

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie zur Untersuchung von Mikroorganismen

Patrick Kubryk

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: Prof. Dr. Michael Schuster
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Prof. Dr. Martin Elsner

Die Dissertation wurde am 02.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.07.2017 angenommen.

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“
– Enrico Fermi

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2013 bis Dezember 2016 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC), Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München (TUM) unter der Leitung von o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner angefertigt. Die Arbeit wurde vom Helmholtz Zentrum München (Water Alliance) finanziell gefördert.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Nießner für die freundliche Aufnahme am Institut, die Möglichkeit hier meine Arbeit anfertigen zu können und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

Besonders bedanke ich mich auch bei meiner Mentorin Dr. N. P. Ivleva für die hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft, fachlichen und konstruktiven Diskussionen und die ausführliche Einführung in die Welt der Raman-Mikrospektroskopie.

Bei Prof. Dr. R. Meckenstock und Dr. J. S. Kölschbach vom Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen und bei Dr. T. Lüders und Dr. S. Marozava vom Institut für Grundwasserökologie des Helmholtz Zentrum München bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben, die fachliche Unterstützung und die angenehmen, kollegialen und interessanten Projekttreffen.

Andreas Kunze danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um Mikroorganismen und deren Kultivierung.

Vielen Dank auch an Haibo Zhou und Christian Metz für die Hilfe bei der Synthese der Kolloide.

Ruben Weiß danke ich für die engagierte Mitarbeit an meinen Studien im Rahmen seines Forschungspraktikums und seiner Masterarbeit. Einige seiner Ergebnisse befinden sich auch in dieser Arbeit.

Großer Dank geht auch an meine Kollegen Alexandra Wiesheu, Bettina Kiwull und Michaela Eß aus der Raman- und Aerosolgruppe für die gute Zusammenarbeit, die großartige Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Momente.

Weiterer Dank gilt allen weiteren Kollegen des IWC für das freundschaftliche Umfeld, die vielen Diskussionen und die daraus resultierenden neuen Blickwinkel auf bestehende Fragestellungen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden, meinen Geschwistern und natürlich auch bei meinen Eltern für die Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Ohne eure Mithilfe wäre ich sicherlich drei Monate früher fertig geworden.

Publikationen

Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

P. Kubryk, J. Kölschbach, S. Marozava, T. Lueders, R. Meckenstock, R. Niessner, N. P. Ivleva; *Exploring the potential of stable isotope (resonance) Raman microspectroscopy and SERS for the analysis of microorganisms at single cell level*. Analytical Chemistry 2015, 87, 6622-6630.

P. Kubryk, R. Niessner, N. P. Ivleva; *The origin of the band at around 730 cm^{-1} in the SERS spectra of bacteria: a stable isotope approach*. Analyst 2016, 141, 2874-2878.

N. P. Ivleva, **P. Kubryk**, R. Niessner; *Raman microspectroscopy, surface-enhanced Raman scattering microspectroscopy, and stable-isotope Raman microspectroscopy for biofilm characterization*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2017, 409, 4353-4375.

Kurzfassung

Die Raman-Mikrospektroskopie ist eine wichtige Methode, um die molekulare und isotopische Zusammensetzung von mikrobiellen Zellen zu charakterisieren. Jedoch begrenzen eine niedrige Nachweisstärke und lange Aufnahmezeiten die breite Anwendbarkeit des Verfahrens in der Umweltanalytik. In dieser Arbeit werden das Potential, die Anwendbarkeit und die Grenzen der Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM), Resonanz-SIRM und SIRM in Kombination mit oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) zur Charakterisierung einzelner Bakterienzellen untersucht. Die beiden letztgenannten Techniken haben das Potential, die Nachweisstärke signifikant zu erhöhen und die Aufnahmezeiten in der SIRM zu senken, bislang gibt es aber nur wenige Studien in der Umweltmikrobiologie. Die analysierten Mikroorganismen wurden mit vollständig ^{13}C -, ^2H - oder ^{15}N -isotopenmarkierten Substraten und Substraten mit natürlicher Isotopenhäufigkeit kultiviert. Raman-Banden von bakteriellen Substanzen in stabilisotopenmarkierten Mikroorganismen zeigten eine charakteristische Verschiebung in Richtung höherer Wellenlängen (Rotverschiebung) in den analysierten Spektren. Insbesondere konnte festgestellt werden, dass sich die scharfe Bande des Phenylalanins als sehr geeignet für die SIRM-Analyse der mit ^{13}C -Naphthalin gezüchteten anaeroben *Deltaproteobacteria* aus der Anreicherungskultur N47 herstellte. Die Analyse von *Geobacter metallireducens*, welche mit ^{13}C - und ^2H -Acetat kultiviert wurden, zeigte, dass die Informationen über das Chromophor Cytochrom *c*, erhalten durch eine Resonanz-SIRM-Analyse bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm, erfolgreich durch Fingerabdruckspektren der Bakterienzellen ergänzt werden konnten. Die Fingerabdruckspektren wurden durch reguläre SIRM nach Photobleichung der Zellen erhalten. Weiterhin konnte eine reproduzierbare SERS-Analyse von mikrobiellen Zellen, welche mit Stabilisotopen markiert wurden, erfolgreich durchgeführt werden. Als Modellorganismus wurden der *Escherichia coli*-Stamm DSM 1116, der auf unmarkierten (^{12}C , ^{14}N) und markierten (^{13}C , ^{15}N) Kohlenstoff- und Stickstoffquellen gezüchtet wurde, verwendet. *In situ* synthetisierte Silbernanopartikel wurden hierbei als SERS-Medium eingesetzt. Die SERS-Bande der stabilisotopenmarkierten Mikroorganismen zeigte eine charakteristische Rotverschiebung in den SERS-Spektren, die allein von der Isotopenzusammensetzung abhing. Es war daher möglich, diese Bande adeninhaltigen Verbindungen sicher zuzuordnen. Darüber hinaus konnten *E. coli*-Bakterien, welche verschiedene Stabilisotopen enthielten, durch eine Hauptkomponentenanalyse deutlich voneinander unterschieden werden. Hierfür wurden als Grundlage die Fingerabdruckspektren der Einzelzell-SERS-Analyse verwendet. Die durchgeführten Analysen von stabilisotopenmarkierten mikrobiellen Zellen mit SERS-SIRM und Resonanz-SIRM ebnet den Weg für neuartige Ansätze und Anwendungen der Raman-Mikrospektroskopie in Umweltprozessstudien.

Abstract

Raman microspectroscopy is a prime tool to characterize the molecular and isotopic composition of microbial cells. However, low sensitivity and long acquisition times limit the broad applicability of this method in environmental analyses. In this thesis the potential, the applicability and the limitations of stable isotope Raman microspectroscopy (SIRM), resonance SIRM, and SIRM in combination with surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the characterization of single bacterial cells is explored. The latter two techniques have the potential to significantly increase sensitivity and decrease measurement times in SIRM, but to date there is only a limited amount of studies in environmental microbiology. The analyzed microorganisms were grown with substrates, which were fully labeled with the stable isotopes ^{13}C , ^2H or ^{15}N and compounds with natural abundance of atomic isotopes. Raman bands of bacterial cell compounds in stable isotope-labeled microorganisms exhibited a characteristic red-shift in the spectra. In particular, the sharp phenylalanine band was found to be an applicable marker band for SIRM analysis of *Deltaproteobacteria* from the enrichment strain N47 growing anaerobically on ^{13}C -naphthalene. The study of *Geobacter metallireducens* cultivated with ^{13}C - and ^2H -acetate showed that information on the chromophore cytochrome *c* obtained by resonance SIRM at 532-nm excitation wavelength can be successfully complemented by whole-organism fingerprints of bacteria cells achieved by regular SIRM after photobleaching. Furthermore, a reproducible SERS analysis of microbial cells labeled with stable isotopes was performed. *Escherichia coli* strain DSM 1116, grown on unlabeled (^{12}C , ^{14}N) and labeled (^{13}C , ^{15}N) carbon and nitrogen sources, were used as model organisms. Silver nanoparticles synthesized *in situ* were applied as SERS media. The SERS band of stable isotope-labeled microorganisms showed a characteristic red-shift in the SERS spectra, which solely depends on the isotopic composition. It was therefore possible to confidently assign this band to adenine-related compounds. Furthermore, by utilizing the fingerprint area of single-cell SERS spectra as the input for the principal component analysis, one can clearly differentiate *E. coli* bacteria incorporating different stable isotopes. The performed analysis of isotopically labeled microbial cells with SERS-SIRM and resonance SIRM paves the way towards novel approaches to apply Raman microspectroscopy in environmental process studies.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Theoretischer Hintergrund.....	4
2.1	Biofilme und Mikroorganismen.....	5
2.1.1	Eigenschaften und biochemische Zusammensetzung.....	5
2.1.2	Anreicherungskultur N47.....	6
2.1.3	Bakterium <i>Geobacter metallireducens</i>	6
2.1.4	Bakterium <i>Escherichia coli</i>	7
2.1.5	Methoden zur Analyse von Biofilmen und Mikroorganismen	7
2.2	Raman-Spektroskopie (RS) und -Mikrospektroskopie (RM).....	11
2.2.1	Physikalischer Hintergrund.....	11
2.2.2	Auflösungsvermögen	15
2.2.3	Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels RM.....	17
2.2.4	Datenanalyse	21
2.3	Resonanzverstärkte Raman-Streuung	23
2.3.1	Physikalischer Hintergrund.....	23
2.3.2	Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels Resonanz-RM.....	25
2.4	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS).....	27
2.4.1	Physikalischer Hintergrund.....	27
2.4.2	SERS-Substrate	33
2.4.3	Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels SERS	35
2.5	Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS).....	39
2.6	Nichtlineare Raman-Mikrospektroskopie.....	40
2.7	Raman-Mikrospektroskopie mit Stabilisotopen (SIRM).....	42
2.7.1	Physikalischer Hintergrund.....	42
2.7.2	Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels SIRM	47
3.	Experimenteller Teil	50
3.1	Raman-Mikrospektroskopie (RM).....	51
3.2	Raman-Analyse der Referenzsubstanzen.....	53
3.3	Artifizielle Biofilme – 3-D-Raman	54
3.4	Raman-Analyse der N47-Kultur	54
3.5	(Resonanz)-Raman-Analyse von <i>G. metallireducens</i>	55
3.6	SERS-Analysen	55

