

Isolierung und Charakterisierung von Zellwandkomponenten der gram-positiven Bakterienstämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 und deren Wechselwirkungen mit ausgewählten relevanten Metallen und Metalloiden

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

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

vorgelegt

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

von

Master of Science Matthias Suhr

geboren am 12.07.1983 in Dresden

Eingereicht am 20.02.2015

Die Dissertation wurde in der Zeit von März 2011 bis August 2014
am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf
angefertigt

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Eike Brunner
Prof. Dr. rer. nat. Jörg-Uwe Ackermann

Tag der Verteidigung: 13.07.2015

*Für meine Eltern
in Gedenken an meinen Vater Gerd †*

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.

Justus von Liebig (1803-1873)

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>I</u>
<u>Danksagung</u>	<u>V</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>VII</u>
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>X</u>
<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>XIII</u>
1	Einleitung
1.1	Bakterielles Leben und Metallinteraktionen
1.2	Primäre Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien
1.2.1	Cytoplasmamembran
1.2.2	Peptidoglykan und sekundäre Zellwandpolymere
1.2.3	„Surface layer“-Proteine
1.3	Metallinteraktionen lebenden Mikroorganismen
1.3.1	Biosorption
1.3.2	Bioakkumulation
1.3.3	Biotransformation, Biomineralisation und Biokomplexierung
1.4	Schwermetalle
1.4.1	Bedeutung, Toxizität und Umweltrelevanz
1.4.2	Ausgewählte Metalle und Metalloide – Relevanz und Nutzen
1.5	Einsatzmöglichkeiten von Mikroorganismen und Biomolekülen zur Umweltsanierung und in der Bionanotechnologie
1.5.1	Biosorptive Materialien zur Entfernung von Metallkontamination und Metallrückgewinnung
1.5.2	Biomoleküle als Template in der Bionanotechnologie
2	Motivation und Zielstellung
3	Material und Methoden
3.1	Chemikalien und verwendete Geräte
3.2	Verwendete Mikroorganismen
3.3	Kultivierung von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53
3.3.1	Stammhaltung und Vorkulturen
3.3.2	Geregelte Kultivierungen im Bioreaktor
3.3.3	Ungeregelte Kultivierungen im Schüttelkolben
3.4	Offline Methoden zur Verfolgung des Bakterienwachstums und Proteinexpression
3.4.1	Bestimmung der optischen Dichte
3.4.2	Ermittlung der Biotrockenmasse

3.4.3	Mikroskopische Untersuchungen	19
3.4.4	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen mittels UV-VIS Spektroskopie	19
3.4.5	Bestimmung der Zellzahl mittels Flowcytometrie	20
3.5	Zellernte und Zellbehandlung	21
3.5.1	Zellernte aus geregelter Kultivierung	21
3.5.2	Zellernte aus unregelter Kultivierung	21
3.6	Zellaufschluss und Extraktion der Zellwandkomponenten	22
3.6.1	Kurzaufschluss der Zellen für SDS-PAGE	22
3.6.2	Mechanischer Zellaufschluss und Fragmentseparation	22
3.6.3	Extraktion der Membranlipide	23
3.6.4	Isolierung von Surface-Layer-Proteinen	24
3.6.5	Gewinnung der Peptidoglykanschicht	25
3.6.6	Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikel aus Lipidsuspensionen	25
3.7	Charakterisierung isolierter Zellwandkomponenten	27
3.7.1	SDS-PAGE zur Proteinidentifizierung	27
3.7.1.1	<i>Herstellung der Gele</i>	27
3.7.1.2	<i>Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE</i>	28
3.7.1.3	<i>Kolloidale Coomassie Färbung von SDS-Gelen</i>	29
3.7.2	Proteinbestimmung nach Lowry	29
3.7.3	Dünnschichtchromatografie zur Lipidcharakterisierung	30
3.7.4	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Lipidcharakterisierung	30
3.7.5	Gaschromatografie zur Identifizierung des Lipidfettsäureprofils	31
3.7.5.1	<i>Derivatisierung der Lipide mit Bortrifluorid</i>	31
3.7.5.2	<i>GC-FID Messungen</i>	32
3.8	Untersuchung des Sorptionsverhaltens isolierter Zellwandkomponenten und Bakterien	33
3.8.1	Auswahl der genutzten Metalle und Versuchsbedingungen	33
3.8.2	Durchführung der Sorptionsversuche im Batch-Verfahren	33
3.8.3	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) zur Analyse des Metallgehalts	34
3.9	Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D)	35
3.9.1	Theoretische Grundlagen	35
3.9.2	Modellierungsmethoden	37
3.9.3	Allgemeiner Versuchsaufbau und Gerätespezifikationen	38
3.9.4	Reinigung der QCM-D Kristalle und Messvorbereitungen	39
3.10	Untersuchungen der Adsorption von Biomolekülen auf Oberflächen mittels QCM-D	40
3.10.1	Rekristallisation von S-Layer-Proteinen auf nicht modifizierten SiO ₂ -Oberflächen	40
3.10.2	Rekristallisation von S-Layer-Proteinen auf Polyelektrolytmodifizierten SiO ₂ -Oberflächen	40
3.10.2.1	<i>Layer by Layer Technik zum Aufbau von Polyelektrolytschichten</i>	41
3.10.2.2	<i>S-Layer Rekristallisation auf polyelektrolytmodifizierten SiO₂-Oberflächen</i>	41
3.10.3	Erzeugung von Lipid-Bilayern auf nicht modifizierten SiO ₂ -Oberflächen	41

3.10.4	Abscheidung einer Peptidoglykanschicht	42
3.11	Metall- und Metalloidinteraktion auf rekristallisierten S-Layer-Proteinen	43
3.12	Interaktion von metallischen Nanopartikeln mit S-Layer-Proteinschichten	43
3.12.1	Synthese von Goldnanopartikeln	43
3.12.2	Goldnanopartikelabscheidung auf rekristallisierten S-Layer-Proteinen	44
3.13	Rasterkraftmikroskopie zur Visualisierung von Proteinstrukturen (AFM)	45
3.13.1	Theoretische Grundlagen	45
3.13.2	Präparation von SiO ₂ Wafern	46
3.13.3	Rekristallisation von S-Layer-Proteinen auf Siliziumdioxid Wafern	47
3.13.4	Durchführung der Rasterkraftmikroskopie	47
3.14	Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS)	47
3.14.1	Allgemeiner Versuchsaufbau und Messparameter	48
3.14.2	Datenanalyse und Spektrenanalyse	49
3.15	Photonenkorrelationsspektroskopie zur Bestimmung von Partikelgrößen	49
4	Ergebnisse und Diskussion	50

4.1	Kultivierung von Mikroorganismen	50
4.1.1	Kultivierung von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	50
4.1.2	Kultivierung von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	53
4.2	Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen Zellwandkomponenten	55
4.2.1	Isolierung der S-Layer-Proteine und Charakterisierung mittels SDS-PAGE	55
4.2.2	Isolierung und Charakterisierung der Membranlipide	57
4.2.2.1	<i>Isolierung der Membranlipide</i>	57
4.2.2.2	<i>Lipididentifizierung mittels Dünnschichtchromatografie</i>	60
4.2.2.3	<i>Ermittlung des Fettsäureprofils mittels GC-FID</i>	62
4.2.2.4	<i>Lipididentifizierung mittels ESI-MS</i>	67
4.2.3	Isolierung und Charakterisierung von Peptidoglykan mit sekundären Zellwandpolymeren	73
4.3	QCM-D Beschichtungsversuche von bakteriellen Zellwandkomponenten und AFM-Analytik	74
4.3.1	Einfluss der Polyelektrolytmodifizierung auf die S-Layer Rekristallisation	74
4.3.2	Rekristallisation und Schichtstabilität von S-Layer-Proteinen	77
4.3.2.1	<i>QCM-D Beschichtungsversuche</i>	77
4.3.2.2	<i>AFM-Analytik zur Rekristallisation von S-Layer-Proteinen</i>	80
4.3.3	Ausbildung von Lipiddoppelschichten	83
4.3.3.1	<i>Herstellung von Lipidvesikeln</i>	83
4.3.3.2	<i>Abscheidung von Lipiddoppelschichten</i>	85
4.3.4	Abscheidung von Peptidoglykan	87
4.4	Metallsorptionsuntersuchungen an Biomolekülen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53	90

4.5	Metallsorptionsversuche mit Biomolekülen im Batch-Verfahren	92
4.5.1	Metallsorption an Membranlipiden	93
4.5.2	Metallsorption an Peptidoglykan	98
4.5.3	Metallsorption an S-Layer-Proteinen	100
4.5.4	Metallsorption an intakten Zellen	104
4.6	QCM-D und AFM Untersuchungen zur Metallbindung an rekristallisierten S-Layer-Proteinen	110
4.6.1	QCM-D Versuche zu Metallbindungen an SifB und SIp1	110
4.6.2	AFM-Analytik von SIp1 nach Metallinteraktion auf QCM-D Sensoren	123
4.6.3	QCM-D Versuche zur Abscheidung von Goldnanopartikeln auf rekristallisierten S-Layer Schichten	125
4.6.4	AFM-Analytik von SIp1 nach Metallinteraktion auf QCM-D Sensoren	129
4.7	Spektroskopische Untersuchungen an Biomolekülen	130
4.7.1	TRLFS Messungen von Europium	130
4.7.2	TRLFS Untersuchungen der Wechselwirkung von Zellen und Biomolekülen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 mit Europium	133
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	142
6	Ausblick	147
7	Literaturverzeichnis	149
Anhang		i
A1	Chemikalienverzeichnis	i
A2	Batch-Sorptionsversuche	iv
A3	QCM-D Diagramme der Metallsorptionsversuche an S-Layer-Proteinen	xi
A4	AFM-Bilder	xvii
A5	PCS Messungen	xix
A6	TRLFS-Messungen	xx
A7	Publikationen und Lehrtätigkeiten	xxi

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit konstruktiv beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Meiner Betreuerin Frau Dr. Katrin Pollmann, die es mir ermöglicht hat meine Promotion am Institut für Ressourcenökologie anzufertigen, sowie für die sehr gute und umfassende fachliche Betreuung während der Promotionszeit. Ebenfalls danke ich ihr für die vielen Diskussionen und das entgegengebrachte große Vertrauen.

Bei meinem Betreuer Herrn Dr. Johannes Raff bedanke ich mich Vielmals für die zahl- und hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen beim Anfertigen meiner Dissertation. Für sein Vertrauen in mich und meine Arbeiten und die vielfältige Unterstützung während meiner Zeit am Institut und die Möglichkeit mich in der Arbeitsgruppe zu etablieren.

Meinen beiden betreuenden Professoren, seitens der Technischen Universität Dresden Herrn Prof. Dr. Eike Brunner sowie Herrn Prof. Dr. Jörg-Uwe Ackermann von der Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden danke ich für das große Interesse an dem Promotionsthema und ihre Bereitschaft dieses zu fördern, sowie für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.

Ebenfalls möchte ich den Direktoren des Institutes für Ressourcenökologie Herrn Prof. Dr. Gert Bernhard, Herrn Dr. Vincenz Brendler und Herrn Prof. Dr. Thorsten Stumpf für Ihre Unterstützung danken die sie mir über die Jahre zukommen ließen und dafür, dass sie mir stets für Diskussionen zur Verfügung standen.

Herrn Dr. Oliver Riebe von der Universität Rostock danke ich für die Hilfe bei der Isolierung einzelner Zellwandkomponenten, die enge Zusammenarbeit vor Ort und den intensiven fachlichen Austausch.

Herrn Dr. Hermann Heipieper vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig danke ich für die Unterstützung bei der Lipidanalytik mittels GC-FID und die darauf stattgefundenen Diskussionen.

Mein Dank gilt weiter allen Mitarbeitern der Gruppe Biotechnologie des Helmholtz-Institutes Freiberg für Ressourcentechnologie sowie den Mitarbeitern des Institutes für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, die durch ihre Hilfestellung und Kollegialität zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Es war mir über die Jahre hinweg eine sehr große Freude und Ehre mit ihnen zusammenzuarbeiten und nicht nur beruflich von ihnen vorangebracht worden zu sein. Auch hier möchte ich folgende Personen namentlich aufführen ohne deren Hilfe diese Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre:

Herrn Tobias Günther, danke ich für seinen Beitrag zu den AFM-Studien; Herrn Dr. Robin Steudtner für die Hilfe bei den TRLFS-Untersuchungen, den fachlichen Diskussionen und seine Freundschaft; Frau Aline Ritter für die umfangreiche Unterstützung bei der Bewältigung der ICP-MS Messungen; Frau Peggy Wecke für die Hilfe bei den ESI-MS Messungen; Frau Dr. Sabine Kutschke, Frau Dr. Sabine Matys und Frau Dr. Franziska Lederer für die enge Zusammenarbeit und wissenschaftlichen Gespräche. Weiter danke ich Herrn Falk Lehmann, Frau Monika Dudek, Frau Sarah Fischer, Frau Miriam Bader für ihre Unterstützung und positive Ablenkung im Labor; sowie Frau Jana Gorzitze und Frau Katrin Flemming von administrativer Seite aus. Herrn Stephan Weiß danke ich für die Unterstützung bei den PCS Messungen und deren Ergebnisdiskussion. Bei Frau Dr. Manja Vogel und Herrn Björn Drobot bedanke ich mich für die unzähligen Diskussionen im Büro, den wissenschaftlichen Ideenreichtum sowie ihre Unterstützung und Geduld gerade in der letzten Phase des Zusammenschreibens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt weiter meinen beiden Studentinnen Frau Nancy Unger (geb. Drechsel) und Frau Karen Elda Viacava Romo ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken. Speziell bei meiner Mutter Barbara, du hast mich unterstützt und an mich geglaubt, warst immer für mich da und hast mir in schweren Zeiten zur Seite gestanden. Ebenfalls danke ich meiner Schwester Andrea und meinem Neffen Paul Ole. Ohne euch alle, euren Rückhalt, eure Geduld und liebevolle Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht erfolgreich abschließen können. Ebenso danke ich meinen ENGSTEN Freunden, ihr habt mir nicht nur motivierend zur Seite gestanden, sondern habt mir den nötigen Rückhalt und die Kraft gegeben um das alles zu schaffen.

Abkürzungsverzeichnis

ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

Ac	Actinide
ad	Auffüllen auf
aq.	Aqua
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>englisch: atomic force microscopy</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
AT-cut	Temperaturkompensierter Schnitt eines Quarzkristalls
BE	BugEye (<i>online</i> Biomassemonitor)
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>englisch: Desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dO ₂	Gelöster Sauerstoff (<i>englisch: dissolved oxygen</i>)
ES-	Negativer Ionisationsmodus
ES+	Positiver Ionisationsmodus
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
FAB-MS	Fast atom bombardment Massenspektrometrie
FAME	Fettsäuremethylester (<i>englisch: fatty acid methyl ester</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>englisch: forward scattering</i>)
GC-FID	Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
HSAB	Harten und Weichen Säuren und Basen (<i>englisch: Hard and Soft Acids and Bases</i>)
HZDR	Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>englisch: inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
JG	Johanngeorgenstadt
KWS	Kohlenwasserstoff
Ln	Lanthanide
LUV	Große unilamellare Vesikel (<i>englisch: large unilamellar vesicles</i>)
MeOH	Methanol
mesoA ₂ pm	meso-Diaminopimelinsäure
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht in (g/mol)
MWCO	Größenausschlussgrenze nach Molekulargewicht (<i>englisch: molecular weight cut off</i>)
NB	Nährbouillon (<i>englisch: nutrient broth</i>)
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
n _{H₂O}	Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle
NP	Nanopartikel
ODA	Oxydiacetat
P	Pellet
p. A.	Zur Analyse
PARAFAC	Parallele Faktoranalyse (<i>englisch: parallel factor analysis</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>englisch: phosphate buffered saline</i>)

PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie (<i>englisch: photon correlation spectroscopy</i>)
PE	Polyelektrolyt(e)
PEA	Phosphatidylethanolamin
PEI	Polyethylenimin
PG+	Peptidoglykan mit SCWP(s)
PG-	Peptidoglykan ohne SCWP(s)
PS	Phosphatidylserin
PSS	Polystyrensulfonat
QCM-D	Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (<i>englisch: quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i>)
RCA	Radio Corporation of America
RE	Entfernungseffizienz (<i>englisch. removal efficiency</i>)
RK	Rekristallisation
RNase	Ribonuklease
SCWP(s)	Sekundäre Zellwandpolymere (<i>englisch: secondary cell wall polymers</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
S-Layer	Bakterielle Hüllproteine (<i>englisch: surface layer proteins</i>)
SIfB	Funktionales S-Layer-Protein von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12
Slp1	Funktionales S-Layer-Protein von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53
sp./spp.	Spezies (Singular) / Spezies (Plural)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>englisch: sideward scattering</i>)
SUV	Kleine unilamellare Vesikel (<i>englisch: small unilamellar vesicles</i>)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TRLFS	Zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (<i>englisch: time resolved laser induced fluorescence spectroscopy</i>)
Ü	Überstand
UFZ	Helmholtz Zentrum für Umweltforschung Leipzig
U _{nat}	Natürliches Uran
UV	Ultravioletter Spektralbereich (<i>englisch: ultraviolet</i>)
VE	Vollentsalzt
VIS	Sichtbarer Spektralbereich (<i>englisch: visible</i>)

PHYSIKALISCHE UND MATHEMATISCHE GRÖßEN UND EINHEITEN

A	Absorption (UV-VIS Spektroskopie) / Quarzfläche (QCM-D)
a.u.	Beliebige Einheit (<i>englisch arbitrary unit</i>)
BxHxT	Breite mal Höhe mal Tiefe
C	Spezifische Sauerbrey-Konstante in (ng/(cm ² ·Hz)) (QCM-D)
c	Konzentration
c _e	Endkonzentration
c _s	Startkonzentration
Da	Dalton
d _{Layer}	Schichtdicke in (nm)
E _{gespeichert}	Gespeicherte Energie
E _{Verlust}	Verlustenergie
f ₀	Resonanzfrequenz in (Hz)
g	Schwerebeschleunigung/ Erdbeschleunigung

h	Stunde(n)
I	Intensität(en)
kDa	Kilo Dalton
m	Masse
M	Molmasse
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
n	Oberton (QCM-D)
OD	Optische Dichte/ Extinktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
q	Metallsorptionsrate
q_{\max}	Maximale Metallsorptionsrate
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>englisch: revolutions per minute</i>)
s	Standardabweichung
t	Zeit
T	Temperatur in (°C)
$t_{\text{krit.}}$	Kritischer t-Test
$U_{\text{el.}}$	Elektrische Spannung
v/v	Volumen pro Volumen (<i>englisch: volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>englisch: weight per volume</i>)
y	Ausbeute in (%) (<i>englisch: yield</i>)
α	Wahrscheinlichkeit
ΔD	Dissipationsänderung
ΔD_{norm}	Normierte Dissipationsänderung
Δf	Frequenzänderung in (Hz)
Δf_n	Frequenzänderung eines spezifischen Obertons (n) in (Hz)
Δf_{norm}	Normierte Frequenzänderung aus den Frequenzobertönen in (Hz)
Δm	Massenänderung in (ng/cm ²)
$\Delta m_{\text{auf Sensor}}$	Absolute Masse (QCM-D) auf Sensor in (ng)
Δm_{max}	Maximale Masseänderung/ Adsorbierte Masse in (ng/cm ²)
η	Viskosität in (kg/(m·s))
λ	Wellenlänge in (nm)
μ_{Layer}	Schermodul in (Pa)
μ_q	Effektives Schermodul des Quarzkristalls in (N/m ²)
ρ	Dichte in (g/cm ³)
ρ_q	Quarzdichte in (kg/m ³)
σ	Standardfehler
τ	Lumineszenzlebensdauer in (μs)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Zellquerschnittes eines gram-positiven Bakteriums mit den primären Zellwandbestandteilen, adaptiert nach Drobot, B. (2013) ²⁵	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipidstruktur und Einteilung der hydrophilen und hydrophoben Gruppen	3
Abbildung 3: Darstellung eines Ausschnittes der Cytoplasmamembran mit integralen und peripheren Proteinen, adaptiert nach Drobot, B. (2014) ³¹	4
Abbildung 4: Strukturausschnitt des Makromoleküls Peptidoglykan adaptiert nach Vollmer, W. et al. (2008) ³²	4
Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Gittersymmetrien von S-Layer-Proteinen: <i>p1</i> , <i>p2</i> (schräg), <i>p4</i> (quadratisch) und <i>p3</i> , <i>p6</i> (hexagonal) nach Sleytr, U. B. et al. (2011) ³⁹	6
Abbildung 6: Schematischer Überblick der Metallwechselwirkungen am Beispiel eines gram-positiven Bakteriums, adaptiert nach Drobot, B. (2013) ²⁵	7
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Isolierung der Zellwandkomponenten	22
Abbildung 8: Schematische Einordnung der häufigsten genutzten und vorkommenden Lipid-vesikel nach Aufbau und sphärischen Durchmesser, adaptiert nach Jesorka, A. et al. (2008) ¹⁴⁷	26
Abbildung 9: Zonenözentrifugation der Vesikel und Separation aus den einzelnen Zonen.	26
Abbildung 10: a) Darstellung der AT-geschnittenen Quarzkristalle relativ zur z-Achse, b) Auslenkung des Schwingquarzes durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung.	36
Abbildung 11: Schematischer Aufbau der QCM-D Versuche im Durchflussmodus (links); Querschnitt des Durchflussmoduls QFM 401 (rechts), adaptiert nach Q-Sense (2006) ¹⁷¹	38
Abbildung 12: Vereinfachte grafische Darstellung des Messaufbaus der verwendeten SiO ₂ beschichteten Quarzkristalle (QX 303).....	39
Abbildung 13: Ausbildung einer Lipiddoppelschicht aus SUV.....	42
Abbildung 14: Darstellung des Aufbaus der citratstabilisierten Goldnanopartikel, adaptiert nach Hayat, M. A. et al.(1989) ¹⁸⁰	43
Abbildung 15: Vereinfachter schematischer Aufbau des Rasterkraftmikroskops.	46
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Messaufbaus des verwendeten TRLFS-Systems.	48
Abbildung 17: Darstellung der <i>online</i> (a) und <i>offline</i> (b) Kultivierungsparameter von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12.	50
Abbildung 18: (a) Mikroskopische Aufnahme in 400 facher Vergrößerung zum Zeitpunkt der Zellernte und SDS-Proteinprofil der Kultivierungsproben von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12.	52
Abbildung 19: Darstellung der <i>online</i> (a) und <i>offline</i> (b) Kultivierungsparameter von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 ¹²⁸	53
Abbildung 20: (a) Mikroskopische Aufnahme in 400 facher Vergrößerung zum Zeitpunkt der Zellernte und SDS-Proteinprofil der Kultivierungsproben von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	54
Abbildung 21: SDS-Proteinprofile der einzelnen Fraktionen während der Isolierung der S-Layer-Proteine (SlfB) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12.....	55
Abbildung 22: SDS-Proteinprofile der einzelnen Fraktionen während der Isolierung der S-Layer-Proteine (Slp1) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	56

Abbildung 23: SDS-Proteinprofil der mechanisch-biochemischen Lipidaufreinigung von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 (a); (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 mit 0,1 g/l gealterter Proteinase K sowie (c) unter Verwendung von 0,15 g/l aktiver Proteinase K.	58
Abbildung 24: (a) DC-Originalbild der Lipidauftrennung von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 – Lipide der mechanisch-biochemischen Lipidextraktion vor der Zugabe von Proteinase K (Bahn 1), Lecithin-Standard (Bahn 2), Lipide der mechanisch-biochemischen Lipidextraktion nach der Zugabe von Proteinase K (Bahn 3), Lipide der kombinierten Extraktionsmethode (Bahn 4); (b) rekonstruiertes DC-Bild von Abbildung (a) mit R_f -Werten; (c) getestete Referenzsubstanzen mit R_f -Werten aus Voruntersuchungen zur Identifikation der Kopfgruppen, PEA-Standard (Bahn 1), Lecithin-Standard (Bahn 2), PC-Standard (Bahn 3), Mix-Standard aus Lecithin, PC, PS und PEA (Bahn 4), PS-Standard (Bahn 5).	61
Abbildung 25: GC-FID Chromatogramme der FAMEs von: (a) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 (Nicht gekennzeichnete Peaks sind FAME-Standardlösungen zuzuordnen).	62
Abbildung 26: Fettsäurezusammensetzung von (a) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) JG-B53.	65
Abbildung 27: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse von 1,2-Distearyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin in im (a) ES+ und (b) ES- Modus.	69
Abbildung 28: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse der Lipide von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 im (a) ES+ und (b) ES- Modus.	69
Abbildung 29: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse der Lipide von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 in im (a) ES+ und (b) ES- Modus.	70
Abbildung 30: SDS-Profil zur Aufreinigung von proteinfreien PG+ von (a) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	73
Abbildung 31: Vergleich des Rekristallisationsverhaltens von S-Layer-Proteinen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 auf PE-modifizierten und nicht PE-modifizierten SiO ₂ -Sensoren innerhalb von 15 Stunden im Frequenz-/Dissipationsplot (a) und im Massenprofil (b).	74
Abbildung 32: Rekristallisation von SlfB von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 auf polyelektrolytmodifizierten SiO ₂ -Sensoren im (a) Frequenz/Dissipations-Plot und (b) im Schichtdickenprofil modelliert nach dem Kelvin-Voigt und Sauerbrey-Modell.	77
Abbildung 33: Rekristallisation von S-Layer-Proteinen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 auf polyelektrolytmodifizierten SiO ₂ -Sensoren im Frequenz/Dissipations-Plot (a) und im Schichtdickenprofil modelliert nach dem Kelvin-Voigt und Sauerbrey-Modell.	78
Abbildung 34: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisierten SlfB von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 auf SiO ₂ Wafer (a) 1x1 µm Übersichtsscan und (b) Ausschnitt aus 1 x 1 µm Scan.	80
Abbildung 35: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisierten Slp1 von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 auf SiO ₂ QCM-D-Kristallen (a) 2 x 2 µm Übersichtsscan und (b) Ausschnitt aus 1 x 1 µm Detailscan.	81
Abbildung 36: AFM Amplitudenbilder von vitalen Zellen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 (a) 20 x 20 µm Übersichtsscan und (b) 250 x 250 nm Detailscan des Slp1 Gitters auf der Zelloberfläche ¹⁹⁰	82
Abbildung 37: Intensitätsgewichtete(a) und anzahlgewichtete (b) Größenverteilung der hergestellten Lipidvesikel aus Zone 3 berechnet nach CONTIN.	84
Abbildung 38: Ausbildung einer Lipiddoppelschicht aus SUVs der Modellschicht Lecithin im Frequenz-/ Dissipations Plot und Schichtdickenprofil unter Nutzung des offenen Moduls des (a-b) und des Durchflussmoduls (c-d).	85
Abbildung 39: Abscheidung von PG+ von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 auf SiO ₂ - und polyelektrolytmodifizierten SiO ₂ QCM-D Sensoren.	87

Abbildung 40: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von Membranlipiden von (a) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	93
Abbildung 41: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von Peptidoglykan von (a) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	98
Abbildung 42: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von S-Layer-Proteinen von (a) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 (SlfB) und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 (Slp1).	100
Abbildung 43: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von intakten Zellen von (a) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	104
Abbildung 44: Exemplarische Darstellung der mikroskopischen 24 h Probe von (a) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 nach Inkubation mit 1 mM Eu und (b) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 nach Inkubation mit 1 mM Cd in 400 facher Vergrößerung.	106
Abbildung 45: Darstellungen der maximalen Metallsorptionsraten (q_{\max}) von Uran nach der Inkubation mit intakten Zellen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 bei verschiedenen Temperaturen.	108
Abbildung 46: QCM-D Diagramme der Interaktion von 1 mM Pd ²⁺ mit Slp1 Schicht (pH=6,0); (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massenprofil der adsorbierten Massen auf der Slp1 Schicht innerhalb der Versuchszeit von 21 h.	110
Abbildung 47: QCM-D Diagramme der Interaktion von 5 mM Pd ²⁺ mit Slp1 Schicht (pH=6,0); (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massenprofil der adsorbierten Massen auf der Slp1 Schicht innerhalb der Versuchszeit von 21 h.	112
Abbildung 48: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisierten S-Layer-Proteingittern auf QCM-D SiO ₂ Sensoren nach Inkubation von 5 mM Goldmetallsalzlösung- (a) SlfB von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12, (b) Slp1 von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53.	123
Abbildung 49: Intensitätsgewichtete (a) und anzahlgewichtete (b) Größenverteilung der synthetisierten und citratstabilisierten Goldnanopartikel (Ø 10-18 nm).	126
Abbildung 50: QCM-D Diagramme der Abscheidung von Goldnanopartikeln auf einer Slp1 Schicht; (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massen- und Schichtdickenprofil der adsorbierten Nanopartikel auf der Slp1 Schicht.	127
Abbildung 51: AFM-Amplitudenbild von abgeschiedenen Gold Nanopartikeln auf rekristallisierten Slp1 auf SiO ₂ QCM-D Sensoren (links) und 3D Profil (rechts).	129
Abbildung 52: Speziesverteilung der gelösten Europium(III)-Spezies im Referenzsystem ($c_{Eu}=1$ mM, 0,15 M NaCl, pH=4-10, T=25 °C) ohne Biomoleküle.	131
Abbildung 53: (a) TRLFS Spektrum und (b) Einzellumineszenzspektrum von 1 mM freiem Eu ³⁺ in 0,15 M NaCl-Lösung bei pH=6,0.	131
Abbildung 54: Einzellumineszenzspektren der Biomoleküle nach der Inkubation mit 1 mM Europium (pH=6,0; 0,15 NaCl; T=25°C); (a-d) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 – (a) intakte Zellen, (b) Lipide, (c) PG+, (d) SlfB und (e-h) von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 – (e) intakte Zellen, (f) Lipide, (g) PG+ und (h) Slp1 im Vergleich zur Referenzmessung mit Eu ³⁺	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele (Angabe für 2 Gele).....	27
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Probenpuffers.....	28
Tabelle 3:	Zusammensetzung des 10 fach konzentrierten Laufpuffers.....	28
Tabelle 4:	Zusammensetzung der Fixierungslösung.....	29
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.....	29
Tabelle 6:	Parameter zur GC-FID Messung.....	32
Tabelle 7:	Eingesetzte Konzentrationen an Biomolekülen und Metallsalzen für die Sorptionsversuche.....	33
Tabelle 8:	Zeitpunkte der Probenahmen während der Sorptionsversuche.....	34
Tabelle 9:	Parameterrauflistung zur Modellierung nach dem Kelvin-Voigt-Modell.....	38
Tabelle 10:	Verwendete Stocklösungen zur Synthese citratstabilisierter Goldnanopartikel.....	44
Tabelle 11:	Zusammensetzung der RCA-Reinigungslösungen 1 und 2.....	46
Tabelle 12:	Fettsäureprofil der isolierten Lipide von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53.....	63
Tabelle 13:	Fettsäuren der Membranlipide der Mikroorganismen <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53.....	64
Tabelle 14:	Positiv geladene Ionisationsprodukte der isolierten Lipide von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 und der Referenzsubstanzen.....	71
Tabelle 15:	Negativ geladene Ionisationsprodukte der isolierten Lipide von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 und der Referenzsubstanzen.....	71
Tabelle 16:	Adsorbierte maximale S-Layer Massen (Δm_{\max}) und Schichtdicken (d_{Layer}) auf PE-modifizierten SiO_2 Sensoren.....	79
Tabelle 17:	Zusammenfassung der hauptsächlich vorhandenen funktionellen Gruppen in Zellwandkomponenten und Zellen von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53.....	91
Tabelle 18:	Darstellung der maximalen Sorptionswerte (q_{\max}) und der Sorptionseffizienz (RE) der untersuchten Biomoleküle von <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 bei Inkubation bei 4 °C.....	96
Tabelle 19:	Vergleichswerte zur Metallbindung ausgewählter Biosorbenten aus der Literatur.....	97
Tabelle 20:	Darstellung der maximalen Massenabscheidungen (Δm_{\max}) und der absoluten Masse ($\Delta m_{\text{auf Sensor}}$) auf Schichten von SIFB und SIp1 nach der Metallinteraktion berechnet nach dem Sauerbrey und Kelvin Voigt Modell.....	114
Tabelle 21:	Darstellung der maximalen Massenabscheidungen (Δm_{\max}), der absoluten Masse ($\Delta m_{\text{auf Sensor}}$) auf Schichten von SIFB und SIp1, sowie der gemittelten Schichtdicken (d_{Layer}) nach der Goldnanopartikelabscheidung berechnet nach dem Sauerbrey und Kelvin Voigt Modell.....	128
Tabelle 22:	Zuordnung der Peakpositionen zu den korrespondierenden Energieübergängen von freien Eu^{3+} und Vergleich zu Literaturwerten.....	132
Tabelle 23:	Lumineszenzlebenszeiten (τ) und Anzahl der umgebenden Wassermoleküle ($n_{\text{H}_2\text{O}}$) von Eu^{3+} in verschiedenen wässrigen Systemen.....	132
Tabelle 24:	Zusammenfassung der experimentell ermittelten Lumineszenzlebenszeiten (τ_1 , τ_2), Hauptemissionsbanden (${}^7\text{F}_1$, ${}^7\text{F}_2$, ${}^7\text{F}_4$), Intensitätsverhältnisse, dem Bestimmtheitsmaß (R^2) und Anzahl der Wassermoleküle ($n_{\text{H}_2\text{O}}$)* für die Europiuminteraktion ($c_{\text{Eu}}=1 \text{ mM}$; $\text{pH}=6,0$; $T=25 \text{ °C}$) an Biomolekülen der Mikroorganismen <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 und JG-B53 in 0,15 M NaCl-Lösung.....	135
Tabelle 25:	Zusammenfassung und Vergleich von Lumineszenzlebenszeit (τ), der koordinierenden Wassermoleküle ($n_{\text{H}_2\text{O}}$) der Ergebnisse dieser Arbeit mit ausgewählten Literaturwerten.....	138

1 Einleitung

1.1 Bakterielltes Leben und Metallinteraktionen

Das Verständnis von Mikroorganismen hat sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund von molekularbiologischen und phylogenetischen Studien stark verbessert¹. Durch die genetischen Arbeiten erfolgt die Einteilung von Organismen auf Basis der DNA in drei Reiche. Diese bilden zusammen den Baum des Lebens (tree of life)¹⁻³. Bakterien repräsentieren dabei neben Archaeen und Eukaryonten eines der drei Reiche. Dabei ist die mikrobielle Diversität der unterschiedlichen Arten von Bakterien sehr vielfältig und unterliegt weiteren Einteilungen und Klassifizierungen. Neben der Unterteilung der Mikroorganismen auf molekularer Ebene gibt es weitere Unterscheidungsmerkmale der Bakterien. Diese können beispielsweise morphologische Unterschiede der äußeren Form (Kokken, Stäbchen, Spirillen und weitere Formen) oder unterschiedliche Zellwände (gram-positiv oder gram-negativ) sein. Ebenfalls kann eine Unterscheidung von Bakterien nach den Stoffwechsel- und Energie-/Substratverwertungswegen erfolgen. Diese sich daraus ergebende Diversität und die Möglichkeit Bakterien, deren Stoffwechselprodukte und Komponenten nutzen zu können, machen diese für verschiedene biotechnologische Anwendungen in der Pharma-, Nahrungsmittel oder chemischen Industrie zum Beispiel für die Synthese von Biopolymeren, chemischen Grundstoffen oder Enzymen interessant^{4,5}. Neben der Nutzung in der Biotechnologie sind Bakterien ebenfalls für den Menschen wichtig. In der Darmflora z. B. sind sie verantwortlich für die Stärkung des Immunsystems⁶. Für das Überleben der Bakterien als auch entsprechende technische Anwendungen wie z. B. biobasierte Filtermaterialien ist der Grad der Anpassung der Bakterien an die entsprechenden Lebensräume und Umwelteinflüsse (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffversorgung und toxische Substanzen wie z. B. Schwermetalle) unter Nutzung verschiedener Schutzmechanismen (Biosorption, Bioakkumulation u. a.) von großer Bedeutung⁷. So kann die Fähigkeit von verschiedenen Bakterien und deren Komponenten aus ähnlichen Lebensräumen sich z. B. stark in der Toleranz oder Bindung von Metallen unterscheiden^{8,9}. Dies wird in Teilen dieser Arbeit untersucht werden. Durch stetig wachsende Umwelteinflüsse durch die Industrialisierung wie z. B. Bergbau, Ressourcengewinnung und Industrieabwässern kommt es verstärkt zu Boden- und Wasserkontaminationen durch Schwermetalle oder weitere toxische Substanzen^{7,10,11}. Diesen sind Mikroorganismen direkt ausgesetzt. Durch die Untersuchung von z. B. schwermetalltoleranten Mikroorganismen aus solchen Umgebungen, ist die Entwicklung von z. B. biosorptiven Materialien bestehend aus intakten Zellen, toter Biomasse oder Zellkompartimenten von großem Interesse u. a. für die Sanierung von kontaminierten Umwelthabitaten¹²⁻¹⁴.

EXTREME HABITATE - BAKTERIELLE ISOLATE DER URANABRAUMHALDE HABERLAND

Der jahrelange Uranerzbergbau in der westlichen Erzgebirgsregion ist ein sehr gutes Beispiel für den Einfluss des Menschen auf die Umwelt und wird daher exemplarisch betrachtet. Die Ablagerung des gering uranhaltigen Abfalls nach der Urangewinnung auf der Haberlandhalde (nahe Johanngeorgenstadt, Sachsen) hat zu einer weitreichenden Veränderung der Landschaft geführt. Infolge des Abbaus und der Lagerung kam es zu einer erhöhten Metallbelastung des Bodens und

Sickerwassers an diesem Standort und den Lagerstätten¹⁵. Dabei konnten neben dem chemo- und radiotoxischen Uran weitere Schwermetalle wie Pb, Cd, Cu, Fe, As, Ni und Zn in erhöhten Konzentrationen detektiert werden¹⁶. Wie in vielen weiteren extremen Habitaten, z. B. heiße Quellen, salinen oder sauren Böden und Wässern konnten auch in der Haberlandhalde gut an die Umweltbedingungen angepasste und schwermetalltolerante Mikroorganismen in den Bodenproben in einer hohen Diversität festgestellt und anschließend isoliert und klassifiziert werden¹⁶⁻²⁰. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate mit den Bezeichnungen JG-A12 und JG-B53 konnten in vorangegangenen Untersuchungen bereits als *Lysinibacillus sphaericus* (alte Bezeichnung *Bacillus sphaericus*) klassifiziert werden. *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 sind natürlich vorkommende gram-positive Bodenbakterien^{16, 21-23}. Diese stäbchenförmigen und mesophilen Bakterien können unter Stressbedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur und Nährstoffmangel) sehr resistente Endosporen bilden um ihr eigenes Überleben zu gewährleisten. Beide Isolate sind aerob kultivierbar. Die Abkürzung JG bezieht sich dabei auf den Haldenstandort bei Johanngeorgenstadt und die Buchstaben auf die jeweilige Probennahmestelle/-tiefe (A - 4-5 m Tiefe; pH=7,0; 30 °C und B - 1-2 m Tiefe; pH=4,6; 30 °C). Die isolierten Stämme wurden bereits in verschiedensten Untersuchungen hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit Uran, aber auch mit weiteren Schwermetallen wie Cu, Ni, Al und As untersucht, wobei der Fokus dieser Untersuchungen meist auf dem Stamm JG-A12 und dessen S-Layer-Proteinen lag^{15, 16, 22, 24}.

1.2 Primäre Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien

Die Bestandteile der gram-positiven Zellwand, welche im Folgenden vorgestellt werden, stellen wichtige Komponenten dar, die für eine Interaktion mit der Umwelt z. B. mit Metallen direkt zur Verfügung stehen. In Abbildung 1 ist schematisch der Aufbau einer gram-positiven Zellwand dargestellt.

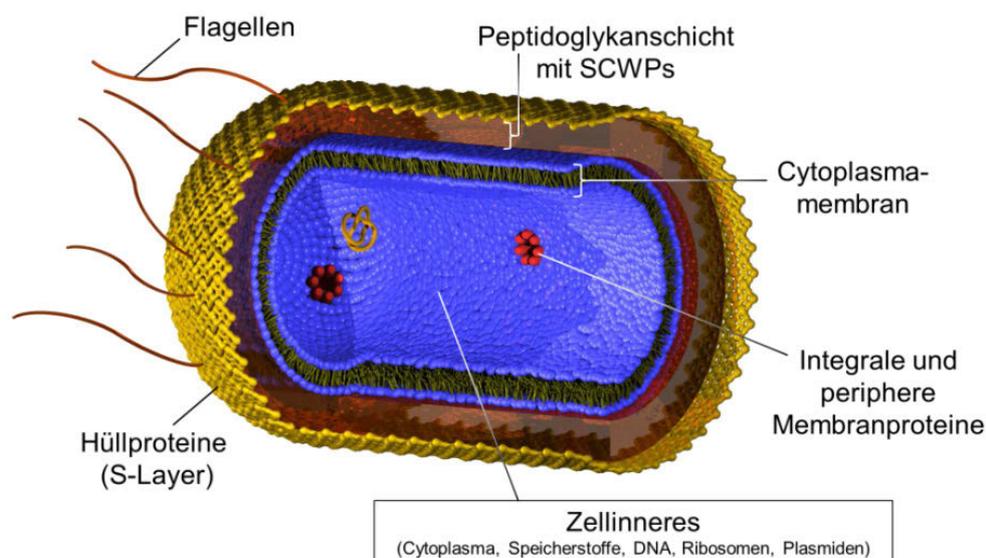


Abbildung 1: Darstellung eines Zellquerschnittes eines gram-positiven Bakteriums mit den primären Zellwandbestandteilen, adaptiert nach Drobot, B. (2013)²⁵.

Die Zellwand stellt ein komplexes System aus mehrschichtigen Strukturen dar, welches sich evolutionär bedingt zum Schutz der Zelle vor äußeren Umwelteinflüssen entwickelt und adaptiert hat. Dabei stellen gram-positive, mit ihrer fehlenden äußeren Membran und der dicken mit sekundären Zellwandpolymeren (SCWPs) durchzogenen Peptidoglykanschicht die zweite Hauptgruppe neben den gram-negativen Bakterien dar ²⁶. Neben den schutz- und formgebenden Eigenschaften der Zellwand ist sie für eine Reihe weitere Vorgänge wie der Transport von Nährstoffen in die Zelle, die Ausschleusung zellulärer Abbauprodukte aus dem Zellinneren, der Verankerung von Flagellen zur bakteriellen Fortbewegung, sowie an der Zellteilung und dem Zellwachstum beteiligt ²⁷. Zusätzlich schützt sie den Protoplasten vor osmotischen Druckunterschieden ²⁸. Aufgrund des komplexen Zellwandaufbaus und der vielen funktionellen Gruppen der einzelnen Komponenten ist die Charakterisierung dieser Komponenten für das Verständnis der Metallwechselwirkungen von großer Bedeutung.

1.2.1 Cytoplasmamembran

Die Cytoplasmamembran ist eine semipermeable Schicht aus Glycerophospholipiden, welche als Grenzschicht zwischen den Komponenten des Zellinneren und den äußeren Zellwandschichten fungiert. Diese Cytoplasmamembran gram-positiver Bakterien besteht aus zwei Domänen, einem hydrophoben Teil aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (Fettsäureschwänze) und einem hydrophilen Teil (phosphathaltige Kopfgruppe). Diese phosphathaltige Kopfgruppe kann strukturell verschieden sein. Zu den häufigsten Vertretern zählen Cholin, Serin, Ethanolamin und Sphingomyelin, welche an die Phosphatgruppe gebunden sind ²⁹. Diese beiden Teile (Kopfgruppen und Schwanzgruppen) sind über Esterbindung mit einem Glycerolmolekül verknüpft. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau der Lipide.

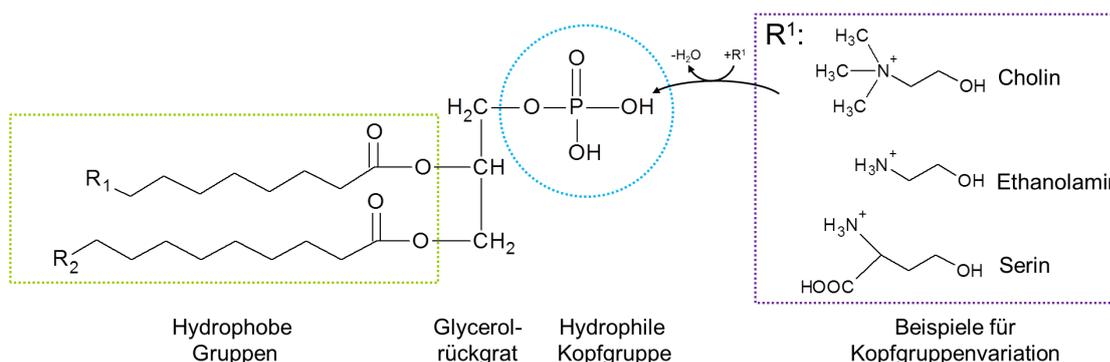


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipidstruktur und Einteilung der hydrophilen und hydrophoben Gruppen.

Die amphiphilen Lipide ordnen sich spontan selbst zu sogenannten Vesikeln oder Liposomen unterschiedlicher Größen an, wobei die Kopfgruppen nach außen gerichtet sind und den hydrophoben inneren Teil der Fettsäurereste im wässrigen System abschirmen ²⁷. Innerhalb der Zelle sind die Lipide paarweise angeordnet und liegen sich mit ihren hydrophoben Resten gegenüber, sodass es zu einer Ausbildung der doppelagigen Schicht, der sogenannten Lipid-Doppelschicht (Lipid-Bilayer) kommt. Die Lipide können bezogen auf die Trockenmasse ca. 20-30 % der bakteriellen Zellwand

ausmachen. Strukturell sind die in organischen Lösungsmitteln solubilisierbaren Membranlipide sehr divers, da in Abhängigkeit des Wachstums der Bakterien und der physiologischen Bedingungen unterschiedliche Fettsäuren gebildet werden können. Somit kommt es zu einer Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Membranlipide^{29,30}. Die Schichtdicke einer Lipiddoppelmembran kann daher je nach Art des gram-positiven Bakteriums und der o.g. abhängigen Parameter in einem Bereich von 5 bis zu 8 nm liegen. Zusätzlich kann die Schichtdicke durch integrale und periphere Proteine, welche die Schicht unterbrechen können beeinflusst werden. In Abbildung 3 ist schematisch ein Ausschnitt einer Cytoplasmamembran dargestellt.

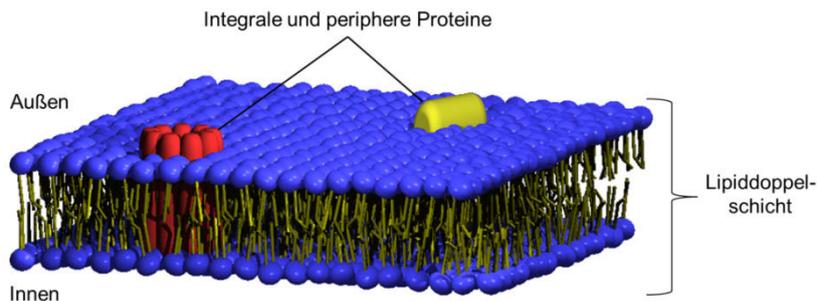


Abbildung 3: Darstellung eines Ausschnittes der Cytoplasmamembran mit integralen und peripheren Proteinen, adaptiert nach Drobot, B. (2014)³¹.

1.2.2 Peptidoglykan und sekundäre Zellwandpolymere

Die der Lipiddoppelschicht aufgelagerte nächste Schicht ist das Peptidoglykan. Dieses Mehrschichtsystem ist bei gram-positiven Organismen zwischen 20-80 nm dick und kann die Form der Bakterien bestimmen^{27,28}. Einzelschichten von Peptidoglykan weisen dabei eine Dicke von ca. <15-30 nm auf³². In Abbildung 4 ist ein Ausschnitt aus der Struktur des Peptidoglykan dargestellt.

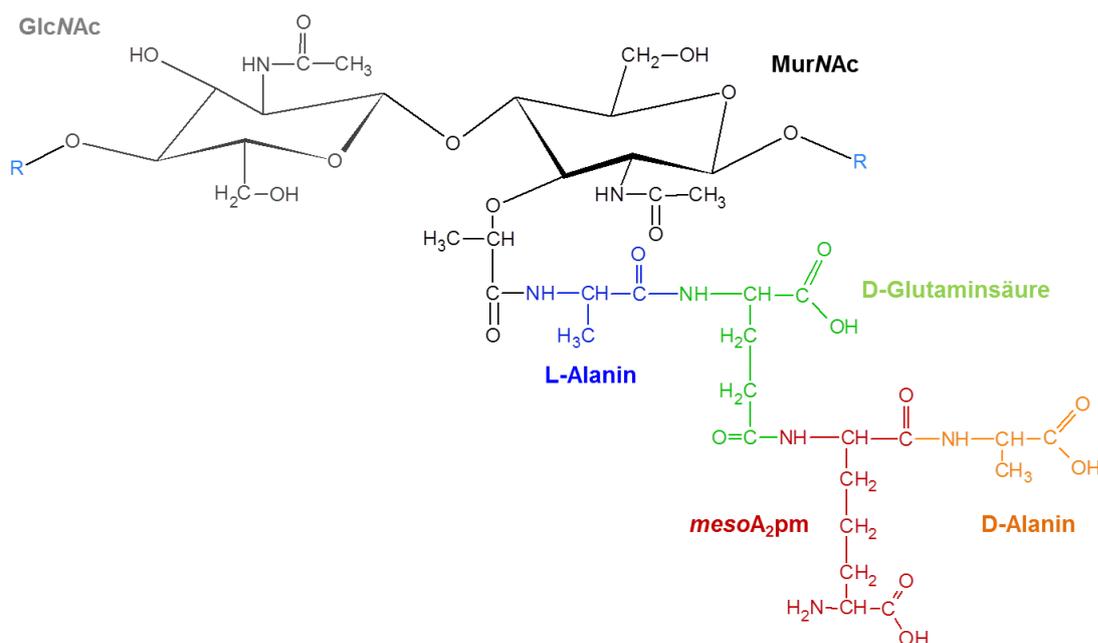


Abbildung 4: Strukturausschnitt des Makromoleküls Peptidoglykan adaptiert nach Vollmer, W. et al. (2008)³².

Aufgrund der Schichtdicke ist das Peptidoglykan hauptsächlich dafür verantwortlich, dass der gebildete Farbkomplex (Kristallviolett und Lugolsche Lösung) der Gram-Färbemethode mit Alkoholen nicht herausgewaschen werden kann. Somit kann eine Unterscheidung von gram-positiven und -negativen Organismen erfolgen³³. Das Makromolekül Peptidoglykan besteht aus sich ständig wiederholenden Peptid- und Zuckereinheiten. Dabei bestehen die Zuckereinheiten aus den alternierenden Monomereinheiten *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), welche zusätzlich über Peptideinheiten miteinander quervernetzt sind. Dies sorgt für eine erhöhte Stabilität des Peptidoglykangrundgerüsts³². Die Art der vorhandenen Peptideinheiten (bis zu 5 Aminosäuren (AS)) sind jedoch von Spezies zu Spezies unterschiedlich und müssen für jeden Stamm gesondert bestimmt werden³⁴. In verschiedenen Arbeiten konnten jedoch sehr oft die folgenden Polypeptidbrücken detektiert werden: L-Alanin→D-Glutaminsäure→L-Lysin→D-Alanin oder L-Alanin→D-Glutaminsäure→ *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*A₂pm)→D-Alanin^{26, 32, 34}. Bei Bakterien wie *Lysinibacillus sphaericus* erfolgte die neue Klassifizierung bezugnehmend auf den Lysin-Aspartat-Typ im Peptidoglykan der Zellwand²¹. Bezogen auf die Gesamtmasse der Zellwand nimmt Peptidoglykan mit ca. 60 % der Trockensubstanz den größten Anteil der Zellwandkomponenten ein²⁶. Das in Abbildung 4 dargestellte Grundgerüst des Peptidoglykans wird außerdem von weiteren langkettigen anionischen Substanzen, den sogenannten sekundären Zellwandpolymeren (SCWPs) durchzogen. Diese können über die Peptidoglykanschicht bis auf die Zelloberfläche hinausreichen³⁵. Zu diesen SCWPs zählen Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren und Teichuronsäuren, welche eingebettet oder verknüpft mit dem Peptidoglykangerüst vorliegen. Die polymeren Teichonsäuren bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von Glycerol- und Zuckerphosphaten (Ribitolphosphate), welche kovalent mit dem Peptidoglykan gebunden sind (wandassoziiert)^{35, 36}. Die Lipoteichonsäuren sind direkt mit den Membranlipiden verbunden. Teichuronsäuren als Sonderform der Teichonsäuren entstehen bei Phosphatmangel³⁷. Analog der hohen Diversität des Peptidoglykans, welches von Bakterium zu Bakterium unterschiedlich in Bezug auf die eingebauten Zuckerstrukturen und Kettenlängen sein kann, variieren auch die sekundären Zellwandpolymere in ihrer Zusammensetzung deutlich³⁶.

1.2.3 „Surface layer“-Proteine

Als äußerste Schicht einer gram-positiven Zellwand können sogenannte Hüllproteinschichten (*engl. Surface layer*, kurz S-Layer) dem Peptidoglykan aufgelagert sein. Diese hochgeordneten zweidimensionalen und parakristallinen Proteinpolymere machen ca. 15 % der Gesamtproteinmasse der Zelle aus. Sie stellen als abgrenzende Zellschicht die erste Barriere dar, welche die Zelle vor Umwelteinflüssen schützt³⁸. Erstmals wurden die S-Layer, welche die ältesten und auch einfachsten Membranen in vielen Bakterien und Archaeen darstellen durch Houwink, A. L. et al. (1953) auf der Oberfläche von Mikroorganismen nachgewiesen^{39 40}. Die S-Layer gram-positiver Bakterien und auch Archaeen sind direkt auf der Oberseite der polymeren Struktur des Peptidoglykans angelagert bzw. kovalent mit den sekundären Zellwandpolymeren gebunden und weisen Molekulargewichte zwischen 40 und 200 kDa auf^{39 41, 42}. Die zweidimensionalen Proteine können auf der Oberfläche der Bakterien in unterschiedlicher Struktur der Untereinheiten vorkommen. Dabei reichen die Gittersymmetrien der Untereinheiten von schräg (*p1*, *p2*), quadratisch (*p4*) bis hexagonal (*p3*, *p6*) (Abbildung 5) mit einem Zentrum zu

Zentrum Abstand von 3,5-35 nm^{39, 43, 44}. Die Schichtdicken der S-Layer-Proteine auf Bakterienoberflächen erreichen dabei Stärken von ca. 5-20 nm und bis zu 70 nm bei Archaeen^{45, 46}.

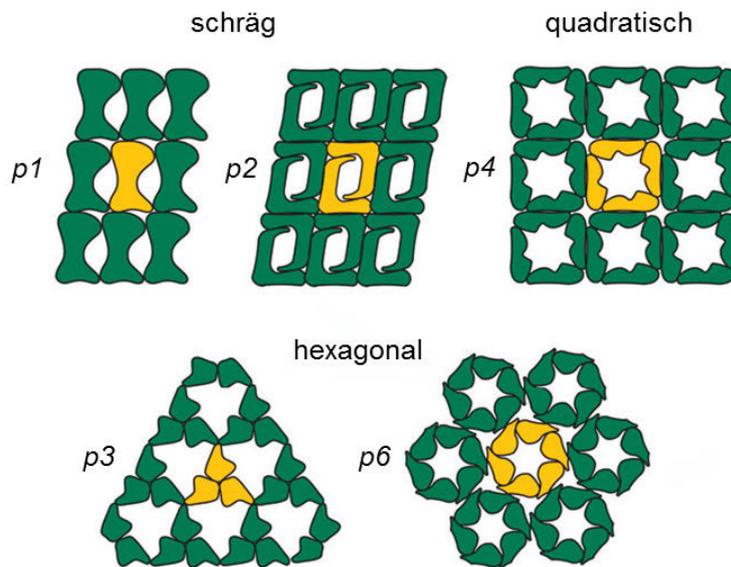


Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Gittersymmetrien von S-Layer-Proteinen: *p1*, *p2* (schräg), *p4* (quadratisch) und *p3*, *p6* (hexagonal) nach Sleytr, U. B. et al. (2011)³⁹.

Als interessanteste Eigenschaft weisen S-Layer-Proteine die Fähigkeit der Selbstassemblierung auf^{41, 47}. Diese Eigenschaft kann sowohl auf der lebenden Zelle als auch nach der Isolierung der Proteine und der nachfolgenden Rekristallisation auf verschiedensten Oberflächen beobachtet werden. Dabei werden die gleichen Gittersymmetrien, welche unter natürlichen Bedingungen auch auf der Zelloberfläche vorhanden sind wieder ausgebildet. Des Weiteren sind S-Layer-Proteine in der Lage, selektiv hohe Mengen an Metallen zu binden. Durch eine Vielzahl an zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen wie Carboxyl- (COOH), Hydroxid- (OH), Amino- (NH₂), sowie Zucker- und Phosphatgruppen, welche in einer hohen Dichte und Regelmäßigkeit angeordnet sind, erfolgt die Interaktion mit der Umgebung wie z. B. mit Metallen. Diese funktionellen Gruppen variieren je nach der entsprechenden Aminosäuresequenz und posttranslationalen Modifikationen der S-Layer und ermöglichen gezielte chemische Modifikationen^{41, 48, 49}. Die aufgeführten Eigenschaften machen S-Layer-Proteine sehr interessant für verschieden Forschungsgebiete wie z. B. die Bionanotechnologie oder die Umweltbiotechnologie (Entfernung von Metallen).

1.3 Metallinteraktionen lebenden Mikroorganismen

Für die Interaktion von Mikroorganismen (gram-positiv, gram-negativ, Algen oder Pilze) mit Metallen sind verschiedene Mechanismen bekannt^{7, 50}. Dabei sind diese Mechanismen sowohl wichtig für die Interaktion der Zellen mit essentiellen Metallen wie z. B. Na, Mg, Ca, Mn, als auch zum Schutz der Bakterien gegenüber möglicherweise schädlichen Metallen wie z. B. Cu, Hg, Cd, Au oder Pb⁵¹. Abbildung 6 zeigt dabei die fünf wichtigsten Prozesse an denen die äußeren Zellwandkomponenten beteiligt sind. Dies sind die Biosorption, die Bioakkumulation, die Biokomplexierung, die Biotransformation und die Biomineralisation (mit Biopräzipitation)⁵²⁻⁵⁵. Diese Prozesse können entweder zusammen oder auch nur einzeln bei der Interaktion von Metallen mit dem Bakterium eine Rolle spielen. Aufgrund der hohen Komplexität der Bakterienzelle ist jedoch auch bei den Interaktionsmechanismen ein Zusammenspiel mehrerer Prozesse sehr wahrscheinlich. Die einzelnen Mechanismen können dabei zusammengefasst werden in direkte Prozesse (Biosorption, Bioakkumulation und Biotransformation), bei denen eine direkte Wechselwirkung der Mikroorganismen mit den Metallen stattfindet und in indirekte Metallwechselwirkungen über Bioliganden wie z. B. Siderophore. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Mikroorganismen als potentielle Biosorbenten für die Reinigung schwermetall- oder toxinhaltiger Wässer interessant und rücken in den Fokus von umweltökologischen Forschungsarbeiten. Sie können eine Alternative zu bisherigen teuren und teilweise wenig selektiven und effektiven physikochemischen Verfahren darstellen^{13, 56}.

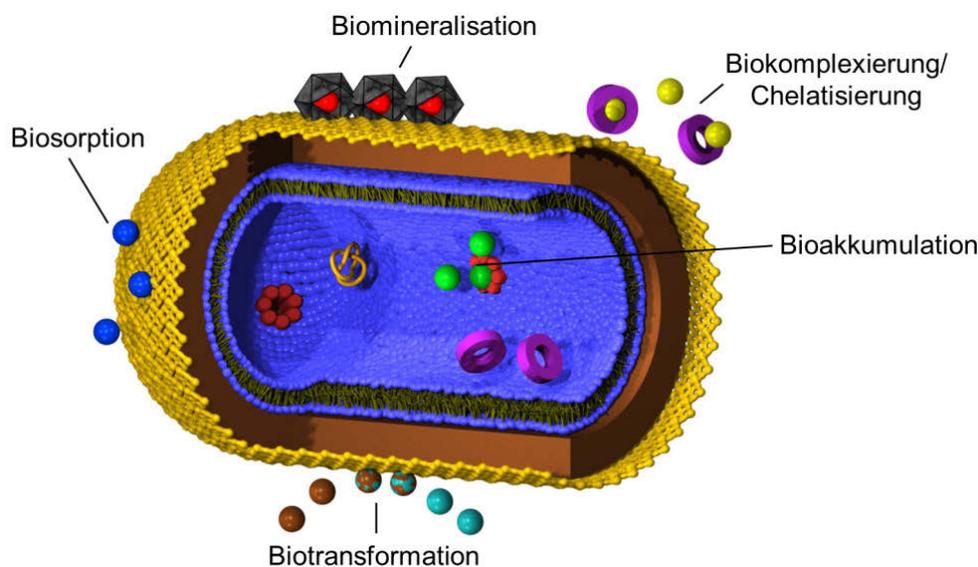


Abbildung 6: Schematischer Überblick der Metallwechselwirkungen am Beispiel eines gram-positiven Bakteriums, adaptiert nach Drobot, B. (2013)²⁵.

1.3.1 Biosorption

Die Biosorption kann als die Bindung von Metallen, Metalloiden, Molekülen oder Partikeln aus wässrigen Systemen durch biologische Komponenten (vitale Zellen, tote Biomasse, Zellbestandteile oder Biomoleküle) definiert werden^{14, 52}. Dabei erfolgt die Sorption an den äußeren Zellwandbestandteilen, da diese als abgrenzende Schicht der Zelle zur Umwelt direkt z. B. mit Metallen interagieren können. Dieser passive, d. h. metabolisch unabhängige Prozess der Biosorption erfolgt bei Metallen an den funktionellen Gruppen wie z. B. an Carboxyl-, Hydroxyl-, Phosphat-, Amino- oder Sulfonatgruppen, welche an oder in den äußeren Zellschichten vorhanden sind^{52, 53}. Daher ist zum genauen Verständnis der Metallsorption das Wissen über die Zusammensetzung der bakteriellen Zellwand (funktionelle Gruppen aus Proteinen, Zellmembranzusammensetzung oder Oberflächenmodifikationen mit Zuckern oder Phosphatgruppen) von entscheidender Bedeutung. Dabei kann die Biosorption durch einen oder durch die Kombination von chemischen Prozessen wie z. B. Ionenaustausch, Komplexierung, Adsorption oder elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgen^{11, 57}. Bisherige Arbeiten haben bei einer Vielzahl an untersuchten Mikroorganismen, Pilzen und Biomasse gezeigt, dass der Prozess der Biosorption teilweise sehr hohe Metallbindungskapazitäten ermöglicht und bei einigen Organismen metallselektiv erfolgt^{54, 58, 59}.

1.3.2 Bioakkumulation

Die Bioakkumulation, d. h. die Anreicherung von z. B. Metallen in der Zelle stellt anders als die Biosorption einen metabolisch aktiven Prozess dar. Hier kann zusätzlich zu der Aufnahme über die Zellwand in das Zellinnere eine Komplexierung mit intrazellulären Liganden stattfinden. Dieser Prozess verläuft jedoch um einiges langsamer als die Biosorption und muss hinsichtlich der Aufnahme von essentiellen und nicht-essentiellen Metallen unterschieden werden^{60 61}. Allerdings können deutlich höhere Metallmengen gebunden werden als dies bei der Biosorption der Fall ist⁵². Essentielle Metalle können dabei aufgenommen und gespeichert werden, bis diese benötigt werden. Nicht-essentielle Metalle hingegen werden zuerst passiv an der Oberfläche über biosorptive Mechanismen gebunden und in einem zweiten Schritt über aktive energiegebende Stoffwechselwege in das Zellinnere geschleust. Dort können sie in verschiedene Kompartimente eingeschlossen werden. Dadurch wird eine Detoxifizierung der Schwermetalle erreicht. Jedoch wird durch den Einschluss eine schnelle Freisetzung der Schwermetalle aus dem Mikroorganismus verhindert⁶¹. Die unbeabsichtigte Aufnahme von Schwermetallen erfolgt dabei als Folge von Konkurrenzaufnahmen anderer essentieller Metalle (z. B. zur Eisenaufnahme) aufgrund von Ähnlichkeiten der Metalle. Die Bildung von schwermetallbindenden Proteinen konnte bei verschiedenen Organismen wie Bakterien oder Pilzen beobachtet werden und gilt als weitere Möglichkeit der intrazellulären Detoxifizierung. Die Schwermetallaufnahme in die Zelle kann zusätzlich auch über permeabilisierte Zellmembranen erfolgen^{52, 62}.

1.3.3 **Biotransformation, Biomineralisation und Biokomplexierung**

Die Biotransformation ist die Umwandlung einer Metallspezies mittels Redoxreaktionen in eine andere chemische Spezies. Dadurch können Mikroorganismen direkten Einfluss auf die Mobilität, Bioverfügbarkeit, Stabilität, Löslichkeit und somit auch auf die Toxizität der Metalle haben^{60, 63}. Die Biotransformation und deren Einfluss auf die Stabilität und Mobilität der Elemente ist vor allem von gesteigertem Interesse bei der Betrachtung von technologisch und begleitenden umweltökologischen Aspekten wie z. B. der beabsichtigten Metallfreisetzung aus Mineralen (Ressourcengewinnung) und der unbeabsichtigten Freisetzung z. B. bei der Lagerung von schwermetallhaltigen oder radioaktiven Abfällen⁶⁴. Dieser Interaktionsmechanismus erfolgt über Sekundärmetabolite der Zelloberfläche.

Die Biomineralisation ist die Fähigkeit von Mikroorganismen anorganische mineralische Stoffe kontrolliert zu bilden^{65, 66}. Dabei werden durch Wechselwirkungen mit Bioliganden und Biopolymeren unlösliche Metallpräzipitate gebildet. Beispiele der Biomineralisation finden sich in nahezu allen Domänen von Organismen wie z. B. bei Algen, Pilzen, oder Bakterien. So sind verschiedene Organismen für den Aufbau einer breiten Palette von speziell entwickelten organisch-anorganischen Hybridmaterialien wie Knochen, Zähnen und Muscheln bekannt⁶⁷. Dabei weisen die gebildeten Biomineralien unterschiedlichste Funktionen und Eigenschaften auf und können so beispielsweise Stütz- oder Schutzfunktionen für das weichere organische Material übernehmen⁶⁸. Exemplarisch können hierfür verschiedene Kieselalgen (Diatomeen) genannt werden, welche biogene Kieselsäure produzieren. Dieses, meist in einer amorphen Matrix eingebettete Biomineral zeigt wie im Fall der Kieselalgen oft sehr regelmäßige Formen im nanoskaligen Bereich⁶⁹. Durch die Verfolgung der Kristallisationsprozesse biologischer Systeme und dem Verständnis der ablaufenden Prozesse, kann das daraus gewonnene Wissen zur Erzeugung von synthetischen Biomaterialien für technische Anwendungen z. B. in der Materialwissenschaft und Medizintechnik genutzt werden. Ein weiteres Beispiel stellt die Biomineralisation von Uran durch Phosphatasen aus verschiedenen bakteriellen Isolaten oder die Uranpräzipitation durch *Myxococcus xanthus* dar, welche die Mobilität dieses Schwermetalls in der Umwelt stark beeinflussen können^{70, 71}.

Die Biokomplexierung oder Chelatisierung mittels mikrobieller Siderophore ist eine weitere Möglichkeit Metalle zu binden und in die Zelle aufzunehmen. Diese niedermolekularen Bioliganden werden unter Eisenmangel gebildet und in das umgebende Medium der Zelle geschleust, wo sie in der Lage sind, sowohl Eisen als auch Metalle ähnlicher Ionenradien zu binden. Nach der Metallbindung werden die gebildeten Komplexe über verschiedene aktive und spezifische Transportsysteme wieder in die Zelle aufgenommen^{72, 73}.

1.4 Schwermetalle

1.4.1 Bedeutung, Toxizität und Umweltrelevanz

Der Begriff Schwermetall ist in den letzten Dekaden oft genutzt worden und wird meist im negativen Kontext der Toxizität und Verschmutzung von Ökosystemen gesetzt ⁷⁴. Eine einheitliche Definition dieses Begriffes ist bisher nicht gegeben, obwohl es viele Ansätze gibt den Begriff und die Metallzugehörigkeiten zu diesen zu klassifizieren. Meist beschreibt der Begriff Metalle und Halbmetalle, welche mit einer direkten Kontamination der Umwelt und Ökotoxizität in Verbindung gebracht werden und Dichten von $>3,8 - 5 \text{ g/cm}^3$ aufweisen. Andere Versuche Metalle oder Metalloide entsprechend dem Atomgewicht, Ordnungszahl oder weiteren Eigenschaften dieser Begrifflichkeit zuzuordnen, konnten sich bisher nicht etablieren ^{74, 75}. Auch eine Einordnung nach der Toxizität der Metalle und Metalloide ist nicht möglich, da dies für die meisten Metalle konzentrationsabhängig und zusätzlich von dem Bezugssystem z. B. dem interagierenden Organismus abhängig ist. Dies kann mit dem bereits von Paracelsus geprägten Satz „*Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift sei*“ verdeutlicht werden ⁷⁶. Die Toxizität von „Schwermetallen“ ist daher nur teilweise richtig anzugeben, da sie neben der Konzentration von weiteren Faktoren wie der chemischen Form (Speziation) und der sich daraus ableitenden Bio- und Umweltverfügbarkeit sowie die Biozugänglichkeit abhängt ^{77, 78}. Bioverfügbare Stoffe liegen daher meist in gelöster Form in der Umwelt vor und können sich in Böden, Wässern und Organismen verteilen und anreichern ⁷⁹. Ebenfalls kann keine allgemeingültige Toxizität für alle Organismen abgeleitet werden, da für einige Organismen bestimmte „Schwermetalle“ auch essentielle Bestandteile darstellen ⁸⁰. Bei *Thalassiosira weissflogii* ist beispielsweise Cadmium ein essentieller Nährstoff ⁸¹. Weitere Organismen zeigten Toleranzen gegenüber hohen Konzentrationen an Cadmium, Kupfer, Blei oder Nickel ⁸².

1.4.2 Ausgewählte Metalle und Metalloide – Relevanz und Nutzen

Für die in dieser Arbeit genutzten Metalle und Metalloide werden im Folgenden Unterkategorien dargestellt und der ihre Relevanz in Bezug auf eine effiziente Gewinnung, ein effizientes Recycling und ihre Entfernung als umweltschädliche Elemente vorgestellt.

EDELMETALLE – PLATIN, PALLADIUM UND GOLD

Die Metalle Platin und Palladium (Platingruppenelemente) sowie Gold werden zu der Kategorie der Edelmetalle zugeordnet. Sowohl Platin, Palladium als auch Gold weisen sehr hohe Schmelztemperaturen, eine niedrige Reaktivität und eine hohe Korrosionsbeständigkeit auf und kommen in der Natur meist in gediegener Form vor ⁸³. Diese Eigenschaften rücken die Metalle in den Fokus und machen sie für die Nutzung in der heutigen Zeit sehr wichtig für die Entwicklung von Katalysatoren, als Bestandteile elektronischer Bauteile, in der Sensorik, Optik, Medizin, Nanotechnologie oder Schmuckindustrie ⁸⁴⁻⁸⁶. Aufgrund ihrer Bedeutung, der limitierten Verfügbarkeit und der hohen Preise der Edelmetalle sind ihre effiziente Gewinnung aus Lagerstätten mit geringeren Edelmetallanteilen

oder die Rückgewinnung aus industriellen Prozesswässern oder Elektronikschrott von gesteigertem Interesse, um den steigenden Bedarf dieser Metalle gewährleisten zu können^{87, 88}. Unter diesem Aspekt sind innovative, umweltschonende und kostengünstigere Verfahren zur Rückgewinnung und erneuten Nutzung von Edelmetallen z. B. durch biosorptive Stoffe von größerer Bedeutung als die bisher genutzten und herkömmlichen hydro- und pyrometallurgischen Prozesse, Fällungen oder Ionenaustauschreaktionen^{14, 87}.

LANTHANIDE UND ACTINIDE

In dieser Arbeit wird Europium als Vertreter der Lanthanide und Uran als Vertreter der Actinide genutzt. Sowohl bei Lanthaniden als auch bei Actiniden handelt es sich um Metalle der f-Gruppen Elemente des Periodensystems der Elemente⁸⁹. Dabei muss man beide Metalle hinsichtlich ihrer Eigenschaften, Nutzung und Umweltrelevanz deutlich voneinander unterscheiden.

Europium als Lanthanid ist ebenfalls ein Vertreter der Seltenen Erdmetalle. Anders als diese Bezeichnung vermuten lässt sind diese Elemente im Vergleich zu anderen Metallen wie z. B. Zinn, Molybdän oder Kupfer in der Erdkruste nicht seltener vorhanden, sondern aufgrund ihrer hohen Reaktivität nur feiner in Erzen (Europium z. B. in Bastnäsit) verteilt vorzufinden. Zum Einsatz kommt Europium beispielsweise in der Elektronikindustrie zur Produktion von Leuchtstoffen in Fernsehgeräten und Bildschirmen^{90, 91}. Ebenfalls sind auch größere Lagerstätten rar, welches einen einfachen Abbau dieser Metalle erschwert^{92, 93}. Um zusätzlich einen offeneren Markt zu generieren, können neu entwickelte und innovative Verfahren zur Gewinnung und Rückgewinnung von Seltenen Erdmetallen wie z. B. Europium genutzt werden, um unabhängiger von Hauptproduzenten wie z. B. China zu werden⁹⁴. In der wissenschaftlichen Forschung nimmt Europium ebenfalls eine wichtige Stellung ein, auch wenn hier prozentual gesehen keine großen Metallmengen benötigt werden. Aufgrund der chemisch ähnlichen Eigenschaften von Lanthaniden und Actiniden, vor allem bei Elementen gleicher Oxidationsstufe rückt die Untersuchung z. B. von dreiwertigem Europium in den Vordergrund^{89, 95, 96}. Diese Untersuchungen können zur Vorhersage für das Reaktions- und Sorptionsverhalten dreiwertiger Actinide wie Curium oder Americium genutzt werden.

Uran wurde als natürlicher Vertreter der Actinide für diese Arbeit gewählt. Aufgrund seiner chemo- und radiotoxischen Wirkungen spielt die Ausbreitung von Uran in der Natur für den Menschen eine wichtige Rolle⁹⁷. Uran besteht in seinem natürlichen Zustand (U_{nat}) aus den Isotopen ^{238}U mit 99,275 %, ^{235}U mit 0,72 % und ^{234}U mit 0,005 % Häufigkeit, welche alle dem radioaktiven Zerfall unterliegen^{97, 98}. Das am häufigsten vorkommende natürliche Uranisotop (^{238}U), hat dabei die längste Halbwertszeit von 4,47 Milliarden Jahren⁹⁹. In der Natur kommt Uran in einer Vielzahl von Mineralen wie z. B. Autunit, Pechblende, Uranit oder Carnotit vor⁹⁷. Aus diesen Mineralen können durch Erosion oder Verwitterung angrenzende Ökosysteme kontaminiert werden. Anthropogene Eintragungsmöglichkeiten erfolgen z. B. durch den Uranabbau, der Nutzung in Kernwaffen, der Energiegewinnung in Atomkraftwerken, durch radioaktive Störfälle oder aus Panzerungsmaterialien⁹⁹. Die stabilsten Formen der Uranoxidationsstufen (+2 bis +6) weisen das vierwertige Uran und das

zweiwertige Uranylion (UO_2^{2+}) auf ⁹⁷. Dabei unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres Verhaltens in aquatischen Systemen. Das sechswertige Uran weist aufgrund seiner guten Löslichkeit eine hohe Mobilität auf und ist für die Verbreitung in der Umwelt von größerer Relevanz als das schwerlösliche vierwertige Uran. Daher ist es von gesteigertem Interesse, dieses toxische Element zu immobilisieren oder zu entfernen und so eine Reinigung und Gefahrenminimierung kontaminierter Gebiete (z. B. Trinkwässer, Wässer und Böden) zu erreichen und gesetzliche Urangrenzwerte einzuhalten ^{100, 101}. Ebenso ist auch bei der Einrichtung von Endlagern die Immobilisierung radioaktiver Stoffe von großem Interesse. Daher sind innovative biologisch basierte Verfahren ^{102, 103}, durch die Uran stabil gebunden, immobilisiert oder von anderen Stoffen getrennt werden kann, eine geeignete Alternative zu bisherigen sorptiven Materialien (Abtrennung durch Ionenaustauscher) oder Verfahren (Filtrierung und Fällungen) ^{104, 105}.

WEITERE AUSGEWÄHLTE METALLE UND METALLOIDE

Die Metalle Cadmium, Blei und das Halbmetall (Metalloid) Arsen werden im Folgenden gesondert aufgrund ihrer hohen Relevanz in Bezug auf Toxizität und Umweltbelastungen dargestellt.

Das Metalloid bzw. Halbmetall Arsen kommt in der Natur in gediegener Form meist in sulfidischer Form vor. Dessen Oxidationsstufen +3 und +5 (Arsenit und Arsenat) spielen in biologischen Systemen dabei eine entscheidende Rolle und finden sich in verschiedenen Grund- und Trinkwässern in verschiedenen Ländern (z. B. Bangladesch, Chile und China) oder in organischer Form nach Anreicherung in Tieren wieder ^{106, 107}. Neben dem natürlichen Eintrag von Arsen durch das Auswaschen aus Gesteinen, erfolgt der anthropogene Eintrag durch Verhüttung von Nichteisenmetallen, sowie der Nutzung von Arsen in Pflanzen- und Holzschutzmitteln sowie der Halbleiterindustrie ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeiten von AsO_4^{3-} zu Phosphaten kann eine biologische Aufnahme über verschiedene Stoffwechselwege erfolgen, welche bereits in geringen Konzentrationen hohe toxische Auswirkungen hat ¹⁰⁶. Daher ist es unabdingbar, Arsen aus kontaminierten Wässern effektiv abzutrennen.

Cadmium ist ein sehr seltenes Metall, welches meist in gediegener Form in der Erdkruste vorkommt. Der hauptsächliche Umwelteintrag erfolgt durch Erosionen und der Gewinnung von Nichteisenmetallen. Es wird sowohl in der Halbleiter- als auch Elektronikindustrie beispielsweise zur Herstellung von Akkumulatoren verwendet und ist Bestandteil in Düngemitteln ¹⁰⁸. Es ist bereits in geringsten Konzentrationen für viele Organismen schädlich, weshalb ein gesteigertes Interesse in der Abtrennung von Cadmium aus kontaminierten Wässern besteht.

Einer der bekanntesten Metallvertreter, welcher meist in Verbindung mit dem Wort „Schwermetall“ gebracht wird, ist Blei. Es kommt in überwiegender Form als Bleisulfid in der Umwelt vor und wird verstärkt in der Elektrotechnik für die Herstellung von Bleiakkumulatoren und aufgrund seiner hohen Dichte von $11,34 \text{ g/cm}^3$ und der relativ einfachen Verarbeitungsweise für Abschirmungen in der Strahlentechnik und Medizin verwendet. Ebenfalls wurde Blei für den Bau von Trinkwasserleitungen

und als Antiklopfmittel in Kraftstoffen eingesetzt, wodurch der Eintrag in die Umwelt erfolgte¹¹⁰. Somit übersteigt der anthropogene Eintragung in einigen Regionen den der natürlichen Bleifreisetzung¹⁰⁸. Die hohe Toxizität von Blei wird durch die direkte Wirkung auf das Nervensystem und der sich daraus ergebende Vergiftungserscheinungen bestimmt. Durch die Aufnahme von Blei über die Nahrungskette des Menschen ergibt sich ein hohes Gefährdungspotenzial¹⁰⁷.

1.5 Einsatzmöglichkeiten von Mikroorganismen und Biomolekülen zur Umweltsanierung und in der Bionanotechnologie

1.5.1 Biosorptive Materialien zur Entfernung von Metallkontamination und Metallrückgewinnung

Durch den stetigen Eintrag von „Schwermetallen“ durch natürliche und anthropogene Wege wie z. B. Bergbau, Industrieabwässer, Sickerwässer aus Abraumhalden oder technologischen Prozessen werden natürliche Ökosysteme zunehmend geschädigt und gefährden schlimmstenfalls auch die menschliche Gesundheit^{53, 111-113}. Bisherige angewandte physikochemische Verfahren zur Umweltsanierung und Dekontamination von Abwässern z. B. durch Fällungen oder Ionenaustausch haben sich teilweise als nicht sehr effektiv, nicht-selektiv und kostenintensiv herausgestellt¹¹³. Als weitere Konsequenz birgt ein Teil dieser Verfahren den Nachteil der Einbringung weiterer Substanzen in die Umwelt. Daher rücken vor allem biosorptive Prozesse mit lebender oder toter Biomasse, als auch mit zellulären organischen Liganden in den Interessenfokus zur Umweltsanierung und der Entwicklung biologisch basierter Metallfiltermaterialien^{13, 113, 114}. Solche Materialien bieten weiter den Vorteil, dass diese nicht nur zur Sanierung von metallkontaminierten Ökosystemen genutzt werden können, sondern auch für Recyclingstrategien- und Rohstoffgewinnung von wertvollen und seltenen Metallen durch selektive Metallabtrennung genutzt werden können. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit der Regenerierung dieser biologischen Filtermaterialien und damit in ihrer mehrfachen Nutzung zur Metallentfernung, sowie die Minimierung des Einsatzes von Chemikalien. Dies, die gute Verfügbarkeit sowie der geringe Preis von Biomasse ermöglichen die Entwicklung eines kostengünstigen und effektiven Filtermaterials⁷. Die sorptiven Eigenschaften von Mikroorganismen sind dabei schon vielfältig untersucht worden und variieren stark in Art und Menge des gebundenen Metalls. Die Art des gebundenen Metalls ist dabei stark von dem jeweiligen Mikroorganismus und dessen Adaption an spezielle Umweltfaktoren abhängig. Beispielsweise ist *Bacillus megaterium* in der Lage bis zu 34,5 mg Cr⁶⁺/g BTM, *Saccharomyces cerevisiae* bis zu 0,8 µg Pt²⁺/g BTM und bis zu 12 µg Pd²⁺/g BTM, *Chlorella vulgaris* bis zu 98,5 mg Au³⁺/g BTM und bis zu 87,73 mg UO₂²⁺/g BTM zu binden^{62, 115-118}. Weitere Beispiele sind die Entfernung von Au³⁺, Pd²⁺ und Pt²⁺ durch *Desulfovibrio desulfuricans* sowie die Bindung von Eu³⁺ an *Bacillus subtilis*^{119, 120}. Dies repräsentiert nur eine kleine Auswahl, jedoch ist nicht jeder Organismus in der Lage große Mengen an Metallen zu tolerieren oder zu binden. Neben den Untersuchungen mit Biomasse als Sorbent für die Metallentfernung aus aquatischen Systemen werden zunehmend auch zelluläre Bestandteile und Zellwandfragmente wie Lipide, Peptidoglykan, Proteine oder Chitosan untersucht um ein besseres Verständnis der Metallbindung zu erhalten und ef-

fektive Filtermaterialien zu entwickeln¹²¹⁻¹²⁴. Für die Entwicklung von Filtermaterialien bedarf es zusätzlicher Methoden zur Immobilisierung der Biomasse wie z. B. die Einbettung in verschiedene Matrixsysteme wie Polysulfone oder Sol-Gel-Keramiken, welche dann in verschiedenen Filteranlagen wie z. B. Festbettreaktoren und Säulensystemen eingebaut werden können¹²⁵⁻¹²⁷. Als biosorptive Materialien sind gerade auch selbstassemblierende Biomoleküle wie z. B. S-Layer-Proteine oder Lipide attraktiv¹³. Diese können nach geeigneter Immobilisierung auf technischen Oberflächen als Mono- und Multischichtsysteme zur Metallentfernung genutzt werden^{22, 39, 128}. Diese Biomoleküle können aber nicht nur für Filtermaterialien genutzt werden, auch in der Bionanotechnologie können sie vielfältige Anwendung finden.

1.5.2 Biomoleküle als Template in der Bionanotechnologie

Strukturierte Biopolymere wie z. B. bakterielle S-Layer-Proteine oder abgeschiedene Lipidschichten bieten neben ihren sorptiven Eigenschaften zusätzlich die Möglichkeit für verschiedene Anwendungen in der Bionanotechnologie genutzt zu werden¹²⁹. S-Layer-Proteine können beispielsweise als Grundlage für die Erzeugung sensorischer Schichten zur Detektion und Bindung von Metallen oder Pharmazeutika genutzt werden^{39, 45, 130}. Eine weitere Möglichkeit der Nutzung von S-Layern als Vertreter für Biomoleküle besteht im Bereich der Katalyse, bei dem die Proteine als Template zur Abscheidung und Erzeugung hochgeordneter Nanopartikelcluster genutzt werden können. So können beispielsweise Pd- und Pt- Nanopartikelkatalysatoren mit einer hohen katalytisch aktiven Oberfläche für verschiedene chemische Reaktionen wie z. B. Hydrierungs- oder Kupplungsreaktionen oder zur Synthese von Kohlenstoffnanoröhrchen hergestellt werden¹³¹. Hochgeordnete Goldnanopartikel können zusätzlich für die Herstellung optischer Sonden oder im Bereich Drug Delivery als Katalysatoren zum Einsatz kommen^{132, 133}. Zusätzlich können die hochfunktionalen S-Layer als Antigenträgermaterial für die Herstellung von Vakzinen genutzt werden^{39, 134}. Die amphiphilen selbstassemblierenden Lipide und Lipidvesikel mit ihren unterschiedlichen Kopf- und Schwanzgruppen stellen eine weitere interessante Komponente für die Anwendung in der Bionanotechnologie dar. So können zelluläre Lipide im Bereich des Wirkstofftransportes von Medikamenten, der Erzeugung biomimetischer Systeme, der Nanoelektronik, als Antifoulingmittel und in der Lebensmittelindustrie zur Anwendung kommen¹³⁵. Für die Entwicklung dieser Anwendungen ist die Charakterisierung der Biomoleküle bezüglich ihrer Zusammensetzung und Interaktion mit potenziellen technischen Oberflächen, aber auch die Untersuchung von Wechselwirkungen freier Biomoleküle und Biomolekülschichten mit verschiedenen Metallen oder organischen Molekülen von großem Interesse.

