

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie

Gasblasenbildung und Sorption von organischen SERS-aktiven Substanzen an mikro- und nanostrukturierten Oberflächen

Christian M. Metz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. L. Hintermann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. I. Kögel-Knabner

Die Dissertation wurde am 11.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Chemie am 22.06.2016 angenommen.

...

Danksagung

Die vorliegende Dissertation war Teil des DFG-Schwerpunktprogramms „Biogeochemical Interfaces in Soil“ (SPP 1315).

Zuallererst möchte ich besonders o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit danken, diese Dissertation an seinem Institut anzufertigen sowie die Bereitstellung der dafür nötigen finanziellen Mittel. Ich bedanke mich für die Nutzungsmöglichkeit der Laborinfrastruktur und aller analytischen Geräte, aber auch für die herzliche Aufnahme in sein Institut und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

PD Dr. Thomas Baumann möchte ich für die freundliche Überlassung der hochinteressanten Themenstellung, seine geduldige Führung und Betreuung, sowie die zahlreichen konstruktiven Diskussionen danken. Seine Unterstützung bei allen fachlichen und IT-Fragen war beispielhaft. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojekts gewährte.

Bei Dr. Natalia P. Ivleva möchte ich mich ebenfalls sehr für ihre Betreuung am Raman-Mikrospektroskop bedanken. Ihr stets offenes Ohr sowie die vielen aufschlussreichen Diskussionen waren mir immer eine unschätzbare Hilfe. Ihre klugen Anregungen und Denkanstöße trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Sebastian Wiesemann und Roland Hoppe danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Planung und ihre perfekte Anfertigung aller speziellen Arbeitsmaterialien. Ihr Rat und Tat war eine wirklich große Hilfe. Einen herzlichen Dank auch an Birgit Apel und Joachim Langer, die mich ebenfalls immer tatkräftig und kompetent unterstützten, sowie auch Christine Beese, Cornelia Popp, Christa Stopp, Susanne Mahler und Christine Sternkopf.

Herzlich möchte ich auch dem gesamten Arbeitskreis von PD Dr. Thomas Baumann meinen Dank aussprechen. Ich werde mich immer gerne an das sehr gute Arbeitsklima erinnern. Danke an meine direkten Kollegen Christina, Susanne, Melli, Tine, Moritz und Mark für die nette gemeinsame Zeit. Danke auch an all die anderen Kollegen vom IWC, deren Freundlichkeit ich nicht vergessen werde.

Ich bedanke mich ausdrücklich bei allen Projektpartnern des SPP 1315 sowie allen universitären Kollegen, mit denen ich zusammenarbeiten durfte, wie Prof. Dr. Werner Manz, Alexandra Grün, Dr. Nicole Rudolph-Mohr, Cordula Vogel, Birgit Ungerböck, Dr. Marianne Hanzlik, Prof. Dr. Michael Kersten, Dr. Frieder Enzmann, Dr. Faisal Khan und Christopher Koch und alle anderen, die ich möglicherweise vergessen habe zu erwähnen. Vielen Dank auch

an Philipp Weber für die fruchtbare Zusammenarbeit während des Forschungspraktikums.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und speziell meinen Eltern. Ohne die finanzielle vor allem aber die sonstige unermüdliche Unterstützung in anderen Bereichen hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können. Vielen Dank! Ich danke auch meiner Freundin Sandy für ihre liebevolle und grenzenlose Unterstützung und ihr beispielloses Verständnis. Was würde ich nur ohne Dich machen?

Kurzfassung

Biogeochemische Grenzflächen (engl.: *biogeochemical interfaces*, BGIs) im Boden bestimmen den Abbau von Schadstoffen. Sie sind durch ihren biochemischen Stoffumsatz im generellen stark mitverantwortlich für die Produktivität von Nutzpflanzen und die Qualität von Trinkwasser sowie das Langzeitverhalten von Chemikalien in belasteten Böden. Ziel dieser Arbeit war es, die räumliche Verteilung und die Aktivität von Biofilmen in mikroporösen Netzwerken und deren Wechselwirkung mit den speziellen Eigenschaften von Porenstrukturen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Konzentrationsverteilung von chemischen Stoffen (Konzentrationsgradienten) im Bereich von Mikrometern mittels oberflächenverstärkter Raman-Streuung (engl.: *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) quantifiziert werden. Diese Fragestellung ist ein Teil des Schwerpunktprogramms 1315 (engl.: *priority programme*, „*biogeochemical interfaces in soil*“, SPP 1315), welches von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert wurde und zum Ziel hatte, biogeochemische Grenzflächen in der Pedosphäre systematisch zu charakterisieren und deren Rolle im Abbau chemischer Substanzen zu enthüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch der Stoffumsatz des Bodenbakteriums *Paracoccus denitrificans* in einem geschlossenen mikrofluidischen System, welches die Topologie eines porösen Sediments abbildet (Mikromodell) untersucht. Als Maß für den Stoffumsatz wurde die Produktion von N_2 bzw. N_2O über die Größenänderung von Gasblasen gemessen. Aus Videoaufnahmen wurden die Grenzflächen zwischen Gasblase und Wasser ermittelt. Diese wurde in eine aktive (Gas/Wasser) und eine passive (Gas/Matrix) Grenzfläche unterteilt. Die Wachstumskurven der Gasblasen wurden mathematisch beschrieben und angenähert. Des Weiteren wurden alle relevanten Diffusionsprozesse sowie die Ausbildung von Gradienten der Gaskonzentrationen im Wasser mit Hilfe von Computersimulationen modelliert. Ein Vergleich der Gasproduktionsraten mit aktuellen Literaturdaten zeigte dabei eine gute Übereinstimmung. Auf diese Weise war es möglich, die Aktivität der beobachteten Bakterien in Beziehung mit den veränderlichen Bedingungen und lokal begrenzten Eigenschaften in dem sie umgebenden Porennetzwerk des Mikromodells in Verbindung zu bringen.

Für eine Quantifizierung chemischer Konzentrationsgradienten in freier Lösung wurde oberflächenverstärkte Raman-Streuung verwendet. Dazu wurden Silber-Nanopartikel synthetisiert und anschließend modifiziert. Dies geschah, indem sie mit Hilfe von NaCl zu einer kontrollierten Agglomeration gebracht wurden (Präagglomeration) und nach einer definierten Zeitspanne mit Wasser verdünnt wurden, um eine weitere Agglomeration zu verhindern. Mit dieser nun wesentlich stabileren und auch SERS-aktiveren Nanopartikel-Agglomerat-Suspension wurde eine reproduzierbare Beziehung zwischen der Konzentration der Modellsubstanz Kristallviolett (engl.: *crystal violet*, CV) und der Intensität ihrer SERS-Spektren gefunden und charakterisiert.

Dabei konnten vier Konzentrationsbereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften identifiziert werden. Bei extrem geringen CV-Konzentrationen ($1 \cdot 10^{-14}$ M - $1 \cdot 10^{-9}$ M) wurden lediglich intermittierende SERS-Spektren mit stark unterschiedlichen Intensitäten gefunden. Diese waren nur Sekundenbruchteile detektierbar. Zwischen $1 \cdot 10^{-9}$ M und $1 \cdot 10^{-7}$ M konnte eine reproduzierbare, lineare Kalibration ermittelt werden. Zwischen $1 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M wurde, aufgrund von erneut einsetzender Agglomeration durch den Analyten selbst, eine stark steigende, exponentielle Kalibrierkurve gefunden. Diese war jedoch nicht stabil und veränderte sich über die Zeit. Ab $1 \cdot 10^{-6}$ M verringerte sich die Intensität wieder mit zunehmender CV-Konzentration, was durch die Sedimentation der gebildeten Makro-Agglomerate der Nanopartikel, aber auch durch eine einsetzende Färbung der Lösung durch die hohe Analyt-Konzentration, bedingt wurde. Ferner wurde das Agglomerationsverhalten der präagglomerierten Nanopartikel-Suspension mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht und in Zusammenhang mit der Konzentration und der resultierenden SERS-Signalintensität von Kristallviolett gebracht.

Da die Diffusion eines Analyten aus einer Ölphase heraus als Modell für Gradientenmessungen an einer Schadstoffquelle dienen sollte, wurden ebenfalls präagglomerierte Nanopartikel-Suspensionen untersucht, welche über eine Beschichtung mit n-Octanol verfügten. Hierbei zeigte sich, dass die reproduzierbare Kalibration im Konzentrationsbereich zwischen $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-9}$ M und $1 \cdot 10^{-7}$ M bei einer n-Octanolbeschichtung nicht länger linear war. Sie folgte dort nun der Gleichung der Adsorptionsisotherme von Brunauer, Emmett und Teller (BET-Isotherme). Mit Hilfe dieses Zusammenhangs konnten schließlich Konzentrationsgradienten von CV im Bereich von Mikrometern mit quantitativen SERS-Messungen in Lösung erfasst und charakterisiert werden. Dabei wurden Diffusionskoeffizienten für CV zwischen $3 \cdot 10^{-10}$ m²/s und $5 \cdot 10^{-11}$ m²/s gefunden. Die Ergebnisse stimmten dabei gut mit den Literaturwerten und den theoretischen Konzentrationsverteilungen nach den Fick'schen Gesetzen überein. Zusätzlich wurde ein Modell vorgeschlagen, welches den Übergang von einer linearen Kalibration bei Nanopartikeln ohne n-Octanolbeschichtung zu einem Zusammenhang analog der BET-Isotherme bei einer Beschichtung mit n-Octanol, erklärt.

Ebenfalls wurde eine reproduzierbare Kalibration mit quantitativem SERS für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure, einer Zwischenstufe im bakteriellen Abbauweg des Schadstoffs Phenanthren, im Konzentrationsbereich zwischen $8,40 \cdot 10^{-4}$ M und $8,40 \cdot 10^{-3}$ M gefunden und charakterisiert.

Die Messung chemischer Konzentrationsgradienten im Bereich von Mikrometern mit quantitativem SERS in Lösung ist neu und wurde in der Literatur in dieser Form noch nicht beschrieben.

Abstract

Biogeochemical interfaces (BGIs) in soil determine the degradation of pollutants. They are by their biochemical metabolism in general jointly responsible for the productiveness of agricultural plants and for the quality of drinking water as well as for the long-term behaviour of chemicals in polluted grounds. It was the aim of this work, to examine the spatial distribution and the activity of biofilms in microporous networks together with their interaction with the special properties of pore structures. Furthermore the concentration distribution of chemical substances (concentration gradients) in the range of micrometers should be quantified with surface-enhanced Raman scattering (SERS). This question is part of the priority program 1315 („*biogeochemical interfaces in soil*“, SPP 1315), funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). It had the aim to systematically characterize biogeochemical interfaces in the pedosphere and to reveal their role in the degradation of chemical substances.

In the presented thesis the material turnover of the soil bacterium *Paracoccus denitrificans* was exemplarily investigated in a closed microfluidic system (micromodel) which mimics the topology of a porous sediment. As a measure for the material turnover rate the production of N_2 and N_2O was quantified by the growth of gas bubbles. The interface between the gas bubble and the water were determined from video recordings and were divided into an active (gas/water) and a passive (gas/matrix) interface. The growth curves of the gas bubbles were described mathematically and approximated. Furthermore all relevant diffusion processes as well as the formation of gradients of the gas concentrations in water were modeled with the help of computer simulations. A comparison of the gas production rates with current literature data showed good agreement. In this way it was possible to link the activity of the observed bacteria and the variable conditions as well as the locally limited properties with the surrounding porous network of the micromodel.

For a quantification of chemical concentration gradients in free solution surface-enhanced Raman scattering was used. For this silver nanoparticles were synthesized and subsequently modified. Therefore a controlled agglomeration (pre-agglomeration) with the help of NaCl was initiated and then diluted with water after a defined time span to prevent further agglomeration. With this more stable and more SERS-active nanoparticle-agglomerate-suspension a reproducible relation between the concentration of the model substance crystal violet (CV) and the intensities of the corresponding SERS-spectra were found and characterized.

In this way four concentration regions with different properties could be identified. At extremely low CV-concentrations ($1 \cdot 10^{-14}$ M - $1 \cdot 10^{-9}$ M) only intermittently SERS-spectra with strongly deviating intensities were found. These were only detectable for fractions of seconds. Between $1 \cdot 10^{-9}$ M and $1 \cdot 10^{-7}$ M a reproducible, linear calibration could be determined. Between $1 \cdot 10^{-7}$ M and $1 \cdot 10^{-6}$ M a strongly rising, exponential calibration curve was found, due to a new agglomeration process caused by the analyte itself. This rela-

tion however was not stable and changed by time. Above $1 \cdot 10^{-6}$ M the intensity decreased again with an increasing CV-concentration. This was caused by sedimentation of newly formed nano-particle macro-agglomerates, and by an increased staining of the solution by the high analyte concentration. Furthermore the agglomeration behavior of the pre-agglomerated nanoparticle-suspension was examined by means of UV/VIS- spectroscopy and was brought in connection with the relation between the concentration and the SERS-signal-intensity of crystal violet.

As the diffusion of an analyte out of an oil phase should serve as a model for gradient measurements at a pollutant source, also pre-agglomerated nanoparticle-suspensions with an n-octanol-coating were examined. It was found, that the calibration between $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-9}$ M and $1 \cdot 10^{-7}$ M was no longer linear, in case of an n-octanol-coating. It now followed the equation of the adsorption isotherm of Brunauer, Emmett and Teller (BET-isotherm). With the help of this relation concentration gradients of CV in the range of micrometers could finally be recorded and characterized with quantitative SERS measurements in solution. In doing so, diffusion coefficients for CV between $3 \cdot 10^{-10}$ m²/s und $5 \cdot 10^{-11}$ m²/s were found. These results agreed well with literature data and the theoretical concentration distributions by the Fick's laws. In addition, a model was proposed, which explains the transition from a linear SERS-signal-intensity-relation at the absence of an n-octanol-coating to a BET-isotherm analogue relation at the presence of an n-octanol-coating.

Beyond that, a reproducible calibration of the SERS-signal intensities in the concentration range between $8,40 \cdot 10^{-4}$ M and $8,40 \cdot 10^{-3}$ M was found and characterized for 1-hydroxy-2-naphthoic acid, an intermediate in the bacterial degradation pathway of the contaminant phenanthrene.

The measurement of chemical concentration gradients in the range of micrometers with quantitative SERS in solution is new and has not been described in the literature, yet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	12
2	Theoretische Grundlagen	16
2.1	Mikromodelle und poröse Netzwerke	16
2.1.1	Mikromodelle zur Untersuchung von Porenprozessen im Boden	16
2.1.2	Versuche in Mikromodellen und porösen Netzwerken	17
2.1.3	Chemische Gradienten in porösen Netzwerken	20
2.2	Stickstoffkreislauf und Denitrifikation	21
2.2.1	Quantifizierung des mikrobiellen Stoffumsatzes im Boden	21
2.2.2	Einflussgrößen und Parameter der Denitrifikation	23
2.2.3	Aerobe Denitrifikation	25
2.3	Stofftransport und Adsorption	27
2.3.1	Diffusion und Konzentrationsgradienten	27
2.3.2	Massentransfer an Phasengrenzflächen	30
2.3.3	Oberflächenspannung und Druckdifferenzen	37
2.3.4	Adsorption an Nanopartikel-Oberflächen und der n-Octanol Wasser Verteilungskoeffizient	39
2.4	Grundlagen der Raman-Mikrospektroskopie	43
2.5	Raman-Mikrospektroskopie an Biofilmen und Methoden der Spektrenauswertung	44
2.6	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SERS	46
2.7	Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen	50
2.7.1	Die Eigenschaften der Nanopartikel und ihrer Agglomerate	51
2.7.2	Die Eigenschaften der Analytmoleküle und Wechselwirkung mit der NP-Oberfläche	52
2.7.3	Die Art der Probenpräparation	52
2.7.4	Die Messbedingungen und Geräteparameter	54
2.8	<i>Single-Molecule-SERS</i> (SM-SERS)	55
2.9	SERS zur Untersuchung von Biofilmen	57
2.10	Quantitative SERS-Messungen in Lösung	57
2.11	Gradientenmessungen mit quantitativem SERS	60

3	Experimenteller Teil	61
3.1	Chemische Verbindungen, Lösemittel und Materialien	61
3.2	Mikromodell-Versuche	63
3.2.1	Versuchsaufbau: Mikromodelle und Spritzenpumpe	63
3.2.2	Sammlung des Bild- und Videomaterials	64
3.2.3	Versuchsdurchführung: Kultivierung von <i>Paracoccus denitrificans</i> in einem Mikromodell	65
3.3	Bildbearbeitung zur Messung des Volumens, der gesamten und der aktiven Grenzfläche von Gasblasen mit dem Programm Octave	66
3.4	Quantitative SERS-Messungen in Lösung	69
3.4.1	Raman-System LabRAM HR (Firma Horiba Scientific)	69
3.4.2	Synthese und Modifikation von Silber-Nanopartikeln (AgNPs) für quantitative SERS-Messungen	69
3.4.3	Messung von Kalibrierkurven und chemischen Gradienten mit quantitativem SERS in Lösung	70
3.4.4	Bestimmung der Stabilität der präagglomerierten AgNP-Suspension	74
3.4.5	Anreicherung von CV in der n-Octanolbeschichtung von Nanopartikel-Agglomeraten	76
3.5	Automatisierte Quantifizierung von SERS-Spektren mit der Programmiersprache R	76
3.6	Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mittels UV/VIS-Spektroskopie	79
3.6.1	Reaktion von AgNPs mit CV: zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen	80
4	Ergebnisse und Diskussion	82
4.1	Einfluss eines Porennetzwerks auf biogeochemische Grenzflächen - Mikromodell	82
4.2	BGIs im Mikromodell	83
4.2.1	Bedingungen in einem Mikromodell mit gasproduzierendem Biofilm	87
4.2.2	Anreicherung des Mediums mit Gas (Konzentrationsgradienten):	91
4.2.3	Gasaustausch durch Diffusion und Gasproduktion durch Bakterien	93
4.2.4	Ergebnisse der Computersimulation des Gasblasenwachstums im Mikromodell	98
4.2.5	Weiterführende Diskussion	104
4.3	Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen	109
4.4	Quantitative SERS-Messungen in Lösung	116
4.4.1	Reproduzierbare Quantifizierung von Kristallviolett	117
4.4.2	SERS-Verstärkung bei anderen chemischen Verbindungen	126
4.4.3	Reproduzierbare Quantifizierung von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure mit SERS in Lösung	127

4.4.4	CV in hohen Konzentrationen: nichtlineare Signalverstärkung und Signalabnahme	132
4.4.5	Übergangsbereiche in der Kalibration für den Analyten CV	135
4.5	SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration	140
4.5.1	Zeitaufgelöste SERS-Messungen	140
4.5.2	Zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen	142
4.5.3	Übergangsbereiche bei der Kalibration für den Analyten CV	145
4.6	Applikation: Quantitative SERS-Messungen an einer NAPL/Wasser-Phasengrenze	149
4.6.1	Versuchsaufbau und Messanordnung	149
4.6.2	Anstieg der mittleren CV-Konzentration	150
4.7	Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen	157
4.7.1	Beschichtung der Nanopartikel und veränderte Agglomerationseigenschaften	157
4.7.2	Agglomeration bei Anwesenheit von n-Octanol	159
4.7.3	Stabilitätsbereich bei Anwesenheit von n-Octanol	161
4.7.4	Kalibrierkurven bei Anwesenheit von n-Octanol	162
4.7.5	BET- Isotherme	171
4.8	Quantitative Gradientenmessungen mit SERS in Lösung	174
5	Zusammenfassung und Ausblick	178
6	Abkürzungsverzeichnis	181
7	Literaturverzeichnis	183

1 Einleitung und Problemstellung

Die Pedosphäre ist die Region des Bodens, in der sich die Atmosphäre, die Biosphäre und die Lithosphäre überschneiden und miteinander in Wechselwirkung treten. Sie hat, zusammen mit all den in ihr lebenden Organismen, einen globalen Einfluss auf den Wasser-, den Kohlenstoff-, und den Stickstoffkreislauf, sowie auf andere biochemische Kreisläufe (1–4). Sie ist in der Lage Wasser, Wärme, Gase und chemische Substanzen zu adsorbieren, zu speichern, zu leiten und wieder freizusetzen. Ihr Netzwerk aus Porenhohlräumen ist ein Lebensraum für eine große Anzahl an Organismen und Mikroorganismen, welche zusammen mit Biofilmen und der anorganischen Matrix sogenannte biogeochemische Grenzflächen (engl.: *biogeochemical interfaces*, BGIs) aufbauen. An diesen werden chemische Substanzen umgewandelt und abgebaut, weshalb sie für die Gesundheit und Produktivität von Pflanzen (Nahrungproduktion) sowie für eine gute Wasserqualität entscheidend sind (3). Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze sind Teil der lebenden Komponenten des Bodens und treten über biogeochemische Grenzflächen in eine dynamische und zeitlich veränderbare Wechselwirkung mit dem wasserleitenden porösen Netzwerk des Bodens (5). Ein mechanistisches Verständnis der Architektur, der Regeln bei der Bildung und der Veränderung von biogeochemischen Grenzflächen, und ihrer Eigenschaften und Interaktionen ist deshalb eine Grundvoraussetzung für ein Verständnis der Prozesse, welche im Boden stattfinden. Es ist daher im Hinblick auf die Produktion von Nahrung durch Nutzpflanzen, sowie für die Aufrechterhaltung einer guten Wasserqualität, aber auch für den Umgang mit schadstoffbelasteten Böden unabdingbar, all diese Einflüsse auf Mikroorganismen und ihre Folgen zu verstehen (6).

Das Schwerpunktprogramm 1315 („*biogeochemical interfaces in soil*“, SPP 1315), finanziert und gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), hat sich zum Ziel gesetzt, ein mechanistisches Verständnis dieses Zusammenspiels und der Abhängigkeiten physikalischer, chemischer und biologischer Vorgänge an biogeochemischen Grenzflächen zu gewinnen. Dabei sollen die Faktoren, welche ihre Architektur kontrollieren, identifiziert werden und die stattfindenden Prozesse auf molekularer Ebene in Verbindung mit der makroskopischen Welt gebracht werden (engl.: *upscaling*). Auf diese Weise soll das Mittel- und Langzeitverhalten von organischen Chemikalien im Boden besser erklärt und vorhergesagt werden können (6–8).

An biogeochemische Grenzflächen treten Mikroorganismen und ihre Biofilme mit der anorganischen Matrix des Bodens, aber auch mit den im Wasser befindlichen chemischen Stoffen (Nährstoffe sowie Schadstoffe) in Wechselwirkung. Sie sind räumlich und zeitlich stark ver-

änderlich, da dort eine chemische Umsetzung stattfindet, und die Biofilme von einem wechselndem Nahrungsangebot stark beeinflusst werden (5). Bakterien derselben Spezies können beispielsweise mehrere unterschiedliche Zellwandstrukturen ausbilden, als Reaktion auf Änderungen des Nährstoffangebotes und anderer Umwelteinflüsse (9–11). Sie sind eingebettet in sogenannte *extracellular polymeric substances* (EPS), welche hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Phospholipiden bestehen (11–15). Dabei ist die wichtigste Aufgabe der EPS das Zurückhalten und Speichern von Wasser und Nährstoffen, sowie der Schutz der Mikroorganismen vor Umweltstressoren, wie z. B. Scherkräften (9). Der Erdboden an sich ist jedoch undurchsichtig, weshalb einzelne Prozesse in Poren und die dabei entscheidenden Einflussgrößen oft nicht direkt zugänglich sind (16, 17). Deshalb sind die genauen Bedingungen, welche biogeochemische Grenzflächen in natura beeinflussen, häufig unbekannt.

Für ein fundiertes Verständnis des Abbaus und der Umsetzung von chemischen Stoffen an BGIs und der Prozesse, welche im Boden stattfinden, ist es ebenfalls nötig, geringe chemische Konzentrationen mit hoher Auflösung messen zu können. Die Einflüsse in einem porösen Netzwerk wie dem Boden können sich innerhalb der Dimension einer einzelnen Pore bereits stark ändern. Es ist daher nötig, über eine nichtinvasive und chemisch sensitive Analyse-methode zu verfügen, um eben diese chemischen Konzentrationsgradienten an biogeochemischen Grenzflächen auf der Skala von wenigen Mikrometern in einer ungestörten Umgebung messen zu können (17).

Es ist dabei möglich, Bakterien in sogenannten Mikromodellen zu kultivieren. Dies sind in Siliziumwafer geätzte, mit einem Deckglas versehene und nur wenige Mikrometer tiefe Strukturen. Sie imitieren das poröse Netzwerk des Bodens und sind gleichzeitig für optische Analysemethoden gut zugänglich. Dabei zeigt sich, dass die Bakterien stark auf die Eigenschaften der sie umgebenden, mikroporösen Strukturen reagieren. Nambi et al. fanden, dass der Bewuchs von Bakterien in einem Mikromodell dem örtlich veränderlichen Nährstoffangebot nachfolgt (5). Experimente von Pearce et al. (18) zur Bioverfügbarkeit zeigten ebenfalls den starken Einfluss von bevorzugten Fließpfaden in porösen Netzwerken und einer räumlicher Begrenzung auf das Verhalten von Bakterien. Diesen Versuchen gemein ist jedoch die Tatsache, dass chemische Konzentrationen nicht direkt gemessen werden konnten, sondern nur indirekt durch die Reaktion der biogeochemischen Grenzflächen auf Veränderungen von Konzentrationen der Nährlösungen sichtbar gemacht werden konnten.

Biofilme selbst hingegen wurden untersucht, um unter anderem deren Entstehung, Struktur, Alterung und Reaktionen auf unterschiedliche Umweltbedingungen besser zu verstehen. Hier können als Untersuchungsmethoden beispielsweise konfokale Laserraster-Mikroskopie (engl.: *confocal laser scanning microscopy*, CLSM, (19)), Thermische-Linsen-Mikroskopie (engl.: *thermal lens microscopy*, TLM, (11, 20)), photoakustische Spektroskopie (engl.:

photoacoustic spectroscopy, PAS, (21)) oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (engl.: *fluorescence in situ hybridisation*, FISH, (22)) genannt werden.

Dagegen bietet die Raman-Mikrospektroskopie die Gelegenheit, Wasser enthaltende biologische Systeme zerstörungsfrei und ohne schwierige Probenpräparation zu untersuchen, und gleichzeitig chemische Informationen über die Schwingung von Bindungen zu erhalten (23–25). So können beispielsweise charakteristische Spektren von ganzen Mikroorganismen erhalten werden (12, 26, 27), welche Aufschluss über Zusammensetzung und Zustand der Biofilme geben können (26, 27).

Mit Hilfe von Nanopartikeln und oberflächenverstärkter Raman-Streuung (engl.: *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) lässt sich, dank elektromagnetischer und chemischer Verstärkung, die Sensitivität dieser Messmethode zusätzlich um einen Faktor von bis zu 10^{11} erhöhen (28–30). Damit kann chemische Information von Biofilmen und Bakterien mit hoher örtlicher Auflösung erfasst werden (31, 32). Es ist daher sogar möglich mit SERS einzelne Bakterien und EPS individuell zu detektieren und zu charakterisieren (33–35). Allerdings ist für oberflächenverstärkte Raman-Mikrospektroskopie eine Bindung oder die direkte Nähe der zu untersuchenden Stoffe zu der Oberfläche der Nanopartikel (< 10 nm) zwingend nötig, da die Verstärkung mit wachsender Distanz schnell abfällt ($I \sim d^{-12}$). In der Literatur wurde bislang noch nicht über Messungen von Abbau oder Stoffumsatz anhand chemischer Konzentrationen mit SERS berichtet. Die Konzentrationen von relevanten Stoffwechselprodukten können dabei in funktionierenden biologischen Systemen in mikro- bis nanomolaren Bereichen liegen. Gleichzeitig wurden auf diese Weise bisher nur die Bakterien und Biofilme selbst untersucht. Deren direkte Umgebung (Batch-Reaktor oder mikrofluidisches System) und der von dort stammende Einfluss auf das Verhalten der Bakterien wurde nicht mit einbezogen. Zwar wurde in der Literatur bereits über den Einsatz von SERS-Messungen an frei in Lösung schwimmenden und nicht auf Oberflächen liegenden Nanopartikeln als quantitative Analysemethode berichtet (36–39), jedoch konnten diese bisher noch nicht dazu benutzt werden, um durch Diffusion erzeugte chemische Gradienten zu quantifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die räumliche Verteilung und die Aktivität von Biofilmen in mikroporösen Netzwerken zu quantifizieren und zu charakterisieren. Ebenfalls sollte die Konzentrationsverteilung geringer Mengen organischer Substanzen über Distanzen von wenigen hundert Mikrometern, welche typisch für die Größenordnungen von Poren sind, quantifiziert werden. Die Biofilme der Bakterien sollten dabei in Mikromodellen (geschlossene mikroporöse Durchflusssysteme mit Netzwerkstruktur) untersucht werden. Zusätzlich sollten die Einflüsse, welche das umgebende Porensystem eines Mikromodells auf das Verhalten der Bakterien und BGIs ausübt, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurde die Bakterienaktivität anhand von deren Gasproduktion mit Hilfe von computergestützter Bildauswertung gemessen und in Bezug zu den sich lokalen ändernden Bedingungen gesetzt. Weiter wurden erfolgreich Computersimulationen durchgeführt, um die Gasproduktion der Bakterien,

1 Einleitung und Problemstellung

die Diffusionsprozesse und die sich dadurch ändernden Gaskonzentrationen im Wasser zu modellieren.

Für die Messung und Visualisierung chemischer Konzentrationsgradienten hingegen kam oberflächenverstärkte Raman-Streuung zum Einsatz. Diese Verwendung von SERS für die quantitative Analyse ist neu und stellt eine zerstörungsfreie Methode zur Messung geringster Konzentration in freier Lösung dar. Die dazu benötigten Silber-Nanopartikel mussten für diese Art der Anwendung modifiziert werden, weshalb deren Wechselwirkungen untereinander und mit dem Analyten ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen waren. Ziel war es, einen reproduzierbaren Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Analyten und der resultierenden SERS-Signalintensität zu finden und zu charakterisieren.

Darauf aufbauend sollte die Ausbildung von Konzentrationsgradienten bei der Diffusion eines Analyten aus einer Ölphase heraus gemessen werden, weshalb ebenfalls der Einfluss von einer Beschichtung der Nanopartikel untersucht wurde. Da für diese Art der Messungen eine große Zahl an SERS-Spektren aufgezeichnet und ausgewertet werden mussten, sollte eine automatisierte Computerauswertung zum Einsatz kommen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Mikromodelle und poröse Netzwerke

2.1.1 Mikromodelle zur Untersuchung von Porenprozessen im Boden

Die speziellen Eigenschaften von Porennetzwerken, vergleichbar mit denen des Bodens, können mit Hilfe von Mikromodellen sehr effektiv untersucht werden (17, 40). Dies sind Strukturen von Netzwerken (künstliche oder natürliche), welche beispielsweise wasserleitende Schichten in Böden imitieren und in einen Siliziumwafer geätzt wurden (41) (vgl. Abbildung 2.1). Hierbei kommen Trocken- oder Nass-Ätzverfahren zum Einsatz. Der Wafer wird anschließend mit Bohrungen für Ein- und Auslässe und einem Borosilikat-Deckglas versehen, welches mittels anodischem Bonding irreversibel mit dem Wafer verbunden wird. Dadurch ergibt sich, je nach Abmessungen, eine flache Netzwerk Struktur, mit einer Kanaltiefe zwischen typischerweise $25\ \mu\text{m}$ und $35\ \mu\text{m}$. Nach der Montage auf einem Stahlblock und Anschluss an mikrofluidische Kapillaren, gleicht dieser experimentelle Aufbau sehr stark den Bedingungen in einem porösen Netzwerk des Bodens (vgl. Abbildung 2.1).

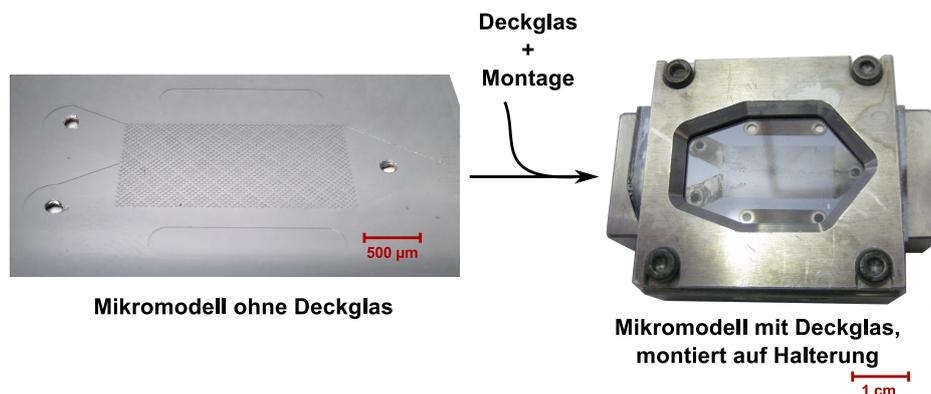


Abbildung 2.1: Links: Siliziumwafer mit geätzter Mikrostruktur und Bohrungen zum Durchleiten von Flüssigkeiten; ohne Deckglas. Rechts: Mikromodell mit gebondetem Deckglas, montiert auf einem Edelstahlblock mit Anschlüssen für mikrofluidische Kapillaren (seitlich am Stahlblock, nicht sichtbar).

Im Laufe der Fertigung wird der Wafer zusätzlich unter einer Sauerstoffatmosphäre erhitzt. Dadurch wird die direkte Oberfläche, welche später im Kontakt mit den Mikroorganismen und den hindurch geleiteten Flüssigkeiten steht, oxidiert und ist damit vergleichbar mit

2.1 Mikromodelle und poröse Netzwerke

Quarz. Der genaue Produktionsprozess von Mikromodellen wird detailliert in Baumann et al. (40) und Chomsurin et al. (42) beschrieben.

Auf Mikromodelle können unter anderem optische Analyseverfahren wie Fluoreszenz-Mikroskopie (41) oder Raman-Mikrospektroskopie aber auch fluoreszierende Tracerpartikel für Flussfeldanalysen angewandt werden (40, 43). Dabei sind die vorherrschenden Bedingungen und Parameter in der Regel gänzlich bekannt, im Gegensatz zu Säulen-Versuchen mit realen Böden. In Abbildung 2.2 ist ein typischer Aufbau eines Experiments mit einem Mikromodell zu sehen. Mit Hilfe von Spritzen, mikrofluidischen Kapillaren und Ventilen können in dem hier gezeigten Aufbau verschiedene Flüssigkeiten oder Gase über zwei Einlässe durch das Mikromodell geleitet werden. Die verwendeten Fließraten Q liegen dabei in der Regel zwischen $5 \mu\text{L/h}$ und $20 \mu\text{L/h}$, was einer Filtergeschwindigkeit v von $0,4 \text{ m/d}$ bis $1,6 \text{ m/d}$ entspricht (mit $v = Q/A$ und Querschnittsfläche $A = 3 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$). Die Fließgeschwindigkeit von Grundwasser in Sand bewegt sich normalerweise in der Größenordnung von 1 m/d (1, 2).

Über zwischengeschaltete 3- oder 6-Wege-Ventile können zusätzlich Lösungen oder Gase während den laufenden Versuchen injiziert werden.

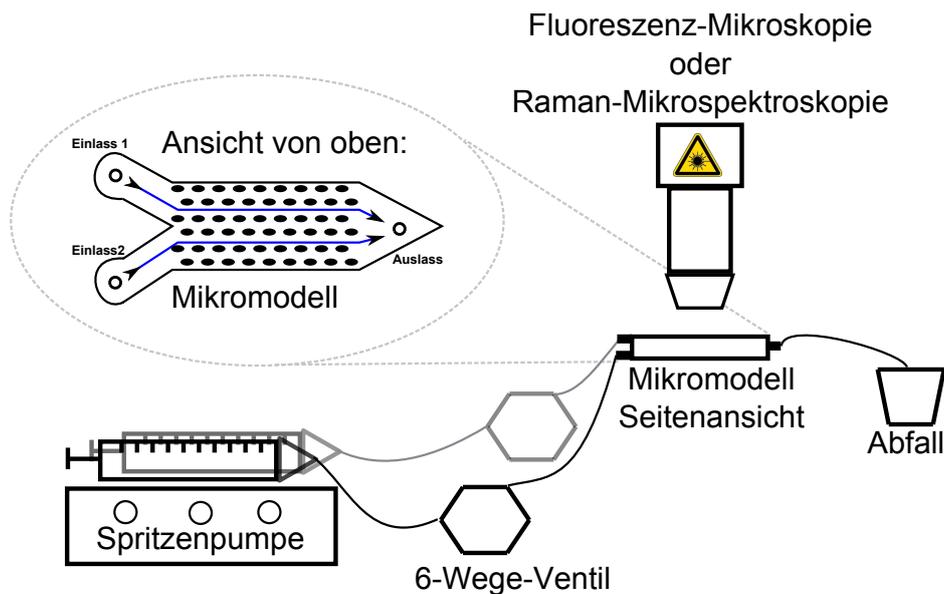


Abbildung 2.2: Skizze eines typischen Versuchsaufbaus für Mikromodell-Experimente. Die Flüssigkeiten werden mit einer Spritzenpumpe über mikrofluidische Kapillaren durch das Mikromodell geleitet. Über zwischengeschaltete Ventile können Lösungen oder Gase injiziert werden.

2.1.2 Versuche in Mikromodellen und porösen Netzwerken

Mit Mikromodellen kann das Transportverhalten in bodenähnlichen Netzwerken untersucht werden. Baumann et al. analysierten, wie sich fluoreszierende Kolloide durch ein Mikromodell bewegten und verglichen die Ergebnisse mit statistischen Berechnungen und mathematischen Modellen (40). Auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte anhand der

2.1 Mikromodelle und poröse Netzwerke

Länge des zurückgelegten Weges die Geschwindigkeit der Kolloide ermittelt werden. Zusätzlich dazu wurde mit einem zweidimensionalen Lattice-Boltzmann-Modell das Flussfeld im Mikromodell simuliert und in Verbindung mit einem Algorithmus zum Verfolgen der Partikel die theoretischen Fließpfade berechnet. Sie fanden dabei eine gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den Simulationsergebnissen und konnten die Effizienz der Partikelfiltration durch das Netzwerk bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten bestimmen. Da natürliche Kolloide im Grundwasser, wie sie beispielsweise unter anderem bei der Verwitterung von Laub entstehen können, durch Adsorption den Transport von chemischen Stoffen entscheidend beeinflussen, ist es wichtig das Verhalten von Kolloiden im Boden genau zu verstehen.

Durch Versuche mit Mikromodellen konnten die theoretischen Modelle zum Transport- und Dispersionsverhalten von Kolloiden experimentell bestätigt und wesentlich verbessert werden (43) (Dispersion = Die räumliche Verteilung von Partikeln durch das flüssige Medium). Baumann et al. (43) untersuchten, wie unterschiedliche Porengeometrien die Dispersion bei dem Transport kolloidhaltiger Flüssigkeiten beeinflussen. Dabei kam eine computergestützte Auswertung des Bildmaterials mit Algorithmen zum Verfolgen von Partikeln (Trajektorien-Analyse mit Verfolgung einzelner Partikel, engl.: *single-particle tracking*) zum Einsatz. So konnte das Verhalten einer großen Zahl von Kolloiden analysiert und in Verbindung zu den Eigenschaften des Porennetzwerks gebracht werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, in welcher Weise eine durch Adsorption erzeugte Schicht von Huminsäure auf der Mikromodell-Struktur das Dispersionsverhalten beeinflusst. Diese bewirkte eine Verlangsamung der Partikel, welche aufgrund von einer erhöhten Haftung und dadurch hervorgerufene kurzzeitigen Wechselwirkungen entstand, und erhöhte damit die Dispersion (43). Der Transport von hydrophoben Schadstoffen über die Adsorption an beweglichen Kolloiden ist ein entscheidender Faktor bei Gefährdungsbeurteilungen von Böden, welche mit organischen Phasen belastet sind.

In Versuchen mit Mikromodellen wurden von Baumann et al. ebenfalls untersucht, wie sich Kolloide in einer chemisch reaktiven Umgebung verhalten (41). Dazu wurden fluoreszierende Latex-Nanopartikel in ein Porennetzwerk, welches mit n-Octanol-Tröpfchen kontaminiert war eingebracht. Mittels Bildverarbeitung konnte die Tropfengröße der Ölphase und der in ihr vorhandene Gehalt des gelösten, fluoreszierenden Farbstoffes ermittelt werden. Es zeigte sich dabei deutlich, dass abhängig von der Beschaffenheit des vorhandenen Porennetzwerks, ein Kolloid-vermittelter Transport und auch Wiedereintrag der Kontaminanten in die organische Phase, einen nicht zu vernachlässigenden Effekt auf die gesamte transportierte Menge an Schadstoffen haben kann. Sowohl der Transport, als auch der Wiedereintrag müssen also, je nach Art der vorliegenden Bodenbelastung, mitberücksichtigt werden (41).

Auset et al. untersuchten das Transportverhalten in porösen Medien im Hinblick auf die Filtereigenschaften für die Wasseraufbereitung (44, 45). Dabei verglichen sie gelöste Tracer

2.1 Mikromodelle und poröse Netzwerke

(NaI) mit Bakterien (*Eschericia coli*) sowohl in Mikromodellen, als auch in mit Sand gefüllten Säulen (45). Sie konnten nachweisen, dass der wiederholte Transport von gelöstem Tracer bei intermittierenden Spülvorgängen hauptsächlich durch Diffusion aus stagnierenden Bereichen in die mobile Phase dominiert wird. Immobiles Wasser in Poren fungierte also als Speicherreservoir, aus dem der Tracer bei erneuter Spülung in die mobile Phase diffundieren konnte. Dem gegenüber wird der Transport von Bakterien hauptsächlich durch die Adsorption an Fest/flüssig- und Flüssig/gasförmig-Grenzflächen oder aber durch die Speicherung in dünnen Wasserfilmen bestimmt (45).

Porennetzwerke haben darüber hinaus einen spezifischen Einfluss auf das Wachstum von Biofilmen oder das Abscheideverhalten von anorganischen Phasen beispielsweise bei der Einbringung und Speicherung von CO_2 in Böden. Yoon et al. beschrieben die Auswirkungen der Struktur von porösen Netzwerken auf die Abscheidung von CaCO_3 bei der Vermischung einer CaCl_2 - und einer Na_2CO_3 -Lösung in einem Mikromodell (46, 47). Begleitende Computersimulationen hoben dabei die stark veränderliche Dynamik des Fließverhaltens bei der Blockierung einzelner Poren hervor. Diese Untersuchungen trugen damit zu einem besseren Verständnis der Vorgänge bei, welche bei einer CO_2 -Injektion in den Boden stattfinden, da in diesen Bereichen noch nicht alle Prozesse restlos aufgeklärt sind.

Van Noorden et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der dynamischen Veränderung des Flussfeldes in porösen Netzwerken (48). Dabei wurde der Bewuchs von Biofilmen in einer Reihe von Kanälen mathematisch simuliert. Bei der Anwendung der erhaltenen Gleichungen für die mikroporösen Systeme auf makroskopische Systeme, zeigte sich eine extrem starke Abhängigkeit der zugrunde liegenden Mikrogeometrie auf die Ergebnisse. So wurde ein quadratischer Zusammenhang zwischen der Permeabilität (Maß für die Durchlässigkeit von Böden für Flüssigkeiten) und der Porosität (Verhältnis von Hohlraumvolumen zu Gesamtvolumen) gefunden, wenn die Gleichungen auf größere poröse Netzwerke angewandt wurden. Dieser quadratische Zusammenhang ändert sich jedoch bei einer anderen Mikrogeometrie, was ein *upscaling* zur Beschreibung von makroskopischem Verhalten in porösen Netzwerken generell erschwert.

Rossteuscher et al. wendeten Thermische-Linsen-Mikroskopie (TLM) auf Biofilme von gemischten Bakterienspezies in Mikrokanälen an (11, 20). Es wurden dabei funktionalisierte Oberflächen mit unterschiedlicher Hydrophobizität im Hinblick auf das Anhafte- und Wachstumsverhalten der Bakterien untersucht. Diese waren Glas (hydrophil), MPC-Copolymer (Poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholin(MPC)-co-methyl-carboxylsäure]), APTS (3-Aminopropyltriethoxysilan) und ODS (Octadecyltrichlorosilan) nach steigender Hydrophobizität. In den Mikrokanälen aus hydrophilem Glas konnten nur wenige runde Bakterien anhaften und wachsen, wohingegen auf Oberflächen mit zunehmender Hydrophobizität mehr und eher stäbchenförmige Bakterien Biofilme bildeten. Diese Ergebnisse zeigten, dass bei Biofilmbildung nicht nur die Eigenschaften der bewachsenen Oberfläche entscheidend sein

2.1 Mikromodelle und poröse Netzwerke

können, sondern auch die Oberflächeneigenschaften der Bakterien selbst eine Rolle spielen. Weiter legten die Ergebnisse nahe dass, je nach verfügbarer Oberfläche, der Initialbewuchs von gemischten Biofilmen durch spezialisierte Untergruppen der Bakterien gesteuert wird (11, 20).

Knutson et al. fanden bei einem Vergleich von Mikromodell-Experimenten mit Computersimulationen, dass hauptsächlich Scherkräfte und die Geschwindigkeit, mit der Mikroorganismen Nährstoffe umsetzten, entscheidend dafür waren, wie sich die Biomasse in Mikromodellen verteilte (49). Dabei wurden die Versuche von Nambi et al. (5) nachmodelliert, bei denen ein Mikromodell mit dem anaeroben Bakterium *Sulfurospirillum multivorans* beimpft wurde. Anschließend wurde über die separate Zuläufe eine Tetrachlorethen-Lösung (Elektronenakzeptor) und eine Lactat-Lösung (Elektronendonator) injiziert. Damit waren lediglich in der Mischungszone dieser beiden Lösungen die Voraussetzungen für ein Bakterienwachstum gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass der Biofilm durch sein Wachstum auf eine Veränderung der Konzentrationen und der Zusammensetzung der Lösungen reagierte und so den geeigneten Nährstoffkonzentrationen, welche sich räumlich und zeitlich veränderten, folgte (5).

Pearce et al. untersuchten das Wachstum des fluoreszierenden Bakteriums *Geobacter sulfurreducens* in einem Mikromodell, das ebenfalls über separate Zuläufe mit Elektronendonator und -akzeptor beladen wurde (18). Die räumliche Anordnung der Bakterien wurde dabei mit Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass die Bildung von bevorzugten Fließpfaden und daraus entstehende Scherkräfte maßgeblich die Verteilung von Biomasse beeinflussen. Diese wuchs ebenfalls in der Mischungszone, in der Elektronendonator und -akzeptor in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

2.1.3 Chemische Gradienten in porösen Netzwerken

Chemische Gradienten bilden sich ebenfalls innerhalb komplexer Systeme wie Böden aus. Beispielsweise untersuchten Rudolph et al. die Gradienten von Sauerstoff und pH-Wert in der direkten Nähe von Wurzeln, welche an Glasplatten wuchsen (50–52). Dabei wurden mittels chemisch sensitiver Farbstoffe in Folien an der Innenseite dieser Glasplatten Fluoreszenzbilder erhalten, anhand derer die Sauerstoffkonzentration und der pH-Wert quantifiziert werden konnten. Die räumliche Auflösung betrug dabei 50 μm (51). Zusätzlich wurden einerseits analytische Verfahren, wie Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (engl.: *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI-MS) (51) und andererseits Neutronenradiographie (50) eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ältere Wurzelteile schneller Wasser und Sauerstoff aufnehmen können, als jüngere. Ebenso konnte ein signifikant niedriger pH-Wert an Wurzelregionen mit niedrigem Wassergehalt nachgewiesen werden (50). Auch konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert einen Einfluss auf

den Abbau des Schadstoffes Metalaxyl an Wurzeln hat, sowie dass dort gleichzeitig niedrige Sauerstoffkonzentrationen entstehen können (51).

2.2 Stickstoffkreislauf und Denitrifikation

2.2.1 Quantifizierung des mikrobiellen Stoffumsatzes im Boden

Um die Aktivität von Bakterien mit den lokalen Bedingungen der sie umgebenden Netzwerkstruktur in Verbindung bringen zu können, ist es nötig über eine messbare Größe zu verfügen, welche mit dem Stoffumsatz der Bakterien verknüpft ist. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck die Produktionsgeschwindigkeit von Gas durch Bakterien, welche sich in einem Mikromodell befanden, herangezogen. Es ist bekannt, dass Bakterien sehr empfindlich auf Änderungen ihrer Lebensbedingungen (Nährstoffangebot, Sauerstoffkonzentration etc.) reagieren, welche ihrerseits eng mit dem Porennetzwerk des sie umgebenden Bodens verknüpft sind (5, 18, 49). Daher können sie auch als sensible und gut verteilte Sensoren angesehen werden, welche aufgrund ihres Verhaltens Rückschlüsse auf sonst schwer zugängliche Eingangsgrößen zulassen. Die Produktion von N_2 (oder N_2O) bei der Denitrifikation scheint dabei für dieses Vorhaben gut geeignet zu sein.

Bodenbakterien sind durch die chemischen Prozesse, welche sie katalysieren, unter anderem auch an der Umsetzung von stickstoffhaltigen Verbindungen und damit am Stickstoffkreislauf beteiligt. Dieser ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt. Er lässt sich in drei Bereiche einteilen, die Nitrifikation, die Denitrifikation und die N_2 -Fixierung.

Die Nitrifikation bezeichnet die Oxidation von organischem Stickstoff (z.B. in Form von Aminogruppen oder Ammoniak) über NH_4^+ (Oxidationszahl -3), zu NO_3^- (Oxidationszahl +5). Für diese Umwandlung sind sogenannte nitrifizierende Bakterien verantwortlich. Dabei ist die Anwesenheit von Sauerstoff (in Form von O_2) zwingend nötig, da er an der hier ablaufenden, mehrstufigen enzymatischen Reaktion beteiligt ist (aerobe Bedingungen) (53).

Unter der Denitrifikation versteht man die Umsetzung von Nitrat (NO_3^- , Oxidationszahl +5) zu molekularem Stickstoff (N_2 , Oxidationszahl 0). Für diese ebenfalls mehrstufige enzymatische Reaktion ist kein Sauerstoff nötig. Dabei gibt es eine Vielzahl von Parametern, welche den Ablauf der Reaktion und die Produktivität der Bakterien beeinflussen (54, 55).

Der Kreislauf wird durch die Umsetzung von molekularem Stickstoff (N_2 , Oxidationszahl 0) zu Ammoniak (NH_3 , Oxidationszahl -3) durch symbiotische Bakterien in Wurzelknöllchen wieder geschlossen (N_2 -Fixierung) (53). Diese sind die einzigen bekannten Bakterien, abgesehen von wenigen Archaeen, welche im Stande sind, die starke Dreifachbindung des Stickstoffs durch Nitrogenasen, einem Enzymsystem aus mehreren Proteinen, aufzubrechen. Da Nitrogenasen empfindlich gegenüber Sauerstoff sind, schützen die Bakterien diese entweder durch Schleimkapseln, dickwandige Zellen (Heterocysten) oder die außergewöhnlich schnelle Veratmung von Sauerstoff (53).

2.2 Stickstoffkreislauf und Denitrifikation

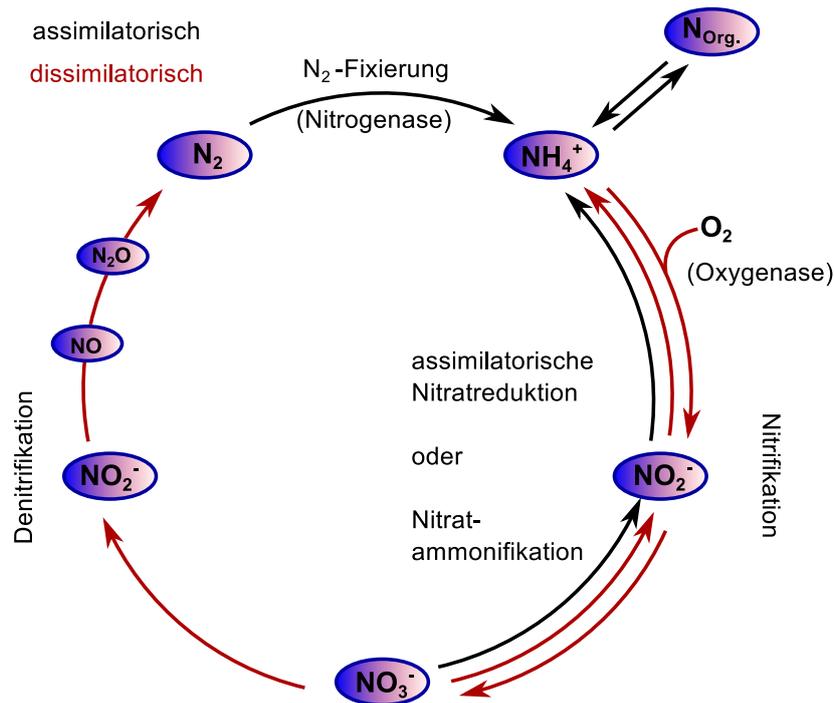


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs. Bei der Denitrifikation sind auch die Vorstufen NO und N₂O aufgeführt. Angelehnt an Cypionka et al. (53)

Die enzymatischen Reaktionen, welche von den Bakterien vollzogen werden, befinden sich in einem sensiblen Gleichgewicht, das empfindlich auf kleinste Veränderungen reagiert. So kann bei der Denitrifikation beispielsweise eine Versauerung des Bodens das Verhältnis von N₂ (Endprodukt) zu N₂O (letzte Vorstufe vor N₂) verändern oder die Geschwindigkeit der Reaktion beeinflussen (54). Die exakten Abläufe der Denitrifikation und die genaue Rolle einzelner Enzyme sind dabei immer noch nicht lückenlos verstanden (56).

Die Geschwindigkeit der Gasproduktion durch Bakterien kann dann als ein Maß für den Stoffumsatz herangezogen werden. Um diesen anschließend mit dem umgebenden Netzwerk in Verbindung bringen zu können, müssen jedoch die Faktoren, welche die Umsatzrate beeinflussen und deren Gründe bekannt sein.

2.2.2 Einflussgrößen und Parameter der Denitrifikation

Die Denitrifikation an sich benötigt keinen Sauerstoff. Dennoch sind denitrifizierende Bakterien in der Regel auch in der Lage Sauerstoff anstatt von Nitrat als Elektronenakzeptor für ihre Energiegewinnung zu nutzen (fakultative anaerobe Bakterien) (53). In diesem Falle wird also ein gänzlich anderer Abbauweg als die Denitrifikation von den Bakterien beschrrieben. Da die Veratmung von Sauerstoff jedoch eine höhere Energieausbeute hat als die anaerobe Denitrifikation, ist die Umstellung zwischen diesen beiden Abbauwegen für Bakterien essentiell. Die Denitrifikation ist deshalb häufig bei Böden zu finden, in denen sich der Sauerstoffgehalt vergleichsweise schnell ändern kann. Die Bakterien können somit Sauerstoff für eine aerobe Atmung nutzen, solange dieser zur Verfügung steht, sind aber auch in der Lage bei einer temporären Abwesenheit von O_2 , Nitrat über den anaeroben Abbauweg der Denitrifikation zu Stickstoff (N_2) umzusetzen (54, 57). Das rechtzeitige Umstellen auf einen anaeroben Abbauweg ist dabei jedoch essentiell, da ansonsten ein Überleben der Bakterien bei zu plötzlichem Sauerstoffmangel eventuell nicht mehr möglich wäre.

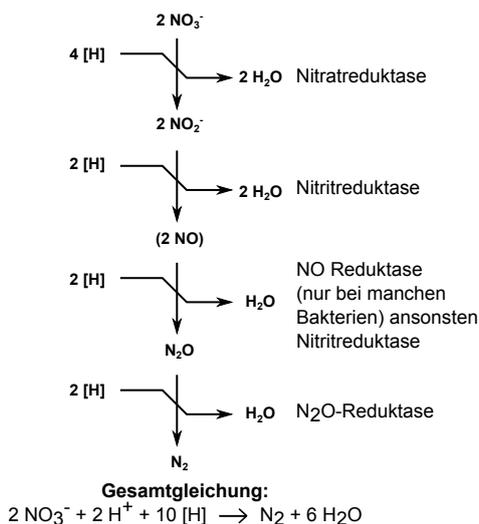


Abbildung 2.4: Übersicht der Einzelschritte der Denitrifikation mit Nennung der beteiligten Enzyme. Angelehnt an Cypionka et al. (53)

Es kann dabei vorkommen, dass durch die teilweise Hemmung einzelner Enzyme, unter anderem durch den zu schnellen Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen, nicht alle Schritte der Denitrifikation durchlaufen werden können. So kann es sein, dass das Endprodukt nicht mehr N_2 alleine, sondern eine Mischung aus N_2 und N_2O ist. In einem solchen Fall können sich zusätzlich Zwischenprodukte, wie NO_2^- oder NO ansammeln (vgl. Abbildung 2.4), welche ab nanomolaren Konzentrationen (jedoch abhängig von Bakterienstamm und Wachstumsbedingungen) dann toxisch auf die Bakterien wirken können. Eine unvollständig durchlaufene Denitrifikation kann also nicht nur die Menge an produziertem N_2O erhöhen, sondern gleichzeitig auch schädlich für die beteiligten Bakterien sein (57, 58). Bei einer gänzlichen Hemmung der Enzyme ist es sogar möglich, dass ausschließlich N_2O

2.2 Stickstoffkreislauf und Denitrifikation

und kein N_2 mehr produziert wird (55). Das Wissen über die Abläufe bei der Denitrifikation und die Einflüsse, welche sie und ihre Endprodukte kontrollieren, ist somit entscheidend beispielsweise bei der Abwasseraufbereitung oder dem Betreiben von Biogasanlagen. Weiter ist N_2O ein Treibhausgas, welches 320 mal stärker an der Klimaerwärmung beteiligt ist, als CO_2 (59) und darüber hinaus den Abbau der Ozonschicht begünstigt (54).

Die Faktoren, welche die Denitrifikation in ihrer Effektivität beeinflussen können, sind unter anderem die Anwesenheit von Sauerstoff, die verfügbare Menge an Nitrat, der Wassergehalt, die Temperatur und die Menge an vorhandenem C-Substrat, sowie der pH-Wert des Bodens (60). So fanden beispielsweise Bergaust et al. (54), dass die Denitrifikation bei *Paracoccus denitrificans*, einem fakultativ anaeroben Bodenbakterium, bei pH-Werten zwischen 7,5 und 6 beginnt langsamer zu werden und sich auch das N_2O/N_2 Verhältnis ändert. Je geringer der pH-Wert war, desto schlechter kamen die Bakterien mit den Bedingungen zurecht. Dabei wurden Bakterienkulturen in Flüssignährmedium in geschlossenen Gefäßen untersucht, wobei sowohl das Medium, als auch der Gasüberstand durch laufende Messungen analysiert wurden. Es zeigte sich, dass sich das N_2O/N_2 -Verhältnis von 0,08 % (pH 7,5) über 0,2 % (pH 7), 0,3 % (pH 6,5), 20 % (pH 6,25) zu 100 % bei pH 6 ändern kann. Die Ursache dafür schien eine Hemmung der N_2O -Reduktase aufgrund des zu niedrigen pH-Wertes zu sein. Dieses Enzym, welches von dem sogenannten nosZ-Gen codiert wird, konnte die Umsetzung von N_2O zu N_2 unter diesen Bedingungen nicht mehr hinreichend katalysieren, oder konnte nicht richtig exprimiert werden. Ebenfalls konnten Bakterien, welche die Möglichkeit hatten, sich langsam an die anaeroben Bedingungen zu gewöhnen, N_2O auch bei niedrigen pH-Werten noch zu N_2 umsetzen. Dies geschah jedoch langsamer (im Bereich von Stunden), wie bei neutralem pH-Wert (54).

In gleicher Weise können Zwischenprodukte der Denitrifikation (NO_2^- und NO), wenn sie in zu hohen Konzentrationen vorliegen, die beteiligten Enzyme hemmen und so die Effektivität der Gesamtreaktion beeinflussen. Baumann et al. (57) berichteten beispielsweise über ein Experiment, bei dem ebenfalls das Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* untersucht wurde. Die Bakterien wurden dabei in einem Chemostat-Bioreaktor gezüchtet, bei dem aufgrund eines fließenden Gleichgewicht die Zusammensetzung des Nährmediums und die Bakterienzahl konstant blieb. In dem Versuch war es möglich durch Begasen des Mediums mit Sauerstoff oder Helium schnell zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen zu wechseln. Es zeigte sich, dass die Bakterien bei einem plötzlichen Sauerstoffentzug und einem pH-Wert von 6,8 des Mediums nicht mehr in der Lage waren eine stabile Reaktionskaskade zur Denitrifikation aufzubauen. Das N_2O/N_2 -Verhältnis änderte sich drastisch zugunsten von N_2O . Erst als wieder der Sauerstoffgehalt an normale Bedingungen angeglichen wurde, konnten sich die Bakterien wieder vermehren. Wurde dasselbe Experiment jedoch bei einem pH Wert von 7,5 durchgeführt, so konnten die Bakterien den Schock abfangen und es war ihnen noch möglich wieder ein Gleichgewicht bei der Denitrifikation mit einem normalen, sehr kleinen N_2O/N_2 -

2.2 Stickstoffkreislauf und Denitrifikation

Verhältnis zu erreichen. Baumann et al. (57) fanden dabei eine hohe Nitrit-Konzentration bei niedrigerem pH-Wert und schlossen deshalb daraus, dass primär eine Hemmung der N_2O -Reduktase durch eine Ansammlung von Nitrit dafür verantwortlich war, dass die Bakterien keine stabile Denitrifikationsreaktion aufbauen konnten. Dies müsste bedeuten, dass Nitrit dabei in Form von HNO_2 vorläge (57). Dieses Molekül sei jedoch in der Lage, gut durch Membranen zu diffundieren, weshalb es die Nitritreduktase selbst, oder deren Synthese hemmen könnte. Die Nitritreduktase ist ein Enzym, welches sich im periplasmatischen Raum (also zwischen innerer und äußerer Zellwand) befindet. Das Bakterium *Paracoccus denitrificans* ist jedoch nur in der Lage in seinem Zellinneren, dem Zytoplasma, den pH-Wert zu regulieren, nicht aber in seinem periplasmatischen Raum. Damit wäre die Nitritreduktase also eher von einer hohen HNO_2 -Konzentration betroffen als die Nitratreduktase, welche ein Transmembranprotein ist (also sein Aktives Zentrum im Zytoplasma hat). Bergau et al. (54) fanden jedoch genau wie Baumann et al. (57), dass keine Zwischenprodukte der Denitrifikation (speziell NO_2^-) detektiert werden konnten, wenn die Bakterienkulturen bereits an anaerobe Bedingungen angepasst waren, bevor der pH-Wert gesenkt wurde. Jedoch war in diesem Fall die Stickstoffproduktion signifikant langsamer, als bei einem höheren pH-Wert (54, 57).

2.2.3 Aerobe Denitrifikation

Es gibt, wie gerade erwähnt, mehrere Berichte darüber, dass die Denitrifikation generell durch Sauerstoff gehemmt oder sogar teilweise unterbunden werden kann (54, 57, 58, 60, 61). Dem gegenüber stehen jedoch Berichte, bei denen Bakterien unter variablen Sauerstoffkonzentrationen bis hin zur Sättigung des Mediums mit Sauerstoff fähig waren, eine Denitrifikation zu betreiben (62, 63). Dabei zeigen sich starke Abweichungen des N_2O/N_2 -Verhältnisses, abhängig von der Art der untersuchten Bakterien und der Sauerstoffkonzentration. Entscheidend sind aber auch andere Faktoren, wie z. B. die Zeit zum Angleichen für den Stoffwechsel bei sich ändernden Bedingungen oder der pH-Wert. Inwieweit es manchen Bakterien möglich ist, unter bestimmten Bedingungen die Denitrifikationsreaktion auch bei der Anwesenheit von Sauerstoff zu vollziehen, obwohl sie dazu normalerweise nicht in der Lage wären, bleibt dabei strittig (54, 57, 64, 65).

Lloyd et al. (65) zeigten, dass sich das N_2/N_2O -Verhältnis bei *Paracoccus denitrificans* bei einer zunehmenden Sättigung des Mediums mit Luft, stark zugunsten von N_2O veränderte, die Denitrifikation aber nicht komplett gehemmt wurde.

Miyahara et al. berichteten über einen Bakterienstamm (*Pseudomonas stutzeri* TR2), welcher in der Lage war, unter aeroben Bedingungen eine Denitrifikation zu betreiben, wobei er nur geringe Mengen an Stickoxiden produzierte (66). Dabei waren seine Wachstumsraten sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen vergleichbar schnell, im Gegensatz zu typischen denitrifizierenden Bakterien unter denselben Bedingungen. Weiter war

2.2 Stickstoffkreislauf und Denitrifikation

es diesem Stamm sogar möglich, die für eine Denitrifikation nötigen Proteine unter aeroben Bedingungen zu exprimieren. Weiter war er dabei resistent gegen das sonst toxische Nitrit und konnte dieses sogar als Substrat nutzen.

Zheng et al. (59) berichteten, dass ein neu entdeckter Stamm dieses Bakteriums (*Pseudomonas stutzeri* PCN-1) ebenfalls fähig war, unter aeroben Bedingungen fast ausschließlich Stickstoff zu produzieren. Die Zwischenprodukte NO und N₂O konnten dabei nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Patureau et al. untersuchten 28 verschiedene Bakterienstämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Denitrifikation unter wechselnden Bedingungen (67). Die Bakterien stammten dabei aus einem Ökosystem, welches wechselnde Sauerstoffkonzentrationen aufwies. Sie fanden dabei, dass zehn der untersuchten Stämme zu einer aeroben Denitrifikation in der Lage waren, wobei es Unterschiede in der Effizienz der Denitrifikation gab und nicht alle Stickstoff als Endprodukt hatten. Patureau et al. äußerten aufgrund ihrer Ergebnisse die Vermutung, dass die aerobe Denitrifikation aufgrund einer periplasmatischen Nitratreduktase und nicht wie sonst durch eine membrangebundene Nitratreduktase ermöglicht werden könnte. Sie schlugen weiter vor, dass es wohl keine spezielle biologische Nische für aerobe Denitrifizierer gäbe, dieser Abbauweg jedoch durch wechselnde Sauerstoffkonzentrationen verstärkt genutzt würde (67).

Es scheint daher schwierig vorherzusagen, wann eine aerobe Denitrifikation stattfinden kann und wann nicht. Weiter scheint es stark von den jeweiligen Bedingungen abhängig zu sein, ob vorwiegend Stickstoff oder nur N₂O von den Bakterien produziert wird. Dabei spielen offensichtlich sowohl die momentan vorherrschenden Einflüsse, aber auch die bereits vergangenen Wachstumsbedingungen, wie z. B. die Zeit für das Angleichen des Stoffwechsels, eine große Rolle.

Diese Versuche und viele weitere haben gemeinsam, dass eine große Zahl an Bakterien in flüssigem, festem oder gelartigem Medium, wie *Gel-Pellets* (64), unter wechselnden Konditionen, wie Sauerstoffgehalt, pH-Wert oder Temperatur untersucht wurden. Es ist auf diese Weise möglich die generellen Prinzipien und die Einflüsse der äußeren Parameter auf das Verhalten der Bakterien zu untersuchen. Dabei können Mittelwerte von Stoff- und Gaskonzentrationen über die gesamte Probe erhalten werden und diese in Zusammenhang mit den vorherrschenden Bedingungen gebracht werden.

Dem gegenüber stehen Bodenuntersuchungen, bei denen ein natürlicher oder synthetischer Boden den Lebensraum der Mikroorganismen bildet, welcher als poröses und undurchsichtiges Netzwerk generell schwer zu analysieren ist. Die genauen Parameter und lokalen Konzentrationen von Stoffen sind oft nicht bekannt, die exakten Verteilungen, der momentane Zustand und die Zusammensetzungen der Bakterienkolonien und ihrer Biofilme sind in der Regel nicht zugänglich.

2.3 Stofftransport und Adsorption

Es bleibt daher eine schwierige Aufgabe, die Ergebnisse dieser unterschiedlichen Ansätze (Versuche in definierten Nährmedien und Analysen von komplexen Netzwerken, wie Bodenproben) in Zusammenhang zu bringen. Der Schlüssel zu einer sinnvollen Kombination dieser Daten liegt jedoch nicht zuletzt in den Eigenschaften der natürlichen Umgebung der Bakterien selbst, dem porösen Netzwerk des Bodens. Dieses verfügt über Besonderheiten in seinen Eigenschaften, wie beschränktem Platz in Poren, Druckgradienten, Kapillarkräfte, wechselnden Oberflächeneigenschaften, wechselnder chemischer Verfügbarkeit aufgrund von bevorzugten Fließpfaden, Änderungen in der Ionenstärke durch Nass Trocken-Zyklen oder Ähnliches. All diese Besonderheiten beeinflussen stark die Möglichkeiten für Mikroorganismen den Boden zu besiedeln und in ihm zu leben. Die Eigenschaften der Bakterien sind auf diese besonderen Merkmale ihres Lebensraumes abgestimmt, weshalb eine Untersuchung von Mikroorganismen unter Laborbedingungen losgelöst von diesem Lebensraum möglicherweise nicht alle bakteriellen Eigenschaften im Bezug auf ihre Wechselwirkung mit dem Boden richtig erfassen kann. Es ist daher ein sinnvoller Ansatz, das Verhalten von Bakterien in Mikromodellen zu untersuchen, da nur so Rückschlüsse auf die Anpassung der Bakterien an ihren Lebensraum gezogen werden können.