3.6.1	SERS-Analyse der Referenzsubstanzen.....	55
3.6.2	SERS-Messung der N47-Kultur.....	56
3.6.3	SERS-Messung von <i>E. coli</i>	56
3.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	58
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	59
4.1	Raman-Analyse von Referenzsubstanzen.....	60
4.1.1	Referenzreinsubstanzen und Mischungen.....	60
4.1.2	Artifizielle Biofilme – 3-D-Raman-Analyse von Referenzpartikeln.....	72
4.2	Raman- und SERS-Analyse der isotoopenmarkierten N47-Zellkultur.....	73
4.3	Analyse von isotoopenmarkierten <i>G. metallireducens</i> -Zellen	79
4.4	SERS-Analyse des <i>E. coli</i> -Stamms DSM 1116.....	85
4.5	SERS-Analyse zur Zuordnung von SERS-Banden	88
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	96
6.	Anhang.....	100
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	101
6.2	Chemikalien	103
6.3	Material	104
6.4	Instrumente	104
6.5	Software	104
7.	Literaturverzeichnis	105

1. EINLEITUNG

Auf unserem Planeten leben die meisten Mikroorganismen in multizellulären Gemeinschaften (aus z. B. Bakterien, Protozoen, Algen und Pilze). Diese sind unterschiedlich stark in einer hydratisierten Biopolymermatrix (extrazelluläre polymere Substanzen, Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäure und Lipide) eingebettet und bilden sogenannte Biofilme [1]. Die Biofilmbildung findet vor allem an Phasengrenzen statt. Besonders häufige Besiedlungsräume der Mikroorganismen sind die Grenzflächen von Wasser zu festen oder gasförmigen Phasen [2]. Daher haben Biofilme einen entscheidenden Einfluss auf den Abbau von wasserqualitätsrelevanten Schadstoffen. Allerdings reagieren sie sehr empfindlich auf äußere Einflüsse. Ein schnelles und nichtinvasives analytisches Verfahren zur chemischen Charakterisierung mit hoher räumlicher Auflösung und Nachweisstärke ist deswegen essentiell.

Die Raman-Mikrospektroskopie (RM) ist eine Kombination aus Raman-Spektroskopie (RS) und (konfokaler) optischer Mikroskopie. Die Technik ist zerstörungsfrei, nichtinvasiv, benötigt kaum oder eine geringe Probenvorbereitung und bietet eine räumliche Auflösung von bis zu 1 μm . Durch die Entwicklung immer besserer Filter zur Unterdrückung des elastisch gestreuten Lichts, der Entwicklung von sehr nachweisstarken Detektoren und der Einführung von sehr intensitätsstarken Laserquellen hat die Bedeutung der RM in der nahen Vergangenheit stark an Bedeutung gewonnen [3]. Mit dieser analytischen Methode können Informationen über molekulare Strukturen *in situ* in einzelnen Zellen ohne Interferenz von Wasser gewonnen werden. Als molekülspektroskopische Methode mit einer Ortsauflösung im μm -Bereich eignet sich die Raman-Mikrospektroskopie bei der Analyse von Mikroorganismen besonders, da hier Informationen über die chemische Zusammensetzung oder den physiologischen Zustand von einzelnen Zellen mit Hilfe der Fingerabdruckspektren gewonnen werden können. Jedoch ist die normale Raman-Spektroskopie durch die geringen Streuquerschnitte der Analyten in der Nachweisstärke stark eingeschränkt. Für große und komplexe biologische Strukturen sind allerdings, bedingt durch ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis, lange Belichtungszeiten, welche in einer möglichen Zerstörung der Probenoberfläche resultieren können, vonnöten. Sofern die Nachweisstärke der RM mit einer Quantenausbeute von nur 10^{-6} – 10^{-8} nicht mehr ausreicht, kann die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) angewendet werden. Dieser verstärkende Effekt tritt auf, wenn sich Moleküle in der Nähe von nanostrukturierten Metalloberflächen (Ag, Au) befinden. Mit dieser Technik können Verstärkungsfaktoren im Bereich von 10^3 – 10^6 (bis maximal 10^{11}) erreicht werden [4,5]. Diese hohen Verstärkungen bei SERS sind jeweils dem elektromagnetischen (*surface plasmon resonance*) und chemischen (*charge transfer complex*) Effekt zuzuordnen [6]. Durch diese Verbesserung der Nachweisstärke mit SERS ist eine reproduzierbare und schnelle Analyse der Biofilmmatrix möglich [7-10]. Neben SERS gibt es auch andere Möglichkeiten das Raman-Signal zu verstärken und die Aufnahmezeit zu verringern. Einer davon ist die Resonanz-Raman-Streuung. Der Resonanz-Raman-Effekt tritt auf, wenn die einfallende Wellenlänge innerhalb oder nahe eines elektronischen Übergangs einer Molekülschwingung liegt. Wenn die mikrobielle Probe geeignete Resonanz-Raman aktive Substanzen, wie beispielsweise bestimmte Chromophore enthält, ist eine schnellere Analyse mög-

lich, indem eine geeignete Laserwellenlänge (grüner Spektralfarbbereich) ausgewählt wird [11]. Aufnahmezeiten von bis zu 1 ms für Bakterienzellen sind hiermit erreichbar [12].

Alle drei Techniken, Raman-Mikrospektroskopie, SERS und Resonanz-Raman-Mikrospektroskopie, haben das Potenzial Mikroorganismen zu detektieren und zu unterscheiden, wenn diese mit Stabilisotopen markiert sind. Wird ein Atom durch ein (stabiles) Isotop des gleichen Elements substituiert, ist die Änderung der chemischen Struktur des Moleküls vernachlässigbar, und die Intensität der entsprechenden Schwingungsbanden bleibt gleich. Jedoch wird die Schwingungsfrequenz der beteiligten Bindung(en) signifikant beeinflusst. Bei schwereren Isotopen wird hierbei die entsprechende Raman-Bande im Spektrum rotverschoben. Diese sog. Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) in Kombination mit Resonanz-Raman oder SERS haben das Potential, die Nachweisstärke signifikant zu erhöhen und die Aufnahmezeiten in der SIRM zu senken. Bislang gibt es aber in der Umweltmikrobiologie nur wenige Studien zu diesem Thema.

In dieser vorliegenden Arbeit wurden SIRM, Resonanz-SIRM und SIRM in Kombination mit oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) eingesetzt, um das Potenzial, die Anwendbarkeit und die Limitierungen dieser Techniken für die Analyse von ^{13}C -, ^2H - und ^{15}N -markierten einzelnen Bakterienzellen zu erforschen. Substrate und Bakterien, die mit natürlicher Isotopenhäufigkeit (^{12}C 98,93%, ^1H 99,98% oder ^{14}N 99,63) analysiert wurden, wurden als ^{12}C -, ^1H - bzw. ^{14}N abgekürzt. Eine quantitative Analyse von Referenzsubstanzen wurde durchgeführt, um die minimale absolute Menge an Stabilisotopen, die mit SIRM nachweisbar waren, zu bestimmen. Auf einzelne Zellen fokussierte Raman-Analysen wurden für strikt anaerobische *Deltaproteobacteria* spez. aus der Anreicherungskultur N47 durchgeführt [13]. Für die Resonanz-Raman-Analyse wurden Zellen von *Geobacter metallireducens* GS-15 verwendet, welche für ihre große Menge an Cytochromen vom Typ *c* bekannt sind [14,15]. Aufgrund der einfachen Handhabung und des schnellen Wachstums wurde der *Escherichia coli*-Stamm DSM 1116 als Modellorganismus für die *in situ* SERS-Analyse ausgewählt. Darüber hinaus wurde dieser Organismus verwendet, um den Ursprung einer spezifischen SERS-Bande bei 730 cm^{-1} zu ergründen. Auch wird gezeigt, dass sich die verschiedenen unmarkierten (^{12}C , ^{14}N) und markierten (^{13}C , ^{15}N) *E. coli*-Zellen anhand ihrer SERS-Daten mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse unterscheiden lassen. Diese Methoden können helfen metabolische Prozesse in Bakterien und Biofilmen zu verstehen. Außerdem können sie benutzt werden, um Abbau- und Anreicherungsprozesse von Metaboliten in Mikroorganismen und Biofilmen darzustellen.