2 Motivation und Zielstellung

In vorangegangenen Untersuchungen wurde das Adsorptions- und Desorptionsverhalten von Metallen insbesondere von Schwermetallen und Actiniden von vitalen Bakterien der Uranabraumhalde Haberland (Johanngeorgenstadt) sowohl als Gesamtsystem, als auch von S-Layer-Proteinen als exponierter Bestandteil der Zelloberfläche intensiv studiert. In diesen Versuchen wurden jedoch Diskrepanzen der Metallbindungskapazitäten der Zellen und der S-Layer-Proteine festgestellt, die aufgezeigt haben, dass neben den Proteinen weitere Komponenten oder Prozesse an der Metallbindung beteiligt sein könnten. Durch die hohe Komplexität der bakteriellen Zellwände, bestehend aus verschiedenen Multischichtsystemen von Membranlipiden, Peptidoglykanen, Teichonsäuren, Proteinen und weiteren Modifikationen wie Zuckern oder Phosphaten wird das Verständnis des Bindungsverhalten und der Metallinteraktionen dieser Bakterien auf molekularer Ebene erschwert. Zudem konzentrierten sich bisherige Untersuchungen auf freie Biomoleküle, nicht jedoch auf biologische Schichten, wie sie in der Zellwand zu finden sind. Diese Untersuchungen lassen nur bedingt Rückschlüsse auf das Gesamtsystem zu. Durch die Untersuchung der Wechselwirkungen der Einzelkomponenten in dieser Arbeit werden detaillierte Informationen über die Komplexierung von Biomolekülen mit Metallen erwartet.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Metallbindungsverhalten der beiden gram-positiven Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 nach deren Kultivierung vergleichend zu untersuchen. Dafür sollen die primären Zellwandkomponenten in reiner Form unter Verwendung geeigneter Verfahren isoliert und bezüglich ihrer Zusammensetzung charakterisiert werden. Analog zu den Untersuchungen der intakten Zellen, sollen die Metallbindungseigenschaften der isolierten freien Zellwandbestandteile mit den ausgewählten Elementen As, Au, Cd, Eu, Pb, Pd, Pt und U untersucht werden. Dies soll Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten des Gesamtsystems geben. Dabei soll die selektive und bevorzugte Bindung einzelner Metalle an den potentiellen funktionellen Gruppen der Einzelkomponenten und Bakterien diskutiert werden. Dazu sollen nach der Kultivierung der Mikroorganismen die primären Zellwandbestandteile wie Membranlipide, Peptidoglykan mit sekundären Zellwandpolymeren und S-Layer-Proteine isoliert werden und ihre Metallbindung in Batch-Sorptionsversuchen unter Verwendung der ICP-MS zur Metallgehaltbestimmung und in spektroskopischen Versuchen näher betrachtet werden.

In der Arbeit sollen zusätzlich zu den Arbeiten mit den freien Biomolekülen erstmals die primären Zellwandbestandteile von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 separat auf technischen Oberflächen abgeschieden werden um ein vereinfachtes Schichtsystem analog der gram-positiven Zellwandschichten zu entwickeln. Im Weiteren soll das Einzelschichtmodell der abgeschiedenen S-Layer-Proteine beider Stämme dazu verwendet werden, Bindungsprozesse *online* zu verfolgen. Ebenfalls soll dabei der Einfluss von Metallen auf die Strukturen der S-Layer-Proteine als erste Interaktionsschicht der Zellen mit der Umwelt erforscht werden. Die Quarzmikrowaage mit

Dissipationsmonitor (QCM-D) wird dabei als Methode genutzt, um die Abscheidung der biologischen Einzelschichten von S-Layer-Proteinen, Lipiden und Peptidoglykan beider Stämme zu untersuchen und ihre Abscheidungskinetik, Abscheidungsmenge und Schichtstabilität, aber auch die Metall- und Metallnanopartikelinteraktion rekristallisierter S-Layer-Proteine zu analysieren. Dafür wird der Einfluss von Untergrundmodifikationen getestet werden. Ergänzt wird die QCM-D Methode durch die Nutzung der Rasterkraftmikroskopie (AFM), durch die der Schichtaufbau von S-Layer-Proteinen und ihre Stabilität nach der Metall- und Metallnanopartikelinteraktion untersucht wird. Die Kombination dieser beiden Methoden soll dabei als geeignetes System zur Untersuchung biologischer Grenzflächen dienen.

Die Daten aus dieser Arbeit sollen dem allgemeinen Verständnis der Metallinteraktionen sowohl von Bakterien als Gesamtsystem als auch von biologischen Einzelkomponenten und Einzelschichten dienen. Dadurch kann das Wissen für potentielle technische Anwendungen, wie z. B. metallselektive biosorptive Materialien, sensorische Schichten oder Katalysatortemplates für Metallnanopartikel erweitert werden und die Entwicklung solcher innovativen Technologien vorangebracht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und verwendete Geräte

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden zu großen Teilen von den Herstellern Sigma-Aldrich, Merck, Carl Roth, Alfa Aesar mindestens in den Reinheitsstufen „zur Analyse“ bezogen. Die Metallsalzlösungen für die Interaktionen der Bakterien und Zellwandkomponenten wiesen eine Reinheit von $\geq 99,9\%$ auf. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Chemikalien ist im Anhang (Tabelle A1) hinterlegt. Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind direkt in den einzelnen Methodenkapiteln aufgelistet.

3.2 Verwendete Mikroorganismen

Die beiden gram-positiven Bakterien *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 stammen aus der Uranabfallhalde „Haberland“ nahe Johanngeorgenstadt in Sachsen. Diese beiden Isolate aus Bodenproben zeigten in vorangegangenen Untersuchungen eine sehr hohe Affinität zu verschiedenen Schwermetallen auf. Gleiches konnte für deren S-Layer-Proteine erkannt werden, welche zusätzlich eine hohe chemische und mechanische Stabilität aufweisen^{16, 22, 23}. Für die Untersuchungen wurden die Bakterienstämme als Kryostasiskultur aus der Stammsammlung des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR) entnommen.

3.3 Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53

3.3.1 Stammhaltung und Vorkulturen

Die Stammhaltung der Mikroorganismen erfolgte nach Erhalt der Kryostasiskulturen auf Agarnährmedien-platten bei Raumtemperatur. Dafür wurde ebenso wie für die Vorkulturen ein Nutrient-Broth (NB)- Mast-medium (4 g/l Pepton, 4 g/l Rindfleischextrakt und 2 g/l Natriumchlorid) verwendet. Für die Herstellung der Agarplatten erfolgte die Zugabe von Agar-Agar (18 g/l). Unter sterilen Bedingungen wurden die Bakterienstämme in die NB-Mastmedien-Kolben ($V_{\text{Medium}}=30\text{ ml}$) überführt. Die Kultivierung der Vorkulturen erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 30 °C und 110 rpm im Schüttelinkubator (SM 30 Control, Edmund Bühler-Labortechnik GmbH, Tübingen).

3.3.2 Geregelt Kultivierungen im Bioreaktor

Die Kultivierung beider untersuchter gram-positiver Mikroorganismen erfolgte im Batch-Verfahren in einer 70 l Bioreaktoranlage (Pilot System 70 l, Applikon Biotechnology B.V., Delft, Niederlande). Alle Kultivierungen wurden mit dem beschriebenen NB-Mastmedium durchgeführt. Hierfür wurden 50-60 l flüssiges Medium direkt im Rührkessel vorgelegt und mit 1,5 ml Antischaummittel (Antifoam 204) versetzt. Die Sterilisation erfolgte direkt in der Steam-in-Place Bioreaktoranlage bei 122 °C mit einer Haltdauer von 30 Minuten. Nach Abkühlen und vollständiger Sauerstoffsättigung des Nährmediums erfolgte der Anschluss der Peripheriegeräte und Schlauchverbindungen. In vorangegangenen Untersuchungen haben sich die Kultivierungsparameter pH-Wert (pH=7,0), Temperatur (T=30 °C) und eine minimale Gelöstsauerstoffrate (dO_2) von 30 % als Wachstumsoptimum für die Bakterien herausgestellt^{128, 136}. Die automatisierte Regulierung des pH-Wertes wurde durch 1 M H_2SO_4 und 2 M NaOH als Korrekturflüssigkeiten realisiert. Der minimale Sauerstofflevel wurde über die Rührergeschwindigkeit (minimal 200 U/min) reguliert. Bei einem Unterschreiten des Wertes und Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl von 1000 U/min erfolgte ein zusätzlicher Lufteintrag über ein sekundäres pneumatisches Druckventil.

Die Vorkulturen wurden in einem Volumen von ca. 250 ml automatisch in den Reaktor zudosiert und die Datenaufzeichnung (Software BioXpert V2, Applikon Biotechnology B.V., Delft, Niederlande) zur Kultivierung gestartet, um die Wachstumsparameter zu verfolgen. Während der Kultivierungen wurden *online* die Parameter des Gelöstsauerstoffs (dO_2 in %), des pH-Wertes, Säure- und Basenverbrauchs (ml) sowie Rührergeschwindigkeit (U/min) erfasst. Zusätzlich erfolgte die Wachstumsverfolgung mittels des nicht-invasiven Trübungsmessgerätes BugEye 2100 (BugLab LLC, Concord (CA), USA)¹³⁶⁻¹³⁸. Weiter erfolgte eine stündliche Probennahme zur Ermittlung von *offline* Parameter wie OD, BTM, SDS-Proteinprofile, Gesamtproteinkonzentration und mikroskopische Verlaufskontrolle. Beim Erreichen des Endes der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Zellernte (Kapitel 3.5.1), da hier eine maximale Ausbeute an S-Layer-Proteinen und weiteren Zellwandbestandteilen erreicht werden sollte.

3.3.3 Ungeregelt Kultivierungen im Schüttelkolben

Zur Gewinnung von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, welche für die Sorptionsversuche mit intakten Zellen genutzt wurden, erfolgte die Kultivierung in 500 ml Schüttelkolben. Das NB-Nährmedium wurde unter sterilen Bedingungen in der Laminarbox (Hera safe[®], Kendro, Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland) mit 5 ml flüssiger Vorkultur inokuliert und für ca. 4-5 h im Schüttelinkubator bei 30 °C und 110 rpm inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch eine stündliche Probennahme kontrolliert. Hierfür wurden die optische Dichte bei 600 nm (OD) und die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt sowie eine mikroskopische Verlaufskontrolle durchgeführt (Kapitel 3.5.2).

3.4 Offline Methoden zur Verfolgung des Bakterienwachstums und Proteinexpression

Zur Analyse des mikrobiellen Wachstums wurden zusätzlich zu den *online* Daten auch *offline* Proben untersucht. Hierzu wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden genutzt. Zusätzlich erfolgte zur Darstellung der Proteinexpression der untersuchten und aufgeschlossenen Bakterien (Kapitel 3.6.1) eine SDS-PAGE (Kapitel 3.7.1).

3.4.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspensionen wurde bei einer Wellenlänge (λ) von 600 nm an einem UV/VIS Spektrometer (Ultrospec[®] 1000, Amersham Pharmacia Biotech, Großbritannien) gemessen. Die Proben aus den Kultivierungen wurden gegen sterilfiltriertes NB-Mastmedium als Referenz gemessen. Für die Bestimmung der optischen Dichte für die Sorptionsversuche erfolgten die Referenzmessungen gegen sterilfiltrierte 0,9 %ige NaCl-Lösung (pH=6,0).

3.4.2 Ermittlung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 1-5 ml Bakteriensuspension in bis zur Massenkonstanz ausgeheizten Probenröhren überführt und bei 5000 g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert (Galaxy MiniStar Mikrozentrifuge, VWR Deutschland). Die erhaltenen Zellpellets wurden bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die Ermittlung der BTM erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung.

3.4.3 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Kontrolle des Bakterienwachstums, zur Überprüfung des Isolierungsfortschritts sowie der Kontrolle der Batch-Sorptionsversuche wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (BX61 motorisiertes Forschungsmikroskop, Olympus Germany LLC, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden sowohl in einer 400- als 1000-facher Vergrößerungsstufe mit der Software Cell[^]P (Version 3.1, Olympus Soft Imaging Solutions LLC, Münster, Deutschland) angefertigt.

3.4.4 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen mittels UV-VIS Spektroskopie

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels UV/VIS Spektroskopie (Nanodrop[®] 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) bestimmt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen über das spezielle Adsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm, welches charakteristisch für Nukleinsäuren ist. Jeweils 5 ml Bakteriensuspension aus den

Probennahmeintervallen wurden bei 8000 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein Kurzaufschluss (Kapitel 3.6.1) durchgeführt und 2,5 µl des erhaltenen Überstands am Photometer unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten ($\epsilon=1$) vermessen. Als Referenzsubstanz diente eine 10 %iges SDS-Lösung.

3.4.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Flowcytometrie

Zur Wachstumskontrolle der Mikroorganismen während der Kultivierungen wurde das Verfahren der Flowcytometrie genutzt. Die Flowcytometrie (Durchflussanalyse) ist eine sehr vielfältige *offline*-Analysemethode mit deren Hilfe nicht nur einfache Bestimmung der Partikelzahl pro Milliliter gewonnen werden können sondern vielmehr auch Aussagen zur Zelldynamik und morphologischen Eigenschaften (Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) der Zellen zulassen. Diese spezielle Partikelmesstechnik detektiert die zu vermessenden Zellen entsprechend ihrer Eigenschaften. Dazu werden die Zellen in einen Hüllstrom eingebettet und so hydrodynamisch in der Strahlmitte fokussiert. Passieren die einzelnen Zellen einen Laserstrahl so wird der Streulicht- bzw. Fluoreszenzimpuls mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) zu einer zentralen Auswerteeinheit übertragen. Mit einer genauen Kalibrierung des Gerätes und den detektierten Signalen können strukturelle Aussagen über die Mikroorganismen als auch über die Zellanzahl gewonnen werden.

PROBENVORBEREITUNG UND MESSUNGEN AM FLOWCYTOMETER

Für die Messungen der Zellzahl und der Streuungseigenschaften wurde das Gerät CyFlow[®] Space (Partec, Münster Deutschland), welches mit einem luftgekühlten Festkörperlaser ($\lambda=488$ nm), sowie den beiden Diodenlasern der Wellenlänge $\lambda=405$ nm und $\lambda=561$ nm ausgestattet ist, gemessen. Zur Fokussierung der Probe wurde diese in einem Hüllstrom (Reinstwasser mit 0,01 % Triton X-100, 0,04 % NaN₃, sterilfiltriert und im Ultraschallbad entgast) eingebettet. Die Datenanalyse und -auswertung erfolgte über die Software FloMax[®] (Version 2.51, Partec, Münster, Deutschland). Vor Beginn der Messung erfolgte zunächst eine Gerätekalibrierung mit 1 µm und 3 µm fluoreszierenden „Calibrationbeads“, um eine Größeneinordnung der Bakterien zu erhalten. Jeweils 5 ml der Kultivierungsproben wurden bei 8000 g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA). Das Pellet wurde anschließend drei Mal mit je 5 ml sterilfiltrierter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS - 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na₂HPO₄, 0,27 g KH₂PO₄, pH=7,4) gewaschen. Die vom Medium befreiten Zellen wurden mit 5 ml PBS versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis kurz vor der Messung bei -20 °C gelagert. Die flüssigen Proben wurden soweit mit PBS verdünnt, dass eine maximale Zählrate von 1000-1100 Ereignissen/Sekunde nicht überschritten wurde, um eine Signalverfälschung zu vermeiden. Die Messung der Bakteriensuspension und der PBS-Referenz erfolgten mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 2,2-4,4 µl/s.

3.5 Zellernte und Zellbehandlung

3.5.1 Zellernte aus geregelter Kultivierung

Die Mikroorganismen wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mittels einer Durchflusszentrifuge (Powerfuge Pilot Separation System Serie 9010-S, Carr Centritech, Florida, USA) bei 17000 g bei 4 °C geerntet. Zuvor erfolgte eine Absenkung der Bioreaktortemperatur auf 8 °C, um ein weiteres Wachstum während der ca. 1,5 stündigen Zellernte zu minimieren und um die Sporulation der Bakterien zu vermeiden. Die erhaltene Biofeuchtmasse wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Vorbereitung des Zellaufschlusses wurde die gefrorene Biomasse bei 4°C über 1 Stunde langsam angetaut und anschließend zwei Mal mit Standardpuffer (50 mM TRIS, 1 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 3 mM NaN₃, pH=7,5) gewaschen.

3.5.2 Zellernte aus unregelter Kultivierung

Die Ernte der Biomasse aus den Schüttelkolben erfolgte mittels Zentrifugation bei 8000 g, 4 °C für 20 Minuten (Sorvall[®] Evolution RC Superspeed Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific[®], USA). Anschließend wurde die Biomasse drei Mal mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung (pH=6,0) gewaschen und direkt nach Einstellung der entsprechenden Zelldichte für die Sorptionsversuche genutzt.

3.6 Zellaufschluss und Extraktion der Zellwandkomponenten

Zur Extraktion der einzelnen primären Zellwandkomponenten wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden angewandt. In Abbildung 7 ist schematisch die Isolierungsstrategie ausgehend von der gewonnenen bakteriellen Biomasse vereinfacht dargestellt.

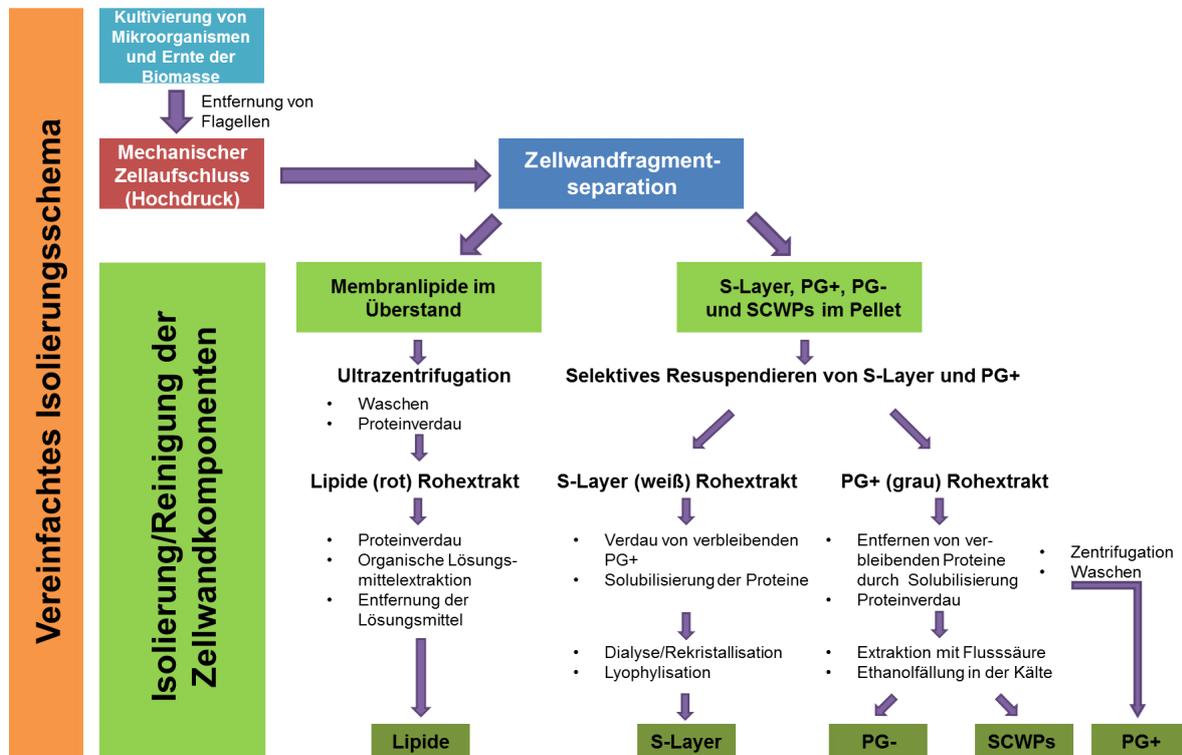


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Isolierung der Zellwandkomponenten.

3.6.1 Kurzaufschluss der Zellen für SDS-PAGE

Die gewaschene und anschließend zentrifugierte Biomasse wird zum Denaturieren der S-Layer-Proteine mit einer 10 %igen SDS-Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 95 °C im Wasserbad (Typ WB, Memmert, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Anschließend wird das Pellet mittels Zentrifugation (8000 g, 20 °C, 10 Minuten) abgetrennt und der Überstand zur Auftragung für die SDS-PAGE genutzt.

3.6.2 Mechanischer Zellaufschluss und Fragmentseparation

Zur weiteren Isolierung der Zellwandbestandteile wurde die resuspendierte Biomasse unter Verwendung eines modifizierten mechanischen Verfahrens nach Engelhard, H. et al. (1986), Sprott, G. D. et al. (1994) und Raff, J. (2002) aufgeschlossen¹³⁹⁻¹⁴¹. Zunächst erfolgte die Entfernung der Flagellen von den Bakterien mittels eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax T18 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) für 10 Minuten auf Stufe 3 unter stetiger Eisbadkühlung (4 °C). Anschließend wurde die homogenisierte Suspension bei 8000 g, 4 °C für 20 Minuten (Sorvall® Evolution RC Superspeed Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific®, USA) zentrifugiert. Danach wurde das erhaltene

Zellpellet zwei Mal mit Standardpuffer gewaschen und der Überstand mit den abgetrennten Flagellen wurde verworfen.

Das gewaschene Zellpellet wurde in einem Verhältnis von 1:4 (w/v) im Standardpuffer resuspendiert. Zum Verdau von Nukleinsäuren und zur Vermeidung hochviskoser Suspensionen erfolgte die Zugabe von DNase II und RNase (je 0,4 Einheiten/g BFM). Anschließend wurde die beige Zellsuspension mittels eines Hochdruckhomogenisators (M-110EH-30 Pilot, Microfluidics, Westwood (MA), USA) unter Verwendung einer γ -Kammer bei einem Druck von ca. 1000 bar und unter stetiger Kühlung von 5-7 °C aufgeschlossen. Nach jedem Zyklus wurde der Fortschritt des Aufschlusses mikroskopisch kontrolliert. Waren mittels dieser Kontrolle mehr als 3 intakte Zelle im Fokusfeld des Mikroskops zu erkennen wurde ein weiterer Aufschlusszyklus durchgeführt.

Die nun rötlich-beige erscheinende Zellfragmentsuspension wurde im Anschluss bei 27500 g, 4 °C für 60 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene rötliche Überstand, der den überwiegenden Anteil der Membranlipide enthält, wurde zur direkten Extraktion der Lipide (Kapitel 3.6.3) verwendet. Das beige-graue Pellet wurde zwei Mal mit Standardpuffer gewaschen und zur Extraktion der S-Layer-Proteine und des Peptidoglykans genutzt. Die Überstände aus den Waschschritten des Pellets wurden zur Ausbeutesteigerung mit dem rötlichen Überstand der Lipide vereinigt.

3.6.3 Extraktion der Membranlipide

Für die Extraktion der Membranlipide wurde eine kombinierte Methode einer mechanisch-enzymatischen und einer adaptierten Lösungsmittelextraktion nach Bligh, E. G. et al. (1959) und Morrison, W. R. et al. (1964) verwendet^{142, 143}.

Die vereinigten rötlichen Überstände, welche nach dem mechanischen Zellaufschluss erhalten wurden, wurden zur weiteren Extraktion der Phospholipide verwendet. Die in Lösung befindlichen Lipide wurden mittels Ultrazentrifugation (Sorvall WX Ultra 80, Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA; Rotor A-621) bei 39000 g bei 4 °C über 4 Stunden sedimentiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt bis der Überstand keine Trübung und rötliche Färbung mehr aufweist. Die vereinigten rötlichen lipidhaltigen Pellets wurden in Reinstwasser resuspendiert (T18 basic Ultra Turrax®, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) und gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Ultrazentrifugation bei 100000 g bei 4 °C über 3 Stunden. Der Überstand mit abgetrennten Proteinen und weiteren Biomolekülen wurde verworfen. Das gewaschene rotbraune Pellet wurde erneut mit Reinstwasser mit Hilfe des Dispensers resuspendiert und mit unspezifischer Proteinase K (0,15 g/l) versetzt und bei 4 °C für 24 Stunden im Überkopfschüttler (Multi RS-60, Lab4You, Berlin, Deutschland) inkubiert, um enthaltene Proteine zu verdauen. Nach dem Proteinverdau wurde bei 200000 g bei 4 °C über 2 Stunden zentrifugiert und anschließend wie vorher beschrieben zwei Mal mit Reinstwasser gewaschen, um weitere Proteine abzutrennen.

Die Lipide wurden in wenig Reinstwasser resuspendiert und zur weiteren Lösungsmittelextraktion verwendet¹⁴⁴. Dafür wurde die wässrige Lipidsuspension in einem Verhältnis von 1:1:3 (v/v) mit Methanol

und Chloroform gemischt und in einen Scheidetrichter überführt. Durch wiederholtes Ausschütteln wurden die Membranlipide in die organische Chloroformphase (untere Phase) überführt. Diese wurde vorsichtig entfernt und die wässrige Phase wurde erneut mit Chloroform versetzt und erneut geschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen, welche Reste von Methanol beinhalten, wurden am Vakuumrotationsverdampfer (VV 2001, WB 2001, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bis zur Trockne eingeeengt. Die eingeeengten Lipide wurden in wenig Chloroform angelöst und aus dem Rundkolben in 10 ml Kapsolutflaschen überführt. Hier wurde das Chloroform unter einem stetigen Stickstoffstrom (N₂) entfernt. Zur vollständigen Trocknung wurden die Lipide lyophilisiert (Alpha 1-4 LSC Freeze dryer, Martin Christ Freeze dryers LLC, Osterode, Deutschland). Der Extraktionserfolg wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kapitel 3.7.3) dokumentiert, sowie die Abtrennung der enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.7.1) und Proteinbestimmung nach Lowry (Kapitel 3.7.2) nachgewiesen.

3.6.4 Isolierung von Surface-Layer-Proteinen

Die Reinigung der S-Layer-Proteine erfolgte nach einer adaptierten Methode nach Raff^{128, 140, 145}. Die gewaschenen mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossenen Zellen wurden mittels eines Dispensers im Standardpuffer homogenisiert und mit 1 % (w/v) Triton X-100 versetzt, um verbliebene Lipidreste zu entfernen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten unter schütteln bei 150 rpm inkubiert und anschließend bei 27500 g und 4 °C für 60 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene zweischichtige Pellet wurde zwei Mal mit Standardpuffer gewaschen.

Das obere helle Pellet wird in Standardpuffer resuspendiert. Das untere gräuliche Pellet wurde für die Isolierung des Peptidoglykans (Kapitel 3.6.5) verwendet. Dem resuspendierten weißen Pellet wird 0,2 g/l Lysozym hinzugefügt und der Ansatz für 6 Stunden bei 30 °C unter Schütteln (110 rpm) inkubiert. Hierbei wurden die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin des sich in dem Extrakt befindlichen Peptidoglykans enzymatisch gespalten^{139, 140}. Nach der Zentrifugation (45000 g, 4 °C, 60 Minuten) wurde ein zweifarbiges Pellet erhalten. Die obere proteinhaltige weiße Schicht wurde selektiv mit dem Zentrifugationsüberstand vom unteren beigen Pellet, welches das aufgespaltene Peptidoglykan enthält, getrennt. Die weiße Suspension wurde im Verhältnis von 1:1 (v/v) mit Guanidinhydrochloridlösung (6 M GuHCl, 50 mM TRIS, pH=7,2) zum solubilisieren der Proteinpolymere versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die klare leicht beige Lösung wurde im Anschluss sterilfiltriert (0,2 μ m Filter) und das Filtrat bei 45000 g für 60 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um enthaltene Verunreinigung zu entfernen. Der Überstand wurde unter mehrmaligen Austausch der Dialyseflüssigkeit gegen Rekristallisationspuffer (1,5 mM TRIS, 10 mM CaCl₂, pH=8,0) über 48 Stunden dialysiert (Dialysemembran, MWCO 50000 Da). Anschließend erfolge die Dialyse über 24 Stunden gegen Reinstwasser, um die Puffersubstanzen zu entfernen. Das Präzipitat, welches nach der Zentrifugation (45000 g, 4 °C, 60 Minuten) erhalten wurde, wurde in wenig Reinstwasser resuspendiert und anschließend zur längeren Haltbarkeit der Proteine lyophilisiert.

3.6.5 Gewinnung der Peptidoglykanschicht

Nach dem Entfernen letzter Lipidfragmente durch den Einsatz von Triton X-100 erfolgt das selektive Resuspendieren des erhaltenen zweifarbigen Zellfragmentpellets in wenig Standardpuffer. Das untere graue Pellet, welches das Peptidoglykan mit den verankerten sekundären Zellwandpolymeren enthielt, wurde von dem oberen S-Layer-Proteinen haltigen Pellet getrennt. Im Folgenden wird diese graue Zellkomponente als PG+ bezeichnet. Das PG+ wurde mit Guanidinhydrochloridlösung (6 M GuHCl, 50 mM TRIS, pH=7,2) im Verhältnis 1:10 (v/v) versetzt, um anhaftende S-Layer-Polymer und weitere Proteine in Lösung zu überführen. Die PG+ Guanidinhydrochloridlösung wurde unter konstanten Schütteln (150 rpm) bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das PG+ mittels Zentrifugation bei 45000 g und 4 °C über 60 Minuten vom proteinhaltigen Überstand abgetrennt. Das erhaltene Pellet wurde in Reinstwasser im Verhältnis 1:5 (v/v) unter Verwendung eines Dispensers (T18 basic Ultra Turrax®, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) resuspendiert. Zur Entfernung von GuHCl- und Proteinresten erfolgte eine 24 stündige Dialyse (Dialysemembran, MWCO 50000 Da) gegen Reinstwasser bei 4 °C. Der Dialysemembraninhalt wurde im Weiteren bei 45000 g bei 4 °C über 45 Minuten zentrifugiert. Um weitere Proteinanhaftungen am PG+ zu entfernen, erfolgte die Denaturierung dieser durch Zugabe von 20 ml SDS-Lösung (1 % SDS (w/v), 50 mM TRIS HCl). Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten gekocht und anschließend bei 45000 g, 20 °C und 60 Minuten zentrifugiert. Diese Prozedur wurde mit dem erhaltenen Pellet zwei Mal wiederholt. Anschließend wird, um das SDS und Proteine von dem gereinigten PG+ zu entfernen, das Pellet fünf Mal mit Reinstwasser gewaschen und nach jedem Reinigungsschritt für 30 Minuten bei 45000 g und 20 °C zentrifugiert. Das gereinigte PG+ wurde in wenig Reinstwasser resuspendiert und lyophilisiert.

3.6.6 Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikel aus Lipidsuspensionen

Zur Ausbildung einer Lipiddoppelmembran auf technischen Oberflächen mittels der Quarzmikrowaage (Kapitel 3.10.3) war es notwendig, Lipidvesikel in einer einheitlichen Größenverteilung herzustellen. Die mit der im Folgenden beschriebenen Methode hergestellten kleinen unilamellaren Vesikel (SUV, *englisch: small unilamellar vesicles*) mit einem maximalen sphärischen Durchmesser von 50 nm (Abbildung 8) sollen ideal zur Ausbildung einer solchen Schicht geeignet sein¹⁴⁶. Aufgrund der benötigten Ausgangsmenge der Lipide wurde auf Modelllipide zurückgegriffen, welche in der Lipidzusammensetzung der Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ähnlich sind.

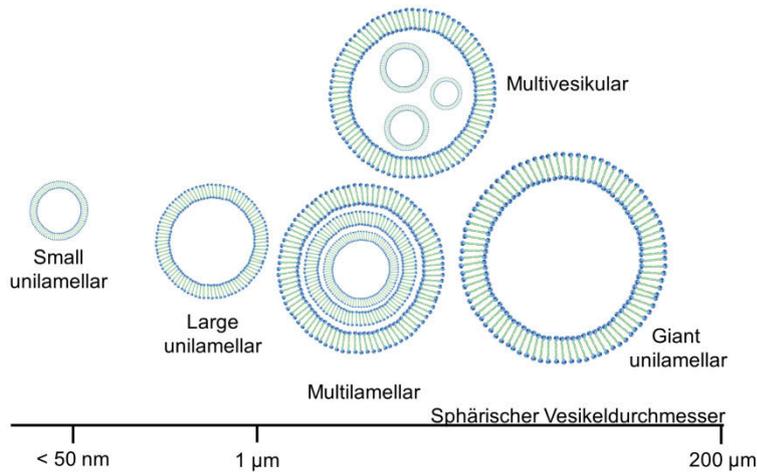


Abbildung 8: Schematische Einordnung der häufigsten genutzten und vorkommenden Lipidvesikel nach Aufbau und sphärischen Durchmesser, adaptiert nach Jesorka, A. et al. (2008)¹⁴⁷.

300 mg Phospholipid (PC aus Lecithin) wurden in einem Rundkolben vorgelegt und in 30 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel wurde mittels Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurde die Suspension am Vakuumrotationsverdampfer bis zur vollständigen Trockne eingengt. Die multivesikulären Lipide wurden in 30 ml Puffer (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH=8,0) suspendiert. Die trübe gelblich-weiße Suspension wurde mittels Ultraschallaufschluss (Digital Sonifier W-250 D, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury (CT), USA) zur Herstellung der SUVs genutzt. Hierfür wurde die Suspension unter stetiger Eisbadkühlung (4 °C) bei einer Leistung $P_{\max}=85\text{ W}$ dem Ultraschallaufschluss unterzogen. Die Gesamtschalldauer betrug 36 Minuten. Beim Erreichen von einer maximalen Temperatur von 15 °C in der Lösung, erfolgte eine Kühlpause bis eine Temperatur von 4 °C erreicht wurde und der Leistungseintrag fortgeführt werden konnte. Die so erhaltene Suspension wurde direkt für die Ultrazentrifugation (161000 g, 8 °C, 1,25 Stunden) verwendet. Die unterschiedlichen Fraktionen der Zonen-zentrifugation wurden unter vorsichtiger Abnahme mittels Kanülenspritzen aus dem Überstand separiert (Abbildung 9). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels PCS (Kapitel 3.15) bezüglich deren Größenverteilung untersucht.

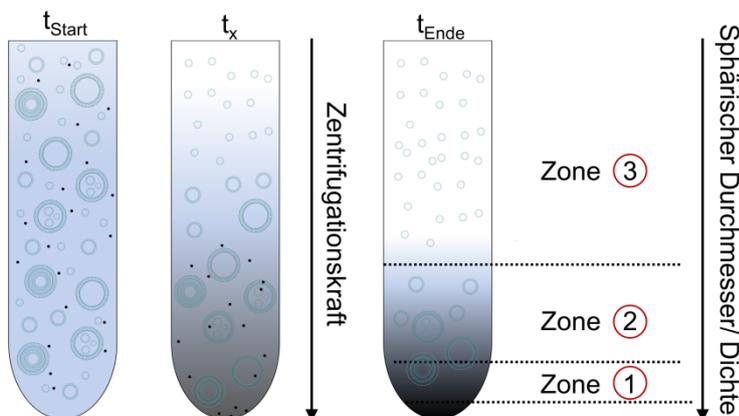


Abbildung 9: Zonen-zentrifugation der Vesikel und Separation aus den einzelnen Zonen.

3.7 Charakterisierung isolierter Zellwandkomponenten

3.7.1 SDS-PAGE zur Proteinidentifizierung

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine der am häufigsten genutzten Methoden zur Analyse komplexer Proteinmischungen, der Bestimmung ihrer Molekulargewichte und der Reinheitskontrolle. Die Analyse basiert auf dem diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli, U. K. (1970)¹⁴⁸. Durch das anionische Detergenz SDS wird die Quartär- und Tertiärstruktur zerstört und die Eigenladungen der Proteine werden so effektiv überdeckt, sodass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit (1,4 g SDS pro 1 g Protein) entstehen. Die Proteinauftrennung erfolgt nur nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteinbewegung zur Anode nach dem Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld ist somit nur noch von der Proteinmasse (Da) abhängig.

3.7.1.1 Herstellung der Gele

Die verwendeten Gele für die SDS-Page (BxHxT: 90 mm x 75 mm x 1,5 mm) wurden mit Hilfe eines Gießstandes der Firma Bio-Rad gegossen. Für die Reinheitskontrolle der S-Layer-Proteine sowie zur Überprüfung der Proteinentfernung aus den Lipid- und Peptidoglykanproben und der Proben der Kultivierungen wurde ein 10 %iges Trenngel (H=50 mm) sowie ein 4 %iges Sammelgel (H=25 mm) verwendet. Die Zusammensetzungen und das Pipettierschema für beide Gele ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele (Angabe für 2 Gele).

Chemikalien	10 %iges Trenngel (ml)	4 %iges Sammelgel (ml)
VE-Wasser	9,7	6,34
Trenngelpuffer 1,5 M TRIS (pH=8,8)	5	---
Sammelgelpuffer 0,5 M TRIS (pH=6,8)	---	2,5
40 % Acrylamid/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)	5	1
10 % SDS-Lösung	0,2	0,1
TEMED	0,01	0,01
APS	0,1	0,05

Für die Herstellung der Gele wurde zuerst VE-Wasser, Trennpuffer und Acrylamid/Bis gemischt und unter Rühren im Exsikkator unter Vakuum für 30 Minuten entgast. Nach der Zugabe der restlichen Substanzen gemäß dem Pipettierschema wurde das Gel zwischen zwei Glasplatten in dem Gießstand gegossen und mit wassergesättigten *n*-Butanol überschichtet, um ein Austrocknen der oberen Schicht

des Trenngels zu verhindern. Nach erfolgter Polymerisation (50 bis 60 Minuten) wurde das 25 mm hohe Sammelgel nach dem gleichen Vorgehen hergestellt und auf das Trenngel gegossen. Zur Ausbildung der 10 Probestaschen wurde direkt nach dem Gießen ein Geltaschenformer eingesetzt und nach erfolgreicher Polymerisation (30 Minuten) wieder entfernt.

3.7.1.2 *Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE*

Zur Probenvorbereitung wurden 20 µl Probe 1:1 mit dem Probenpuffer (Tabelle 2) versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C im Thermoblock (ST51 OSA, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien) inkubiert. Hierdurch werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken der Moleküle zerstört. Durch das enthaltene β-Mercaptoethanol können zusätzlich enthaltene Disulfidbrücken zerstört werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Probenpuffers.

Chemikalien	Zusammensetzung
TRIS	1,97 g
Bromphenolblau	5 mg
Glycerin (reinst)	5,8 ml
SDS	1 g
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
Reinstwasser	ad 50 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung des 10 fach konzentrierten Laufpuffers.

Chemikalien	Zusammensetzung
TRIS Base	30,28 g
Glycin	144,13 g
SDS	10 g
VE-Wasser	ad 1000 ml
TRIS Base	30,28 g
Glycin	144,13 g

Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad eingesetzt und mit 1:10 (v/v) verdünnten Laufpufferkonzentrat (Tabelle 3) versetzt. Nach der Inkubation der Proben wurden diese kurz zentrifugiert und der Überstand in die Probestaschen pipettiert. Wenn nicht anders angegeben wurden stets 2-5 µg Gesamtproteingehalt pro Geltasche aufgetragen. Die Kontrollproben der Lipidextraktion zur Verifizierung der Proteinabtrennung wurden unverdünnt aufgetragen. Als Referenz wurde bei jedem Gel 5 µl eines definierten Proteingelmarker (Thermo Scientific, Tabelle A1) in eine Probestasche zur Verifizierung des Molekulargewichtes im Bereich von 20 bis 200 kDa pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 60 V für ca. 30 Minuten zum Durchlaufen des Sammelgels und 120 V im Trenngel bis die Laufmittelfront die Unterkante des Gels erreicht hat.

3.7.1.3 Kolloidale Coomassie Färbung von SDS-Gelen

Zur Detektion der aufgetrennten Proteinbanden wurde eine unspezifische Färbung mit Coomassie Brillant Blau R 250 durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an kationische, unpolare und hydrophobe Proteine, wodurch eine Vielzahl von Proteinen nachgewiesen werden können¹⁴⁹. Das Gel wurde ca. 2 Stunden in der Fixierlösung (Tabelle 4) bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler (IKA-Vibrax-VXR, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einer Färbelösung (Tabelle 5) über Nacht inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurde das Gel unter mehrmaligen Wechsel des genutzten VE-Wassers entfärbt. Die Auswertungsbilder wurden mit einem Geldokumentationssystem (VersaDoc Imaging System 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgenommen.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Fixierlösung.

Chemikalien	Zusammensetzung
Essigsäure	10 %
Ethanol (96 %, vergällt)	50 %

Tabelle 5: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.

Chemikalien	Zusammensetzung
Coomassie-Stammlösung	375 ml
2 % o-H ₃ PO ₄	
10 % (NH ₄) ₂ SO ₄	
0,1 % Coomassie Brillant Blau G250	
Methanol	125 ml

3.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und zur Kontrolle der erfolgreichen Proteinentfernung aus den Lipid- und Peptidoglykanisolaten wurde eine modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry unter Verwendung eines Proteintestkits (Total Protein Kit, Sigma Diagnostics, Deisenhofen) durchgeführt¹⁵⁰. Dieses Verfahren beruht im ersten Schritt auf einer Biuret-Reaktion bei der im Alkalischen ein blauer Cu(II)-Peptid-Komplex gebildet wird. Anschließend erfolgt eine Reduktion von Cu(II) zu Cu(I), welches das gelbliche Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau reduziert. Dieser Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=750$ nm quantitativ detektiert. Dafür wurden 1-10 μ l Probe mit 0,1 M NaCl-Lösung auf 50 μ l aufgefüllt und 1:1 (v/v) mit Deoxycholatlösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden 50 μ l Trichloressigsäure (70 %ig) zugegeben und das gebildete Präzipitat durch Zentrifugation (15 Minuten, 15000 x g, 20 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml Lowryreagenz aufgenommen und 1:1 (v/v) mit Reinstwasser verdünnt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurden 250 μ l Folin-Ciocalteu-Reagenz zugegeben und der Reaktionsansatz wurde erneut für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung (μ Quant MQX200, BIO-TEK Instruments, Winooski (VT), USA). Zur Kalibrierung und Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine Rinderserumalbuminlösung (0-400 μ g/ml) verwendet, welches analog der Proben behandelt wurde.

3.7.3 Dünnschichtchromatografie zur Lipidcharakterisierung

Zur Charakterisierung der isolierten Lipide diente die Dünnschichtchromatografie (DC). Hierbei wurde das zu analysierende Substanzgemisch auf einer stationären festen Phase aufgetragen und durch spezifische Wechselwirkungen unter Verwendung einer flüssigen mobilen Phase aufgetrennt¹⁵¹. Durch verschiedene Visualisierungsmethoden wie z. B. UV-Aktivität oder Färbetechniken können die einzelnen Komponenten dargestellt werden. Der Trennerfolg wurde anschließend über den Retentionsfaktor (R_f) beschrieben. Der R_f -Wert einer Substanz ist als Quotient der zurückgelegten Strecke des Substanzfleckes von der Startlinie auf der stationären Phase und der Gesamtlauflänge (Start- bis Endlinie) des Eluentengemisches definiert und wurde als einheitenloser Zahlenwert angegeben. Optimal liegt dieser Wert zwischen 0,3 und 0,6¹⁵². Für die Auftrennung der Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurde eine mobiles Eluentengemisch von Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis von 60:35:8 gewählt. Dieses zeigte in vorangegangenen Untersuchungen mit Modelllipiden wie z. B. Lecithin (Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-gruppen), 1,2-Dioctadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin den besten Trennerfolg^{153, 154}.

Die lyophilisierten Lipidproben wurden in wenig Eluentengemisch gelöst, 2-5 μ l Probe wurde mit Hilfe einer Glaskapillare auf die stationäre Phase aufgetragen und das Lösungsmittelgemisch wurde abgedampft. Als stationäre Phase diente eine immobilisierte 0,2 mm Kieselgel-60-Schicht mit Fluoreszenzindikator (Polygram[®] SIL G/UV254, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Als Referenzproben wurden erneut Lecithin, 1,2-Dioctadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin eingesetzt. Die präparierten DC-Platten wurden solange in eine Entwicklungskammer mit dem vorgelegten Lösungsmittelgemisch gestellt bis dieses die vordefinierte Laufmittelstrecke zurückgelegt hat. Nach dem anschließenden Abdampfen der mobilen Phase wurden die Platten in eine 0,2 %ige ethanolische Ninhydrinlösung getaucht und anschließend bei 105 °C im Trockenschrank zum Stabilisieren der Farbflecke gelegt. Diese Lösung hat sich als ideal zum Anfärben von Aminophosphatiden herausgestellt^{155, 156}. Zusätzlich erfolgte ein weiteres Anfärben mit ethanolischer 0,01 %iger Fluoreszinlösung und der Detektion der Substanzgemische unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) zur Detektion der ungesättigten Fettsäuren der Lipide¹⁵⁵.

3.7.4 Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie zur Lipidcharakterisierung

Die isolierten Lipide beider untersuchter Bakterienstämme und die Referenzlipide wurden mit einem Tandem-Quadrupol Massenspektrometer (Xevo TQ-S, Waters Corporation, Milford (MA), USA) für UPLC/MS/MS Anwendungen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung des HZDR analysiert. Die Datenauswertung erfolgte mittels der Gerätesoftware masslynx 4.2. Als Ionisierungstechnik wird bei dem verwendeten Gerät die Elektronensprayionisation (ESI) eingesetzt. Dabei werden die gelösten Probenmoleküle mit dem Lösungsmittel in ein Kapillarsystem injiziert und an einer Düse, an welcher eine Hochspannungsquelle anliegt unter Druck versprüht. Die

durch die Hochspannung erzeugten feinen Elektronentröpfchen werden zum Detektor hin beschleunigt und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels als reine geladene Probenmoleküle und -fragmente detektiert. In den Untersuchungen wurden die Proben sowohl im positiven Ionisationsmodus (ES+) und negativen Ionisationsmodus (ES-) analysiert. Die eigentliche Detektion der Probenmoleküle erfolgte im Quadrupolmassenspektrometer entsprechend der spezifischen Masse zu Ladungsverhältnisse (m/z) der ionisierten Moleküle nach durchqueren des Quadrupols. Die Signale wurden anschließend verstärkt und die Daten zur Auswerteeinheit weitergeleitet.

Die lyophilisierten Proben und Referenzsubstanzen wurden in Chloroform gelöst und eine Konzentration von 5 mg/ml wurde eingestellt. Kurz vor der Messung erfolgte eine Verdünnung der Proben auf 1:10 bis 1:20 (v/v) mit Methanol für ES+ Messungen und eine weitere Verdünnung von 1:10 (v/v) mit Methanol erfolgte zur Messung der Proben im ES- Modus. Diese Verdünnungen waren notwendig, um eine hinreichende Signalqualität für die Messungen zu erhalten. Anschließend wurden die Proben in das Kapillarsystem (Flussrate 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) injiziert.

3.7.5 Gaschromatografie zur Identifizierung des Lipidfettsäureprofils

Zur Charakterisierung der isolierten Lipide aus der Zellwand der genutzten Mikroorganismen wurde die Gaschromatografie (GC) in Kopplung mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) genutzt. Die Messungen erfolgten am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ Leipzig) in der Arbeitsgruppe von Dr. Hermann Heipieper der Abteilung Umweltbiotechnologie. Hierbei werden leichtflüchtige Verbindungen in einem Trägergasstrom durch eine dünnen Kapillare, auf welcher die stationären Phase immobilisiert ist, geleitet, diese interagieren entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften unterschiedlich mit der stationären Phase und werden so aufgetrennt. Der genutzte massenstromabhängige Flammenionisationsdetektor ionisiert die Moleküle der zu untersuchenden Probe in einer Wasserstoffflamme und am Detektor wird der resultierende Ionenstrom gemessen, verstärkt und analysiert. Die GC-FID dient bei diesen Untersuchungen nicht nur als qualitative Analyseverfahren zur Detektion der hydrophoben Fettsäurereste sondern vielmehr auch als quantitative Methode, die Aufschluss über die Fettsäurezusammensetzung im Probengemisch gibt.

3.7.5.1 Derivatisierung der Lipide mit Bortrifluorid

Zur Detektion der hydrophoben Fettsäurereste der isolierten Lipide musste zunächst eine Abspaltung der Fettsäureketten von den Lipiden und eine anschließende Derivatisierung zu den jeweiligen Methylestern durchgeführt werden¹⁴³. Dies war notwendig, da die Fettsäuren nicht flüchtig und schlecht detektierbar sind. Die leicht flüchtigen Methylsterinderivate hingegen eigneten sich ideal zur Detektion mittels GC-FID. Die lyophilisierten Lipide (10 mg) wurden mit 0,6 ml des Methylierungsmittels Bortrifluorid-Methanol ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$) versetzt und im Wasserbad bei 80 °C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils 0,3 ml Reinstwasser und 0,5 ml *n*-Hexan zugegeben und kurz geschüttelt (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA). Anschließend wurde die obere *n*-

Hexan Phase mit einer Glaspasteurpipette abgenommen und für die Messungen in GC-Fläschchen überführt. Zur Konzentration der Lösung wurde das organische Lösungsmittel durch einen Stickstoffstrom abgedampft und erneut in 0,15 ml *n*-Hexan aufgenommen. Die Lösung wurde direkt für GC-FID Messung genutzt.

3.7.5.2 GC-FID Messungen

Die hergestellten Fettsäuremethylester (engl. fatty acid methyl ester, FAME) wurden mit einem GC-FID (Agilent 6890N, Agilent Technologies, Palo Alto (CA), USA) bestimmt. Die Aufzeichnung der Chromatogramme und die Integration der Peakflächen erfolgten mit Hilfe der Software Agilent ChemStation. Die FAME-Standardlösungen zur Identifizierung Fettsäuremethylester stammten von der Firma Sigma Aldrich (München). Die genutzte Silica-Säule ist für die Messung von FAMEs besonders geeignet. In Tabelle 6 sind die Parameter für die Gerätekonfigurationen dargestellt.

Tabelle 6: Parameter zur GC-FID Messung.

Säule:	Chromopack Capillary Column (Firma VARIAN, Darmstadt) CP7488 (CP-SIL 88 für FAME), 50 m Länge; 0,25 mm Innendurchmesser, 0,2 µm Filmdicke
Mobile Phase:	Helium
Split:	splitlos
Injektortemperatur:	240 °C
Detektor:	Flammenionisation
Detektortemperatur:	270 °C
Einspritzvolumen:	1 µl
Flussrate:	2,0 ml/min
Temperaturprogramm:	Start: 40 °C isotherm für 2 Minuten Steigerung: 8 °C/min auf 220 °C isotherm: 220 °C für 5 Minuten
Druck:	Start: 27,7 psi für 2 Minuten Steigerung von 0,82 psi/min auf 45,7 psi isobar 8,6 Minuten

3.8 Untersuchung des Sorptionsverhaltens isolierter Zellwandkomponenten und Bakterien

3.8.1 Auswahl der genutzten Metalle und Versuchsbedingungen

Zur Untersuchung der Metallinteraktionen mit Biomolekülen wurden vitale Zellen der Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 und deren isolierte primären Zellwandkomponenten (Membranlipide, S-Layer-Proteine und Peptidoglykane) genutzt. Die Auswahl der Metalle und Metalloide (As, Au, Cd, Eu, Pb, Pd, Pt, U) erfolgte hinsichtlich der Aspekte für umwelt- und strategische Relevanz die unter Kapitel 1.4 beschrieben wurden. In Tabelle A1 sind die entsprechenden Metallsalze und deren Reinheitsstufen aufgeführt, die für die Sorptions- und Beschichtungsversuche und Abscheidungsversuche genutzt wurden.

3.8.2 Durchführung der Sorptionsversuche im Batch-Verfahren

Die Bestimmung der Metallsorptionsraten der einzeln untersuchten Biomoleküle und intakter Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 mit den Metallsalzlösungen erfolgten im Batch-Verfahren. Hierfür wurden die Biomoleküle und Zellen mit sterilfiltrierter physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) in Polypropylenröhrchen (Probengesamtvolumen 10-15 ml) vorgelegt und auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt. Der pH-Wert wurde mittels verdünnter Salzsäure und Natronlauge auf pH=6,0 voreingestellt. Als Biomoleküle wurden die primären Zellwandbestandteile S-Layer-Proteine, Lipide, Peptidoglykan und intakte Bakterienzellen der beiden Mikroorganismen untersucht. Die Metallsalze wurden in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und dem Ansatz zugegeben. Der pH-Wert für die Sorption war selbsteinstellend entsprechend der jeweiligen Metallsalzlösung (Abbildung A 1). Die Konzentrationen der Metallsalze und Biokomponenten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Eingesetzte Konzentrationen an Biomolekülen und Metallsalzen für die Sorptionsversuche.

	Intakte Zellen	S-Layer	Lipide	Peptidoglykan	Referenz
Metallsalzkonzentration	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Biokomponente	OD=0,5	1 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	0 g/l

Der Ansatz wurde bei 4 °C über 48 Stunden unter kontinuierlichem Schütteln (Rotator Multi RS-60, Lab4You, Berlin, Deutschland) inkubiert. Nach den gewählten Zeitpunkten (Tabelle 8) erfolgte jeweils die Probenahme zur Bestimmung der sorbierten Metallmenge durch die Biokomponente. Hierfür wurden je 1 ml aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Biokomponente durch Zentrifugation (15000 g, 4 °C, 30 Minuten) von dem nicht sorbierten Metallsalz im Überstand separiert. Nach den letzten Probenahmen wurde das Reaktionsgefäß mit 1 ml 0,1 M Salpetersäure gespült und der Metallgehalt der Spüllösungen wurde mittels ICP-MS bestimmt. Die Metallkonzentration im Überstand

wurde ebenfalls mittels ICP-MS Messungen (Kapitel 3.8.3) bestimmt. Das Sorptionsverhalten der einzelnen Komponenten erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Ebenfalls wurde Referenzproben, welche keine Biokomponenten enthielten, untersucht, um eventuelle Sorptionseffekte der Metallsalze mit der Gefäßwand der Proberöhrchen oder Präzipitationen der Metalle auszuschließen.

Tabelle 8: Zeitpunkte der Probennahmen während der Sorptionsversuche.

Probe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zeit (h)	0,00	0,17	0,33	0,5	1	2	3	4	6	24	48

3.8.3 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) zur Analyse des Metallgehalts

Zur Bestimmung der Metallkonzentrationen im Überstand der Proben aus dem Batch-Versuchen wurde die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) (Elan 9000, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden die Proben mit hochreiner 1 %iger HNO₃ auf eine Konzentration von ca. 10 µg Metall/l (ca. 10 ppb) verdünnt und auf ein Endvolumen von 10 ml mit Reinstwasser verdünnt. Die hier gewählte Verdünnungsstufe gewährleistet eine verlässliche Messung bezugnehmend auf die Detektionsgrenzen des genutzten Systems¹⁵⁷. Zur Verifizierung der Messungen wurden 50 µl (1 mg/ml) Rhodium als interner Standard zugesetzt. Dieser dient aufgrund seiner spezifischen Charakteristika wie Molekulargewicht, Monoisotropie und hoher Ionisationsrate zur Korrektur der Messungen im Falle von Systemstörungen, Drifterscheinungen durch Zusetzen des Zerstäubersystems, Verkrusten von Sampler und Skimmer, Wechselwirkungen mit der Matrix oder Säureeffekte, was sich sowohl auf die Intensität der zu messenden Metallionen als auch auf den internen Standard auswirken kann¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Die Metalllösungen, Standards, Säuren und Spüllösungen wurden über eine peristaltische Pumpe zur ICP-MS transportiert. Nach 10 Proben wurde die ICP-MS gespült und ein Kontrollstandard vermessen. Bei den Messungen der Goldmetallsalzlösungen wurde nach jeder zweiten Probe die ICP-MS mit einem HCl/HNO₃ (100 µl HCl_{konz.} pro 10 ml 1 %iger HNO₃) gespült. Die Messdatenausgabe und der Datenexport erfolgten mittels des Programms „Elan“ (PerkinElmer, Rodgau, Deutschland). Für die Datenauswertung wurden die Metallsorptionsrate (q und q_{max} in mg Metall/g Biomolekül) und die Metallentfernungseffizienz (RE in %) bestimmt. Die Berechnungen beider Werte sind in Gleichung 1-3 dargestellt. Die Ausgangskonzentrationen der eingesetzten Metalle wurden in der Referenzproben der Metallsalzlösung bestimmt und die Proben auf 1 mM Metallsalz normiert.

$$q = \frac{V (c_s - c_e)}{m} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

$$q_{max} = \frac{V (c_s - c_{max})}{m} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

$$RE (\%) = \frac{(c_s - c_e)}{c_s} \cdot 100 \quad \text{(Gleichung 3)}$$

In Gleichung 1-3 steht c_s für die Startkonzentration des zu untersuchenden Metalls (mg/l), c_e für die Endkonzentration des Metalls (mg/l) zu jedem Probenzeitpunkt im Zentrifugationsüberstand, V für das Volumen (l) und m (g) für die Trockenmasse der entsprechenden biologischen Komponente. Der Wert q_{\max} gibt die maximale Metallsorptionsrate der entsprechenden biologischen Probe mit dem untersuchten Metall zu einem Zeitpunkt t an. Zur Fehlerberechnung wurde ein kritischer t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % unter Nutzung der statistischen Streuung der Dreifachbestimmung der Sorptionswerte durchgeführt. Die Berechnungen zur Fehlerbetrachtung sind in den Gleichungen 4-7 dargestellt.

$$\sigma = \sqrt{\text{Var } X} \quad \text{Gleichung 4} \quad \text{Standardfehler } (\sigma)$$

$$s = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} \quad \text{Gleichung 5} \quad \text{Standardabweichung } (s)$$

$$\bar{X} - t_{\text{krit}} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad ; \quad \bar{X} + t_{\text{krit}} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 6} \quad \text{Kritischer t-Test } (t_{\text{krit}})$$

$$\bar{X} - t_{\left(1-\frac{\alpha}{2}; n-1\right)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad ; \quad \bar{X} + t_{\left(1-\frac{\alpha}{2}; n-1\right)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 7} \quad \text{Wahrscheinlichkeit } \alpha$$

3.9 Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D)

3.9.1 Theoretische Grundlagen

Die Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D, *englisch Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*) ist ein Messverfahren, welches in der Lage ist, minimalste Massenänderungen bis in den Nanogramm-Bereich (ng/cm^2) zu detektieren. Die Basis dieser Methode beruht dabei auf dem piezoelektrischen Effekt von Quarzschwingquarzen, welche durch das Anlegen einer externen Wechselspannung zum Schwingen an deren Resonanzfrequenz (f_0) angeregt werden. Dieses stabile Schwingungsverhalten des Quarzes kann unmittelbar für analytische Fragestellungen der Massenadsorption und -desorption genutzt werden. Diese Beziehung der direkten Korrelation zwischen der zu messenden Frequenzänderung wurde erstmals 1959 in der für diese Methode fundamentalen Veröffentlichung von Günther Sauerbrey beschrieben und gilt bis heute als Grundlage für alle Messungen¹⁶¹. Die aus diesen Arbeiten entwickelte Formel, die sogenannte Sauerbrey-Gleichung (Gleichung 8-11) beschreibt die proportionale Massebeladung des Quarzes zur Frequenzänderung in Abhängigkeit der sogenannten Sauerbrey-Konstante. Dabei beschreibt Δf die Frequenzänderung, Δm die Massenänderung, f_0 die Resonanzfrequenz, A die aktiv zugängliche Sensoroberfläche, ρ_q die Quarzdichte mit $2648 \text{ kg}/\text{m}^3$ und μ_q das effektive Schermodul des Quarzes mit $2,957 \cdot 10^{10} \text{ N}/\text{m}^2$ und der Faktor C die Sauerbrey-Konstante.

$$\Delta f_n = -\frac{2 \cdot f_0^2}{\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} \cdot \frac{\Delta m}{A} \cdot \frac{1}{n} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

$$C = -\frac{2 \cdot f_0^2}{\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} = -17.7 \frac{ng}{cm^2 \cdot Hz} \quad \text{(Gleichung 9)}$$

$$\Delta f_n = -C \cdot \frac{\Delta m}{A} \cdot \frac{1}{n} \quad \text{(Gleichung 10)}$$

$$\Delta f_{norm} = -C \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad \text{(Gleichung 11)}$$

Die bei den Messungen verwendeten Schwingquarze wurden aus einem alpha-Einkristall mit einer definierten Orientierung in Bezug zur kristallographischen Achsen geschnitten, um den piezoelektrischen Effekt zu nutzen. Grundsätzlich wird dabei zwischen dem direkten und indirekten Effekt unterschieden. Beim direkten piezoelektrischen Effekt führt ein mechanischer Druck auf den Kristall zu einer elektrischen Spannung auf der Oberfläche. Beim indirekten piezoelektrischen Effekt wird die mechanische Verformung des Kristalls durch das Anlegen einer Wechselspannung hervorgerufen. Dabei ist dieser Effekt abhängig von der Orientierung der Kraft und der angelegten Spannung relativ zu den Kristallachsen¹⁶². Daher ist es unabdingbar, dass die Schwingquarze in einer definierten Orientierung geschnitten werden. Für die Versuche wurden wie in Abbildung 10 dargestellt AT-geschnittene Quarzkristalle genutzt. Dabei erfolgte der Schnitt in einem Winkel von 35° und 10 Winkelminuten relativ zur optischen Achse.

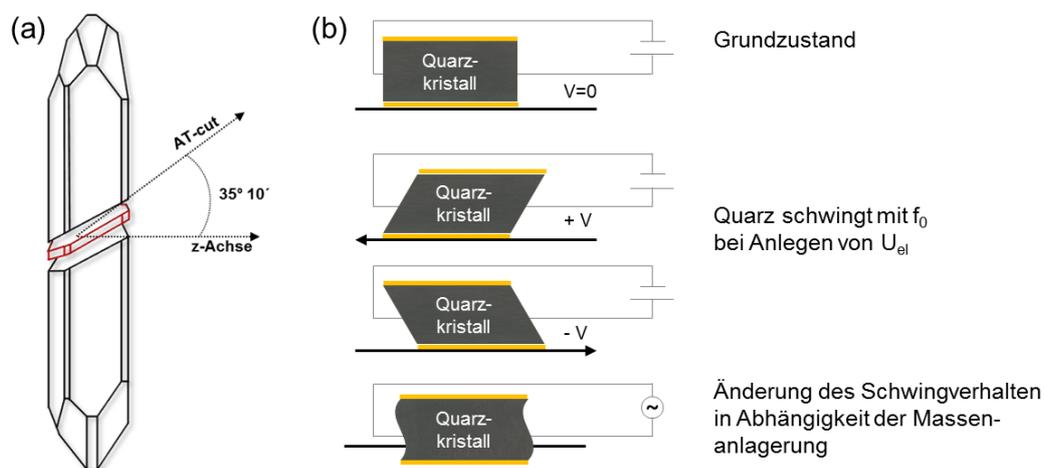


Abbildung 10: a) Darstellung der AT-geschnittenen Quarzkristalle relativ zur z-Achse, b) Auslenkung des Schwingquarzes durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung.

Da die Messgrundlage und die Herleitung der Sauerbrey-Gleichung sich jedoch nur für starre Filme exakt wiedergeben lässt, können bei der Untersuchung von weichen und elastischen Filmen wie z. B. Polymeren und Biomolekülen diese Werte ungenau sein und nur eine Näherung darstellen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät stand zusätzlich die Möglichkeit der Dissipationsmessung zur Verfügung. Durch das Ad- und Desorptionsverhalten der Moleküle an der Sensorgrenzfläche sowie deren Interaktion der Moleküle mit dem umgebenden Medium kann durch ein kurzzeitiges Abschalten

der elektrischen Spannung das Abkling- bzw. Ausschwingverhalten des Kristalls untersucht werden. Dabei sind weiche, hoch viskoelastische Moleküle in der Lage, das Ausschwingverhalten des Quarzes stärker zu beeinflussen als starre kleine Moleküle, welche durch die Interaktion mit der Umgebung z. B. durch Reibung nur eine geringen Energiedämpfung verursachen. In Gleichung 12 ist die Ermittlung des Dissipationswertes (D) aus der Verlustenergie (E_{Verlust}) und der gespeicherten Energie ($E_{\text{gespeichert}}$) dargestellt.

$$D = \frac{E_{\text{Verlust}}}{2 \cdot \pi \cdot E_{\text{gespeichert}}} \quad (\text{Gleichung 12})$$

3.9.2 Modellierungsmethoden

Aufgrund der Tatsache, dass die beschriebene Sauerbrey Beziehung zur Ermittlung der abgeschiedenen Massen über die Frequenzänderung nur für starre Filme exakt anwendbar ist, wurde zusätzlich zu dem Sauerbrey-Modell das Kelvin-Voigt-Modell zur Darstellung der Abscheidung von Biomolekülen genutzt^{163, 164}. In dieses Modell fließen u. a. die gemessenen Dissipationswerte ein, Flüssigkeits- und Layerviskositäten, welche zusätzliche Aussagen zu den viskoelastischen Eigenschaften der abgeschiedenen Schichten zulassen. Dieses Modell hat sich zur Analyse von viskoelastischen Schichten wie z. B. Proteinen und anderen Biomolekülen in verschiedenen Arbeiten als ideal herausgestellt^{165, 166}. Da jedoch für starre und hinreichend dünne Schichten Gleichung 11 eine gute Näherung ist, wird die adsorbierte Massenempfindlichkeit durch die Molekülabscheidung auf der Sensoroberfläche normiert auf den spezifischen Oberton ohne Berücksichtigung auf Reibungseffekte in dieser Arbeit vergleichend zu dem Kelvin-Voigt-Modell beschrieben. Beide Modelle sind in der Software QTools3 hinterlegt und wurden für die Datenauswertung genutzt. Zusätzlich zur Ermittlung der Massenabscheidung erfolgte die Modellierung der resultierenden Schichtdicken. Zur Modellierung der Daten wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Parameter genutzt. Dabei ist vor allem die Dichte des entstehenden Proteinlayers ein entscheidender Faktor. In verschiedenen Forschungsarbeiten sind Dichteveriationen von $1,0 \text{ g/cm}^3$ bis ca. $1,5 \text{ g/cm}^3$ zu finden, welche jeweils nur als Näherungen für den entsprechende Proteinfilm zu sehen sind und die Einlagerung und Interaktion von Wasser mit einbeziehen¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Für die Auswertung wurde in dieser Arbeit eine Dichte von $1,350 \text{ g/cm}^3$ zu Grunde gelegt, welche bei Untersuchungen mit anderen S-Layer-Proteinen bereits erfolgreich genutzt wurde. Für die Berechnung der Schichtdicken nach der Metallinteraktion wurde ebenfalls dieser Wert genutzt, da hier ebenfalls S-Layer-Proteine als Schichtuntergrund dienten.

Tabelle 9: Parameterauflistung zur Modellierung nach dem Kelvin-Voigt-Modell.

Parameter	Werte	Modellierungs- /Parametereinstellung
Dichte $\rho_{\text{Protein/Biomolekül (-abscheidung)}}$ ¹⁶⁸	1,350 g/cm ³	konstant
Dichte $\rho_{\text{Metall- und NP-Interaktion}}$	1,350 g/cm ³	konstant
Dichte $\rho_{\text{Fluid (wässrige Lösungen)}}$	1,080 g/cm ³	konstant
Viskosität $\eta_{\text{Fluid (Wasser bei T=25°C)}}$	0,001 kg/m·s	konstant
Viskosität η_{Layer}	0,0005-0,01 kg/m·s	variabel
Schermodul μ_{Layer}	10 ⁴ -10 ⁸ Pa	variabel
Schichtdicke d_{Layer}	0,01-1000 nm	variabel
Massenabscheidung m	1·10 ⁻⁸ -0,001 kg/m ²	variabel

3.9.3 Allgemeiner Versuchsaufbau und Gerätespezifikationen

Für die Rekristallisationsversuche der S-Layer-Proteine, sowie für die Metallsorptionsversuche mittels Quarzmikrowaage wurde ein Durchflussverfahren genutzt, welches schematisch in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Untersuchungen wurden mit dem Q-sense E4 System (Q-Sense AB, Göteborg, Schweden) durchgeführt, welches mit 4 geschlossenen Durchflussmodulen QFM 401 ausgestattet wurde. Zusätzlich erfolgte für die Versuche der Lipiddoppelschichtausbildung die Nutzung des Q-sense E1 Systems (Q-Sense AB, Göteborg, Schweden) mit der offenen Messzelle QOM 401. Für die Versuche im Durchflussverfahren wurde eine peristaltische Pumpe ((IPC-N4) IBM935C, Ismatec, IDEX Health und Science GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland), welche den Messmodulen nachgeschaltet war, eingesetzt.

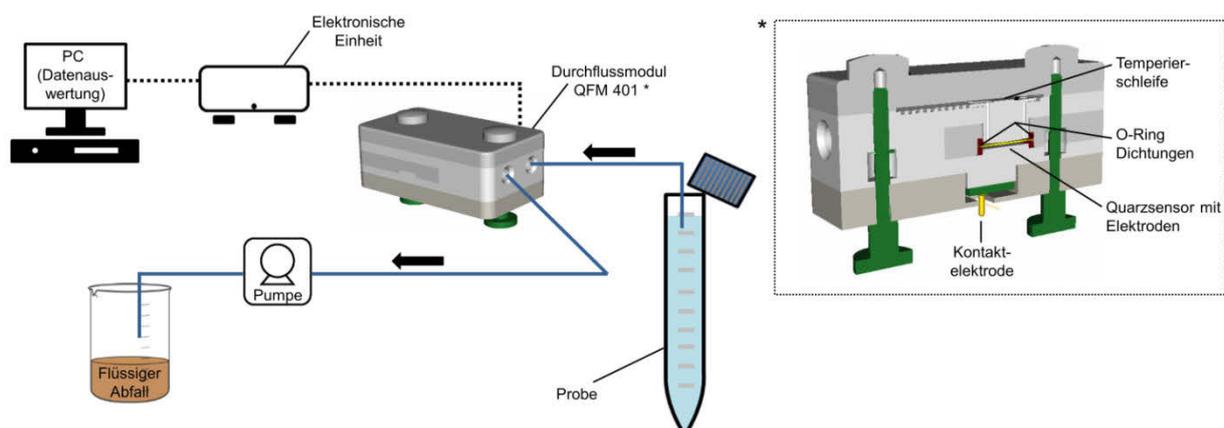


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der QCM-D Versuche im Durchflussmodus (links); Querschnitt des Durchflussmoduls QFM 401 (rechts), adaptiert nach Q-Sense (2006)¹⁷¹.

Bei allen Messungen wurden piezoelektrische AT-geschnittene Quarzkristallsensoren, welche mit einer 50 nm Schicht Siliziumdioxid (QSX 303) beschichtet waren, verwendet. Die tatsächliche aktive Sensoroberfläche weist dabei einen Durchmesser von 14 mm auf. Auf der Kristallunterseite erfolgt die Anregung des Schwingquarzes über goldkontaktierte Fläche (Abbildung 12), über welche die

Datenübermittlung der Frequenz- und Dissipationswerte erfolgt. Die Grundfrequenz (Resonanzfrequenz) der SiO_2 dotierten Kristalle beträgt durchschnittlich 5 MHz.

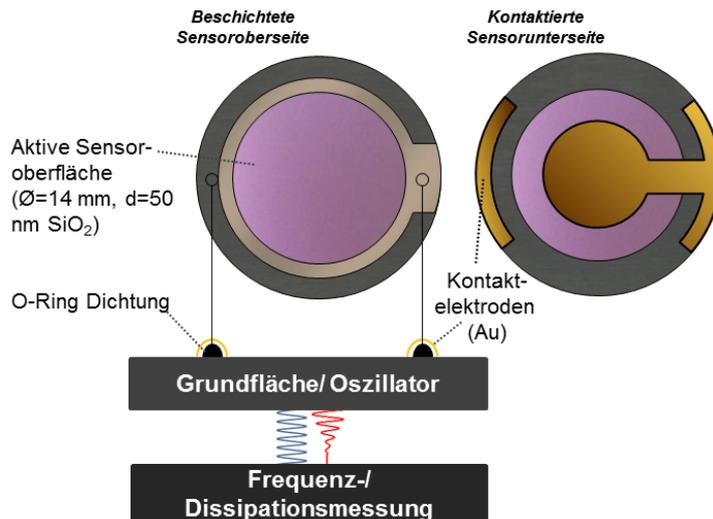


Abbildung 12: Vereinfachte grafische Darstellung des Messaufbaus der verwendeten SiO_2 beschichteten Quarzkristalle (QSX 303).

Die entsprechenden Messbedingungen, Probenvorbereitungen und Reinigungsmethoden sind nachfolgend beschrieben. Die Datenaufnahme erfolgte mittels der Software QSoft3 (Q-Sense AB, Göteborg, Schweden) und die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der gerätespezifischen Software QTool3 unter Verwendung beschriebener Modellierungsmethoden nach Sauerbrey und Kelvin-Voigt (Kapitel 3.9.2).

3.9.4 Reinigung der QCM-D Kristalle und Messvorbereitungen

Die verwendeten Durchflussmodule inklusive des Schlauchsystems (Tetrafluorethylen-Perfluorpropylen (FEP), 0,8 x 1,6 mm, Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) wurden zur Entfernung von organischen Verunreinigungen mit 20 ml 2 %iger (v/v) Hellmanex III-Lösung je Kammer und anschließend intensiv mit 40 ml Reinstwasser je Kammer gespült. Zur Entfernung von Metallsalzen wurde zusätzlich mit 10 ml 1 M HNO_3 und 20 ml Reinstwasser gespült. Die Quarzsensoren wurden vor dem Versuchsbeginn außerhalb der Messmodule für 60 Minuten in 2 %iger (w/v) SDS-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend intensiv mit Reinstwasser gespült^{172, 173}. Anhaftungen von Metallsalzen oder Metallnanopartikeln wurden durch Inkubation der Kristalle in 1 M HNO_3 Lösung und anschließendem Spülen mit Reinstwasser entfernt. Danach wurden die Sensoren mit ölfreier Druckluft getrocknet und in einer Ozonkammer (Bioforce Nanoscience, Ames (IA), USA) für mindestens 20 Minuten gereinigt^{174, 175}. Die Reinigungsprozedur wurde zwei Mal wiederholt.

3.10 Untersuchungen der Adsorption von Biomolekülen auf Oberflächen mittels QCM-D

3.10.1 Rekrystallisation von S-Layer-Proteinen auf nicht modifizierten SiO₂-Oberflächen

Zur Adsorption von S-Layer-Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurden die SiO₂ Kristalle entsprechend (Kapitel 3.9.4) gereinigt und für den Beschichtungsversuch als technische Oberfläche verwendet. Nach dem Einspannen der Sensorkristalle in die Durchflussskammern erfolgte zunächst die Äquilibration in Reinstwasser bei 25 °C für ca. 1 Stunde und einer Flussrate von 125 µl/min. Anschließend wurde ein Flüssigkeitsaustausch gegen sterilfiltrierten Rekrystallisationspuffer (pH=8,0) durchgeführt und der Sensor wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie von Frequenz- und Dissipationsänderung äquilibriert. Die lyophilisierten S-Layer-Polymere wurden 1:1 (v/v) in Reinstwasser und 8 M Harnstofflösung aufgenommen, um die polymeren Strukturen in niedermolekulare Subeinheiten zu überführen. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 15000 g für 60 Minuten und 4 °C zentrifugiert, um größere Proteinagglomerate abzutrennen. Die Monomerlösung wurde mit Rekrystallisationspuffer versetzt und direkt für die Beschichtungsversuche genutzt. Hierzu wurde die Proteinlösung mit dem Puffer auf eine Konzentration von 0,2 g/l verdünnt und mit einer Durchflussrate von 125 µl/min bei 25 °C über die nicht modifizierten SiO₂ Kristalle mittels einer peristaltische Pumpe zugegeben. Der Durchfluss wurde für 30 Minuten beibehalten und anschließend zur weiteren Rekrystallisation abgeschaltet. Nach Einstellen konstanter Kennlinien für Frequenz- und Dissipationsänderung erfolgten diverse Spülschritte mit Rekrystallisationspuffer und Reinstwasser (pH=6,0), um die Stabilität der abgeschiedenen Proteinschicht zu testen.

3.10.2 Rekrystallisation von S-Layer-Proteinen auf Polyelektrolytmodifizierten SiO₂-Oberflächen

Um die Rekrystallisation von S-Layer-Proteinen auf technischen Oberflächen wie Siliziumdioxid zu verbessern und um diese reproduzierbar, effizient und schnell zu realisieren, ist die Einführung von Oberflächenmodifizierungen unabdingbar^{176, 177}. Im Folgenden wird die Implementierung von Polyelektrolyten als Zwischenschicht zwischen Substrat und Proteinschicht beschrieben, welche eine signifikante Verbesserung der Proteinadsorption bezüglich Beschichtungskinetik und dem Bedeckungsgrad auf Oberflächen gewährleisten sollen.

3.10.2.1 Layer by Layer Technik zum Aufbau von Polyelektrolytschichten

Toca-Herera; J. L. et al. (2005) zeigten bereits den positiven Effekt von Polyelektrolyten als Haftvermittler für die Rekristallisation von S-layer-Proteinen auf¹⁷⁷. In deren Studie wurde der Einfluss der einheitlichen negativen Oberflächenladung durch die Polyelektrolytbeschichtung auf das Rekristallisationsverhalten der Proteine untersucht. In dieser Arbeit wurden die Quarzkristalle mit alternierenden Polyelektrolytschichten nach dem Layer-by-Layer Verfahren (LbL) über das Dip-Coating Verfahren (Tauchverfahren) modifiziert^{178, 179}. Die gereinigten Quarzkristalle (Kapitel 3.9.4) wurden dafür in 3 g/l Polyethyleniminlösung (PEI, MW 25000, Sigma) getaucht und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Substrate intensiv mit Reinstwasser gespült und für weitere 10 Minuten in einer 3 g/l Polystyrolsulfonatlösung (PSS, MW 70000, Sigma) inkubiert. Zum Aufbau von mehrlagigen Schichten wurden die Arbeitsschritte bis zum Erreichen der gewünschten Schichtanzahl wiederholt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten in den Polyelektrolytlösungen erfolgte ein intensives Spülen mit Reinstwasser. Als abschließenden Schritt wurden die Substrate nach erfolgter Beschichtung für 10-20 Minuten in Reinstwasser inkubiert. Die für die QCM-D genutzten Modifikationen bestanden aus drei PE-Schichten beginnend und endend mit PEI zur Generierung einer einheitlichen positiven Oberflächenladung.

3.10.2.2 S-Layer Rekristallisation auf polyelektrolytmodifizierten SiO₂-Oberflächen

Die PE beschichteten Siliziumdioxid Quarze wurden in die Durchflussmodule eingespannt und mit Reinstwasser (T=25 °C, 1 h, Flussrate 125 µl/min) und anschließend mit dem Rekristallisationspuffer (1,5 mM TRIS, 10 mM CaCl₂, pH=8,0) bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie der Frequenz- und Dissipationswerte äquilibriert. Die Rekristallisation der S-Layer-Polymere erfolgte analog den Versuchsbedingungen der Proteinadsorption ohne PE-Modifizierung, welche in Kapitel 3.10.1 beschrieben wurde.

3.10.3 Erzeugung von Lipid-Bilayern auf nicht modifizierten SiO₂-Oberflächen

Die Ausbildung einer geschlossenen Lipiddoppelschicht wurden mit den auf Basis von Lecithin hergestellten SUVs (Kapitel 3.6.6) durchgeführt. Die Messungen erfolgten sowohl im Durchflussmodul (QFM 401) als auch mit der offenen Messzelle (QOM 401).

Die gereinigten SiO₂ Kristalle (Kapitel 3.9.4) wurden nach Einspannen in die entsprechenden Module zuerst mit Reinstwasser (T=20 °C, 1 Stunde, Flussrate 125 µl/min) und anschließend mit dem Lipidpuffer (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH=8,0) bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie der Frequenz- und Dissipationswerte äquilibriert. Bei Verwendung des offenen Moduls erfolgte zum äquilibrieren jeweils ein fünffacher Austausch von je 300 µl der genutzten Lösungen. Die Vesikelsuspension ($c_{\text{Lipide}} \approx 100 \mu\text{g/ml}$, $\varnothing \approx 35 \text{ nm}$) wurde mit einer Flussrate von 125 µl/min über die Sensorkristalle geleitet, um die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht zu verfolgen. Bei Verwendung der

offenen Messzelle erfolgte der Austausch der Pufferlösung mit der auf 20 °C vortemperierten Vesikelsuspension. Die Abscheidung der Vesikel bzw. die Ausbildung der Lipiddoppelschicht (Abbildung 13) wurde bis zum Erreichen konstanter Werte für Frequenz- und Dissipationsänderung durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Umspülen bzw. Austausch der Lösungen mit dem reinen Lipidpuffer zur Verifizierung der Schichtstabilität. Die Datenauswertung erfolgte analog mit den unter Kapitel 3.9.2 beschriebenen Modellierungsmethoden.

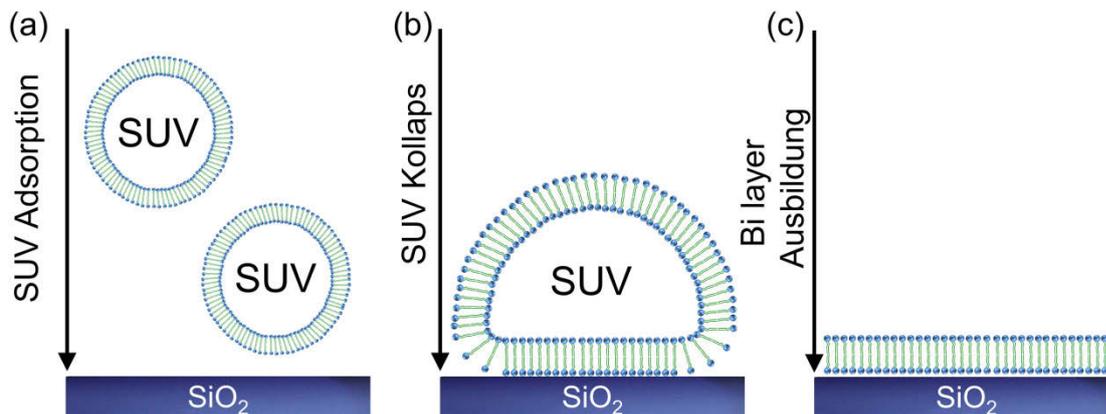


Abbildung 13: Ausbildung einer Lipiddoppelschicht aus SUV.

3.10.4 Abscheidung einer Peptidoglykanschicht

Zur Abscheidung von Peptidoglykan wurden 10 mg/l PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 in Reinstwasser suspendiert. Die Beschichtungsversuche wurden auf PE modifizierten (LbL-Verfahren) und nicht modifizierten Siliziumdioxidsensoren, welche in die Durchflussmodule eingespannt wurden, bei T=25 °C und einer Flussrate von 125 µl/min durchgeführt. Die Sensoroberflächen wurden bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie der Frequenz- und Dissipationswerte äquilibriert. Anschließend wurden die PG+ Suspensionen zugegeben. Die Flussrate wurde nach 3 Stunden auf 100 µl/min reduziert und bis 18 Stunden beibehalten. Anschließend erfolgte eine Zugabe einer weiteren PG+ Lösung (c=100 mg/l). Nach 22 Stunden erfolgte ein intensives Spülen mit Reinstwasser, um nicht gebundenes PG+ von der Oberfläche zu lösen.

3.11 Metall- und Metalloidinteraktion auf rekristallisierten S-Layer-Proteinen

Zur Untersuchung der Metallwechselwirkung von rekristallisierten S-Layer-Proteinen der Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurden diese wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben auf SiO_2 Sensoren rekristallisiert. Anschließend erfolgte das Äquilibrieren mit sterilfiltrierter 0,9 %iger NaCl-Lösung (pH=6,0). Die entsprechenden Metallsalzlösungen in den Konzentrationen von 1 mM und 5 mM wurden vor dem Versuch in sterilfiltrierter 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und mindestens 24 Stunden vor Zugabe zu den S-Layer-Schichten inkubiert. Nach erfolgter Äquilibrierung der S-Layer-Strukturen durch Spülen mit der NaCl-Lösung erfolgte die Zugabe der Metallsalzlösungen in die Durchflussskammern mit einer Flussrate von 125 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Flussrate der Metallsalzlösungen wurden nach dem Erreichen nahezu konstanter Frequenz- und Dissipationswerte auf 0 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert. Anschließend wurde mit der Äquilibrierungslösung gespült, um die tatsächliche Metallbindung auf den rekristallisierten Proteinschichten bestimmen zu können. Auf Grundlage der in Kapitel 3.9.2 aufgeführten Modelle erfolgte die Auswertung der Daten. Partiiell erfolgte ein Ausbau der Kristalle nach der Metallinteraktion mit den Proteinen zur weiteren Untersuchung mittels Rasterkraftmikroskopie.