2.3 Stofftransport und Adsorption

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits anhand der Wachstumsgeschwindigkeit von Gasblasen, welche durch Bakterien in mikroporösen Netzwerken produziert wurden, auf bakterielle Gasproduktionsraten und den Massentransfer in und aus dem umgebenden Medium geschlossen. Andererseits wurden chemische Gradienten auf der μm -Skala quantifiziert, welche durch Diffusion der Modellsubstanz Kristallviolett aus einer nicht wässrigen, flüssigen Phase (engl.: *non-aqueous phase liquid*, NAPL), wie n-Octanol, entstanden. Für diese Art der Analyse wurde SERS an Nanopartikeln verwendet, wobei die Adsorption von Kristallviolett an der Oberfläche der Silber-Nanopartikel in Verbindung mit einer n-Octanolbeschichtung von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse war.

In diesem Kapitel sollen daher die relevanten Formeln und Gleichungen zu den theoretischen Hintergründen für Diffusion und Adsorption, sowie weiterer wichtiger Prozesse, diskutiert werden, welche später nötig sind, um die Ergebnisse qualitativ und quantitativ zu beschreiben.

2.3.1 Diffusion und Konzentrationsgradienten

Die Diffusion ist ein physikalischer Prozess bei dem, aufgrund von ungerichteter thermischer Bewegung der Moleküle, eine gleichmäßige Durchmischung von zwei oder mehr Stoffen stattfindet. Dabei bewegen sich statistisch gesehen mehr Moleküle vom Ort hoher Konzentration

2.3 Stofftransport und Adsorption

zum Ort niedriger Konzentration als umgekehrt, weshalb makroskopische Konzentrationsunterschiede mit der Zeit ausgeglichen werden. Mathematisch kann die Teilchenstromdichte J (in mol/m² s) dabei nach dem ersten Fick'schen Gesetz (68–72) beschrieben werden:

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.1)$$

mit:

D = Diffusionskoeffizient in m²/s,

c = Konzentration in mol/m³,

x = Strecke in m,

$\frac{\partial c}{\partial x}$ = Konzentrationsgradient in mol/m⁴.

Die Teilchenstromdichte gibt damit die Netto-Bewegung eines Stoffes senkrecht zur Diffusionsrichtung pro Flächeneinheit und Zeiteinheit an. Die Ableitung von J nach der Strecke x hingegen gibt den Verlauf der Konzentration nach der Zeit t wieder (zweites Fick'sches Gesetz (69, 70)).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \right) = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

Gleichung 2.2 beschreibt die instationäre Diffusion, und stellt so einen Zusammenhang zwischen der örtlichen und zeitlichen Veränderung der Konzentration her. Sie gehört zu den partiellen Differentialgleichungen und hat deshalb mehrere mögliche Lösungen, abhängig von den vorliegenden mathematischen Randbedingungen. Für die Diffusion eines Stoffes aus einer Quelle heraus in ein umliegendes Medium beispielsweise (Kontaminant diffundiert in Wasser aus einer NAPL-Phase heraus), ist oft der Verlauf der Konzentration mit der Entfernung x zur Grenzfläche zu einem bestimmten Zeitpunkt von Interesse. Dabei sind häufig zwei verschiedene Fälle anzutreffen (Abbildung 2.5).

2.3 Stofftransport und Adsorption

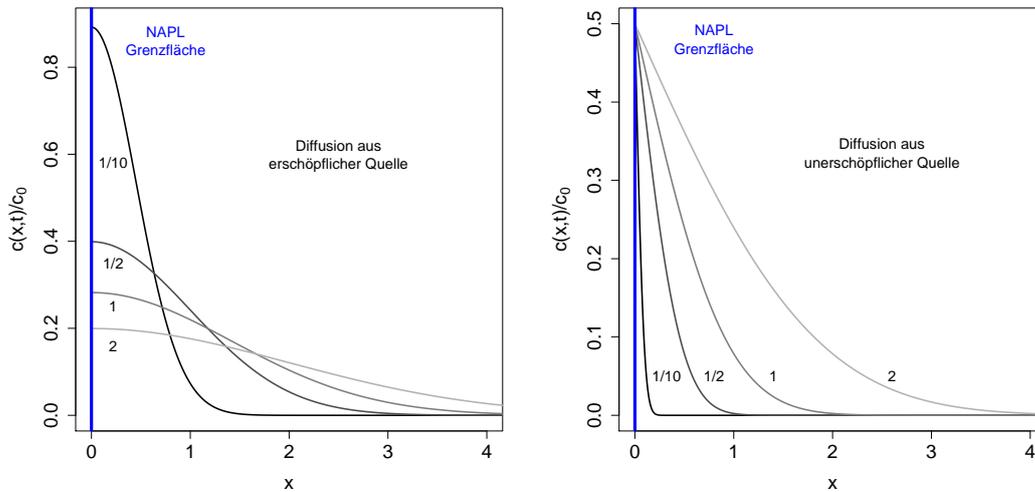


Abbildung 2.5: Diffusion aus einer Grenzfläche in ein angrenzendes Medium.
 links: bei $t = 0$ ist bei $x = 0$ eine endliche Stoffmenge vorhanden.
 rechts: bei $x < 0$ und $t = 0$ ist die Konzentration konstant $c(t_0) = c_0$.
 Die Zahlen an den Kurven sind Werte von $D \cdot t$.

1. Diffusion aus erschöpflicher Quelle:

In Abbildung 2.5, links, diffundiert eine endliche Menge an Substanz aus einer Ebene bei $x = 0$ in das angrenzende Medium hinein. Da die gesamte zur Verfügung stehende Zahl an Molekülen dabei konstant bleibt, wird der sich ausbildende Gradient mit der Zeit immer flacher. Die Formel, um den Verlauf eines derartigen Gradienten zu beschreiben ist (70):

$$c(x, t) = \frac{c_0}{\sqrt{\pi D t}} \cdot e^{\left(\frac{-x^2}{4 D t}\right)} \quad (2.3)$$

mit:

$c(x, t)$ = Konzentration an der Stelle x zur Zeit t in mol/m^3 ,

c_0 = Anfangskonzentration in mol/m^3 ,

x = Distanz zur Quelle in m,

D = Diffusionskoeffizient in m^2/s ,

t = Zeit in s.

2. Diffusion aus unerschöpflicher Quelle:

In Abbildung 2.5, rechts hat die Konzentration bei $x < 0$ und $t = 0$ den konstanten Wert c_0 . Da aus dieser unerschöpflichen Quelle stets neue Substanz nachgeliefert werden kann, bleibt die Menge an Molekülen im angrenzenden Medium nicht mehr konstant. Sie nimmt

2.3 Stofftransport und Adsorption

mit fortschreitender Zeit zu. Die mathematische Beschreibung richtet sich dabei nach der Formel (70):

$$c(x, t) = \frac{1}{2}c_0 \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (2.4)$$

mit:

$c(x, t)$ = Konzentration an der Stelle x zur Zeit t in mol/m³,

c_0 = Anfangskonzentration in mol/m³,

erfc = komplementäre Fehlerfunktion,

x = Distanz zur Quelle in m,

D = Diffusionskoeffizient in m²/s,

t = Zeit in s.

2.3.2 Massentransfer an Phasengrenzflächen

Ist hingegen nicht der räumliche Verlauf eines Konzentrationsgradienten entscheidend, sondern wird nur die Menge betrachtet, welche über eine Phasengrenze in einer bestimmten Zeit übertritt, so können andere Modelle zur Beschreibung dieser Prozesse verwendet werden.

Diffusion durch einen dünnen Film:

Das einfachste Modell nimmt dabei an, dass an der Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit ein dünner Film existiert, welcher nicht in Bewegung ist (69, 73). Da die Geschwindigkeit eines vorbeifließenden Mediums tatsächlich jedoch selbst an einer Grenzfläche zu einer festen Phase selten ganz auf null sinkt (69), ist die Annahme eines derartigen Films eher als hypothetisch zu betrachten, ist aber notwendig, um den Vorgang mathematisch beschreiben zu können.

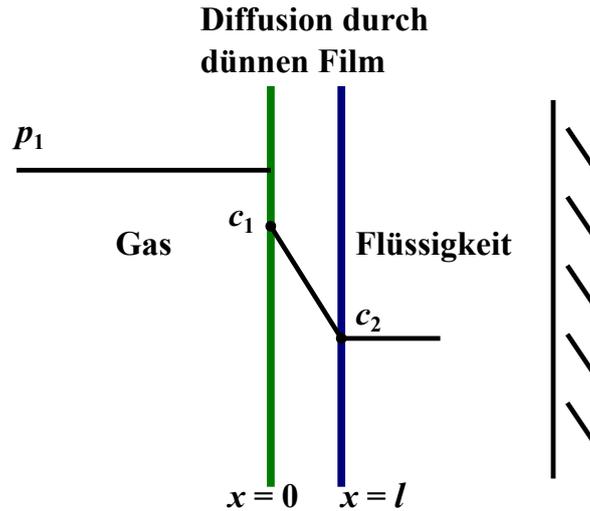


Abbildung 2.6: Diffusion durch einen dünnen Film. Dieser ist idealisiert dargestellt, die Konzentration nimmt dort linear ab. Angelehnt an Cussler et al. (69).

mit:

p_1 = Druck in der Gasphase in Pa,

c_1 = Konzentration an der Grenzfläche zum Gas in mol/m³,

c_2 = Konzentration in der Flüssigkeit in mol/m³.

Weiter gilt die Annahme, dass die Lösungen stark verdünnt sind, weshalb eine Konvektion aufgrund starker Konzentrationsunterschiede ausgeschlossen werden kann. Dabei kann der Massenfluss J_m in mol/(m² s) wie folgt beschrieben werden (69):

$$J_m = k \cdot (c_2 - c_1) \quad (2.5)$$

mit:

k = Massentransferkoeffizient in m/s,

und

$$k = \frac{D}{l} \quad (2.6)$$

mit:

D = Diffusionskoeffizient in m²/s,

l = Dicke des Films in m.

Diese Theorie berücksichtigt jedoch nicht die Geschwindigkeit des vorbeifließenden Mediums. Es würde also keinen Unterschied machen, ob das Medium schnell oder langsam an einer Phasengrenzfläche vorbei fließt, weshalb die Gleichung in dieser Form selten auf reale Fälle angewendet werden kann.

2.3 Stofftransport und Adsorption

Modell der stehenden Grenzschichten:

Für die mathematische Beschreibung der Diffusionsvorgänge beim Übergang von Flüssigkeit zu Gas, können aber auch zwei Schichten einbezogen werden. Dabei werden sowohl eine ruhende Grenzschicht im Gas, also auch eine ruhende Grenzschicht in der Flüssigkeit angenommen. An ihrem Übergang wird von einer Gleichgewichtseinstellung nach dem Gesetz von Henry ausgegangen. Dabei ergeben sich folgende Gleichungen (74):

$$J = k_{sg} \cdot (c_F - c_G \cdot H) \quad (2.7)$$

mit:

J = Massenfluss in mol/(m² s),

k_{sg} = Massentransferkoeffizient in m/s,

c_F = Konzentration in der Flüssigkeit in mol/m³,

c_L = Konzentration im Gas in mol/m³.

H = Verteilungskoeffizient, hier: dimensionslose Form der Henry-Konstante.

Für den Massentransferkoeffizienten ergibt sich dabei:

$$\frac{1}{k_{sg}} = \frac{z_F}{D_F} + \frac{z_G \cdot H}{D_G} \quad (2.8)$$

mit:

z_F = Dicke der ruhenden Grenzschicht in der Flüssigkeit in m,

z_G = Dicke der ruhenden Grenzschicht im Gas in m,

D_F = Diffusionskoeffizient in der Flüssigkeit in m^s/s,

D_G = Diffusionskoeffizient im Gas in m^s/s.

Die Gleichungen für den Massenfluss 2.5 und 2.7 sind dabei insofern äquivalent, als dass in beiden Fällen eine Konzentrationsdifferenz die treibende Kraft für einen Diffusionsprozess darstellt. Es findet demnach kein Netto-Massenfluss durch Diffusion statt, wenn sich die Konzentrationen vollständig angeglichen haben. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass, je nach vorliegendem Fall, ein Konzentrationsausgleich auch bedeuten kann, dass die absoluten Konzentrationen nicht gleich sind. Ein solcher Fall wäre beispielsweise die Diffusion aus einer wässrigen Phase in eine nichtwässrige Phase, wobei die diffundierende Substanz in einer der beiden Phasen besser löslich ist, als in der anderen Phase. Hierbei stellt sich erst Gleichgewicht, und somit ein Ende der Netto-Diffusion ein, wenn dieser Unterschied in der Löslichkeit in der Konzentrationsdifferenz mitberücksichtigt ist. Bei Gleichung 2.5 ist dies allgemein vorausgesetzt, Gleichung 2.7 stellt somit einen Spezialfall beim Übergang flüssig/gasförmig dar.

2.3 Stofftransport und Adsorption

Grenzschichttheorie:

Die Grenzschichttheorie geht davon aus, dass die Konzentration und die Geschwindigkeit des Mediums in allen drei Koordinaten variabel ist. Wenn jedoch nur die x-Richtung (Diffusion rechtwinklig zur Grenzfläche) berücksichtigt wird, vereinfachen sich die Gleichungen. Für die Diffusion durch eine laminare Grenzschicht ist der durchschnittliche Massentransferkoeffizient \bar{k}_{bl} in m/s, wie folgt definiert (75):

$$\bar{k}_{bl} = g \cdot \frac{D}{L} \cdot Re^n Sc^m = g \cdot \frac{D}{L} \cdot \left(\frac{\rho v d}{\eta}\right)^n \cdot \left(\frac{\eta}{\rho D}\right)^m \quad (2.9)$$

mit:

L = charakteristische Länge in m,

$Re = \frac{\rho v d}{\eta}$ = Reynolds-Zahl [dimensionslos],

$Sc = \frac{\eta}{\rho D}$ = Schmidt-Zahl [dimensionslos],

ρ = Dichte in kg/m³,

v = Strömungsgeschwindigkeit in m/s,

d = charakteristischer Durchmesser in m,

η = dynamische Viskosität in kg/(m s²),

die dimensionslosen Konstanten g , n und m sind dabei abhängig von den Fließbedingungen (turbulent oder laminar).

Penetrationstheorie:

Werden nun die Annahmen gemacht, dass

- der Film an der Grenzschicht dick ist,
- die Diffusion senkrecht zur Grenzfläche größer als die Konvektion und
- parallel zur Grenzfläche kleiner als die Konvektion ist,

so ergibt sich folgende Definition für den Massentransferkoeffizienten k_{pt} in m/s (69, 76):

$$k_{pt} = 2 \sqrt{\frac{D \cdot v_{max}}{\pi L}} \quad (2.10)$$

mit:

v_{max} = Geschwindigkeit des Mediums in m/s,

L = Länge der Grenzfläche in m.

Der Quotient $\frac{L}{v_{max}}$ wird dabei oft als Verweilzeit des Mediums an der Grenzschicht bezeichnet. Da L die Länge der umflossenen Grenzschicht beschreibt, ist der Massentransferkoeffizient k_{pt} bei der Betrachtung einer wachsenden oder schrumpfenden Blase abhängig vom Radius der Blase und damit nicht konstant.

2.3 Stofftransport und Adsorption

Theorie der Oberflächenerneuerung:

Danckwerts et al. schlugen 1935 eine Erweiterung der Penetrationstheorie vor (77). Hierbei wird angenommen, dass sich Volumenelemente aus der Grenzschicht erneuern, in dem sie immer wieder durch Volumenelemente aus dem angrenzenden Medium ersetzt werden. Dabei wird eine durchschnittliche Verteilung der Lebensdauer $E(t)$ dieser Volumenelemente angegeben, mit:

$$E(t) = \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \quad (2.11)$$

τ = durchschnittliche Lebensdauer eines Volumenelements in s.

Damit kann ein Massentransferkoeffizient mit folgender Formel definiert werden:

$$k_{sr} = \sqrt{\frac{D}{\tau}} \quad (2.12)$$

Obwohl die genannten Modelle alle physikalisch sinnvolle Annahmen machen, kann es sein, dass die jeweiligen Vorhersagen nicht genau mit den Beobachtungen übereinstimmen. Diese Grenzen zeigen sich beispielsweise bei dem Auswaschen von Ammoniak aus der Gasphase mit wässriger Schwefelsäure. Dabei kann es sein, dass das Medium nicht gleichmäßig genug an den zu Verfügung stehenden Oberflächen in einer Säule vorbeifließt und sich auf diese Weise Bereiche bilden (sowohl in der Flüssigkeit, als auch in der Gasphase), bei denen die Diffusion nicht schnell genug ist. Schlünder et al. schlugen 1977 vor, dass dies der Grund dafür sei, warum auf diese Weise errechnete Werte für Massentransferkoeffizienten stärker mit der Geschwindigkeit schwankten, als theoretisch vorhergesagt (78).

Es ist daher entscheidend, die genauen physikalischen Bedingungen des jeweiligen Falles mit in das verwendete Modell einfließen zu lassen. In der Literatur finden sich, je nach Problemstellung deshalb weitere, leicht abweichende Definitionen für den Massentransferkoeffizienten (Holocher et al. 2003 (79)). Keines der genannten Modelle ist deshalb universell gültig und würde immer und in jedem Fall eine korrekte Beschreibung der experimentellen Vorgänge liefern. Da oftmals viele der für die Formeln entscheidenden Größen unbekannt sind (z. B. charakteristische Längen, Verweilzeiten oder Lebensdauer von Volumenelementen oder andere Konstanten), kann eine Wahl des richtigen Modells manchmal schwierig sein. Teilweise müssen in solchen Fällen sinnvolle Schätzungen der beteiligten Parameter vorgenommen werden.

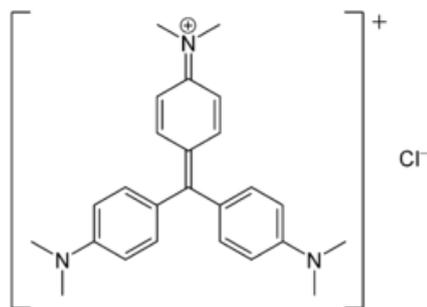
Für den Diffusionskoeffizienten von Kristallviolett in Wasser, welcher in dieser Arbeit für die mathematische Beschreibung der Gradientenmessungen verwendet wurde, und chemisch

2.3 Stofftransport und Adsorption

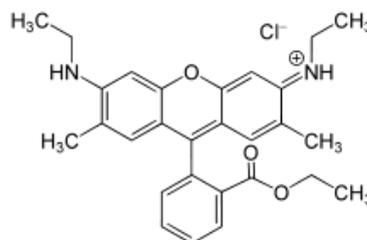
verwandte Farbstoffe finden sich in der Literatur die in Tabelle 2.1 angegebenen Werte. Einige Strukturformeln der Farbstoffe sind in Abbildung 2.7 gezeigt.

Tabelle 2.1: Diffusionskoeffizienten von Kristallviolett und chemisch ähnlichen Farbstoffen in Wasser bei 25°C.

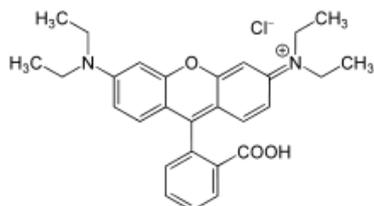
Farbstoff	Diffusionskoeffizient in $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	Quelle
Kristallviolett	$2,93 \pm 0,07$	Litzenberger 2010, (80)
Rhodamin 6G	$4,14 \pm 0,05$	Müller et al. 2008, (81)
Rhodamin B	$4,27 \pm 0,04$	Culbertson et al. 2002, (82)
Fluorescein	$4,25 \pm 0,01$	Culbertson et al. 2002, (82)
Atto 665	$4,26 \pm 0,08$	Dertinger et al. 2007, (83)



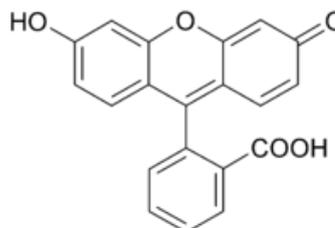
Kristallviolett



Rhodamin 6G



Rhodamin B



Fluorescein

Abbildung 2.7: Strukturformeln einiger Farbstoffe aus Tabelle 2.1

2.3 Stofftransport und Adsorption

Dimensionslose Kennzahlen:

In der Strömungsmechanik gibt es darüber hinaus mehrere dimensionslose Kennzahlen, welche komplexe Zusammenhänge in einer einzigen Zahl darstellen können (84). Das Reynolds'sche Ähnlichkeitsgesetz beispielsweise sagt aus, dass ein physikalischer Vorgang am Modell ähnlich dem realen Vorgang abläuft, solange die Reynolds-Zahlen übereinstimmen (84). In Tabelle 2.2 sind einige, für die in dieser Arbeit beschriebenen Prozesse im Mikromodell relevanten, dimensionslosen Kennzahlen zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Dimensionslose Kennzahlen.

Name	Formel	Beschreibung
Péclet-Zahl	$Pe = \frac{Lv}{D} = Re \cdot Sc$	Verhältnis von advektiven zu diffusiven Flüssen
Reynolds-Zahl	$Re = \frac{\rho v d}{\eta}$	Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften
Schmidt-Zahl	$Sc = \frac{\eta}{\rho D} = \frac{Pe}{Re}$	Verhältnis von diffusivem Impulstransport zu diffusiven Stofftransport

mit:

L = charakteristische Länge in m, v = Geschwindigkeit in m/s,

D = Diffusionskoeffizient in m^2/s , ρ = Dichte in kg/m^3 ,

d = charakteristischer Durchmesser in m, η = dynamische Viskosität in $\text{kg}/(\text{m s})$.

Der Péclet-Zahl kommt für die Beschreibung der Prozesse in einem Mikromodell dabei eine besondere Bedeutung zu. Sie gibt an, ab wann der Übergang von diffusivem Stofftransport zu advektivem Stofftransport an einer Grenzfläche stattfindet. Sie ist daher wichtig, um den Gasaustausch an Gasblasen in einem Mikromodell zu beschreiben. Eine eingehende Größe ist neben der Länge des umflossenen Körpers und dem Diffusionskoeffizienten auch die Fließgeschwindigkeit des Mediums. Da BGIs in einem Mikromodell durch ihren Bewuchs das Flussfeld dynamisch ändern, ist bei der Auswertung der Wachstumsgeschwindigkeit von Gasblasen auf die umliegende Geometrie zu achten. Befindet sich eine Gasblase beispielsweise in einer verschlossenen Pore, so bildet sich dort eine Stagnationszone, in der die Fließgeschwindigkeit sogar auf null sinken kann.

Die Reynolds-Zahl hingegen definiert unter anderem, ab wann eine laminare Strömung ($Re < Re_{krit}$) in eine turbulente Strömung ($Re > Re_{krit}$) umschlägt.

2.3.3 Oberflächenspannung und Druckdifferenzen

Laplace-Überdruck:

Bei der gekrümmten Oberfläche einer Mikro-Blase bildet sich aufgrund der Oberflächenspannung ein Überdruck aus (Laplace-Überdruck p). Bei der Untersuchung des Massentransfers an Gasblasen im Mikromodell, sind die Löslichkeit von Gasen und deren Druckverhältnisse entscheidend. Aufgrund der zwischenmolekularen Anziehungskräfte, besitzen Flüssigkeiten den Drang, ihre Oberfläche so gering, wie möglich zu halten. Daher muss eine Kraft aufgewendet werden, um die Oberfläche von beispielsweise einer Gasblase im Wasser zu vergrößern. Eine Oberfläche besitzt also eine spezifische Oberflächenenergie, die Oberflächenspannung γ . Ihre Einheit ist Energie pro Fläche (in J/m^2 beziehungsweise in N/m). Befindet sich eine Blase im Gleichgewicht, so kompensiert der erhöhte Innendruck der Blase das Bestreben der Flüssigkeit ihre Grenzfläche zu minimieren. Der Überdruck beeinflusst damit aber auch die Geschwindigkeit, mit der sich kleine Blasen auflösen. Kurz vor dem Auflösen nimmt bei einem kleinen Blasenradius deshalb die Lösegeschwindigkeit zu. Für den Laplace-Überdruck p in Pa gilt:

$$p = \frac{2\gamma}{r} \quad (2.13)$$

mit:

γ = Oberflächenspannung in N/m ,

r = Radius in m.

Bei der Herleitung des Laplace-Überdrucks für Gleichung 2.13 wurde jedoch von einer Kugelgeometrie der Blase ausgegangen. Bei einer flachen Blase ($r_1 \neq r_2$, $r_1 = \text{konst.}$), wie sie in einem Mikromodell vorkommt (Höhe des Mikromodells $h_{MM} = 30 \mu\text{m}$), setzt sich der Laplace-Überdruck hingegen aus zwei Komponenten (p_1 und p_2) zusammen. Dabei kontrolliert der kleinere Radius ($r_1 = h_{MM}/2 = 15 \mu\text{m}$) bei großen Blasen die Höhe des Überdrucks (wenn $r_1 \ll r_2$).

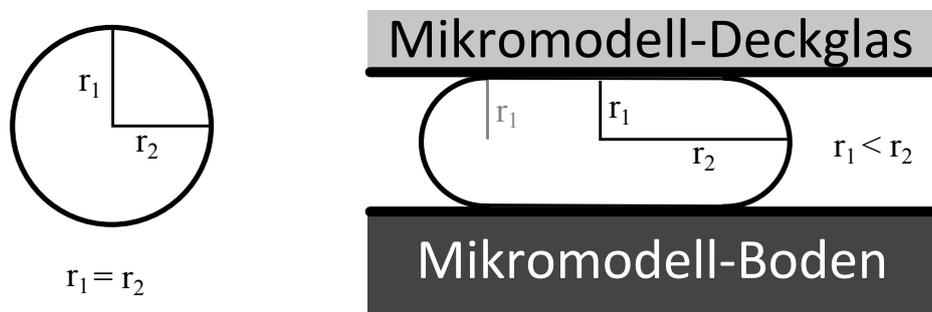


Abbildung 2.8: Vergleich einer kugelförmigen, freien Blase mit einer flachen Blase in einem Mikromodell (Seitenansicht).

2.3 Stofftransport und Adsorption

Wird für die Änderung der Grenzfläche einer kreisrunden Blase im Mikromodell $dA = 2 \cdot \pi \cdot h_{MM} \cdot dr_2$ angenommen, so ergibt sich für den variablen Anteil des Laplace-Überdrucks p_2 , hervorgerufen durch den größeren Radius einer flachen Blase:

$$p_2 = \frac{\gamma}{r_2} \quad (2.14)$$

mit:

γ = Oberflächenspannung in N/m,

r_2 = größerer Radius einer flachen Blase in m.

Der konstante Anteil p_1 hat dagegen bei $r_1 = 15 \mu\text{m}$ und $\gamma = 72 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$ (bei 25°C) (85) einen Wert von 4800 Pa.

Überdruck durch Strömungswiderstand:

Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von Überdruck ergibt sich durch den Strömungswiderstand von Flüssigkeiten beim Fließen durch enge Röhren bzw. durch die engen Poren eines Mikromodells. Diese Druckdifferenz Δp wird dabei durch das Gesetz von Hagen-Poiseuille beschrieben:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot Q \cdot \eta \cdot l}{\pi \cdot r^4} \quad (2.15)$$

mit:

Q = Volumenstrom in m^3/s ,

r = Innenradius der Röhre in m,

Δp = Druckdifferenz zwischen Rohranfang und Rohrende in Pa,

η = dynamische Viskosität in $\text{kg}/(\text{m s})$,

l = Länge des Rohres in m.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Kersten, Johannes Gutenberg Universität Mainz, in einem *Joint-Experiment* des SPP 1315 und der Anfertigung einer Masterarbeit von Christopher Koch (Arbeitskreis von Prof. Kersten) wurden unter anderem Druckdifferenzen in einem Mikromodell untersucht (86). Dabei wurde durch Computersimulationen ein Wert von 22 Pa bei einer Fließrate $10 \mu\text{m/s}$ berechnet.

Analog kann Gleichung 2.15 für eine Abschätzung der Druckdifferenzen in einem Mikromodell angewendet werden. Dabei wurde, analog der in dieser Arbeit verwendete Geometrie der Mikromodell-Struktur (vgl. Abbildung 2.2 und Kapitel 3.2.1), eine Anordnung von 54 Röhren mit einem Radius r von je $15 \mu\text{m}$ angenommen. Bei dem in den Versuchen verwendeten Volumenstrom Q von $6 \mu\text{L/h}$ ergibt sich dabei eine Druckdifferenz Δp von $\approx 27,7 \text{ Pa}$ (bei $\eta(\text{Wasser}, 25^\circ\text{C}) = 0,891 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ und $l = 0,02 \text{ m}$). Dies stellt für die spätere Auswertung

2.3 Stofftransport und Adsorption

der Versuche einen vernachlässigbar kleinen Wert dar.

Marangoni-Effekt:

An einer Phasengrenze sind neben der Betrachtung des Massentransfers und Druckdifferenzen allerdings zusätzlich noch weitere Aspekte zu berücksichtigen. Der sogenannte Marangoni-Effekt beschreibt die Energieübertragung durch Konvektion an Phasengrenzflächen, bei denen ein lokaler Gradient in der Oberflächenspannung vorliegt (87). Da die Oberflächenspannung durch die Temperatur stark beeinflusst wird, können Temperaturunterschiede an einer NAPL/Wasser-Phasengrenzfläche die Ausbildung von Strömungen zur Folge haben. Diese können je nach Geometrie und Stärke des Gradienten mehr oder weniger ausgeprägt sein und den Massentransfer durch Diffusion beeinflussen.

Straub et al. zeigten 1990 anhand von Versuchen mit Luftblasen in Flüssigkeiten, wie bei einem Temperaturgradient eine konvektive Strömung an der Blasenoberfläche stattfindet (88). Dabei befand sich eine 2,5 mm große Luftblase in verschiedenen Flüssigkeiten (Silikonölen), mit unterschiedlichen Temperaturgradienten (1100 K/m bis 1800 K/m, $\approx 2,8$ bis 4,5 K pro 2,5 mm). Die konvektiven Strömungen wurden dabei mit einem Laser-Doppler-Anemometer erfasst. Sie wurden dadurch hervorgerufen, dass der Temperaturgradient lokale Unterschiede in der Grenzflächenspannung hervorrief, da die Grenzflächenspannung eine Funktion der Temperatur bzw. der Konzentration ist. Es bildeten sich damit, je nach vorhandener Geometrie und Stärke der Temperaturunterschiede mehr oder weniger stabile Strömungen aus, welche maßgeblich an der Umverteilung der Wärme beteiligt waren.

Die Marangoni-Konvektion ist damit ein wichtiger Faktor, wenn ein durch Diffusion entstandener Konzentrationsgradient an einer NAPL/Wasser-Grenzfläche mit quantitativem SERS nachgewiesen werden soll.

2.3.4 Adsorption an Nanopartikel-Oberflächen und der n-Octanol Wasser Verteilungskoeffizient

Als Nanopartikel werden Teilchen bezeichnet, deren Abmessungen sich zwischen 10^{-7} m und 10^{-9} m befinden (4). Sie sind heutzutage in einer Vielzahl von Produkten, wie Kosmetika, Textilien, Nahrungsmitteln und Vielem mehr anzutreffen (89–91). Ihr Eintrag in die Umwelt ist daher nicht zuletzt auch unter gesundheitlichen Gesichtspunkten von großer Bedeutung (92–94). Die Eigenschaften von Nanopartikeln werden dabei nicht nur durch die Elemente, aus denen sie bestehen, und ihre Form und Größe bestimmt, sondern werden darüber hinaus auch maßgeblich von einer eventuell vorhandenen Beschichtung ihrer Oberfläche beeinflusst. Hierbei kann zwischen einer Beschichtung (Adsorption eines Stoffes, wie z.B. n-Octanol) und einer Funktionalisierung der Oberfläche (Einführung von Molekülen oder funktionellen Gruppen, welche über eine chemische Bindung zur Oberfläche verfügen) unterschieden werden. Eine Beschichtung kann dabei beispielsweise aus einer NAPL-Phase, wie n-Octanol oder

2.3 Stofftransport und Adsorption

aus natürlichen organischen Substanzen (engl.: *natural organic matter*, NOM) bestehen, wie sie in der Umwelt und im Grundwasser enthalten sind.

Die Einflüsse, welche eine Beschichtung mit NOM an Nanopartikeln bewirken kann, wurde von Kühn et al. mittels SERS untersucht (95). Dabei zeigte sich, dass selbst nach mehreren Reinigungsschritten aus Zentrifugation und Resuspension im Ultraschallbad noch eine Anhaftung von Huminsäure an den Nanopartikeln nachweisbar war.

Das Adsorptionsverhalten von Nanopartikeln und Nanopartikel-Agglomeraten an chemisch modifizierten Oberflächen wurde von Abraham et al. untersucht (96). Hierbei wurden Oberflächen, welche mit n-Octadecyl-, Phenyl-, Cyano- oder Diol-Gruppen funktionalisiert wurden sowie Glas, Silicagel, aber auch Blattoberflächen, hinsichtlich ihrer Adsorption charakterisiert. Dabei wurde ein Adsorptionsverhalten entsprechend der Langmuir-Isotherme ermittelt. Bei instabilen Nanopartikel-Suspensionen hingegen zeigte sich kein Zusammenhang mit klassischen Adsorptionsmodellen, was ein Zusammenspiel von Agglomeration und Adsorption nahelegte (96).

In der vorliegenden Arbeit waren jedoch die veränderten Eigenschaften durch eine Beschichtung der Nanopartikel-Agglomerate Gegenstand der Untersuchungen. Diese entstand durch die Messung eines Konzentrationsgradienten an einer n-Octanol/Wasser-Grenzfläche, aus welcher der Analyt (Kristallviolett, CV), aber auch n-Octanol in die Nanopartikel-Suspension diffundierte. Daher ist das Adsorptionsverhalten sowohl von CV, als auch von n-Octanol an den Nanopartikel-Agglomeraten zur richtigen Deutung der Ergebnisse entscheidend. Zur Beschreibung der Adsorptionsprozesse an Oberflächen gibt es unterschiedliche Modelle:

Adsorptionsisotherme nach Henry:

Es wird oft ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Sorbats und der Beladung des Sorbens gefunden (74):

$$c_{sf} = K_H \cdot c_{eq} \quad (2.16)$$

mit:

c_{sf} = Beladung des Sorbens in mol/g Adsorbens,

K_H = Henry-Koeffizient in L/g Adsorbens,

c_{eq} = Konzentration des Sorbats in Lösung in mol/L.

Die Gültigkeit ist dabei allerdings in der Regel nur auf stark verdünnte Systeme begrenzt, bei denen die für die Adsorption zu Verfügung stehende Fläche groß ist, verglichen mit dem Platzbedarf und der Menge des adsorbierenden Stoffes. Wechselwirkungen der adsorbierten Moleküle untereinander bleiben dabei unberücksichtigt.

2.3 Stofftransport und Adsorption

Adsorptionsisotherme nach Langmuir:

Bei der Adsorptionsisotherme nach Langmuir werden folgende Annahmen gemacht (74, 85):

1. Es kann maximal eine Monolage an Molekülen adsorbieren.
2. Alle Bindungsstellen sind gleichwertig, die Oberfläche ist also einheitlich.
3. Die Adsorptionsenergie für Bindungsstellen ist immer gleich, sie ist also unabhängig davon, ob an benachbarter Stelle ein Molekül adsorbiert ist oder nicht.

Aufgrund dieser Annahmen ergibt sich folgende Formel für die Beladung des Sorbens:

$$c_{sf} = \frac{K_L \cdot q_{max} \cdot c_{eq}}{1 + K_L \cdot c_{eq}} \quad (2.17)$$

mit:

c_{sf} = Beladung des Sorbens in mol/g Adsorbens,

K_L = Langmuir Koeffizient,

q_{max} = maximale Beladung des Sorbens, entsprechend einer Monolage in mol/g Adsorbens,

c_{eq} = Konzentration des Sorbats in Lösung in mol/L.

Adsorptionsisotherme nach Freundlich:

Die Adsorption nach Freundlich trägt zusätzlich der Tatsache Rechnung, dass sich die Adsorptionsenergie bei steigender Besetzung ändern kann. Dabei wird ein logarithmischer Zusammenhang vorausgesetzt, wobei die Adsorptionsenthalpie weniger negativ wird, je mehr Moleküle adsorbiert sind (85). Sie wird beschrieben durch die Formel:

$$c_{sf} = K_{fr} \cdot c_{eq}^n \quad (2.18)$$

mit:

c_{sf} = Beladung des Sorbens in mol/g Adsorbens,

K_{fr} = Freundlich-Koeffizient in L/g Adsorbens,

n = Freundlich-Exponent,

c_{eq} = Konzentration des Sorbats in mol/L.

Sie ist dabei eine empirische Isotherme, bei der die Adsorptionsplätze nicht limitiert sind.

Adsorptionsisotherme nach Temkin:

Bei der Adsorption nach Temkin hingegen wird im Gegensatz zu der Adsorption nach Freundlich ein linearer Zusammenhang bei der Änderung der der Adsorptionsenthalpie bei steigender Besetzung vorausgesetzt (85). Dies führt zu der Formel:

2.3 Stofftransport und Adsorption

$$c_{sf} = K_1 \cdot \ln(K_2 \cdot c_{eq}) \quad (2.19)$$

mit:

c_{sf} = Beladung des Sorbens in mol/g Adsorbens,

K_1, K_2 = Konstanten,

c_{eq} = Konzentration des Sorbats in Lösung in mol/L.

Das BET-Modell:

Bei der Isotherme nach dem Modell von Brunauer, Emmett und Teller wird angenommen, dass sich zuerst eine Monolage aus Molekülen auf der Oberfläche des Sorbens ausbildet. Diese Schicht dient im Folgenden dann als neue Fläche für eine weitere Adsorption. Auf diese Weise können sich mehrere Schichten an Molekülen bilden. Die Adsorptionsenergie ist dabei für die erste Monolage eine andere als die für alle folgenden, weiteren Molekülschichten (97). Die Kräfte, welche die weiteren Molekülschichten bilden seien dabei dieselben, wie bei einer Kondensation (85, 97). Damit ergibt sich die Formel:

$$c_{sf} = \frac{K_{bet} \cdot q_{max} \cdot c_{eq}}{(c_{sat} - c_{eq}) \cdot \left(1 + \frac{(K_{bet}-1) \cdot c_{eq}}{c_{sat}}\right)} \quad (2.20)$$

mit:

c_{sf} = Beladung des Sorbens in mol/g Adsorbens,

K_{bet} = Konstante,

q_{max} = maximale Beladung für eine Monolage in mol/g Adsorbens,

c_{sat} = Löslichkeit des Sorbats in mol/L.

Der Kurvenverlauf der BET-Isotherme ist für geringe Konzentrationen erst konvex und für höhere Konzentrationen dann konkav gegenüber der Abszisse. Am ersten Scheitelpunkt der Kurve wird dabei eine vollständig geschlossene Monolage angenommen (97).

Der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient:

Um das System aus n-Octanol-beschichteten Nanopartikeln und Kristallviolett umfassend beschreiben zu können, soll noch eine weitere Kenngröße, der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}), erwähnt werden. Dieser gibt das Verhältnis an, zu welchen Teilen sich ein chemischer Stoff in einem Gemisch aus n-Octanol und Wasser auf die Phasen verteilt (98). Er wird in der Praxis oftmals herangezogen um Abschätzungen zum Löslichkeitsverhalten von Stoffen in anderen Systemen als Wasser und n-Octanol machen zu können, da er als ein Modellmaß für das Verhältnis von Lipophilie und Hydrophilie bezeichnet werden kann. Der K_{OW} -Wert ist ebenfalls entscheidend bei der Beurteilung des Umweltverhaltens von Schadstoffen. Je höher der K_{OW} -Wert ist, desto mehr sammelt sich ein Stoff in einer NAPL-

2.4 Grundlagen der Raman-Mikrospektroskopie

Phase an und kann von dieser dann anschließend über lange Zeit hinweg im Boden in das Grundwasser abgegeben werden.

$$K_{OW} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{wasser}} \quad (2.21)$$

mit:

$c_{n-octanol}$ = Konzentration in n-Octanol in mol/L,

c_{wasser} = Konzentration in Wasser in mol/L.

Meistens wird der K_{OW} -Wert auch in seiner logarithmischen Form angegeben ($\log(K_{OW})$). Tsai et al. bestimmten den $\log(K_{OW})$ -Wert von CV 1991 mittels *Toroidal Coil Centrifugal Partition Chromatography (TCCPC)* und gaben 0,51 bei einem pH-Wert 7,4 an (99). Dies entspricht damit einem K_{OW} von 3,2. Bei gleichen Volumina von n-Octanol und Wasser befinden sich somit 76,2 % des CVs in der n-Octanolphase und 23,8 % in der Wasserphase.

2.4 Grundlagen der Raman-Mikrospektroskopie

Die Quantifizierung von Konzentrationsgradienten an Phasengrenzflächen, welche durch Diffusion im Bereich weniger Mikrometer gebildet werden, erfordert eine nicht invasive Untersuchungsmethode mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Die Raman-Mikrospektroskopie (RM) ist eine Kombination aus Raman-Spektroskopie und optischer Mikroskopie und scheint daher, unter bestimmten Voraussetzungen, gut für diesen Zweck geeignet zu sein.

Sie ist eine Methode zur Anregung und Identifizierung von Schwingungsübergängen von Molekülen mittels monochromatischem Laserlicht. Die unelastische Streuung von Licht an Molekülen oder Festkörpern wurde 1928 erstmals von dem indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman nachgewiesen. Die Photonen des einfallenden Laserlichts treten dabei in Wechselwirkung mit der Materie der Probe und heben deren Moleküle auf ein virtuelles Energieniveau an (85). Fällt ein Molekül danach in den Grundzustand zurück (elastische Streuung), so unterscheidet sich die Energie des Streulichts nicht von der der einfallenden Strahlung (Rayleigh-Streuung). Bei der Rückkehr in einen angeregten Schwingungszustand allerdings (Stokes-Streuung) oder wenn sich das Molekül vor dem Stoß mit dem Photon bereits in einem angeregten Schwingungszustand befand und so aus diesem in den Grundzustand zurückkehrt (Anti-Stokes Streuung), so entspricht die Energiedifferenz zwischen dem einfallenden Licht und dem Streulicht dem Energieniveau dieser betreffenden Schwingung (85). Voraussetzung für den Raman-Effekt ist jedoch, dass sich bei der Schwingung der Moleküle ihre Polarisierbarkeit ändert (85). Je nach Atom und Bindungsart besitzen Verbindungen charakteristische Schwingungsfrequenzen, anhand derer sie identifiziert werden können. Dabei ist die Raman-Spektroskopie nicht auf trockene Proben begrenzt, da Wasser

2.5 Raman-Mikrospektroskopie an Biofilmen und Methoden der Spektrenauswertung

selbst nur eine sehr geringe Raman-Aktivität besitzt (85). Sie eignet sich somit auch zur Untersuchung von mikrobiologischen Systemen.

Ein großer Vorteil liegt deshalb in ihrer breiten Anwendbarkeit und dem oft geringen Aufwand, den die Präparation einer Probe benötigt. Bei richtiger Wahl der Laserleistung kann sie gänzlich zerstörungsfrei sein und eignet sich auch für Messungen bei durchsichtigen Proben innerhalb der Eindringtiefe des Lasers.

Das Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül in Wechselwirkung mit dem einfallenden Laserlicht tritt und von diesem zur Schwingung angeregt wird, bezeichnet man dabei als Streuquerschnitt (engl.: *cross section*). Er wird als Fläche angegeben und bewegt sich normalerweise in Größenordnungen von 10^{-30} - 10^{-25} cm^2 (100) und ist nicht identisch mit der projizierten Fläche des Moleküls. Der Raman-Effekt ist aufgrund dieses meist geringen Streuquerschnitts eher intensitätsschwach, da im Mittel nur eines von 10^8 bis 10^{10} Photonen inelastisch gestreut wird. Aus diesem Grund muss die Konzentration der Moleküle im Fokus des Laserstrahls hoch genug sein, damit ein ausreichendes Signal erhalten werden kann. In reinen Festkörpern ist diese Bedingung normalerweise immer gegeben. Die Situation ist jedoch anders, sobald Lösungen oder gar Gase untersucht werden sollen.

2.5 Raman-Mikrospektroskopie an Biofilmen und Methoden der Spektrenauswertung

Die Tatsachen, dass Wasser aufgrund seiner schwachen Raman-Aktivität bei Messungen selten störend wirkt und Raman-Mikrospektroskopie charakteristische Fingerabdruckspektren liefert, erlauben die Untersuchung von mikrobiologischen Proben (101, 102). Ivleva et al. identifizierten und klassifizierten auf diese Weise einzelne allergene Pollen anhand von Datenbanken (103). Für die sichere Zuordnung der großen Anzahl der erhaltenen Spektren kombinierten sie eine Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*, PCA, mathematisches Verfahren zum strukturieren umfangreicher Datensätze) mit einer hierarchischen Clusteranalyse (Zerlegung von Datensätzen in ähnliche Ansammlungen (Cluster), nach vordefinierten Kriterien).

Ebenfalls können Mikroorganismen und Biofilme mit Raman-Mikrospektroskopie untersucht werden (104, 105).

Sandt et al. (13) berichteten über die Charakterisierung eines Biofilms in einer Flusszelle mittels konfokaler Raman-Mikrospektroskopie, wobei Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bezüglich der Verteilung der Biomasse (EPS) untersucht wurden. Sie fanden anfangs runde Bakterienkolonien, bei denen nach 19 Tagen des Wachstums der Anteil an EPS am Rand der Kolonien zunahm. Diese konzentrischen Strukturen waren damit vergleichbare Formen, wie sie bereits Allsen-Holm et al. beschrieben (106). Sandt et al. erklärten diese Verteilung von EPS mit dem besseren Zugang der äußeren Bakterien zu den Nährstoffen

2.5 Raman-Mikrospektroskopie an Biofilmen und Methoden der Spektrenauswertung

des umgebenden Mediums verglichen mit den Bakterien im Inneren der Kolonien (13). Es konnte jedoch mit den verwendeten Untersuchungsmethoden keine DNA nachgewiesen werden und somit auch nicht bestätigt werden, dass EPS von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hauptsächlich aus DNA-Fragmenten bestehen würde, wie es bereits von Matsukawa et al. vorgeschlagen wurde (107).

Ivleva et al. untersuchten Biofilme mit Raman-Mikrospektroskopie und kombinierten die Ergebnisse mit Referenzproben sowie mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) (12, 19). Dabei wurden in drei Flusskanälen Biofilme auf Glasobjektträgern gezüchtet. Die Fließbedingungen des überspülenden Mediums waren dabei sowohl laminar, im Übergang von laminar zu turbulent, als auch turbulent. Mit Hilfe der Referenzproben konnte eine exakte Aufschlüsselung der Zusammensetzung und der Verteilung der Bestandteile von EPS ermittelt werden. Es konnte so ebenfalls der Zustand und die Alterung von Biofilmen dokumentiert werden (12, 19).

Marcotte et al. gelang die Bestimmung der Diffusion von Polyethylenglykol und deuteriertem Wasser in Biofilmen (108). Dabei konnte die Verteilung von Biomasse anhand von charakteristischen Schwingungen bestimmt werden. Es konnte weiter gezeigt werden, dass deuteriertes Wasser nahezu überall in den Biofilm hinein diffundieren konnte, die Beweglichkeit von Polyethylenglykol jedoch eingeschränkt war. Mit Hilfe von Kalibrierkurven konnte Sandt et al. sogar den Wassergehalt und die Biomasse in Biofilmen genau quantifizieren, wofür ebenfalls konfokale Raman-Mikroskopie zum Einsatz kam (14).

Pätzold et al. konnten, durch die Verwendung einer geeigneten Lochblende, lokale chemische Information (Fingerabdruckspektren) von Mikroorganismen erhalten (24). Dies ermöglichte eine bildgebende Darstellung anhand der Intensitäten von Raman-Banden, ohne die Bakterienkolonien zuvor mit eventuell toxischen Substanzen färben zu müssen, wie beispielsweise bei FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) oder CLSM.

Eine weitere Verbesserung dieses Vorgehens konnte mit Hilfe von Resonanzphänomenen erzielt werden (109). Cytochrom *c* hat beispielsweise einen elektronischen Übergang $\pi \rightarrow \pi^*$ seines Porphyrin-Ringes im Wellenlängenbereich bei 532 nm. Damit konnten intensive Raman-Banden erhalten werden, welche damit Pätzold et al. ebenfalls eine bildgebende Verteilung des Cytochroms innerhalb der Bakterienkolonien erlaubten (109).

Kniggendorf et al. analysierten und verglichen die *Fingerprint*-Bereiche von Raman-Spektren an Biofilmen (konfokale Raman-Mikroskopie) und konnten somit die Verteilung unterschiedlicher Bestandteile bildlich darstellen (23). Dabei wurde eine hierarchische Clusteranalyse angewendet, um die Verteilung der Carotinoide Neurosporen und Spheroïden, sowie Cytochrom *c*, aber auch von TiO_2 zu ermitteln.

Eine weitere Möglichkeit, um den Fingerprintbereich von Raman-Spektren auszuwerten, ist neben einer hierarchischen Clusteranalyse, die Verwendung einer *multiclass support vector machine*, MC-SVM. Hierbei können Datensätze aus einer großen Anzahl sehr ähnlicher

2.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SERS

Raman-Spektren analysiert werden, wobei diese Art der Auswertung zusätzlich lernfähig ist. Dabei wird, vor der eigentlichen Spektrenauswertung, anhand einer vorgegebenen Beispiel-Zusammenstellung, deren Teile ihrerseits jeweils einer bestimmten Kategorie angehören, ein Modell für später folgende Unterscheidungen etabliert (110). Damit ist es also für den geschriebenen Softwarecode möglich, anhand von Beispielen zu lernen (111).

Kusic et al. gelang es auf diese Weise mittels Raman-Spektroskopie zwischen elf verschiedenen Mikroorganismen, aus einer Datenbank von 22 Bakterien der *Legionellen* Familie, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* zu unterscheiden (27). Stöckel et al. konnten auf dieselbe Weise eine Identifizierung von *Burkholderia mallei* und *Burkholderia pseudomallei* (Erreger von Melioidose oder Pseudo-Rotz), innerhalb von Stunden und ohne einer vorangegangenen Kultivierung vornehmen (26). Dabei wurde eine zweistufige *support vector machine* (SVM) eingesetzt, um Vergleiche mit einer Datenbank vorzunehmen. Auf diese Weise konnten sogar Bakterien an zuvor präpariertem Futtermittel identifiziert werden. Ebenfalls war eine schnelle und effektive Identifizierung von nicht mehr kultivierbaren Zellformen von *Legionella pneumophila* mittels Raman-Spektroskopie und einer SVM möglich (112).

Die vorliegende Arbeit hatte jedoch zum Ziel, chemische Konzentrationsgradienten zu quantifizieren. Da die Nährstoffe und Abbauprodukte in der Umgebung von biologischen Systemen wie Biofilmen in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, waren daher abweichende Anforderungen an die Raman-Messungen als die gerade beschriebenen nötig. Eine Quantifizierung von chemischen Substanzen in Lösung mittels konventioneller Raman-Mikrospektroskopie ist aufgrund des geringen Streuquerschnitts der Moleküle und der geringen Konzentrationen in der Regel nicht sensitiv genug. Eine Verlängerung der Einzelmesszeit, um ein besseres S/N-Verhältnis zu erreichen, ist insofern problematisch, als dass sich dadurch die Gesamtmesszeit zu stark verlängern würde (S/N-Verhältnis $\sim \sqrt{t}$), um die Ausbreitung eines Gradienten verfolgen zu können. Eine Erhöhung der Laserleistung ist ebenfalls nur bis zu einem gewissen Grade möglich, da einerseits der zu untersuchende Biofilm dabei zerstört werden könnte und andererseits selbst bei maximaler Laserleistung die Sensitivität oftmals immer noch zu gering wäre.

2.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SERS

Eine Möglichkeit zur Verstärkung der Signalintensität bei Raman-Messungen ist oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS). Hierbei können im besten Fall Verstärkungen des Signals um einen Faktor von $\sim 10^9$ - 10^{11} erhalten werden (29).

Fleischman et al. fanden 1974 zum ersten Mal eine außergewöhnlich große Signalverstärkung bei Pyridin, welches an einer Nano-rauen Silberoberfläche adsorbiert war (113). Diese Signalverstärkung an der Oberfläche eines Edelmetalls wurde später lokal begrenzten elektromagnetischen Feldverstärkungen aufgrund von Oberflächenplasmonen zugeordnet. Diese

2.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SERS

Gitterschwingungen des Metalls werden dabei von der Wechselwirkung der Photonen des Raman-Lasers mit der Metalloberfläche erzeugt. Für SERS-Messungen können auch Nanopartikel verschiedener Form und Größe verwendet werden (114–119). Silber oder Gold eignet sich neben Kupfer sehr gut für eine Signalverstärkung durch SERS (120–124). Dabei ist es oft auch sinnvoll durch die Zugabe von Salz (beispielsweise KCl, NaCl oder CaCl₂) eine Agglomeration der Nanopartikel herbeizuführen und so die SERS-Aktivität in der Regel deutlich zu erhöhen (125–127).

In der Theorie wird heutzutage davon ausgegangen, dass sich die SERS-Signalverstärkung aus einer elektromagnetischen und einer chemischen Verstärkung zusammensetzt (128, 129).

Elektromagnetische Verstärkung und *hot spots*

Der Dichtefunktionaltheorie zur Folge, können Metalle anhand ihrer Leitungsbänder beschrieben werden. Diese entstehen formal durch die Überlagerung der einzelnen Atomorbitale im Festkörper, und können mit Hilfe von quantenmechanischen Berechnungen beschrieben werden (Bändermodell). Die Elektronen, welche sich in den Leitungsbändern befinden können, sofern sie frei beweglich sind (teilweise gefüllte Bänder), in Wechselwirkung mit dem einfallenden Raman-Laser treten. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Metallstruktur klein ist, verglichen mit der Wellenlänge des Laserstrahls (28). Es ist damit auch gleichzeitig eine Erklärung, warum eine Rauigkeit im Größenbereich von Nanometern nötig ist, damit eine Signalverstärkung durch SERS ermöglicht wird.

Findet eine solche Wechselwirkung statt, so entstehen dadurch Plasmonen (Gitterschwingungen) im Metall. Diese Gitterschwingungen sorgen dabei für eine Umverteilung des Energiefeldes des Laserstrahls (28). Dadurch können Bereiche mit starken elektromagnetischen Feldern in kurzen Distanzen zur Metalloberfläche (< 10 nm, da Intensität $I \sim d^{-12}$) entstehen. Wenn sich nun beispielsweise zwei Nanopartikel einander annähern und der Abstand ihrer Metalloberflächen nur noch wenige Nanometer beträgt, so ist die elektromagnetische Feldverstärkung in diesen Bereichen besonders stark (Abbildung 2.9). Derartige Bereiche werden als *hot spots* bezeichnet. Das SERS-Signal (I_{SERS}) kann dabei mit folgenden Formeln beschrieben werden (100):

$$I_{SERS} \propto N \cdot I_L \cdot |A(\nu_L)|^2 \cdot |A(\nu_S)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad (2.22)$$

$$\sigma_{eff}^{SERS} = \sigma_{ads}^R A(\nu_L)^2 A(\nu_S)^2 \quad (2.23)$$

mit:

2.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SERS

I_{SERS} = SERS-Signal

N = Zahl der am SERS-Prozess beteiligten Moleküle

I_L = Intensität der Anregung

$A(\nu_L), A(\nu_S)$ = Verstärkungsfaktoren für Anregung und Streufeld.

σ_{ads}^R = Erhöhter Raman-Streuquerschnitt der adsorbierten Moleküle
(verglichen mit dem normalen Raman-Streuquerschnitt σ^R)

σ_{eff}^{SERS} = Effektiver SERS-Streuquerschnitt

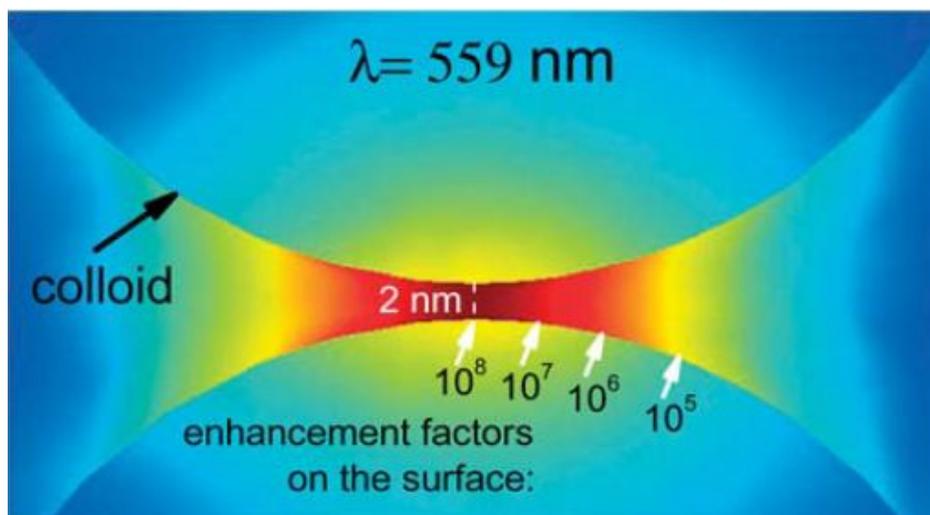


Abbildung 2.9: Verteilung des SERS-Verstärkungsfaktors in einen *hot spot* zwischen zwei Gold-Nanopartikeln ($r = 30 \text{ nm}$, $d = 2 \text{ nm}$, $\lambda = 559 \text{ nm}$). Rot: hohe, blau: niedrige SERS-Verstärkung. Abbildung entlehnt aus Etchegoin et al. (130). Für weitere Berechnungen siehe Le Ru et al. (29) und Brown et al. (131).

Innerhalb eines *hot spots* konzentriert sich die elektromagnetische Verstärkung auf engstem Raum und kann daher über wenige Nanometer ($\hat{=}$ wenige Moleküldurchmesser) bereits wieder um Größenordnungen abfallen (29, 130, 131). Damit ist die exakte Position eines Analyt-Moleküls entscheidend für die Signalintensität des resultierenden SERS-Spektrums. Ein einzelnes Analyt-Molekül kann somit allein bereits ein gut messbares SERS-Spektrum erzeugen, sofern es sich genau in einem *hot spot* befindet. Die Chance dafür ist jedoch sehr gering, da die Fläche eines *hot spots* klein ist, verglichen mit der restlichen verfügbaren Oberfläche der Nanopartikel. Wird das Molekül aber nur um wenige Nanometer bewegt,

so fällt sein SERS-Signal, abhängig von der genauen Geometrie des *hot spots*, um mehrere Größenordnungen ab ($\sim d^{-12}$) (29). Aus diesem Grund kann anhand der Intensität eines SERS-Spektrums nicht ohne weiteres auf die Anzahl der Analyt-Moleküle geschlossen werden, die zu diesem Spektrum beigetragen haben.

Weiter wird angenommen, dass bei Agglomeraten von Nanopartikeln unterschiedlicher Größe, die elektromagnetische Verstärkung umgekehrt proportional zu ihrer Größe weiter geleitet und weiter verstärkt werden kann (128) (siehe Abbildung 2.10). Solche sogenannten fraktalen Cluster von Nanopartikeln fokussieren die Verstärkung auf eine kleiner werdende Fläche und konzentrieren sie dadurch (132). Eine Voraussetzung ist bei dieser Art von Nanolinsen, dass eine Selbstähnlichkeit im geometrischen Sinne besteht (128). Dies bedeutet, dass vergrößerte Teilstrukturen gleich oder ähnlich ihrer Ausgangsstruktur sind (z. B. ein Radius R bei Nanopartikel-Agglomeraten ist ein Vielfaches der anderen Radien: $R_{i+1} = k \cdot R_i$, mit $k = \text{konstant}$) (132). Wenn also Nanopartikel mit entsprechenden Radien und Abständen hintereinander liegen, so sind in ihren Zwischenräumen extrem hohe Feldverstärkungen die Folge, ähnlich wie bei der Bündelung von Licht durch eine Linse. Die zwei *hot spots* aus Abbildung 2.10 gehören damit also einem zusammenhängenden System an.

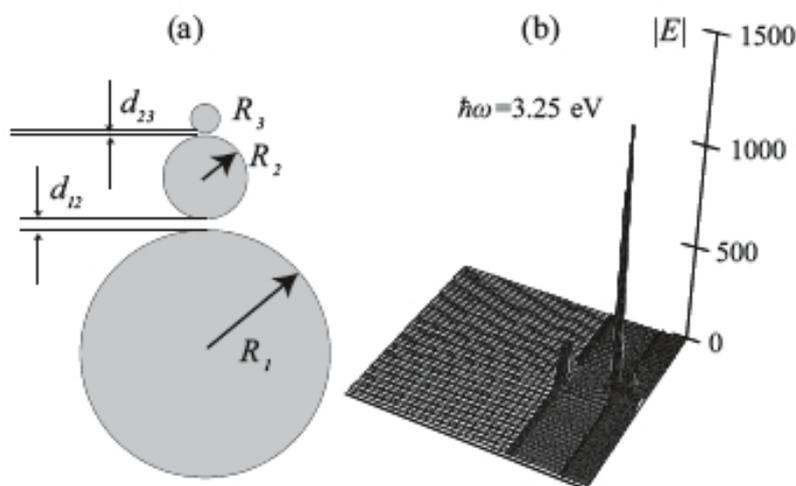


Abbildung 2.10: Nanolinse mit lokalem Feldverstärkungskoeffizient. (a) Drei Silbernanopartikel mit $R_1 = 45 \text{ nm}$, $R_2 = 15 \text{ nm}$, $R_3 = 5 \text{ nm}$ und dem Abstand $d_{12} = 4.5 \text{ nm}$ und $d_{23} = 1.5 \text{ nm}$. (b) Lokaler Feldverstärkungskoeffizient. Die Feldverstärkung wird wie durch eine Linse gebündelt und ist zwischen den kleineren Nanopartikeln am größten. Abbildung entlehnt aus Stockman et al. (128).

Chemische Verstärkung

Wenn ein Molekül an ein Nanopartikel adsorbiert wird, so kann es eine Bindung aufbauen und einen Komplex formen. Dabei kann Ladung von dem Molekül auf das Metall oder von dem Metall auf das Molekül übertragen werden (133, 134). In diesem Fall ist das Fermi-

2.7 Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen

Niveau des Metalls mit dem HOMO (engl.: *highest occupied molecular orbital*), oder dem LUMO (engl.: *lowest unoccupied molecular orbital*) des Moleküls in seiner Energie sehr ähnlich. Das Leitungsband des Metalls, in dem sich die Elektronen frei bewegen können, kann dann mit dem Orbital des Analyt- Moleküls überlappen. Auf diese Weise kann Ladung in Form von Elektronen übertragen werden (engl.: *charge transfer*). In der Literatur wurde vorgeschlagen, dass ein Übergang von dem Grundzustand des Moleküls zu einem ungefüllten Energieband des Metalls oder von einem gefüllten Energieband des Metalls zu einem angeregten Schwingungszustand des Moleküls stattfinden kann (133). Jedoch wird angenommen, dass der Beitrag der chemischen Verstärkung zur gesamten SERS-Verstärkung eher gering ist (128, 135).

Eine gute Übersicht dieser Thematik findet sich bei Cialla et al. (129), Le Ru et al. (29) sowie Stockman et al. (128).

2.7 Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen

SERS ist und wurde in der Literatur bereits viel und kontrovers diskutiert. Es wird häufig berichtet, dass es Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Spektren gibt und dass keine feste Beziehung zwischen der Konzentration eines Stoffes und seiner SERS-Signalintensität zu existieren scheint (29, 135–137).

Allerdings gibt es ebenfalls Erklärungsversuche für dieses Verhalten. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von SERS-Messungen müssen daher vier Bereiche genauer betrachtet werden:

1. Die Eigenschaften der Nanopartikel und ihrer Agglomerate:
Elementsorte (Ag, Au, Cu ...); Größe; Form (Kugel, Dreieck...); Funktionalisierung der Oberfläche; Anzahl und Anordnung der Nanopartikel pro Agglomerat.
2. Die Eigenschaften der Analyt-Moleküle und Wechselwirkung mit der NP-Oberfläche:
Streuquerschnitt; Adsorptionsvermögen und Beweglichkeit auf der NP-Oberfläche; Fähigkeit eine Agglomeration der Nanopartikel hervorzurufen.
3. Die Art der Probenpräparation:
Trocknung der Probe (Temperaturerhöhung, Stickstoffstrom...); Salzzugabe für eine NP-Agglomeration; Geschwindigkeit und Dauer der NP-Agglomeration; die Reihenfolge von Agglomeration und Analyt-Zugabe; Messung nach Trocknung, mit Lösungsüberstand oder ganz in Lösung.
4. Die Messbedingungen und Geräteparameter:
Wellenlänge des Raman-Lasers; Laserleistung; Akquisitionszeit; Größe des Fokus des Laserstrahls.

2.7.1 Die Eigenschaften der Nanopartikel und ihrer Agglomerate

Obwohl einzelne Nanopartikel bereits eine SERS-Verstärkung hervorrufen können, wird häufig eine Agglomeration eingeleitet, um die SERS-Aktivität des Substrats zu erhöhen. Dies kann entweder durch eine Trocknung der Probe, durch die Zugabe von Salz oder durch den Analyten selbst erreicht werden. Agglomerate von Nanopartikeln können dabei stark unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, je nach Form und Größe der Nanopartikel oder ihrer Anordnung innerhalb eines Agglomerats (28). An den Berührungspunkten der Nanopartikel bilden sich *hot spots*, in denen die elektromagnetische SERS-Verstärkung stark lokal begrenzt ist. Da diese aber, wie bereits erwähnt, schnell mit wachsender Distanz d wieder abnimmt ($\sim d^{-12}$) (29), erfährt ein Molekül extrem unterschiedliche Verstärkungen, sobald sich seine Position um nur wenige Nanometer ändert. Damit wird die Geometrie und die Häufigkeit der *hot spots* zusammen mit der Verteilung der elektromagnetischen Verstärkung innerhalb der *hot spots* sehr entscheidend (29):

- Geometrie der *hot spots*

Lagern sich beispielsweise kugelförmige Nanopartikel zusammen, ist eine andere *hot spot* Geometrie zu erwarten, als bei der Agglomeration von Stäbchen oder Nanopartikel mit Ecken (130). Die Ergebnisse von SERS-Messungen können deshalb selbst bei vermeintlich ähnlichen SERS-Substraten unter Umständen kaum vergleichbar sein (29, 130). Die Art der Agglomeration (Trocknung, Salzzugabe) und die Geschwindigkeit hat hierbei ebenfalls Einfluss auf die Agglomerat- und damit auch auf die *hot spot*-Geometrie.

- Anzahl der *hot spots*

Sowohl ihre absolute Zahl, als auch ihre Zahl pro Agglomerat beeinflussen die Häufigkeit, mit der SERS-Spektren erhalten werden können (29). Der Grad der Agglomeration (Agglomerationszeit) der Nanopartikel-Suspension ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

- Maximale elektromagnetische Verstärkung eines *hot spots*

Es gibt *hot spots*, die aufgrund ihrer Geometrie eine hohe maximale Signalverstärkung aufweisen (29) (gestreckte Rotationsellipsoide erzeugen an der Spitze stärkere Felder als Kugeln). Je nach Material der Nanopartikel kann diese maximale Höhe der Verstärkung ebenfalls unterschiedlich ausfallen. Gibt es wenige aber intensive *hot spots*, so sind eher große Schwankungen in der Signalintensität zu erwarten. Hingegen wenn in einem Substrat nur eine schwache maximale Signalverstärkung an *hot spots* herrscht, deren Anzahl jedoch hoch ist, so sind die Schwankungen des Signals entsprechend weniger ausgeprägt.

2.7 Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen

- Intensitätsverteilung der elektromagnetischen Verstärkung innerhalb eines *hot spots*

Die elektromagnetische Verstärkung kann innerhalb eines *hot spots*, abhängig von dessen Geometrie, schnell oder langsam abnehmen (29, 130, 131). Diese Verteilung hat Einfluss auf die Fläche, in der die SERS-Verstärkung noch nennenswert ist (29, 130). Sie hat daher auch Einfluss auf die Empfindlichkeit mit der die resultierende SERS-Signalintensität auf die Position eines Moleküls im *hot spot* reagiert.

2.7.2 Die Eigenschaften der Analytmoleküle und Wechselwirkung mit der NP-Oberfläche

Ändert sich bei einer Molekül-Schwingung die Polarisierbarkeit, so ist diese Schwingung Raman-aktiv (85). Je größer der Streuquerschnitt eines Moleküls ist, desto besser eignet es sich für die Raman-Spektroskopie. Bei SERS-Messungen muss sich das Molekül jedoch innerhalb der elektromagnetischen Feldverstärkung aufhalten, was bedeutet, dass es sich zumindest auf der Oberfläche der Nanopartikel befinden muss. Alle Moleküle, welche sich nicht auf der Oberfläche und somit noch in der umgebenden Lösung befinden, erzeugen also auch kein SERS-Spektrum.

Damit sind die Adsorptionseigenschaften entscheidend für den Erfolg von SERS-Messungen. Analyten mit hohem Adsorptionsvermögen an der Nanopartikeloberfläche eignen sich besser für SERS-Messungen, als solche mit einem niedrigen Adsorptionsvermögen.

Ebenfalls entscheidend kann die Eigenschaft eines Analyten sein, die Nanopartikel selbst zur Agglomeration zu bringen. CV besitzt beispielsweise diese Eigenschaft, was sich jedoch erst ab hohen Konzentrationen bemerkbar macht. Die genaue Höhe ist dabei zusätzlich abhängig von der Konzentration der Nanopartikel.