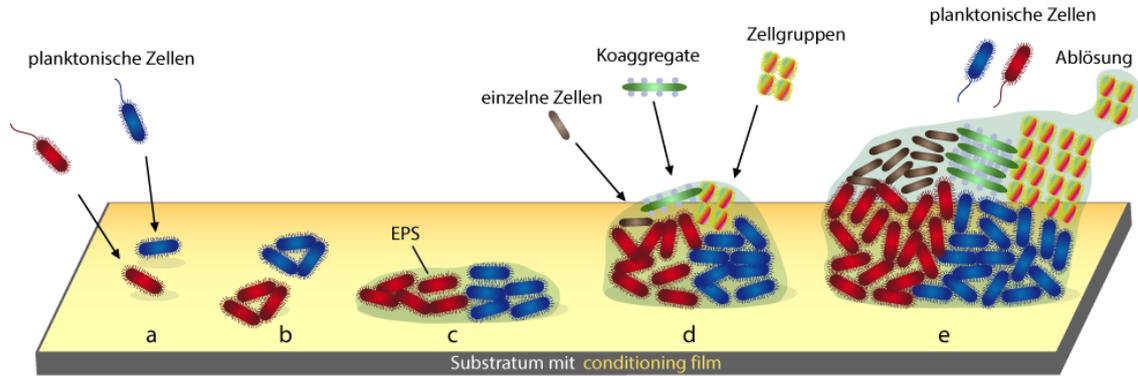
2. THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Biofilme und Mikroorganismen

2.1.1 Eigenschaften und biochemische Zusammensetzung

Über 99 % der Mikroorganismen in der Welt organisieren sich in multizellulären Gemeinschaften. Diese finden sich vor allem an den Phasengrenzen fest-flüssig, flüssig-flüssig, flüssig-gasförmig und fest-gasförmig. Diese so genannten Biofilme sind ubiquitär und bestehen aus verschiedensten Mikroorganismen, wie beispielsweise gramnegativen und grampositiven Bakterien, Protozoen, Algen und Pilzen. Diese sind unterschiedlich stark in einer hydratisierten Biopolymermatrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS, wie Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden) eingebettet. Hier befinden sich die einzelnen Organismen für relativ lange Zeit in unmittelbarer Nähe zueinander und können zahlreiche Wechselwirkungen aufbauen. In EPS können auch huminsäureartige Substanzen, sowie Verbindungen der unmittelbaren Umgebung, wie beispielsweise Mineralien, Kolloide, Bodenpartikel usw., enthalten sein. Der Hauptbestandteil der EPS-Matrix ist Wasser (bis zu 98 %) [2]. Abhängig von den eingeschlossenen Mikroorganismen, den Nährstoffbedingungen und allgemein den Umgebungsbedingungen ist die EPS-Matrix unterschiedlich aufgebaut und die extrazelluläre organische Masse kann bis zu 90 % der Trockenmasse ausmachen. Diese dreidimensionale EPS-Matrix ermöglicht die Adhäsion an Oberflächen, Aggregation von Zellen und Sorption exogener organischer Stoffe, anorganischer Ionen, sowie biotischer und abiotischer Partikel [16]. In Biofilmen kommt es somit zu einer Nährstoffanreicherung, was besonders in nährstoffarmer Umgebung einen Vorteil darstellt. Ebenso wird der konvektive Stofftransport gegenüber dem diffusiven wesentlich eingeschränkt und es entstehen somit Konzentrationsgradienten innerhalb des Biofilms. Dies hat besonders im Falle des Sauerstoffs ökologische Konsequenzen, da er von aeroben Organismen schneller verbraucht wird, als er nachdiffundieren kann und auf diese Weise in direkter Nachbarschaft anaerobe Zonen schafft. In aeroben Systemen werden also Habitate für anaerobe Mikroorganismen geschaffen [2]. Die Adhäsion an Oberflächen und die Entstehung verschiedener Lebensräume erleichtert die Umsetzung von anorganischen und organischen Verbindungen, welche sonst in Suspension nicht oder viel langsamer stattfinden würden. Die EPS-Matrix wirkt als Wasserreservoir und Schutzbarriere gegen Biozide, Schwermetalle und organische Schadstoffe. Weiterhin stellt sie eine Matrix für Zell-Zell-Kommunikation (*quorum sensing*) dar und erleichtert horizontalen Gentransfer von einem Organismus in einen bereits existierenden anderen. Ebenso wird Zellproliferation von synergetisch lebenden Mikroorganismen ermöglicht, welche sonst keinen eigenen Biofilm formen. Eine große Anzahl an Genen der in Biofilmen lebenden Mikroorganismen wird anders reguliert als in planktonisch lebenden Zellen, welche in einer wässrigen Umgebung einzeln vorkommen. Dies führt in Folge zu teilweise stark ausgeprägten phänotypischen und physiologischen Unterschieden innerhalb derselben Art [17,18]. Das Biofilmwachstum lässt sich in fünf Phasen einteilen (siehe Abbildung 1): (i) Adhäsion von Mikroorganismen an eine Aufwuchsoberfläche (Substratum) mit *conditioning film* (angelagerte anorganische und organische Moleküle), (ii) irrever-

sible Anlagerung der Organismen an das Substratum, (iii) mikrobielle Akkumulation und EPS-Produktion, (iv) Entwicklung eines spezieübergreifenden Biofilm durch Anlagerung von Zellen und Zellverbänden, (v) reifer Biofilm mit aktiver Ablösung einzelner Bestandteile wie beispielsweise Einzelorganismen und Biofilm-Fetzen [18-21].



Phasen des Biofilmwachstums

Abbildung 1 Biofilmentwicklung; (a) *conditioning film* und reversible Zelladhäsion (b) irreversible Adhäsion, (c) EPS-Produktion und Bildung von Mikrokolonien, (d) reifer spezieübergreifender Biofilm, (e) Ablösung einzelner Bestandteile.

2.1.2 Anreicherungskultur N47

Die hoch angereicherte Frischwasserkultur N47 stammt aus Naphthalin-kontaminiertem Bodenmaterial einer grundwasserführenden Schicht nahe Stuttgart [13]. Die strikt anaerobische Kultur kann unter Sulfat-reduzierenden Bedingungen unter anderem Naphthalin als Kohlenstoffquelle benutzen. Die Kultur besteht hauptsächlich aus den zwei Mikroorganismen *Deltaproteobacteria* und *Spirochäte* [22]. Die *Deltaproteobacteria* machen hierbei den größten Anteil der Kultur aus, während der Anteil der *Spirochäten* nur sehr gering ist. Die Anzucht dieser Kultur gestaltet sich sehr langwierig, da diese extrem langsam wächst (2 – 3 Monate bis zur stationären Phase). Die Fähigkeit den Schadstoff Naphthalin abzubauen und somit die Umweltrelevanz macht die Kultur zu einem sehr interessanten Versuchsorganismus in dieser Arbeit.

2.1.3 Bakterium *Geobacter metallireducens*

Geobacter metallireducens sind stäbchenförmige, gramnegative und anaerobe Bakterien, welche teilweise mit Geißeln und Fimbrien ausgestattet sind. Sie gehören der Ordnung der *Desulfuromonadales* an. Dieser Mikroorganismus, auch bekannt als Stamm GS-15, wurde erstmals 1987 aus einem Frischwassersediment nahe Washington D.C. isoliert [23]. *G. metallireducens* besondere Eigenschaft besteht darin, Eisenoxid bei der Oxidation von organischen Verbindungen (z. B. Acetat) zu Kohlendioxid zu nutzen. *G. metallireducens* war der erste Mikroorganismus, der entdeckt wurde, welcher

Eisenoxid als Elektronenakzeptor nutzt. Neben Fe(III) können auch Mn(IV), U(VI), elementarer Schwefel und Huminsäuren reduziert werden [24]. Die hohe Menge an Cytochrom *c* innerhalb des Mikroorganismus, welche als wichtige Elektronentransporter für Elektronentransferprozesse spielt, ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse.

2.1.4 *Bakterium Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, welches der Ordnung der *Enterobacteriales* angehört. Sie sind mit Geißeln an der Zelloberfläche ausgestattet. Die *E. coli*-Stämme K-12, B, C und W sind Modellorganismen der Risikogruppe 1. Dies bedeutet, dass es unwahrscheinlich ist, dass diese beim Menschen eine Krankheit hervorrufen (§ 3 Biostoffverordnung). Sie eignen sich deswegen hervorragend für die biotechnologischen Forschung und Industrie [25]. *E. coli* kann verschiedene Zucker und Aminosäuren in der gemischten Säuregärung zur Energiegewinnung verwenden. Die Anzucht dieser Kultur ist sehr schnell und einfach, da eine Zellteilung üblicherweise alle 20 Minuten auftritt. In dieser Arbeit wurde *E. coli* DSM 1116 verwendet, welches dem Stamm W angehört.

