus deren Mittelwert die andere Halbachse, die dem Radius der Kreisfläche entspricht, berechnet (Abb. 10).

Für die Berechnungen und das Auslesen der Koordinaten des xyz-Tisches über die serielle Schnittstelle wurde Matlab 6.5.1 (©1984-2005 The MathWorks Inc.) verwendet und die notwendigen Funktionen von Claudia Beileites übernommen (Kommunikation mit dem xyz-Tisch) oder geschrieben (Generierung des Messrasters).

Um ein Messraster zu berechnen, ist außer den beiden Halbachsen noch ein Ausgangspunkt für das Messraster notwendig. Dafür wurde der Mittelpunkt der Kreisfläche gewählt. Die x- und y-Koordinaten wurden als Mittelwert der vier Punkte auf der

Kreisfläche und dem Höhenpunkt berechnet, die z-Koordinate aus dem Mittelwert z-Koordinaten der vier Punkte auf der Kreisfläche.

Ausgehend von dem so berechneten Mittelpunkt und den beiden Halbachsen wurde ein Messraster mit einem Abstand von einem Mikrometer in x- und y-Richtung generiert, während in der z-Koordinate eine Nachkommastelle mitgeführt wurde.

Da HoloGRAMS nur über die Möglichkeit rechteckige Raster zu messen verfügte, wurde für alle orts aufgelösten Messungen das Messraster wie oben beschrieben generiert. Der xyz-Tisch wurde über Matlab gesteuert und die Aufnahme der Spektren, nach Einstellung der Messparameter in HoloGRAMS, ebenfalls über Matlab unter Verwendung der DDE (Dynamic Data Exchange) Schnittstelle von HoloGRAMS ausgelöst.

Für alle Messungen wurden Zellwände ausgewählt die hinreichend plan auf den Objektträgern lagen.

4 Auswertung

4.1 Schwingungsspektroskopie von Biomineralien und biomimetischen Kompositen

4.1.1 Schwammskelette

Durch den systematischen Nachweis von α -Chitin in den Skelettfasern verschiedener Schwammspezies wird die Zuordnung der Spezies unterstützt. Auch das Verständnis der Beziehungen zwischen den Spezies kann erweitert werden.

Für die Untersuchung der Skelettfasern ist es notwendig andere organische und anorganische Komponenten zu entfernen. Dafür wurde das vorgestellte von Ehrlich [31] etablierte Verfahren verwendet (siehe 3.1). Abb. 11 zeigt den Vorgang der Extraktion der Skelettfasern im Überblick: Links die gefriergetrocknete Probe, in der Mitte die Skelettfasern mit Pigmentresten nach Behandlung mit Essigsäure (20%) und Natronlauge (2,5 M) und rechts die von allen Pigmentresten befreiten farblosen Skelettfasern nach Reinigung mit Wasserstoffperoxid (35%)

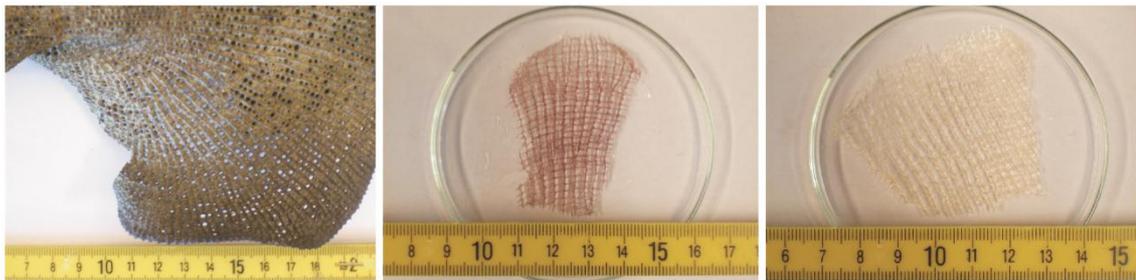


Abb. 11: Extraktion der Skelettfasern am Beispiel von *Ianthella basta*: Links: gefriergetrocknete Probe, Mitte: Extrahierte Skelettfasern nach Behandlung mit Essigsäure (20%) und Natronlauge (2,5 M), Rechts: Farblose Skelettfasern nach Reinigung mit Wasserstoffperoxid (35%)

Zur Untersuchung der extrahierten Schwammskelette wurden zuerst α - und β -Chitin als Referenz gemessen. Es standen aus Krabbenpanzern gewonnenes α -Chitin der Firma FLUKA und aus dem Wurm *Riftia pachyptila* extrahiertes β -Chitin von Dr. H. Ehrlich zur Verfügung. Die größten Unterschiede zwischen α - und β -Chitin sind im Wellenzahlbereich von 800 bis 1500 cm^{-1} zu finden (Abb. 12 Links). Die Amid I ($\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$)

und CH_x -Valenzschwingungsbande ($2850\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$) unterscheiden sich nur in den Intensitäten und tragen daher weniger zur Identifizierung bei.

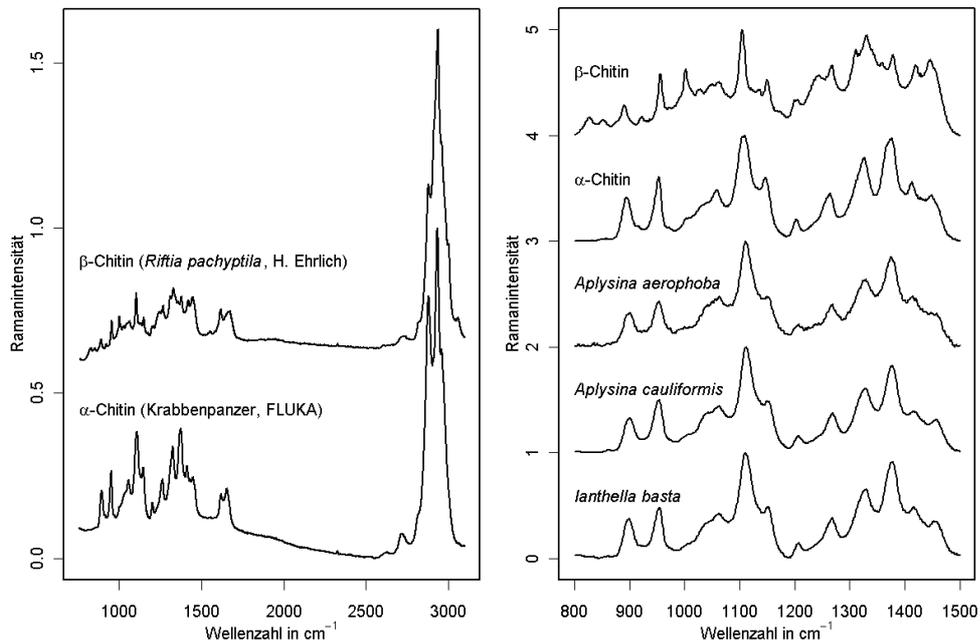


Abb. 12: Links: Ramanspektren der Chitinreferenzen; Rechts: Basislinienkorrigierte Ramanspektren der demineralisierten Schwammskelette im Vergleich mit den Referenzen

Daher wurde für den Vergleich zwischen den demineralisierten Schwammskeletten und den Chitinreferenzen der Wellenzahlbereich auf $800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ eingeschränkt. Um die Intensitätsunterschiede und unterschiedliche Basislinien auszugleichen, wurde zuerst eine lineare Basislinienkorrektur zwischen 800 und 1500 cm^{-1} durchgeführt, gefolgt von einer Minimum-Maximum-Normierung.

In Abb. 12 (Rechts) ist die sehr gute Übereinstimmung der Spektren der Schwammskelette mit der α -Chitinreferenz zu erkennen. In der Bandentabelle (Tab. 4) wird der Unterschied zu β - und die Übereinstimmung mit α -Chitin noch einmal verdeutlicht. Die Zuordnung zu den Schwingungen wurde auf der Grundlage vorhandener Veröffentlichungen [38, 3] vorgenommen.

Generell ist zu bemerken, dass β -Chitin schmalere Banden als α -Chitin aufweist und auch die Intensitäten verschieden sind. Zusätzlich zeigt β -Chitin Banden, die in α -Chitin und den Schwammskeletten nicht oder nur als „Schulter“ auftreten. Beispiele sind die Banden bei 921 , 1002 und 1244 cm^{-1} . Auch die Bande bei 1049 cm^{-1} im Bereich der C-O-C-Valenzschwingung ist signifikant gegenüber der Bande in α -Chitin (1068 cm^{-1}) ver-

schoben. Diese typischen β -Chitin-Merkmale sind bei keinem der Schwammskelette zu beobachten. Abweichungen von der Referenz bleiben im Rahmen der spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} .

β -Chitin	α -Chitin	<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Aplysina cauliformis</i>	<i>I. basta</i>	Zuordnung
Wellenzahl / cm^{-1}					
890	895	899	899	895	CH _x Deformation (o. o. p.)
922					
952	952	953	953	950	
1002					C–O–C / C–O Valenz
1049	1058	1063	1061	1057	
1104	1108	1111	1111	1108	
1134					
1150	1147	1150	1151	1146	
1203	1203	1205	1207	1202	Amid III
1244					
1266	1264	1267	1268	1264	
1311					
1331	1326	1327	1328	1326	
1359					
1379	1375	1376	1376	1375	CH _x Deformation
1419	1413	1413	1416	1411	
1446	1448	1445	1456	1449	

Tab. 4: Bandentabelle zu Abb. 12 (Rechts): Vergleich der demineralisierten Schwammskelette mit den Chitinreferenzen

Ordnung Verongidae

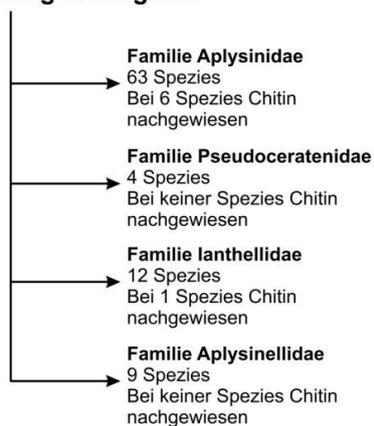


Abb. 13: Familien der Ordnung Verongidae und die Anzahl der Spezies bei denen Chitin nachgewiesen werden konnte

Das Ergebnis der Raman-Spektroskopie, dass es sich bei dem Material der Schwammskelette um α -Chitin handelt, wurde auch durch weitere Methoden [39, 31] bestätigt.

Der Nachweis von Chitin in Schwammspezies leistet einen Beitrag zur Einordnung der Schwämme in Familien. In Abb. 13 sind die vier Familien der Ordnung Verongidae im Überblick dargestellt. Nach dem jetzigen Stand der Forschung sind in zwei Familien Chitin vorhanden und in zwei nicht.

Das Vorhandensein von Chitin könnte sich hier als biochemisches Kriterium für die Zugehörigkeit einer Spezies zu einer Familie anbieten.

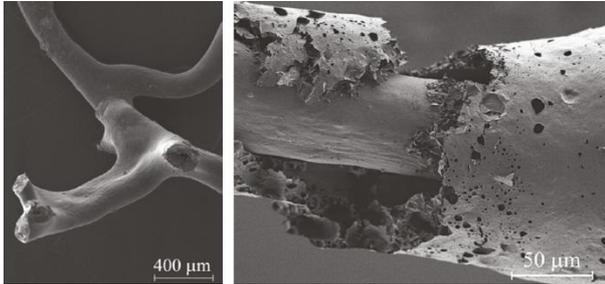


Abb. 14: REM-Aufnahmen von Fasern von *Verongula gigantea* vor (Links) und nach 3 wöchiger Behandlung mit 3M HCl bei 37°C (Rechts). Im rechten Bild ist das im Inneren befindliche Chitin umgeben von einer löchrigen Schicht aus Silikat zu sehen.

An Fasern der Spezies *Verongula gigantea* wurde mittels Raman-Mikroskopie untersucht ob noch andere mineralische Bestandteile außer Silikat nachgewiesen werden können.

Erste Hinweise auf eine weitere, säurelösliche Komponente in den Fasern gaben REM-Aufnahmen nach Behandlung der Fasern mit 3M Salzsäure

[40]. Wie in Abb. 14 zu sehen verblieb ungelöstes Silikat und der innere Chitinstrang. In dem Silikat waren Poren zu erkennen, die vorher nicht vorhanden waren.

Bei 4 Messungen an verschieden nicht demineralisierten Fasern konnte ein sehr starkes Signal bei 1083 cm^{-1} beobachtet werden. Ein Signal in diesem Bereich ist typisch für Calciumcarbonat [41]. Es sind drei Modifikationen von Calciumcarbonat bekannt: Aragonit, Calcit und Vaterit. Vaterit konnte sofort ausgeschlossen werden, da es keine einzelne Bande in diesem Bereich sondern drei Banden bei ca. 1075 , 1085 und 1090 cm^{-1} aufweist [41, 42].

Um den Nachweis zu führen, dass Aragonit vorliegt, wurden Referenzen, die vom Institut für Mineralogie in Münster zur Verfügung gestellt wurden, gemessen.

Das Ramanspektrum der *Verongula gigantea* Fasern zeigt außer der sehr starken Bande bei 1084 cm^{-1} noch eine zweite intensive Bande bei 702 cm^{-1} (Abb. 15 Links), die bei Calcit nach 711 cm^{-1} verschoben ist. Wie die Vergrößerung der Spektren rechts in Abb. 15 zeigt existiert noch eine Reihe schwacher Banden. Diese stimmen mit den Bandenpositionen in Aragonit überein (Tab. 5) und identifizieren den mineralischen Bestandteil eindeutig als Aragonit.

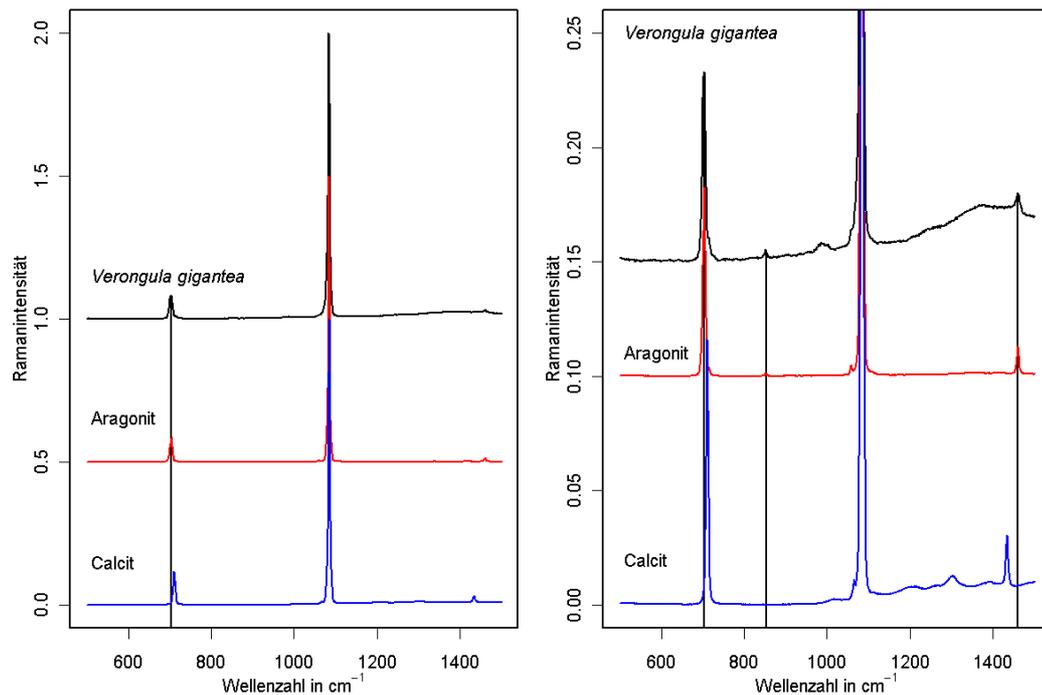


Abb. 15: Mittelwert-Ramanspektren *Verongula gigantea* Fasern, Aragonit- und Calcit-Referenz

Deformation (in plane)	Deformation (out of plane)	Valenz symmetrisch	Valenz antisymmetrisch	Carbonation- Schwingung
702	852	1084	1461	Verongula gigantea
704	852	1084	1461	Aragonit
711		1085	1435	Calcit

Tab. 5: Bandentabelle für *Verongula gigantea* Fasern, Aragonit- und Calcit-Referenz, Zuordnung nach [41]

Bei allen aufgeführten Schwingungen handelt es sich um Carbonation-Schwingungen. Durch das Kristallgitter der Minerale wird auch die Symmetrie des Carbonations beeinflusst. Sie sinkt von D_{3h} auf D_3 in Calcit und weiter auf C_s in Aragonit [43]. Dadurch ist das Auftreten der eigentlich Raman-verbotenen out-of-plane Deformationsschwingung in Aragonit zu erklären.

Die Ergebnisse der Raman-Messungen wurden durch weitere Messungen abgesichert. Die Entdeckung der Einlagerung von Aragonit in das Silikat von *Verongula gigantea* veranlasste uns das in Abb. 16 dargestellte Modell vorzuschlagen [40].

Nach diesem Modell erfolgt die Kristallisation von Aragonit in Anwesenheit von polymerisiertem Silikat in Umgebung der Chitinstränge. Das α -Chitin dient dabei als

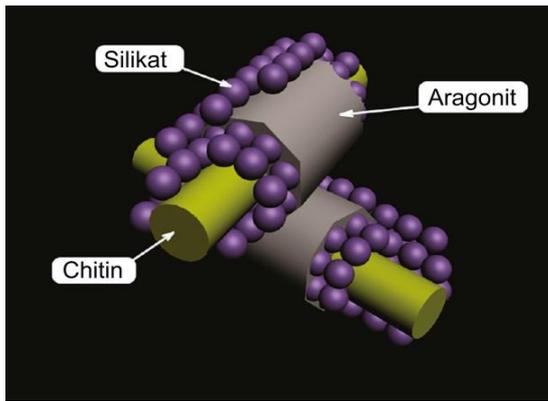


Abb. 16: Modellvorschlag von Ehrlich et al für die *Verongula gigantea* Fasern

Templat für die Abscheidung der anorganischen Phasen. Weitere Inhaltsstoffe des Schwammes werden vermutlich eine regulierende Wirkung haben.

Das Ergebnis ist ein bis dahin unbekanntes, neuartiges Bio-Kompositmaterial, das im wesentlichen aus den drei Komponenten α -Chitin, Aragonit und Silikat besteht.

4.1.2 Biomimetische Silifizierung

Chitin in Verbindung mit Silikat kommt nicht nur wie gezeigt in verschiedenen Schwammspezies vor, es bildet auch ein Netzwerk im Biosilikat der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* [4].

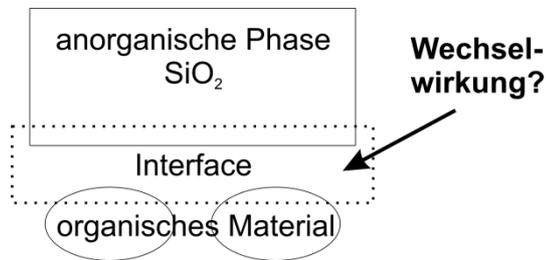


Abb. 17: Fragestellung der hier gezeigten Messungen zur biomimetischen Silifizierung

Um die Wechselwirkungen zwischen der organischen Matrix (Chitin) und der anorganischen Silikatphase zu untersuchen wurden *in vitro* poly-NAG-Fasern (aufbereitetes β -Chitin) silifiziert. Die möglichen Wechselwirkungen reichen von einer reinen Abscheidung von Silikat auf

den Fasern, über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, bis zu kovalenten Bindungen an die Sauerstoffe der SiO₄-Tetraeder.

Die Proben wurden von DC Katrin Spinde hergestellt. Die poly-NAG-Fasern wurden in einer Natrium-Metasilikatlösung (pH 5,5) suspendiert. pH-Wert und Natrium-Metasilikat wurden gewählt um die biologischen Bedingungen möglichst gut zu reproduzieren [44]. Über 24h bildete sich ein Gel um die poly-NAG-Fasern. Es wurde abzentrifugiert und über Nacht bei 318 K getrocknet. Für die Messungen wurden die erhaltenen Gele in Stücke zerteilt.

Um die Verteilung der Fasern in dem Silikat zu charakterisieren wurden mikroskopische (Belichtung: 1/100 s) und fluoreszenzmikroskopische (Belichtung: 1 s) Bilder am Keyence BZ-8000 Mikroskop bei 10facher Vergrößerung aufgenommen.

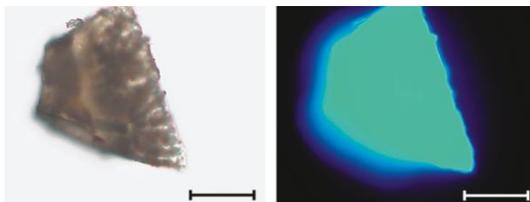


Abb. 18: Mikroskopische (Rechts) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des poly-NAG-Silikat-Komposits, Maßstab: 100 μ m

In Abb. 18 (Rechts) ist gut zu erkennen, dass sich die typische blaue Fluoreszenz der poly-NAG-Fasern über die gesamte Probe erstreckt. Das zeigt, dass die Probe homogen aus poly-NAG-Fasern und Silikat besteht und dass die Fasern in das Silikat eingelagert sind.

Um nur die reinen Probenspektren zu erhalten wurden die Spektren hintergrundkorrigiert. In Abb. 19 (Links) sind die so erhaltenen Spektren für die reine Silikat-Blindprobe, die silifzierten poly-NAG-Fasern und die reine poly-NAG-Faser Referenz dargestellt.

Auch nach Trocknung ist im Silikat-Spektrum eine breite Bande bei 1646 cm^{-1} vorhanden. Diese Bande kann OH-Deformationsschwingungen zugeordnet werden und weist auf im Gel eingelagertes Wasser und Si-OH-Schwingungen hin. Die hohe Intensität deutet darauf hin, dass es sich nicht nur um Si-OH-Schwingungen handelt.

Das Spektrum des silifzierten poly-NAG zeigt bei 792 und 981 cm^{-1} neue Banden, die Silikat zuzuordnen sind. Das zeigt, dass Silikat an den poly-NAG Fasern abgeschieden wurde. Alle Banden sind im Vergleich mit der poly-NAG Referenz verbreitert.