3.12 Interaktion von metallischen Nanopartikeln mit S-Layer-Proteinschichten

3.12.1 Synthese von Goldnanopartikeln

Zur Erzeugung von nanopartikulären Gold wurde eine Methode nach Mühlpfordt; H. et al. (1982) adaptiert^{180, 181}. Mit dieser Methode können citratstabilisierte Goldnanopartikel (NP) (Abbildung 14) mit einem sphärischen Durchmesser von 3 -5 nm bzw. 10 -15 nm synthetisiert werden, welche eine hohe Langzeitstabilität aufweisen sollen.

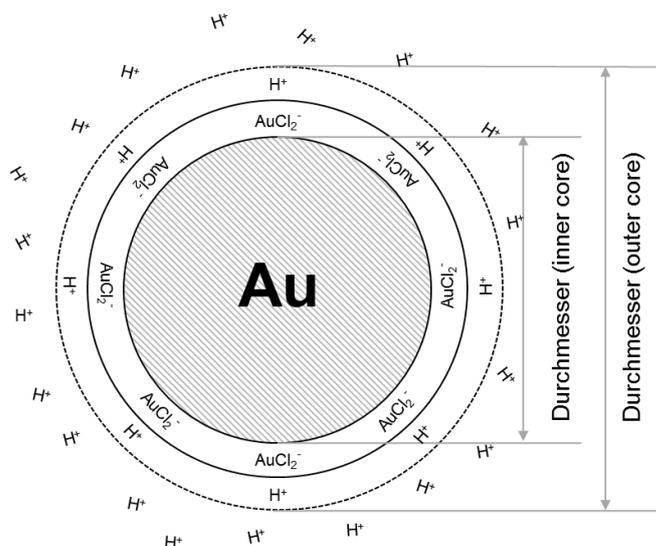


Abbildung 14: Darstellung des Aufbaus der citratstabilisierten Goldnanopartikel, adaptiert nach Hayat, M. A. et al.(1989)¹⁸⁰.

In Vorbereitung zur Synthese erfolgte die Herstellung von 4 Stocklösungen, welche in Tabelle 10 aufgelistet sind. Alle aufgeführten Stocklösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt.

Tabelle 10: Verwendete Stocklösungen zur Synthese citratstabilisierter Goldnanopartikel.

Lösung	Chemikalie	Stoffmenge (mM)
Stock 1	Gold(III)chlorid (HAuCl ₄)	25,0
Stock 2	tri-Natriumcitrat	38,8
Stock 3	Tannin	a) 5,9
		b) 29,8
Stock 4	K ₂ CO ₃	0,25

250 µl der Stocklösung 1 wurden mit 19,75 ml Reinstwasser gemischt und langsam auf 62-63 °C im Wasserbad (Typ WB, Memmert, Schwabach, Deutschland) erwärmt (im Folgenden Syntheselösung 1 genannt). In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 1 ml von Stocklösung 2 mit 2 ml Stocklösung 3 a bzw. 3 b und 1 ml Stocklösung 4 versetzt (Syntheselösung 2). Dieser Ansatz wurde im Wasserbad langsam auf 62-63 °C erwärmt. Nach 30 minütiger Inkubation von Syntheselösung 1 und 2 im Wasserbad erfolgte die Überführung der Syntheselösung 1 in einen vorgewärmten Rundkolben. Der Ansatz wurde bei 62-63 °C unter langsamen Rühren mit Syntheselösung 2 vorsichtig vereinigt und der Syntheseansatz wurde bei der o. g. Temperatur 5 Minuten langsam gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Vereinigung der beiden Lösungen resultierte in einem Farbumschlag von Gelb nach Rot. Die synthetisierten Partikel ($A_{520\text{ nm}}=1,00$) wurden bis zur weiteren Nutzung und Charakterisierung bei 4 °C und/oder bei Raumtemperatur gelagert. Die Größenverteilung der hergestellten Partikel wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt (Kapitel 3.15).

3.12.2 Goldnanopartikelabscheidung auf rekristallisierten S-Layer-Proteinen

Analog Kapitel 3.10.2.2 erfolgte zunächst die Abscheidung der S-Layer-Proteinschichten auf den modifizierten SiO₂-Sensoren. Anschließend erfolgte die Äquilibration der Sensoren mit Citratpuffer (1,6 mM tri-Natriumcitrat, pH=5,0) bis zum Erreichen konstanter Werte der Frequenz- und Dissipationsänderung. Die synthetisierte Goldnanopartikelsuspension ($A_{520\text{ nm}}=1$) wurde anschließend mit einer Flussrate von 125 µl/ml und T=25 °C über die Sensoren in den Durchfluskkammern geleitet. Nach Ende der Nanopartikelabscheidung erfolgte das Spülen mit nanopartikelfreiem Citratpuffer. Die Sensoren wurden anschließend aus den Kammern ausgebaut und mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht.

3.13 Rasterkraftmikroskopie zur Visualisierung von Proteinstrukturen (AFM)

3.13.1 Theoretische Grundlagen

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) ist eine oberflächensensitive Technik, deren Ursprung sich in der Materialwissenschaft findet und erstmals 1986 durch Binnig und Rohrer vorgestellt wurde^{182, 183}. Die Methode ermöglicht die Abbildung der Struktur und Morphologie einer Probe und findet Anwendung im Bereich der Materialwissenschaften aber auch in Bereichen der Physik, Chemie und Biologie. Durch die Möglichkeit, nicht nur feste trockene Substrate sondern auch dünne organische Schichten und biologische Proben unter nativen Bedingungen in Flüssigkeiten zu untersuchen sind diese AFM Untersuchungen im vorliegenden Fall besonders nützlich¹⁸⁴. Somit ist die Erforschung von z. B. Nukleinsäuren, Proteininteraktionen, Zellmembranen und lebenden Zellen und Mikroorganismen im nanoskaligen Bereich möglich¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

Mittels der Rasterkraftmikroskopie werden Oberflächentopografien abgebildet, indem mechanisch mit einer Messspitze, die an einem Federarm (Cantilever) befestigt ist, die Oberfläche systematisch abgerastert wird. Hierbei ist es möglich, die Messspitze in alle 3 Raumachsen (X-, Y-, Z-Achse) relativ zur Probe auszulenken. Durch das Abtasten der Oberfläche wird durch die jeweilige Oberflächenbeschaffenheit der Probe der Cantilever ausgelenkt. Der auf die Oberseite des Cantilevers gerichtete Laserstrahl, welcher je nach dem Einfallswinkel auf einen viergeteilten Photodiodendetektor reflektiert wird, ist somit in der Lage, kleinste Änderungen in der Cantileverauslenkung zu detektieren. Die Signalverarbeitung und Bilderzeugung wird dann je nach verwendetem Messmodus über die entsprechende Auswerteeinheit (PC und Software) analysiert und verarbeitet. Der in dieser Arbeit verwendete Messmodus ist der dynamische Messmodus (AC-Modus), bei dem die Messspitze und die Probe nicht in Kontakt stehen und mindestens einen Abstand von $> 1\text{nm}$ aufweisen. Hierbei wird der Cantilever durch einen eingebauten Z-Piezo zum Schwingen an seiner Resonanzfrequenz angeregt. Der Abstand des Cantilevers ist dabei bestimmt durch die Dämpfung der Oszillation. Wirkt nun eine Kraft zwischen Messspitze und Probenoberfläche, so kann die daraus resultierende Schwingungsänderung detektiert werden. Zur Auswertung der AFM-Messungen wurden verschiedene Informationskanäle betrachtet. Der im Höhenkanal/Höhenbild gescannte Bereich ermöglicht Aussagen zur Oberflächentopologie (3D Darstellung, Höhenprofil, Substratraugigkeit). Zusätzlich zu den Höhenbildern wurden auch über dem abgerasterten Substrat die Amplitudenänderung der Schwingung und die Abweichung der Frequenz zur Anfangsfrequenz (Phasenverschiebung) als Amplituden- bzw. Phasenkontrastbild aufgenommen. In Abbildung 15 ist schematisch der Messaufbau der hier verwendeten Rasterkraftmikroskopie vereinfacht dargestellt.

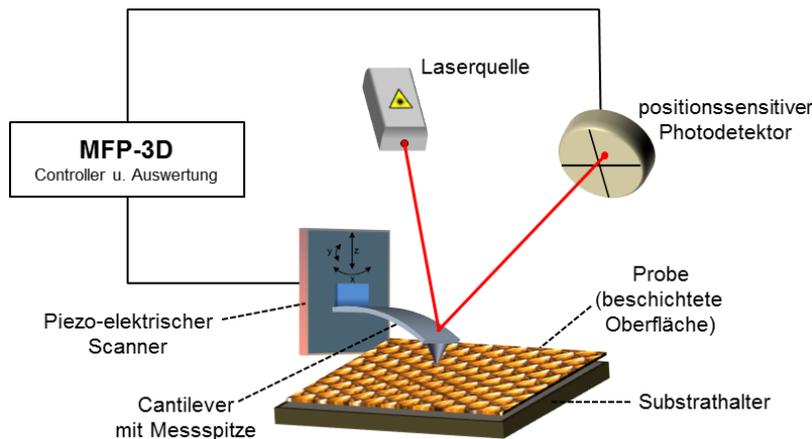


Abbildung 15: Vereinfachter schematischer Aufbau des Rasterkraftmikroskops.

3.13.2 Präparation von SiO₂ Wafern

Für die Rasterkraftmikroskopiemessungen (AFM) wurden neben den QCM-D Kristallen 5 x 5 mm Siliziumdioxidwafer (AMD Saxony LLC & Co. KG, Dresden, Deutschland) verwendet. Diese wurden entsprechend der nasschemischen RCA-Reinigungsmethode behandelt^{188, 189}. Dazu wurden die Wafer für 20 Minuten in der RCA-1 Lösung (Tabelle 11) bei 70 °C inkubiert und anschließend intensiv mit Reinstwasser gespült. Im zweiten Schritt wurden die Wafer analog dem vorigen Arbeitsschritt in RCA-2 Lösung (Tabelle 11) inkubiert und erneut mit Reinstwasser gespült. Die Lagerung der gereinigten Wafer erfolgte in neu hergestellter RCA-2 Lösung.

Tabelle 11: Zusammensetzung der RCA-Reinigungslösungen 1 und 2.

Chemikalien	Zusammensetzung (v/v)
RCA-1	
Ammoniaklösung, konz.	1
Wasserstoffperoxidlösung, 30 %	1
Reinstwasser	5
RCA-2	
Salzsäure, 37 %	1
Wasserstoffperoxidlösung, 30 %	1
Reinstwasser	5

Die Polyelektrolytbeschichtung der Wafer erfolgte über das Layer-by-Layer Verfahren auf Grundlage eines Dip-Coating Verfahrens. Die PE-Beschichtung der Siliziumdioxidwafer wurde analog dem Beschichtungsverfahren der QCM-D Kristalle durchgeführt (Kapitel 3.10.2.1). Durch die negative Substratladung des eingesetzten SiO₂-Wafers erfolgte der Schichtaufbau beginnend mit dem positiv geladenen Polyelektrolyten Polyethylenimin (PEI, MW 25000, Sigma) gefolgt vom negativ geladenen Polystyrolsulfonat (PSS, MW 70000, Sigma). Als idealer Schichtaufbau für die AFM-Messungen von den genutzten S-Layer-Proteinen hat sich ein 3-Schichtsystem aus alternierenden Polyelektrolyten beginnend und endend mit PEI herausgestellt^{132, 190}. Durch die einheitlich vorliegende positive Oberflächenladung erfolgt eine ideale Gitterstrukturausbildung der späteren abzuscheidenden Proteine,

welche auf ihrer Unterseite eine negative Nettoladung aufweisen. Die so präparierten Wafer wurden nach intensivem Spülen mit Reinstwasser direkt für die Rekristallisation der S-Layer-Proteine verwendet.

3.13.3 Rekristallisation von S-Layer-Proteinen auf Siliziumdioxid Wafern

Für die Rekristallisation wurden die lyophilisierten S-Layer-Proteine in 4 M Harnstoff gelöst und anschließend bei 15000 x g, 4 °C, 60 Minuten zentrifugiert, um Proteinagglomerate abzutrennen. Der Überstand, welcher die Proteinmonomere enthielt, wurde weiter für die Beschichtung genutzt. Für die Rekristallisation wurden die in Harnstoff solubilisierten Proteine in einer Endkonzentration von 0,2 g/l mit Rekristallisationspuffer (1,5 mM TRIS, 1 mM CaCl₂, pH=8,0) versetzt. Der PE-beschichtete Siliziumdioxid-wafer wurde für ein Stunde in der frisch präparierten Proteinrekristallisationslösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend intensiv mit Reinstwasser gespült. Der beschichtete Wafer wurde im Anschluss direkt für die Rasterkraftmikroskopie verwendet.

3.13.4 Durchführung der Rasterkraftmikroskopie

Die AFM-Messungen wurden mit einem Rasterkraftmikroskop MFP3D Bio (Asylum Reseach, Santa Barbara (CA), USA), welches mit einem inversen optischen Mikroskop gekoppelt ist, durchgeführt. Alle AFM-Aufnahmen wurden in Flüssigkeit (Rekristallisationspuffer und Reinstwasser) unter Verwendung des dynamischen Kontaktmodus (Nicht-Kontakt Modus) angefertigt. Der Cantilever (Biolever mini BL-AC40TS-C2, Olympus) weist eine Resonanzfrequenz von ca. 25 kHz in Wasser und eine Federkonstante von <0,1 N/m auf. Dies ermöglicht die Messung von biologisch weichen Strukturen im Nanometerbereich. Für die Messungen wurde der Wafer als auch die untersuchten QCM-D Kristalle in einer geschlossenen Messzelle platziert mit den entsprechenden Lösungen überschichtet und auf 30°C temperiert (BioHeater, Asylum Research, Santa Barbara (CA), USA). Die Scangeschwindigkeit wurde zwischen 2,5 und 10 µm/s eingestellt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Asylum Research AFM Software AR Version 120804+1223, Igor Version Pro 6.3.2.3 und WSxM 5.0 Develop 6.5 (2013).

3.14 Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie ist eine spektroskopische Methode zur Bestimmung der chemischen Bindungsform (Speziation) von fluoreszierenden Metallionen wie z. B. der Lanthanide (Eu³⁺, Tb³⁺) oder der Actinide (UO₂²⁺, Cm³⁺)¹⁹¹⁻¹⁹³. Dabei erfolgt die Unterscheidung der verschiedenen chemischen Spezies hinsichtlich ihrer spezifischen Anregungs- und Emissionsspektren und der Fluoreszenzlebenszeiten¹⁹⁴. Für die Aussendung von Licht bei der Rückkehr in energieärmere Zustände wird im Folgenden der Begriff Lumineszenz genutzt, da dieser sowohl den Begriff Fluoreszenz und Phosphoreszenz einbezieht und somit aktuelle wissenschaftliche Kontroversen bezüglich dieser Begriffe in der Emission von Licht in aquatischen Systemen außen vor lässt^{195, 196}. Die TRLFS wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Interaktion von isolierten Zellwandkomponenten und intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 mit Eu³⁺

genutzt. Anhand der spektroskopischen Daten sollen erste Aussagen zur strukturellen Umgebung des Metallions in den gebildeten Komplexen und zur dessen Komplexstabilität erfolgen.

3.14.1 Allgemeiner Versuchsaufbau und Messparameter

Für die spektroskopischen Untersuchungen der Metallinteraktion von Eu^{3+} mit den Zellwandbestandteilen und den intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurden alle Proben mit einem Nd:YAG Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser, Typ Minilite, Continuum, Santa Clara (CA), USA) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=266$ nm und einer durchschnittlichen Laserenergie von 0,3 mJ gemessen. Das emittierte Lumineszenzlicht der Proben und Lösungen wurde mit einem Spektrograph (iHR 550, HORIBA Jobin Yvon, Unterhachingen, Deutschland) und einer ICCD-3000 Kamera (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhachingen, Deutschland) detektiert. Die spektralen Daten wurden mit der Software Labspec 5 (HORIBA Scientific, HORIBA Jobin Yvon SAS France, Longjumeau Cedex, Frankreich) aufgenommen und für die weitere Auswertung mittels Origin 9.0 (Kapitel 3.14.2) gespeichert. In Abbildung 16 ist der schematische Aufbau des verwendeten Lasersystems dargestellt.

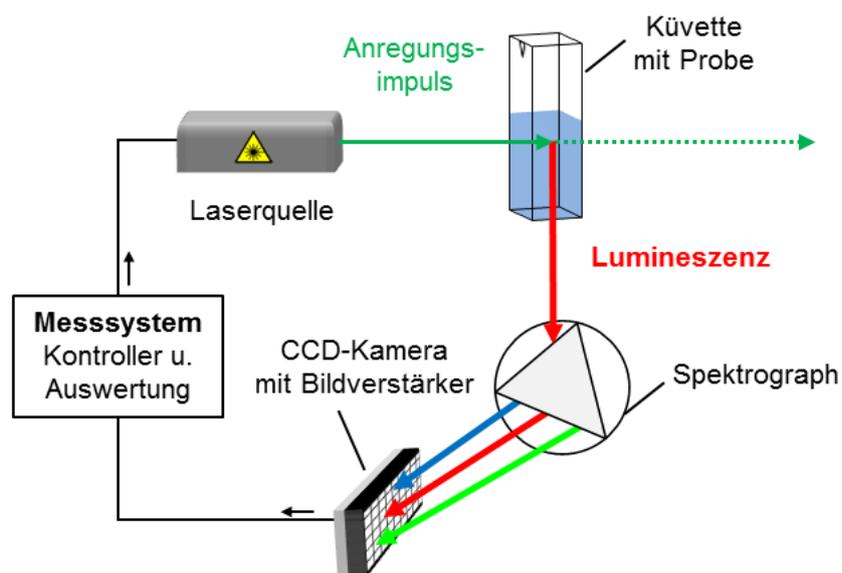


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Messaufbaus des verwendeten TRLFS-Systems.

Zur Charakterisierung der chemischen Natur von Eu^{3+} wurden die Proben analog zu den Proben aus den Batch-Versuchen (Kapitel 3.8.2) vorbereitet. Die TRLFS-Untersuchungen erfolgten bei einem pH-Wert von 6,0 und nach einer Reaktionsdauer von einer Stunde und 24 Stunden. Die 24 Stunden Proben wurden bis 1 Stunde vor der Messung bei 4 °C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Suspensionen wurden in 3,5 ml Quarzglaszküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm überführt und unter konstanten Rühren und einer konstanten Temperatur von 25 °C mit dem Laser angeregt und die Spektren aufgenommen. Der pH-Wert der Proben wurde jeweils vor und nach der Messung kontrolliert (pH 540 GLP, WTW Weinheim, Deutschland) und gegebenenfalls auf den pH-Wert von 6,0 wieder eingestellt.

3.14.2 Datenanalyse und Spektrenanalyse

Die Spektrenauswertung erfolgte mittels der Software Origin Version 9.0G (OriginLab Corporation, Northampton (MA), USA) unter Verwendung des Moduls „Nichtlinearer Fit“. Mit Hilfe dieser Auswertungsmethode wurden die Lumineszenzlebenszeiten über das exponentielle Abklingverhalten der charakteristischen Emissionsbanden bestimmt. Zur Bestimmung der Lumineszenzlebenszeiten der unterschiedlichen Spezies wurden mono-, bi- und triexponentielle Fitfunktionen angewandt. Anschließend wurde das beste mathematische Modell unter Berücksichtigung, dass die Lumineszenzlebenszeiten unterschiedlich waren und der Fit nicht überparametrisiert war, ausgewählt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Peakpositionen über das Modul „Basislinie und Impulse“. Die erhaltenen Daten zu Lumineszenzlebenszeiten und der chemischen Umgebung bzw. der Sorption der Metallionen an den biologischen Komponenten wurden mit literaturbekannten Daten verglichen und entsprechend diskutiert.

3.15 Photonenkorrelationsspektroskopie zur Bestimmung von Partikelgrößen

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS, *englisch: Photon Correlation Spectroscopy*) ist auch unter dem Namen der dynamische Lichtstreuung bekannt. Dieses hochauflösende Messverfahren ermöglicht die Größenuntersuchung von Partikeln in Lösungen in einem Bereich von ca. 2 nm-2 μm ¹⁹⁷. Dabei wird das gestreute Laserlicht der Einzelpartikel in einem Winkel von 90° durch die zufällige Positionsänderung der Streuzentren (Brownsche Molekularbewegung) am Detektor als Fluktuation der Streulichtintensität gemessen. Somit ist die Ermittlung der Partikelgrößen durch die dynamische Lichtstreuung nur eine indirekte Messmethode.

Die PCS wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die hergestellten Goldnanopartikel und die Lipidvesikel bezüglich ihrer Größenverteilung zu untersuchen. Dabei wurden 1,5 ml der Goldnanopartikelsuspension ($A_{520\text{ nm}}=1$) unter staubfreien Bedingungen in eine Küvette überführt, anschließend verschlossen und mittels des Zetasizer, (Malvern Instruments, Worcestershire, Vereinigte Königreich) vermessen. Die hergestellten Lipidvesikel wurden nach der Zonenzentrifugation mit dem Partikelgrößenmessgerät BI-90 (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville (NY), USA) analysiert. Als Lichtquelle wurde hier ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von $\lambda=514,5\text{ nm}$ und einer Energie von 0,4 W (LEXER Laser, Fremont (CA), USA) genutzt. Dafür wurden aus jeder Zone (Kapitel 3.6.6) eine Probe von 1,5 ml Probe entnommen, in Küvetten überführt und verschlossen. Die Auswertung der exportierten Daten erfolgte mit der Software Origin Version 9.0G (OriginLab Corporation, Northampton (MA), USA).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung von Mikroorganismen

In dem folgenden Kapitel erfolgt die Darstellung der Kultivierung der beiden verwendeten Mikroorganismen unter kontrollierten Prozessbedingungen. Die optimierten Versuchsparameter wie z. B. pH-Wert, Sauerstoffeintrag und Detektion des Erreichens der stationären Wachstumsphase mit Hilfe der *online* und *offline* Messwerte ermöglicht hohe Biomassenausbeuten. Aus der erhaltenen Biomassen können reproduzierbar die primären Zellwandbestandteile wie z. B. S-Layer-Proteine quantitativ und qualitativ hochwertig isoliert werden. In vorangegangenen teilweise unregelmäßigen Kultivierungsstrategien von bakteriellen Isolaten der Haberlandhalde wurden durch die Variation der pH-Werte, Sauerstoffeintrag sowie Mediumkonzentration und –zusammensetzung geringere Ausbeuten an Biomassen erhalten¹³⁶. Ebenfalls konnte der Einfluss der Prozessparameter auf die Bildung von S-Layer-Proteinen aufgezeigt werden. Dabei konnten neben geringeren Ausbeuten, als im nachfolgenden beschrieben wird erhalten werden, auch Veränderungen im SDS-Proteinprofil in Folge veränderter Nährmedien detektiert werden¹⁹⁸.

4.1.1 Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12

Die aufgezeichneten *online* Parameter der Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 sind in Abbildung 17 a zusammen mit den bestimmten *offline* Parametern (Abbildung 17 b) dargestellt.

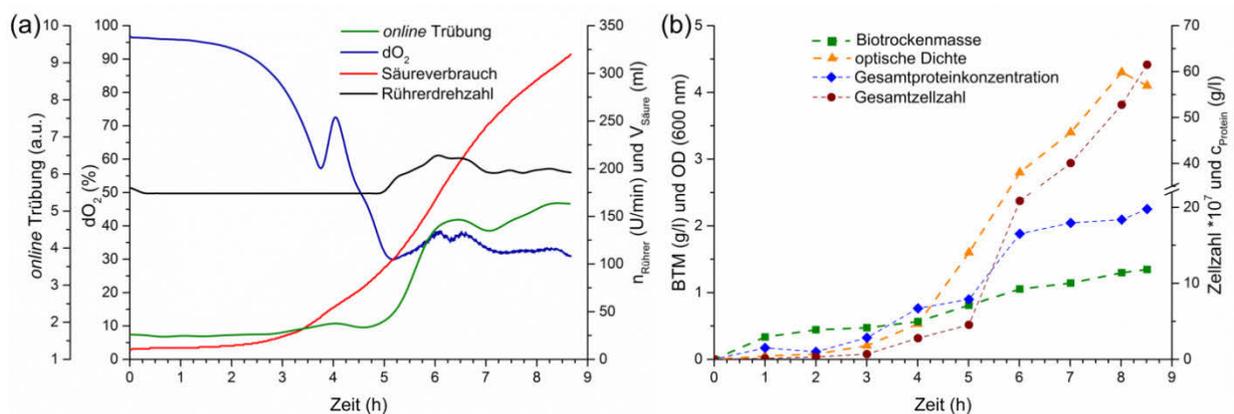


Abbildung 17: Darstellung der *online* (a) und *offline* (b) Kultivierungsparameter von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

Innerhalb der ersten drei Stunden nach der Inokulation ist ein nahezu konstantes Signal der *online* gemessenen optischen Dichte sowie der *offline* OD-Messungen zu erkennen. In dieser lag-Phase passen sich die Mikroorganismen den geänderten Wachstumsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffangebot an. Die Länge dieser Phase ist abhängig von den verwendeten Mikroorganismen und den gewählten Kultivierungsparametern. Betrachtet man die Signale der *online*

und *offline* Messungen ist erkennbar, dass diese Phase in Bezug auf Biomassebildung nahezu unproduktiv ist. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach ca. drei Stunden ist ein stetiger Anstieg der optischen Dichte, der Biotrockenmasse und der Gesamtzellzahl zu erkennen. In dieser Wachstumsphase erreichen die Mikroorganismen ihre maximale Wachstumsgeschwindigkeit aufgrund der idealen Wachstumsbedingungen¹⁹⁹. Aufgrund der Verwendung eines Komplexnährmediums kann eine genaue Aussage über die zur Verfügung stehenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie weiterer Substrate nicht getroffen werden. Der kurze Anstieg des dO_2 -Levels nach ca. 3,5 Stunden kann durch eine Stoffwechseladaption an ein anderes Substrat hervorgerufen werden. Dies führt zu einer kurzzeitigen Minimierung der Wachstumsgeschwindigkeit und somit zu einem verminderten Sauerstoffbedarf der Zellen. Dieses Phänomen konnte bereits bei verschiedenen bakteriellen Isolaten der Haberlandhalde und in weiteren Arbeiten beispielsweise der Kultivierung von *E.coli* in Luria bertani Medium beobachtet werden²⁰⁰. Nach der Adaption an die Wachstumsbedingungen nach ca. vier Stunden ist ein stetig ansteigender Sauerstoffbedarf der Zellen erkennbar. Ebenfalls steigen die Werte der *online* und *offline* ermittelten optischen Dichte und der Gesamtzellzahl exponentiell bis zum Erreichen des Endes der exponentiellen Wachstumsphase bei ca. 6,5 Stunden. Ab ca. fünf Stunden ist ein Anstieg der Rührerdrehzahl zu erkennen. Die Erhöhung trägt zu einem vermehrten Sauerstoffeintrag in die Kultivierungsbrühe bei und ist notwendig, um den erhöhten Sauerstoffbedarf der Bakterien in dieser Phase und eine sehr gute Biomasseausbeute zu gewährleisten. In Abbildung 17 a ist zusätzlich der Säureverbrauch während der Kultivierung aufgezeigt. Aufgrund der stetigen Zudosierung von Säure kann auf eine vermehrte Bildung alkalischer Produkte geschlossen werden. Diese können einerseits durch den Verbrauch des Mediums selbst gebildet werden oder durch das Segregieren von alkalischen Stoffwechselintermediaten durch die Mikroorganismen während des Wachstums hervorgerufen werden. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach ca. sieben Stunden kommt es zu einem verminderten Sauerstoffbedarf der Zellen und somit zu einem langsam fallenden Signal des dO_2 -Levels. Korrelierend dazu ist die Verringerung der Rührerdrehzahl zu beobachten. Diese Phase des bakteriellen Wachstums wird meist durch einen beginnenden Nährstoffmangel eines limitierenden Faktors hervorgerufen. Betrachtet man weiter die Kurven der optischen Dichten, Gesamtzellzahl, Biotrockenmasse und der Gesamtproteinkonzentration ist zu erkennen, dass nach sieben Stunden die exponentielle Wachstumsphase beendet ist und die Bakterien mit einer verminderten Geschwindigkeit wachsen. Vorangegangene Kultivierungen mit den hier verwendeten Haldenisolaten haben gezeigt, dass kurz vor Erreichen der stationären Phase der ideale Erntezeitpunkt erreicht ist, um eine maximale Ausbeute an S-Layer-Proteinen zu erhalten. Durch eine einsetzende Endosporenbildung kommt es zum Abbau bzw. Verdau der gewünschten S-Layer-Proteine am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Durch diesen evolutionär entwickelten Prozess der Sporenbildung von Bakterien, sind diese in der Lage sich vor widrigen Umweltbedingungen (pH-Wert, Temperatur oder Schadstoffe) oder Nährstoffmangel abzukapseln und das eigene Überleben zu sichern. Abbildung 18 a zeigt eine mikroskopische Aufnahme von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 zum Zeitpunkt der Zellernte. In der mikroskopischen Aufnahme ist zu erkennen, dass nach sieben Stunden noch keine Sporulation begonnen hat und nur stäbchenförmige vitale Bakterien vorhanden sind.

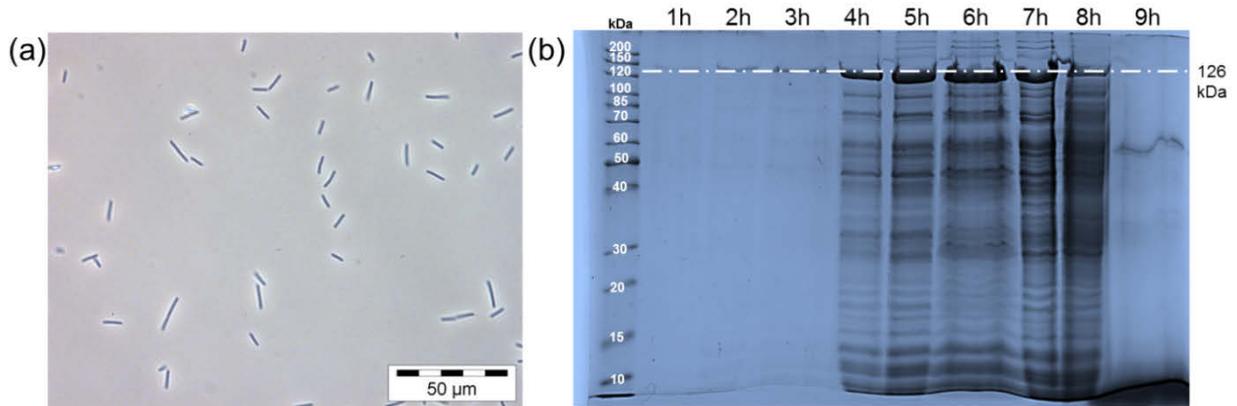


Abbildung 18: (a) Mikroskopische Aufnahme in 400-facher Vergrößerung zum Zeitpunkt der Zellernte und SDS-Proteinprofil der Kultivierungsproben von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

Ebenfalls wurde zusätzlich als begleitende *offline* Analytik ein SDS-Proteinprofil angefertigt, um die Bildung von S-Layer-Proteinen verfolgen zu können. In Abbildung 18 b ist zu erkennen, dass zum Erntezeitpunkt bei ca. sieben Stunden eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 126 kDa zu erkennen ist, welche dem funktionalen S-Layer Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (SlfB) zugeordnet werden kann^{22, 201}. Die Probe zum Zeitpunkt von 8 Stunden zeigt, dass hier ein Abbau der charakteristischen Proteinbande der S-Layer-Proteine stattgefunden hat. Dies kann ein Indiz für den Verdau der S-Layer-Proteine bei einsetzender Sporulation sein. Das Fehlen nahezu aller Banden im Proteinprofil bei 9 Stunden ist auf ein Problem bei der Probennahme zurückzuführen und nicht in Verbindung mit einem vollständigen Proteinverdau zu bringen. Unter Verwendung der jeweiligen *online* Parameter kann somit der ideale Erntezeitpunkt für diesen Stamm bestimmt werden und eine reproduzierbare Biomasseproduktion gewährleistet werden. Ebenfalls konnten durch geeignete Methoden wie z. B. der SDS-PAGE der geeignete Erntezeitpunkt der Biomasse dargestellt werden, bei dem primäre Zellwandkomponenten wie z. B. S-Layer-Proteine in einer sehr hohen Ausbeute isoliert werden können. Zusätzlich kann durch die Wahl geeigneter *offline* Analysen eine Korrelation zu den *online* aufgezeichneten Daten hergestellt werden. Es konnten am Ende der Kultivierung 233 g Biofeuchtmasse (Anfangsvolumen 57 l) nach der Separation mittels der Durchflusszentrifuge erhalten werden.

4.1.2 Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53

Analog der Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 erfolgte die Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 unter identischen Startbedingungen. In Abbildung 19 sind die *online* und *offline* bestimmten Werte der Kultivierung zusammengefasst¹²⁸. Aus der Grafik wird ersichtlich, dass trotz der Ähnlichkeiten der beiden Stämme und den vergleichbaren Startbedingungen sich der Kultivierungsverlauf bezüglich der Kultivierungszeit, der Gesamtzellzahl und des Säureverbrauchs unterscheidet.

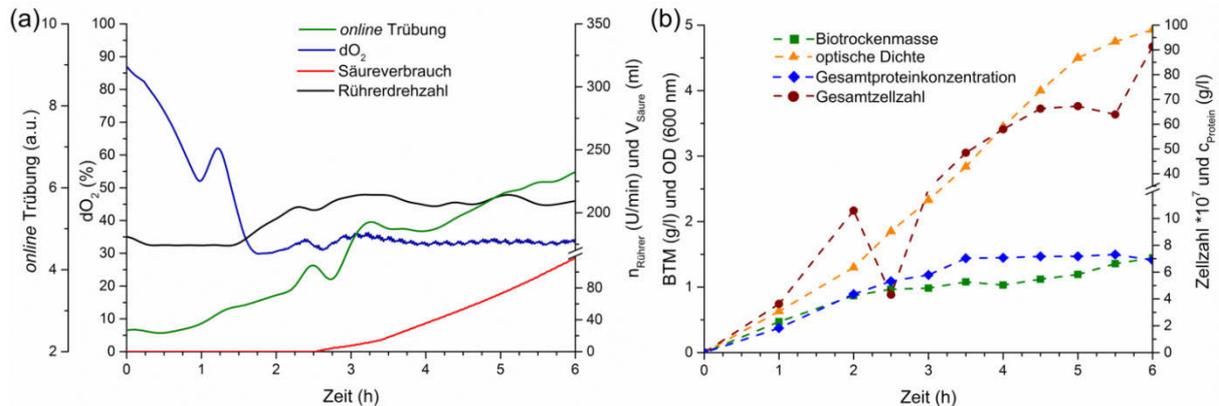


Abbildung 19: Darstellung der *online* (a) und *offline* (b) Kultivierungsparameter von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53¹²⁸.

Besonders auffällig ist die relativ kurze lag-Phase des Organismus, die er benötigt hat sich den veränderten Umgebungsbedingungen anzupassen. Im Vergleich zu der Kultivierung des Stammes JG-A12 kann dies darin begründet sein, dass die Zellen in einem aktiveren bzw. vitalerem Wachstumsstadium zum Animpfzeitpunkt vorlagen als die Bakterienzellen bei der Kultivierung des Stammes JG-A12. Dies führte zu einer schnelleren Anpassung des Zellen aufgrund der gesteigerten metabolischen Aktivität. Analog der Kultivierung des Stammes JG-A12 ist auch bei dieser Kultivierung bei ca. 1,5 Stunden ein kurzzeitiges Ansteigen des Sauerstofflevels zu beobachten. Anschließend fiel der dO₂-Level nach weiteren 30 Minuten wieder ab. Dieser Peak stützt die Aussage, dass es sich hierbei nicht um ein organismenspezifisches Phänomen handelt, sondern um eine Umstellung des Metabolismus der Bakterien auf ein anderes Nährstoffsubstrat wie z. B. die Verwendung einer anderen Kohlenstoffquelle. In der exponentiellen Wachstumsphase ab ca. zwei Stunden ist ein stetiger Anstieg der OD, der BTM und der Gesamtzellzahl zu erkennen. Parallel ist auch die Erhöhung der Rührerdrehzahl zu erkennen, welche die Sauerstoffzufuhr für das vermehrte mikrobielle Wachstum sicherstellt. Vergleichend zu der Kultivierung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 fällt der Verbrauch an Säure als Dosierungsmittel in der Kultivierung von JG-B53 geringer aus. Daher kann auf eine andere Verstoffwechslung des Mediums oder andere gebildete Stoffwechselintermediate, welche durch die Bakterien gebildet werden, geschlossen werden. Diese Tatsache muss jedoch in weiteren unabhängigen Untersuchungen zum mikrobiellen Wachstumsverhalten beider Organismen untersucht werden, bei welchem u. a. eine begleitende Analytik zur Bildung organischer Säuren und weiterer Stoffwechselprodukte empfehlenswert ist. Betrachtet man die *offline* ermittelten Signale ist zu er-

kennen, dass nach ca. zwei stündiger exponentieller Phase die Kurvenverläufe abflachen, was bei ca. 4,5 Stunden auf den Übergang in die stationäre Phase und einen limitierenden Substratmangel hindeutet. Die meist mit der stationären Phase einhergehende beginnende Sporulation kann wie in der mikroskopischen Aufnahme zum idealen Erntezeitpunkt (4,5-5 Stunden) in Abbildung 20 a dargestellt nicht erkannt werden.

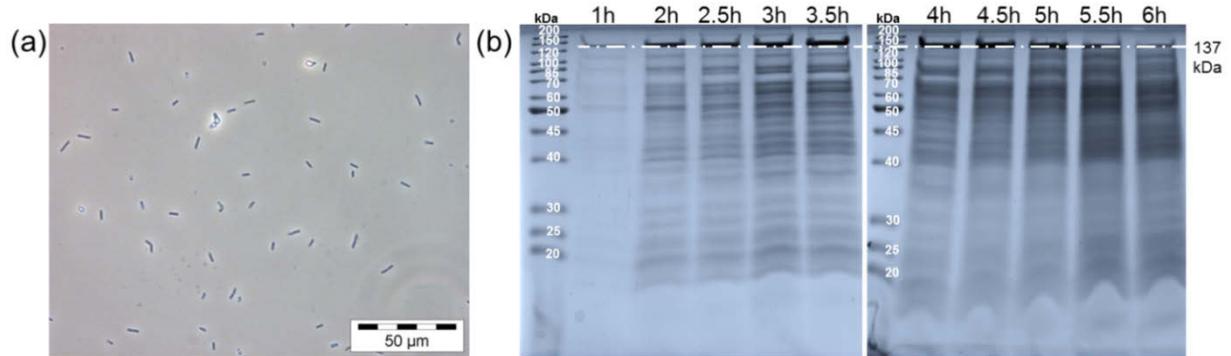


Abbildung 20: (a) Mikroskopische Aufnahme in 400 facher Vergrößerung zum Zeitpunkt der Zellernte und SDS-Proteinprofil der Kultivierungsproben von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

In Abbildung 20 b ist das SDS-Proteinprofil der Kultivierungsproben dargestellt. Über die Zeit ist das Proteinprofil der Bakterien sowie die charakteristische Bande von Slp1 bei ca. 150 kDa zu erkennen¹⁴⁵. Bis zu einem Zeitpunkt von 4,5 Stunden ist ein Anstieg der Bandenintensität zu erkennen. Ab ca. 5 Stunden nimmt die Bandenintensität von Slp1 ab und niedermolekulare Proteinbanden sind verstärkt erkennbar. Dies deutet auf einen Abbau von Slp1 hin zu kleineren Fragmenten bzw. die Sekretion niedermolekularer Proteine hin. Daher kann aufgrund des Proteinprofils aus Abbildung 20 b die Werte der *offline* und *online* Daten aus Abbildung 19 bestätigt werden, die den idealen Erntezeitpunkt bei 4,5 Stunden kennzeichnen. Nach der Ernte mit der Durchflusszentrifuge wurden 260 g Biofeuchtmasse aus der Kultivierung von anfänglich 57 l gewonnen.

4.2 Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen Zellwandkomponenten

4.2.1 Isolierung der S-Layer-Proteine und Charakterisierung mittels SDS-PAGE

Nach dem Entfernen der Flagellen, dem Aufschluss der Zellen am Hochdruckhomogenisator und der Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet vom Überstand getrennt und die obere helle Schicht für die Extraktion der S-Layer-Proteine der beiden Stämme genutzt. Die Isolierung der S-Layer-Proteine von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 ist in Abbildung 21 und von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 in Abbildung 22 zusammengefasst. In beiden Abbildungen ist jeweils zu erkennen, dass nach dem Aufschluss mittels des Hochdruckhomogenisators der Überstand (Ü) sowie das separierte und resuspendierte Pellet (P) eine Vielzahl von Proteinbanden unterhalb von 100 kDa aufweisen. Diese werden im Verlauf der Aufreinigung abgetrennt, so dass am Ende nur die charakteristischen Proteinbanden der jeweiligen S-Layer-Proteine verbleiben. In den Proteinprofilen sind sowohl die Proben der Pellets als auch die der Überstände, welche nach den jeweiligen Zentrifugationen erhalten worden, dargestellt. In Abbildung 21 und Abbildung 22 sind die einzelnen Proben (Überstände und Pellets) für die SDS-PAGE nach der Abtrennung verbleibender Lipidreste (Behandlung mit Triton), dem Verdau des verbliebenen Peptidoglykans (Lysozymverdau), der Behandlung mittels Guanidinhydrochlorid (Proteinsolubilisierung) und der Dialyse vergleichend dargestellt.

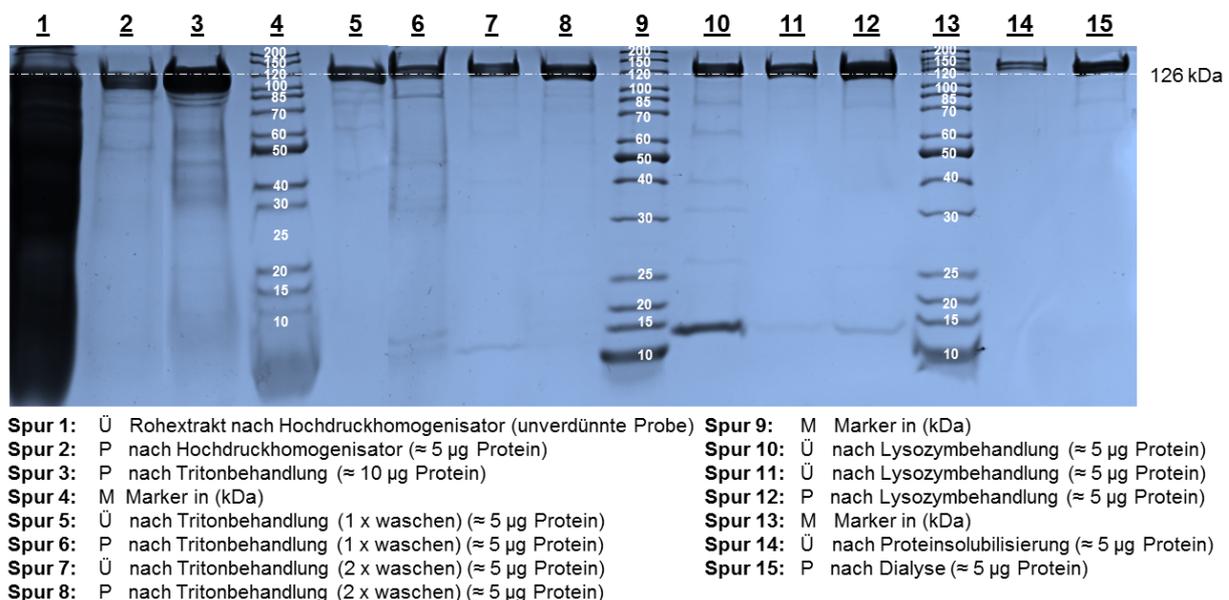


Abbildung 21: SDS-Proteinprofile der einzelnen Fraktionen während der Isolierung der S-Layer-Proteine (SlfB) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

In Abbildung 21 ist die charakteristische Proteinbande von SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 bei ca. 126 kDa (Markierung) zu erkennen. Diese Bande korrespondiert mit der theoretischen molekularen Masse von 126,3 kDa dieses S-Layer-Proteins, welche nach der Sequenzierung von SlfB berechnet wurde²⁰¹. Dieses S-Layer-Protein, welches die Zelloberfläche von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 bedeckt, konnte bereits in vorangegangenen biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen bezüglich der Aminosäuresequenz (1238 Aminosäuren) und dem sich daraus

ergebenden Molekulargewicht von 126 kDa, sowie bezüglich von Phosphorylierungen an SIfB hinreichend charakterisiert werden^{140, 201, 202}. Somit können die bereits vorhandenen Daten mit den SDS-PAGE-Analysen dieser Arbeit in Bezug auf die Molekulargröße von SIfB sehr gut bestätigt werden. Es ist zu erkennen, dass im Verlauf der SIfB-Isolierung niedermolekulare Proteine abgetrennt werden und im SDS-Profil nicht mehr präsent sind. In den aufgereinigten Proben von SIfB nach der Solubilisierung mit Guanidinhydrochlorid und dem Pellet der letzten Probe (nach der Dialyse) ist neben der charakteristischen Bande bei 126 kDa ein weitere Bande unterhalb von 120 kDa zu erkennen. Diese Bande resultiert vermutlich aus der Abspaltung des *N*-Terminus von SIfB.

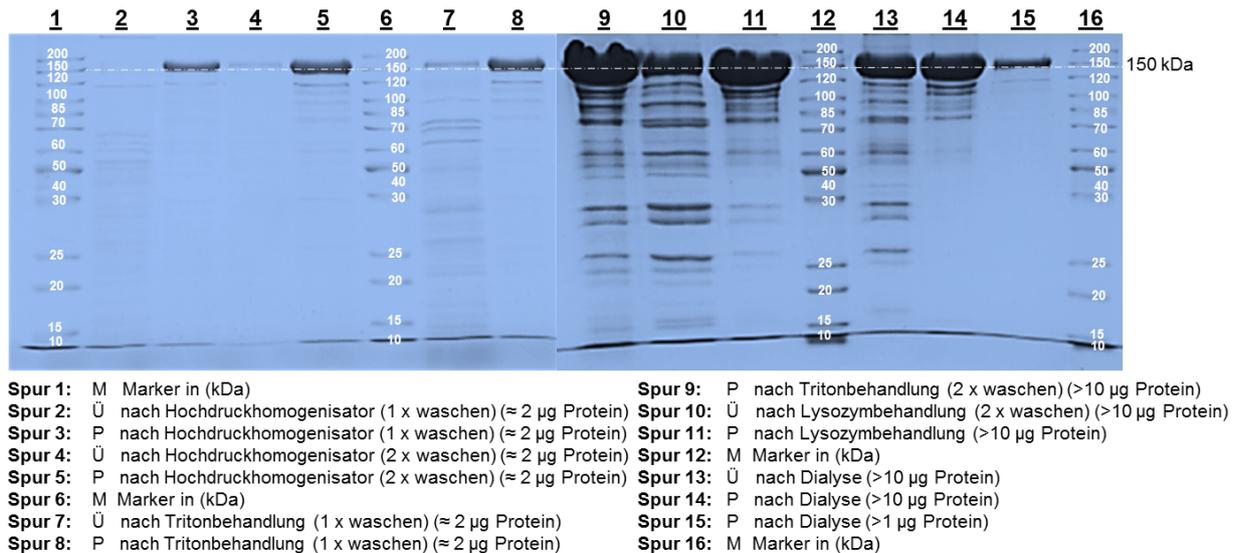


Abbildung 22: SDS-Proteinprofile der einzelnen Fraktionen während der Isolierung der S-Layer-Proteine (Slp1) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

In Abbildung 22 ist eine dominante Bande bei der Isolierung von Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 bei ca. 150 kDa zu erkennen. Dieses Molekulargewicht entspricht dem bereits literaturbeschriebenen Wert von Slp1^{128, 130, 145}. Jedoch fällt die mittels SDS-PAGE ermittelte Proteingröße wesentlich höher aus als das theoretische über die Sequenzierung von Slp1 ermittelte Molekulargewicht von 116,0 kDa (mit Signalpeptid, 1104 Aminosäuren) bzw. 112,9 kDa (ohne Signalpeptid)^{145, 202}. Dies kann durch mögliche posttranslationale Modifizierungen hervorgerufen werden^{49, 203}. In bisherigen Untersuchungen konnten typische Modifikationen wie z. B. Phosphorylierungen oder Glykosilierungen detektiert werden. Diese geringen Modifikationen können die Differenz der Molekulargewichte jedoch nicht erklären. Ebenfalls konnten durch keine anderen Proteine und Gene ähnlicher oder identischer *N*-terminaler Sequenzen in dem Genom von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 detektiert werden²⁰². Untersuchungen mit Hilfe der Methode der Photonenkorrelationsanalyse zeigten für Slp1 ein Molekulargewicht von 115 ± 10 kDa auf, welche die Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen stärken¹⁴⁵. Der Unterschied zwischen dem theoretischen Molekulargewicht und den SDS-PAGE-Analysen kann daher beispielsweise durch ladungsabhängige Artefakte des SDS-Gels verursacht werden, bei denen einige hochalkalische Proteine das SDS-Gel langsamer durchlaufen und es zu Verfälschungen in der Proteinauftrennung und der detektierten Proteingröße kommt. Mit einem isoelektrischen Punkt von 5,5 scheint dieser

Grund bei SIp1 jedoch nicht als wahrscheinlich. Daher kann als weitere Möglichkeit die Ausbildung von Iso-Peptidbindungen angenommen werden, welche bei der Denaturierung während der Probenvorbereitung nicht zerstört werden¹⁴⁵. Die hier getroffenen Aussagen, welche die unterschiedlichen Molekulargewichte erklären könnten, müssen jedoch in weiteren Untersuchungen näher betrachtet werden.

Wie in Kapitel 4.1 dargestellt konnten für *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 4,09 g Biofeuchtmasse pro Liter Kulturbrühe (1,35 g/l BTM) erhalten werden. Dabei entfallen ca. 50 % der BTM auf die Gesamtproteinkonzentration, wovon 15 % auf den maximal möglichen Anteil von S-Layer-Proteinen entfallen⁶. Aus der Gesamtbiofeuchtmasse von 233 g aus 57 l Kulturmedium konnten 1,91 g lyophilisiertes SIfB isoliert werden. Bezogen auf die theoretische, maximale Ausbeute (5,17 g SIfB) bezogen auf die BTM ergibt sich eine Ausbeute (y) von 37 % . Aus den 260 g Biofeuchtmasse von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 aus einem 57 l Ansatz (4,56 g Biofeuchtmasse pro Liter Kulturmedium entspricht 1,45 g/l BTM) konnten 1,60 g lyophilisiertes SIp1 isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von $y=25,8$ % des theoretisch maximalen Wertes von 6,2 g. Somit konnte in den Isolierungen von S-Layer-Proteinen von SIfB höhere Ausbeuten als bei den Isolierungen von SIp1 erhalten werden. Betrachtet man den theoretischen Anteil der S-Layer-Proteine an der BTM, so können in weiteren Arbeiten durch die Optimierung der Isolierungsmethode die Ausbeuten der S-Layer-Proteine noch wesentlich gesteigert werden.

4.2.2 Isolierung und Charakterisierung der Membranlipide

4.2.2.1 Isolierung der Membranlipide

Die Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurden anfänglich über zwei verschiedene Extraktionsmethoden isoliert. Es sollte hierbei getestet werden, welches Verfahren am geeignetsten ist um die Membranlipide qualitativ und quantitativ hochwertig zu isolieren. Für die späteren Sorptionsversuche mit Metallen und Halbmetallen musste auf eine vollständige Entfernung von S-Layer- und weiteren Proteinen aus den Membranlipiden geachtet werden, da diese die Metallbindung erheblich beeinflussen können. Mittels SDS-PAGE wurde die Reinheit der Membranlipidproben überprüft. Das jeweilige SDS-Proteinprofil der mechanisch-biochemischen Lipidaufreinigung für *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 unter Verwendung einer unspezifischen Proteinase K ist in Abbildung 23 dargestellt. In Abbildung 23 a und b ist zu erkennen, dass bei den isolierten Membranlipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 nach dem Proteinverdau mit Proteinase K schwache Proteinbanden im SDS-Profil zu erkennen sind. Diese müssen in weiteren Extraktionsschritten entfernt werden, um für die späteren Metallbindungsversuche reine Lipidfraktionen nutzen zu können.

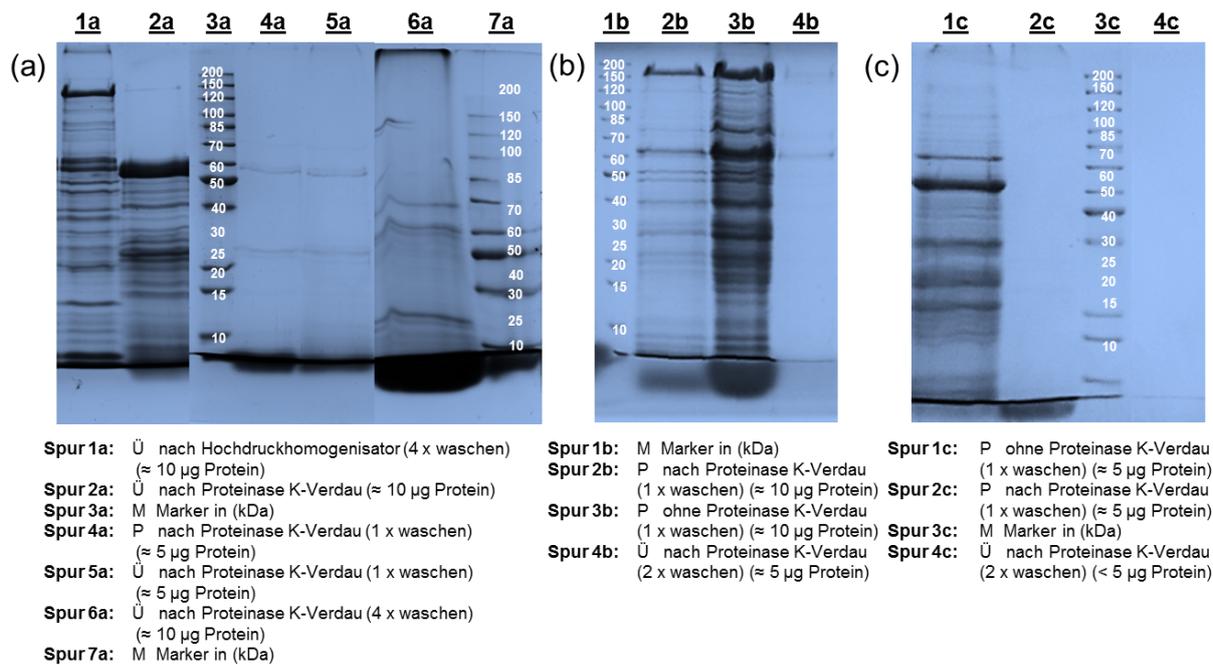


Abbildung 23: SDS-Proteinprofil der mechanisch-biochemischen Lipidaufreinigung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (a); (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 mit 0,1 g/l gealterter Proteinase K sowie (c) unter Verwendung von 0,15 g/l aktiver Proteinase K.

Im SDS-Proteinprofil sind bei ca. 130 kDa (Abbildung 23 a) und bei ca. 150 kDa (Abbildung 23 b) Proteinbanden zu erkennen, welche den charakteristischen Banden der S-Layer-Proteine der beiden verwendeten Mikroorganismen zuzuordnen sind. Die Präsenz dieser Banden zeigt, dass durch den Zellaufschluss ein Teil der S-Layer-Proteine im Überstand nach dem Aufschluss am Hochdruckhomogenisator verbleiben. Durch den Verdau mit der unspezifisch scheidenden Proteinase K ist ein Abbau dieser Banden zu erkennen. Zusätzlich wurde die Konzentration der Proteinase K auf 0,15 g/l erhöht (Abbildung 23 c). Diese Versuche zeigen, dass eine zu geringe Konzentration an Proteinase K bzw. daraus resultierend durch eine zu geringe Enzymaktivität die enthaltenen Proteine nicht komplett verdaut werden können. Dies führt zu einem drastischen Verlust der Lipidqualität. Zusätzlich konnten über die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry die Lipidproben bezüglich der enthaltenen Proteinrestmengen untersucht werden^{150, 154}. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter Verwendung der mechanisch-biochemischen Extraktion teilweise hohe Proteinkonzentrationen vorhanden waren, welche für die weiteren Sorptionsversuche negative Beeinflussungen der Messergebnisse hervorrufen würden. Betrachtet man in Abbildung 23 a-c die Proteinprofile, so sind in allen Proben niedermolekulare Proteinbanden im Bereich kleiner 10 kDa zu erkennen. Die Extraktion der Membranlipide unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln hat hingegen keine Proteinbanden in den durchgeführten SDS-PAGE-Analysen ergeben, da durch diese Methode nur die Chloroform löslichen Membranlipide in die organische Phase überführt werden. Alle weiteren Komponenten wie z. B. Proteine, welche in dem organischen Lösungsmittel nicht löslich sind verbleiben in der wässrigen Phase und wurden verworfen. Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry, konnte die Proteinentfernung aus den Membranlipiden ebenfalls nachgewiesen werden¹⁵⁴.

Vergleicht man die Lipidmengen der unterschiedlichen Extraktionsmethoden so kann die mechanisch-biochemische Methode eindeutig favorisiert werden. Jedoch kann aufgrund hoher Anhaftungen von Proteinen keine Ausbeuteberechnung für die reine Lipidfraktion durchgeführt werden, da es sonst zu einer Werteverfälschung kommt. Bezieht man aber zusätzlich die Reinheit der Lipide mit in die Betrachtungen ein, so ist die Lösungsmittlextraktion trotz einer geringeren Ausbeute die geeignetere Methode. Unter Verwendung der reinen Lösungsmittlextraktion konnten aus 20 g Biofeuchtmasse teilweise nur wenige Milligramm Membranlipide gewonnen werden. Dies lag an den verschiedenen Zellfragmenten, welche z. B. bei den Ausschüttelversuchen neben der organischen und wässrigen Phase eine dritte hochviskose Phase ausgebildet haben und zu erheblichen Materialverlust geführt haben. Aus diesem Grund wurden wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben beide Methoden kombiniert, um die hohe Ausbeute der mechanisch-biochemischen Methode mit der hohen Reinheit der Membranlipide aus der organischen Extraktion zu vereinen. Dabei diente die mechanisch-biochemische Methode ebenfalls als erster Reinigungsschritt, bei welchem grobe zelluläre Verunreinigungen entfernt werden konnten. Im Anschluss an die mechanisch-biochemischen Methode wurde die Lösungsmittlextraktion durchgeführt und die Membranlipide für die folgenden Versuche in einer adäquaten Menge und Reinheit hergestellt. Die erfolgreiche Proteinentfernung wurde anschließend mittels der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry bestätigt. Die Proteinkonzentrationen in den Lipidfraktionen lagen unterhalb des Detektionslimits der Methode.

Aus 233 g Biofeuchtmasse (57 l Kultivierungsansatz) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (1,35 g/l BTM) konnten über die kombinierte Extraktionsmethode 254 mg vollständig proteinfreie Membranlipide isoliert werden. In der Biotrockenmasse machen die Membranlipide ca. 5 % des Gewichtes aus⁶. Somit ergibt sich für die Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 eine Ausbeute von 6,6 % bezogen auf die theoretische mögliche Lipidmenge in der BTM. Aus einem Kultivierungsansatz von 57 l konnten 206 g Biofeuchtmasse (1,08 g/l BTM) erhalten werden, aus dem 367,6 mg vollständig proteinfreie JG-B53 Membranlipide isoliert werden konnten. Bezogen auf die theoretisch mögliche Lipidmenge in der Biotrockenmasse konnte somit eine Ausbeute von 11,9 % erhalten werden. Somit konnte eine deutliche bessere Lipidausbeute für den Stamm JG-B53 erhalten werden. Es zeigt jedoch, dass bezogen auf die theoretisch möglichen Ausbeuten ebenfalls noch eine Optimierung erfolgen muss, um höhere Produktausbeuten zu erzielen.

Aufgrund der hohen Qualität der Lipide war es möglich, ihre Zusammensetzung detailliert zu charakterisieren. Zur Charakterisierung der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 wurden die Methoden der GC-FID, DC, ESI-MS und eine Phosphatkonzentrationsbestimmung durchgeführt um die Lipide bezüglich der enthaltenen hydrophilen Kopfgruppen, der enthaltenen hydrophoben Fettsäurereste und des Phosphatgehalts zu analysieren. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.2.2.2 Lipididentifizierung mittels Dünnschichtchromatografie

Zur Auftrennung und Detektion der Membranlipide wurde die Dünnschichtchromatografie (DC) genutzt. Hierbei wurde der Fokus auf die Identifizierung der entsprechenden Kopfgruppen gelegt. Durch die Variation der mobilen Phase (Chloroform/ Wasser/ Methanol) konnten die Lipide bei einem Lösungsmittelverhältnis von 65:30:8 sehr gut aufgetrennt werden. Mit den anschließend genutzten Färbemethoden erfolgte die Visualisierung der funktionellen hydrophilen Kopfgruppen der aufgetrennten Lipide. Mit Hilfe der Ninhydrinlösung wurden Amine angefärbt und durch eine Fluoreszinlösung die Lipide detektiert. Zur näheren Charakterisierung der Kopfgruppen wurden Modellsubstanzen wie Phosphatidylethanolamin (PEA), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) gewählt. Diese Substanzen stellen die am häufigsten vorkommenden Lipidkopfgruppen in Bakterien dar²⁹. Zusätzlich wurde Lecithin als Referenzsubstanz mit einem 99 %igen Anteil an Phosphatidylcholin eingesetzt, welches den maximalen Anteil an hydrophilen Kopfgruppen im Lecithin ausmacht. Der verbleibende Anteil entfällt auf Lipide mit Phosphatidylethanolamin als Kopfgruppe als zweitstärksten Vertreter bei bekannten Bazillenstämmen. Exemplarisch ist in Abbildung 24 a und b (Original- und rekonstruiertes DC-Bild) die Auftrennung der extrahierten Lipide des Stammes JG-B53 dargestellt. In Abbildung 24 c sind die o. g. Referenzsubstanzen unter Verwendung der gleichen Lösungsmittelzusammensetzung als rekonstruiertes DC-Bild dargestellt. Anhand der Dünnschichtchromatogramme konnten keine Unterschiede der beiden untersuchten Lipide der Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass beide Stämme sich im Aufbau und Zusammensetzung der Lipidkopfgruppen nicht signifikant unterscheiden. Für die Membranlipide der beiden Stämme konnte ein Retentionsfaktor von $\approx 0,6$ ermittelt werden. Vergleicht man den Wert mit den getesteten Referenzproben, dann ist ein direkter Vergleich mit dem R_f -Wert von 0,6 der Lecithin-Probe und der Referenzsubstanz (PC) erkennbar. Daher kann aus den Ergebnissen der Dünnschichtchromatografie die Aussage getroffen werden, dass bei den untersuchten Lipiden Phosphatidylcholin die vorherrschende Kopfgruppe darstellt. Durch den Vergleich der Lipide der kombinierten Extraktionsmethode mit Lipiden der einzeln durchgeführten mechanisch-biochemischen- bzw. Lösungsmittlextraktion (Voruntersuchungen) konnte ein identisches DC-Profil der Lipide detektiert werden. Dies zeigt die Effektivität der Extraktionsmethoden auf. Bei den Proben der mechanisch-biochemischen Extraktionsmethode war jedoch ein weiterer Substanzfleck zu erkennen, welcher am Startpunkt zurückbleibt. Dieser kann auf nicht abgetrennte Proteine zurückgeführt werden, welche über das gewählte System nicht auftrennbar sind. Betrachtet man die Proben, die zusätzlich mit Proteinase K behandelt wurden, so ist eine Minimierung des Substanzfleckes am Startpunkt bei gleicher Auftragungsmenge zu erkennen. Dieser Fleck ist bei den Proben der kombinierten Lösungsmittlextraktion (Abbildung 24 a und b, Bahn 4) nicht erkennbar, da hier durch die Überführung in die organische Phase anhaftende Proteine aus dem vorangegangenen Zellaufschluss in der wässrigen Phase verbleiben.

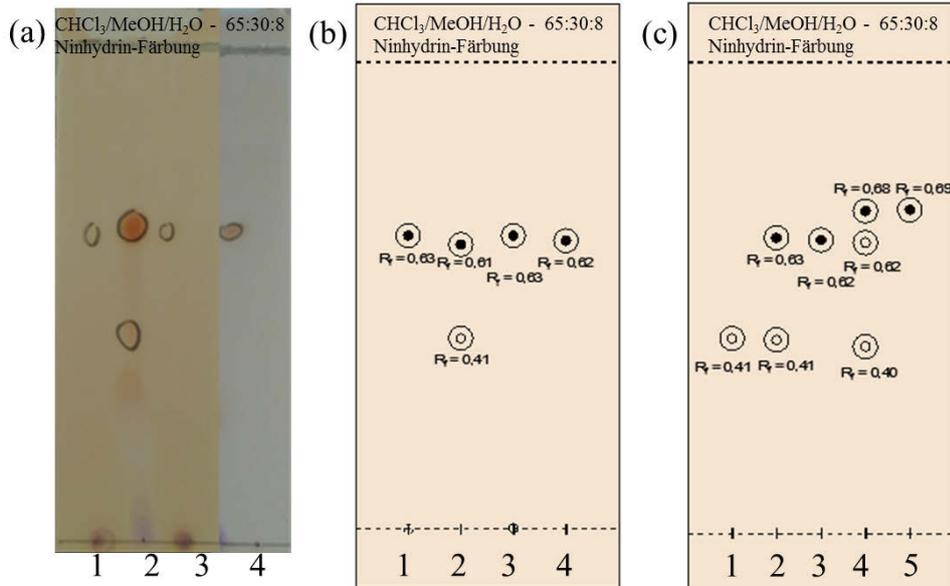


Abbildung 24: (a) DC-Originalbild der Lipidauftrennung von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – Lipide der mechanisch-biochemischen Lipidextraktion vor der Zugabe von Proteinase K (Bahn 1), Lecithin-Standard (Bahn 2), Lipide der mechanisch-biochemischen Lipidextraktion nach der Zugabe von Proteinase K (Bahn 3), Lipide der kombinierten Extraktionsmethode (Bahn 4); (b) rekonstruiertes DC-Bild von Abbildung (a) mit R_f-Werten; (c) getestete Referenzsubstanzen mit R_f-Werten aus Voruntersuchungen zur Identifikation der Kopfgruppen, PEA-Standard (Bahn 1), Lecithin-Standard (Bahn 2), PC-Standard (Bahn 3), Mix-Standard aus Lecithin, PC, PS und PEA (Bahn 4), PS-Standard (Bahn 5).

In weiteren Versuchen wurde die Stabilität der in Wasser und Lösungsmittel gelagerten Lipide untersucht. Hierbei konnte exemplarisch für den Stamm JG-B53 und vergleichender Weise für das Modelllipid Lecithin, welche in wässriger Lösung suspendiert vorlagen festgestellt werden, dass nach 4-8 Wochen weitere Substanzflecke nach dem Anfärben zu erkennen sind. Dieser Effekt (Daten nicht gezeigt) konnte bei vergleichbaren Proben, welche in Chloroform gelöst waren, nicht festgestellt werden. Daher ist eine Abspaltung der gebundenen Fettsäuren sehr wahrscheinlich. Da jedoch dieses Phänomen nur bei den wässrigen Proben zu erkennen war, kann eine wasserinduzierte Lipidoxidation angenommen werden, bei der die Fettsäurereste stufenweise hydrolytisch abgebaut werden²⁰⁴. Da die Präparation der Lipide über die mechanisch-biochemische Methode nicht unter sterilen Bedingungen erfolgt, können weitere Einflüsse durch enzymatische Spaltung durch das Einwirken von Lipasen nicht ausgeschlossen werden^{29, 205, 206}. Da durch die gewählte Anfärbemethode nur die stickstoffhaltigen Kopfgruppen sichtbar gemacht werden, ist mit abnehmendem Retentionsfaktor die Abspaltung der Fettsäurereste von den Kopfgruppen zu vermuten. Durch die abgespaltenen Fettsäuren wechselwirkt der entsprechende Phosphatidylcholinrest stärker mit der stationären Phase (Kieselgelträgermaterial) und wird somit schlechter über die feste Phase transportiert. Dies führt zu geringeren R_f-Werten im Vergleich zu den intakten Membranlipiden. Daher sollte eine Lagerung der Lipide nur in wasserfreier Form als Lyophilisat oder im entsprechenden organischen Lösungsmittel erfolgen, um die Lipidoxidation zu vermeiden.

4.2.2.3 Ermittlung des Fettsäureprofils mittels GC-FID

Mittels der GC-FID konnten die derivatisierten Fettsäuren der isolierten Membranlipide der beiden Stämme bestimmt werden. Hierfür wurden von beiden Stämmen Lipidisolatate der kombinierten Lipidextraktion vergleichend zu den genannten Einzelisierungsstrategien (Methode 1 in Tabelle 12) und der reinen Lösungsmittel- (Methode 2 in Tabelle 12) und der mechanisch-biochemischen-Extraktion (Methode 3 in Tabelle 12) dargestellt. Dies soll als Vergleich der Darstellung der unveränderten Fettsäurezusammensetzung in Abhängigkeit der genutzten Extraktionsmethoden dienen. In Abbildung 25 sind exemplarisch die GC-FID-Chromatogramme der FAMES aus den Lipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 dargestellt, welche aus der kombinierten Extraktionsmethode isoliert wurden. Die GC-FID Messungen der Lipide beider Stämme erfolgten am UFZ in Leipzig in der Arbeitsgruppe von Dr. Hermann Heipieper.

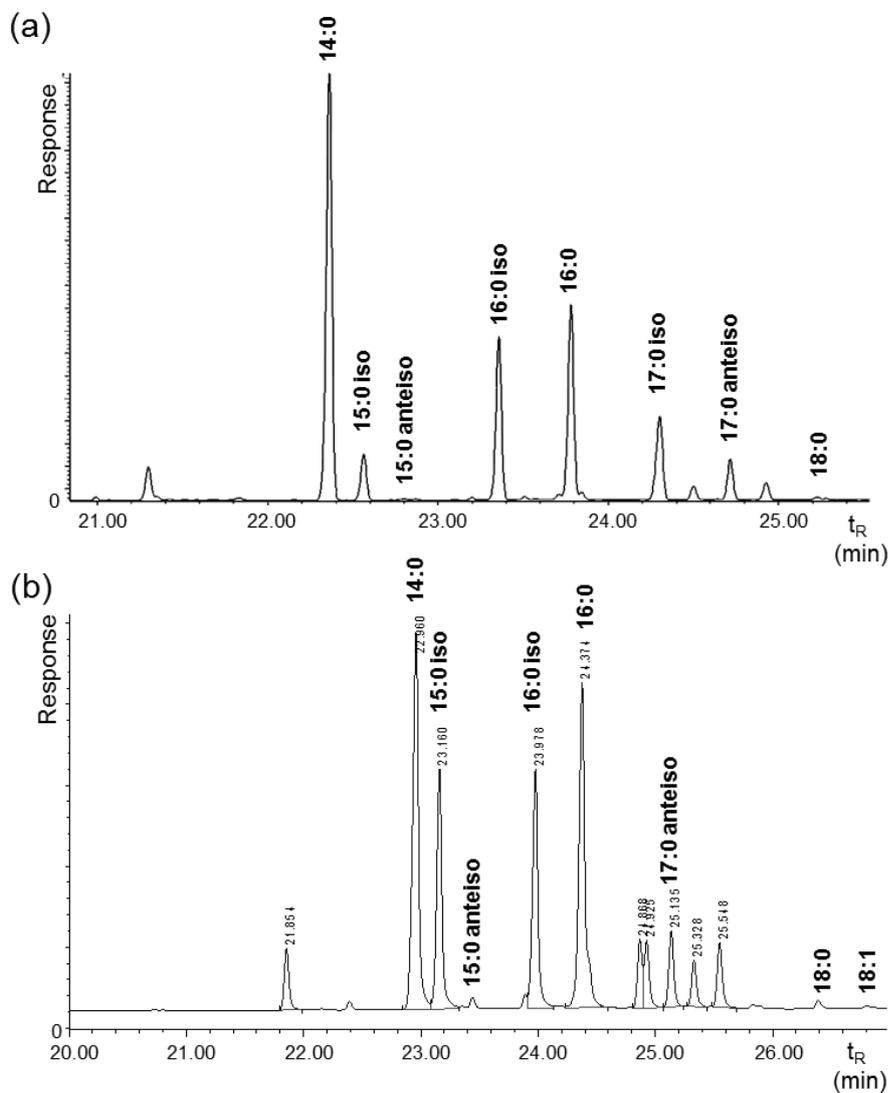


Abbildung 25: GC-FID Chromatogramme der FAMES von: (a) *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 (Nicht gekennzeichnete Peaks sind FAME-Standardlösungen zuzuordnen).

In Abbildung 25 a und b sind die Peaks der FAMES aus den Membranlipiden mit aufsteigender Retentionszeit dargestellt. Dabei erfolgte die Zuordnung der detektierten Peaks zu den korrespondierenden Fettsäuren. Die nicht gekennzeichneten Peaks stammen aus den Messlösungen zugesetzten Standardlösungen an FAMES und wurden für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Die in den Chromatogrammen dargestellten Retentionszeiten der einzelnen FAMES sind dabei abhängig von der Kettenlänge des Kohlenwasserstoff- (KWS) Grundgerüsts der Fettsäuren. Daher werden Peaks kürzerer Fettsäureketten wie z. B. die der Myristinsäure (14:0) zuerst im Chromatogramm detektiert, gefolgt von Fettsäuren aufsteigender Kettenlänge (z. B. Palmitinsäure, 16:0). Die Ergebnisse der in Abbildung 25 dargestellten integralen Peakflächen und der daraus berechneten prozentualen Anteile der bestimmten FAMES bzw. der korrespondierenden Fettsäuren der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Fettsäureprofil der isolierten Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53.

Organismus	Stamm	Methode	Fettsäureanteile [%]									Σ
			14:0	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0 iso	16:0	17:0 iso	17:0 anteiso	18:0	18:1 cis d9	
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	JG-A12	*1	43,79	4,60	0,33	16,21	21,09	9,68	4,09	0,21	0	100
	JG-A12	*2	41,64	6,14	0,41	14,41	21,53	12,05	3,47	0,36	0	100
	JG-A12	*3	37,83	4,58	0,25	13,65	24,33	12,65	6,50	0,21	0	100
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	JG-B53	*1	30,43	17,64	0,19	17,91	27,48	0	5,13	0,68	0,53	100
	JG-B53	*2	30,49	17,85	0,74	17,06	27,77	0	5,06	0,67	0,36	100
	JG-B53	*3	30,30	17,51	0,62	17,55	27,06	0	5,47	0,91	0,59	100

*1 ... reine Lösungsmittelextraktion

*2 ... kombinierte Lipidextraktion

*3 ... reine mechanisch-biochemische Extraktion

Die Werte aus Tabelle 12 errechnen sich aus den ermittelten integralen Peakflächen, welche in den Chromatogrammen gegenüber der Retentionszeit dargestellt sind (Abbildung 25). Aus Tabelle 12 ist erkenntlich, dass sich das Fettsäureprofil der untersuchten Membranlipide nahezu unabhängig von der gewählten Isolierungsmethode und der Biomassencharge verhält, aus denen die Lipide extrahiert wurden. Dies lässt sich aus den minimalen Schwankungen der prozentual vorkommenden Fettsäuren ableiten. Unter Beibehaltung der beschriebenen Kultivierungsbedingungen wie z. B. Temperatur, Nährmedium und dem Erntezeitpunkt der Biomasse am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen herrscht eine reproduzierbare und kaum variierende Fettsäurezusammensetzung vor. Durch Veränderungen der Kultivierungstemperatur, Substratzugabe oder Erntezeitpunkt ist es jedoch möglich, Einfluss auf die Zusammensetzung zu nehmen und eine Verschiebung der prozentualen Fettsäureanteile zu erreichen oder gezielt Einfluss auf die Bildung einzelner Fettsäuren zu nehmen^{30, 207, 208}. Aus den erhaltenen Daten ist ersichtlich, dass beide Extraktionsmethoden zur Isolierung der Membranlipide geeignet sind, da aus beiden Proben keine signifikanten Schwankungen in der Zusammensetzung festgestellt werden konnte. Im Vergleich der Membranlipide beider Bakterienstämme untereinander ist erkennbar, dass trotz der jeweils vier dominierenden Fettsäuren

(Markierungen in Tabelle 12) sich die Zusammensetzung stark unterscheidet. *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 weist beispielsweise keine ungesättigten Fettsäuren auf, wie sie in Form der *cis*-konfigurierten Ölsäure (*cis* 18:1 d9) bei *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 vorkommt. Hingegen kommt es zu einer verstärkten Bildung von C₁₇ iso-Fettsäuren, welche sich im Profil von JG-B53 nicht wiederfinden lassen. Ebenfalls charakteristische Unterschiede in den enthaltenen Fettsäuren der Membranlipide sind in dem signifikant höheren Anteil an Myristinsäure bei *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 ($\sum_{14:0} \approx 41\%$) im Vergleich zu JG-B53 ($\sum_{14:0} \approx 30\%$) zu erkennen. Beide untersuchten Membranlipide weisen sehr hohe Anteile an Palmitinsäure (16:0) und 14-Methylpentadecansäure (16:0 iso) auf. Die Beschreibung und die Strukturen der detektierten Fettsäuren in den Lipiden beider Stämme sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 13: Fettsäuren der Membranlipide der Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53.

Abkürzung	Name	Strukturformel
14:0	n-Tetradecansäure (Myristinsäure)	
15:0 iso	13-Methyltetradecansäure	
15:0 anteiso	12-Methyltetradecansäure	
16:0 iso	14-Methylpentadecansäure	
16:0	n-Hexadecansäure (Palmitinsäure)	
17:0 iso	15-Methylhexadecansäure	
17:0 anteiso	14-Methylhexadecansäure	
18:0	n-Octadecansäure (Stearinsäure)	
<i>cis</i> 18:1 d9	<i>cis</i> -9-Octadecensäure (Ölsäure)	

Diese Unterschiede im Profil zeigen, dass anhand der Fettsäuren aus den Membranlipiden eine zusätzliche Methode zur Unterscheidung der beiden Stämme entwickelt werden kann. Die gemittelten Fettsäureanteile der beiden Stämme sind in Abbildung 26 a und b vergleichend dargestellt. Es konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit, sowohl bei den Membranlipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, als auch bei denen von JG-B53 dargestellt werden, dass je kürzer die Fettsäuren sind, die Methylverzweigungen bevorzugt an der zweiten Position (iso) der KWS-Kette entstehen.

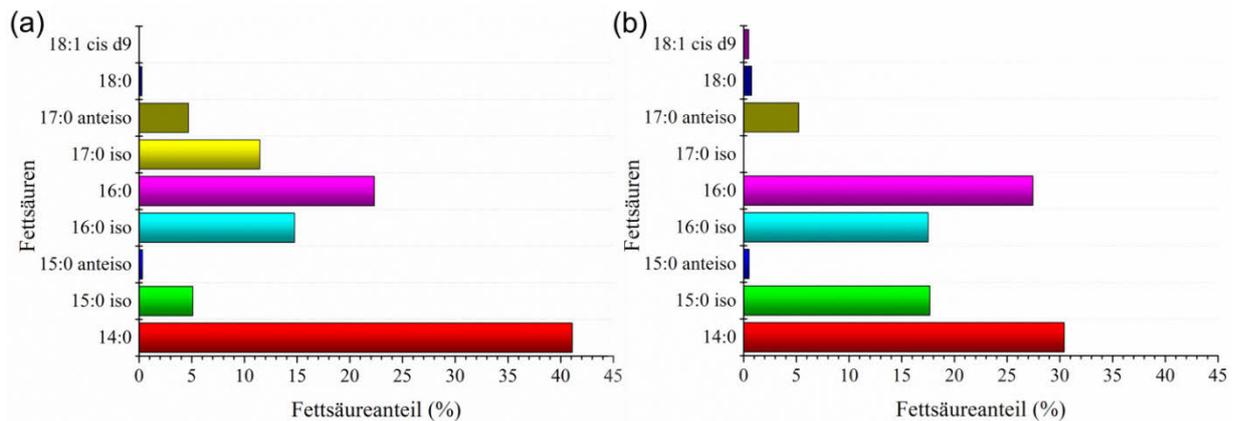


Abbildung 26: Fettsäurezusammensetzung von (a) *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) JG-B53.

Vergleichend zu weiteren Bakterienstämmen aus der Literatur wie *Bacillus cereus* B-17, *Bacillus subtilis* B-4, *Bacillus thuringiensis* W.S. und *Lysinibacillus sphaericus* (alte Stammbezeichnung: *Bacillus sphaericus*) ist das für die Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ermittelte Fettsäureprofil sehr typisch für Bakterienarten^{30, 209}. Die Variation der Kohlenstoffkettenlänge beträgt sowohl bei den aus der Literatur bekannten Spezies und den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen zwischen C₁₄ und C₁₆. Die dominierenden Fettsäuren bilden dabei meist unverzweigte C₁₄- und C₁₆-KWS-Ketten sowie verzweigte 15:0 iso-, 15:0 anteiso-, 16:0 iso-, 17:0 iso-, 17:0 anteiso-KWS-Ketten, wie sie in Abbildung 26 für die Fettsäuren der in dieser Arbeit untersuchten Membranlipide dargestellt sind. Diese verzweigten Ketten (iso- und anteiso-Fettsäuren) mit der Methylgruppe an Position 2 und 3 der KWS-Kette spielen eine entscheidende Rolle in der Phospholipidsynthese für die Membranfunktion. Vor allem das Vorkommen von 15:0 iso und 16:0 anteiso Fettsäuren ist bei vielen Mikroorganismen ähnlich stark ausgeprägt wie z. B. bei *Bacillus subtilis* B-7, *Bacillus cereus* B-17 oder bei *E. coli*^{209, 210}. Wie in der Literatur allgemein für Bakterien vom Typ *Lysinibacillus sphaericus* beschrieben, kann die 15:0 iso-Fettsäure bei beiden untersuchten Stämmen jedoch nicht als dominierende Fettsäure detektiert werden²¹. Die Lipide von JG-B53 zeigen jedoch einen wesentlich höheren Anteil von 15:0 iso-Fettsäuren als die Lipide von JG-A12 auf.

Ebenfalls konnte durch Kaneda, T. et al. (1977) herausgefunden werden, dass die Bildung von verzweigten Fettsäuren und deren Position (Position 1 oder 2) am Phosphatidylglycerol einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionen und physikalischen Eigenschaften des gesamten Phospholipids haben²⁰⁹. So kann beispielsweise die Fluidität, die Phospholipidsynthese und Konformationseigenschaften beeinflusst werden. Kaneda, T. et al. (1977) stellte dabei fest, dass je kürzer die gebildeten Fettsäuren sind, desto bevorzugter ist die Position 2 am Phosphatidylglycerol²⁰⁹. Dabei stellte er für Fettsäuren mit gleicher Kohlenstoffanzahl die folgende Bindungspräferenz an Position 2 auf: anteiso > iso > unverzweigte Fettsäuren. Ableitend daraus würde sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ein bevorzugte Bindungspräferenz an der zweiten Position des Glycerolrückgrates von 15:0 anteiso < 15:0 iso < 14:0 ergeben. Dies ist jedoch in weiteren Untersuchungen zur Strukturaufklärung noch genauer zu betrachten. Aus den ermittelten Fettsäuren der beiden Membranlipide lassen sich ebenfalls Aussagen zu einer weiteren Eigenschaft

der Membranlipidschicht treffen. Die Membranfluidität wird dabei durch die Art der Fettsäuren innerhalb der Phospholipide beeinflusst. Durch die Mischung an langen unverzweigten Fettsäuren wie Myristin- und Palmitinsäure beider Stämme ($\Sigma \approx 60\%$) sowie langkettigen und verzweigten Fettsäuren der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53, kann auf eine sehr hohe Beweglichkeit der Lipide in der Membran und somit auf eine hohe Membranfluidität geschlossen werden. Durch die Präsenz der verzweigten Fettsäuren in den Membranlipiden dieser Arbeit kann die Phasenübergangstemperatur zwischen einer parakristallinen Lipidschichten und weniger geordneten Lipidschichten gesenkt werden (Flüssig-Mosaik-Modell)^{211, 212}. Dadurch kann die Ausbildung eines parakristallinen Zustandes der Membran erschwert werden, welcher zu einer starren Membran führen würde. Ein solcher Zustand könnte wichtige Beteiligungen der Membran z. B. an der Zellteilung, dem Transport von Substanzen und weiterer Prozesse, wie z. B. die Proteinbiosynthese erschweren²¹². Dabei ist die Art der Lipide jedoch stark von der Temperatur abhängig. Eine Verringerung der idealen Wachstumstemperatur der Bakterien kann dabei zu einer verstärkten Bildung von anteiso-Fettsäuren führen, welche eine niedrigere Schmelztemperatur aufweisen als verzweigte Fettsäuren²⁰⁹. Ebenfalls wird die Ausbildung des starren parakristallinen Zustandes der Membran durch die verzweigten Fettsäuren erschwert. Durch die vermehrte Bildung dieser Fettsäuren kann die Membranfluidität erhöht und die Membranfunktion aufrechterhalten werden. Betrachtet man die untersuchten Membranlipide dieser Arbeit so kann kein signifikanter Unterschied der Fluidität in einer realen Membran beider Stämme aufgrund der in Summe gleichen Fettsäureanteile ($\Sigma_{\text{unverzweigte Fettsäuren}} \approx 60\%$, $\Sigma_{\text{verzweigte Fettsäuren}} \approx 40\%$) abgeleitet werden. Die Präsenz der Ölsäure (*cis* 18:1 d9) bei den Lipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 kann jedoch ein Indiz für eine geringfügig höhere Fluidität sein als bei JG-A12. Durch den „Knick“ in der Fettsäure-Acylkette kann ein dichtes Packen der Lipide gestört werden und die Fluidität somit steigern²¹².