2.7.3 Die Art der Probenpräparation

Weiter ist die Art der Probenpräparation (u. a. Agglomeration der NP durch Trocknung, Salzzugabe oder durch den Analyten selbst) von entscheidender Bedeutung. Die Geschwindigkeit und Dauer der Agglomeration hat Einfluss auf die Größe und die Form der Agglomerate, sowie die Anzahl der *hot spots*. Weiter können die Messergebnisse stark unterschiedlich sein, wenn der Analyt vor oder nach der Agglomeration der Nanopartikel zugegeben wird.

Der Agglomerationsgrad einer Nanopartikel-Suspension beeinflusst entscheidend die SERS-Verstärkung (29, 125–131). Lemma et al. berichteten 2002 über die Messung von SERS-Spektren an einzelnen Molekülen, nachdem eine Analytlösung zu einer Nanopartikel-Suspension zugegeben wurde und diese, erkennbar an einer Farbänderung, zu einer Agglomeration anregte (138). Bei der, durch den Farbstoff gesteuerten Agglomeration, war es nun möglich Einzelmolekül-SERS-Spektren zu erhalten, obwohl die durchschnittliche Häufigkeit von nur einem einzigen Farbstoffmolekül im Volumen des Fokus des Laserstrahls gegeben war. Wäre hier die rein statistische Adsorption der Moleküle auf der gesamten Nanopartikel-Oberfläche

2.7 Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen

der einzige Effekt, so müsste die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Molekül gerade in einem *hot spot* befindet, rein rechnerisch derart gering sein, dass es Zufall gewesen wäre, auf diese Weise ein Einzelmolekül-SERS-Spektrum zu erhalten. Da die Fläche von *hot spots* sehr gering ist, ist anzunehmen, dass sich die Analytmoleküle aufgrund der vorangegangenen Adsorption auf der Nanopartikel-Oberfläche, mit erhöhter Häufigkeit in den neu geschaffenen *hot spots* befanden.

Daher ist es entscheidend, ob ein Analyt vor oder nach einer Agglomeration von Nanopartikeln zugegeben wird, da er sich im ersten Fall bereits auf der Nanopartikel-Oberfläche befindet, wenn es zur Annäherung der Nanopartikel kommt (vgl. Abbildung 2.11).

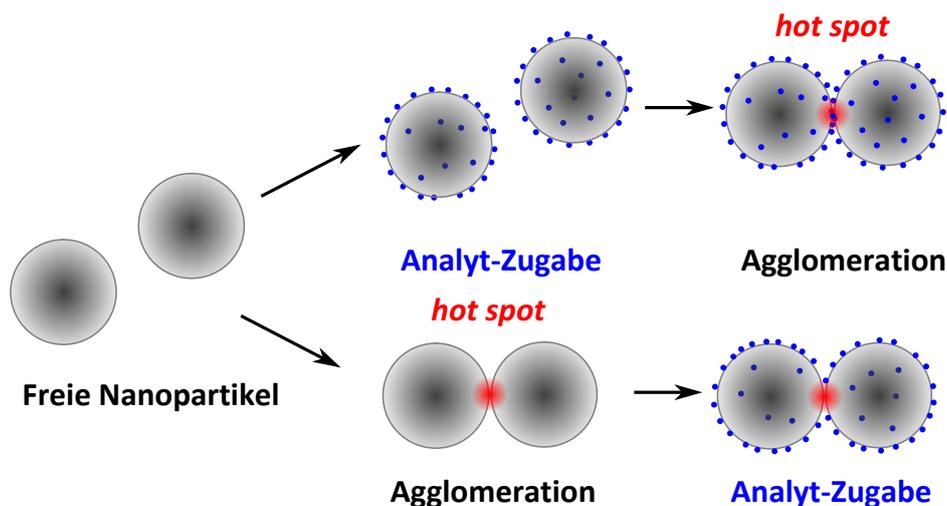


Abbildung 2.11: Wenn die Analytmoleküle bereits auf den Nanopartikeln adsorbiert sind, bevor diese agglomerieren, so ist die Chance größer, dass die neu generierten *hot spots* mit Analyt-Molekülen beladen sind.

Es ist nicht selten in der Literatur zu finden, dass Salze dazu benutzt werden (z.B. NaCl, KCl, CaCl₂), um Nanopartikel kurz vor SERS-Messungen zu einer Agglomeration zu bringen (139, 140). Dabei wird die Ionen-Doppelschicht der Nanopartikel durch die Salzionen teilweise kompensiert. Als Folge daraus werden die Coulomb-Wechselwirkungen abgeschwächt, sodass sich Agglomerate aus mehreren Nanopartikel bilden können. Jedoch wird in der Literatur dabei selten erwähnt, ob sich der Analyt bei der Agglomeration bereits in der Nanopartikel-Suspension befand oder erst danach zugegeben wurde. Weiter wird der Zeitspanne, welche zwischen der Salzzugabe (also dem Auslösen der Agglomerationsreaktion) und der Aufzeichnung der SERS-Spektren lag, in der Regel kaum Beachtung geschenkt.

Kneipp et al. haben es beispielsweise bereits 1997 geschafft, ein Einzelmolekül-SERS-Spektrum von dem Farbstoff CV zu erhalten, wobei die Zugabe des Analyten sogar nach der Agglomeration erfolgte (139). Es wurde dabei jedoch nicht erwähnt, wie viel Zeit nach Zugabe des NaCl verging, bis dieses Spektrum aufgenommen wurde. Es wäre also theoretisch denkbar, dass die Agglomeration noch nicht ganz vollendet war, als der Farbstoff zugege-

2.7 Reproduzierbarkeit bei SERS-Messungen

ben wurde, er somit von den neuen Agglomeraten eingeschlossen wurde und sich dadurch häufiger in neu geformten *hot spots* befand.

Da durch eine Agglomeration die Zahl der *hot spots* zunehmen, sich aber auch ihre Geometrie verändern kann, ist die Zeitspanne und die Geschwindigkeit mit der die Reaktion abläuft dabei von entscheidender Bedeutung. Dieses Problem wird jedoch stark relativiert, dadurch dass SERS sehr häufig auf Oberflächen, wenn auch mit einem Überstand an Lösung, gemessen wird. Die Messungen erfolgen also an Nanopartikeln, welche auf einer Oberfläche liegen oder an eine Oberfläche gebunden sind. Oft wurden dabei die Proben vorher getrocknet, so dass bei Aufzeichnung der SERS-Spektren bereits keine Flüssigkeit mehr vorhanden ist. Bei einer Trocknung erhöht sich allerdings zwangsweise die Konzentration der Nanopartikel und auch die des Analyten in der flüssigen Phase stark, was letztlich immer zu einer (eventuell unkontrollierten) Agglomeration während des Trocknungsprozesses führt.

Aus diesem Grunde sind auch elektronenmikroskopische Aufnahmen nicht immer aussagekräftig, wenn aus ihnen die Anzahl und Form von Nanopartikel-Agglomeraten abgeschätzt werden soll, da der Trocknungsprozess nicht exakt genug reproduzierbar ist. Für Bewertungen und Vergleiche von Nanopartikel-Agglomeraten, welche in Lösung erzeugt wurden, sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen daher nicht unbedingt herangezogen werden, da einerseits der Trocknungsprozess zu viele unbekannte Größen beinhaltet und andererseits jede dreidimensionale Form der Agglomerate (falls vorhanden) zwangsweise zu einer quasi-zweidimensionalen Form reduziert wird.

Wird SERS zur quantitativen Analyse eingesetzt, so sollten bei der Versuchsdurchführung keine Schritte enthalten sein, bei denen eine unkontrollierte oder unbekannt Reaktion (z.B. Agglomeration bei der Trocknung) stattfinden kann. Im Falle einer eingeleiteten Agglomeration der Nanopartikel sollte diese vor der Messung abgeschlossen sein, da ansonsten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darunter leiden würde.

2.7.4 Die Messbedingungen und Geräteparameter

Bei SERS-Experimenten an Nanopartikeln haben darüber hinaus ebenfalls die Geräteparameter während der Messung einen Einfluss auf die Messergebnisse. Unter anderem ist die Größe des Fokus des Raman-Laserstrahls bei der Messung zusammen mit der Messzeit und der Laserleistung und der Wellenlänge von entscheidender Bedeutung. Durch sie wird definiert, wie viele Nanopartikel erfasst werden und, bei welcher Leistung gemessen wird und wie lange. Formeln, welche die theoretische Größe des Fokus des Laserstrahls (Durchmesser und Länge des Rotationsellipsoids) beschreiben, sind bei Everal et al. (141) zu finden. Die Kenndaten der in dieser Arbeit verwendeten Objektive sind in Tabelle 2.3 zusammengestellt.

2.8 Single-Molecule-SERS (SM-SERS)

Tabelle 2.3: Theoretische Abmessungen des Fokus des Raman-Laserstrahls (Rotationsellipsoid) in Abhängigkeit der Vergrößerung bei einer Wellenlänge von 633 nm.

Vergrößerung/ Objektiv	Numerische Apertur	waagrechter Durchmesser Laserfokus	senkrechter Durchmesser Laserfokus	Volumen Laserfokus
20x Wasserimmersionsobjektiv	0,5	1,5 μm	13,5 μm	17 μm^3
10x Objektiv	0,25	3 μm	54 μm	270 μm^3

Es ist daher möglich, dass durch zu hohe Energien das zu untersuchende Molekül zerstört wird. Ist ein Laser zu stark eingestellt, so kann sich das Signal also zeitlich verändern, oder sogar ganz verschwinden. In diesem Zusammenhang wird leider oft vernachlässigt, dass bei einer „Kurzzeitmessung“ mit einem Raman-Gerät (für beispielsweise 0,1 Sekunde), der Laser jedoch vor und nach dem Aufzeichnen des Signal in der Regel bereits auf die Probe strahlt. Es könnte also sein, dass die Probe zwar zu Anfang der Messung ein SERS-Signal aussendete, dieses jedoch nicht mehr (oder nur noch schwach) messbar war zum Zeitpunkt des Aufzeichnens des Spektrums.

2.8 Single-Molecule-SERS (SM-SERS)

Bei dem häufig verwendeten Ansatz geringer Konzentrationen (engl.: *low concentration approach*) zum Nachweis einzelner Moleküle mittels SERS (engl.: *single molecule SERS*, SM-SERS), wird die Nanopartikel-Konzentration und die Analyt-Konzentration so gewählt, dass rein rechnerisch ungefähr ein einziges Molekül des Analyten im Fokus des Laserstrahls ist (138, 142, 143). Statistisch gesehen hat ein Analyt-Molekül dabei jedoch sehr viel mehr Möglichkeiten für eine Adsorption an einem ungünstigen Platz ohne nennenswerte SERS-Verstärkung, als für die Adsorption ausgerechnet in einem *hot spot* (29).

Kleinman et al. haben mit SM-SERS an Silber-Nanopartikeln Einzelmolekülspektren von CV untersucht (144). Dafür wurde die Bi-Analyt-Technik verwendet, wie sie bereits von Le Ru et al. beschrieben wurde (145). Dabei werden die Konzentrationen von zwei möglichst ähnlichen, aber noch unterscheidbaren Stoffen so gewählt, dass nur noch selten SERS-Spektren erhalten wurden. Konzentrationsbedingt sollten sich aber stets beide Farbstoffmoleküle im Laserfokus befinden. Man erhält auf diese Weise also selten SERS-Spektren, wobei diese dann in der Regel aus einer Überlagerung der beiden Farbstoffe bestehen. Dabei wird, aufgrund von statistischen Überlegungen, davon ausgegangen, dass sobald ein SERS-Spektrum von nur einem der beiden Farbstoffe erhalten wird, dieses dann zwangs-

2.8 Single-Molecule-SERS (SM-SERS)

weise ein Einzelmolekül-SERS-Spektrum sein muss (145). Um dieses Verfahren anzuwenden, benutzten Kleinman et al. Isotopologe von CV (CV-d0 und CV-d12, bei dem alle Phenyl-Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt waren) (144). Sie fanden, dass bei einem ungefähren Verhältnis von 0,5 CV-Molekülen pro Ag-Nanopartikel (nicht Nanopartikel-Agglomerat) Einzelmolekülspektren mit SERS erhalten werden können, jedoch schien es Zufall zu sein, wann ein Spektrum erhalten wurde und wann nicht. Es musste folglich eine große Anzahl von Messungen durchgeführt werden, um genügend SERS-Spektren zu erhalten für statistische Auswertungen. Allerdings wurden die eigentlichen SERS-Messungen erst durchgeführt, nachdem die Probe eingetrocknet war, was Raum für Diskussionen lässt bezüglich dem Einfluss von unkontrollierten Trocknungseffekten auf die SERS-Messungen. Diese Trocknungseffekte können an sich bereits sehr unterschiedlich ausfallen, je nach vorherrschenden Prozessbedingungen (Geschwindigkeit der Trocknung, Trocknung unter Stickstoffstrom, Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Eigenschaften der Oberfläche, auf der sich die Probe befindet, Zusammensetzung des flüssigen Mediums und Ähnliches).

Constantino et al. (146) beschrieben ebenfalls die Messung von Einzelmolekül-SERS-Spektren eines Farbstoffes. Dieser wurde adsorbiert an die Oberfläche von Nanopartikeln nachgewiesen, als er in einer Molekül-Monolage von Arachinsäure (= Icosan-Säure, $C_{20}H_{40}O_2$) gelöst war. Es wurde dabei auch von sogenanntem „*blinking*“ berichtet (146). Dabei sind zum Teil sehr deutliche SERS-Spektren an einem Messort zu sehen, die kurz darauf wieder verschwinden. Ihr erneutes Auftauchen soll aber nicht als Beweis für Einzelmolekül-Spektroskopie (SM-SERS) gewertet werden, sondern als Eigenschaft von sehr verdünnten Systemen (146). Le Ru et al. nennen als Ursache für *blinking*, sowie für die starken Fluktuationen in der Intensität von SERS-Spektren, die thermische Bewegung eines Moleküls im *hot spot* (145). Als Beleg für SM-SERS sehen Constantino et al. die Variation der drei spektralen Parameter, Banden-Intensität, Halbwertsbreite einer Bande (engl.: *full width at half maximum*, FWHM) und Frequenz bei unterschiedlichen Aufnahmen eines SERS-Spektrums desselben Stoffes (146).

Aus den Diskussionen in der Literatur ist nicht ersichtlich, inwieweit die Beweglichkeit der adsorbierten Analyten über weitere Strecken auf den Oberflächen der SERS-Substrate mit in die Überlegungen einbezogen wurden. Es wird lediglich berichtet, dass die thermische Diffusion von Analyt-Molekülen in *hot spots* hinein und wieder heraus - neben der zufälligen minimalen Veränderung der *hot spot* Geometrie (relative Bewegung der Nanopartikel zueinander) - als ein Grund für das *blinking* bei SM-SERS angenommen wird (29, 145, 146). Jedoch ist nicht klar, wie beweglich ein Molekül auf einer Oberfläche wirklich ist, da bereits eine Positionsänderung von wenigen Nanometern entscheidenden Einfluss auf die SERS-Verstärkung haben kann und Untersuchungen dazu deswegen schwierig sind.

Darüber hinaus wurde bisher noch nicht der potentielle Einfluss einer Beschichtung (beispielsweise mit n-Octanol) auf das Verhalten und die Beweglichkeit eines adsorbierten Analyten auf einer Nanopartikel-Oberfläche bei SERS-Messungen untersucht.

2.9 SERS zur Untersuchung von Biofilmen

SERS wurde bereits mehrfach zur Untersuchung von einzelnen Bakterien und Zellen, DNA-Fragmenten, Proteinen oder Lipiden verwendet (147–164). Bei vielen dieser Arbeiten wurden die Proben allerdings getrocknet, nachdem sie mit den Nanopartikeln in Kontakt kamen und bevor sie gemessen wurden, wodurch Trocknungseffekte unvermeidbar sind.

Generell muss bei der Untersuchung von Biofilmen mit SERS berücksichtigt werden, dass nur das Signal der Moleküle verstärkt wird, welche sich auf der Oberfläche der Nanopartikel befinden. Die Adsorptionseigenschaften der Bestandteile des Biofilms (EPS) sind dabei entscheidend (95, 96). Ivleva et al. berichteten über den *in situ* Einsatz von SERS zur Analyse von Biofilmen (31). Dabei wurde eine Messanordnung verwendet, bei der sich der Biofilm in einer Nanopartikel-Suspension befand und dort mit einem Flüssigkeitsüberstand und einem Wasserimmersionsobjektiv gemessen wurde. Auf diese Weise konnten Trocknungseffekte vollkommen vermieden werden. Diese und weitere Untersuchungen zeigten eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messungen, wobei gleichzeitig eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber konventioneller Raman-Mikrospektroskopie erreicht werden konnte (30, 32). Ramya et al. untersuchten Algen und Bakterien mit SERS, wobei die Messungen ebenfalls mit einem Lösungsüberstand stattfanden (25).

Knauer et al. gelang die Detektion und Charakterisierung einzelner Mikroorganismen mittels SERS (33). So konnten Fingerabdruck-SERS-Spektren einzelner Bakterien erhalten werden, wobei Nanopartikel-Agglomerate über die Zugabe von Natriumazid direkt auf den Zellwänden der Bakterien realisiert werden konnten (140). Eine online-Identifizierung der Bakterien mittels SERS konnte sogar innerhalb einer Flusszelle vorgenommen werden (34).

Zhou et al. kombinierten ein Verfahren zur Synthese von Nanopartikeln für SERS direkt an einer bakteriellen Zellwand mit einer hierarchischen Clusteranalyse (35). Dadurch war es möglich, einzelne Mikroorganismen von *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* zu unterscheiden.

2.10 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Für eine quantitative SERS-Messung geringer Konzentration, ist eine reproduzierbare Beziehung zwischen der Konzentration des nachzuweisenden Stoffes und der Intensität seiner SERS-Spektren nötig.

2.10 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Joseph et al. berichteten über den Zusammenhang der Größe von Gold-Nanopartikeln und ihrer SERS-Verstärkung (165). Dabei wurde ebenfalls untersucht, wie sich die Beziehung zwischen der Konzentration des Analyten CV und der SERS-Signalintensität verhält. Im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ M und $5 \cdot 10^{-6}$ M wurde keine Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Analyt-Konzentration gefunden. Bei einer Konzentration von $> 5 \cdot 10^{-6}$ M, fanden Joseph et al. jedoch stark unterschiedliche Zusammenhänge für drei verschiedene Nanopartikelgrößen (linearer Zusammenhang für 40-nm-Nanopartikel, exponentieller Zusammenhang für 30-nm-Nanopartikel und ein erst steigender, dann fallender Zusammenhang für 15-nm-Nanopartikel). Es wurde ebenfalls betont, dass die SERS-Signalverstärkung entscheidend von dem Agglomerationsgrad der Nanopartikel abzuhängen schien. Der Verstärkungsfaktor (EF) war hierbei definiert als (165):

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot C_{RS}}{I_{RS} \cdot C_{SERS}}$$

Wobei I_{SERS} und I_{RS} die Intensitäten bei SERS-Experimenten und Messungen mit konventioneller Raman-Spektroskopie sind, sowie C_{SERS} und C_{RS} die Konzentrationen bei SERS-Experimenten und Messungen mit konventioneller Raman-Spektroskopie (165). Diese Definition findet sich ebenfalls bei Le Ru et al. (166).

Pearman et al. untersuchten die SERS-Intensitäten von N-Hexanoyl-DL-homoserin lacton (C6-AHL, *Autoinducer*-Molekül für bakterielle Kommunikation durch *quorum sensing*) (136) und Saxitoxin (Toxin, produziert von Cyanobakterien und Dinoflagellaten) (167). Dabei wurde zweimal ein linearer Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und SERS-Signalintensität gefunden, wobei jedoch die oben genannten experimentellen Parameter über den Agglomerationsgrad der Nanopartikel keine Erwähnung fanden. Allerdings wurde explizit betont, dass die Menge an verwendeter KCl-Lösung zur Einleitung einer Agglomeration und Erzielung einer maximalen SERS-Verstärkung stets unterschiedlich war und offensichtlich keiner festen Beziehung folgte. Weiter wurden die Nanopartikel zuerst mit der Analytlösung vermischt und erst danach zur Agglomeration gebracht (136).

Han et al. untersuchten systematisch den Effekt einer Zugabe von Salz zur Agglomeration von Silber-Nanopartikeln auf die SERS-Verstärkung von Cotinin und *trans*-3'-Hydroxycotinin (Biomarker beim Nikotin-Abbau) (168). Dabei zeigte sich, dass die SERS-Verstärkung aufgrund von Agglomeration der Nanopartikel zuerst zunimmt, jedoch nach Überschreiten eines konzentrations- und ionenabhängigen Maximums wieder abnimmt. Zusätzlich konnte dabei ein linearer Zusammenhang zwischen der SERS-Signalintensität und der Analyt-Konzentration erarbeitet werden. Jedoch wird auch hier nicht explizit erwähnt, wie lange die Suspension mit Nanopartikeln, Salz für die Agglomeration und Analyt Zeit hatte zu agglomerieren.

2.10 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Bezogen auf eine verbesserte Reproduzierbarkeit findet sich in der Literatur darüber hinaus die experimentelle Versuchsanordnung von mikrofluidischen „*Lab-on-a-Chip*“-Systemen für quantitative SERS-Messungen (36–39, 137, 169, 170). Hierbei wurden nasschemisch geätzte, mikrofluidische Kanäle auf einem Glassubstrat verwendet, welche derart geformt waren, dass über mehrere Einlässe Flüssigkeiten der Reihe nach zusammengeführt und vermischt werden konnten (171, 172). Damit konnte die Fließgeschwindigkeit des Mediums exakt eingestellt werden und so die Zeit, welche den Nanopartikeln zur Agglomeration blieb, genau kontrolliert werden. Da die Messungen mit dem Raman-Laser immer an der gleichen Stelle ausgeführt wurden, konnten quantitative SERS-Messungen reproduzierbar durchgeführt werden. Jedoch hing der Erfolg der Messungen maßgeblich von den experimentellen Bedingungen, wie beispielsweise der Fließrate ab.

Keir et al. stellten so eine Beziehung zwischen der Konzentration von 5-(2'-Methyl-3',5'-dinitrophenylazo)quinolin-8-ol, einem TNT-Derivat, und seiner SERS-Signalintensität bei SERS-Messungen an Silber-Nanopartikeln vor (137). Dabei wurden die Messungen in einem mikrofluidischen System mit Kanälen ($30 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$) vorgenommen, wobei die Reagenzien derart eingeleitet wurden, dass sich die Nanopartikel *in situ* formten, der Analyt zugegeben wurde und dann augenblicklich danach gemessen wurde. Die Folge dieses Versuchsaufbaus und der resultierenden schnellen und immer exakt gleichen Vermischung aller Komponenten war, dass alle veränderlichen Parameter und vor allem Zeiten (Kontaktzeit der Nanopartikel mit dem Analyten) stets exakt gleich waren. Damit wäre es sogar möglich, reproduzierbare Messungen in einer Nanopartikel-Suspension vorzunehmen, welche sich noch in fortschreitender Agglomeration befände.

Strehle et al. nutzten einen vergleichbaren Versuchsaufbau, wobei die flüssige Phase zusätzlich durch immer wieder zugeführte Tröpfchen einer Ölphase abgetrennt wurde (36). In den mikrofluidischen Kanälen flossen also abwechselnd Tröpfchen mit wässriger Nanopartikel-Analyt-Lösung und Öltröpfchen. Dabei wurden die Lösungen ebenfalls erst unmittelbar vor den Messungen vermischt. Da aber, bedingt durch die konstanten und genau kalibrierten Fließraten, die Zeit zwischen Mischen und Messen stets exakt gleich blieb, konnten auch hier quantitative SERS-Messungen durchgeführt werden.

Mit Hilfe dieses Aufbaus konnte ebenfalls eine Kalibrierung für Antibiotika und Adenin durch quantitative SERS-Messungen vorgenommen werden (37, 38).

Shamsaie et al. verfolgten sogar noch einen weiteren Ansatz, bei dem N-(3-((2,4-dinitrophenyl)amino)propyl)-N-(3-aminopropyl)methylamin (DAMP, ein sogenannter *Lyso Tracker* zur Untersuchung der Biosynthese von Lysosomen) intrazellulär und an der Oberfläche von Gold-Nanopartikeln gemessen wurde (161). Dabei wurde die konzentrationsunabhängige Gitterschwingung der Nanopartikel selbst (ist sichtbar im SERS-Spektrum) verwendet, um die Intensität der SERS-Spektren von DAMP zu normalisieren. Auf diese Weise konnte eine

Kalibrierung für quantitative SERS-Messungen erhalten werden.

2.11 Gradientenmessungen mit quantitativem SERS

Bei den hier genannten Arbeiten zu quantitativem SERS wurden zwar Konzentrationen punktuell mit SERS bestimmt, jedoch konnte, bedingt durch den Versuchsaufbau, kein Konzentrationsgradient gemessen werden. Des Weiteren wurden einzelne Mikroorganismen, EPS und Biofilme mittels SERS untersucht, identifiziert und die Ergebnisse mit Referenzproben oder Datenbanken verglichen. Allerdings konzentrierten sich die Analysen meist auf den Biofilm bzw. die Bakterien selbst. Zu den Einflüssen der Umgebung (Porennetzwerk) oder den Wachstumsbedingungen konnten bislang noch nicht alle Fragen restlos geklärt werden. Bei einer Kontamination mit hydrophoben Schadstoffen, wie beispielsweise n-Octanol, bilden sich Tröpfchen im Porennetzwerk des Bodens aus. Diese stellen Phasengrenzflächen dar, über die ein Schadstoffeintrag in das vorbeifließende Grundwasser stattfindet. Dabei bilden sich chemische Konzentrationsgradienten aus, welche einen entscheidenden Einfluss auf die räumliche Verteilung von Biofilmen in den Poren ausüben. Die NAPL-Tröpfchen stellen dabei eine Senke für andere Kontaminanten dar und können so als Reservoir fungieren und die Abgabe in die wässrige Phase verzögern und zeitlich ausdehnen. Da der Stoffumsatz an den biogeochemischen Grenzflächen geschieht, ist die genaue Kenntnis der Ausbildung von chemischen Konzentrationsgradienten nötig, um die im Boden vorherrschende Dynamik bei einem Abbau von Schadstoffen zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit vergleicht dabei einerseits die Aktivität von Bodenbakterien mit den Eigenschaften des sie umgebenden Porennetzwerks und quantifiziert und visualisiert andererseits die Ausbildung eines chemischen Gradienten an einer n-Octanol/Wasser-Grenzfläche mit quantitativem SERS. Dabei wurden sowohl eine Auswertung mittel computergestützter Datenanalyse und Bildbearbeitung, als auch eine Erforschung grundlegender Vorgänge bei quantitativen SERS-Messungen in freier Lösung bei Anwesenheit einer Beschichtung mit n-Octanol vorgenommen. Die mit n-Octanol beschichteten Nanopartikel zeigten ein grundlegend anderes Verhalten in ihrer SERS-Aktivität bei den Messungen. Daher wurde ein Modell erarbeitet und vorgeschlagen, welches das in den Versuchen beobachtete Verhalten erklärt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemische Verbindungen, Lösemittel und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten chemischen Verbindungen und Lösemittel sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt und wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

Tabelle 3.1: Chemische Verbindungen und Lösemittel.

Produkt	Reinheit/ Gehalt	Firma	
Aceton		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
AgNO ₃	99,8 %	Th. Geyer	Renningen, DE
Bentazon	99,9 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
EtOH		Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
1-Hydroxy-2-naphthoesäure	99 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Kristallviolett (CV)	≥88 %	Merck	Darmstadt, DE
Metalaxyl	99,6 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
NaCl		Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
NaOH, 0,1 N		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
NH ₂ OH·HCl	≥98 %	Th. Geyer	Renningen, DE
Phenanthren	99,5 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE

In Tabelle 3.2 sind die Geräte und Materialien angegeben, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.1 Chemische Verbindungen, Lösemittel und Materialien

Tabelle 3.2: Geräte und Materialien.

Produkt	Beschreibung	Firma	
CCD-Videokamera schwarz/weiß	EHD Kam-Pro 03HD CCD	EHD Imaging GmbH	Damme, Deutschland
Dreiwege-Ventil		Liquid-Scan GmbH & Co. KG	Überlingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	BX 60	Olympus	Shinjuku, Japan
Hochpräzisions- Deckgläser	Borosilikatglas	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop, verbaut im Raman-Gerät	Olympus BXFM (angepasst)	Olympus	Shinjuku, Japan
Objektträger mit Vertiefungen		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Raman-Laser	- 785 nm - 532 nm - 633 nm, He-Ne-Laser 35 mW Initialleistung 15 mW an der Probe	Horiba Scientific	Kyoto, Japan
Raman-Mikrospek- troskop-System	Horiba LabRAM HR	Horiba Scientific	Kyoto, Japan
Sechswegen-Ventil		Upchurch Scientific	Oak Harbor, USA
Spiegelreflex- Kamera	Nikon D70	Nikon	Chiyoda, Japan
Spritzenfilter, d = 15 mm Porengröße 0,20 μm	Nylon nicht steril	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Spritzenfilter, d = 15 mm Porengröße 0,20 μm	PES steril	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Spritzenpumpe	PicoPlus	Harvard Apparatus GmbH	Holliston, USA
UV/VIS-Küvetten 1,5 - 3,0 mL	PMMA Halbmikromaßstab	Th. Geyer	Renningen, Deutschland
UV/VIS-Spektrometer	SPECORD 250 PLUS	Analytik Jena	Jena, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 mL	nicht steril	Th. Geyer	Renningen, Deutschland

3.2 Mikromodell-Versuche

Alle Versuche mit Bakterien fanden in Mikromodellen statt, wobei der zugehörige experimentelle Aufbau in Abbildung 2.2 (Seite 17, Kapitel 2.1.1) zu sehen ist. Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten des Versuchsaufbaus und die Versuchsdurchführung beschrieben.

3.2.1 Versuchsaufbau: Mikromodelle und Spritzenpumpe

Alle Mikromodelle wurden von Thomas Baumann (Technische Universität München) und von Thomas Willingham (Universität von Illinois, Urbana/Champaign, USA) angefertigt. Bei dem Herstellungsprozess wurde ein Trockenätzverfahren verwendet, bei dem eine definierte Struktur in einen Siliziumwafer geätzt wurde. Die Kanaltiefe dieser Struktur betrug $30\ \mu\text{m}$, ihre zweidimensionalen Abmessungen ohne die Zu- und Ablaufkanäle waren $2\ \text{cm}$ auf $1\ \text{cm}$. Die Porenstruktur bei Versuchen mit *Paracoccus denitrificans* bestand aus elliptischen Säulen ($d_1 = 600\ \mu\text{m}$, $d_2 = 200\ \mu\text{m}$), welche in abwechselnd versetzten Reihen mit ihrem größeren Radius in Fließrichtung angeordnet waren. Die Breite der Porenkörper betrug $60\ \mu\text{m}$ und die Öffnung der Porenhälsa betrug $30\ \mu\text{m}$, die Porosität ϵ der Struktur war $0,26$ (Abbildung 3.1). Die Mikromodelle wurden mit einem Borosilikat-Deckglas ($d = 550\ \mu\text{m}$) versehen, welches mit Hilfe von anodischem Bonden permanent an dem Mikromodell befestigt wurde.

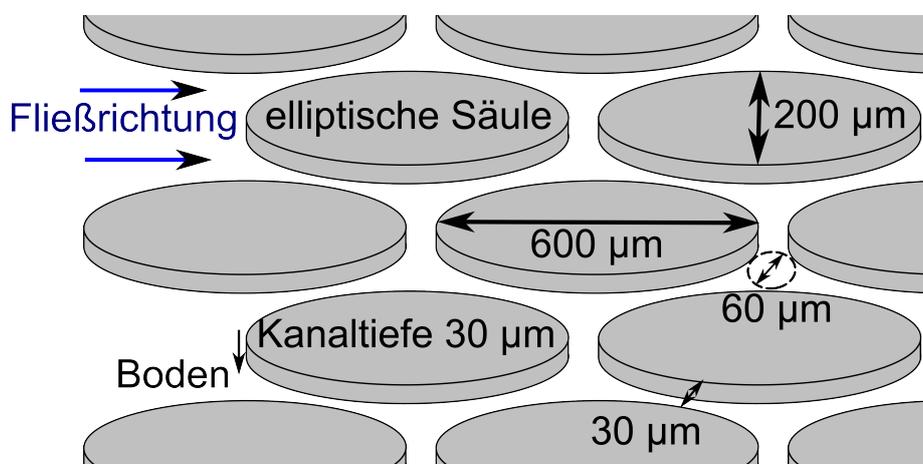


Abbildung 3.1: Skizze: Struktur des Mikromodells.

Im Folgenden wurden diese auf einem Edelstahlträger befestigt, in welchen Löcher, Kanäle und Anschlüsse für die Verbindung mit mikrofluidischen Kapillaren aus PTFE (Innendurchmesser $0,8$ und $0,5\ \text{mm}$) eingearbeitet waren. Auf diese Weise konnten Flüssigkeiten oder Gase hindurch geleitet werden. Dazu wurde das System mit einer Spritzenpumpe (PicoPlus, Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA, USA) verbunden, wobei die Fließraten in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen angegeben sind. Um während eines laufenden Versuches unterschiedliche Flüssigkeiten oder Gasblasen zu injizieren, wurden Sechsweg-Ventile

3.2 Mikromodell-Versuche

(Upchurch Scientific, Oak Harbor, Washington, USA) oder Dreiwege-Ventile (Liquid-Scan GmbH & Co.KG, Überlingen, Deutschland) benutzt.

Der gesamte Fertigungsprozess ist darüber hinaus bei Baumann et al. (40) und Chomsurin et al. (42) beschrieben.

3.2.2 Sammlung des Bild- und Videomaterials

Die Bildserien während den Mikromodell-Versuchen wurden entweder mit einer Nikon D70 Spiegelreflex-Kamera (Nikon, Chiyoda, Japan) oder mit einer EHD Kam-Pro 03HD CCD-Kamera (schwarz/weiß, digital, EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland) aufgenommen. Die Steuerung der Kameras wurde über einen Computer mit Linux-Betriebssystem vorgenommen.

Die Kameras waren auf einem BX 60 Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Shinjuku, Japan) angebracht, welches über ein $4x$ ($NA = 0,13$), ein $10x$ ($NA = 0,30$), ein $20x$ ($NA = 0,50$) und ein $40x$ ($NA = 0,75$) Objektiv verfügte. Weiter war es mit den folgenden optischen Fluoreszenz-Filterwürfeln ausgestattet: „Texas Red“ (Anregungsfilter: HQ 560/55x, Emissionsfilter: HQ 645/75m, dichroischer Spiegel: Q 595 LP), „41017-Endow GFP Bandpass Emission“ (Anregungsfilter: HQ 470/40x, Emissionsfilter: HQ 525/50m, dichroischer Spiegel: Q 495 LP) und einem „Custom built Filter“ (Anregungsfilter: ET 460/40x, Emissionsfilter: HQ 510/LP, dichroischer Spiegel: T 495 LP) sowie einem Hellfeld-Filterwürfel. In Tabelle 3.3 sind die resultierende Auflösung und der Sichtbereich (engl.: *field of view*, FOV) der Objektive angegeben. Der Sichtbereich der Spiegelreflex-Kamera war dabei ein kreisförmiger Ausschnitt (Durchmesser 2200 Pixel) des Gesamtbildes (3008×2000 Pixel), der Sichtbereich der digitalen Videokamera war rechteckig (640×480 Pixel).

Tabelle 3.3: Resultierende Auflösung und Sichtbereich des Olympus BX 60 Fluoreszenzmikroskop-Systems. Die resultierende Auflösung ergibt sich durch das Rayleigh-Kriterium.

Objektive: Vergrößerung/ Numerische Apertur	resultierende Auflösung Nikon D70	Durchmesser d Sichtbereichs Nikon D70	resultierende Auflösung Videokamera	Abmessungen Sichtbereich Videokamera
$4x / 0,13$ NA	$3,66 \mu\text{m}$	$4230 \mu\text{m}$	$5,26 \mu\text{m}$	$3368 \times 2526 \mu\text{m}$
$10x / 0,30$ NA	$1,59 \mu\text{m}$	$1692 \mu\text{m}$	$2,14 \mu\text{m}$	$1370 \times 1027 \mu\text{m}$
$20x / 0,50$ NA	$0,95 \mu\text{m}$	$846 \mu\text{m}$	$1,07 \mu\text{m}$	$687 \times 515 \mu\text{m}$
$40x / 0,75$ NA	$0,63 \mu\text{m}$	$423 \mu\text{m}$	$0,63 \mu\text{m}$	$342 \times 257 \mu\text{m}$

3.2.3 Versuchsdurchführung: Kultivierung von *Paracoccus denitrificans* in einem Mikromodell

Das Bakterium *Paracoccus denitrificans* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Werner Manz (Universität Koblenz-Landau) in Form von tiefgefrorenen Kulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Glycerol zur Verfügung gestellt. Um eine Bakterien Suspension herzustellen, wurden 1 mL tiefgefrorenes Substrat in 50 mL steriles Flüssig-Nährmedium (*Nutrient Bouillon*) mit folgender Zusammensetzung pipettiert:

- Pepton: 5 g/L
- Fleischextrakt: 3 g/L

Dieses wurde anschließend über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Parallel dazu wurde ein Mikromodell (elliptische Struktur, 2 Zulaufkanäle, 1 Ablaufkanal) zusammen mit allen angeschlossenen mikrofluidischen Kapillaren und Ventilen autoklaviert. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass das ganze System steril war, bevor es mit Bakterien beimpft wurde. Eine Spritze mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung wurde mit dem einen Zulaufkanal, und eine Spritze mit 1:2 verdünnter Bakterien-Suspension wurde mit dem anderen Zulaufkanal verbunden. Auf diese Weise wurde das Mikromodell lediglich einseitig mit *Paracoccus denitrificans* beimpft.

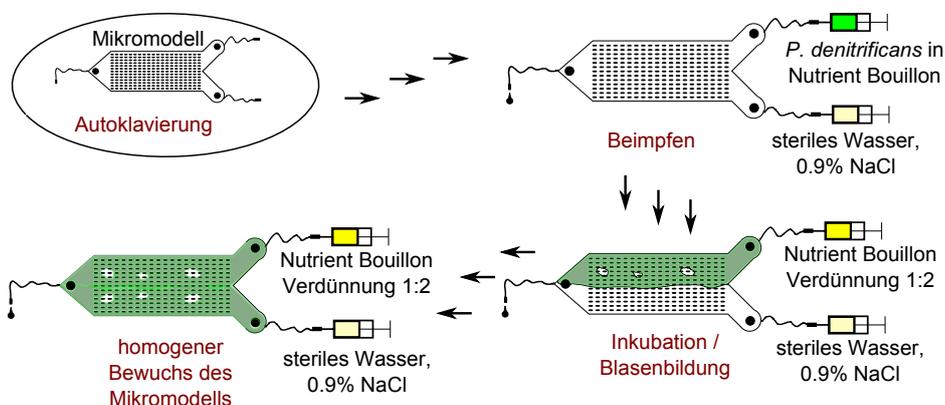


Abbildung 3.2: Biofilm von *Paracoccus denitrificans* in einem Mikromodell. Das Mikromodell mit allen Anschlüssen und Kapillaren wurde autoklaviert. Anschließend wurde mit einer Bakterien-Suspension beimpft und bei Versorgung mit Nährlösung inkubiert.

Nach dem Beimpfen wurde die Bakterien-Suspension durch ein 1:2 verdünntes Nährmedium (*Nutrient Bouillon*) ersetzt und das Mikromodell bei einer Fließrate von $5\text{ }\mu\text{L/h}$ pro Kanal, bei einer Temperatur von $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, inkubiert. Diese Fließrate entsprach dabei einer Filtergeschwindigkeit von $0,80\text{ m/d}$.

3.3 Bildbearbeitung zur Messung des Volumens, der gesamten und der aktiven Grenzfläche von Gasblasen mit dem Programm Octave

Nach 4 Tagen war noch kein Wachstum der Bakterien sichtbar und die Fließrate wurde auf $3 \mu\text{L/h}$ pro Kanal gesenkt (Filtergeschwindigkeit = $0,48 \text{ m/d}$). Nach weiteren 10 Tagen war ein Biofilm erkennbar und es hatte eine Produktion von Gas eingesetzt. Durch die Blasenbildung wurde das Flussfeld über das gesamte Mikromodell jedoch dynamisch verändert, wodurch sich die eingebrachten Lösungen vermischen konnten. Ebenfalls gelangten so Bakterien auf die andere, bis dahin noch nicht bewachsene Seite des Mikromodells, sodass dieses nun gänzlich mit Bakterien bewachsen war. Die Geschwindigkeit der Gasproduktion wurde zu diesem Zeitpunkt mit Hilfe von Bildbearbeitung ermittelt.

3.3 Bildbearbeitung zur Messung des Volumens, der gesamten und der aktiven Grenzfläche von Gasblasen mit dem Programm Octave

Das Bild- und Videomaterial, welches während den Versuchen mit Bakterien in einem Mikromodell gesammelt wurde, bestand unter anderem aus Bildern von sich vergrößernden Gasblasen, aufgrund von einer Gasproduktion durch Bakterien. Hierbei musste das Volumen der Blasen, die Länge der Blasengrenzflächen und die Grenzflächen, welche nur im Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit und nicht im Kontakt mit der Matrix standen (aktive Grenzflächen) gemessen werden. Dazu wurden die Bilder mit dem Programm „Octave“ (173) und einem in der zugehörigen Skriptsprache selbst verfassten Algorithmus ausgewertet. Zu diesem Zweck wurde eine Sammlung von Einzelfunktionen zur Bearbeitung von Bildern (engl.: *image processing toolbox*, „*octave forge image package*“) teilweise eingebunden (174).

Arbeitsweise des Algorithmus:

Das Volumen und die (aktive) Grenzfläche von Gasblasen im mikrofluidischen System wurde aus den Bilddaten durch Segmentierung und Quantifizierung nach folgendem Schema gewonnen (siehe Abbildung 3.4):

1. Das Rohbild wurde mit einem manuell festgelegten Schwellwert in ein Binärbild konvertiert (Funktion: „*built-in-Operator: <*“, Abbildung 3.4b).
2. Die Blase wurde mittels flood-filling (Funktion: *bwfill.m*, (174)) aufgefüllt (Abbildung 3.4c). Hierbei musste der Ursprung der Pixelausbreitung zu Beginn im Blaseninneren anfänglich einmal manuell definiert werden.
3. Die übrig gebliebenen Strukturelemente des Bildes wurden durch Subtraktion des vorangegangenen Bildes entfernt (Abbildung 3.4d).

3.3 Bildbearbeitung zur Messung des Volumens, der gesamten und der aktiven Grenzfläche von Gasblasen mit dem Programm Octave

4. Die Artefakte in der Blase wurden entfernt (Funktion: *bwmorph.m*, Option: *majority*, (174), Abbildung 3.4e).
5. Die Anzahl der Pixel in der Blase wurden ermittelt (Funktion: *find.m*, built-in (173)). Sie ist, entsprechend der Bildauflösung, proportional zu ihrem Volumen.
6. Die inneren Pixel der Blase wurden entfernt (Funktion: *bwmorph.m*, Option: *remove*, (174), Abbildung 3.4g). Dadurch wurde die gesamte Grenzfläche der Blase erhalten.
7. Die Länge der Grenzfläche wurde ermittelt. Die dabei verwendete Funktion zum Auffinden der Pixel (Funktion: *bwboundaries.m*, (174)) lieferte jedoch nur deren Koordinaten. Da die Distanz zwischen kantenverknüpften Pixeln eine Längeneinheit, die zwischen eckenverknüpften Pixeln hingegen $\sqrt{2}$ Längeneinheiten beträgt, war es zwingend nötig zwischen beiden Formen zu unterscheiden (Abbildung 3.3). Dies wurde durch die Subtraktion und entsprechende Auswertung der Koordinaten bewerkstelligt.

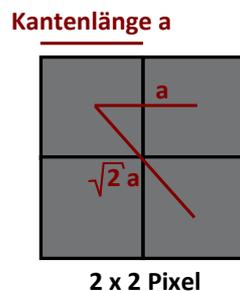


Abbildung 3.3: Distanz zwischen kanten- und eckenverknüpften Pixeln.

8. Ein auf die gleiche Weise manuell bearbeitetes Binärbild der leeren Mikromodell-Struktur wurde von dem Grenzflächenbild subtrahiert. Dadurch konnte die aktive Grenzfläche mit Kontakt zum umgebenden Medium erhalten werden (Abbildung 3.4i).
9. Die Länge der Fragmente der so erhaltenen aktiven Grenzfläche erfolgte ebenfalls wieder durch die Auswertung der Pixelkoordinaten (vgl. Punkt 7).

Der Algorithmus verfügt zusätzlich über Kontrollmechanismen, welche es dem Nutzer erlauben Fehler zu erkennen und die Ergebnisse händisch zu überprüfen.

3.3 Bildbearbeitung zur Messung des Volumens, der gesamten und der aktiven Grenzfläche von Gasblasen mit dem Programm Octave

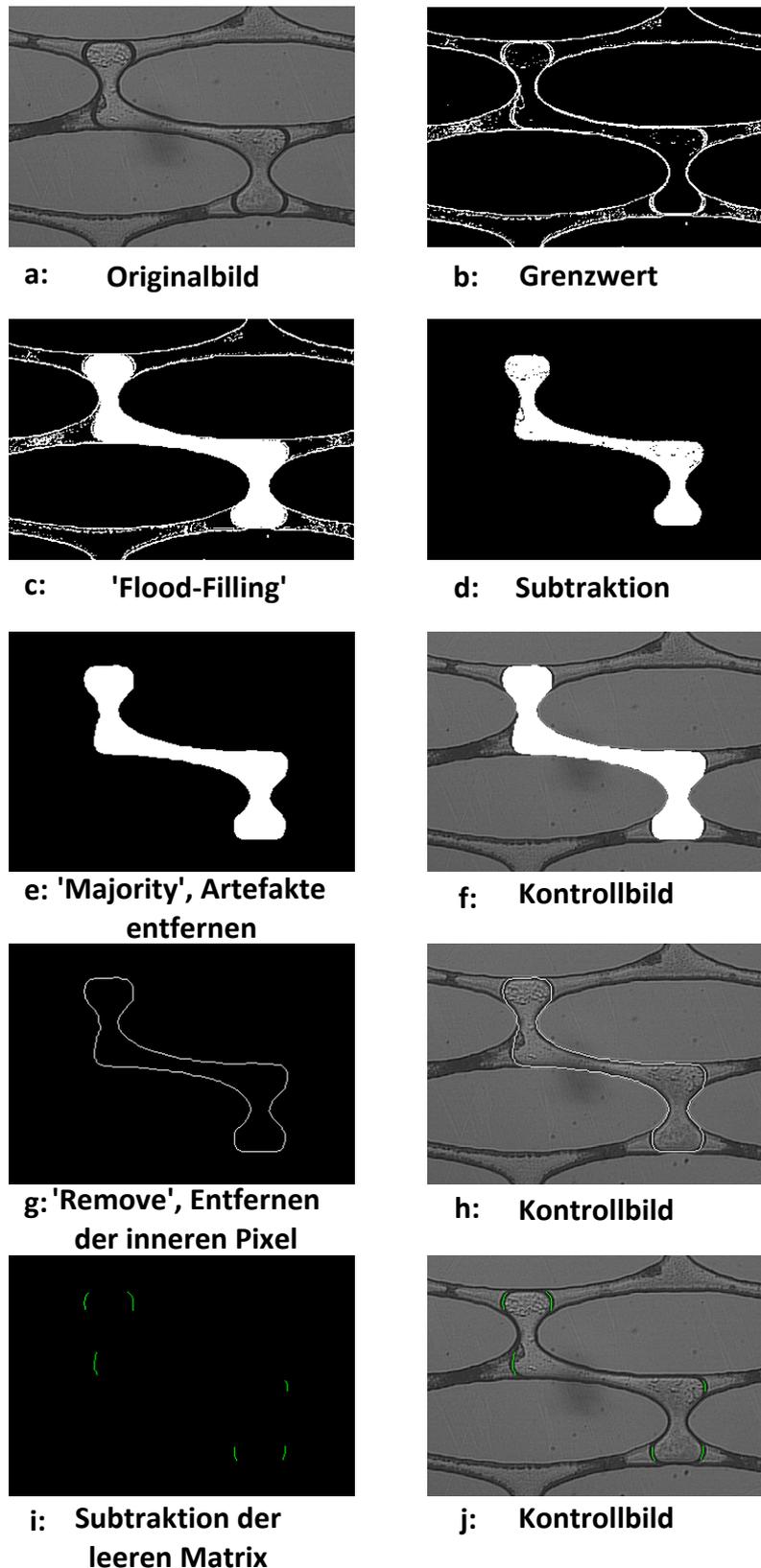


Abbildung 3.4: Bildbearbeitung mit Octave zur Quantifizierung des Volumens, der gesamten Grenzfläche und der aktiven Grenzfläche (in Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit, grün dargestellt) von wachsenden oder schrumpfenden Mikrogasblasen.

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Da SERS bislang noch nicht für quantitative Analysen von chemischen Konzentrationsgradienten in Lösung eingesetzt wurde, mussten vorab noch unbeantwortete experimentelle Fragen bearbeitet werden. Dazu musste die Beziehung zwischen der Analyt-Konzentration und der Signalintensität der SERS-Spektren systematisch untersucht werden. Weiter war es nötig, die Wechselwirkungen des Analyten mit den Nanopartikeln (Agglomeration) und das Verhalten der Nanopartikel selbst (Stabilität und Agglomerationsgeschwindigkeit) zu untersuchen. Experimentell bedingt sollte ein n-Octanoltröpfchen mit dem darin gelösten Analyten (z.B. CV) als Schadstoffquelle dienen, weshalb mit einer Beschichtung der Nanopartikel-Agglomerate mit n-Octanol gerechnet werden musste. Die veränderten Eigenschaften durch eine derartige Beschichtung mussten jedoch vor Versuchsdurchführung bekannt sein, um die Ergebnisse richtig deuten zu können. Begleitend zu den SERS-Messungen wurden die Nanopartikel-Agglomerate ebenfalls mit UV/VIS-Spektroskopie untersucht.

3.4.1 Raman-System LabRAM HR (Firma Horiba Scientific)

Alle Raman- und SERS-Messungen wurden mit einem Horiba LabRAM HR Raman-Mikroskop System (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) mit einer Anregungswellenlänge λ_0 von 633 nm (He-Ne Laser, 35 mW Anfangsintensität, ca. 14 mW an der Probe) durchgeführt. Zu Beginn jeder Messreihe an einem Tag wurde eine Kalibration mit der Silizium-Gitterschwingung bei $520,7 \text{ cm}^{-1}$ an einem Siliziumwafer und einer Korrektur des Nullpunktes des geblazten Gitters (Liniendichte 600 Linien/mm) vorgenommen. Das SERS-Signal wurde entweder mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (NA = 0,5, Olympus), oder einem 10x Objektiv (NA = 0,25, Olympus) aufgenommen, wobei eine konfokale Blende mit einem Lochdurchmesser von $500 \mu\text{m}$ verwendet wurde. Bei quantitativen SERS-Messungen befand sich der Fokus des Laserstrahls, unabhängig vom sonstigen experimentellen Aufbau, stets voll in der Lösung und nicht an einer Oberfläche. In Tabelle 2.3 (Seite 55, Kapitel 2.7.4) sind die theoretischen Werte für die Länge und den Durchmesser des Fokus des Laserstrahls analog Everal et al. (141) aufgeführt, sowie das Volumen des resultierenden Rotationsellipsoids angegeben.

3.4.2 Synthese und Modifikation von Silber-Nanopartikeln (AgNPs) für quantitative SERS-Messungen

Synthese der Silber-Nanopartikel (AgNPs):

Die Silber-Nanopartikel, welche als Substrat für die quantitativen SERS-Messungen dienten, wurden analog zu Knauer et al. (140), nach einer modifizierten Methode von Leopold und Lendl (114), synthetisiert. Es wurden 100 mL einer wässrigen Lösung, welche 11,6 mg (0,17 mmol) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ und 3,3 mL einer 0,1 M NaOH Lösung enthielt, hergestellt und 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 9 Zentrifugenröhrchen

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

mit jeweils 9 mL dieser Lösung befüllt. Parallel dazu wurden 17 mg (0,1 mmol) AgNO_3 in 10 mL Milli-Q Wasser gelöst und je 1 mL dieser Lösung rasch zu den 9 mL der basischen $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ Lösung pipettiert. Diese änderte darauf augenblicklich ihre Farbe von farblos nach orange-grün. Durch sofortiges Schütteln der Zentrifugenröhrchen nach der Zugabe der AgNO_3 -Lösung, konnte eine gute Durchmischung gewährleistet werden. Nach Vereinigung von 6 dieser Zentrifugenröhrchen zu einem „Ansatz“ (60 mL), erfolgte eine Charakterisierung mittels UV/VIS-Spektroskopie.

Präagglomeration der AgNPs:

Da die Stabilität der unbehandelten Nanopartikel jedoch für Langzeitmessungen bei Anwesenheit von CV nicht ausreichend war, wurde ein kontrollierter Agglomerationschritt (Präagglomeration) durch die Zugabe von NaCl durchgeführt. Als zusätzlicher Effekt sollte dies die SERS-Aktivität erhöhen, da bekannt ist, dass durch Agglomeration von Nanopartikel bei der Anwesenheit von Salz zusätzliche *hot spots* generiert werden.

Die AgNP-Suspension wurde für eine kontrollierte Präagglomeration auf eine endgültige NaCl-Konzentration von 0,015 mol/L eingestellt. Dazu wurden 915 μL einer 1 molaren NaCl-Lösung zu den 60 mL AgNP-Suspension zugegeben. Diese färbte sich dadurch augenblicklich metallisch grau. Die Suspension wurde alle 30 Sekunden geschüttelt und nach genau 5 Minuten mit 120 mL gefiltertem Milli-Q Wasser verdünnt, um so eine weitere Agglomeration zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung mittels UV/VIS-Spektroskopie. Das Milli-Q Wasser für die Synthese von Silber-Nanopartikeln, die Präagglomeration der Silber-Nanopartikel-Suspensionen und alle Verdünnungsschritte, wurde vor Gebrauch mit einem sterilen PES-Spritzenfilter (Porengröße 0,2 μm , $d = 15$ mm) gefiltert.

3.4.3 Messung von Kalibrierkurven und chemischen Gradienten mit quantitativem SERS in Lösung

Um die Konzentration eines Analyten in wässriger Lösung mit SERS bestimmen zu können, wurden sowohl für CV als auch für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure Kalibrierkurven erstellt. Bei den Messungen fanden zwei verschiedene Messanordnungen Verwendung (Abbildungen 3.5 und 3.6). Auf diesen Messungen aufbauend wurden später Konzentrationsgradienten von CV mit SERS in Lösung erfolgreich gemessen.

Quantitative SERS-Messungen in Objektträgern mit Vertiefungen:

Hierbei dienten Glasobjektträger mit einer Vertiefungen als Messanordnung, wie sie in Abbildung 3.5 dargestellt sind (Tiefe ≈ 600 μm , Durchmesser ≈ 16 mm, Volumen ≈ 80 μL).

Eine wässrige CV-Lösung wurde in einem Eppendorfgesäß mit einer präagglomerierten AgNP-Suspension vermischt und anschließend in die Vertiefung des Objektträgers pipettiert. Bei jeder Messung kam ein neuer Objektträger zum Einsatz. Ein Volumenverhältnis von neun Teilen präagglomerierter AgNP-Suspension zu einem Teil CV-Lösung (Volumenverhältnis

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

9:1) war bei allen Versuchen gleich. Anschließend wurde die Vertiefung mit einem Deckglas abgedeckt (Länge = 22×22 mm, Dicke = $175 \mu\text{m}$) und die SERS-Spektren mit einem $20\times$ Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen. Der Fokus des Laserstrahls befand sich dabei $125 \mu\text{m}$ innerhalb der Suspension.

Kalibrierkurven:

Für die Erstellung von Kalibrierkurven mit SERS wurden jeweils 3 Messungen für jede Analyt-Konzentration der Kurve, wie oben beschrieben, vorgenommen. Dabei wurde jede Konzentration für jede Messung stets neu pipettiert. Dies wurde so lange wiederholt, bis der gesamte untersuchte Konzentrationsbereich abgedeckt war. Anschließend wurden die Intensitäten der SERS-Banden (bei CV: 1175 cm^{-1}), wie später in Kapitel 3.5 beschrieben, durch eine Computerauswertung ermittelt, und so eine Kalibrierkurve erhalten. Insgesamt wurde dabei für CV der Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ und $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ durch mehrere Kalibrierkurven abgedeckt. Die Laserleistung betrug dabei zwischen 100 % (14 mW) und 10 % (1,4 mW) und ist bei der Diskussion der Ergebnisse angegeben.

Weiter wurden zwei Kalibrierkurven von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure im Konzentrationsbereich zwischen $8,40 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und $8,40 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ erstellt. Das Vorgehen war dabei dasselbe, wie bei der Erstellung der Kalibrierkurven für CV. Die Messungen wurden mit einer Akquisitionszeit 10×1 Sekunde vorgenommen und jede Konzentration wurde mit 3×20 Wiederholungen erfasst (insgesamt 600 Sekunden Messzeit pro Konzentration).

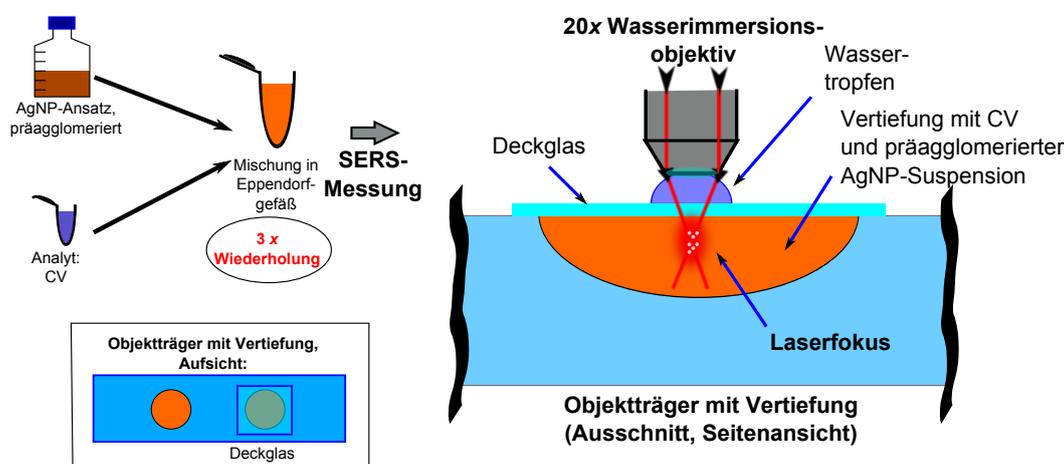


Abbildung 3.5: Schema zur Erstellung von Kalibrierkurven in Objektträgern mit Vertiefungen. Die präagglomerierten Nanopartikel wurden mit dem Analyten in einem Eppendorfgefäß gemischt. Anschließend wurde diese Mischung in die Vertiefung eines Glasobjektträgers überführt und vermessen. Der Fokus des Raman-Lasers befand sich in der Lösung, nicht auf einer Oberfläche.

Quantitative SERS-Messungen in einem Gefäß aus PTFE:

Hierbei diente eine in PTFE gefräste Struktur, wie sie später ebenfalls für die Gradientenmessungen verwendet wurde, als Messanordnung (siehe Abbildung 3.6). Sie wurde in

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

der Feinmechanik-Werkstatt des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München von Sebastian Wiesemann und Roland Hoppe gefertigt und bestand aus einer größeren, rechteckigen Vertiefung (10 mm × 10 mm, Tiefe: 2 mm), welche über einen Kanal (500 μm × 500 μm, Länge: 5 mm) mit einer kleineren, zylinderförmigen Vertiefung (Radius: 3 mm, Tiefe: 2 mm) verbunden war.

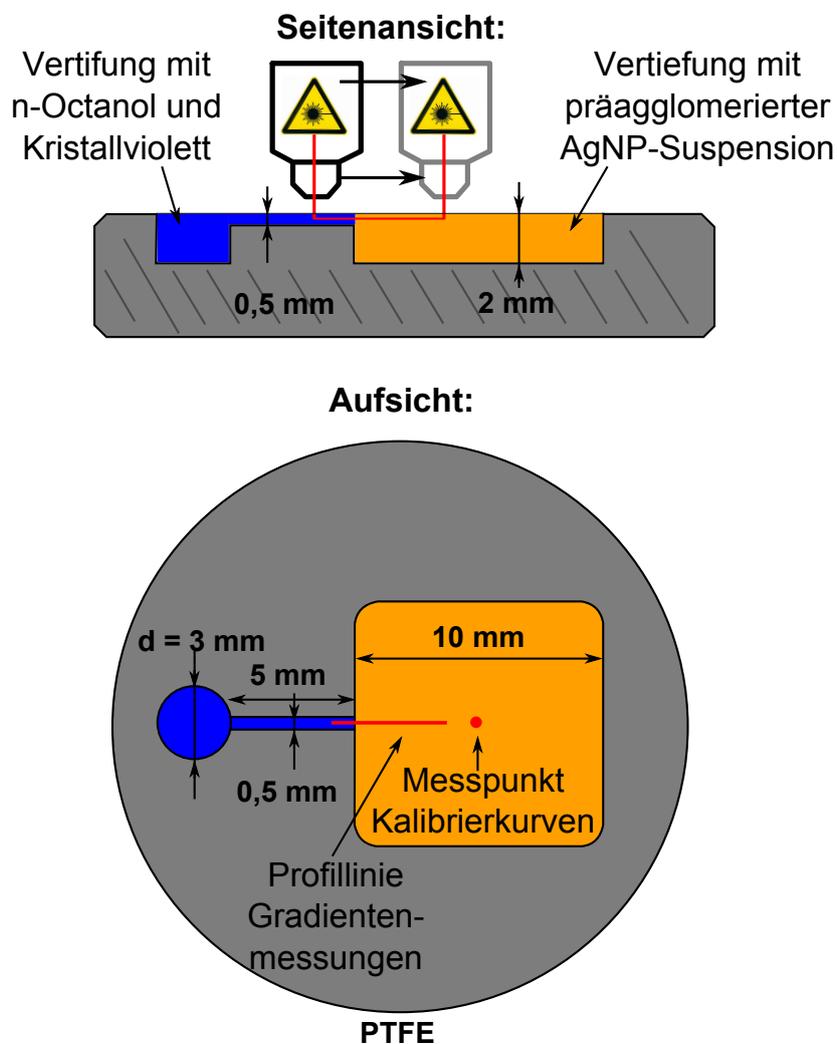


Abbildung 3.6: Quantitative SERS-Messungen in einem PTFE-Gefäß. In der zylinderförmigen Vertiefung befand sich wahlweise n-Octanol mit einer definierten CV-Konzentration (nur bei Gradientenmessungen). Dieses floss durch den Kanal zur quaderförmigen Vertiefung mit der präagglomerierten AgNP-Suspension. Kontinuierliche Profile, bestehend auch Einzelmessungen, zeichneten dabei die Änderung der Konzentration auf.

Kalibrierkurven:

Um die SERS-Signalintensität bei Gradientenmessungen einer CV-Konzentration zuordnen zu können, wurden zeitnah zu diesen ebenfalls Kalibrierkurven erstellt. Dies geschah in demselben PTFE-Gefäß. Damit konnte sicher gestellt werden, dass die Signalintensität

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

ten der Kalibrierkurven und der Gradientenmessungen aufgrund der Verwendung desselben experimentellen Aufbaus und desselben AgNP-Ansatzes direkt miteinander vergleichbar waren. Die Messanordnung wurde nach jeder Einzelmessung gründlich mit Ethanol und Wasser gereinigt. Ebenfalls wurden in regelmäßigen Abständen auch Messungen an der präagglomerierten AgNP-Suspension ohne CV durchgeführt, um eine Verunreinigung mit dem Analyten, und so eine Verfälschung der Kalibrierkurven, ausschließen zu können.

Zu der Erstellung von Kalibrierkurven wurde lediglich in der großen, quaderförmigen Vertiefung gemessen (vgl. Abbildung 3.6). In diese wurde zuerst die präagglomerierten AgNP-Suspension pipettiert und gleich darauf die wässrige CV-Lösung. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen verblieb diese Mischung in der Vertiefung und floss nicht über den angrenzenden Kanal ab. Ein Volumenverhältnis von neun Teilen präagglomerierte AgNP-Suspension zu einem Teil CV-Lösung (Volumenverhältnis 9:1) war bei allen Versuchen stets gleich. Die Messungen wurden sowohl mit, als auch ohne einer n-Octanolbeschichtung der AgNP-Agglomerate durchgeführt.

Für den Fall der Durchführung mit n-Octanolbeschichtung, wurden sowohl die verwendeten CV-Lösungen, als auch die präagglomerierte AgNP-Suspension vor den Messungen mit n-Octanol gesättigt. Dazu wurden 20 mL der präagglomerierten AgNP-Suspension mit 20 mL n-Octanol in einem Überkopfschüttler über Nacht geschüttelt, und die Phasen anschließend getrennt. Alle SERS-Spektren wurden in dieser Anordnung mit einem 10x Objektiv aufgenommen. Der Fokus des Raman-Lasers befand sich bei den Einzelmessungen der Kalibrierkurven jeweils in der Mitte der quaderförmigen Vertiefung und 250 μm innerhalb der Suspension. Der gesamte Messvorgang wurde jeweils 3 mal für jede CV-Konzentration so lange wiederholt, bis der gesamte untersuchte Konzentrationsbereich abgedeckt war. Anschließend konnten, durch Auftragen der Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} gegen die Konzentration, Kalibrierkurven erhalten werden. Insgesamt wurde dabei der Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-9}$ M und $5 \cdot 10^{-7}$ M abgedeckt.

Gradientenmessungen:

Für die Messung von chemischen Konzentrationsgradienten wurde zuerst die quaderförmige Vertiefung ganz mit einer präagglomerierten AgNP-Suspension befüllt. Aufgrund der Benetzungseigenschaften von PTFE und der Oberflächenspannung blieb die wässrige AgNP-Suspension in dieser Vertiefung und floss nicht durch den Kanal in die zylinderförmige Vertiefung. Parallel dazu wurde CV in reinem n-Octanol gelöst ($c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-6}$ M). Als diese Lösung nun in die zylinderförmige Vertiefung pipettiert wurde (15 μL), floss sie aufgrund der Benetzungseigenschaften von PTFE selbstständig durch den Kanal zur rechteckigen Vertiefung mit der präagglomerierten AgNP Suspension. Dort formte sich dann eine Phasengrenz-

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

fläche zwischen n-Octanol und Wasser, durch welche das CV nun in die präagglomerierte AgNP-Suspension hinein diffundieren konnte.

Kurz nach dem Kontakt der zwei Phasen wurden aufeinander folgende Raman-Profilmessungen gestartet. Diese, aus Einzelmessungen bestehenden Messlinien, hatten ihren Ursprung in der n-Octanolphase und führten von dort über die Phasengrenze in die AgNP-Suspension (Abbildung 3.6, rote Linie). Die Spektren wurden dabei stets mit einem $10x$ Objektiv und 100 % Laserleistung aufgenommen. Der Fokus des Raman-Lasers lag $250 \mu\text{m}$ tief innerhalb der Lösung, die Akquisitionszeit eines Einzelspektrums betrug $0,1 \text{ s}$. Auf diese Weise konnte die Änderung der CV-SERS-Signalintensität örtlich und zeitlich verfolgt werden. Dabei wurde die Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} als Maß für die CV-Konzentration verwendet. Die Einzelspektren der Profilmessungen wurden also auf die gleiche Weise, wie die Spektren in den Versuchen zu den Kalibrierkurven ausgewertet. Damit ergaben sich Intensitäten der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} , welche einer Distanz x und einem Zeitpunkt t zugeordnet werden konnten. Die Gradientenmessungen wurden sowohl mit, als auch ohne vorheriger Sättigung der Phasen (n-Octanol mit Wasser und umgekehrt) vorgenommen.

3.4.4 Bestimmung der Stabilität der präagglomerierten AgNP-Suspension

In den Versuchen zu den Kalibrierkurven zeigte sich eine erneut einsetzende Agglomeration der bereits präagglomerierten AgNP-Suspension bei hohen Kristallviolett-Konzentrationen. Der Agglomerationsgrad der Nanopartikel hat jedoch einen starken Einfluss auf die SERS-Signalintensität. Deshalb wurden im Hinblick auf die CV-Konzentration sowohl Versuche unternommen, die Stabilität der AgNP-Suspension zu untersuchen, also auch die Geschwindigkeit der Agglomerationsreaktion abzuschätzen.

Stabilität der präagglomerierten AgNP-Suspension

Die präagglomerierte AgNP-Suspension wurde hinsichtlich ihrer Stabilität und Haltbarkeit untersucht. Dazu wurde eine geringe CV-Konzentration von $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ zweimal pro Tag an 4 aufeinander folgenden Tagen vermessen. Bei dieser CV-Konzentration konnte davon ausgegangen werden, dass keine Agglomeration durch CV hervorgerufen wurde. Die SERS-Signalintensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} wurde anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Der gesamte Vorgang wurde schließlich mit einem neu synthetisierten und präagglomerierten AgNP-Ansatz wiederholt (Abbildung 4.27).