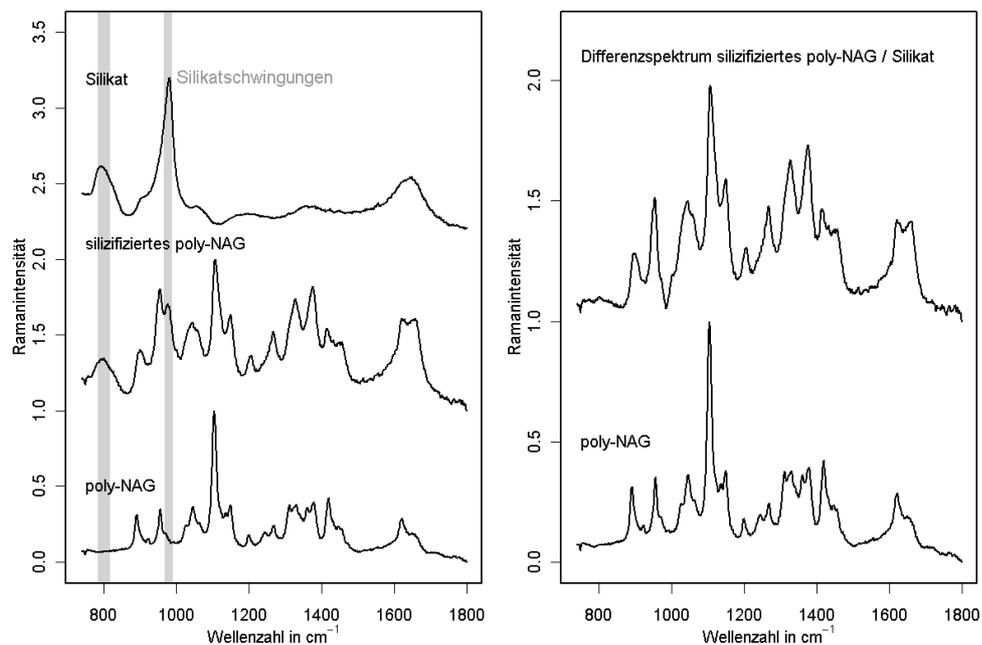


Abb. 19: Links: Hintergrundkorrigierte Ramanspektren der Blindprobe (reines Silikatpräzipitat), der silifizierten poly-NAG Fasern und des reinen poly-NAG; Rechts: Differenzspektrum silifiziertes poly-NAG/Silikat im Vergleich mit reinem poly-NAG

Die Banden bei 1245 , 1311 und 1361 cm^{-1} in der Referenz gehen nach der Silifizierung durch die Verbreiterung der Banden in die Banden bei 1268 , 1328 und 1377 cm^{-1} über. Um den Einfluss des Silikates zu korrigieren wurde das Differenzspektrum aus silifiziertem poly-NAG und der Blindprobe gebildet (Abb. 19, Rechts). Im Differenzspektrum ist die Ähnlichkeit zur poly-NAG Referenz deutlich zu erkennen. Die Ver-

breiterung der Banden ist auch im Differenzspektrum zu erkennen. Das lässt darauf schließen, dass die Bandenverbreiterung auf die Silifizierung zurückzuführen ist und nicht nur ein Summenspektrum ohne Wechselwirkungen zwischen Silikat und poly-NAG vorliegt.

Es sind keine signifikante Verschiebungen der Bandenlagen zwischen Differenzspektrum und Referenz zu beobachten. Das zeigt, dass keine Umwandlung in α -Chitin vorliegt und die Wechselwirkung zwischen poly-NAG und Chitin nur schwache Wechselwirkungen sein können.

Silikat	silifiziertes poly-NAG	poly-NAG	Differenz silifiziertes poly-NAG/Silikat	Zuordnung
792	797			Silikat
	901	892	898	CH _x Deformation (o. o. p.)
	924 (schwach)	924	923 (schwach)	
	956	957	955	
981	977			Silikat
	1044	1047	1044	C–O–C / C–O Valenz
1055				Silikat
	1108	1105	1108	C–O–C / C–O Valenz
	1149	1149	1149	
	1206	1201	1206	Amid III
		1245		
	1268	1268	1267	
		1311		
	1328	1330	1328	
		1361		
	1377	1379	1376	CH _x Deformation
	1416	1420	1416	
	1622	1621	1622	Amid I
1646 (breit)				Deformation OH H ₂ O/Si-OH
	1656	1651	1660	Amid I

Tab. 6: Bandentabelle und Zuordnung für die in Abb. 19 gezeigten Spektren

Es ist bekannt, dass β -Chitin quellfähig ist [3]. Bei poly-NAG handelt es sich um extrahiertes β -Chitin. Die Bandenlage sowie das Aussehen stimmen gut mit der β -Chitin Referenz überein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich poly-NAG wie β -Chitin verhält.

Das Einlagern von Silikat in die poly-NAG Fasern erklärt neben der Verbreiterung der Banden auch die Veränderungen im Bereich der Amid I Bande. Saito et. al. [45] stellten fest, dass durch das Quellen der Fasern eine höherer Intensität der Bande 1622 cm^{-1} auftritt. Die Veränderung der Amid I Bande lässt sich nicht durch die OH-Deformationsschwingung erklären, da diese Bande breit ist und ihr Maximum bei 1646 cm^{-1} hat.

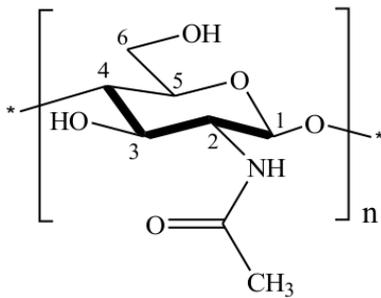


Abb. 20: Monomer von poly-NAG (β-Chitin)

Die an diesen Proben durchgeführten ^{13}C -CP-NMR-Messungen [34] zeigen, dass die stärksten Veränderungen am C6 Atom (Abb. 20) in der Seitenkette auftreten. Die an diesem Kohlenstoffatom gebundene Hydroxylgruppe ist zur Bildung von Wasserstoffbrücken fähig und Veränderungen können daher auf Änderungen in den Wasserstoffbrücken zurückgeführt werden. Die Veränderungen an der Carbonylfunktion

der Amidgruppe waren nicht signifikant.

Aus den Raman-Spektren lässt sich zunächst nur auf eine Einlagerung von Silikat in die poly-NAG Fasern schließen, während die Festkörper-NMR außerdem zeigt, dass Veränderungen in den Wasserstoffbrücken auftreten.

4.2 Ortsaufgelöste IR-Messungen

Um die Möglichkeiten der IR-Spektroskopie zur Untersuchung der Verteilung des organischen Materials in extrahierten Diatomeen-Zellwänden festzustellen, wurden Transmissions-Messungen an Zellwänden aller 3 Spezies vorgenommen. Es wurden Zellwände aus den Ansätzen von Prof. Sumper verwendet. Transmission wurde gewählt um das gesamte Zellwand-Material zu erfassen.

Auf den Mikroskopbildern zu den Messungen ist gut die Symmetrie der Zellwände von *S. turris* und *C. asteromphalus* zu erkennen. Die Zellwände von *C. wailesii* neigen leicht zum Zerschneiden, daher wurde ein möglichst zusammenhängendes Bruchstück gewählt (Abb. 21).

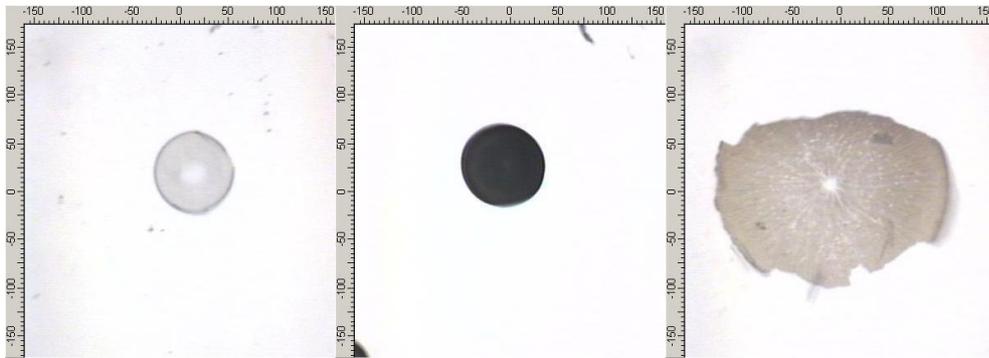


Abb. 21: Mikroskopbilder des IR-Mikroskops (15x Vergrößerung): Rechts *S. turris*, Mitte *C. asteromphalus*, Links *C. wailesii*

Zur Veranschaulichung von ortsaufgelösten Messungen werden Falschfarb-Darstellungen verwendet. Die Farbskala von blau bis rot zeigt die Intensität an den Ortskoordinaten an. In Abb. 22 ist das Integral ($1000-1250\text{ cm}^{-1}$) der stärksten Bande im Spektrum dargestellt. Diese Bande wird Si-O-Valenzschwingungen zugeordnet [46].

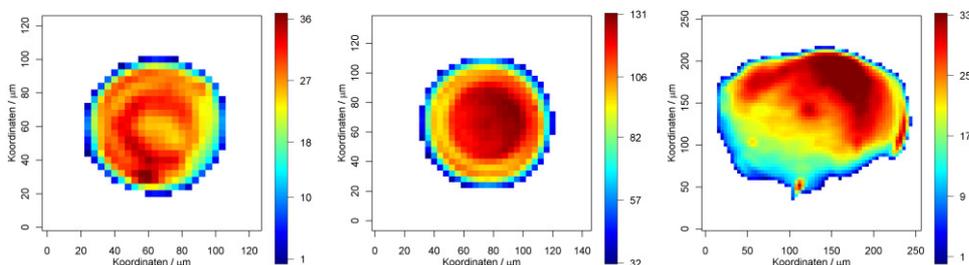


Abb. 22: Ortsaufgelöste Darstellung des Integrals von $1000-1250\text{ cm}^{-1}$ für die drei Arten (Rechts *S. turris*, Mitte *C. asteromphalus*, Links *C. wailesii*), die Farbskala von blau nach rot gibt die Intensität an, Pixelbreite: $4,2\text{ }\mu\text{m}$

Die schwachen Intensitäten (blau) am Rand der Zellwände sind auf eine Mittelung zwischen Pixeln mit Zellwand und der Umgebung zurückzuführen. Der Anstieg der Intensitäten im Inneren kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Extinktion = $\epsilon \cdot c \cdot d$) von folgenden Faktoren abhängen: spezifischer Extinktionskoeffizient (ϵ), Konzentration (c) und Schichtdicke (d).

Der spezifische Extinktionskoeffizient ändert sich mit der Zusammensetzung des Materials. Eine Änderung in der Zusammensetzung des Materials verursacht auch eine Änderung im Spektrum. Die Unterschiede der Spektren sind jedoch insgesamt zu gering um die höheren Intensitäten zu erklären. Eine signifikante Änderung von ϵ erscheint wenig wahrscheinlich.

Die Diatomeen-Zellwände sind strukturiert. Durch Veränderungen in der Porosität und der Bereiche unterschiedlicher Dichte in der Zellwand kann sich die Konzentration an Silikat erhöhen. Derartige Veränderungen sind durch IR-Spektroskopie nicht eindeutig nachweisbar.

Die höheren Intensitäten im Inneren der Zellwände sind vermutlich hauptsächlich auf Änderungen der Dicke der Schalen zurückzuführen.

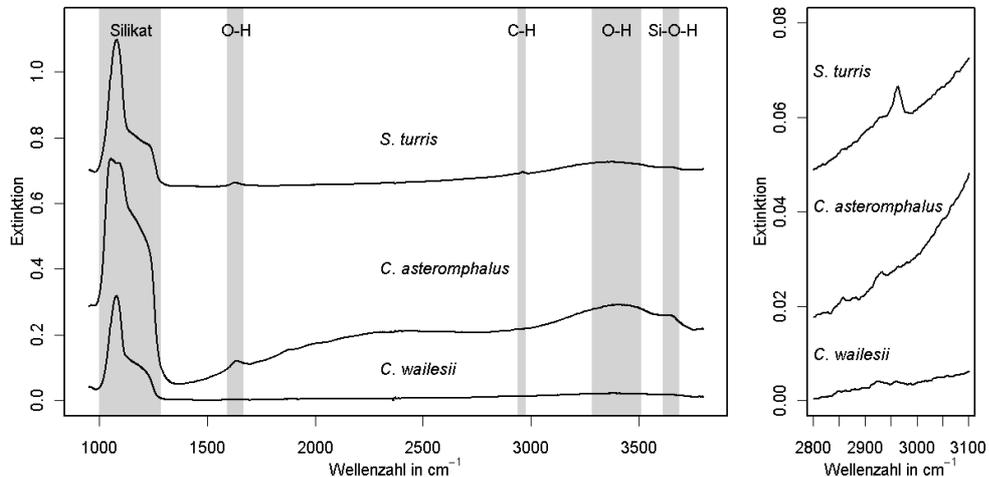


Abb. 23: Mittelwertspektren der Imaging Messungen, Links: Bereich der CH-Valenzschwingungsbande vergrößert

Die Mittelwertspektren (Abb. 23) aller Spezies zeigen die stärksten Signale im Bereich 1000–1250 cm⁻¹. Die Unterschiede zeigen in erster Linie unterschiedliche Schichtdicken. Das Mittelwertspektrum von *C. asteromphalus* hat eine deutlich andere Form in diesem Bereich als *S. turris* und *C. wailesii*. Statt der einzelnen Bande bei ca.

1080 cm^{-1} ist eine breite Doppelbande mit Maxima bei 1053 und 1090 cm^{-1} zu erkennen.

Die genauen Bandenlagen der Si-O-Valenzschwingungen 1000–1250 cm^{-1} hängen von vielen Faktoren ab, unter anderem vom Polymerisationsgrad, der lokalen Symmetrie und dem Einbau von anderen Elementen in der Umgebung.

Als Zuordnung für die Schulter in Richtung 1200 cm^{-1} wurde bereits früher die Ausbildung einer Si=O-Doppelbindung verursacht durch Strukturdefekte in dichter gepackten Bereichen vorgeschlagen [47, 46]. An Filmen wurde festgestellt, dass bei vorhandener Fehlordnung neue Banden bei ca. 1250 und 1170 cm^{-1} auftreten [48]. Da es sich bei den Diatomeen-Zellwänden um amorphe Materialien biologischen Ursprungs handelt, kann von einem nicht unbeträchtlichen Grad an Fehlordnung ausgegangen werden. Auch das Auftreten von Bereichen mit Strukturdefekten ist wahrscheinlich.

In amorphen Phasen mit tetraedrisch-kordiniertem Silizium wird im Bereich 1080–1100 cm^{-1} immer eine breite Bande beobachtet [49, 48, 46]. Sie tritt bei allen Spezies auf. Durch unterschiedliche Umgebungen der Tetraeder [49] sowie die breite Verteilung der Si-O-Si Winkel zwischen den SiO_4 -Tetraedern [50] wird diese Bande verbreitert.

Interessant ist die bei *C. asteromphalus* auftretende Bande bei 1053 cm^{-1} . In der Literatur findet man Banden in diesem niedrigen Wellenzahlbereich bei teilweise polymerisierten Silikaten bei 1056 cm^{-1} [51]. Bei Natrium-Silikat-Glas, das im wässrigen Medium synthetisiert wurde, trat eine Bande bei ca. 1030 cm^{-1} auf [52]. In beiden Fällen handelt es sich um Materialien mit Einlagerung von Fremdatomen in die Silikatstruktur.

Die Beobachtung von zwei Banden bei *C. asteromphalus* lässt vermuten, dass in der Zellwand Bereiche mit unterschiedlich hohem Fremdatom-Anteil existieren. Diese Bereiche sind so klein, dass sie mit IR-Imaging nicht örtlich aufgelöst werden können.

<i>S. turris</i>	<i>C. asteromphalus</i>	<i>C. wailesii</i>	Zuordnung
	1053		Si-O-Valenz
1080		1078	Si-O-Valenz
	1090		Si-O-Valenz
1628	1633	1628	OH-Deformation (Si-OH, H ₂ O)
2962	2931	2962	CH _x -Valenz
3355	3407	3382	OH-Valenz (H ₂ O)
3644	3637	3646	Si-OH-Valenz

Tab. 7: Bandenzuordnung der IR-Mittelwertspektren

Die restlichen erkennbaren Banden sind OH-Deformationsschwingungen (adsorbiertes Wasser, Si-OH-Gruppen), CH-Valenzschwingungen, OH-Valenzschwingungen (adsorbiertes Wasser) und Si-OH-Valenzschwingungen zuzuordnen (Tab. 7).

Aufgrund der zu geringen Intensitäten der CH-Valenzschwingungsbanden in *C. asteromphalus* und *C. wailesii* (Abb. 23) wurde eine Auswertung der CH-Valenzschwingungsbande nur für *S. turris* vorgenommen. Das Image des Integrals der CH-Valenzschwingungsbande zeigt höhere Intensitäten in den Randbereichen der Zellwand. Um unterschiedliche Schichtdicken zu kompensieren, wurde das Verhältnis Integral CH-Valenz- zu Integral Silikat-Bande gebildet.

Auch dieses Image zeigt dieselbe Tendenz wie das Image der CH-Valenzschwingungsbande (Abb. 24).

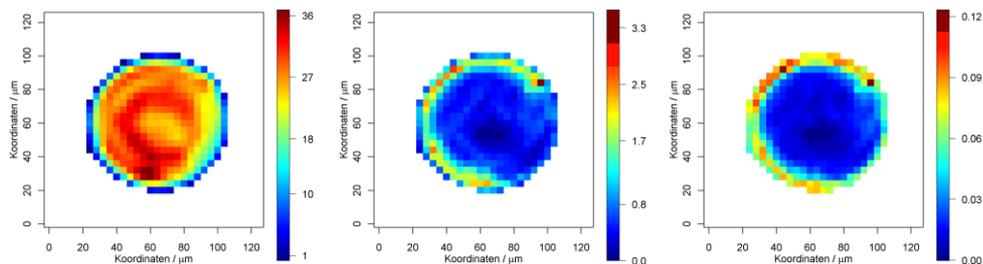


Abb. 24: *S. turris* Images: Links Silikatbande, Mitte CH-Valenzschwingungsbande, Rechts Verhältnis Silikat zu CH-Valenz

Unpolare Gruppen wie die CH_x-Gruppen liefern intensivere Signale im Raman-Spektrum als im IR-Spektrum. Neben intensiveren CH_x-Signalen ist Raman-Mapping auch im Hinblick auf die Ortsauflösung der IR-Spektroskopie überlegen, weil erheblich kürzere Wellenlängen verwendet werden. Für die verwendeten Geräte ergeben sich

nach der Abbe-Gleichung $d=0,612 \cdot \lambda / NA$ (d: Ortsauflösung, λ : Wellenlänge, NA: Numerische Apertur) die folgenden Werte für die beugungsbegrenzte Ortsauflösung:

IR: λ : 10 – 3,3 μm ($1000\text{-}3000\text{cm}^{-1}$); NA: 0,4 ; d = 15,3 – 5,1 μm

Raman: λ : 785 nm ; NA: 0,9 ; d = 0,5 μm

Aufgrund der intensiven Silikatsignale ist die IR-Spektroskopie sehr gut geeignet um Unterschiede in der Silikatzusammensetzung ortsaufgelöst zu untersuchen, allerdings eingeschränkt durch die Ortsauflösung der Technik. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem die Verteilung des organischen Materials untersucht werden sollte, wurde das IR-Imaging nicht weiter verfolgt.

4.3 Ortsaufgelöste Raman-Messungen

4.3.1 Überblick

Die Raman-Spektroskopie weist eine hohe erreichbare Ortsauflösung und eine höhere Empfindlichkeit für unpolare Gruppen auf. Daher wurden örtlich aufgelöste Raman-Messungen durchgeführt, um die Verteilung des organischen Materials der extrahierten Diatomeen-Zellwände zu untersuchen.

In Abb. 25 sind die Mittelwertspektren aller ortsaufgelöst gemessenen Zellwände der Ansätze von Prof. Sumper dargestellt. Die Spektren werden durch die breite Bande im Bereich $1100\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ dominiert. Diese Bande ist dem Hintergrund (gestrichelt) zuzuordnen. Die Banden, welche dem Biosilikat und dem organischen Material der Zellwände zuzuordnen sind, werden in grau markiert. Die schmalen Banden bei 1553 und 2327 cm^{-1} sind auf Sauerstoff bzw. Stickstoff in der Luft zurückzuführen.

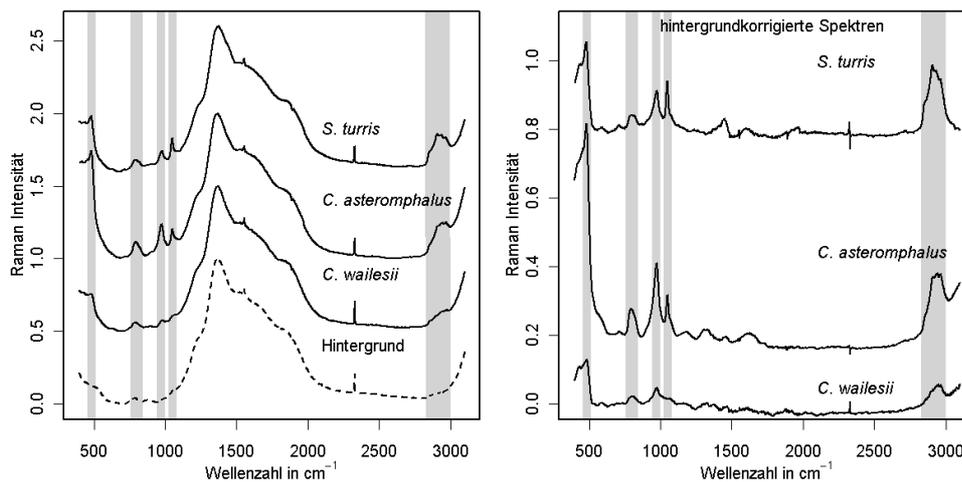


Abb. 25: Links: Mittelwertspektren der 3 Arten (*S. turris* 15, *C. asteromphalus* 29, *C. wailiesii* 3 Messungen) und Hintergrund (gestrichelt), Rechts: Mittelwertspektren nach Hintergrundkorrektur

Nach der Hintergrundkorrektur treten diese Banden noch deutlicher hervor (Abb. 25, Rechts). Die Banden im Bereich $400\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ sind dem Silikat zuzuordnen. Die Bande im Bereich $2820\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$ rührt von CH_x -Valenzschwingungen her und gehört damit zu dem im Silikat eingelagerten organischen Material. Andere Signale, die sich organischen Substanzen eindeutig zuordnen lassen, sind nicht nachweisbar.

Im Vergleich zu den IR-Spektren ist die CH_x -Valenzschwingungsbande deutlich stärker und bei allen Arten zu erkennen. Damit ist gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie

zur Untersuchung der Verteilung organischen Materials in Biosilikat von Diatomeen prinzipiell geeignet ist.

Bei dem verwendeten Gerät der Firma Kaiser betrug der Fokusbereich des Lasers auf der Probe ca. 1,5 μm .