Zusammenfassend ist bei den isolierten Membranlipiden ein erhöhtes Vorkommen an unverzweigten Fettsäuren wie Myristinsäure (14:0) und Palmitinsäure (16:0) zu verzeichnen, welche unter den gewählten Wachstumsbedingungen (Temperatur von 30 °C und Nährmedium) der Mikroorganismen charakteristisch für verschiedene Extraktionschargen beider verwendeter Stämme ist. Die Bildung von unverzweigten (gesättigte und ungesättigt), sowie in ungesättigten Fettsäuren gilt in Abhängigkeit von der Temperatur als charakteristisch für viele Bakterienstämme³⁰. Die unterschiedlich starke Ausbildung verzweigter Fettsäureketten bei beiden untersuchten Stämmen wie z. B. 17:0 iso- oder 15:0 iso-Fettsäuren kann als signifikant angesehen werden, kann ein Hinweis auf verschiedene metabolische Mechanismen sein und kann daher als mögliche Identifizierung der beiden Mikroorganismen genutzt werden³⁰. Ebenfalls konnte die Ölsäure nur im Fettsäureprofil von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 detektiert werden.

4.2.2.4 Lipididentifizierung mittels ESI-MS

Auf Grund der hohen Relevanz und der vielfältigen Funktionen der Zellmembranen (Phospholipidschicht) in den Organismen von Archaeen, Pflanzen und Menschen wie z. B. der Kompartimentierung, intrazelluläre Adhäsionen oder Substrataufnahme sind viele Analysemethoden zur Detektion von Lipiden und der Strukturaufklärung entwickelt worden²¹³. In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung der isolierten Membranlipide durch die Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie. Diese Methode bietet den Vorteil, dass durch die relative weiche Ionisationsmethode sowohl größere Lipidfragmente als auch intakte Lipidmoleküle wesentlich sensitiver erfasst werden und Matrixeffekt minimiert werden können, als dies beispielsweise bei der Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie (FAB-MS) möglich ist^{210, 213, 214}. Durch die Energie der Ionisation im elektrischen Feld werden positive und negative Ladungen an den Lipiden erzeugt. Durch die Molekülkollisionen werden Fragmente erzeugt, welche im Detektor mit unterschiedlichen Flugzeiten (time of flight) detektiert werden²¹⁵. Jedes Fragment kann somit bezüglich des entsprechenden Masse zu Ladungsverhältnisses (m/z) gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Fragmente im positiven Ionisationsmodus (ES+) als auch Fragmente negativen Ionisationsmodus (ES-) detektiert. Unter Verwendung des positiven Ionisationsmodus konnten die hydrophilen Kopfgruppen der isolierten Lipide charakterisiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Referenzsubstanzen untersucht um eine fundierte Datengrundlage für die Vergleichbarkeit der Untersuchungen zu den Membranlipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 zu erhalten. Hierfür wurden die Referenzsubstanzen 1,2-Distearyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (PC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (PS), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamin (PEA) sowie Lecithin untersucht. Exemplarisch ist in Abbildung 27 das Massenspektrum von PC dargestellt. Auf die Darstellung der weiteren Referenzen wird aufgrund der erhaltenen Daten der Dünnschichtchromatografie, welche Phosphatidylcholin als dominierende Kopfgruppe identifiziert hat, verzichtet. Als Kopfgruppe konnte bei der Messung der Referenzsubstanz (PC) im positiven Ionisationsmodus (Abbildung 27 a) Phosphatidylcholin bei einem $m/z=184$ $[PC+H]^+$, der Gesamtmolmassenpeak bei $m/z=790$ $[M+H]^+$, bei $m/z=1580$ $[2M+H]^+$ der doppelte Molmassenpeak und das Diacylglycerinderivat bei $m/z=607,5$ $[DAG]^+$ detektiert werden. Unter Verwendung des negativen Ionisationsmodus (Abbildung 27 b) war es möglich, die Fragmente der Stearinsäure der Referenzsubstanz bei $m/z=283$ $[18:0-H]^-$ als auch eine Methylgruppenabspaltung bei $m/z=774$ $[M-CH_3]^-$ am hydrophilen Ende des Membranlipids zu detektieren. Bei der Referenzsubstanz Lecithin wurde ebenfalls Phosphatidylcholin als dominierende Kopfgruppe im positiven Ionisationsmodus detektiert. Im negativen Ionisationsmodus konnten bei dem verwendeten Lecithin (kommerzielles natürliches Isolat) eine Vielzahl an Fragmentenpeaks detektiert werden, welche den im Lecithin enthaltenen Fettsäuren zugeordnet werden konnten. Dabei konnten die Peaks bei $m/z=241$ $[15:0 \text{ iso-}H]^-$ bzw. $[15:0 \text{ anteiso-}H]^-$, bei $m/z=255$ $[16:0 \text{ iso-}H]^-$ bzw. $[16:0 -H]^-$ und bei $m/z=283$ $[18:0-H]^-$ detektiert werden. Die Peakpositionen sind zusammen mit den Daten der isolierten Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgelistet.

In den Massespektren der beiden isolierten Membranlipide (Abbildung 28 und Abbildung 29) konnten im positiven Ionisationsmodus bei $m/z=184$ der $[\text{PC}+\text{H}]^+$ Peak identifiziert werden, welcher analog den Untersuchungen der Referenzsubstanzen der Phosphatidylcholin-Kopfgruppe zugeordnet werden kann. Weitere Molmassenpeaks, welche auf die Präsenz anderer Kopfgruppen wie PEA ($m/z=141$ für $[\text{PEA}+\text{H}]^+$) oder PS ($m/z=141$ für $[\text{PS}+\text{H}]^+$) vergleichend zu den Peakpositionen der Referenzsubstanzen (Tabelle 14) hinweisen, konnten im positiven Ionisationsmodus nicht detektiert werden. Dies bekräftigt die getroffenen Aussagen resultierend aus den Ergebnissen der Dünnschichtchromatografie, welche Phosphatidylcholin bei den Membranlipiden der Stämme *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 als dominierende Kopfgruppe identifiziert haben. Aufgrund der Vielzahl an Fettsäuren der beiden untersuchten Membranlipide und den vielen Kombinationsmöglichkeiten der enthaltenen Fettsäuren am Glycerolrückgrat kann nur ein Gesamtmolmassenbereich der Lipide von JG-A12 und JG-B53 sowie ein $[\text{DAG}^+]$ -Bereich angegeben werden. Die Bereichsauswahl ($m/z=670-800$) bezieht sich jeweils auf die kleinste Kombinationsmöglichkeit ($2 \times \text{C}_{14}$ -KWS-Kette) zur größten ($2 \times \text{C}_{18}$ -KWS-Kette).

Unter Verwendung des negativen Ionisationsmodus wurden die abgespaltenen Fettsäurereste der Membranlipide als Carboxylatanionen detektiert. Auffällig bei den in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellten Spektren ist, dass bei den isolierten Membranlipiden von JG-A12 und JG-B53 eine wesentlich größere Peakanzahl vorhanden ist als bei den untersuchten synthetisierten Referenzsubstanzen (Abbildung 27). Dies ist wahrscheinlich auf die Vielzahl an Membranlipiden zurückzuführen, welche durch die unterschiedlichen Fettsäuren gebildet werden können. Diese Membranlipidvielfalt führt bei der Ionisation des Probengemisches zu einer verstärkten Signal-/Peakanzahl. Wie in Abbildung 28 b und Abbildung 29 b in den Spektren des negativen Ionisationsmodus erkennbar ist, konnten bei beiden Stämmen dominierende Molmassenpeaks detektiert werden, welche den Fettsäuren der Membranlipide als $[\text{RCOOH}-\text{H}]^-$ -Peaks eindeutig zugeordnet werden konnten. Diese Peaks sind in Tabelle 15 vergleichend zusammengefasst. Aufgrund der gleichen Molmassen der 15:0 iso- und 15:0 anteiso- (242,40 g/mol), der 16:0 iso- und 16:0- (256,42 g/mol) sowie der 17:0 iso- und 17:0 anteiso-Fettsäuren (270,45 g/mol) können deren korrespondierenden Molmassenpeaks nicht getrennt voneinander detektiert werden. Die Ermittlung der Fettsäuren unter Verwendung der ESI-MS bestätigt die Ergebnisse der untersuchten Membranlipide aus den GC-FID Messungen. Somit konnten sowohl in den Lipiden von JG-A12 als auch von JG-B53 sowohl die unverzweigte Myristin- und Palmitinsäure (14:0), als auch verzweigte Fettsäuren wie z. B. 15:0 iso und 16:0 iso detektiert werden.

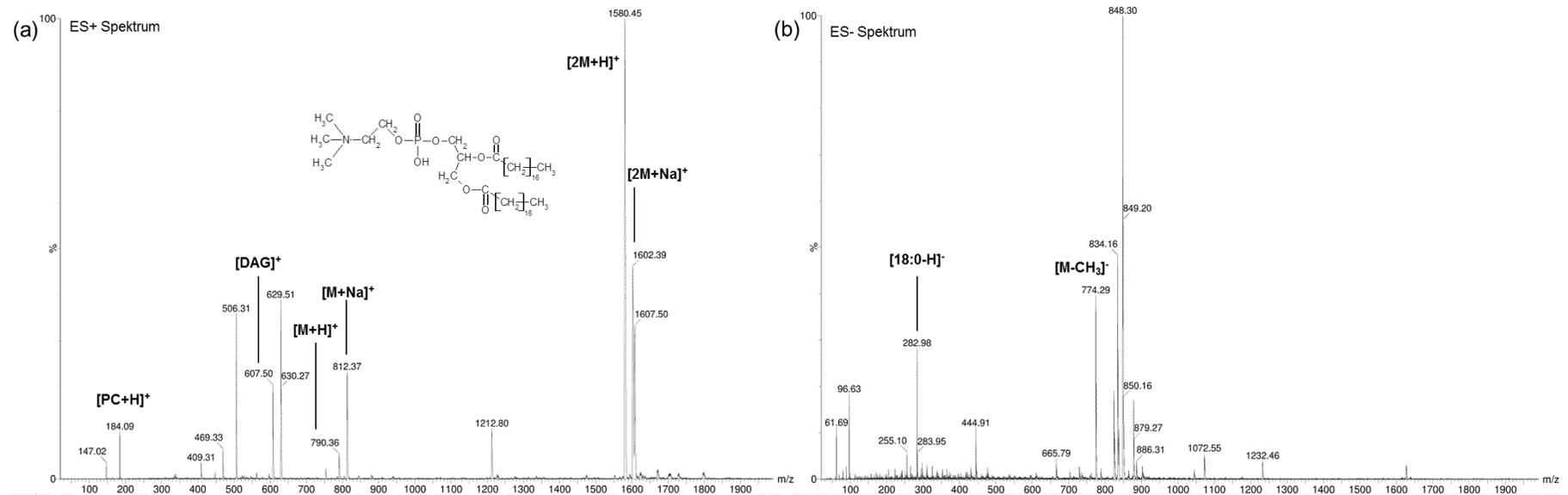


Abbildung 27: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse von 1,2-Distearyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin im (a) ES+ und (b) ES- Modus.

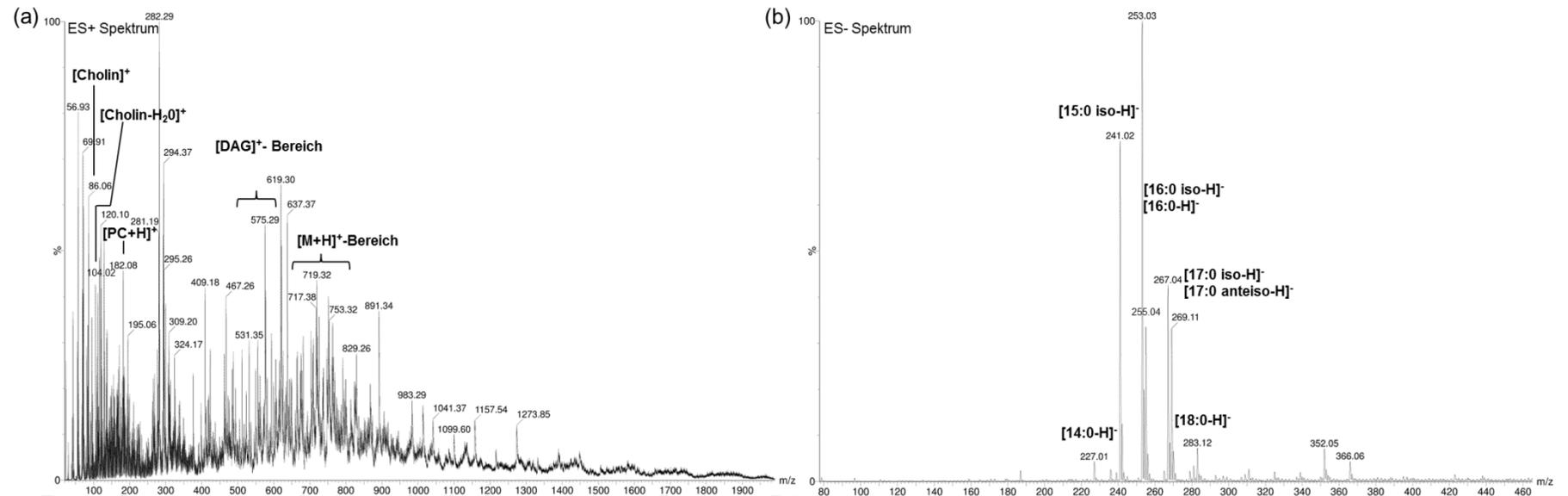


Abbildung 28: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse der Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 im (a) ES+ und (b) ES- Modus.

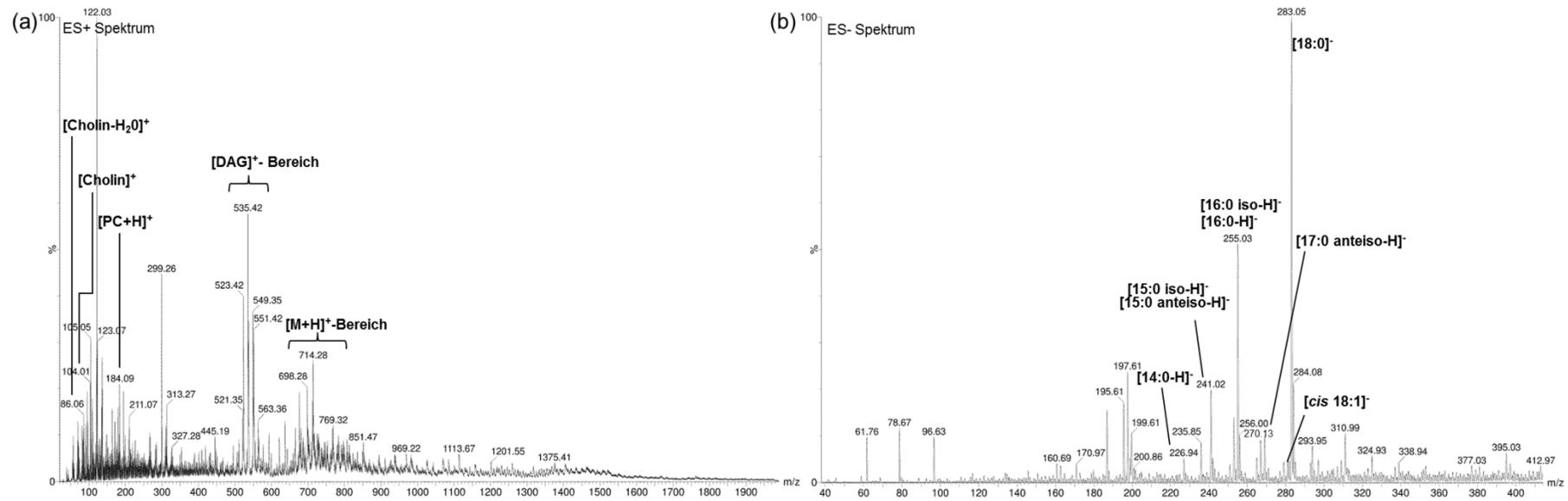


Abbildung 29: Massenspektren und Aufspaltungen der m/z -Verhältnisse der Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 in im (a) ES+ und (b) ES- Modus.

Tabelle 14: Positiv geladene Ionisationsprodukte der isolierten Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 und der Referenzsubstanzen.

Lipidklasse/ Organismus	Ionisationsfragmente (m/z)									
	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[2M+H] ⁺	[2M+Na] ⁺	[DAG] ⁺	[PC+H] ⁺	[PEA+H] ⁺	[PS+H] ⁺	[Cholin] ⁺ ***	[Cholin-H ₂ O] ⁺ ****
PC	790	812	1581	1603	607	184	---	---	(104) Geringe Intensität	(86) Geringe Intensität
PEA*	745	767	1489	1511	604	---	141	---	---	---
PS*	758	780	1516	1538	573	---	---	185	---	---
Lecithin* (Soja)	670- 800**	---	1340- 1600**	---	480- 600**	184	---	185	104	86
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	670- 800**	---	1340- 1600**	---	480- 600**	184	---	---	104	86
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	670- 800**	---	1340- 1600**	---	480- 600**	184	---	---	104	86

* Massespektren nicht dargestellt

** Bereichsangabe durch Variation durch unterschiedliche Fettsäurekombinationen

*** [OHCH₂CH₂N(CH₃)₃]⁺ Abspaltung

**** [OHCH₂CH₂N(CH₃)₃-H₂O]⁺ Abspaltung

Tabelle 15: Negativ geladene Ionisationsprodukte der isolierten Lipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 und der Referenzsubstanzen.

Lipidklasse/ (Organismus)	Ionisationsfragmente (m/z)										
	[M-H] ⁻	[M-CH ₃] ⁻	[RCOOH-H] ⁻								
			14:0	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0 iso	16:0	17:0 iso	17:0 anteiso	18:0	18:1 cis d9
PC	---	774	---	---	---	---	---	---	---	283	---
PEA*	743	---	---	---	---	---	---	---	---	---	281
PS*	756	742	---	---	---	---	255	---	---	---	---
Lecithin* (Soja)	---	---		241	241	255	255	(---)**	(---)**	283	(---)**
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	---	---	227	241	241	255	255	269	269	283	---
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	---	---	227	241	241	255	255	269	(269)	283	281

* Massespektren nicht dargestellt

** Signale sind vorhanden, jedoch mit sehr geringer relativer Intensität

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der ESI-MS Untersuchungen der Membranlipide mit anderen Forschungsarbeiten aus der Literatur, so kann Phosphatidylcholin ($[\text{PC}+\text{H}]^+$) eindeutig dem Molmassenpeak bei $m/z=184$ (positiver Ionisationsmodus) zugeordnet werden^{215, 216}. Ebenso konnten die charakteristischen Peaks bei $m/z=104$ für das Cholinprodukt ($[\text{Cholin}]^+$) bei $m/z=86$ für das Cholinprodukt ohne Wasser ($[\text{Cholin}-\text{H}_2\text{O}]^+$) detektiert werden. Ebenfalls zeigen Vergleiche zu den Arbeiten von Kerwin, J. L. et al. (1996), dass die ESI-MS eine geeignete Methode ist, um Fettsäuren aus biologischen Proben im negativen Ionisationsmodus zu detektieren²¹⁷. Dabei konnten durch Kerwin, J. L. et al. (1996) dominierende Molmassenpeaks ($[\text{M}-\text{H}]^-$) der unverzweigten und gesättigten Fettsäuren (Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure), sowie die Wasserabspaltung von der Carboxylgruppe der Fettsäuren ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$) detektiert werden²¹⁷. Letzteres resultiert jedoch in wesentlich geringeren relativen Intensitäten im Spektrum, weshalb in dieser Arbeit wahrscheinlich nur die dominierenden Peaks der Myristin- und Palmitinsäure der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 in den Spektren zu erkennen sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass unter Verwendung der ESI-MS sowohl die hydrophilen Kopfgruppen der Membranlipide als auch die korrespondierenden Fettsäureketten des hydrophoben Phospholipids charakterisiert werden konnten. Es wurde für die Ermittlung der entsprechenden Kopfgruppen die theoretische molare Masse der häufigsten auftretenden Gruppen errechnet und über Peaks (m/z) ausgewertet. Die erhaltenen Daten der korrespondierenden Fettsäuren aus den ESI-MS Spektren korrelieren sehr gut mit den GC-FID Fettsäureprofilen und bestätigen diese Ergebnisse. Die detektierten hydrophilen Kopfgruppen der Lipidextrakte bestätigen weiter die Ergebnisse der Dünnschichtchromatografie und konnten zusätzlich durch das Vermessen von Referenzsubstanzen verifiziert werden. Die Zusammensetzung der Membranlipide aus *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ist vergleichbar mit Lipiden, welche aus gram-positiven und gram-negativen Mikroorganismen isoliert wurden. Hierbei ist ein ähnliches Verteilungsmuster der enthaltenen Fettsäuren erkennbar. Bei beiden Lipidisolaten konnte als dominierende Kopfgruppe Phosphatidylcholin identifiziert werden. Betrachtet man die in den ESI-MS Ergebnissen dargestellten Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 zu dem verwendeten Lecithin, so kann diese Substanz als ein vereinfachtes System für die beiden Membranlipide der Bakterien genutzt werden. Alle drei Lipide weisen Phosphatidylcholin als dominierende Kopfgruppe auf und bieten durch die verschiedenen Fettsäuren von C_{15} - C_{18} eine hohe Kombinationsvielfalt an Lipiden, welche dem natürlichen System in der Zellmembran ähnelt. Aus diesem Grund wurde Lecithin für die Herstellung der Lipidvesikel und der Ausbildung geschlossener Lipiddoppelschichten auf technischen Oberflächen in den QCM-D-Versuchen als natürliches Referenzsystem genutzt.

4.2.3 Isolierung und Charakterisierung von Peptidoglykan mit sekundären Zellwandpolymeren

Für die Metallbindungsversuche des PG⁺ sind anhaftende Proteine zu entfernen, um die Metallbindung mit dem PG⁺ direkt untersuchen zu können. Dadurch kann ein Einfluss weiterer Komponenten wie z. B. S-Layer-Proteine und intrazelluläre Proteine ausgeschlossen werden. Daher wird nach dem selektiven Resuspendieren der S-Layer-Proteine das verbleibende graue PG⁺ haltige Pellet mit Guanidinhydrochlorid versetzt, um anhaftende Proteine in Lösung zu bringen. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand verworfen und das Pellet zur Entfernung der Guanidinhydrochloridreste gegen Reinstwasser dialysiert. Weitere Proteinanhaftungen im PG⁺ Pellet wurden durch mehrmalige SDS-Hitzebehandlungen entfernt und das gereinigte Pellet wurde mehrmals mit Reinstwasser gewaschen, um das SDS abzutrennen. Die Proteinabtrennung aus dem Peptidoglykan ist in den SDS-Proteinprofilen in Abbildung 30 a und Abbildung 30 b von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 dargestellt.

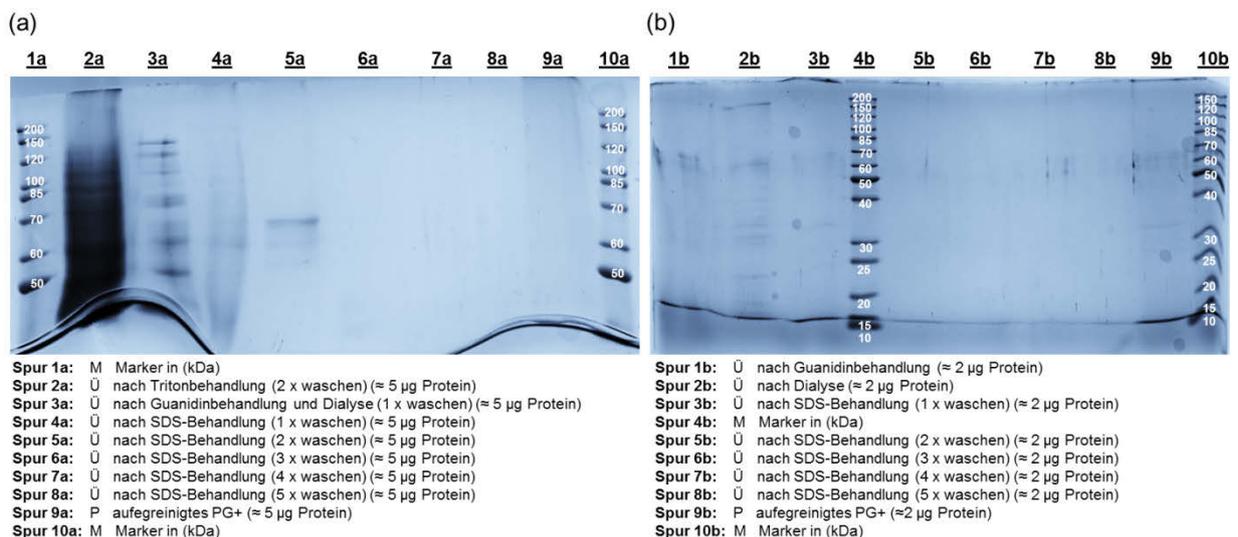


Abbildung 30: SDS-Profil zur Aufreinigung von proteinfreiem PG⁺ von (a) *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

Die Zellwand macht ca. 10-20 % der Biotrockenmasse aus⁶. Daher erfolgt die Berechnung der Ausbeuten für PG⁺ als eine der Hauptkomponente in der Zellwand auf Basis dieser Werte. Somit ergibt sich für das PG⁺ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 bezugnehmend auf die theoretisch maximalen Ausbeute bezogen auf die BTM (1,35 g/l aus 57 l Kultivierungsansatz) eine Ausbeute von 4,6 %. Für das PG⁺ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 ergibt sich eine Ausbeute von 5,8 % bezogen auf die BTM (1,45 g/l aus 57 l Kultivierungsansatz). Für die weiteren Metallsorptionsversuche wurde das Bindungsverhalten von Peptidoglykan mit anhaftenden sekundären Zellwandpolymeren (PG⁺) untersucht, da eine Extraktion der SCWPs mittels Flusssäure nur in sehr geringen Ausbeuten (47 mg SCWPs/≈300 g Biofeuchtmasse; Extraktion aus *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53) möglich war. Somit wurde auf die Extraktion der SCWPs und der Erzeugung von SCWP-freien Peptidoglykan (PG⁻) verzichtet.

4.3 QCM-D Beschichtungsversuche von bakteriellen Zellwandkomponenten und AFM-Analytik

4.3.1 Einfluss der Polyelektrolytmodifizierung auf die S-Layer Rekrystallisation

Am Beispiel von Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 wurde das Rekrystallisationsverhalten der Proteine bezüglich der Adsorptionskinetik, der ausgebildeten Schichtdicke, der Massenadsorption mittels QCM-D untersucht. In Abbildung 31 sind die Adsorptionsverläufe im Frequenz-/Dissipationsplot (a) und im Massenprofil (b) auf PE-modifizierten und nicht modifizierten SiO₂ Sensoren dargestellt.

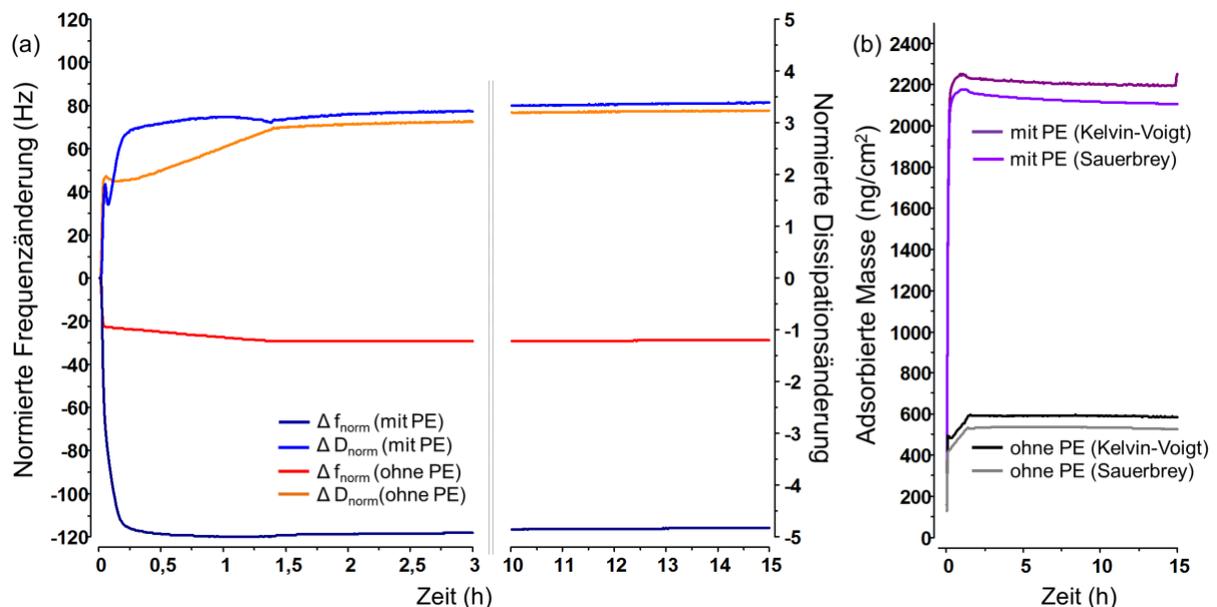


Abbildung 31: Vergleich des Rekrystallisationsverhaltens von S-Layer-Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 auf PE-modifizierten und nicht PE-modifizierten SiO₂-Sensoren innerhalb von 15 Stunden im Frequenz-/Dissipationsplot (a) und im Massenprofil (b).

In Abbildung 31 a ist zu erkennen, dass nach Zugabe der Slp1 Lösung im Rekrystallisationspuffer zu den nicht modifizierten SiO₂ Sensoren eine Adsorption der Proteine auf der Oberfläche stattfindet. Durch den direkten Zusammenhang über die Sauerbrey-Beziehung kann aufgrund der Frequenzverringerung auf eine schnelle Massenabscheidung geschlossen werden. Die Adsorption von Slp1 auf den nicht modifizierten Sensoren zeigt jedoch nur eine sehr geringe Frequenzänderung (roter Kurvenverlauf) von ca. 20 Hz. Daraus kann eine geringe Massenadsorption und eine nicht vollständig mit Proteinen beschichtete Oberfläche abgeleitet werden. Betrachtet man weiter den Kurvenverlauf der Versuche ohne PE so ist zu erkennen, dass eine Massenlagerung bis zu 1,5 h stattfindet und somit auf eine lange Proteinadsorption aufzeigt. Die Versuche wurden über 15 Stunden durchgeführt um eine mögliche Proteinabscheidung bzw. Proteinrekrystallisation auf den nicht modifizierten Sensoren zu ermöglichen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass kein weiterer Massenzuwachs bis zum Ende des Versuchs stattgefunden hat. Betrachtet man die Dissipationswerte der Messungen ohne PE (oranger Kurvenverlauf) nach der Slp1 Zugabe kommt es zu einer Erhöhung der Dissipationswerte auf ca. 3,5 innerhalb von 1,5 h. Dies zeigt die Adsorption von viskoelastischen

Molekülen auf der Oberfläche, welche das Schwingungsverhalten des Sensor Kristalls nach Abschaltung der angelegten Spannung sehr stark dämpfen. Diese Dämpfung durch die Moleküle führt zu einer Erhöhung der Dissipationswerte. Im Massenprofil (Abbildung 31 b) ist im Fall der Slp1 Abscheidung auf der nicht modifizierten SiO₂ Sensoroberfläche ist nur ein geringer Massenaufwuchs von ca. 525 ng/cm² (Sauerbrey) und 585 ng/cm² (Kelvin-Voigt) zu erkennen.

Betrachtet man in Abbildung 31 a die Versuche der Proteinadsorption auf PE modifizierten Sensoroberflächen, dann kann nach der Zugabe Slp1 Lösung im Rekristallisationspuffer zu den Sensoren eine schnelle Adsorption auf der Oberfläche erkannt werden. Dies ist durch den Frequenzverlauf (dunkelblaue Kurve) und den Zusammenhang zwischen Frequenz- und Masseänderung der Sauerbrey-Beziehung zu beobachten. Im Fall des Frequenzverlaufs der PE-modifizierten Sensoren ist innerhalb der ersten 5-10 Minuten eine Frequenzänderung von ca. 115 Hz zu erkennen. Nach ca. 10 Minuten ist die Massenabscheidung auf den PE-modifizierten Sensoroberflächen nahezu abgeschlossen, resultierend aus nahezu konstanten Werten der Frequenzänderungen. Kleinere Frequenzänderungen resultieren wahrscheinlich aus der Desorption kleinerer schwach adsorbierter Proteine von der Sensoroberfläche. Die Dissipationswerte der Versuche mit PE (blauer Kurvenverlauf) steigen innerhalb der ersten 10 Minuten auf einen Wert von ca. 3,5 an und zeigen die Anlagerung von viskoelastischen Molekülen auf der Sensoroberfläche auf. Im direkten Vergleich der Messungen, kann bei den Versuchen mit PE-modifizierten Oberflächen eine schnellere Adsorption von viskoelastischen Molekülen erkannt werden, als bei den Versuchen auf reinen SiO₂-Oberflächen. Die Unterscheidung zwischen der Abscheidung eines dünnen elastischen Films und kleinen Proteinagglomeraten kann auf Basis der hier ermittelten Dissipationswerte nicht erfolgen. Die ermittelte Energiedämpfung in Folge der Proteinadsorption ermöglicht nur Aussagen zu den viskoelastischen Eigenschaften der abgeschiedenen Moleküle und Schichten auf der Sensoroberfläche. Im Massenprofil der Slp1 Abscheidung auf den PE-modifizierten Sensoren konnte ein Massenaufwuchs von ca. 2105 ng/cm² (Sauerbrey) und 2190 ng/cm² (Kelvin-Voigt) detektiert werden.

Die Experimente haben gezeigt, dass durch die Nutzung von Polyelektrolytschichten (PEI/PSS/PEI) als haftvermittelnden Untergrund und durch die positive Nettoladung der PEI-Schicht eine schnellere Anhaftung der S-Layer-Proteine möglich ist und eine nahezu vollständig beschichtete Oberfläche der rekristallisierten Proteine ermöglicht wird^{128, 176}. Somit ist die positiv geladene Polyelektrolytschicht für die Abscheidung von S-Layer-Proteinen unabdingbar. Sensormodifikationen mit negativ endenden Polyelektrolytschichten haben bei der Immobilisierung von S-Layer-Proteinen (*Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53) eine schwache Proteinadsorption und eine längere Abscheidungskinetik gezeigt¹³². Die erhaltenen Aussagen der QCM-D Messungen konnten über rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zum Rekristallisationsverhalten auf unterschiedlichen Substraten und unter Verwendung eines variierenden Polyelektrolytaufbaus verifiziert werden¹³².

Die Messungen auf den blanken SiO₂ Kristallen zeigten dagegen, dass nur eine geringe Proteinadsorption stattgefunden hat. Daraus kann auf eine nicht komplett geschlossene Proteinschicht

auf der Oberfläche geschlossen werden. Im Massenprofil (Abbildung 31 b) sind die Unterschiede der beiden Rekristallisationsansätze deutlich erkennbar. Vergleicht man diese Werte mit der abgeschiedenen Masse von Slp1 auf den modifizierten Sensoroberflächen ist dieser Wert etwa um den Faktor 3,7 größer als bei den Versuchen ohne Untergrundmodifizierung der SiO₂-Sensoren und zeigt somit eine höhere Affinität des Proteins zu der Oberfläche auf.

Die Experimente weisen die effiziente Wirkung von Polyelektrolyten als Haftvermittler für die Proteinadsorption und die Eignung der QCM-D als *online* Methode zur Detektion nanoskaliger Schichten nach. Es konnte gezeigt werden, dass für die vollständige Beschichtung mit S-Layer-Proteinen die Untergrundmodifizierung mit dem in dieser Arbeit dargestellten Polyelektrolytschichten unabdingbar ist, um reproduzierbare S-Layer-Proteinoberflächen zu generieren. Diese ermöglichen es, zusätzliche Informationen über Protein-Protein- und Protein-Metallinteraktionen erhalten zu können. Durch die reproduzierbare Abscheidung der S-Layer-Proteine als monolagige Schichten auf dem PE-Untergrund können diese Oberflächenstrukturen für verschiedenste technische Anwendungen wie z. B. proteinbasierte Metallfiltermaterialien, Biotemplates für Nanopartikel oder Biosensoren genutzt werden.

4.3.2 Rekristallisation und Schichtstabilität von S-Layer-Proteinen

4.3.2.1 QCM-D Beschichtungsversuche

Auf Basis der Ergebnisse aus den Beschichtungsversuchen PE-modifizierter Oberflächen der S-Layer-Proteine wurden die weiteren Rekristallisationen auf diesem Untergrund durchgeführt. In den weiter dargestellten und detaillierteren Untersuchungen auf den modifizierten Quarzoberflächen sollen Aussagen zur S-Layer Rekristallisation, Schichtstabilität und Abscheidungskinetik getroffen werden, um die spätere Metallinteraktionen dieser monolagigen Schichten zu untersuchen. In Abbildung 32 ist die Adsorption von SlfB (*Lysinibacillus sphaericus* JG-A12) im Frequenz-/Dissipations Plot und im Schichtdickenprofil dargestellt.

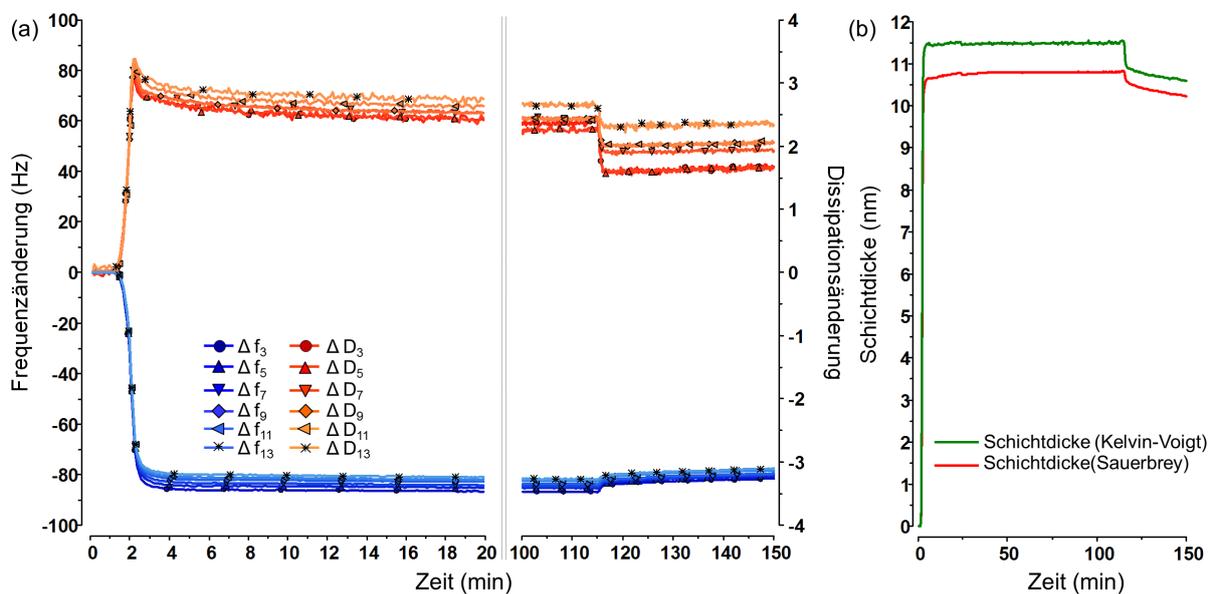


Abbildung 32: Rekristallisation von SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 auf polyelektrolytmodifizierten SiO₂-Sensoren im (a) Frequenz/Dissipations-Plot und (b) im Schichtdickenprofil modelliert nach dem Kelvin-Voigt und Sauerbrey-Modell.

In Abbildung 32 a ist nach Zugabe der SlfB-Lösung eine rapide Frequenzverringerng (Δf_5 - Δf_{11}) infolge der Masseänderung zu erkennen. Gleichzeitig erfolgt ein Anstieg der Dissipationswerte (ΔD_5 - ΔD_{11}) aufgrund der Adsorption weicher elastischer Moleküle auf der Sensoroberfläche. Die Proteinabscheidung ist innerhalb der ersten fünf Minuten vollständig abgeschlossen, was durch die nahezu konstante Frequenz- und Dissipationswerte bestätigt wird. Der Beschichtungsvorgang wurde dennoch bis 60 Minuten durchgeführt, um mögliche weitere Gitterausbildungen oder Proteinreorientierungen zu ermöglichen. Nach mehr als 60 Minuten erfolgte der Wechsel zum reinen Rekristallisationspuffer, um die Stabilität der entstandenen Schichten zu beurteilen. Durch das Spülen werden größere Proteinagglomerate und schwach gebundene Proteine von der Oberfläche abgelöst, was in einer geringen Frequenzerhöhung resultiert. Durch die Desorption elastischer Moleküle, welche auf die Sensoroberfläche eingewirkt haben kommt es zu einer Verringerung der Dissipationswerte infolge der herabgesetzten Energiedämpfung. Betrachtet man das Schichtdickenprofil der SlfB

Adsorption ergibt sich nach dem Spülen mit dem Puffer eine Schichtdicke von 7,9 nm (Kelvin-Voigt Modell). Die Slp1 Adsorption von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 ist in Abbildung 33 dargestellt und folgt einem ähnlichen Verlauf wie die SlfB Adsorption.

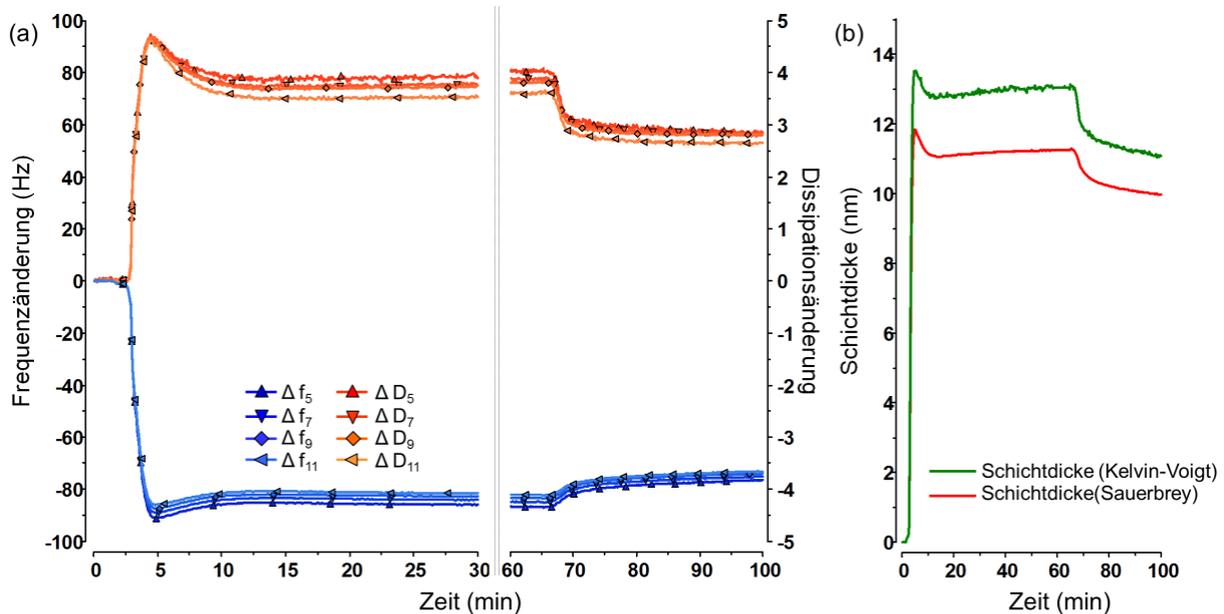


Abbildung 33: Rekristallisation von S-Layer-Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 auf polyelektrolytmodifizierten SiO₂-Sensoren im Frequenz/Dissipations-Plot (a) und im Schichtdickenprofil modelliert nach dem Kelvin-Voigt und Sauerbrey-Modell.

Durch die Anbindung und Gitterausbildung von Slp1 kommt es innerhalb der ersten 5 Minuten zu einer Frequenzverringern und einer Dissipationserhöhung infolge der Adsorption elastischer Moleküle an der Quarzoberfläche (Abbildung 33). Die Untersuchungen der Slp1 Adsorption haben gezeigt, dass im Vergleich zu SlfB die Frequenz reproduzierbar weiter absinkt, was auf eine höhere abgeschiedene Masse schließen lässt. Nach dem Spülen mit dem reinen Rekristallisationspuffer werden schwach gebundene Proteine von der Oberfläche gelöst. Betrachtet man über den weiteren Versuchszeitraum die Kurvenverläufe, bleiben bei beiden Proteinadsorptionen (Slp1 und SlfB) Frequenz- und Dissipationswerte nahezu konstant und belegen somit eine stabile Proteinbindung an der Oberfläche. In weiteren Versuchen (Daten nicht gezeigt) konnten durch weitere Spülvorgänge z. B. unter Verwendung von Rekristallisationspuffer, Reinstwasser oder physiologischer NaCl-Lösung keine desorptiven Effekte der Proteinschicht beobachtet werden. Dies zeigt die sehr stabile Adsorption der rekristallisierten S-Layer-Proteine auf der Oberfläche.

In Tabelle 16 sind die Werte der Proteinadsorption von SlfB und Slp1 vergleichend zusammengefasst. Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 weist dabei in allen durchgeführten Versuchen eine höhere Schichtdicke von ca. 10,8 nm als SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 mit 7,9 nm auf. Korrespondierend zu den Schichtdicken, welche nach dem Sauerbrey-Modell und dem Kelvin-Voigt Modell bestimmt wurden, sind die adsorbierten Proteinmassen auf der Oberfläche dargestellt.

Tabelle 16: Adsorbierte maximale S-Layer Massen (Δm_{\max}) und Schichtdicken (d_{Layer}) auf PE-modifizierten SiO_2 Sensoren.

Biomolekül	Organismus	Schichtdicke	Schichtdicke	Adsorbierte Masse	Adsorbierte Masse
		d_{Layer} (nm) Sauerbrey	d_{Layer} (nm) Kelvin-Voigt	Δm_{\max} (ng/cm ²) Sauerbrey	Δm_{\max} (ng/cm ²) Kelvin-Voigt
SfB	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	7,9	11,4	1061,2	1540,0
Slp1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	10,0	11,2	1351,6	1505,6

Vergleicht man die resultierenden Massenabscheidungen und die Schichtdicken, welche über die beiden unterschiedlichen Auswertemethoden erhalten wurden, so kann gezeigt werden, dass die nach dem Sauerbrey-Modell erhaltenen Werte sowohl der Masse als auch der Schichtdicke geringer ausfallen als bei den Modellierungen nach dem Kelvin-Voigt Modell. Dies zeigt, dass für akustisch dünne Proteinschichten das Sauerbrey-Modell wegen der Ausbreitung scherakustischer Wellen in viskoelastischen Flüssigkeitsfilmen versagt und in einer Unterbestimmung der adsorbierten SfB und Slp1 Masse und Schichtdicke resultiert^{218, 219}. Dies kann durch die elastischen Eigenschaften der S-Layer-Proteine und Interaktion mit Wasser während des Adsorptionsprozesses erklärt werden, welche im Kelvin-Voigt Modell berücksichtigt werden. Die Wechselwirkungen von Wasser mit den Proteinen können dabei durch die Bildung von Hydrathüllen, viskosen Widerständen oder Hohlräumeinschlüssen beschrieben werden²²⁰. Daher ergeben sich unter Nutzung des Kelvin-Voigt-Modells höhere Werte in den resultierenden adsorbierten Massen und Schichtdicken. Vergleicht man am Beispiel der Schichtdicken von Slp1 die erhaltenen Werte von 10,0 nm (Sauerbrey) und 11,2 nm (Kelvin-Voigt), so kann jedoch gezeigt werden, dass beide modellierten Werte sich nicht signifikant unterscheiden und somit das Sauerbrey-Modell für dünne viskoelastische Schichten vergleichend genutzt werden kann. Gleiches kann sowohl bei den Masseabscheidungen und Schichtdicken von SfB aus Tabelle 16 erkannt werden. Bei den ermittelten Daten und den Aussagen beider Modelle der QCM-D Messungen zur Abscheidung monolager Proteinschichten, handelt es sich um gemittelte Werte über die gesamte aktive Sensoroberfläche. Daher können auch Massenabscheidungen größerer Proteinagglomerate auf der Oberfläche, als auch Fehlstellen in den Proteingittern mit in den Berechnungen enthalten sein, welche die tatsächlichen Werte beeinflussen können. Daher ist es komplementär zu den QCM-D Studien notwendig weitere Verfahren wie z. B. die Rasterkraftmikroskopie zu nutzen, um die getroffenen Aussagen der Proteinadsorption, sowie der Rekristallisation der S-Layer-Proteine in den spezifischen Gitterstrukturen und die ermittelten Schichtdicken zu verifizieren.

4.3.2.2 AFM-Analytik zur Rekristallisation von S-Layer-Proteinen

Die in den vorangegangenen Beschichtungsversuchen dargestellten Techniken, welche unter anderem mittels QCM-D untersucht wurden, lassen nur Aussagen zur Proteinadsorption nicht aber zur Polymer- und damit verbundenen Gitterstruktur auf den Oberflächen zu. Dafür und für die Bestimmung der Schichtdicken wurde das bildgebende Verfahren der Rasterkraftmikroskopie genutzt. Die Untersuchungen der Proteinbeschichtung erfolgten sowohl auf SiO₂-Wafer wie in Kapitel 3.13.3 beschrieben, als auch direkt auf den SiO₂ Sensorkristallen der QCM-D nach der Untersuchung der Proteinabscheidungen. In Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die Amplitudenbilder der Proteingitter von SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und von Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 dargestellt.

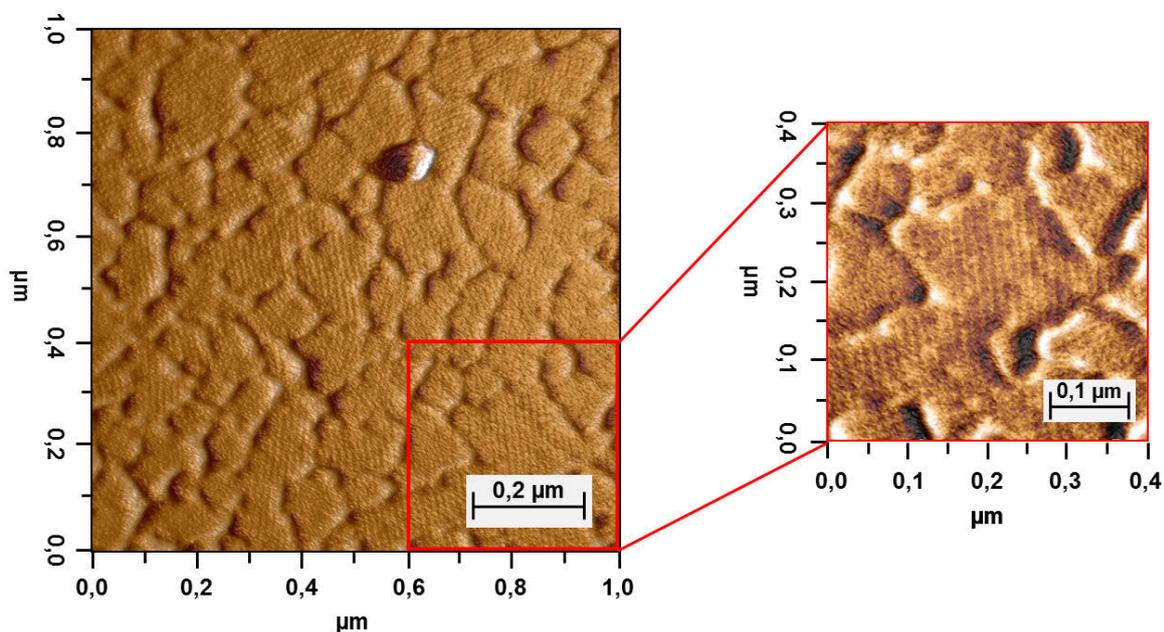


Abbildung 34: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisiertem SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 auf SiO₂ Wafer (a) 1x1 µm Übersichtsscan und (b) Ausschnitt aus 1 x 1 µm Scan.

Abbildung 34 zeigt die rekristallisierte Proteinschicht von SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. In der Abbildung und dem Detailausschnitt ist die typische tetragonale Gittersymmetrie (p4) der rekristallisierten S-Layer-Proteine deutlich zu erkennen. Offenkundig bildet sich keine einheitliche symmetrisch ausgerichtete und geschlossene Proteinschicht aus, sondern die Proteine rekristallisierten in vielen kleineren Proteinflächen (Inselwachstum) auf der Oberfläche. Die gemessenen Schichtdicken von 8-9 nm (Abbildung A 8) korrelieren mit vorangegangenen Untersuchungen²²¹. Durch die Ablagerung von größeren Proteinagglomeraten, wie in Abbildung 34 zu sehen, kann diese tatsächliche Schichtdicke geringer ausfallen als die aus den QCM-D-Versuchen. Die in den AFM Aufnahmen detektierten größeren Proteinagglomerate werden bei den QCM-D-Messungen in die Berechnungen der Schichtdicken ($d_{\text{Layer}}=11,4$ nm) mit einbezogen und resultieren in höheren Schichtdicken. Jedoch wird die über die QCM-D gemittelte Schichtdicke ebenso von Fehlstellen auf der beschichteten Oberfläche beeinflusst, welches in einer Unterbestimmung resultieren kann. Betrachtet man die über diese beiden Methoden erhaltenen Schichtdicken, so kann

nur ein sehr geringer Unterschied der Schichtdicken detektiert werden. Daher kann durch die Kombination der QCM-D und der Rasterkraftmikroskopie, ein tieferes Verständnis der Proteinabscheidungen gewonnen werden. In weiteren Versuchen sollte daher die Kombination beider Methoden forciert werden, um die Vorteile der QCM-D zur Detektion von Oberflächeninteraktionen und des AFM als bildgebendes Verfahren zur Untersuchung von biologischen Proben und Wechselwirkungen nutzen und detaillierter beschreiben zu können.

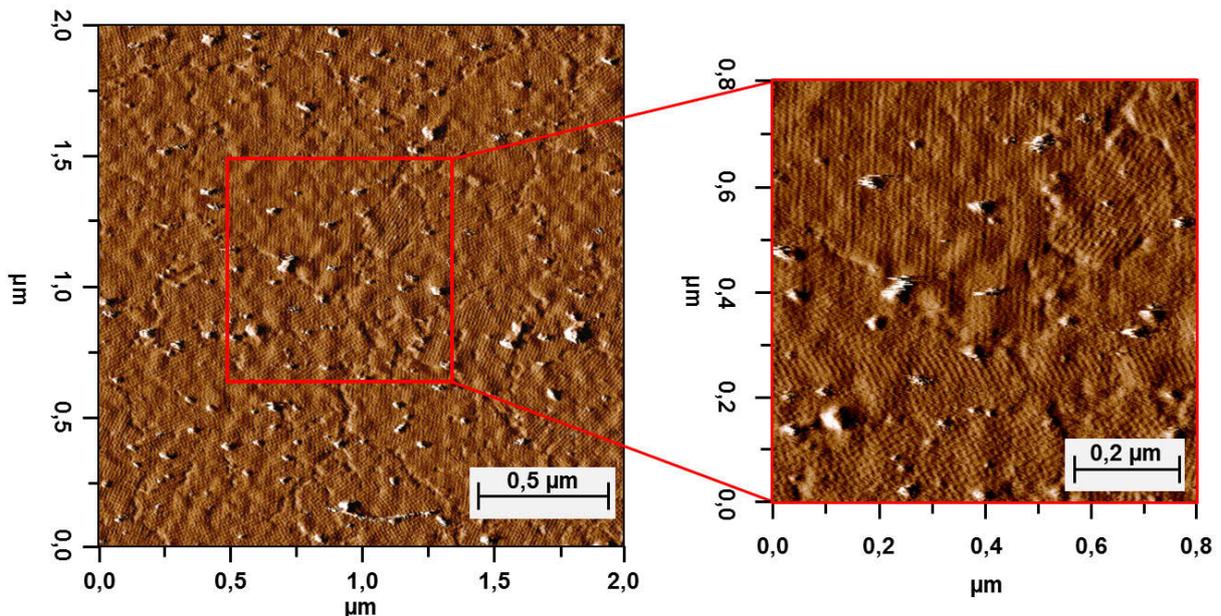


Abbildung 35: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisiertem Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 auf SiO₂ QCM-D-Kristallen (a) 2 x 2 µm Übersichtsscan und (b) Ausschnitt aus 1 x 1 µm Detailscan.

In Abbildung 35 ist das AFM-Amplitudenbild einer typischen Schicht von Slp1 nach der Rekristallisation auf einem polyelektrolytbeschichteten (PEI/PSS/PEI) Wafer dargestellt. In dem 2 x 2 µm großen Übersichtsscan ist analog zu Bildern von SlfB-Schichten eine nahezu vollständige Bedeckung der Oberfläche mit hochstrukturierten Proteinpolymeren in Form kleinerer Patches auf der Oberfläche zu sehen. Über die AFM-Messungen konnte für Slp1 eine durchschnittliche Schichtdicke von 8-12 nm (\varnothing 10 nm) ermittelt werden (Abbildung A 9). Ebenfalls sind größere Proteinagglomerate auf den AFM-Bildern zu erkennen. Betrachtet man den Ausschnitt des Amplitudenbildes in Abbildung 35 so lässt sich die typische tetragonale Gittersymmetrie der Slp1 Schicht erkennen, welche vergleichbar ist mit der nativen Proteinschicht auf intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53^{132, 190}. Die in Abbildung 35 zu erkennenden Proteinagglomerate führen bei den über die Sensoroberfläche gemittelten Schichtdicken für eine monolagige Schicht von Slp1 aus den QCM-D Messungen zu minimal höheren Schichtdicken (\varnothing 11,2 nm) als bei den AFM-Messungen. Vergleicht man die durchschnittlichen Schichtdicken, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied (Faktor \approx 1,1) zwischen den AFM- und QCM-D Untersuchungen. Dies zeigt die sehr gute Übereinstimmung der über beide Methoden ermittelten Schichtdicken. Die im Anschluss an die QCM-D Messungen durchgeführten AFM-Messungen an Quarzkristallen und an S-Layer beschichteten SiO₂ Wafer ermöglichen es daher, die Ergebnisse beider Methoden hinsichtlich Gitterausbildung und Schichtdicke von SlfB und Slp1 direkt zu vergleichen. Um beurteilen zu können, ob die auf künstlichen Oberflächen gebildeten Gitter

(Abbildung 35) einem nativen Gitter entspricht, wurden zusätzlich S-Layer-Proteine auf einer vitalen Bakterienzelle von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 visualisiert (Abbildung 36). Die Abscheidung der Zellen wurde nach einer neuen Immobilisierungsmethode auf Basis von polyelektrolytmodifizierten Oberflächen durchgeführt wie sie von Günther, T. J. und Suhr, M. et al. (2014) erstmalig beschrieben wurde¹⁹⁰. Es ist in den AFM Amplitudenbildern zu erkennen, dass auf den vitalen Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 die Proteingitterstruktur anders als bei den Rekrystallisationsversuchen von Slp1 in einer geschlossen Schicht und in einer einheitlichen Gitterorientierung vorliegt. Es zeigt aber, dass die selbstassemblierenden Proteine von Slp1 nach deren Isolierung die gleichen Eigenschaften bezogen auf die Gittersymmetrie und Zentrum zu Zentrum Abstand der nativen Proteinschicht auf lebenden Zellen aufweisen.

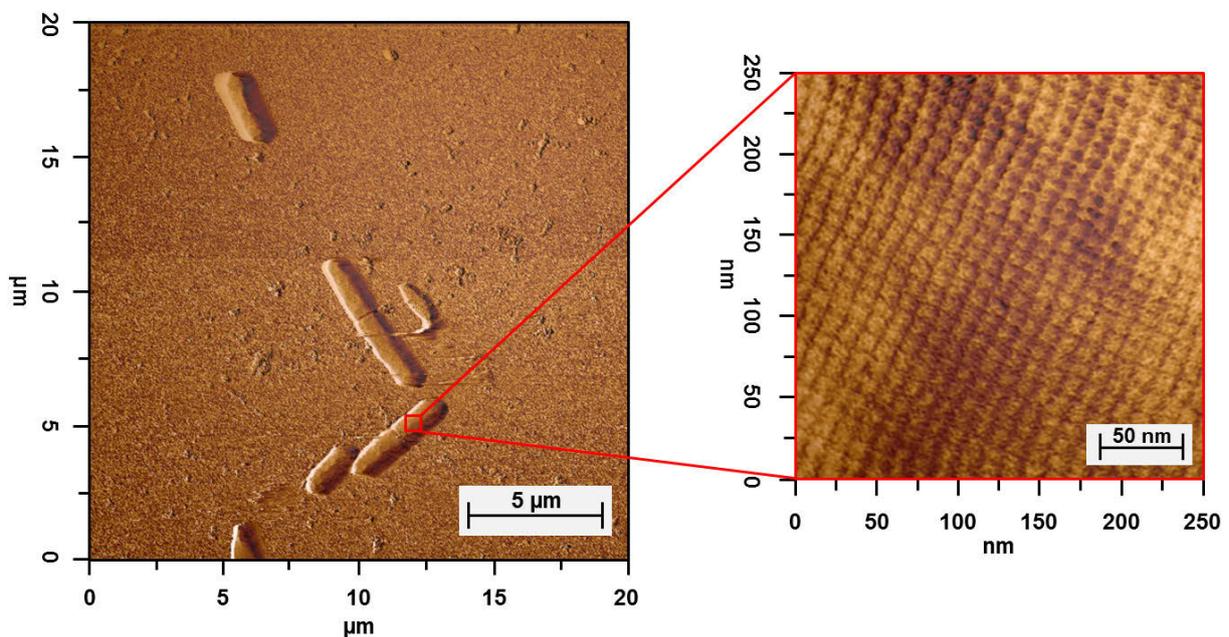


Abbildung 36: AFM Amplitudenbilder von vitalen Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 (a) 20 x 20 µm Übersichtsscan und (b) 250 x 250 nm Detailscan des Slp1 Gitters auf der Zelloberfläche¹⁹⁰.

4.3.3 Ausbildung von Lipiddoppelschichten

4.3.3.1 Herstellung von Lipidvesikeln

Zur Herstellung definierter Größenklassen von Lipidvesikeln sind eine Vielzahl von Methoden wie z. B. Lösungsmittelaustausch, Hochdruckbehandlung und Ultrafiltrationen bekannt²²². Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV, <<100 nm) hat sich der Lösungsmittelaustausch und einer milden Ultraschallbehandlung als effiziente Methode etabliert¹⁴⁷. Unter Nutzung dieser Methode konnten Vesikelsuspensionen hergestellt werden, welche nach der PCS Analyse eine bimodale Größenverteilung aufwiesen²²³. Für die weiteren Beschichtungen und QCM-D Untersuchungen der Lipiddoppelschichtausbildung wurden Vesikel aus Lecithin hergestellt, welche wie bereits beschrieben in ihrer Zusammensetzung denen der Lipide aus *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 ähneln und somit als Modells substanz für die weiteren Versuche genutzt wurden. Um eine solche Schichtausbildung vergleichend zu der Beschaffenheit von bakteriellen doppelschichtigen Membranlipiden zu ermöglichen, ist es notwendig, SUVs in einem durchschnittlichen sphärischen Durchmesser von kleiner 50 nm herzustellen. Dies ist notwendig um die Ausbildung einer einheitlichen monolagigen Lipiddoppelschicht gewährleisten zu können, da die Vesikeleigenschaften und -durchmesser einen großen Einfluss auf die Erzeugung von Lipiddoppelschichten haben²²⁴⁻²²⁶.

Nach dem Resuspendieren der in Chloroform umgelagerten Lipidvesikel in dem Lipidpuffer erfolgte die Generierung kleiner Vesikel mittels Ultraschallbehandlung. Die erhaltene Suspension wurde anschließend in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Hier erfolgte die Separation der Lipidvesikel entsprechend ihrer Größe bzw. ihres korrespondierten Gewichtes. Kleine feinverteilte Partikel weisen dabei ein geringeres Sedimentationsverhalten auf und verweilen in den oberen Zonen des Zentrifugationsüberstandes. Größere Partikel setzten sich als dunkelgraues Pellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens ab. Zusätzlich erfolgte durch die Ultraschallbehandlung der Eintrag von Titanpartikeln der Ultraschallspitze in die Suspension, welche sich durch die Zentrifugation schnell als Pellet absetzten. Von jeder in Kapitel 3.6.6 dargestellten Zone wurden Proben mittels der Photonenkorrelationspektroskopie untersucht.

In Abbildung 37 sind die intensitätsgewichtete (a) und anzahlgewichtete (b) Partikelgrößenverteilung berechnet nach CONTIN für die Zone 3 exemplarisch dargestellt. In Abbildung 37 a ist zu erkennen, dass gewichtet nach der Intensität eine bimodale Größenverteilung der gemessenen Partikel vorliegt. Die Berechnung der Größenverteilung erfolgte nach CONTIN (Auswertung implementiert in der Gerätesoftware)^{227, 228}. Diese bimodale Verteilung konnte bereits in anderen Untersuchungen zur Herstellung von Lipidvesikeln beobachtet werden²²³. Die Größenklassen befinden sich in einem Bereich von 25-41 nm (SUV) und 70-98 nm (LUV). Zu beachten ist, dass die detektierten Partikel im Bereich von 98 nm eine höhere Intensität aufweisen, da diese größeren Partikel einen stärkeren Streulichteffekt hervorrufen als kleiner Partikel. Somit ist es möglich, dass wenige große Partikel in der Lage sind die Signale kleinerer Partikel zu überlagern²²⁹.

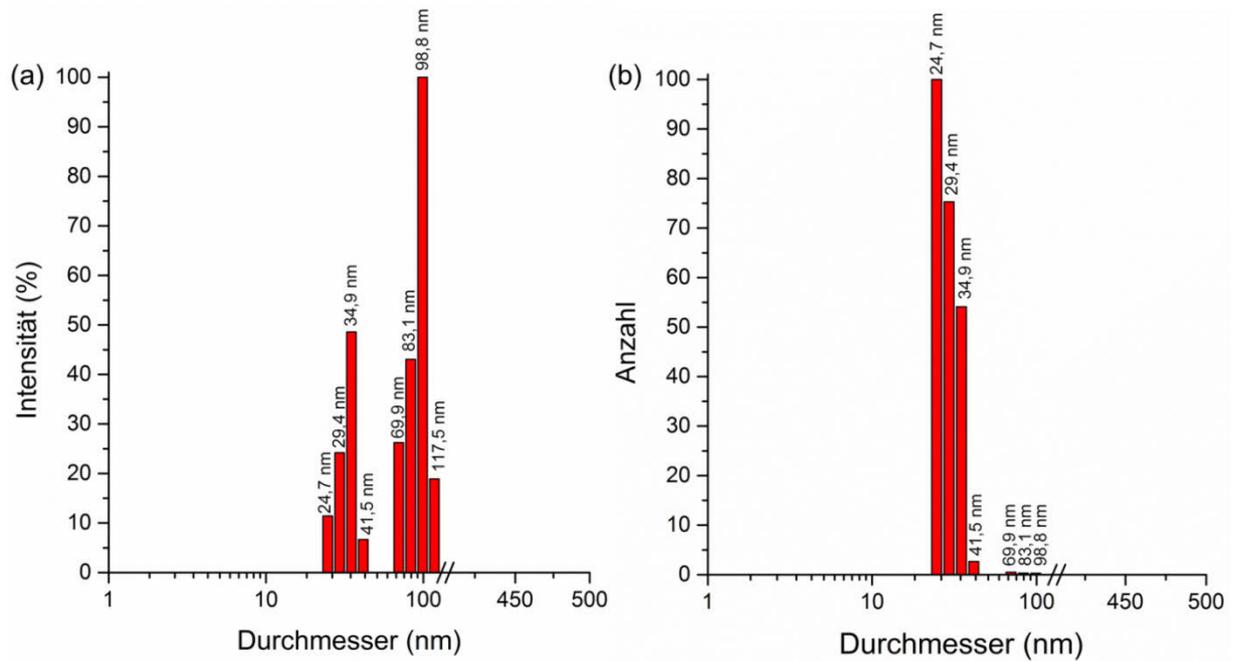


Abbildung 37: Intensitätsgewichtete (a) und anzahlgewichtete (b) Größenverteilung der hergestellten Lipidvesikel aus Zone 3 berechnet nach CONTIN.

Betrachtet man neben der Intensitätsgewichteten Größenverteilung die Größenverteilung nach der Anzahl der Messereignisse (Abbildung 37 b) können die SUVs mit einer Größe von 25-41 nm als Hauptkomponente ($\gg 98\%$) identifiziert werden. Daher wurden diese erzeugten Vesikel aus Zone 3 für die weiteren QCM-D Versuche zur Simulierung einer bakteriellen Lipiddoppelschicht genutzt. Partikel aus Zone 2 wurden ebenfalls mittels der PCS analysiert und waren in einem vergleichbaren Größenbereich (25-100 nm) wie die Partikel aus Zone 3 zu finden, jedoch waren diese Partikel polydispers und folgten keiner bimodalen Verteilung. Die Messungen der Partikel aus Zone 1 ergeben eine Größe von 1-2 μm , hervorgerufen durch den Titanabrieb der Ultraschallspitze und größere agglomerierte Vesikel. Die Suspensionen aus den Zonen 1-2 wurden verworfen und für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

4.3.3.2 Abscheidung von Lipiddoppelschichten

Abbildung 38 zeigt die QCM-D Diagramme zur Ausbildung einer geschlossenen Lipiddoppelschicht aus den in Kapitel 4.3.3.1 hergestellten SUVs. Dabei sind zwei verschiedene Versuchsanordnungen gewählt worden, um die Lipiddoppelschichtausbildung verfolgen zu können. In Abbildung 38 a-b wurde eine offene QCM-D Messzelle verwendet, bei der die Lipidvesikel direkt zudosiert wurden. In Abbildung 38 c-d wurde ein Durchflussmodul zur Schichtabscheidung verwendet.

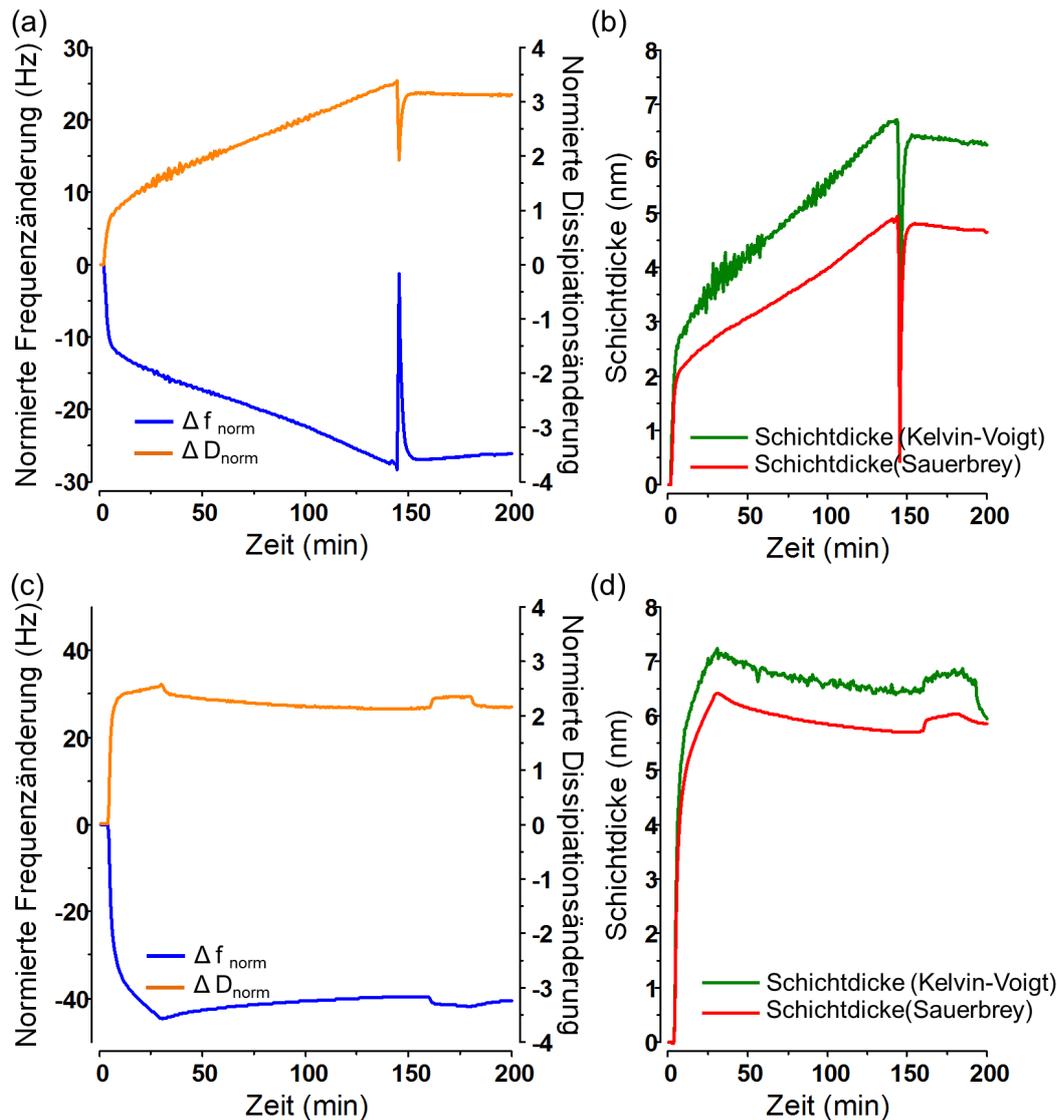


Abbildung 38: Ausbildung einer Lipiddoppelschicht aus SUVs der Modellschicht Lecithin im Frequenz-/ Dissipations Plot und Schichtdickenprofil unter Nutzung des offenen Moduls des (a-b) und des Durchflussmoduls (c-d).

Abbildung 38 a-b zeigt einen fallenden Kurvenverlauf der Frequenzänderung und einen Anstieg in den Dissipationswerten über die Zeit nach Austausch der Pufferlösung gegen die in Puffer suspendierten SUVs. Innerhalb der ersten 10 Minuten des Versuches ist eine Frequenzänderung von 10 Hz zu erkennen und ein Dissipationsanstieg auf 1. Dies deutet auf die Abscheidung von viskoelastischen Molekülen auf der Sensoroberfläche hin. Nach 10 Minuten ist ein deutlich abgeflachter Kurvenverlauf bei beiden Werten zu erkennen. Dies kann auf eine sukzessive Sedimentation der Vesikel aus dem

Überstand auf die SiO₂-Oberfläche und einer langsamen Ausbildung einer Lipiddoppelschicht nach dem Zusammenbrechen der SUVs zurückgeführt werden. Die Sedimentation der Vesikel findet aufgrund eines fehlenden Flüssigkeitsstromes statt, wie er beispielsweise bei den Durchflussversuchen vorherrscht. Daher ist ein stetiger Massezuwachs bis zur vollständigen Partikelsedimentation möglich. Nach ca. 150 Minuten wird durch das Entfernen der Lipidvesikelsuspension und der Zugabe des gleichen Volumens an vesikelfreiem Puffer als Spülschritt ein signifikanter Peak hervorgerufen. Nach diesem Spülvorgang sind nahezu konstante Werte des Frequenz- und Dissipationsverlaufes zu erkennen, was auf eine feste Adsorption an der Oberfläche schließen lässt. In dem Durchflussversuch zur Erzeugung einer geschlossenen Lipiddoppelschicht (Abbildung 38 c-d) vermindert sich die Frequenz innerhalb der ersten 30 Minuten um ca. 40 Hz und die Dissipation steigt auf ca. 2,2. Analog zu dem Versuch mit der offenen Messzelle kann daher auf die Anlagerung einer viskoelastischen Schicht auf der Sensoroberfläche geschlossen werden. Nach ca. 30 Minuten sind ein leichter Frequenzanstieg und eine Dissipationserhöhung zu erkennen, bevor sich nahezu konstante Werte für Δf und ΔD einstellen. Dieser in Abbildung 38 c nicht monotone Kurvenverlauf zeigt sehr gut die anfängliche Abscheidung intakter Vesikel auf der SiO₂ Oberfläche und der anschließend stattfindende Zusammenbruch der Vesikel und die Ausbildung einer geschlossenen Lipiddoppelschicht. Dieses Abscheidungsphänomen auf SiO₂ Oberflächen konnte bereits in anderen Forschungsarbeiten beobachtet werden²³⁰. Nach ca. 150 Minuten wurde mit lipidfreiem Puffer gespült, was zu keiner signifikanten Änderung der Δf - und ΔD -Werte führt. Der Spülvorgang zeigt, dass die erzeugte Oberflächenschicht unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr stabil ist.

Die Modellierung nach dem Sauerbrey- und Kelvin-Voigt Modell bezüglich der erreichten Schichtdicke sind grafisch in Abbildung 38 d dargestellt. Bei beiden Versuchsanordnungen wird unter Berücksichtigung der viskoelastischen Eigenschaften und Interaktion mit Wasser eine Schichtdicke von 6,3 nm erreicht. Dabei sind die Werte nach dem Sauerbrey-Modell wesentlich geringer als die des Kelvin-Voigt Modells, da die Wechselwirkungen mit Wasser in der Sauerbrey-Modellierung nicht berücksichtigt werden. Die ermittelten Schichtdicken sind vergleichbar mit Untersuchungen zur Ausbildung von Lipid-Bilayern (4-7 nm) aus der Literatur und vergleichbar zur Membranstärke verschiedener Organismen^{225, 231, 232}. Die Schichtdickenunterschiede zwischen den einzelnen Lipiden wird durch Variation der beinhaltenden Fettsäurenkettenlänge des entsprechenden Phospholipids hervorgerufen²³³. Daher kann von dem untersuchten Modelllipid Lecithin aufgrund seiner ähnlichen Zusammensetzung im Vergleich zu den Membranlipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 eine breite Größenverteilung der hergestellten SUVs geschlossen werden, da diese ähnlich dem Lecithin aus unterschiedlichen Fettsäureresten bestehen. Dies kann sich in ebenfalls in der Schichtdickenbestimmung der Lipiddoppelschicht auswirken.

4.3.4 Abscheidung von Peptidoglykan

Als weitere Schicht der Zellwand erfolgte die Abscheidung von isolierten Peptidoglykan mit sekundären Zellwandpolymeren. Exemplarisch ist die Sorption von PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 in Abbildung 39 auf nicht- und PE-modifizierten Siliziumdioxidoberflächen dargestellt.

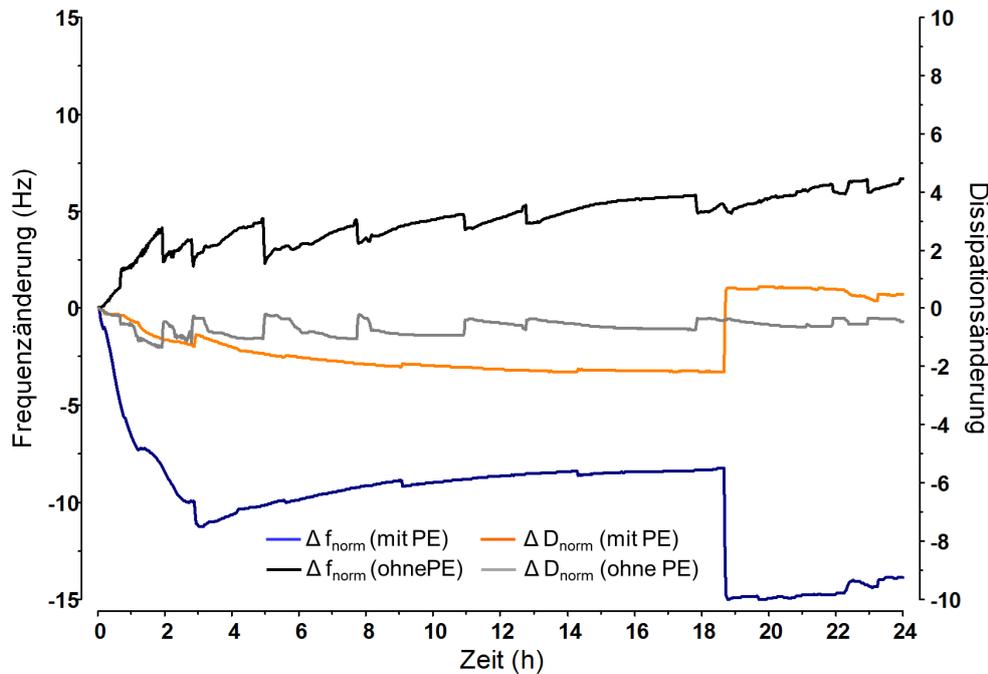


Abbildung 39: Abscheidung von PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 auf SiO₂- und polyelektrolytmodifizierten SiO₂ QCM-D Sensoren.

Da es sich bei dem Makromolekül Peptidoglykan (PG+) um ein negativ geladenes Polymer handelt, wurde sowohl eine SiO₂-Oberfläche (schwach positiv geladen) als auch eine Polyelektrolytmultischicht endend mit PEI (positiv geladen) zur Abscheidung des PG+ verwendet. In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die Zugabe des in Wasser resuspendierten Peptidoglykans (10 mg/l) auf die nicht beschichtete SiO₂ Oberfläche zu keiner Frequenzänderung (schwarze Kurve) über die Zeit führt. Der Dissipationswert (grauer Kurvenverlauf) zeigt ebenso nur geringe Änderungen um den ursprünglichen Nullwert an. Auch die Zugabe der 100 mg/l PG+ Lösung führt zu keiner weiteren Änderung die eine Anlagerung von PG+ auf der Oberfläche entsprechen würde. Die über die Modellierungsansätze ermittelten Massen ergaben ebenfalls keinen Massenanstieg auf den reinen SiO₂-Oberflächen. Dies zeigt, dass die positive Nettoladung des SiO₂ allein nicht ausreichend ist, um ausgeprägte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und dem Peptidoglykan hervorzurufen, welche in einer Adsorption an der Oberfläche resultieren. Betrachtet man die Frequenzänderung in Abbildung 39 der PE-modifizierten Oberfläche (blaue Kurve), so ist nach der Zugabe der Peptidoglykanlösung (10 mg/l) eine langsame Frequenzverringering bis ca. 10 Hz zu beobachten, welche auf eine Massenadsorption hindeutet. Betrachtet man hierbei die Dissipationswerte (oranger Kurvenverlauf) so ist zu erkennen, dass diese ebenfalls langsam abfallen. Dies steht jedoch nicht im

Widerspruch zu der Adsorption von viskoelastischen Molekülen, welche für gewöhnlich einen Anstieg der Dissipationswerte verursachen. Vielmehr kann durch die Wechselwirkungen des PG⁺, welches aufgrund seiner langkettig verzweigten Struktur ebenfalls als Polyelektrolyt anzusehen ist, eine Interaktion mit dem positiv geladenen Untergrund abgeleitet werden. Durch die Anlagerung des negativ geladenen PG⁺ an die PEI-Schicht kann es aufgrund der Wechselwirkungen der unterschiedlich geladenen Schichten zu Konformationsänderungen auf der Oberfläche kommen. Dies führt zu einer Versteifung der organischen Schicht auf der Oberfläche und kann die sinkenden Dissipationswerte sehr gut erklären kann. Nach der Zugabe der höher konzentrierten PG⁺ Suspension (100 mg/l) ergibt sich nach ca. 18 Stunden eine weitere Frequenzänderung, welche einen Massenaufwuchs kennzeichnet. Die Dissipationswerte steigen zu diesem Zeitpunkt wieder an, was auf die Anlagerung viskoelastischer Moleküle auf der Oberfläche hindeutet. Als finale Frequenzänderung wurde ein Wert von 15 Hz detektiert.

Nutzt man das Modell nach Sauerbrey, erhält man für eine Massenadsorption von ca. 200 ng/cm² nach 18 h bzw. ca. 300 ng/cm² nach 24 h auf den PE-modifizierten Oberflächen. Bei der Modellierung der entsprechenden Schichtdicken nach dem Kelvin-Voigt Modell wurden Stärken im Bereich von 2 nm (18 h) -11 nm (24 h) errechnet. Dies und die niedrige Frequenzänderungen zeigen jedoch in den Versuchen mit modifizierten Sensoroberflächen, dass wahrscheinlich keine vollständige geschlossene bzw. hinreichend dicke Peptidoglykanschicht vergleichbar zu der Schichtdicke gram-positiver bakterieller Zellwände (20-80 nm) erreicht werden konnte^{27, 28}. Schichtdicken von 1-15 nm werden meist bei Zellwänden gram-negativer Mikroorganismen wie z. B. *Escherichia coli* (Ergebnisse aus Dünnschnitten von TEM-Untersuchungen) detektiert^{32, 234}. Da es sich in dieser Arbeit jedoch um isolierte Zellwandsucculi handelt, kann eine rekonstruierte Schicht in einer geringeren Dicke als bei vitalen Bakterien üblich nicht ausgeschlossen werden. Vermutlich finden Strukturänderungen durch die Behandlung während der Isolierung statt. Ebenfalls ist die Abscheidung einer einzelnen dünnen PG⁺ Schicht möglich, welche sich stark von dem mehrschichtigen Peptidoglykan in der Zellwand unterscheidet. Einen direkten Vergleichswert der beiden untersuchten Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 bezüglich der tatsächlichen Schichtdicken des Peptidoglykans in intakten Zellen gibt es derzeit noch nicht und muss in weiteren Arbeiten näher betrachtet werden.