Stabilitätsbereich bei hohen CV-Konzentrationen

In einem Eppendorfgefäß wurden $450 \mu\text{L}$ einer präagglomerierten und mit n-Octanol gesättigten AgNP-Suspension mit $50 \mu\text{L}$ wässriger, aber ebenfalls mit n-Octanol gesättigter CV-Lösung vermischt. Unmittelbar danach wurden $200 \mu\text{L}$ davon in die Vertiefung des PTFE-Gefäßes aus Abbildung 3.6 pipettiert und vermessen. Die Laserleistung musste bei hohen

3.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

CV- Konzentrationen entsprechend angepasst werden, da sonst bei der CCD-Kamera des Raman-Gerätes eine Sättigung eintrat (ab 65.000 *counts/second*). Die Aufnahmen wurden mit 100 % Laserleistung für geringe Konzentrationen begonnen. Bei den CV-Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-7}$ M und $7 \cdot 10^{-7}$ M musste die Laserleistung auf 10 % verringert werden und auf 1 % bei einer CV-Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M. Die Zeitspanne zwischen dem Mischen der AgNP-Suspension mit dem CV und der Aufnahme der SERS-Spektren war dabei stets konstant (120 Sekunden). Die verbliebenen 300 μ L der AgNP-CV-Mischungen wurden in den Eppendorfgefäßen bei + 7 °C über Nacht aufbewahrt und am nächsten Tag noch einmal gemessen.

Auf diese Weise konnten zwei Kalibrierkurven aus denselben Proben, jedoch mit einem zeitlichen Abstand der Messungen von ca. 18 Stunden erstellt werden (Abbildung 4.54).

Abnahme­geschwindigkeit der Signalintensität bei hohen CV-Konzentrationen

Es wurde ebenfalls die Abnahme­geschwindigkeit des SERS-Signals untersucht, welche durch die Agglomeration bei hohen CV-Konzentrationen verursacht wurde. Dabei wurde die SERS-Intensität ein und derselben Probe über längere Zeit verfolgt. Für diese Messungen wurden Glasobjektträger mit Vertiefungen und eine Laserleistung von 10 % verwendet (20x Wasserimmersionsobjektiv, siehe Abbildung 3.5). Für die Konzentrationen $c(\text{CV}) = 7 \cdot 10^{-7}$ M, $c(\text{CV}) = 3 \cdot 10^{-6}$ M und $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-5}$ M wurden 20 Minuten lang SERS-Spektren ein und derselben Probe aufgenommen und für die Konzentration $c(\text{CV}) = 3 \cdot 10^{-7}$ M 45 Minuten lang (Akquisitionszeit jeweils 0,1 s pro Einzelspektrum, ca. 5200 Spektren pro CV-Konzentration). Anschließend wurde die Intensität der Spektren gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.38).

Vergleichsversuch: Abnahme der Signalintensität mit und ohne n-Octanolbeschichtung

Darüber hinaus wurde der Einfluss von n-Octanol auf die Agglomeration und die damit verbundene Abnahme der SERS-Signalintensität verglichen. Das Mischen der Analytlösung (CV) und der präagglomerierten AgNP-Suspension geschah dabei in dem PTFE-Gefäß aus Abbildung 3.6 während es sich bereits unter dem Objektiv des Raman-Mikroskops befand. Dadurch konnte die Zeitspanne zwischen dem Mischvorgang und dem Aufnehmen der SERS-Spektren gering gehalten werden (ca. 10 Sekunden). Es wurde die CV-Konzentration $7 \cdot 10^{-7}$ M mit n-Octanolsättigung und ohne n-Octanolsättigung der Komponenten untersucht. Es wurden jeweils 18 Minuten lang SERS-Spektren aufgenommen (Akquisitionszeit jeweils 0,1 s pro Einzelspektrum, jeweils ca. 4500 Spektren) und anschließend die SERS-Signalintensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} gegen die Zeit aufgetragen (Abbildungen 4.52 und 4.53).

3.4.5 Anreicherung von CV in der n-Octanolbeschichtung von Nanopartikel-Agglomeraten

Es wurden zwei Versuchsreihen zur SERS-Signalintensität von CV bei unterschiedlichen n-Octanolkonzentrationen unternommen, um den Einfluss einer Beschichtung der Nanopartikel-Agglomerate mit n-Octanol zu beleuchten. Bei der ersten Versuchsreihe war kein n-Octanol anwesend (Negativkontrolle), bei der Zweiten war n-Octanol in unterschiedlichen Konzentrationen unterhalb der maximalen Löslichkeit mit im Messsystem. Die absolute CV-Konzentration, die AgNP-Konzentration und das Gesamtvolumen jeder Probe war in beiden Versuchsreihen stets gleich. Das Augenmerk galt daher vielmehr dem Verhalten bei der Reihenfolge der Verdünnung (CV-Lösung auf Nanopartikel-Suspension oder Nanopartikel-Suspension auf CV-Lösung) und dem Verhalten bei unterschiedlichen n-Octanolkonzentrationen.

In jeder Messung wurden 360 μL einer präagglomerierten AgNP-Suspension und 40 μL einer CV-Lösung ($c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) jeweils separat mit Wasser verdünnt (0 μL und 400 μL , 100 μL und 300 μL , 200 μL und 200 μL , 300 μL und 100 μL , 400 μL und 0 μL). Erst nach diesen Verdünnungsschritten wurden die Lösungen vereinigt und die SERS-Signalintensität in einem PTFE-Gefäß untersucht. Das Gesamtvolumen der Proben betrug demnach immer 800 μL .

Das Wasser zum Verdünnen der präagglomerierten AgNP-Suspension war in der ersten Versuchsreihe reines Milli-Q Wasser, jedoch in der zweiten Versuchsreihe Milli-Q Wasser, welches vorher mit n-Octanol gesättigt wurde. Das Wasser zum Verdünnen der CV-Lösungen war in beiden Fällen reines Milli-Q Wasser ohne n-Octanol. Auf diese Weise war die n-Octanolkonzentration in den vereinigten Proben unterschiedlich.

Zur Auswertung der Messungen wurde die SERS-Signalintensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} gegen den mit n-Octanol gesättigten Wasseranteil aufgetragen (Abbildung 4.51).

3.5 Automatisierte Quantifizierung von SERS-Spektren mit der Programmiersprache R

Die SERS-Spektren mussten mit einer Computersoftware ausgewertet werden. Diese separate Computerauswertung, im Gegensatz zu einer sonst oft üblichen händischen Auswertung durch die mitgelieferte Software des Raman-Gerätes, war nötig wegen der großen Zahl an Spektren (typischerweise 7000 bis 30.000 Einzelspektren pro Versuch).

Die Auswertung der SERS-Rohspektren wurde mit der Programmiersprache „R“ für statistisches Rechnen vorgenommen (175). Dabei wurde die Funktion „SpektrumSearch.R“ aus der Funktionssammlung „Peaks“ (176) zum Annähern und Auswerten der SERS-Spektren verwendet. Außerdem kamen weitere Funktionssammlungen zur Auswertung und Darstellung der Daten zum Einsatz (177–182). Nach der Aufnahme der Spektren wurde die Signalintensität der Schwingung bei 1175 cm^{-1} für CV und der Schwingung bei 725 cm^{-1} für

3.5 Automatisierte Quantifizierung von SERS-Spektren mit der Programmiersprache R

1-Hydroxy-2-naphthoesäure bestimmt. Die Funktion „SpektrumSearch.R“ benötigte bei der mathematischen Annäherung des Spektrums einen Sigma-Wert als Eingangsparameter. Dieses Sigma beschreibt die Halbwertsbreite der zur Annäherung verwendeten Gauß-Verteilung. Sein Wert war daher abhängig von der Bandenbreite, welche ihrerseits mit der Signalintensität verknüpft war. Der Sigma-Wert musste deshalb für jede Analyt-Konzentration anfangs pro Versuch und Tag einmal händisch angepasst werden.

Für die Auswertung einer Kalibrierkurve wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Bei jeder Konzentration einer Kalibrierkurve wurde ein repräsentatives SERS-Spektrum mit der Funktion „SpektrumSearch.R“ und unterschiedlichen Sigma-Werten angepasst und eine Basislinienkorrektur vorgenommen. So konnte der bestmögliche Sigma-Wert für jede Signalintensität ermittelt werden.
2. Alle Spektren derselben Konzentration wurden nun nachfolgend mit dem zuvor ermittelten Sigma-Wert automatisch ausgewertet.
3. Die SERS-Signalintensität der Bande bei 1175 cm^{-1} (für CV) beziehungsweise 725 cm^{-1} (für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure) wurde gegen die Konzentration aufgetragen.

In Abbildung 3.7 sind typische SERS-Spektren von Kristallviolett zusammen mit den angepassten Kurven, der Basislinienkorrektur und dem Differenzspektrum zu sehen.

3.5 Automatisierte Quantifizierung von SERS-Spektren mit der Programmiersprache R

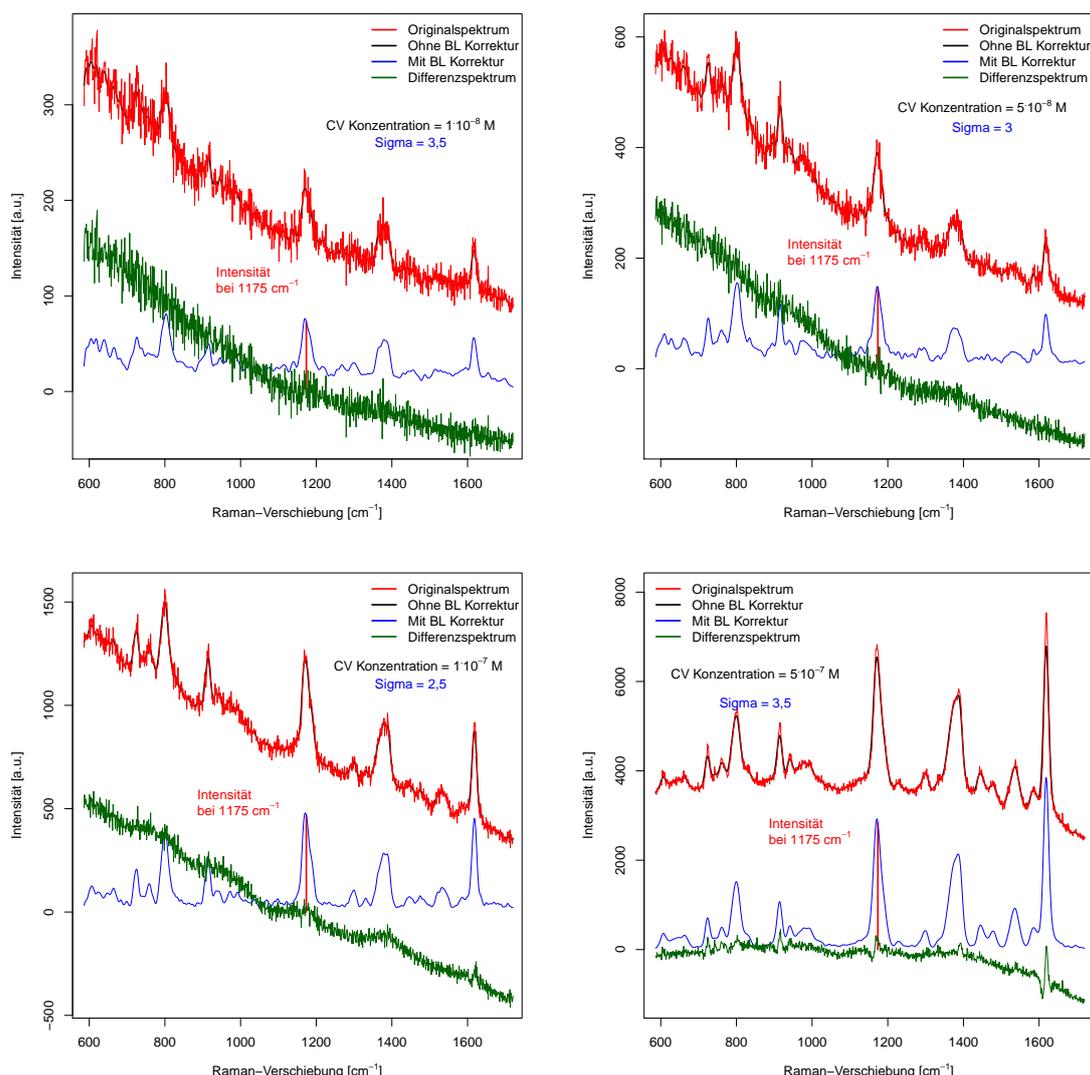


Abbildung 3.7: Anpassung und Basislinienkorrektur der SERS-Spektren mit „Spektrum-Search.R“. Ermittlung der SERS-Signalintensität bei 1175 cm^{-1} .

$c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (links oben), $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (recht oben), $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (links unten), $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (rechts unten). Akquisitionszeit $1 \times 0,1 \text{ s}$ pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633 \text{ nm}$.

Die Bandenintensitäten von Raman-Spektren verhalten sich der Theorie nach wie Lorentz-Verteilungen, aufgrund von gerätespezifischen Einflüssen ergeben sich jedoch in der Praxis Gauß-Lorentz-Profile (engl.: „Gaussian line broadening“) (111). Anhand der Differenzspektren (Subtraktion der basislinienkorrigierten Spektrums vom Originalspektrum, Abbildung 3.8) ist zu sehen, dass eine Annäherung mit einem reinen Gauß-Profil bei richtiger Wahl des Sigma-Wertes jedoch ebenfalls ausreichende Ergebnisse liefert. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Sigma-Werte zu verdeutlichen, wurde ein CV-SERS-Spektrum bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ mit unterschiedlichen Werten für Sigma angenähert. In Abbildung 3.8 sind vergrößerte Ausschnitte der Differenzspektren zu sehen. Dabei fällt auf, dass

3.6 Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mittels UV/VIS-Spektroskopie

bei zu kleinen, aber auch zu großen Sigma-Werten ein Rest der Originalbande bei 1175 cm^{-1} im Differenzspektrum erhalten bleibt. Bei einem Sigma-Wert von 2,5 ist die Annäherung jedoch bei dieser Konzentration optimal.

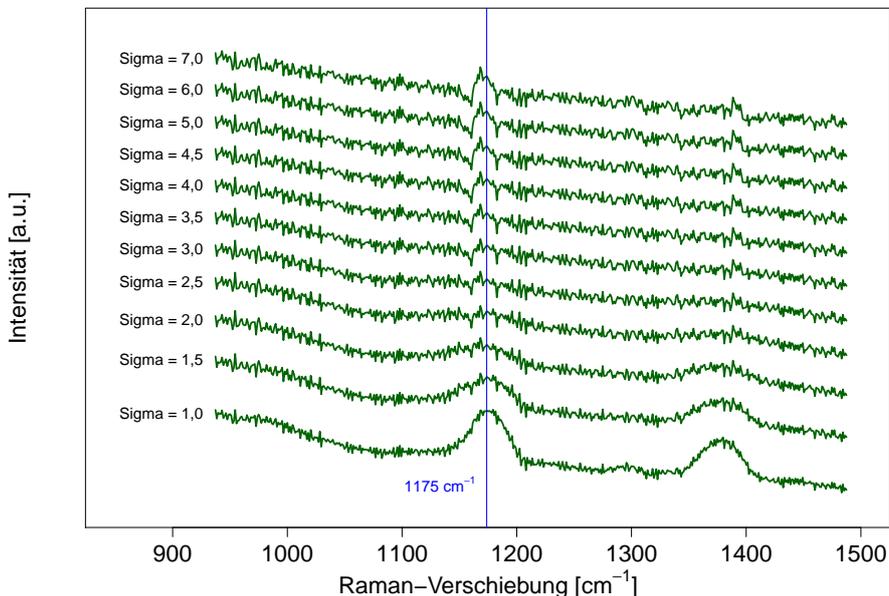


Abbildung 3.8: Vergrößerte Ausschnitte der SERS-Differenzspektren bei unterschiedlichen Sigma-Werten ($c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7}\text{ M}$). Bei zu kleinen, aber auch zu großen Sigma-Werten bleibt ein Rest der Originalbande erhalten. Ein manuelles Anpassen der Sigma-Werte für jede Konzentration einer Kalibrierkurve ist deshalb nötig.

3.6 Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mittels UV/VIS-Spektroskopie

Alle UV/VIS-Spektren wurden mit einem „Analytik Jena SPECORD 250 PLUS“ UV/VIS-Spektrometer aufgenommen. Bei den erhaltenen Spektren wurden, wenn nötig, analog zu der Auswertung der SERS-Spektren mittels R eine Basislinienkorrektur durchgeführt.

Die Untersuchungen mit UV/VIS-Spektroskopie wurden als zweite unabhängige Untersuchungsmethode herangezogen, um die vorangegangenen SERS-Messungen an Nanopartikeln und ihren Agglomeraten zu überprüfen. Die optische Dichte einer Suspension hängt stark mit dem Agglomerationsgrad der Nanopartikel zusammen. Deshalb wurden ebenfalls die Stabilität der unbehandelten und der präagglomerierten Nanopartikel-Suspensionen auf verschiedene Weisen untersucht. Zusätzlich dazu wurden zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen unternommen, um die Geschwindigkeit der Agglomerationsreaktion im Hinblick auf die Kon-

3.6 Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mittels UV/VIS-Spektroskopie

zentration von CV zu untersuchen.

UV/VIS-Spektren einer unbehandelten AgNP-Suspension:

In eine UV/VIS-Küvette mit 950 μL Milli-Q Wasser wurden 50 μL einer unbehandelten und salzfreien AgNP-Suspension pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Flüssigkeiten gut durchmischten und sich keine Blasen im Strahlengang befanden. Nach der Aufnahme der UV/VIS-Spektren wurde der Vorgang zweimal wiederholt (Abbildung 4.16).

Zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen: unbehandelte AgNP-Suspension bei einer Salzkonzentration von $c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ M}$

Zu 10 mL einer unbehandelten AgNP-Suspension wurden 310 μL einer 1 M NaCl-Lösung pipettiert, was einer Endkonzentration von 0,03 mol/L NaCl entsprach. Zu festgelegten Zeiten wurden Aliquoten von 50 μL entnommen und in Küvetten mit 950 μL Milli-Q Wasser pipettiert. Durch Schütteln der Suspension vor der Entnahme der Aliquoten konnte eine Sedimentation von Agglomeraten ausgeschlossen werden. Nach den Messungen wurde das Absorptionsmaximum der UV/VIS-Spektren gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.18).

UV/VIS-Spektren einer präagglomerierten AgNP-Suspension:

In eine Küvette mit 850 μL Milli-Q Wasser wurden 150 μL einer präagglomerierten AgNP-Suspension pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Flüssigkeiten gut durchmischten und sich keine Blasen im Strahlengang befanden. Nach der Aufnahme der UV/VIS-Spektren wurde der Vorgang zweimal wiederholt (Abbildung 4.19).

Langzeit-UV/VIS-Messungen: präagglomerierte AgNP-Suspension:

Um die Stabilität der präagglomerierten AgNP-Suspensionen abschätzen zu können, wurden bei 3 verschiedenen, jeweils neu synthetisierten Suspensionen zweimal pro Tag, UV/VIS-Spektren aufgenommen. Dies wurde über einen Zeitraum von jeweils 4 Tagen wiederholt. Dabei wurden immer 150 μL Suspension entnommen, in eine Küvette mit 850 μL Milli-Q Wasser pipettiert und ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen. Das Absorptionsmaximum der Spektren wurde anschließend gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.20).

3.6.1 Reaktion von AgNPs mit CV: zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen

Reaktion von AgNPs mit CV in einem Zentrifugenröhrchen

Es wurden Zentrifugenröhrchen mit 9,9 mL einer präagglomerierten AgNP-Suspension vorbereitet. Zu Beginn eines Versuches wurden 0,1 mL einer CV-Lösung mit definierter Konzentration zupipettiert, und das Zentrifugenröhrchen unmittelbar nach der Zugabe geschüttelt

3.6 Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mittels UV/VIS-Spektroskopie

($t = 0$ s). Danach wurden zu bestimmten Zeitintervallen $100 \mu\text{L}$ Aliquoten entnommen, in Küvetten mit $900 \mu\text{L}$ Milli-Q Wasser pipettiert und sofort mit dem UV/VIS-Spektrometer gemessen. Die Suspension, aus welcher die Aliquoten entnommen wurden, wurde jedes Mal vor der Entnahme geschüttelt. Nach einer ausreichenden Anzahl an Messungen (abhängig von der Geschwindigkeit der Reaktion) wurde der Versuch weitere zweimal wiederholt.

Auf diese Weise wurden die CV-Endkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-7}$ M, $3,5 \cdot 10^{-7}$ M, $6,5 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M je dreimal untersucht. Die Absorptionsmaxima der UV/VIS-Spektren wurden später gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.39).

Reaktion von AgNPs mit CV in einer UV/VIS-Küvette

Es wurden UV/VIS-Küvetten mit $900 \mu\text{L}$ CV-Lösungen verschiedener Konzentrationen vorbereitet. Zu diesen Lösungen wurden nun $100 \mu\text{L}$ einer präagglomerierten AgNP-Suspension pipettiert, wobei auf eine gute Durchmischung der Komponenten geachtet wurde. Die AgNP-Zugabe wurde als Zeitpunkt $t = 0$ s betrachtet. Die CV-Lösungen hatten entsprechende Konzentrationen, sodass die endgültigen CV-Konzentrationen $1 \cdot 10^{-7}$ M, $3,5 \cdot 10^{-7}$ M, $6,5 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M während den Messungen betragen. Die Küvetten wurden während den Versuchen nicht bewegt, es wurde weder geschüttelt, noch gerührt. Die gesamte Messzeit lag zwischen 20 Minuten und 180 Minuten, je nach Geschwindigkeit der Reaktionen. Die Versuche wurden jeweils noch zweimal wiederholt und die Absorptionsmaxima der UV/VIS-Spektren wurden später gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.40).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss eines Porennetzwerks auf biogeochemische Grenzflächen - Mikromodell

Biogeochemische Grenzflächen steuern den Abbau von Schadstoffen im Boden und sind wichtig für dessen Filtereigenschaften. Sie sind entscheidend für die Wasserqualität und die Pflanzenproduktivität, also auch für die wirtschaftliche Nutzbarkeit eines Bodens. Um die Prozesse, welche an BGIs stattfinden verstehen und quantifizieren zu können, bieten sich in Siliziumwafer geätzte Strukturen (Mikromodelle) an, welche die porösen Netzwerke von wasserleitenden Schichten nachbilden. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich Mikroorganismen in einem Umfeld mit annähernd denselben Eigenschaften, wie sie im Boden vorherrschend sind, zu untersuchen. Zu diesen speziellen Eigenschaften gehören unter anderem:

- Begrenzter Platz,
- Begrenzter räumlicher und zeitlicher Zugang zu Nährstoffen,
- Bevorzugte Fließpfade,
- Nass/Trockenzyklen,
- Kapillarkräfte,
- Druckgradienten.

Es ist deshalb ein zweckmäßiger Ansatz die Wechselwirkungen des Bodens mit den enthaltenen Mikroorganismen anhand eines Mikromodells im Labor zu untersuchen, da der Boden selbst zu viele unbekannte Einflussgrößen mit sich bringt und Prozesse an Poren im Bereich von Mikrometern vielen hoch sensitiven Untersuchungsmethoden unzugänglich sind.

Ziel des Schwerpunktprogramms 1315 der DFG ist unter anderem: „ein mechanistisches Verständnis des komplexen Wechselspiels physikalischer, chemischer und biologischer Prozesse zu erlangen, die an biogeochemischen Grenzflächen ablaufen. Dabei sollen diejenigen Faktoren identifiziert werden, die die komplexe Struktur der Grenzflächen bestimmen, die Prozesse auf molekularer und Organismen-Skala mit Phänomenen auf der Aggregat-Skala mechanistisch verknüpft und das mittel- bis langfristige Verhalten organischer Chemikalien in Böden innerhalb eines generellen mechanistischen Rahmens erklärt werden.“ (Zitat aus der

4.2 BGIs im Mikromodell

Projektbeschreibung des SPP 1315 (8)). Ebenfalls soll, anhand der Eigenschaften mikroskopischer Systeme (z.B. Biofilme und Mikroorganismen in mikroporösen Netzwerken) versucht werden, die Eigenschaften makroskopischer Systeme, wie die des Bodens als Gesamtsystem, besser zu verstehen (engl.: „*upscaling*“).

Um bei Versuchen in Mikromodellen mit Bakterien Aussagen über deren Aktivität treffen zu können, ist jedoch es nötig über einen Marker zu verfügen, der auf irgend eine Weise mit dem Stoffwechsel der Bakterien verknüpft ist. Rein optisch ist es normalerweise nicht möglich zu unterscheiden, ob Bakterien leben und aktiv sind, oder ob sie bereits tot sind.

Ein Weg, um die Umsetzung von Stoffen durch Bakterien beobachten zu können, zeigt sich auf bei der Verwendung des denitrifizierenden Bodenbakteriums *Paracoccus denitrificans*, welches freundlicherweise von Prof. Dr. Werner Manz, Uni-Koblenz-Landau, zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Bakterium ist in der Lage durch Denitrifikation Gas zu bilden, weshalb das Wachstum von Gasblasen in einem Mikromodell als Marker für die Aktivität und die stoffliche Umsetzung der Bakterien herangezogen werden kann. Bei einer vollständig durchlaufenen Denitrifikation wird dabei N_2 gebildet, bei einem vorzeitigen Abbruch (z. B. bei Anwesenheit von O_2) kann ebenfalls N_2O entstehen (siehe Abbildungen 2.3 und 2.4). Zusätzlich ist *Paracoccus denitrificans* in der Lage bei Anwesenheit von Sauerstoff diesen abzubauen und für eine aerobe Energiegewinnung zu nutzen (fakultativ anaerob). Auf diesem Abbauweg wird jedoch kein Gas produziert. Obwohl der Abbau von Sauerstoff eine höhere Energieausbeute als die Denitrifikation hat und diese sogar hemmen kann, sind in der Literatur jedoch zahlreiche Fälle von teilweise simultaner N_2 und N_2O -Produktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von O_2 erwähnt (59, 62, 63, 65–67) (aerobe Denitrifikation).

4.2 BGIs im Mikromodell

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mikromodell mit *Paracoccus denitrificans* beimpft und anschließend verdünntes Nährmedium hindurch geleitet. Nach insgesamt 14 Tagen war deutlich ein Biofilm zu sehen und die Bakterien hatten damit begonnen Gas zu produzieren und so das Flussfeld dynamisch und teilweise sehr stark zu verändern. So konnten auch Bakterien in noch unbesiedelte Bereiche geschwemmt werden. Das Mikromodell wurde auf diese Weise gänzlich mit einem homogenen Bakterienbewuchs überzogen. Das Wachstum von zwei Gasblasen an verschiedenen Stellen wurde auf Video aufgenommen (Abbildung 4.1) und untersucht. Dabei sollten einerseits die Regeln und Bedingungen, die das Wachstumsverhalten der Blasen im Mikromodell bestimmen, ermittelt und andererseits die Auswirkungen und Veränderungen, welche ein poröses Netzwerk verursacht, enthüllt werden. Daher wurde das Volumen, die Grenzfläche und die aktive Grenzfläche (Grenzfläche mit Kontakt zum umgebenden Wasser) von zwei Gasblasen durch Bildbearbeitung ermittelt. Zusätzlich wurde eine

4.2 BGIs im Mikromodell

Computersimulation gerechnet, welche alle Prozesse des Blasenwachstums modellierte. Eine Blase befand sich dabei direkt vor Beginn der elliptischen Porenstruktur des Mikromodells, also noch in einem der weiten Zulaufkanäle (Abbildung 4.2, links). Die andere befand sich bereits innerhalb der Struktur und damit innerhalb des porösen Netzwerks (Abbildung 4.2, rechts). Ihre Position war bei $2/3$ der Länge der Mikromodell-Porenstruktur.

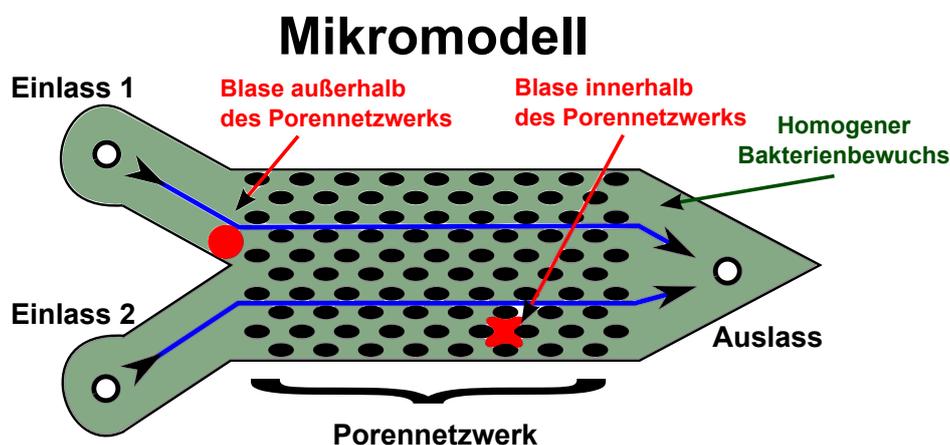


Abbildung 4.1: Übersichtsskizze: Mikromodell und Porennetzwerk-Struktur (nicht maßstabsgetreu) mit Biofilm von *P. denitrificans*. Es wurden zwei Gasblasen, direkt vor Beginn und bei $2/3$ der Länge der Porennetzwerk-Struktur, hinsichtlich ihres Wachstums untersucht.

4.2 BGIs im Mikromodell

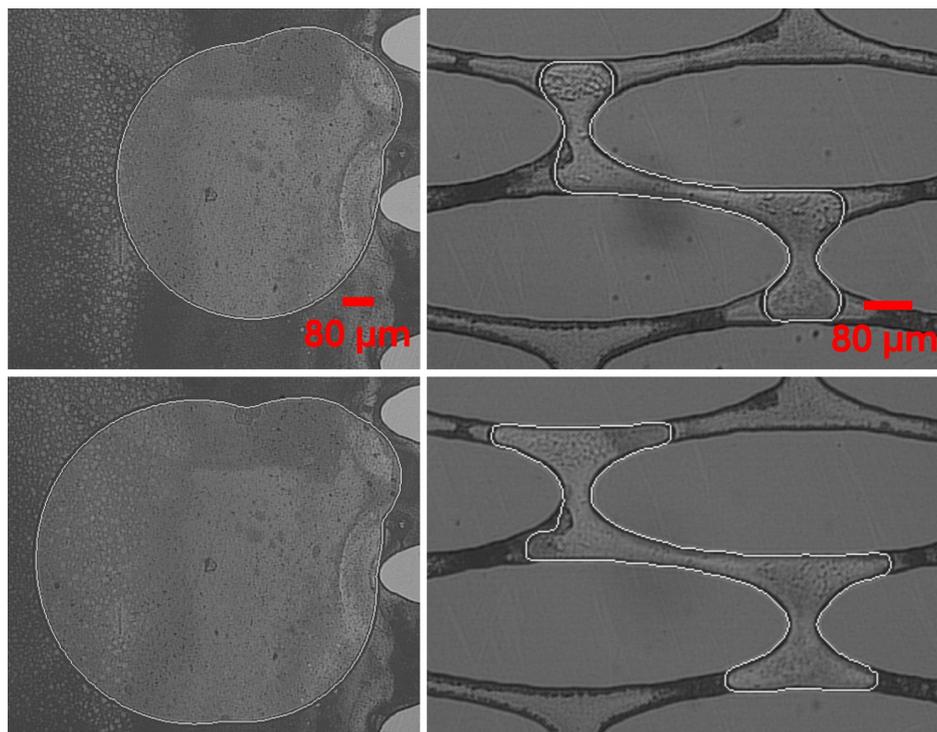


Abbildung 4.2: Wachstum von Gasblasen in einem Mikromodell mit Biofilm (Sicht von oben). links: Gasblase außerhalb des Porennetzwerks (oben $t = 0$ Minuten; unten $t = 9$ Stunden). rechts: Gasblase innerhalb des Porennetzwerks (oben $t = 0$ Minuten; unten $t = 4,5$ Stunden). Die Grenzflächen sind weiß hervorgehoben. Fließrichtung: von links nach rechts, Fließrate: $6 \mu\text{L}/\text{h}$, Temperatur: $26 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Fließrate betrug während den Aufnahmen $3 \mu\text{L}/\text{h}$ pro Kanal, die gesamte Akquisitionszeit betrug bei der Blase außerhalb der Porenstruktur 9 Stunden (Abbildung 4.2, links) und innerhalb 4,5 Stunden (Abbildung 4.2, rechts), die Temperatur lag bei $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Werden die Volumina gegen die Zeit aufgetragen, ergeben sich folgende Verläufe:

4.2 BGIs im Mikromodell

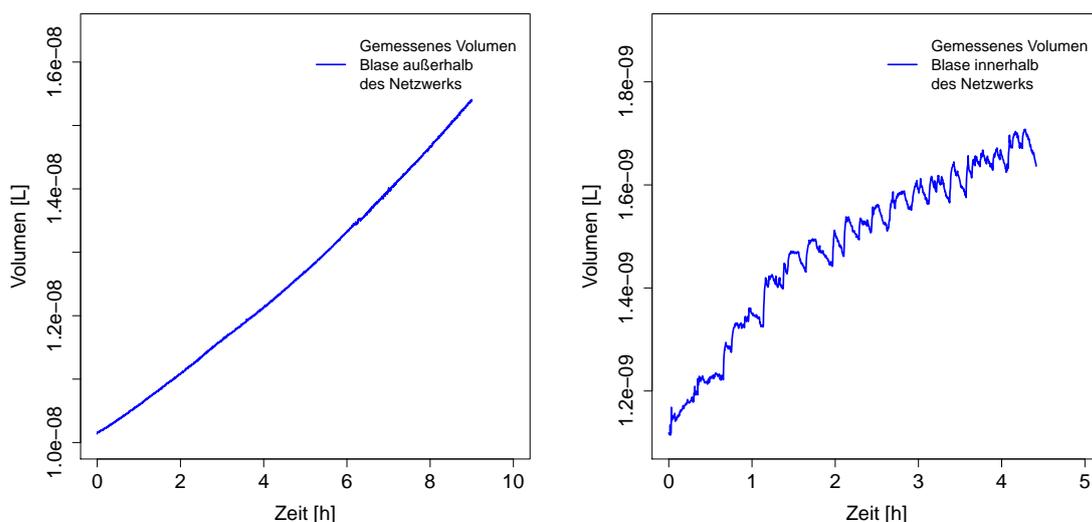


Abbildung 4.3: Links: Volumen der Blase außerhalb des Porennetzwerks. Rechts: Volumen der Blase innerhalb des Porennetzwerks. Ihr Volumen betrug nur ca. 1/10 des Volumens der Blase außerhalb des Netzwerks.

In der Beobachtungszeit konnte bei der Blase außerhalb der Porenstruktur (Abbildung 4.2 und 4.3, links) eine Volumenvergrößerung von 10 nL auf ca. 15 nL beobachtet werden. Dies entspricht einer scheinbaren Gasproduktionsrate von $R_{gas} = 56,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ oder $1,39 \text{ ml}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$. Diese Gasproduktionsrate ist dabei definiert als der gemessene Volumenzuwachs pro Bodenfläche mit direktem Bakterienkontakt und Zeit. Bei der Blase außerhalb der Porenstruktur (Abbildung 4.2 und 4.3, rechts) hingegen entspricht das gemessene Wachstum einer scheinbaren Gasproduktionsrate von $R_{gas} = 84,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ oder $2,07 \text{ ml}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$. Trotz der größeren Grenzfläche mit direktem Bakterienkontakt (Wände der Mikromodell-Porenstruktur) bezogen auf ihr Volumen, wuchs diese Blase damit prozentual gesehen schneller, als die Blase außerhalb des Netzwerks.

Ebenfalls fällt auf, dass die Kurvenverläufe unterschiedlich sind. Die zweite kleinere Blase (rechts) innerhalb des Porennetzwerks schien, verglichen mit der Blase außerhalb, ihre Wachstumsgeschwindigkeit in der Aufnahmezeit insgesamt zu verlangsamen.

Die kurzfristigen Schwankungen wiederum in der Kurve aus Abbildung 4.3 rechts hingegen entstanden vermutlich durch kleine Druckschwankungen. Diese wurden durch zwei Prozesse verursacht. Einerseits änderten andere Blasen im Porennetzwerk plötzlich ihre Position, sobald sie groß genug waren, um sich in eine benachbarte Pore auszudehnen. Aufgrund der Oberflächenspannung geschah ein derartiger Vorgang stets ruckartig. Er zog Druckschwankungen und eine Veränderung des Flussfeldes nach sich, da Poren plötzlich blockiert oder frei gegeben wurden. Andererseits flossen auch Blasen aus dem Mikromodell ab. Diese konnten jedoch, wieder aufgrund der Oberflächenspannung, eine bestimmte Mindestgröße nicht unterschreiten. Wegen der geringen Größe des Mikromodells setzten sich derartige Druckschwankungen über weite Entfernungen im Porennetzwerk fort.

4.2.1 Bedingungen in einem Mikromodell mit gasproduzierendem Biofilm

Die scheinbaren Gasproduktionsraten R_{gas} , welche aus den Messungen der Volumenänderungen der Blasen errechnet wurden, erfassen jedoch nur die Summe aller Gase nach jedem Zeitschritt. Da durch zusätzliche Diffusion aber mehrere Gase (N_2 , O_2 oder N_2O) an dem Wachstum der Blasen im Mikromodell beteiligt sein müssen, wurde eine zusätzlich Computersimulation gerechnet, um diese einzelnen Prozesse auftrennen zu können. Dabei wurde von folgenden Annahmen ausgegangen:

1. Im gesamten Mikromodell (Boden und Wände der Struktur, SiO_2) befand sich maximal eine Monolage aus Bakterien, ihre Verteilung war homogen.
2. Am Deckglas (Borosilikatglas) des Mikromodells konnten unter dem Mikroskop keine Bakterien entdeckt werden, weshalb hier von keinem Bewuchs ausgegangen wurde.
3. Jedes einzelne Bakterium produzierte dieselbe Menge an Gas pro Zeitschritt. Diese Menge war konstant und änderte sich während des Versuches nicht.
4. Die Teilungsrate der Bakterien und damit die Zunahme ihrer Zahl war während der Akquisitionszeit vernachlässigbar klein. (Im Experiment konnten seit mehr als vier Tagen vor den Aufzeichnung des Gasblasenwachstums optisch nahezu keine Änderungen mehr im Biofilm der Bakterien festgestellt werden.)
5. Das von den Bakterien produzierte Gas wurde an das vorbeifließende Wasser abgegeben. Auf diese Weise nahm ein Volumenelement Wasser umso mehr Gas auf, je länger seine zurückgelegte Strecke im Mikromodell war.
6. Nur die Bakterien, welche direkten Kontakt zur Blasengrenzfläche hatten, also von ihr eingeschlossen wurden, gaben ihr produziertes Gas direkt an die Blase ab.

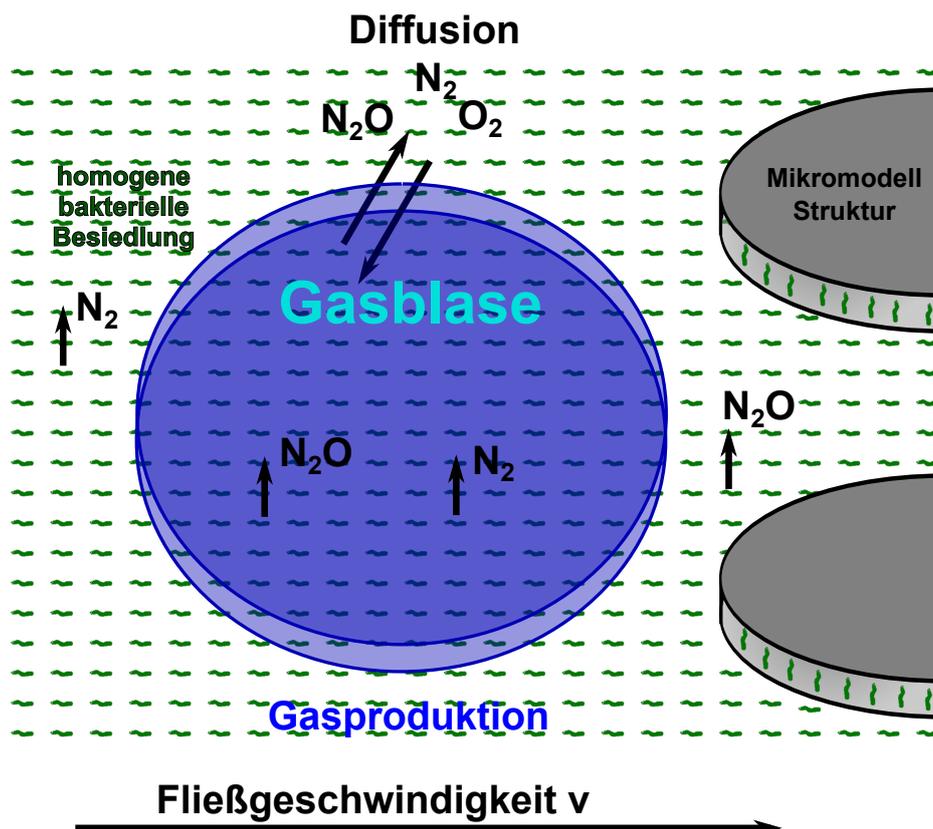


Abbildung 4.4: Skizze: Gasblase außerhalb des Porennetzwerks des Mikromodells.

Ein homogener Bakterienrasen produziert Gas. Nur die Bakterien unter der Blase geben ihr produziertes Gas direkt in die Blase ab. Zusätzlich findet ein Gasaustausch durch Diffusion über die seitliche Blasengrenzfläche statt.

Um alle an dem Blasenwachstum beteiligten Vorgänge aufzutrennen, muss der Gasaustausch der Blase mit dem Medium korrekt beschrieben werden. Hierfür ist unter anderem die Péclet-Zahl entscheidend, welche das Verhältnis von advektiven zu diffusiven Flüssen angibt. Sie entscheidet also darüber, welches mathematische Modell zur Berechnung der diffusiven Massenströme verwendet werden muss. Es ist in diesem Fall allerdings nicht ohne weiteres möglich, einen exakten Wert für die Péclet-Zahl der Blase außerhalb der Mikromodell-Struktur anzugeben, da hierfür die Kenntnis der Fließgeschwindigkeit des Mediums in direkter Nähe der Blasenoberfläche nötig ist. Wird ein durchschnittlicher Durchmesser der Blase von $721,5 \mu\text{m}$ und eine Breite des Kanals, in dem sich die Blase befand, von 10 mm angenommen, so ergibt sich eine Péclet-Zahl von $\approx 2,1$ für Sauerstoff (Stickstoff: $Pe \approx 2,2$; N_2O : $Pe \approx 2,5$). Zwar ist die Fließrate mit $6 \mu\text{L/h}$ und die Abmessungen des Bereiches um die Blase herum bekannt, jedoch befanden sich im Mikromodell während des Versuches mehrere Blasen an verschiedenen anderen Stellen. Die tatsächliche Péclet-Zahl muss deshalb größer gewesen sein, da der Kanal vor der Porenstruktur durch die anderen Blasen verengt und so die Fließgeschwindigkeit wohl in nicht zu vernachlässigender Weise erhöht wurde. Es erscheint daher sinnvoll, ein rein advektives Fließregime anzunehmen, was bedeutet, dass stets

4.2 BGIs im Mikromodell

schnell genug neues Medium nachfließen konnte, um die Gaskonzentrationen in der direkten Umgebung der Blase konstant zu halten.

Für die kleinere Blase innerhalb des porösen Netzwerks des Mikromodells galten jedoch teilweise andere Bedingungen, als für die Blase außerhalb der Struktur:

1. Erhöhte resultierende Grenzfläche mit Bakterienkontakt
2. Abnahme der aktiven Grenzfläche mit Kontakt zum flüssigen Medium
3. Starke Grenzflächenkrümmung
4. Stagnationszone

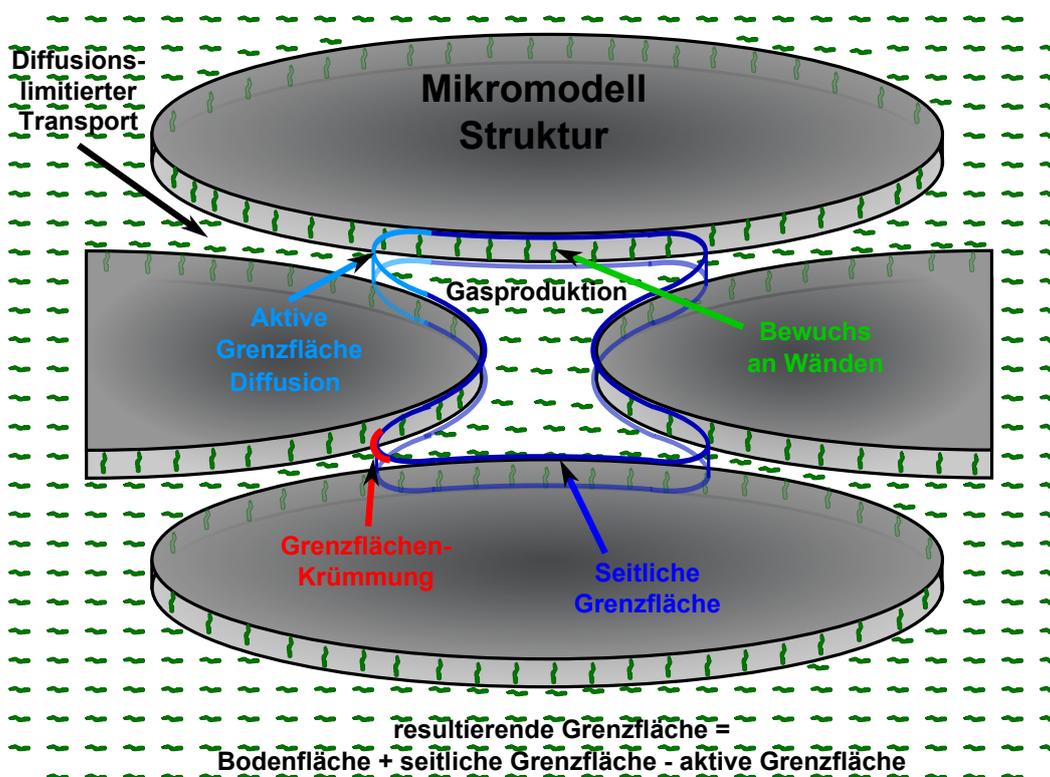


Abbildung 4.5: Skizze: Gasblase innerhalb des Porennetzwerks des Mikromodells.

Die aktive Grenzfläche der Blase wird in den Porenhälsen stark gekrümmt. Die Blase versperrte die Poren, weshalb in direkter Nähe keine Strömung herrschte ($Pe = 0$). Zusätzlich sind die Wände der Struktur mit Bakterien besetzt, das Deckglas jedoch nicht.

Erhöhte resultierende Grenzfläche: Bei der Blase im Porennetzwerk musste zusätzlich beachtet werden, dass die Wände der Porenstruktur ebenfalls mit Bakterien bewachsen waren. Da die Tiefe des Mikromodells $30 \mu\text{m}$ betrug, was vergleichbar mit dem Durchmesser der Poren war, ergab sich so ein weiterer erheblicher Flächenanteil. Aus den separaten Messungen der Bodenfläche, der gesamten (seitlichen) Grenzfläche und der Grenzfläche ohne Matrixkontakt (= aktive Grenzfläche) mit dem in dieser Arbeit geschriebenen Algorithmus, konnte die

4.2 BGIs im Mikromodell

resultierende Grenzfläche errechnet werden (Abbildung 4.6). Diese war nur die Grenzfläche, bei der die Blase direkten Kontakt zu Bakterien hatte (resultierende Grenzfläche = Bodenfläche + gesamte seitliche Grenzfläche - aktive Grenzfläche). Dabei war die resultierende Grenzfläche um den Faktor $\approx 2,15$ größer, als die reine Bodenfläche der Blase. Genauso, wie bei der ersten Blase außerhalb der Porenstruktur, wurde aufgrund von Lichtmikroskop-Aufnahmen angenommen, dass sich auf dem Borosilikat-Deckglas des Mikromodells keine Bakterien befanden.

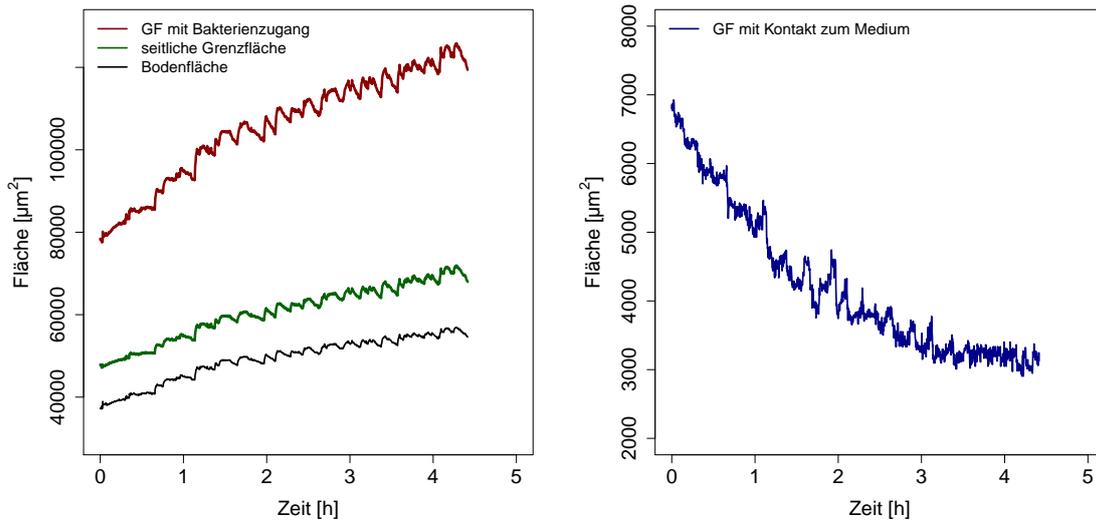


Abbildung 4.6: Zeitliche Entwicklung Blasengrenzflächen. links: resultierende Grenzfläche, seitliche Blasengrenzfläche und Bodenfläche der Blase innerhalb des Porennetzwerks. rechts: aktive Grenzfläche mit Zugang zum Medium.

Abnahme der aktiven Grenzfläche: Abbildung 4.6 rechts zeigt zusätzlich, dass die aktive Grenzfläche (Grenzfläche mit Kontakt zum umgebenden Medium) mit fortschreitender Zeit und wachsendem Volumen der Blase abnahm. Dadurch verminderte sich die Fläche, über die ein Gasaustausch mit dem Medium möglich war.

Starke Grenzflächenkrümmung: Die aktive Grenzfläche wurde zusätzlich durch das Wachstum der Blase in die Porenhäule hinein stark gekrümmt (vgl. Abbildung 4.7). Dies hatte, aufgrund des dadurch entstehenden Laplace-Überdrucks, eine Erhöhung des Blaseninnendrucks zur Folge, welcher neben einem kleineren Volumen, ebenfalls Einfluss auf die Konzentrationsdifferenzen hatte (und damit auf den Massenstrom der Diffusion). Der Laplace-Überdruck konnte dabei, genauso wie bei der Blase außerhalb der Struktur mit Gleichung 2.14 berechnet werden, welche die flache Geometrie der Blase berücksichtigt.

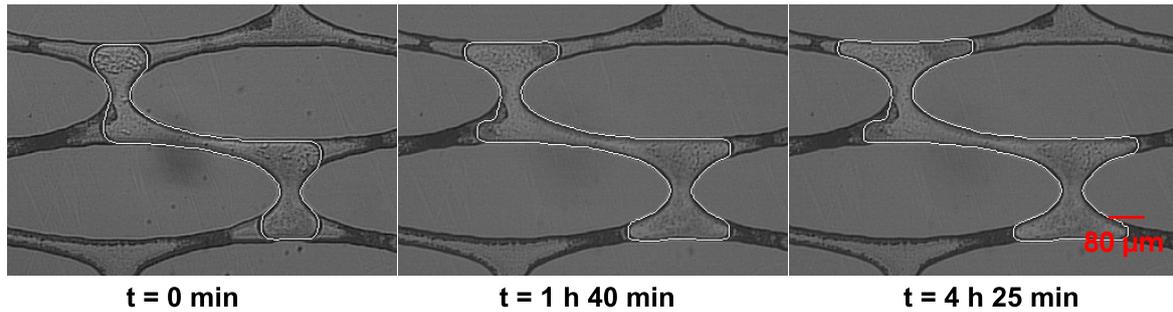


Abbildung 4.7: Drei Aufnahmen derselben Gasblase zu den Zeiten $t = 0$ min, $t = 1$ Stunde, 40 Minuten und $t = 4$ Stunden, 25 Minuten. Die Ausdehnung der Blase in die Porenhäule bei $t = 1$ Stunde, 40 Minuten bewirkte eine starke Krümmung der Grenzflächen.

Stagnationszone: Da die Blase selbst, wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, immer die ganzen Porenhäule ausfüllte, muss davon ausgegangen werden, dass sich das Medium in der direkten Nähe der Grenzfläche nicht bewegte. Die Péclet-Zahl war in diesem Fall also 0. Die Blase befand sich somit in einer Stagnationszone und es handelte sich deshalb nicht länger um ein advektives Regime. Als Folge davon konnte der Massentransferkoeffizient aus der Penetrationstheorie, wie es bei der Blase außerhalb der Porenstruktur der Fall war, nicht mehr für eine Simulation verwendet werden. Stattdessen wurde das Modell der stehenden Grenzschichten angewendet (vgl. Gleichung 2.8 für den Massentransferkoeffizienten).

4.2.2 Anreicherung des Mediums mit Gas (Konzentrationsgradienten):

Da das gesamte Mikromodell mit Bakterien besiedelt war, wurde durch ihre Gasproduktion das Medium, welches sich beim Eintritt in das Mikromodell noch im Gleichgewicht mit Luft befand, mit Gas angereichert (N_2 bzw. N_2O). Im Falle einer parallel ablaufenden aeroben Atmung wurde zusätzlich O_2 aus dem Medium entfernt. Dadurch bildeten sich Konzentrationsgradienten über die gesamte Länge des Mikromodells aus.

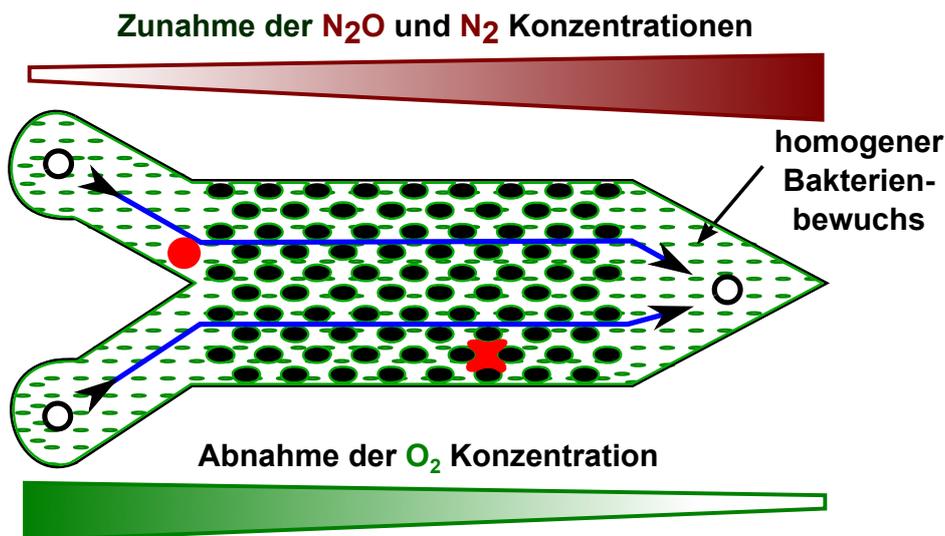


Abbildung 4.8: Durch den Stoffwechsel der Bakterien bilden sich Konzentrationsgradienten über die gesamte Länge des Mikromodells aus. Die N_2O - und die N_2 -Konzentrationen nehmen dabei in Fließrichtung zu (Denitrifikation), die O_2 -Konzentration nimmt, im Falle eines aeroben Stoffwechsels, ab.

Diese Gaskonzentrationsgradienten sind entscheidend bei der Deutung der Ergebnisse. Die Position einer Blase im Mikromodell gab damit vor, wie viel Gas sich bereits im Wasser in ihrer direkten Umgebung befand. Die Konzentrationsunterschiede bestimmten dann gemäß Gleichung 2.5 bzw. 2.7 die Geschwindigkeit und die Richtung der Diffusion. Eine Blase erfuhr also je nach ihrer Position im Mikromodell unterschiedliche Wachstumsbedingungen.

Um die gebildeten Konzentrationsverläufe mathematisch beschreiben zu können, musste die Geometrie der Zu- und Ablaufkanäle sowie der Mikromodell-Porenstruktur berücksichtigt werden. Dazu wurde der mit Flüssigkeit gefüllte Hohlraum in Abschnitte mit je gleichem Volumen zerlegt. Auf diese Weise ergeben sich für diese Bereiche teilweise unterschiedliche Verweilzeiten des hindurch fließenden Mediums. Die Fließgeschwindigkeit innerhalb des Porennetzwerks war beispielsweise höher, als in den Zu- und Abläufen des Mikromodells. Der Gasgehalt des Mediums änderte sich daher im Mikromodell nicht überall gleich schnell, da die Bakterien nicht immer gleich viel Zeit hatten, durch die Produktion von Gas die Konzentration im Medium anzureichern. In Abbildung 4.9 ist der theoretische Verlauf der Konzentration von N_2 über die Länge des Mikromodells bei unterschiedlichen Gasproduktionsraten der Bakterien angegeben.

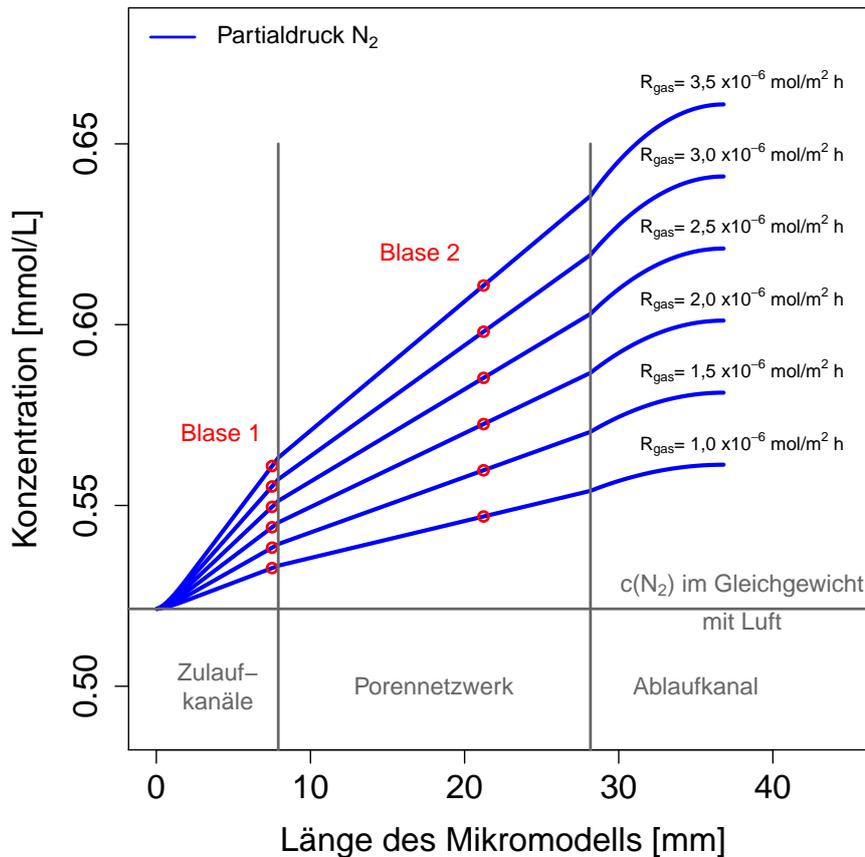


Abbildung 4.9: Exemplarischer Verlauf der Konzentration von Stickstoff im Wasser im Mikromodell bei den Gasproduktionsraten von $R_{gas} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ bis $R_{gas} = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$.

4.2.3 Gasaustausch durch Diffusion und Gasproduktion durch Bakterien

Mithilfe einer Computersimulation war es in Zusammenarbeit mit PD Dr. Thomas Baumann möglich, die Diffusionsprozesse zu modellieren und in die mathematische Annäherung der gemessenen Wachstumskurve aus Abbildung 4.3 mit einzubeziehen. Dabei wurde neben der Gasproduktion durch die Bakterien zusätzlich die Diffusion von Gas aus der Blase in das Medium und die Diffusion aus dem Medium in die Blase berücksichtigt.

Die Modellierung ging dabei von folgenden Rahmenbedingungen aus:

- Für die Blase außerhalb der Mikromodell-Porenstruktur wurde ein advektives Fließregime angenommen und der Massentransferkoeffizient der Penetrationstheorie verwendet (Gleichung 2.10). Dieser berücksichtigt die Länge der umströmten Grenzfläche und die Fließgeschwindigkeit des Mediums.

4.2 BGIs im Mikromodell

- Die Blase innerhalb des Porennetzwerks befand sich in einer Stagnationszone, weshalb hier das Modell der stehenden Grenzschichten zur Beschreibung der Diffusionsprozesse verwendet wurde (Gleichungen 2.7 und 2.8).
- Der Laplace-Überdruck wurde nach Gleichung 2.14 berechnet. Damit wurde die flache Geometrie der Gasblasen im Mikromodell berücksichtigt.

Die Größenänderung der Gasblasen wurde durch zwei unterschiedliche Prozesse verursacht. Einerseits diffundierte Gas über die Grenzfläche Gas/Wasser (gasförmig/flüssig) in die Blase hinein oder aus ihr heraus. Andererseits gaben die Bakterien, welche über den Boden oder die Wände der Mikromodell-Struktur direkten Kontakt zu Blase hatten (=resultierende Grenzfläche, gasförmig/fest), ihr Gas direkt an diese ab oder verbrauchten, im Falle einer parallel ablaufenden aeroben Atmung, Sauerstoff. Folgende Gleichung beschreibt das Wachstum allein aufgrund der Gasproduktion von Bakterien, welche direkten Kontakt zur Blase hatten:

$$A_t = A_0 \cdot (1 + K)^t \quad (4.1)$$

mit

- A_t = Bodenfläche der Blase nach Vollendung des Zeitschritts t in m^2 ,
- A_0 = Anfängliche Bodenfläche zum Zeitpunkt 0 in m^2 ,
- K = Prozentualer Flächenzuwachs im Zeitintervall Δt [dimensionslos],
- t = Zeit in s.

Dabei ist K der prozentuale Flächenzuwachs pro Zeitschritt. Nach dieser Gleichung nimmt eine Gasblase also pro Zeitschritt immer denselben Prozentsatz an Größe zu und wächst damit, absolut betrachtet, umso schneller, je größer sie ist. K ergibt sich dabei aus der in einem Zeitschritt produzierten Gasmenge und den geometrischen Abmessungen des Mikromodells.

$$K = \left(\frac{B_d \cdot \rho_{gas} \cdot \Delta t \cdot V_M}{d_{MM}} \right) \quad (4.2)$$

mit:

- B_d = bakterielle Besiedlungsdichte in g/m^2 ,
- ρ_{gas} = produzierte Menge an Gas pro Bakterienmenge und Zeit in $\text{mol}/(\text{g h})$,
- Δt = Zeitintervall in h,
- V_{MM} = molares Volumen in m^3/mol ,
- d_{MM} = Tiefe des Mikromodells in m.

Wenn ρ_{gas} die produzierte Menge an Gas pro Gramm Bakterien und Stunde ist ($\text{mol}/(\text{g h})$) und B_d die Besiedlungsdichte in Gramm Bakterien pro Fläche (g/m^2), so ergibt das Pro-

4.2 BGIs im Mikromodell

dukt aus beiden Größen die Menge an produziertem Gas pro Quadratmeter und Stunde:

$$R_{gas} = B_d \cdot \rho_{gas} \quad (4.3)$$

Somit kann die Vergrößerung der Blasenfläche (Blasenwachstum), welche ausschließlich durch das Gas der Bakterien mit direkten Kontakt zur Blase verursacht wird, wie folgt beschrieben werden:

$$A_t = A_0 \cdot \left(1 + \frac{R_{gas} \cdot \Delta t \cdot V_M}{d_{MM}} \right)^t \quad (4.4)$$

Aufgrund der Porengeometrie der Mikromodell-Netzwerkstruktur ist Gleichung 4.4 für die Kontaktfläche der Blase mit den Bakterien (= resultierende Grenzfläche) innerhalb des Netzwerks nicht mehr direkt proportional zu dem Volumen der Blase ($V = A_{Bakterien} \cdot \text{Höhe}_{Mikromodell}$ gilt nicht mehr). Die Bildung des Verhältnisses von resultierender Grenzfläche zu dem Blasenvolumen aus den Messwerten ermöglichte es jedoch, das Volumen (und damit die Partialdrücke in der Blase) in eine resultierende Grenzfläche umzurechnen (Abbildung 4.10). Dies war nötig für eine Computersimulation des Blasenwachstums, da Gleichung 4.4 in dieser Form streng genommen nur für die Bodenfläche einer Blase gilt. Die Geometrie des Porennetzwerks schlug sich damit in der Wachstumskurve der resultierenden Grenzfläche nieder. In der vorliegenden Geometrie des Mikromodells (Abbildung 4.5) war die Veränderung der Kurvenform zufälligerweise jedoch eher gering (Abbildung 4.6).

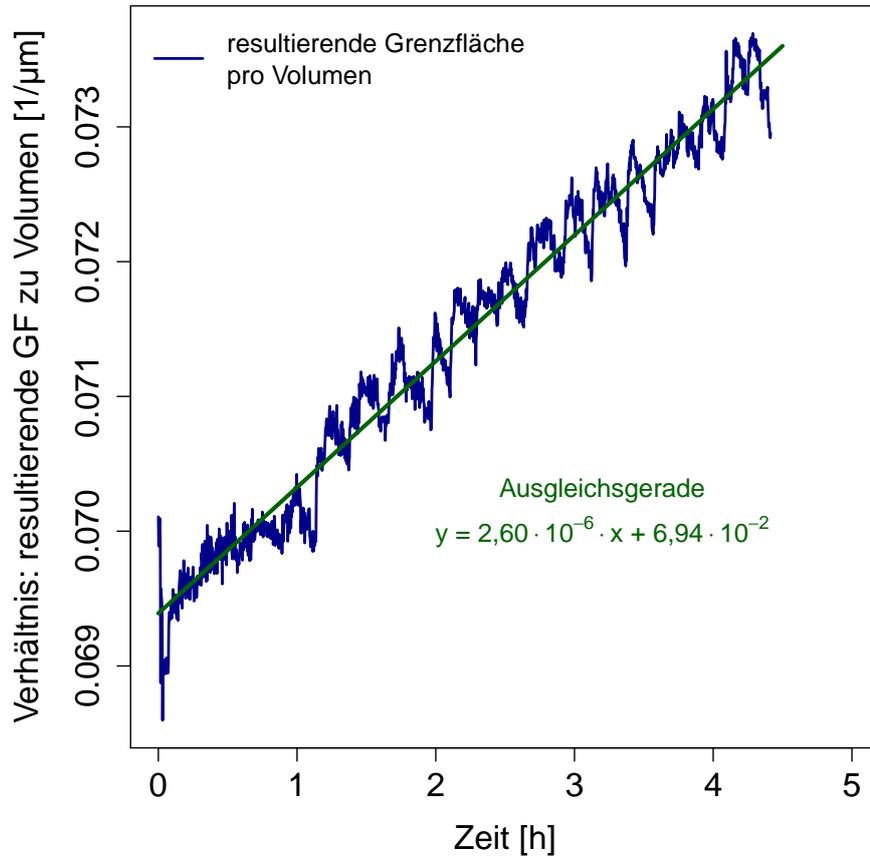


Abbildung 4.10: Die Besiedelung der Porenwände des Mikromodells hat ein veränderliches Verhältnis von der Grenzfläche mit Bakterienkontakt (= resultierende Grenzfläche) zum Blasenvolumen bei der Blase innerhalb des Porennetzwerkes (Abbildung 4.5) zur Folge.

Diese Beziehung zwischen resultierender Grenzfläche und Blasenvolumen aus Abbildung 4.10 ist damit charakteristisch für jede Netzwerkgeometrie. Wäre die Netzwerkgeometrie nicht eine Mikromodell-Porenstruktur, sondern beispielsweise eine dicht gepackte Säule mit Kugeln, so wäre das Verhältnis von resultierender Grenzfläche zu Volumen bei einer wachsenden Gasblase unterschiedlich.

Somit kann die Gasproduktion durch Bakterien mit direktem Kontakt zur Blasengrenzfläche und die Diffusion über die Grenzfläche mit folgenden Gleichungen beschrieben werden:

Produziertes Volumen an Stickstoff:

$$V_{Prod}(N_2) = A_t \cdot R_{gas}^{N_2} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.5)$$

Diffundiertes Volumen an Stickstoff:

4.2 BGIs im Mikromodell

$$V_{Diff}(N_2) = Gf_t \cdot J^{N_2} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.6)$$

Verbrauchtes Volumen an Sauerstoff:

$$V_{Prod}(O_2) = -A_t \cdot R_{gas}^{O_2} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.7)$$

Diffundiertes Volumen an Sauerstoff:

$$V_{Diff}(O_2) = Gf_t \cdot J^{O_2} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.8)$$

Produziertes Volumen an N₂O:

$$V_{Prod}(N_2O) = A_t \cdot R_{gas}^{N_2O} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.9)$$

Diffundiertes Volumen an N₂O:

$$V_{Diff}(N_2O) = Gf_t \cdot J^{N_2O} \cdot \Delta t \cdot V_m \quad (4.10)$$

mit:

A_t = Resultierende Grenzfläche mit direktem Bakterienkontakt zum Zeitpunkt t in m²,

Gf_t = Aktive Grenzfläche mit Kontakt zum Medium zum Zeitpunkt t in m²,

$R_{gas}^{N_2}$ = Gasproduktionsrate von N₂ in mol/(m² s),

$R_{gas}^{O_2}$ = Verbrauchsrate von Sauerstoff in mol/(m² s),

$R_{gas}^{N_2O}$ = Gasproduktionsrate von N₂O in mol/(m² s),

Δt = Zeitabstand in s,

V_m = molares Volumen in m³/mol,

J^{N_2} , J^{O_2} , J^{N_2O} = diffusive Massenströme der Gase N₂, O₂ und N₂O gemäß der Gleichungen 2.5 bzw. 2.7 in mol/(m² s).