2.1.5 *Methoden zur Analyse von Biofilmen und Mikroorganismen*

In verschiedensten Bereichen, wie der Medizin, Biologie und technischen Prozessen, sind die Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen, sowie detaillierte Informationen über die biochemische Zusammensetzung des sie umgebenden EPS von großer Bedeutung. Vor allem kann dieses Wissen in der Krankheitsdiagnostik, in der Entwicklung neuer Antibiotika, Biozide und Reinigungsmittel, in der Erforschung neuer Methoden zur Vermeidung von Biofouling, sowie in der Wasseraufbereitung eingesetzt werden.

Die tatsächliche chemische Zusammensetzung und Struktur der Biofilme variiert jedoch stark. Sie ist dabei abhängig von mehreren Faktoren: den vorhandenen mikrobiellen Zellen, ihrer metabolischen Aktivität, den verfügbaren Nährstoffen, den vorherrschenden physikochemischen Bedingungen (Temperatur, Flussbedingung, pH usw.) und der Stufe der Biofilmentwicklung. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste Techniken zur Identifizierung und Charakterisierung von Biofilmen, deren Molekularstruktur und den zugehörigen biochemischen Funktionen verwendet und entwickelt [26]. Eine schematische Übersicht über diese Methoden findet sich in Abbildung 2. Es existieren klassische chemische und biochemische Methoden wie zum Beispiel das Profiling von Fettsäuren, Nukleinsäure oder genetische Verfahren und Proteomik im Allgemeinen. Üblicherweise sind diese Methoden allerdings sehr zeitaufwendig, arbeitsintensiv, benötigen teure Ausrüstung, hoch ausgebildetes Personal und zeigen dabei aber nur eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit und Spezifität. Weiterhin ist die Identifizierung von Mikroorganismen in einer Mischung verschiedener Bakterientypen nahezu unmöglich [26,27].

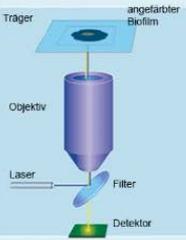
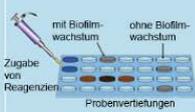
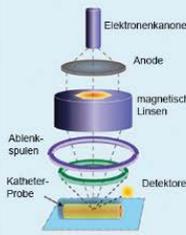
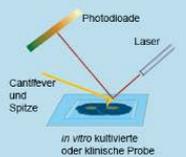
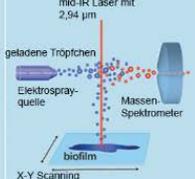
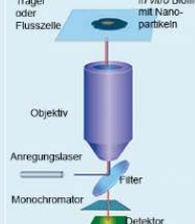
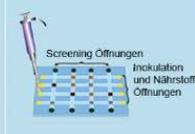
Technik	Schematischer Aufbau	Nutzung	Vorteile	Limitierungen	Technik	Schematischer Aufbau	Nutzung	Vorteile	Limitierungen
Konfokale Mikroskopie		<ul style="list-style-type: none"> • Laborstudien mit Anfärbung und Label • 3D-Profil (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) • Diffusionsuntersuchungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Nachweisstark (LOD \approx 1000 Moleküle) • Hohe Auflösung (\approx 0,3 μm) • Auch für Flusszellen geeignet 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringer Durchsatz • Halbquantitativ • Flach, optisch transparent 	Mikroplatten Systeme		<ul style="list-style-type: none"> • Laborscreening des Biofilmwachstums 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenziell hoher Durchsatz • Potenziell quantitativ 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsamer wenn Kultivierung notwendig • Nicht unbedingt „realistisch“
Rasterelektronenmikroskopie		<ul style="list-style-type: none"> • Visualisierung von Biofilmen auf klinischen Proben • Bestätigende Mikroskopie bei <i>in vitro</i> Tests 	<ul style="list-style-type: none"> • Gesamtkeimzahl sichtbar unabhängig von der Anfärbbarkeit • Hohe x-y Auflösung (\approx 1 nm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringer Durchsatz • Keine Echtzeit • Kann extra Probenvorbereitung benötigen • Qualitativ 	Massenspektrometrie (MS)		<ul style="list-style-type: none"> • Proteomik von Biofilmmarten • Analyse des Metaboloms • Signalmoleküle 	<ul style="list-style-type: none"> • 100 - 1000nde identifizierte Verbindungen • Hoher Durchsatz 	<ul style="list-style-type: none"> • Beschwerliche Probenvorbereitung • Erfordert langwierige Trennung
Rasterkraftmikroskopie		<ul style="list-style-type: none"> • Analyse der Schichtdicke und Morphologie des Biofilms • Adhäsionskraft analysierbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe z-Auflösung (0,1-1 nm) • Informationen über physik. Kräfte 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringer Durchsatz • Offenes System • Keine Information über die Beschaffenheit 	Bildgebende MS		<ul style="list-style-type: none"> • Chem. Zusammensetzung und Verteilung von Biofilmkomponenten • Analyse lebenden Biofilms 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> Analyse von intaktem Biofilm • Untersuchung der lateralen Tiefenveränderung 	<ul style="list-style-type: none"> • Halbquantitativ • Matrixeinflüsse • Ionensuppressions-effekte
Genetische Untersuchung		<ul style="list-style-type: none"> • Klinische Diagnostik • Speziesbestimmung auf Wunden und explantierten Geräten • Epidemiologie 	<ul style="list-style-type: none"> • Artspezifische Information möglich • Schneller (1-2 Tage) als kulturbasierte Methoden • Findet unkultivierbares 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantifizierung schwierig • Keine Biofilmmasse oder EPS Information • Teuer 	Raman		<ul style="list-style-type: none"> • Chemische Analyse des Biofilms • Quantitatives Mapping und 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Label oder Anfärbung notwendig • Mehrere Analyten 	<ul style="list-style-type: none"> • Schlechte Nachweisstärke - evtl. Nanopartikel benötigt • Lange Analysendauer
					Mikrofluidische Systeme		<ul style="list-style-type: none"> • Hochdurchsatz-Screening • Detektiert Signalmoleküle • Metabolisches Profiling 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Probenmenge (< 1 μL) • Wenig biogefährlicher Müll (mL vs L) • Wenig Probe 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine kommerziellen Formate • Schwierig Materialien zu testen (Katheter, Schläuche, etc.)

Abbildung 2 Verschiedene gebräuchliche analytische Methoden zur Untersuchung von Biofilmen (nach [26]).

Eine andere häufig verwendete Methode ist Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Diese Methode erlaubt die Detektion unterschiedlicher Mikroorganismen in einem Biofilm bestehend aus verschiedenen Arten, indem mit rRNA koppelnde Nukleinsäure-Sonden verwendet werden [28,29]. Zur Biofilmanalyse wird FISH häufig mit Fluoreszenz-induzierter konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) kombiniert [28]. Durch diese Vorgehensweise wird es ermöglicht zerstörungsfreie und dreidimensionale Informationen über die Struktur und den Aufbau des Biofilms zu erhalten [30,31]. Allerdings ist die Probenvorbereitung relativ aufwändig und das Anfärben der EPS-Matrix ziemlich kompliziert und teuer, da die EPS aus einer komplexen Mischung verschiedener Biopolymere mit einer großen Anzahl an Bindungsstellen bestehen. Deswegen ist üblicherweise eine zeitgleiche Analyse von maximal zwei Biofilm-Komponenten mit CLSM möglich [26]. Weiterhin ist die örtliche Auflösung auf einige Mikrometer limitiert. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Visualisierung eines Biofilm mit einer deutlich höheren örtlicheren Auflösung. Örtliche Auflösungen bis in den nm-Bereich hinein