Die geringe Adsorption des PG⁺ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 und die daraus geschlussfolgerte unvollständig bedeckte Sensoroberfläche, würden weitere QCM-D-Untersuchungen dieser Biokomponente bezüglich der Metallinteraktion erschweren. Ebenfalls weist, dass PG⁺ anders als beispielsweise die abgeschiedenen S-Layer-Proteine beider Stämme eine sehr geringe Schichtstabilität auf, was in Abbildung 39 durch leicht ansteigende Frequenzwerte nach 22 h dargestellt ist und auf eine Massendesorption des PG⁺ hindeutet. Daher sind vor den Untersuchungen der PG⁺/Metallinteraktionen in nachfolgenden Arbeiten weitere Versuche zum stabilen Schichtaufbau von PG⁺ notwendig, um verlässliche Aussagen der Metallinteraktion auf molekularer Ebene erhalten zu können. Ebenfalls ist dabei zu prüfen, ob die abgeschiedenen Schichten von isolierten PG⁺, denen in natürlichen Zellwandschichten sowohl im Aufbau und der Schichtdicke entsprechen und somit

verlässliche Aussagen zur Metallinteraktion ermöglichen. Dabei sollte nach erfolgreicher und stabiler Schichtabscheidung der Einfluss unterschiedlicher Schichtdicken von SCWP-haltigen und SCWP-freien Peptidoglykanen auf die Metallinteraktion geprüft werden.

Die Resultate der bisher durchgeführten Arbeiten haben gezeigt, dass es mit der QCM-D möglich ist, die Abscheidung von Peptidoglykan als weitere biologische Schicht zu verfolgen. Dabei haben die Untersuchungen gezeigt, dass für die Abscheidung einer PG⁺ Schicht eine Untergrundschiicht bestehend aus Polyelektrolyten benötigt wird, um das PG⁺ als dünne Schicht auf der Sensoroberfläche abzuscheiden. Dabei dient das PE als Untergrund ähnlich der Lipidschicht in der Zellwand dem das Peptidoglykan unter natürlichen Bedingungen aufgelagert ist. Die durchgeführten Versuche können in weiteren Untersuchungen als Basis für den Aufbau von weiteren PG⁺/PG⁻ Einzelschichtsystemen und zur vereinfachten Darstellung bakterieller Zellwände sowie zum Aufbau von Multischichtsystemen der Zellwand genutzt werden, wodurch weitere detaillierte Aussagen zu Interaktionsmechanismen des Zellwandsystems erhalten werden können. Hierfür ist es jedoch notwendig, weitere Versuche mit den Einzelkomponenten durchzuführen, um reproduzierbare Schichten aufbauen zu können.

4.4 Metallsorptionsuntersuchungen an Biomolekülen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53

Im Folgenden werden die funktionellen Gruppen, welche in den Strukturen der bakteriellen Zellwand der untersuchten Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 präsent sind, näher betrachtet. Die beschriebenen funktionellen Gruppen werden anschließend zur Dateninterpretation der Sorptionsversuche und TRLFS-Messungen genutzt. Zusätzlich erfolgt ein Vergleich mit Sorptionsdaten und Vergleichswerten aus der Literatur.

FUNKTIONELLE GRUPPEN GRAM-POSITIVER MIKROORGANISMEN UND ZELLWANDBESTANDTEILE ZUR METALLBINDUNG

Es ist eine Vielzahl von funktionellen Gruppen und Biomolekülen bekannt, welche eine Wechselwirkung mit Metallen ermöglichen. Bei lebenden Mikroorganismen kann die Metallinteraktion (Kapitel 1.3) auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Bei der Metall-Biomolekül-Interaktion von Bakterien hat jedoch die direkte Interaktion mit den äußeren Zellwandbestandteilen meist die größte Bedeutung. Untersuchungen mit Modellorganismen wie z. B. verschiedenen gram-positiven und -negativen Bakterien wie *Bacillus* sp und *Escherichia coli* zeigten eine bevorzugte Metallbindung an Carboxyl-, Phosphat-, Hydroxyl- und Aminogruppen^{65, 235, 236}. Dabei ist die Art und Stärke der Interaktion abhängig von der Quantität sowie der spezifischen Metallaffinität und Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen¹³. Betrachtet man weiter die Komponenten der bakteriellen Zellwand von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 sowie die von literaturbekannten Organismen, so kann die Metallbindungsfähigkeit den funktionellen Gruppen z. B. der Membranlipide (Phosphatgruppen), dem Peptidoglykan mit SCWPs (Carboxylgruppen und Phosphatgruppen aus z. B. Teichonsäuren) und der S-Layer-Proteine (Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und Phosphatgruppen) zugeordnet werden. Somit ist bei vitalen Mikroorganismen die Metallinteraktion durch eine Vielzahl an funktionellen Gruppen, welche in der Zellhülle vorhanden sind, möglich.

Bei der Charakterisierung der isolierten Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 konnte als dominierende funktionelle Gruppen Phosphatidylcholin identifiziert werden, welche eine Metallbindung wahrscheinlich hauptsächlich über die organischen Phosphatgruppe ermöglicht. Weitere Studien zeigten, dass vor allem die hydrophilen Kopfgruppen (PC, PEA, PS) der Membranlipide als Hauptbindungsstelle für viele Metalle in Frage kommen^{58, 236}.

Peptidoglykan als weiterer Bestandteil der Zellwand bietet eine Vielzahl an potentiellen Metallbindungsstellen. Durch das Netzwerk an β -1,4-verknüpften *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäuren stehen Carboxyl-, Amid-, Hydroxymethyl und Aminogruppen zur Verfügung^{32, 34, 58, 237}. In der Struktur eingebaute SCWPs wie z. B. Teichonsäuren bieten zusätzliche Hydroxyl- und Phosphatfunktionalitäten, welche für eine Metallbindung zur Verfügung stehen³⁵. Ebenfalls können

durch den beschriebenen Lysin-Asparaginsäure-Typ der Peptidketten im Peptidoglykan zusätzliche Carboxyl- und Aminogruppen für die Metallbindung zur Verfügung stehen ²¹.

Eine weitere wichtige Zellwandkomponente sind die S-Layer-Proteine von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (SlfB) und JG-B53 (Slp1) mit ihren zahlreichen funktionellen Gruppen. Diese sind sowohl in isolierter Form als Polymer (Batch-Versuche), als rekristallisierte Monolage (QCM-D Versuche) sowie auch in ihrer nativen Form als äußerste Schicht auf der Bakterienzelle in der Lage Metalle zu binden. Über die Sequenzierung von SlfB und Slp1 konnten hauptsächlich Carboxylgruppen durch den hohen Anteil an Alanin, Aspartat- und Glutamat, Aminogruppen resultierend aus den Aminosäuren Arginin und Lysin sowie Hydroxylgruppen durch den hohen Serin- und Threoninanteil als potentielle Bindungspartner bestimmt werden ^{145, 201}. Aufgrund der fehlenden Aminosäure Cystein in der Proteinsequenz ist eine Metallbindung über Thiolgruppen bei beiden Proteinen nicht möglich. Weitere funktionelle Gruppen könnten jedoch über posttranslationale Modifizierungen der Proteine z. B. Glykosilierung oder Phosphorylierungen zur Verfügung stehen. Aufgrund von verschiedenen Mechanismen wie z. B. intramolekularen Wechselwirkungen stehen jedoch nicht alle funktionelle Gruppen der S-Layer Proteine zur Verfügung. In vorangegangenen Untersuchungen von SlfB konnten 30 bis 40 mol% der vorhandenen Carboxyl- und Aminogruppen detektiert werden, welche frei zur Interaktion mit Metallen oder für weitere Modifizierungen zur Verfügung stehen. Ähnliche Werte sind für Slp1 anzunehmen. In Tabelle 17 sind die funktionellen Gruppen der isolierte Zellwandbestandteile beider untersuchter Mikroorganismen vereinfacht zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der hauptsächlich vorhandenen funktionellen Gruppen in Zellwandkomponenten und Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53.

Funktionelle Gruppen	Zellen/ Zellwandbestandteile				
	Intakte Zellen	Lipide	PG+	S-Layer-Proteine	
				SlfB	Slp1
Carboxylgruppen (R-COO⁻)	X (aus Einzelzellschichten)	X (z. B. aus Fettsäuren)	X (z. B. aus AS Seitenketten)	X (z. B. 125 freie COO ⁻ -Reste aus Aspartat und Glutamatketten)	X (z. B. 116 freie COO ⁻ -Reste aus Aspartat und Glutamatketten)
Hydroxylgruppen (R-OH)	X (aus Einzelzellschichten)	X (z. B. aus Glycerolrückgrat)	X (aus GlcNAc- und MurNAc-Kette)	X (z. B. aus hohen Anteil der AS Serin (5,3 mol) und Threonin (13,8 mol%))	X (z. B. aus hohen Anteil der AS Serin (6,9 mol) und Threonin (11,7 mol%))
Phosphatgruppen (R-PO₄³⁻)	X (aus Einzelzellschichten)	X (aus Kopfgruppe)	X (aus SCWPs)	(über posttranslationale Modifikationen möglich)	(über posttranslationale Modifikationen möglich)
Aminogruppen (R-NH₃⁺)	X (aus Einzelzellschichten)	(nur über PEA-Kopfgruppen)	X (aus AS Seitenketten)	X (z. B. 107 freie NH ₂ ⁺ -Reste aus Arginin- und Lysinketten)	X (z. B. 105 freie NH ₂ ⁺ -Reste aus Arginin- und Lysinketten)
Amidgruppen R'-CO-NH-R''	X (Peptidbindungen)	---	X (Peptidbindungen)	X (Peptidbindungen)	X (Peptidbindungen)

4.5 Metallsorptionsversuche mit Biomolekülen im Batch-Verfahren

Unter Verwendung der ICP-MS konnten die Metallbindungsfähigkeiten der intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 sowie deren einzelnen primären Zellwandkomponenten wie Membranlipide, PG+ und S-Layer-Proteine nach der entsprechenden Inkubationszeiten ausgewertet werden. In den Batch-Sorptionsversuchen wurden die Bindungsfähigkeiten der Biomoleküle mit As, Au, Cd, Eu, Pb, Pd, Pt und U über einen Sorptionszeitraum von 48 Stunden untersucht. Dabei wurden zu festgelegten Zeitpunkten (Kapitel 3.8.2) Probenahmen durchgeführt. Aufgrund der vorangegangenen Charakterisierung der isolierten Zellwandbestandteile und den aus vorangegangenen Arbeiten erhaltenen Informationen zum chemischen Aufbau und dem Vorhandensein funktioneller Gruppen erfolgte die Interpretation und Zuordnung der Bindungsereignisse. Resultierend aus den berechneten Metallsorptionsraten (q und q_{\max}) mit je einer Bezugsgröße von 1 g Biosorbent wurden Bindungspräferenzen der einzelnen Biomoleküle und intakten Zellen abgeleitet. Zusätzlich wurde die Metallentfernungseffizienz (RE) bezogen auf die eingesetzte Menge an Metallen berechnet und in Tabelle 18 dargestellt. Ausgewählte Daten dieser Sorptionsversuche wurden vorab bereits veröffentlicht^{128, 238, 239}. In den mitgeführten Metallreferenzlösungen ohne Biokomponenten konnten keine größeren Sorptionseffekte ($\ll 1\%$), wie z. B. durch eine Sorption an der Gefäßwand beobachtet werden, sodass die detektierten Metallsorptionen direkt auf die Biomoleküle zurückgeführt werden konnten. Die vernachlässigbar niedrigen Werte der Wandsorption wurden daher in die weiteren Berechnungen der Metallsorptionsraten nicht mit einbezogen. Aufgrund von Pufferwirkungen der Biomoleküle wurden für die Sorptionen der pH-Wert der Biokomponenten mittels physiologischer NaCl-Lösung auf pH=6,0 voreingestellt und durch die Zugabe der Stammlösung der Metallsalze wurde ein selbsteinstellender pH-Wert über die Versuche genutzt. Die entsprechenden Verläufe der pH-Werte der Sorptionsuntersuchungen sind in Abbildung A 1 dargestellt. Es konnte bei allen Metall-Biosorbent-Untersuchungen festgestellt werden, dass sich nach der Zugabe der Metallsalzlösung ein pH-Wert im leicht sauren Milieu einstellt, welcher über die gesamte Sorptionszeit nahezu konstant bleibt. So können desorptive Effekte innerhalb der Versuchsreihen bedingt durch eine pH-Wert Änderung ausgeschlossen werden. Ebenfalls sind im Anhang in Tabelle A 2 für *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und in Tabelle A 3 für *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 die gemittelten Einzelsorptionswerte der einzelnen Probenahmen dargestellt, aus welchen in den folgenden Kapiteln die maximalen Metallsorptionsraten und die Metallentfernungseffizienzen bestimmt wurden.

4.5.1 Metallsorption an Membranlipiden

Die Membranlipide stellen die unterste Zellschicht der in dieser Arbeit vorgestellten Biomoleküle dar, auf denen die eigentlichen Zellwandkomponenten wie Peptidoglykan oder S-Layer-Proteine aufgelagert sind. Die Membranlipide wurden als erste Komponente der isolierten Zellwandbestandteile von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 bezüglich ihrer Metallbindungsfähigkeiten untersucht. In Abbildung 40 sind vergleichend die Sorptionsraten über den Zeitraum von 48 Stunden der beiden untersuchten Membranlipide mit den ausgewählten Metallen dargestellt.

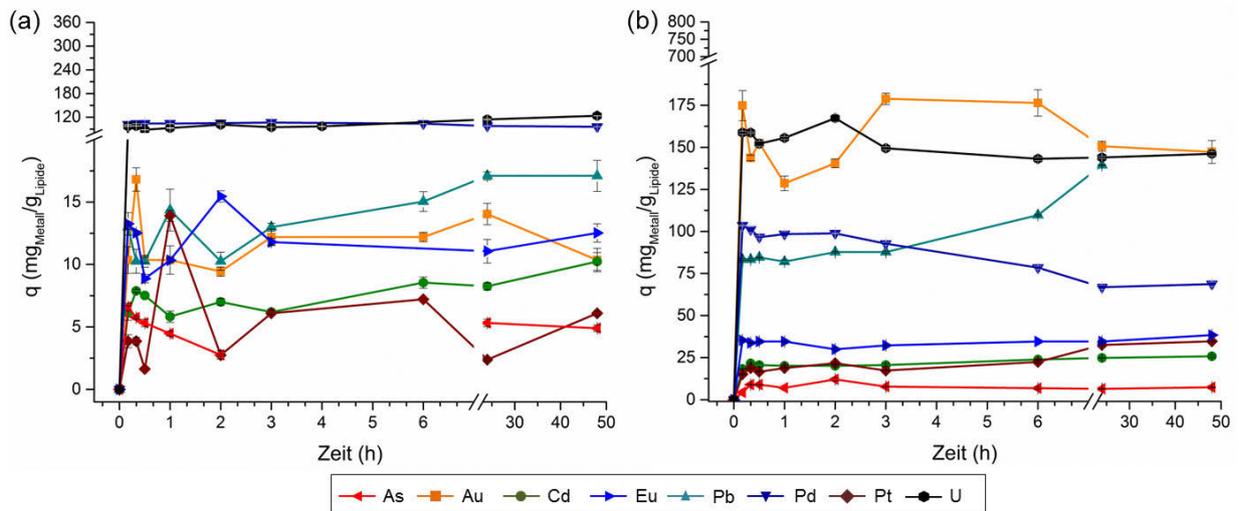


Abbildung 40: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von Membranlipiden von (a) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

Betrachtet man das Metallbindungsverhalten beider untersuchten Membranlipide in Abbildung 40 so ist zu erkennen, dass diese sich signifikant in der Art und Menge an gebundenem Metall unterscheiden. Diese unterschiedliche Metallspezifität kann durch den unterschiedlichen Aufbau der beiden Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 begründet sein. Beide Membranlipide bestehen wie in Kapitel 4.2.2 festgestellt wurde aus der hydrophilen Kopfgruppe Phosphatitylcholin, welche an dem Glycerolrückgrat verestert sind. Betrachtet man den Aufbau der beiden Membranlipide, so ist eine bevorzugte Bindung der Metallionen an den Phosphatgruppen der hydrophilen Kopfgruppen zu vermuten. Die unterschiedlichen Metallbindungsfähigkeiten beider Stämme zeigen jedoch, dass die Bindungsereignisse nicht vollständig durch die Phosphatgruppen bestimmt werden können. Aufgrund der gleichen Kopfgruppen beider Membranlipide müssten die Metalle in diesem Fall in ähnlichen Mengen gebunden werden. Somit deuten die unterschiedlichen Metallbindungsdaten, welche in den Versuchen festgestellt wurden auf eine Beteiligung weiterer Komponenten hin. Aufgrund der ermittelten unterschiedlichen hydrophoben Fettsäuren (C_{14} - C_{18} Kettenlängen), welche die Membranlipide von JG-A12 und JG-B53 aufweisen und die am Glycerolrückgrat verestert sind ist daher anzunehmen, dass weitere funktionelle Gruppen wie z .B. die Fettsäurereste bzw. Fettsäureester (R_1 - $COOR_2$) der Membranlipide einen Einfluss auf die Metallbindungsfähigkeit haben ²⁴⁰.

Aus den in Abbildung 40 dargestellten Graphen lässt sich erkennen, dass die Bindung der Metalle innerhalb der ersten Stunde nahezu vollständig abgeschlossen ist und über den weiteren untersuchten Zeitraum von 48 Stunden konstant verlaufen. Lediglich minimale Fluktuationen in den Sorptionsdaten zeigen den dynamischen Gleichgewichtsprozess der Metallsorption auf. Eine Aussage über eine Verschiebung des Gleichgewichtes von Desorption zu Sorption einzelner Metalle kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht getroffen werden. Es kann jedoch aufgrund der sehr guten Metallbindungen an den Membranlipiden eine sehr starke Interaktion dieser Biomoleküle mit den untersuchten Metallen abgeleitet werden. Die Membranlipide von JG-A12 zeigten dabei in den Versuchen sehr hohe Metallsorptionsraten von Uran (≈ 124 mg/g) und Palladium (≈ 107 mg/g), wohingegen Arsen (≈ 7 mg/g), Cadmium (≈ 10 mg/g), Platin (≈ 14 mg/g), Europium (≈ 15 mg/g), Gold (≈ 17 mg/g) und Blei (≈ 17 mg/g) in deutlich geringeren Mengen gebunden wurden. Vergleicht man diese Werte zu den Metallbindungen der Membranlipide von JG-B53 so ist zu erkennen, dass dessen Membranlipide deutlich höhere Metallmengen binden konnten. Die Membranlipide von JG-B53 weisen die größten Metallsorptionsraten zu Uran (≈ 167 mg/g) und Gold (≈ 179 mg/g), sowie von Blei (≈ 140 mg/g) und Palladium (≈ 104 mg/g) auf²⁴¹. Ebenfalls wie bei den Membranlipiden von JG-A12 konnten Arsen (≈ 12 mg/g), Cadmium (≈ 26 mg/g) und Platin (≈ 35 mg/g) im Vergleich zu den anderen Metallen in deutlich geringeren Raten gebunden werden. Dies zeigt, dass die hier beobachtete Metallbindung der Membranlipide sich sehr spezifisch verhält. In Tabelle 18 sind die maximalen Sorptionswerte (q_{\max}) und die Metallentfernungseffizienz (RE) der Membranlipide vergleichend zu den anderen untersuchten Biosorbenten und den Metallen zusammengefasst. Die Biosorption von Metallen wie z. B. die untersuchten Metalle in dieser Arbeit mit Biomasse oder Zellkomponenten werden in der Literatur oft durch die Interaktion mit verschiedenen funktionellen Gruppen, vor allem durch Carboxylgruppen beschrieben. Es konnte jedoch auch der Einfluss weiterer O-, N-, S- oder P-haltiger Gruppen an der direkten Metallbindung nachgewiesen werden^{14, 53}. Betrachtet man daher die Struktur der hier untersuchten Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 kann eine Interaktion der Metalle mit den Estergruppen der Fettsäurereste, als auch der hydrophilen Kopfgruppe des Cholins ($R-N^+-(R)_3$) erfolgen¹⁴. Bezugnehmend auf das HSAB-Prinzip (Harten und Weichen Säuren und Basen, *englisch: Hard and Soft Acids and Bases*)²⁴² zeigen, dass weiche Ionen (kleines Ladungs- zu Radiusverhältnis) wie z. B. Blei, Palladium und weiterer Schwermetalle starke Interaktionen mit stickstoff- oder schwefelhaltigen Gruppen aufweisen, meist resultierend in kovalenten Bindungen. Daher kann die beobachtete sehr gute Bindung von Blei, Gold und Palladium ebenfalls durch die Wechselwirkung mit der quartären Ammoniumgruppe des Cholins verursacht werden. Ebenfalls könnten durch die Ausbildung stabiler kovalenter Bindungen, die starken metallselektiven Interaktionen erklärt werden. Das untersuchte Uran (Uranylions), welches von beiden isolierten Membranlipiden in sehr hohen Mengen gebunden wurde, sollte als hartes Ion hingegen bevorzugt einen ionischen Bindungscharakter zu Phosphat- und Carboxylgruppen aufweisen. Jedoch kann aufgrund der durchgeführten Batch-Versuche lediglich die These der potentiellen Bindungspartner und funktionellen Gruppen aufgestellt werden, welche in weiteren Untersuchungen näher betrachtet werden müssen.

Die Sorptionsergebnisse der isolierten Membranlipide zeigen, dass diese ein sehr hohes und selektives Bindungspotenzial aufweisen und somit theoretisch in der Lage sind signifikante Mengen an Metallen im Gesamtsystem der Zelle zu binden. In der Literatur wird die Biosorption von Metallen durch isolierte Membranlipide nur sehr vage im Kontext des Gesamtsystem komplexer bakterieller Zellwände durch die Metall-Phosphatgruppeninteraktion beschrieben⁸. Aufgrund der semipermeablen Eigenschaften (selektiver Nährstofftransport) der 5-10 nm dicken Lipidmembranbarriere in der Bakterienzelle stellt diese jedoch eine wichtige Komponente zur Interaktion oder Kommunikation der Zelle mit der äußeren Umgebung dar¹⁴. Aufgrund weiterer der Lipidmembran aufgelagerten Zellschichten wie z. B. der 20-80 nm starken Peptidoglykanschicht und der S-Layer-Proteinschicht (5-20 nm) ist eine direkte Beteiligung der Membranlipide an der Metallbindung im Gesamtsystem intakter Bakterien wahrscheinlich jedoch sehr gering. Vielmehr sollte die Metallbindung in erster Linie von den oberflächen-/umweltnahen Schichten der Zellwand erfolgen, bevor eine Metallinteraktion mit den Lipiden der Cytoplasmamembran (mit integralen und peripheren Proteinen) erfolgen kann. Somit sollte nach dem bisherigen Verständnis eine Detoxifizierung von Schwermetallen durch die Lipidmembran des Gesamtsystems nicht ermöglicht werden. Die isolierten Membranlipide sind jedoch sehr wohl in der Lage signifikante Mengen an Metallen zu binden. Die Metalle würden durch die funktionellen Gruppen der Membranlipide im Fall von Schädigungen aufgelagerter Zellwandschichten gebunden, wodurch das Zellinnere vor einer direkten Aufnahme toxischer Metalle geschützt wird. Da dies jedoch nicht die primäre Funktion der Membran darstellt, besteht vielmehr die Wahrscheinlichkeit, dass z. B. durch die Interaktion von toxischen Metallen mit der Cytoplasmamembran wichtige Enzyme der Atmungskette inaktiviert werden und somit die Zelle geschädigt werden kann.

Vergleicht man die erhaltenen q_{\max} -Werte der isolierten Membranlipide mit ausgewählten Biosorbenten aus der Literatur (Tabelle 19), kann z. B. im Fall der sehr guten Palladiumbindung beider Stämme (bis zu 107 mg/g Lipide) eine vergleichbare Bindung detektiert werden wie bei der gesamten Biomasse von *Desulfovibrio desulfuricans* (128 mg/g) beschrieben wurde^{14, 243}. Betrachtet man die Bindung von Uran an den Membranlipiden, können signifikant höhere Uranmengen gebunden werden als dies bei den in Tabelle 19 dargestellten Beispielen der Biomassen beschrieben wurde. Friis; N. et al. (1986) untersuchte den Einfluss der Metallsorption von Uran und Blei von *Streptomyces longwoodensis* (Zellen, Zellwandfragmenten und der kompletten Cytoplasmamembran)²⁴⁴. Dabei konnten durch die Zellbiomasse bis zu 440 mg U/g und durch die Zellwand bis zu 380 mg U/g gebunden werden. Dabei konnte er die sehr hohe Uranbindung auf eine Interaktion mit Phosphatgruppen zurückführen, welche ebenfalls in den hier untersuchten Membranlipidstrukturen wiederzufinden sind. Die sehr gute Bleibindung (140 mg/g) der Membranlipide von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 ist vergleichbar mit der von *Bacillus subtilis* (189 mg/g), jedoch deutlich geringer als die der Biomasse von *Corynebacterium glutamicum* (567 mg/g)^{14, 54, 245}. Zusammenfassend kann aus den ermittelten Daten der Metallsorption in Abbildung 40 und den gelisteten Werten in Tabelle 18 eine bevorzugte Bindungsreihenfolge der Membranlipide (JG-A12) von U> Pd> Pb > Au> Eu> Pt> Cd> As und der Membranlipide (JG-B53) von Au> U> Pb> Pd> Eu> Pt> Cd> As aufgestellt werden.

Tabelle 18: Darstellung der maximalen Sorptionswerte (q_{\max}) und der Sorptionseffizienz (RE) der untersuchten Biomoleküle von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 bei Inkubation bei 4 °C.

Metall	$C_s(\text{Metall})$ (mg/l)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12				<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53				
		intakte Zellen	SlfB	Lipide	PG+	intakte Zellen	Slp1	Lipide	PG+	
As	74,92	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	15,43	3,51	6,60	4,08	96,86	7,40	12,05	2,29
		RE (%)	4,12	4,69	4,40	2,72	15,51	9,87	8,04	1,53
Au	196,97	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	76,60	58,93	16,81	47,88	700,08	75,68	178,83	42,99
		RE (%)	7,78	29,92	4,27	12,16	42,65	38,42	45,39	10,91
Cd	112,41	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	38,62	5,30	10,23	41,02	109,28	12,41	25,76	84,43
		RE (%)	6,87	4,72	4,55	18,25	11,67	11,04	11,46	37,56
Eu	151,96	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	40,47	7,73	15,46	93,47	159,90	10,36	38,38	293,85
		RE (%)	5,33	5,09	5,09	30,75	12,63	6,82	12,63	96,69
Pb	207,20	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	66,67	10,94	17,10	320,10	591,35	40,69	139,40	393,04
		RE (%)	6,44	5,28	4,13	77,24	34,25	19,64	33,64	94,85
Pd	106,42	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	303,50	58,28	106,74	88,33	616,41	70,85	103,60	88,50
		RE (%)	57,04	54,76	50,15	41,50	69,51	66,58	48,67	41,58
Pt	195,08	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	31,97	15,32	13,91	13,62	150,59	12,29	34,70	13,60
		RE (%)	3,28	7,85	3,56	3,49	9,26	6,30	8,89	3,49
U_{nat} (4 °C)	238,03	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	7,14	41,17	123,76	353,70	8,36	42,34	167,34	454,49
		RE (%)	1,20	17,30	26,00	74,30	0,42	17,79	35,15	95,47
U_{nat} (30 °C)	238,03	q_{\max} (mg/g Biosorbent)	15,75	---	---	---	162,59	---	---	---
		RE (%)	2,65	---	---	---	27,32			

Grün markiert – höchstes q_{\max} an Biokomponente (stammspezifisch)
 Orange markiert – niedrigstes q_{\max} an Biokomponente (stammspezifisch)

Tabelle 19: Vergleichswerte zur Metallbindung ausgewählter Biosorbenten aus der Literatur.

Metall	Biosorbent	q (mg/g)	Referenzen
As	<i>Lessonia nigrescens</i>	45,2	Hansen, H.K. (2006) ²⁴⁶
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	≈ 0,3 (As III)	Yan, I. (2010) ²⁴⁷
	<i>Bacillus</i> sp. JG-B62, S-Layer-Proteine	1,62	Matys, S. (2010) ²⁴⁸
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , S-Layer-Proteine	1,96	Matys, S. (2010) ²⁴⁸
Au	<i>Bacillus subtilis</i> , Biomasse	70	Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Bacillus subtilis</i> , isolierte Zellwand	79	Beveridge, T.J. (1985) ²⁴⁹ Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Spirulina platensis</i>	5,1	Savvaïdis, I. (1998) ²⁵⁰ , Das, N. (2010) ⁸⁷
	<i>Bacillus subtilis</i> , gram positive Zellwand	71,5	Beveridge, T.J. (1985) ²⁴⁹
	Braune Meeresalge, <i>Turbinaria conoides</i>	34,5	Vijayaraghavan, K. (2011) ²⁵¹
	<i>Chlorella vulgaris</i>	98,5	Darnall, D.W. (1986) ¹¹⁶ , Das, N. (2010) ⁸⁷
<i>Streptomyces erythraeus</i>	5,9	Savvaïdis, I. (1998) ²⁵⁰ , Das, N. (2010) ⁸⁷	
Cd	<i>Bacillus subtilis</i> , Biomasse	101	Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Pseudomonas</i> sp.	278	Ziagova, M. (2007) ²⁵² ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
	Gram-positive Bakterien	18,5	Gourdon, R. (1990) ²⁵³ ; aus Veglio, F. (1997) ⁵⁷
	<i>E. coli</i> K12, Peptidoglykan	10,4	Hoyle, B. D. (1984) ²³⁷
Eu	Braune Meeresalge, <i>Turbinaria conoides</i>	138,2	Vijayaraghavan, K. (2010) ²⁵⁴
Pb	<i>Bacillus subtilis</i> , Biomasse	189	Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79,5	Chang, J.S. (1997) ²⁵⁵ ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	567,7	Choi, S.B. (2004) ²⁴⁵ ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
Pd	Pilzbiomasse	65	Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	128,2	de Vargas, I. (2004) ²⁴³ ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
Pt	Süßwasser-alge	53	Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	62,5	de Vargas, I. (2004) ²⁴³ ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
U	<i>Bacillus</i> sp.	38	Cotoras, D. (1993) ²⁵⁶ ; Volesky, B. (1995) ⁵⁴
	<i>Chlorella vulgaris</i> , (lebend/tot)	14/28	Vogel, M. (2010) ¹¹⁸
	<i>Bacillus megaterium</i>	37,8	Nakajima, A. (2004) ²⁵⁷ ; Wang, J.L. (2009) ¹⁴
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12, S-Layer	20	Raff, J. (2002) ¹⁴⁰
	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	440	Friis, N. (1986) ²⁴⁴
	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1026	52,4	Nakajima, A. (2004) ²⁵⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1054	31,7	Nakajima, A. (2004) ²⁵⁷	

4.5.2 Metallsorption an Peptidoglykan

Als weitere Biokomponente wurde das Peptidoglykan mit integrierten sekundären Zellwandpolymeren untersucht (PG+). Diese bei gram-positiven Bakterien sehr dicke Schicht (20-80 nm) kann aufgrund des hohen prozentualen Anteils an der bakteriellen Zellwand den ggf. höchsten Beitrag zur Metallbindung liefern, falls eine Bindung erfolgt²⁷. Daher ist dessen Untersuchung sehr wichtig. In Abbildung 41 vergleichend die Metallsorptionsraten von PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 über den Sorptionszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

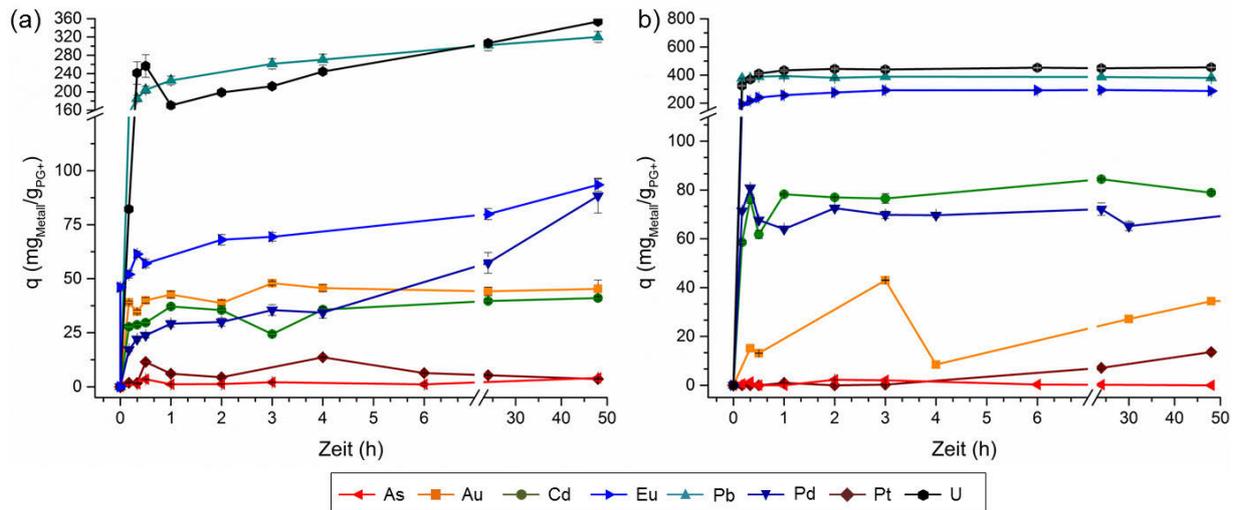


Abbildung 41: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von Peptidoglykan von (a) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass beide PG+ bevorzugt Uran (354 mg/g JG-A12, 455 mg/g JG-B53), Blei (320 mg/g JG-A12, 455 mg/g JG-B53) und Europium (93 mg/g JG-A12, 294 mg/g JG-B53) in höheren Mengen binden. Andere Metalle wie z. B. Arsen und Platin werden im Vergleich zu den weiteren untersuchten Metallen weniger gut gebunden. In Tabelle 18 sind die maximalen Metallsorptionsraten (q_{max}) und die Metallentfernungseffizienzen (RE) vergleichend zu den anderen untersuchten Biokomponenten beider Mikroorganismen dargestellt.

Betrachtet man die Sorptionsverläufe beider Stämme so ist zu erkennen, dass analog der Membranlipide die Sorption innerhalb der ersten Stunde stattgefunden hat. Jedoch ist bei den PG+ Versuchen (JG-A12) bei nahezu allen verwendeten Metallen eine zunehmende Sorptionsrate über die Zeit zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass Metalle über die Zeit in dem hochverzweigten Peptidoglykangerüst auch durch sterisch schlecht zugängliche funktionelle Gruppen gebunden werden können. Bei PG+ von JG-B53 sind nach einer Sorptionszeit von einer Stunde nahezu konstante Graphen zu erkennen, welche auf eine extrem starke und schnelle Metallinteraktion hinweisen. Betrachtet man die sehr guten Uran-, Blei- und Europiumsorptionsdaten des PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53, so hat sich diese Komponente als eine der besten extrahierten Biosorbenten in den Versuchen für diese ausgewählten Metalle herausgestellt. Ebenfalls konnten durch das PG+ dieses Stammes signifikante Mengen Cadmium (bis zu 84 mg/g) und Palladium (bis zu 89 mg/g)

gebunden werden. Vergleicht man die Bindungsergebnisse des PG+ von JG-A12, so können bei diesem Stamm teilweise geringere Werte als bei PG+ von JG-B53 detektiert werden. Dieses bessere Bindungsverhalten ist ebenfalls in den Versuchen der anderen Biosorbenten von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 zu beobachten. Dies legt die These nahe, dass es sich bei der Metallbindungsfähigkeit um eine mikroorganismen-/stammspezifische Metallinteraktion handelt, welche sich selbst in den Substrukturen der bakteriellen Zellwand wiederfinden lässt. Durch das hochverzweigte Rückgrat des Makromoleküls Peptidoglykan stehen eine große Anzahl an Carboxyl- und Aminogruppen der alternierenden *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäureketten, sowie Phosphatgruppen über SCWPs wie z. B. Teichon- und Teichuronsäuren zur Metallbindung zur Verfügung³⁴. Zusätzlich können weitere Carboxyl- und Aminofunktionalitäten der Peptidverzweigungen im PG+ zur Verfügung stehen²¹. Diese hohe Verfügbarkeit an potentiellen Bindungsstellen für die Metalle und die hohe negative Nettoladung des Peptidoglykans können die in den Versuchen ermittelten hohen Bindungskapazitäten im Vergleich zu den weiteren untersuchten Biokomponenten beider Stämme erklären²⁴⁹. Ebenfalls stellt PG+ durch seinen hohen Anteil (40-90 %) an der Zellwand gram-positiver Bakterien eine der wichtigsten Komponenten zur Bindung von Metallen im Gesamtsystem der Zellen dar^{14, 258}.

Vergleicht man die erhaltenen Werte der Metallbindung ausgewählter Biosorbenten aus der Literatur (Tabelle 19), so weist das PG+ beider Stämme eine geringere Metallbindungsfähigkeit als beispielsweise isolierte Zellwände von *Bacillus subtilis* (bis zu 79 mg Au/g) auf^{54, 249}. Vergleicht man jedoch die Bindung von Cadmium können beide PG+ signifikant höhere Mengen binden, als dies bei PG von *E. coli* K12 (10,4 mg Cd/g Biosorbent) zu beobachten war²³⁷. Diese geringeren Metallbindungen bei *E. coli* können z. B. durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand des gram-negativen Organismus im Vergleich zu den beiden untersuchten gram-positiven PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 erklärt werden. Weitere Beispiele zur Metallbindung vergleichender Biosorbenten sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Zusammenfassend stellt das Peptidoglykan mit den enthaltenen SCWPs von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 eine der vielversprechendsten Komponenten für Biosorptionsversuche dar und kann als ideale Komponente für die Entfernung von Metallen aus metallkontaminierten Wassern und Umweltproben angesehen werden. Im Hinblick auf die Metallbindung des komplexen Systems von intakten Zellen kann zusätzlich die Metallinteraktion mit den Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und Phosphatgruppen im PG+ für die sehr guten Sorptionseigenschaften verantwortlich sein. Der Einfluss auf die Metallbindung durch die im PG+ enthaltenen Teichonsäuren (PO_4^{3-} -Interaktionen) in Mikroorganismen z. B. in *Bacillus subtilis* konnte bereits in den vorangegangenen Forschungsarbeiten beschrieben werden^{259, 260}. Dabei wird die Interaktion der Metallkationen hauptsächlich durch die negative Nettoladung, aufgrund der hohen Anzahl an funktionellen Gruppen im Peptidoglykan mit SCWPs, bestimmt. Somit ist die Metallbindung im PG+, sowohl als Einzelkomponente als auch im Gesamtsystem von Bakterien durch Ionenaustauschreaktionen bestimmt^{7, 258}. Es dient daher nicht nur zur Strukturgebung der Bakterienzelle und Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes, sondern stellt als weitere physiologische Funktion in der Bakterienzelle eine wichtige Komponente dar, um beispielsweise selektiv und in hohem Maße toxische Metallionen wie z. B. Blei, Uran oder Cadmium

zu binden. Somit kann das Eindringen der toxischen Metalle in das Zellinnere verhindert werden²³⁷. Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Studien lässt sich für das PG+ von JG-A12 zusammenfassend eine Metallbindungsreihenfolge von U > Pb > Eu > Pd > Au > Cd > Pt > As und für PG+ von JG-B53 von U > Pb > Eu > Cd > Pd > Au > Pt > As aufstellen. Ebenfalls kann aufgrund der erhaltenen Daten festgestellt werden, dass das PG+ entscheidend an der Metallbindung intakter Zellen beteiligt sein muss. In weiteren Studien sollten isolierte SCWPs mit deren Phosphatfunktionalitäten und das Peptidoglykan ohne SCWPs (PG-) separat untersucht werden, um den Einfluss der jeweiligen funktionellen Gruppen beider Biomoleküle auf die Bindung der Metallkationen aufzuklären.

4.5.3 Metallsorption an S-Layer-Proteinen

Die S-Layer-Proteine bilden die äußerste Schicht der Bakterienzellen und interagieren daher als erste biologische Komponente mit der Umwelt. Es ist daher anzunehmen, dass sie einen großen Einfluss auf die Biosorption von Metallen haben. Daher erfolgten nach der Isolierung der S-Layer-Proteine von der Bakterienhülle die Studien zur Metallinteraktion dieser Biomoleküle in ihrer polymeren Form in den Batch-Versuchen. Dazu sind in Abbildung 42 vergleichend die Metallsorptionsraten der S-Layer-Proteine von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 dargestellt.

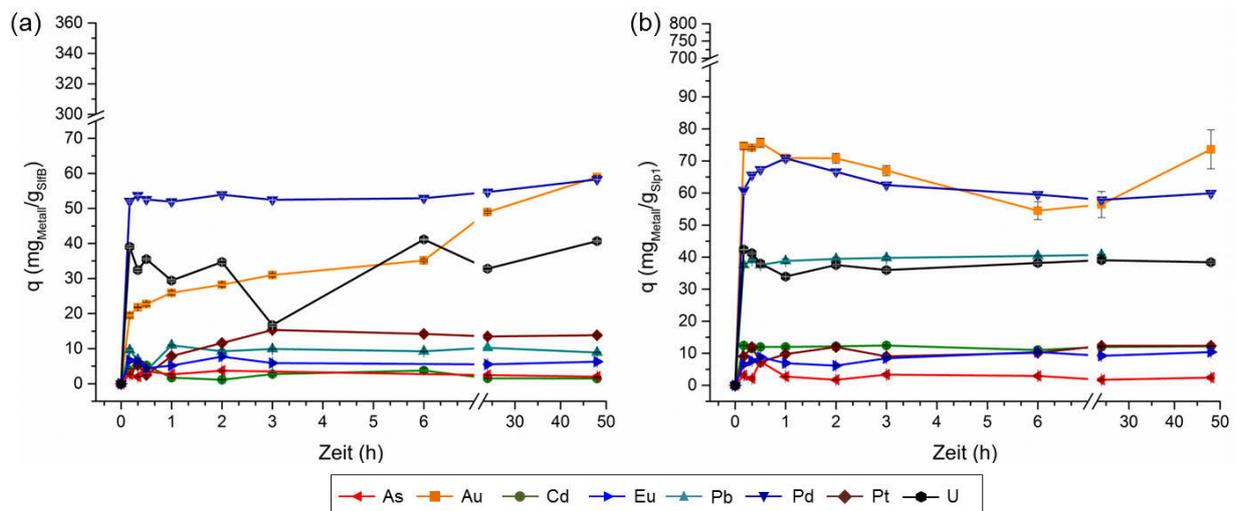


Abbildung 42: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von S-Layer-Proteinen von (a) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (SlfB) und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 (Slp1).

Ähnlich der beiden vorangegangenen Untersuchungen der Membranlipiden und des Peptidoglykans von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ist auch in diesen Versuchen die sehr schnelle Sorption innerhalb der ersten Stunde nach der Zugabe der Metallsalzlösung zu erkennen. Nach dieser Zeit ist bei beiden Komponenten eine nahezu stabile Sorptionsrate aller Metalle bis 48 Stunden zu erkennen. Dabei konnten die geringsten Interaktionen sowohl bei SlfB und Slp1 mit Cadmium (5,3 mg/g SlfB, 12,4 mg/g Slp1), Europium (7,73 mg/g SlfB, 10,4 mg/g Slp1), Platin (15,3 mg/g SlfB, 12,3 mg/g Slp1) und dreiwertigem Arsen (3,2 mg/g SlfB, 7,4 mg/g Slp1) detektiert werden. Bei SlfB von JG-A12 sind jedoch größere Schwankungen in den Sorptionswerten von Uran zu erkennen, welche einerseits durch Fehler in der Probenbehandlung zurückgeführt werden könnten oder nicht stabile Sorptionen

von Uran an SlfB aufzeigen. Bei den untersuchten Metallen Gold und Platin ist zu erkennen, dass über die Zeit mehr Metall durch SlfB gebunden wird. Sowohl für SlfB von JG-A12 als auch Slp1 von JG-B53 kann eine bevorzugte Bindung der Metalle Palladium (58,3 mg/g SlfB, 70,9 mg/g Slp1), Gold (58,9 mg/g SlfB, 75,7 mg/g Slp1) und Uran (41,2 mg/g SlfB, 42,3 mg/g Slp1) und zusätzlich bei Slp1 von Blei (40,7 mg/g Slp1) festgestellt werden. Betrachtet man die Sorptionsraten beider S-Layer-Proteine so ist zu erkennen, dass Slp1 in der Lage ist geringfügig mehr Palladium und Gold (Faktor 1,3) zu binden als SlfB. Vergleicht man die Metallbindungsfähigkeit beider S-Layer-Proteine bei Uran, so ist ein nahezu identisches Bindungsverhalten zu erkennen. In Tabelle 18 sind die maximalen Metallsorptionsraten (q_{max}) und die Metallentfernungseffizienzen (RE) vergleichend zu den weiteren Biomolekülen dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt.

Vergleicht man die sehr guten Sorptionsergebnisse von SlfB mit vorangegangenen Untersuchungen, so konnte ebenfalls eine Uranbindung von 41,2 mg /g SlfB festgestellt werden. Betrachtet man hingegen die Sorptionswerte von Uran mit vernetzten SlfB von JG-A12 (19,5 mg/g) aus vorangegangenen Untersuchungen so kann ein um den Faktor 2 höheres Sorptionsverhalten in dieser vorliegenden Arbeit detektiert werden^{15, 127, 140}. Durch die Quervernetzung von S-Layer-Proteinen erfolgte eine Stabilisierung der rekristallisierten Proteine und Gitterstrukturen. Durch die Stabilisierung der S-Layer-Proteinschichten werden diese für den Einsatz potentieller biotechnologischer Anwendungen wesentlich interessanter. Jedoch stehen durch die Modifizierung der funktionellen Gruppen weniger Bindungspartner zur Verfügung. Die Uranbindung von Slp1 ist mit 42,3 mg U/g Slp1 vergleichbar mit vorangegangenen Untersuchungen (42,5 mg U/g Slp1; pH=4,5)²⁶¹. So zeigen beide S-Layer-Proteine nahezu identische Sorptionsergebnisse von Uran. In Sorptionsversuchen von As(V) (pH=6,0) konnten vergleichbare Sorptionsergebnisse für SlfB bestimmt werden, wie in dieser Arbeit für As(III)²⁴⁸. Daher kann auf ein ähnliches Bindungsverhalten beider Oxidationsstufen von Arsen mit SlfB geschlossen werden.

Die sehr gute Interaktion der S-Layer-Proteine mit verschiedenen Metallen rückt diese in den Fokus verschiedenster Forschungsarbeiten³⁹. Betrachtet man daher die sehr gute Bindung des Edelmetalls Palladium (58 mg /g SlfB und 71 mg/g Slp1), so können die Aussagen der sehr guten Interaktion von S-Layer-Proteinen mit diesem Edelmetall bestätigt werden, welches von großem Interesse für weitere technische Anwendungen ist^{22, 262}. Auf molekularer Ebene konnte die Bindung von Pd(II) an SlfB durch spektroskopische Untersuchung der Einzelmoleküle auf die vorwiegende Interaktion mit Carboxylgruppen zurückgeführt werden²⁶³. Dabei erfolgt die Palladiumbindung vorwiegend über die Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure, welche beide zu je ca. 5 mol% in der Aminosäuresequenz beider S-Layer-Proteine vorkommen^{202, 263}. Zusätzlich konnten in den Untersuchungen die Bindungsbeteiligung von Aminogruppen nachgewiesen werden. In den Untersuchungen von SlfB konnte zusätzlich eine stabilisierende Wirkung des Edelmetalls Palladium auf die Sekundärstruktur der Proteine festgestellt werden, welche die hohe Bindung dieses Edelmetalls sowohl vorangegangener Studien als auch in dieser Arbeit erklären können²⁶³. Diese hohen Bindungskapazitäten von SlfB könnten dabei ausgenutzt werden, um hochstrukturierte Pd(0)-Nanopartikelcluster unter Verwendung von Reduktionsmitteln zu erzeugen. Dies konnte bereits in

vorangegangenen Untersuchungen sowohl bei isolierten S-Layer-Proteinen, als auch bei Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 nachgewiesen werden, wodurch diese Komponenten als Biotemplate für die Herstellung von definierten Nanopartikeln genutzt werden können^{262, 264, 265}. Aufgrund der hohen genetischen Ähnlichkeiten des funktionales S-Layer-Proteins Slp1 zu SlfB von 67 % ist ein ähnliches Bindungsverhalten, sowie ein ähnlich stabilisierender Effekt von Palladium auf Slp1 anzunehmen¹⁴⁵. Durch das höhere Bindungsverhalten von Palladium an Slp1 ist diese Biokomponente für weitere Anwendungen wahrscheinlich wesentlich interessanter und effizienter in der Entfernung von Edelmetallen aus Wässern. Wie in den Studien beschrieben, sollte ein nahezu ähnliches Bindungsverhalten für weitere Elemente der 8. Nebengruppe insbesondere für Platin nachweisbar sein²². Dies konnte durch die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da zwar mit einer Bindungsfähigkeit von 15,3 mg Pt/g SlfB und 12,3 mg Pt/g Slp1 gute Metallsorptionsraten erzielt werden konnten, jedoch liegen diese deutlich unter den Werten von Palladium. Ebenfalls kann hier keine Bindungspräferenz eines der beiden S-Layer-Proteine abgeleitet werden. Somit scheint es, dass im Fall der Platinbindung kein stabilisierender Effekt auf die Proteine durch die Metallbindung existiert. Dies würde die geringeren Bindungswerte erklären und auf einen eher destabilisierenden Effekt von Platin auf die Proteine SlfB und Slp1 hindeuten. Dies muss in weiteren Untersuchungen näher zu betrachtet werden.

Das Edelmetall Gold konnte sowohl auf von SlfB (58,9 mg/g) als auch von Slp1 (75,7 mg/g) in höheren Mengen gebunden werden. Dies zeigt eine starke Interaktion von Gold mit den S-Layer-Proteinen beider Stämme. In Untersuchungen von SlfB mit Au(III) und der Ausbildung von Goldnanopartikelclustern, konnte diese starke Interaktion auf die Beteiligung von C-, N- oder O-tragenden Gruppen wie sie in den funktionellen Gruppen wie z. B. Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen beider Proteinen vorkommen, zurückgeführt werden^{266, 267}. Jankowski, U. et al. (2010) konnte durch spektroskopische Untersuchungen von SlfB eine starke Interaktion von Gold mit Carboxylgruppen nachweisen²⁶⁸. Ebenfalls wurden in der beschriebenen Arbeit Reduktionen von Au(III) zu Au(0) festgestellt, welche auch in Abwesenheit von Reduktionsmitteln stattgefunden haben²⁶⁸. Dies deutet auf intrinsische Reduktionseigenschaften der S-Layer-Proteine hin, welche die sehr hohen und guten Bindungswerte von SlfB und Slp1 in dieser Arbeit erklären können. Ebenfalls konnte durch Jankowski, U. et al. (2010) ein stabilisierender Effekt auf die Sekundärstruktur der Proteine ähnlich wie bei Palladium festgestellt werden. Durch die starke Interaktion mit den Proteinen und der weiteren Reduktion von Au(III) zu Au(0) können hochgeordnete metallische Nanopartikel für verschiedene katalytische Anwendungen entwickelt werden. Auch hier ist, analog der besseren Interaktion von Slp1 mit Palladium, eine sehr viele höhere Bindungskapazität für Gold als bei SlfB zu beobachten. Diese sehr gute Bindung von Gold bietet nicht nur die Möglichkeit die untersuchten S-Layer-Proteine als Filtertemplate zur Rückgewinnung von Gold aus metallkontaminierten Wässern zu nutzen, vielmehr sollte es die Möglichkeit bieten, Goldnanopartikel auf monolagigen Proteinschichten zu erzeugen¹²⁸. Die Untersuchungen zu Metall- und Metallnanopartikelinteraktionen mit rekristallisierten S-Layer Schichten sollten einen detaillierteren Einblick in die Metallwechselwirkungen dieser interessanten und vielversprechenden biologischen Moleküle geben (Kapitel 4.5.4). Vergleicht

man die Sorptionsdaten der Edelmetalle Au und Pd mit ausgewählten Biosorbenten aus der Literatur (Tabelle 19) so kann eine ähnliche bzw. teilweise höhere Metallbindung der S-Layer-Proteine in dieser Arbeit erkannt werden.

Im Vergleich der hohen Bindungswerte der beschriebenen Edelmetalle mit SlfB und Slp1 fallen die Werte für Europium (7,7 mg/g SlfB und 10,4 mg/g Slp1) wesentlich geringer aus. Aufgrund der jedoch unterschiedlichen Bindung von Europium mit den Proteinen, muss die Europiuminteraktion separat betrachtet werden. SlfB und Slp1 sind ähnlich dem in der Literatur sehr gut untersuchten und beschriebenen Calmodulin calciumabhängige Proteine. Dabei ist das zweiwertige Ion Calcium verantwortlich für die strukturelle Stabilität des Proteinrückgrates¹²⁸. Durch die sehr ähnlichen Ionenradien von Lanthaniden (z. B. Eu) und Calcium, sowie durch vorangegangene Untersuchungen der Calcium/Lanthaniden-Interaktionen konnte bereits eine geringere Bindung von Lanthaniden im Vergleich zu Calcium festgestellt werden²⁶⁹. Dies kann durch einen geringen Calciumaustausch und durch die Europiumkomplexierung in der Proteinstruktur hervorgerufen werden. Im Falle einer vollständigen Calciumsubstitution würde es jedoch zu einem strukturellen Kollaps der Proteine kommen. Dies würde in einer geringeren Europiumbindung resultieren. Ob die geringe Europiumbindung, wie sie in dieser Arbeit sowohl bei SlfB als auch bei Slp1 detektiert wurde jedoch mit einer Veränderung der Proteinstruktur erklärt werden kann, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Eine weitere Erklärung der geringeren Europiumbindung ist, dass durch die vollständige Sättigung aller Calciumbindungsstellen in der Proteinstruktur eine sehr viel geringere Europiumbindung möglich ist¹²⁸. Daher sollte in weiterer Studien die Europiumintaktion und der mögliche Calciumaustausch in calciumabhängigen Proteinen wie SlfB und Slp1 untersucht werden, um detailliertere Aussagen zur Proteinstruktur zu erhalten²⁷⁰.

Zusammenfassend kann die Interaktion der untersuchten Metalle von SlfB und Slp1 auf die Interaktion freier Carboxylgruppen aus Seitenketten der Asparagin- und Glutaminsäure der Aminogruppen aus Arginin und Lysin, sowie Hydroxidgruppen aus Serin, Threonin und Thryptophan resultierend aus der Aminosäuresequenz beider Proteine beschrieben werden. Die Primärstruktur von SlfB beinhaltet 125 COOH-Gruppen (10,1 mol), 107 NH₂-Gruppen (8,3 mol%) und 274 OH-Gruppen (22,1 mol%)²⁰¹. Bei Slp1 stehen 116 COOH-Gruppen (10,5 mol), 105 NH₂-Gruppen (9,5 mol%) und 238 OH-Gruppen (21,6 mol%) zur Verfügung¹⁴⁵. Jedoch stehen infolge intramolekularer Wechselwirkungen nur ca. 30-40 mol% der COOH- und NH₂-Gruppen bei SlfB zur Metallbindung zur Verfügung²⁷¹. Betrachtet man den höheren Anteil der funktionellen Gruppen bei Slp1, so kann damit eine bessere Metallbindung als die von SlfB abgeleitet werden. Ebenfalls können einige Edelmetalle wie Gold und Palladium stabilisierend auf die Proteinstrukturen wirken, was zu höheren Metallbindungen führen kann. Im Fall weiterer untersuchter Metalle wie z. B. Blei und Platin konnten geringere Bindungen detektiert werden, was auf einen destabilisierenden Einfluss dieser Metalle auf die Proteine hinweisen könnte. Betrachtet man daher die Funktion der S-Layer-Proteine in Bezug auf das Gesamtsystem intakter Bakterien, so sind die S-Layer-Proteine als abgrenzende Zellwandschicht zur Umwelt direkt an der selektiven Metallbindung beteiligt. Sie dienen als Schutzsystem für die Zelle und können das Eindringen toxischer Schwermetalle in die Zelle verhindern. In diesen Untersuchungen konnten aus den

eingesetzten Metallsalzlösungen (1 mM) teilweise sehr hohe Mengen des jeweiligen Metalls gebunden werden. Betrachtet man daher umweltrelevante Metallkonzentrationen (abhängig von Art des Metalls und Ursprung jeweiliger kontaminierter Wässer), welche meist sehr viel geringer sind, so können aus solchen Lösungen wahrscheinlich ein sehr hoher prozentualer Anteil des Schwermetalls herausgelöst werden. Dies konnte bereits bei der Uranentfernung in einer umweltrelevanten Konzentrationen (< 5 mg/l) durch SlfB gezeigt werden, bei dem Uran nahezu vollständig gebunden werden konnte^{201, 272}. Aus den in Tabelle 18 dargestellten maximalen Metallsorptionsraten ergibt eine bevorzugte Bindungsreihenfolge für SlfB von Au < Pd < U < Pt < Pb < Eu < Cd < As und für Slp1 von Au < Pd < U < Pb < Cd < Pt < Eu < As dargestellt.

4.5.4 Metallsorption an intakten Zellen

Nach der Untersuchung der isolierten Einzelkomponenten beider Stämme erfolgten die Untersuchungen der Metallbindungsfähigkeiten der intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53. Dazu sind in Abbildung 43 die Metallsorptionsraten (q) intakter Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 gegenübergestellt.

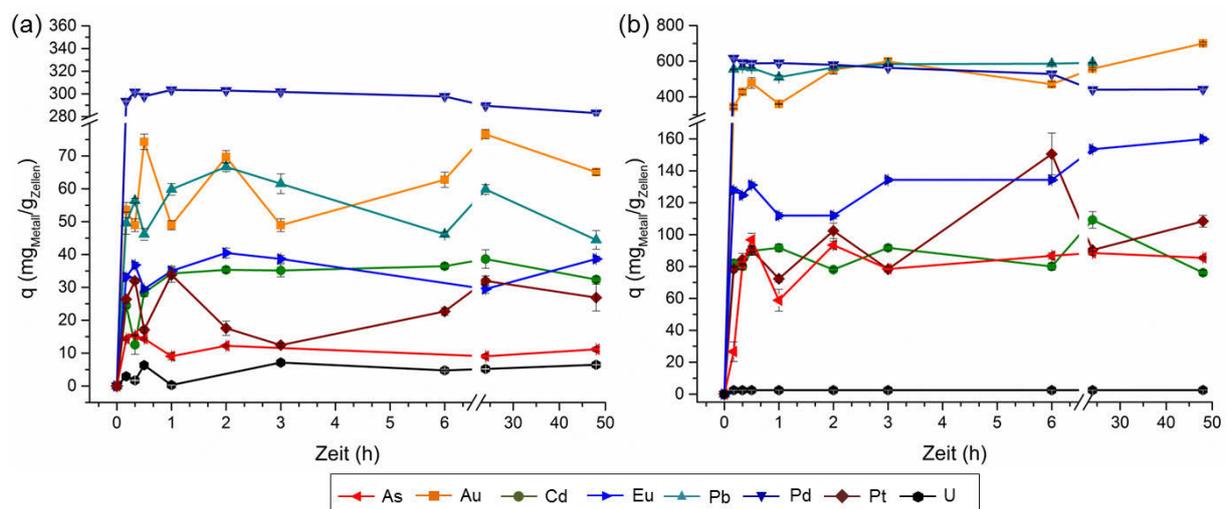


Abbildung 43: Darstellung der Metallsorptionsraten q (mit Fehlerbalken) über die Sorptionszeit (48 h) von intakten Zellen von (a) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass von beiden Mikroorganismen signifikante Mengen der Metalle Palladium (303,5 mg/g JG-A12; 616,4 mg/g JG-B53), Gold (76,6 mg/g JG-A12; 700,1 mg/g JG-B53) und Blei (66,7 mg/g JG-A12; 591,4 mg/g JG-B53) gebunden werden konnten. Im Weiteren konnten Europium (40,47 mg/g JG-A12; 159,9 mg/g JG-B53), Cadmium (38,6 mg/g JG-A12; 109,3 mg/g JG-B53) und Platin (32,0 mg/g JG-A12; 150,6 mg/g JG-B53) in sehr guten Mengen durch die beiden gram-positiven Bakterien gebunden werden. Auf die Interaktionen der beiden Mikroorganismen mit Uran wird in diesem Kapitel gesondert eingegangen. Die maximalen Metallsorptionsraten und die Metallentfernungsraten sind mit den weiteren untersuchten Biosorbenten in Tabelle 18 zusammengefasst.

Betrachtet man das Sorptionsverhalten der einzelnen Metalle so fällt auf, dass der Stamm JG-B53 analog der untersuchten Einzelkomponenten wesentlich höhere Metallmengen binden bzw. tolerieren kann. Daher kann die beobachtete bessere Metallinteraktion der Einzelkomponenten von JG-B53 auf eine stammabhängige und metallselektive Bindung zurückgeführt werden. Ebenfalls kann die sehr viel höhere Metallbindung der intakten Zellen auf ein Zusammenwirken der Sorptionseigenschaften der oberflächennahen Zellwandschichten hindeuten. Betrachtet man die Metallsorptionen über die Zeit so ist zu erkennen, dass die Sorptionen innerhalb der ersten Stunde erfolgten und die Metalle innerhalb der Versuchsreihen bis 48 Stunden nahezu konstant gebunden bleiben. Die geringen Fluktuationen über die Zeit zeigen, dass es sich bei den Sorptionsprozessen um dynamische Gleichgewichtsprozesse handelt. Ebenfalls konnte in vorangegangenen Untersuchungen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 gezeigt werden, dass es sich bei den Metallinteraktionen um reversible Prozesse handelt, welche die leichten Wertefluktuationen hervorrufen können^{140, 201}. Unter Verwendung der ICP-MS ist es insgesamt möglich Aussagen zu der entsprechenden Menge an sorbiertem Metall an den intakten Zellen als auch einzelnen Zellwandkomponenten treffen zu können. Eine Zuordnung an welchen funktionellen Gruppen die Metallbindung bevorzugt stattfindet kann unter Verwendung dieser Analysemerhode nicht erfolgen. Betrachtet man jedoch die potentiell zu Verfügung stehenden funktionellen Gruppen der intakten Zellen, so kann auf eine starke Metallinteraktion mit den äußeren Zellwandschichten z. B. den Carboxyl-, Amino- und Hydroxylgruppen der S-Layer-Proteinschicht, durch Carboxylgruppen des Peptidoglykan und Phosphatgruppen aus z. B. SCWPs geschlossen werden.

Die sehr hohe Bindung von Gold, Palladium und Blei durch die intakten Zellen konnte ebenfalls bei den S-Layer-Proteinen beider Stämme detektiert werden. Daher ist die Metallbindung intakten Zellen wahrscheinlich maßgeblich durch die S-Layer-Proteinschicht als abgrenzende Schicht zur Umwelt bestimmt. Dabei kann analog wie bei der Sorption von Gold und Palladium eine starke Interaktion dieser Metalle mit den Carboxyl- und Aminogruppe der S-Layer-Proteine auf der Bakterienhülle stattfinden und in einer Stabilisierung dieser resultieren. Ebenfalls konnte zusätzlich eine sehr gute Interaktion der Peptidoglykanschicht mit Blei und Europium in den Untersuchungen der Einzelkomponenten von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 detektiert werden, welche sich auch in den Untersuchungen der gesamten Bakterienzelle beobachten lässt. Somit kann ebenfalls eine geringe Interaktion der oberflächennahe Schicht des Peptidoglykans mit SCWPs vermutet werden. Eine direkte Interaktion der Cytoplasmamembran mit den verschiedenen Metallen sollte bei den Bakterien und einer intakten Zellwand eine untergeordnete Rolle spielen, da die Cytoplasmamembran anders als die isolierten und einzelnen Membranlipide nicht direkt mit der Metalllösung interagieren kann. In Abbildung 44 sind daher exemplarisch mikroskopische Aufnahmen beider Mikroorganismen nach 24 stündiger Metallinkubation dargestellt.

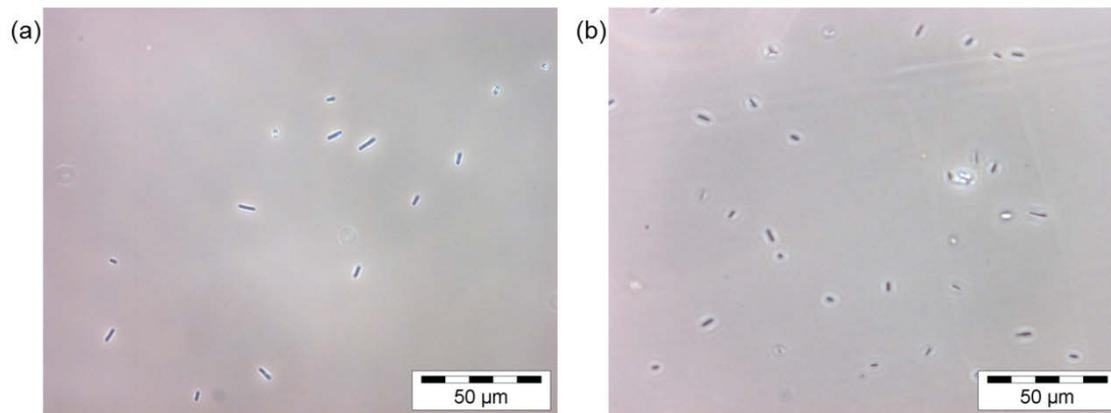


Abbildung 44: Exemplarische Darstellung der mikroskopischen 24 h Probe von (a) *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 nach Inkubation mit 1 mM Eu und (b) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 nach Inkubation mit 1 mM Cd in 400 facher Vergrößerung.

Es zeigt sich, dass sowohl die Zellen von JG-A12 und JG-B53 noch in ihrer intakten stäbchenförmigen Morphologie vorliegen und durch die Inkubation mit Metallen die Zellintegrität nicht sichtbar beeinträchtigt wurde. Daher kann von einer intakten Zellwand der Bakterienzellen ausgegangen werden, wodurch eine direkte Interaktion der Cytoplasmamembran mit der Metallsalzlösung ausgeschlossen werden kann. Ebenfalls konnten in den mikroskopischen Aufnahmen keine anderen Organismen in den Kontrollproben festgestellt werden, welche eine Werteverfälschung der Sorptionsergebnisse bezogen auf das getestete biologische System der Bakterien hervorrufen könnten.

Beide Mikroorganismen weisen wie in Abbildung 43 zu erkennen ist eine metallspezifische Bindung auf. Vergleicht man die Menge an gebundenen Metallen beider Bakterien in Abbildung 43 untereinander, so kann für *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 eine sehr viel höhere Sorptionsrate bei allen Metallen (mit Ausnahme von Uran) als bei *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 erkannt werden. Dies zeigt, dass trotz der genetischen Ähnlichkeiten beider Stämme in Bezug auf Bindungseigenschaften sich *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 als besseres Biosorbent herausgestellt hat. Im Vergleich zu JG-A12 sind die Zellen von JG-B53 z. B. in der Lage höhere Mengen von Arsen (15,4 mg/g JG-A12, 96,9 mg/g JG-B53) zu binden. Somit kann die Biomasse von JG-B53 für eine effektivere Schwermetallentfernung genutzt werden. Vergleicht man die Sorptionswerte der Edelmetalle mit ausgewählten Mikroorganismen aus der Literatur (Tabelle 19), so weist *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 ähnlich gute Goldbindungswerte (76,6 mg/g) wie Zellen von *Bacillus subtilis* (70 mg/g) oder *Chlorella vulgaris* (98,5 mg/g) auf⁵⁴. Weitere Vergleichswerte sind zusammenfassend in Tabelle 19 dargestellt. *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 übertrifft diese Bindungswerte rund mit dem Faktor 10. Ebenfalls konnten beide Stämme deutlich höhere Mengen an Palladium (303,5 mg/g JG-A12, 616,4 mg/g JG-B53) binden als dies bei *Desulfovibrio desulfuricans* (62,5 mg/g) oder Pilzbiomasse (65 mg/g) zu beobachten war^{14, 54, 243}. Ebenfalls konnten sehr gute Bindungen von Platin durch die Biomasse von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 im Vergleich zu literaturbeschriebenen Biosorbenten (Tabelle 19) festgestellt werden⁵⁴. Beide untersuchten Mikroorganismen in dieser Arbeit sind vor allem für die Bindung von Edelmetallen äußerst gut geeignet. Betrachtet man

die in den Untersuchungen eingesetzten Metallsalzkonzentrationen von 1 mM, so liegen diese deutlich über denen umweltrelevanter Konzentration ($\approx 1\text{-}10\ \mu\text{g}$ Schwermetall/l). Jedoch zeigen die Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ein enormes Rückhaltepotenzial für die untersuchten Metalle und eignen sich daher als ideales Filtermaterial zur Rückgewinnung strategisch relevanter Edel- und Schwermetalle aus höher konzentrierteren Wässern wie z. B. Industrie- oder Prozesswässern. Betrachtet man den Einsatz beider Mikroorganismen in Bezug auf Bioremediationsprozesse, so ist aufgrund der hohen Metallaffinitäten ebenfalls die Bindung niedriger konzentrierter Salzlösungen möglich. Zusammenfassend lässt sich aus den ermittelten Daten eine bevorzugte Bindungsreihenfolge der intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 von Pd > Au > Pb > Eu > Cd > Pt > As > U und für JG-B53 von Au > Pb > Pd > Eu > Pt > Cd > As > U aufstellen.

SORPTION VON URAN AN BIOMASSE VON *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS* JG-A12 UND JG-B53

Da beide Mikroorganismen der Haberlandhalde in ihrer natürlichen Umgebung höheren Konzentrationen des Schwermetalls Uran ausgesetzt waren und hohe Toleranzen gegenüber diesem Schwermetall aufweisen, sind die Sorptionsuntersuchungen des Actinides Uran im Hinblick auf umweltökologische Aspekte z. B. der Uranentfernung aus kontaminierten Wässern oder für Bioremediationsprozesse von besonderem Interesse ¹⁶. Daher werden im Folgenden die Sorptionsdaten dieser Arbeit mit bekannten Literaturdaten verglichen und die Bindungen von Uran an der Biomasse unter Einbezug der Zellwandkomponenten näher betrachtet.

Die Sorption beider Bakterienstämme von der verwendeten 1 mM Uranlösung (Abbildung 43) ist bei den Versuchen dieser Arbeit bei 4 °C mit 7,1 mg U/g JG-A12 und 8,4 mg U/g JG-A12 jedoch geringer als die der S-Layer-Proteine wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden. Betrachtet man den Anteil der Gesamtproteinmenge von 50 % an der Biotrockenmasse der Zellen, wovon die S-Layer-Proteine einen Anteil von ca. 15 % ausmachen, so können die Sorptionswerte der Zellen in Bezug auf die S-Layer-Proteine besser beschrieben werden. Somit sollten die S-Layer-Proteine beider Zellen eine der Hauptkomponenten darstellen, welche an der Uransorption der Bakterienzelle beteiligt sind. Dabei stehen für die Uranbindung ebenso wie bereits bei den S-Layer-Proteinen als Einzelkomponente diskutiert, hauptsächlich Carboxyl-, Amino- und Hydroxidgruppen der S-Layer-Proteine für die Uransorption zu Verfügung. Betrachtet man jedoch die Uranbindung der isolierten S-Layer-Proteine (bis zu 42 mg/g S-Layer-Protein) so ist zu erkennen, dass im Fall der intakten Zellen die Uranbindung unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch nicht komplett durch die S-Layer-Proteinschicht verursacht werden können. Eine Beteiligung weiterer oberflächennaher Zellwandschichten wie z. B. die von PG mit sekundären Zellwandpolymeren scheint daher sehr wahrscheinlich. Diese Komponente zeigte in den Untersuchungen der Einzelkomponenten ebenfalls sehr hohe Uransorptionen von bis zu 454,5 mg U/g PG+. Dabei sollte die Uranbindung wie bereits in Kapitel 4.5.2 beschrieben durch die Carboxylgruppen des PG, als auch durch die Phosphatgruppen der sekundären Zellwandpolymere erfolgen.

Vergleicht man die erhaltenen Sorptionswerte von Uran der Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 im Vergleich zu literaturbeschriebenen Biosorbenten wie z. B. mit lebenden Algen von *Chlorella vulgaris* (14 mg U/g) so können vergleichbare Werte erhalten werden¹¹⁸. Betrachtet man die sehr guten Sorptionswerte von *Streptomyces longwoodensis* (440 mg U/g), so kann bei diesem Stamm eine viel höhere Sorption beobachtet werden²⁴⁴. In den Untersuchungen von Raff, J. (2002)^{16, 140} konnten für den Stamm *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 jedoch deutlich höhere gebundene Uranmengen (64,2 mg/g) detektiert werden. Dies kann durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen hervorgerufen werden. Dabei war die verwendete Biomasse von JG-A12 in der Lage mehr Uran infolge der besseren Bioverfügbarkeit des Uranylions (umweltrelevanter Metallkonzentration) in dem Sickerwasser und der gesteigerten metabolischen Aktivität bei $T=28\text{ °C}$ zu binden. Eine Beeinflussung der Sorptionsrate durch den pH-Wert kann ausgeschlossen werden, da diese in einem vergleichbaren Bereich (4-4,5) lagen. Aus diesem Grund erfolgten weitere Sorptionsuntersuchungen beider Mikroorganismen mit Uran bei einer veränderten Temperatur von 30 °C , um den Einfluss der Sorption durch die Temperatur aufzuklären. Dazu sind die Sorptionsdaten dieser Untersuchungen zusammen mit den Werten der Inkubation bei 4 °C in Abbildung 45 zusammenfassend dargestellt.

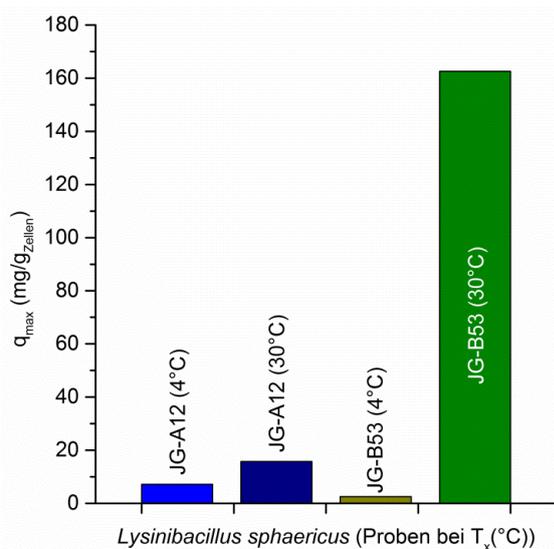


Abbildung 45: Darstellungen der maximalen Metallsorptionsraten (q_{\max}) von Uran nach der Inkubation mit intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 bei verschiedenen Temperaturen.

Exemplarisch zeigt Abbildung 45 die Unterschiede der Bindung von Uran an beiden Mikroorganismen bei geänderten Versuchsbedingungen ($T=30\text{ °C}$). In der Abbildung ist sehr gut erkennbar, dass die Temperaturerhöhung zu einer gesteigerten Uransorption durch beide Mikroorganismen führt. Dabei konnten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 mit 15,8 mg U/g nahezu die doppelte Menge an Uran sorbieren als dies in den Versuchen bei 4 °C zu beobachten war. *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 hingegen konnte unter den gewählten Bedingungen mit 162,6 mg U/g die zwanzigfache Menge an Uran sorbieren als dies bei den Untersuchungen bei 4 °C möglich war. Dabei kann bei Uran analog der Untersuchungen der anderen Metalle bei 4 °C eine stärkere Interaktion mit *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 beobachtet werden, was dieses Bakterium in den Fokus weiterer Untersuchungen

rückt. Die Versuche zeigen eine höhere Uransorption durch die Erhöhung der Temperatur auf die ideale Wachstumstemperatur beider Organismen (Vergleich zu den Kultivierungen der Mikroorganismen, Kapitel 4.1). Eine verringerte metabolische Aktivität der Zellen bei 4 °C, welche die geringere Sorption erklären könnten, kann in Anbetracht der sehr guten Sorptionsergebnisse der Zellen mit den anderen Metallen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Daher wird angenommen, dass bei einer Temperatur von 30 °C Uran eine bessere Bioverfügbarkeit aufweist. Da nach dem derzeitigen Kenntnisstand keine plausible Erklärung für diese Sorption gefunden wurden, sollte in weiteren Arbeiten der Wechselwirkungsmechanismus der Bioakkumulation näher untersucht werden, bei dem Uran infolge der gesteigerten metabolischen Aktivität eventuell in die Zelle aufgenommen werden könnte. Ebenfalls bleibt die Diskrepanz der Sorptionsdaten von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 mit den vorangegangenen Arbeiten von Raff, J. (2002) zu prüfen. Trotz der Anpassung der Temperatur auf 30°C konnten geringere Sorptionswerte erzielt werden als durch Raff, J. (2002) beschrieben wurden. Daher kann nach bisherigem Kenntnisstand davon ausgegangen werden, dass ebenfalls die unterschiedlichen Urankonzentrationen einen erheblichen Einfluss auf die Sorptionsfähigkeit der Zellen haben oder die untersuchten Bakterien beider Arbeiten in unterschiedlichen Wachstumsstadien vorlagen. Die verwendete Urankonzentration von 1 mM zeigt jedoch, dass beide Mikroorganismen in der Lage sind unter solchen harschen Umgebungsbedingungen signifikante Mengen Uran zu binden. Daher können beide Biomassen in technischen Materialien und Prozessen z. B. als metallselektives Filtermaterial zum Einsatz kommen.

4.6 QCM-D und AFM Untersuchungen zur Metallbindung an rekristallisierten S-Layer-Proteinen

Im Folgenden Abschnitt erfolgt die Darstellung der Interaktionen rekristallisierter S-Layer-Proteine von SlfB und Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 mit Metallen. Dazu wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, die Proteine auf den Sensoroberflächen in den Durchflussmodulen abgetrennt und anschließend intensiv mit physiologischer NaCl-Lösung (pH=6,0) gespült. Anschließend wurden die Werte der Frequenzänderung als auch die der Dissipationsänderung auf die Nullwerte gesetzt. Die Untersuchungen der QCM-D zur Metallinteraktion soll nicht nur ein tieferes Verständnis für die Metallwechselwirkung mit diesen Biomolekülen, sondern auch mit den rekristallisierten S-Layer Schichten ermöglichen. Zusätzlich können durch die Untersuchung der Schichten Referenzdaten für den Vergleich der Metallinteraktion mit ganzen Zellen gewonnen werden. Daher wurden zum ersten Mal die Metalle As, Au, Cd, Eu, Pb, Pd, Pt und U bezüglich ihrer Bindungsfähigkeiten, Sorptionskinetik und der Einfluss der Metalle auf die Proteinschichten und ihre Stabilität im nanoskaligen Bereich untersucht.

4.6.1 QCM-D Versuche zu Metallbindungen an SlfB und Slp1

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT PALLADIUM

Exemplarisch für die Metallsorptionsversuche erfolgt die Darstellung der QCM-D Diagramme am Beispiel von Slp1 für die Interaktion mit 1 mM Pd²⁺ und 5 mM Pd²⁺ (Abbildung 46 und Abbildung 47) auf Grund der in Kapitel 4.5.3 gezeigten sehr hohen Sorptionswerte der S-Layer-Proteine in Lösung. Die QCM-D Diagramme der Metallinteraktionen der weiteren Metalle mit den rekristallisierten Schichten von SlfB und Slp1, welche im Folgenden diskutiert werden, sind im Anhang (Abbildung A 2 - Abbildung A 6) dargestellt.

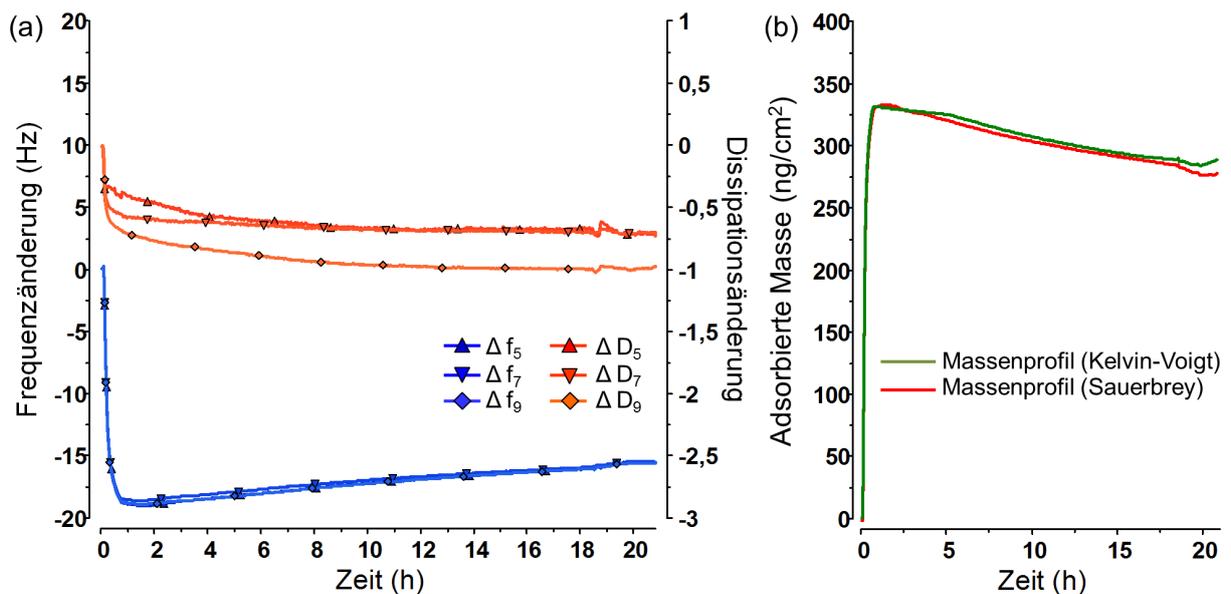


Abbildung 46: QCM-D Diagramme der Interaktion von 1 mM Pd²⁺ mit Slp1 Schicht (pH=6,0); (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massenprofil der adsorbierten Massen auf der Slp1 Schicht innerhalb der Versuchszeit von 21 h.

In Abbildung 46 a ist zu erkennen, dass nach der Zugabe der 1 mM Pd²⁺-Lösung zu der rekristallisierten Proteinschicht von Slp1 sowohl in den Frequenzwerten (Δf_5 , Δf_7 , Δf_9) als auch in den Dissipationswerten (ΔD_5 , ΔD_7 , ΔD_9) signifikante Änderungen stattfinden. Innerhalb der ersten Stunde nach der Metallzugabe erfolgt eine Frequenzverringering um 19 Hz, welche auf eine Massenanlagerung von Palladium an der Struktur des Proteingitters hinweist. Bis zum Spülen bei t=18 Stunden ist jedoch erkennbar, dass die Frequenzwerte bis ca. 16 Hz ansteigen. Die Dissipationswerte in Abbildung 46 a zeigen ebenfalls abfallende Werte innerhalb der ersten Stunde. Diese Abnahme der Dissipation deutet auf eine starrer werdende Proteinschicht infolge der Metallabscheidung hin. Aus den Versuchen kann daher abgeleitet werden, dass Palladium die weiche Proteinschicht stabilisiert. Die stabilisierte monolagige Schicht von Slp1 kann das Schwingungsverhalten des Sensorkristalles daher weniger dämpfen und resultiert in den geringeren Dissipationswerten. Nach ca. 2 Stunden ist zu erkennen, dass sowohl die Frequenzänderungen als auch die Dissipationswerte nahezu konstante Kurvenverläufe zeigen. Ein Ablösen geringer Mengen an Palladium ist in diesem Fall möglich, jedoch deutet der Frequenzanstieg eher auf ein Quellverhalten der Polyelektrolyte auf der Sensoroberfläche hin. Ein derartiges Verhalten wurde in vorangegangenen längeren Experimenten bereits beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls kann diese minimale Erhöhung auf das in den Batch-Versuchen beobachtete dynamische Sorptionsverhalten der Metalle zurückzuführen sein. Unter Verwendung des Kelvin-Voigt Modells konnte nach dem Spülen mit der NaCl-Lösung eine Palladiumabscheidung von $\approx 270 \text{ ng/cm}^2$ auf der geschlossenen Proteinschicht berechnet werden. Betrachtet man die beiden Modellierungsansätze in den Massenprofilen Abbildung 46 b, so ist zu erkennen, dass beide Modelle einen nahezu identischen Verlauf zeigen. Daher kann aufgrund der geringen Masseabscheidung aus der wässrigen Metallsalzlösung ebenfalls das Sauerbrey Modell für die Dateninterpretation dieser starren Metallabscheidung auf der dünnen Proteinschicht genutzt werden. In Referenzmessungen konnte eine Sorption der Metalle an den sehr dünnen Polyelektrolytschichten (<5 nm) unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen werden. Ebenfalls kann eine direkte Bindung der Metalle an dem Polyelektrolytuntergrund durch die vollständige Bedeckung der PE mit einer geschlossenen S-Layer-Proteinschicht ausgeschlossen werden. Daher kann in den Versuchen die Metallsorption direkt auf die Proteine zurückgeführt werden. Nach der Palladiumbindung an Slp1 erfolgte das Spülen mit metallfreier NaCl-Lösung um die Stabilität der Metallbindung nachzuweisen. Nach Zugabe der metallfreien NaCl-Lösung ab ca. 18 Stunden ist zu erkennen, dass bis zum Versuchsende keine signifikanten Mengen Palladium von der Slp1 Schicht abgelöst werden. Dies zeigt die sehr stabile Bindung von Palladium an dem Slp1 Proteingitter. Aus den Versuchen im Batch-Verfahren konnte bereits eine sehr gute Palladiumbindung an den Slp1 Polymeren nachgewiesen werden. Mit den QCM-D Untersuchung ist es daher gelungen, dies für die rekristallisierte Proteinschicht ebenfalls erstmals nachzuweisen und die Tendenz der hohen Palladiumaffinität auf molekularer Ebene mit den rekristallisierten Proteinschichten nachzuweisen. Auf Grund der geringeren funktionellen Gruppen, welche nach der Rekristallisation auf dem Sensor aktiv für eine Metallbindung zur Verfügung stehen, ist ein direkter Vergleich zu den Sorptionswerten der S-Layer-Polymere aus den Batch-Versuchen nicht durchführbar.