Vorgehen bei der Computersimulation:

Bei der Computersimulation des Gasblasenwachstums wurden die gemessenen Volumenkurven beider Blasen angenähert, indem die Gasproduktionsraten systematisch verändert wurden, bis die simulierten Kurven mit den gemessenen Kurven übereinstimmten.

Durch die gewählten Gasproduktionsraten wurde so der Verlauf der Gaskonzentrationen im vorbeiströmenden Medium (Gradienten) über die gesamte Länge des Mikromodells festgelegt. Bei einer Änderung der Gasproduktionsraten, änderten sich also auch die Verläufe der Gaskonzentrations-Gradienten im ganzen Mikromodell. Die Positionen der Blasen bestimmte damit dann automatisch die jeweiligen Konzentrationen im Medium in ihrer direkten Umgebung.

4.2 BGIs im Mikromodell

Zu Beginn wurde ein Gleichgewicht der Gasphase der Blasen mit der jeweiligen Gaskonzentration im Wasser an den Stellen der Blasen, gemäß der Henry-Gleichung, angenommen.

Im ersten Zeitschritt wurde nun die Gasproduktion durch die Bakterien berechnet und zu ihrem Anfangsvolumen addiert. Diese Änderung des Volumens bewirkte einen Konzentrationsunterschied zwischen der Blase und dem Wasser, welcher dann eine Diffusion über die aktive Grenzfläche nach sich zog. Anfänglich war die Blase ja im Gleichgewicht mit dem umgebenden Medium und wäre daher bei einer Gasproduktion von $R_{gas} = 0 \text{ mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ nicht gewachsen. Nach Beendigung jedes Zeitschritts wurden die diffundierten und produzierten Volumina zusammengezählt und so das neue Volumen der Gasblase für den folgenden Zeitschritt berechnet.

Tabelle 4.1: Parameter, und Kenngrößen der Simulationen des Blasenwachstums.

Kenngröße	Wert	Beschreibung	Quelle
$D(N_2)$	$2,01 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$	Diffusionskoeffizient von N_2	Ferrell et al. 1967, (71)
$D(O_2)$	$2,10 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$	Diffusionskoeffizient von O_2	Cussler 2009, (69)
$D(N_2O)$	$1,70 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$	Diffusionskoeffizient von N_2O	Versteeg et al. 1988, (72)
$k_H(N_2)$	$6,61 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{atm})$	Henry-Konstante von N_2	Stumm und Morgan 1996, (74)
$k_H(O_2)$	$1,26 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{atm})$	Henry-Konstante von O_2	Stumm und Morgan 1996, (74)
$k_H(N_2O)$	$2,57 \cdot 10^{-2} \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{atm})$	Henry-Konstante von N_2O	Stumm und Morgan 1996, (74)

4.2.4 Ergebnisse der Computersimulation des Gasblasenwachstums im Mikromodell

Da von vornherein nicht bekannt war, ob N_2 oder N_2O produziert und ob auch zusätzlich O_2 von den Bakterien verbraucht wurde, wurden die folgenden Fälle simuliert:

1. Ausschließliche Produktion von N_2 , kein gleichzeitiger Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem N_2/N_2O -Verhältnis von 1.

4.2 BGIs im Mikromodell

2. Ausschließliche Produktion von N_2O , kein gleichzeitiger Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ -Verhältnis von 0.
3. Gemeinsame Produktion von N_2 und N_2O , kein gleichzeitiger Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ -Verhältnis zwischen 1 und 0.
4. Ausschließliche Produktion von N_2 , mit gleichzeitigem Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ -Verhältnis von 1 bei gleichzeitig stattfindender aerober Atmung.
5. Ausschließliche Produktion von N_2O , mit gleichzeitigem Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ -Verhältnis von 0 bei gleichzeitig stattfindender aerober Atmung.
6. Gemeinsame Produktion von N_2 und N_2O , mit gleichzeitigem Verbrauch von O_2 .
Denitrifikation mit einem $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ -Verhältnis zwischen 1 und 0 bei gleichzeitig stattfindender aerober Atmung.

Bei richtiger Wahl der N_2 - und N_2O -Gasproduktions- bzw. O_2 -Verbrauchsraten konnten bei jedem der genannten Fälle die gemessenen und die simulierten Wachstumskurven der Gasblasen zur Deckung gebracht werden (Tabelle 4.2). Im Falle einer ausschließlichen N_2 -Produktion ohne gleichzeitigem O_2 -Verbrauch (Fall 1) gibt es nur eine mögliche Produktionsrate, um das Wachstum von beiden Blasen korrekt anzunähern, da die Gaskonzentration im umgebenden Wasser jeweils durch den sich herausbildenden N_2 -Konzentrationsgradienten festgelegt ist. Dasselbe gilt für die ausschließliche N_2O -Produktion ohne gleichzeitigem O_2 -Verbrauch (Fall 2).

4.2 BGIs im Mikromodell

Tabelle 4.2: Ergebnisse der erfolgreichen Simulationen des Blasenwachstums bei unterschiedlichen N_2 - und N_2O -Gasproduktions- bzw. O_2 -Verbrauchsrate.

Fall	$R_{gas}^{N_2}$ $\cdot 10^{-6}$ mol/(m ² ·h)	$R_{gas}^{N_2O}$ $\cdot 10^{-6}$ mol/(m ² ·h)	$R_{gas}^{O_2}$ $\cdot 10^{-6}$ mol/(m ² ·h)
1	2,40	0	0
2	0	88	0
3	zwischen 0 und 2,4	zwischen 0 und 88	0
4	maximal 8,40	0	maximal -11,3
5	0	maximal 310	maximal -11,3
6	2,20	72,0	-3,40

Wenn nun eine gemeinsame Produktion von N_2 und N_2O angenommen wird, so ist jedes beliebige N_2/N_2O -Verhältnis zwischen 0 und 1 möglich, da eine höhere N_2 -Produktion mit einer verminderten N_2O -Produktion ausgeglichen werden kann. Es gibt also zu jeder N_2 -Produktionsrate zwischen 0 und $2,4 \cdot 10^{-6}$ mol/(m²·h) genau eine zugehörige N_2O -Produktionsrate zwischen 0 und $88 \cdot 10^{-6}$ mol/(m²·h). Damit stellt Fall 3 einen Übergangsbereich zwischen den Extremfällen (Fälle 1 und 2) einer ausschließlichen Produktion von nur einer Gassorte dar.

Wird nun zusätzlich die Möglichkeit einer parallel ablaufenden aeroben Atmung (Verbrauch von O_2 , Fälle 4-6) mit in Betracht gezogen, so muss die bakterielle Gasproduktion entsprechend steigen, um die verminderte Diffusion von O_2 über die aktive Grenzfläche (Gas/Wasser) in die Blase auszugleichen. Es kann also eine höhere Gasproduktion von nur einer Gassorte (entweder N_2 oder N_2O) mit genau einem Wert für den O_2 -Verbrauch ausgeglichen werden. Dies geht jedoch nur soweit, bis die O_2 -Konzentration, durch den sich dabei bildenden Gradienten an der Stelle der zweiten Blase auf 0 gesunken ist. Eine weitere Erhöhung der Gasproduktion führt dann zu einem zu schnellen Wachstum der zweiten Blase, da hier die O_2 -Konzentration ja nicht weiter sinken kann. Bei einer Verbrauchsrate von $-11,3 \cdot 10^{-6}$ mol/(m²·h) ist die O_2 -Konzentration an der Stelle der zweiten Blase auf 0 gesunken, weshalb dies dann den beschriebenen Extremfall darstellt (Fall 4 für eine N_2 -Produktion und Fall 5 für eine N_2O -Produktion), siehe Tabelle 4.2. Daher beträgt, bei gleichzeitigem Sauerstoffverbrauch, die maximale N_2 -Produktionsrate $8,4 \cdot 10^{-6}$ mol/(m²·h), die maximale N_2O -Produktionsrate hingegen $310 \cdot 10^{-6}$ mol/(m²·h).

4.2 BGIs im Mikromodell

Da aber bei einer Anwesenheit von O_2 während der Denitrifikation die gleichzeitige Produktion von N_2 und N_2O jedoch am wahrscheinlichsten ist (Fall 6, aerobe und teilweise unvollständige Denitrifikation), ist zusätzlich eine Simulation bei einem derartigen Fall aufgeführt. Diese stellt dabei lediglich eine mögliche Situation von vielen denkbaren Möglichkeiten dar. Fall 6 im Allgemeinen erscheint jedoch das realistischste Szenario zu sein, da in der Literatur über eine unvollständige Denitrifikation (gemeinsame Produktion von N_2 und N_2O) bereits bei Anwesenheit geringer Mengen an O_2 am häufigsten berichtet wird (59, 62, 63, 65–67). In der Simulation wurde für das N_2/N_2O -Verhältnis der Gasproduktion dabei willkürlich ein Wert von 0,03 gewählt.

Im folgenden sind die Ergebnisse des Falles 6 aus Tabelle 4.2 in den Abbildungen 4.11 bis 4.15 grafisch dargestellt.

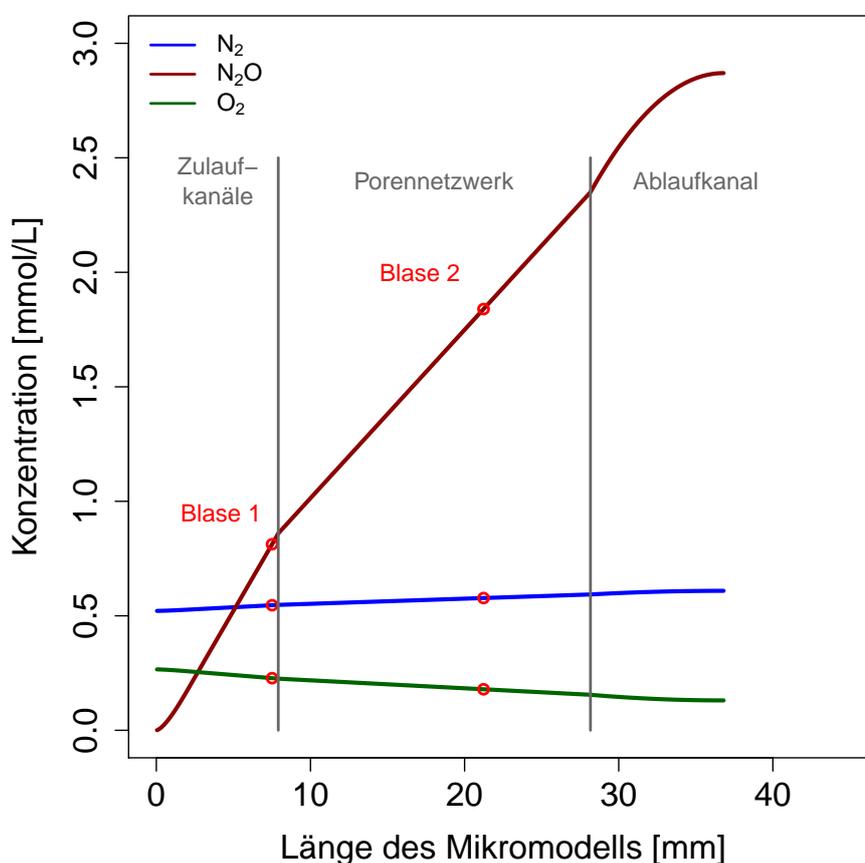


Abbildung 4.11: Verlauf der Gaskonzentration im Wasser des Mikromodells bei der Simulation von Fall 6 aus Tabelle 4.2. Bei 25 °C und 1 bar Druck lösen sich 0.661 mmol/L N_2 und 25.7 mmol/L N_2O , diese Werte werden nicht überschritten.

Blase außerhalb der Porenstruktur (Blase 1):

Bei dieser Simulation wurde ein Anfangsradius der Blase außerhalb der Mikromodell-Porenstruktur von 40 μm angenommen. Dies führte zu den in den Abbildungen 4.12 bis 4.13

4.2 BGIs im Mikromodell

dargestellten Kurven. Der Nullpunkt der Zeitachse ist dabei der Beginn der Videoaufnahmen ($t = 0$). Die Blase musste also bereits seit ungefähr 26 Stunden gewachsen sein, um auf die beobachtete Größe kommen zu können.

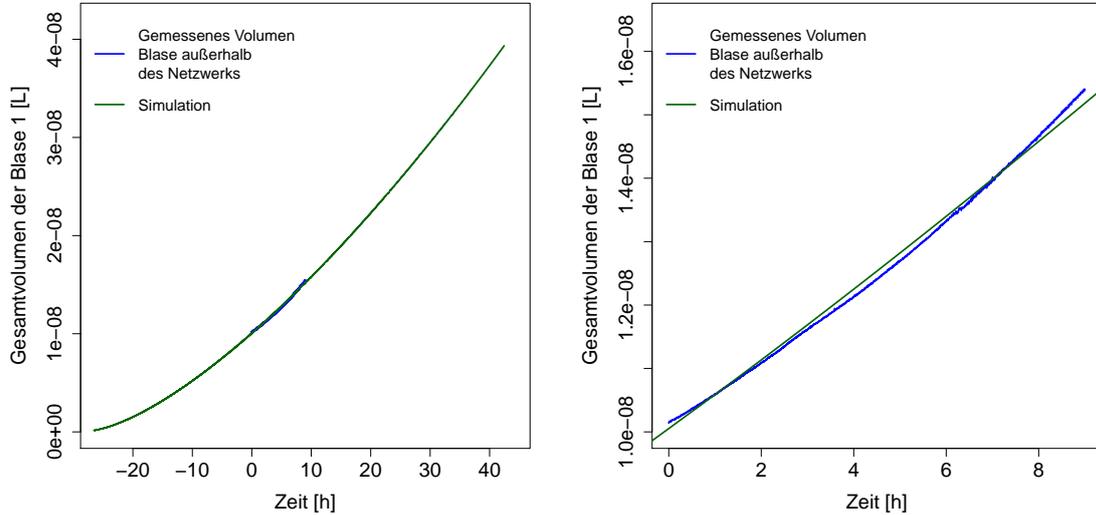


Abbildung 4.12: Simulation des Volumens der Blase 1 außerhalb der Porenstruktur. Links: Extrapolation der Wachstumskurve, beginnend bei einem Radius von $40 \mu\text{m}$. Rechts: Vergrößerung des Bereichs der Messung.

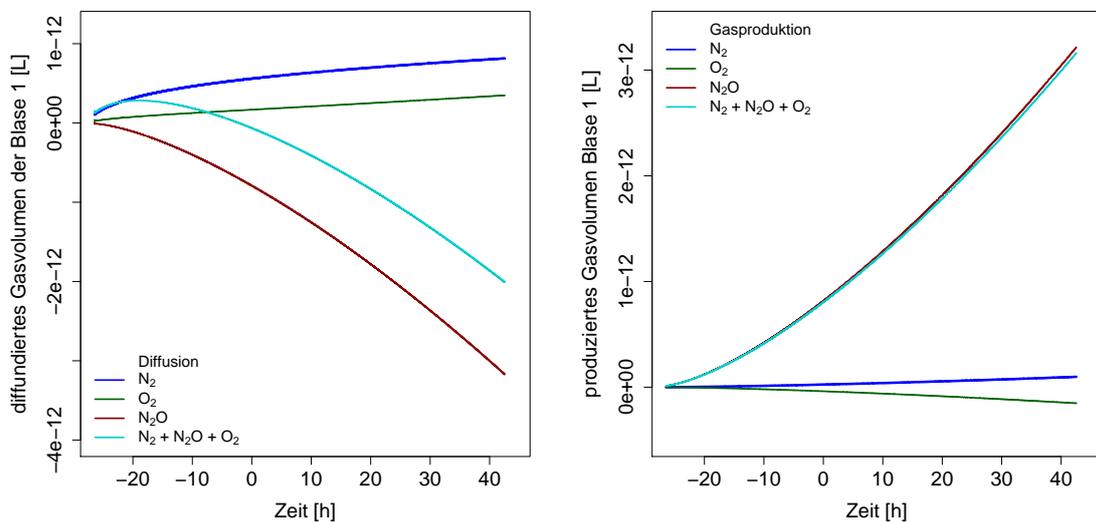


Abbildung 4.13: Blase 1. Links: über die Grenzfläche Gas/Wasser diffundierte Volumina der Gase N_2 , N_2O und O_2 . Rechts: Durch die Bakterien produzierten bzw. verbrauchten Volumina der Gase N_2 , N_2O und O_2 .

4.2 BGIs im Mikromodell

Die Partialdrücke innerhalb der Blase 1 blieben dabei die gesamte simulierte Zeit über nahezu konstant mit $p(\text{N}_2) = 0,792$, $p(\text{N}_2\text{O}) = 0,033$ und $p(\text{O}_2) = 0,175$.

Blase innerhalb der Porenstruktur (Blase 2):

Da die Grenzfläche mit Bakterienkontakt das produzierte Gasvolumen bestimmt, musste diese über die Beziehung aus Abbildung 4.10 jeweils aus dem Blasenvolumen errechnet werden. Dies ist eine Besonderheit eines porösen Netzwerkes und wird durch die Geometrie der direkten Blasen Umgebung bestimmt. Ebenfalls wird dadurch die Diffusion über die verbleibende, aktive Grenzfläche (Gas/Wasser) beeinflusst. Es war daher auch nicht möglich, wie bei der Blase außerhalb der Netzwerkstruktur, eine Extrapolation der Wachstumskurve über die beobachtete Zeit hinaus anzustellen.

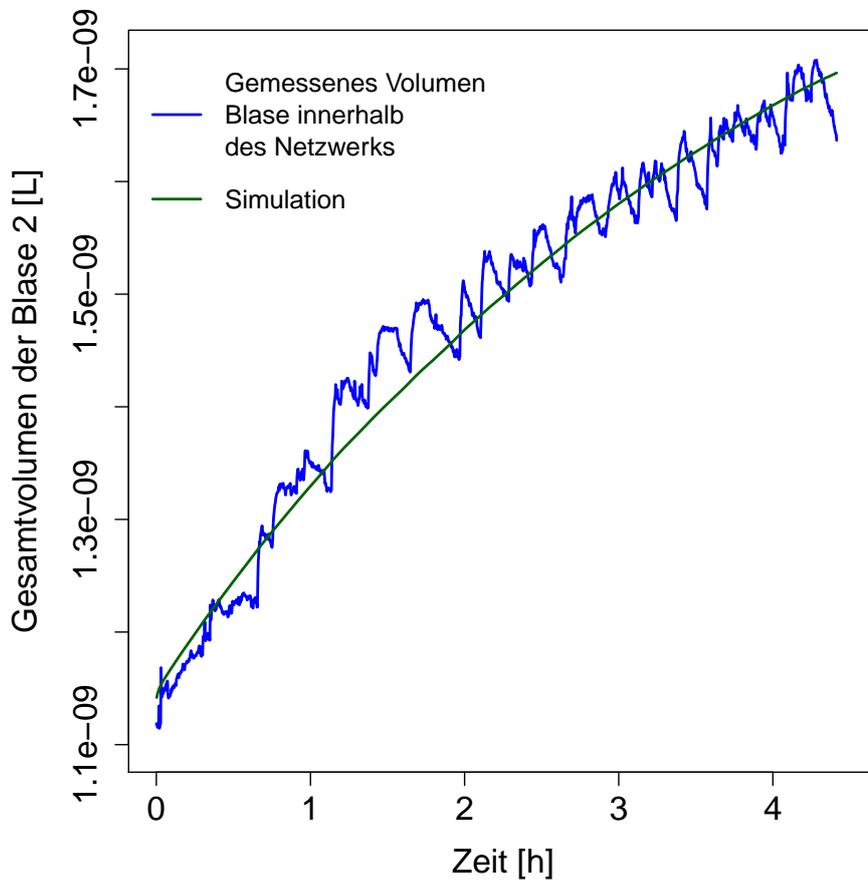


Abbildung 4.14: Simulation: Blase 2. Aufgrund der veränderten Beziehung zwischen der Blasenrenzfläche mit direktem Bakterienkontakt und aktiver Grenzfläche sowie anderer Gaskonzentrationen im Wasser, ergibt sich eine andere Kurvenform als bei Blase 1.

4.2 BGIs im Mikromodell

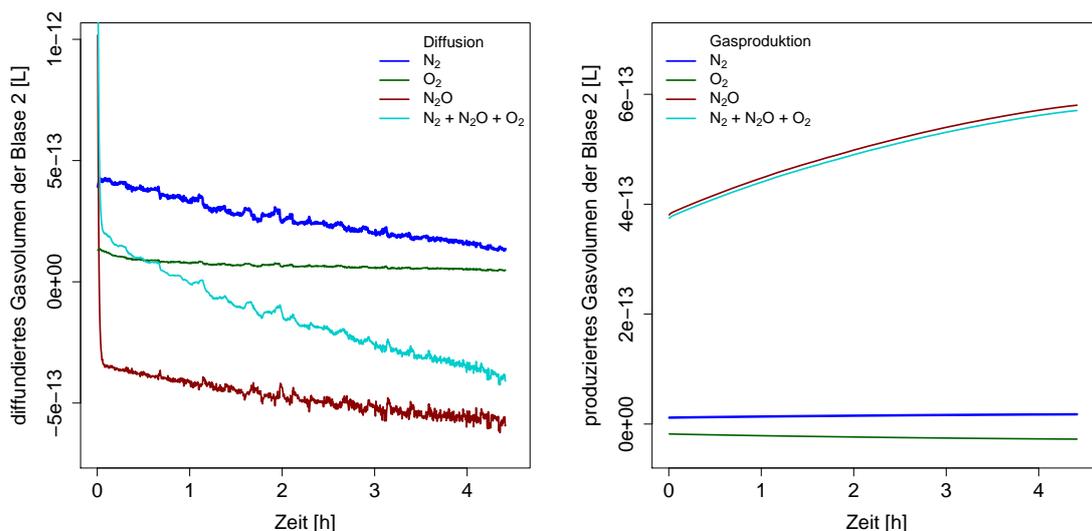


Abbildung 4.15: Blase 2. Links: über die Grenzfläche Gas/Wasser diffundierte Volumina der Gase N₂, N₂O und O₂. Rechts: Durch die Bakterien produzierten bzw. verbrauchten Volumina der Gase N₂, N₂O und O₂.

Die Partialdrücke innerhalb der zweiten Blase blieben, wie auch bei der ersten Blase, ebenfalls über die gesamte simulierte Zeit nahezu konstant mit $p(\text{N}_2) = 0,797$, $p(\text{N}_2\text{O}) = 0,069$ und $p(\text{O}_2) = 0,134$.

Die hier beschriebene Computersimulation der Diffusionsvorgänge und der Gasproduktion im Mikromodell unter Berücksichtigung der lokalen Geometrie des Porennetzwerks, liefert ein fundiertes und genaues Modell der ablaufenden Prozesse im Bereich von Mikrometern. In Verbindung mit dem Algorithmus zur Grenzflächenerkennung, ist es dadurch auch möglich andere Prozesse, wie z.B. die Auflösung von NAPL-Phasen quantitativ zu erfassen. Dieses Computermodell verknüpft damit Prozesse an unterschiedlichen Stellen miteinander und ermöglicht so ein ganzheitliche Sicht eines porösen Mikromodell-Netzwerks. Es kann also auch in Zukunft noch genutzt werden, um das System Mikromodell auf lange Frist besser zu beschreiben und zu verstehen.

4.2.5 Weiterführende Diskussion

Werden die Gasproduktionsraten von *Paracoccus denitrificans* aus dem Mikromodell-Versuch (Tabelle 4.2) theoretisch auf einen Boden übertragen, so würde dies nahe legen, dass Bakterien fähig wären, selbst in großer Tiefe noch Gasblasen zu erzeugen. Tabelle 4.3 zeigt die Drücke, welche in einem Boden mit dem beschriebenen porösen Netzwerk des Mikromodells, derselben Fließrate und bakteriellen Besiedelungsdichte sowie demselben Nährstoffgehalt im

4.2 BGIs im Mikromodell

Wasser, entstünden. Weiter ist zu sehen, welche Gasproduktionsraten bereits ausreichen würden, um jeweils genau den zusätzlichen Druck, der durch die darüber liegende Wassersäule entsteht, zu kompensieren (1 bar pro Meter). Diese theoretischen Gasproduktionsraten lägen dabei deutlich unter den Gasproduktionsraten aus dem Mikromodell-Versuch. Ebenfalls ist die O₂-Verbrauchsrate genannt, welche nötig wäre, um in genau einem Meter Tiefe allen im Wasser enthaltenen Sauerstoff gerade aufzubreuchen. Diese theoretische O₂-Verbrauchsrate liegt ebenfalls unterhalb der O₂-Verbrauchsrate aus dem Mikromodell-Versuch.

Tabelle 4.3: Simulationen des zusätzlichen Drucks durch eine Gasbeladung des Wassers aufgrund von bakterieller Denitrifikation unter den Bedingungen des Mikromodell-Versuchs. Die Drücke sind in atm angegeben, die Gasproduktionsraten in 10⁻⁶ mol/(m²·h).

Fall	$R_{gas}^{N_2}$	$R_{gas}^{N_2O}$	$R_{gas}^{O_2}$	p(N ₂) in 1 m Tiefe	p(N ₂ O) in 1 m Tiefe	p(O ₂) in 1 m Tiefe
1	2,40	0	0	3,73	0	0
2	0	88	0	0	3,51	0
4	8,40	0	-11,3	13,0	0	0
5	0	310	-11,3	0	12,4	0
6	2,20	72,0	-3,40	3,42	2,87	0
	0,65	0	0	1,01	0	0
	0	25,1	0	0	1,00	0
	0	0	-0,20	0	0	gerade 0

Eine Blasenbildung in großer Tiefe im Boden würde theoretisch den verfügbaren Porenraum für Wasser verkleinern. Dadurch müsste sich die Fließgeschwindigkeit erhöhen und die Verweilzeit an den biogeochemischen Grenzflächen verringern. Der Abbau von Schadstoffen durch Bakterien würde dabei ebenfalls abnehmen, verglichen mit einem Netzwerk des Bodens, in dem keine Blasenbildung stattfindet.

4.2 BGIs im Mikromodell

Literaturvergleich der Gasproduktionsraten:

Um die gemessenen Wachstumsraten und errechneten Gasproduktionsraten mit Literaturdaten vergleichen zu können, müssen zwangsweise Schätzungen vorgenommen werden, um Mengen und Einheiten ineinander umrechnen zu können. Wird für ein Bakterium von *Paracoccus denitrificans* ein Platzbedarf von $1 \times 1 \times 1 \mu\text{m}$ angenommen, so befinden sich in einer Monolage $1 \cdot 10^{12}$ Bakterien pro Quadratmeter. Nimmt man weiter an, dass die Dichte der Bakterien ungefähr der Dichte von Wasser entspricht, so wiegt eine Monolage von Bakterien ca. 1 g/m^2 .

Bergau et al. (54) fanden 2010 eine Denitrifikationsrate bei *Paracoccus denitrificans* von $0,55 \cdot 10^{-15} \text{ mol N}_2$ pro Zelle und Stunde. Mit der gerade gemachten Annahme von $1 \cdot 10^{12}$ Bakterien pro Quadratmeter in einer Monolage, ergäbe sich somit eine Gasproduktionsrate von $550 \cdot 10^{-6} \text{ mol N}_2/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$.

Das verwendete Nährmedium in der vorliegenden Arbeit war jedoch *Nutrient Bouillon* (Pepton: 5 g/L, Fleischextrakt 3 g/L, pH-Wert = 7) und nicht wie bei Bergau et al. Sistro's Medium (mit 34 mM Butandisäure als C-Quelle und 20 mM Phosphat-Puffer).

Baumann et al. gaben 1996 eine N_2 -Produktionsrate für *Paracoccus denitrificans* von $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/(\text{g Trockengewicht} \cdot \text{h})$ an (61). Diese ist wegen der Angabe in Trockengewicht leider nicht direkt vergleichbar, könnte aber mit der Annahme dass ca. 90 % des Bakteriengewichts bei der Trocknung verloren geht (11), eine weitere Abschätzung liefern. In diesem Falle wäre die Produktionsrate $140 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{g Nassgewicht} \cdot \text{h})$ und damit $140 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ in einer Bakterien-Monolage.

Wird der jeweilige Literaturwert der Gasproduktionsrate für die in dieser Arbeit kultivierten Bakterien angenommen, so lässt sich anhand der errechneten Werte eine Besiedelungsdichte der Bakterien-schicht im Mikromodell-Versuch abschätzen (Tabelle 4.4).

4.2 BGIs im Mikromodell

Tabelle 4.4: Vergleich der gemessenen und errechneten Gasproduktionsraten mit Literaturwerten. Es lässt sich die Besiedelungsdichte der Bakterienschicht im Mikromodell abschätzen.

Literaturstelle/ Produktionsrate	Gasproduktionsrate in $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}}$	Prozent an geschlossener Monolage
Bergaust et al. 2010, (54)	550	100 %
Baumann et al. 1996, (61)	140	100 %
Errechnete Produktionsraten im Mikromodell:		
Fall 1: N ₂ -Produktion, kein O ₂ -Verbrauch	$R_{gas}^{N_2} = 2,4$	0,4 % nach (54) 1,7 % nach (61)
Fall 4: N ₂ -Produktion, maximaler O ₂ -Verbrauch	$R_{gas}^{N_2} = 8,4$	1,5 % nach (54) 6,0 % nach (61)
Fall 2: N ₂ O-Produktion, kein O ₂ -Verbrauch	$R_{gas}^{N_2O} = 88$	16 % nach (54) 62,9 % nach (61)
Fall 5: N ₂ O-Produktion, maximaler O ₂ -Verbrauch	$R_{gas}^{N_2O} = 310$	56,4 % nach (54) 221 % nach (61)

Mit Hilfe von Mikromodellen ist die Aktivität von gasproduzierenden Bakterien in porösen Netzwerken mit vergleichsweise geringem Aufwand äußerst präzise (im nL-Bereich) messbar. In diesem Versuch wurden weder die Fließraten, noch die Nährstoffkonzentration des Mediums verändert. Es wäre jedoch denkbar, einen Versuchsaufbau in abgewandelter Form dafür zu benutzen, die Aktivität und die Reaktion von Bakterien auf die Veränderung von Bedingungen in eventuell zukünftig folgenden Arbeiten genauer zu charakterisieren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Bakterien ortsfest am Boden eines Mikromodells verbleiben, während das Medium über ihnen ausgetauscht werden kann. In herkömmlichen Versuchsaufbauten befinden sich die Bakterien in der Regel frei schwimmend in dem Medium. Ihr Wachstum kann damit nur schwer kontrolliert werden. Ebenfalls ist es nicht ohne weiteres möglich, die Zusammensetzung des Mediums unabhängig von der Bakterienkonzentration beliebig zu verändern. In einem Chemostat-Bioreaktor werden kontinuierlich Bakterien aus einem fließenden Gleichgewicht abgeführt, weshalb die Gesamtzahl an Bakterien abnimmt, sobald sich deren Teilungsrate zu sehr verlangsamt. In einem Mikromodell allerdings kann das vorbeiströmende Medium beliebig verändert werden, und sogar Nass/Trockenzyklen durch die

4.2 BGIs im Mikromodell

Injektion von Luftblasen simuliert werden. Die Unbeweglichkeit und auch konstante Anzahl der Bakterien bei gleichzeitiger freier Wahl der Zusammensetzung des vorbeiströmenden Mediums ermöglicht so ein weitaus breiteres Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten, das auch näher an den Bedingungen in realen Böden liegt. Damit können die Reaktionen von ein und denselben Bakterien auf wechselnde Bedingungen untersucht werden. Es könnten auf diese Weise also einzelne Bakterienkolonien getestet werden, und nicht wie bei Versuchen in Chemostat-Bioreaktoren immer andere Bakterien, welche dann nach einer durchschnittlichen Zeitspanne aus dem Versuch heraus geschwemmt werden und durch neue Bakterien ersetzt werden. Die potentielle Unsterblichkeit von Bakterien konnte in derartigen Versuchen daher bisher noch keine Rolle spielen. In dem genannten Versuch waren die Bakterien deshalb höchst wahrscheinlich älter, als sie es in einem Chemostat-Bioreaktor Versuch gewesen wären. Die Gasproduktion setzte auch erst 14 Tage nach Versuchsbeginn ein. Sie ist dabei ein sicherer und vergleichsweise leicht zugänglicher Marker für deren Aktivität.

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

Der Biofilm von *Paracoccus denitrificans* im Mikromodell wurde ebenfalls mit konventioneller Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Dazu wurde das Mikromodell noch während des laufenden Versuchs auf der Probenplattform des Raman-Mikroskops befestigt und Spektren an verschiedenen Punkten aufgenommen. Diese Versuche zeigten jedoch, dass die Sensitivität der Messanordnung bei einem derartigen experimentellen Aufbau zu gering war, um den Biofilm quantitativ charakterisieren zu können. Das Mikromodell-Deckglas (Durchmesser 550 μm) war unter anderem ein Grund, weshalb die Raman Signale nur abgeschwächt erhalten werden konnten. Einen chemischen Gradienten in der Nähe des Biofilms nachzuweisen war daher ebenfalls auf diese Weise nicht möglich.

Knauer et al. haben jedoch bereits gezeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe von oberflächenverstärkter Raman-Streuung an Silber-Nanopartikeln sogar einzelne Mikroorganismen zu detektieren und zu charakterisieren (33, 34, 140). Ziel der vorliegenden Arbeit war jedoch unter anderem die Quantifizierung von Konzentrationsgradienten in Lösung im Bereich weniger hundert Mikrometern. Die Anwendung von SERS für dieses Vorhaben ist jedoch neu und wurde in dieser Form noch nicht berichtet. Folgende Voraussetzungen sind dazu nötig:

1. Die Intensität eines SERS-Signals muss reproduzierbar mit der Konzentration des zugrundeliegenden Analyten in Verbindung gebracht werden können.
2. Die Sensitivität der Messung muss hoch sein (μM - nM), da natürliche Nährstoffkonzentrationen, wie sie an biogeochemischen Grenzflächen vorkommen, oft sehr gering sind.
3. Die Nanopartikel-Suspension für die Messungen muss mindestens 12 Stunden stabil sein aufgrund der großen Zeitspanne, die die Versuche mit einem Mikromodell in Anspruch nehmen.
4. Es muss eine reproduzierbare Messung direkt in einer Lösung möglich sein und nicht an Nanopartikeln, die nur an einer Oberfläche anhaften und damit unbeweglich sind.
5. Es müssen einerseits die Interaktionen zwischen den AgNPs und dem Analyten und andererseits die Wechselwirkungen zwischen den AgNPs und ihrer Umgebung (Matrix, NAPL) bekannt sein.

Für SERS-Messungen geeignete Nanopartikel wurden bereits in vielen verschiedenen Formen und Größen synthetisiert und charakterisiert (116), (115). Die in dieser Arbeit verwendeten Silber-Nanopartikel (AgNP) wurden analog zu Leopold und Lendl (114), jedoch

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

abgewandelt durch Knauer et al. (140), synthetisiert. Die Sensitivität bei SERS-Messungen konnte durch die Zugabe von NaCl stark verbessert werden (Agglomeration: Erhöhung der Anzahl von *hot spots*). Knauer et al. schlugen in früheren Arbeiten dabei eine NaCl-Konzentration zwischen 0,01 M 0,04 M vor (140), berichteten jedoch auch, dass die Stabilität der Nanopartikel-Suspension nach einer Zugabe von Salz stets begann abzunehmen.

Die Partikel reagierten sehr empfindlich auf die Salzkonzentration, und die Agglomerationsreaktion konnte mitunter sehr schnell verlaufen. Je nach vorherrschenden Bedingungen konnten dabei früher oder später nahezu alle Nanopartikel als Makro-Agglomerate durch Sedimentation aus der Lösung entfernt werden.

Wurde beispielsweise NaCl zu den hier verwendeten AgNP gegeben, sodass die letztendliche NaCl-Konzentration 0,03 M betrug (wie von Knauer et al. für eine maximale SERS-Verstärkung vorgeschlagen (140)), so färbte sich die Suspension augenblicklich metallisch grau. Wurde sofort nach Zugabe des Salzes ein SERS-Spektrum aufgenommen, so konnte zwar eine gute SERS-Verstärkung beobachtet werden, jedoch war die Suspension nach ungefähr 2 Stunden bereits SERS-inaktiv (vgl. Abbildung 4.18). Einer derartige Salzkonzentration eignet sich daher nur für Messungen an Nanopartikeln, welche sich auf einer Oberfläche befinden, nicht jedoch für Messungen in freier Lösung.

Die UV/VIS-Spektroskopie ist dabei eine gut geeignete Methode, um Aussagen über Änderungen in der optischen Dichte der AgNP-Suspension zeitlich zu verfolgen. Die optische Dichte ist eng mit der Teilchengröße in der Suspension und damit mit dem Grad der Agglomeration verknüpft. Abbildung 4.16 zeigt UV/VIS-Spektren der in dieser Arbeit verwendeten Silber-Nanopartikel nach ihrer Synthese.

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

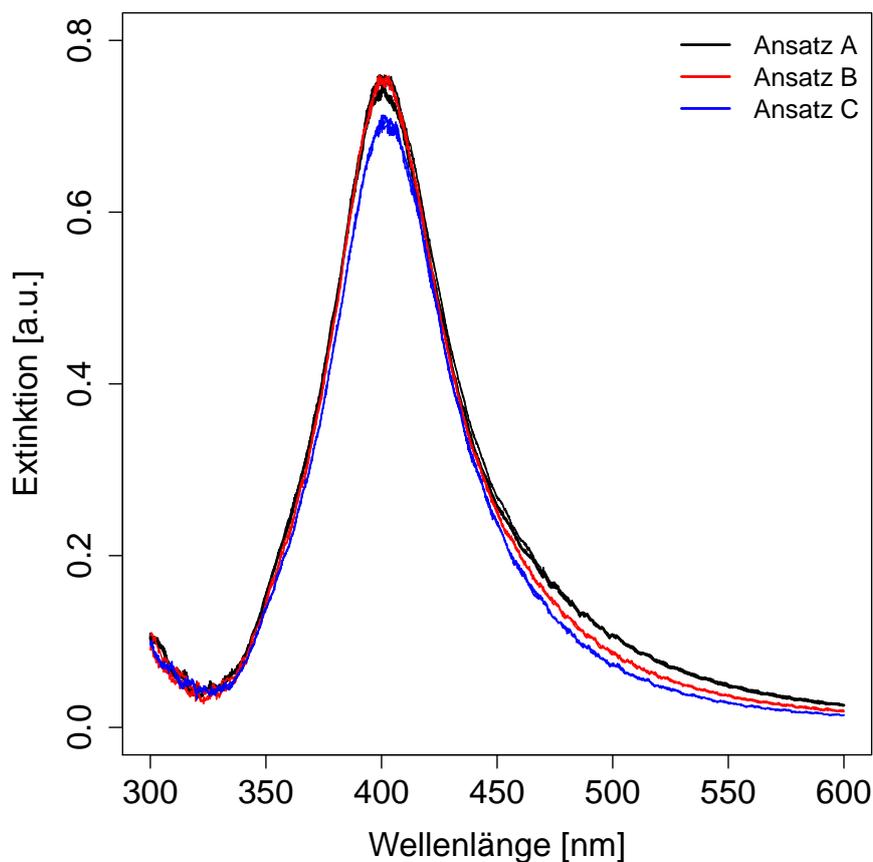


Abbildung 4.16: UV/VIS-Spektren von unbehandelten AgNPs. Gezeigt sind drei wiederholte Syntheseansätze (= Ansatz A - C).

Die Spektren hatten ein Absorptionsmaximum bei 402 nm und wiesen eine gute Reproduzierbarkeit über mehrfache Synthesen auf. Weiter ist in Abbildung 4.16 keine Schulter zu sehen, was für eine monodisperse Größenverteilung der Nanopartikel spricht. Die Spektren stimmen damit gut mit denen von Knauer et al. überein (140).

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

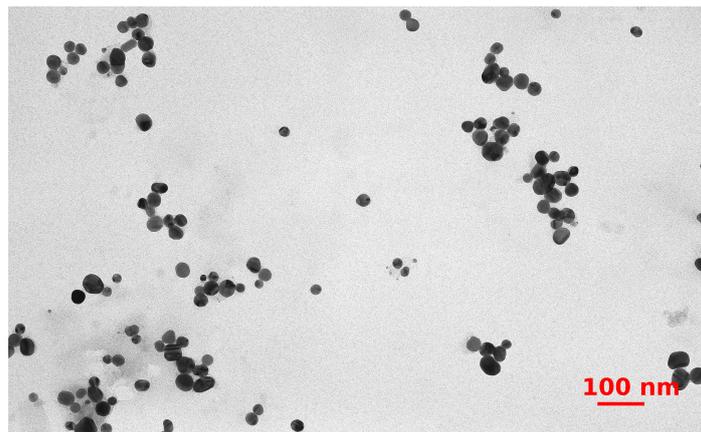


Abbildung 4.17: TEM-Aufnahme von unbehandelten und nicht präagglomerierten AgNPs. Die Verbände der Nanopartikel sind höchst wahrscheinlich durch Trocknungseffekte entstanden und können damit nicht als Beweis für die Bildung von Agglomeraten in der Suspension vor dem Eintrocknen dienen. Aufnahme: Dr. Marianne Hanzlik, TUM.

Für die Nanopartikel wurde aus TEM-Aufnahmen (Abbildung 4.17) ein durchschnittlicher Radius der Primärpartikel von 16 nm (+/- 5nm) bestimmt.

Abbildung 4.18 zeigt die zeitlich aufgelöste Abnahme der Intensität des Absorptionsspektrums der Nanopartikel bei einer NaCl-Konzentration von 0,03 M.

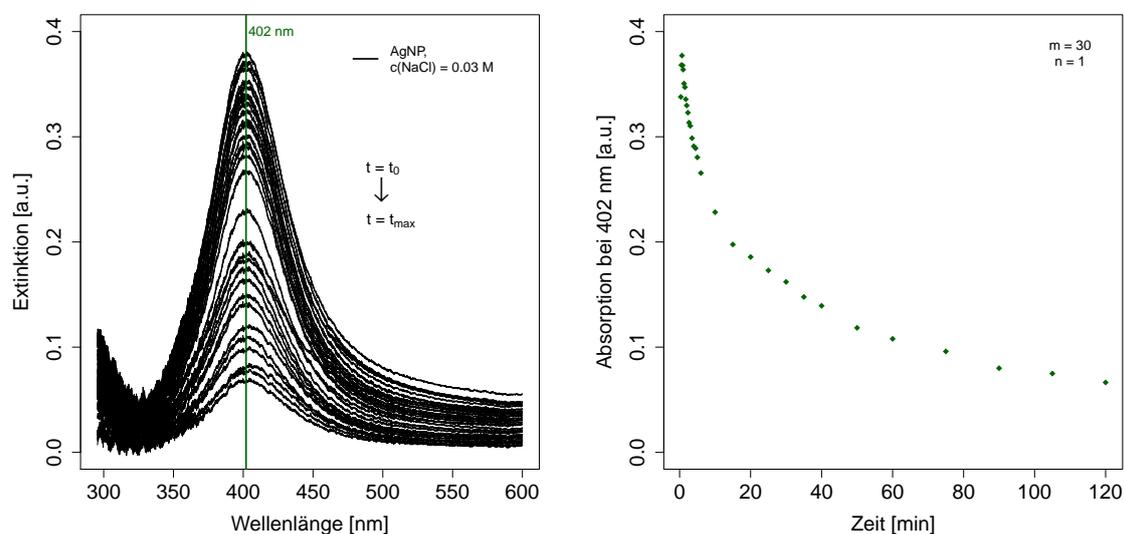


Abbildung 4.18: Abnahme der Intensität (links) und des Absorptionsmaximums bei 402 nm (rechts) einer AgNP-Suspension über die Zeit bei einer NaCl-Konzentration von 0,03 M. Aufgrund der schnellen Reaktion konnte jeweils nur eine Probe pro Messpunkt genommen werden.

Dabei verringerte sich die Intensität der gesamten Absorptionsbande. Es bildeten sich keine Schultern und es konnten auch keine Änderungen anderer spektraler Attribute gefunden werden (Abbildung 4.18, links). Nach nicht einmal zwei Stunden war die Suspension bereits

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

soweit agglomeriert, dass mit dem bloßen Auge deutlich Makro-Agglomerate am Gefäßboden zu sehen waren. Da bei SERS-Messungen die geometrische Form der Agglomerate und ihre Größe (also Anzahl an Nanopartikeln pro Agglomerat) maßgeblich die SERS-Verstärkung beeinflussen, war dieses Vorgehen für die quantitative Analyse ungeeignet. Es würde sich bei einer zeitlich nicht stabilen AgNP-Suspension, also bei einem fortlaufenden Wachstum der NP-Agglomerate, ebenfalls die SERS-Verstärkung und damit die Signalintensität zeitlich verändern. Damit würde eine konstante und reproduzierbare Beziehung zwischen der Konzentration und der SERS-Signalintensität fehlen.

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

Präagglomeration:

Ein Weg die Silber-Nanopartikel für SERS-Analysen in Lösung empfindlicher und gleichzeitig stabiler gegen Agglomeration zu machen, ist die Verwendung einer geringeren Menge Salz und die Verdünnung mit Wasser nach einer definierten Zeitspanne. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die NaCl-Konzentration auf 0,015 M einzustellen und nach genau 5 Minuten das doppelte Volumen an Wasser zuzugeben. Die Ionenkonzentration und auch die Nanopartikel-Konzentration werden dabei verringert, beide Konzentrationen beeinflussen maßgeblich die Agglomerationsgeschwindigkeit.

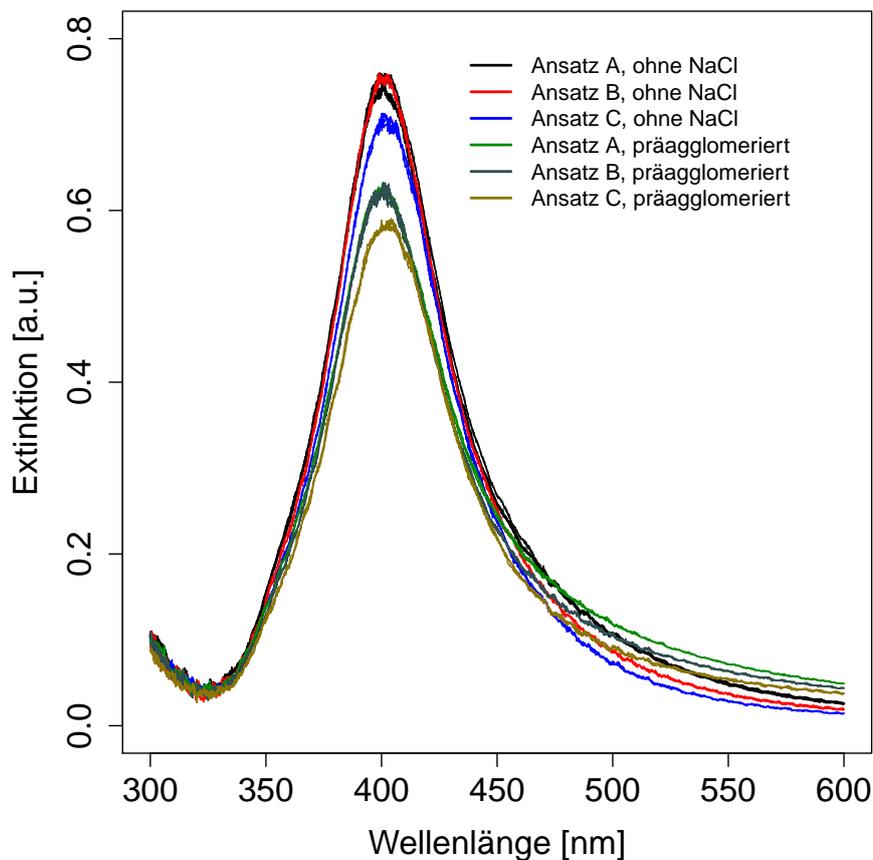


Abbildung 4.19: UV/VIS-Spektren von unbehandelten und präagglomerierten AgNPs. Durch Zugabe von NaCl ($c = 0,015$ M) und Verdünnung nach fünf Minuten wurde eine kontrollierte Agglomeration eingeleitet.

Die so behandelten, präagglomerierten AgNPs wiesen eine bessere SERS-Verstärkung auf, als die unbehandelten AgNPs. Sie konnten einfach und gut reproduzierbar synthetisiert werden, waren unempfindlicher gegen weitere Agglomeration und eigneten sich, wie später noch gezeigt werden soll, für quantitative SERS-Messungen in freier Lösung. Die Intensität des Absorptionsmaximums bei 402 nm des UV/VIS-Spektrums änderte sich nach einer Präagglomeration innerhalb von 4 Tagen nicht mehr signifikant (Abbildung 4.20)

4.3 Modifizierung (Präagglomeration) von Silber-Nanopartikeln für quantitative SERS-Messungen

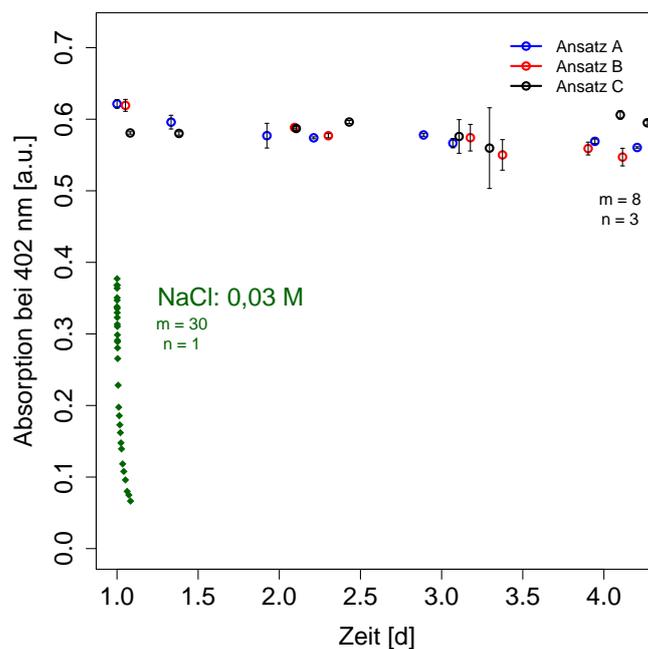


Abbildung 4.20: UV/VIS-Messung: Das Absorptionsmaximum der präagglomerierten AgNPs änderte sich nicht mehr signifikant (Ansatz A - C). Grüne Kurve: Vergleichsmessung, Absorptionsmaximum bei $c(\text{NaCl}) = 0,03 \text{ M}$ aus Abb. 4.18, rechts.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Um die Eignung von SERS in freier Lösung als quantitative Analysemethode zu untersuchen, wurde der Farbstoff CV als Modellsubstanz verwendet. Die maximale Löslichkeit von CV in Wasser ist ungefähr $1 \cdot 10^{-2}$ M. Die CV-Konzentration, bei der noch ein Spektrum mit konventioneller Raman-Mikrospektroskopie (wenn auch mit schlechtem S/N-Verhältnis) erhalten werden kann, ist abhängig von den verwendeten Messparametern, wie der Laserleistung, der Akquisitionszeit, der Vergrößerung und der Größe der Lochblende. Sie befand sich bei der Messanordnung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ M und $1 \cdot 10^{-5}$ M (siehe Abbildung 4.21).

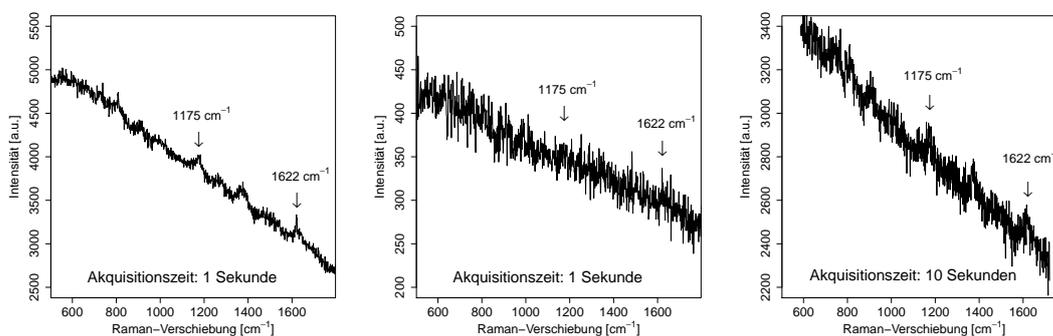


Abbildung 4.21: Konventionelle Raman-Spektren von CV ohne SERS, links: $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-4}$ M, 1 s Akquisitionszeit; Mitte: $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-5}$ M, 1 s Akquisitionszeit; rechts: $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-5}$ M, 10 s Akquisitionszeit.

In der Literatur wurde bereits vielfach die Verwendung von SERS für einen Nachweis von CV bei sehr geringen Konzentrationen erwähnt (100), (165), (144). Es konnten dabei bisher jedoch keine dauerhaft beobachtbaren Signale erhalten werden (typischer Weise bei $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-10}$ M bis $1 \cdot 10^{-14}$ M). In diesem Konzentrationsbereich verschwinden SERS-Signale nach ihrer Entstehung in Bruchteilen von Sekunden wieder. Weiter ist es dabei nicht möglich von der Intensität eines SERS-Signals auf die Konzentration zu schließen (siehe Abbildung 4.22). Das Fehlen von Reproduzierbarkeit ist ein generelles Problem bei der Signalverstärkung durch SERS.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

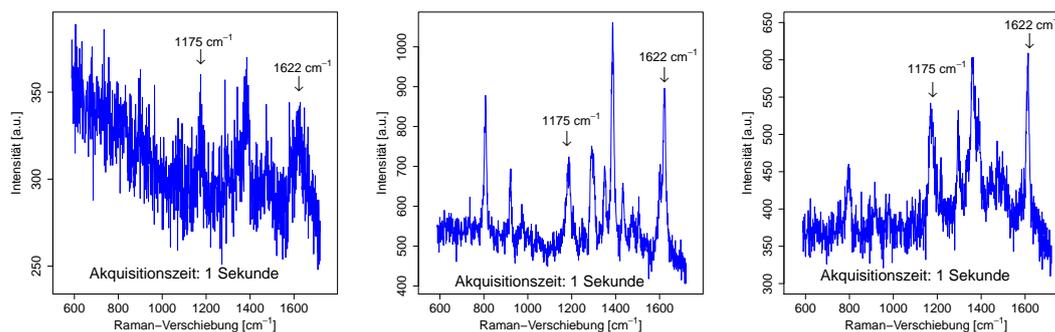


Abbildung 4.22: SERS-Spektren von CV, links : $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-12}$ M; Mitte: $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-13}$ M; rechts: $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-14}$ M, je 1 s Akquisitionszeit. Die gezeigten Spektren stammen aus Versuchsreihen, in denen zwischen 500 und 1000 Spektren pro Versuch aufgezeichnet wurden. Jedoch nur extrem selten wurden dabei SERS-Spektren erhalten.

Die SERS-Spektren aus Abbildung 4.22 wurden bei einer NaCl-Konzentration von 0,03 M ohne vorherige Präagglomeration erhalten.

4.4.1 Reproduzierbare Quantifizierung von Kristallviolett

Abbildung 3.5 zeigt das Vorgehen, mit welchem der Zusammenhang zwischen der Analyt-Konzentration und der SERS-Signalintensität untersucht wurde. Die Messungen fanden dabei in einem Glasobjektträger mit Vertiefungen statt. Der Fokus des Raman-Laserstrahls befand sich bei allen Messungen in der freien Lösung und nicht auf einer Oberfläche mit adsorbierten oder sedimentierten Nanopartikeln.

Für eine Quantifizierung wurde die Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} des basislinienkorrigierten SERS-Spektrums betrachtet. Diese wurde gegen die CV-Konzentration aufgetragen. Diese Wellenzahl entspricht der antisymmetrischen Streckschwingung der C-H-Bindungen und der C-C-Bindungen innerhalb der Ebene der Phenylringe des CVs (144) (für die chemische Struktur von CV vgl. Abbildung 2.7). In den Versuchen zeigte sich, dass bei einer CV-Konzentration oberhalb von $5 \cdot 10^{-9}$ M ein kontinuierliches SERS-Signal aus dem Hintergrundrauschen aufzutauchen begann.

Insgesamt wurde der Konzentrationsbereich mit Kalibrierkurven von $5 \cdot 10^{-9}$ M bis $1 \cdot 10^{-7}$ M achtmal in Folge untersucht. Die Messungen bestanden dabei aus zwei identischen Messreihen: 4 x Ansatz A und 4 x Ansatz B als Wiederholungsmessung. Zwei dieser acht Kalibrierkurven sind in den Abbildungen 4.23 und 4.24 dargestellt.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

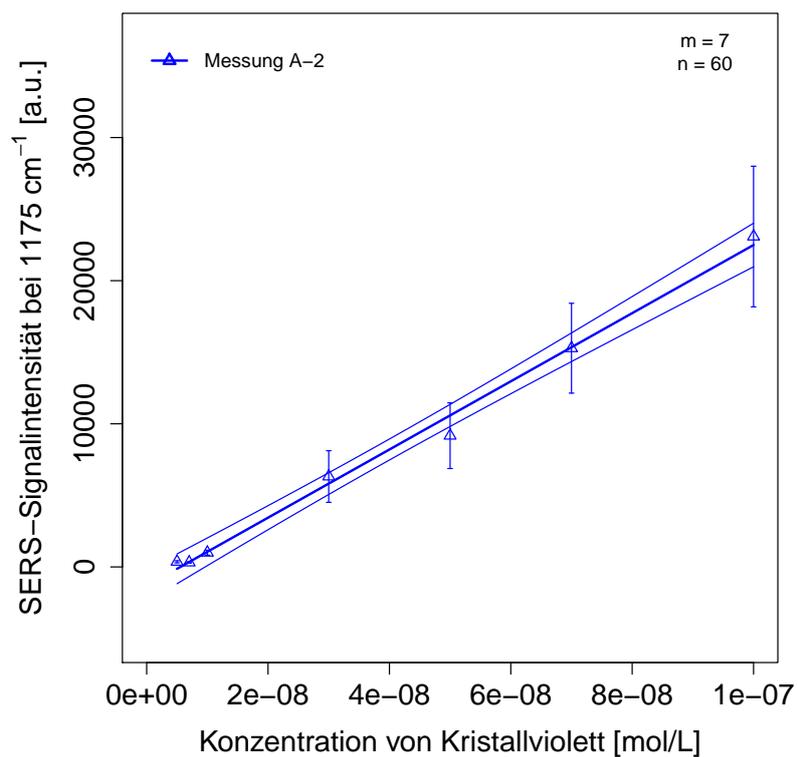


Abbildung 4.23: Messung A-2 der Messreihe Ansatz A. Jedem Datenpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 20 Einzelspektren (ES) zugrunde. Die Ausgleichsgerade zeigt ein Konfidenzintervall mit einem Konfidenzniveau von 95 %. Akquisitionszeit 10×1 s pro ES, Laserl. 100 % (14 mW), 20x W Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

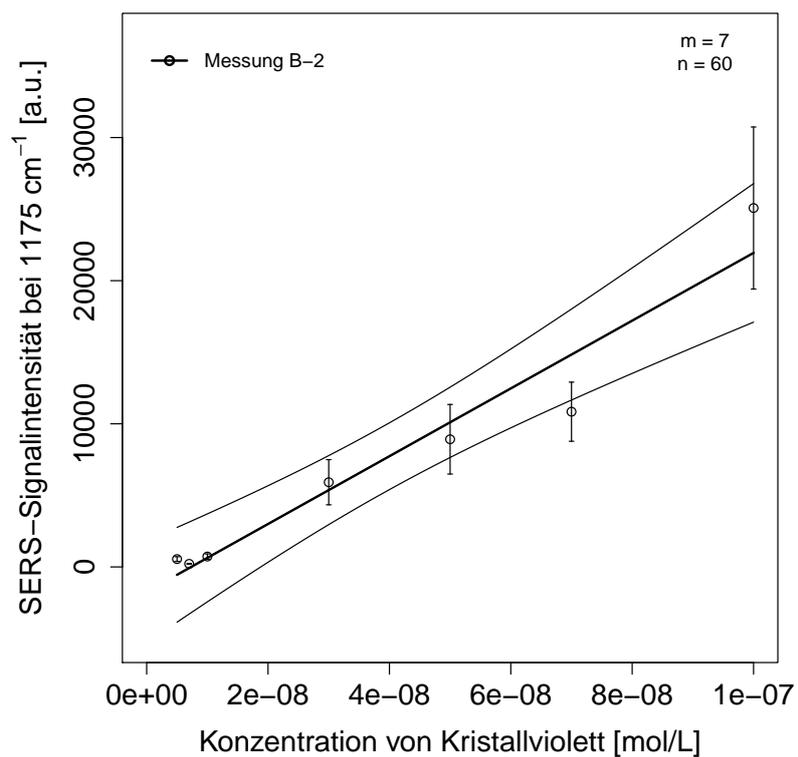


Abbildung 4.24: Messung B-2 der Messreihe Ansatz B. Jedem Datenpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 20 Einzelspektren (ES) zugrunde. Die Ausgleichsgerade zeigt ein Konfidenzintervall mit einem Konfidenzniveau von 95 %. Akquisitionszeit 10×1 s pro ES, Laserl. 100 % (14 mW), 20x W Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

Tabelle 4.5: Koeffizienten der linearen Ausgleichsgeraden aller Messungen der Messreihe zu der Kalibration für den Analyten CV bei quantitativen SERS-Messungen.

Messreihe/ Ansatz	Wiederholung/ Kalibrierkurve	Steigung m der Ausgleichsgerade	Ordinatenabschnitt t der Ausgleichsgerade	R^2
Ansatz A	Messung A-1	$2,26 \cdot 10^{11} \pm 2,54 \cdot 10^{10}$	$-1,01 \cdot 10^3 \pm 1,41 \cdot 10^3$	0,95
	Messung A-2	$2,38 \cdot 10^{11} \pm 8,49 \cdot 10^9$	$-1,32 \cdot 10^3 \pm 4,36 \cdot 10^2$	0,99
	Messung A-3	$1,66 \cdot 10^{11} \pm 7,09 \cdot 10^9$	$-0,43 \cdot 10^3 \pm 3,64 \cdot 10^2$	0,99
	Messung A-4	$2,32 \cdot 10^{11} \pm 3,49 \cdot 10^{10}$	$-2,34 \cdot 10^3 \pm 1,94 \cdot 10^3$	0,92
Ansatz B	Messung B-1	$2,11 \cdot 10^{11} \pm 3,38 \cdot 10^{10}$	$0,57 \cdot 10^3 \pm 1,73 \cdot 10^3$	0,89
	Messung B-2	$2,37 \cdot 10^{11} \pm 2,70 \cdot 10^{10}$	$-1,73 \cdot 10^3 \pm 1,39 \cdot 10^3$	0,94
	Messung B-3	$1,70 \cdot 10^{11} \pm 1,65 \cdot 10^{10}$	$-0,99 \cdot 10^3 \pm 8,48 \cdot 10^2$	0,96
	Messung B-4	$1,77 \cdot 10^{11} \pm 3,21 \cdot 10^{10}$	$-1,98 \cdot 10^3 \pm 1,78 \cdot 10^3$	0,89
Ansatz A	Mittelwert	$2,16 \cdot 10^{11}$	$-1,28 \cdot 10^3$	
	Standard- abweichung σ	$0,33 \cdot 10^{11}$	$0,80 \cdot 10^3$	
	Varianz	$1,10 \cdot 10^{21}$	$6,43 \cdot 10^5$	
Ansatz B	Mittelwert	$1,99 \cdot 10^{11}$	$-1,04 \cdot 10^3$	
	Standard- abweichung σ	$0,31 \cdot 10^{11}$	$1,15 \cdot 10^3$	
	Varianz	$9,65 \cdot 10^{20}$	$1,32 \cdot 10^6$	

In Tabelle 4.5 sind die Koeffizienten der linearen Regression der insgesamt acht Kalibrierkurven der zwei Messreihen (Ansatz A und Ansatz B) zu sehen. In den Abbildungen 4.23 und 4.24 ist ein repräsentativer Ausschnitt der Messreihen gezeigt (Messung A-2 und Messung B-2).

Es ist zu sehen, dass die Intensität der Bande bei 1175 cm^{-1} und damit die Intensität des CV-SERS-Spektrums mit steigender CV-Konzentration linear zunimmt. Der Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ bis $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ wurde viermal an vier aufeinander folgenden Tagen gemessen. Für jede Konzentration wurden 20 Einzelspektren aufgenommen (Akquisitionszeit pro Einzelspektrum $10 \times 1 \text{ s}$) und drei Wiederholungen gemacht.

Für die Wiederholung der gesamten Messreihe mit neu synthetisierten, präagglomerierten AgNPs zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit (Ansatz B). In Tabelle 4.6 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aller SERS-Signalintensitäten der jeweiligen CV-Konzentrationen der zwei Messreihen Ansatz A und Ansatz B angegeben. Zusätzlich dazu wird auch der Quotient aus Standardabweichung und Signalintensität (relative Standardab-

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

weichung oder Variationskoeffizient) angegeben.

Tabelle 4.6: Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen der SERS-Signalintensitäten der zwei Messreihen Ansatz A und Ansatz B zur Kalibration für den Analyten CV.

	CV-Konzentration	Mittelwert aller Einzelmessungen	Standardabweichung	relative Standardabweichung
Ansatz A	$5 \cdot 10^{-9}$ M	$4,75 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$	0,32
	$7 \cdot 10^{-9}$ M	$2,95 \cdot 10^2$	$0,23 \cdot 10^2$	0,08
	$1 \cdot 10^{-8}$ M	$9,28 \cdot 10^2$	$1,16 \cdot 10^2$	0,13
	$3 \cdot 10^{-8}$ M	$5,85 \cdot 10^3$	$1,06 \cdot 10^3$	0,18
	$5 \cdot 10^{-8}$ M	$8,84 \cdot 10^3$	$2,28 \cdot 10^3$	0,26
	$7 \cdot 10^{-8}$ M	$1,20 \cdot 10^4$	$2,21 \cdot 10^3$	0,18
	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$2,17 \cdot 10^4$	$3,57 \cdot 10^3$	0,16
Ansatz B	$5 \cdot 10^{-9}$ M	$5,38 \cdot 10^2$	$3,14 \cdot 10^2$	0,58
	$7 \cdot 10^{-9}$ M	$2,80 \cdot 10^2$	$0,65 \cdot 10^2$	0,24
	$1 \cdot 10^{-8}$ M	$8,34 \cdot 10^2$	$4,19 \cdot 10^2$	0,50
	$3 \cdot 10^{-8}$ M	$5,66 \cdot 10^3$	$1,71 \cdot 10^3$	0,30
	$5 \cdot 10^{-8}$ M	$9,09 \cdot 10^3$	$5,51 \cdot 10^3$	0,60
	$7 \cdot 10^{-8}$ M	$1,04 \cdot 10^4$	$3,08 \cdot 10^3$	0,30
	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$2,02 \cdot 10^4$	$3,28 \cdot 10^3$	0,16

Der Mittelwert aller relativen Standardabweichungen aller Einzelmessungen (Messung A-1 bis Messung A-4) der Messreihe Ansatz A betrug 0,21 oder 21 %, der Mittelwert aller relativen Standardabweichungen der Messreihe Ansatz B betrug 0,27 oder 27 % (nicht in Tabelle 4.6 enthalten). Bei der Messreihe Ansatz A lagen alle Messpunkte innerhalb der $2 \cdot \hat{\sigma}$ Grenze. Lediglich 2 von 27 Messpunkten zeigten bei der Messreihe Ansatz B eine signifikante Abweichung von der $2 \cdot \hat{\sigma}$ Grenze um den Mittelwert der relativen Standardabweichungen.

In den Abbildungen 4.25 und 4.26 sind die Mittelwerte über jeweils eine gesamte Messreihe Ansatz A und Ansatz B zusammen mit der linearen Regression und einem Konfidenzintervall (Konfidenzniveau von 95 %) gezeigt (vgl. Tabelle 4.6).