können hierbei erreicht werden. Allerdings beinhaltet die übliche Probenvorbereitung in der Elektronenmikroskopie die Fixierung oder Trocknung der Probe. Dies kann große Auswirkungen auf die Morphologie des Biofilms haben, was direkt die Reproduzierbarkeit und Authentizität der Bilder beeinträchtigt [32]. Um die Veränderung der EPS-Matrix während der Probenvorbereitung zu vermeiden, können Niedrigtemperatur-REM (Cryo-REM) oder Niedrigdruck-REM (*environmental scanning electron microscopy*, ESEM) für die Analyse von unfixierten Biofilmen verwendet werden [26]. Eine andere Technik zur Visualisierung von Biofilmen ist die optische Kohärenztomografie (*optical coherence tomography*, OCT). Die örtliche Auflösung dieser Methode ist deutlich niedriger als bei der REM. Allerdings ist es ohne Anfärben der Probe möglich *in situ* in 2-D und 3-D die Biofilmstrukturen abzubilden und die Biofilmverteilung und -ablösung zu beobachten [33,34]. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Techniken, kann die Analyse der Topographie, sowie der mechanischen und physikalischen Eigenschaften des Biofilms mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) im nm-Bereich durchgeführt werden [35]. Wenn dagegen eine tiefenaufgelöste Analyse der physikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise Biofilmdichte oder -dicke, von Interesse ist, kann die photoakustische Spektroskopie (*photoacoustic spectroscopy*, PAS) genutzt werden. Diese erlaubt eine Analyse in Tiefen von mehr als 1 cm und kann angewendet werden, um das Biofilmwachstum oder die Biofilmablösung mit hoher zeitlicher Auflösung zu untersuchen [36]. Zur Charakterisierung von Biofilmen kann auch die Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (*solid state nuclear magnetic resonance*, ssNMR) benutzt werden, wobei eine orts aufgelöste Analyse hierbei nicht möglich ist [37]. Die Charakterisierung, Identifizierung und bildliche Darstellung der Biofilmmatrixzusammensetzung ist auch mit verschiedenen massenspektroskopischen (MS) Methoden möglich. Verwendet werden unter anderem Sekundärionen-Massenspektrometrie (*secondary ion mass spectrometry*, SIMS), Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) und Desorptions-Elektrospray-Ionisation (*desorption electrospray ionization*, DESI). Allerdings erfordern diese MS-basierten Techniken eine recht aufwändige Probenvorbereitung, sind destruktiv und die Messung erfordert einen hohen instrumentellen analytischen Aufwand. Auch ist die Quantifizierung der betrachteten molekularen Spezies eine große Herausforderung für MS-basierte bildgebende Verfahren [26].

Zuletzt existieren noch Schwingungsspektroskopie-basierte Methoden, hauptsächlich Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (*Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) und Raman-Spektroskopie (*Raman spectroscopy*, RS). Beide Methoden liefern komplementäre Informationen über die Eigenschaften des Biofilms auf molekularer Ebene [38,39]. Diese schwingungsspektroskopischen Methoden basieren auf der Veränderung des Dipolmoments (IR) oder der Polarisierbarkeit des Moleküls (RS). Die beteiligten molekularen Schwingungen werden über die Absorption des eingestrahnten Lichts oder über die inelastische Streuung der Photonen angeregt. Die unterschiedlichen physikalischen Prinzipien beider Methoden führen zu unterschiedlichen Intensitäten der gleichen Bindungen. Beispielsweise ist die O–H-Streckschwingung in

IR-Spektren stark ausgeprägt, in Raman-Spektren jedoch nur schwach sichtbar. Daher ist RS besser geeignet für die Analyse von wasserhaltigen Proben, wie Bakterien oder Biofilmen.

Eine Reihe von Raman-basierten Methoden stehen heutzutage bei der Analyse von mikrobiologischem Probenmaterial zur Verfügung. Die nächsten Kapitel dieser Arbeit sind deswegen diesen Methoden gewidmet, um einen detaillierten Überblick über diese Techniken zu vermitteln. Da sich diese Arbeit mit der Analyse mikrobiologischer Proben beschäftigt, wird insbesondere auf diejenigen Eigenschaften eingegangen, welche eine wichtige Rolle bei der Analyse mikrobiologischer Proben spielen. Vorweg ist eine Übersicht über diese Methoden, die sich insbesondere auf deren mikrobiologischen Anwendungen bezieht, in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1 Übersicht über Raman-basierte Methoden zur Analyse von mikrobiologischen Proben und Biofilmen mit Vorteilen, Limitierungen und Anwendungen

Technik	Vorteile	Nachteile	Anwendungen
Raman-Mikrospektroskopie (RM)	<ul style="list-style-type: none"> • Molekulare/chemische Fingerabdrücke • Wasser unempfindlich • Laterale Auflösung im μm-Bereich • Markierungsfrei 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluoreszenzinterferenzen • Lange Messdauer • Geringe Nachweisstärke 	<ul style="list-style-type: none"> • Biochemisches Imaging • Identifizierung und Charakterisierung von einzelnen Mikroorganismen und EPS • Analyse der Biofilmentwicklung und -heterogenität
Resonanz-RM	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Nachweisstärke und Selektivität • Schnelle Analyse 	<ul style="list-style-type: none"> • Chromophor notwendig • Photobleichung 	<ul style="list-style-type: none"> • Biochemisches Imaging • Schnelle Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen • Zellsortierung
Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Verstärkung • Fluoreszenzlöschung • Schnelle Analyse 	<ul style="list-style-type: none"> • Reproduzierbarkeit der Spektren häufig schwierig • Abhängig vom Analyten und der Absorptionsstelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Biochemisches Imaging • Schnelle Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen und EPS • Analyse des <i>quorum sensing</i>
Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)	<ul style="list-style-type: none"> • Laterale Auflösung unterhalb des optischen Diffraktionslimits • Korrelation zw. strukturellen und topographischen Daten 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwierige Produktion reproduzierbarer Spitzen • Verunreinigung der Spitze • Bisher keine Untersuchungen <i>in situ</i> gezeigt 	<ul style="list-style-type: none"> • Biochemisches Imaging • Charakterisierung von einzelnen Mikroorganismen • Analyse der Dynamik auf Zelloberflächen
Nichtlineare Raman-Spektroskopie (z. B. kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung, CARS)	<ul style="list-style-type: none"> • Fluoreszenz unempfindlich • Hohes Signal-Rausch-Verhältnis • Schnelle Analyse 	<ul style="list-style-type: none"> • Nichtresonantes Hintergrundrauschen • Meist nur für einen schmalen Spektralbereich nutzbar • Komplexe Instrumentierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Biochemisches Imaging (C–H/O–H-Streckschwingung, Lipide) • Nichtinvasives Zell-Tracking

2.2 Raman-Spektroskopie (RS) und -Mikrospektroskopie (RM)

2.2.1 Physikalischer Hintergrund

Als Raman-Spektroskopie wird die Untersuchung von Molekülen oder Kristallen mit Hilfe der inelastischen Streuung von Licht bezeichnet. Dieses Phänomen wird als Raman-Streuung bezeichnet und konnte, nach Vorhersage von Adolf Smekal [40,41] im Jahre 1923, nur fünf Jahre später von Chandrasekhara V. Raman nachgewiesen werden [42].

Die zu untersuchende Probe wird bei der Raman-Spektroskopie mit monochromatischem Licht, klassischerweise einem Laser, bestrahlt. Dabei ist zusätzlich zur Absorption der Photonen auch eine Streuung der Photonen beobachtbar. Im Streulicht findet sich neben elastisch gestreutem Licht mit derselben Frequenz wie das eingestrahlte Licht (Rayleigh-Streuung) auch inelastisch gestreutes Licht mit einer unterschiedlichen, da verschobenen, Frequenz (Raman-Streuung) [43]. Die Interaktion eines Photons der Energie $h\nu_0$ mit einem Molekül oder Kristall führt zur virtuellen Absorption dieses Photons und gleichzeitigen Anhebung des Moleküls auf einen virtuellen Zustand. Dieser Zustand befindet sich zwischen Grundzustand und erstem angeregten Elektronenzustand, ist kurzlebig, nicht quantisiert und kann somit jeden beliebigen Wert annehmen [44].

Grundsätzlich ergeben sich aus der Interaktion zwischen dem Molekül an dem die Streuung auftritt und dem eingestrahnten Licht drei Möglichkeiten. Der häufigste eintretende Fall ist die elastische Streuung, bei der sich der Energiezustand des Moleküls nicht ändert. Das Molekül wird durch das Photon der Energie $h\nu_0$ in einen virtuellen Zustand angeregt und gibt ein Photon der Energie $h\nu_0$ ab. Das Molekül nimmt somit keine Energie auf, dadurch bleiben die Frequenzen des eingestrahnten und des gestreuten Lichts gleich. Dieser Prozess wird auch Rayleigh-Streuung genannt.

Am zweithäufigsten tritt die sogenannte Stokes-Streuung auf. Hierbei wird ein Photon der Energie $h(\nu_0 - \nu_m)$ abgegeben, das Molekül nimmt also folglich Energie auf und befindet sich in einem angeregten Schwingungszustand. Die Streustrahlung besitzt somit eine um $h\nu_m$ geringere Energie (geringere Frequenz) als die des eingestrahnten Lichts. Die nun beobachtbaren Spektrallinien werden auch Stokes-Linien genannt.

Ist das Molekül vor der Anregung in einen virtuellen Zustand bereits in einem angeregten Schwingungszustand positioniert, tritt der seltenste Fall, die Anti-Stokes-Streuung, auf. Dabei fällt das Molekül nach Anregung aus dem virtuellen Zustand in den Grundzustand. Die Streustrahlung besitzt eine um $h\nu_m$ höhere Energie (höhere Frequenz) als die des eingestrahnten Lichts. Diese Spektrallinien werden auch Anti-Stokes-Linien genannt. Die geringe Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses im Vergleich zur Stokes-Streuung begründet sich darin, dass sich nach der Boltzmann-Verteilung weit weniger Moleküle in einem angeregten Schwingungszustand als im Grundzustand befinden. Dementsprechend ist diese Streustrahlung im Spektrum deutlich intensitätsschwächer und somit nur in Ausnahmefällen für analytische Zwecke nutzbar. In Abbildung 3 werden diese drei Prozesse, die bei der Interaktion von Licht und Molekülen

aufzutreten, in einem Jablonski-Diagramm gezeigt. Interessant für die Raman-Spektroskopie sind nur die Stokes- und Anti-Stokes-basierte Streuprozesse, die als inelastische Streuung des Photons am Molekül dargestellt werden [45,46].