In weiteren Versuchen erfolgte die Untersuchung der Metallinteraktionen der geschlossenen Proteinschichten mit höher konzentrierten Metallsalzlösungen. Betrachtet man die Frequenz- und Dissipationsverläufe in Abbildung 47 a nach der Zugabe einer 5 mM Palladiumlösung, so ist eine nahezu identische zeitliche Abscheidung zu erkennen. Analog der Versuche mit 1 mM Pd²⁺-Lösung ist die Metallinteraktion nach ca. 1 Stunde nahezu vollständig abgeschlossen. Jedoch kann eine deutlich höhere Frequenzänderung von ≈ 180 Hz und eine Dissipationserhöhung von ≈ 15 festgestellt werden, was auf eine deutlich höhere Massenabscheidung hinweist. Die höheren Dissipationswerte deuten hierbei auf eine wesentlich elastischere Schicht nach der Metallinteraktion hin. Ebenfalls ist es möglich, dass auf Grund der höheren Metallkonzentration zu einer stärkeren Hydrathüllenausbildung als bei der niedrig konzentrierteren Palladiumlösung kommt.

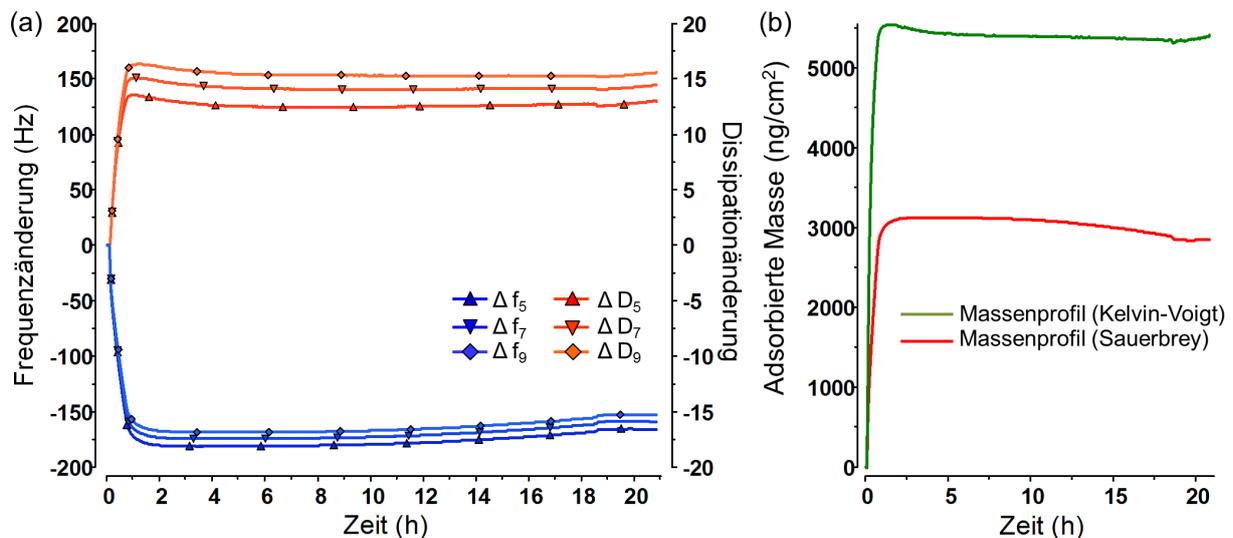


Abbildung 47: QCM-D Diagramme der Interaktion von 5 mM Pd²⁺ mit Slp1 Schicht (pH=6,0); (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massenprofil der adsorbierten Massen auf der Slp1 Schicht innerhalb der Versuchszeit von 21 h.

In Abbildung 47 b ist das Profil der adsorbierten Massen dargestellt. Nach dem Spülen mit metallfreier NaCl-Lösung nach ca. 18 Stunden konnte eine Massenänderung von ≈ 5410 ng/cm² (Kelvin-Voigt Modell) und 2850 ng/cm² (Sauerbrey Modell) berechnet werden. In den weiteren Versuchen konnte durch die Konzentrationserhöhung der Metalle von 1 mM auf 5 mM ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Dies zeigt, dass sich bei höheren Schichtdicken und Massenlagerungen bei denen Wasseranlagerungen oder Hydrathüllen stärker beteiligt sind, die Sauerbrey-Gleichung in einer Unterbestimmung der ermittelten Werte resultiert und nicht mehr direkt für die Auswertung der Daten Berücksichtigung finden kann. Betrachtet man jedoch die sehr guten Werte der Palladiumbindung der QCM-D-Messungen, sowohl bei den Versuchen mit 1 mM Pd²⁺ als auch bei den Versuchen mit 5 mM Pd²⁺-Lösungen, so können bereits zuvor veröffentlichte Daten zur Bindung von Palladium an S-Layer-Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 mit für die Betrachtungen von Slp1 herangezogen werden. In den Arbeiten von Fahmy, K. et al. (2006) wurde der strukturstabilisierende Einfluss des Schwermetalls Pd²⁺ auf die S-Layer-Proteine von JG-A12 nachgewiesen²⁶³. Dabei konnte durch die dominierende bidentate Koordination von Pd²⁺ durch die Carboxylgruppen und durch die Bindungsbeteiligung von stickstoffhaltigen Aminosäuren aus den Seitenketten ein stabilisierender

Effekt auf die S-Layer-Proteine beobachtet werden. Betrachtet man in Abbildung 46 und Abbildung 47 die sehr stabile und hohe Palladiumabscheidung auf den rekristallisierten Slp1 Strukturen nach dem Spülen mit metallfreien NaCl-Lösungen, so kann auch hier ein ähnlich stabilisierender Effekt von Pd²⁺ vermutet werden.

Ähnlich den in Abbildung 46 und Abbildung 47 dargestellten QCM-D Diagrammen konnte ein sorptives Verhalten von SlfB gegenüber Pd detektiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse der Palladiumbindung an rekristallisierten SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 in dieser Arbeit (Werte in Tabelle 20 und Abbildung A 3 im Anhang), so kann eine geringe Palladiumbindung beobachtet werden. Die sorbierte Pd²⁺ Masse (berechnet nach dem Kelvin-Voigt Modell) an SlfB fällt mit $\approx 118 \text{ ng/cm}^2$ (1 mM Versuch) und $\approx 1145 \text{ ng/cm}^2$ (5 mM Versuch) deutlich geringer aus als bei Slp1, zeigt jedoch die gute Übereinstimmung zu den zuvor erhalten Sorptionswerten aus den Batch-Versuchen und weist erneut auf eine bevorzugte Bindung der S-Layer-Proteine zu Pd auf. Jedoch sind auch bei den Interaktionen von Pd²⁺ mit den nanoskaligen Schichten von SlfB sehr stabile Abscheidungen von Palladium zu erkennen, welche die Ergebnisse von Fahmy, K. et al. (2006) stützen²⁶³. Ebenfalls konnte mittels der QCM-D Untersuchungen der stabilisierend wirkende Effekt von Pd²⁺ auf die Proteinschichten dargestellt werden. Eine Ausbildung polynuklearer Palladiumspezies (Pd²⁺/Pd⁰) kann ähnlich wie auch bei der nachfolgend diskutierten Sorption von Au³⁺ durch die intrinsischen Reduktionseigenschaften der Proteine nicht ausgeschlossen werden. Durch diese Eigenschaft ist die Entwicklung von Protein-Palladium-Templates für verschiedene biotechnologische Anwendung denkbar. Mittels der QCM-D Untersuchungen dieser Arbeit konnten der stabilisierende Effekt sowohl für SlfB als auch für Slp1 erstmals bei rekristallisierten Proteinschichten betrachtet werden.

Die maximalen Massenabscheidungen (Δm_{max}) und die abgeschiedenen Massen der jeweiligen Metalle auf dem Sensor ($\Delta m_{\text{auf Sensor}}$) bzw. der Proteinschicht von SlfB und Slp1 aus den entsprechenden Versuchen sind in Tabelle 20 zusammenfassend dargestellt. Die in Tabelle 20 dargestellten Werte wurden sowohl nach dem Sauerbrey Modell als auch nach dem Kelvin-Voigt Modell berechnet.

Tabelle 20: Darstellung der maximalen Massenabscheidungen (Δm_{\max}) und er der absoluten Masse ($\Delta m_{\text{auf Sensor}}$) auf Schichten von SIFB und SIp1 nach der Metallinteraktion berechnet nach dem Sauerbrey und Kelvin Voigt Modell.

Bio-sorbent	Metall	C_{Metall} (mM)	pH-Wert	Adsorbierte Masse Δm_{\max} (ng/cm ²) (Kelvin-Voigt)	Absolute Masse $\Delta m_{\text{auf Sensor}}$ (ng) (Kelvin-Voigt)	Adsorbierte Masse Δm_{\max} (ng/cm ²) (Sauerbrey)	Absolute Masse $\Delta m_{\text{auf Sensor}}$ (ng) (Sauerbrey)			
SIFB	As ⁵⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>						
		5	6,0							
	Au ³⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>						
		5	6,0					337,1 ± 0,2	518,9 ± 0,3	331,3 ± 0,2
	Cd ²⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>						
		5	6,0					<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIFB</i>		
	Eu ³⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>						
		5	6,0					---	---	---
	Pb ²⁺	1	5,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>						
		5	4,5					70,8 ± 0,01	108,9	70,9 ± 0,02
	Pd ²⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIFB</i>						
		5	6,0					117,7 ± 0,1	181,2 ± 0,2	118,0 ± 0,1
Pt ²⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIFB</i>							
	5	6,0					96,3 ± 0,4	148,2 ± 0,6	87,5 ± 0,1	135,0 ± 0,2
U ⁶⁺	1	5,0	<i>pH=5,0 → Hydroxidausfall</i>							
	5	5,0					207,8 ± 0,4	320,0 ± 0,6	211,4 ± 0,5	325,4 ± 0,8
	1	3,5					<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar</i>			
5	3,5									
SIp1	As ⁵⁺	1	6,0	<i>Ablösung von SIp1 bei Metallinteraktion</i>						
		5	6,0							
	Au ³⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIp1</i>						
		5	6,0					955,0 ± 2,7	1470,1 ± 4,2	932,6 ± 2,9
	Cd ²⁺	1	6,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIp1</i>						
		5	6,0					4534,4 ± 5,5	6983,2 ± 8,5	4687,9 ± 6,3
	Eu ³⁺	1	6,0	<i>keine Metallinteraktion detektierbar, Proteinschicht intakt</i>						
		5	6,0					---	---	---
	Pb ²⁺	1	5,0	<i>Keine stabile Metallabscheidung erkennbar, desorptiver Effekt auf SIp1</i>						
		5	4,5					<i>Ablösung von SIp1 bei Metallinteraktion</i>		
	Pd ²⁺	1	6,0	<i>Schichtablösung von SIp1 nach Zugabe der Metallsalzlösung</i>						
		5	6,0					269,8 ± 0,6	415,3 ± 0,9	269,9 ± 0,6
Pt ²⁺	1	6,0	<i>Schichtablösung von SIp1 nach Zugabe der Metallsalzlösung</i>							
	5	6,0					5409,2 ± 7,7	8326,8 ± 11,9	2840,6 ± 1,2	4372,8 ± 1,8
U ⁶⁺	1	5,0	<i>pH=5,0 → Hydroxidausfall</i>							
	5	5,0					457,3 ± 0,4	704,0 ± 0,6	453,4 ± 0,4	698,0 ± 0,6
	1	3,5					<i>SIp1 Schichtablösung bereits bei spülen mit 0,9 % NaCl (pH=3,5)</i>			
5	3,5									

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT ARSEN

Bei den QCM-D Arsenorptionsversuchen wurde das besser lösliche As^{5+} genutzt, welches vergleichbare Sorptionswerte in Batch-Versuchen ($\leq 900 \mu\text{g/g}$ Protein) gezeigt hat wie das zuvor untersuchte As^{3+} ²⁴⁸. In den QCM-D Messungen konnten mit SlfB nur sehr geringe Frequenzänderungen (1 Hz) beobachtet werden, die eine minimalste Massenlagerung aufzeigen. Nach dem Spülen konnte diese wieder auf den Ausgangswert zurückgebracht werden, was auf keine Interaktion oder Metallbindung von As mit den rekristallisierten Proteinschichten und deren funktionellen Gruppen hindeutet. Bei den Schichten von Slp1 führte die Zugabe der As-Lösungen direkt zu einem langsamen Ablösen der Slp1 Schicht, was aus den erhaltenen ansteigenden Frequenzwerten und der daraus abzuleitenden Massendesorption (Abbildung A 5) ersichtlich wird. Diese Untersuchungen zeigen korrelierend zu den Batch-Sorptionsversuchen mit As eine sehr geringe Metallbindungsfähigkeit der beiden untersuchten S-Layer Proteine zu diesem Element, sowohl in Lösung als auch als rekristallisierte Schicht. Aufgrund des destabilisierenden Einflusses der Arsenlösungen auf die rekristallisierten Proteingitter wurden diese von der Sensoroberfläche abgelöst. Daher kann eine stabile Arsenbindung an den S-Layer-Strukturen als rekristallisierte Schicht ausgeschlossen werden. In polymerer Form ist, wie bereits in den Batch-Versuchen dargestellt eine geringe Arsenbindung an den Proteinen möglich. Ein genauer Mechanismus der Arsenbindung an den S-Layer-Proteinen ist bisher nicht bekannt. Es kann nach derzeitigem Wissensstand eine Arsenbindung an den abgelösten und vermutlich denaturierten Proteinen nicht ausgeschlossen werden. Diese Vermutung wird durch die geringen Sorptionswerte aus den Batch-Versuchen gestützt werden, welche eine schwache Arseninteraktion mit den Proteinen SlfB und Slp1 aufzeigen.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT GOLD

Die Versuche mit Au zeigten bei SlfB nur in den Versuchen mit 5 mM Goldlösung eine Bindung an der Proteinschicht. Bei der niedriger konzentrierten 1 mM Lösung kam es nach kurzer Interaktion mit dem Protein direkt zu einer Desorption von Au, ohne jedoch die Proteinschicht negativ zu beeinflussen oder abzulösen. Dies konnte aus den Frequenzänderungen abgeleitet werden, welche auf den Ausgangswert der proteinbeschichteten Sensoren zurückgekehrt sind. Die resultierende Masse des Abscheidungsversuches mit der höher konzentrierten Lösung ist in Tabelle 20 dargestellt. Bei den Versuchen mit Slp1 konnte im Vergleich zu SlfB eine deutlich stärkere Interaktion sowohl bei den niedriger als auch der höher konzentrierten Au-Lösung resultierend in höheren Δf erkannt werden, welche über die Sauerbrey-Gleichung eine Massenzunahme aufzeigen. Nach dem Spülen der Slp1 Schichten konnte die adsorbierte Masse von der Proteinschicht nicht abgelöst werden. Dies zeigt die sehr stabile Bindung von Au an der Slp1-Schicht. Dabei konnten aus der 1 mM Au-Lösung $\approx 1470 \text{ ng/cm}^2$ gebunden werden, dies entspricht nahezu der gleichen adsorbierten Masse an Slp1. Bei den Versuchen mit 5 mM Au-Lösung erfolgte die Bindung von $\approx 6983 \text{ ng/cm}^2$ auf der Slp1 Schicht und entspricht somit mehr als der fünffachen abgeschiedenen Masse von Slp1 auf der modifizierten Sensoroberfläche. Ähnlich der stabilisierenden Wirkung von Pd^{2+} auf SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, welche in den Arbeiten von Fahmy, K. et al. (2006) und erstmals mit der QCM-D

an geschlossenen Proteinschichten in dieser Arbeit gezeigt wurden, konnte bereits ein stabilisierender Effekt von Au^{3+} auf die S-Layer-Proteinstrukturen von JG-A12 durch Jankowski, U. et al. (2010) festgestellt werden^{263, 268}. Dabei konnte durch die starke Interaktion und Komplexierung von Au^{3+} mit den Carboxylgruppen der Proteine trotz des Fehlens schwefelhaltiger Aminosäuren wie Cystein nachgewiesen werden. Die von Jankowski, U. et al. (2010) beschriebene Goldinteraktion mit SlfB zeigt eine hohe Stabilität gegenüber saurer Denaturierung der Proteine und eine Strukturstabilisierung durch die Metallbindung auf²⁶⁸. Dieser Effekt des stabilisierend wirkenden Einflusses der Au^{3+} -Bindung kann erstmals in dieser Arbeit durch die QCM-D Versuche, sowohl bei den rekristallisierten Proteinschichten von Slp1 als auch bei denen von SlfB beobachtet werden. Ebenfalls stärken diese Untersuchungen die Aussagen, welche für die S-Layer-Proteine in Lösung getroffen wurden. Durch die ebenfalls sehr guten Sorptionsraten aus den Batch-Versuchen von Au an Slp1, ist analog der Versuche von Jankowski, U. et al. (2010) ein ähnliches Verhalten von Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 zu erwarten wie es SlfB gezeigt hat²⁶⁸. Dies muss jedoch in weiteren Untersuchungen näher betrachtet werden. In den QCM-D Messungen konnte zusammenfassend eine sehr hohe Bindung von Au an beiden S-Layer-Proteinen *online* detektiert werden und die Stabilität der resultierenden S-Layer-Au-Schicht erfolgreich aufgezeigt werden. Die unterschiedlichen Adsorptionsmengen, welche bei den Versuchen mit den verwendeten Metallkonzentrationen detektiert wurden (Tabelle 20) sind noch nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Grund kann die Ausbildung polynuklearer Spezies sein. Dabei kann sowohl Au^{3+} als auch Au^0 vorliegen. Die Bildung von nanopartikulärem Au^0 auf der Proteinoberfläche kann dabei durch die bereits beobachtete intrinsische Reduktionseigenschaft der S-Layer-Proteine erklärt werden, wie sie bereits bei SlfB von JG-A12 in Lösung gezeigt und diskutiert wurde^{267, 268, 273}. Als Folge ist bei der Metallsalzkonzentration von 5 mM die verstärkte Bildung kleinster Nanopartikel denkbar. Die hohen Goldabscheidungsraten und Schichtstabilitäten der Proteine zeigen u. a. das hohe Potenzial von Slp1 zur Interaktion mit Au auf. In Übereinstimmung mit den Batch-Versuchen konnte Slp1 auch in den QCM-D Versuchen eine bessere Sorption von Au zeigen als SlfB, weshalb Slp1 für weitere Versuche zur Entwicklung bionanotechnologischer Anwendungen in den Fokus rückt.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT CADMIUM

Die Versuche mit Cd zeigten teilweise nur geringe Frequenzänderungen auf den SlfB und Slp1 Schichten. Vor allem bei Slp1 führte die Zugabe der Cd-Lösung gleich zu Beginn zu einem Ablösen der Proteinschichten. Durch diese Untersuchungen konnte infolge der Metallinteraktion ein destabilisierender Einfluss von Cd auf die Proteinstruktur abgeleitet werden, welche die geringen Sorptionswerte bei den Batch-Versuchen erklären könnten. Ähnlich der desorptiven Eigenschaften, welche bereits bei Arsen auf die Proteinschichten festgestellt wurden, kann auch nach der Destabilisierung bzw. der Ablösung der Proteinschicht von der Sensoroberfläche, eine geringe Sorption von Cadmium an den Proteinen nicht ausgeschlossen werden. Diese These wird durch die maximalen Metallsorptionsraten von 5,3 mg Cd/g SlfB und 12,4 mg Cd/g Slp1 unterstützt, welche bei den Batch-Versuchen bestimmt wurden. Somit sind die untersuchten Komponenten aufgrund der

geringen Schichtstabilität gegenüber cadmiumhaltigen Wässern weniger für die Entwicklung von Filtermaterialien geeignet. Eine Quervernetzung der Proteinschichten könnte jedoch zu einer Erhöhung der Schichtstabilität führen, wodurch eine selektive Bindung von geringen Mengen Cd möglich ist. Die geringen Metallsorptionsraten zeigen jedoch, dass die untersuchten S-Layer-Proteine Cd nicht selektiv binden und somit forciert andere Metalle gebunden werden können. In weiteren Versuchen sollte der Einfluss quervernetzter Proteinschichten mittels der QCM-D sowie die Interaktion von Cd untersucht werden.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT EUROPIUM

Die Experimente mit Eu zeigten bei beiden Proteinschichten nur geringe Frequenzänderungen, welche nach dem Spülen mit Eu-freier Lösung auf den Ausgangswert zurückkehrten. Jedoch konnte in den Versuchen gerade bei SIp1 eine höhere Interaktion mit Eu und leichtes Signaldriften während der Messung beobachtet werden. Diese sehr geringe Interaktion kann jedoch in der Tatsache begründet sein, dass ein Ionenaustausch mit dem Ionenradius analogen zweiwertigen Ion Ca^{2+} , welches für den Rekristallisationsprozess der Proteinstruktur notwendig ist, stattgefunden hat. Eine solche Substitution von Calcium gegen dreiwertige Lanthanide wie z. B. Eu in calciumbindenden und calciumabhängigen Proteinen wie z. B. Calmodulin konnte bereits in vorangegangenen und aktuellen Studien beschrieben werden (unveröffentlichte Daten)^{274, 275}. Diese Eigenschaft wird in der Literatur genutzt um sukzessiv ein Calciumion aus den Proteinen gegen ein dreiwertiges Lanthanid zu substituieren, um beispielweise spektroskopische Sonden zu entwickeln. Im Fall der Untersuchungen der Europiuminteraktion mit den S-Layer-Proteinen in dieser Arbeit kann der langsame Austauschprozess von Calcium und Europium gleichzeitig zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus der Proteinstruktur führen. Die simultane Eu^{3+} -Aufnahme und Ca^{2+} -Freisetzung kann mit der QCM-D Technik nicht mehr detektiert werden. Daher ist eine genaue Aussage auf Basis der bisherigen Datenlage, sowohl der Batch-Sorptionsversuche, als auch der QCM-D Versuche zur Europiuminteraktion noch nicht möglich und wird in weiteren Arbeiten näher betrachtet.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT BLEI

Die Metallabscheidung von Pb auf den Proteinschichten konnte nur bei der höheren untersuchten Konzentration von 5 mM Pb^{2+} mit SIfB nachgewiesen werden. Dabei konnten jedoch nur sehr geringe Interaktionen mit der Proteinschicht festgestellt werden, welche durch eine sehr geringe Frequenzänderung von ca. 5 Hz aufgezeigt wurden. Ebenfalls erfolgten die QCM-D Versuche anders als bei den anderen Metallen bei einem niedrigeren pH-Wert von 4,5 und 5,0, um eine Ausfällung von $\text{Pb}(\text{OH})_2$ zu vermeiden, welche bei höheren Werten und den gewählten Konzentrationen der QCM-D Versuche auftrat. Die monolagige Schicht von SIp1 wurde direkt nach der Zugabe der Pb-Lösung von der Oberfläche des Sensor kristalls gelöst. Somit konnte die sehr gute Sorption von Pb mit den S-Layer-Proteinen von SIfB und SIp1 aus den Batchversuchen, an rekristallisierten S-Layer-Proteinschichten nicht dargestellt werden. Eine Sorption von Pb^{2+} an den von der Oberfläche abgelösten Proteinen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In vorangegangenen

Untersuchungen konnte in infrarotspektroskopischen Untersuchungen eine Denaturierung von Phosvitin während der Inkubation mit bleihaltigen Lösungen, welche vergleichbar mit der Denaturierung unter Hitzeeinwirkung ist, beobachtet werden²⁷⁶. Dieser Effekt der Denaturierung durch das Schwermetall Blei kann ebenfalls für die Ablösung von geschlossenen S-Layer-Proteinschichten verantwortlich sein, wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde. Daher kann auch bei weiteren Metallen wie z. B. Cd^{2+} , Pt^{2+} und As^{5+} die Annahme getroffen werden, dass die Ablösung der S-Layer-Proteinschicht durch eine schwermetallinduzierte Proteindenaturierung hervorgerufen werden kann. In den durchgeführten Batch-Sorptionsversuche kann ein solcher denaturierender Effekt auf die polymere Proteinstruktur ebenfalls möglich sein, jedoch lag der Fokus in diesen Versuchen auf der Fähigkeit der Metallbindung durch die S-Layer-Proteine und wurde nicht näher untersucht. In den Versuchen konnte dennoch im Fall der bleihaltigen Lösung signifikante Mengen Pb^{2+} durch SIp1 sorbiert werden. Dabei kann Pb^{2+} im Fall einer Proteindenaturierung unspezifisch an die funktionellen Gruppen der Proteine oder Proteinfragmente binden. Für folgende Arbeiten sollte daher eine Quervernetzung der rekristallisierten Proteinstruktur mittels der QCM-D untersucht werden, um die Schichtstabilität der Proteine zu erhöhen. In weiteren Messungen kann im Anschluss der Einfluss verschiedener Schwermetalle auf die Schichtstabilität der quervernetzten Proteine und deren Metallbindungsfähigkeit untersucht werden. Durch die Quervernetzung stehen jedoch, je nach Art der genutzten Vernetzungsagenzien weniger funktionelle Gruppen für eine Metallinteraktion zur Verfügung, wodurch eine geringere Metallbindung erwartet werden kann.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT PLATIN

Versuche zur Metallbindung von Pt zeigten nur bei SIfB eine geringfügige Frequenzänderung von ≈ 5 Hz (≈ 96 ng/cm² Pt-Abscheidung). Sowohl bei der niedrigeren untersuchten Konzentration von 1 mM Pt an SIfB-Schichten, als auch bei den SIp1 Proteinschichten wurden trotz des gewählten pH-Werte von 6,0 bei welchem die Proteinstruktur auch über längere Zeit intakt bleiben vollständig abgelöst¹³². Dies zeigt, dass Platin ähnlich der untersuchten Schwermetalle Arsen, Blei und Cadmium einen destabilisierenden Effekt auf die rekristallisierte Struktur der S-Layer-Proteine hat. Dieser Prozess kann ähnlich der beobachteten bleiinduzierten Denaturierung der Proteine erfolgen. Dieser destabilisierend wirkende Effekt von Pt könnte einen Indiz für die geringe Metallbindungsrate in den vorangegangenen Batch-Sorptionsversuchen darstellen. Dabei kann auch in diesen Versuchen eine durch Platin hervorgerufene Denaturierung der Proteine nicht ausgeschlossen werden, an denen dennoch eine Platinsorption stattfinden kann. Daher kann auch hier in weiteren Arbeiten die Untersuchung des Einflusses von Platin auf quervernetzte Proteinschichten zu einem besseren Verständnis der Proteinestabilität führen um stabilere Schichten zu erzeugen, welche als potentielle Metallbindungstemplates fungieren können.

QCM-D UNTERSUCHUNGEN VON PROTEINSCHICHTEN MIT URAN

Als weiteres Metall wurde die Interaktion von Uran mit den Proteinschichten untersucht. Ähnlich der Versuche von Pb^{2+} erfolgte die Absenkung der pH-Werte der U-Lösungen auf 3,5 und 5,0 um die Ausfällung von Hydroxiden zu vermeiden. Beide S-Layer-Proteinschichten zeigten bei U (1 mM, pH=5,0) geringe Frequenzänderungen infolge einer Massenabscheidung von U auf der geschlossenen Proteinoberfläche. Dabei konnten über das Kelvin-Voigt Modell eine abgeschiedene Uranmasse von $\approx 208 \text{ ng/cm}^2$ auf der S1fB Schicht berechnet werden. Die Abscheidung von Uran auf der S1p1 Schicht von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 fällt mit $\approx 458 \text{ ng/cm}^2$ mehr als doppelt so hoch aus wie die Masse auf der S1fB Schicht von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Somit kann bei beiden Proteinschichten eine starke Uraninteraktion der S-Layer-Proteinschichten auf molekularer Ebene mittels der QCM-D Messungen festgestellt werden. Dies bestätigt die Sorptionsdaten aus den Batch-Versuchen, welche ebenfalls eine Uraninteraktion der polymeren Strukturen von S1fB und S1p1 nachgewiesen haben. Auffällig ist jedoch, dass S1p1 Schichten die Fähigkeit hat mehr als die doppelte Menge an Uran zu binden als S1fB. Dieses Phänomen konnte in den Batch-Versuchen nicht erkannt werden. In den Batch-Versuchen wurden nahezu gleiche Metallsorptionsraten von rund 42 mg U/g S-Layer-Protein festgestellt. Somit kann die Annahme getroffen werden, dass beispielsweise nach der Rekristallisation von S1p1 mehr funktionelle Gruppen an der Proteinoberseite für eine Interaktion mit Uran zur Verfügung stehen. Dadurch eignet sich diese Schicht unter den gewählten Versuchsparametern besser für die Entwicklung metallselektiver Filtermaterialien z. B. für die Uranentfernung aus belasteten Wässern. Im Fall der höher konzentrierten Uranlösungen bei pH=5 konnten keine Untersuchungen durchgeführt werden, da es hierbei zu einer Ausfällung von Uranhydroxiden vor der Zugabe in die Messmodule gekommen ist. Im Fall von S1p1 und der Sorption von U (pH=3,5) wurde die Proteinschicht unabhängig vom Metall bei dem Spülen mit NaCl-Lösung (pH=3,5) von der Sensoroberfläche bereits gelöst. Dies zeigt, dass die rekristallisierte Schicht von S1p1 bei diesem pH-Wert nicht mehr stabil ist und somit für eine Metallbindung bei diesem pH-Wert nicht mehr einsatzfähig ist. Vergleichbare desorptive Effekte konnten in weiteren Versuchen bereits verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Im Fall von S1fB und der verwendeten 5 mM Uranlösung konnte keine Metallsorption detektiert werden. Dieses Phänomen kann dem niedrigeren pH-Wert geschuldet sein, welcher für die QCM-D Untersuchung gewählt wurde. Hierbei kann ein Großteil der funktionellen Gruppen protoniert vorliegen, wodurch eine Metallbindung erschwert würde. Es zeigt jedoch anders als bei S1p1, dass die geschlossene Proteinschicht von S1fB bei diesem pH-Wert intakt bleibt und durch die Zugabe der Uranlösung nicht denaturiert und von der Oberfläche gelöst wird.

QCM-D VERSUCHE ZUR METALLBINDUNG - ZUSAMMENFASSUNG

In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Interaktion ausgewählter Schwer-, Edel- und Seltener Erdmetalle und Metalloide mit S-Layer-Proteinen war es das erste Mal möglich, deren Einfluss auf die Proteinschichtstabilität von SlfB und Slp1 und die Metallbindungsfähigkeit auf rekristallisierten, monolagigen Schichtsystemen der S-Layer-Proteine von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 unter Nutzung der QCM-D zu untersuchen. Bei diesen Untersuchungen konnte die QCM-D Technik genutzt werden um ein detailliertes Verständnis der Metall-Protein-Interaktion zu generieren und *online* die Masseabscheidungen auf den Proteinschichten verfolgen zu können.

In den Versuchen konnte für die Edelmetalle Au und Pd eine sehr hohe Affinität zu den Schichten von SlfB und Slp1 nachgewiesen werden. Wobei die Präsenz polynuklearer Pd- und Au-Spezies bei den Interaktionen mit den Proteinen zu berücksichtigen sind. Ebenfalls zeigten die Untersuchungen, dass beide Metalle einen stabilisierenden Effekt auf die rekristallisierte Proteinschicht sowohl von SlfB als auch von Slp1 ausüben. SlfB wies für As, Cd, Pb und Pt nur geringe Metallaffinitäten auf, welche auf der geschlossenen Proteinschicht detektiert werden konnten. Die Proteinschichten von Slp1 wiesen ein ähnliches Verhalten auf. Auffällig war, dass unter Verwendung der Schwermetalle As, Cd, Pb und dem Edelmetall Platin die Stabilität der Proteinschicht negativ beeinflusst wurde und zu einem ablösen dieser von der modifizierten Sensoroberfläche geführt hat. Nach dem bisherigen Wissensstand kann vermutet werden, dass dieser Effekt durch eine schwermetallinduzierte Denaturierung der Proteinschichten hervorgerufen wird. Dies ist ebenfalls bei den durchgeführten Batch-Sorptionsversuchen wahrscheinlich. Trotz dessen kann eine Bindung der Metalle an die von der Sensoroberfläche gelösten und denaturierten Proteine nicht ausgeschlossen werden. Diese Aussage kann durch die teilweise sehr guten Sorptionsdaten aus den Batch-Versuchen bestätigt werden.

Eine Sonderform der Untersuchungen nimmt Eu ein. Hier ist vermutlich anders als bei den weiteren untersuchten Metallen keine Sorption an der Proteinstruktur möglich. Vielmehr findet ein Austausch mit dem zweiwertigem Ion Ca unter gleichzeitiger Einlagerung des dreiwertigen Europiums statt. Dieser Effekt konnte bereits in mehreren Arbeiten mit calciumbindenden und -abhängigen Proteinen beobachtet werden. Durch die gleichzeitige Freisetzung von Ca während der Eu-Versuche konnte unter Verwendung der QCM-D Technik und die Detektionsgrenzen dieser Methode eine direkte Interaktionen mit Eu sowohl für Slp1, als auch für SlfB Proteinschichten nicht detektiert werden. Jedoch konnte die Bindung von Uran an den Proteinschichten von SlfB und Slp1 dargestellt werden. Dabei wiesen, anders als beispielweise bleihaltige Lösungen, die verwendeten Uranlösungen keinen destruktiven Effekt auf die rekristallisierten Proteinoberflächen auf.

Die Ergebnisse dieser Studien können für den Aufbau metallselektiver Filtermaterialien auf Basis dieser vielversprechenden selbstassemblierenden Proteinschichten genutzt werden. Der beschriebene destabilisierende Effekt einiger Metalle mit z. B. Cd oder Blei auf die Proteinstrukturen limitiert deren Einsatzmöglichkeit als selektives Filtermaterial für die o. g. Metalle. Daher kann auf der bisherigen Datenlage eine hohe Metallbindung von Au, Pd und U belegt werden, wodurch diese auf Basis der untersuchten S-Layer-Proteine selektiv von weiteren Metallen separiert werden können. Die

QCM-D Untersuchungen haben gezeigt, dass es nicht nur möglich ist direkte Aussagen zu Schichtstabilitäten der Proteine in ihrer rekristallisierten Form in Folge der Metallinteraktionen treffen zu können, sondern zeigen auch die hohe Leistungsfähigkeit dieser Methode auf nanoskalige Analysen durchführen zu können. Es konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass die Proteine in der Lage sind selektiv geringste Mengen an verschiedenen Schwermetallen aus den Lösungen zu binden. Somit können die Proteine bei der Entwicklung von selektiven Metallfiltermaterialien genutzt werden um Schwermetalle sowohl aus höher konzentrierten und belasteten Wässern wie z. B. Industrie- oder Haldenabwässern, als auch geringste Mengen von Schwermetallen aus Trinkwässern o. ä. zu binden. Dabei kann durch die sehr gute Interaktion mit Au und Pd beispielsweise geeignete Strategien zur Edelmetallrückgewinnung unter Verwendung der beschriebenen S-Layer-Proteine und auch der Entfernung von Uran aus belasteten Wässern forciert werden.

Die QCM-D eröffnet zusätzlich die Möglichkeit diese Methode zur *online* Detektion von geringsten Schwermetallkontaminationen (Auflösungsgrenze bis $0,5 \text{ ng/cm}^2$) in wässrigen Lösungen unter Verwendung geeigneter Sensorkonzepte wie z. B. der S-Layer-Proteintemplate zu nutzen. Diese können selektiv für verschiedene Schwermetalle entwickelt und zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser eingesetzt werden. Die geringeren sorbierten Massen an der Proteinoberfläche, welche bei den QCM-D Versuchen im Vergleich zu den ICP-MS Ergebnissen der Batch-Versuche ermittelt wurden, können direkt mit der Immobilisierung der Proteine zusammenhängen. Hierbei stehen nur die funktionellen Gruppen (COOH-, OH- und NH₂-Gruppen) auf der Proteinoberseite für eine direkte Metallinteraktion zu Verfügung. Die in den QCM-D Versuchen erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch präziser die Wechselwirkungen der geschlossenen S-Layer-Proteinschichten mit den Metallen auf. Diese rekristallisierten Schichten stellen im Vergleich zu den polymeren Proteinstrukturen (Batch-Versuche) das natürliche System der S-Layer-Proteine auf der Zelloberfläche vitaler Bakterien besser dar. Somit konnte die QCM-D zur Erlangung eines besseren Verständnisses der S-Layer-Protein/Metall-Interaktion auf molekularer Ebene erfolgreich genutzt werden.

Eine direkte Aussage zur bevorzugten Bindung der Metalle an spezifischen funktionellen Gruppen ist mit der QCM-D Methode jedoch nicht möglich, da nur die Interaktion und Adsorption auf der Oberfläche als Frequenz- oder Dissipationswerte aufgezeichnet werden können. Durch komplementäre Methoden und Untersuchungen können jedoch die beobachteten Effekte bei den QCM-D Versuchen besser beschrieben werden und auch die Beteiligung funktioneller Gruppen an der Metallbindung nachgewiesen werden. So weist beispielsweise die zuvor erwähnte sehr hohe Metallbindungsfähigkeit von Au und Pd beider S-Layer-Proteinschichten aus den QCM-D Versuchen auf eine starke Beteiligung von Carboxylgruppen an der Metallbindung hin, welche durch die Arbeiten von Fahmy, K. et al. (2006) und Jankowski, U. et al. (2010) gestützt werden. Sie zeigten die starke Metallkomplexierung an Carboxylgruppen von Glutamin- und Asparaginsäure und der damit verbundenen stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur der S-Layer-Proteine von JG-A12 in Lösung auf. Legt man deren Arbeiten zu Grunde, so konnte dieser Effekt erstmals durch die QCM-D Untersuchungen dieser Arbeit auf rekristallisierten Proteinoberflächen nachgewiesen werden. Dies wird durch die detektierten hohen Bindungen der Edelmetalle Au und Pd und deren stabilisierenden

Einfluss auf die S-Layer-Proteinschichten in dieser Arbeit dargestellt. Die höheren Metallinteraktionen von Au und Pd, welche mittels der QCM-D Messungen des S-Layer-Proteins Slp1 im Vergleich zu SlfB nachgewiesen wurden, können dabei durch den prozentual höheren Anteil von Glutaminsäure (4,8 Mol% (Slp1) zu 5,1 Mol% (SlfB)) und von Asparaginsäure (5,7 Mol% (Slp1) und 5,0 Mol% (SlfB)) in der Aminosäuresequenz der Proteine und der damit verbundenen stärkeren Komplexierungsmöglichkeit hervorgerufen werden.

Schlussendlich können aus den QCM-D Messungen der Einzelmetalllösungen folgende Tendenzen der selektiven Metallbindung an den monolagigen Schichten aufgezeigt werden: für rekristallisierte SlfB Proteinschichten $Pd < Au < U < (Pt < Pb < As, Cd, Eu)$ und für die rekristallisierten Schichten von Slp1 von $Pd \ll Au < U < (As, Cd, Eu, Pb, Pt)$.

4.6.2 AFM-Analytik von SIp1 nach Metallinteraktion auf QCM-D Sensoren

Nach den QCM-D Untersuchungen zur Metallinteraktionen wurde partiell auf eine Reinigung der Sensorkristalle verzichtet und diese nur mit der entsprechenden Äquilibrationslösungen gespült und aus den Durchflussmodulen zur weiteren AFM-Charakterisierung ausgebaut. Exemplarisch sind in Abbildung 48 die S-Layer (SlfB und SIp1) beschichteten SiO_2 -Sensoren nach der Interaktion mit 5 mM Goldmetallsalzlösung dargestellt.

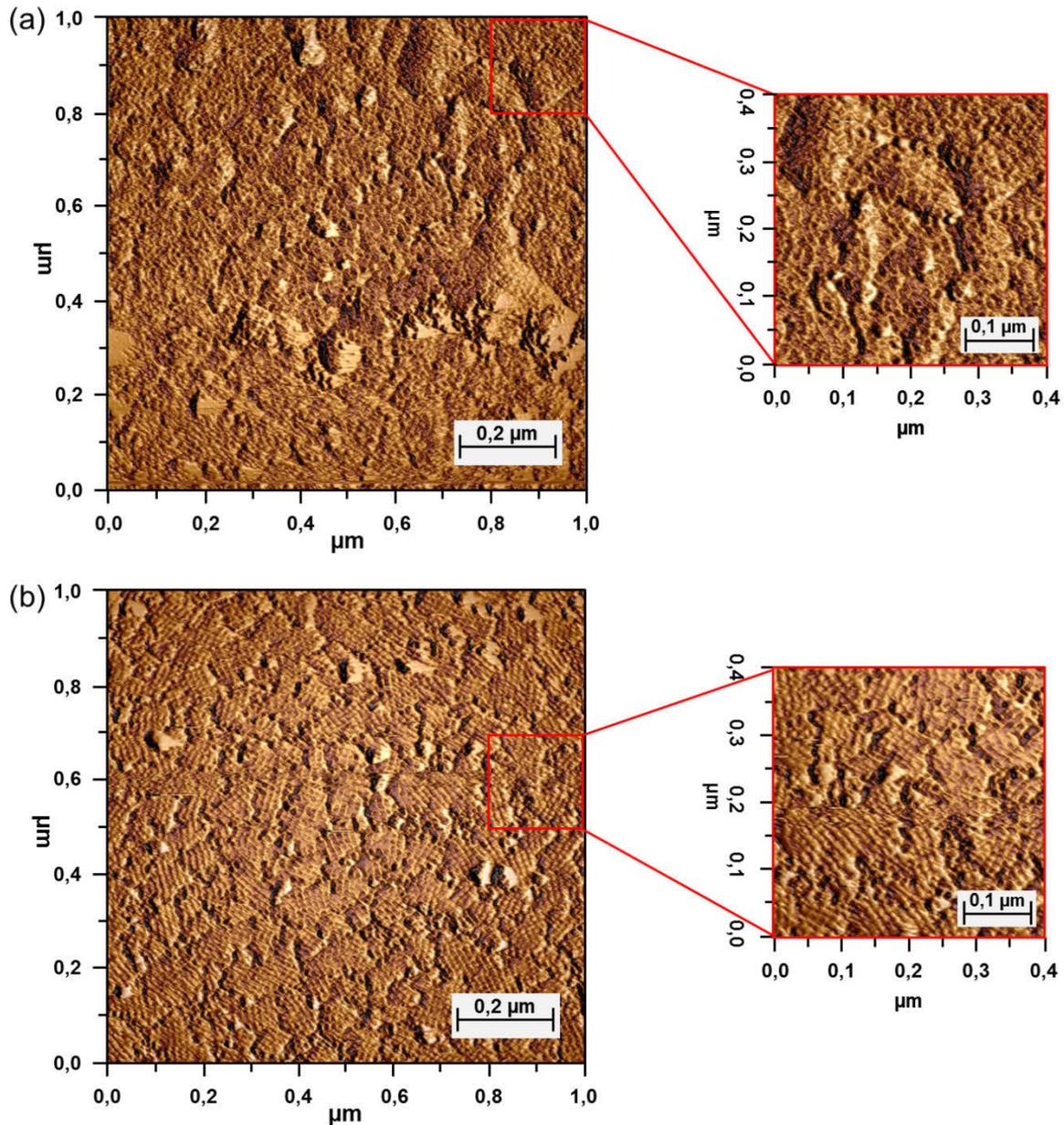


Abbildung 48: AFM-Amplitudenbilder von rekristallisierten S-Layer-Proteingittern auf QCM-D SiO_2 Sensoren nach Inkubation von 5 mM Goldmetallsalzlösung- (a) SlfB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, (b) SIp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

In Abbildung 48 a ist zu erkennen, dass nach den Metallsorptionsuntersuchungen mit der QCM-D das rekristallisierte Proteingitter von SlfB intakt geblieben ist und keine größeren Defekte oder Ablösungen

der typischen Proteinstruktur in dem AFM-Amplitudenbild zu erkennen sind. Diese AFM-Visualisierung der Proteinstruktur stützt die Ergebnisse, der QCM-D Untersuchungen, nach denen keine Proteindesorption infolge der Interaktion mit der Goldmetallsalzlösung von der Sensoroberfläche festgestellt werden konnten. In Abbildung 48 b ist in dem dargestellten AFM-Amplitudenbild des rekristallisierten S-Layer-Proteins Slp1 ebenfalls die typische $p4$ Gitterstruktur von Slp1 zu erkennen. Es konnte genauso wie bei SlfB beschrieben keine Proteindesorption von der Sensoroberfläche in Folge der Goldinteraktion festgestellt werden, was durch die AFM-Studien nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich der Amplitudenbilder von Slp1 und SlfB ist in Abbildung 48 b die Gitterstruktur von Slp1 deutlicher zu sehen. Wie auch schon in den AFM Studien zur Rekristallisation der beiden S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 zu erkennen war, sind auch hier neben der typischen Gitterstruktur beider Proteine größere Proteinfragmente auf der Sensoroberfläche erkennbar, welche aus der Rekristallisation der S-Layer resultiert. Diese Agglomerate können ebenfalls an der Goldbindung, welche mit der QCM-D detektiert wurden beteiligt sein. Bei den Untersuchungen konnten jedoch keine nanopartikulären Strukturen resultierend aus einer Reduktion von Au^{3+} zu $Au(0)$ erkannt werden. Jedoch können diese Nanopartikel auch zu klein sein um sie mit dieser Methode bzw. mit dem verwendeten Gerätetyp auf den S-Layer-Strukturen oder innerhalb der Poren zu detektieren.

Mit Hilfe der AFM-Untersuchungen ist es gelungen, die getroffenen Aussagen zur Stabilität der Proteinschichten aus den QCM-D Versuchen zu verifizieren, wenn auch über die AFM-Messungen selbst keine Aussagen zur Adsorption von Metallen aus den entsprechenden Lösungen getroffen werden können. Untersuchte Sensoren aus den QCM-D Versuchen bei denen Proteindesorptionen nach oder während der Metallinteraktionen auftraten wurden ebenfalls partiell untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnten bei diesen Proben größere Agglomerate organischer Moleküle auf der Oberfläche detektiert werden, jedoch war eine intakte und geschlossene Proteinschicht in den üblichen Gitterstrukturen nicht erkennbar. Diese beobachteten Agglomerate können dabei direkt von den Proteinen als auch von den Polyelektrolytuntergrund stammen, der ebenfalls negativ von den Metallsalzlösungen beeinflusst werden kann wenn die darüber liegende S-Layer-Proteinschicht abgelöst wurde. Demgegenüber stehen jedoch Referenzmessungen mit der QCM-D, welche eine nur sehr geringe Interaktionen der Polyelektrolyte mit den Metallsalzlösungen erkennen lassen.

Die QCM-D-Analysen erfordern eine reproduzierbare Abscheidung der Biomoleküle und eine Ausbildung gleichmäßiger geschlossener Schichten. Diese Bedingungen wurden für die Abscheidung der S-Layer-Proteine erfüllt. Daher wurden für die Untersuchung der Metallinteraktion mit monolagigen isolierten Zellwandschichten die S-Layer-Proteine Slp1 und SlfB exemplarisch als Vertreter für die QCM-D und AFM-Untersuchungen gewählt. Diese konnten sowohl in ausreichender Quantität und Qualität isoliert, sowie reproduzierbar auf verschiedenen Oberflächen unter Verwendung von Polyelektrolytuntergrundmodifikationen stabil als Schichten abgeschieden werden. Diese dienen in dieser Arbeit zur Beschreibung eines vereinfachten Zellwandsystems zur Interaktion mit verschiedenen relevanten Metallen. Weiter stellen die S-Layer-Proteine die erste Interaktionsschicht der Bakterienzelle zur Umwelt dar, weshalb der Fokus der Untersuchungen auf diese

vielversprechenden Zellwandbestandteile gelegt wurde. Ebenfalls war es möglich die regelmäßige Oberflächenstruktur der S-Layer-Proteine mittels AFM-Untersuchungen abzubilden und diese für die Diskussion der Schicht-/ und Gitterstabilität durch den Einfluss Metallen mit einzubeziehen. In weiteren Arbeiten können nach der Ausbildung von stabilen und reproduzierbaren Schichten auf Sensoroberflächen weitere Zellwandkomponenten, analog dem natürlichen System, Metallinteraktionen mittels der QCM-D auf molekularer Ebene erfolgen. Dafür sind jedoch weitere Studien der Schichtausbildung sowohl des Peptidoglykans als auch der Vesikelherstellung und Lipidabscheidung der isolierten Zellwandkomponenten beider untersuchter Stämme unabdingbar.

4.6.3 QCM-D Versuche zur Abscheidung von Goldnanopartikeln auf rekristallisierten S-Layer Schichten

Aufgrund der beobachteten sehr hohen Affinitäten der S-Layer-Proteine von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 zu Gold, sowie der Möglichkeit der Herstellung von sensorischen Schichten für den Einsatz in der Bionanotechnologie, erfolgten die Untersuchung und Herstellung von Goldnanopartikeln auf den strukturierten S-Layer-Proteinoberflächen.

Die citratstabilisierten Goldnanopartikel ($A_{520\text{nm}}=1$) (Kapitel 3.12.1) wurden nach der Synthese bezüglich der Größenverteilung mittels PCS untersucht. Dabei konnten in Abhängigkeit der eingesetzten Tanninkonzentration unterschiedliche Größenverteilungen der Nanopartikel erhalten werden. Ebenfalls konnte in Abhängigkeit der Tanninkonzentration eine unterschiedlich starker Farbumschlag von schwachem Gelb nach Rot während der Synthese erkannt werden. Dieser Farbumschlag wird durch die Anregung der Oberflächenplasmonsoschwingungen metallischer Nanopartikel hervorgerufen, und zeigt die Bildung der Goldnanopartikel auf^{267 277}. Höhere Konzentrationen führten dabei zu einer deutlichen roten Farbtintensivierung. In Abbildung 49 sind die Größenverteilungen der für die QCM-D und anschließenden AFM Versuche genutzten Goldnanopartikel dargestellt. Betrachtet man Abbildung 49 a so kann unter Verwendung von 6 mM Tannin eine monomodale Größenverteilung von Partikeln erkannt werden. Betrachtet man die Größenverteilungen bezogen auf die Anzahl der gemessenen Nanopartikel (Abbildung 49) so kann eine Verteilung der Partikel im Bereich von 10-18 nm exakt beschrieben werden. In weiteren zeitversetzten Messungen konnte gezeigt werden, dass die Goldnanopartikel, welche unter den beschriebenen Parametern hergestellt wurden, über Monate stabil bleiben und keine Agglomerate bilden, welche zu einer Veränderung der Partikelgrößenverteilung führt. Dies zeigt den Syntheserfolg der citratstabilisierten Goldnanopartikel.

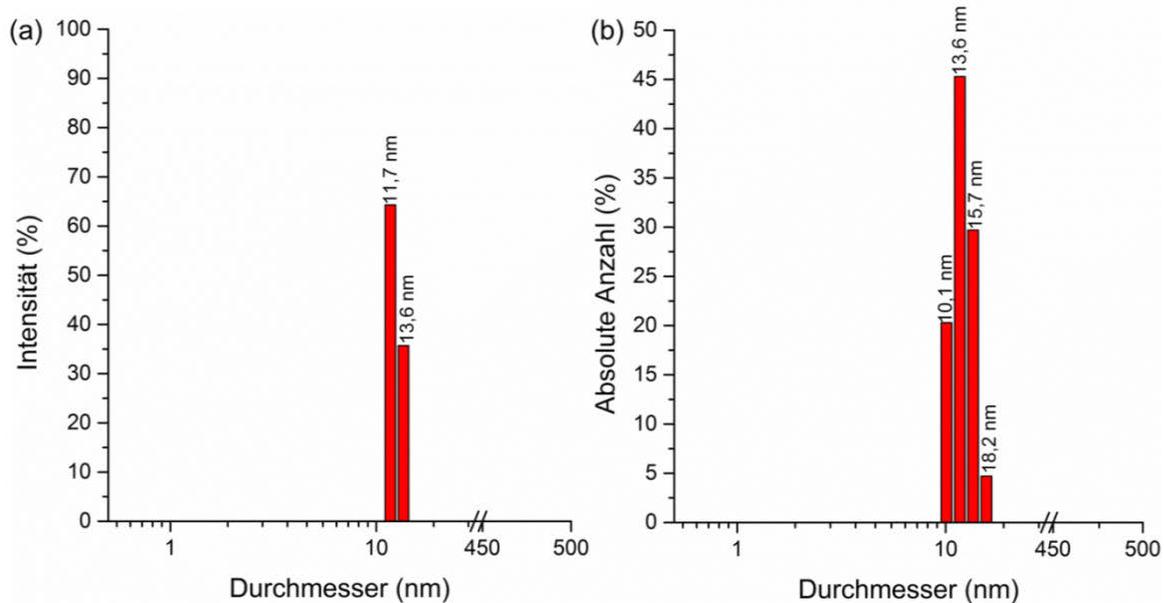


Abbildung 49: Intensitätsgewichtete (a) und anzahlgewichtete (b) Größenverteilung der synthetisierten und citratstabilisierten Goldnanopartikel (Ø 10-18 nm).

In Versuchen in denen die Tanninkonzentration bis zu ≈ 30 mM erhöht wurde, konnten Nanopartikel im Bereich von $<< 5$ nm synthetisiert werden (Abbildung A 11), welche sich bezogen auf deren Größe besser in der regelmäßigen Porenstruktur der S-Layer-Proteine abscheiden lassen sollten. Diese Partikel zeigten jedoch innerhalb weniger Tage bis zu wenigen Stunden eine deutliche Trübung der Suspension durch die beinhaltende Gerbsäure auf. Versuche die entstandenen Trübstoffe durch Zentrifugation oder Filtration von den Partikeln zu entfernen führten stets zu größeren Nanopartikelagglomeraten und einer breiteren Größenverteilung, weshalb für die weiteren Versuche die Partikel mit einem sphärischen Durchmesser von 10-18 nm aus den Ansätzen mit der niedrigeren Tanninkonzentration genutzt wurden.

Nach der Herstellung der Goldnanopartikel erfolgten die Untersuchungen der Interaktion der sphärischen Partikel mit den S-Layer-Proteinen beider Mikroorganismen. Für die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen mit der Quarzmikrowaage wurden die S-Layer-Proteine von S1fB und S1p1 analog der QCM-D-Beschichtungsversuche und der QCM-D Metallsorptionsversuche auf polyelektrolytmodifizierten SiO_2 Sensoren rekristallisiert, bevor die Zugabe der Nanopartikelsuspension in die Durchflussmodule erfolgte. In Abbildung 50 ist exemplarisch die Interaktion von Goldnanopartikeln auf der rekristallisierten Schicht von S1p1 in den QCM-D Diagrammen dargestellt. Die Diagramme für S1fB sind im Anhang (Abbildung A 7) hinterlegt.

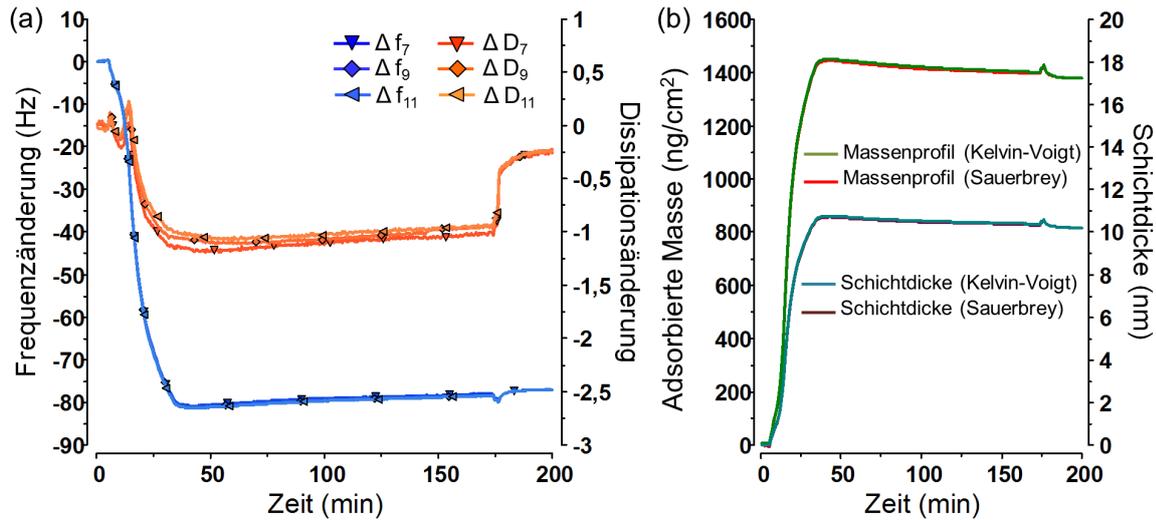


Abbildung 50: QCM-D Diagramme der Abscheidung von Goldnanopartikeln auf einer Slp1 Schicht; (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massen- und Schichtdickenprofil der adsorbierten Nanopartikel auf der Slp1 Schicht.

Nach der Zugabe der Nanopartikelsuspension erfolgte eine sehr schnelle Anlagerung der Partikel auf der abgeschiedenen Schicht von Slp1 innerhalb der ersten 30 Minuten. Nach dieser Zeit finden keine weiteren Frequenzänderungen statt, welche über die Sauerbrey-Gleichung eine Massenänderung infolge von Nanopartikelanlagerungen darstellen würden. Damit ist die Partikelanlagerung nach 30 Minuten vollständig abgeschlossen. Die Verringerung der Dissipationswerte die nach der Zugabe der konzentrierten Nanopartikellösung zu erkennen sind, deuten auf eine durch die Nanopartikel hervorgerufene starrer werdende Oberfläche hin. Bis zu dem durchgeführten Spülvorgang ($t=180$ Minuten) mit der reinen Pufferlösung sind nahezu konstante Frequenz- und Dissipationswerte zu beobachten. Dies weist auf eine sehr stabile Nanopartikelschicht auf der Proteinoberfläche hin und zeigt eine hohe Affinität der Proteine zu nanopartikelärem Gold. Somit weisen die S-Layer-Proteinschichten sowohl für metallisches Gold in Form der Nanopartikel als auch in ionischer Form (QCM-D Metallsorptionsversuche mit Au^{3+}) auf. Das Abspülen bei ca. 180 Minuten zeigt keinen signifikanten Anstieg der Frequenzwerte, was die zuvor getroffenen Aussagen zur Schichtstabilität und der Affinität stärkt. Der Anstieg der Dissipationswerte, welche jedoch nicht auf den Ausgangswert zurückkehren und somit eine Versteifung der Oberfläche infolge der Nanopartikelanlagerung schließen lassen, wird auf die hohe Konzentration an Nanopartikeln im Überstand über der Sensoroberfläche zurückgeführt. Diese werden durch das Spülen aus dem Durchflussmodul ausgetragen und können somit den Schwingquarz nicht mehr so stark in seinem Ausschwingverhalten dämpfen. Da über die Zeit trotz eines Überschusses an Nanopartikeln über der Sensoroberfläche keine weitere Anlagerung an der Proteinschicht reproduzierbar zu erkennen ist, kann von einer nahezu vollständigen Bedeckung bzw. Sättigung der Proteinoberfläche mit den Goldnanopartikeln ausgegangen werden. Durch diese ist eine weitere proteinabhängige Goldnanopartikelanlagerung nicht mehr gegeben. Die Anlagerung der metallischen Goldnanopartikel auf den Strukturen der rekristallisierten Proteinstrukturen von SlfB und Slp1 kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Dabei sollen im Folgenden kurz zwei Erklärungsansätze dargestellt werden, welche die hohe Affinität der Goldnanopartikel zu den S-

Layer-Proteinen erklären können. Die wohl wahrscheinlichste Bindung der Goldnanopartikel kann durch die Ausbildung kovalenter Bindungen mit funktionellen Gruppen erfolgen. Dabei kann die Goldbindung nicht auf die Präsenz der oft in Proteinen vorkommenden goldaffinen Thiolgruppen z. B. aus der Aminosäure Cystein erklärt werden, da diese bei Slp1 und SlfB in der Aminosäuresequenz nicht vorhanden ist. Jedoch stehen resultierend aus der Aminosäuresequenz eine Vielzahl an freien Carboxylgruppen (aus Aspartat und Glutamat), Aminogruppen über Lysinseitenketten oder Hydroxidgruppen über z. B. Threoninseitenketten zur Verfügung, welche für die Metallbindung zur Verfügung stehen^{202, 278}. Eine weitere Möglichkeit der Bindung wurde von Wahl, R. (2003) mit den S-Layer-Proteinen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 untersucht²⁷⁸. Dabei besteht die Möglichkeit der Anlagerung der Goldnanopartikel infolge von elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Poren bzw. Hohlräumen der ausgebildeten Proteingitter, welche als negative Ladungszentren angesehen werden können. Dadurch könnte eine regelmäßige Abscheidung der metallischen Nanopartikel stattfinden. Der genaue Bindungsmechanismus der S-Layer-Proteine mit den Goldnanopartikeln ist jedoch noch nicht vollständig verstanden und muss in weiteren Studien untersucht werden. Aufgrund der hohen Anzahl von funktionellen Gruppen, welche auch an der zuvor in dieser Arbeit untersuchten und diskutierten Bindung der Metallionen beteiligt sind, erscheint die kovalente Bindung der Nanopartikel jedoch als der wahrscheinlichste Mechanismus. In Abbildung 50 b ist zu erkennen, dass nach dem Spülprozess eine Massenlagerung von $\approx 1400 \text{ ng/cm}^2$ erreicht wurde und eine resultierende Schichtdicke von $\approx 11 \text{ nm}$. Unter der Annahme, dass die Partikel sich auf der Oberfläche der Proteinschicht angelagert haben und teilweise in die Proteinschicht eingesunken sind, deutet dieses Ergebnis auf eine erfolgreiche und stabile Abscheidung der citratstabilisierten Goldnanopartikeln ($\varnothing 10\text{-}18 \text{ nm}$) hin. Alternativ kann bedingt durch die räumliche Anordnung der sphärischen Nanopartikel auf der Oberfläche eine Unterbestimmung der über die Sensoroberfläche gemittelte Schichtdicke durch die beiden genutzten Modelle möglich sein, da die Angabe der Schichtdicke jeweils bezogen wird auf eine vollständig ebene geschlossene Schicht auf dem Quarzkristall. Somit werden Fehlstellen, welche zwischen benachbarten Nanopartikeln auftreten mit in die Berechnungen einbezogen. In den Versuchen mit rekristallisierten SlfB Schichten konnte ein nahezu identischer Versuchsverlauf resultierend in vergleichbaren adsorbierten Massen auf der Oberfläche und Schichtdicken detektiert werden. In Tabelle 21 sind die Daten zur Goldnanopartikelabscheidung auf Slp1 und SlfB vergleichend dargestellt.

Tabelle 21: Darstellung der maximalen Massenabscheidungen (Δm_{max}), der absoluten Masse ($\Delta m_{\text{auf Sensor}}$) auf Schichten von SlfB und Slp1, sowie der gemittelten Schichtdicken (d_{Layer}) nach der Goldnanopartikelabscheidung berechnet nach dem Sauerbrey und Kelvin Voigt Modell.

Bio-sorbent	Metall	pH-Wert	Adsorbierte Masse Δm_{max} (ng/cm^2) (Kelvin-Voigt)	Absolute Masse $\Delta m_{\text{auf Sensor}}$ (ng) (Kelvin-Voigt)	Adsorbierte Masse Δm_{max} (ng/cm^2) (Sauerbrey)	Absolute Masse $\Delta m_{\text{auf Sensor}}$ (ng) (Sauerbrey)	Schichtdicke d_{Layer} (nm) (Kelvin-Voigt)	Schichtdicke d_{Layer} (nm) (Sauerbrey)
SlfB	Au-NP	4,7	1393,9	2145,7	1399,7	2154,7	10,3	10,4
Slp1	Au-NP	4,7	1382,9	2128,8	1382,7	2128,5	10,2	10,2

4.6.4 AFM-Analytik von Slp1 nach Metallinteraktion auf QCM-D Sensoren

Zur Überprüfung der erfolgreichen Abscheidung der Goldnanopartikel wurden direkt im Anschluss an die QCM-D Versuche die beschichteten SiO₂ Sensoren mit Puffer gespült und zur weiteren Charakterisierung mittels der Rasterkraftmikroskopie verwendet. Exemplarisch ist in Abbildung 51 ein AFM-Amplitudenbild einer mit Goldnanopartikeln beschichteten Slp1 Schicht von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 dargestellt.

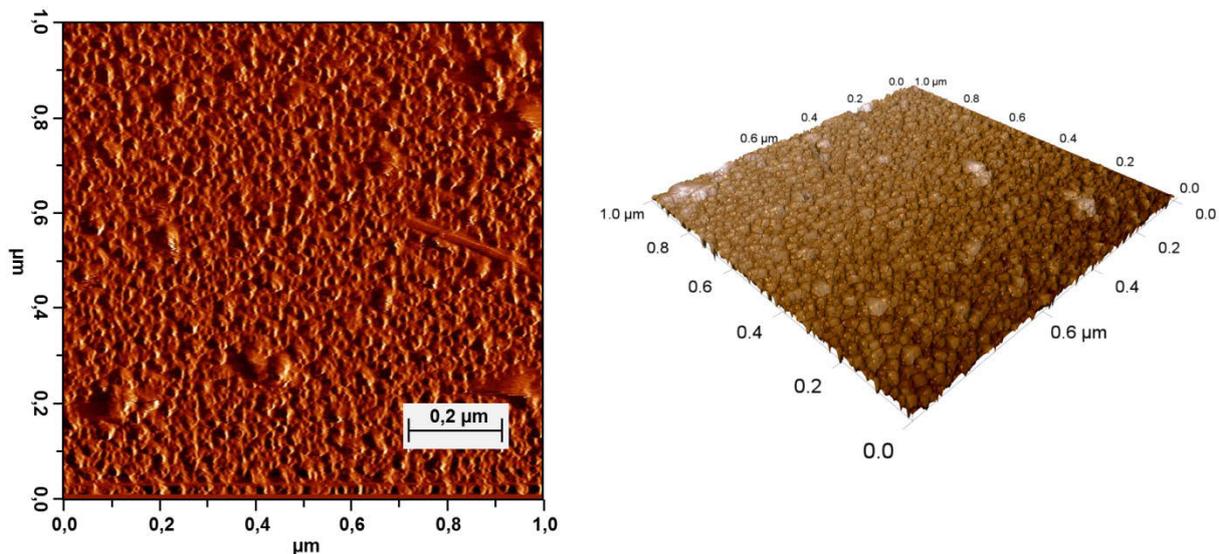


Abbildung 51: AFM-Amplitudenbild von abgeschiedenen Gold Nanopartikeln auf rekristallisierten Slp1 auf SiO₂ QCM-D Sensoren (links) und 3D Profil (rechts).

In dem Amplitudenbild in Abbildung 51 sind die abgeschiedenen Goldnanopartikel auf der Oberfläche der Slp1 Schicht zu erkennen. Aus der Vermessung der Oberflächenstruktur im AFM-Höhenbild (Abbildung A 10) konnten die Größen der abgeschiedenen Nanopartikel in einem Bereich von 16-23 nm bestimmt werden. Ebenfalls konnten kleinere Partikel auf der AFM Probe im Bereich um die 10 nm \pm 2 nm detektiert werden. Diese Daten weisen eine erfolgreiche Abscheidung der synthetisierten Nanopartikel auf der Proteinschicht nach. Die AFM Bilder zeigen ferner eine nahezu vollständige Bedeckung der Proteinschicht mit Nanopartikeln, welche zuvor in den QCM-D Versuchen vermutet wurde. Betrachtet man die Struktur im AFM Bild so ist ersichtlich, dass die Nanopartikel statistisch auf der Oberfläche der rekristallisierten Slp1 Schicht verteilt sind. Aufgrund der Partikelgröße ist eine regelmäßige Anordnung der Partikel in der Porenstruktur der hochgeordneten S-Layer-Proteine nicht möglich. Die in dem Amplitudenbild erkennbaren größeren Agglomerate resultieren vermutlich aus der Proteinbeschichtung, welche vor der Nanopartikelabscheidung in dem Durchflussmodul der QCM-D durchgeführt wurde. Aus dem AFM-Bild in Abbildung 51 können Lücken zwischen den einzelnen Nanopartikeln erkannt werden. Diese Fehlstellen sind in den berechneten Schichtdicken der QCM-D Messungen enthalten, welche sich auf eine theoretisch geschlossene Schicht bezieht. Somit erfolgt eine Unterbestimmung der tatsächlichen Schichtdicken. In der rechten Darstellung von Abbildung 51 ist die 3D rekonstruierte Oberfläche der Goldnanopartikelschicht dargestellt, in der die strukturierte Oberfläche deutlicher erkennbar ist.

4.7 Spektroskopische Untersuchungen an Biomolekülen

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung und Speziation von Europium mit intakten Zellen und primären Zellwandbestandteilen der Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-53 mittels TRLFS untersucht. Dazu wurden die Lumineszenzeigenschaften, Peakposition und Lumineszenzlebenszeiten des Europiums in Abwesenheit und in Gegenwart der Biokomponenten untersucht und bewertet. Dabei dient Europium mit seinen lumineszierenden Eigenschaften als spektroskopische Sonde zur Detektion der Wechselwirkungen mit verschiedenen Substanzen²⁷⁹. Diese Studien sollen zusätzlich zu den durchgeführten Batch-Sorptionsversuchen die Möglichkeit bieten, erste detaillierte Informationen zur Europium-Biomolekül-Wechselwirkung zu erhalten und ermöglichen erste Rückschlüsse auf eine Bindung an spezifischen funktionellen Gruppen. Ebenfalls können aufgrund der chemisch ähnlichen Eigenschaften von Lanthaniden und Actiniden gleicher Oxidationsstufen Vorhersagen für das Reaktions- und Sorptionsverhalten dreiwertiger Actinide wie Curium oder Americium getroffen werden.

Wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, wurde zunächst das Europium ohne biologische Komponenten unter den gewählten Versuchsparametern (z. B. pH-Wert, Hintergrundelektrolyt) näher betrachtet, bevor die Untersuchungen mit den einzelnen Biomolekülen (Kapitel 4.7.2) durchgeführt wurden. Die weiteren in den Batch-Sorptionsversuchen untersuchten Metalle wie Arsen, Gold, Cadmium, Blei, Palladium, Platin konnten in den TRLFS-Studien ausgeschlossen werden, da diese Metalle keine fluoreszierenden Eigenschaften aufweisen, welche mit dem verwendeten System messbar sind. Erste TRLFS-Messungen wurden ebenfalls mit Uran zur Untersuchung der Wechselwirkung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Biomolekülen durchgeführt. Die Ergebnisse müssen jedoch für eine fundierte Aussage zunächst verifiziert und teilweise näher betrachtet werden, bevor die Daten veröffentlicht werden können.

4.7.1 TRLFS Messungen von Europium

Vor Beginn der TRLFS Messungen erfolgte die thermodynamische Berechnung der Europiumspeziation unter Berücksichtigung der gewählten Versuchsparameter (1 mM Eu; pH=6,0; T=25 °C; 0,15 M NaCl-Lösung). In Abbildung 52 ist das resultierende Speziationsdiagramm von Europium in einem pH-Bereich von 4 bis 10 dargestellt. Die Berechnung der Speziesverteilung in den Referenzsystemen erfolgte mit Hilfe des Speziationsprogrammes EQ3/6 unter Einbeziehung der Komplexbildungskonstanten aus der „Nagra/PSI Chemical Thermodynamic Data Base 01/01“ Datenbank^{280, 281}. Aus der Speziationsverteilung (Abbildung 52) ist zu erkennen, dass bis zu einem pH-Wert von 6,0 die freie Eu^{3+} - und das EuCl^{2+} -Spezies dominieren. Mit Überschreitung des neutralen pH-Wertbereiches erfolgt die vermehrte Bildung verschiedener Europiumhydroxid- und -carbonat-spezies. Ab einem pH-Wert von 10,0 dominiert $\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$ die Speziation. Für die folgenden beschriebenen TRLFS Untersuchungen wurde ein pH-Wert von 6,0 gewählt, bei dem hauptsächlich das freie $\text{Eu}_{\text{aq.}}^{3+}$ (88 % lt. Speziationsverteilung) für die Interaktion mit den Biomolekülen verantwortlich ist.

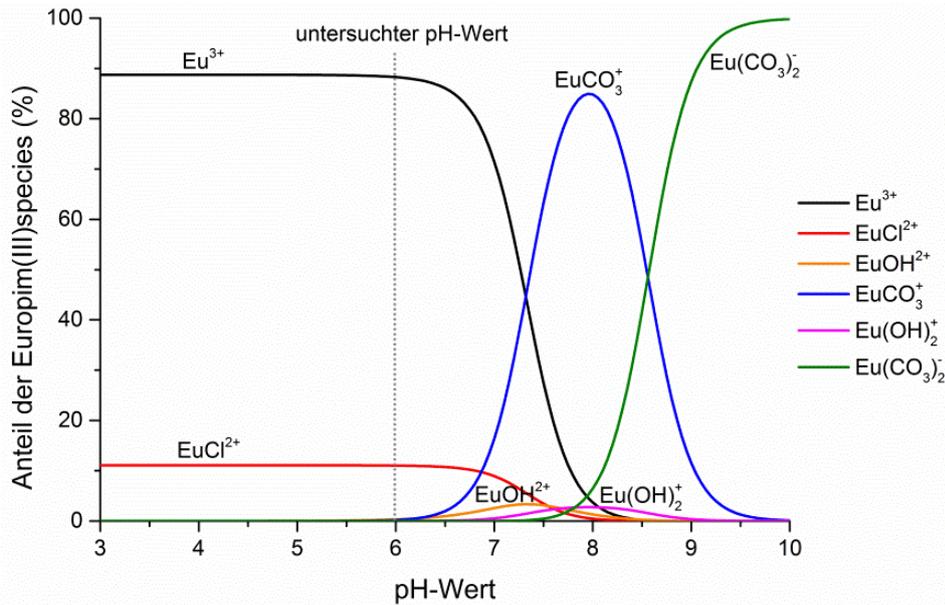


Abbildung 52: Speziesverteilung der gelösten Europium(III)-Spezies im Referenzsystem ($c_{Eu}=1\text{ mM}$, $0,15\text{ M NaCl}$, $\text{pH}=4-10$, $T=25\text{ }^\circ\text{C}$) ohne Biomoleküle.

Europium weist wie andere Lanthanide charakteristische scharfe Emissionsbanden auf. Zur strukturellen Analyse werden neben den Emissionsbanden auch die Lumineszenzlebenszeiten genutzt. In Abbildung 53 ist exemplarisch das zeitaufgelöste Lumineszenzspektrum (a) und das Einzelumineszenzspektrum von $\text{Eu}_{aq.}^{3+}$ (b) unter Verwendung der o. g. Versuchsbedingungen dargestellt.

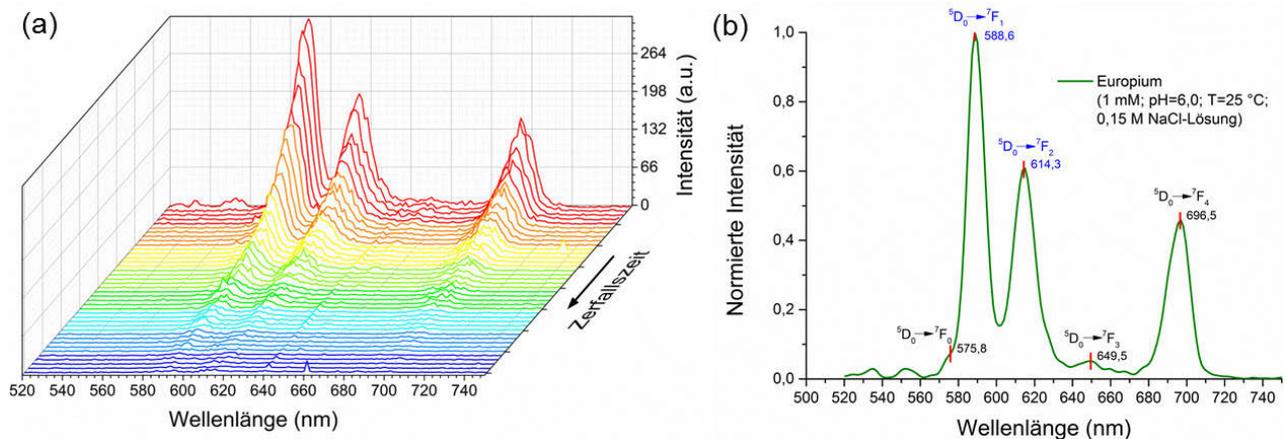


Abbildung 53: (a) TRLFS Spektrum und (b) Einzelumineszenzspektrum von 1 mM freiem Eu^{3+} in $0,15\text{ M NaCl}$ -Lösung bei $\text{pH}=6,0$.

In Abbildung 53 (b) sind fünf der sieben charakteristischen Hauptemissionsbanden des Eu^{3+} -Spektrums im wässrigen Chloridsystem im Bereich von $520-750\text{ nm}$ entsprechend der elektronischen Übergänge aus dem ersten angeregten Energieniveau (5D_0) in die 7F_n -Zustände dargestellt. Die bestimmten Peakmaxima sind in Tabelle 22 vergleichend mit Literaturwerten dargestellt und zeigen eine sehr gute Übereinstimmung.

Tabelle 22: Zuordnung der Peakpositionen zu den korrespondierenden Energieübergängen von freien Eu^{3+} und Vergleich zu Literaturwerten.

Energieübergänge	Emissionswellenlänge λ (nm)			
	Ergebnisse dieser Arbeit (2015); Viacava, K.E. (2013) ²³⁹	Tan, X. et al. (2010) ²⁸²	Lakowicz, J. R. (2006) ²⁸³	Texier, A. C. et al. (2000) ²⁸⁴
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$	575-579	579	578-585	585
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$	589-592	594	580-600	590
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$	612-615	619	610-630	615
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$	649-651	651	645-660	650
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$	695-697	702	680-705	---

Die Emissionsbandenpeaks von $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_{1,4}$ sind größtenteils unabhängig von der chemischen Umgebung um Eu^{3+} . Nur der $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ Übergang zeigt signifikante Veränderungen infolge der chemischen Umgebung und der koordinierenden Wassermoleküle aufgrund des hypersensitiven Effektes. So können aus dem Verhältnis der Übergänge $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1 / ^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ und deren Lumineszenzlebenszeiten strukturelle Aussagen über Europiumkomplexe in wässrigen Systemen gewonnen werden^{282, 285, 286}. Der Peak resultierend aus dem Übergang $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$ (≈ 697 nm) ist ebenfalls signifikant, fällt jedoch geringer aus als die $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ und $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ Übergänge. Korrespondierend zu den strukturellen Aussagen der Peakpositionen und Lumineszenzlebenszeiten kann die Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre von Eu^{3+} nach Horrocks, W. D. et al. (1979) berechnet werden^{285, 287-289}. Die Berechnungen erfolgten nach der in Gleichung 13 dargestellten Formel. In vorangegangenen Untersuchungen konnten keine messbaren Einflüsse zwischen Europium und dem wässrigen System (NaCl oder NaClO_4 bzw. HClO_4) bezüglich der Lumineszenzlebenszeiten (τ), Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre ($n_{\text{H}_2\text{O}}$) in dem dargestellten Konzentrationsbereich beobachtet werden^{290, 291}.

$$n_{\text{H}_2\text{O}} \pm 0,5 = \frac{1,07}{\tau} - 0,62 \quad \text{Gleichung 13}$$

In dieser Arbeit wurde für das freie Eu^{3+} eine Lumineszenzlebenszeit von $\tau=110-112 \mu\text{s}$ ermittelt. Daraus resultieren nach Gleichung 13 neun Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre von Eu^{3+} . Die ermittelten Lebenszeiten und die Anzahl der Wassermoleküle zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Tabelle 23)^{285, 291-295}.

Tabelle 23: Lumineszenzlebenszeiten (τ) und Anzahl der umgebenden Wassermoleküle ($n_{\text{H}_2\text{O}}$) von Eu^{3+} in verschiedenen wässrigen Systemen.

$C_{\text{Lösung}}$	$C_{\text{Eu}^{3+}}$	Lumineszenzlebenszeiten τ (μs)	$n_{\text{H}_2\text{O}} \pm 0,5$	Referenz
0,15 M NaCl	1 mM	110 -112 \pm 2	9	diese Arbeit (2015)
H_2O	0,001 mM	104	9,6	Horrocks, W. D. et al. (1979) ²⁹⁵
0,10 M HClO_4	0,03 mM	113 \pm 1	8-9	Schott, J. et al. (2014) ²⁹⁴
0,10 M NaClO_4	0,66 mM (100 ppm)	110 \pm 10	9	Plancque, G. et al. (2003) ²⁸⁵
0,10 M NaClO_4	10 mM	111	9	Lis, S. et al. (1992) ²⁹¹
0,10 M HClO_4	10 mM	112 \pm 1	9	Lis, S. et al. (2001) ²⁹³
0,10 M NaCl	10 mM	109	9	Lis, S. et al. (1992) ²⁹¹

4.7.2 TRLFS Untersuchungen der Wechselwirkung von Zellen und Biomolekülen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 mit Europium

Bei den TRLFS Untersuchungen mit den Biokomponenten wurden nach zwei verschiedenen Inkubationszeiten (1 Stunde und 24 Stunden) Messungen durchgeführt. Zusätzlich wurden Referenzproben der reinen Biokomponenten und der physiologischen NaCl-Lösung in dem relevanten Wellenlängenbereich (500-750 nm) gemessen. Somit konnte in den Untersuchungen eine Beeinflussung durch die Biomoleküle ausgeschlossen werden. In Abbildung 54 sind die normierten Einzellumineszenzspektren der untersuchten Komponenten von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 nach der Inkubation von 1 Stunde und 24 Stunden mit Europium vergleichend dargestellt (zeitaufgelöste Spektren siehe Abbildung A 12). Bereits nach einer einstündigen Sorptionszeit von Europium ist bei allen untersuchten Proben beider Stämme eine Intensitätsverschiebung der 7F_1 Emissionsbande hin zur 7F_2 Emissionsbande zu verzeichnen. Aus den nicht normierten Spektren (Daten nicht gezeigt) kann zusätzlich erkannt werden, dass sich die maximalen Intensitäten noch zwischen der 1- und 24-stündigen Inkubation ändern. Dabei bleiben die erhaltenen Intensitätsverhältnisse aus der Bandenverschiebung ${}^7F_1 \rightarrow {}^7F_2$ nahezu gleich. Diese Bandenverschiebung deutet auf eine starke Wechselwirkung des Europiums mit den biologischen Proben hin, welche jedoch nach einer Stunde noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Nach Einstellung des Sorptionsgleichgewichtes sollten keine Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen mehr zu verzeichnen sein. Bezugnehmend auf die erhaltenen Daten aus den Batch-Versuchen kann jedoch eine nahezu vollständige Europiumbindung nach 24 Stunden angenommen werden. Für jeden untersuchten Biosorbenten ist die Anzahl der Lumineszenzlebenszeiten abhängig von der entsprechenden chemischen Umgebung und den funktionellen Gruppen mit denen Europium interagieren kann. Die Auswertung der Lumineszenzlebenszeiten für die biologischen Komponenten wurde entsprechend der erhaltenen Daten mit einer biexponentiellen Funktion gefittet. Diese Funktion zeigt auf, dass zwei verschiedene chemische Umgebungen an der Europiuminteraktion beteiligt sind²³⁹. Die Auswertungen haben gezeigt, dass höher exponentielle Funktionen keinen weiteren Lumineszenzlebenszeiten bzw. auf weitere Wechselwirkungspartner für Europium hingewiesen haben und überparametrisiert waren. Die aus der biexponentiellen Funktion resultierenden Lebenszeiten sind ein Anzeichen für eine Veränderung der chemischen Umgebungen des Europiums. Die ermittelten Lumineszenzlebenszeiten, Bestimmtheitsmaße, Hauptemissionsbanden, Intensitäten aus den nicht normierten Spektren, Verhältnisse (I/I_{Eu}) und I_{7F_2}/I_{7F_1} sowie der Anzahl der Wassermoleküle (n_{H_2O}) in der ersten Koordinationssphäre sind in Tabelle 24 vergleichend zusammengefasst.