Die Zellwände von Diatomeen haben eine Dicke in der Größenordnung von ca. 100 nm. Die Spezies *S. turris* weist z. B. eine Zellwanddicke von ca. 50 nm auf [53]. Damit kann davon ausgegangen werden, dass mit einem Laserfokus von 1,5 μm die gesamte Zellwand vertikal erfasst wurde. Der Trend, dass die Intensität der intensivsten Silikatbande von *C. asteromphalus* über *S. turris* zu *C. wailesii* abnimmt, lässt sich daher auf die unterschiedliche Dicke der Zellwände zurückführen. Dieser Trend wurde auch in den IR-Spektren beobachtet (Abb. 23).

Die Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Silikatbanden weisen hingegen auf unterschiedlich ausgeprägte Silikatnetzwerke der Proben hin, wobei sich die Bandenlagen (Tab. 8) nicht signifikant zwischen den Spezies unterscheiden.

Die Bande bei ca. 482 cm^{-1} kann Defektstrukturen im Silikat zugeordnet werden [54, 55, 56]. Dabei wird die Bildung 4-gliedriger Ringe angenommen.

Die Bande um 800 cm^{-1} wird in der Literatur Beiträgen mehrerer Schwingungen zugeordnet. Zum einen wird als Ursache die Bewegung von Silizium in den SiO_4 -Tetraedern vorgeschlagen [26, 57]. Als Ursache werden auch eine Si-O-Si-Deformationsschwingung [58, 59] oder Schwingungen im Silikatnetzwerk [60] in Erwägung gezogen.

Die Bande um 975 cm^{-1} ist symmetrischen Si-O-Valenzschwingungen in Silikat-Tetraedern mit zwei nicht an ein anderes Siliziumatom gebundenen Sauerstoffatomen zuzuordnen [26]. Im Bereich zwischen 1050–1100 cm^{-1} werden Signale von symmetrischen Si-O-Valenzschwingungen in Tetraedern mit einem nicht an Silizium gebundenen Sauerstoff erwartet [26, 59]. Intensive Banden um 1050 cm^{-1} wurden bei der Untersuchung der Auflösung von Natrium-Silikat-Gläsern festgestellt und dabei Valenzschwingungen von SiO_4 -Tetraedern mit 2–3 nicht verbundenen Sauerstoffatomen zugeordnet [59]. Die geringe Breite der Bande und ihre hohe Intensität lassen auch die Vermutung zu, dass es sich um eine weitere anorganische Phase handeln könnte.

Das Spektrum von *S. turris* weist zwei starke Banden bei 975 und 1049 cm^{-1} auf. Wenn man der Deutung von Halasz et al [59] folgt, weist die Tatsache, dass die Bande bei 1049 cm^{-1} am intensivitätsstärksten ist darauf hin, dass sehr viele nicht verbrückte Sauerstoffatome im Silikat vorliegen. Die Intensität der Bande bei 975 cm^{-1} widerspricht dieser Interpretation nicht. Eine sinnvolle Erklärung wäre die Annahme, dass die Bande bei 1049 cm^{-1} unverbrückten SiO_4 -Tetraedern an der Oberfläche zuzuordnen ist. Die Tetraeder sind dabei wahrscheinlich an Wasser gebunden.

Die Bande bei 975 cm^{-1} ist aufgrund der Kompositnatur des Biosilikats intensiv ausgeprägt. Durch die Einlagerung von Fremdatomen und organischem Material während der Synthese entsteht ein Silikat mit nicht mehr vollständig vernetzten SiO_4 -Tetraedern im Inneren.

Die Unterschiede der Spektren von *C. asteromphalus* und *S. turris* lassen sich auf mehrere Faktoren zurückführen. Durch die höhere Dicke der Zellwände ist davon auszugehen, dass proportional weniger SiO_4 -Tetraeder an der Oberfläche vorliegen. Die IR-Spektren lassen auch auf Bereiche mit höherer Dichte bzw. geringerer Porosität schließen. Dies würde ebenfalls zu einer stärkeren 975 cm^{-1} Bande beitragen.

Das Spektrum von *C. walesii* weist sehr schwache, tendenziell breitere Banden als die anderen Spezies auf. Die stärksten Banden liegen bei 484 und 974 cm^{-1} , was als ein Netzwerk mit vielen zweifach nicht Silizium-verbrückten SiO_4 -Tetraedern gedeutet werden kann.

<i>S. turris</i>	<i>C. asteromphalus</i>	<i>C. walesii</i>	Zuordnung
481	482	484	Defektbande
797	793	806	Si in Tetraedern Silikat-Netzwerk Si-O-Si-Deformation
975	975	974	Si-O-Valenz (2 freie O)
1049	1049	1050 (Schulter)	Si-O-Valenz (1 freies O) Si-O-Valenz (2-3 freie O)

Tab. 8: Zuordnung der Silikatbanden (Quellen imText)

Um das Biosilikat mit anderen Silikaten zu vergleichen sind in Abb. 26 auf der linken Seite das *S. turris* Spektrum im Silikatbereich im Vergleich mit Quarzglas und Opal dar-

gestellt. In allen drei Spektren sind Banden im Bereich von 480 und 800 cm^{-1} zu erkennen. Im Quarzglas fehlt die Bande bei 975 cm^{-1} und die Bande bei 1050 cm^{-1} ist sehr schwach und breit, während bei Opal beide Banden schwach und breit vorhanden sind. Die Unterschiede lassen sich durch die hochporöse Struktur des Biosilikats mit einer entsprechend größeren Oberfläche erklären. Bei den hier gezeigten Spektren von Quarzglas und Opal (Mineralproben) handelt es sich hingegen um Spektren von Bulk-Materialien.

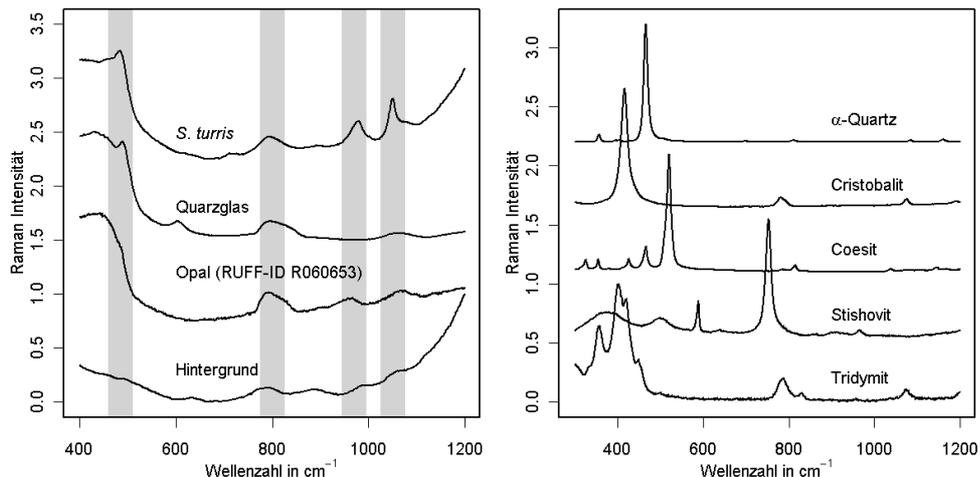


Abb. 26: Links: Vergleich Biosilikat-Raman-Spektrum (*S. turris*) mit amorphen Materialien, Rechts: Gegenüberstellung von Raman-Spektren von kristallinen Mineralien der RUFF-Datenbank [61], alle Spektren Minimum-Maximum-Normiert

Kristalline Siliziumdioxid-Modifikationen zeigen im Vergleich mit den amorphen Silikaten schmalere Banden (Abb. 26, Rechts).

Besonders α -Quartz und α -Cristobalit sind durch ihre intensiven Banden bei 446 bzw. 416 cm^{-1} gekennzeichnet. Falls im Biosilikat der untersuchten Diatomeen kristalline Bereiche vorhanden wären, müssten diese stärksten Banden im Spektrum zu erkennen sein. Im Bereich von 400-500 cm^{-1} treten jedoch keine auffälligen Banden auf. Beide Modifikationen sowie Tridymit (intensivste Bande 402 cm^{-1}) wären mit Raman-Spektroskopie im Biosilikat nachweisbar.

Coesit und Stishovit zeigen ihre intensivsten Banden bei 520 cm^{-1} bzw. 753 cm^{-1} . In den Spektren des Biosilikats waren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zu erkennen.

Im Rahmen der Empfindlichkeit der Raman-Spektroskopie kann deshalb festgestellt werden, dass im untersuchten Biosilikat keine kristallinen Bereiche vorhanden sind.

Durch die Zucht der Diatomeen in einem kontrollierten Nährmedium sind Verunreinigungen während der Zucht sehr unwahrscheinlich. Die Extraktion der Zellwände mittels Lysepuffer gefolgt von mehreren Waschvorgängen entfernt physikalisch gebundenes Material. Dabei stellt der Lysepuffer mit den Bestandteilen EDTA und SDS selber eine mögliche Quelle für Verunreinigungen dar.

In Abb. 27 sind die Spektren der reinen Komponenten des Lysepuffers im Vergleich mit dem Mittelwertspektrum einer verunreinigten *C. walesii* Zellwand (10808 Spektren in der Raman-Map) und einem *C. walesii* Referenzspektrum dargestellt. Durch erneutes Waschen mit Reinstwasser konnte die Verunreinigung von den Zellwänden entfernt werden.

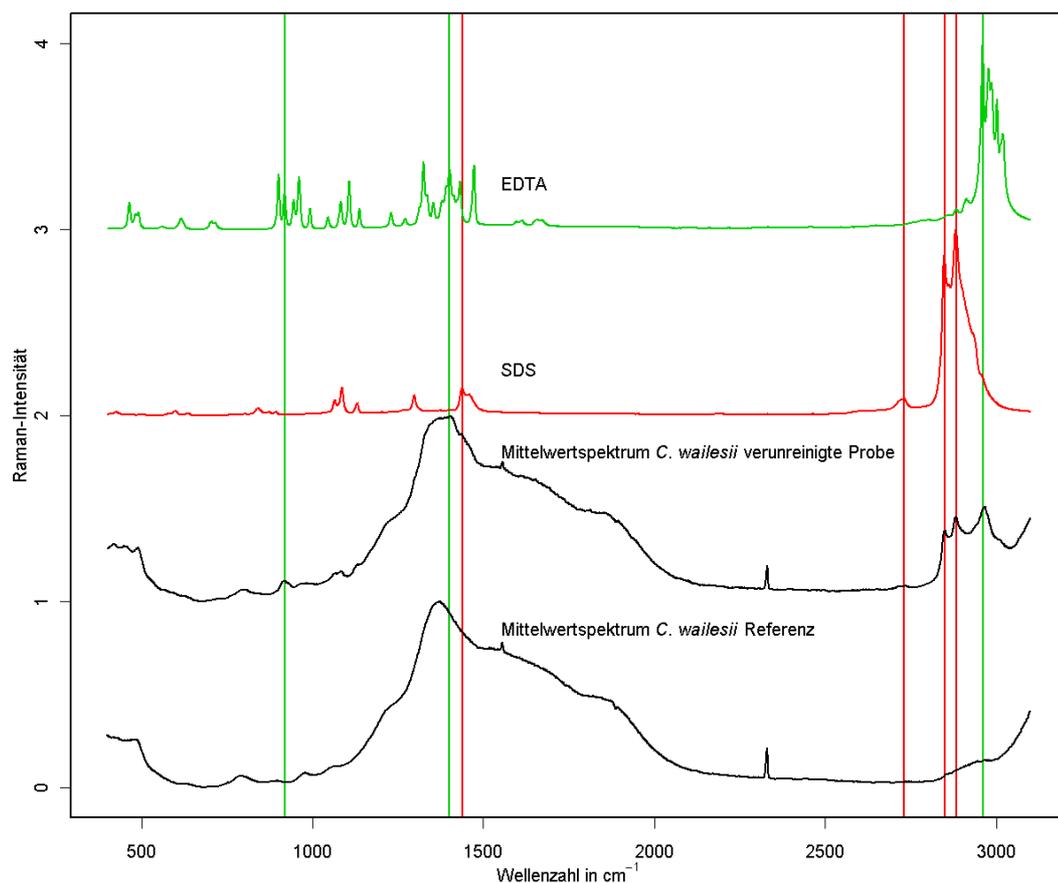


Abb. 27: Raman-Spektren der Bestandteile des Lysepuffers (EDTA und SDS) im Vergleich mit einer verunreinigten Zellwand von *C. walesii* und dem *C. walesii* Referenzspektrum aus Abb. 25

Dass eine Verunreinigung vorliegen muss, wurde an der im Vergleich mit der Referenz sehr intensiven CH_x -Valenzschwingungsbande im Bereich 2820–3010 Wellenzahlen festgestellt. Die typischerweise breite unstrukturierte Bande weist drei eindeutige Banden bei 2849, 2883 und 2961 Wellenzahlen auf, die sich EDTA (grün) und SDS (rot) zuordnen lassen.

Die intensitätsschwächeren Banden sind stark von der breiten Bande des Hintergrundes (1200–1800 Wellenzahlen) und den Signalen des Biosilikats (unter 500 Wellenzahlen) überlagert. Die weiteren den Lysepufferbestandteilen zuzuordnenden Banden sind in Abb. 27 entsprechend markiert.

Eine Verunreinigung durch den Lysepuffer kann also an der CH_x -Valenzschwingungsbande erkannt werden. Bei keinem weiteren Ansatz waren Banden bei 2489, 2883 und 2961 Wellenzahlen zu beobachten.

4.3.2 Datenvorbereitung und Auswertung der örtlichen Verteilung

Als erster Schritt der Datenvorbereitung wurden alle Spektren entfernt, die nicht innerhalb der 3,5-fachen Standardabweichung vom Mittelwertspektrum lagen. Dieser Schritt dient dazu Spektren zu erkennen, die als sogenannte „Ausreißer“ zu bewerten sind. Diese Spektren sind in den folgenden Abbildungen weiß dargestellt.

Zur Auswertung der Silikatverteilung wurde das basislinienkorrigierte Integral (760–840 cm^{-1}) der Bande um 800 cm^{-1} gewählt, da diese zuverlässig in allen Spektren die mit dem Kaiser-Raman-Spektrometer aufgenommen wurden auftrat.

In Abb. 28 (Links) ist an einer *S. turris*-Zellwand die so erhaltene Silikatverteilung dargestellt. Die Raman-Messung umfasste 6073 Spektren.

Die „Fortsätze“ von *S. turris* führen zu den hohen Intensitäten in der ringförmigen Struktur in der Mitte der Silikatverteilung. An diesen Stellen ist mehr Material vorhanden. Der starke Abfall der Intensität zum Rand hin ist wahrscheinlich auf die Form der Zellwände zurückzuführen. Da *S. turris*-Zellwände die Form eines Rotationsellipsoids haben, tritt der Laserstrahl am Rand fast parallel zur Zellwand auf. In diesem Bereich ist daher von höherer Streuung und Reflexion auszugehen, was zu schwächeren Signalen führt.

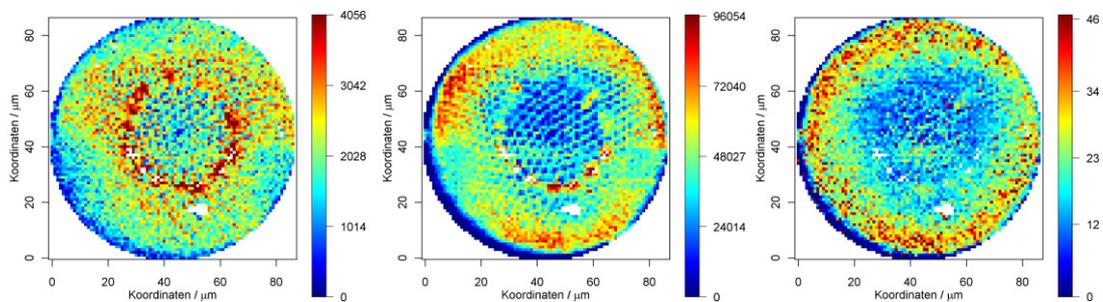


Abb. 28: Raman-Maps von *S. turris*: Links: Silikatverteilung (Integral Bande bei 800 cm^{-1}), Mitte: Verteilung des organischen Materials (Integral Bande bei 2910 cm^{-1}), Rechts: Verhältnis von organischem Material zu Silikat, Pixel $1 \times 1 \mu\text{m}$

Für die Bestimmung der Verteilung des organischen Materials wurde das basislinienkorrigierte Integral der CH_x -Valenzschwingungsbande um 2910 cm^{-1} berechnet. Die Basislinie wurde – wie bei der Silikatbande – an den Endpunkten des Integrationsbereiches durchgeführt. Das Integral wurde für die Bande um 2910 cm^{-1} von 2820–3010 cm^{-1} berechnet.

Auch in der Verteilung des organischen Materials (Abb. 28, Mitte) ist die ringförmige Struktur im Inneren zu erkennen. Im Gegensatz zur Silikatverteilung sind in den Randbereichen auch hohe Intensitäten zu erkennen, während in der Mitte niedrige Intensitäten zu finden sind. Wie schon an der Silikatverteilung diskutiert treten im Randbereich (äußerste 2 Pixel) nur sehr schwache Intensitäten auf. Die sehr niedrigen Intensitäten links unten sind auf die nicht vollkommene Symmetrie der Zellwand zurückzuführen, d. h. diese Pixel lagen vermutlich außerhalb der Zellwand.

Um Unterschiede in der Schichtdicke und durch die Messbedingungen an der Krümmung der Zellwand auszugleichen, wurde das Verhältnis des Integrals der Bande bei 2910 cm^{-1} zu dem Integral der Bande bei 800 cm^{-1} gebildet. Damit wird eine Verteilung des Anteils des organischen Materials im Biosilikat erhalten, wie sie in Abb. 28 (Rechts) dargestellt ist. In den Randbereichen ist eine deutliche Tendenz zu einem höheren Anteil an organischem Material zu erkennen.

Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und die Möglichkeiten des Messaufbaus zu zeigen, wurden zwei Wiederholungsmessungen an derselben Zellwand durchgeführt (Schrittweite $1\text{ }\mu\text{m}$ und $0,5\text{ }\mu\text{m}$). Die geometrischen Parameter der Zellwände wurden bei jeder Messung erneut gemessen und neue Messraster berechnet. Daher umfasst die Wiederholungsmessung mit derselben Schrittweite von $1\text{ }\mu\text{m}$ 5785 Spektren. Die Messung mit der Schrittweite von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ umfasst 22469 Spektren.

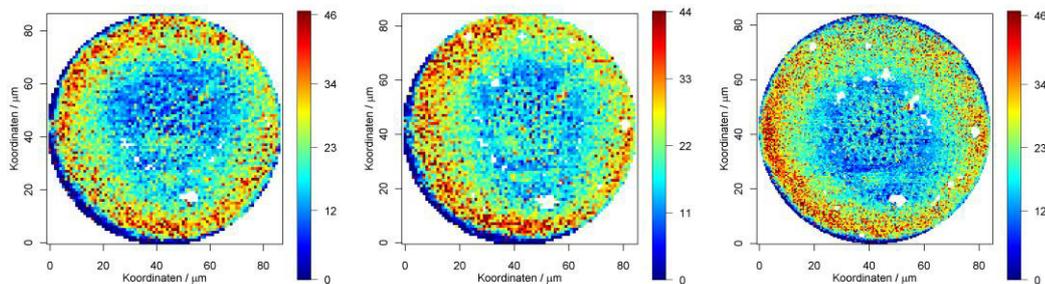


Abb. 29: Verhältnis des Integrals $2910/800\text{ cm}^{-1}$ bei Wiederholungsmessungen an derselben Zellwand, Pixel Links und Mitte: $1\times 1\text{ }\mu\text{m}$, Pixel Rechts: $0,5\times 0,5\text{ }\mu\text{m}$

In den Intensitätsverteilungen sind kleine Unterschiede zu sehen. Alle Messungen zeigen aber dieselbe Tendenz zu höheren Anteilen von organischem Material am Rand der Zellwand. In der Messung mit Schrittweite $0,5\text{ }\mu\text{m}$ sind mehr Details der Zellwand-

struktur aufgelöst, dies wird jedoch nur mit einem sehr hohen Zeitaufwand erreicht. Daher wurden alle weiteren Messungen mit einer Schrittweite von 1 μm durchgeführt.

Die Minimum-Maximum-Mittelwertspektren aller 3 Messungen Abb. 30 (Links) sind identisch. Für die Untersuchung der Verteilung der Integrale von 2910 und 800 cm^{-1} -Bande sowie des Verhältnisses 2910/800 cm^{-1} werden Boxplots verwendet (Abb. 30 Rechts). Für die Darstellung wurden zusätzlich zu den Werten, die über den Unterschied vom Mittelwertspektrum als Ausreißer erkannt wurden, auch alle Werte, deren Integral von CH_x -Valenzschwingungsbande (2820–3010 cm^{-1}) oder Silikatbande (760–840 cm^{-1}) aufgrund zu geringer Bandenintensität oder wegen zu hohem Rauschen kleiner als Null war, als Ausreißer entfernt.

Die absoluten Verteilungen der Integrale der 2910 und 800 cm^{-1} Banden sind statistisch signifikant unterschiedlich. Dies wird durch sich nicht überlappende Einkerbungen in den Boxplots gezeigt. Das ist vermutlich auf Änderungen in der Messumgebung zurückzuführen.

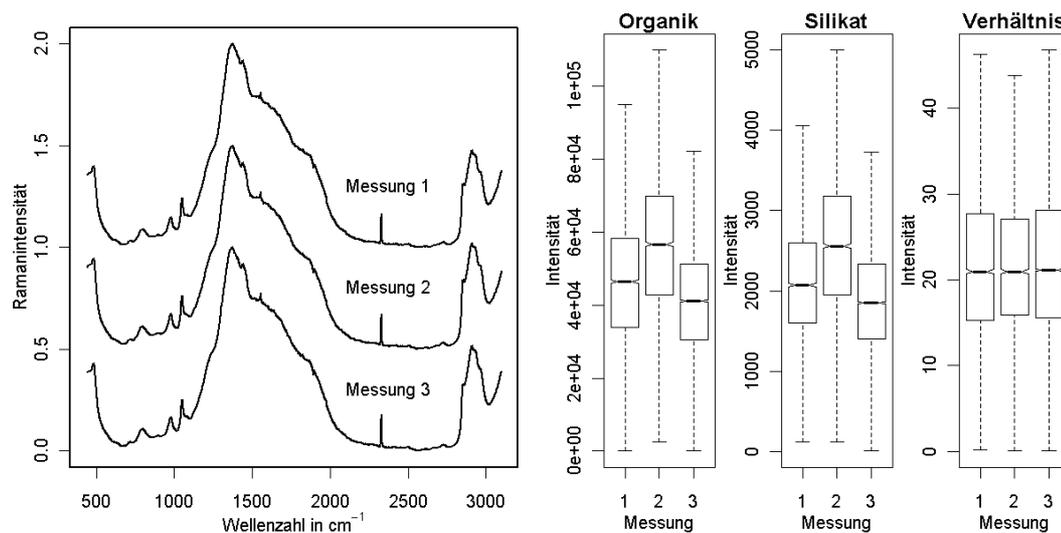


Abb. 30: Links Minimum-Maximum-normierte Mittelwertspektren der 3 Wiederholungsmessungen, Rechts Verteilung der Werte für die Integrale der 2910 und 800 cm^{-1} Bande und des Verhältnisses 2910/800 cm^{-1}

Bei den Verteilungen des Verhältnisses der Bandenintensitäten bei 2910 zu 800 cm^{-1} ist jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen. Durch die Verhältnisbildung werden Unterschiede der absoluten Intensitäten ausgeglichen. Um verschiedene Zellwände und Arten miteinander vergleichen zu können, ist das Bandenverhältnis daher als die relevante und zuverlässigste Größe anzusehen.