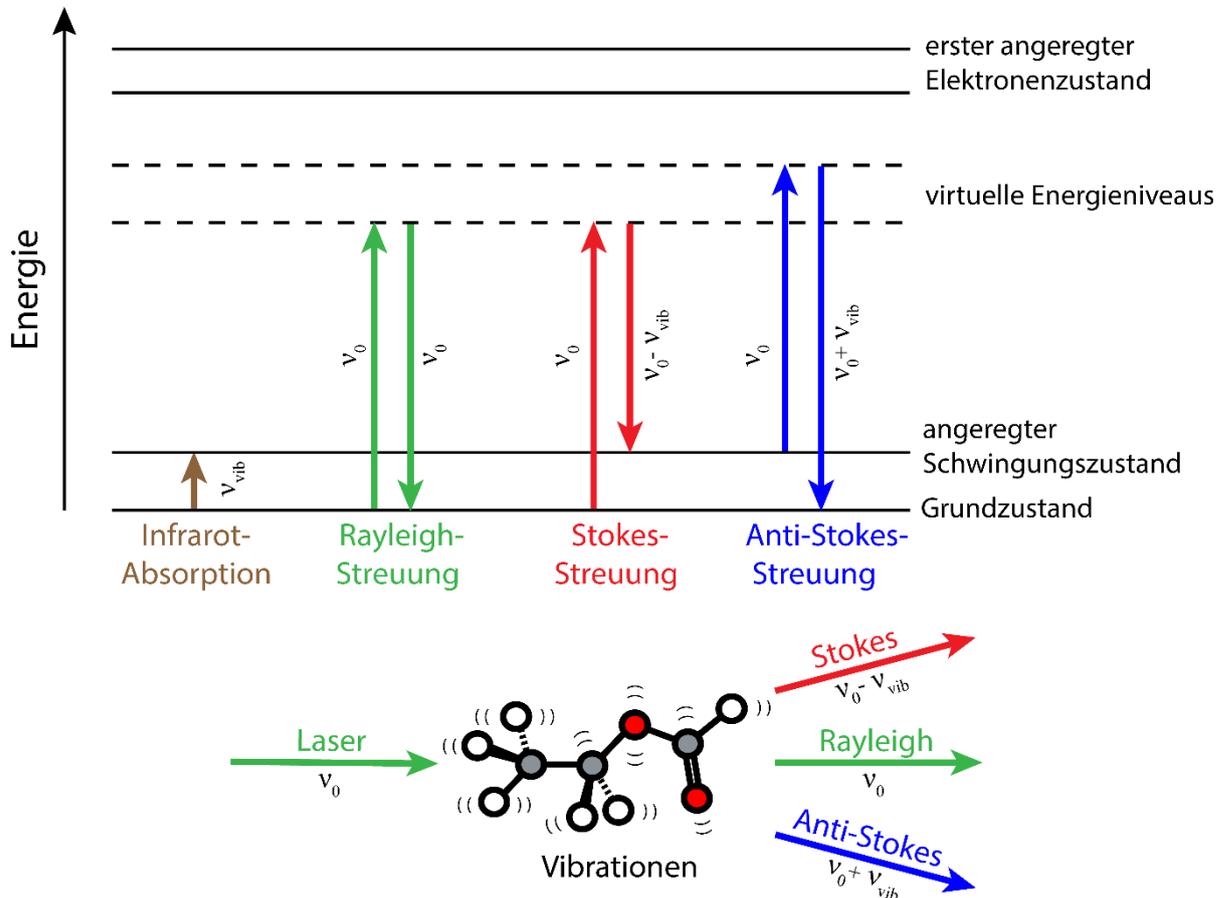


Abbildung 3 Darstellung der Streuprozesse bei der Raman-Spektroskopie in einem Jablonski-Diagramm.

In einer klassischen Ansicht wird mit Hilfe eines oszillierenden elektrischen Feldes der Laserstrahlung $E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ im Molekül ein Dipolmoment P induziert. Dieser induzierte Dipol wird von den Molekülschwingungen moduliert und strahlt selbst eine elektromagnetische Welle ab. Der auftretende Energieunterschied zwischen dem eingestrahlenen Licht und dem gestreuten Licht entspricht dabei dem charakteristischen Schwingungszustand $h\nu_m$ [6]. Das Dipolmoment und das äußere elektrische Feld hängen über die Polarisierbarkeit α zusammen. Die Polarisierbarkeit ist ein Maß für das Deformationsvermögen der Elektronenhülle im Molekül bei äußerer Einwirkung eines elektrischen Feldes. Moleküle mit einem kleinen Abstand zwischen dem höchst besetzten Orbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Orbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) zeigen eine hohe Polarisierbarkeit, Moleküle mit einem großen HOMO-LUMO-Abstand dagegen eine niedrigere Polarisierbarkeit [47,48]. Aus dem Tayloransatz für die Polarisierbarkeit ergibt sich folgende klassische Beschreibung des Raman-Effekts: [46,49]

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} E_0 q_M^0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_M} \right)_0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_M)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_M)t]$$

Gleichung (1)

P	induzierter Dipol
E_0	elektrische Feldstärke
ν_0	Frequenz des eingestrahlten Lichts
ν_M	Frequenz der Schwingung
α	Polarisierbarkeit
q	Schwingungsnormalkoordinate
$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_M} \right)$	Polarisierbarkeitsänderung

Diese Gleichung stellt einen zeitlich oszillierenden Dipol dar, der elektromagnetische Wellen abgibt (Hertz'scher Dipol). Die verschiedenen Terme stehen dabei für die unterschiedlichen auftretenden Prozesse. Der erste Term beschreibt die Rayleigh-Streuung, bei der das eingestreuete Licht in eine beliebige Richtung unverändert abgestrahlt wird. Die frequenzverschobenen Terme stehen für die Raman-Streuung mit $\nu_{Anti-Stokes} = \nu_0 + \nu_M$ und $\nu_{Stokes} = \nu_0 - \nu_M$. Dadurch, dass die Lage der Linien abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ist, werden die Stokes- und Anti-Stokes-Linien relativ zur Frequenz des Lasers (ν_0) angegeben (relative Raman-Verschiebung $\bar{\nu}_M$ [cm^{-1}]). Außerdem zeigt sich, dass die Raman-Streuung stark stoffspezifisch ist, da die Polarisierbarkeit abhängig vom Aufbau des Moleküls und dadurch auch $\frac{\partial \alpha}{\partial q_M}$ abhängig vom Molekül ist [46].

Die Raman-Streuung als Stokes- und Anti-Stokes-Anteil aus Gleichung (1) kann somit nur auftreten, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_M} \right)_0 \neq 0$$

Gleichung (2)

Eine Schwingung ist also nur dann Raman-aktiv, wenn sich die Polarisierbarkeit des Moleküls dabei ändert. Weiterhin lässt sich aus dem Tayloransatz zumindest qualitativ ableiten, dass die Raman-Streuung als Term erster Ordnung gegenüber der Rayleigh-Strahlung (Term nullter Ordnung) deutlich schwächer ausgeprägt ist. Tatsächlich wird bei dem Prozess der Raman-Streuung nur ungefähr eines aus 10^8 Photonen gestreut [50]. Der Grund dafür liegt am geringen Streuquerschnitt von ca. 10^{-29} cm^2 pro Molekül [6,43,51]. Daher werden heutzutage auch ausschließlich intensitätsstarke Anregungsquellen wie Laser bei der Raman-Spektroskopie benutzt.

Die Energie der Schwingung bei Anregung des Moleküls durch monochromatische Strahlung wird durch die beteiligten Bindungspartner, deren Masse und die vorherrschenden Bindungskräfte bestimmt. Die entstehende Frequenzverschiebung und somit deren Lage im Raman-Spektrum ist demnach molekülspezifisch. Im Allgemeinen

werden hierbei die Normalschwingungen betrachtet. Während einer Normalschwingung schwingen alle Atome des Moleküls in der gleichen Frequenz (Normalfrequenz). Ein N -atomiges Molekül besitzt dabei $3N-6$ Normalschwingungen, ein lineares Molekül $3N-5$ Normalschwingungen.