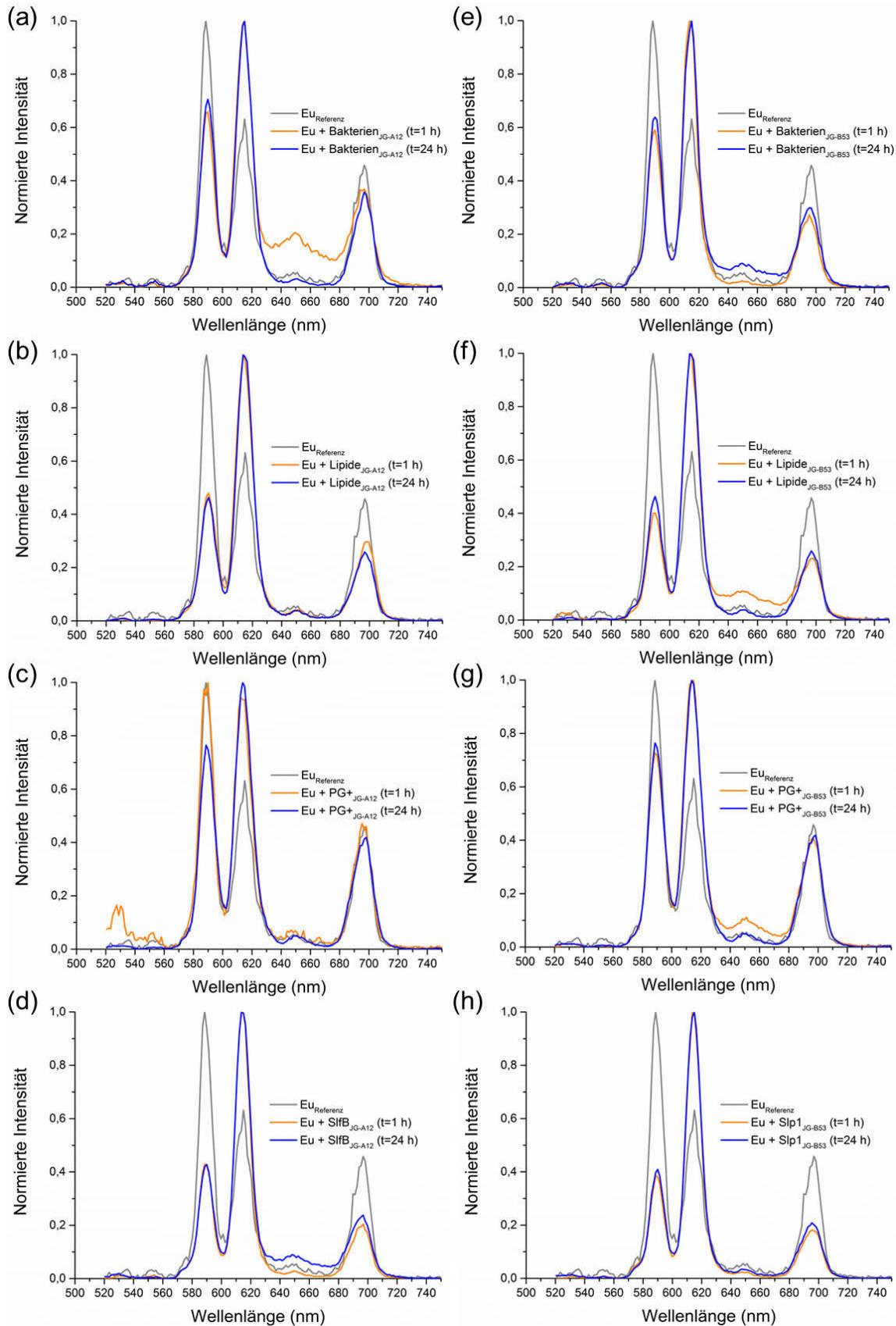


Abbildung 54: Einzellumineszenzspektren der Biomoleküle nach der Inkubation mit 1 mM Europium (pH=6,0; 0,15 NaCl; T=25°C); (a-d) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 – (a) intakte Zellen, (b) Lipide, (c) PG+, (d) SIFB und (e-h) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – (e) intakte Zellen, (f) Lipide, (g) PG+ und (h) Slp1 im Vergleich zur Referenzmessung mit Eu^{3+} .

Tabelle 24: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Lumineszenzlebenszeiten (τ_1 , τ_2), Hauptemissionsbanden (7F_1 , 7F_2 , 7F_4), Intensitätsverhältnisse, dem Bestimmtheitsmaß (R^2) und Anzahl der Wassermoleküle (n_{H_2O})* für die Europiuminteraktion ($c_{Eu}=1$ mM; pH=6,0; T=25 °C) an Biomolekülen der Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 in 0,15 M NaCl-Lösung.

Organismus	Bio-molekül/ Probe	Sorp-tionszeit (h)	Lebenszeiten (μ s)		Bestimmt- heits- maß R^2	Hauptemissions- banden (nm)			Intensität I (a.u.)			Verhältnis (I/I_{Eu})			Verhältnis (I_{7F_2}/I_{7F_1})	$n_{H_2O} \pm 0,5$ aus τ_1
			τ_1	τ_2		7F_1 (1)	7F_2 (2)	7F_4 (3)	7F_1 (1)	7F_2 (2)	7F_4 (3)	(1)	(2)	(3)		
--	Referenz (freies Eu)	1	111,6 \pm 1,7	---	0,9985	591,4	615,0	696,8	299,5	221,7	160,8	1,0	1,0	1,0	0,7	9,0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	intakte Zellen	1	166,7 \pm 10,0	64,0 \pm 8,9	0,9999	590,0	615,0	696,8	1371,8	2083,5	766,6	4,6	9,4	4,8	1,5	5,8
	intakte Zellen	24	148,4 \pm 2,5	32,1 \pm 3,6	0,9999	590,0	615,0	696,8	1422,2	2015,8	720,1	4,7	9,1	4,5	1,4	6,6
	Lipide	1	167,7 \pm 6,9	36,4 \pm 1,6	0,9997	590,0	613,6	698,2	3415,5	7126,8	2119,4	11,4	32,1	13,2	2,1	5,8
	Lipide	24	197,2 \pm 4,9	36,5 \pm 2,7	0,9998	590,0	613,6	696,8	1756,6	3794,4	980,5	5,9	17,1	6,1	2,2	4,8
	PG+	1	122,4 \pm 5,6	---	0,9975	590,0	612,2	695,4	390,7	368,3	183,2	1,3	1,7	1,1	0,9	8,1
	PG+	24	112,3 \pm 4,1	28,7 \pm 2,9	0,9997	588,6	612,2	696,8	626,2	541,5	295,9	2,1	2,4	1,8	0,9	8,9
	SlfB	1	209,6 \pm 5,3	---	0,9976	588,6	613,6	696,8	1420,9	3307,0	677,4	4,7	14,9	4,2	2,3	4,5
	SlfB	24	155,7 \pm 1,9	---	0,9991	590,0	613,6	696,8	2117,3	4946,0	1178,8	7,1	22,3	7,3	2,3	6,3
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	intakte Zellen	1	159,3 \pm 1,3	---	0,9996	588,6	615,0	696,8	351,4	221,7	160,8	1,2	1,0	1,0	0,6	6,1
	intakte Zellen	24	202,2 \pm 18,3	75,5 \pm 10,1	0,9999	590,0	615,0	695,4	1813,5	2840,6	847,6	6,1	12,8	5,3	1,6	4,7
	Lipide	1	224,9 \pm 5,9	37,0 \pm 1,5	0,9999	590,0	615,0	696,8	2417,5	6040,6	1386,2	8,1	27,2	8,6	2,5	4,1
	Lipide	24	217,2 \pm 4,4	32,4 \pm 1,3	0,9999	590,0	615,0	696,8	3489,1	8839,8	1762,6	11,7	39,9	11,0	2,5	4,3
	PG+	1	216,3 \pm 24,5	54,7 \pm 19,6	0,9987	588,6	615,0	696,8	1748,5	2406,5	976,7	5,8	10,9	6,1	1,4	4,3
	PG+	24	179,6 \pm 11,1	48,4 \pm 5,3	0,9996	588,6	613,6	698,2	2570,7	3362,2	1406,4	8,6	15,2	8,7	1,3	5,3
	Slp1	1	159,5 \pm 7,0	20,8 \pm 8,7	0,9624	588,6	613,6	695,4	1684,2	4367,2	793,5	5,6	19,7	4,9	2,6	6,1
	Slp1	24	213,2 \pm 24,5	80,2 \pm 11,3	0,9998	590,0	615,0	695,4	2436,7	5960,3	1240,8	8,1	26,9	7,7	2,4	4,4

*Berechnungen für n_{H_2O} nur gültig für τ_1 - Gleichung 13 versagt bei Lumineszenzlebenszeiten in dem Bereich von τ_2 (Plancque, G. (2003))

Es konnten über die Datenanalyse in nahezu allen biologischen Proben zwei Lumineszenzlebenszeiten ermittelt werden. Zur Interpretation der erhaltenen Lumineszenzspektren, -lebenszeiten und der Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre von Europium werden die experimentell ermittelten Daten mit Literaturwerten (Tabelle 25) verglichen. Dadurch können das Bindungsverhalten und potentielle Bindungsstellen der Bakterien und der Zellwandkomponenten betrachtet werden. Dabei wurden die längeren Lumineszenzlebenszeiten τ_1 (Bereich bis 225 μs) den Eu-Interaktionen mit organischen funktionellen Gruppen (Carboxyl-, Amino-, Hydroxid- und Phosphatgruppen) der entsprechenden Biomoleküle zugeordnet und mit den Referenzsubstanzen aus Tabelle 25 verglichen und diskutiert. Die zweite sehr kurze Lumineszenzlebenszeit τ_2 (Bereich 14-80 μs) kann nicht wie von Plancque, G. et al. (2003) beschrieben auf die Bildung von Hydroxidspezies zurückgeführt werden, da diese bei dem untersuchten pH-Wert von 6,0 lt. Speziationsverteilung nicht vorhanden sind (Abbildung 52) ²⁸⁵.

Mögliche Ursachen der ermittelten kürzeren Lumineszenzlebenszeiten stellen beispielsweise Quenching-Effekte, systematische Fehler oder Auswertefehler dar, welche im Folgenden diskutiert werden. Eine mögliche Erklärung könnten Quenching-Effekte geben. Dadurch kann es zu einer Verkürzung der detektierten Lumineszenzlebenszeiten bei den biologischen Proben kommen. Beispielsweise könnten Metallionen wie z. B. Eisen oder Mangan zu einem Signalquenchen der detektierten Europiumlumineszenzen führen. Das Quenchen durch Metalle konnte bereits in Arbeiten von Lukman, S. et al. (2012) und Manciuola, A. et al. (2009) bei den Untersuchungen der Europiuminteraktion mit Huminsäuren als Biomolekül beobachtet werden ^{296, 297}. Dieses Quenching wirkt sich jedoch nicht nur auf die kürzere Lumineszenzlebenszeit τ_2 aus, sondern kann auch zu einer Unterbestimmung von τ_1 führen. Ebenfalls kann durch das Quenchen die aus Gleichung 13 ermittelte Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre von Europium für die jeweiligen Biokomponenten größer ausfallen. Die Bestimmung der koordinierenden Wassermolekülen nach Gleichung 13 kann für die kurzen Lumineszenzlebenszeiten (τ_2) nicht erfolgen, da eine Berechnung für extrem kurze Lebenszeiten versagt und keine zuverlässigen Werte ausgibt ²⁸⁵. Betrachtet man die untersuchten Biomoleküle, so sollte vor allem bei den isolierten Zellbestandteilen wie S-Layer-Proteinen, Membranlipiden und Peptidoglykanen mit SCWPs der Einfluss durch anhaftende Metallionen wie z. B. Eisen oder Mangan aufgrund der aufwändigen Reinigungen und Abtrennung der Metallionen keinen signifikante Beeinflussung zeigen. Eine mögliche Quenching der erhaltenen Lumineszenzlebenszeiten durch Metallionen wie von Lukman, S. et al. (2010) gezeigt, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden ²⁹⁶. Die Untersuchungen von Lukman, S. et al. (2010) und von Reiller, P. E. et al. (2010) zeigten jedoch analog der Ergebnisse in dieser Arbeit zwei verschiedene Lumineszenzlebenszeiten ^{296, 298}. Dabei konnten beide Lumineszenzlebenszeiten der Europiuminteraktion mit den untersuchten Biomolekülen bzw. deren funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Die detektierten kürzeren Lumineszenzlebenszeiten (<100 μs) weisen wie von Lukman, S. et al. (2010) berichtet auf eine Interaktion von Eu^{3+} mit den Bindungsstellen der untersuchten organischen Moleküle (Huminsäuren) hin ²⁹⁶. Dabei können die detektierten Lumineszenzlebenszeiten durch einen Quenchingme-

chanismus des Kohlenstoffgerüsts der Huminsäuren verkürzt werden. Ein solches Quenching durch das Kohlenstoffgerüst der in dieser Arbeit untersuchten, sehr komplex aufgebauten und langkettigen Biokomponenten ist daher die wahrscheinlichste Erklärung der detektierten kürzeren Lumineszenzlebenszeit (τ_2). Der Einfluss der zuvor diskutierten Quenchingeffekte sollte jedoch in weiteren auf dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen detaillierter betrachtet werden. Da die kurzen Lumineszenzlebenszeiten jedoch in nahezu alle biologischen Proben detektiert wurden, ist ebenfalls ein systematischer Fehler in den Proben z. B. durch eine Wechselwirkung mit dem Hintergrundelektrolyten denkbar. Andolina, C. M. et al. (2003) konnte bereits den Konzentrationseinfluss von Hintergrundelektrolyten wie z. B. NaCl auf die Intensität des $\text{Eu}_{\text{aq.}}^{3+}$ Ions nachweisen²⁹⁹. Jedoch zeigten die zeitaufgelösten Messungen keine signifikante Beeinflussung der Lumineszenzlebenszeiten²⁹⁹. Die Untersuchungen und Referenzmessungen des freien Europiums in dieser Arbeit (Kapitel 4.7.1), welche unter identischen Messbedingungen wie die biologischen Proben durchgeführt wurden, wiesen ebenfalls keine Beeinflussung der Lumineszenzlebenszeiten auf und sind vergleichbar mit den in der Literatur aufgezeigten Daten. Daher kann diese Beeinflussung ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden die TRLFS-Daten partiell mittels der Parallel factor analysis (PARAFAC) ausgewertet, welche sich als robuste Methode zur Interpretation von TRLFS-Daten herausgestellt hat³⁰⁰⁻³⁰². Mittels PARAFAC konnte ebenfalls ein Zweikomponentensystem in den untersuchten biologischen Proben mit vergleichbaren Lumineszenzlebenszeiten identifiziert werden, wodurch die Ergebnisse der in dieser Arbeit genutzten Auswertemethode gestützt werden konnten.

Aufgrund der komplexen Strukturen der S-Layer-Proteine, der Membranlipide, des PG+ und der Bakterienzellen als Gesamtsystem ist eine Vielzahl an Bindungsstellen möglich. Daher wurden für den Vergleich potentieller Bindungsstellen vereinfachte Referenzsubstanzen ausgewählt, welche sich in der Struktur von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 und deren isolierten Zellwandkomponenten wiederfinden lassen. In Tabelle 25 ist vergleichend eine Zusammenfassung von Literaturwerten potentiell zur Verfügung stehender funktioneller Gruppen dargestellt (siehe Kapitel 4.4). Ein direkter Vergleich zu anderen isolierten und komplexeren Zellwandkomponenten ist jedoch nicht möglich, da die bisherig publizierte Datenlage zur Europiuminteraktion mit einzelnen zellulären Biomolekülen sehr gering ist.

Tabelle 25: Zusammenfassung und Vergleich von Lumineszenzlebenszeit (τ), der koordinierenden Wassermoleküle (n_{H_2O}) der Ergebnisse dieser Arbeit mit ausgewählten Literaturwerten.

Funktionelle Gruppen/ Interaktion	Untersuchte Komponenten/ Sorbent	Lumineszenz- lebenszeiten (μ s)		$n_{H_2O} \pm 0,5$		Referenzen
		T_1	T_2	aus T_1	aus T_2	
Eu-Interaktionen mit Mikroorganismen	Eu ³⁺ , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12	148-167	32-65	3	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53	159-202	76	4-5	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , <i>Bacillus subtilis</i> (pH=5,0)	230 \pm 20	730 \pm 30	4	1	Markai, S. (2003) ¹²⁰
	Eu ³⁺ , <i>Bacillus subtilis</i> (pH=7,0)	234 \pm 20	730 \pm 30	4	1	Markai, S. (2003) ¹²⁰
	Eu(NO ₃) ₃ – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	254	677	4	1	Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴
	Eu ₂ (SO ₄) ₃ – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	133	567	7	1	Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴
	EuCl ₃ – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98	534	10	1	Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴
	Eu ³⁺ – <i>Sporomusa</i> sp.	170 \pm 23	515 \pm 73	6	2	Moll, H. (2014) ³⁰³
(R-PO ₄) ^{*1} Phosphatgruppen	Eu ³⁺ , Lipide JG-A12	168-197	36-37	5-6	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , Lipide JG-B53	217-225	32-37	4-5	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , Glycerol-2-phosphat	704 \pm 30	---	1	---	Markai, S. (2003) ¹²⁰
	Eu(PO ₄) (Präzipitat)	745	---	1	---	Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴
(-RCOOH) ^{*2} Carboxylgruppen	Eu ³⁺ , PG+ JG-A12	112-122	14-29	8	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , PG+ JG-B53	180-216	48-55	4	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , Polyacrylsäure (PAA)	270-290	---	3	---	Takahashi, Y (1999) ²⁸⁷
	Eu, Oxalsäure	269-312	---	3	---	Markai, S. (2003) ¹²⁰ Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴
	Eu, Malonsäure	158 \pm 5	---	6	---	Thakur, P. (2009) ³⁰⁴
	Eu, Bernsteinsäure	138 \pm 5	---	7	---	Thakur, P. (2009) ³⁰⁴
	Eu, Adipinsäure	127 \pm 5	---	8	---	Thakur, P. (2009) ³⁰⁴
	Eu, ODA ⁺ (Oxydiacetat)	176 \pm 5	---	6	---	Thakur, P. (2009) ³⁰⁴
(R-COOH' R-NH ₂ , R-OH) ^{*3} (Carboxyl-, Amino-/ Hydroxidgruppen	Eu ³⁺ , SifB JG-A12	156-210	---	4-6	---	diese Arbeit (2015)
	Eu ³⁺ , SIp1 JG-B53	160-213	21-80	4-6	---	diese Arbeit (2015)
	Eu, Threonin	130	---	8	---	Rönitz, O. (2009) ³⁰⁵ Heller, A. (2010) ³⁰⁶
	Eu, Glutaminsäure	129 \pm 5	---	8	---	Thakur, P. (2009) ³⁰⁴
	Eu, Alanin	133 \pm 4	---	7	---	Rönitz, O. (2009) ³⁰⁵ Heller, A. (2010) ³⁰⁶
	Eu, Asparagin	239	---	4	---	Texier, A. C. (2000) ²⁸⁴

*1 Eu-Interaktion mit Phosphaten und Lipiden

*2 Eu-Interaktion mit Polycarbonsäuren und PG+

*3 Eu-Interaktion mit Aminosäuren und Proteinen

ZUSAMMENFASSUNG DER EUROPIUM-BIOMOLEKÜL TRLFS UNTERSUCHUNGEN

In dieser Arbeit wurden erstmals systematische Untersuchungen mit verschiedenen isolierten Zellwandbestandteilen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 durchgeführt. Dabei konnten in den dargestellten TRLFS-Untersuchungen sowohl an isolierten Einzelkomponenten, als auch an intakten Zellen beider Stämme die Wechselwirkung von Europium beobachtet werden. In den Untersuchungen und durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen aus der Literatur (Tabelle 25) wurde die Europiuminteraktion mit den funktionellen Gruppen näher untersucht. Eine Beteiligung von Carboxylfunktionalitäten konnte sowohl bei den Membranlipiden, Peptidoglykanen und S-Layer-Proteinen beider Stämme durch den Vergleich der Lumineszenzlebenszeiten und der Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Europiums aufgezeigt werden. In nahezu allen TRLFS-Untersuchungen dieser Arbeit konnten ähnliche Eu-Interaktionen der Biomoleküle beider Bakterienstämme festgestellt werden. Dies deutet auf ein ähnliches Bindungsverhalten der beiden Mikroorganismen hin. Einzig das isolierte Peptidoglykan der Stämme zeigt deutliche Unterschiede auf.

Die Untersuchungen der Einzelkomponenten haben gezeigt, dass wahrscheinlich die Carboxylgruppen der S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 (vor allem Aspartat und Glutamat - resultierend aus der Aminosäuresequenz) wesentlich an der Bindung von Europium beteiligt sind^{145, 201, 202}. Dies konnte durch den Vergleich zu freien Aminosäuren wie Glutaminsäure, Alanin, Threonin und Asparagin als Referenzsysteme (Tabelle 25) dargestellt werden. Bei den untersuchten freien Aminosäuren kann die Interaktion von Europium direkt auf die freien Carboxylgruppen zurückgeführt werden, wobei Lumineszenzlebenszeiten im Bereich von 129-133 μs bzw. bei Asparagin von 239 μs detektiert wurden^{284, 304-306}. Betrachtet man die Lumineszenzlebenszeiten von SlfB und Slp1 ($\tau_1=156-213 \mu\text{s}$), so kann die Wechselwirkung hauptsächlich durch die freien Carboxylgruppen aus den Aminosäureseitenketten der Proteine hervorgerufen werden. Interaktionen dreiwertiger Actinide wie z. B. Curium mit Carboxyl-, Amino- und Hydroxylgruppen aus den Seitenketten konnten bereits durch Moll, H. et al. (2007) bei Untersuchungen einzelner Aminosäuren (L-Threonin und O-Phospho-L-Threonin) nachgewiesen werden³⁰⁷. Bei den langkettigen S-Layer Proteinen sollten zukünftig Proteinfragmente von SlfB und Slp1 untersucht werden, um präzisere Vergleiche bezüglich der Wechselwirkung mit spezifischen funktionellen Gruppen treffen zu können. Auch die exakte Bestimmung post-translationaler Modifikationen und deren Nutzung als Referenzsubstanzen können detailliertere Informationen der Metallinteraktionen geben. Bei den Untersuchungen der Membranlipide ($\tau_1=168-225 \mu\text{s}$) beider Stämme konnten keine Interaktionen von Europium mit organischen Phosphatgruppen z. B. mit den hydrophilen Kopfgruppen der Membranlipide vergleichend zu den Referenzsubstanzen aus der Literatur z. B. Eu^{3+} mit Glycerol-2-phosphat oder $\text{Eu}(\text{PO}_4)$ detektiert werden (Tabelle 25)^{120, 284}. Jedoch kann durch Metallionen ein Quenchen der Europiumlumineszenz möglich sein, wodurch es zu einer Verkürzung der Lumineszenzlebenszeiten kommen kann. Bei den Membranlipiden ist ebenfalls eine Interaktion mit weiteren Funktionalitäten innerhalb der Membranlipidstruktur wie z. B. Carbonylgruppen über die Esterbindungen, $-\text{N}^+\text{R}_3$ -Gruppe oder freien Carboxylfunktionalitäten resultierend aus

hydrolytischen Abspaltungen der Fettsäurereste möglich, welche bisher jedoch noch nicht untersucht wurden. Die Untersuchungen der Peptidoglykane ($\tau_1=112-216 \mu\text{s}$) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 zeigten analog der Untersuchungen der Membranlipide keine Interaktionen von Europium mit organischen Phosphatgruppen z. B. der SCWPs im PG+ vergleichend zu den Referenzsubstanzen aus der Literatur (Tabelle 25)^{120, 284}. Dies kann wie bereits diskutiert durch verschiedene Quenchingeffekte erklärt werden. Das PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 weist jedoch eine wesentlich stärkere Interaktion mit Europium auf als das PG+ von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Dies lässt sich aus den längeren Lumineszenzlebenszeiten (τ_1 und τ_2) sowie der verschiedenen Intensitätsverhältnisse (I/I_{Eu}) (Tabelle 24) ableiten. Diese stärkere Interaktion konnte bereits in den Bindungsversuchen der Batch-Sorptionsexperimente nachgewiesen werden. Betrachtet man den Aufbau von PG+ beider Stämme, so kann aus der allgemeinen Struktur (GlcNAc-MurNAc-Kette und Peptidseitenketten) eine starke Eu-Interaktion mit verschiedenen funktionellen Gruppen wie z. B. Carboxyl- und Aminogruppen abgeleitet werden. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen aus der Literatur z. B. Polyacrylsäure (PAA), Oxalsäure und Bernsteinsäure sollte die Komplexierung von Europium an dem langkettigen und verzweigten Peptidoglykan sehr gut beschreiben können. Für diese Referenzsubstanzen wurden Lumineszenzlebenszeiten im Bereich von 138-290 μs in der Literatur beschrieben^{120, 304}. Im Vergleich der einzelnen Biomoleküle (S-Layer-Proteine, Membranlipide und PG+) als auch intakter Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 konnten längere Lumineszenzlebenszeiten detektiert werden als bei *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Dies weist allgemein auf eine stärkere Interaktion der Biomoleküle von JG-B53 mit Europium hin. Diese beobachtete stärkere Europiuminteraktion der Einzelmoleküle als auch der intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 konnte bereits in den Batch-Sorptionsversuchen festgestellt werden. Um die an der Europiuminteraktion beteiligten funktionellen Gruppen zu beschreiben, wurden verschiedene literaturbekannte Referenzsysteme wie *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Sporomusa* sp. verglichen^{120, 284, 303}. Die Lumineszenzlebenszeiten in dem Bereich von 140-254 μs der Referenzorganismen (Tabelle 25) werden dabei der Europiumbindung an Carboxylgruppen zugeordnet. Ähnliche Lumineszenzlebenszeiten wurden ebenfalls bei den untersuchten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 ermittelt werden. Die Europiuminteraktion mit Phosphatgruppen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Dennoch ist eine Beteiligung von Phosphatgruppen an der Europiumbindung nach dem derzeitigen Kenntnisstand bei allen untersuchten Biomolekülen dieser Arbeit nicht vollständig auszuschließen. Im Vergleich der intakten Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und JG-B53 mit den Messungen der einzelnen S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 können sehr ähnliche der Einzellumineszenzspektren und Lumineszenzlebenszeiten detektiert werden. Daher kann eine vorwiegende Europiuminteraktion mit den S-Layer-Proteinen beider Stämme als äußerste Schicht der Bakterienzelle angenommen werden.

Eine Europiuminteraktion mit den weiteren Zellwandkomponenten oder ein Zusammenwirken aller Komponenten kann nach dem bisherigen Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden. Jedoch erscheint eine Wechselwirkung mit den unteren Zellwandschichten aufgrund der räumlichen Anordnung als unwahrscheinlich in dem Gesamtsystem der Bakterienzelle.

Letztendlich ist ein exakter Vergleich der Lumineszenzlebenszeiten in dieser Arbeit zu literaturbekannten Referenzsubstanzen nach dem derzeitigen Kenntnisstand aufgrund möglicher Quenchingeffekte durch Metallionen und des Kohlenstoffgerüsts nur bedingt möglich. Diese sollten in weiteren Arbeiten näher betrachtet werden. Jedoch stellen die Ergebnisse dieser Arbeit die Basis für zukünftige detaillierte spektroskopische Untersuchungen dar. In den Arbeiten sollten sowohl die einzelnen Biomoleküle als auch die Zellen hinsichtlich deren Metallwechselwirkung nach der Gleichgewichtseinstellung nach 24 Stunden untersucht werden, als auch Messungen einzelner vereinfachter Referenzsubstanzen durchgeführt werden. Die durchgeführten TRLFS-Untersuchungen und die erhaltenen Ergebnisse, können in weiteren Arbeiten zusätzlich als Grundlage für die Untersuchungen dreiwertiger Actinide wie z. B. Curium und Americium aufgrund der Analogchemie genutzt werden. Dadurch kann ein tieferes Verständnis der Komplexierungsverhaltens erhalten werden, wodurch sowohl aus einzelnen Biomolekülen als auch aus intakten Zellen verschiedene biotechnologische Anwendungen wie z. B. effiziente Filtermaterialien zur selektiven Bindung von Actiniden und Lanthaniden entwickelt werden können.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist es erfolgreich gelungen die beiden grampositiven Mikroorganismen *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 unter geregelten und idealen Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor in hinreichenden Biomasseausbeuten zu kultivieren. Dabei konnten unter Nutzung der *online* und *offline* Analysen der ideale Erntezeitpunkt detektiert und vitale Zellen der exponentiellen Wachstumsphase für die weiteren Untersuchungen erhalten werden. Aus der Biomasse beider Stämme ist es anschließend unter Nutzung geeigneter und verbesserter Isolierungsmethoden gelungen, die primären Zellwandkomponenten bestehend aus Membranlipiden, Peptidoglykan mit sekundären Zellwandpolymeren und S-Layer-Proteinen in reiner Form und in guten Ausbeuten aus der Biomasse zu extrahieren. Diese Zellwandkomponenten wurden dann unter Verwendung von biochemischer und strukturanalytischer Methoden charakterisiert um deren Reinheit zu kontrollieren und ihre Strukturen aufzuklären. Dabei ist es erstmals gelungen, die Membranlipide beider genutzter Mikroorganismen in Bezug auf deren Zusammensetzungen der enthalten hydrophoben Fettsäuren und der hydrophilen phosphathaltigen Kopfgruppen zu charakterisieren. Dabei konnten signifikante Unterschiede der KWS-Kettenlänge (C₁₄-C₁₈) der Fettsäurereste beider Membranlipide festgestellt werden. Diese waren unter den gewählten Kultivierungsbedingungen reproduzierbar. Aus der geringen Präsenz ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 kann eine höhere Fluidität der Membran innerhalb der Zellen abgeleitet werden. Dies könnte bessere Interaktionen mit Substraten oder Metallen ermöglichen. Die Ergebnisse der Membranlipidanalyse zeigten ebenfalls die Möglichkeit auf, Membranlipide zur Identifizierung oder zur Unterscheidung von Mikroorganismen nutzen zu können. Die funktionellen Gruppen der S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 wurden in dieser Arbeit ableitend aus den bekannten Aminosäuresequenzen beschrieben. Für die Struktur des Peptidoglykan konnte nach derzeitigen Kenntnisstand nur ein Vergleich mit literaturbekannten Strukturen durchgeführt werden.

Durch die vergleichend durchgeführten Metallbindungsversuche im Batch-Verfahren konnten Bindungspräferenzen intakter Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 und *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 und deren isolierten Zellwandkomponenten mit den Metallen As, Au, Cd, Eu, Pb, Pd, Pt bzw. U untersucht werden. Dabei konnten sowohl in den Untersuchungen intakter Zellen und der primären Zellwandbestandteile deutlich höhere Metallsorptionsraten und Metallentfernungseffizienzen für *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 festgestellt werden als dies bei *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 nachzuweisen war. Dies macht diesen Stamm für potentielle technische Anwendungen als metallselektives biosorptives Material weitaus interessanter. Durch die Untersuchung der Einzelkomponenten konnten dabei Rückschlüsse auf potentielle Bindungsstellen durch die zur Verfügung stehen funktionellen Gruppen geschlossen werden und die Beteiligung der entsprechenden Zellschichten an der Metallbindung des Gesamtsystems der Zelle abgeleitet werden. In den Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass vor allem die oberflächennahen Zellwandschichten

wie S-Layer-Proteine und Peptidoglykan mit SCWPs an der Metallbindung der Gesamtzellschicht beteiligt sein müssen. Dabei ist vor allem der hohe Anteil an Carboxyl- und Aminogruppen der S-Layer-Proteine, als auch die Carboxyl- und Aminogruppen des Peptidoglykans sowie die Phosphatgruppen der sekundären Zellwandpolymere mutmaßlich an der Metallbindung des Gesamtzellsystems beteiligt. Bei beiden Stämmen konnten vor allem sehr hohe Metallaffinitäten zu den Edelmetallen Gold (bis zu 700,1 mg Au/g Biosorbent) und Palladium (bis zu 616,0 mg Pd/g Biosorbent) sowie zu dem Metall Blei (bis zu 393,0 mg Pb/g Biosorbent) nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen die isolierten Zellwandkomponenten eine selektive und hohe Bindung von Uran auf. Von den isolierten Zellwandkomponenten haben sich das Makromolekül Peptidoglykan mit SCWPs, aufgrund der hohen Anzahl an funktionellen Gruppen wie Carboxyl- Hydroxyl- und Phosphatgruppen sowie die Membranlipide als Sorbenten mit den höchsten Bindungsraten der o. g. Metalle herausgestellt. Die S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 binden vergleichend zu den anderen freien Biomolekülen weniger Metallmengen, jedoch immer noch in signifikant hohen Mengen von z. B. 59 mg Au/g SlfB und 76 mg Au/g Slp1. Die weiteren Metalle wie z. B. Europium wurden in geringeren jedoch sehr guten Raten durch die biologischen Komponenten gebunden. Da die untersuchten Metalle keine offensichtliche oder bekannte essentielle Funktion für die untersuchten Zellen aufweisen, kann die Interaktion der intakten Zellen und der verschiedenen Zellschichten mit diesen Metallen als ein Resultat von physiko-chemischen Interaktionsmechanismen und Transportsystemen angesehen werden, wie es in der Literatur diskutiert wird ³⁰⁸. Die Membranlipide beider Stämme zeigten in den Batch-Versuchen ebenfalls sehr gute Metallbindungsfähigkeiten mutmaßlich durch die Interaktionen mit den phosphathaltigen Kopfgruppen bzw. teilweise auch mit dem Fettsäureresten. Jedoch kann eine Beteiligung der Membranlipide an der Metallbindung intakter Zellen als sehr gering eingeschätzt werden, da der Zellmembran im Gesamtzellsystem das Makromolekül Peptidoglykan mit SCWPs (bis zu 80 nm stark) und die S-Layer-Proteinschicht (bis zu 15 nm stark) aufgelagert sind. Daher kann bei einer intakten Zellwand eine direkte Metallwechselwirkung mit den Membranlipiden nach bisherigem Kenntnisstand nahezu ausgeschlossen werden. Dennoch zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass es bevorzugte Metallbindungen der Mikroorganismen und Zellkomponenten gibt. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit die untersuchten biologischen Systeme für metallselektive biologisch inspirierte Filtermaterialien zu nutzen. Dabei ist der Einsatz abhängig von dem jeweiligen Stamm oder Komponente, der Metallspezies und den Umweltbedingungen (z. B. pH-Wert, Metallkonzentrationen und Temperatur). Die in dieser Arbeit verwendete Metallkonzentration von 1 mM liegen deutlich höher sonstige umweltrelevante Metallkonzentrationen (1-10 µg/l) oder beispielsweise bei Grenzwerten für Trinkwässer ^{100, 101}. Jedoch ist je nach Metall und Umgebung eine klare Definition einer umweltrelevanten Metallkonzentration schwierig, wodurch diese Angabe gewissen Schwankungen unterliegen ist. Daher wurde die Metallkonzentration von 1 mM gewählt, um die guten Sorptionseigenschaften der Biomoleküle darzustellen und Möglichkeiten aufzuzeigen Metalle aus höher konzentrierten Lösungen zu binden. Somit können die Biomoleküle beispielsweise zur Metallentfernung oder -rückgewinnung höher konzentrierter Metalllösungen (z. B. Edelmetalle) genutzt werden können. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Biomoleküle aufgrund der sehr guten Sorptionswerte in der

Lage sind auch kleinste Mengen Metalle zu binden und somit für die Entfernung von niedrigeren/umweltrelevanteren Metallkonzentrationen aus Wässern genutzt werden können.

Die Untersuchungen der Einzelkomponenten in Suspension lieferten jedoch nur begrenzt Informationen zur Interaktion der Metalle mit den Schichten wie sie unter natürlichen Bedingungen in der Zelle vorkommen. Daher wurden unter Verwendung der QCM-D erstmals die primären Zellwandkomponenten beider Mikroorganismen (S-Layer und Peptidoglykan) sowie von Referenzlipiden an Grenzflächen erfolgreich im nanoskaligen Bereich abgeschieden und *online* verfolgt. Dadurch war es möglich vereinfachte Einzelschichtsysteme der gram-positiven bakteriellen Zellwand nachzubilden. In den Untersuchungen konnten stabile Schichten generiert werden, welche vergleichbar zu dem Schichtsystem vitaler Zellen sind. Zusätzlich konnte bei den Abscheidungen der S-Layer-Proteine SlfB und Slp1 der positive Effekt von Polyelektrolytmodifizierungen auf das Rekristallisationsverhalten, die Schichtstabilität und den Bedeckungsgrad auf der technischen Oberfläche aufgezeigt werden. Zur Untersuchung der Metallinteraktion zellulärer Einzelschichtsysteme wurden in dieser Arbeit exemplarisch nach den erfolgreichen Untersuchungen zur Rekristallisation, die S-Layer-Proteine als erste Interaktionsschicht des Gesamtzellsystems mit der QCM-D untersucht. Die S-Layer-Proteine wurden hierzu stabil und in einer nahezu vollständig geschlossenen Schicht auf den Quarzsensoren rekristallisiert und mit den entsprechenden Metalle inkubiert, welche zuvor in den Batch-Versuchen genutzt wurden. Diese Untersuchungen belegen den Einfluss einzelner Metalllösungen auf die sehr stabile Proteinschicht. Dabei konnten analog der Untersuchungen im Batch-Verfahren eine sehr hohe Affinität der S-Layer-Proteinschicht zu den Edelmetallen Gold und Palladium detektiert werden. Die hohen Massenabscheidungen (Frequenzänderungen) der beiden Edelmetalle können zudem auch durch die Bildung kleinster metallischer Nanopartikel infolge der intrinsischen Reduktionseigenschaften der S-Layer-Proteine hervorgerufen werden. Mit der QCM-D Methode war es möglich die schnelle Metallinteraktion innerhalb der ersten Minuten nach der Metallzugabe zu detektieren und so die sehr schnell ablaufenden Bindungsvorgänge an Einzelschichtsystemen in Echtzeit verfolgen zu können. Zusätzlich bietet die QCM-D Technik die Möglichkeit kleinste Massenänderungen infolge von Metall-Biomolekülinteraktionen zu detektieren. Dadurch können selbst niedrigere Metallkonzentrationen und deren Einfluss z. B. auf die S-Layer-Proteine unter dem Aspekt umweltrelevanter Metallkonzentrationen untersucht werden. Anders als bei den Batch-Untersuchungen konnten die Metallbindungen von As, Cd, Pb, Pt und U nur teilweise bestimmt werden, da diese Metalllösungen einen destabilisierenden Effekt auf die rekristallisierte Proteinschicht ausgeübt haben. Es konnte hierbei auf eine Denaturierung der S-Layer-Proteinschicht durch diese Metalle geschlossen werden, die erstmals für diese Proteine unter Verwendung der QCM-D auf nanoskaliger Ebene detektiert werden konnte. Für S-Layer-Proteine auf der vitalen Zelloberfläche kann dieser Effekt der schwermetallinduzierten Ablösung von der Zelle (z. B. durch Blei) infolge von Denaturierung derzeit nur vermutet werden. Es kann jedoch damit aufgezeigt werden, dass die S-Layer-Proteine eine der wichtigsten Zellkomponenten darstellen, welche die Zelle vor dem Einfluss hoher Metallkonzentrationen schützen. Ebenfalls wäre es möglich, dass die Zelle unter Stressbedingungen genau diesen Effekt der Proteindenaturierung zur Schwermetallbindung ausnutzt und

eine weitere Lage von S-Layer-Proteinen bildet, welche nach dem Ablösen der denaturierten Proteinschicht als neue Schutzschicht der Zelle dienen könnten. Dies könnte die teilweise sehr hohen Metallbindungsraten des intakten Zellsystems erklären. Durch die in den Batch-Versuchen detektierten hohen Metallbindungsraten der S-Layer-Proteine kann davon ausgegangen werden, dass die denaturierten Proteine in der Lage sind signifikante Mengen an Schwermetallen zu binden. Gleiches gilt für die abgelösten Proteinschichten in den QCM-D Versuchen. Zusammenfassend konnten in den QCM-D Versuchen Bindungspräferenzen der S-Layer-Proteine detektiert werden und die stabilisierende Wirkung von Gold, Palladium auf die S-Layer-Proteinschichten dargestellt werden. Durch diese Untersuchungen ist es gelungen das Verständnis der Metallinteraktion der Einzelschichten auf molekularer Ebene zu stärken, was zu einem besseren Verständnis der Metallinteraktion des Gesamtsystems intakter Zellen beider verwendeter Mikroorganismen führt.

In den spektroskopischen Untersuchungen (TRLFS) der Zellwandkomponenten konnten die lumineszierenden Eigenschaften von Europium ausgenutzt werden, um das Metallbindungsverhalten der einzelnen Komponenten als auch des Gesamtsystems der Zellen beider Mikroorganismen zu bestimmen. Somit konnte Europium als spektroskopische Sonde eingesetzt werden um Rückschlüsse die Biomolekül-Metallwechselwirkungen zu ermöglichen. Dabei konnten vor allem mit den beiden oberflächennahen Zellschichten wie S-Layer-Proteine und PG+ in Lösung teilweise sehr starke Metall-Biomolekül-Wechselwirkungen beobachtet werden. Durch die detektierten längeren Lumineszenzlebenszeiten und der Anzahl der koordinierenden Wassermoleküle, kann daher auf die Bildung sehr stabiler Europium-Biomolekülkomplexe geschlossen werden. Zusätzlich war es durch den Vergleich mit literaturbekannten Werten möglich, potentielle Bindungsstellen zuzuordnen. Dabei konnten vor allem bei den S-Layer-Proteinen und Peptidoglykan mit SCWPs eine sehr starke Europiuminteraktion mit Carboxyl- und Aminogruppen nachgewiesen werden, was die Aussagen aus den Batch-Versuchen nochmals bestätigt. Eine Interaktion mit Phosphatgruppen der SCWPs als auch mit denen der Membranlipide konnte in den Untersuchungen nicht festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Europiumbindung bevorzugt an anderen funktionellen Gruppen erfolgt. Jedoch kann durch ein mögliches Quenchen durch Metallionen wie z. B. Eisen oder Mangan oder durch das Kohlenstoffgrundgerüst die ermittelten Lumineszenzlebenszeiten einer Unterbestimmung unterliegen, wodurch eine Phosphatinteraktion zum derzeitigen Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden kann. Durch die Untersuchung der Einzelkomponenten waren jedoch erste Aussagen zu potentiellen Bindungsbeteiligungen oberflächennaher Schichten am Gesamtsystem intakter Zellen möglich die als Basis für weitere Arbeiten dienen können. Vor allem S-Layer-Proteine und Peptidoglykan mit SCWPs können durch die hohe Anzahl an Carboxyl- und Aminofunktionalitäten an der Metallbindung der Zellen beteiligt sein. Tieferliegende Zellschichten wie z. B. die Membranlipide sollten nicht direkt mit den Metallen außerhalb der Zelle interagieren können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine bevorzugte Bindung der Biomoleküle in Lösung mit den Edelmetallen Gold und Palladium als auch mit den Schwermetallen Blei, Uran und Europium festgestellt werden. Die bevorzugten Metallbindungsreihen der untersuchten Zellkomponenten und

intakten Zellen sind dazu in den jeweiligen Kapiteln dieser Arbeit zusammengefasst. Dabei zeigt jedes der untersuchten Biomoleküle sehr gute Metallbindungsfähigkeiten als Einzelkomponente auf. Betrachtet man jedoch die mögliche Beteiligung der Einzelschichten an der Metallbindung des Gesamtsystems, so sind wahrscheinlich nur oberflächennahe Zellwandschichten an der Metallinteraktion beteiligt und sollten hierfür berücksichtigt werden. Durch die detektierten Bindungspräferenzen einzelner Metalle mit den untersuchten Biomolekülen in dieser Arbeit ist es möglich metallselektive Filtermaterialien zu entwickeln um beispielsweise höher konzentrierte Edelmetalle (Au, Pd) und Schwermetalle (Pb, U) aus Industriebässern von anderen Metallen abzutrennen. Weniger geeignet ist jedoch die Abtrennung von As und Pt durch die Einzelkomponenten im Vergleich zu den anderen untersuchten Metallen, aufgrund der geringeren Metallbindungsraten. Dies zeigt jedoch die hohe Selektivität der untersuchten biologischen Komponenten auf. Betrachtet man hingegen die Metallinteraktion auf molekularer Ebene mit abgeschiedenen Zellwandschichten wie z. B. der S-Layer-Proteine so lässt sich erkennen, dass diese Schichten gegenüber verschiedener Metallsalzlösungen sehr instabil sind und somit in ihrer rekristallisierten Form auf Oberflächen weniger für den Einsatz als Filtermaterialien für Metalle wie Blei, Cadmium oder Platin geeignet sind. Durch den stabilisierenden Effekt von Gold und Palladium auf die S-Layer-Proteinstrukturen, sind diese jedoch sehr gut geeignet selektiv diese beiden Edelmetalle zu binden. Die detektierten hohen Abscheidungsraten auf den Proteinstrukturen können jedoch auch ein Indiz die intrinsischen Reduktionseigenschaften der S-Layer-Proteine sein, wodurch hochgeordnete metallische Nanopartikelcluster definierten Größen abgeschieden werden könnten. Somit können die S-Layer-Proteinstrukturen als Biotemplat zur Herstellung katalytischer und sensorischer Schichten für die Bionanotechnologie fungieren. Aufgrund der sehr guten Resultate der Metallbindung von Gold wurde mit der QCM-D erstmals die stabile Adsorption synthetisierter Goldnanopartikel aufgezeigt. Diese stabilen und intakten Schichten konnten analog zu den Schichtuntersuchungen der reinen biologischen Komponenten und nach den QCM-D Metallinteraktionsstudien mit den S-Layer Strukturen mittels der Rasterkraftmikroskopie untersucht und bildgebend dargestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die S-Layer-Proteine als Biotemplat genutzt werden können um Metallnanopartikel strukturiert abzuscheiden und diese für technische Anwendungen wie sensorische Schichten zu nutzen. Aufgrund der besseren Ergebnisse der Metallbindungen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 sollte dieser Stamm für die Entwicklung verschiedener Anwendungen für die Bionanotechnologie bevorzugt werden.

6 **Ausblick**

Durch die stetig wachsende Bedeutung der Sanierung von schwermetallkontaminierten Umwelthabitaten und dem Recycling strategisch wertvoller Edel- und Seltener Erdmetalle sind umweltschonende und effiziente Sorptionsverfahren wie die Biosorption und Bioakkumulation biologischer Systeme von lebenden Zellen und zellulären Bestandteilen von gesteigertem Interesse für Forschungsarbeiten und die Industrie. Ebenfalls ist die Generierung geeigneter *online*-Sensorkonzepte zur Detektion von Metallkontaminationen sowohl in der Trink- als auch Abwasseranalytik von großem Interesse. Daher bedarf es intensiver Forschungsarbeiten zum Sorptionsverhalten von metalltoleranten Mikroorganismen und deren zellulären Bestandteilen sowohl in Untersuchungen freier Biomoleküle als auch an biologischen Schichtsystemen. Die detaillierte Aufklärung struktureller Eigenschaften ermöglicht dabei ein verbessertes Verständnis der Sorptionsprozesse sowohl an dem Gesamtsystem der Zellen als auch den Einzelkomponenten.

In den vorgestellten Arbeiten wurden die Bindungspräferenzen der biologischer Sorptionsmaterialien der beiden Stämme aus Einzelmetalllösungen aufgezeigt und die teilweise sehr hohen Metall-sorptionsraten diskutiert. Zur Aufstellung metallselektiver Bindungsreihen ist in weiteren Versuchen geplant, die Biomoleküle mit Multimetallsalzlösungen, realer kontaminierter Sicker- und Industrierwässer als auch simulierter Multimetallsalzlösungen im Labormaßstab zu inkubieren. Dies soll die Entwicklung metallselektiver Filtermaterialien bis zur technischen Anwendung weiter voranzubringen. Dazu ist es vorher jedoch unabdingbar die Biokomponenten bezüglich deren strukturellen Aufbaus und dem Vorhandensein spezifischer funktioneller Gruppen zu untersuchen um ein besseres Verständnis potentieller Metallbindungsstellen zu erhalten. Gerade das Makromolekül Peptidoglykan mit den sekundären Zellwandpolymeren sollte dabei, aufgrund seiner sehr guten Metallbindungseigenschaften und der hohen Verfügbarkeit an funktionellen Gruppen, in den Fokus der Analysen wie z. B. NMR, Massenspektrometrie und UV-VIS gestellt werden. Über bisherige NMR-Untersuchungen waren die Peptidoglykanstrukturen der beiden Stämme nicht zugänglich. Ebenfalls sind in anschließenden Arbeiten die Extraktion und Analyse der SCWPs aus der PG+ Struktur und nachfolgenden Metallbindungsversuchen mit extrahierten Teichonsäuren und Teichuronsäuren als auch mit PG- zum besseren Verständnis der Bindungsereignisse durchzuführen.

Die TRLFS stellte in den Arbeiten eine sehr gute Möglichkeit der begleitenden Analytik dar um Bindungsereignisse an funktionellen Gruppen und der Stärke der Eu-Biomolekül-Komplexe abzuleiten. Daher sollten die TRLFS Untersuchungen intensiviert werden um einen tieferen Einblick in die Bindungsprozesse zu erhalten. Der Vergleich der Wechselwirkung mit Carbonsäuren oder Phosphatgruppen der Membranlipide und PG+ zu den Lumineszenzlebenszeiten literaturbekannter Verbindungen zeigten jedoch kleine Abweichungen. Dies könnte auf Quechingeffekte hindeuten, welche gezielt untersucht werden sollten. Ebenfalls sollten zu einem besseren Verständnis der von Metallinteraktionen der komplex aufgebauten Strukturen der isolierten Einzelkomponenten gezielt niedermolekulare Referenzsubstanzen untersucht werden. Dabei sollten die erstmaligen

Untersuchungen von Carbonsäureestern oder Glycerolfettsäureester interessante Lösungsansätze bieten um die Europiuminteraktion mit diesen Biomolekülen und der Lumineszenzlebenszeiten dieser Komplexe besser beschreiben zu können um eine detailliertere Datenbasis für den Vergleich zu dreiwertigen Actinidenverbindungen zu generieren. Ebenfalls sollten TRLFS-Untersuchungen kleinerer Proteinfragmente von SlfB und Slp1 als einfacheres Bezugssystem durchgeführt werden, mit welchem die Proteine besser verglichen werden können. Ferner sollten die beobachteten Effekte der Verkürzung der Lumineszenzlebenszeiten, welche durch ein mögliches Quenchen durch Metallionen oder das Kohlenstoffgrundgerüst hervorgerufen wurden, näher betrachtet werden.

Die Nutzung der Quarzmikrowaage mit Dissipationsmonitor hat gezeigt, dass dieses System sehr gut geeignet ist stabile biologische Einzelschichten abzuscheiden und somit vereinfachte Systeme der gram-positiven Zellwand abzubilden. Durch die weitere Nutzung dieser Technik und dem Aufbau von biologischen Multischichtsystemen bestehend aus Lipiddoppelschicht, Peptidoglykan- und S-Layer-Proteinschichten kann eine vollständige gram-positive Zellwand simuliert und die Metallinteraktionen dieser komplexeren Schicht untersucht werden. Damit kann ein komplexes Bezugssystem zu vitalen Zellen geschaffen werden, welches das Verständnis zellwandassoziierter Metallsorptionen erleichtern kann. In ersten Untersuchungen der QCM-D erfolgten bereits stabile Abscheidungen vitaler Zellen auf technischen Oberflächen. In Erweiterung dieser Versuche können Metallbindungsversuche mittels der QCM-D im nanoskaligen Bereich durchgeführt werden und ermöglichen somit eine schnelle *online* Methode zur Detektion biosorptiver und bioakkumulativer Prozesse. Die Ausbildung rekristallisierter S-Layer-Proteinschichten hat gezeigt, dass diese Matrix für spezifische Metalle geeignet ist, um diese aus wässrigen Lösungen zu extrahieren und stabil zu binden. Daher stellen diese hochgeordneten Strukturen sehr gute Metallfilter dar, welche regenerierbar und kosteneffizient für technische Anwendungen genutzt werden können. Hier sollte der Aufbau von Multischichtsystemen bestehend aus unterschiedlichen metallselektiven S-Layer-Proteinen fokussiert werden, um Filtermaterialien für eine breite Auswahl an Metallen zu entwickeln. Ein interessanter Ansatzpunkt könnten beispielsweise Multischichtsysteme von S-Layer-Proteinen auf sphärischen Partikeln oder beschichteten Polymerbeads darstellen, welche entweder direkt kontaminierten Wässern zur Reinigung zugegeben werden und leicht für die Filterregeneration abtrennbar sind oder partikulär als Füllmaterial in Festbettreaktoren eingesetzt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen die Katalyse und Sensorik dar. Hier können biologische hochstrukturierte Biotemplate wie S-Layer-Proteine oder Lipiddoppelschichten genutzt werden um strukturierte Metallnanopartikel abzuscheiden. Diese können für chemische oder photokatalytische Prozesse sowie der Entwicklung sensorischer Schichten oder biokompatibler Oberflächen genutzt werden. Hier stellt die QCM-D in Kombination mit der Rasterkraftmikroskopie eine ideale Methode dar um solche Schichten nicht nur zu erzeugen, deren Abscheidungen zu verfolgen und Stabilitäten zu prüfen, sondern vielmehr die Effizienz und Funktionalitäten solcher Schichten nachzuweisen und als Grundlage für die Filterentwicklung im technischen Maßstab zu dienen.

7 Literaturverzeichnis

1. Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774 (1998).
2. Doolittle, W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284, 2124-2128 (1999).
3. Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 4576-4579 (1990).
4. Turnbull, P.C.B. in *Medical Microbiology*, Edn. 4th (University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX), 1996).
5. Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1-17 (2004).
6. Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie*. (Springer, 2010).
7. Gavrilescu, M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences* 4, 219-232 (2004).
8. Mullen, M.D.W., D.C.; Ferris, F.G.; Beveridge, T.J.; Flemming, C.A.; Bailey, G.W. Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3143-3149 (1989).
9. Duxbury, T. & Bicknell, B. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 243-250 (1983).
10. Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261-278 (2004).
11. Vijayaraghavan, K. & Yun, Y.-S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* 26, 266-291 (2008).
12. Mudhoo, A., Garg, V.K. & Wang, S.B. Removal of heavy metals by biosorption. *Environ. Chem. Lett.* 10, 109-117 (2012).
13. Schiewer, S. & Volesky, B. Biosorption processes for heavy metal removal. *Environmental Microbe-Metal Interactions*, 329-362 (2000).
14. Wang, J.L. & Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27, 195-226 (2009).
15. Raff, J. & Selenska-Pobell, S. Toxic avengers. *Nucl. Eng. Int.* 51, 34-36 (2006).
16. Selenska-Pobell, S. et al. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 59-67 (1999).
17. Nies, D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730-750 (1999).
18. Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092-1101 (2001).
19. Oarga, A. Life in extreme environments. *Rev Biol Cienc Terra* 9, 1-10 (2009).
20. Selenska-Pobell, S., Kampf, G., Flemming, K., Radeva, G. & Satchanska, G. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 149-161 (2001).
21. Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A. & Fujiwara, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 1117-1125 (2007).
22. Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K. & Selenska-Pobell, S. Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnol. Adv.* 24, 58-68 (2006).
23. Panak, P. et al. Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U(VI). *J. Alloy. Compd.* 271, 262-266 (1998).

24. Panak, P.J. et al. Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile. *Radiochim. Acta* 88, 71-76 (2000).
25. Drobot, B. Schematic of gram-positive bacteria. POV-RAY, Vers. 3.6, *Bacterial cell and cell-metal interaction*, Dresden (HZDR) (2013).
26. Silhavy, T.J., Kahne, D. & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000414 (2010).
27. Vadillo-Rodriguez, V. & Dutcher, J.R. Viscoelasticity of the bacterial cell envelope. *Soft Matter* 7, 4101-4110 (2011).
28. Shockman, G.D. & Barren, J. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 37, 501-527 (1983).
29. Vance, J.E. & Vance, D.E. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. (Elsevier, 2008).
30. Kaneda, T. Fatty acids in the genus *Bacillus* I. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* 93, 894-903 (1967).
31. Drobot, B. Schematic of Lipid Bilayer. POV-RAY, Vers. 3.6, *Bacterial cell and cell-metal interaction*, Dresden (HZDR) (2014).
32. Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149-167 (2008).
33. Beveridge, T.J. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem* 76, 111-118 (2001).
34. Schleifer, K.H. & Kandler, O. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell-Walls and Their Taxonomic Implications. *Bacteriological Reviews* 36, 407-477 (1972).
35. Delcour, A.H. Bacterial cell surfaces : methods and protocols. (Humana Press ; Springer, New York; 2013).
36. Weidenmaier, C. & Peschel, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Micro* 6, 276-287 (2008).
37. Bhavsar, A.P. & Brown, E.D. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Molecular Microbiology* 60, 1077-1090 (2006).
38. Sleytr, U.B., Sara, M., Pum, D., Schuster, B. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* 68, 231-278 (2001).
39. Sleytr, U. et al. Nanobiotechnology with S-layer proteins as building blocks. *Molecular Assembly in Natural and Engineered Systems* 103, 277-352 (2011).
40. Houwink, A.L. A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum spec.* *Biochimica Et Biophysica Acta* 10, 360-366 (1953).
41. Sleytr, U.B. et al. S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 131-144 (2007).
42. Sleytr, U.B. et al. Self-assembling Protein Systems: Microbial S-layers. *Biopolymers Online* (2002).
43. Beveridge, T.J. & Graham, L.L. Surface-layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55, 684-705 (1991).
44. Stewart, M., Beveridge, T.J. & Trust, T.J. Two Patterns in the *Aeromonas salmonicida* A-Layer May Reflect a Structural Transformation That Alters Permeability. *J. Bacteriol.* 166, 120-127 (1986).
45. Schuster, B., Pum, D., Sara, M. & Sleytr, U.B. S-layer proteins as key components of a versatile molecular construction kit for biomedical nanotechnology. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 909-920 (2006).
46. Pum, D., Toca-Herrera, J.L. & Sleytr, U.B. S-layer protein self-assembly. *International journal of molecular sciences* 14, 2484-2501 (2013).
47. Horejs, C. et al. Atomistic Structure of Monomolecular Surface Layer Self-Assemblies: Toward Functionalized Nanostructures. *ACS Nano* 5, 2288-2297 (2011).
48. Sara, M. & Sleytr, U.B. S-layer proteins. *J. Bacteriol.* 182, 859-868 (2000).
49. Sleytr, U.B. & Beveridge, T.J. Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* 7, 253-260 (1999).

50. Gadd, G.M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119 (2004).
51. Bruins, M.R., Kapil, S. & Oehme, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotox Environ Safe* 45, 198-207 (2000).
52. Gadd, G.M. Heavy-Metal Accumulation by Bacteria and other Microorganisms. *Experientia* 46, 834-840 (1990).
53. Volesky, B. Biosorption and me. *Water Res.* 41, 4017-4029 (2007).
54. Volesky, B. & Holan, Z.R. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology progress* 11, 235-250 (1995).
55. Haferburg, G. & Kothe, E. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of basic microbiology* 47, 453-467 (2007).
56. Munoz, A.J. et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chem. Eng. J.* 210, 325-332 (2012).
57. Veglio, F. & Beolchini, F. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44, 301-316 (1997).
58. Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R. & Mohapatra, H. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *current Science-Bangalore-* 78, 967-973 (2000).
59. Das, N., Vimala, R. & Karthika, P. Biosorption of heavy metals—an overview. *Indian Journal of Biotechnology* 7, 159-169 (2008).
60. Francis, A.J. Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes. *J. Alloy. Compd.* 271, 78-84 (1998).
61. Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M. & Peijnenburg, W.J.G.M. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705-4712 (2004).
62. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W. & Garg, S.K. Chromium (VI) biosorption and bio-accumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48, 427-435 (2002).
63. Francis, A. Microbial dissolution and stabilization of toxic metals and radionuclides in mixed wastes. *Experientia* 46, 840-851 (1990).
64. Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. & Sand, W. Bioleaching review part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 239-248 (2003).
65. Beveridge, T.J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Reviews in Microbiology* 43, 147-171 (1989).
66. Addadi, L. & Weiner, S. Control and Design Principles in Biological Mineralization. *Angewandte Chemie International Edition in English* 31, 153-169 (1992).
67. Nudelman, F. & Sommerdijk, N.A.J.M. Biomineralization as an Inspiration for Materials Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 6582-6596 (2012).
68. Kröger, N. & Brunner, E. Complex-shaped microbial biominerals for nanotechnology. *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 615-627 (2014).
69. Gröger, C., Lutz, K. & Brunner, E. Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization. *Cell Biochem Biophys* 50, 23-39 (2008).
70. Beazley, M.J., Martinez, R.J., Sobecky, P.A., Webb, S.M. & Taillefert, M. Uranium Biomineralization as a Result of Bacterial Phosphatase Activity: Insights from Bacterial Isolates from a Contaminated Subsurface. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5701-5707 (2007).
71. Jroundi, F. et al. Spectroscopic and Microscopic Characterization of Uranium Biomineralization in *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiology Journal* 24, 441-449 (2007).
72. Brainard, J.R. et al. Actinide binding and solubilization by microbial siderophores. *Radiochimica Acta* 58, 357-364 (1992).

-
73. Kraemer, S.M., Xu, J., Raymond, K.N. & Sposito, G. Adsorption of Pb (II) and Eu (III) by oxide minerals in the presence of natural and synthetic hydroxamate siderophores. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1287-1291 (2002).
 74. Hodson, M.E. Heavy metals - geochemical bogey men? *Environmental Pollution* 129, 341-343 (2004).
 75. Duffus, J.H. "Heavy Metals" - a Meaningless Term? *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807 (2002).
 76. Zeno. Volltext Philosophie: Theophrast Paracelsus: Werke. Bd. 2, D., S. 508-513.: Die dritte Definition wegen des Schreibens der neuen Rezepte, zugänglich über: <http://www.zeno.org/Philosophie/M/Paracelsus/Septem+Defensiones/Die+dritte+Defension+wege+n+des+Schreibens+der+neuen+Rezepte>; Zugriff am 18.12.2014.
 77. Reeder, R.J., Schoonen, M.A.A. & Lanzirrotti, A. Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Medical Mineralogy and Geochemistry* 64, 59-113 (2006).
 78. Sheraleti, I. Soil Heavy Metals. *Springer* (2010).
 79. Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C. & Ruedel, H. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotox Environ Safe* 56, 45-51 (2003).
 80. Sarkar, B. Heavy metals in the environment. (CRC Press, 2002).
 81. Morel, F.M. Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr* 40, 1056-1063 (1995).
 82. Silver, S. & Phung, L.T. Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annual review of microbiology* 50, 753-789 (1996).
 83. Moeller, E. Handbuch Konstruktionswerkstoffe: Auswahl, Eigenschaften, Anwendung. (Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2013).
 84. GFMS Materials Flow of Platinum Group Metals. *Thomson Reuters GFMS, Öko-Institute and Umicore* (2006).
 85. Hagenlücken, C. Materials Flow of Platinum Group Metals – Systems Analysis and Measures for Sustainable Optimization of the Materials Flow of Platinum Group Metals. *Umicore Precious Metals Refining and Öko-Institut* (2005).
 86. Alloway, B.J. Heavy Metals in Soils : Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. *Springer* (2012).
 87. Das, N. Recovery of precious metals through biosorption - A review. *Hydrometallurgy* 103, 180-189 (2010).
 88. Cui, J. & Forssberg, E. Mechanical recycling of waste electric and electronic equipment: a review. *J. Hazard. Mater.* 99, 243-263 (2003).
 89. Seaborg, G.T. Overview of the actinide and lanthanide (the f) elements. *Radiochimica Acta* 61, 115-122 (1993).
 90. Nazarov, M. & Noh, D.Y. New Generation of Europium- and Terbium-Activated Phosphors : From Syntheses to Applications. *CRC Press* (2011).
 91. Resende, L.V. & Morais, C.A. Study of the recovery of rare earth elements from computer monitor scraps–Leaching experiments. *Minerals Engineering* 23, 277-280 (2010).
 92. Castor, S.B. & Hedrick, J.B. Rare earth elements. *Industrial Minerals volume, 7th edition: Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Littleton, Colorado*, 769-792 (2006).
 93. Hedrick, J.B. Rare earth metals. *Minerals Yearbook 1996* (1997).
 94. Buchert, M., Schüler, D. & Bleher, D. Critical Metals for Future Sustainable Technologies and their Recycling Potential. *United Nations Environment Programme & United Nations University* (2009).
 95. Gschneidner, K.A., Eyring, L. & Lander, G.H. Handbook on the physics and chemistry of rare earths, Vol. 32. (Elsevier, 2001).
 96. Guillaumont, D. Quantum chemistry study of actinide (III) and lanthanide (III) complexes with tridentate nitrogen ligands. *The Journal of Physical Chemistry A* 108, 6893-6900 (2004).
-

-
97. Craft, E.S. et al. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 7, 297-317 (2004).
 98. Domingo, J.L. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reproductive Toxicology* 15, 603-609 (2001).
 99. Bleise, A., Danesi, P. & Burkart, W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93-112 (2003).
 100. Borchers, U. Die Revision der Trinkwasserverordnung von 2001–Was ist neu? *Vom Wasser* 109, 1-30 (2011).
 101. Bundesministerium für Gesundheit und Bundesministerium für Umwelt Naturschutz und Reaktorsicherheit in Bundesgesetzblatt Jahrgang 2011 Teil I Nr. 21 Bonn; 2011).
 102. Wall, J.D. & Krumholz, L.R. Uranium reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 149-166 (2006).
 103. Baiget, M., Constantí, M., López, M.T. & Medina, F. Uranium removal from a contaminated effluent using a combined microbial and nanoparticle system. *New Biotechnology* 30, 788-792 (2013).
 104. Sengupta, A.K. Ion exchange technology: advances in pollution control. (CRC Press, 1995).
 105. Hermann, A., Suhr, B. & Liebscher, B. Extraction chromatographic separation of uranium and fission products in the system di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid-hydrochloric acid. *Journal of Radioanalytical Chemistry* 51, 253-266 (1979).
 106. Rosen, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. *Febs Lett* 529, 86-92 (2002).
 107. Järup, L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182 (2003).
 108. Hutchinson, T.C.M., K.M. Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment, Vol. 31. (John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto,; 1987).
 109. Bradl, H. Heavy Metals in the Environment : Origin, Interaction and Remediation. *Elsevier Science* (2005).
 110. Wang, L.K., Chen, J.P., Hung, Y.-T. & Shammass, N.K. Heavy Metals in the Environment. *CRC Press* (2009).
 111. Naja, G., Mustin, C., Volesky, B. & Berthelin, J. Biosorption study in a mining wastewater reservoir. *Int. J. Environ. Pollut.* 34, 14-27 (2008).
 112. Chojnacka, K. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environ. Int.* 36, 299-307 (2010).
 113. Vilar, V.J.P., Botelho, C.M.S. & Boaventura, R.A.R. in Security of Industrial Water Supply and Management. (eds. A.T. Atimtay & S.K. Sikdar) 159-173 (Springer, Dordrecht; 2010).
 114. Lovley, D.R. & Lloyd, J.R. Microbes with a mettle for bioremediation. *Nat. Biotechnol.* 18, 600-601 (2000).
 115. Godlewska-Zylkiewicz, B. Biosorption of platinum and palladium for their separation/preconcentration prior to graphite furnace atomic absorption spectrometric determination. *Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.* 58, 1531-1540 (2003).
 116. Darnall, D.W. et al. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 20, 206-208 (1986).
 117. Amini, M., Younesi, H. & Bahramifar, N. Biosorption of U(VI) from Aqueous Solution by *Chlorella vulgaris*: Equilibrium, Kinetic, and Thermodynamic Studies. *J. Environ. Eng.-ASCE* 139, 410-421 (2013).
 118. Vogel, M. et al. Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Sci. Total Environ.* 409, 384-395 (2010).
 119. Creamer, N., Baxter-Plant, V., Henderson, J., Potter, M. & Macaskie, L. Palladium and gold removal and recovery from precious metal solutions and electronic scrap leachates by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnol. Lett.* 28, 1475-1484 (2006).
 120. Markai, S., Andres, Y., Montavon, G. & Grambow, B. Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modeling and reversibility. *J. Colloid Interface Sci.* 262, 351-361 (2003).
-

-
121. Ledin, M. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51, 1-31 (2000).
 122. Chassary, P., Vincent, T., Marcano, J.S., Macaskie, L.E. & Guibal, E. Palladium and platinum recovery from bicomponent mixtures using chitosan derivatives. *Hydrometallurgy* 76, 131-147 (2005).
 123. Maruyama, T. et al. Proteins and Protein-Rich Biomass as Environmentally Friendly Adsorbents Selective for Precious Metal Ions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1359-1364 (2007).
 124. Barkleit, A., Moll, H. & Bernhard, G. Complexation of uranium (VI) with peptidoglycan. *Dalton Transactions*, 5379-5385 (2009).
 125. Yan, G. & Viraraghavan, T. Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. *Bioresour. Technol.* 78, 243-249 (2001).
 126. Pannier, A. et al. Long-term activity of biohybrid coatings of atrazine-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. ADP. *RSC Advances* 4, 19970-19979 (2014).
 127. Raff, J., Soltmann, U., Matys, S., Selenska-Pobell, S.; Bottcher, H., Pompe, W. Biosorption of uranium and copper by biocers. *Chem. Mat.* 15, 240-244 (2003).
 128. Suhr, M. et al. Investigation of metal sorption behavior of Slp1 from *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – A combined study using QCM-D, ICP-MS and AFM. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 27, 1337-1349 (2014).
 129. Kasemo, B. Biological surface science. *Surface Science* 500, 656-677 (2002).
 130. Weinert, U., Pollmann, K. & Raff, J. Fluorescence resonance energy transfer by S-layer coupled fluorescence dyes. *Sens. Actuator B-Chem.* 185, 553-559 (2013).
 131. Astruc, D., Lu, F. & Aranzaes, J.R. Nanopartikel als regenerierbare Katalysatoren: an der Nahtstelle zwischen homogener und heterogener Katalyse. *Angewandte Chemie* 117, 8062-8083 (2005).
 132. Günther, T.J. S-Layer als Technologieplattform – Selbstorganisierende Proteine zur Herstellung funktionaler Beschichtungen. Dissertation *Technische Universität Dresden* (2014 eingereicht).
 133. Glomm, W.R. Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology. *Journal of Dispersion Science and Technology* 26, 389-414 (2005).
 134. Sleytr, U.B., Egelseer, E.M., Ilk, N., Pum, D. & Schuster, B. S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *Febs J.* 274, 323-334 (2007).
 135. Mashaghi, S., Jadidi, T., Koenderink, G. & Mashaghi, A. Lipid nanotechnology. *International journal of molecular sciences* 14, 4242-4282 (2013).
 136. Suhr, M. Einsatz von optischen und elektrooptischen Messmethoden zur Kontrolle von Fermentationsprozessen unterschiedlicher Mikroorganismen. Masterarbeit *HTW Dresden* (2009).
 137. Debreczeny, M., O'Neill, M.P., Kasapi, A. Self-compensating radiation sensor with wide dynamic range. Patent: US 6,573,991 B1 (2003).
 138. Debreczeny, M., Romero, J., Petersen, E. Particle sensor with wide linear range. Patent: US2009/0075248 A1 (2009).
 139. Engelhardt, H., Saxton, W.O. & Baumeister, W. 3-Dimensional structure of the tetragonal surface-layer of *Sporosarcina-urea*. *J. Bacteriol.* 168, 309-317 (1986).
 140. Raff, J. Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden mit Schwermetallen. PhD thesis *University of Leipzig* (2002).
 141. Sprott, G.D., Koval, S.F., Schnaitman, C.A. Methods for general and molecular bacteriology, Vol. 1325. (American Society for Microbiology, Washington, DC; 1994).
 142. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917 (1959).
 143. Morrison, W.R. & Smith, L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600-608 (1964).
-

-
144. Suhr, M., Raff, J., Pollmann, K. Isolation, characterization and biosorption of heavy metals with membrane lipids of *Lysinibacillus* sp. JG-B53. *HZDR, Annual Report 2012 - Institute of Resource Ecology* (2013).
 145. Lederer, F.L., Weinert, U., Gunther, T. J., Raff, J., Weiss, S., Pollmann, K. Identification of multiple putative S-layer genes partly expressed by *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53. *Microbiology* 159, 1097-1108 (2013).
 146. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 16, 1806-1815 (2000).
 147. Jesorka, A. & Orwar, O. in Annual Review of Analytical Chemistry, Vol. 1 801-832 (Annual Reviews, Palo Alto; 2008).
 148. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-& (1970).
 149. Stoscheck, C., Stoscheck & Deutscher, M.P. Quantitation of protein, Vol. 182. (1990).
 150. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
 151. Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M. & Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *J. Chromatogr. A* 1218, 2754-2774 (2011).
 152. Hahn-Deinstrop, E. Dünnschicht-Chromatographie-Praktische Durchführung und Fehlervermeidung, Vol. 27. (WILEY-VCH Verlag, Weinheim 1998).
 153. Holtzhauer, M. Biochemische Labormethoden, Vol. 3. Auflage. (Springer Verlag, Berlin Heidelberg; 1997).
 154. Drechsel, N. Isolierung und Charakterisierung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Mikroorganismen. Praxissemesterarbeit *University of Applied Sciences* (2012).
 155. Mangold, H.K. Thin-layer chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society* 38, 708-727 (1961).
 156. Skipski, V.P., Peterson, R.F. & Barclay, M. Separation of phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine, and other phospholipids by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 3, 467-470 (1962).
 157. Sciex Perkin Elmer Instruments, I C P M a s s S p e c t r o m e t r y - The 30-Minute Guide to ICP-MS. *PerkinElmer Sciex Instruments* (2001).
 158. Tangen, A. & Lund, W. A multivariate study of the acid effect and the selection of internal standards for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 54, 1831-1838 (1999).
 159. Ammann, A.A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry* 42, 419-427 (2007).
 160. Vanhaecke, F., Vanhoe, H., Dams, R. & Vandecasteele, C. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta* 39, 737-742 (1992).
 161. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift Fur Physik* 155, 206-222 (1959).
 162. Neubig, B. & Briese, W. Das grosse Quarz-Kochbuch: Quarze, Quarzoszillatoren, Quarz- und Oberflächenwellenfilter (SAW), Messtechnik ; mit 23 Tabellen. (Franzis, 1997).
 163. Höök, F. & Kasemo, B. in Piezoelectric Sensors, Vol. 5. (eds. A. Janshoff & C. Steinem) 425-447 (Springer Berlin Heidelberg, 2007).
 164. Voinova, M.V., Rodahl, M., Jonson, M. & Kasemo, B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Phys. Scr.* 59, 391-396 (1999).
 165. Edvardsson, M., Rodahl, M., Kasemo, B. & Höök, F. A dual-frequency QCM-D setup operating at elevated oscillation amplitudes. *Anal. Chem.* 77, 4918-4926 (2005).
 166. Reviakine, I., Rossetti, F.F., Morozov, A.N. & Textor, M. Investigating the properties of supported vesicular layers on titanium dioxide by quartz crystal microbalance with dissipation measurements. *J. Chem. Phys.* 122 (2005).
-

-
167. Fischer, H., Polikarpov, I. & Craievich, A.F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science* 13, 2825-2828 (2004).
168. Schuster, B., Pum, D. & Sleytr, U.B. S-layer stabilized lipid membranes (Review). *Biointerphases* 3, FA3-FA11 (2008).
169. Malmström, J., Agheli, H., Kingshott, P. & Sutherland, D.S. Viscoelastic Modeling of Highly Hydrated Laminin Layers at Homogeneous and Nanostructured Surfaces: Quantification of Protein Layer Properties Using QCM-D and SPR. *Langmuir* 23, 9760-9768 (2007).
170. Vörös, J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophys. J.* 87, 553-561 (2004).
171. Q-Sense Introduction and QCM-D Theory - Q-Sense Basic Training. *Q-Sense - Biolin Scientific* (2006).
172. Penfold, J., Staples, E., Tucker, I. & Thomas, R.K. Adsorption of mixed anionic and nonionic surfactants at the hydrophilic silicon surface. *Langmuir* 18, 5755-5760 (2002).
173. Harewood, K. & Wolff, J.S. Rapid electrophoretic procedure for detection of SDS-released oncornavirus RNA using polyacrylamide-agarose gels. *Anal. Biochem.* 55, 573-581 (1973).
174. Vig, J.R. UV ozone cleaning of surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films* 3, 1027-1034 (1985).
175. Krozer, A. & Rodahl, M. X-ray photoemission spectroscopy study of UV/ozone oxidation of Au under ultrahigh vacuum conditions. *J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films* 15, 1704-1709 (1997).
176. Habibi, N. et al. Nanoengineered polymeric S-layers based capsules with targeting activity. *Colloids and surfaces. B, Biointerphases* 88, 366-372 (2011).
177. Toca-Herrera, J.L. et al. Recrystallization of bacterial S-layers on flat polyelectrolyte surfaces and hollow polyelectrolyte capsules. *Small* 1, 339-348 (2005).
178. Decher, G., Lehr, B., Lowack, K., Lvov, Y. & Schmitt, J. New nanocomposite films for biosensors - Layer-by-Layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosens. Bioelectron.* 9, 677-684 (1994).
179. Decher, G. & Schmitt, J. Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes, Vol. 89. (Dr Dietrich Steinkopff Verlag, Berlin; 1992).
180. Hayat, M.A. Colloidal Gold - Principles, Methods and Applications, Vol. 1. (Academic Press, INC, London; 1989).
181. Muhlfordt, H. The preparation of colloidal Gold Nanoparticles using tannic-acid as an additional reducing agent. *Experientia* 38, 1127-1128 (1982).
182. Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933 (1986).
183. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy. *IBM J. Res. Dev.* 30, 355-369 (1986).
184. Drake, B. et al. Imaging crystals, polymers and processes in water with the Atomic Force Microscope. *Science* 243, 1586-1589 (1989).
185. Liu, S.Y. & Wang, Y.F. Application of AFM in Microbiology: A Review. *Scanning* 32, 61-73 (2010).
186. Müller, D.J. & Dufrene, Y.F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature Nanotechnology* 3, 261-269 (2008).
187. Györvary, E.S., Stein, O., Pum, D. & Sleytr, U.B. Self-assembly and recrystallization of bacterial S-layer proteins at silicon supports imaged in real time by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 212, 300-306 (2003).
188. Kern, W. & Puotinen, D.A. Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology. *RCA rev* 31, 187-206 (1970).
189. Kern, W. The Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology. *Journal of The Electrochemical Society* 137, 1887-1892 (1990).
-

-
190. Günther, T.J., Suhr, M., Raff, J. & Pollmann, K. Immobilization of microorganisms for AFM studies in liquids. *RSC Advances* 4, 51156-51164 (2014).
 191. Valeur, B. & Berberan-Santos, M.N. Molecular fluorescence: principles and applications. (John Wiley & Sons, 2012).
 192. Moulin, C., Decambox, P., Moulin, V. & Decaillon, J.G. Uranium Speciation in Solution by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Anal. Chem.* 67, 348-353 (1995).
 193. Moulin, C., Decambox, P. & Mauchien, P. Analytical applications of Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence in the nuclear fuel cycle. *Le Journal de Physique IV* 1, C7-677-C677-680 (1991).
 194. Collins, R.N. et al. Applications of time-resolved laser fluorescence spectroscopy to the environmental biogeochemistry of actinides. *J. Environ. Qual.* 40, 731-741 (2011).
 195. Ghosh, R., Mondal, J.A., Ghosh, H.N. & Palit, D.K. Ultrafast Dynamics of the Excited States of the Uranyl Ion in Solutions. *The Journal of Physical Chemistry A* 114, 5263-5270 (2010).
 196. Binnemans, K. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. *Chemical reviews* 109, 4283-4374 (2009).
 197. Tscharnuter, W. Photon correlation spectroscopy in particle sizing. *Encyclopedia of analytical chemistry* (2000).
 198. Kutschke, S., Suhr, M. & Lehmann, F. Influence of nutrients on S-Layer formation. *FZD, Annual Report 2009 - Institute of Radiochemistry* (2010).
 199. Monod, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology* 3, 371-394 (1949).
 200. Schneider, K., Schutz, V., John, G.T. & Heinzle, E. Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* 33, 541-547 (2010).
 201. Pollmann, K., Raff, J., Schnorpfeil, M., Radeva, G. & Selenska-Pobell, S. Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion elements. *Microbiology* 151, 2961-2973 (2005).
 202. Lederer, F.L. Genetic characterization, heterologous expression and application of S-layer proteins from the bacterial isolates *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 and *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Dissertation *University Rostock* (2012).
 203. Bahl, H. et al. IV. Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 47-98 (1997).
 204. Grit, M., Underberg, W.J. & Crommelin, D.J. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Journal of pharmaceutical sciences* 82, 362-366 (1993).
 205. Zhang, J.A. & Pawelchak, J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 357-364 (2000).
 206. Grit, M., de Smidt, J.H., Struijke, A. & Crommelin, D.J.A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics* 50, 1-6 (1989).
 207. Daron, H.H. Fatty acid composition of lipid extracts of a thermophilic *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 101, 145-151 (1970).
 208. Chang, N.C. & Fulco, A.J. Effects of Temperature and fatty-acid structure on lipid-metabolism in *Bacillus-licheniformis* 9259. *Biochimica Et Biophysica Acta* 296, 287-299 (1973).
 209. Kaneda, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological reviews* 41, 391 (1977).
 210. Smith, P.B.W., Snyder, A.P. & Harden, C.S. Characterization of Bacterial Phospholipids by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 1824-1830 (1995).
 211. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731 (1972).
 212. Horton, H.R. et al. Biochemie. 4., aktualisierte Auflage. (Pearson Studium, 2008).
 213. Pulfer, M. & Murphy, R.C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass spectrometry reviews* 22, 332-364 (2003).
-

-
214. Kim, H.-Y., Wang, T.-C.L. & Ma, Y.-C. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Phospholipids using Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* 66, 3977-3982 (1994).
215. Milne, S., Ivanova, P., Forrester, J. & Alex Brown, H. Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods* 39, 92-103 (2006).
216. Cao, W., Zhang, K., Tao, G., Wang, X. & Liu, Y. Identification of the Fatty Acyl Residues Composition and Molecular Species of Phosphatidylcholines in Soy Lecithin Powder by UPLC-ESI-MS/MS. *Chromatographia* 75, 1271-1278 (2012).
217. Kerwin, J.L., Wiens, A.M. & Ericsson, L.H. Identification of fatty acids by electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 31, 184-192 (1996).
218. Caruso, F., Furlong, D.N. & Kingshott, P. Characterization of ferritin adsorption onto gold. *J. Colloid Interface Sci.* 186, 129-140 (1997).
219. Ward, M.D. & Buttry, D.A. Insitu interfacial mass detection with piezoelectric transducers. *Science* 249, 1000-1007 (1990).
220. Höök, F. et al. Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal. Chem.* 73, 5796-5804 (2001).
221. Günther, T., Raff, J., Pollmann, K. Recrystallization of bacterial S-layer on technical surfaces. *FZD, Annual Report 2009 - Institute of Radiochemistry* (2010).
222. Lasic, D.D. The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal* 256, 1 (1988).
223. Woodbury, D.J., Richardson, E.S., Grigg, A.W., Welling, R.D. & Knudson, B.H. Reducing Liposome Size with Ultrasound: Bimodal Size Distributions. *Journal of Liposome Research* 16, 57-80 (2006).
224. Schönherr, H., Johnson, J.M., Lenz, P., Frank, C.W. & Boxer, S.G. Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 20, 11600-11606 (2004).
225. Richter, R.P., Him, J.L.K. & Brisson, A. Supported lipid membranes. *Materials Today* 6, 32-37 (2003).
226. Coldren, B., Van Zanten, R., Mackel, M., Zasadzinski, J. & Jung, H.-T. From vesicle size distributions to bilayer elasticity via cryo-transmission and freeze-fracture electron microscopy. *Langmuir* 19, 5632-5639 (2003).
227. Provencher, S.W. CONTIN: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications* 27, 229-242 (1982).
228. Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606-1619 (2000).
229. Weiß, S. *Persönliche Mitteilung* HZDR (2012).
230. Keller, C. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* 75, 1397-1402 (1998).
231. Kunze, A., Sjövall, P., Kasemo, B. & Svedhem, S. In situ preparation and modification of supported lipid layers by lipid transfer from vesicles studied by QCM-D and TOF-SIMS. *J Am Chem Soc* 131, 2450-2451 (2009).
232. Reimhult, E., Höök, F. & Kasemo, B. Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†. *Langmuir* 19, 1681-1691 (2002).
233. Lewis, B.A. & Engelman, D.M. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* 166, 211-217 (1983).
234. Yao, X., Jericho, M., Pink, D. & Beveridge, T. Thickness and Elasticity of Gram-Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy. *J. Bacteriol.* 181, 6865-6875 (1999).
235. Fein, J.B., Daughney, C.J., Yee, N. & Davis, T.A. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim Cosmochim Acta* 61, 3319-3328 (1997).
-

-
236. Beveridge, T. & Koval, S. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 325-335 (1981).
237. Hoyle, B. & Beveridge, T. Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.* 30, 204-211 (1984).
238. Drechsel, N. Das Metallbindungsverhalten von Membranen Gram-positiver Bakterien. Bachelorarbeit *Hochschule Mittweida* (2012).
239. Viacava Romo, K.E. Investigation of heavy metals sorption behavior of isolated bacterial cell wall components of Gram-positive bacteria using ICP-MS and TRLFS. Master Thesis *Technische Universität Dresden* (2013).
240. Binder, H. & Zschörnig, O. The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chemistry and physics of lipids* 115, 39-61 (2002).
241. Suhr, M., Raff, J. & Pollmann, K. Isolation, characterization and biosorption of heavy metals with membrane lipids of *Lysinibacillus* sp. JG-B53. *HZDR, Annual Report 2012 - Institute of Resource Ecology* (2013).
242. Pearson, R.G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533-3539 (1963).
243. de Vargas, I., Macaskie, L.E. & Guibal, E. Biosorption of palladium and platinum by sulfate-reducing bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 49-56 (2004).
244. Friis, N. & Myers-Keith, P. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 21-28 (1986).
245. Choi, S. & Yun, Y.-S. Lead biosorption by waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* generated from lysine fermentation process. *Biotechnol. Lett.* 26, 331-336 (2004).
246. Hansen, H.K., Ribeiro, A. & Mateus, E. Biosorption of arsenic (V) with *Lessonia nigrescens*. *Minerals Engineering* 19, 486-490 (2006).
247. Yan, L. et al. Biosorption of inorganic and organic arsenic from aqueous solution by *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3. *J. Hazard. Mater.* 178, 209-217 (2010).
248. Matys, S., Katschner, B., Weinert, U., Lehmann, F., Raff, J. Comparison of arsenic removal from water by bacterial cells, S-layer proteins and granulated ferric hydroxide (Ferrosorp). *FZD, Annual Report 2009 - Institute of Radiochemistry* (2010).
249. Beveridge, T. & Fyfe, W. Metal fixation by bacterial cell walls. *Can J Earth Sci* 22, 1893-1898 (1985).
250. Savvaidis, I. Recovery of gold from thiourea solutions using microorganisms. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 11, 145-151 (1998).
251. Vijayaraghavan, K., Mahadevan, A., Sathishkumar, M., Pavagadhi, S. & Balasubramanian, R. Biosynthesis of Au(0) from Au(III) via biosorption and bioreduction using brown marine alga *Turbinaria conoides*. *Chem. Eng. J.* 167, 223-227 (2011).
252. Ziagova, M. et al. Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in single and binary mixtures. *Bioresour. Technol.* 98, 2859-2865 (2007).
253. Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E. & Sofer, S.S. Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol. Lett.* 12, 839-842 (1990).
254. Vijayaraghavan, K., Sathishkumar, M. & Balasubramanian, R. Biosorption of lanthanum, cerium, europium, and ytterbium by a brown marine alga, *Turbinaria Conoides*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 4405-4411 (2010).
255. Chang, J.-S., Law, R. & Chang, C.-C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Res.* 31, 1651-1658 (1997).
256. Cotoras, D., Viedma, P. & Pimentel, J. Biosorption of Metal-Ions by Attached Bacterial-Cells in a Packed-Bed Bioreactor. *Biohydrometallurgical Technologies, Vol 2*, 103-110 (1993).
257. Nakajima, A. & Tsuruta, T. Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 260, 13-18 (2004).
258. Volesky, B. Sorption and biosorption. (BV Sorbex, 2003).
-

-
259. Matthews, T.H., Doyle, R.J. & Streips, U.N. Contribution of peptidoglycan to the binding of metal ions by the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* 3, 51-53 (1979).
260. Heckels, J.E., Lambert, P.A. & Baddiley, J. Binding of Magnesium-ions to cell-walls of *Bacillus-subtilis*-W23 containing teichoic-acid or teichuronic acid. *Biochemical Journal* 162, 359-365 (1977).
261. Raff, J., Berger, S., Selenska-Pobell, S. Uranium binding by S-layer carrying isolates of the genus *Bacillus*. *FZR, Annual Report 2005 - Institute of Radiochemistry* (2006).
262. Pollmann, K., Merroun, M., Raff, J., Hennig, C. & Selenska-Pobell, S. Manufacturing and characterization of Pd nanoparticles formed on immobilized bacterial cells. *Letts. Appl. Microbiol.* 43, 39-45 (2006).
263. Fahmy, K. et al. Secondary Structure and Pd(II) Coordination in S-Layer Proteins from *Bacillus sphaericus* Studied by Infrared and X-Ray Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* 91, 996-1007 (2006).
264. Pollmann, K. et al. Interactions of the S-layer of *Bacillus sphaericus* JG-A12 with palladium and formation of Pd-nanoclusters. *FZR, Annual Report 2004 - Institute of Radiochemistry* (2005).
265. Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Scheinost, A. & Selenska-Pobell, S. EXAFS studies of palladium nanoclusters formed at the cells and S-layers of *Bacillus sphaericus* JG-A12 *FZR, Annual Report 2003 - Institute of Radiochemistry* (2004).
266. Merroun, M., Rossberg, A., Scheinost, A.C. & Selenska-Pobell, S. XAS characterization of gold nanoclusters formed by cells and S-layer sheets of *B. sphaericus* JG-A12. *FZR, Annual Report 2004 - Institute of Radiochemistry* (2005).
267. Merroun, M., Rossberg, A., Hennig, C., Scheinost, A.C. & Selenska-Pobell, S. Spectroscopic characterization of gold nanoparticles formed by cells and S-layer protein of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Materials Science and Engineering: C* 27, 188-192 (2007).
268. Jankowski, U., Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. & Fahmy, K. S-Layer protein from *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 as matrix for Au III sorption and Au-nanoparticle formation. *Spectroscopy: An International Journal* 24, 177-181 (2010).
269. Pidcock, E. & Moore, G.R. Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6, 479-489 (2001).
270. Allen, K.N. & Imperiali, B. Lanthanide-tagged proteins - an illuminating partnership. *Current Opinion in Chemical Biology* 14, 247-254 (2010).
271. Weinert, U. Erzeugung funktionaler Schichten auf Basis von bakteriellen Hüllproteinen. Dissertation *Technische Universität Dresden* (2013).
272. Raff, J. & Selenska-Pobell, S. Posttranslational modification of the S-layer protein from *Bacillus sphaericus* JG-A12 and its influence on uranium binding. *FZR, Annual Report 2003 - Institute of Radiochemistry* (2004).
273. Selenska-Pobell, S. et al. Magnetic Au nanoparticles on archaeal S-Layer ghosts as templates. *Nanomaterials and Nanotechnology* 1, 8-16 (2011).
274. Bertini, I., Gelis, I., Katsaros, N., Luchinat, C. & Provenzani, A. Tuning the affinity for lanthanides of calcium binding proteins. *Biochemistry* 42, 8011-8021 (2003).
275. Drobot, B. *Persönliche Mitteilung* HZDR (2014).
276. Li, B. Arbeitstitel: Spectroscopic Characterization of the Molecular Interactions of Actinyl Cations with Biological Building Blocks. Dissertation *Technische Universität Dresden* (unveröffentlichte Arbeit).
277. Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* 12, 788-800 (1996).
278. Wahl, R. Reguläre bakterielle Zellhüllenproteine als biomolekulares Templat. Dissertation *Technischen Universität Dresden* (2003).
279. Bünzli, J.-c.G. The europium(III) ion as spectroscopic probe in bioinorganic chemistry. *Inorg Chim Acta* 139, 219-222 (1987).
-

-
280. Wolery, T.J. EQ3/6, a software package for geochemical modeling of aqueous systems: package overview and installation guide (version 7.0). (1992).
281. Delany, J.M. & Lundeen, S.R. The LLNL thermochemical database. *Lawrence Livermore National Laboratory* (1990).
282. Tan, X., Fang, M. & Wang, X. Sorption speciation of lanthanides/actinides on minerals by TRLFS, EXAFS and DFT studies: a review. *Molecules* 15, 8431-8468 (2010).
283. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, Edn. 3rd. (Springer, New York; 2006).
284. Texier, A.C., Andres, Y., Illemassene, M. & Le Cloirec, P. Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 34, 610-615 (2000).
285. Plancque, G., Moulin, V., Toulhoat, P. & Moulin, C. Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta* 478, 11-22 (2003).
286. Rabung, T., Stumpf, T., Geckeis, H., Klenze, R. & Kim, J.I. Sorption of Am(III) and Eu(III) onto gamma-alumina: experiment and modelling. *Radiochim. Acta* 88, 711-716 (2000).
287. Takahashi, Y., Kimura, T., Kato, Y. & Minai, Y. Speciation of Europium(III) sorbed on a montmorillonite surface in the presence of polycarboxylic acid by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4016-4021 (1999).
288. Kimura, T., Choppin, G.R., Kato, Y. & Yoshida, Z. Determination of the hydration number of Cm(III) in various aqueous solutions. *Radiochim. Acta* 72, 61-64 (1996).
289. Horrocks, W.D. & Sudnick, D.R. Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 334-340 (1979).
290. Silber, H.B., Maraschin, V. & Campbell, R. Europium(III)-triflate interactions in water and aqueous methanol studied by UV-vis and luminescence. *J. Solid State Chem.* 171, 225-229.
291. Lis, S. & Choppin, G.R. Luminescence Lifetimes of Aqueous Europium Perchlorate, Chloride and Nitrate Solutions. *Mater Chem Phys* 31, 159-161 (1992).
292. Moulin, C. et al. Europium complexes investigations in natural waters by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta* 396, 253-261 (1999).
293. Lis, S., Kimura, T. & Yoshida, Z. Luminescence lifetime of lanthanide(III) ions in aqueous solution containing azide ion. *J. Alloy. Compd.* 323, 125-127 (2001).
294. Schott, J. et al. Formation of a Eu(III) borate solid species from a weak Eu(III) borate complex in aqueous solution. *Dalton Transactions* 43, 11516-11528 (2014).
295. Horrocks, W.D. & Sudnick, D.R. Time-Resolved Europium(III) Excitation Spectroscopy - Luminescence Probe of Metal-ion binding sites. *Science* 206, 1194-1196 (1979).
296. Lukman, S., Saito, T., Aoyagi, N., Kimura, T. & Nagasaki, S. Speciation of Eu³⁺ bound to humic substances by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) and parallel factor analysis (PARAFAC). *Geochim Cosmochim Acta* 88, 199-215 (2012).
297. Manciualea, A., Baker, A. & Lead, J. A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles. *Chemosphere* 76, 1023-1027 (2009).
298. Reiller, P.E. & Brevet, J. Bi-exponential decay of Eu(III) complexed by Suwannee River humic substances: Spectroscopic evidence of two different excited species. *Spectrosc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 75, 629-636 (2010).
299. Andolina, C.M., Mathews, R.A. & Morrow, J.R. Solution Chemistry of Europium(III) Aqua Ion at Micromolar Concentrations as Probed by Direct Excitation Luminescence Spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta* 92, 2330-2348 (2009).
300. Saito, T. et al. Application of Parallel Factor Analysis for Time-Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy: Implication for Metal Speciation Study. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5055-5060 (2010).
301. Andersson, C.A. & Bro, R. The N-way Toolbox for MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 52, 1-4 (2000).
-

302. Drobot, B. et al. Combining luminescence spectroscopy, parallel factor analysis and quantum chemistry to reveal metal speciation - a case study of uranyl(vi) hydrolysis. *Chemical Science* (2015).
303. Moll, H. et al. Interactions of the Mont Terri Opalinus Clay isolate *Sporomusa* sp. MT-2.99 with curium (III) and europium (III). *Geomicrobiology Journal*, 00-00 (2014).
304. Thakur, P., Pathak, P.N., Gedris, T. & Choppin, G.R. Complexation of Eu(III), Am(III) and Cm(III) with Dicarboxylates: Thermodynamics and Structural Aspects of the Binary and Ternary Complexes. *J. Solut. Chem.* 38, 265-287 (2009).
305. Rönitz, O. Komplexierung von Eu(III) mit verschiedenen Aminosäuren. Diplomarbeit *Hochschule für Technik und Wirtschaft* (2009).
306. Heller, A., Rönitz, O., Barkleit, A., Bernhard, G. & Ackermann, J.-U. Complexation of Europium (III) with the Zwitterionic Form of Amino Acids Studied with Ultraviolet-Visible and Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 64, 930-935 (2010).
307. Moll, H. & Bernhard, G. Complex formation of curium(III) with amino acids of different functionalities: L-threonine and O-phospho-L-threonine. *Journal of Coordination Chemistry* 60, 1795-1807 (2007).
308. Gadd, G.M. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 197-203 (1992).