Die Darstellung der Verteilung des Bandenverhältnisses zeigt die Unterschiede der Verteilung anschaulich. Die absoluten Konzentrationen sind aus diesen Abbildungen jedoch nicht bestimmbar.

Die Messungen in Abb. 29 zeigen einen radial nach außen steigenden Anteil des organischen Materials. Um diese These einfach auswertbar zu prüfen, werden radiale Verteilungen berechnet. Zuerst wurde der Radius der gemessenen Zellwand ermittelt. Dann wurde im Abstand der Schrittweite der Messung eine Abfolge von Abständen vom Mittelpunkt festgelegt. Bei einem Radius von 10 und einer Schrittweite 1 würde eine Folge 0, 1, 2, 3, ... 10 entstehen. Alle Werte, die (gerundet) denselben Abstand vom Mittelpunkt besitzen, werden für die radialen Verteilungen gemittelt.

Für die radialen Verteilungen wurden alle Werte entfernt, die über das Mittelwertspektrum oder Integrale bei 2910 oder 800 cm^{-1} kleiner Null als Ausreißer erkannt wurden.

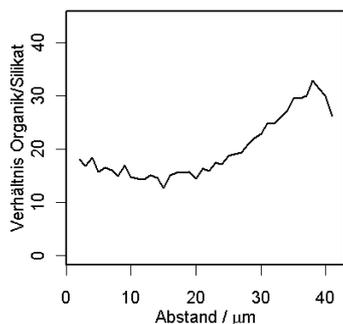


Abb. 31: Beispiel einer radialen Verteilung des Bandenverhältnis 2910/800 cm^{-1} (Organik/Silikat)

Nahe der Mitte der Zellwand tragen nur sehr wenige Spektren bei. Deswegen können starke, nicht aussagekräftige Schwankungen auftreten. Aus diesem Grund werden die beiden Werte mit dem geringsten Abstand (0 und 1) nicht betrachtet.

Ähnliche Schwankungen können im Bereich nahe dem Radius auftreten, zum Beispiel durch leichte Asymmetrie der Zellwand. Deswegen wurden auch die beiden Werte mit dem höchsten Abstand von der Mitte der Zellwand entfernt. Der Beispiel-Graph in Abb. 31 beginnt daher nicht bei Abstand Null und endet vor Erreichen des maximalen Abstands.

4.3.3 *S. turris*: Verteilung des organischen Materials

Die Verteilung organischen Materials wurde zuerst an Proben, welche Herr Prof. Sumper (Regensburg) zur Verfügung stellte, untersucht. Der gesamte Datensatz umfasst 15 Zellwände, die durch Einsatz von Lysepuffer (siehe Diatomeen 3.3) von physikalisch gebundenem organischen Material befreit wurden. Damit verblieb nur die aus Biosilikat bestehende Zellwand mit fest an das Silikat gebundenem oder eingelagertem organischen Material.

In Abb. 32 sind drei Zellwände gezeigt, die im Randbereich erhöhte Gehalte an organischem Material aufweisen. In dieser Abbildung sind, wie in 4.3.2 bezüglich der radialen Verteilungen diskutiert, die Pixel am äußeren Rand entfernt worden. Außerdem sind alle „Ausreißer“ (Mittelwertkriterium, Integral kleiner Null) entfernt und als weiße Pixel dargestellt.

Die Abweichungen von der Symmetrie am oberen Rand in Abb. 32 Mitte und Rechts beeinträchtigen nicht die Tendenz zum höheren Gehalt im Randbereich, die in allen Raman-Maps erkennbar ist.

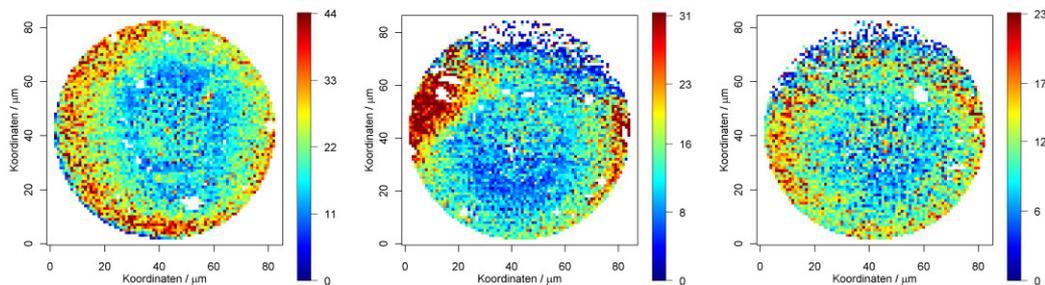


Abb. 32: Verteilung des organischen Materials (Bandenverhältnis 2910/800 cm^{-1}) an drei Raman-Maps, weiße Pixel: als Ausreißer entfernte Werte

In der mittleren Raman-Map lassen sich Bereiche mit deutlich höherer Konzentration an organischem Material links oben und rechts erkennen. Zur Überprüfung, ob in diesen Bereichen eine geänderte Zusammensetzung für die hohen Konzentrationen verantwortlich ist wurden zwei Referenz-Bereiche gewählt: Ein Bereich am unteren Rand und ein Bereich in der Mitte. Die Bereiche und die dazugehörigen Mittelwertspektren sind in Abb. 33 dargestellt.

In keinem der Spektren treten neue Banden auf, die auf eine signifikante Änderung der Zusammensetzung hinweisen würden. Alle Spektren sind ähnlich, unterscheiden sich aber hinsichtlich der Bandenintensitäten.

Der auffälligste Unterschied besteht, wie aus der Map des Bandenverhältnisses (Abb. 32) zu erwarten ist, in der Intensität der Bande bei 2910 cm^{-1} . Auch die Intensitätsabnahme von Bereich 1 zu Bereich 4 folgt dem nach Abb. 32 zu erwartenden Verlauf. Dies belegt, dass die gekennzeichneten Bereiche tatsächlich unterschiedliche Mengen an organischem Material aufweisen.

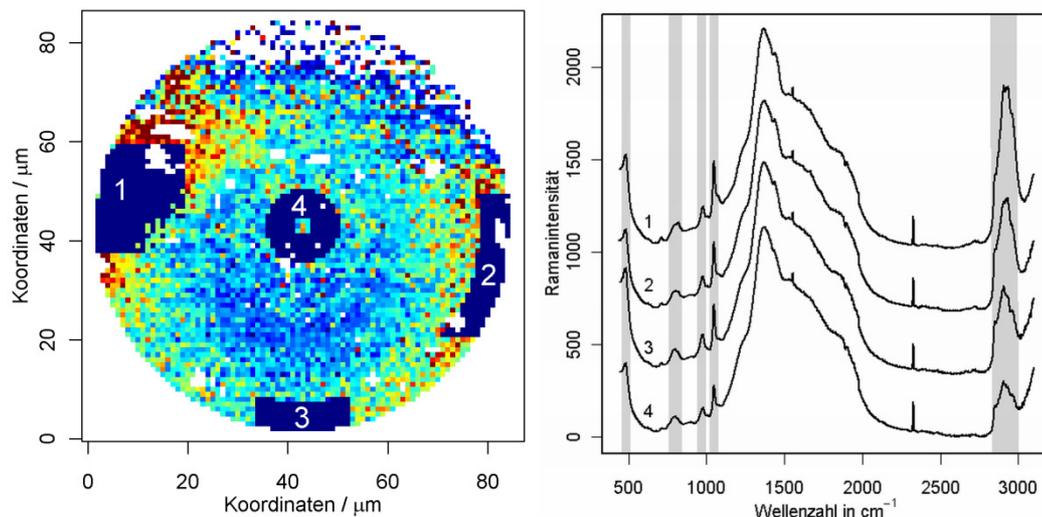


Abb. 33: Raman-Map von *S. turris* mit den gewählten Bereichen in dunkelblau und den dazugehörigen Mittelwertspektren, ausgefilterte Spektren als weiße Pixel

Im Wellenzahlbereich der Silikatbanden von $450\text{ bis }1200\text{ cm}^{-1}$ fallen zwei Unterschiede auf: Die höhere Intensität der Bande bei 480 cm^{-1} im Bereich 3 und die geringere Intensität der Bande bei 1050 cm^{-1} im Bereich 4 (Mitte) im Vergleich mit den Bereichen 1–3 (Rand).

Wie in Kapitel 4.3.1 diskutiert, ist die Bande um 480 cm^{-1} Defektstrukturen im Silikatnetzwerk durch Bildung von Ringen zuzuordnen, während die Bande bei 1050 cm^{-1} SiO_4 -Tetraedern mit unverbrückten Sauerstoffatomen zuzuordnen ist.

Da die Bande bei 480 cm^{-1} nur im Bereich 3 deutlich erkennbare Unterschiede gegenüber anderen Bereichen zeigt, kann von einer lokalen Veränderung im Silikat ausgegangen werden.

Die höhere Intensität der Bande bei 1050 cm^{-1} im Randbereich der Zellwand lässt sich hingegen als Ausbildung eines stärker durch die Einlagerung von organischem Material gestörten Silikatnetzwerkes interpretieren.

Obwohl sich die Struktur des Silikatnetzwerkes in den Bereichen leicht unterscheidet, sind keine Unterschiede in der Zusammensetzung zu erkennen, nur der Gehalt an organischem Material ist verschieden. Daher ist es sinnvoll, als nächstes die radialen Verteilungen für alle Zellwände aus Abb. 32 zu betrachten, dargestellt in Abb. 34.

Alle Verteilungen zeigen einen ähnlichen Verlauf. In der Mitte der Zellwand, d. h. um Abstand 0, liegt eine etwas höhere Konzentration vor. Das Minimum befindet sich im Bereich zwischen 10 und 20 μm , gefolgt von einem Anstieg der Konzentration zum Rand hin.

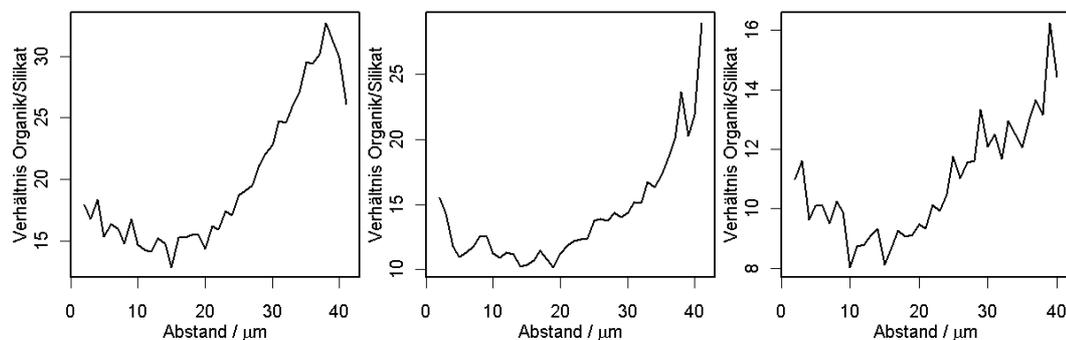


Abb. 34: Radiale Verteilungen der Konzentration des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800\text{ cm}^{-1}$) zu den drei Beispielen aus Abb. 32

Um den Einfluss aller Messungen zu verarbeiten und statistisch zu bewerten wurden die radialen Verteilungen aller Messungen ausgewertet. Da die Zellwandradien nicht gleich sind ($41\text{ }\mu\text{m}$: 2 \times ; $42\text{ }\mu\text{m}$: 2 \times ; $43\text{ }\mu\text{m}$: 6 \times ; $44\text{ }\mu\text{m}$: 5 \times) ergibt sich auch eine unterschiedliche Anzahl von Datenpunkten von (41 bis 44). Damit alle Verteilungen gemeinsam ausgewertet werden können, müssen alle die gleiche Anzahl von Datenpunkten aufweisen. Da die Verteilung des organischen Materials zwischen Mitte und Rand von Interesse ist wurde lineare Interpolation angewandt um für alle Verteilungen die gleiche Anzahl von Datenpunkten zu erreichen, in diesem Fall 44.

Auch die absoluten Gehalte an organischem Material zwischen den Zellwänden schwanken, wie schon in Abb. 34 zu sehen ist. Die maximalen Bandenverhältnisse betragen 32,6, 28,6 und 16,0. Deswegen wurden alle Verteilungen Maximum-normiert,

d. h. durch den höchsten Wert der entsprechenden Verteilung geteilt. Damit bleibt die Verteilung des Gehaltes an organischem Material erhalten, aber jede einzelne Verteilung geht mit dem gleichen „Gewicht“ ein. Das Prinzip ist in Abb. 35 an zwei Verteilungen demonstriert.

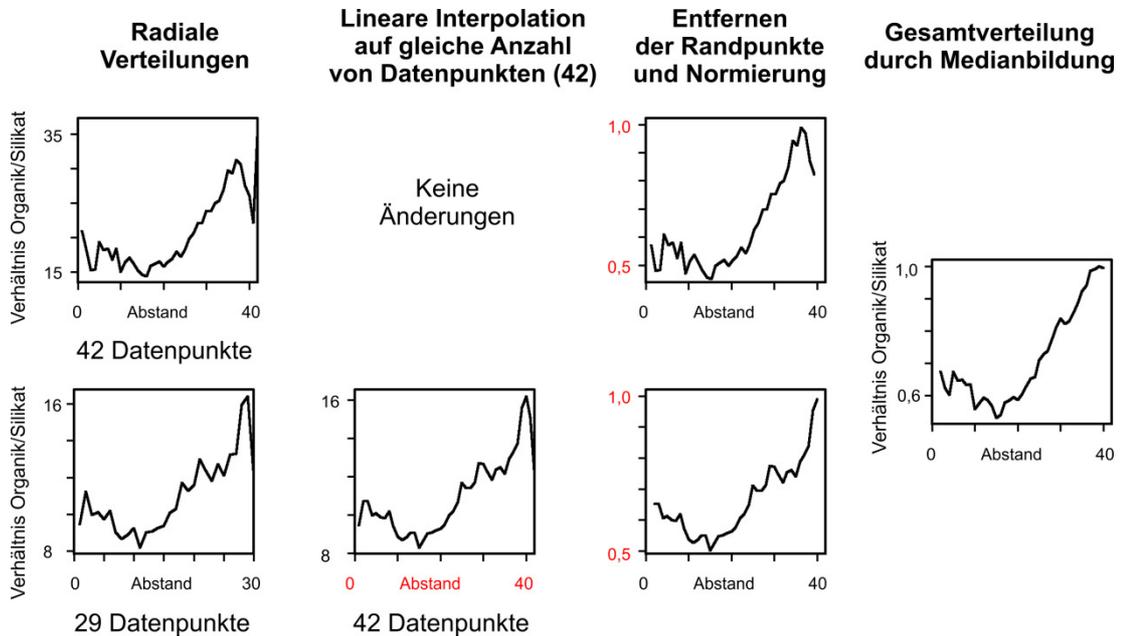


Abb. 35: Prinzip der Berechnung der Gesamtverteilung gezeigt an zwei Verteilungen, Veränderungen an den Achsen in rot markiert

Die so entstehende radiale Gesamtverteilung über alle gemessenen Zellwände zeigt Abb. 36 (Links). Die schwarze Linie verbindet die Mediane der Werte an den unterschiedlichen Abständen vom Mittelpunkt. Die Boxplots zeigen die Verteilung der Werte an den einzelnen Abständen über die Zellwände. Wie in 4.3.2 beschrieben wurden die beiden Werte am Mittelpunkt (Abstand 0–1 μm) und am Rand (Abstand 43–44 μm) entfernt.

Der Verlauf der Mediane der Gesamtverteilung ist weniger stark ausgeprägt als der Verlauf in den radialen Verteilungen in Abb. 34, vor allem der Anstieg zum Rand hin ist weniger stark. Trotzdem ist derselbe schon diskutierte Verlauf mit drei Bereichen zu erkennen: In der Mitte ein etwas höherer Gehalt an organischem Material (Blau), gefolgt von einem Sinken bis auf den niedrigsten Gehalt (Grün), endend in einem Anstieg des Gehaltes zum Rand (Rot) hin.

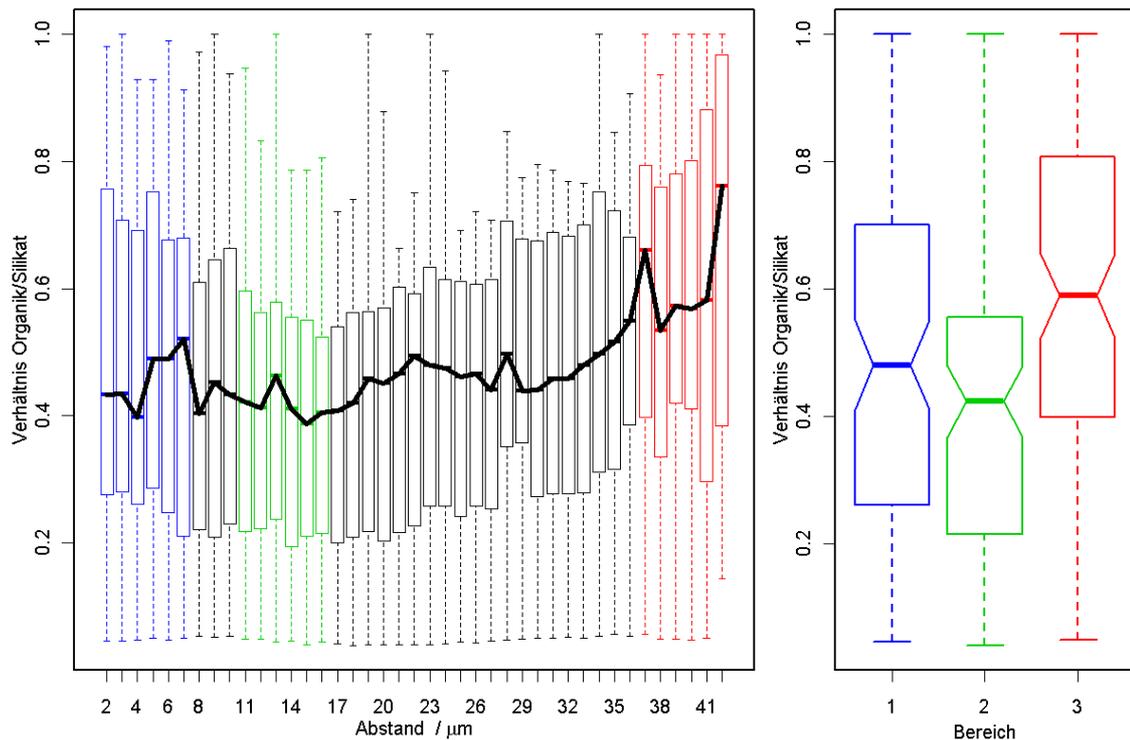


Abb. 36: Links: Gewichtete radiale Verteilung aller 15 Zellwände, die schwarze Linie verbindet die Mediane, die Boxplots zeigen die Verteilung der Werte, die Farben zeigen die zum Vergleich ausgewählten Bereiche. Rechts: Vergleich der drei Bereiche Mitte (Blau: 2–7 μm) Band um die Mitte (Grün: 11–16 μm) und Rand (Rot, 37–42 μm)

Die Werte in den so farblich markierten Bereichen wurden zu einem jeweils 6 μm breiten Band zusammengefasst und als Boxplot, der jeweils alle Werte in dem betreffenden Band umfasst, in Abb. 36 (Rechts) dargestellt. Hier zeigt sich wieder der diskutierte Verlauf der Mediane von 0,50 (Bereich 1) über 0,44 (Bereich 2) zu dem höchsten Gehalt 0,60 in Bereich 3 am Rand.

Wegen des Überlappens der Notches im Boxplot des Mittelbereichs (1) mit den Notches der beiden anderen Boxplots (2; 3) muss festgestellt werden, dass sich der Gehalt an organischem Material in diesem Bereich nicht signifikant von dem in den anderen Bereichen unterscheidet. Dennoch ist die Überlappung zwischen diesem Bereich und dem Randbereich (3) geringer als mit dem Bereich 2, was größere Unterschiede zeigt.

Statistisch signifikant ist hingegen der Unterschied zwischen Bereich 2 und 3, was an den nicht überlappenden Notches erkennbar ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in *S. turris* die höchsten Gehalte an organischem Material am Rand der Zellwand vorliegen, gefolgt von einer Zone in der Mitte. Diese Beobachtung könnte sich aus strukturellen Überlegungen erklären lassen. Durch die Einlagerung von organischem Material wird der spröde Werkstoff Silikat flexibler, zäher und hält damit größeren Kräften von außen stand. In der Nähe der Ränder findet das Wachstum der Zelle durch Gürtelbänder statt, deswegen ist dort eine höhere Flexibilität wünschenswert. Gleichzeitig kann eine höhere Zähigkeit besser vor Fressfeinden schützen, da die Zellwand nicht so leicht durchbrochen wird.

In der Mitte der Zelle befinden sich die Fortsätze, welche die Zellen untereinander verbinden. Auch hier ist eine höhere Zähigkeit wünschenswert um den mechanischen Anforderungen zu genügen: Die Fortsätze müssen in der Zellwand verankert werden und dieser Bereich muss auch der Beanspruchung durch die Bewegung der anderen Zellen standhalten, die durch die Fortsätze auf die Zellwand übertragen werden.

4.3.4 *S. turris*: Hochortsaufgelöste Messungen

Die Ortsauflösung eines Raman-Spektrometers wird durch die verwendete Laserwellenlänge und die minimale Schrittweite des motorisierten Tisches bestimmt. Das für die hochortsaufgelösten Messungen verwendete Spektrometer der Firma Witec ist mit einem 488 nm Laser und einem piezo-gesteuerten Tisch ausgestattet.