Unterschieden werden diese in Valenzschwingungen, die durch eine Änderung der Bindungslänge hervorgerufen werden, und Deformationsschwingungen, welche durch eine Änderung der Bindungswinkel zueinander erzeugt werden. Deformationsschwingungen finden sich typischerweise im Raman-Spektrum in einem Bereich unter 2000 cm^{-1} , Valenzschwingungen von 1000 cm^{-1} bis 3600 cm^{-1} . Der Bereich unter 1500 cm^{-1} wird Fingerabdruck-Bereich genannt, da hier die charakteristischen Schwingungen eines Moleküls liegen. Besonders bei großen Molekülen wird jedoch nicht jede einzelne Schwingung betrachtet, sondern es werden die Schwingungen von ähnlichen Systemen mit gleichen Bindungen oder funktionellen Gruppen zusammengefasst. Tritt z. B. eine bestimmte Bindung häufig im Molekül auf, wird deren Bande im Raman-Spektrum deutlich intensiver sein, als Banden, die nur von einer Stelle im Molekül hervorgerufen werden. Zur Identifizierung einzelner Banden helfen folgende Regeln: [46]

- Je stärker die Bindung ist, desto höher liegt die Schwingungsfrequenz:

$$\nu(\text{C}\equiv\text{C}) > \nu(\text{C}=\text{C}) > \nu(\text{C}-\text{C})$$

- Je größer die Masse, desto niedriger liegt die Schwingungsfrequenz:

$$\nu(\text{C}-\text{H}) > \nu(\text{C}-\text{O}) > \nu(\text{C}-\text{Cl})$$

Mehrere Faktoren sind für die Intensität der Raman-Banden verantwortlich: [46,47]

$$I \sim I_0 \nu_0^4 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_M} \right)_0^2 \quad \text{Gleichung (3)}$$

I_0 Intensität des eingestrahnten Lichts

ν_0 Frequenz des eingestrahnten Lichts

N Anzahl der streuenden Moleküle

$\frac{\partial \alpha}{\partial q_M}$ Polarisierbarkeitsänderung

Die Intensität der Raman-Banden wird durch die Anregungswellenlänge (Frequenz) am stärksten beeinflusst. Die Intensität der Streuung steigt mit der vierten Potenz der Anregungsfrequenz. Wird bei der Messung einer bestimmten Substanz mit konstanter Polarisierbarkeitsänderung die gleiche Anregungswellenlänge genutzt, kann direkt auf die Stoffmenge geschlossen werden [46]. Die Anregung mit energiereichen Photonen (kleine Wellenlänge respektive hohe Frequenz) führt zu einer hohen Streuintensität. Problematisch ist hierbei, dass die ebenfalls stärker werdende Fluoreszenzstrahlung das schwache Raman-Signal überdecken kann. Der Streuquerschnitt bei der Fluoreszenzstrahlung erreicht ca. 10^{-16} cm^2 pro Molekül und ist mit 14 Größenordnungen deutlich größer als der Streuquerschnitt der Raman-Streuung [6]. Zusätzlich muss be-

achtet werden, dass energiereiche Strahlung zur Zerstörung der Probe führen kann. In erster Linie ist es jedoch wichtig, die Fluoreszenzstrahlung durch Verwendung einer hohen Wellenlänge zu vermeiden. Da dadurch allerdings die Intensität der Raman-Banden geringer wird, muss dies mit hoher Laserleistung kompensiert werden. Ferner ist die Quanteneffizienz der verwendeten CCD-Kamera zu beachten, da diese im nahen Infrarot abnimmt [46]. Die Raman-Spektroskopie selbst bietet eine Reihe an Vorteilen. Insbesondere die Messung in wässriger Phase, die kaum oder überhaupt nicht benötigte Probenvorbereitung und das hohe Auflösungsvermögen bei Kopplung mit einem optischen Mikroskop sind hierbei besonders hervorzuheben.

2.2.2 Auflösungsvermögen

Durch die Kopplung mit einem Lichtmikroskop (Raman-Mikrospektroskopie) ergibt sich eine hohe örtliche Auflösung durch einfache Positionierung und Fokussierung des Lasers mit vorheriger lichtmikroskopischer Auswahl der zu analysierenden Probe [46,52]. Das örtliche Auflösungsvermögen ist dabei vom beugungsbedingten Rayleigh-Kriterium abhängig. Bei einer kohärenten Beleuchtung ergibt sich, abhängig von der numerischen Apertur und der Wellenlänge, ein minimaler Durchmesser d_0 des Beugungsscheibchens (*AIRY*-Scheibe, Veranschaulichung siehe Abbildung 4) in der Beleuchtungsebene von:

$$d_0 \approx 1,22\lambda/NA \quad \text{Gleichung (4)}$$

λ Wellenlänge

Die numerische Apertur NA wird dabei durch den folgenden Zusammenhang definiert:

$$NA = n \cdot \sin \theta \quad \text{Gleichung (5)}$$

n Brechungsindex

θ Öffnungswinkel des Objektivs

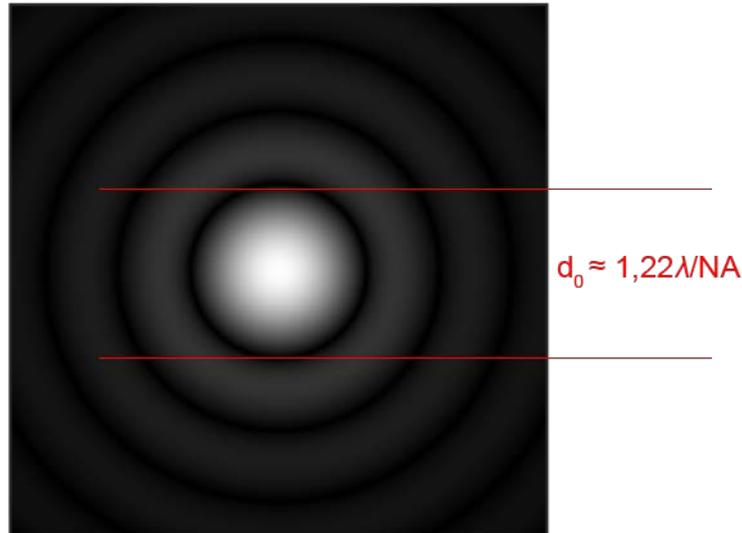


Abbildung 4 Veranschaulichung des Beugungsscheibchens (*AIRY*-Scheibe) und dessen Durchmessers.

Das Rayleigh-Kriterium besagt hierbei, dass zwei Objekte genau dann noch lateral aufgelöst werden können, wenn sie durch den Radius r einer *AIRY*-Scheibe getrennt werden:

$$r \approx 0,61\lambda/NA \quad \text{Gleichung (6)}$$

Beispielsweise können bei Verwendung eines 633-nm-Lasers (532-nm-Lasers) und einem Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,90 zwei Objekte noch lateral aufgelöst werden, wenn sie $0,43 \mu\text{m}$ ($0,36 \mu\text{m}$) voneinander entfernt sind. Es muss hierbei aber unbedingt beachtet werden, dass diese Annahmen in erster Konsequenz nur für lichtmikroskopische Betrachtungen gelten. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Raman-Spektren zweier nah beieinanderliegender Objekte keine spektralen Einflüsse („Verunreinigungen“) des jeweils anderen Objektes enthalten. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn heterogene Proben, wie in der Mikrobiologie häufig der Fall, untersucht werden [53]. Um dieses Problem bei der Analyse zu umgehen, hat es sich in der wissenschaftlichen Praxis und insbesondere bei der Untersuchung von mikrobiologischen Proben als praktikabel herausgestellt ein maximales Auflösungsvermögen von $\approx 1 \mu\text{m}$ anzunehmen.

2.2.3 Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels RM

Anfangs wurde RM genutzt, um die Analyse von einzelnen Zellen mikrobieller Kulturen durchzuführen. Da sich Biofilme grundlegend aus vielen Mikroorganismen zusammensetzen, wurde die RM bald auch für diese komplexeren Systeme eingesetzt. Die erste Charakterisierung von einzelnen Zellen wurde hierbei von Schuster *et al.* im Jahre 2000 berichtet, bei der sie eine Methode bei dem RM genutzt wurde, um die chemische Zusammensetzung und Heterogenität einer *Clostridium acetobutylicum*-Kolonie zu untersuchen, präsentierten [54]. Viele Gruppen nutzten darauf RM als Methode, um einzelne Zellen zu identifizieren oder zu charakterisieren. Beispielsweise analysierte und klassifizierte die Arbeitsgruppe Popp einzelne Bakterienzellen verschiedener Spezies in Kombination mit verschiedenen multivariaten Methoden, z. B. Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA), hierarchischer Clusteranalyse (*hierarchical cluster analysis*, HCA) und Analysen mittels *support vector machines* (SVM) [55-58]. Vor allem die schnelle Identifizierung von mikrobiellen Krankheitserregern in der klinischen Mikrobiologie ist ein bedeutsames Thema. Maquelin *et al.* zeigten, dass die Identifizierung und Unterscheidung der Spezies und sogar des Stammes von verschiedenen mikrobiellen Krankheitserregern möglich ist [59,60]. Mehr Informationen (vor allem über Techniken zur Isolierung von einzelnen Bakterienzellen) können in einem aktuellen Review von Pahlow *et al.* gefunden werden [61].