Anhang

A1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle A1: Alphabetische Auflistung der kommerziell erhältlichen und in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Stoffe und Zubereitungen.

Name	Summenformel	Reinheit	Firma/Lieferant
1,2-Dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P	≥99 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	≥99 % (GC), ≥98 % (TLC)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₀ P	≥99 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	99,999 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Acrylamid 40 %	C ₃ H ₅ NO	(37,5:1 Acrylamide/Bis)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Ammoniaklösung	NH ₄ OH	30 %	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Ammoniumpersulfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	98 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	biochem.Zwecke	Merck KGaA
Antifoam 204	---	---	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Arsen(III)oxid	As ₂ O ₃	ACS reagent	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Arsen(V)oxid Hydrat	As ₂ O ₅ · H ₂ O	Reinst, ≥97.0%	Riedel-de-Haen Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH
Bacto Pepton	---	---	Becton Dickinson (BD Bioscience Heidelberg)
Bortrifluorid	BF ₃	Bestand aus dem UFZ Leipzig	
Bromphenolblau Na-salz	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	ACS	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Cadmiumchlorid Hydrat	CdCl ₂ · xH ₂ O	99,999 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ · 2H ₂ O	p.A.	Merck KGaA
Calibration Beads 1 µm	--	Fluoreszenz bei 488 nm, Konzentrat	Partec GmbH, Münster
Calibration Beads 3 µm	--	Fluoreszenz bei 488 nm, Ready to use	Partec GmbH, Münster
Chloroform	CHCl ₃	HPLC	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Coomassie Brilliant Blue R	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	---	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Deoxyribonuclease II Typ IV von FROM*PORCINE SPLEEN	---	Lyophilisiertes Pulver, 2,000- 6,000 k Units/mg Protein	Sigma-Aldrich Co. LLC.
di-Kalium-hydrogenphosphat Trihydrat	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	p.A.	Merck KGaA
Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	reinst	Merck KGaA

Anhang

Ethanol, vergällt	C_2H_5OH	95 %	BDH Prolabo (VWR International GmbH)
Fleischextrakt, trocken, granuliert	---	für die Mikrobiologie	VWR International GmbH
Fluorescein – Natriumsalz	$C_{20}H_{10}Na_2O_5$	Fluorescent Tracer	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Glycerin	$C_3H_8O_3$	p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Glycin	$C_2H_5NO_2$	>99 %, p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Gold(III)-chlorid Trihydrat	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	99,9	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Guanidinhydrochlorid	$CH_5N_3 \cdot HCl$	≥ 99,5 %	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Hellmanex III	---	---	Hellma GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid	KCl	p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Kalium-dihydrogenphosphat	KH_2PO_4	p.A.	Merck KGaA
Kaliumtetrachloro-platinat(II)	K_2PtCl_4	99,99 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Lecithin	---	biochem.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Lysozym, von Hühnereinweiß	---	Protein ≥90 %, ≥40,000 k Units/mg Protein	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Magnesiumchlorid Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	p.A.	Merck KGaA
Methanol	CH_3OH	99,9 %, p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Molybdätophosphorsäure Hydrat		p.a., ACS	Merck KGaA
Natriumazid	NaN_3	---	Merck KGaA
Natriumchlorid	NaCl	p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Natriumdodecylsulfonat (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	95 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Natriumhydroxid	NaOH	>99 %, p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Natriumtetrachloropalladate(II)	Na_2PdCl_4	99,998 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
NB-Media	---	---	Mast Diagnostica GmbH
n-Hexan	C_6H_{14}	Bestand aus dem UFZ Leipzig	
Ninhydrin	$C_9H_6O_4$	99%	Alfa Aesar GmbH & Co KG
o-Phosphorsäure	H_3PO_4	85% p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Platinum(II)chlorid	$PtCl_2$	98,00 %	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Poly(sodium 4-styrenesulfonat)	$(C_8H_7NaO_3S)_n$	MW ~70,000	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Polyethylenimin (PEI)	$H(NHCH_2CH_2)_nNH$ 2	MW ~25,000	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Proteinase K von <i>Tritirachium album</i>		BioUltra, ≥30 Units/mg Protein, for molecular biology	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Proteinmarker, Protein Ladder 26614	---	PageRuler Unstained	ThermoScientific-Pierce

Anhang

Rinderserumalbumin	---	Lyophilisiertes Pulver, ≥96%	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Rnase A Ribonuclease A Typ I aus Rinderpankreas	---	50-100 k units/mg Protein	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Salpetersäure	HNO ₃	69 % supra	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Salzsäure	HCl	p.A., 37 % rauchend	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	98%	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Tannin (Tannic acid)	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	puriss.	Sigma-Aldrich Co. LLC.
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	99%; p.A.; f.d. Elektrophorese	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Total Protein Kit, Micro Lowry,	---	---	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Trichooessigsäure	C ₂ HCl ₃ O ₂	≥99 %, p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O	p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
TRIS Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	p.A.	CARL ROTH GmbH+CO.KG
TRIS HCl	C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl	≥ 99 %	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Triton X-100	t-Oct-C ₆ H ₄ - (OCH ₂ CH ₂) _x OH _{x:9} - 10	for molecular biology	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Uranyl Nitrat Hexahydrat	UO ₂ (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	p.A.	Chemapol
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	p.A., 30 %	CARL ROTH GmbH+CO.KG
Zitronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	p.A.	Merck KGaA
β-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	---	Merck KGaA

A2 Batch-Sorptionsversuche

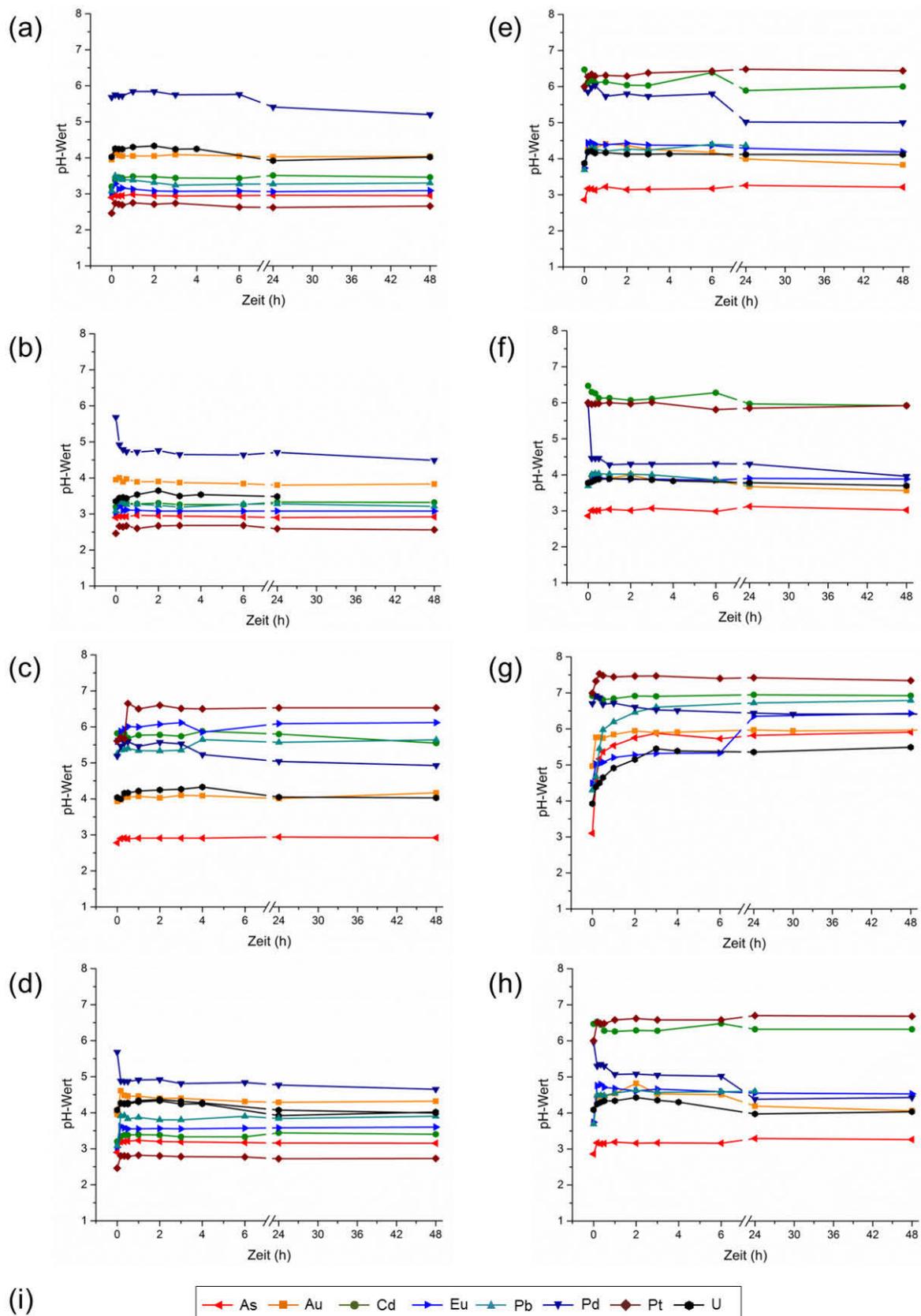


Abbildung A 1: Darstellung der pH-Wert Verläufe der Batch-Sorptionsversuche der einzelnen Metalle mit (a-d) *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 - (a) intakte Zellen, (b) Lipide, (c) PG+ (d) SIFB und von (e-g) *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – (e) intakte Zellen, (f) Lipide, (g) PG+, (h) SIp1 und (i) Legende der Diagramme.

Tabelle A 2: Darstellung der gemittelten Einzelergebnisse und der Ergebnisse der Fehlerberechnungen aus den Batch-Sorptionsversuchen mit den Biomolekülen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

	Zeit (h)	S-Layer				Lipide				PG+				Intakte Zellen				
		c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{SIFB})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{Lipide})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{PG+})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{Zellen})	RE (%)	
As $c_s=74,92$ mg/l	0,17	2,66	0,15	2,66	3,55	3,30	0,15	6,60	4,40					2,87	0,05	14,37	3,84	
	0,33	2,02	0,09	2,02	2,70	2,87	0,05	5,75	3,84	0,65	0,12	1,30	0,87	3,09	0,05	15,43	4,12	
	0,5	3,51	0,05	3,51	4,69	2,66	0,15	5,32	3,55	1,72	0,04	3,44	2,30	2,87	0,05	14,37	3,84	
	1	2,66	0,15	2,66	3,55	2,23	0,10	4,47	2,98	0,57	0,03	1,15	0,77	1,81	0,22	9,04	2,41	
	2	3,73	0,10	3,73	4,97	1,38	0,17	2,76	1,84	0,63	0,02	1,27	0,85	2,45	0,05	12,24	3,27	
	3										1,03	0,08	2,06	1,37				
	6										0,55		1,10	0,74				
	24	2,45	0,13	2,45	3,27	2,66	0,15	5,32	3,55					1,81	0,13	9,04	2,41	
	48	2,02	0,09	2,02	2,70	2,45	0,13	4,89	3,27	2,04	0,16	4,08	2,72	2,23	0,13	11,17	2,98	
Au $c_s=196,97$ mg/l	0,17	19,47	0,60	19,47	9,88	5,18	0,54	10,35	2,63	19,52	0,28	39,04	9,91	10,71	0,47	53,55	5,44	
	0,33	21,77	0,11	21,77	11,05	8,40	0,47	16,81	4,27	17,36	0,42	34,72	8,81	9,79	0,39	48,94	4,97	
	0,5	22,70	0,49	22,70	11,52	5,18	0,11	10,35	2,63	19,99	0,64	39,97	10,15	14,86	0,47	74,30	7,54	
	1	25,92	0,57	25,92	13,16	5,18	0,57	10,35	2,63	21,33	0,77	42,67	10,83	9,79	0,28	48,94	4,97	
	2	28,23	0,56	28,23	14,33	4,72	0,19	9,43	2,39	19,37	0,63	38,74	9,83	13,94	0,39	69,69	7,08	
	3	31,00	0,49	31,00	15,74	6,10	0,32	12,20	3,10	23,94	0,45	47,88	12,16	9,79	0,39	48,94	4,97	
	4										22,82	0,82	45,63	11,58				
	6	35,15	0,32	35,15	17,84	6,10	0,19	12,20	3,10					12,55	0,47	62,77	6,37	
	24	48,98	0,32	48,98	24,86	7,02	0,43	14,04	3,56	22,07	0,99	44,14	11,20	15,32	0,28	76,60	7,78	
48	58,93	0,56	58,93	29,92	5,18	0,47	10,35	2,63	22,66	2,04	45,31	11,50	13,02	0,19	65,08	6,61		
Cd $c_s=112,41$ mg/l	0,17	3,79	0,50	3,79	3,38	3,06	0,29	6,12	2,72	13,86	0,47	27,73	12,33	4,90	0,15	24,48	4,36	
	0,33	5,30	0,29	5,30	4,72	3,94	0,06	7,88	3,51	14,32	0,33	28,64	12,74	2,51	0,58	12,54	2,23	
	0,5	5,19	0,32	5,19	4,62	3,76		7,52	3,34	14,82	0,41	29,65	13,19	5,67	0,22	28,34	5,04	
	1	1,72	0,13	1,72	1,53	2,91	0,22	5,83	2,59	18,57	0,34	37,14	16,52	6,84	0,31	34,22	6,09	
	2	1,11	0,09	1,11	0,99	3,50	0,14	7,00	3,11	17,72	0,34	35,43	15,76	7,06	0,17	35,32	6,28	
	3	2,73	0,37	2,73	2,43	3,10	0,09	6,19	2,75	12,17	0,36	24,33	10,82	7,03	0,38	35,13	6,25	
	4										17,85	0,38	35,69	15,88				
	6	3,76	0,63	3,76	3,34	4,27	0,23	8,54	3,80					7,28	0,16	36,42	6,48	
	24	1,55	0,18	1,55	1,38	4,12	0,14	8,25	3,67	19,83	0,33	39,66	17,64	7,72	0,56	38,62	6,87	
48	1,48	0,17	1,48	1,32	5,12	0,36	10,23	4,55	20,51	0,47	41,02	18,25	6,48	0,17	32,38	5,76		

	Zeit (h)	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE
		(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{SIFB})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Lipide})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{PG+})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Zellen})	(%)
Eu $c_s=151,96$ mg/l	0,17	6,63	0,45	6,63	4,36	6,63	0,45	13,26	4,36	22,99	0,83	45,98	15,13	6,63	0,23	33,15	4,36
	0,33	6,26	0,09	6,26	4,12	6,26	0,09	12,53	4,12	25,98	0,85	51,96	17,10	7,36	0,17	36,81	4,84
	0,5	4,43	0,17	4,43	2,92	4,43	0,17	8,87	2,92	30,67	0,75	61,33	20,18	5,90	0,15	29,49	3,88
	1	5,17	0,09	5,17	3,40	5,17	0,09	10,33	3,40	28,52	0,94	57,05	18,77	7,00	0,29	34,98	4,60
	2	7,73	0,23	7,73	5,09	7,73	0,23	15,46	5,09					8,09	0,29	40,47	5,33
	3	5,90	0,15	5,90	3,88	5,90	0,15	11,79	3,88	34,00	1,20	68,01	22,38	7,73	0,23	38,64	5,09
	4									34,71	1,00	69,41	22,84				
	24	5,53	0,47	5,53	3,64	5,53	0,47	11,06	3,64	39,98	1,26	79,95	26,31	5,90	0,26	29,49	3,88
	48	6,26	0,37	6,26	4,12	6,26	0,37	12,53	4,12	46,73	1,51	93,47	30,75	7,73	0,17	38,64	5,09
Pb $c_s=207,2$ mg/l	0,17	9,57	0,44	9,57	4,62	6,50	0,08	12,99	3,14	76,19	2,66	152,38	36,77	9,92	0,68	49,58	4,79
	0,33	6,84	0,42	6,84	3,30	5,13	0,48	10,26	2,48	92,70	3,68	185,41	44,74	11,28	0,14	56,42	5,45
	0,5	3,76	0,32	3,76	1,82	5,13	0,24	10,26	2,48	102,28	3,98	204,56	49,36	9,23	0,36	46,16	4,46
	1	10,94	0,21	10,94	5,28	7,18	0,84	14,36	3,47	112,48	4,77	224,97	54,29	11,97	0,35	59,84	5,78
	2	9,23	0,41	9,23	4,46	5,13	0,36	10,26	2,48					13,33	0,28	66,67	6,44
	3	9,92	0,16	9,92	4,79	6,50	0,16	12,99	3,14	130,64	5,61	261,28	63,05	12,31	0,60	61,54	5,94
	4									135,24	5,96	270,47	65,27				
	6	9,23	0,14	9,23	4,46	7,52	0,40	15,04	3,63					9,23	0,14	46,16	4,46
	24	10,26		10,26	4,95	8,55	0,16	17,10	4,13	150,98	5,95	301,95	72,87	11,97	0,29	59,84	5,78
48	8,89	0,16	8,89	4,29	8,55	0,62	17,10	4,13	160,05	6,04	320,10	77,24	8,89	0,57	44,45	4,29	
Pd $c_s=106,42$ mg/l	0,17	52,08	0,26	52,08	48,94	50,73	0,25	101,45	47,67	8,58	0,38	17,16	8,06	58,69	0,11	293,44	55,15
	0,33	53,70	0,14	53,70	50,46	51,86	0,02	103,71	48,73	11,03	0,44	22,06	10,37	60,31	0,14	301,57	56,68
	1	52,57	0,07	52,57	49,40	52,10	0,11	104,21	48,96	11,88	0,55	23,77	11,17	59,57	0,10	297,85	55,98
	1	51,94	0,07	51,94	48,81	51,99	0,19	103,99	48,86	14,58	0,77	29,16	13,70	60,70	0,13	303,50	57,04
	2	53,92	0,35	53,92	50,67	52,57	0,07	105,15	49,40	14,97	0,96	29,94	14,07	60,59	0,05	302,95	56,93
	3	52,46	0,08	52,46	49,30	53,37	0,04	106,74	50,15	17,73	1,24	35,47	16,66	60,34	0,14	301,71	56,70
	4									17,16	1,29	34,32	16,13				
	6	52,90	0,06	52,90	49,71	51,88	0,12	103,77	48,75					59,54	0,11	297,71	55,95
	24	54,69	0,09	54,69	51,39	49,02	0,24	98,04	46,06	28,67	2,40	57,33	26,94	57,89	0,12	289,45	54,40
48	58,28	0,05	58,28	54,76	47,97	0,09	95,94	45,08	44,16	3,94	88,33	41,50	56,62	0,10	283,11	53,21	

	Zeit (h)	Pt				Pt				Pt				Pt			
		c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g S_{IB})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $Lipide$)	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $PG+$)	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $Zellen$)	RE (%)
Pt $c_s=195,08$ mg/l	0,17					1,93	0,26	3,86	0,99	0,92	0,01	1,84	0,47	5,28		26,39	2,71
	0,33	5,28	0,40	5,28	2,71	1,93	0,15	3,86	0,99	0,86	0,07	1,72	0,44	6,39	0,15	31,97	3,28
	0,5	2,49	0,04	2,49	1,28	0,81		1,63	0,42	5,73	0,40	11,47	2,94	3,42	0,17	17,09	1,75
	1	7,88	0,31	7,88	4,04	6,95	0,22	13,91	3,56	3,00	0,26	6,01	1,54	6,77	0,46	33,83	3,47
	2	11,60	0,53	11,60	5,95	1,37	0,04	2,75	0,70	2,19	0,27	4,39	1,12	3,52	0,44	17,60	1,80
	3	15,32	0,18	15,32	7,85	3,05		6,09	1,56					2,49	0,13	12,44	1,28
	4									6,81	0,11	13,62	3,49				
	6	14,21	0,40	14,21	7,28	3,60	0,04	7,21	1,85	3,18	0,05	6,36	1,63	4,53	0,23	22,67	2,32
	24	13,46	0,43	13,46	6,90	1,19	0,09	2,37	0,61	2,67	0,05	5,34	1,37	6,39	0,30	31,97	3,28
	48	13,83	0,23	13,83	7,09	3,05		6,09	1,56	1,78	0,08	3,56	0,91	5,38	0,82	26,90	2,76
U $c_s=238,03$ mg/l (bei 4°C)	Zeit (h)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g S_{IB})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $Lipide$)	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $PG+$)	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $Zellen$)	RE (%)
	0,17	39,06	0,32	39,06	16,41	48,54	0,12	97,07	20,39	54,26347213	0,52	82,22	22,80	1,18	0,00	0,71	0,50
	0,33	32,41	0,37	32,41	13,62	48,99	0,13	97,99	20,58	120,62	12,37	241,25	50,68	0,69	0,04	1,72	0,29
	0,5	35,53	0,23	35,53	14,93	44,19	0,14	88,37	18,56	128,36	12,38	256,72	53,93	2,53		6,32	1,06
	1	29,43	0,30	29,43	12,36	46,39	0,38	92,78	19,49	85,19	1,41	170,38	35,79	0,12	0,01	0,29	0,05
	2	34,68	0,44	34,68	14,57	50,61	0,06	101,23	21,26	99,42	1,58	198,83	41,77				
	3	16,73	0,31	16,73	7,03	47,42	0,01	94,84	19,92					2,86		7,14	1,20
	4	41,17	0,16	41,17	17,30	48,51	0,22	97,02	20,38	106,21	1,41	212,41	44,62				
	6									122,18	1,80	244,35	51,33	1,90	0,14	4,74	0,80
	24	32,79	0,52	32,79	13,77	57,22	0,72	114,44	24,04	153,21	2,11	306,43	64,37	2,07	0,03	5,19	0,87
48	40,69	0,22	40,69	17,09	61,88	0,07	123,76	26,00	176,85	1,73	353,70	74,30	2,59	0,02	6,47	1,09	
U $c_s=238,03$ mg/l (bei 30°C)	Zeit (h)													c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g $Zellen$)	RE (%)
	72													6,30	0,00	15,75	2,65

Tabelle A 3: Darstellung der gemittelten Einzelergebnisse und der Ergebnisse der Fehlerberechnungen aus den Batch-Sorptionsversuchen mit den Biomolekülen von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

	S-Layer					Lipide				PG+				Zellen			
	Zeit (h)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{SIP1})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{Lipide})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{PG+})	RE (%)	c_e (mg/l)	Fehler $c_e (\pm)$	q (mg/g _{Zellen})	RE (%)
As $c_s=74,92$ mg/l	0,17	3,15	0,32	3,15	4,20	2,16	0,00	4,32	2,88	0,26	0,00	0,53	0,35	3,19	0,74	26,62	4,26
	0,33	2,16	0,29	2,16	2,88	4,47	0,06	8,93	5,96	0,68	0,00	1,36	0,91	9,75	0,04	81,25	13,01
	0,5	7,40	0,84	7,40	9,87	4,47	0,14	8,93	5,96					11,62	0,48	96,86	15,51
	1	2,74	0,07	2,74	3,65	3,53	0,00	7,06	4,71					7,06	0,82	58,83	9,42
	2	1,73	0,16	1,73	2,31	6,03	0,44	12,05	8,04	1,14	0,00	2,29	1,53	11,21	0,30	93,45	14,97
	3	3,34	0,31	3,34	4,46	3,89	0,12	7,78	5,19	1,02	0,00	2,05	1,37	9,41	0,13	78,44	12,56
	6	2,93	0,17	2,93	3,91	3,41	0,26	6,82	4,55	0,15	0,00	0,30	0,20	10,40	0,24	86,65	13,88
	24	1,73	0,16	1,73	2,31	3,24	0,08	6,48	4,33	0,11	0,00	0,23	0,15	10,61	0,16	88,45	14,17
	48	2,40	0,22	2,40	3,21	3,67	0,14	7,35	4,90					10,25	0,07	85,45	13,69
Au $c_s=196,97$ mg/l	0,17	74,66	1,10	74,66	37,91	87,39	4,47	174,77	44,37					41,33	1,23	344,41	20,98
	0,33	74,10	0,37	74,10	37,62	71,85	0,80	143,69	36,48	7,57	0,02	15,15	3,84	51,35	1,54	427,93	26,07
	0,5	75,68	1,45	75,68	38,42	76,24	0,89	152,48	38,71	6,55	0,05	13,11	3,33	57,43	3,63	478,60	29,16
	1	70,95	0,53	70,95	36,02	64,30	2,16	128,60	32,65					43,24	0,27	360,36	21,95
	2	70,83	1,54	70,83	35,96	70,27	1,31	140,54	35,68					66,22	2,90	551,80	33,62
	3	67,00	1,59	67,00	34,02	89,41	1,68	178,83	45,39	21,50	0,00	42,99	10,91	71,85	2,02	598,72	36,48
	4									4,25	0,00	8,50	2,16				
	6	54,50	2,80	54,50	27,67	88,18	3,91	176,35	44,77					56,53	1,68	471,10	28,70
	24	56,42	4,06	56,42	28,64	75,34	1,49	150,68	38,25					66,89	0,66	557,43	33,96
	30									13,57	0,00	27,14	6,89				
	48	73,65	6,10	73,65	37,39	73,65	3,40	147,30	37,39	17,22	0,00	34,44	8,74	84,01	0,86	700,08	42,65
144									19,43	1,28	38,86	9,87					
Cd $c_s=112,41$ mg/l	0,17	12,41	0,05	12,41	11,04	9,13	0,16	18,27	8,12	29,29	0,25	58,57	26,05	9,84	0,28	81,96	8,75
	0,33	11,47	0,20	11,47	10,21	10,77	0,29	21,54	9,58	38,15	0,89	76,29	33,94	9,60	0,24	80,01	8,54
	0,5	11,94	0,16	11,94	10,62	10,30	0,47	20,61	9,17	30,89	0,85	61,78	27,48	10,77	0,33	89,77	9,58
	1	11,94	0,33	11,94	10,62	10,07	0,27	20,14	8,96	39,14	0,15	78,27	34,82	11,01	0,29	91,72	9,79
	2	12,18	0,14	12,18	10,83	10,07	0,36	20,14	8,96	38,50	0,11	76,99	34,25	9,37	0,14	78,06	8,33
	3	12,41	0,14	12,41	11,04	10,30	0,38	20,61	9,17	38,26	1,00	76,52	34,03	11,01	0,20	91,72	9,79
	6	11,01	0,20	11,01	9,79	11,94	0,09	23,89	10,62					9,60	0,27	80,01	8,54
	24	11,94	0,09	11,94	10,62	12,41	0,11	24,82	11,04	42,22	0,16	84,43	37,56	13,11	0,63	109,28	11,67
	48	12,18	0,14	12,18	10,83	12,88	0,33	25,76	11,46	39,45	0,24	78,91	35,10	9,13	0,19	76,11	8,12

	Zeit (h)	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE
		(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Slip1})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Lipide})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{PG+})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Zellen})	(%)
Eu $c_s=151,96$ mg/l	0,17	6,52	0,45	6,52	4,29	17,65	0,18	35,31	11,62	96,93	0,82	193,85	63,78	15,35	0,24	127,92	10,10
	0,33	7,68	0,32	7,68	5,05	16,89	0,09	33,77	11,11	108,76	0,94	217,52	71,57	14,97	0,15	124,72	9,85
	0,5	8,83	0,24	8,83	5,81	17,27	0,15	34,54	11,36	120,32	0,83	240,64	79,18	15,73	0,24	131,12	10,35
	1	6,91	0,46	6,91	4,55	17,27	0,15	34,54	11,36	128,40	1,03	256,80	84,50	13,43	0,24	111,93	8,84
	2	6,14	0,09	6,14	4,04	14,97	0,27	29,93	9,85	138,01	0,86	276,02	90,82	13,43	0,24	111,93	8,84
	3	8,44	0,24	8,44	5,56	16,12	0,15	32,24	10,61	145,77	0,51	291,53	95,92	16,12	0,15	134,32	10,61
	6	10,36	0,15	10,36	6,82	17,27	0,00	34,54	11,36	145,76	0,12	291,52	95,92	16,12	0,15	134,32	10,61
	24	9,21	0,54	9,21	6,06	17,27	0,27	34,54	11,36	146,92	0,01	293,85	96,69	18,42	0,15	153,50	12,12
	48	10,36	0,31	10,36	6,82	19,19	0,24	38,38	12,63	143,37	0,15	286,73	94,34	19,19	0,18	159,90	12,63
Pb $c_s=207,2$ mg/l	0,17	37,53	0,41	37,53	18,11	41,63	0,25	83,26	20,09	188,03	0,01	376,07	90,75	66,55	0,15	554,56	32,12
	0,33	39,11	0,45	39,11	18,87	41,63	0,25	83,26	20,09	188,75	0,01	377,50	91,10	68,12	0,44	567,70	32,88
	0,5	37,53	0,64	37,53	18,11	42,26	0,15	84,52	20,40	194,50	0,10	389,00	93,87	67,49	0,29	562,44	32,57
	1	38,79	0,67	38,79	18,72	41,00	0,53	82,00	19,79	196,52		393,04	94,85	61,19	1,32	509,88	29,53
	2	39,42	0,45	39,42	19,03	43,84	0,19	87,68	21,16	190,27	0,18	380,54	91,83	67,81	0,53	565,07	32,73
	3	39,74	0,46	39,74	19,18	43,84	0,26	87,68	21,16	194,32	0,00	388,64	93,78	70,02	0,58	583,47	33,79
	6	40,37	0,19	40,37	19,48	54,88	0,22	109,75	26,49			386,06	93,16	70,33	0,53	586,10	33,94
	24	40,69	0,13	40,69	19,64	69,70	0,07	139,40	33,64	193,03		386,06	93,16	70,96	0,25	591,35	34,25
	48									189,95	0,13	379,91	91,68				
Pd $c_s=106,42$ mg/l	0,17	60,88	0,84	60,88	57,20	51,80	0,18	103,60	48,67	35,72	0,14	71,44	33,56	73,97	0,50	616,41	69,51
	0,33	65,60	0,46	65,60	61,64	50,56	0,88	101,13	47,51	40,41	0,18	80,83	37,98	70,96	0,26	591,36	66,68
	0,5	67,34	0,25	67,34	63,28	48,32	0,38	96,63	45,40	33,84	0,18	67,69	31,80	70,57	0,22	588,08	66,31
	1	70,85	0,40	70,85	66,58	49,21	0,79	98,43	46,25	31,99	0,19	63,99	30,06	70,77	0,15	589,72	66,50
	2	66,64	0,14	66,64	62,62	49,44	0,04	98,88	46,46	36,28	0,38	72,56	34,09	69,61	0,13	580,12	65,41
	3	62,51	0,55	62,51	58,73	46,35	0,46	92,70	43,55	34,92	0,76	69,84	32,81	67,56	0,19	563,03	63,49
	4									34,84	0,43	69,68	32,74				
	6	59,53	0,49	59,53	55,94	39,24	0,53	78,48	36,87					63,46	0,33	528,84	59,63
	24	57,87	0,44	57,87	54,38	33,42	0,64	66,85	31,41	36,10	1,28	72,19	33,92	52,84	0,20	440,33	49,65
	30									32,62	0,93	65,24	30,65				
	48	59,92	0,47	59,92	56,31	34,35	0,64	68,70	32,28					53,01	0,40	441,73	49,81
144									44,25	0,85	88,50	41,58					

	Zeit (h)	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE	c_e	Fehler	q	RE
		(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Slp1})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Lipide})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{PG+})	(%)	(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Zellen})	(%)
Pt $c_s=195,08$ mg/l	0,17	9,04	0,22	9,04	4,63	7,59	0,15	15,18	3,89					9,40	0,22	78,31	4,82
	0,33	11,93	1,01	11,93	6,11	9,40	0,17	18,79	4,82					10,12	0,47	84,33	5,19
	0,5	7,23	0,08	7,23	3,71	8,31	0,08	16,63	4,26					10,84	0,15	90,35	5,56
	1	9,76	0,50	9,76	5,00	9,40	0,08	18,79	4,82	0,50	0,12	1,00	0,26	8,67	0,25	72,28	4,45
	2	11,93	0,91	11,93	6,11	10,84	0,29	21,68	5,56					12,29	0,59	102,40	6,30
	3	9,04	0,17	9,04	4,63	8,67	0,15	17,35	4,45	0,13	0,03	0,27	0,07	9,40	0,22	78,31	4,82
	6	10,12	0,22	10,12	5,19	11,20	0,30	22,41	5,74					18,07	1,57	150,59	9,26
	24	12,29	0,08	12,29	6,30	16,26	0,29	32,53	8,34	3,55	0,20	7,10	1,82	10,84	0,15	90,35	5,56
	48	12,29	0,08	12,29	6,30	17,35	0,15	34,70	8,89	6,80	0,45	13,60	3,49	13,01	0,44	108,42	6,67
U $c_s=238,03$ mg/l (bei 4°C)	0,17	42,34	0,14	42,34	17,79	79,36	0,41	158,73	33,34	161,98	1,86	323,97	68,05	0,99	0,00	2,48	0,42
	0,33	41,22	0,25	41,22	17,32	79,36	0,20	158,73	33,34	184,45	2,90	368,91	77,49	0,99	0,00	2,46	0,41
	0,5	37,98	0,20	37,98	15,96	76,09	0,78	152,18	31,97	205,29	3,18	410,58	86,25	0,99	0,00	2,47	0,41
	1	33,91	0,04	33,91	14,25	77,80	0,41	155,60	32,68	216,67	2,69	433,35	91,03	0,98	0,00	2,45	0,41
	2	37,55	0,26	37,55	15,77	83,67	1,22	167,34	35,15	221,95	2,16	443,90	93,24	0,98	0,00	2,46	0,41
	3	35,96	0,26	35,96	15,11	74,73	0,43	149,47	31,40	219,92	1,69	439,85	92,39	0,99	0,00	2,48	0,42
	6	38,18	0,34	38,18	16,04	71,58	0,48	143,17	30,07	226,26	1,44	452,52	95,06	0,99	0,00	2,47	0,41
	24	39,02	0,00	39,02	16,39	72,00	0,30	144,00	30,25	224,37	0,79	448,75	94,26	0,99	0,00	2,48	0,42
	48	38,36	0,35	38,36	16,12	73,07	0,62	146,15	30,70	227,24	0,63	454,49	95,47	1,00	0,00	2,51	0,42
U $c_s=238,03$ mg/l (bei 30°C)	Zeit (h)													c_e	Fehler	q	RE
	72													(mg/l)	$c_e (\pm)$	(mg/g _{Zellen})	(%)
														65,04	2,76	162,59	27,32

A3 QCM-D Diagramme der Metallsorptionsversuche an S-Layer-Proteinen

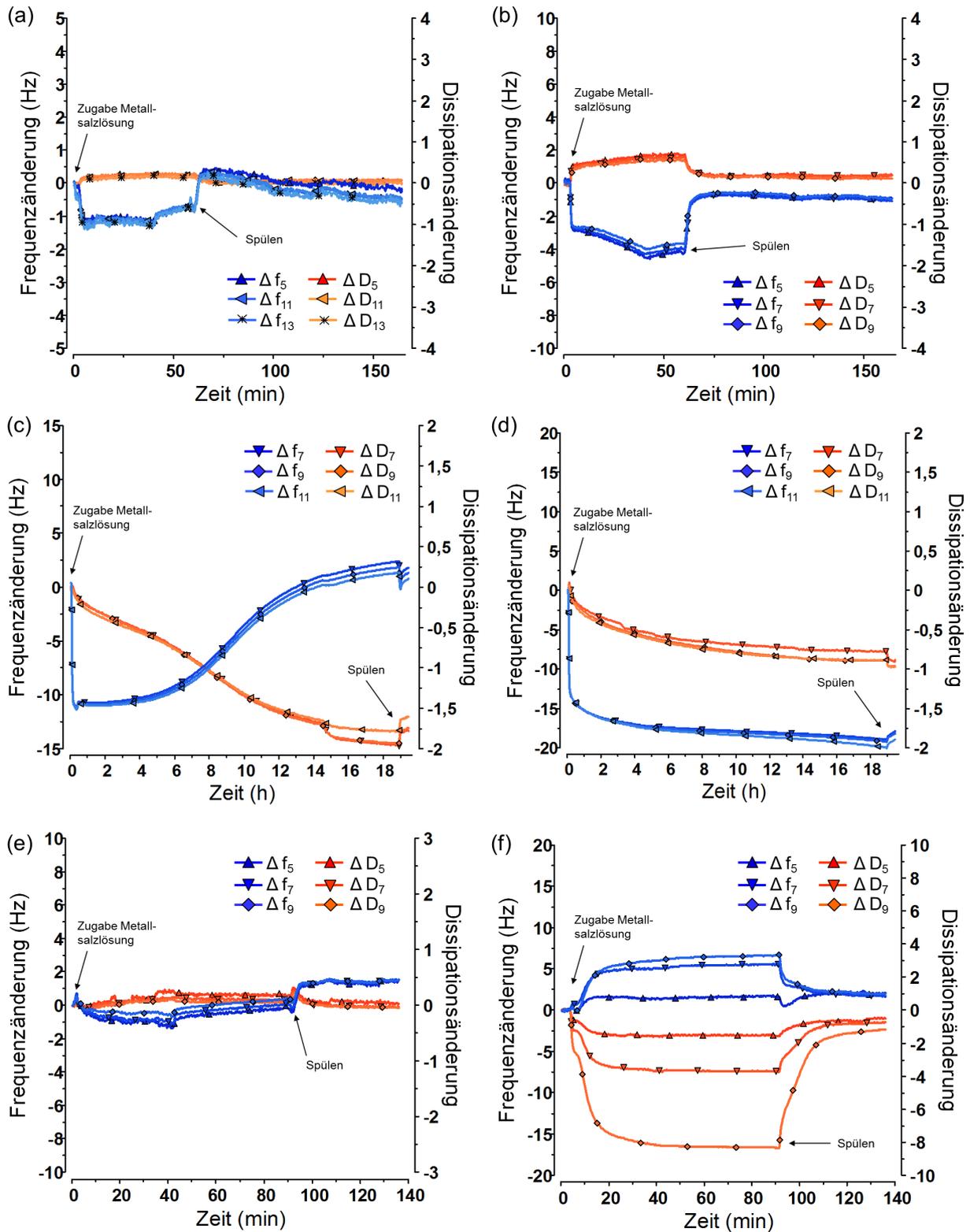


Abbildung A 2: QCM-D Frequenz-/Dissipationsdiagramme über die Zeit der Metallsorptionsversuche von (a) 1 mM As⁵⁺, (b) 5 mM As⁵⁺, (c) 1 mM Au³⁺, (d) 5 mM Au³⁺, (e) 1 mM Cd²⁺ und (f) 5 mM Cd²⁺ auf einer monolagigen Schicht von zuvor rekristallisierten SIFB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

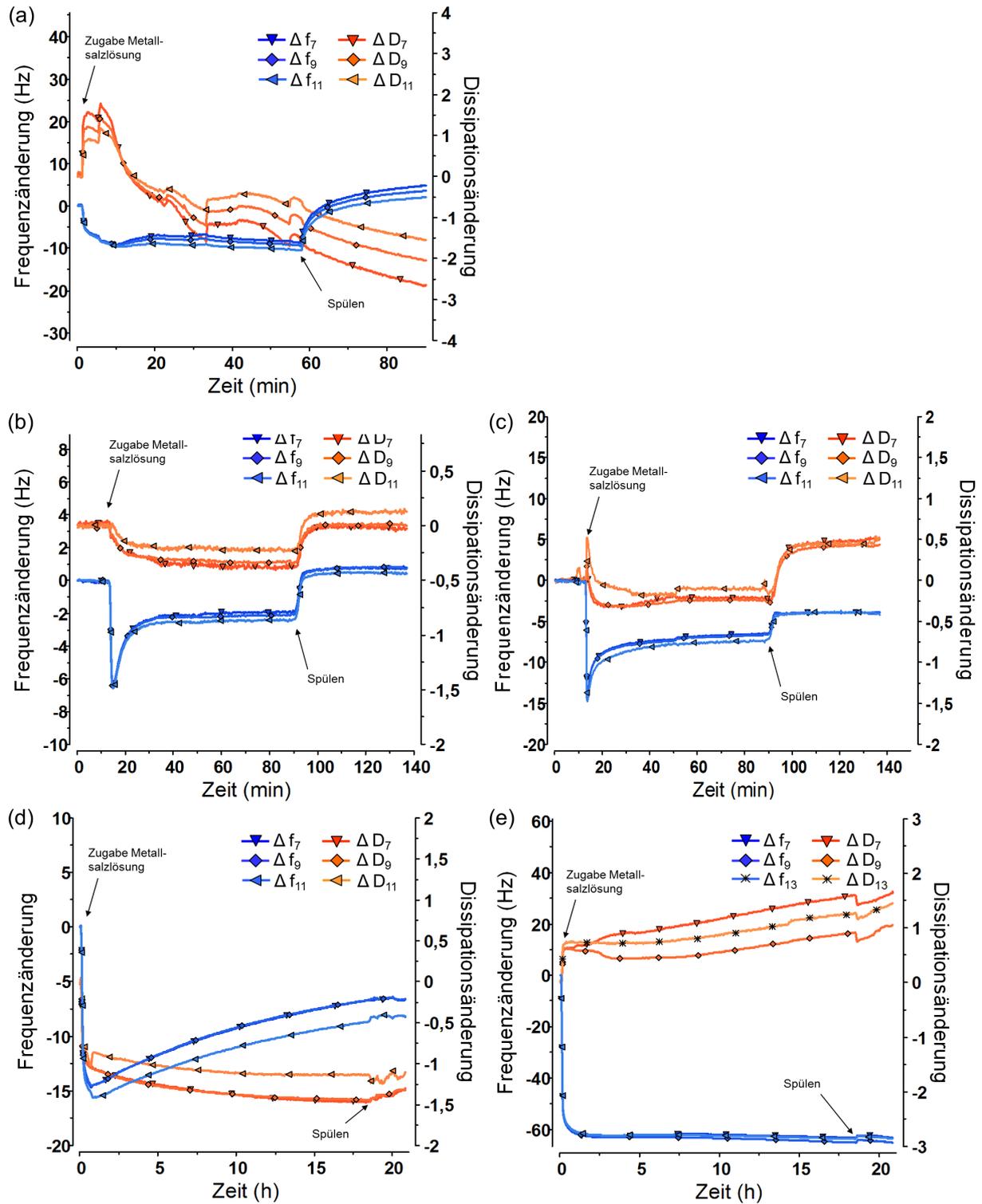


Abbildung A 3: QCM-D Frequenz-/Dissipationsdiagramme über die Zeit der Metallsorptionsversuche von (a) 1 mM Eu^{3+} , (b) 1 mM Pb^{2+} , (c) 5 mM Pb^{2+} , (d) 1 mM Pd^{2+} und (e) 5 mM Pd^{2+} auf einer monolagigen Schicht von zuvor rekristallisiertem SIFB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

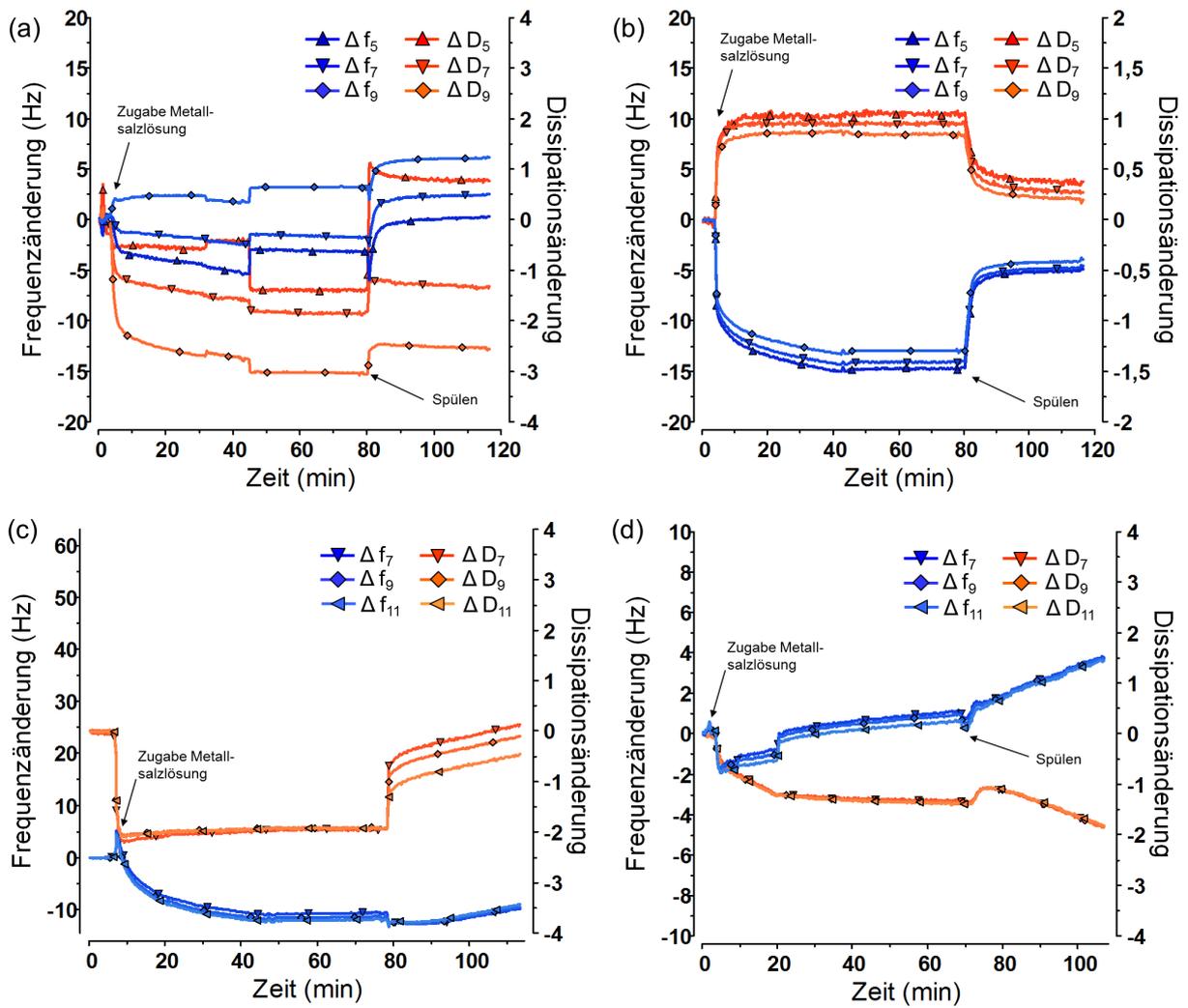


Abbildung A 4: QCM-D Frequenz-/Dissipationsdiagramme über die Zeit der Metallsorptionsversuche von (a) 1 mM Pt²⁺, (b) 5 mM Pt²⁺, (c) 1 mM U⁶⁺ pH=5,0 und (d) 1 mM U⁶⁺ pH=3,5 auf einer monolagigen Schicht von zuvor rekristallisierten SifB von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

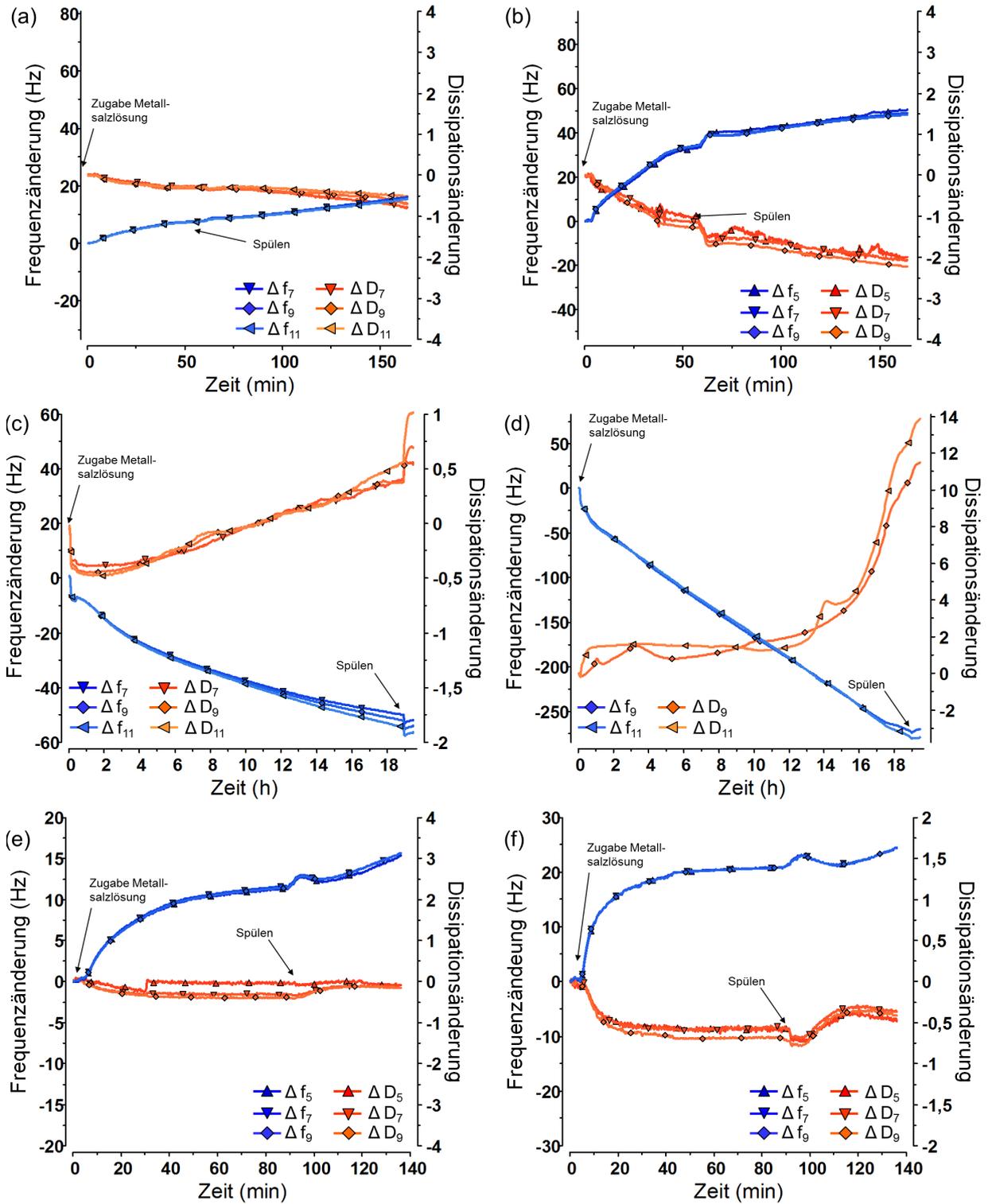


Abbildung A 5: QCM-D Frequenz-/Dissipationsdiagramme über die Zeit der Metallsorptionsversuche von (a) 1 mM As⁵⁺, (b) 5 mM As⁵⁺, (c) 1 mM Au³⁺, (d) 5 mM Au³⁺, (e) 1 mM Cd²⁺ und (f) 5 mM Cd²⁺ einer monolagigen Schicht von zuvor rekristallisiertem Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

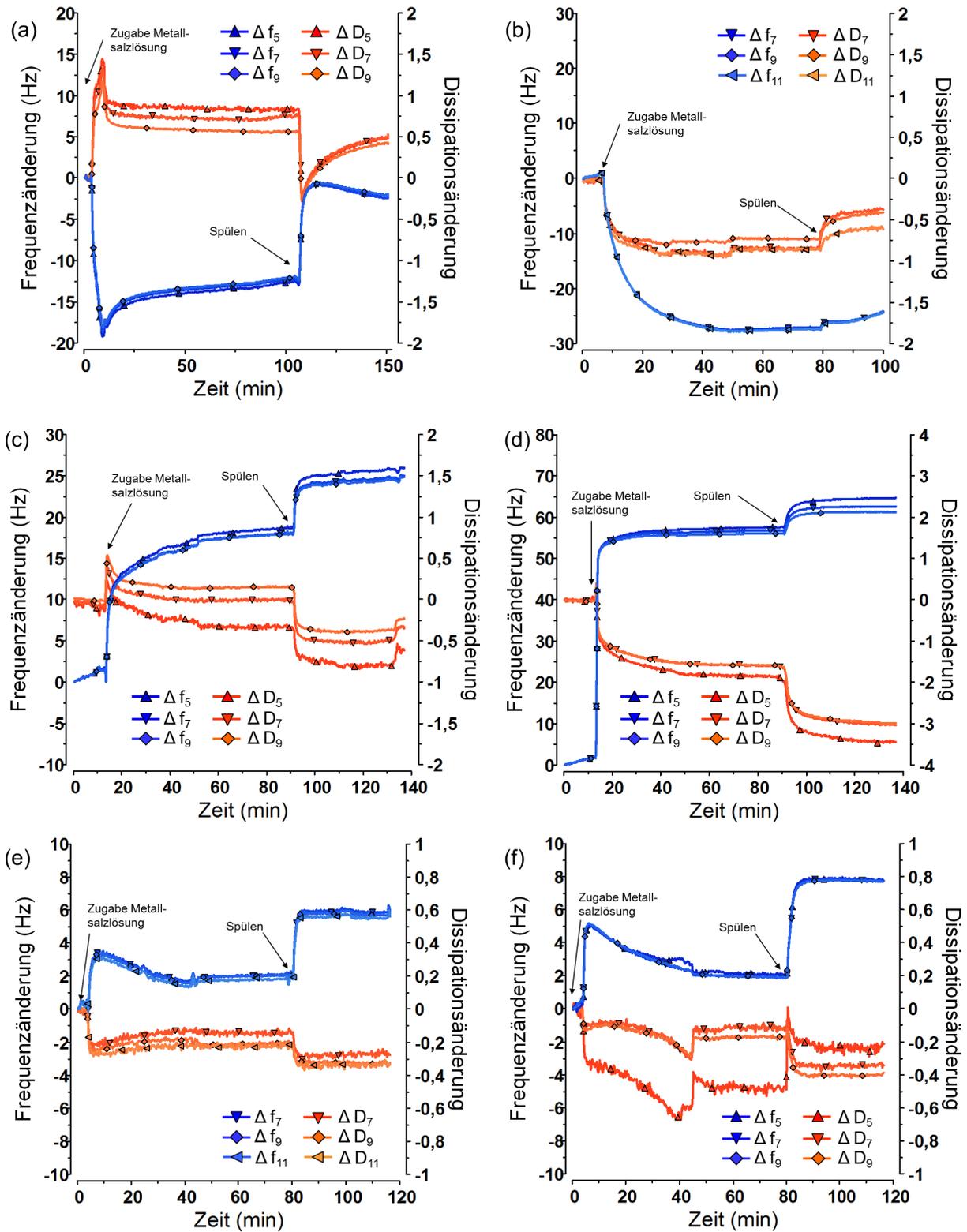


Abbildung A 6: QCM-D Frequenz-/Dissipationsdiagramme über die Zeit der Metallsorptionsversuche von (a) 1 mM Eu^{3+} , (b) 1 mM U^{6+} pH=5,0, (c) 1 mM Pb^{2+} , (d) 5 mM Pb^{2+} , (e) 1 mM Pt^{2+} und (f) 5 mM Pt^{2+} auf einer monolagigen Schicht von zuvor rekristallisiertem Slp1 von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53.

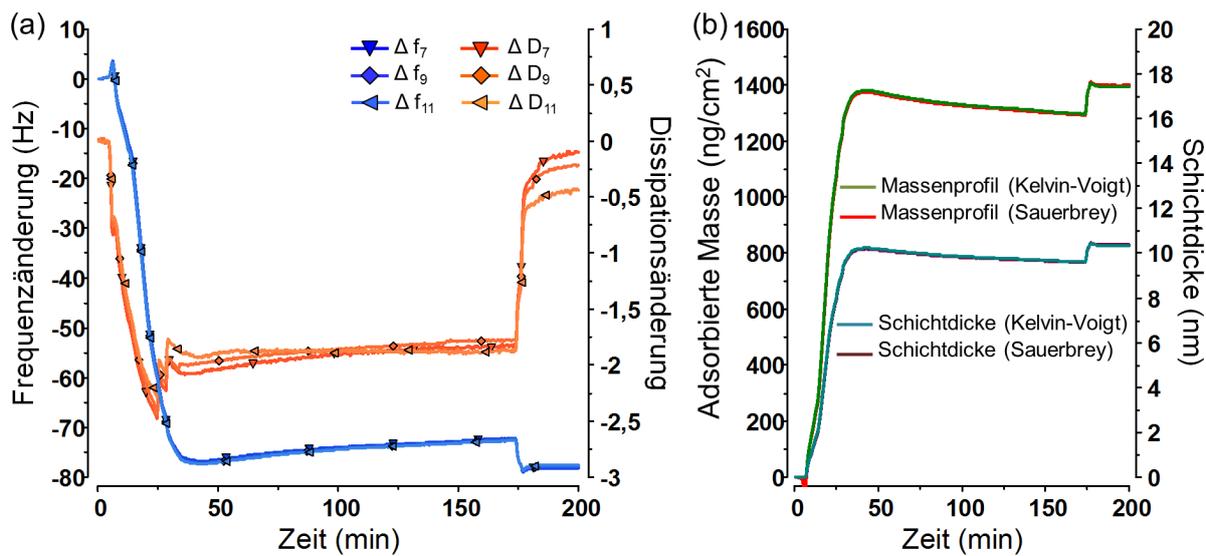


Abbildung A 7: QCM-D Diagramme der Abscheidung von Goldnanopartikeln auf einer SiF₆ Schicht; (a) Frequenz-/Dissipationswerte über die Zeit, und (b) Massen- und Schichtdickenprofil der adsorbierten Nanopartikel auf der SiF₆ Schicht.

A4 AFM-Bilder

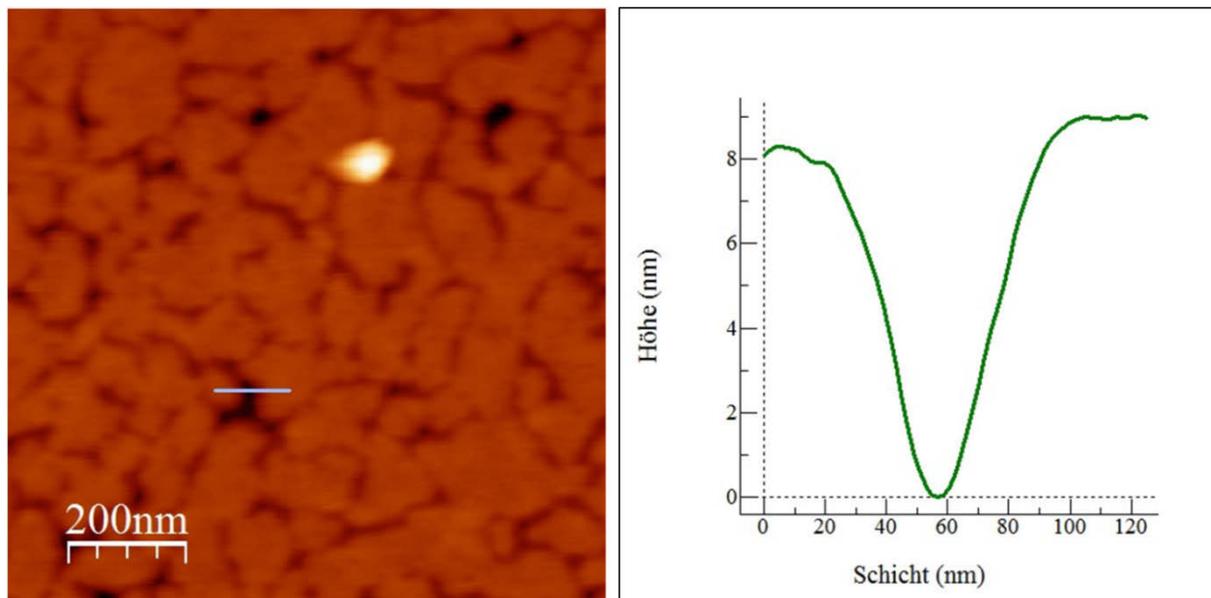


Abbildung A 8: AFM-Höhenbild einer SlfB Schicht von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 (links) und Ermittlung des Höhenprofils (rechts) über die Software WSxM 5.0 Develop 6.5 (2013).

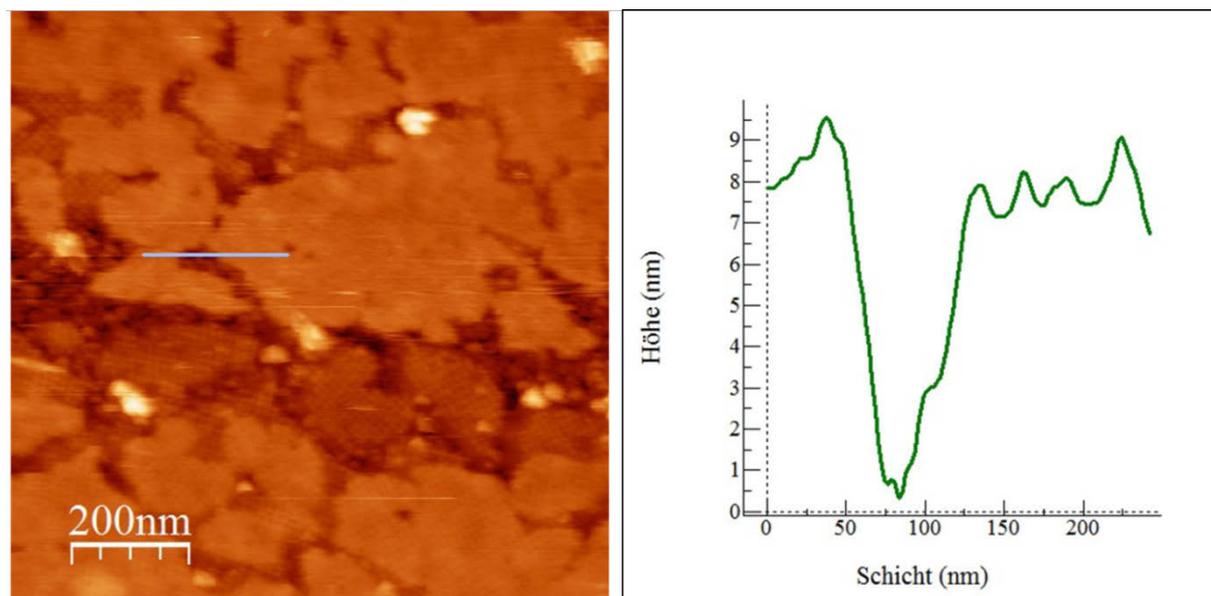


Abbildung A 9: AFM-Höhenbild einer Slp1 Schicht von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 (links) und Ermittlung des Höhenprofils (rechts) über die Software WSxM 5.0 Develop 6.5 (2013).

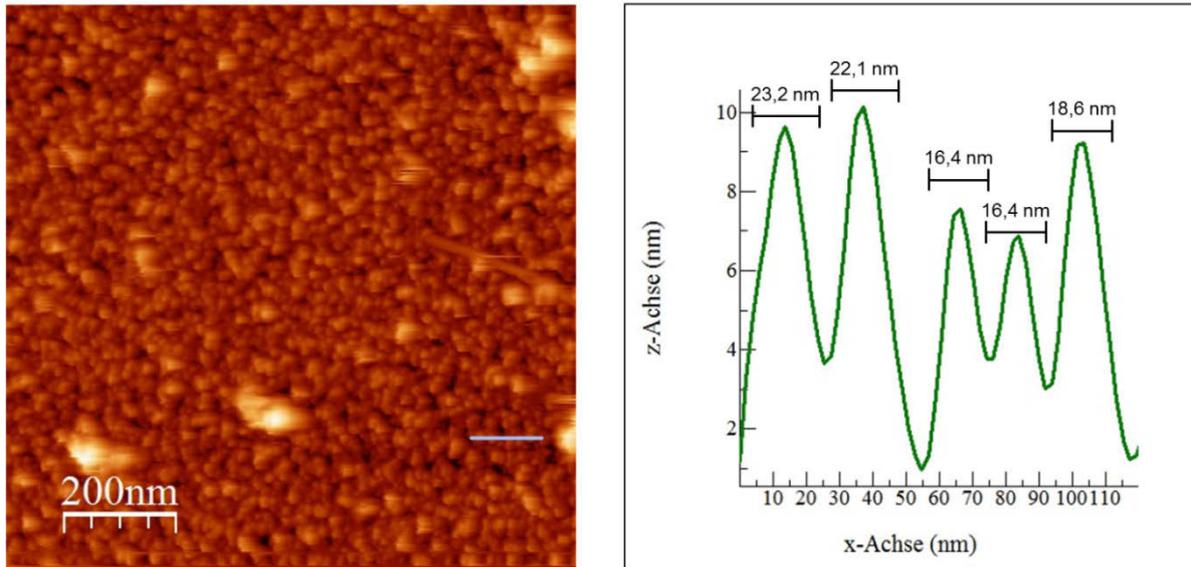


Abbildung A 10: AFM Höhenbild von abgeschiedenen Goldnanopartikeln auf rekristallisierter Slp1 Schicht (links) und Ermittlung des Nanopartikelprofils (rechts) über die Software WSxM 5.0 Develop 6.5 (2013).

A5 PCS Messungen

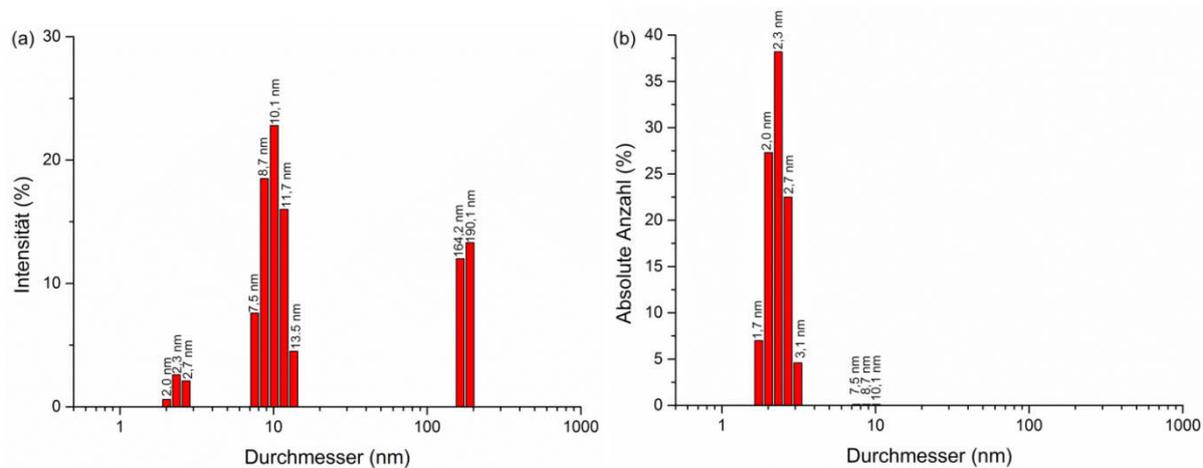


Abbildung A 11: Intensitätsgewichtete(a) und anzahlgewichtete (b) Größenverteilung der synthetisierten und citrat-stabilisierten Goldnanopartikel, 1 Tag nach der Synthese ($\varnothing < 5$ nm).

A6 TRLFS-Messungen

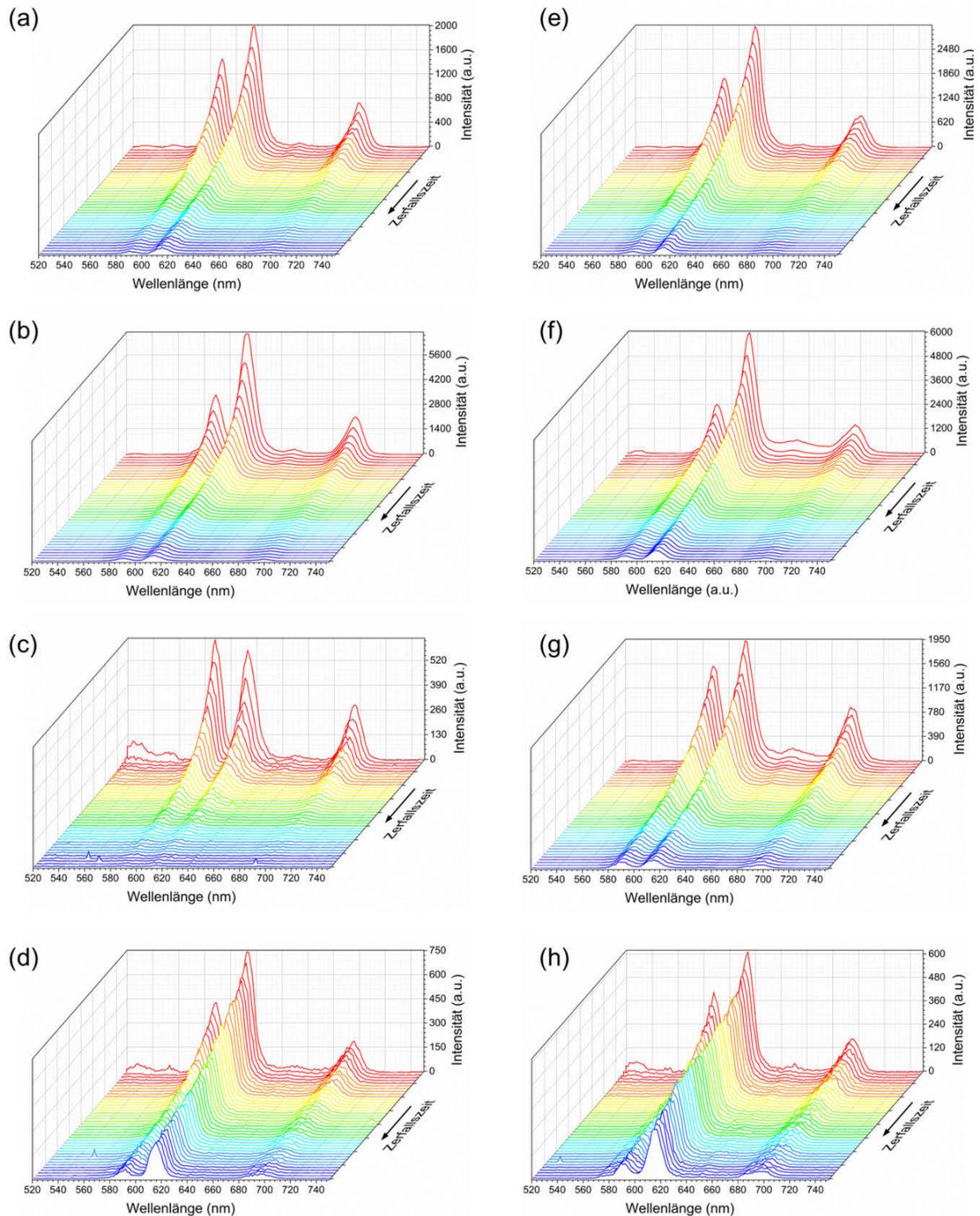


Abbildung A 12: Zeitaufgelöste Lumineszenzspektren von Biomolekülen nach 1 h Inkubation mit 1 mM Europium (pH=6,0; 0,15 M NaCl; T=25 °C); (a-d) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 – (a) intakte Zellen, (b) Lipide, (c) PG+, (d) SIFB und (e-h) von *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – (e) intakte Zellen, (f) Lipide, (g) PG+ und (h) SIFB.

A7 Publikationen und Lehrtätigkeiten

Publikationen

Immobilization of microorganisms for AFM studies in liquids

Günther, T. J.*, Suhr, M.*, Raff, J., Pollmann, K.

*both authors are equally contributed

RSC Advances **4**, 51156-51164 (2014), doi:10.1039/c4ra03874f.

Investigation of heavy metal sorption behavior of Slp1 from *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 – A combined study using QCM-D, ICP-MS and AFM

Suhr, M., Unger, N., Viacava Romo, K. E., Günther, T. J., Raff, J., Pollmann, K.

Biometals **27**, 1337-1349 (2014), doi:10.1007/s10534-014-9794-8.

Konferenzbeiträge und Vorträge (nur als Erstautor)

Adsorption kinetics of cell wall components of gram positive bacteria on technical surfaces studied by QCM-D

Suhr, M., Günther, T. J., Raff, J., Pollmann, K.

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 18.-21.03.2012, Tübingen, Deutschland (**Poster**).

Investigation of metal binding by cell wall components of Gram positive bacteria studied by QCM-D

Suhr, M., Fischer, S., Günther, T. J., Raff, J., Pollmann, K.

5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, 24.-28.06.2012, Prag, Tschechische Republik (**Poster**).

Metal interaction processes with cell wall components of Gram positive bacteria studied by QCM-D

Suhr, M., Matys, S., Raff, J., Pollmann, K.

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 10.-13.03.2013, Bremen, Deutschland (**Vortrag**).

Adsorption behavior and heavy metal interaction processes of cellular components of Gram positive bacteria investigated by QCM-D

Suhr, M., Matys, S., Viacava Romo, K. E., Raff, J., Pollmann, K.

International Soft Matter Conference 2013, 15.-19.09.2013, Rom, Italien (**Poster**).

Industrial applicability of microbial interaction with metals and metalloids

Suhr, M., Vogel, M., Matys, S., Raff, J., Pollmann, K.

Engineering Life 2013: Bio-molecular principles for novel methods and materials, 17.-18.09.2013, Dresden, Deutschland (**Poster**).

Innovative Methoden in der Bionanotechnologie – Die Quarzkristallmikrowaage (QCM-D)

Suhr, M

Umweltkolloquium der Fakultät Maschinenbau/ Verfahrenstechnik, Studiengang Chemieingenieurwesen, 20.05.2014, Dresden, Deutschland (**eingeladener Vortrag**).

Lehrtätigkeiten

TU Dresden, Umwelt- und Radiochemie (MA-CH-BOC 07), Leitung und Praktikumsbetreuung, je 2 SWS, **Sommersemester 2011, Sommersemester 2012, Sommersemester 2013** und Koordination im **Sommersemester 2014**.

TU Dresden, Instrumentelle Analytik (Modul AnC II), Praktikumsbetreuung Isotopenverdünnungsanalyse (IVA), 2 SWS, **Wintersemester 2011/2012** und partiell **Wintersemester 2012/2013**.

Betreuung von Studien- und Abschlussarbeiten

Aufbau von Zellwänden und Wechselwirkungen von Mikroorganismen und Zellwänden mit Schwermetallen, **Drechsel, N.**, Projektarbeit – Hochschule Mittweida 2011/2012.

Isolierung und Charakterisierung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Mikroorganismen, **Drechsel, N.**, Praxissemesterarbeit – Hochschule Mittweida 2012.

Das Metallbindungsverhalten von Membranen gram-positiven Bakterien, **Drechsel, N.**, Bachelorarbeit – Hochschule Mittweida 2012.

Investigation of heavy metals sorption behavior of isolated bacterial cell wall components of Gram positive bacteria using ICP-MS and TRLFS, **Viacava Romo, K. E.**, Masterarbeit – Technische Universität Dresden/ Biotec Dresden 2013.

Eidesstattliche Erklärung

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

Die vorliegende Arbeit wurde im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf am Institut für Ressourcenökologie in der Zeit von März 2011 bis August 2014 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Dr. Katrin Pollmann und Herrn Dr. Johannes Raff angefertigt.

Frühere erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden haben.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuellen Fassung vom 23.02.2011 und den Änderungen durch Beschlüsse des Fakultätsrates vom 15.06.2011 und 18.06.2014 an.

Dresden, den 22.07.2015



Unterschrift