Durch die Verwendung einer Laserwellenlänge von 488 nm steigt die durch die Abbesche Gleichung berechnete Ortsauflösung auf 322 nm. Da die Raman-Intensität proportional zu $1/\lambda^4$ ist hat die kleinere Wellenlänge gleichzeitig den Vorteil, dass die Messzeit pro Spektrum von 10 auf 2 Sekunden verkürzt werden konnte. So kurze Laserwellenlängen sind aber nur bei nicht fluoreszierenden Proben verwendbar. Die Wahrscheinlichkeit Fluoreszenz anzuregen ist umso höher je kürzer die Wellenlänge ist. Da das Kaiser-Spektrometer für biologische Proben angeschafft wurde, in denen oft fluoreszierende Bestandteile vorkommen, wurde dort eine Wellenlänge von 785 nm gewählt.

Bei einem piezo-gesteuerten Tisch wird die Positionierung nicht mehr über Mechanik, sondern durch die Verwendung von piezo-Kristallen vorgenommen. Nur so ist die für die Messungen verwendete Schrittweite von 200 nm realisierbar.

Mit dieser Technik wird es möglich, Details der Struktur der Zellwand zu untersuchen, wie die Raman-Map in Abb. 37 zeigt.

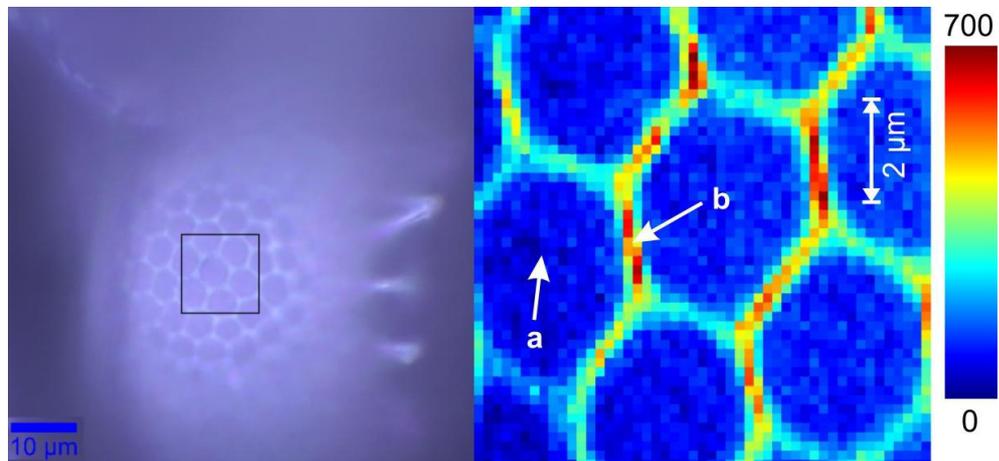


Abb. 37: Links: Mikroskopbild, Messbereich im schwarzen Quadrat; Rechts: Raman-Map des Integrals der 975 cm^{-1} -Bande (Silikatverteilung) mit Bereichen niedriger (a) und hoher (b) Intensität

Die generelle Struktur der *S. turris* Zellwand ist in Abb. 38 an einer Prinzipskizze und REM-Aufnahmen gezeigt. Sie besteht aus wabenförmigen Öffnungen, Areolae genannt, die von Stegen umgeben sind. Die mit Poren durchsetzten Böden werden als Foramen bezeichnet. Im Weiteren werden nicht die Fachausdrücke, sondern die Bezeichnungen Böden und Waben verwendet.

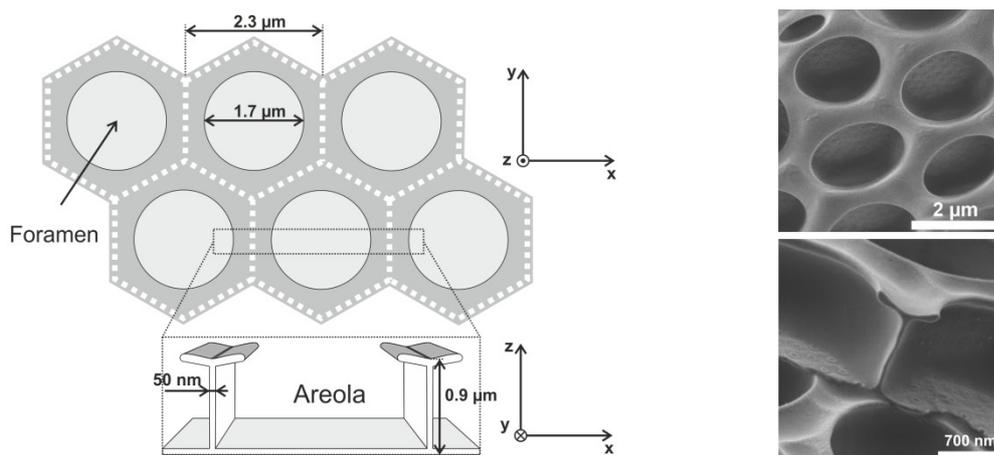


Abb. 38: Links: Struktur der Zellwand von *S. turris* mit Bezeichnungen und Abmessungen, Rechts: Struktur von *S. turris* in REM-Bilder

In der Raman-Map in Abb. 37 ist die in Abb. 38 erläuterte Struktur der Zellwand deutlich aufgelöst. Für die Raman-Map wurde die Bande bei 975 cm^{-1} statt der Bande bei 800 cm^{-1} wegen ihrer höheren Intensität genutzt. Es sind zwei Bereiche zu erkennen: Der Bereich a im Inneren der Waben mit niedrigen Intensitäten und der Bereich b, der die „Stege“ der Waben umfasst, mit deutlich höheren Intensitäten.

Die Intensitätsunterschiede entstehen durch Unterschiede in der vertikalen Ausdehnung der Zellwand in den jeweiligen Bereichen. Wie in REM-Aufnahmen von *S. turris* (Abb. 38) zu sehen ist, bestehen die Waben aus einem dünnen „Boden“ umgeben von hohen „Stegen“. Der Laser erfasst also in den Stegen wesentlich mehr Material als in den Böden, was zu höheren Intensitäten führt.

Auch der Gehalt an organischem Material in den Bereichen ist unterschiedlich, wie an den Intensitäten in den repräsentativen Spektren (Abb. 39) zu erkennen ist.

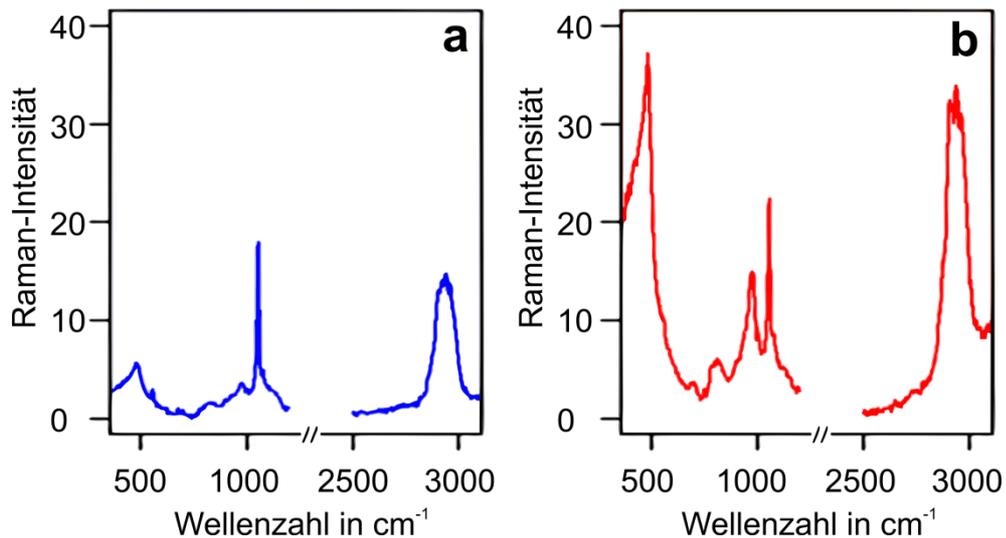


Abb. 39: Repräsentative Spektren für den Bereich a (Boden) und den Bereich b (Stege)

Die absolute Intensität der CH_x -Bande bei 2910 cm^{-1} ist in den Stegen rund doppelt so hoch wie in den Böden. Um die unterschiedlichen vertikalen Ausdehnungen zu korrigieren sollte aber wie erläutert das Verhältnis zu einer Silikatbande betrachtet werden. Da die Intensität der Bande bei 800 cm^{-1} in den Böden sehr niedrig war, wurde das Verhältnis zum Integral der Bande bei 975 cm^{-1} gebildet. Es ergibt sich rund 40 für die Böden und rund 16 für die Stege. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Böden mit dem hohen Gehalt an organischem Material flexibler sind als die vergleichsweise hoch silifizierten Stege. Der Transport von Substanzen in die Zellwand

wird vermutlich über die Böden stattfinden, während die Stege der Stabilisierung und Festigkeit der Zellwand dienen.

4.3.5 *S. turris*: Einfluss der Behandlung mit Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid entfernt im Vergleich zum Lysepuffer durch seine oxidative Wirkung auch stärker an die Zellwand gebundenes organisches Material. Da das amorphe Biosilikat aber mit Poren durchsetzt ist, besteht die Möglichkeit auch Material, das im Silikat nahe der Oberfläche eingebunden ist, zu entfernen. Um die Auswirkungen auf die Verteilung des organischen Materials zu untersuchen, wurden Zellwände mit 35% Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt, auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und danach dreimal mit Reinstwasser gewaschen.

Es wurde ein Ansatz von *S. turris* verwendet, der in Dresden von R. Hedrich gezüchtet wurde. Die Zellwände waren mit Radien von 23–31 µm kleiner als die Zellwände des Ansatzes von Prof. M. Sumper mit Radien von 41–44 µm. Es wurden 3 Zellwände als Referenz für den Gehalt an organischem Material vor der Wasserstoffperoxid-Behandlung gemessen und 12 Zellwände nach der Wasserstoffperoxid-Behandlung. Der Median des Bandenverhältnisses $2910/800 \text{ cm}^{-1}$ sank auf 60% der Referenz-Zellwände. Das zeigt, dass ein entsprechend großer Teil des organischen Materials entfernt wurde.

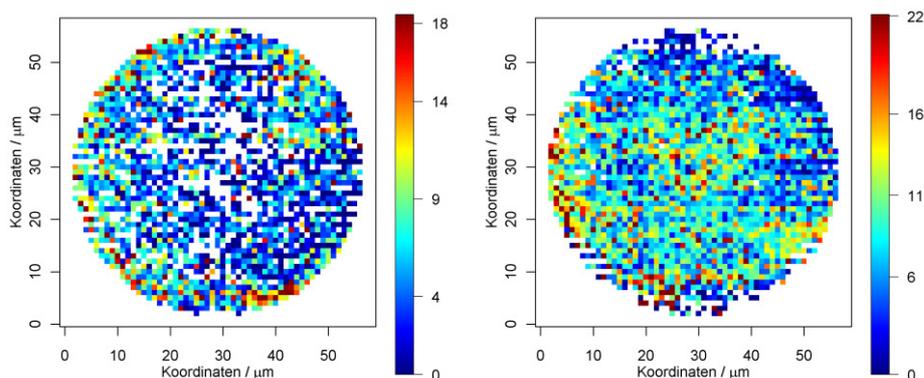


Abb. 40: Raman-Maps der Verteilung des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800 \text{ cm}^{-1}$) nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid (weiße Pixel: als Ausreißer entfernte Werte)

Die geringere Menge an organischem Material führt auch zu einer höheren Anzahl an Spektren, die aufgrund zu geringer Intensitäten ausgefiltert werden. Das ist gut in Abb. 40 an der linken Raman-Map zu erkennen.

Die radialen Verteilungen (Abb. 41) sind auch durch die niedrigen Bandenintensitäten beeinflusst. Die großen Schwankungen bis 5 μm in der linken radialen Verteilung sind auf die ausgefilterten Spektren zurückzuführen, während der Verlauf ab 15 μm dem schon beobachteten entspricht. Die rechte Verteilung weist zwar keine großen Schwankungen auf, hat aber auch keinen gleichmäßigen Anstieg zum Rand.

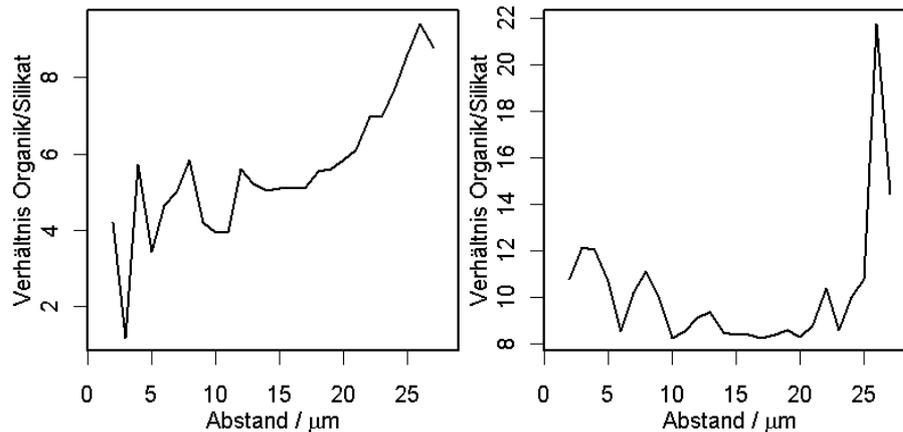


Abb. 41: Radiale Verteilungen zu Abb. 40

In der Gesamtverteilung über alle 12 Zellwände (Abb. 42, Links) sind derartig große Schwankungen ausgeglichen. Sie zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Gesamtverteilung der nur mit Lysepuffer behandelten Zellwände: In der Mitte höhere Gehalte, niedrigere Gehalte in einem konzentrischen Band gefolgt von einem Anstieg zum Rand hin. Die höchsten Werte sind hier aber in der Zellmitte und nicht am Rand zu finden, und der Anstieg zum Rand hin ist flacher.

Zum Vergleich wurden wieder drei Bereiche (Blau: 1; Grün: 2; Rot: 3) gebildet. Da die Radien kleiner sind, wurde die Breite von 6 auf 5 μm reduziert.

Die Boxplots in Abb. 42 (Rechts) zeigen dasselbe Verhalten wie schon bei den nur mit Lysepuffer behandelten Proben. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den drei Bereichen geringer geworden und der Bereich 3 lässt sich nur noch knapp statistisch signifikant von Bereich 2 unterscheiden.

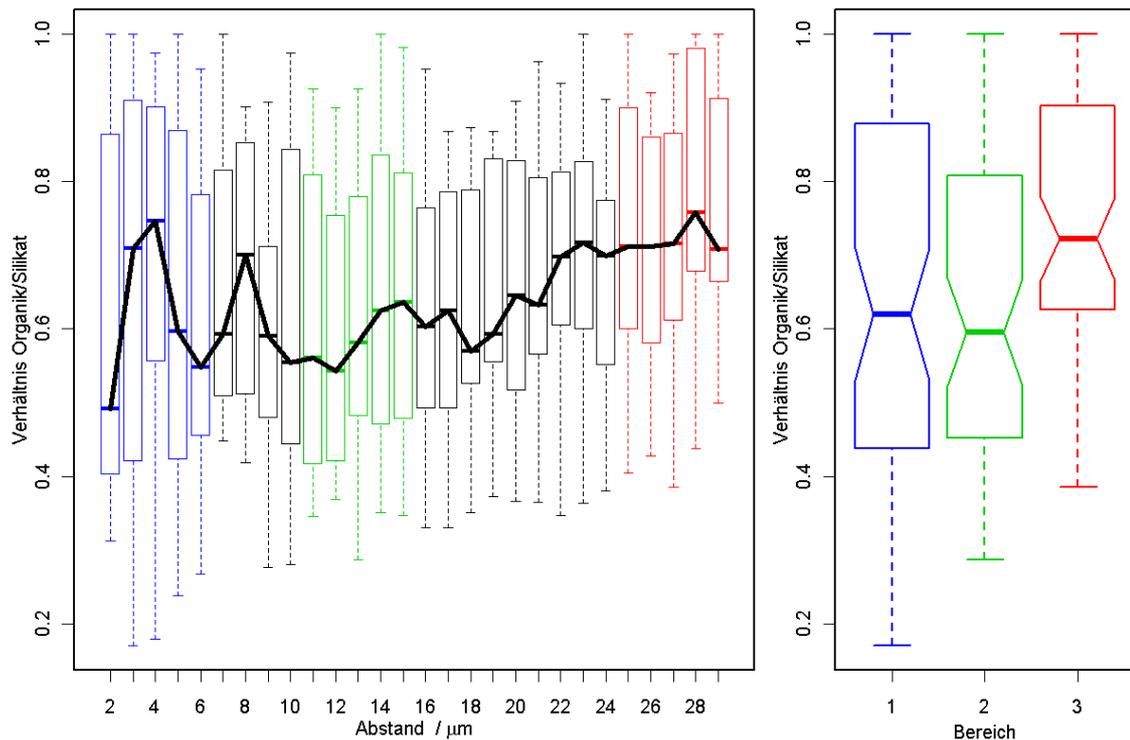


Abb. 42 Links: Gewichtete radiale Verteilung aller 12 Zellwände, die schwarze Linie verbindet die Mediane, die Boxplots zeigen die Verteilung der Werte, die Farben zeigen die zum Vergleich ausgewählten Bereiche. Rechts: Vergleich der drei Bereiche Mitte (Blau: 2–6 μm) Band um die Mitte (Grün: 11–15 μm) und Rand (Rot, 25–29 μm)

Um die Ansätze nur mit Lysepuffer- und mit zusätzlicher Wasserstoffperoxid-Behandlung zu vergleichen, sind die Mediane der Gesamtverteilungen durch die Normierung bei der Berechnung der Werte nicht geeignet. Die Verhältnisse zum Median des Randbereichs (3) geben aber die Möglichkeit den Verlauf zu vergleichen (Tab. 9).

Die Werte zeigen, dass der Abfall zum Bereich 2 nach der Wasserstoffperoxid-Behandlung weniger stark ist (0,83 statt 0,73) und dass in der Mitte etwas mehr organisches Material vorhanden ist (0,86 statt 0,83).

Nur Lysepuffer (Prof. M. Sumper)		Nach H ₂ O ₂ (R. Hedrich)		
Median	Verhältnis zu Bereich 3	Median	Verhältnis zu Bereich 3	
0,5	0,83	0,62	0,86	Bereich 1
0,44	0,73	0,60	0,83	Bereich 2
0,6		0,72		Bereich 3

Tab. 9: Mediane und Verhältnisse der Mediane im Vergleich zwischen Lysepuffer und Lysepuffer mit folgender Wasserstoffperoxid-Behandlung

Dieses Verhalten lässt sich durch die Verteilung des organischen Materials und den Zellwandaufbau erklären (siehe Kapitel 4.3.3). Da die Mitte stärker silifiziert ist als der

Randbereich, kann davon ausgegangen werden, dass Wasserstoffperoxid in der Mitte weniger Möglichkeiten hat organisches Material herauszulösen. Der Randbereich mit dem höchsten Gehalt an organischem Material verliert hingegen etwas mehr. Insgesamt werden Bereiche mit höherem Gehalt an organischem Material stärker angegriffen, wie der Wert von 0,83 im Bereich mit dem geringsten Gehalt an organischem Material und damit höchsten Silifizierung zeigt. Vermutlich ist im Bereich 2 das wenige vorhandene Material sehr fest eingelagert.

Dennoch bestätigt die Gesamtverteilung nach der Wasserstoffperoxid-Behandlung den schon an den nur mit Lysepuffer behandelten Zellwänden beobachteten Verlauf.

4.3.6 *C. asteromphalus*: Verteilung des organischen Materials

An *S. turris* konnte die beschriebene Tendenz der Verteilung des organischen Materials nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob dies ein allgemeines Verhalten darstellt, wurden andere Spezies untersucht. Eine weitere Spezies, die gewählt wurde, war *C. asteromphalus*, deren Zellwände eine ähnliche Größe haben wie die Zellwände von *S. turris*. Die Radien der untersuchten Zellwände lagen zwischen 35 und 52 μm . *C. asteromphalus* hat im Gegensatz zu *S. turris* flache Zellwände mit nur geringer Wölbung (siehe Abb. 2). Der Median des Bandenverhältnisses, welches dem Gehalt an organischem Material entspricht, ist mit 2.91 wesentlich kleiner als 6.59 bei *S. turris*. Es wurden Raman-Maps von 29 Zellwänden aufgenommen.

Wie die Raman-Maps in Abb. 43 zeigen, bestätigt sich die bei *S. turris* beobachtete Tendenz zu höheren Gehalten an organischem Material im Randbereich bei *C. asteromphalus*.

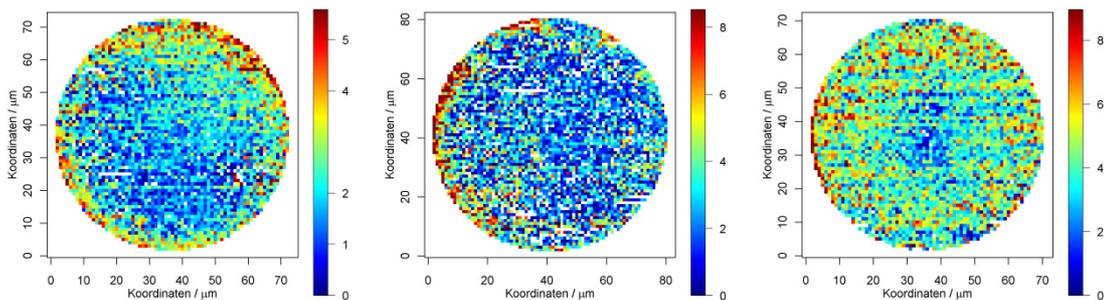


Abb. 43: Verteilung des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800\text{ cm}^{-1}$) an drei Raman-Maps, weiße Pixel: als Ausreißer entfernte Werte

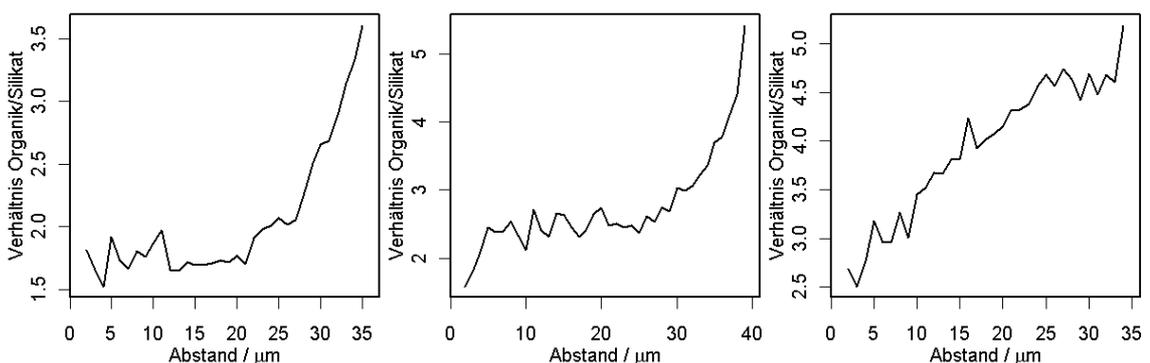


Abb. 44: Radiale Verteilungen der Konzentration des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800\text{ cm}^{-1}$) zu den drei Beispielen in Abb. 43

Dabei zeigen die Maps links und in der Mitte nur in einer schmalen Zone am Rand erhöhte Gehalte, während in der rechten Map der Anstieg graduell erfolgt. Die radialen Verteilungen zu den Maps (Abb. 44) bestätigen diese Beobachtung.