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

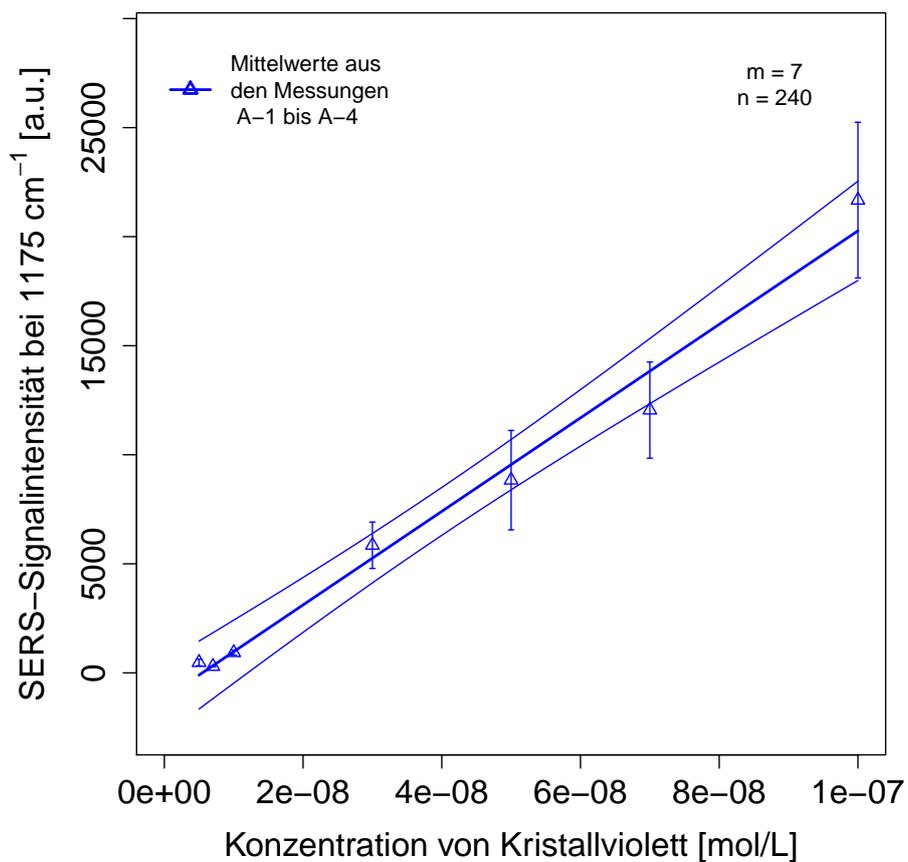


Abbildung 4.25: Mittelwerte der gesamten Messreihe Ansatz A (Messungen A-1 bis A-4 aus Tabelle 4.6) mit linearer Regression (siehe Tabelle 4.7). Jedem Datenpunkt liegen 240 Einzelspektren (ES) zugrunde (n in Tabelle 4.7). Es ist ein Konfidenzintervall mit einem Konfidenzniveau von 95 % eingezeichnet.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

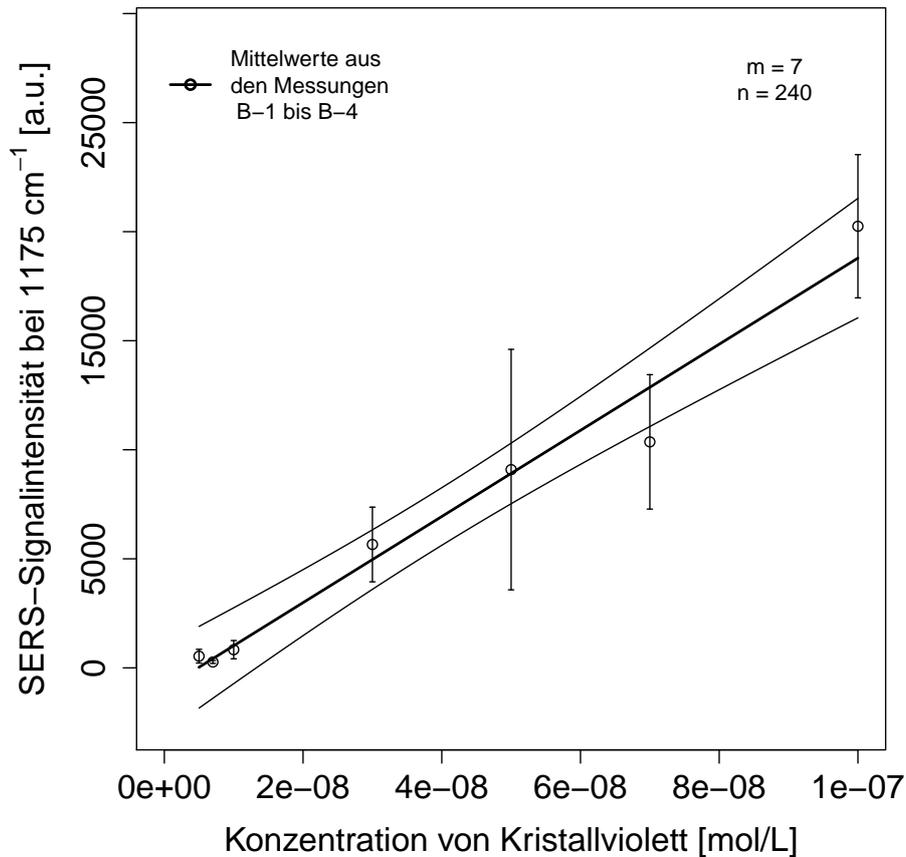


Abbildung 4.26: Mittelwerte der gesamten Messreihe Ansatz B (Messungen B-1 bis B-4 aus Tabelle 4.6) mit linearer Regression (siehe Tabelle 4.7). Jedem Datenpunkt liegen 240 Einzelspektren (ES) zugrunde (n in Tabelle 4.7). Es ist ein Konfidenzintervall mit einem Konfidenzniveau von 95 % eingezeichnet.

Tabelle 4.7: Koeffizienten der linearen Ausgleichsgeraden der Mittelwerte der Messreihen Ansatz A und Ansatz B.

Ansatz - Wiederholung	Steigung m	Ordinatenabschnitt t	R^2	n
Mittelwerte der Messungen A-1 bis A-4	$2,14 \cdot 10^{11} \pm 1,27 \cdot 10^{10}$	$- 1,72 \cdot 10^3 \pm 6,52 \cdot 10^2$	0,98	240
Mittelwerte der Messungen B-1 bis B-4	$1,97 \cdot 10^{11} \pm 1,53 \cdot 10^{10}$	$- 0,96 \cdot 10^3 \pm 7,85 \cdot 10^2$	0,97	240

Diese Versuche zeigen, dass es durchaus möglich ist, mit Hilfe von SERS quantitative Messungen auch ohne komplizierten Versuchsaufbau (*Lab-on-a-Chip* Verfahren), wie er bei-

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

spielsweise bei Keir et al. (137), Strehle et al. (36), März et al. (37) oder Kämmer et al. (38) beschrieben wurde, durchzuführen.

Die Daten aus den Tabellen 4.5 und 4.6 legen den Schluss nahe, dass es nötig ist, bei quantitativen SERS-Messungen zeitnah eine Kalibrierkurve für die jeweils verwendete Nanopartikel-Suspension aufzustellen. Damit würde also jede Messung ihre spezifische Kalibrierkurve benötigen, um zuverlässige Ergebnisse zu liefern.

Experimentell betrachtet ist ein Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Signalintensität nur dann gegeben, wenn die Analyt-Konzentration auf der Oberfläche der Nanopartikel-Agglomerate entweder hoch genug ist oder immer genug beladene *hot spots* in dem Fokus des Laserstrahls sind. Weiter können bei einer SERS-Messung in freier Lösung Nanopartikel-Agglomerate in das Fokusvolumen des Laserstrahls hinein und wieder hinaus diffundieren, bzw. können durch Konvektion nachgeliefert werden. Eine viel bessere statistische Mittelung der Signalstärke ist damit die Folge, verglichen mit einer Messung an unbeweglichen Nanopartikeln, welche auf einer makroskopischen Oberfläche liegen.

In der Literatur ist bei SERS-Messungen an bereits sedimentierten und damit unbeweglichen Nanopartikeln, immer eine sehr geringe Analyt-Konzentration zu finden (138, 139, 142–145). Diese Tatsache ist anscheinend dafür verantwortlich, dass ebenfalls nie genügend besetzte *hot spots* in Fokus des Lasers sind, um ein statistisch gemittelt Signal zu erzeugen. Die Folge sind intensive SERS-Spektren, sobald zufällig ein belegter *hot spot* in den Fokus kommt, aber kein konzentrationsabhängiges und dauerhaft beobachtbares Signal. Dieser Fall ist somit vergleichbar mit einer sehr geringen CV-Konzentration (typischerweise unterhalb von $1 \cdot 10^{-9}$ M) bei den in dieser Arbeit geschilderten SERS-Messungen in Lösung. In diesem Konzentrationsbereich stehen nicht genügend besetzte *hot spots* für ein kontinuierliches SERS-Signal zur Verfügung. Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit auch hier intensive SERS-Spektren erhalten werden, sobald zufällig ein günstig besetzter *hot spot* durch den Fokus diffundierte, oder durch Konvektion der Lösung hindurch getragen wurde. In diesem Fall konnten kurzzeitig auftauchende, aber intensive SERS-Spektren beobachtet werden, welche jedoch augenblicklich wieder verschwanden.

Die Messparameter sind ein weiterer wichtiger Faktor, welcher das Ergebnis von quantitativen SERS-Messungen beeinflusst. Die Messzeit, die Größe des Laserfokus, aber auch die Laserleistung sind neben weiteren anderen wohl die wichtigsten Größen. Je länger die Messzeit und je größer der Fokus des Lasers ist, desto mehr *hot spots* können erfasst werden. Quantitative SERS-Messungen sind also ohne die entsprechenden statistischen Voraussetzungen undenkbar und deshalb nur bei einer genügend großen Zahl an SERS-Spektren oder einer ausreichend langen Messzeit sinnvoll.

Stabilität des CV-SERS-Signals über die Zeit

Da ein Versuch in einem Mikromodell Stunden bis Tage in Anspruch nehmen kann, ist es wichtig, dass die Methode zur Quantifizierung von Konzentrationen mit SERS zeitlich stabile Ergebnisse liefert.

Als nächstes wurde daher die Stabilität der AgNP-Suspension bezüglich ihrer SERS-Verstärkung untersucht. Um diese abschätzen und darstellen zu können, wurde das SERS-Signal der CV-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ M an vier aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die präagglomerierten Nanopartikel des jeweiligen Ansatzes (Ansatz A und Ansatz B als Wiederholungsversuch) und die Analytlösung wurden dabei jedes Mal vor der Messung frisch gemischt (Abbildung 4.27).

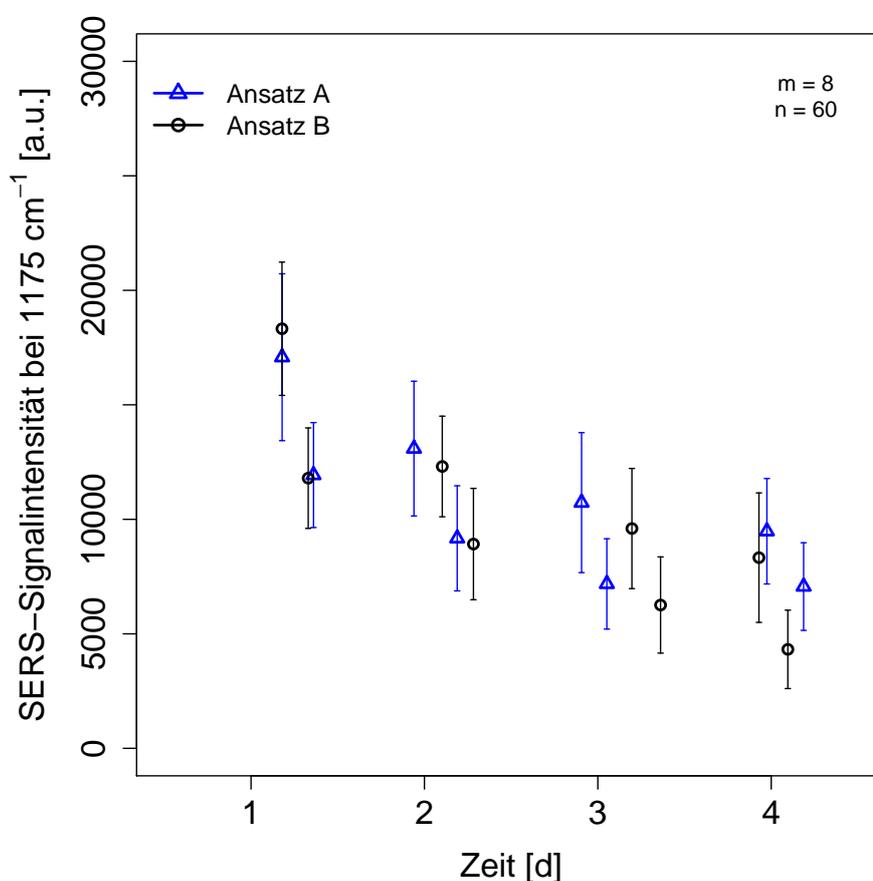


Abbildung 4.27: Entwicklung der Intensität der SERS-Spektren von CV bei der Konzentration $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-8}$ M. Jedem Datenpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 20 Einzelspektren zugrunde. Akquisitionszeit 10×1 s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $20\times$ W Obj., $\lambda = 633$ nm.

Es ist zu sehen, dass die Signalintensität innerhalb von vier Tagen um ca. 40 - 50 % abnimmt. Werden diese Ergebnisse jedoch mit den oben gezeigten UV/VIS-Messungen verglichen (Abbildung 4.20), so zeigt sich, dass diese Signalabnahme aber immer noch langsam genug für Quantifizierungen mit SERS innerhalb von Stunden oder gar Tagen ist. Da die

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

meiste Änderung der Intensität in den ersten 3 Tagen geschieht, wäre es also sinnvoll nach einer Präagglomeration diese Zeit erst abzuwarten, bevor die Nanopartikel-Suspension für quantitative Messungen verwendet wird.

Es ist auch zu sehen, dass die SERS-Intensitäten der Messungen am Anfang des Tages generell höher waren, als die Intensitäten, welche am Ende des Tages gemessen wurden. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte die Tatsache sein, dass jeweils ein Aliquot (30 mL) des Ansatzes mit präagglomerierten Nanopartikel am Anfang des Tages aus dem Kühlschrank entnommen wurde und die UV/VIS-Messungen recht bald danach folgten. Dieses Aliquot wurde dann für alle SERS-Messungen tagsüber verwendet. Die in Abbildung 4.27 gezeigte Entwicklung der Signalintensität der CV-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ M wurde innerhalb eines Tages jeweils mit einem zeitlichen Abstand von 3,5 bis 6 Stunden gemessen. Es ist daher denkbar, dass die Temperaturerhöhung, welche die Aliquots erfuhren, einen Einfluss auf die SERS-Intensitäten hatte.

Aus experimentellen Gründen wurde die CV-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ M sowohl am Anfang und zusätzlich noch einmal am Ende der Messungen für die Kalibrierkurven gemessen. Die CV-Konzentration $7 \cdot 10^{-8}$ M wurde jedoch immer am Ende gemessen. Da eine Abnahme der SERS-Signalintensität mit steigender Temperatur (und verstrichener Zeit) bei späteren Messungen angenommen werden muss, wurden die später am Tag erfolgten Messungen der CV-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ M für die Kalibrierkurven aus den Abbildungen 4.23 bis 4.26 verwendet. Diese Signalabnahme erklärt ebenfalls, dass die Intensität von $7 \cdot 10^{-9}$ M in Tabelle 4.6 kleiner als die von $5 \cdot 10^{-9}$ M ist.

Dem genauen Zusammenhang zwischen der Proben temperatur und der resultierenden SERS-Signalintensität wurde aus Zeitgründen in der vorliegenden Arbeit zwar nicht explizit nachgegangen, jedoch wurden in allen folgenden Versuchsreihen die Messungen erst durchgeführt, nachdem die Aliquots ihre Temperatur vollständig angeglichen hatten.

4.4.2 SERS-Verstärkung bei anderen chemischen Verbindungen

Neben CV wurden zusätzlich andere chemische Verbindungen hinsichtlich ihrer Signalverstärkung durch SERS an präagglomerierten AgNPs untersucht (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: SERS-Messungen an weiteren Substanzen.

Verbindung	SERS-Verstärkung
Bentazon	Keine SERS-Verstärkung
Metalaxyl	Keine SERS-Verstärkung
MCPA, (4-Chloro-2-methylphenoxy)essigsäure	Keine SERS-Verstärkung
Acetonitril	Keine SERS-Verstärkung
n-Octanol	Keine SERS-Verstärkung
Phenanthren	geringe SERS-Verstärkung
1-Hydroxy-2-naphthoesäure	Quantifizierung möglich, siehe Abbildungen 4.29 und 4.30

Phenanthren ist ein Modellschadstoff des SPP 1315 und wurde deshalb ebenfalls auf seine SERS-Verstärkung hin untersucht. Er zeigte jedoch lediglich eine sehr schwache SERS-Verstärkung. Darüber hinaus ist die Wasserlöslichkeit von Phenanthren mit 1,15 mg/L (oder $6,45 \cdot 10^{-9}$ mol/L) gering, was einen Nachweis in einem wässrigen System, wie Biofilmen in einem Mikromodell, zusätzlich erschweren würde.

4.4.3 Reproduzierbare Quantifizierung von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure mit SERS in Lösung

1-Hydroxy-2-naphthoesäure ist eine Zwischenstufe im Abbauweg von Phenanthren, wie er in vielen Bakterien vorkommt, und könnte deshalb dazu verwendet werden, um mittels SERS eine Verstoffwechslung von Phenanthren durch Bakterien sichtbar zu machen. Hierbei konnte ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen der Analyt-Konzentration und der SERS-Signalintensität im Bereich von $8,40 \cdot 10^{-4}$ M bis $8,40 \cdot 10^{-3}$ M gefunden werden. Dabei wurde nach demselben experimentellen Vorgehen gearbeitet, wie bei der Charakterisierung von CV. Bei der Auswertung der SERS-Spektren wurden jedoch jeweils vier Spektren zuerst addiert, bevor die Intensität der SERS-Bande bei Bande bei 725 cm^{-1} ermittelt wurde. Ein derartiges SERS-Spektrum bei einer Konzentration von $4,20 \cdot 10^{-3}$ M zusammen mit der Strukturformel von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Die Volumenteile beim Mischen von präagglomerierter AgNP-Suspension und Analytlösung lagen bei allen SERS-Messungen in dieser Arbeit bei 9:1. Ein Abweichen von diesem Verhältnis

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

wurde vermieden, da dies die Vergleichbarkeit der Ergebnisse stark beeinträchtigt hätte. Da die maximale Löslichkeit dieses Stoffes in 0,1 molarer NaOH $8,40 \cdot 10^{-2}$ M betrug, war es daher nicht möglich, SERS-Messungen bei einer höheren Konzentration als $8,40 \cdot 10^{-3}$ M durchzuführen. Bei der Auswertung der SERS-Spektren wurde die Intensität der Bande bei 725 cm^{-1} gegen die Konzentration aufgetragen.

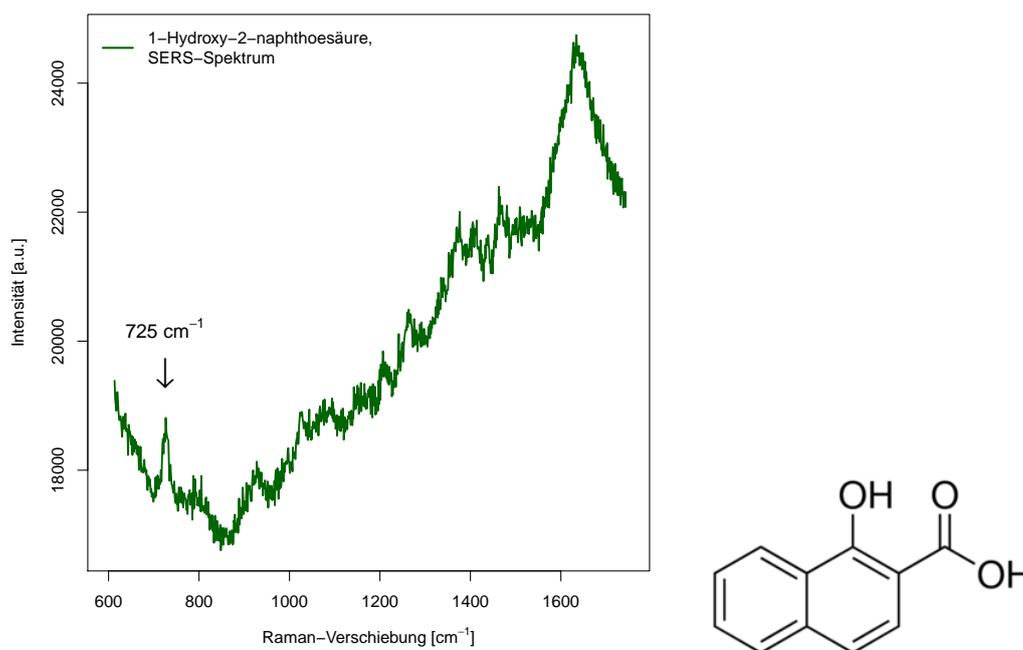


Abbildung 4.28: Links: SERS-Spektrum von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure, $c = 4,20 \cdot 10^{-3}$ M. Akquisitionszeit 40×1 s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $20 \times$ W Obj., $\lambda = 633$ nm. Rechts: Strukturformel.

Es zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen am darauf folgenden Tag (Abbildungen 4.29 und 4.30, Tabellen 4.9 und 4.10).

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

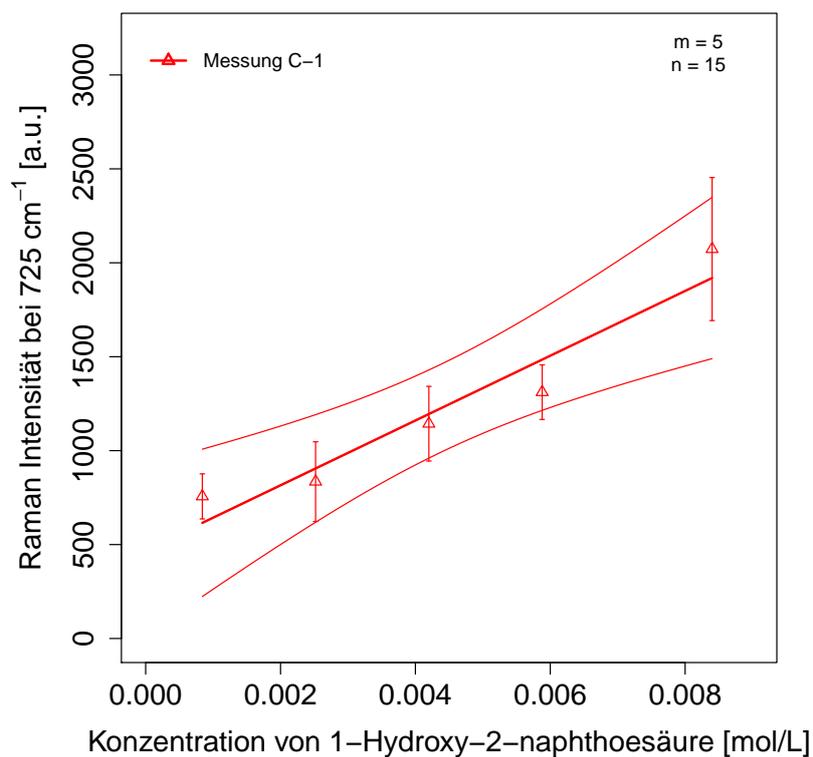


Abbildung 4.29: SERS-Signalintensitäten von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure. Jedem Datenpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 15 Einzelspektren (ES) zugrunde (n in Tabelle 4.9). Die Linien um die Ausgleichsgerade geben ein Konfidenzintervall mit dem Konfidenzniveau von 95 % an. Akquisitionszeit 40×1 s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $20x$ W Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

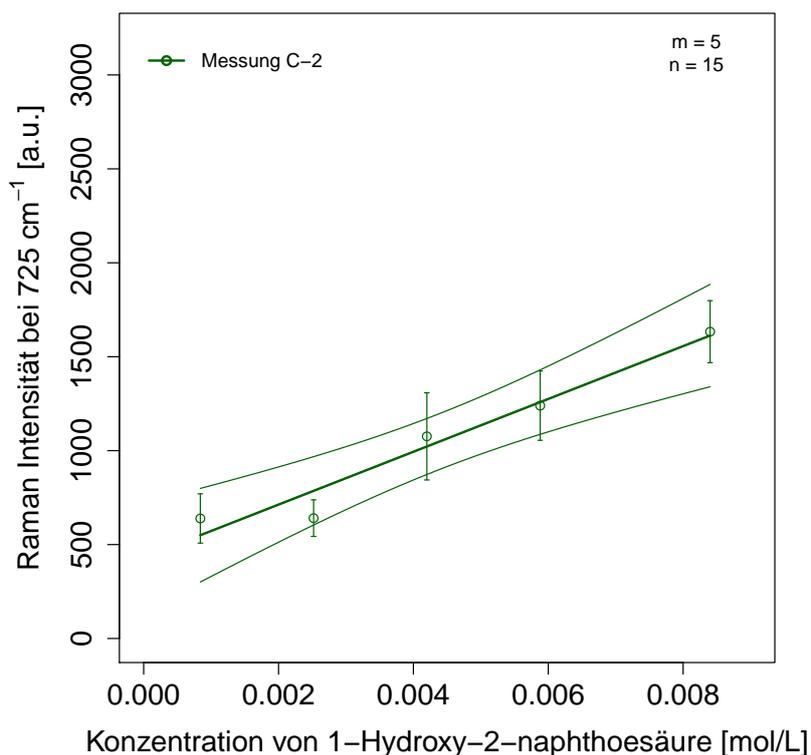


Abbildung 4.30: SERS-Signalintensitäten von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure. Jedem Datenpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 15 Einzelspektren (ES) zugrunde (n in Tabelle 4.9). Die Linien um die Ausgleichsgerade geben ein Konfidenzintervall mit dem Konfidenzniveau von 95 % an. Akquisitionszeit 40×1 s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $20x$ W Obj., $\lambda = 633$ nm.

Tabelle 4.9: Koeffizienten der linearen Ausgleichsgeraden bei quantitativen SERS-Messungen von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure aus den Abbildungen 4.29 und 4.30.

Ansatz - Wiederholung	Steigung m	Ordinatenabschnitt t	R^2	n
Messung C-1	$1,72 \cdot 10^5 \pm 2,80 \cdot 10^4$	$4,71 \cdot 10^2 \pm 1,43 \cdot 10^2$	0,93	15
Messung C-2	$1,41 \cdot 10^5 \pm 1,78 \cdot 10^4$	$4,32 \cdot 10^2 \pm 0,91 \cdot 10^2$	0,95	15

Die Signalverstärkung durch SERS war bei 1-Hydroxy-2-naphthoesäure, trotz der Addition von vier SERS-Spektren mit je 10×1 s Akquisitionszeit, viel geringer, als bei CV (vergleiche Abbildungen 4.23 bis 4.26 mit den Abbildungen 4.29 und 4.30). In Tabelle 4.10 sind die Mittelwerte der beiden gezeigten Kalibrierkurven angegeben (aus den Abbildungen 4.29 und 4.30). In Tabelle 4.9 finden sich die Koeffizienten der zugehörigen linearen Ausgleichsgeraden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden bei 1-Hydroxy-2-naphthoesäure sind dabei um mehr als

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

fünf Größenordnungen geringer als bei CV. Gemessen an der maximalen Löslichkeit könnten folglich nur hohe Konzentrationen von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure mittels SERS in Lösung quantifiziert werden. Bedenkt man jedoch die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, einen chemischen Gradienten in den Größenordnungen von biologischen Systemen mittels SERS zu messen, so scheint 1-Hydroxy-2-naphthoesäure unter diesen Umständen dafür nur wenig geeignet zu sein.

Tabelle 4.10: Mittelwerte und Standardabweichungen bei quantitativen SERS-Messungen von 1-Hydroxy-2-naphthoesäure aus den Abbildungen 4.29 und 4.30.

Konzentration	Messung C-1		Messung C-2	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
$8,40 \cdot 10^{-4}$ M	$7,57 \cdot 10^2$	$1,20 \cdot 10^2$	$6,39 \cdot 10^2$	$1,31 \cdot 10^2$
$2,52 \cdot 10^{-3}$ M	$8,35 \cdot 10^2$	$2,12 \cdot 10^2$	$6,41 \cdot 10^2$	$0,97 \cdot 10^2$
$4,20 \cdot 10^{-3}$ M	$1,14 \cdot 10^3$	$1,99 \cdot 10^2$	$1,08 \cdot 10^3$	$2,32 \cdot 10^2$
$5,88 \cdot 10^{-3}$ M	$1,31 \cdot 10^3$	$1,45 \cdot 10^2$	$1,24 \cdot 10^3$	$1,85 \cdot 10^2$
$8,40 \cdot 10^{-3}$ M	$2,07 \cdot 10^3$	$3,81 \cdot 10^2$	$1,63 \cdot 10^3$	$1,65 \cdot 10^2$

Die bloße Quantifizierung von einer Konzentration ist noch nicht ausreichend, um chemische Gradienten in den oben genannten Bedingungen (mikroporöses Netzwerk, Diffusion eines Kontaminanten aus einer NAPL-Phase heraus) messen zu können. Das Messsystem SERS in Lösung ist, mit seinen freien Nanopartikeln und Nanopartikel-Agglomeraten, recht kompliziert und unterliegt weitaus mehr Einflüssen, als beispielsweise die konventionelle Raman-Mikrospektroskopie. Hierbei können die Wechselwirkungen der Nanopartikel-Agglomerate mit dem Analyten, der umgebenden festen Matrix (Adsorption) oder die Wechselwirkungen untereinander (Agglomeration und Sedimentation) die Messergebnisse stark beeinflussen. So kann es unter anderem sein, dass hohe Analyt-Konzentrationen die Agglomeration von Nanopartikeln begünstigen und so großen Einfluss auf die Signalverstärkung bei SERS nehmen. Beschichtungen der Nanopartikel, können zusätzlich deren Eigenschaften entscheidend ändern.

Diese experimentellen und theoretischen Fragen müssen jedoch beantwortet sein, bevor es möglich ist, mittels SERS in Lösung chemische Gradienten nachweisen und quantifizieren zu können. Bedenkt man dies, so erscheint es durchaus sinnvoll, die Klärung dieser Fragen zuerst mit einer ungiftigen und mit SERS gut sichtbaren Modellsubstanz durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen der weiteren Eigenschaften dieser Nachweismethode mit CV durchgeführt.

4.4.4 CV in hohen Konzentrationen: nichtlineare Signalverstärkung und Signalabnahme

In den Abbildungen 4.31 und 4.32 ist eine weitere Kalibrierkurve von CV im Bereich von $7 \cdot 10^{-9}$ M bis $5 \cdot 10^{-7}$ M zu sehen. In Abbildung 4.31 wurde zum besseren Verständnis zunächst der Bereich bis $1 \cdot 10^{-7}$ M dargestellt.

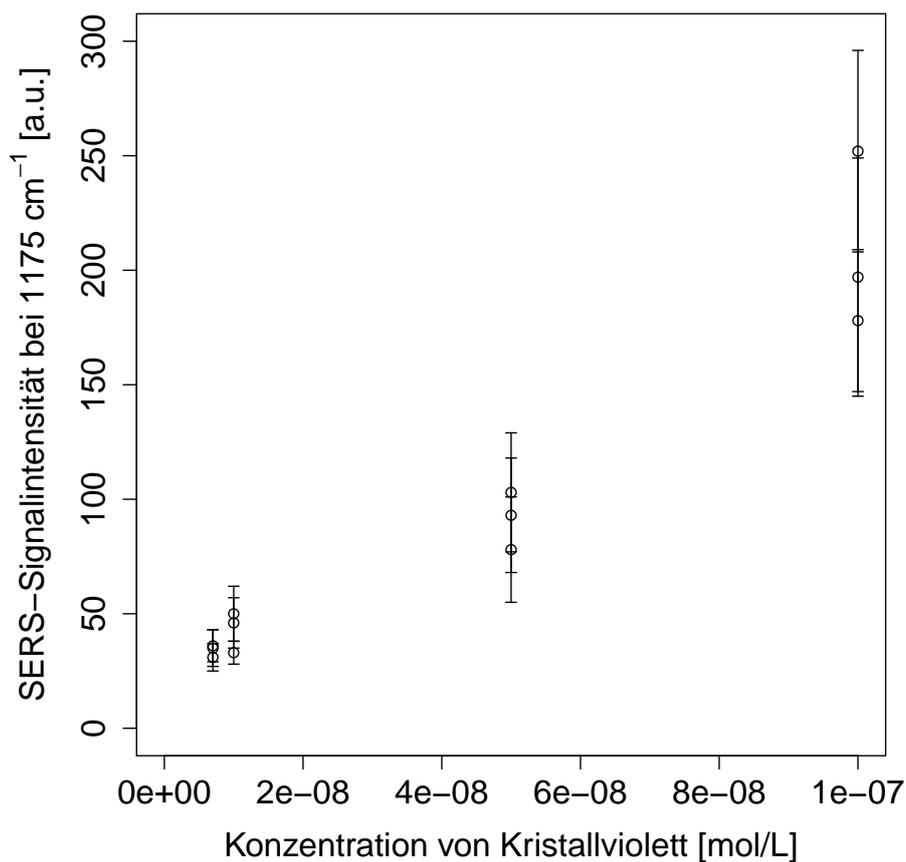


Abbildung 4.31: SERS-Signalintensität von CV, vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 4.32. Jeder Messpunkt stellt einen Mittelwert aus 200 Einzelspektren einer Probe dar. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

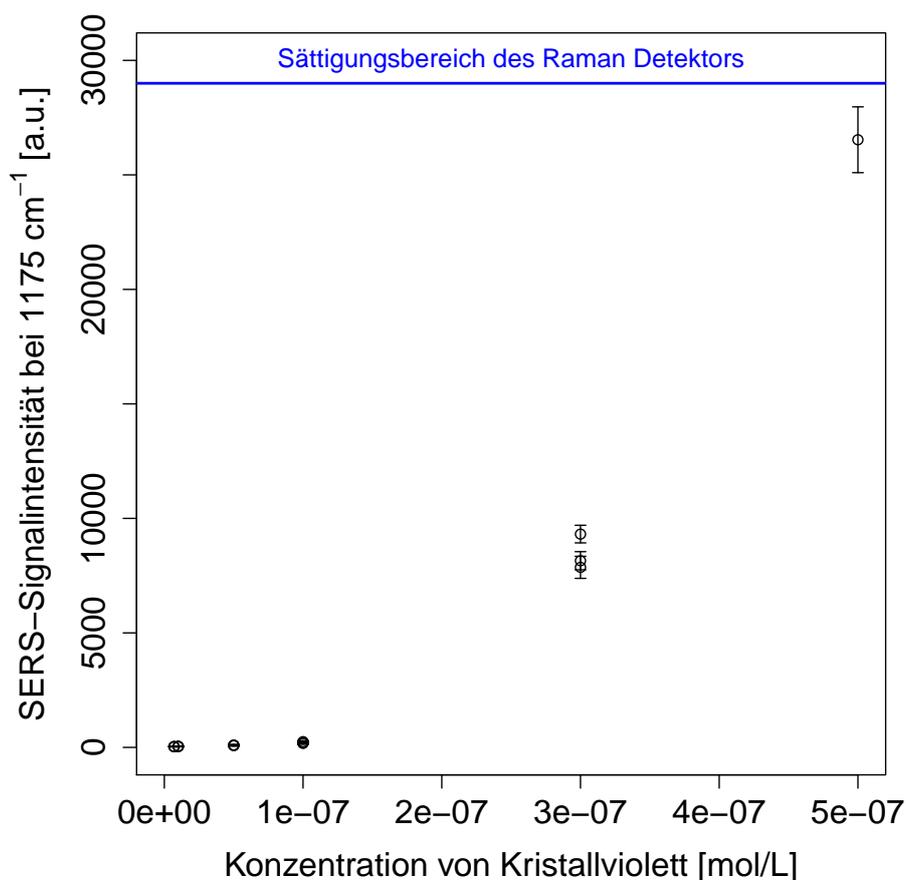


Abbildung 4.32: Kalibration von CV, vollständiger dynamischer Bereich. Bei $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-7}$ M konnte nur ein Messpunkt ausgewertet werden, da die CCD-Kamera des Raman-Detektors bei den anderen zwei Proben teilweise gesättigt war. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $10x$ Obj., $\lambda = 633$ nm.

In Abbildung 4.32 fällt auf, dass die Signalintensität bei $c(\text{CV}) \geq 1 \cdot 10^{-7}$ M stärker mit der Konzentration wuchs, als bei dem linearen Zusammenhang zwischen $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-9}$ M und $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7}$ M zu erwarten gewesen wäre. Dieser Trend konnte auch in späteren Experimenten wiedergefunden werden. Es schien so, als ob diese Änderung in der Beziehung zwischen der Konzentration und der SERS-Signalintensität durch einen weiteren Effekt hervorgerufen wurde. Abbildung 4.33 zeigt die Entwicklung bei noch höheren CV-Konzentrationen anhand von zwei weiteren Kalibrierkurven.

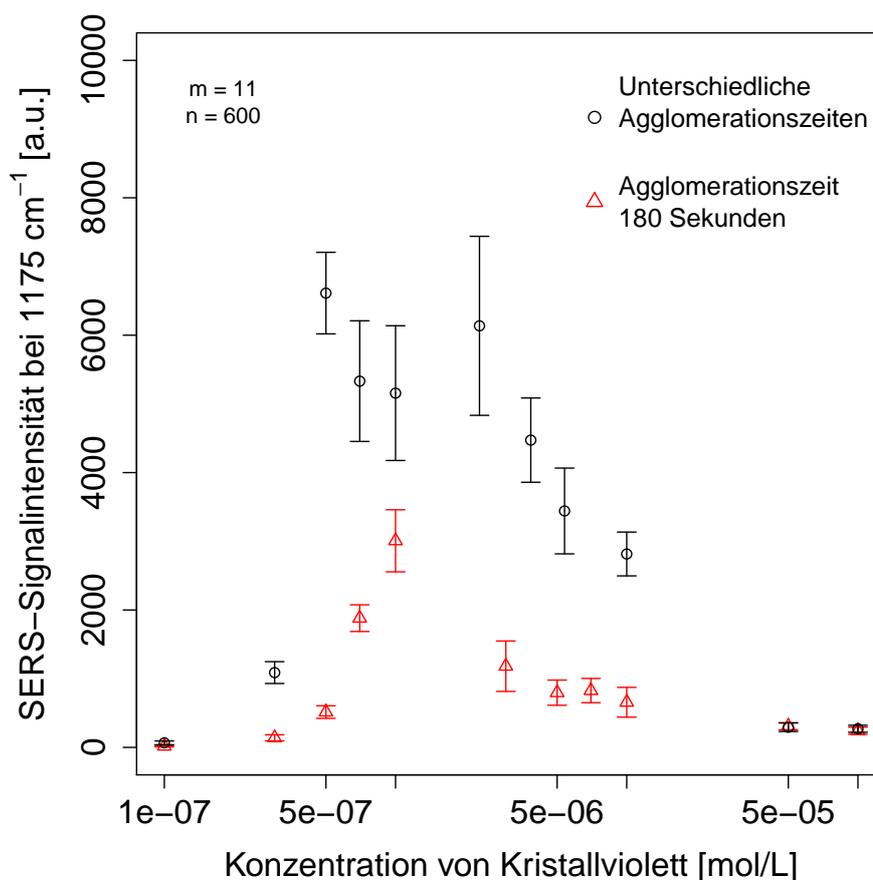


Abbildung 4.33: SERS-Signalintensität von CV bei hohen Konzentrationen. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 10 % (1,4 mW), $20\times$ W Obj., $\lambda = 633$ nm, halblogarithmische Darstellung.

Die Nachweisgrenze für CV mit konventioneller Raman-Mikrospektroskopie lag, je nach verwendeten Messparametern, zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-4}$ M. Abbildung 4.33 zeigt, dass die Signalintensität der SERS-Spektren einen exponentiellen Anstieg hatte, sobald die CV-Konzentration über $1 \cdot 10^{-7}$ M stieg, dann jedoch zu einem Maximum bei ungefähr $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-6}$ M kam. Wurde die Konzentration noch weiter erhöht, so begann die Signalintensität wieder abzunehmen. Hierbei wurde eine logarithmische Darstellung für die x-Achse gewählt.

Die Zeitspanne zwischen dem Mischen der präagglomerierten AgNPs mit der CV-Lösung und dem Aufzeichnen der SERS-Spektren, betrug im ersten Versuch aus Abbildung 4.33 zwischen 2 und 5 Minuten. Sie war also nicht immer konstant (schwarze Kurve). Jedoch schien diese Zeitspanne bei hohen CV-Konzentrationen einen entscheidenden Einfluss auf die Signalintensität der SERS-Spektren zu haben. Während den Messungen war beim Mischen der Lösungen bei hohen CV-Konzentrationen mit bloßem Auge zu sehen, dass sich die präagglomerierte AgNP-Suspension sofort metallisch grau verfärbte, sobald sie in Kontakt mit der CV-Lösung kam. Nach kurzer Zeit formten sich gut sichtbare Makro-Agglomerate, die sich

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

schließlich am Gefäßboden absetzten. Aufgrund dieser Beobachtung kann wohl angenommen werden, dass nun eine weiter fortschreitende Agglomeration der bereits präagglomerierten AgNP-Suspension die starken Abweichungen von einer linearen Kalibration hervorriefen.

Eine Wiederholung des Versuches (rote Kurve) mit einem konstanten Zeitintervall von 180 Sekunden zwischen dem Mischen und dem Aufzeichnen der SERS-Spektren, zeigte einerseits eine geringere Standardabweichung und andererseits einen klareren Kurvenverlauf. Die generelle SERS-Verstärkung war bei dem Wiederholungsversuch, welcher mit einem anderen Ansatz präagglomerierter AgNP gemessen wurde, insgesamt geringer. Diese Tatsache rührt allerdings daher, dass wie bereits erwähnt jeder Ansatz neu synthetisierter und präagglomerierter Silber-Nanopartikel seine eigene Kalibrierkurve für quantitative Messungen benötigt.

Weiter ist zu erwähnen, dass bei dem Vergleich aller bisherigen Ergebnisse die bei der Messung verwendeten Geräteparameter mit berücksichtigt werden müssen. Diese Parameter hatten Einfluss auf die Signalverstärkung bei SERS-Experimenten und damit auf die erhaltene Intensität der Messpunkte bei Kalibrierkurven. Die SERS-Spektren für die Kalibrierkurven bis zu einer CV-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M (Abbildungen 4.23 und 4.24) wurden bei 100 % Laserleistung, 10 s Akquisitionszeit und mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen, während die Spektren, die zu der Kalibrierkurve aus den Abbildungen 4.31 bis 4.32 führte, bei 100% Laserleistung, 0,1 s Akquisitionszeit und einem 10x Objektiv aufgenommen wurden. Die zwei Kalibrierkurven aus Abbildung 4.33 hingegen wurden bei 10% Laserleistung, 0,1 s Akquisitionszeit und mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen. Diese stark unterschiedlichen Messparameter waren nötig, da bei hohen CV-Konzentrationen sonst schnell eine Sättigung der CCD-Kamera des Raman-Detektors eingetreten wäre.

4.4.5 Übergangsbereiche in der Kalibration für den Analyten CV

Sowohl für CV, als auch für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure existierte eine lineare Kalibration, sobald die Konzentration hoch genug war, um ein dauerhaft beobachtbares SERS-Signal zu liefern. Bei CV begann sich diese lineare Beziehung ab einer Konzentration von $\approx 1 \cdot 10^{-7}$ M in einen exponentiellen Zusammenhang zu ändern. Da bei SERS an Nanopartikeln nur die Spektren der Moleküle verstärkt werden, welche direkt an der Nanopartikel-Oberfläche adsorbieren, sind auch nur diese Moleküle „sichtbar“. Die Moleküle in der umgebenden Lösung haben daher keinen Einfluss auf die Signalintensität bei SERS-Messungen. Um also einen Erklärungsansatz für die Übergangsbereiche einer Kalibration bei wachsenden Konzentrationen zu liefern, könnte eine Adsorption nach Langmuir angenommen werden. Dieses Modell geht von einer Besetzung der Oberfläche bis zu einer Monolage aus. Bei geringen Konzentrationen verläuft sie jedoch nahezu linear.

Geht man von einer ungeordneten und statistischen Besetzung der Nanopartikel-Oberfläche aus, so würde dies bedeuten, dass sich bei einer (nahezu) linearen Kalibrierkurve die Oberfläche der Nanopartikel-Agglomerate langsam zu füllen beginnt (Abbildung 4.34). Statistisch gesehen sind *hot spots* jedoch selten und somit ist auch ihre Fläche gering, verglichen mit der übrigen, verfügbaren Oberfläche der Nanopartikel-Agglomerate. Die Steigung der resultierenden Kalibrierkurve ist damit entsprechend flach.

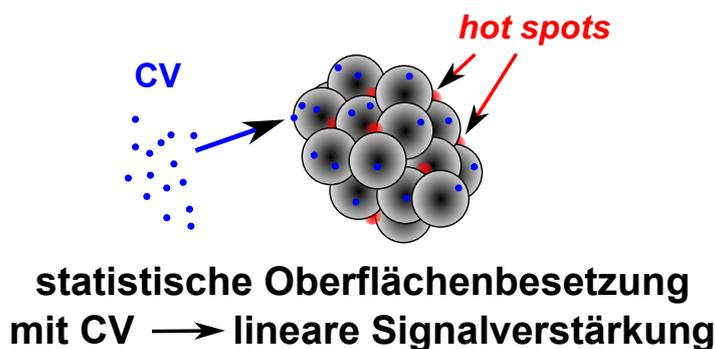


Abbildung 4.34: Die CV-Moleküle verteilen sich statistisch auf der Oberfläche eines Nanopartikel-Agglomerates. Ihre Beweglichkeit ist gering.

Um den Bedeckungsgrad bei dem Übergang von einem linearen in einen exponentiellen Kurvenverlauf rechnerisch abzuschätzen, können folgende Überlegungen angestellt werden:

Die Masse eines in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikels bei einem durchschnittlichen Durchmesser von 32 nm (vgl. TEM-Messung, Abbildung 4.17) betrug $1,8 \cdot 10^{-19}$ kg und seine Oberfläche $3,2 \cdot 10^{-15}$ m².

Die Zahl der Nanopartikel bei Verwendung einer Lösung mit $c(\text{Ag}^+) = 0,01$ mol/L bei der Synthese war damit $\approx 6 \cdot 10^{14}$ Nanopartikel pro Liter.

Da nach der Synthese eine kontrollierte Präagglomeration mit einem anschließenden Verdünnungsschritt stattfand, lagen die Nanopartikel nun als kleinere Agglomerate und nicht mehr als einzelne Nanopartikel in der Suspension vor. Für die Zahl an Nanopartikeln pro Agglomerat muss jedoch an dieser Stelle eine Schätzung gemacht werden, da die genaue Agglomerat-Geometrie und damit die exakte Zahl der Nanopartikel pro Agglomerat unbekannt war und auch nicht eindeutig aus TEM-Messungen erschlossen werden konnte. Es erscheint hierbei sinnvoll ungefähr 20 NP pro Agglomerat zu vermuten, da in den TEM-Aufnahmen keine größeren Nanopartikel-Anhäufungen, wie beispielsweise von 100 oder 1000 agglomerierte Nanopartikel gefunden werden konnten. 20 NP pro Agglomerat entsprächen dabei ungefähr einem kugelförmigen Agglomerat mit einem Durchmesser von 3 Nanopartikeln.

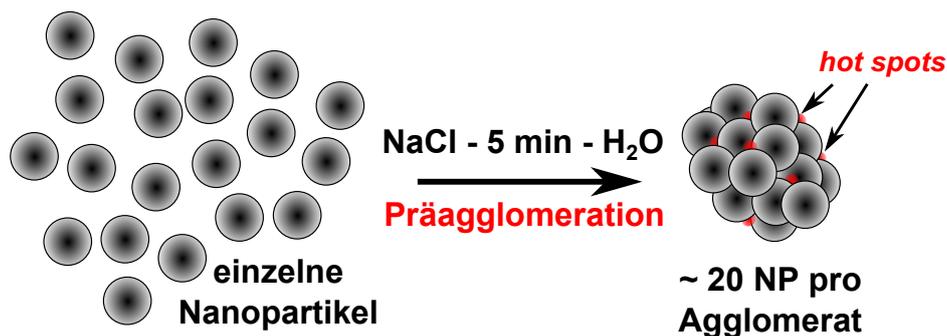


Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der Agglomeration bei Nanopartikeln. Bei der Zugabe von Salz formen sich Agglomerate aus Nanopartikeln. Dabei werden *hot spots* gebildet (rot dargestellt).

Ein Agglomerat hätte damit einen ungefähren Durchmesser von 96 nm, eine Oberfläche von ungefähr $3 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$, ein Volumen von $4,6 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3$ und die Anzahl der Agglomerate würde sich damit, unter Berücksichtigung des Verdünnungsschrittes, auf $\approx 1 \cdot 10^{13}$ Agglomerate pro Liter reduzieren (Für die Berechnung des Volumens und der Oberfläche wurde eine Kugel mit einem Durchmesser von 96 nm angenommen und nicht das addierte Volumen und die Oberfläche von 20 einzelnen Nanopartikeln).

Mit dem frei zugänglichen Chemieprogramm „ChemSketch“ (183) kann eine ungefähre Abschätzung für den Platzbedarf eines CV-Moleküls von $1,83 \text{ nm}^2$ (Radius $\approx 7,63 \cdot 10^{-10} \text{ m}$, ohne Hydrathülle) ermittelt werden. Aufgrund von statistischen Überlegungen gelangten Kneipp et al. (139) zu dem Schluss, dass 80 % der CV-Moleküle aus der Lösung an die Oberfläche von Silber-Nanopartikeln adsorbiert werden. Unter Verwendung dieser Zahlen wäre damit eine vollständige Bedeckung aller Agglomerate bei einer CV-Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ erreicht.

Hierbei sollte jedoch nicht vergessen werden, dass diese Rechnung lediglich eine grobe Abschätzung der Größenordnungen liefern soll. Eine genaue Berechnung ist aufgrund von fehlenden Daten und der Annahmen, die zwangsweise gemacht werden mussten, leider nicht möglich. Jedoch passt die CV-Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ für eine vollständige Bedeckung der Nanopartikel-Agglomerate erstaunlich gut in die Größenordnung des Übergangsbereichs, bei dem sich die Kalibration für CV von linear nach exponentiell änderte. Dies würde bedeuten, dass eine weitere Agglomeration der präagglomerierten Nanopartikel Agglomerate bereits bei einer teilweisen Bedeckung mit CV stattfinden könnte (also bereits bei $\approx 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und nicht erst bei $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). In diesem Fall wäre die nun exponentielle Entwicklung der Kalibration darauf zurück zu führen, dass weitere *hot spots* durch Agglomeration entstehen und so die Wahrscheinlichkeit von günstig platzierten CV-Molekülen direkt in den neue geformten *hot spots* zwangsweise stark ansteigt (vgl. Abbildung 4.37).

Hierbei wurde nicht berücksichtigt, dass es ebenfalls möglich wäre, für CV-Moleküle von außen in die inneren Zwischenräume der Nanopartikel in einem Agglomerat (vor dieser erneuten Agglomeration) zu gelangen. Da der Durchmesser d eines Loches zwischen drei gleich-

4.4 Quantitative SERS-Messungen in Lösung

großen Kugeln mit dem Radius r der Beziehung $d = r_{NP} \cdot (\sqrt{\frac{12}{9}} - 1)$ folgt, wäre in diesem Fall $d \approx 2,5$ nm (bei $r(\text{Nanopartikel}) = 16$ nm, siehe Abbildung 4.36). Dabei ergäbe sich ebenfalls die Frage, ob ein CV-Molekül überhaupt ein SERS-Signal aus dem Inneren eines Nanopartikel-Agglomerats senden könnte, oder nicht. Dafür müssten die CV-Moleküle jedoch über eine gewisse Beweglichkeit auf der Metalloberfläche verfügen.

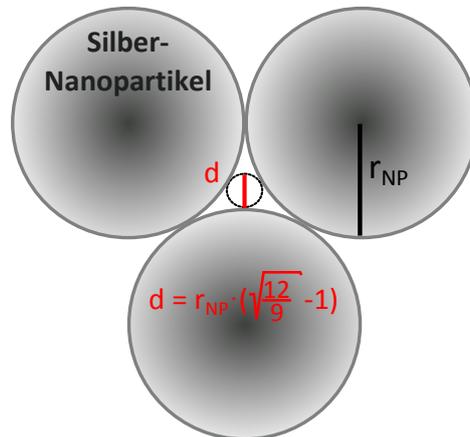


Abbildung 4.36: Agglomeration von 3 Nanopartikeln mit Radius r_{NP} . Das entstehende Loch in der Mitte hat den Durchmesser $d = r_{NP} \cdot (\sqrt{\frac{12}{9}} - 1)$.

Die Annahme, dass eine weitere Agglomeration der bereits präagglomerierten und bereits teilweise mit CV-Molekülen besetzten AgNP-Agglomerate tatsächlich stattfand, konnte im Experiment zweifelsfrei bestätigt werden. Dies war an einer augenblicklichen Graufärbung der präagglomerierten AgNP-Suspension bei der Zugabe einer CV-Lösung mit $c(\text{CV}) > 5 \cdot 10^{-7}$ M mit bloßem Auge innerhalb kurzer Zeit zu sehen. Dabei bildeten sich schnell gut sichtbare, metallisch graue Makro-Agglomerate am Gefäßboden.

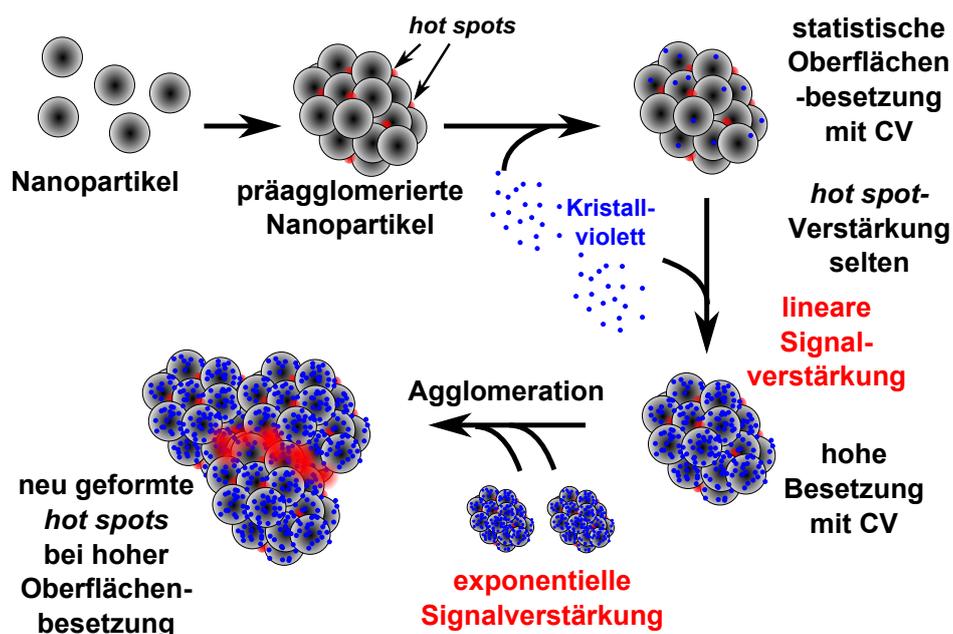


Abbildung 4.37: Schematische Darstellung der fortschreitenden Agglomeration bereits präagglomerierter AgNPs. Die Adsorption von CV geschieht statistisch (linearer Signalanstieg), die Beweglichkeit auf der Metalloberfläche ist gering. Die Wahrscheinlichkeit für CV-Moleküle, sich in neu geformten *hot spots* zu befinden, ist hoch.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

Um die Entwicklung der SERS-Signalverstärkung und der optischen Dichte bei erneuter Agglomeration einer bereits präagglomerierten AgNP-Suspension zu erfassen, wurden zeitaufgelöste SERS-Messungen und zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen unternommen. Dazu wurde, bei hohen CV-Konzentrationen, der zeitliche Verlauf der Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} in SERS-Versuchen und der Verlauf der optische Dichte bei der maximalen Absorption in UV/VIS-Versuchen untersucht.

4.5.1 Zeitaufgelöste SERS-Messungen

In Abbildung 4.38 ist der zeitliche Verlauf der Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} bei aufeinanderfolgenden SERS-Messungen zu sehen. Die schwarze, blaue, rote und grüne Kurve zeigen die Signalintensität bei einer CV-Konzentration von jeweils $3 \cdot 10^{-7}\text{ M}$, $7 \cdot 10^{-7}\text{ M}$, $3 \cdot 10^{-6}\text{ M}$, und $1 \cdot 10^{-5}\text{ M}$. Die Versuche wurden dabei in einem Objektträger mit Vertiefung ($20x$ Wasserimmersionsobjektiv), einer Laserleistung von 10 % und einer Akquisitionszeit von 0,1 s aufgenommen.

Es ist zu sehen, dass die Signalintensität der CV-SERS-Spektren deutlich abnahm, wenn die CV-Konzentration höher als $3 \cdot 10^{-7}\text{ M}$ war.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

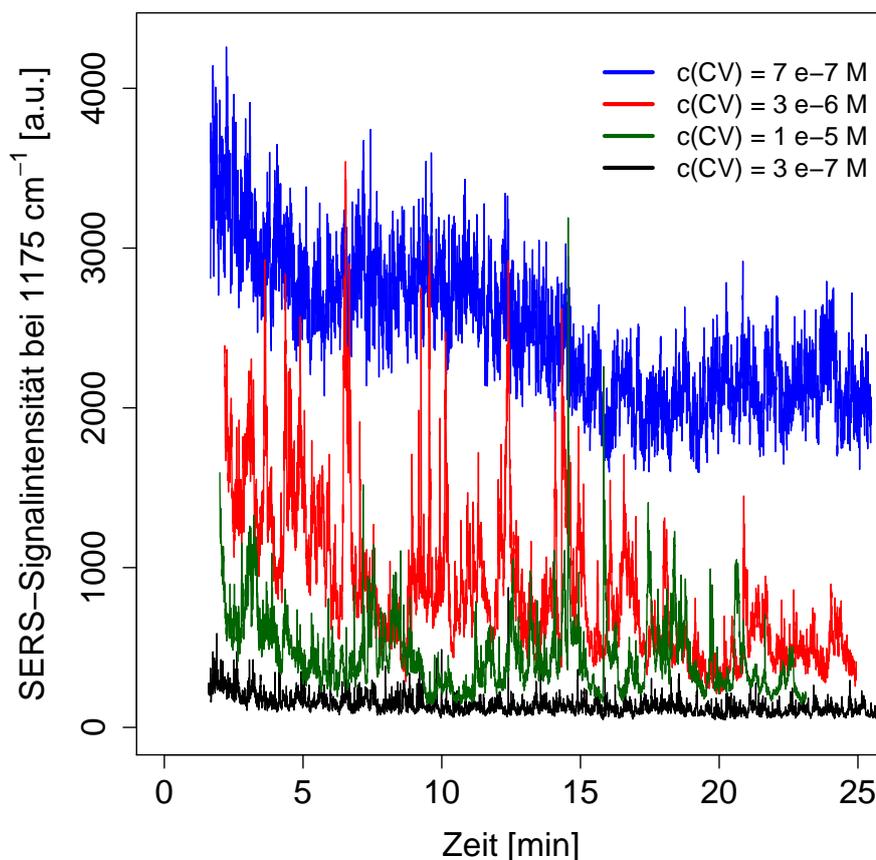


Abbildung 4.38: Entwicklung der SERS-Intensität bei hohen CV-Konzentrationen. Messung in Objektträgern mit Vertiefungen. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 10 % (1,4 mW), $20x$ W Obj., $\lambda = 633$ nm.

Bei diesem Versuch fand sich derselbe Trend wie bei den Kalibrierkurven aus Abbildung 4.33 wieder. Die anfängliche SERS-Signalintensität war bei $7 \cdot 10^{-7}$ M am größten und bei höheren CV-Konzentrationen geringer. Zum einen sedimentieren größere Makro-Agglomerate schneller zum Gefäßboden der Messanordnung und fallen damit aus dem Fokus des Raman-Lasers.

Zum anderen beginnt sich eine CV-Lösung bei solchen Konzentration bereits stark zu färben, was die Laserleistung an den Nanopartikeln abschwächt. Da jedoch bei SERS nur die Signale von den Molekülen verstärkt werden, welche direkt auf der Nanopartikel-Oberfläche adsorbiert sind, oder sich in *hot spots* befinden, ist es für die SERS-Signalintensität unerheblich, wie die Konzentration eines Stoffes zur selben Zeit in der umgebenden Lösung ist. Ist die Konzentration also so hoch, dass die Nanopartikel-Oberfläche bereits vollkommen besetzt ist und keine weiteren Moleküle mehr aufgenommen werden können, so bewirkt eine Abschwächung der Laserleistung durch die Färbung der umgebenden Lösung eine Verringerung der SERS-Signalverstärkung.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

Weiter werden Makro-Agglomerate vom Fokus des Raman-Lasers nicht mehr komplett erfasst, sobald sie größer als dessen Durchmesser werden. Dieser lag je nach Vergrößerung zwischen $1,5\ \mu\text{m}$ und $3\ \mu\text{m}$ (siehe Tabelle 2.3). Ist beispielsweise die Unterseite eines Makro-Agglomerats vom Laser abgeschirmt und wird dadurch nur noch seine Oberfläche erfasst, so nimmt ebenfalls die Signalverstärkung ab, da sich insgesamt weniger Fläche im Fokus des Lasers befindet. Verglichen mit dem Fall von vielen kleineren Agglomeraten schwindet damit die SERS-Verstärkung. Die Bildung von Makro-Agglomeraten war im Experiment durch eine Graufärbung der AgNP-Suspension bei hohen CV-Konzentrationen mit bloßem Auge zu sehen.

4.5.2 Zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen

Um die zeitliche Entwicklung einer Agglomeration in einer bereits präagglomerierten AgNP-Suspension mit einer zweiten Analyseverfahren zu untersuchen, wurden zusätzlich zeitaufgelöste UV/VIS-Messungen unternommen. Dabei wurde beobachtet, dass ein Fortschreiten der Agglomeration eine Abnahme der Intensität des Absorptionsspektrums bedingt und die Abnahmegeschwindigkeit offensichtlich ein Maximum nicht überschreiten kann. Experimentell wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Ansatz 1. Die präagglomerierte AgNP-Suspension, welche das CV enthielt, befand sich in einem gesonderten Zentrifugenröhrchen, von dem zu definierten Zeitpunkten kleine Volumina entnommen, verdünnt und dann gemessen wurden.

Durch eine notwendige Verdünnung der Aliquoten (die reine Lösung war optisch zu dicht für das UV/VIS-Spektrometer) wurde sowohl die CV-Konzentration, als auch die NP-Konzentration stark verringert, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass keine weitere Agglomeration während der eigentlichen Messung mehr stattfand.

Ansatz 2. Die AgNP-Suspension befand sich zusammen mit dem CV direkt in einer UV/VIS-Küvette. Die Agglomerationsreaktion konnte also direkt und ohne Entnahme von kleinen Volumina verfolgt werden.

Da die optische Dichte einer unverdünnten, präagglomerierten AgNP Suspension zu hoch für eine UV/VIS-Messung ist, war die absolute Nanopartikel-Konzentration im zweiten Ansatz während der Messung $1/10$ der Konzentration des ersten Ansatzes. Die absolute CV-Konzentration war allerdings bei beiden Ansätzen gleich.

Vergleich der Ergebnisse:

Ansatz 1: Reaktion im Zentrifugenröhrchen

In Abbildung 4.39 ist die Abnahme des Intensitätsmaximums der Absorption im zeitlichen Verlauf, im ersten Ansatz zu sehen. Es wurden dabei vier CV-Konzentrationen, $1 \cdot 10^{-7}$ M, $3,5 \cdot 10^{-7}$ M, $6,5 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M, untersucht.

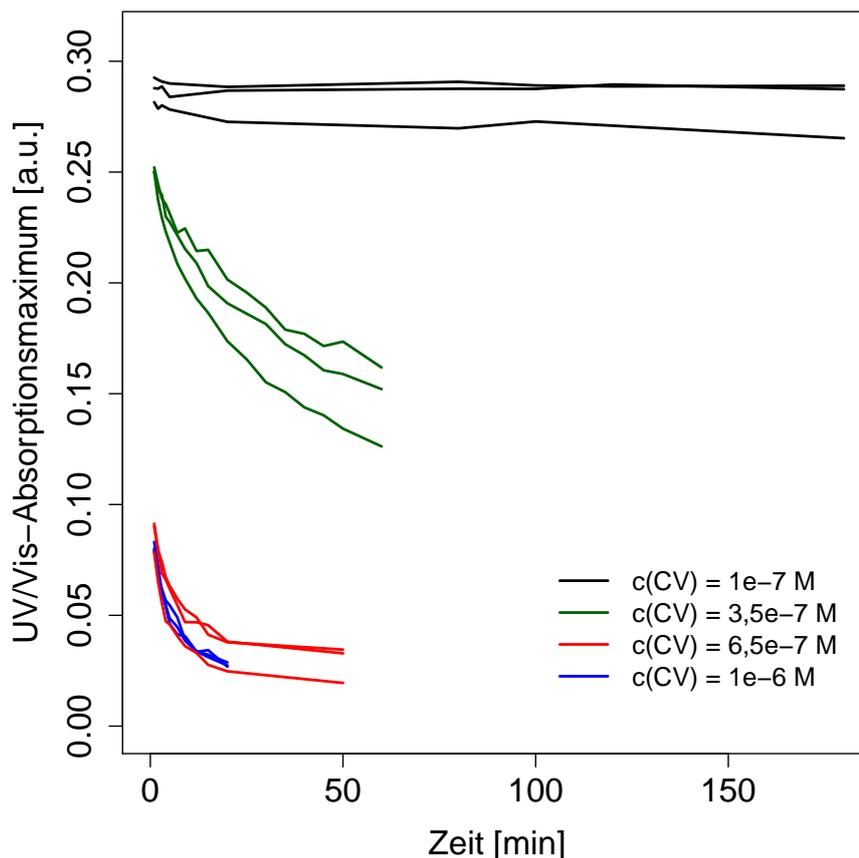


Abbildung 4.39: UV/VIS-Messung: Präagglomerierte AgNPs mit CV bei unterschiedlichen Konzentrationen. Reaktion in einem Zentrifugenröhrchen.

Abbildung 4.39 zeigt, dass sich das Intensitätsmaximum der Absorption der Nanopartikel bei einer CV-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M nicht stark ändert. Die Kurven von $c(\text{CV}) = 6,5 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M hingegen ändern sich schnell und stark. Sie sind auch kaum mehr von einander zu unterscheiden, was darauf schließen lässt, dass die Agglomerationsgeschwindigkeit hier nicht mehr schneller wird. Demnach müsste ein diffusionslimitierter Prozess zugrunde liegen.

Bei $3,5 \cdot 10^{-7}$ M hingegen ist die Krümmung der Kurve zwischen der von $1 \cdot 10^{-7}$ M und $6,5 \cdot 10^{-7}$ M. Damit steigerte sich die Agglomerationsgeschwindigkeit in diesem schmalen Konzentrationsbereich auf ihren maximalen Wert.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

Aufgrund des Versuchsaufbaus, bei dem jeweils (bei vorherigem Schütteln) kleine Volumina entnommen und gemessen wurden, kann hier eine Sedimentation der AgNP-Agglomerate ausgeschlossen werden.

Ansatz 2: Reaktion in einer UV/VIS-Küvette

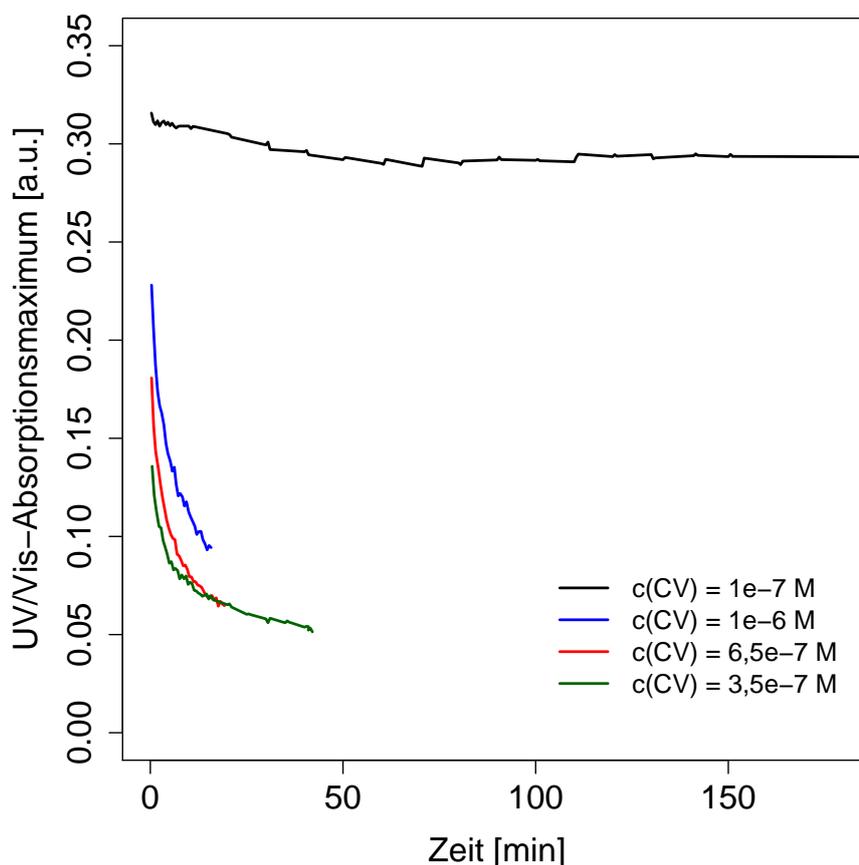


Abbildung 4.40: UV/VIS-Messungen: Präagglomerierte AgNPs mit CV bei unterschiedlichen Konzentrationen. Reaktion in einer UV/VIS-Messküvette.

Die AgNP-Agglomerat-Konzentration war in diesem Versuch nur 1/10 der Konzentration des vorangegangenen Versuches im Zentrifugenröhrchen. Die absolute CV-Konzentration hingegen war bei beiden Versuchen gleich.

Interessant ist nun, dass in diesem zweiten Versuch zwar mehr CV-Moleküle pro AgNP-Agglomerat zu Verfügung standen, weshalb nun auch die Kurve mit $c(\text{CV}) = 3,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ von ihrer Krümmung kaum noch von denen bei höheren CV-Konzentrationen ($c(\text{CV}) = 6,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) zu unterscheiden ist.