Um die spektralen Unterschiede zwischen Bereichen mit niedrigem (Innen) und hohem Gehalt an organischem Material (Rand) zu beurteilen wurden die Mittelwertspektren zweier kreisringförmiger Bereiche berechnet. Für den inneren Bereich umfasst der Bereich alle Spektren mit einem Abstand von 3–6 μm vom Mittelpunkt. Der Randbereich umfasst alle Spektren mit einem Abstand von 2–4 μm vom Rand. Die beiden Bereiche sind in Abb. 45 an einem Beispiel dargestellt.

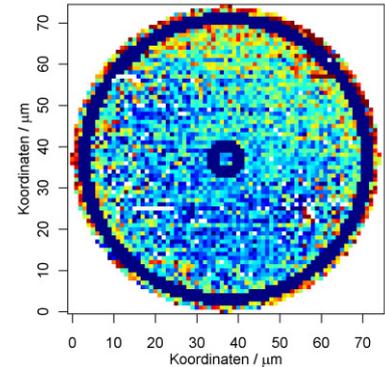


Abb. 45: Innen- und Randbereiche für den Spektrenvergleich

In Abb. 46 sind die Mittelwertspektren zu den drei Raman-Maps aus Abb. 43 dargestellt. Bei allen drei Zellwänden sind keine neuen Banden zu beobachten. Die Unterschiede in den Spektren zwischen den Zellwänden sind auf die natürliche Varianz zurückzuführen. Im Gegensatz zu der Beobachtung bei *S. turris* (Abb. 33) sind bei allen drei Zellwänden nur leicht höhere Intensitäten der Bande bei 2910 cm^{-1} zu erkennen. Dafür sinkt die Intensität der Silikatbande bei 800 cm^{-1} , relativ zur Intensität der Bande bei 2910 cm^{-1} zwischen den Bereichen.

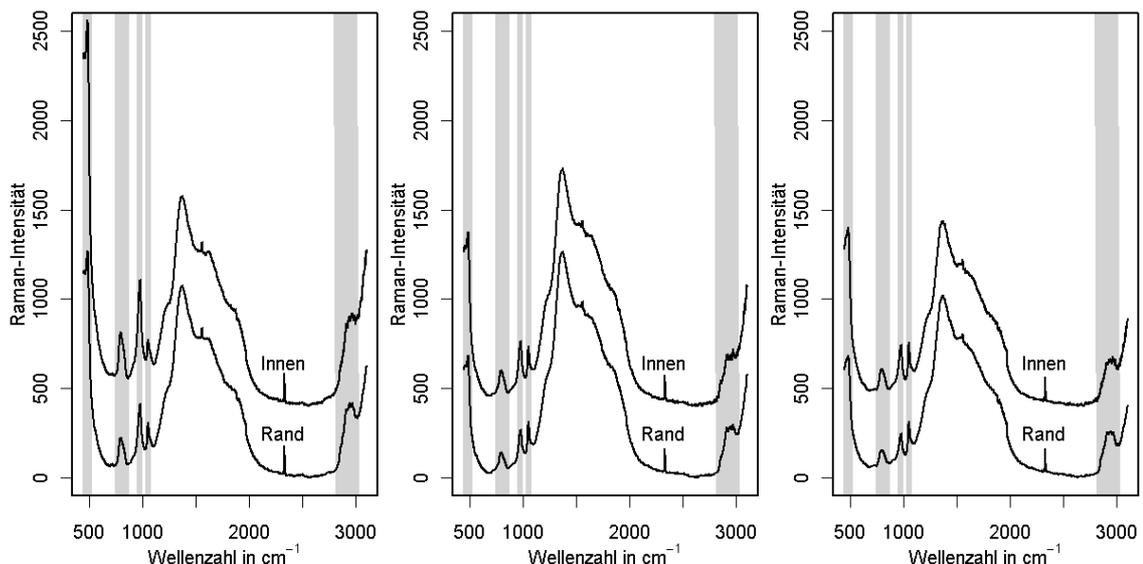


Abb. 46: Mittelwertspektren der Innen- und Randbereiche zu den drei Raman-Maps aus Abb. 43

Auch die Intensität der Silikatbande bei 975 cm^{-1} folgt diesem Trend, während die Intensität der Bande bei 1050 cm^{-1} fast konstant bleibt.

Das zeigt, dass der Randbereich schwächer silifiziert ist als der Innenbereich und damit mehr organisches Material im Verhältnis zum Silikat enthält. Die annähernd konstante Intensität der Bande bei 1050 cm^{-1} könnte auf eine ähnliche Störung des Silikatnetzwerkes in beiden Bereichen hindeuten.

Die Gesamtverteilung über alle Zellwände (Abb. 47) zeigt, dass der Gehalt an organischem Material fast gleichmäßig bis zirka $38\text{ }\mu\text{m}$ ansteigt. Ab $38\text{ }\mu\text{m}$ ist der Anstieg stärker. Damit zeigt die Gesamtverteilung, dass über alle Messungen eine Mischform der beiden Muster aus Abb. 44 vorliegt.

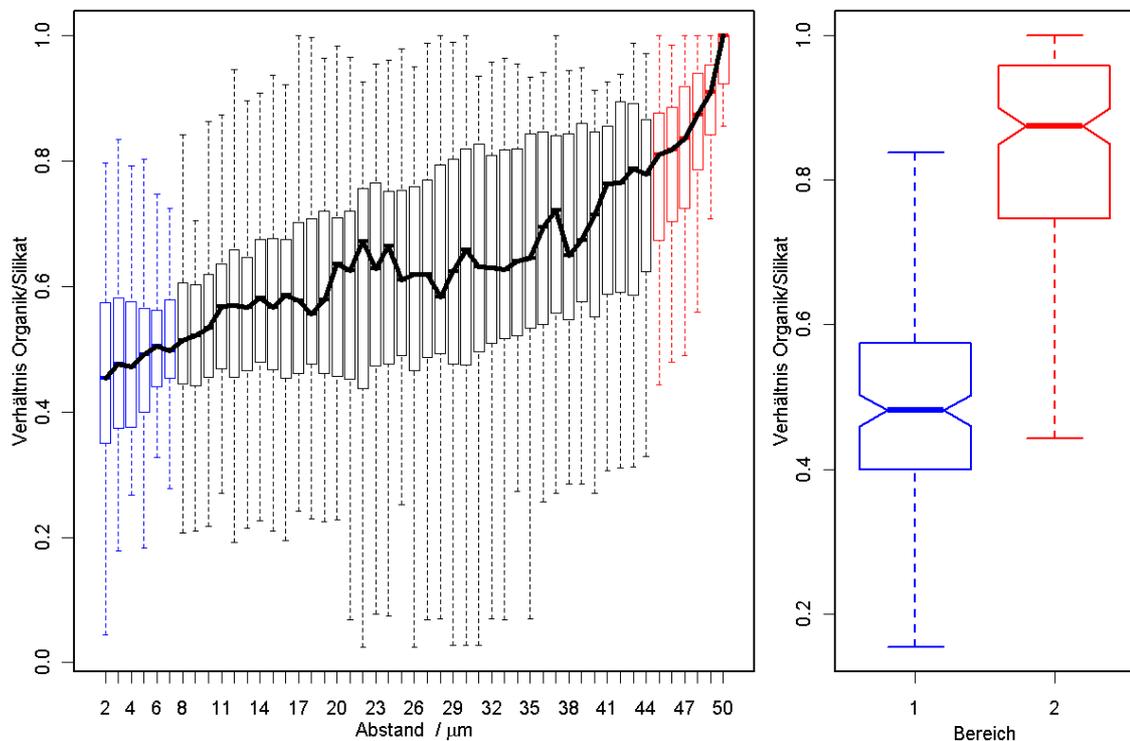


Abb. 47: Links: Gewichtete radiale Verteilung aller 29 Zellwände, die schwarze Linie verbindet die Mediane, die Boxplots zeigen die Verteilung der Werte, die Farben zeigen die zum Vergleich ausgewählten Bereiche. Rechts: Vergleich der zwei Bereiche Mitte (Blau: $2\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$) und Rand (Rot, $45\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$)

Das Fehlen einer Zone mit höherem Gehalt an organischem Material in der Mitte bei *C. asteromphalus* ist vermutlich auf die Unterschiede im Zellwandaufbau zurückzuführen. *S. turris* ist über stachelförmige Fortsätze zu Kolonien verbunden, diese Fortsätze sind in einem Ring in der Nähe der Mitte verankert. *C. asteromphalus* weist hingegen keine derartigen Fortsätze auf, da diese Spezies keine Kolonien bildet. Wie in

4.3.3 diskutiert lässt sich der höhere Gehalt von organischem Material um die Zone mit den Fortsätzen durch mechanische Anforderungen erklären.

C. asteromphalus bestätigt nicht nur die Tendenz zu höheren Gehalten an organischem Material im Randbereich, die bei *S. turris* beobachtet wurde, bei dieser Spezies ist sie sogar eindeutiger ausgeprägt. Mitte (Blau) und Randbereich (Rot) unterscheiden sich deutlich, wie in den beiden Boxplots in Abb. 47 (Links) zu sehen ist. Anscheinend besteht bei radialen Diatomeen-Spezies eine Tendenz zu höheren Gehalten an organischem Material in der Nähe der Gürtelbänder.

4.3.7 *C. wailesii*: Verteilung des organischen Materials

Als dritte Spezies wurde *C. wailesii* untersucht. Bei dieser Spezies sind die Radien der Zellwände mit 100–140 μm wesentlich größer als bei den beiden bisher betrachteten Spezies. Es sollte untersucht werden ob auch *C. wailesii* die bei *S. turris* und *C. asteromphalus* beobachtete radialsymmetrische Verteilung des organischen Materials aufweist. Da der Zeitaufwand für die Messung der gesamten Zellwand nicht vertretbar war, wurden nur Sektoren der Zellwand gemessen, die bei einer radialsymmetrischen Verteilung für die Auswertung ausreichen.

Die Sektorform ist gut in den Raman-Maps in Abb. 48 zu erkennen. In dieser Darstellung sind nur die über die Unterschiede vom Mittelwertspektrum als Ausreißer erkannten Werte entfernt, Werte die kleiner Null waren wurden gleich Null gesetzt. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Spezies ist keine Tendenz in der Verteilung des organischen Materials zu erkennen.

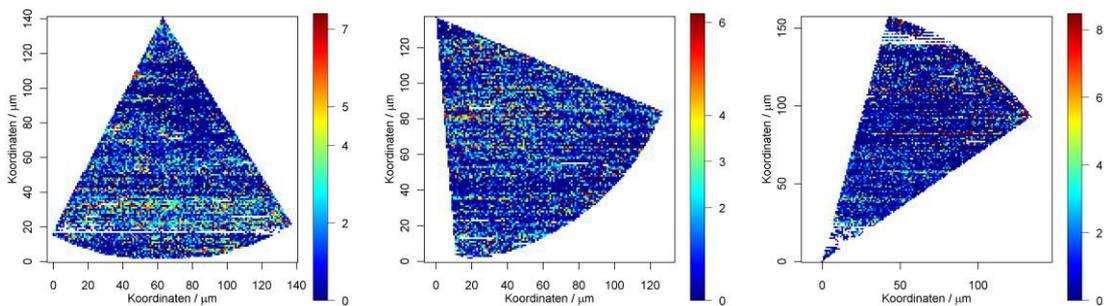


Abb. 48: Verteilung des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800\text{ cm}^{-1}$) an drei Raman-Maps, weiße Pixel: als Ausreißer über das Mittelwertkriterium entfernte Werte

Werden zusätzlich alle Werte kleiner Null, wie bei *S. turris* und *C. asteromphalus*, als Ausreißer entfernt ergibt sich das in Abb. 49 dargestellte Bild.

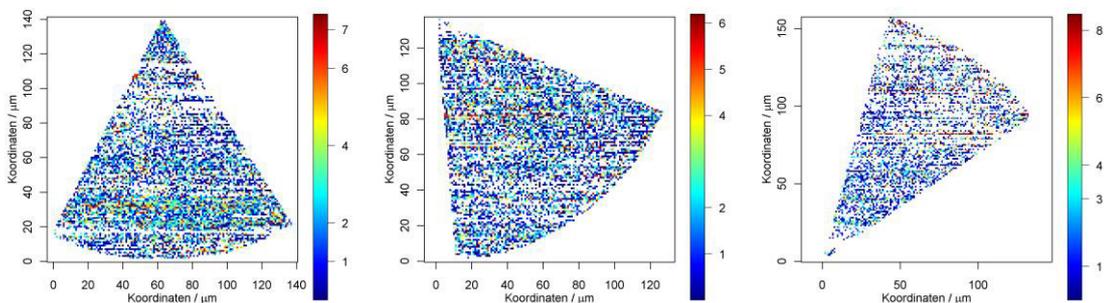


Abb. 49: Verteilung des organischen Materials (Bandenverhältnis $2910/800\text{ cm}^{-1}$) an drei Raman-Maps, weiße Pixel: als Ausreißer entfernte Werte (Mittelwert und Intensität kleiner Null)

Hier zeigt sich ein wesentlicher Grund warum keine Tendenz in der Verteilung des organischen Materials festzustellen ist: Viele Werte sind aufgrund zu geringer Intensitäten nicht aussagekräftig.

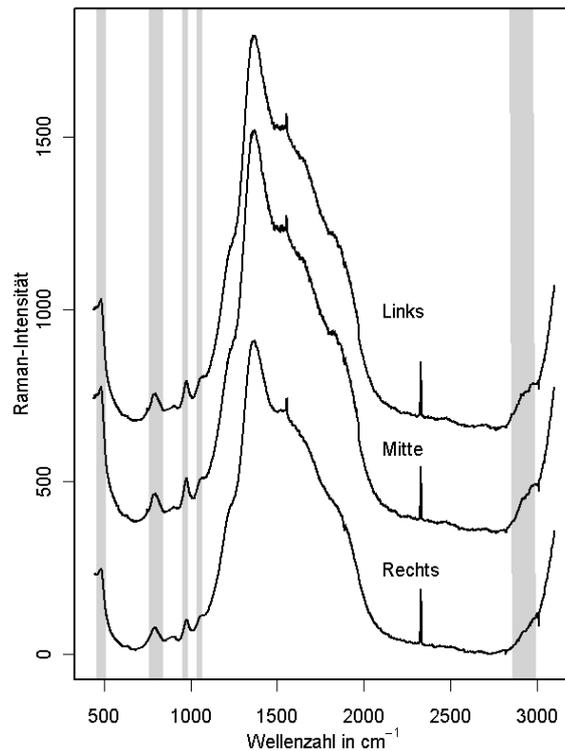


Abb. 50: Mittelwertspektren zu den drei Raman-Maps aus Abb. 49

Die Mittelwertspektren zu den Raman-Maps aus Abb. 49 bestätigen diese Beobachtung. Die Bande bei 2910 cm^{-1} ist schwach ausgeprägt und kaum vom Untergrund zu unterscheiden.

Es ist zwar möglich mittels Raman-Spektroskopie das Vorkommen von organischem Material in den Zellwänden von *C. wailesii* festzustellen, aber für Aussagen über die Verteilung ist der Gehalt eindeutig zu gering.

Ob *C. wailesii* der bei *S. turris* und *C. asteromphalus* festgestellten Tendenz zu höheren Gehalten von organischem Material am Rand der Zellwände folgt, kann also mittels Raman-Spektroskopie weder bestätigt noch widerlegt werden.

4.4 SERS-Messungen an *S. turris*

Wie in 4.3.3 gezeigt ermöglicht die Raman-Spektroskopie die Detektion sowie die Untersuchung der Verteilung des in den Zellwänden von *S. turris* eingeschlossenen organischen Materials. Der Gehalt an organischem Material ist aber nicht hoch genug, um Aussagen über die Art der Biomoleküle treffen zu können.

Um die Intensität der Banden zu verstärken, bietet sich die Verwendung des SERS-Effektes an. Auf das Biosilikat der Zellwände aufgebrachte Nanopartikel können mit an der Oberfläche vorhandenen Biomolekülen wechselwirken. Damit lässt sich eine lokale Verstärkung der Signale der Biomoleküle erreichen und es besteht die Möglichkeit bisher nicht identifizierte Biomoleküle, die fest an die Zellwand gebunden sind, zu untersuchen.

Da es sich um ein lokales Phänomen handelt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass der SERS-Effekt an jeder Stelle der Zellwand zu beobachten ist. Nur durch ortsaufgelöste Messungen ist es möglich eine gesicherte Aussage über das Auftreten des SERS-Effektes auf den Zellwänden zu treffen.

Auch die Bedeckung mit Nanopartikeln spielt eine wichtige Rolle. Es müssen genügend Nanopartikel vorhanden sein, damit die gesamte Zellwand bedeckt ist. Andererseits dürfen nicht zu viele Nanopartikel aufgetragen werden, da es sonst zur Aggregation der Nanopartikel und damit zur Bildung ungeordneter größerer Strukturen kommt. Bei einer derartigen mehrlagigen Bedeckung der Oberfläche steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Laserstrahlung und die Raman-Signale in der Nanopartikelschicht absorbiert werden. Durch diese Absorption könnte die Messung des SERS-Effektes behindert werden.

Für die hier vorgestellten Messungen wurden Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 5 nm eingesetzt. Die Bindung an das Biosilikat erfolgte durch kovalente Kopplung unter Verwendung von 3-(Aminopropyl)-triethoxysilan (3-APTES) als Kopplungsreagenz. Dass sich das verwendete Verfahren prinzipiell zum Hervorrufen des SERS-Effektes eignet, wurde durch gemessene SERS-Spektren von extrahierten Zellwänden der Diatomeen-Spezies *Eucampia Zoodiacus* nachgewiesen [62].

Um zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit des Auftretens des SERS-Effektes von der Anzahl der aufgebrauchten Nanopartikel vorliegt, wurden für 3 zugegebene Mengen (0,175; 0,375 und 1,143 ml Nanopartikellösung/mg Biosilikat) jeweils 4 Proben orts-aufgelöst gemessen.

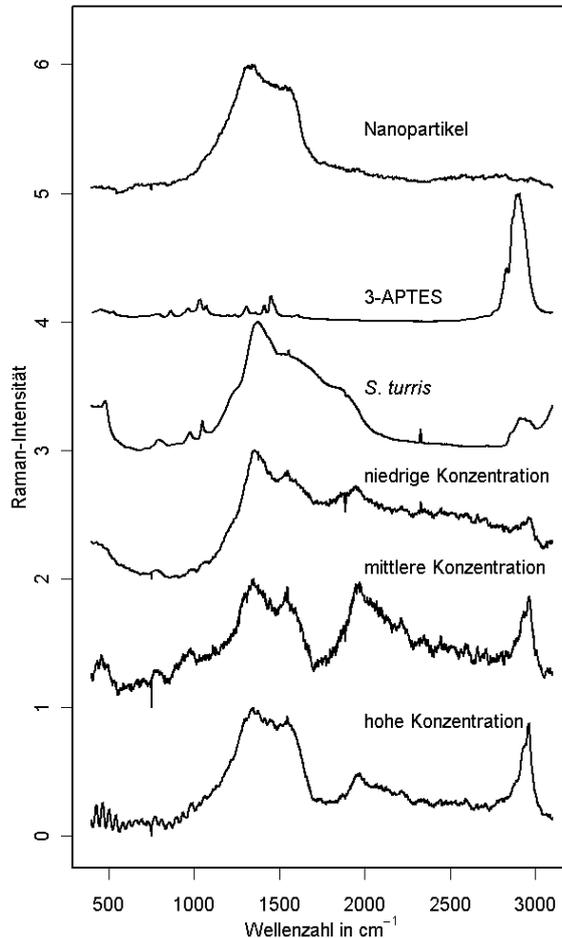


Abb. 51: Referenzspektren und Mittelwertspektren des Biosilikats bei unterschiedlichen Konzentrationen von Nanopartikeln. Alle Spektren basislinienkorrigiert und Minimum-Maximum normiert.

Als Messeinstellungen wurden 3s Messzeit und 3 Akkumulationen pro Spektrum bei einer Laserleistung von 30 mW gewählt. Um einen Überblick über den Einfluss der Nanopartikel auf die Raman-Spektren zu zeigen, sind in Abb. 51 die Referenzspektren der Nanopartikel, des Kopplungsreagenz (3-APTES), *S. turrus* und die Mittelwertspektren aller 4 bei den jeweiligen Nanopartikelmengen orts-aufgelöst aufgenommenen Spektren dargestellt. Um den Vergleich zu erleichtern sind alle Spektren zwischen 400 und 3100 Wellenzahlen linear basislinienkorrigiert und Minimum-Maximumnormiert.

Im Bereich von 1200–1600 Wellenzahlen ist bei allen drei mit Nanopartikelmengen der Einfluss der Nanopartikel im Spektrum zu erkennen. Auch das Kopplungsreagenz trägt in den Spektren im Wellenzahlbereich von 2800–3000 zur CH_x-Valenzschwingungsbande bei. Die anderen Banden von 3-APTES sind zu intensitätsschwach um sie in den Spektren zu erkennen. Die Intensität der CH_x-Valenzschwingungsbande steigt dabei wie zu erwarten mit der Menge der eingesetzten Nanopartikel. Für die Nanopartikelbanden lässt

sich keine eindeutige Aussage treffen, da die Banden sehr breit sind und eine Überlagerung mit den Banden aus dem *S. turris*-Spektrum vorliegt.

In den Mittelwertspektren sind außer der CH_x -Valenzschwingungsbande keine weiteren Banden klar zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass der SERS-Effekt zu selten auftritt um einen Einfluss auf die Mittelwertspektren zu haben.

Da pro Zellwand über 1000 Spektren orts aufgelöst aufgenommen wurden kann die weitere Auswertung nicht manuell erfolgen. Um die SERS-Spektren aus den aufgenommenen Spektren zu identifizieren, war es notwendig ein auf spektralen und mathematischen Kriterien beruhendes Verfahren zur Einschränkung der Anzahl zu verwenden. Das manuelle Untersuchen jedes einzelnen Spektrums wäre zu zeitaufwendig gewesen.

Wie in Abb. 51 zu sehen ist, treten unterhalb ca. 540 Wellenzahlen bei hohen Mengen von Nanopartikeln auf dem Biosilikat keine Banden mehr auf die Strukturmerkmalen zuzuordnen sind. Die anderen Spektren zeigen in dem Bereich unter 540 Wellenzahlen einen Anstieg zu einer Silikatbande (*S. turris*, niedrige Menge) oder wie zu erwarten eine Mischung aus beiden Verhalten bei der mittleren Konzentration. Daher wurden zuerst alle Spektren auf den Wellenzahlbereich von 540-3100 beschränkt. Als nächstes wurde eine lineare Basislinienkorrektur mit den Stützpunkten 540 und 3100 Wellenzahlen durchgeführt.

Spektren, die durch den SERS-Effekt beeinflusst wurden, weisen Banden auf, die deutlich intensiver sind als die Banden „normaler“ Spektren. Daher wurde als nächstes für jedes Spektrum eine Peaksuche durchgeführt und die Intensität der jeweils intensivsten Bande gespeichert. Die erste Raman-Map in Abb. 52 zeigt die Verteilung der so ermittelten Intensitäten über die Zellwand an einem Beispiel (Probe mit hoher Menge an Nanopartikeln).

Als nächstes wurden alle Spektren ausgeschlossen deren Intensität kleiner war als der Mittelwert plus dem Dreifachen der Standardabweichung der Intensitätsverteilung der Probe. Das Ergebnis dieses Schrittes ist in der mittleren Map von Abb. 52 dargestellt, die weiter zu untersuchenden Spektren sind in rot markiert.

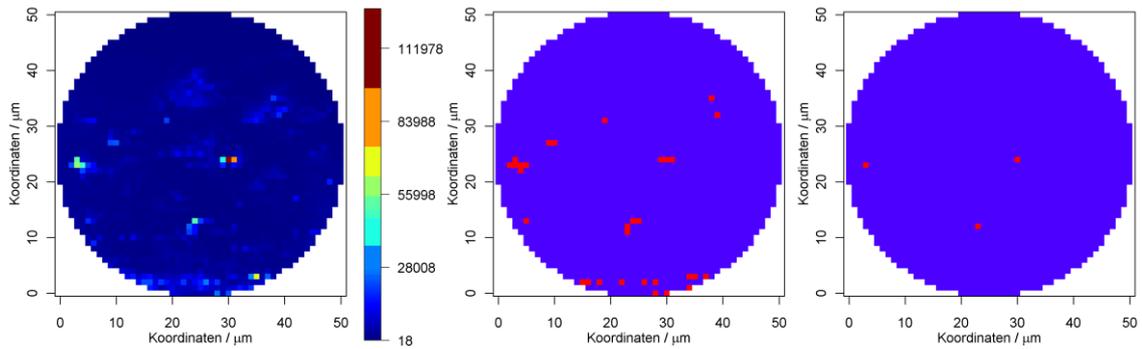


Abb. 52: Links Map der Intensitäten der intensitätsstärksten Bande der Spektren; Mitte: Map der über die Intensitäten als mögliche SERS-Spektren gewählten Spektren (rot: SERS, blau: kein SERS); Rechts: SERS-Spektren nach manueller Untersuchung der einzelnen Spektren die Mitte markiert waren (rot: SERS, blau: kein SERS)

Zur Erkennung der SERS-Spektren wurden die so gewählten Spektren einzeln betrachtet und alle Spektren ohne klar erkennbare Banden ausgeschlossen. Für die Beispielprobe verblieben 3 Spektren (Abb. 52, Rechts).

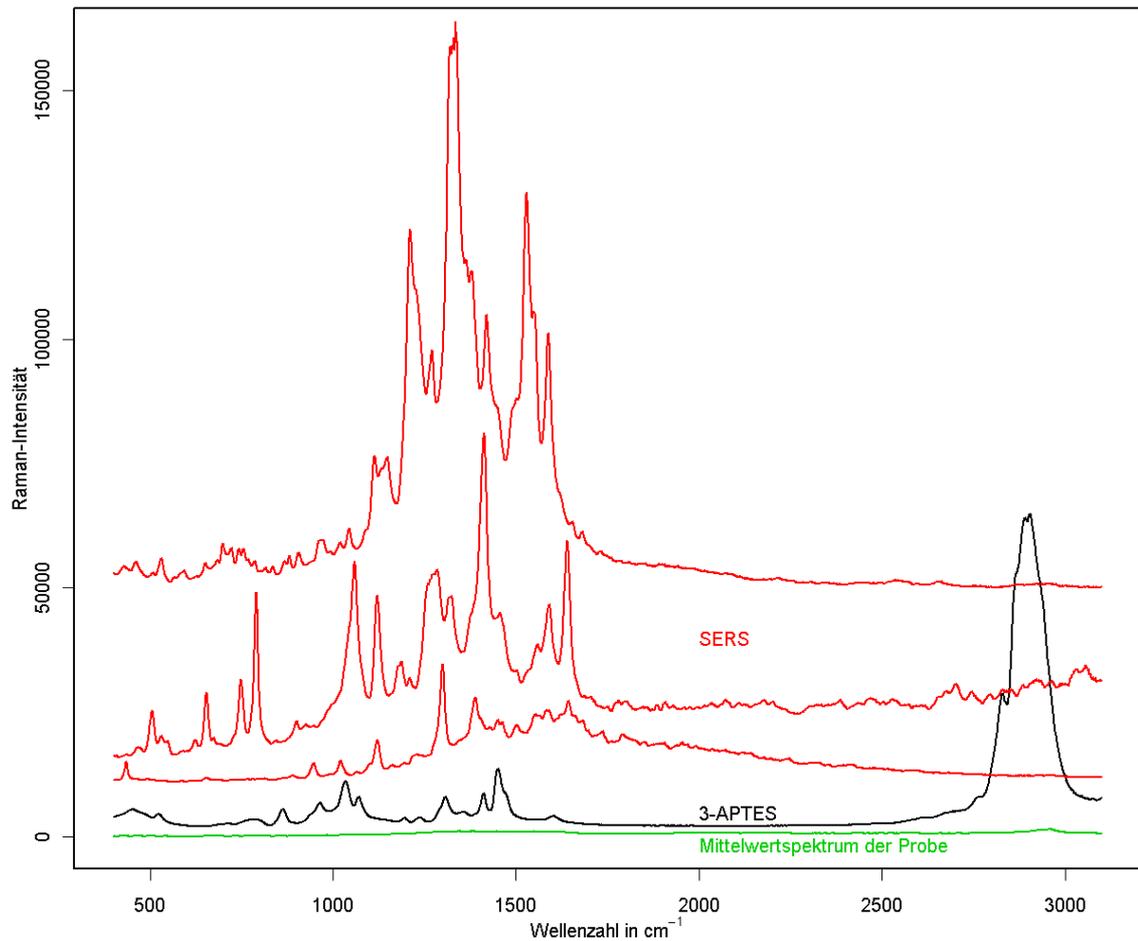


Abb. 53: SERS-Spektren der Beispielprobe im Vergleich mit dem Mittelwertspektrum (Grün) und dem Spektrum des Kopplungsreagenz 3-APTES (Schwarz)

Diese Spektren zeigt Abb. 53 in rot im Vergleich mit dem Mittelwertspektrum der Probe (grün) und dem Spektrum des Kopplungsreagenz (schwarz). Die wesentlich höheren Bandenintensitäten im Vergleich zum Mittelwertspektrum sind gut zu erkennen, es handelt sich also auf jeden Fall um Verstärkung. Dass es sich um SERS handelt, wird auch durch den Wellenzahlbereich, in dem Banden zu erkennen sind, bestätigt. Wie die Forschungsgruppen von Popp [63] und Kneipp [64] an Bakterien zeigen konnten, tritt bei biologischen Proben typischerweise eine SERS-Verstärkung von 500–1600 Wellenzahlen auf. In den SERS-Spektren ist keine CH_x -Valenzschwingungsbande zu erkennen. Das ist ein weiterer Hinweis, dass es sich um Verstärkung durch SERS handelt.

Die Bandenpositionen in den SERS-Spektren stimmen nicht mit denen von 3-APTES überein. Die verstärkten Banden sind also Banden von Biomolekülen, die an die Zellwand gebunden sind, zuzuordnen.

Für die Beurteilung von durch SERS verstärkten Spektren wird ein sogenannter Verstärkungsfaktor angegeben. Der am einfachsten anzugebende Verstärkungsfaktor ist der „analytische Verstärkungsfaktor“ [65]. Er ist definiert als das Verhältnis der Bandenintensität einer definierten Bande mit SERS zu der Bandenintensität dieser Bande des Analyten ohne SERS. Im Fall der hier untersuchten Proben bietet sich das Mittelwertspektrum der Probe als Referenz für die Bandenintensität ohne SERS-Effekt an. Als Bande für die Berechnung des Verstärkungsfaktors wurde in allen Spektren jeweils die intensivste Bande gewählt. Für die in Abb. 53 gezeigten SERS-Spektren betragen die analytischen Verstärkungsfaktoren von oben nach unten 125, 67 und 29.

Es ist beobachtet wurden, dass der SERS-Effekt bei niedrigen Wellenzahlen (<700) oft höhere Verstärkungsfaktoren ergibt. Bei höheren Wellenzahlen können die analytischen Verstärkungsfaktoren auch nur in der Größenordnung von 5-10 liegen [65]. Ein aktueller Übersichtsartikel gibt für die erreichten Verstärkungsfaktoren ebenfalls eine untere Grenze von 5 an [66].

Die Verstärkungsfaktoren liegen also im unteren Bereich der in der Literatur genannten Verstärkungsfaktoren. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Effektivität des SERS-Effektes von einer großen Anzahl von Faktoren abhängt: SERS-Substrat, Analyt, Entfernung zwischen SERS-Substrat und Analyt sowie verwendeter Laserwellenlänge.

Im Falle der hier untersuchten Proben kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die Entfernung zwischen SERS-Substrat (Silber-Nanopartikel) und dem Analyten (organisches Material) eine wichtige begrenzende Größe darstellt. Das organische Material wird vermutlich teilweise oder vollständig von Biosilikat umgeben sein. Daher können die Nanopartikel nicht, wie zum Beispiel in einer kolloidalen Lösung, das organische Material vollständig bedecken. Das könnte als eine Erklärung für die geringe Größe der Verstärkungsfaktoren dienen.

In Tab. 10 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst.

Menge Nanopartikel [ml Lösung/mg Biosilikat]	Aufgenommene Spektren	Anzahl SERS-Spektren	Median der Verstärkungsfaktoren	Maximaler Verstärkungsfaktor
0,175	5988	8	76	305
0,375	6360	4	87	208
1,143	6800	16	36	125

Tab. 10: Übersicht über die SERS-Messungen

Bei der höchsten Menge an zugesetzten Nanopartikel trat der SERS-Effekt wesentlich häufiger auf als bei den niedrigeren Mengen. Dass es sich hier nicht notwendigerweise um einen linearen Prozess handelt, zeigt die niedrigere Anzahl von SERS-Spektren bei der mittleren Menge. Die mittlere Menge wird daher bei den folgenden Betrachtungen nicht mit einbezogen.

Die höhere Anzahl von auftretenden SERS-Spektren bei der hohen Menge geht einher mit niedrigeren Verstärkungsfaktoren. Der Median sinkt auf rund 46% und das Maximum auf rund 41% der Intensität bei der niedrigen Menge. Ein Erklärungsansatz könnte die höhere Bedeckung des Biosilikats bei der hohen Menge sein. Bei der niedrigen Menge können nur die günstig liegenden Biomoleküle angeregt werden, während die höhere Menge auch das Anregen von weniger zugänglichen Biomolekülen ermöglicht. Das Absinken des maximalen Verstärkungsfaktors lässt sich nicht eindeutig erklären. Eine mögliche Interpretation wäre eine teilweise Absorption in der Nanopartikelschicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für den Zweck der Analyse der an die Zellwand von *S. turris* gebundenen Biomoleküle eine hohe Menge von Nanopartikeln

zu empfehlen ist. Die höhere Anzahl an Stellen an denen Verstärkung registriert werden kann wiegt die niedrigeren Verstärkungsfaktoren für die analytische Verwendung auf, da das Ziel in der Identifizierung der Biomoleküle und nicht im Erreichen der maximal möglichen Verstärkungsfaktoren liegt.

Die in den einzelnen SERS-Spektren erkennbaren Banden variieren stark. In der Zellwand liegt eine Mischung verschiedener Biomoleküle vor, daher kann an unterschiedlichen Stellen der Zellwand auch von einer unterschiedlichen Zusammensetzung und Zugänglichkeit für SERS ausgegangen werden. Dies führt zu den Unterschieden zwischen den Spektren.

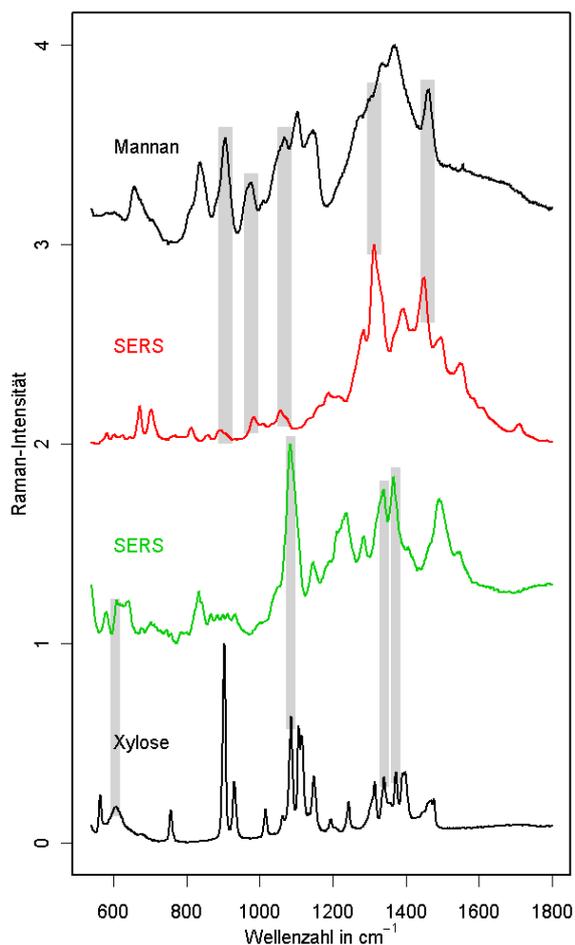


Abb. 54: SERS-Spektren im Vergleich mit Mannan und Xylose als Referenz

Das organische Material in der Zellwand ist ein Gemisch aus verschiedenen Biomolekülen. Um die Komponenten, die durch SERS nachweisbar werden, einordnen zu

Eine erste Einordnung soll hier nur an zwei Spektren gezeigt werden. Aus Festkörper-NMR Untersuchungen an *S. turris* ist das Vorhandensein von Sacchariden in den Zellwänden bekannt [67]. Mittels GC-MS wurden an anderen Diatomeenspezies Mannan und Xylose als Bestandteile der Zellwände identifiziert [68, 69]. Daher wurden diese beiden Substanzen als Referenz verwendet.

Gut zu erkennen ist (Abb. 54), dass keins der SERS-Spektren vollständig den Referenzsubstanzen entspricht. Es sind jedoch ähnliche Bandenlagen zwischen Mannan und dem roten, sowie Xylose und dem grünen SERS-Spektrum vorhanden.

können, erscheint das Aufbauen einer Datenbank von gemessenen SERS-Spektren notwendig.

Mit Hilfe dieser Datenbank und möglicherweise der Anwendung multivariater Analyseverfahren, wie zum Beispiel der Hauptkomponentenanalyse, könnte eine Identifizierung einzelner Bestandteile möglich werden.

Da nicht vorhergesagt werden kann, an welcher Stelle der Zellwand der SERS-Effekt auftritt, sind orts aufgelöste Messungen notwendig um alle möglichen Spektren zu erfassen. Das hier vorgestellte Verfahren aus orts aufgelösten Messungen mit mathematisch gestützter Erkennung der SERS-Spektren bietet sich zum Gewinnen der Spektren für den Aufbau einer Datenbank an.

5 Zusammenfassung

Die Biomineralisation stellt ein vielfältiges Forschungsgebiet dar. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Schwingungsspektroskopie in der Lage wertvolle Beiträge zur Charakterisierung von Biomineralien zu leisten.

Mittels Raman-Spektroskopie konnte α -Chitin in demineralisierten Skelettfasern von Hornkieselchwämmen der Spezies *Ianthella basta*, *Aplysina cauliformis* und *Aplysina cavernicola* nachgewiesen werden. Alle diese Spezies gehören zur Ordnung der Verongiden. Damit wird auch ein Beitrag zur Klassifizierung dieser Spezies geleistet. Es ist möglich, dass neue Grenzen zwischen den Familien aufgrund des Vorhandenseins von α -Chitin in den Skelettfasern aufzustellen sind.

Die Raman-Spektroskopie eignet sich hervorragend, um mineralische Bestandteile in Schwammskeletten nachzuweisen. In den Fasern des Hornkieselchwammes *Verongula gigantea* wurde durch den Einsatz von Raman-Mikroskopie Aragonit nachgewiesen. In Skeletten dieser Spezies kommen auch α -Chitin und Silikat vor. Damit konnte die Raman-Spektroskopie einen Beitrag zur Entdeckung eines neuartigen Biokomposites leisten, welches aus den drei Komponenten Silikat, Chitin und Aragonit besteht.

Bei der Erforschung der Wechselwirkung zwischen Silikat und β -Chitin an biomimetisch synthetisierten Silikat- β -Chitin-Kompositen gelang es durch Raman-Spektroskopie, Hinweise auf die Art der Wechselwirkung und die Art Abscheidung des Silikats auf den β -Chitin-Fasern zu erhalten. Das Silikat lagert sich nicht nur auf den quellfähigen β -Chitin-Fasern ab, sondern dringt auch in die Fasern ein. Aus den Spektren konnte die Existenz schwacher Wechselwirkungen zwischen Silikat und Chitin geschlossen werden. ^{13}C -CP-NMR-Messungen ermöglichten das Identifizieren der Wechselwirkung als Wasserstoffbrückenbindungen.

Sowohl IR- als auch Raman-Spektroskopie können orts aufgelöst durchgeführt werden. Damit bietet sich die Möglichkeit, Informationen über die Verteilung des organischen Materials in den Zellwänden von Diatomeen zu gewinnen. Bis zu der vorliegen-

den Arbeit waren die orts aufgelösten Messverfahren noch nie für die Untersuchung von Diatomeen-Zellwänden verwendet wurden.

Als Proben wurden in künstlichem Meerwasser gezüchtete Diatomeen verwendet. Vor der Messung wurde sämtliches physikalisch gebundenes organisches Material durch eine Lysepufferbehandlung entfernt. Es verblieb nur die Zellwand aus Biosilikat mit in die Zellwand eingelagertem, sowie an die Zellwand chemisch gebundenem organischem Material.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich die Raman-Spektroskopie als die geeignetere Methode zur Untersuchung der Verteilung des organischen Materials in Diatomeen-Zellwänden erwiesen. Das ist durch ihre im Vergleich zur IR-Spektroskopie höhere Ortsauflösung sowie höhere Empfindlichkeit für organisches Material begründet.

Um die Spektrenqualität zu optimieren, wurde für die radialsymmetrische Spezies *S. turris* ein an die Form der Zellwand angepasstes Messverfahren entwickelt. Damit war es das erste Mal möglich zu zeigen, dass bei *S. turris* der Gehalt von organischem Material im Biosilikat zum Rand hin steigt. Durch den höheren Gehalt an organischem Material wird vermutlich die Flexibilität und mechanische Belastbarkeit der Zellwand in diesem Bereich erhöht. Das könnte dem Schutz vor Feinden dienen. In dieser Region wächst die Zellwand auch durch Ausbildung von sogenannten Gürtelbändern. Auch für das Wachstum erscheint eine höhere mechanische Belastbarkeit sinnvoll.

An einem zweiten Ansatz von *S. turris*, der zusätzlich oxidativ mit Wasserstoffperoxid behandelt wurde, wurde dieses Ergebnis überprüft. In den Zellwänden war, im Vergleich zu den nur mit Lysepuffer extrahierten Zellwänden, bedeutend weniger organisches Material vorhanden. Die Verteilung des organischen Materials bestätigte dennoch die Aussage, dass am Rand der Zellwände ein höherer Gehalt an organischem Material vorliegt.

Untersuchungen an einer anderen radialsymmetrischen Spezies, *C. asteromphalus*, zeigten eine noch deutlichere Tendenz zur Anreicherung von organischem Material am Rand. Daraus lässt sich vermuten, dass bei radialsymmetrischen Diatomeen generell ein höherer Gehalt von organischem Material am Rand auftritt.

Der Gehalt an organischem Material in den extrahierten Zellwänden ist zu gering, um die Arten der Biomoleküle zu bestimmen. An die Zellwände gebundene Nanopartikel ermöglichen jedoch das Verwenden des SERS-Effektes zur Verstärkung der Spektren des organischen Materials. Mittels orts aufgelöster Messungen an Zellwänden, an die Nanopartikel kovalent gekoppelt waren, konnte der SERS-Effekt an *S. turris* Zellwänden nachgewiesen werden. Orts aufgelöste Messungen sind für Untersuchungen unter Verwendung des SERS-Effektes besonders gut geeignet, da der Verstärkung der Banden nicht gleichmäßig über die Zellwand zu beobachten waren. Die maximale Anzahl an SERS-Spektren kann nur durch orts aufgelöste Messungen erhalten werden.

An die Zellwandform angepasste orts aufgelöste Messverfahren, wie hier an *S. turris* gezeigt, lassen sich auch für andere Zellwandformen entwickeln. Die sehr regelmäßig und hoch symmetrisch aufgebauten Diatomeen-Zellwände vereinfachen dabei den Prozess. Mit Hilfe derartiger Messverfahren lassen sich weitere Informationen über den Aufbau der Zellwände gewinnen.

Die Möglichkeit, höchst aufgelöste Raman-Messungen durchzuführen, wie am Witec-Spektrometer gezeigt, könnte die Untersuchung von Zellbestandteilen, wie dem Silica Deposition Vesicle, in der lebenden Zelle ermöglichen.

Der SERS-Effekt hat ein großes Potential als Hilfsmittel zur Identifizierung von Bestandteilen in den extrahierten Zellwänden. Durch Optimierung des Verfahrens zur Ankopplung der Nanopartikel an die Zellwände lassen sich die Ergebnisse weiter verbessern. Um das Potential auszuschöpfen, erscheint die Durchführung größerer orts aufgelöster Messreihen angebracht.