Jedoch ist die Agglomerationsgeschwindigkeit bei $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ offensichtlich immer noch sehr ähnlich, wie es bei einer höheren AgNP-Agglomerat-Konzentration der Fall war.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

Der Grund dafür, dass die Kurven für die CV-Konzentrationen im zweiten Versuch (Reaktion in UV/VIS-Küvette) umso höher lagen (also weniger Licht durch die Küvette kam), je höher die CV-Konzentration war, ist dass hier im Falle einer Agglomeration die optische Dichte nicht nur durch die verbleibende AgNP-Agglomerat-Konzentration (außer bei $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), sondern auch durch die Färbung von CV mitbestimmt wurde.

Im ersten Versuch (Ansatz 1) hingegen war die absolute AgNP-Agglomerat-Konzentration höher, und dominierte hier gegenüber der verbleibenden Färbung durch das CV.

4.5.3 Übergangsbereiche bei der Kalibration für den Analyten CV

All diese Tatsachen zeigen, dass eine Kalibrierkurve von CV im gesamten, hier untersuchten Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ und $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ grob in 4 verschiedene Bereiche gegliedert werden kann (Abbildung 4.41).

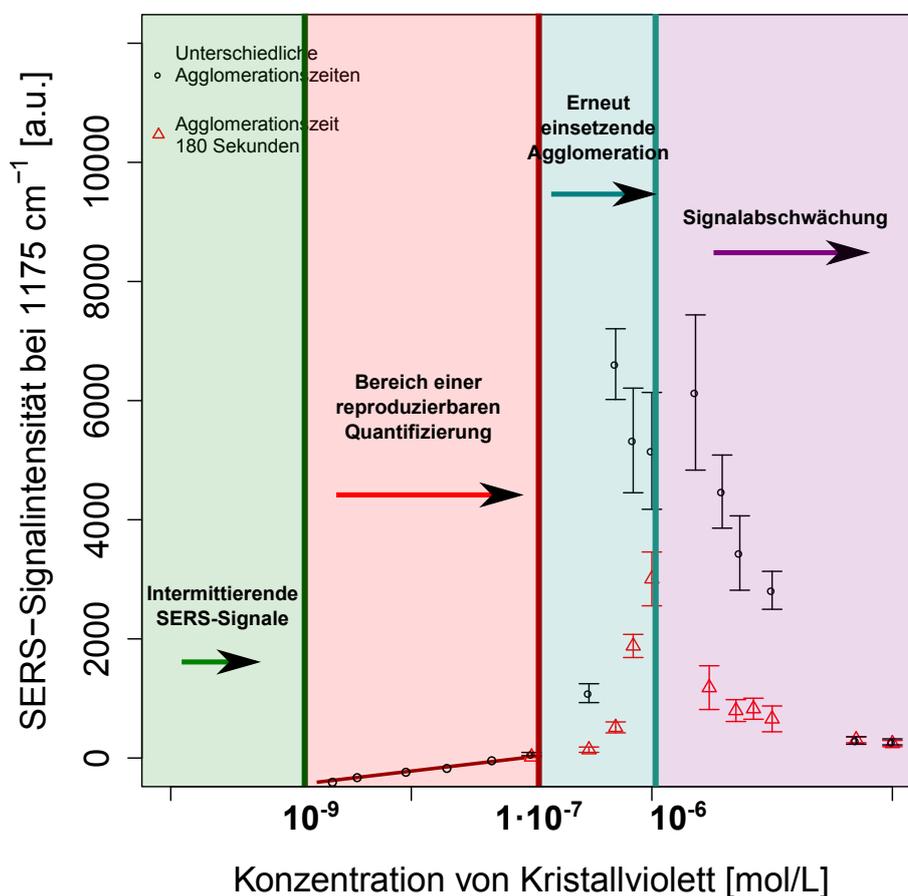


Abbildung 4.41: Skizze: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bereiche der Beziehung zwischen Konzentration und SERS-Signalintensität von CV.

Bereich mit intermittierenden SERS-Signalen

Konzentrationsbereich: 0 M bis $1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$

In diesem Bereich ist die CV-Konzentration, und die Akquisitionszeit bei SERS-Messungen zu gering, um ein kontinuierliches Signal zu liefern. Die Anzahl der CV-Moleküle reicht nicht

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

aus, damit genügend besetzte *hot spots* im Fokus des Laserstrahls sind. Kommt jedoch, aufgrund von Diffusion, zufällig ein günstig besetzter *hot spot* in den Fokus des Laserstrahls, so ist kurzzeitig ein SERS-Signal zu sehen (erfahrungsgemäß ca. 1-2 Spektren pro 500 Aufnahmen). Das baldige Verschwinden eines solchen SERS-Signals könnte dabei entweder durch ein Abdiffundieren des Teilchens, oder durch *blinking* (29), (138), (146) verursacht werden. Die Grenze der Konzentration von $1 \cdot 10^{-9}$ M hängt dabei auch maßgeblich von der Größe des Laserfokus, der Laserleistung und der Akquisitionszeit ab.

Bereich einer reproduzierbaren Quantifizierung

Konzentrationsbereich: $1 \cdot 10^{-9}$ M bis $1 \cdot 10^{-7}$ M

In diesem Konzentrationsbereich herrscht für CV eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der SERS-Signalintensität. Für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure bewegte sich dieser Bereich zwischen $8,40 \cdot 10^{-4}$ M und $8,40 \cdot 10^{-3}$ M. Es befinden sich stets genügend adsorbierte CV-Moleküle auf den Nanopartikel-Agglomeraten im Fokus des Laserstrahls, welche bereits ein kontinuierliches SERS-Signal liefern. Bei den Messungen muss jedoch über längere Zeit gemittelt werden, da durch einzelne Agglomerate und sehr günstig besetzte *hot spots* das Signal sprunghaft ansteigen kann. Wird eine statistische Adsorption an der Silberoberfläche der Nanopartikel-Agglomerate angenommen, und die Adsorptionsisotherme von Langmuir zugrunde gelegt, so befindet sich die ermittelte lineare Kalibrierkurve noch in dem annähernd linearen Bereich geringer Konzentrationen der Langmuir Isotherme.

Erneut einsetzende Agglomeration

Konzentrationsbereich: $1 \cdot 10^{-7}$ M bis $1 \cdot 10^{-6}$ M

Aufgrund von statistischen Überlegungen gelangten Kneipp et al. (139) zu dem Schluss, dass 80 % der Kristallviolett-Moleküle in der Lösung an die Oberfläche von Silber-Nanopartikeln adsorbieren. Rein rechnerisch lässt sich daher für die Agglomerate der hier verwendeten Nanopartikel ein Bereich um die CV-Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-7}$ M abschätzen, bei dem eine vollständige Bedeckung möglich ist (~ 20 NP pro Agglomerat).

Im Experiment war an einer augenblicklichen Graufärbung der Suspension bereits bei einer CV-Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M zu sehen, dass die zuvor schon präagglomerierten AgNPs weiter agglomerierten. Damit ändert sich aber die Geometrie der Agglomerate, ihre Oberfläche und auch die Anzahl der *hot spots*. Diese Änderungen haben Einfluss auf die Signalverstärkung durch den SERS-Effekt, da die Bildung neuer *hot spots* bei einer gleichzeitigen weitgehenden (bzw. vollständigen) Bedeckung mit CV zwangsweise günstig platzierte CV-Moleküle in den neu generierten *hot spots* nach sich ziehen muss. Die Kalibrierkurve wird ab diesem Punkt exponentiell, jedoch ist die Suspension zeitlich nicht mehr stabil. Das SERS-Signal nimmt in diesem Bereich mit der Zeit wieder ab.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

Weiter steigert sich die Agglomerationsgeschwindigkeit innerhalb dieses genannten, schmalen Konzentrationsbereiches sehr schnell bis zu einem Maximum (siehe Kapitel 4.5.2). Sie wird somit auch bei einer weiteren Erhöhung der CV-Konzentration nicht mehr wesentlich schneller, was einen diffusionslimitierten Prozess nahelegt. Die Zeit zwischen dem Vermischen einer Nanopartikel-Suspension mit einer CV-Lösung und dem Messen des SERS-Signals wird in diesem Konzentrationsbereich maßgebend für die Signalintensität, da diese durch den Grad der Agglomeration beeinflusst wird.

Weiter bewirkt eine Vergrößerung der Agglomerate durch fortschreitende Agglomeration, dass ebenfalls deren Sedimentation in der Lösung berücksichtigt werden muss. Dieser Effekt ist eine Besonderheit von quantitativen SERS-Messungen in reiner Lösung und nicht, wie sonst üblich, an einer Oberfläche. Die Sedimentation der Makro-Agglomerate ist dafür verantwortlich, dass die Signalintensität mit der Zeit sogar ganz verschwinden kann, jedoch bewirkt eine Konvektion (Schütteln) und ein erneutes Aufwirbeln der Teilchen wieder ein geringen Signalanstieg. Bei einem derartigen Versuch sind, je nach Wartezeit und CV-Konzentration, graue Makro-Agglomerate am Gefäßboden sichtbar.

Signalabschwächung

Konzentrationsbereich: Ab $1 \cdot 10^{-6}$ M

Wird die CV-Konzentration noch weiter erhöht, so wird eine starke violette Färbung der Lösung mit bloßem Auge sichtbar. Diese steigert sich so weit, dass eine CV-Lösung bei $1 \cdot 10^{-4}$ M fast undurchsichtig ist. Dadurch wird zusätzlich die Laserintensität durch Extinktion gemindert. In Abbildung 4.42 ist die Extinktion durch CV bei den Konzentrationen $1 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-4}$ M bei der Wellenlänge des Raman-Laser von 633 nm gezeigt. Ist die verfügbare Oberfläche der Agglomerate bereits voll besetzt, so wird die Abschwächung des Lasers umso stärker, je höher die CV-Konzentration in der umgebenden Lösung ist, ohne dass die SERS-Verstärkung ebenfalls zunehmen könnte.

Letztlich können Makro-Agglomerate vom Fokus des Raman-Lasers nicht mehr vollständig erfasst werden, sobald sie dessen Durchmesser überschreiten. Bei einem weiteren Anwachsen der Agglomerate kann damit die SERS-Verstärkung nicht entsprechend mitwachsen.

4.5 SERS-Signalveränderung bei fortschreitender Agglomeration

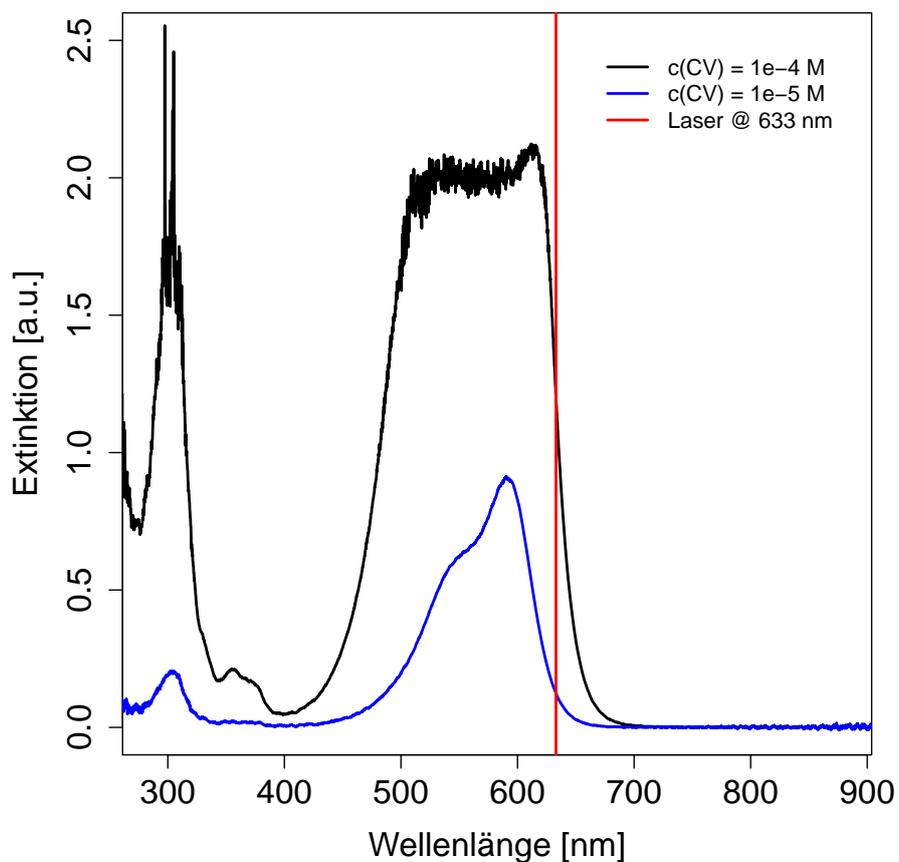


Abbildung 4.42: UV/VIS-Messungen: Optische Dichte von Kristallviolett in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

4.6 Applikation: Quantitative SERS-Messungen an einer NAPL/Wasser-Phasengrenze

4.6.1 Versuchsaufbau und Messanordnung

Im Folgenden wurden quantitative SERS-Messungen in der Nähe einer n-Octanol/Wasser-Phasengrenzfläche durchgeführt. Dabei wurde CV in n-Octanol gelöst und eine Phasengrenzfläche mit der wässrigen präagglomerierten AgNP-Suspension hergestellt (siehe Abbildung 3.6). Über diese Grenzfläche war es dem CV möglich, in die wässrige Phase hinein zu diffundieren. Ein vergleichbares Szenario, bei dem ein Kontaminant aus einer NAPL-Phase in das umgebende Grundwasser diffundiert und dort die Schadstoffkonzentration anhebt, findet sich in der Umwelt überall dort, wo eine Kontamination mit einer unlöslichen, flüssigen organischen Phase stattgefunden hat.

Dabei wurde eine in PTFE gefräste Struktur, wie sie bereits in den Abbildungen 3.6 und 4.43 dargestellt ist, verwendet. Zuerst wurde die Suspension mit den präagglomerierten AgNPs in die quaderförmige Vertiefung pipettiert. Aufgrund von Oberflächenspannung und hydrophoben Wechselwirkungen, floss diese Suspension nicht in den Kanal zu der zylindrischen Vertiefung, sondern verblieb in der quaderförmigen Vertiefung. Nun wurde n-Octanol mit CV in die zylindrische Vertiefung pipettiert. Das n-Octanol wurde dabei aufgrund von Kapillarkräften (starke Benetzung des PTFEs durch n-Octanol) durch den Kanal bis zur quaderförmigen Vertiefung gezogen. Dort bildete sich eine Phasengrenzfläche, über die eine Diffusion stattfinden konnte.

Die Messungen wurden mit einem 10x Objektiv vorgenommen. Schnellstmöglich nach dem Kontakt der Phasen wurde damit begonnen, mehrere hundert Profile, welche jeweils aus vielen Einzelspektren bestanden, aufzunehmen (0,1 Sekunde Akquisitionszeit pro Einzelspektrum). Die Profile begannen dabei im Kanal, in dem sich nur das CV-haltige n-Octanol befand und wurden über die Grenzfläche n-Octanol/Wasser in die Suspension fortgesetzt (siehe rote Linie in Abbildung 4.43). So war es möglich, die zeitliche und räumliche Entwicklung der CV-Konzentration innerhalb der quaderförmigen Vertiefung zu quantifizieren.

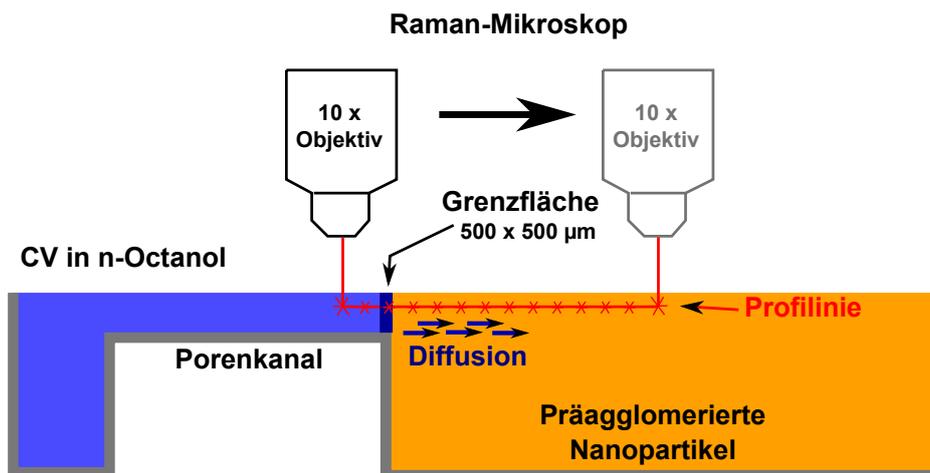


Abbildung 4.43: Seitenansicht: Experimenteller Aufbau bei quantitativen SERS-Messungen an einer Phasengrenzfläche. Die roten Sterne skizzieren die Einzel-Messpunkte auf der Profillinie (Zeichnung nicht maßstabsgetreu).

4.6.2 Anstieg der mittleren CV-Konzentration

Bei den Versuchen zeigte sich immer wieder dieselbe charakteristische zeitliche Entwicklung der SERS-Signalintensität. In Abbildung 4.44 wurde dabei die Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} gegen die Strecke x aufgetragen.

Im Verbindungskanal konnte kein CV detektiert werden, da sich im n-Octanol auch keine Nanopartikel befanden und dort die CV-Konzentration mit $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ unter der Nachweisgrenze der konventionellen Raman-Mikrospektroskopie lag.

An der Grenzfläche war ein sprunghafter Signalanstieg zu verzeichnen, welcher nach $50 - 100 \mu\text{m}$ wieder abfiel. Er unterlag in kurzen Zeitspannen extrem starken Schwankungen in seiner Intensität, über die gesamte Versuchsdauer gesehen nahm die Intensität jedoch stetig ab. An der direkten Phasengrenzfläche war eine erhöhte Neigung zur Ansammlung und Agglomeration der AgNP-Agglomerate zu beobachten, welche sich durch die dortige Anhaftung von sichtbaren Makro-Agglomeraten zeigte.

Jenseits dieses Intensitätsanstiegs war jedoch auf die ganze restliche Länge des Profils nahezu dieselbe Intensität in den CV-SERS-Spektren zu beobachten. Diese Konzentration stieg dann gleichmäßig über die restliche Versuchsdauer hin an (rote Linie in Abbildung 4.44).

4.6 Applikation: Quantitative SERS-Messungen an einer NAPL/Wasser-Phasengrenze

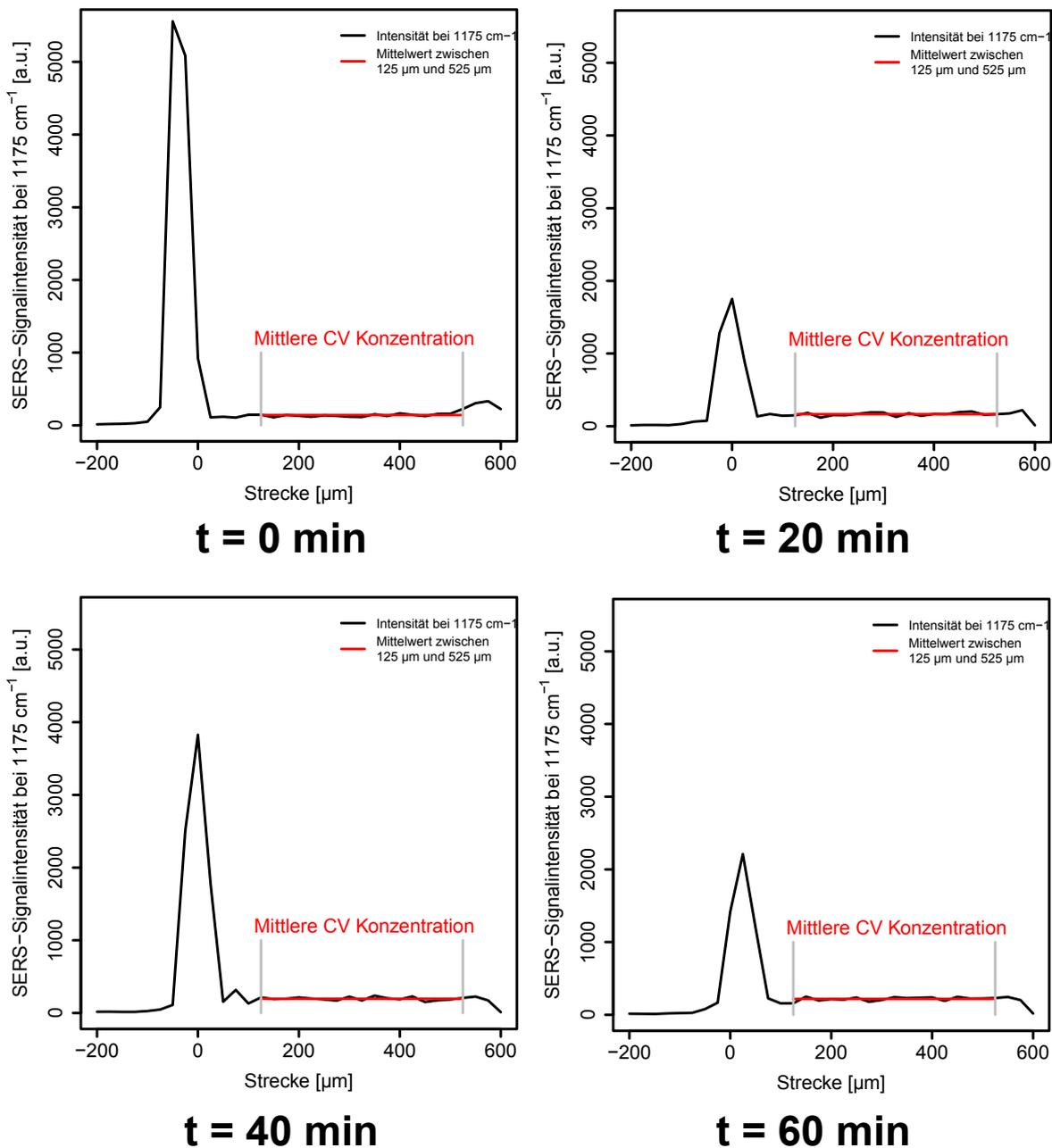


Abbildung 4.44: Konzentrationsprofile von CV zu unterschiedlichen Zeiten nach Versuchsbeginn bei einer Diffusion aus der n-Octanolphase ($x < 0$) in die Wasserphase ($x > 0$). Der Mittelwert der Intensität der SERS-Spektren zwischen 125 μm und 525 μm hinter der Phasengrenze ist als rote Linie markiert.

Da die CV-Konzentration jenseits der Grenzfläche in der ganzen quaderförmigen Vertiefung des Versuchsgefäßes gleich zu sein schien, wurde der durchschnittliche Wert zwischen 125 μm und 525 μm hinter der n-Octanol/Wasser-Grenzfläche genauer betrachtet.

Wird dieser Mittelwert (rote Linie in Abbildung 4.44) gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich folgende Grafik (Abbildung 4.45)

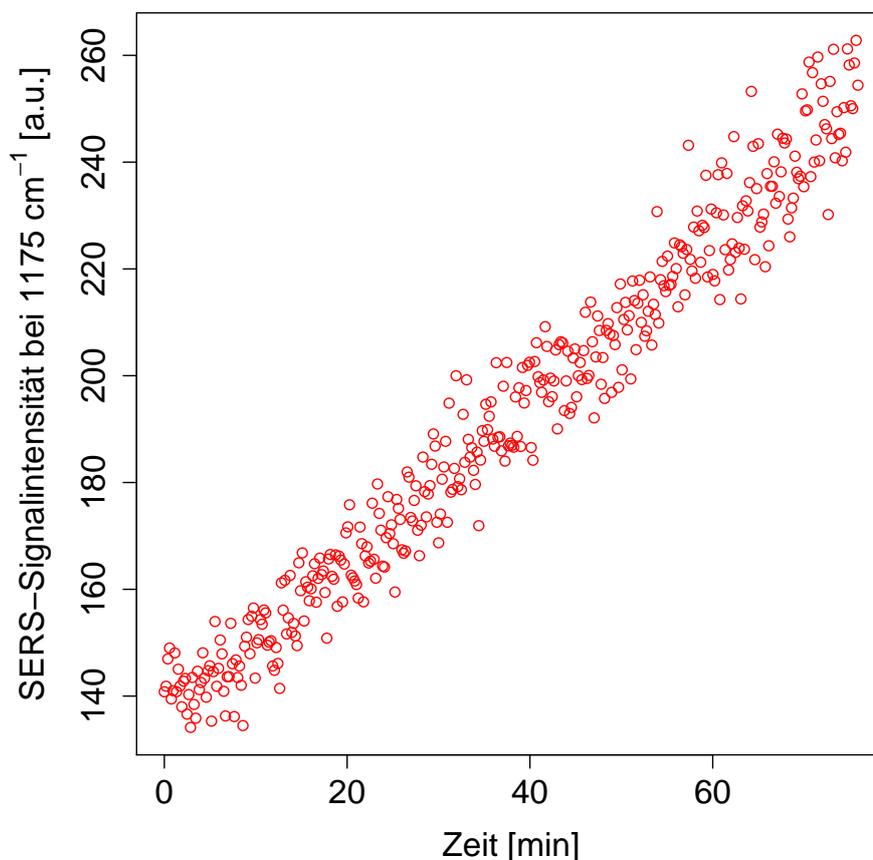


Abbildung 4.45: Mittlere Intensität der CV-SERS-Spektren in der Wasserphase für $125 \mu\text{m} < x < 525 \mu\text{m}$ (rote Linie aus Abbildung 4.44).

Es ist zu sehen, dass sich die Signalintensität der CV-SERS-Spektren innerhalb von 70 Minuten ungefähr verdoppelte. Um nun von der Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} auf die absolute Konzentration schließen zu können, musste zunächst die zugehörige Kalibrierkurve ausgewertet werden. Diese wurde zeitnah unter denselben Bedingungen (gleiche Versuchsanordnung, Messzeit, Laserleistung, Objektiv etc.), wie die gerade erwähnten Profile gemessen (Abbildung 4.46).

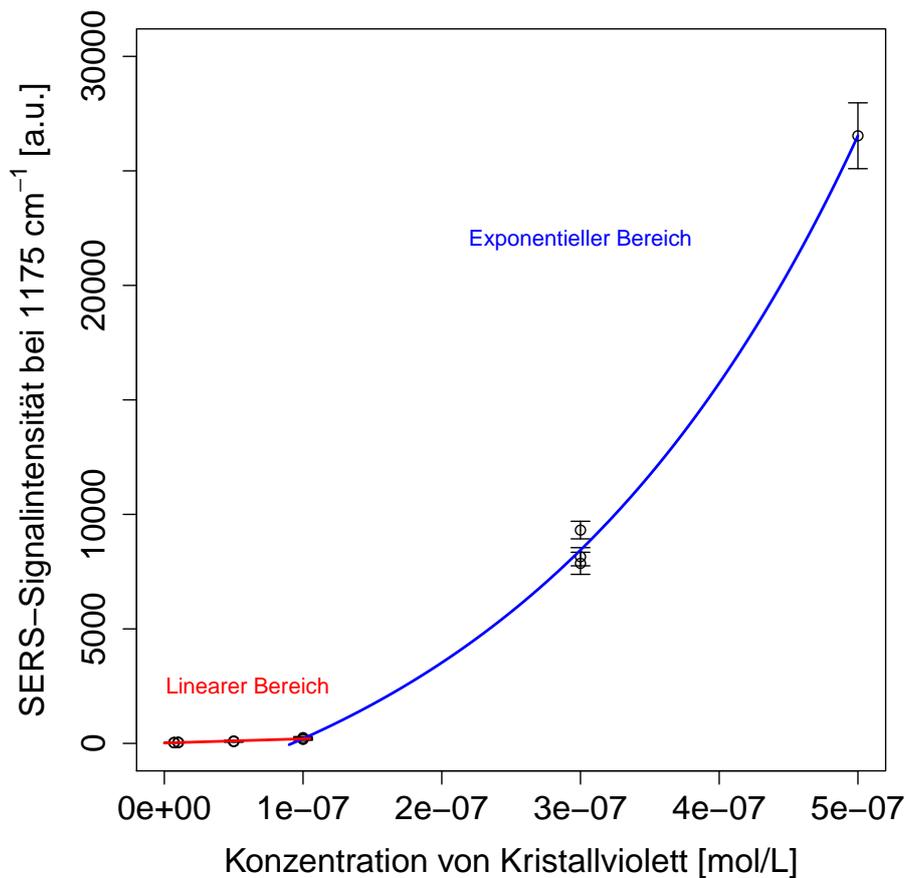


Abbildung 4.46: Kalibrierkurve von CV des zugehörigen AgNP-Ansatzes der Gradientenmessung aus Abbildung 4.44. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $10x$ Obj., $\lambda = 633$ nm.

Die Kalibrierkurve zeigte wieder den bereits beschriebenen Übergang von linear nach exponentiell ab einer CV-Konzentration von $\approx 1 \cdot 10^{-7}$ M. Der lineare Bereich (rot in Abbildung 4.46) folgte dabei der Gleichung:

$$I(c) = a \cdot c + t \quad (4.11)$$

mit $a = 1,83 \cdot 10^9$, $t = 18,0$.

Der exponentielle Bereich (blau in Abbildung 4.46) folgte der Gleichung:

$$I(c) = a \cdot e^{b \cdot c} + t \quad (4.12)$$

mit $a = 4,64 \cdot 10^3$, $b = 3,94 \cdot 10^6$, $t = 6,67 \cdot 10^3$.

Die Kalibrierkurve deckte damit den dynamischen Bereich von $7 \cdot 10^{-9}$ M bis $5 \cdot 10^{-7}$ M ab. Durch Bildung der Umkehrfunktion, konnten die im Experiment erhaltenen Intensitäten der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} (gemessen in $[\text{counts/second}]$) einer Konzentration zugeordnet

werden. Damit war es nun möglich, den zeitlichen Anstieg der Signalintensität aus Abbildung 4.45 in mol/L auszudrücken (Abbildung 4.47).

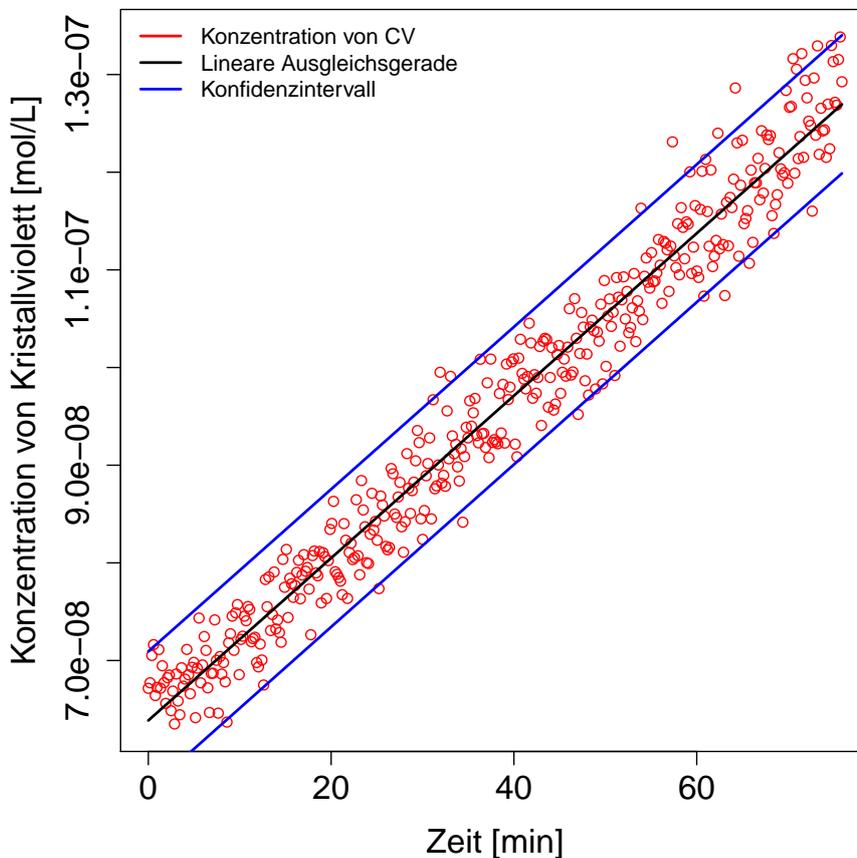


Abbildung 4.47: Mittlere CV-Konzentration in der Wasserphase für $125 \mu\text{m} < x < 525 \mu\text{m}$, rote Linie aus Abbildung 4.44. Das Intervall um die eingezeichnete Ausgleichsgerade enthält 95 % der Messwerte.

Lineare Ausgleichsgerade Abbildung 4.47

$$I(c) = m \cdot c + t \quad (4.13)$$

mit $m = 8,31 \cdot 10^{-10}$, $t = 6,39 \cdot 10^{-8}$.

Bei einer Wiederholung des Versuches war wieder derselbe Anstieg einer mittleren CV-Konzentration in der gesamten quaderförmigen Vertiefung der Messanordnung zu beobachten und nicht die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten, wie es eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Um aber überall eine mittlere CV-Konzentration und keinen Gradienten zu erhalten, konnte in dieser kurzen Zeit nur Konvektion für die Umverteilung der CV-Konzentration verantwortlich sein. Deshalb wurden die Bedingungen, welche bei dem Kontakt der reinen n-Octanolphase mit der Wasserphase herrschen, näher untersucht.

4.6 Applikation: Quantitative SERS-Messungen an einer NAPL/Wasser-Phasengrenze

Konvektion an einer n-Octanol/Wasser-Phasengrenzfläche:

Werden reines Wasser und reines n-Octanol zusammengeführt (kein CV im System), so bildet sich an der Phasengrenze von dem n-Octanol in das Wasser ein Massenstrom aus. Dieser Massenstrom ist in der Lage eine Konvektion zu erzeugen. Mit Hilfe von fluoreszierenden Latex-Nanopartikeln (kein SERS-Effekt möglich) können die Bewegungen der reinen Flüssigkeit sichtbar gemacht werden. Es wurde dieselbe Messanordnung wie bei SERS-Gradientenmessungen verwendet (Abbildung 4.43).

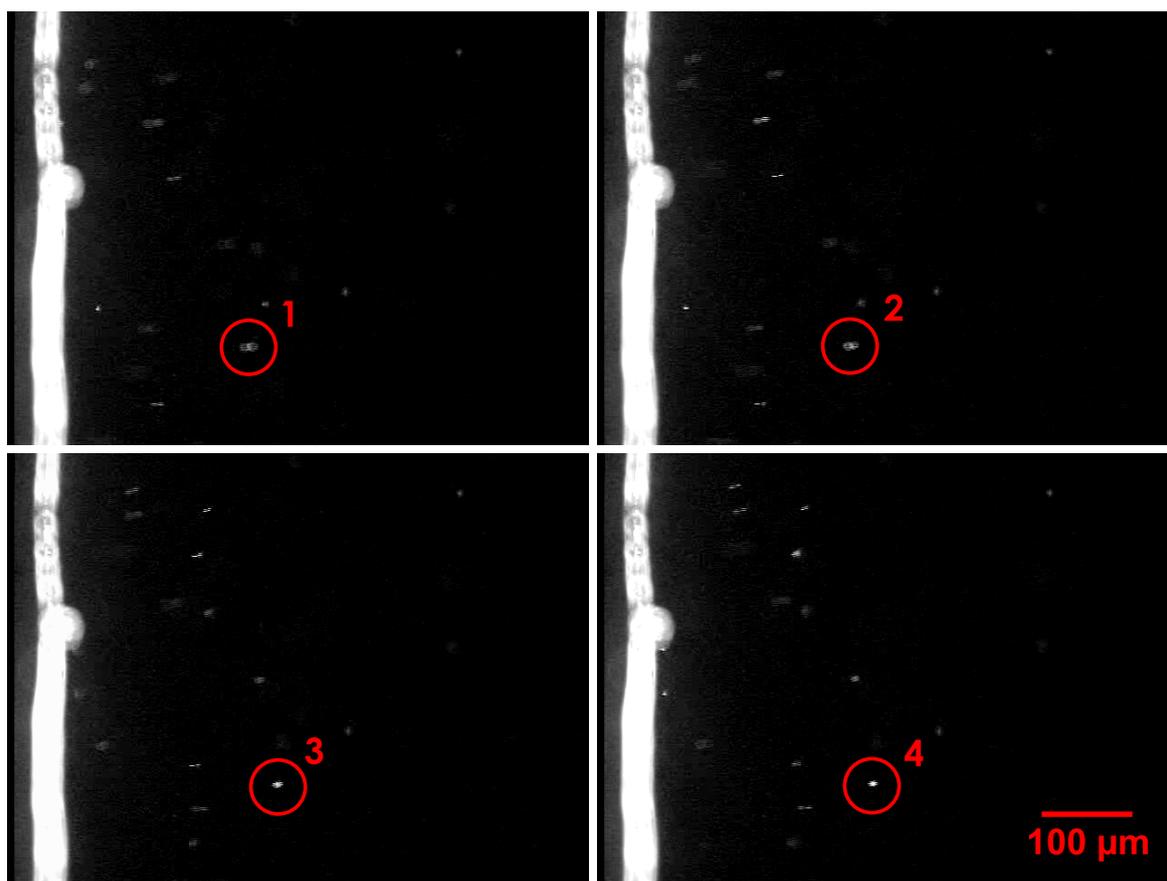


Abbildung 4.48: Vier Fluoreszenz-Aufnahmen: Bewegung von Latex-Nanopartikeln an einer n-Octanol/Wasser-Grenzfläche (heller Streifen) aufgrund eines Massenstroms und des Marangoni-Effekts. Zeitabstand der Bilder: 1/20 s.

Jeweils links in Abbildung 4.48 ist dabei die n-Octanolphase zu sehen, an deren Grenzfläche sich die fluoreszierenden Latex-Nanopartikel (weiße Pünktchen) stark ansammelten (heller Streifen). Rechts ist die Wasserphase zu sehen, in der sich auf Grund von Verwirbelungen eine walzenartige Konvektionszone bildete. Diese Zone reichte zwar nur ein paar 100 μm in die Lösung, jedoch gab es auch andere starke Verwirbelungen, die auf der ganzen Länge der quaderförmigen Vertiefung (11 mm) der Messanordnung zu beobachten waren (Abbildung 4.50).

In Abbildung 4.49 ist ein vergrößerter Ausschnitt der linken unteren Ecke zu sehen, bei dem die vier Bilder aus Abbildung 4.48 addiert wurden, um die Partikelbewegung deutlicher darzustellen.

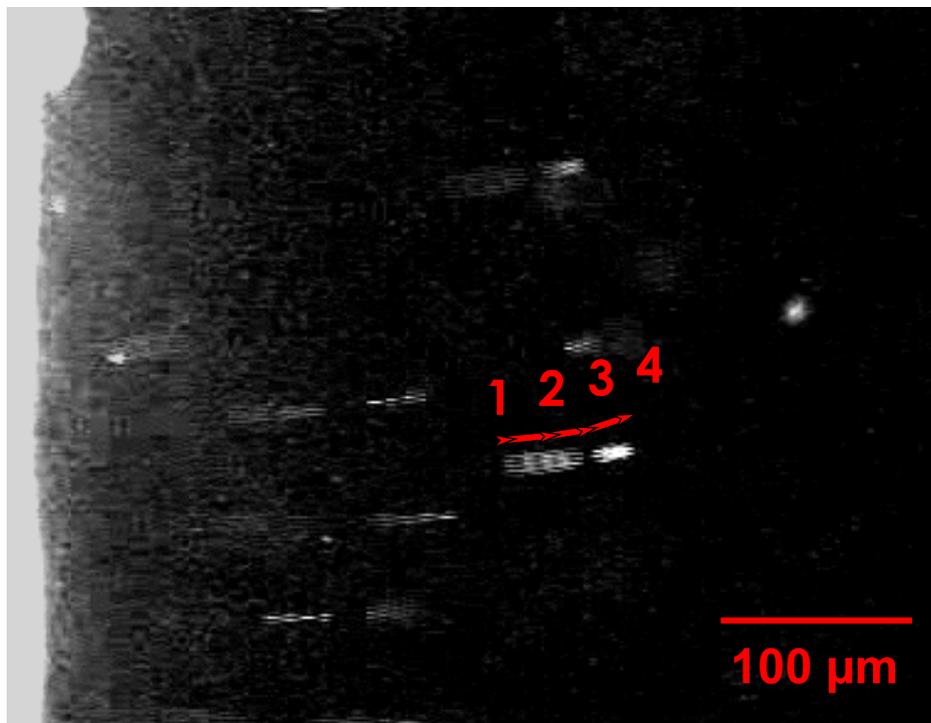


Abbildung 4.49: Partikelbewegung: Addition der vier Einzelbilder von Abbildung 4.48. Vergrößerte Darstellung.

Aufgrund dieser Tatsache wurden bei den nun folgenden Gradientenmessungen die Suspension mit den präagglomerierten AgNPs (Wasserphase) über Nacht mit n-Octanol ausgeschüttelt. Weiter wurde auch das n-Octanol, aus dem heraus später das CV in die Wasserphase diffundieren sollte, über Nacht mit Wasser ausgeschüttelt. Auf diese Weise wurden die Konzentrationen der jeweiligen Phasen (Wasser/n-Octanol) bereits vor ihrem Kontakt gesättigt und angeglichen.

Ein weiterer Effekt ist in der Literatur unter dem Begriff „Marangoni-Effekt“ zu finden (87) und beschreibt den Massen- oder Wärmetransport bei Gradienten in der Grenzflächenspannung (88). Da die Grenzflächenspannung von der Temperatur abhängt, können leichte Temperaturunterschiede an Phasengrenzflächen durch den Marangoni-Effekt eine Konvektion erzeugen, und so Energie aus dem Temperaturgradienten abführen. Haben die wässrige Phase und das n-Octanol also bei ihrem Kontakt leicht unterschiedliche Temperaturen, so entsteht eine Konvektion, welche den Temperaturgradienten (bzw. Gradient in der Oberflächenspannung) abbaut. In Abbildung 4.50 sind die beschriebenen Verwirbelungen schematisch dargestellt.

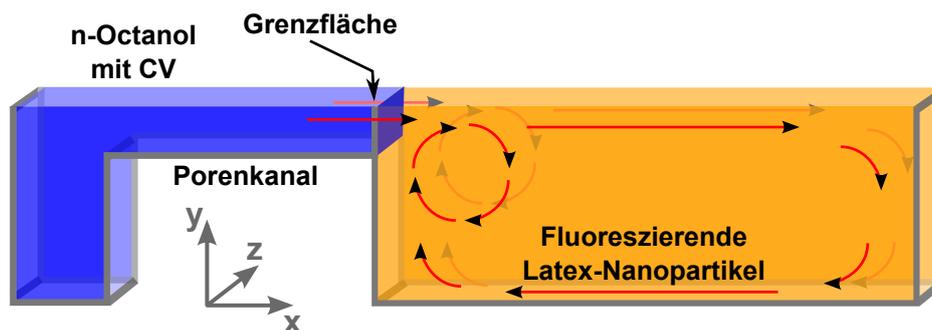


Abbildung 4.50: Skizze: Walzenförmige Verwirbelungen, welche durch den Marangoni-Effekt und den starken Massenstrom des n-Octanols in die wässrige Phase entstanden (nicht maßstabsgetreu).

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

4.7.1 Beschichtung der Nanopartikel und veränderte Agglomerationseigenschaften

Wenn die präagglomerierte wässrige AgNP-Suspension mit n-Octanol gesättigt wird, so hat dies zwangsweise eine Beschichtung der AgNP-Agglomerate zur Folge. Ein Verständnis der Wechselwirkung des n-Octanols mit den AgNPs und CV ist deshalb von entscheidender Bedeutung, um später sicher und reproduzierbar einen Konzentrationsgradienten im Bereich von Mikrometern mit quantitativem SERS messen zu können. Deshalb wurde die SERS-Signalintensität von CV bei Anwesenheit von n-Octanol in unterschiedlichen Konzentrationen unterhalb der maximalen Löslichkeit untersucht (Abbildung 4.51). Die maximale Löslichkeit von n-Octanol in Wasser bei 20°C beträgt 0,3 g/L (also $\approx 360 \mu\text{L}$ n-Octanol pro Liter Wasser) oder 2,3 mmol/L (184).

Bei dem Versuch, welcher Abbildung 4.51 zugrunde liegt, wurden bei jedem Messpunkt eine präagglomerierte AgNP-Suspension (immer $360 \mu\text{L}$) und eine wässrige CV-Lösung (immer $40 \mu\text{L}$) jeweils separat zuerst mit Wasser verdünnt ($0 \mu\text{L}$ und $400 \mu\text{L}$ oder $100 \mu\text{L}$ und $300 \mu\text{L}$ oder $200 \mu\text{L}$ und $200 \mu\text{L}$ oder $300 \mu\text{L}$ und $100 \mu\text{L}$ oder $400 \mu\text{L}$ und $0 \mu\text{L}$) und erst dann vereinigt und gemessen. Das Gesamtvolumen betrug also immer $800 \mu\text{L}$, die endgültige CV-Konzentration bei allen Messungen betrug stets $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

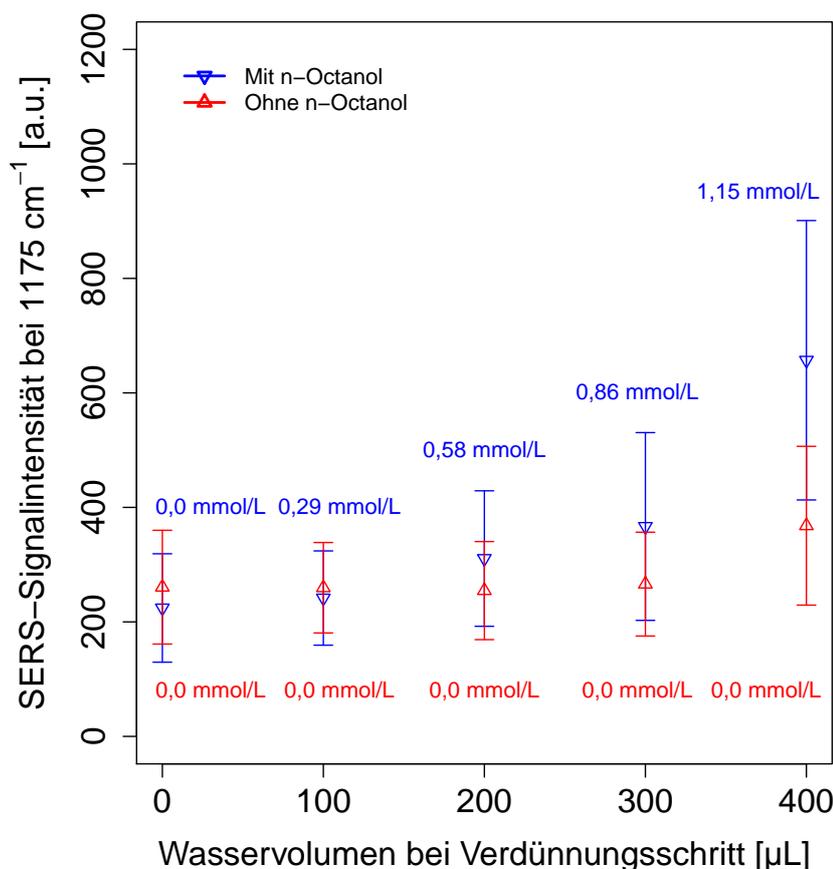


Abbildung 4.51: SERS-Signal-Intensitäten bei gleicher CV-Konzentration ($c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-8}$ M) aber steigendem n-Octanolgehalt (blau). Rote Messpunkte: Vergleichsmessung bei Abwesenheit von n-Octanol. Jedem Messpunkt liegen 3 Wiederholungen mit je 200 Einzelspektren zugrunde. Akquisitionszeit 1×1 s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $20x$ W Obj., $\lambda = 633$ nm.

In der ersten Versuchsreihe (rote Kurve) war das Wasser, mit dem verdünnt wurde, nicht mit n-Octanol versetzt. Bei der zweiten Versuchsreihe hingegen (blaue Kurve), wurden die präagglomerierten AgNP mit Wasser verdünnt, welches vorher mit n-Octanol gesättigt wurde. Der n-Octanolgehalt in den vermessenen Proben stieg also von Null auf die Hälfte der maximalen Löslichkeit (Verdünnung von $400\ \mu\text{L}$ CV-präagglomerierte-AgNP-Suspension mit $400\ \mu\text{L}$ n-Octanol-gesättigtem Wasser), $1,15\text{ mmol/L}$ (oder $0,15\text{ g/L}$) an. Jede Messung wurde 3 mal wiederholt, in Abbildung 4.51 sind die Mittelwerte aus je 3 Wiederholungen aufgetragen.

Dabei ist zu sehen, dass das SERS-Signal von CV umso stärker wurde, je mehr n-Octanol gesättigtes Wasser an einer Messung beteiligt war. Da aber ansonsten alle Versuchsbedingungen gleich waren, bedeutet dies, dass eine Beschichtung mit n-Octanol auf der Oberfläche der AgNPs auch eine stärkere Anreicherung des CVs in dieser Beschichtung bedingt. Dies

erscheint naheliegend, da CV besser in n-Octanol löslich ist als in Wasser, weshalb sich auch mehr CV in einer Beschichtung an der direkten Oberfläche der AgNP befinden sollte ($\log K_{OW}(CV) = 0,38 \pm 0,03$, im Zuge dieser Arbeit mit UV/VIS-Spektroskopie bestimmt, beziehungsweise $\log K_{OW}(CV) = 0,51$ bestimmt durch Tsai et al. mit *TCCPC* (99) bei $\text{pH} = 7,4$).

4.7.2 Agglomeration bei Anwesenheit von n-Octanol

Wird in einem weiteren Versuch die zeitliche Entwicklung des SERS-Signals bei erneuter Agglomeration (hohe CV-Konzentration) in Ab- und Anwesenheit von n-Octanol verglichen, so zeigen sich ebenfalls Unterschiede (Abbildungen 4.52 ohne n-Octanol-Beschichtung und 4.53 mit n-Octanol-Beschichtung). In diesem Versuch war die CV-Konzentration so hoch ($c(CV) = 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), dass wie bereits gezeigt, eine weitere Agglomeration der bereits präagglomerierten AgNP-Suspension ausgelöst wurde. Im Experiment war dies ebenfalls an der schlagartigen Graufärbung der präagglomerierten AgNP-Suspension zu sehen, sobald diese in Kontakt mit dem CV kam. Es wurde anschließend wieder die Intensität der CV-Bande bei 1175 cm^{-1} gegen die Zeit aufgetragen.

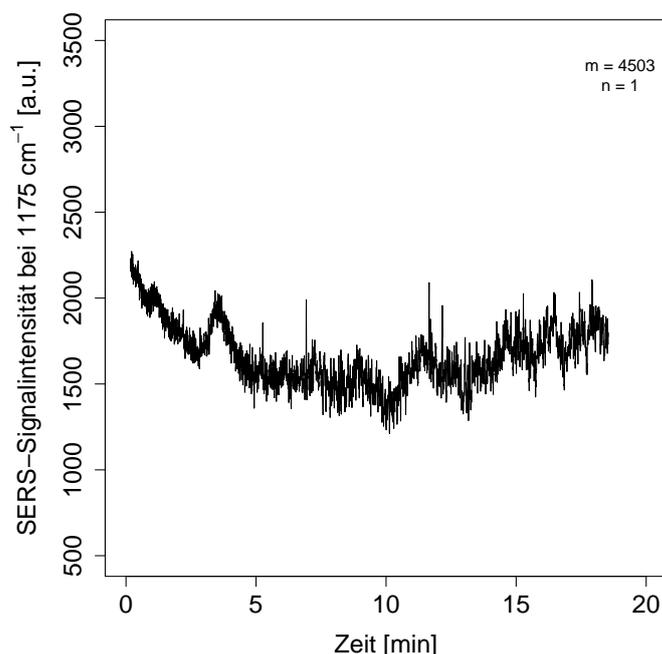


Abbildung 4.52: Entwicklung der Signalintensität bei Agglomeration durch CV ($c(CV) = 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). Es befand sich kein n-Octanol in der Probe. Akquisitionszeit $1 \times 0,1 \text{ s}$ pro ES, 4503 Einzelspektren, Laserleistung 10 % (1,4 mW), $10x$ Obj., $\lambda = 633 \text{ nm}$.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

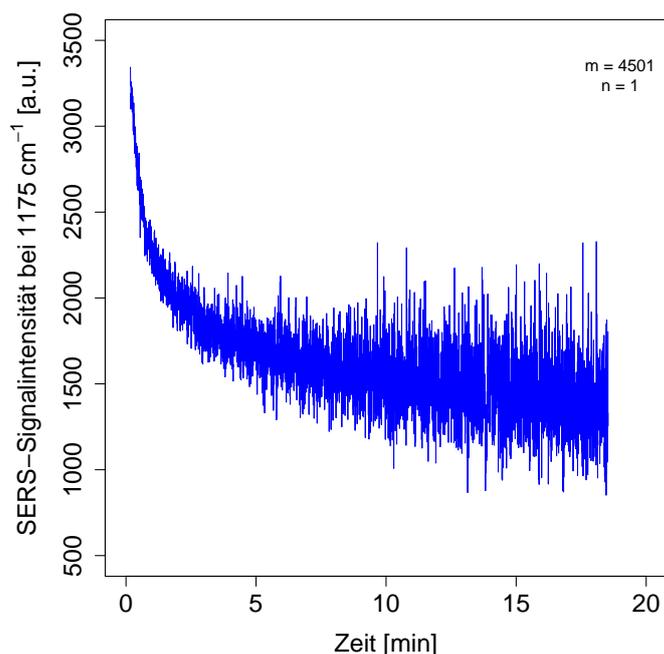


Abbildung 4.53: Entwicklung der Signalintensität bei Agglomeration durch CV ($c(\text{CV}) = 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). Die Nanopartikel-Agglomerate verfügten über eine Beschichtung mit n-Octanol. Akquisitionszeit $1 \times 0,1 \text{ s}$ pro ES, 4501 Einzelspektren, Laserleistung 10 % (1,4 mW), $10\times$ Obj., $\lambda = 633 \text{ nm}$.

In Abbildung 4.52 ist die Abnahme der Signalintensität bei der Abwesenheit von n-Octanol und in Abbildung 4.53 bei Anwesenheit von n-Octanol zu sehen. Die SERS-Signalintensität schwankt bei Abwesenheit von n-Octanol deutlich stärker. Sie nimmt erst ab, erhöht sich 4 Minuten nach der CV-Zugabe kurzzeitig (bis $2000 \text{ counts/second}$), nimmt bis $t = 10$ Minuten wieder ab (bis $1500 \text{ counts/second}$) und erhöht sich danach wieder auf ca. $1900 \text{ counts/second}$. Diese Signalschwankungen scheinen jedoch eher durch zufällige Diffusion von größeren, neu geformten Makro-Agglomeraten entstanden zu sein.

Bei einer Beschichtung der Nanopartikel-Agglomerate mit n-Octanol, ist der Kurvenverlauf deutlich unterschiedlich. Trotz derselben CV-Konzentration von $c(\text{CV}) = 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, ist die SERS-Signalintensität anfänglich höher ($3400 \text{ counts/second}$). Diese fällt dann innerhalb von 18 Minuten stetig auf $1600 \text{ counts/second}$ ab. Dabei erhöht sich die Schwankungsbreite des Signals deutlich. Diese Unterschiede der beiden Kurven zeigen, dass es ebenfalls große Unterschiede im Agglomerationsverhalten der präagglomerierten AgNP-Suspension bei An- und Abwesenheit von n-Octanol gibt. Eine genaue Aufklärung der Gründe hätte jedoch weitere Versuche zu dem Agglomerationsverhalten erfordert, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich war.

Eine quantitative Messung der Konzentration mit SERS ist allerdings nur in einem Konzentrationsbereich sinnvoll, in dem die Nanopartikel-Agglomerate bei Anwesenheit von CV zeitlich stabil bleiben. Die CV-Konzentration von $c(\text{CV}) = 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ in diesem Versuch

liegt außerhalb dieses zeitlich stabilen Bereiches und wäre für quantitative SERS-Messungen ohnehin ungeeignet.

4.7.3 Stabilitätsbereich bei Anwesenheit von n-Octanol

Bei einem veränderten Agglomerationsverhalten durch die Anwesenheit von n-Octanol, stellt sich jedoch auch die Frage, ob die Konzentrationsbereiche von CV in denen Agglomeration stattfindet ebenfalls andere sind, als bei der Abwesenheit von n-Octanol. Um dies zu untersuchen wurde eine Kalibrierkurve mit n-Octanolbeschichtung aufgenommen. Die Proben wurden dann nach ca. 18 Stunden noch einmal gemessen, um die Veränderung in den SERS-Signalen ein und derselben Probe abschätzen zu können (Abbildung 4.54, logarithmische Darstellung der x-Achse).

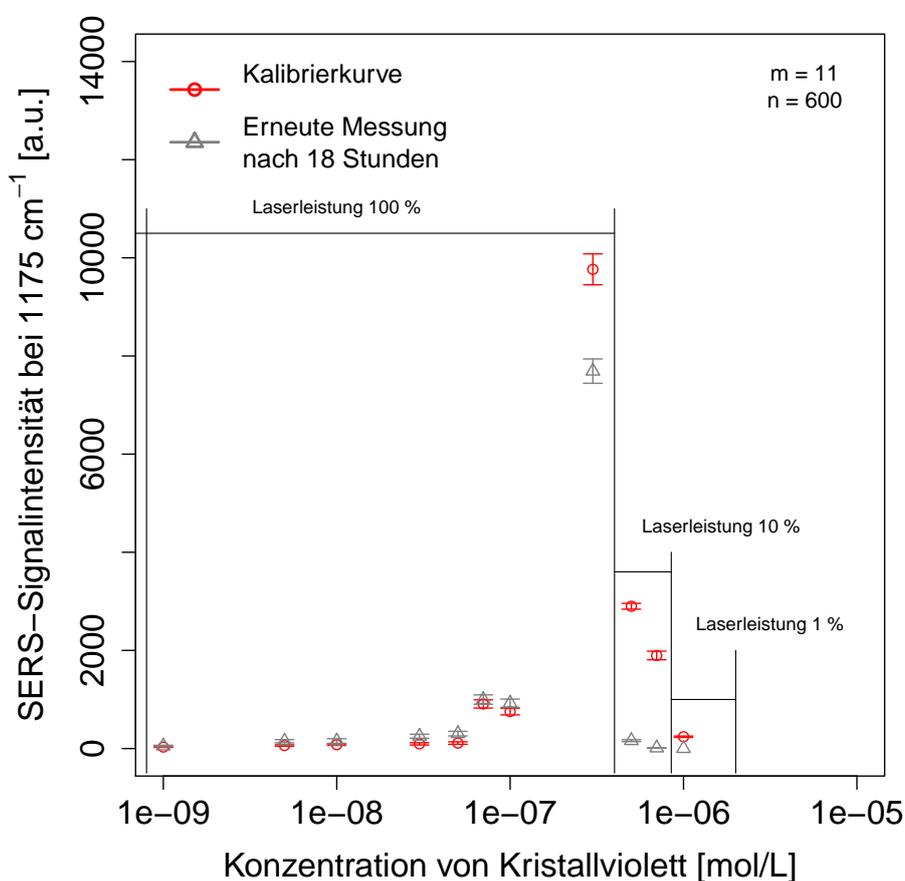


Abbildung 4.54: SERS-Intensitäten von CV an AgNP-Agglomeraten mit n-Octanolbeschichtung. Eine erneute Messung nach 18 Stunden zeigte signifikante Änderungen in den SERS-Intensitäten (halblogarithmische Darstellung). Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW) für $c(\text{CV}) > 3 \cdot 10^{-7}$ M, $10\times$ Obj., $\lambda = 633$ nm.

Es zeigte sich, dass bei der CV-Konzentration ab $3 \cdot 10^{-7}$ M die SERS-Signalintensität begann mit der Zeit abzunehmen. Ab $c(\text{CV}) = 5 \cdot 10^{-7}$ M war das SERS-Signal nach 18 h

fast vollständig verschwunden. Eine Signalabsenkung durch Agglomeration konnte in diesem Versuch also nur oberhalb von $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ beobachtet werden, und fällt damit in denselben Konzentrationsbereich wie bei der Abwesenheit von *n*-Octanol. Jedem Datenpunkt aus Abbildung 4.54 liegen 3 Wiederholungen mit je 200 Einzelspektren zugrunde.

4.7.4 Kalibrierkurven bei Anwesenheit von *n*-Octanol

Es wurden nun insgesamt drei Kalibrierkurven aufgenommen, bei denen sich *n*-Octanol mit im Messsystem befand. Dabei zeigten sich, wie bei den vorherigen Versuchen wiederum unterschiedlichen Kurvenformen, jedoch innerhalb derselben Konzentrationsgrenzen.

Im Bereich einer CV-Konzentration unterhalb von $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ verhielt sich die Beziehung zwischen Konzentration und Signalintensität der SERS-Spektren jedoch diesmal nicht linear. Die Kalibrierkurve stieg dort zuerst steil an und nahm dann einen weitgehend flachen Verlauf. Kurz unterhalb von $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ begann sie jedoch wieder steil anzusteigen. Ein derartiger Kurvenverlauf ähnelt der Isothermengleichung von Brunauer, Emmett und Teller (BET-Isotherme). Wird versucht, die Kalibrierkurve mit der BET-Isothermengleichung anzunähern, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung.

Die folgenden Abbildungen 4.60 bis 4.57 zeigen drei Kalibrierkurven, die jeweils an unterschiedliche Tagen gemessen wurden. Dabei ist immer der Übersichtlichkeit halber zuerst der Konzentrationsbereich von 0 M bis $3,75 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (bzw. $3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) zu sehen und in der folgenden Abbildung der vergrößerte Konzentrationsbereich von 0 M bis $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

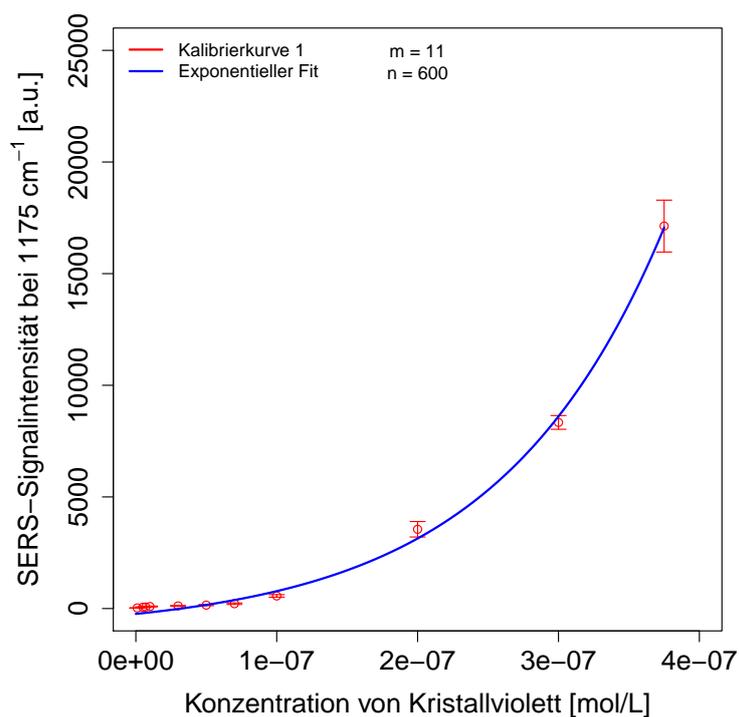


Abbildung 4.55: Kalibrierkurve 1 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit n-Octanol. Gesamter Konzentrationsbereich, Annäherung mit einer Exponentialgleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

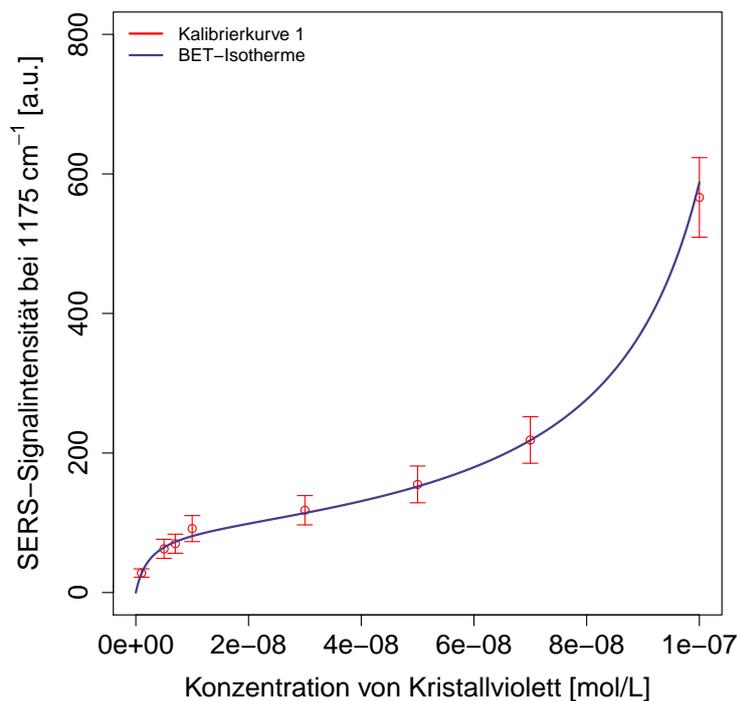


Abbildung 4.56: Kalibrierkurve 1 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit n-Octanol. Vergrößerte Darstellung bis $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7}$ M, Annäherung mit einer BET-Isothermengleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

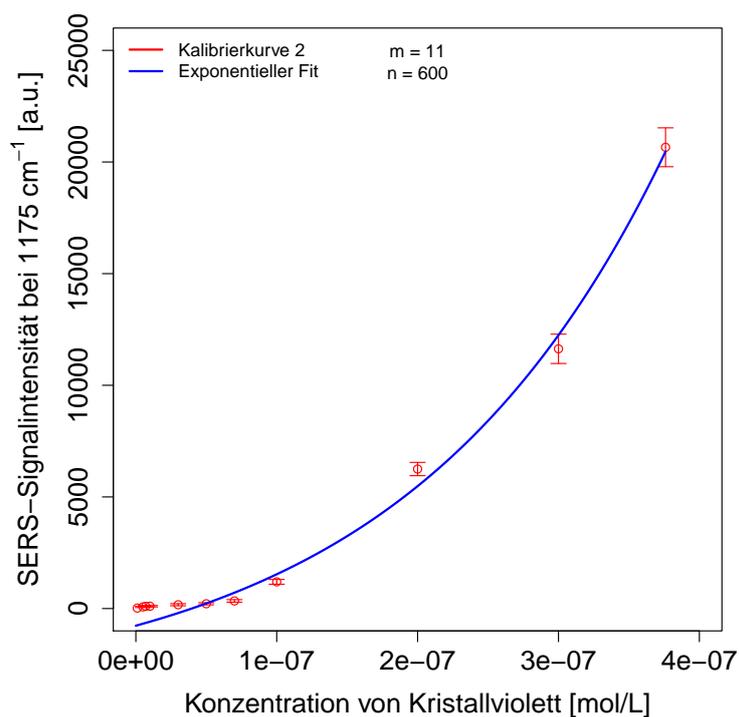


Abbildung 4.57: Kalibrierkurve 2 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit n-Octanol. Gesamter Konzentrationsbereich, Annäherung mit einer Exponentialgleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.7 Der Einfluss von *n*-Octanol bei SERS-Messungen

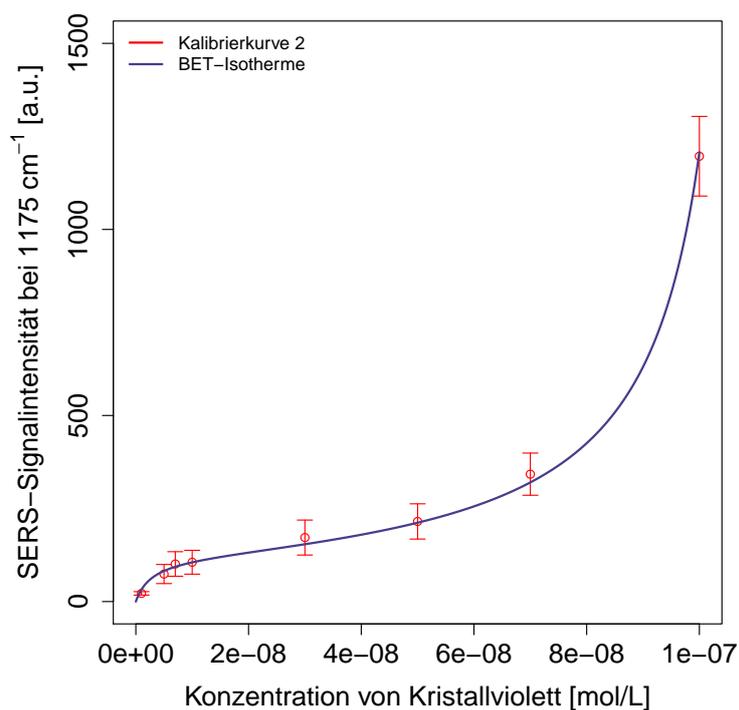


Abbildung 4.58: Kalibrierkurve 2 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit *n*-Octanol. Vergrößerte Darstellung bis $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7}$ M, Annäherung mit einer BET-Isothermengleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.7 Der Einfluss von *n*-Octanol bei SERS-Messungen

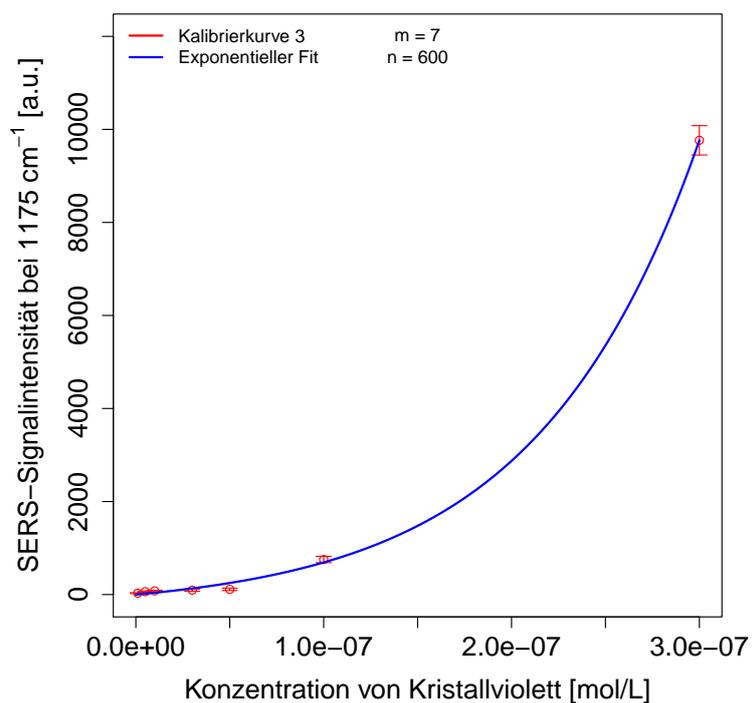


Abbildung 4.59: Kalibrierkurve 3 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit *n*-Octanol. Gesamter Konzentrationsbereich, Annäherung mit einer Exponentialgleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), 10x Obj., $\lambda = 633$ nm.

4.7 Der Einfluss von *n*-Octanol bei SERS-Messungen

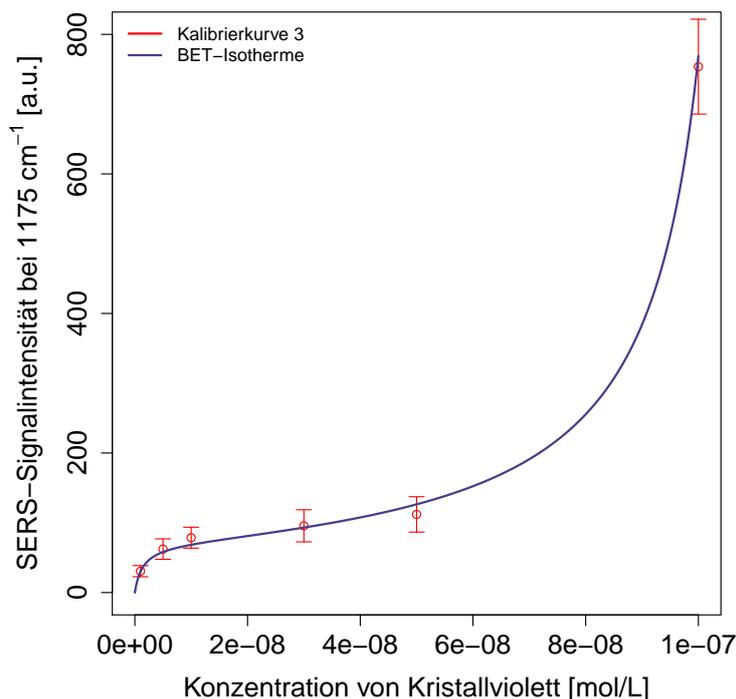


Abbildung 4.60: Kalibrierkurve 3 von CV bei einer Beschichtung der präagglomerierten AgNPs mit *n*-Octanol. Vergrößerte Darstellung bis $c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7}$ M, Annäherung mit einer BET-Isothermengleichung. Akquisitionszeit $1 \times 0,1$ s pro ES, Laserleistung 100 % (14 mW), $10x$ Obj., $\lambda = 633$ nm.

Für $c(\text{CV}) < 1 \cdot 10^{-7}$ M konnten die Messwerte mit einer BET-Isothermengleichung angenähert werden:

$$I(c) = \frac{K \cdot q \cdot c}{(C_{\text{sat}} - c) \cdot (1 + (K - 1) \cdot (\frac{c}{C_{\text{sat}}}))} \quad (4.14)$$

Wobei $I(c)$ die gemessene SERS-Intensität, c die Kristallviolett-Konzentration und K , q und C_{sat} Konstanten sind (siehe Tabelle 4.11).

Im Bereich höherer CV-Konzentrationen (oberhalb von $1 \cdot 10^{-7}$ M) wurde, wie auch bei der Abwesenheit von *n*-Octanol, eine exponentielle Kurvenform beobachtet (erneute Agglomeration).

Für $c(\text{CV}) > 1 \cdot 10^{-7}$ M wurden die Messwerte daher mit einer Exponentialgleichung angenähert:

$$I(c) = a \cdot e^{b \cdot c} + t \quad (4.15)$$

mit den Konstanten a , b , und t .

In den Tabellen 4.11 und 4.12 sind die Werte der Konstanten zu den Gleichungen 4.14 und 4.15 angegeben, mit welchen die Anpassungen der Kalibrierkurven vorgenommen wurden.

4.7 Der Einfluss von n-Octanol bei SERS-Messungen

Tabelle 4.11: Koeffizienten der BET-Isothermengleichung 4.14 zu den Kalibrierkurven 1 - 3 mit n-Octanolbeschichtung der präagglomerierten AgNPs.
Konzentrationsbereich: $c(\text{CV}) = 0 \text{ M}$ bis $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

Koeffizient	Kalibrierkurve 1	Kalibrierkurve 2	Kalibrierkurve 3
K	50	40	80
q	90	120	70
C_{sat}	$1,18 \cdot 10^{-7}$	$1,11 \cdot 10^{-7}$	$1,10 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 4.12: Koeffizienten des exponentiellen Bereichs (Gleichung 4.15) der Kalibrierkurven 1 - 3 mit n-Octanolbeschichtung der präagglomerierten AgNPs.
($c(\text{CV}) = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ bis $3,75 \cdot 10^{-7} \text{ M}$).

Koeffizient	Kalibrierkurve 1	Kalibrierkurve 2	Kalibrierkurve 3
a	$7,72 \cdot 10^2$	$3,22 \cdot 10^3$	$3,20 \cdot 10^2$
b	$8,41 \cdot 10^6$	$5,39 \cdot 10^6$	$7,15 \cdot 10^7$
t	$1,01 \cdot 10^3$	$3,99 \cdot 10^3$	$3,20 \cdot 10^2$

Der Grund für die Änderung der Kurvenform der Kalibrierkurven von linear, zu einem Verlauf analog der BET-Isothermengleichung ist in einer Beschichtung der Nanopartikel-Agglomerate mit n-Octanol zu suchen.

Um die Dicke der n-Octanolbeschichtung abzuschätzen, kann folgende Rechnung unternommen werden:

Die Kenngrößen der Nanopartikel und der im Versuch verwendeten Agglomerate wurde bereits in Kapitel 4.4.5 angegeben:

- Durchschnittlicher Radius eines einzelnen Nanopartikels: 16 nm.
- Masse: $1,8 \cdot 10^{-19} \text{ kg}$, Oberfläche: $3,2 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$.
- Zahl der Nanopartikel $\approx 6 \cdot 10^{14}$ Nanopartikel pro Liter.
- Annahme: 20 Nanopartikel pro Agglomerat.
- Durchschnittlicher Durchmesser eines Agglomerates: 96 nm.
- Oberfläche: $3 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$, Volumen: $4,6 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3$.
- Zahl der Agglomerate $\approx 1 \cdot 10^{13}$ Agglomerate pro Liter.

Dicke der n-Octanolbeschichtung:

Die maximale Löslichkeit von n-Octanol beträgt 0,3 g/L (Gestis Stoffdatenbank (184)) und seine Dichte ist 0,82 kg/L (184). Daraus ergibt sich ein Volumen von $3,66 \cdot 10^{-4}$ Liter n-Octanol pro Liter Wasser. Bei $1 \cdot 10^{13}$ Agglomeraten pro Liter entfallen also $3,66 \cdot 10^{-17}$ Liter n-Octanol auf ein Nanopartikel-Agglomerat. Zählt man nun das n-Octanol-Volumen und das Volumen eines Agglomerats zusammen, so kann daraus der neue Radius des beschichteten Partikels errechnet werden (siehe Abbildung 4.61).

$$V_{Oct.} + V_{Aggl.} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{Ges.}^3 \quad ;$$

$$r_{Ges.} - r_{Aggl.} = r_{Besch.}$$

mit:

$V_{Oct.}$ = Volumen n-Octanol pro Agglomerat,

$V_{Aggl.}$ = Volumen eines Agglomerats,

$r_{Ges.}$ = Gesamt-Radius eines beschichteten Agglomerats,

$r_{Aggl.}$ = Radius eines Agglomerats,

$r_{Besch.}$ = Radius der Beschichtung.

Die Dicke der Beschichtung ist damit, bei Verwendung aller bisherigen Zahlen, rein rechnerisch ca. 160 nm (Durchmesser des Agglomerates 96 nm). Dies wäre jedoch nur der Fall, wenn auch wirklich 100 % des n-Octanols an den Nanopartikel-Agglomeraten adsorbierten. Bei einer Adsorption von 10 % des im Wasser gelösten n-Octanols an der Agglomeratoberfläche wäre die Beschichtung allerdings noch ca. 51 nm und bei nur 1 % Adsorption immer noch ca. 10 nm dick. Der genaue Anteil des adsorbierenden n-Octanols ist zwar unbekannt, jedoch sollte es trotzdem sehr wahrscheinlich sein, dass die Beschichtung mit n-Octanol das ganze Agglomerat vollständig umschließt.

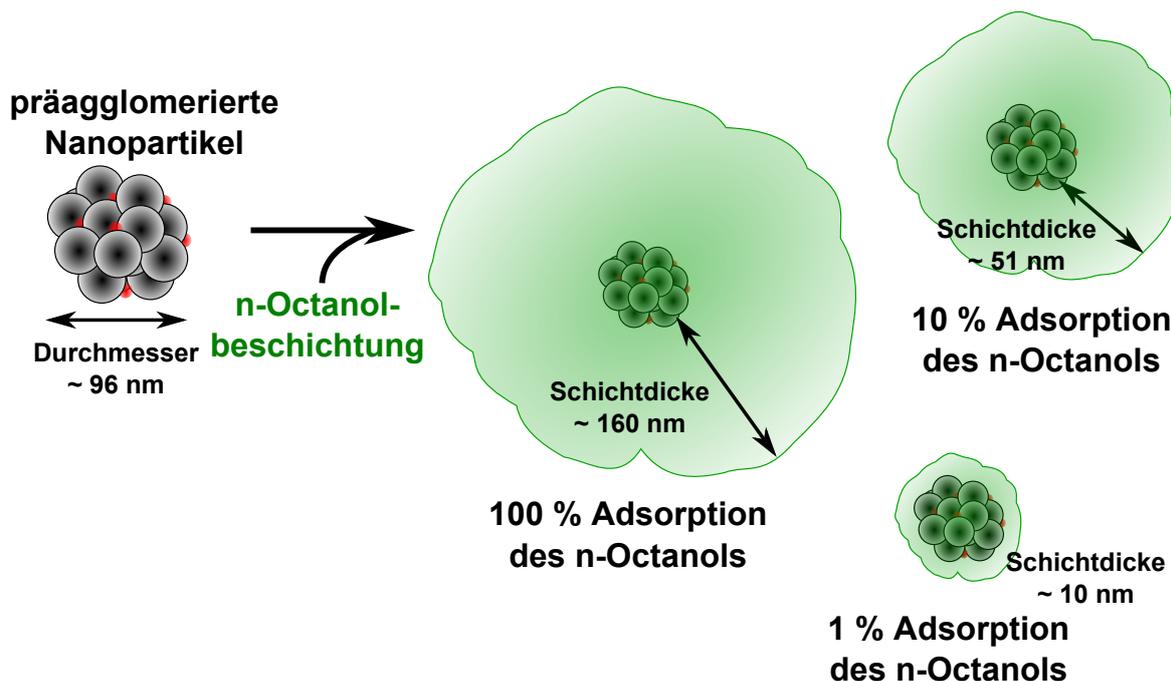


Abbildung 4.61: Schematische Darstellung der Bildung einer Beschichtung mit *n*-Octanol bei präagglomerierten AgNPs. Je nach adsorbierter Menge des im Wasser gelösten *n*-Octanols unterscheidet sich die Dicke der Schicht.

Ab einer CV-Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M verfärbte sich die präagglomerierte Nanopartikel-Suspension im Versuch grau, was mit bloßem Auge gut sichtbar war. Dies war unabhängig von der An- oder Abwesenheit von *n*-Octanol. Weiter war die Form der Kalibrierkurve bei der Anwesenheit von *n*-Octanol unterhalb einer CV-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M nicht linear, sondern verhielt sich analog der Isothermengleichung von Brunauer, Emmett und Teller. Erst oberhalb einer CV-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M wurde die Beziehung wieder exponentiell, genauso wie bei der Abwesenheit von *n*-Octanol.

4.7.5 BET- Isotherme

Brunauer, Emmett und Teller erweiterten die Isotherme von Langmuir 1938 um den Fall einer Adsorption von mehr als einer Monolage (97). Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Adsorptionsenergie für die erste Schicht eine andere sei, als für alle folgenden Schichten. Die Kräfte, welche die Moleküle ab der zweiten Schicht anordneten seien dieselben, wie bei einer Kondensation (97). Damit ist die Isotherme von Langmuir theoretisch ein Spezialfall der BET-Isotherme.

Der Kurvenverlauf einer BET-Isotherme ist bei geringen Konzentrationen konkav gegenüber der *x*-Achse, hat dann einen stetigen Anstieg und wird bei höheren Konzentrationen schließlich konvex. Die Kurve erreicht jedoch keine Sättigung, wie die Isotherme von Langmuir. Das physikalische Modell, welches hinter der Herleitung der Isotherme steht, nimmt eine vollständige Monolage des Adsorbats am ersten Scheitelpunkt der Kurve bei geringen

4.7 Der Einfluss von *n*-Octanol bei SERS-Messungen

Konzentrationen an, allerdings ist diese Annahme in dem hier beschriebenen Fall so anscheinend nicht zutreffend. Wie bereits mit einer rechnerischen Abschätzung gezeigt wurde, ist eine vollständige Bedeckung der Nanopartikel-Agglomerate erst bei einer ungefähren CV-Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-7}$ M und nicht bereits bei ca. $7 \cdot 10^{-9}$ M (erster Scheitelpunkt) zu erwarten.

Es wäre jedoch eventuell denkbar, dass die resultierende Signalintensität nicht einfach linear mit der Konzentration von CV-Molekülen skaliert. Mit anderen Worten könnte es sein, dass der Beitrag der einzelnen CV-Moleküle zur Gesamtintensität des SERS-Spektrums nicht für jedes Molekül gleich ist. Das Modell von Brunauer, Emmett und Teller setzt für die erste Molekülschicht eine andere Adsorptionsenergie voraus, wie für die folgenden Schichten. Wenn nun zuerst wenige bevorzugte Adsorptionsplätze besetzt werden (*hot spots*) und erst später andere, weniger bevorzugte Adsorptionsplätze (mit einer anderen Adsorptionsenergie), so müsste dies im Kurvenverlauf nicht von dem Fall einer Monolage und der Adsorption von darauf folgenden Molekülschichten zu unterscheiden sein. Jedoch bedeutet dies, dass die Beweglichkeit der CV-Moleküle auf der Oberfläche der Nanopartikel-Agglomerate bei einer Beschichtung mit *n*-Octanol hoch genug sein müsste, damit diese zuerst die *hot spots* besetzen können. Der Drang der CV-Moleküle zuerst die Berührungspunkte der Nanopartikel (*hot spots*) zu besetzen, könnte dabei durch die Kapillarkondensation erklärt werden. Die Beschichtung von *n*-Octanol müsste also derart Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen den CV-Molekülen und der Metalloberfläche der Silber-Nanopartikel nehmen, dass sich die Beweglichkeit der CV-Moleküle auf ihr erhöht. Damit wären sie in der Lage am energetisch günstigsten Ort zu verweilen, wenn sie durch Diffusion auf der Oberfläche dorthin gelangten (Abbildung 4.62).

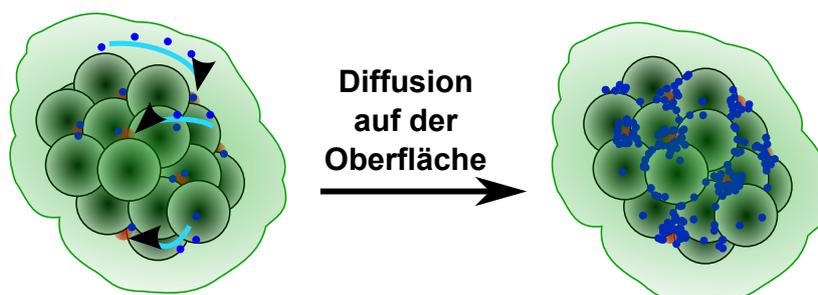


Abbildung 4.62: Eine *n*-Octanolbeschichtung könnte eine erhöhte Beweglichkeit der CV-Moleküle auf der Agglomeratoberfläche bewirken. Eine Ansammlung in den Berührungspunkten (*hot spots*) der Nanopartikel wäre die Folge (Kapillarkondensation).

Sobald alle *hot spots* besetzt sind, würde sich die restliche Oberfläche mit CV-Molekülen füllen. Wenn dann schließlich ab einer CV-Konzentration von mehr als $1 \cdot 10^{-7}$ M eine erneute Agglomeration einsetzt, so ist die Kalibrierkurve aus denselben Gründen, wie be-

4.7 Der Einfluss von *n*-Octanol bei SERS-Messungen

reits zuvor dargelegt, wieder exponentiell. Die erneut einsetzende Agglomeration von bereits weitgehend mit CV bedeckten Agglomeraten zieht zwangsweise günstig besetzte *hot spots* nach sich. Die daraus resultierende Signalverstärkung würde also den exponentiellen Anstieg der Signalintensität bei steigender CV-Konzentration erklären.

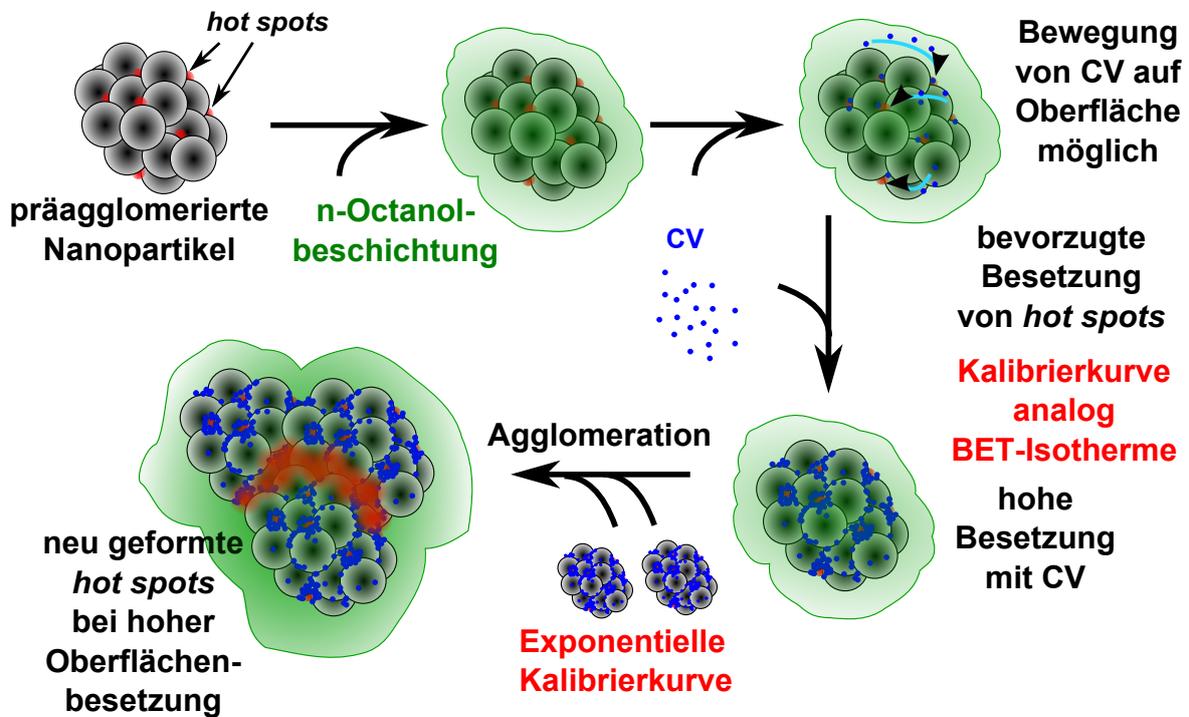


Abbildung 4.63: Eine *n*-Octanolbeschichtung erhöht die Beweglichkeit von CV auf der Metalloberfläche. Es werden zuerst die Berührungspunkte der Nanopartikel besetzt (Kapillarkondensation). Eine erneut einsetzende Agglomeration der weitgehend mit CV-Molekülen besetzten Agglomerate, hat anschließend einen exponentiellen Kurvenverlauf zur Folge.

4.8 Quantitative Gradientenmessungen mit SERS in Lösung

Es wurden nun zu den drei Kalibrierkurven aus den Abbildungen 4.55 bis 4.60 jeweils eine Gradientenmessung vorgenommen. Die Versuche hatten dabei denselben Ablauf, wie die bereits erwähnten SERS-Messungen an einer NAPL/Wasser-Phasengrenze (Kapitel 4.6), jedoch mit dem Unterschied, dass die n-Octanolphase vorher mit Wasser und die Wasserphase vorher mit n-Octanol gesättigt wurde. Für die Auswertung wurde, genauso wie bei den vorherigen Quantifizierungen, die Signalintensität der CV-Schwingung bei 1175 cm^{-1} ermittelt. Der Gradientenverlauf wurde mit der Umkehrfunktion der Gleichung der BET-Isotherme in die Einheit mol/L umgerechnet. Anschließend erfolgte eine mathematische Annäherung der Messdaten mit der Diffusionsgleichung 2.4.

Die Ausbildung der Konzentrationsgradienten, hatte in allen drei Versuchen nahezu denselben Ablauf. Zuerst stieg die Konzentration gleichmäßig über die gesamte Messstrecke an, mit Ausnahme in direkter Nähe zur n-Octanol/Wasser-Grenzfläche. Dieser gleichmäßige Anstieg, kann wieder mit dem Marangoni-Effekt erklärt werden, bei dem aufgrund von Unterschieden in der Grenzflächenspannung eine Konvektion in Bereichen von Mikrometern entstand (anfängliche Temperaturunterschiede). Diese Konvektion verlor jedoch bald an Kraft, wodurch nach ungefähr einer Stunde nach Kontakt der Grenzflächen die Ausbildung eines Gradienten beobachtet werden konnte. Dessen Anfangsintensität stieg mit der Zeit und seine Reichweite vergrößerte sich. Er ging jedoch wie bereits erwähnt aufgrund des anfänglich starken Massentransfers und der vorangegangenen Konvektion nicht mehr auf Null zurück, selbst in großer Distanz zur Grenzfläche. Es hatte sich also eine Grundkonzentration von CV in der Messanordnung etabliert, auf welcher sich dann ein messbarer Konzentrationsgradient ausbreitete. Die bei den Versuchen angegebene Zeit ist deshalb von dem Moment an gerechnet, in dem sich der Gradient anfang auszubilden. Dieser Zeitpunkt fiel also nicht mit dem Moment des Kontaktes der Grenzflächen zusammen, sondern war aufgrund des Marangoni-Effekts erst ungefähr eine Stunde nach Versuchsbeginn.

In Abbildung 4.64 ist der Verlauf der CV-Konzentration mit wachsendem Abstand zur n-Octanol/Wasser-Grenzfläche für die erste Gradientenmessung dargestellt. Es ist darüber hinaus der theoretische Konzentrationsverlauf eingezeichnet, welcher sich aus der Anwendung der Diffusionsgleichung 2.4 (Diffusion aus einer unerschöpflicher Quelle) ergibt.

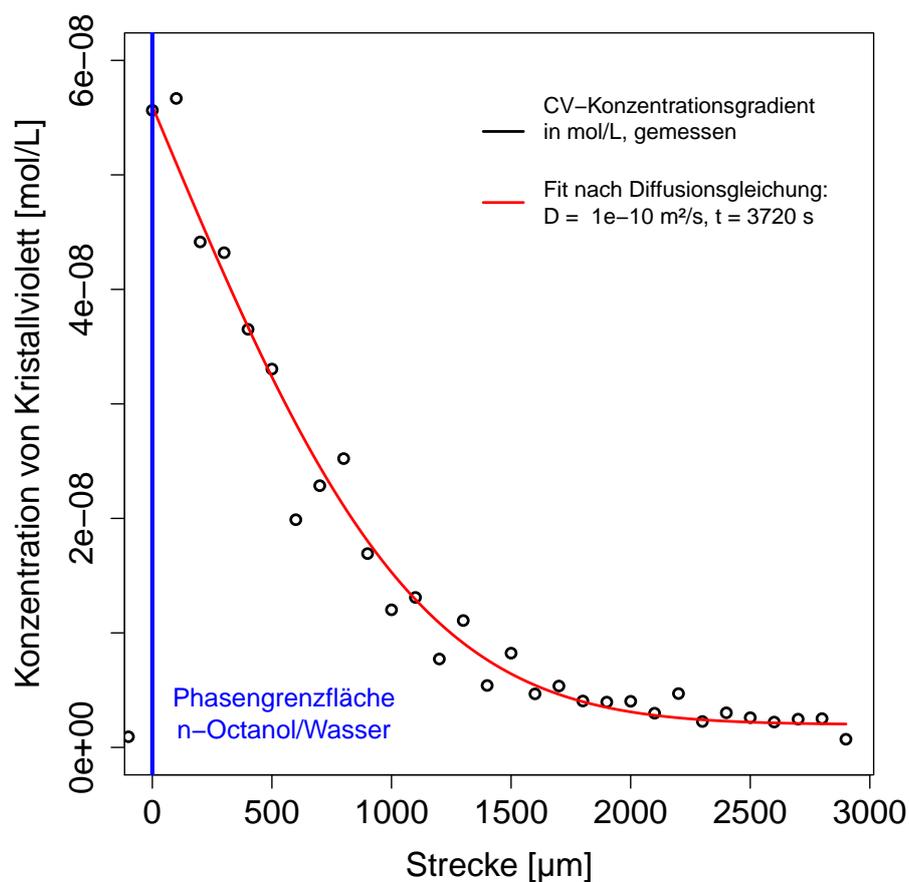


Abbildung 4.64: Gradientenmessung von CV mit SERS in Lösung an einer n-Octanol/Wasser-Grenzfläche. Der theoretische Konzentrationsverlauf der CV-Konzentration nach der Diffusionsgleichung 2.4 „aus unerschöpflicher Quelle“ ist ebenfalls eingezeichnet (rote Linie). Die Abbildung entspricht Messung 1 aus Tabelle 4.13.

In Tabelle 4.13 sind die Diffusionskoeffizienten aller drei Messungen zusammengefasst, welche sich bei der mathematischen Annäherung der Messwerte ergeben.

4.8 Quantitative Gradientenmessungen mit SERS in Lösung

Tabelle 4.13: Ermittelte Diffusionskoeffizienten aus drei verschiedenen Gradientenmessungen. Alle Messungen wurden in einem PTFE-Gefäß mit einem 10x Objektiv, einer Laserleistung von 100 %, ($\lambda = 633$ nm, 14 mW an der Probe) und einer Akquisitionszeit von 0,1 s pro Einzelspektrum durchgeführt.

Gradientenmessung	Diffusionskoeffizient D	Zeit t	Abstand der Messpunkte Δx	Länge der Profilmessung
Messung 1	$1 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$	62 min	100 μm	2900 μm
Messung 2	$5 \cdot 10^{-11} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$	89 min	100 μm	5600 μm
Messung 3	$3 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$	51 min	50 μm	2800 μm

Bei der mathematischen Annäherung der Messwerte wurde die Größe des Diffusionskoeffizienten D angepasst, da sowohl der Zeitpunkt t , als auch die Anfangskonzentration c_0 unveränderlich waren. In der Literatur findet sich für den Diffusionskoeffizient von CV ein Wert von $2,93 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ ($\pm 0,07 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$) (Litzenberger et al. 2010 (80), Tabelle 2.1). Dieser Wert wurde jedoch nur bei der dritten Gradientenmessung zu einem Zeitpunkt von $t = 51$ min gefunden. Bei den Werten aus Tabelle 4.13 fällt auf, dass der Diffusionskoeffizient umso kleiner wird, je länger der Gradient Zeit für seine Ausbreitung hatte. Da die SERS-Signalintensitäten von CV-Molekülen stammen, welche auf den Nanopartikel-Agglomeraten adsorbiert sind, müsste die Selbstdiffusion der Agglomerate nach einer gewissen Zeit eventuell ebenfalls berücksichtigt werden. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung kann ein Diffusionskoeffizient für ein Nanopartikelagglomerat angegeben werden. Je nach Dicke des vorhandenen Beschichtung mit n-Octanol bewegt sich dieser zwischen $\approx 1 \cdot 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ (Dicke der Beschichtung = 160 nm, 100 % Adsorption des im Wasser gelösten n-Octanols) und $3 \cdot 10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ (Dicke der Beschichtung = 10 nm, 1 % Adsorption des im Wasser gelösten n-Octanols), für die zuvor bereits gemachten Annahmen (20 NP pro Agglomerat und 20°C). Die im Versuch gemessenen Diffusionskoeffizienten könnten damit eine Mischung aus Diffusionskoeffizient von CV und Diffusionskoeffizient der Nanopartikel-Agglomerate sein.

Trotz einer großen Zahl an Bedingungen und Effekten, welche berücksichtigt werden müssen, ist es möglich ohne speziellen Versuchsaufbau (z.B. *Lab-on-a-chip*) SERS nicht nur für quantitative Messungen, sondern auch für Gradientenmessungen zu verwenden. Eine derartige Anwendung wurde bisher in der Literatur noch nicht berichtet. In dieser Arbeit ist es darüber hinaus gelungen, die einzelnen Faktoren und Prozesse, welche die Ergebnisse von quantitativen SERS-Messungen beeinflussen aufzuschlüsseln und ihre Auswirkungen zu

beschreiben. Es wurde zusätzlich eine Modellvorstellung vorgeschlagen, welche das Verhalten des verwendeten Messsystems erklärt und es für praktische Anwendungen nutzbar macht.

Die Bedingungen für reproduzierbare und quantitative SERS-Messungen sind zwar komplex, jedoch könnte diese Technik in folgenden Arbeiten dazu verwendet werden, chemische Konzentrationsgradienten direkt an biogeochemischen Grenzflächen zu messen. Diese Daten wären ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der im Boden stattfindenden Prozesse während des Abbaus von Schadstoffen oder der Umsetzung und Verwertung von Nährstoffen in wirtschaftlich genutzten Böden. Hierfür müssten jedoch noch weitere offene Fragen in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und den BGIs selbst geklärt werden, weshalb in diesem Bereich wohl noch zusätzliche Untersuchungen nötig sind. Die Ausbildung chemischer Gradienten an BGIs stellt jedoch eine Schlüsselrolle zum Verständnis der Prozesse des generellen chemischen Stoffumsatzes in Böden dar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der Boden ist ein komplexes System, welches durch seine Zusammensetzung, aber auch durch die in ihm befindlichen Lebewesen, wie beispielsweise Mikroorganismen, definiert wird. Seine Filtereigenschaften sind verantwortlich für eine gute Trinkwasserqualität und von seiner Unversehrtheit hängt maßgeblich die Produktivität und Gesundheit von Nutzpflanzen ab. Ein besseres Verständnis der Prozesse, und Konzentrationsverteilungen im porösen Netzwerk des Bodens und an biogeochemischen Grenzflächen ist deshalb essentiell.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Wachstum von Gasblasen innerhalb und außerhalb des mikroporösen Netzwerks eines Mikromodells quantifiziert. Die Blasengrenzflächen wurden in Gas/Matrix (Grenzfläche mit direktem Bakterienkontakt) und Gas/Flüssigkeit (aktive Grenzfläche für Diffusion) unterteilt. Weiter wurde die Ausbildung von Gradienten der Gaskonzentrationen im Wasser mit Hilfe von Computersimulationen modelliert und in die Berechnung der Diffusionsprozesse mit einbezogen. So konnte eine ganzheitliche Betrachtung des Mikromodell-Systems vorgenommen werden, welche die Einflüsse der Porengeometrien berücksichtigte und die Prozesse an unterschiedlichen Stellen miteinander in Verbindung brachte. Die Formen der Wachstumskurven der Gasblasen waren daher innerhalb und außerhalb des Porennetzwerks unterschiedlich. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Bakterien durch die Anreicherung des Wassers mit Gas selbst mit geringeren Gasproduktionsraten, als die hier gemessenen, durchaus in der Lage sind, selbst in großer Tiefe in Böden noch hohe Drücke zu erzeugen. Diese Drücke würden ausreichen, um dort ebenfalls Gasblasen entstehen zu lassen.

Durch Gasblasen wird jedoch die Porosität eines Netzwerks herabgesetzt, was zusätzlich die Eigenschaften des Bodens stark beeinflussen kann.

Die Versuche zeigten auch, dass das Verhalten ein und desselben Bakterienstamms stark unterschiedlich sein kann, wenn er innerhalb eines Systems mit bodenähnlichen Eigenschaften untersucht wird, verglichen mit Laborbedingungen, denen diese Eigenschaften fehlen.

Der Vorteil der Verwendung von Mikromodellen zur Untersuchung von Bakterien ist die Möglichkeit die Zusammensetzung des Nährmediums beliebig zu verändern, während die Bakterien ortsfest am Boden der Struktur verbleiben. Damit eröffnen sich theoretisch neue Möglichkeiten, die Reaktionen von Mikroorganismen unter wechselnden Bedingungen zu untersuchen. Die Gefahr, dass zukünftige Ergebnisse unter Laborbedingungen (wie beispielsweise Versuche in Chemostat-Bioreaktoren) nur schwer übertragbar auf reale Böden sind,

würde sich daher deutlich bei Versuchen mit Mikromodellen verringern.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Quantifizierung chemischer Konzentrationen mittels oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) in Lösung an Nanopartikel-Agglomeraten. Dafür wurden Silber-Nanopartikel nach ihrer Synthese einer definierten NaCl-Konzentration ausgesetzt und anschließend mit Wasser verdünnt. Die so erhaltenen präagglomerierten Nanopartikel eigneten sich gut für quantitative SERS-Messungen und es wurde eine Kalibration sowohl für den Analyten Kristallviolett, als auch für 1-Hydroxy-2-naphthoesäure (Abbauprodukt des Schadstoffs Phenanthren) vorgenommen. Bei Kristallviolett zeigte sich dabei im zeitlich stabilen Konzentrationsbereich eine lineare Kurvenform. Diese änderte sich jedoch zu einer S-Form analog der Isothermengleichung von Brunauer, Emmett und Teller, sobald die Nanopartikel-Agglomerate über eine Beschichtung mit n-Octanol verfügten.

Zur Erklärung dieser Beobachtungen wurde die Hypothese vorgeschlagen, dass in diesem Konzentrationsbereich die Oberfläche der Nanopartikel-Agglomerate bei Abwesenheit von n-Octanol statistisch mit Analyt-Molekülen bedeckt wird. Diese sind auf der Metalloberfläche unbeweglich. Diese Art der Bedeckung resultierte in einer linearen Kalibrierkurve (linearer Teil einer Langmuir-Isotherme). In einer Beschichtung mit n-Octanol hingegen wurde eine erhöhte Beweglichkeit der Analyt-Moleküle angenommen, welche aufgrund von Kapillarkondensation bewirkte, dass zuerst die *hot spots* gefüllt wurden und erst anschließend die restliche Agglomerat-Oberfläche. Bei der gleichzeitigen Annahme von unterschiedlichen Adsorptionsenergien für die *hot spots* und die restliche Oberfläche würde sich eine Kurvenform analog einer BET-Isotherme ergeben.

Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung des Kristallvioletts wurde, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von einer n-Octanolbeschichtung, eine exponentielle Kalibrierkurve beobachtet. Diese war jedoch zeitlich nicht mehr stabil und eignet sich daher nicht für quantitative SERS-Messungen. Sie entstand durch die erneute Agglomeration bereits präagglomerierter Nanopartikel, welche zeitgleich teilweise mit Kristallviolett-Molekülen besetzt waren. Aus diesem Grund befanden sich dort signifikant mehr Kristallviolett-Moleküle in neu geformten *hot spots*, wie es bei einem Adsorptionsvorgang ohne begleitende Agglomeration der Fall gewesen wäre.

Mit Hilfe der vorgenommenen Kalibrationen konnten schließlich chemische Gradienten von Kristallviolett nachgewiesen werden, als dieses aus einer n-Octanol-Grenzschicht heraus in eine wässrige, präagglomerierte AgNP-Suspension diffundierte. Die Ergebnisse einer mathematischen Annäherung lieferten Diffusionskoeffizienten, welche gut mit Literaturwerten übereinstimmten.

Die Anwendung von quantitativem SERS in Lösung für die Messung von Konzentrationsgradienten, welche durch Diffusion im Bereich von Mikrometern entstanden waren, ist neu und wurde bisher noch nicht in der Literatur berichtet. Weiter könnte eine Beschichtung von

Nanopartikeln mit n-Octanol hilfreich für weiter quantitative SERS-Messungen in Lösung sein, da sie eine Anreicherung der Analyt-Moleküle in der direkten Nähe der Metalloberfläche begünstigen könnte. Eine derartige Beschichtung kann, im Gegensatz zu einer Funktionalisierung der Nanopartikel-Oberfläche bei deren Synthese, auch nachträglich hinzugefügt werden. Damit wäre es möglich selbst Analyt-Moleküle mit SERS zu messen, welche ohne eine Beschichtung mit n-Octanol nicht ausreichend an eine nichtfunktionalisierte Metalloberfläche adsorbieren würden, und somit nicht in der Lage wären, ein SERS-Spektrum zu erzeugen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AgNP	Silber-Nanopartikel
a. u.	Willkürliche Einheiten <i>arbitrary units</i>
BGI	Biogeochemische Grenzfläche <i>biogeochemical interface</i>
CLSM	Konfokale Laserraster-Mikroskopie <i>confocal laser scanning microscopy</i>
CV	Kristallviolett <i>crystal violet</i>
EF	Verstärkungsfaktor <i>enhancement factor</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen <i>extracellular polymeric substances</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung <i>fluorescence in situ hybridisation</i>
FOV	Sichtfeld <i>field of view</i>
FWHM	Halbwertsbreite <i>full width at half maximum</i>
HOMO	Höchstes, besetztes Molekülorbital <i>highest occupied molecular orbital</i>
LUMO	Niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MC-SVM	Mehrklassen-Stützvektormethode <i>multiclass support vector machine</i>
NAPL	Nichtwässrige, flüssige Phase <i>non-aqueous phase liquid</i>
NOM	Natürliche organische Substanzen <i>natural organic matter</i>
NP	Nanopartikel
PAS	Photoakustische Spektroskopie <i>photoacoustic spectroscopy</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse <i>principal component analysis</i>
R	R, Programmiersprache für statistisches Rechnen
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung <i>surface-enhanced Raman scattering</i>
SM-SERS	Einzelmolekül-oberflächenverstärkte Raman-Streuung <i>single-molecule-SERS</i>
SPP 1315	Schwerpunktprogramm 1315 <i>priority programme 1315</i>
SVM	Stützvektormethode <i>support vector machine</i>
TCCPC	Ringspulen-Zentrifugal-Partitions-Chromatographie <i>Toroidal Coil Centrifugal Partition Chromatography</i>
TLM	Thermische-Linsen-Mikroskopie <i>thermal lens microscopy</i>

7 Literaturverzeichnis

- 1 H. Bahlburg, C. Breitzkreuz. *Grundlagen der Geologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Würzburg, 2008.
- 2 F. Scheffer, P. Schachtschabel. *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- 3 H. Weigand, K. U. Totsche, I. Kögel-Knabner, E. Annweiler, H. H. Richnow, W. Michaelis. Fate of anthracene in contaminated soil: transport and biochemical transformation under unsaturated flow conditions. *Eur. J. Soil Sci.*, 53:71 – 81, 2002.
- 4 R. Nießner. (Hrsg.) *Höll Wasser - Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung*. Walter de Gruyter and Co.KG, Berlin/New York, 2010.
- 5 I. M. Nambi, C. J. Werth, R. A. Sanford, A. J. Valocchi. Pore-scale analysis of anaerobic halorespiring bacterial growth along the transverse mixing zone of an etched silicon pore network. *Environ. Sci. Technol.*, 37:5617 – 5624, 2003.
- 6 K. U. Totsche, T. Rennert, M. H. Gerzabek, I. Kögel-Knabner, K. Smalla, M. Spiteller, H.-J. Vogel. Biogeochemical interfaces in soil: The interdisciplinary challenge for soil science. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 173:88 – 99, 2010.
- 7 J. Hanzel, D. Myrold, A. Sessitsch, K. Smalla, C. C. Tebbe, K. U. Totsche. Microbial ecology of biogeochemical interfaces - diversity, structure, and function of microhabitats in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 86:1 – 2, 2013.
- 8 DFG, GEPRIS. Projektbeschreibung, SPP 1315: Biogeochemical interfaces in soil. <http://gepris.dfg.de/gepris/projekt/31907460>, Abgerufen 2015.
- 9 J. C. Costerton, K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41:435 – 464, 1987.
- 10 V. Lorian, O. Zak, J. Suter, C. Bruecher. Staphylococci, in vitro and in vivo. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 3:433 – 444, 1985.
- 11 T. Roßteuscher. *Online monitoring of biofilm in microchannels with thermal lens microscopy*. PhD thesis, Technische Universität München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, 2009.

- 12 N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393:197 – 206, 2009.
- 13 C. Sandt, T. Smith-Palmer, J. Pink, L. Brennan, D. Pink. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *J. Appl. Microbiol.*, 103:1808 – 1820, 2007.
- 14 C. Sandt, T. Smith-Palmer, J. Pink, D. Pink. Quantification of local water and biomass in wild type PA01 biofilms by Confocal Raman Microspectroscopy. *J. Microbiol. Meth.*, 75:148 – 152, 2008.
- 15 I. W. Sutherland. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147:3 – 9, 2001.
- 16 C. Chayabutra, L. Ju. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6:493 – 498, 2000.
- 17 C. J. Werth, C. Zhang, M. L. Brusseau, M. Oostrom, T. Baumann. A review of non-invasive imaging methods and applications in contaminant hydrogeology research. *J. Contamin. Hydro.*, 113:1 – 24, 2010.
- 18 C. I. Pearce, M. J. Wilkins, C. Zhang, S. M. Heald, J. K. Fredrickson, J. M. Zachara. Pore-scale characterization of biogeochemical controls on iron and uranium speciation under flow conditions. *Environ- Sci. Technol.*, 46:7992 – 8000, 2012.
- 19 M. Wagner, N. P. Ivleva, C. Haisch, R. Niessner, H. Horn. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Res.*, 43:63 – 76, 2009.
- 20 T. T. J. Rossteuscher, A. Hibara, K. Mawatari, T. Kitamori. Lateral spatial resolution of thermal lens microscopy during continuous scanning for nonstaining biofilm imaging. *J. Appl. Phys.*, 105:1020301 – 1020306, 2009.
- 21 T. Schmid, C. Helmbrecht, U. Panne, C. Haisch, R. Niessner. Process analysis of biofilms by photoacoustic spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375:1124 – 1129, 2003.
- 22 Y. Aoi. In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *J. Biosci. Bioengin.*, 94:552 – 556, 2002.
- 23 A. Kniggendorf, M. Meinhardt-Wollweber. Of microparticles and bacteria identification - (resonance) Raman micro-spectroscopy as a tool for biofilm analysis. *Water Res.*, 45: 4571 – 4582, 2011.

- 24 R. Pätzold, M. Keuntje, A. Anders von Ahlften. A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386:286 – 292, 2006.
- 25 S. Ramya, R. P. George, R. V. Subba Rao, R. K. Dayal. Detection of algae and bacterial biofilms formed on titanium surfaces using micro-Raman analysis. *Appl. Surf. Sci.*, 256: 5108 – 5115, 2010.
- 26 S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, F. Melzer, P. Rösch, J. Popp. Raman spectroscopic detection and identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* in feedstuff. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407:787 – 794, 2015.
- 27 D. Kusic, B. Kampe, P. Rösch, J. Popp. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy. *Water Res.*, 48:179 – 189, 2014.
- 28 M. Moskovits. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. *J. Raman Spec.*, 36:485 – 496, 2005.
- 29 E. C. Le Ru, P. G. Etchegion. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 63:65 – 87, 2012.
- 30 N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch. Raman microscopy and surface-enhanced Raman scattering (SERS) for in situ analysis of biofilms. *J. Biophotonics*, 3:548 – 556, 2010.
- 31 N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch. In situ surface-enhanced Raman scattering analysis of biofilm. *Anal. Chem.*, 80:8538 – 8544, 2008.
- 32 N. P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch. Label-free in situ SERS imaging of biofilms. *J. Phys. Chem. B*, 114:10184 – 10194, 2010.
- 33 M. Knauer, N. P. Ivleva, X. Liu, R. Niessner, C. Haisch. Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms. *Anal. Chem.*, 82:2766 – 2772, 2010.
- 34 M. Knauer, N. P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch. A flow-through microarray cell for the online SERS detection of antibody-captured *E. coli* bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.*, 4020:2663 – 2667, 2012.
- 35 H. Zhou, D. Yang, N. P. Ivleva, N. E. Mircescu, R. Niessner, C. Haisch. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles. *Anal. Chem.*, 86:1525 – 1533, 2014.

- 36** K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, J. Popp. A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system. *Anal. Chem.*, 79:1542 – 1547, 2007.
- 37** A. März, S. Trupp, P. Rösch, G. J. Mohr, J. Popp. Fluorescence dye as novel label molecule for quantitative SERS investigations of an antibiotic. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402:2625 – 2631, 2012.
- 38** E. Kämmer, K. Olschewski, T. Bocklitz, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla, J. Popp. A new calibration concept for a reproducible quantitative detection based on SERS measurements in a microfluidic device demonstrated on the model analyte adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:9056 – 9063, 2014.
- 39** A. März, T. Bocklitz, J. Popp. Online-calibration for reliable and robust lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy measurement in a liquid/liquid segmented flow. *Anal. Chem.*, 83:8337 – 8340, 2011.
- 40** T. Baumann, C. J. Werth. Visualization and modeling of polystyrol colloid transport in a silicon micromodel. *Vadose Zone Journal*, 3:434 – 443, 2004.
- 41** T. Baumann, R. Niessner. Micromodel study on repartitioning phenomena of a strongly hydrophobic fluorophore at a colloid/1-octanol interface. *Water Res. Res.*, 42:W12S04, 2006.
- 42** C. Chomsurin, C. Werth. Analysis of pore-scale nonaqueous phase liquid dissolution in etched silicon pore networks. *Water Resour. Res.*, 39:1265 – 1275, 2003.
- 43** T. Baumann, L. Toops, R. Niessner. Colloid dispersion on the pore scale. *Water Res.*, 44:1246 – 1254, 2010.
- 44** M. Auset, A. A. Keller. Pore-scale processes that control dispersion of colloids in saturated porous media. *Water Res. Res.*, 40:W03503, 2004.
- 45** M. Auset, A. A. Keller, F. Brissaud, V. Lazarova. Intermittent filtration of bacteria and colloids in porous media. *Water Res. Res.*, 41:W09408, 2005.
- 46** H. Yoon, A. J. Valocchi, C. J. Werth, T. Dewers. Pore-scale simulation of mixing-induced calcium carbonate precipitation and dissolution in a microfluidic pore network. *Water Res. Res.*, 48:W02524, 2012.
- 47** C. Zhang, K. Dehoff, N. Hess, M. Oostrom, T. W. Wietsma, A. J. Valocchi, B. W. Fouke, C. J. Werth. Pore-scale study of transverse mixing induced CaCO_3 precipitation and permeability reduction in a model subsurface sedimentary system. *Environ. Sci. Technol.*, 44:7833 – 7838, 2010.

- 48 T. L. van Noorden, A. Ebigbo I. S. Pop and, R. Helmig. An upscaled model for biofilm growth in a thin strip. *Water Res. Res.*, 46:W06505, 2010.
- 49 C. E. Knutson, C. J. Werth, , A. J. Valocchi. Pore-scale simulation of biomass growth along the transverse mixing zone of a model two-dimensional porous medium. *Water Res. Res.*, 41:W07007, 2005.
- 50 N. Rudolph-Mohr, P. Vontobel, S. E. Oswald. A multi-imaging approach to study the root–soil interface. *Annals of Botany*, 114:1779 – 1787, 2014.
- 51 N. Rudolph-Mohr, S. Gottfried, M. Lamshöft, S. Zühlke, S. E. Oswald M. Spiteller. Non-invasive imaging techniques to study O₂ micro-patterns around pesticide treated lupine roots. *Geoderma*, 239 - 240:257 – 264, 2015.
- 52 R. Rudolph-Mohr. *A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH and oxygen dynamics in soils*. PhD thesis, Mathematisch - Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Potsdam, 2013.
- 53 H. Cypionka. *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2002.
- 54 L. Bergaust, Y. Mao, L. R. Bakken, A. Frostegard. Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:6387 – 6396, 2010.
- 55 P. A. M. Arts, L. A. Robertson, J. G. Kuenen. Nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha* in aerobic chemostat cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 18:305 – 316, 1995.
- 56 L. Bergaust, R. J. M. van Spanning, A. Frostegard, L. R. Bakken. Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR. *Microbiology*, 158:826 – 834, 2012.
- 57 B. Baumann, J. R. van der Meer, M. Snozzi, A. J. B. Zehnder. Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in *Paracoccus denitrificans* by nitrite at a suboptimal pH. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72:183 – 189, 1997.
- 58 R. Knowles. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46:43 – 70, 1982.
- 59 M. Zheng, D. He, T. Ma, Q. Chen, S. Liu, M. Ahmad, M. Gui, J. Ni. Reducing NO and N₂O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Biores. Tech.*, 162:80 – 88, 2014.

- 60 M. D. Wallenstein, D. D. Myrold, M. Firestone, M. Voytek. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecol. Appl.*, 16:2143 – 2152, 2006.
- 61 B. Baumann, M. Snozzi, A. J. B. Zehnder, J. R. van der Meer. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.*, 178:4367 – 4374, 1996.
- 62 C. Wan, X. Yang, D. Lee, M. Du, F. Wan, C. Chen. Aerobic denitrification by novel isolated strain using NO_2^- —N as nitrogen source. *Biores. Tech.*, 102:7244 – 7248, 2011.
- 63 D. Lloyd. Aerobic denitrification in soils and sediments: from fallacies to facts. *Trends Eco. Evol. - TREE*, 8:352 – 356, 1993.
- 64 L. Vackova, M. Srb, R. Stloukal, J. Wanner. Comparison of denitrification at low temperature using encapsulated *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* and mixed culture. *Bioresource Technology*, 102:4661 – 4666, 2011.
- 65 D. Lloyd, L. Boddy, K. J. P. Davis. Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: the rule rather than the exception. *FEMS Microbiol. Eco.*, 45:185 – 190, 1987.
- 66 M. Miyahara, S. Kim, S. Fushinobu, K. Takaki, T. Yamada, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, H. Shoun. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:4619 – 4625, 2010.
- 67 D. Patureau, E. Zumstein, J.P. Delgenes, R. Moletta. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microb. Eco.*, 39:145 – 152, 2000.
- 68 A. Fick. Über Diffusion. *Annalen der Physik*, 170:59 – 86, 1855.
- 69 E. C. Cussler. *Diffusion - mass transfer in fluid systems*. University Printing House, Cambridge, United Kingdom, 2009.
- 70 J. Crank. *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, Oxford, 1975.
- 71 R. T. Ferrell, D. M. Himmelblau. Diffusion coefficients of nitrogen and oxygen in water. *J. Chem. Eng. Data*, 12:111 – 115, 1967.
- 72 G. F. Versteeg, W. P. M. van Swaaij. Solubility and diffusivity of acid gases (CO_2 , N_2O) in aqueous alkanolamine solutions. *J. Chem. Eng. Data*, 33:29 – 34, 1988.
- 73 W. Nernst. Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 47:52 – 55, 1904.

- 74 W. Stumm, J. J. Morgan. *Aquatic chemistry - chemical equilibria and rates in natural waters*. John Wiley and Sons, New York, 1996.
- 75 C. J. Geankoplis. *Transport processes and separation process principles : includes unit operations*. Addison Wesley Pub Co Inc, New Jersey, 2003.
- 76 R. Higbie. The rate of absorption of pure gas into a still liquid during short periods of exposure . *Transact. Am. Inst. Chem. Eng.*, 31:365 – 389, 1935.
- 77 P. V. Danckwerts. Significance of liquid-film coefficients in gas adsorption. *Indust. Eng. Chem.*, 43:1460 – 1467, 1951.
- 78 E. U. Schlünder. On the mechanism of mass transfer in heterogeneous systems - in particular in fixed beds, fluidized beds and on bubble trays. *Chem. Eng. Sci.*, 32:845 – 851, 1977.
- 79 J. Holocher, F. Peeters, W. Aeschbach-Hertig, W. Kinzelbach, R. Kipfer. Kinetic model of gas bubble dissolution in groundwater and its implications for the dissolved gas composition. *Environ. Sci. Technol.*, 37:1337 – 1343, 2003.
- 80 A. L. Litzenberger. A microfluidic method to measure diffusion in hydrogels. Master's thesis, Bucknell University, Department of Chemical Engineering, 2010.
- 81 C. B. Müller, A. Loman, V. Pacheco, F Koberling, D. Willbold, W. Richtering, J. Enderlein. Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL*, 83:46001, 2008.
- 82 C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta*, 56:365–373, 2002.
- 83 T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, J. Enderlein. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *ChemPhysChem*, 8:433 – 443, 2007.
- 84 D. Surek, S. Stempin. *Angewandte Strömungsmechanik - für Praxis und Studium*. B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden 2007, 2007.
- 85 P. W. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 1996.
- 86 C. Koch. Fluid flow and transport simulation in a micromodel. Master's thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich 09, Institut für Geowissenschaften, 2013.
- 87 Z. Wang, P. Lu, G. Zhang, Y. Yong, C. Yang, Z. Mao. Experimental investigation of Marangoni effect in 1-hexanol/water system. *Chem. Engin. Sci.*, 66:2883 – 2887, 2011.

- 88 J. Straub, A. Weinzierl, M. Zell. Thermokapillare Grenzflächenkonvektion an Gasblasen in einem Temperaturgradientenfeld. *Wärme- und Stoffübertragung*, 25:281 – 288, 1990.
- 89 B. Nowack L. Geranio, M. Heuberger. The behavior of silver nanotextiles during Washing. *Environ. Sci. Technol.*, 43:8113 – 8118, 2009.
- 90 F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz, B. Nowack. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.*, 43:9216 – 9222, 2009.
- 91 M. Delay, T. Dolt, A. Woellhaf, R. Sembritzki, F. H. Frimmel. Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *J. Chrom. A*, 1218:4206 – 4212, 2011.
- 92 S. A. Cumberland, J. R. Lead. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *J. Chromatogr. A*, 1216:9099 – 9105, 2009.
- 93 R. Kaegi, A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt, M. Boller. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Poll.*, 156:233 – 239, 2008.
- 94 R. Kaegi, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, E. Mueller, R. Vonbank, M. Boller, M. Burkhardt. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ. Poll.*, 158:2900 – 2905, 2010.
- 95 M. Kühn, N. P. Ivleva, S. Klitzke, R. Niessner, T. Baumann. Investigation of coatings of natural organic matter on silver nanoparticles under environmentally relevant conditions by surface-enhanced Raman scattering. *Sci. Tot. Environ.*, 535:122 – 130, 2015.
- 96 P. M. Abraham, S. Barnikol, T. Baumann, M. Kuehn, N. P. Ivleva, G. E. Schaumann. Sorption of silver nanoparticles to environmental and model surfaces. *Environ. Sci. Tech.*, 47:5083 – 5091, 2013.
- 97 S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller. Adsorption of gases in multimolecular layers. *JACS*, 60:309 – 319, 1938.
- 98 J. Sangster. *Octanol-water partition coefficients: fundamentals an physical chemistry*. John Wiley and Sons, Chichester, 1997.
- 99 R. S. Tsai, N. El Tayar, B. Testa, Y. Ito. Toroidal coil centrifugal partition chromatography, a method for measuring partition coefficients. *J. Chrom.*, 538:119 – 123, 1991.

- 100** J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp. SERS - a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.*, 37:1052 – 1060, 2008.
- 101** K. C. Schuster, E. Urlaub, J.R. Gapes. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J. Microbil. Meth.*, 42:29–38, 2000.
- 102** P. Rösch, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp. The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 661:363 – 369, 2003.
- 103** N. P. Ivleva, R. Niessner, U. Panne. Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381:261 – 267, 2005.
- 104** S. Stöckel, J. Kirchhoff, u. Neugebauer, P. Rösch, J. Popp. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *J. Raman Spec.*, 47:89 – 109, 2016.
- 105** V. Kumar, B. Kampe, , P. Rösch, J. Popp. Classification and identification of pigmented cocci bacteria relevant to the soil environment via Raman spectroscopy. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 22:19317 – 19325, 2015.
- 106** M. Allesen-Holm, K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 59:1114 – 1128, 2006.
- 107** M. Matsukawa, E. P. Greenberg. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 186:4449 – 4456, 2004.
- 108** L. Marcotte, J. Barbeau, M. Lafleur. Characterization of the diffusion of polyethylene glycol in *Streptococcus mutans* biofilms by Raman microspectroscopy. *Appl. Spec.*, 58: 1295 – 1301, 2004.
- 109** R. Pätzold, M. Keuntje, K. Theophile, J. Müller, E. Mielcarek, A. Ngezahayo, A. Anders von Ahlften. In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy. *J. Microbiol. Meth.*, 72:241 – 248, 2008.
- 110** K. Crammer, Y. Singer. On the learnability and design of output codes for multiclass problems. *Machine Learning*, 47:201 – 223, 2002.
- 111** R. J. Meier. On art and science in curve-fitting vibrational spectra. *Vib. Spec.*, 39:266 – 269, 2005.

- 112** D. Kusic, A. Ramoji, U. Neugebauer, P. Rösch, J. Popp. Raman spectroscopic Characterization of Packaged *L. pneumophila* strains expelled by *T. thermophila*. *Anal. Chem.*, 88:2533 – 2537, 2016.
- 113** M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.*, 26:163 – 166, 1974.
- 114** N. Leopold, B. Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J. Phys. Chem. B.*, 107:5723 – 5727, 2003.
- 115** D. K. Bhui, H. Bar, P. Sarkar, G. P. Sahoo, S. P. De, A. Misra. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *J. Molec. Liqu.*, 145:33 – 37, 2009.
- 116** C. Petit, P. Lixon, M. P. Pileni. In situ synthesis of silver nanocluster in AOT reverse micelles. *J. Phys. Chem.*, 97:12974 – 12983, 1993.
- 117** V. Amendola, M. Meneghetti. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 110:4277 – 4285, 2009.
- 118** V. Amendola, O. M. Bakr, F. Stellacci. A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly. *Plasmonics*, 5:85 – 97, 2010.
- 119** J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz, S. Schultz. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.*, 116:6755 – 6759, 2002.
- 120** N. G. Khlebtsov. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra. *Anal. Chem.*, 80:6620 – 6625, 2008.
- 121** J. M. Zook, S. E. Long, D. Cleveland, C. L. A. Geronimo, R. I. MacCuspie. Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV–visible absorbance. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401:1993 – 2002, 2011.
- 122** V. Amendola, S. Polizzi, M. Meneghetti. Laser ablation synthesis of gold nanoparticles in organic solvents. *J. Phys. Chem. B*, 110:7232 – 7237, 2006.
- 123** V. Amendola, S. Polizzi, M. Meneghetti. Free silver nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents and their easy functionalization. *Langmuir*, 23:6766 – 6770, 2007.

- 124** K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manhoaran, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld. Extremely large enhancement factors in surface-enhanced Raman scattering for molecules on colloidal gold clusters. *Appl. Spec.*, 52:1493 – 1497, 1998.
- 125** X. Li, J. J. Lenhart, H. W. Walker. Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles. *Langmuir*, 28:1095 – 1104, 2012.
- 126** G. P. Glaspell, C. Zuo, P. W. Jagodzinski. Surface enhanced Raman spectroscopy using silver nanoparticles: the effects of particle size and halide ions on aggregation. *J. Cluster Sci.*, 16:39 – 51, 2005.
- 127** C. Noguez. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C*, 111:3806 – 3819, 2007.
- 128** M. I. Stockman, edited by K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp. *Surface enhanced Raman scattering – physics and applications*, chapter Electromagnetic Theory of SERS, pages 47 – 65. Springer-Verlag, Heidelberg, 2006.
- 129** D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403:27 – 54, 2012.
- 130** P. G. Etchegion, E. C. Le Ru. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10:6079 – 6089, 2008.
- 131** R. J. C. Brown, J. Wang, M. J. T. Milton. Electromagnetic modelling of Raman enhancement from nanoscale structures as a means to predict the efficacy of SERS substrates. *J. Nanomat.*, 2007:1 – 10, 2007.
- 132** K. Li, M. I. Stockman, D. J. Bergman. Self-similar chain of metal nanospheres as an efficient nanolens. *Phys. Rev. Lett.*, 91:2274021 – 2274024, 2003.
- 133** J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. Lu, J. Xu. Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg-Teller contributions. *J. Chem. Phys.*, 84:4174 – 4181, 1986.
- 134** M. Knauer. *SERS-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms*. PhD thesis, Technische Universität München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, 2012.
- 135** A. Otto. The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spec.*, 36:497 – 509, 2005.

- 136** W. F. Pearman, M. Lawrence-Snyder, S. M. Angel, A. W. Decho. Surface-enhanced Raman spectroscopy for in situ measurements of signaling molecules (autoinducers) relevant to bacteria quorum sensing. *Appl. Spec.*, 61:1295 – 1300, 2007.
- 137** R. Keir, E. Igata, M. Arundell, W. E. Smith, D. Graham, C. McHugh, J. M. Cooper. SERRS. in situ substrate formation and improved detection using microfluidics. *Anal. Chem.*, 74:1503 – 1508, 2002.
- 138** T. Lemma, R. F. Aroca. Single molecule surface-enhanced resonance Raman scattering on colloidal silver and Langmuir–Blodgett monolayers coated with silver overlayers. *J. Raman Spec.*, 33:197 – 201, 2002.
- 139** K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.*, 78:1667 – 1670, 1997.
- 140** M. Knauer, N. P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch. Optimized surface-enhanced Raman scattering (SERS) colloids for the characterization of microorganisms. *Anal. Sci.*, 26: 761 – 766, 2010.
- 141** N. J. Overall. Confocal Raman microscopy: common errors and artefacts. *Analyst*, 135: 2512 – 2522, 2010.
- 142** K. Kneipp, H. Kneipp, G. Deinum, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld. Single-molecule detection of a cyanine dye in silver colloidal solution using near-infrared surface-enhanced Raman scattering. *Appl. Spec.*, 52:175 – 178, 1998.
- 143** K. Kneipp, H. Kneipp, V. B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. E*, 57:6281 – 6284, 1998.
- 144** S. L. Kleinman, E. Ringe, N. Valley, K. L. Wustholz, E. Phillips, K. A. Scheidt, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of crystal violet isotopologues: theory and experiment. *JACS*, 133:4115 – 4122, 2011.
- 145** E. C. Le Ru, M. Meyer, P. G. Etchegoin. Proof of single-molecule sensitivity in surface enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *J. Phys. Chem. B*, 110:1944 – 1948, 2006.
- 146** C. J. L. Constantino, T. Lemma, P. A. Antunes, P. Goulet, R. Aroca. Surface-enhanced resonance Raman scattering: single-molecule detection in a Langmuir–Blodgett monolayer. *Appl. Spec.*, 57:649 – 654, 2003.
- 147** S. Efrima, B. V. Bronk. Silver colloids impregnating or coating bacteria. *J. Phys. Chem. B*, 102:5947 – 5950, 1998.

- 148 S. Farquharson, A. D. Gift, P. Maksymiuk, F. E. Inscore. Rapid Dipicolinic Acid Extraction from Bacillus Spores Detected by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Appl. Spec.*, 58:351 – 354, 2004.
- 149 L. A. Gearheart, H. J. Ploehn, C. J. Murphy. Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: a surface-enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA. *J. Phys. Chem. B*, 105:12609 – 12615, 2001.
- 150 R. M. Jarvis, R. Goodacre. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, 76:40 – 47, 2004.
- 151 R. M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface. *Anal. Chem.*, 76:5198 – 5202, 2004.
- 152 R. M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre. Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria. *Faraday Discussions*, 132:281 – 292, 2006.
- 153 M. Kahraman, M. M. Yazici, F. Sahin, Ö. F. Bayrak, M. Culha. Reproducible surface-enhanced Raman scattering spectra of bacteria on aggregated silver nanoparticles. *Appl. Spec.*, 61:479 – 485, 2007.
- 154 E. Podstawka, Y. Ozaki, L. M. Proniewicz. Part I: surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Appl. Spec.*, 58:570 – 580, 2004.
- 155 E. Podstawka, Y. Ozaki, L. M. Proniewicz. Part II: surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of methionine containing heterodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Appl. Spec.*, 58:581 – 590, 2004.
- 156 E. Podstawka, Y. Ozaki, L. M. Proniewicz. Adsorption of S–S containing proteins on a colloidal silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl. Spec.*, 58:1147 – 1156, 2004.
- 157 W. R. Premasiri, D. T. Moir, M. S. Klempner, N. Krieger, G. Jones, L. D. Ziegler. Characterization of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria. *J. Phys. Chem. B*, 109:312 – 320, 2005.
- 158 A. Sengupta, M. Mujacic, E. J. Davis. Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem*, 386:1379 – 1386, 2006.
- 159 A. Sengupta, M. L. Laucks, E. J. Davis. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria and pollen. *Appl. Spec.*, 59:1016 – 1023, 2005.

- 160** A. Sengupta, N. Brar, E. J. Davis. Bioaerosol detection and characterization by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Coll. Interface Sci.*, 309:36 – 43, 2007.
- 161** A. Shamsaie, J. Heim, A. A. Yanik, J. Irudayaraj. Intracellular quantification by surface enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 461:131 – 135, 2008.
- 162** L. Zeiri, B. V. Bronk, Y. Shabtai, J. Eichler, S. Efrima. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for probing specific biochemical components in bacteria. *Appl. Spec.*, 58:33 – 40, 2004.
- 163** L. Zeiri, B. V. Bronk, Y. Shabtai, J. Czege, S. Efrima. Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria. *Coll. Surf. A*, 208:357 – 362, 2002.
- 164** L. Zeiri, S. Efrima. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu. *J. Raman Spec.*, 36:667 – 675, 2005.
- 165** V. Joseph, A. Matschulat, J. Polte, S. Rolf, F. Emmerlinga, J. Kneipp. SERS enhancement of gold nanospheres of defined size. *J. Raman Spec.*, 42:1736 – 1742, 2011.
- 166** E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P. G. Etchegion. Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study. *J. Phys. Chem. C.*, 111:13794 – 13803, 2007.
- 167** W. F. Pearman, S. M. Angel, J. L. Ferry, S. Hall. Characterization of the Ag mediated surface-enhanced Raman spectroscopy of saxitoxin. *Appl. Spec.*, 62:727 – 732, 2008.
- 168** S. Han, S. Hong, X. Li. Effects of cations and anions as aggregating agents on SERS detection of cotinine (COT) and trans-3-hydroxycotinine (3HC). *J. Coll. Interf. Sci.*, 410:74 – 80, 2013.
- 169** E. Kämmer, K. Olschewski, S. Stöckel, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla-May, T. Bocklitz, J. Popp. Quantitative SERS studies by combining LOC-SERS with the standard addition method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407:8925 – 8929, 2015.
- 170** E. Kämmer, K. Olschewski, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp. High-throughput screening of measuring conditions for an optimized SERS detection. *J. Raman Spec.*, 10.1002/jrs.4849 2015.
- 171** A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Röscha, J. Popp. Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 11:1013 – 1021, 2011.
- 172** K. R. Ackermann, T. Henkel, J. Popp. Quantitative online detection of low-concentrated drugs via a SERS microfluidic system. *ChemPhysChem*, 8:2665 – 2670, 2007.

- 173** Octave community. GNU Octave 3.6.3, 2012. URL www.gnu.org/software/octave/.
- 174** Various Authors and Package Maintainer: S. Hauberg. *Image processing. The Octave-Forge image package provides functions for processing images.*, 2012. URL <http://octave.sf.net>. package version 1.0.15.
- 175** R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
- 176** M. Morhac. *Peaks: Peaks*, 2008. R package version 0.3.
- 177** Frank E Harrell Jr and with contributions from Charles Dupont and many others. *Hmisc: Harrell Miscellaneous*, 2014. URL <http://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>. R package version 3.14-4.
- 178** W. N. Venables, B. D. Ripley. *Modern applied statistics with S*. Springer, New York, 2002.
- 179** H. W. Borchers. *pracma: practical numerical math functions*, 2013. URL <http://CRAN.R-project.org/package=pracma>. R package version 1.4.5.
- 180** Gregory R. Warnes. Includes R source code and/or documentation contributed by: B. Bolker and L. Bonebakker and R. Gentleman and W. H. A. Liaw and T. Lumley and M. Maechler and A. Magnusson and S. Moeller and M. Schwartz and B. Venables. *gplots: various R programming tools for plotting data*, 2013. URL <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>. R package version 2.11.0.1.
- 181** Lemon J. Plotrix: a package in the red light district of R. *R-News*, 6(4):8–12, 2006.
- 182** T. Baumann. *raman: useful functions for Raman spectroscopy*, 2013. URL <http://r-repo.nnamuab.de/src/contrib/>. R package version 1.2-2.
- 183** ACD/Structure Elucidator version 12.01. Advanced chemistry development, Inc., Toronto, ON, Canada. www.acdlabs.com, 2014.
- 184** Gestis. Stoffdatenbank. <http://www.dguv.de/ifa/Gefahrstoffdatenbanken/GESTIS-Stoffdatenbank/index.jsp>, Abgerufen 2014.