Zur Auswertung der so gewonnen Spektren bietet sich der Aufbau einer Datenbank der SERS-Spektren sowie die Verwendung chemometrischer Auswerteverfahren an.

6 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Eike Brunner für die Möglichkeit dieses Thema zu bearbeiten, sowie für die Betreuung und Unterstützung während der Promotion.

Für die zur Verfügungstellung von Diatomeen möchte ich Prof. Manfred Sumper, DC René Hedrich, DC Patrick Richthammer, DC Julia Stukert und M. sc. Anne Jantschke danken.

Dr. Christoph Krafft danke ich für die Hinweise zur Raman-Spektroskopie sowie in besonderem Maße für die Durchführung der hochaufgelösten Raman-Messungen am Witec-Spektrometer.

Bei Dr. Hermann Ehrlich bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei sämtlichen Untersuchungen an Schwämmen.

DC Katrin Spinde danke ich für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der biomimetisch silifzierten Proben.

In allen Fragen zu Nanopartikeln sowie der Präparation der *S. turris*-Zellwände für die SERS-Untersuchungen danke ich M. sc. Anne Jantschke.

Allen Mitarbeitern der Professur für Bioanalytische Chemie danke ich für die kollegiale Atmosphäre sowie die hilfreichen Diskussionen und Hinweise.

7 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen

- **Kammer, M**; Hedrich, R; Ehrlich, H; Popp, J; Brunner, E; Krafft, C: Spatially resolved determination of the structure and composition of diatom cell walls by Raman and FTIR imaging. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(1) (2010), 509-517
- Brunner, E; Ehrlich, H; **Kammer, M**: Biomimetic synthesis of nanostructures inspired by biomineralization in Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics (2010) CRC Press ISBN 9781420075465
- Brunner, E; Ehrlich, H; Schupp, P; Hedrich, R; Hunoldt, S; **Kammer, M**; Machill, S; Paasch, S; Bazhenov, V; Kurek, D; Machill, S; Paasch, S; Bazhenov, V; Kurek, D; Arnold, T; Brockmann, S; Ruhnow, M; Born, R: Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. In: *Journal of Structural Biology* 168(3) (2009), 539-547
- Ehrlich, H; Simon, P; Carrillo-Cabrera, W; Bazhenov, V; Botting, J; Ilan, M; Ereskovsky, A; Muricy, G; Worch, H; Mensch, A; Born, R; Springer, A; Kummer, K; Vyalikh, D; Molodtsov, S; Kurek, D; **Kammer, M**; Paasch, S; Brunner, E: Insights into Chemistry of Biological Materials: Newly Discovered Silica-Aragonite-Chitin Biocomposites in Demosponges. In: *Chemistry of Materials* 22(4) (2010), 1462-1471
- Ehrlich, H.; Ilan, M.; Maldonado, M.; Muricy, G.; Bavestrello, G.; Kljajic, Z.; Carballo, J. L.; Schiaparelli, S.; Ereskovsky, A.; Schupp, P. Born, R; Worch, H; Bazhenov, V; Kurek, D; Varlamov, V; Vyalikh, D; Kummer, K; Sivkov, V; Molodtsov, S; Meissner, H; Richter, G; Steck, E; Richter, W; Hunoldt, S; **Kammer, M**; Paasch, S; Krasokhin, V; Patzke, G; Brunner, E: Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 47(2) (2010), 132-140
- Ehrlich, H.; Steck, E.; Ilan, M.; Maldonado, M.; Muricy, G.; Bavestrello, G.; Kljajic, Z.; Carballo, J. L.; Schiaparelli, S.; Ereskovsky, A; Schupp, P; Born, R; Worch, H; Bazhenov, V; Kurek, D; Varlamov, V; Vyalikh, D; Kummer, K; Sivkov, V; Molodtsov, S; Meissner, H; Richter, G; Hunoldt, S; **Kammer, M**; Paasch, S; Krasokhin, V; Patzke, G;

Brunner, E; Richter, W: Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic potential and applications. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 47(2) (2010), 141-145

- Ehrlich, H; Brunner, E; Simon, P; Bazhenov, V.; Botting, J; Tabachnick, K; Springer, A; Kummer, K; Vyalikh, D; Molodtsov, S; Kurek, D; **Kammer, M**; Born, R; Kovalev, A; Gorb, S; Koutsoukos, P; Summers, A: Calcite Reinforced Silica-Silica Joints in the Biocomposite Skeleton of Deep-Sea Glass Sponges; *Advanced Functional Materials* 21(18) 2011), 3473-3481
- Spinde, K; **Kammer, M**; Freyer, K; Ehrlich, H; Vournakis, J.; Brunner, E: Biomimetic Silicification of Fibrous Chitin from Diatoms. In: *Chemistry of Materials* 23(11) (2011), 2973-2978

Tagungsbeiträge

- **Kammer, M**; Lutz, K, Gröger, C; Krafft, C; Sumper, M, Brunner, E: Solid-state NMR and Raman-Mapping studies of diatom cell walls; 30th Trinational Annual Discussion Meeting: Magnetic Resonance in Biology and Chemistry (GDCh); Regensburg, 22 – 25 September 2008
- **Kammer, M**; Hedrich, R; Stukert, J; Paasch, S; Brunner, E: Characterization of diatom cell walls by solid state NMR and Raman-Mapping; 31st Discussion Meeting: Magnetic Resonance in Chemistry and Materials Research (GDCh); Dresden; 21 – 24 September 2009

8 Literaturverzeichnis

- [1] MANN, Stephen: *Biomineralization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, 2001
- [2] EHRlich, Hermann; MALDONADO, Manuel; SPINDLER, Klaus-Dieter; ECKERT, Carsten; HANKE, Thomas; BORN, René; GOEBEL, Caren; SIMON, Paul; HEINEMANN, Sascha; WORCH, Hartmut: First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (demospongia: Porifera). In: *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308 (2007), Jul, Nr. 4, S. 347–356
- [3] CÁRDENAS, Galo; CABRERA, Gustavo; TABOADA, Edelio; MIRANDA, S. P.: Chitin Characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C Cross Polarization/Mass Angle Spinning NMR. In: *Journal of Applied Polymer Science* 93 (2004), S. 1876—1885
- [4] BRUNNER, E.; RICHTHAMMER, P.; EHRlich, H.; PAASCH, S.; SIMON, P.; UEBERLEIN, S.; PÉE, K.-H. van: Chitin-Based Organic Networks: An Integral Part of Cell Wall Biosilica in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. In: *Angewandte Chemie International Edition* 48 (2009), Nr. 51, S. 9724–9727
- [5] ROUND, F.; CRAWFORD, R.; MANN, D.: *The Diatoms*. Cambridge University Press, Cambridge, 1990
- [6] KRÖGER, Nils; DEUTZMANN, Rainer; SUMPER, Manfred: Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation. In: *Science* 286 (1999), S. 1129 – 1132
- [7] KRÖGER, Nils; DEUTZMANN, Rainer; BERGSDORF, Christian; SUMPER, Manfred: Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), S. 14133 – 14138
- [8] WENZL, Stephan; HETT, Robert; RICHTHAMMER, Patrick; SUMPER, Manfred: Silacidins: Highly Acidic Phosphopeptides from Diatom Shells Assist in Silica Precipitation In Vitro. In: *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008), Nr. 9, S. 1729–1732

- [9] KRÖGER, Nils; BERGSDORF, Christian; SUMPER, Manfred: Frustulins: Domain Conservation in a Protein Family Associated with Diatom Cell Walls. In: *European Journal of Biochemistry* 239 (1996), Nr. 2, S. 259–264
- [10] SUMPER, Manfred; KRÖGER, Nils: Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. In: *J. Materials Chemistry* 14 (2004), S. 2059 – 2065
- [11] BRUNNER, Eike; LUTZ, Katharina; BEHRENS, P. (Hrsg.); BÄUERLEIN, E. (Hrsg.): *Solid-state NMR in biomimetic silica formation, silica biomineralization. In Handbook of biomineralization: biomimetic and bioinspired chemistry.* Wiley-VCH, 2007
- [12] MARCHETTI, A; VARELA, DE; LANCE, VP; JOHNSON, Z; PALMUCCI, M; GIORDANO, M; ARMBRUST, EV: Iron and silicic acid effects on phytoplankton productivity, diversity, and chemical composition in the central equatorial Pacific Ocean. In: *Limnol Oceanogr* 55 (2010), S. 11–29
- [13] HEREDIA, Alejandro; STRATE, Han J. d.; DELGADILLO, Ivonne; BASIUK, Vladimir A.; VRIELING, Engel G.: Analysis of Organo-Silica Interactions during Valve Formation in Synchronously Growing Cells of the Diatom *Navicula pelliculosa*. In: *ChemBioChem* 9 (2008), Nr. 4, S. 573–584
- [14] STEHFEST, K; TOEPEL, J; WILHEM, C: The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. In: *Plant Physiol Biochem* 43 (2005), S. 717–726
- [15] VARDY, S; UWINS, P: Fourier transform infrared microspectroscopy as a tool to differentiate *Nitzschia closterium* and *Nitzschia longissima*. In: *Appl Spectrosc* 56 (2002), S. 1545–1548
- [16] WU, Q.; NELSON, W.H.; TREUBIG, J.M.; BROWN, P.R.; HARGRAVES, P.; KIRS, M.; FELD, M.; DESARI, R.; MANOHARAN, R.; HANLON, E.B.: UV Resonance Raman Detection and Quantitation of Domoic Acid in Phytoplankton. In: *Anal. Chem.* 72 (2000), Nr. 7, S. 1666–1671

- [17] WU, Q; NELSON, WH; HARGRAVES, P; ZHANG, J; BROWN, CW; SEELENBINDER, JA: Differentiation of algae clones on the basis of resonance Raman spectra excited by visible light. In: *Anal Chem* 70 (1998), S. 1782–1787
- [18] GRÖGER, Christian; LUTZ, Katharina; BRUNNER, Eike: NMR studies of biomineralisation. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 54 (2009), Januar, Nr. 1, S. 54–68
- [19] LEHN, Jean-Marie: Toward Self-Organization and Complex Matter. In: *Science* 295 (2002), Nr. 5564, S. 2400–2403
- [20] THAMATRAKOLN, Kimberlee; HILDEBRAND, Mark: Silicon uptake in diatoms revisited: a model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. In: *Plant Physiol* 146 (2008), Mar, Nr. 3, S. 1397–1407
- [21] KRÖGER, Nils; LORENZ, Sonja; BRUNNER, Eike; SUMPER, Manfred: Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis. In: *Science* 298 (2002), S. 584–586
- [22] SUMPER, Manfred; HETT, Robert; LEHMANN, Gerhard; WENZL, Stephan: A Code for Lysine Modifications of a Silica Biomineralizing Silaffin Protein. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007), S. 8405 — 8408
- [23] SUMPER, Manfred; BRUNNER, Eike; LEHMANN, Gerhard: Biomineralization in diatoms: Characterization of novel polyamines associated with silica. In: *FEBS Letters* 579 (2005), S. 3765 — 3769
- [24] SUMPER, Manfred: A Phase Separation Model for the Nanopatterning of Diatom Biosilica. In: *Science* 295 (2002), S. 2430 – 2433
- [25] ETCHEPARE, J.: Interpretation des spectres de diffusion Raman de verres de silice binaires. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 26 (1970), November, Nr. 11, S. 2147–2154. – ISSN 0584–8539

- [26] McMILLAN, Paul: Structural studies of silicate glasses and melts - applications and limitations of Raman spectroscopy. In: *American Mineralogist* 69 (1984), S. 622–644
- [27] McMILLAN, P.F.; POE, B.T.; GILLET, P.H.; REYNARD, B.: A study of SiO₂ glass and supercooled liquid to 1950 K via high-temperature Raman spectroscopy. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58 (1994), September, Nr. 17, S. 3653–3664
- [28] JEANMAIRE, David L.; VAN DUYN, Richard P.: Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 84 (1977), November, Nr. 1, S. 1–20
- [29] ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A.: Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. In: *JACS* 99 (1977), S. 5215–5217
- [30] CHAMBERS, John M.; CLEVELAND, William S.; KLEINER, Beat; TUKEY, Paul A.: *Graphical Methods for Data Analysis*. 1. Auflage. Chapman & Hall, 1983
- [31] EHRLICH, H.; ILAN, M.; MALDONADO, M.; MURICY, G.; BAVESTRELLO, G.; KLJAJIC, Z.; CARBALLO, J.L.; SCHIAPARELLI, S.; ERESKOVSKY, A.; SCHUPP, P.; BORN, R.; WORCH, H.; BAZHENOV, V.V.; KUREK, D.; VARLAMOV, V.; VYALIKH, D.; KUMMER, K.; SIVKOV, V.V.; MOLODTSOV, S.L.; MEISSNER, H.; RICHTER, G.; STECK, E.; RICHTER, W.; HUNOLDT, S.; KAMMER, M.; PAASCH, S.; KRASOKHIN, V.; PATZKE, G.; BRUNNER, E.: Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 47 (2010), August, Nr. 2, S. 132–140
- [32] VOURNAKIS, J. N.; FINKELSZTEIN, S.; PARISER, E. R.; HELTON, M.: *poly-N-acetylglucosamine*. 1994
- [33] VOURNAKIS, J. N.; DEMCHEVA, M.; WHITSON, A.; GURICA, R.; PARISER, E. R.: Purification and Characterization of Poly-N-acetyl Glucosamine for use as a Hemostatic Agent. In: *J. Trauma* 57 (2004), S. S2–S6

- [34] SPINDE, Katrin; KAMMER, Martin; FREYER, Katja; EHRLICH, Hermann; VOURNAKIS, John N.; BRUNNER, Eike: Biomimetic Silicification of Fibrous Chitin from Diatoms. In: *Chem. Mater.* 23 (2011), Mai, Nr. 11, S. 2973–2978
- [35] HARRISON, P.; WATERS, R.; TAYLOR, F.: A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. In: *Journal of Phycology* 16 (1980), S. 28–35
- [36] JANTSCHKE, Anne: *Synthese und Charakterisierung von Nanopartikel-Arrays unter Verwendung biologischer Template*, Technische Universität Dresden, Masterarbeit, 2010
- [37] SHAVEL, Alexey; GAPONIK, Nikolai; EYCHMÜLLER, Alexander: Covalent Linking of CdTe Nanocrystals to Amino-Functionalized Surfaces. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Nr. 3, 449–451. <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200400516>
- [38] FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M.: Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions—evidence from CP-MAS ¹³C-NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. In: *Carbohydrate Polymers* 17 (1992), Nr. 2, S. 97–102. – ISSN 0144–8617
- [39] BRUNNER, E.; EHRLICH, H.; SCHUPP, P.; HEDRICH, R.; HUNOLDT, S.; KAMMER, M.; MACHILL, S.; PAASCH, S.; BAZHENOV, V.V.; KUREK, D.V.; ARNOLD, T.; BROCKMANN, S.; RUHNOW, M.; BORN, R.: Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. In: *Journal of Structural Biology* 168 (2009), Dezember, Nr. 3, S. 539–547
- [40] EHRLICH, Hermann: Chitin and collagen as universal and alternative templates in biomineralization. In: *International Geology Review* 52 (2010), Nr. 7, S. 661–699
- [41] WEHRMEISTER, U.; SOLDATI, A. L.; JACOB, D. E.; HÄGER, T.; HOFMEISTER, W.: Raman spectroscopy of synthetic, geological and biological vaterite: a Raman spectroscopic study. In: *J. Raman Spectrosc.* 41 (2010), Nr. 2, S. 193–201

- [42] WEHRMEISTER, U.; JACOB, D. E.; SOLDATI, A. L.; LOGES, N.; HÄGER, T.; HOFMEISTER, W.: Amorphous, nanocrystalline and crystalline calcium carbonates in biological materials. In: *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011), Nr. 5, S. 926–935
- [43] NAKAMOTO, Kazuo; FUJITA, Junnosuke; TANAKA, Shizuo; KOBAYASHI, Masahisa: Infrared Spectra of Metallic Complexes. IV. Comparison of the Infrared Spectra of Unidentate and Bidentate Metallic Complexes. In: *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957), September, Nr. 18, S. 4904–4908
- [44] VRIELING, Engel G.; GIESKES, W. W. C.; BEELEN, Theo P. M.: Silicon Deposition in Diatoms: Control by the pH inside the Silicon Depositon Vesicle. In: *Journal of Phy-cology* 35 (1999), Nr. 3, S. 548–559
- [45] SAITO, Yukie; OKANO, Takeshi; GAILL, Françoise; CHANZY, Henri; PUTAUX, Jean-Luc: Structural data on the intra-crystalline swelling of [beta]-chitin. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 28 (2000), Oktober, Nr. 1, S. 81–88
- [46] SITARZ, M.: The structure of simple silicate glasses in the light of Middle Infrared spectroscopy studies. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* 357 (2011), M^ab arz, Nr. 6, S. 1603–1608
- [47] KHANNA, R. K.; STRANZ, D. D.; DONN, B.: A spectroscopic study of intermediates in the condensation of refractory smokes: Matrix isolation experiments of SiO. In: *J. Chem. Phys.* 74 (1981), S. 2108–5115
- [48] LANGE, P.: Evidence for disorder-induced vibrational mode coupling in thin amorphous SiO₂ films. In: *Journal of Applied Physics* 66 (1989), Nr. 1, S. 201–204
- [49] GRAETSCH, H.; GIES, H.; TOPALOVIC: NMR, XRD and IR study on microcrystalline opals. In: *Physics and Chemistry of Minerals* 21 (1994), Nr. 3, S. 166–175
- [50] KALAMPOUNIAS, Angelo: IR and Raman spectroscopic studies of sol-gel derived alkaline-earth silicate glasses. In: *Bulletin of Materials Science* 34 (2011), April, Nr. 2, S. 299–303

- [51] DOWTY, Eric: Vibrational interactions of tetrahedra in silicate glasses and crystals. In: *Physics and Chemistry of Minerals* 14 (1987), Nr. 2, S. 122–138. – ISSN 0342–1791
- [52] MEDVEDEV, E. F.; KOMAREVSKAYA, A. S.: IR spectroscopic study of the phase composition for sodium silicate synthesized in aqueous medium. In: *Glass & Ceramics* 64 (2007), Januar, S. 7–11
- [53] KAMMER, Martin; HEDRICH, René; EHRLICH, Hermann; POPP, Jürgen; BRUNNER, Eike; KRAFFT, Christoph: Spatially resolved determination of the structure and composition of diatom cell walls by Raman and FTIR imaging. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010), Nr. 1, S. 509–517
- [54] BOUAJAJ, A.; FERRARI, M.; MONTAGNA, M.: Crystallization of silica xerogels: A study by raman and fluorescence spectroscopy. In: *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 8 (1997), Nr. 1, S. 391–395
- [55] SHARMA, Shiv K.; MAMMONE, Joseph K.; NICOL, Malcolm F.: Raman investigation of ring configurations in vitreous silica. In: *Nature* 292 (1981), S. 140 – 141
- [56] GALEENER, Frank L.: Planar rings in vitreous silica. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* 49 (1982), Mai, S. 53–62
- [57] FAULQUES, Eric; FRITSCH, Emmanuel; OSTROUMOV, Mikhail: Spectroscopy of natural silica-rich glasses. In: *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences* 96 (2001), Nr. 3, S. 120–128
- [58] AGUIAR, H.; SERRA, J.; GONZÁLEZ, P.; LEÓN, B.: Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* 355 (2009), S. 475–480
- [59] HALASZ, Istvan; AGARWAL, Mukesh; LI, Runbo; MILLER, Neil: Monitoring the structure of water soluble silicates. In: *Catalysis Today* 126 (2007), August, Nr. 1-2, S. 196–202

- [60] GALEENER, F. L.; JR., J. C. M.: Vibrational dynamics in 18O-substituted vitreous SiO₂. In: *Physical Review B* 23 NNo. 10 (1981), S. 5527–5530
- [61] DOWNS, R T.: The RRUFF Project: an integrated study of the chemistry, crystallography, Raman and infrared spectroscopy of minerals. In: *Program and Abstracts of the 19th General Meeting of the International Mineralogical Association in Kobe, Japan. 003-13, 2006*
- [62] JANTSCHKE, Anne; ANNE-KRISTIN-HERMANN; LESNYAK, Vladimir; EYCHMÜLLER, Alexander; BRUNNER, Eike: Decoration of Diatom Biosilica awith Noble Metal and Semiconductor Nanoparticles (< 10 nm): Assembly, Characterization, and Appl. In: *Chemistry An Asian Journal* 7 (2012), S. 85–90
- [63] RÖSCH, Petra; HARZ, Michaela; KRAUSE, Mario; POPP, Jurgen: Fast and reliable identification of microorganisms by means of Raman spectroscopy. In: *Proc. SPIE* Bd. 6633. Munich, Germany : SPIE, Juli 2007, 66331A–9
- [64] MATSCHULAT, Andrea; DRESCHER, Daniela; KNEIPP, Janina: Surface-Enhanced Raman Scattering Hybrid Nanoprobe Multiplexing and Imaging in Biological Systems. In: *ACS Nano* 4 (2010), Mai, Nr. 6, S. 3259–3269
- [65] LE RU, E. C.; BLACKIE, E.; MEYER, M.; ETCHEGOIN, P. G.: Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. In: *J. Phys. Chem. C* 111 (2007), August, Nr. 37, S. 13794–13803
- [66] SHARMA, Bhavya; RENNE R, Frontiera; ISABELLE HENRY anne; RINGE, Emilie; DUYNE, Richard P. V.: SERS: Materials, applications, and the future. In: *Materials Today* 15 (1-2) (2012), S. 16–25
- [67] GRÖGER, Christian; LUTZ, Katharina; BRUNNER, Eike: Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization. In: *Cell Biochem Biophys* 50 (2008), S. 23 – 39

- [68] CHIOVITTI, Anthony; HIGGINS, Michael J.; HARPER, Ruth E.; WETHERBEE, Richard; BACIC, Antony: The Complex Polysaccharides of the Raphid Diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). In: *Journal of Phycology* 39 (2003), Nr. 3, S. 543–554
- [69] CHIOVITTI, Anthony; HARPER, Ruth E.; WILLIS, Anusuya; BACIC, Antony; MULVANEY, Paul; WETHERBEE, Richard: Variations in the substituted 3-linked Mannans Closely Associated with the Silicified Walls of Diatoms. In: *Journal of Phycology* 41 (2005), Nr. 6, S. 1154–1161

9 Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 14.02.2008 bis zum 30.03.2012 an der Professur für Bioanalytische Chemie der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Professor Dr. rer. nat. habil. Eike Brunner angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.