Die ersten Untersuchungen von Biofilmen mittels RM konzentrierten sich hauptsächlich auf Diffusionsprozesse. Suci *et al.* analysierten die räumliche und zeitliche Verteilung von Chlorhexidin in Biofilmen von *Candida albicans* mittels RM und abgeschwächter Totalreflexion-Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (*attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR) [62]. Wohingegen Marcotte *et al.* die Diffusion von Polyethylenglykol in *Streptococcus mutans*-Biofilm betrachteten. Die Biomasseverteilung wurde mit Hilfe der C-H-Streckschwingung bei etwa 2900 cm^{-1} abgebildet. Die Autoren fanden dabei eine heterogene Durchlässigkeit des Biofilms für Polyethylenglykol, welche direkt durch den Biomassegehalt beeinflusst wurde [63].

Die nächsten Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf die Untersuchung der chemischen Unterschiede zwischen planktonischen und Biofilmzellen, die Biofilmbildung, den Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren, die metabolischen Wege und die chemische Zusammensetzung des Biofilms. Auch wurde die Gesamtheterogenität eines Biofilms in Kombination mit den physiologischen Zuständen der Mikroorganismen analysiert.

Die Entwicklung von Mikrokolonien und die Wachstumsheterogenität der Mikroorganismen wurden in einer Studie von Choo-Smith *et al.* analysiert. Sie fanden eine ausgeprägte Heterogenität innerhalb der Proben, welche für 12 und 24 Stunden kultiviert wurden. Die hierarchische Clusteranalyse von Spektren aus verschiedenen Positionen und Tiefen ließ auf die Anwesenheit verschiedener Schichten in den Kolonien schließen. Ferner zeigte sich, dass die Oberfläche der Kolonien höhere Glykogengehalte aufwies, während höhere RNA-Werte für die tieferen Schichten typisch waren [64].

Sandt *et al.* nutzten RM als Methode, um *in situ* die chemische Heterogenität, Zusammensetzung, Struktur und Entwicklung eines vollständig hydratisierten Biofilms in einer Flusszelle zu studieren. Sie nutzten die Raman-Signaturen von Zellen und EPS, um die Zusammensetzung und die Bildung des Biofilms zu charakterisieren. Die Autoren behandelten einige Proben mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) um gebundenes EPS über eine Calciumkomplexierung zu entfernen. Durch Subtraktion der Spektren von EDTA-behandelten Biofilmzellen mit denen der unbehandelten Biofilmzellen konnten Spektren mit scharfen, aber meist unidentifizierten Banden erzeugt werden, welche wiederum als Markierungsbanden für EPS verwendet wurden [65].

Später zeigte die gleiche Forschergruppe, dass RM als Methode genutzt werden kann, um Informationen über die Spezies- und Stamm-abhängige Variation des Wassergehalts und der Biomassendichte in *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudoalteromonas* sp. NCIMB 2021-Biofilmen zu erhalten. Es wurde das Wasser-Biomasse-Verhältnis bestimmt, welches das Verhältnis der O–H-Streckschwingung des Wassers und der C–H-Streckschwingungsbande der Biomasse abbildet [66]. Samek *et al.* konnten zeigen, dass es mit RM möglich ist zwei klonal sehr ähnliche *Staphylococcus epidermidis*-Stämme zu unterscheiden (Wildtypstamm und negativ isogener Stamm). Da nur der Wildtyp-Stamm das interzelluläre Polysaccharid Adhäsine produziert, wurden die wesentlichen Unterschiede in den Spektren für Polysaccharid-Banden gefunden. Allerdings erlaubte nur die Verwendung von PCA eine klare Unterscheidung der beiden Stämme [67]. In einer Studie von Beier *et al.* wurden zwei verschiedene orale Bakterien erfolgreich detektiert und deren Verteilung in hydratisierten Biofilmen, welche aus ein oder zwei Bakterienarten bestanden, durch RM abgebildet [68]. In einer Studie von Huang *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass es mit RM möglich ist, zwischen *Pseudomonas fluorescens*-Zellen zu unterscheiden, welche in verschiedenen Umgebungen mit unterschiedlichen Stressfaktoren und metabolischen Hintergründen kultiviert wurden. Die *in vitro* chemische Zusammensetzung einzelner Zellen war wesentlich verändert, wenn sie auf verschiedenen Kohlenstoffquellen oder unter Substratmangel kultiviert wurden. Ein signifikanter Unterschied konnte ebenfalls für *P. fluorescens in planta* nachgewiesen werden, wenn diese in verschiedenen Teilen einer Zuckerrübe gezüchtet wurden [69]. In einer weiteren Studie mit dem gleichen Mikroorganismus verglichen Huang *et al.* planktonische Zellen und Zellen, die aus einem Biofilm gewonnen wurden, und berichteten, dass die Raman-Spektren mittels multivariater Datenanalyse unterschieden werden konnten [70]. In diesem Zusammenhang wurden die chemischen Unterschiede der planktonischen und Biofilmzellen von *Cronobacter sakazakii* von Garima *et al.* untersucht. Insbesondere die Intensität der Banden, die Proteinen zugeordnet werden können, waren in Zellen von Biofilmen erhöht [38]. Kušić *et al.* führten eine RM-Studie durch, um Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen planktonischen und sessilen Zellen verschiedener Biofilme zu untersuchen. Es wurden dabei *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* und sechs unterschiedliche *Legionellen*-Stämme verwendet. Für die *Legionellen*-Biofilme wurde als Hauptunterschied eine Erhöhung der Synthese von Lipiden ausgemacht, die mit der Fähigkeit der Biofilmbildung verknüpft sein könnte. Für die Biofilme von *E. coli*, *K. pneumoniae*

und *P. aeruginosa* konnte eine Erhöhung der Produktion von Polysacchariden nachgewiesen werden [71]. Liu *et al.* analysierten die chemische Zusammensetzung von *Enterococcus faecalis*-Zellen in Biofilmen. Die Autoren berichteten, dass sie den *E. faecalis*-Biofilm von ausgehungerten planktonischen *E. faecalis*-Zellen und Biofilm-Zellen von anderen physiologischen Zuständen (d. h. exponentielle und stationäre Phase) unterscheiden konnten. Dies war hauptsächlich auf Unterschiede in Nukleinsäuren und Proteinen in den Spektren zurückzuführen [72].

Eine Studie, die einen kompletten aus mehreren Arten bestehenden Biofilm inklusive EPS und mikrobieller Bestandteile untersuchte, wurde von Ivleva *et al.* durchgeführt. Eine breite Palette von Referenzproben (Biopolymere, Proteine, Mikroorganismen) wurden ebenso analysiert. Diese waren für die Identifizierung charakteristischer Frequenzbereiche und Markierungsbanden, welche spezifisch für unterschiedliche Biofilm-Komponenten sind, notwendig [73]. In diesem Zusammenhang berichteten Andrews *et al.*, dass es mittels RM möglich sein müsste, die Vielzahl an Makromolekülen zu identifizieren, die eine Rolle bei der Zellanhaftung und dem Biofilmwachstum spielen. Sie konnten zeigen, dass für verschiedene Arten unterschiedliche extrazelluläre Makromoleküle die anfängliche Zellbindung an Oberflächen und sogar das Wachstumsverhalten beeinflussen [74]. In einer Studie von Chen *et al.* wurden verschiedene EPS, einschließlich löslicher EPS, locker gebundener EPS und fest gebundener EPS aus Biofilmen extrahiert und auf ihre unterschiedliche biochemische Zusammensetzung und funktionelle Gruppen untersucht [75].

Biofilme können ein ernstzunehmendes Problem im Gesundheitswesen und in anderen Bereichen, in denen Biofilmentwicklung (z. B. auf medizinischen Geräten) unerwünscht ist, darstellen. Diese Biofilme können leicht zu Kontaminationen und letztendlich zu Krankheiten führen. Daher ist der Einfluss von antimikrobiellen Reagenzien auf solche Biofilme ein wichtiges Forschungsthema. Diese können beispielsweise mittels RM untersucht und charakterisiert werden. Lu *et al.* analysierte die antimikrobielle Wirkung von Diallylsulfid auf *Campylobacter jejuni*-Biofilme. RM wurde verwendet, um das Überleben von sessilen Zellen innerhalb von Biofilmen zu untersuchen. Daher wurden Raman-Maps erzeugt und die chemische Zusammensetzung von Zellen und EPS mit und ohne Diallylsulfid bestimmt und verglichen [76]. Eine andere Studie, welche sich mit den antibiotischen Wirkungen auf Biofilme beschäftigt, wurde von Jung *et al.* durchgeführt. Sie untersuchten *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme mittels RM und multivariater Datenanalyse und berichteten über die Änderungen in den Raman-Spektren als Reaktion auf drei verschiedene antimikrobiellen Reagenzien [77]. Die Antibiofilmaktivität von funktionalisiertem Polycaprolactam auf *E. coli*-Biofilme und das Wachstum des Biofilms wurde durch Prabhawathi *et al.* untersucht. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass die koloniebildenden Einheiten, Proteine und Kohlenhydrate stark reduziert auftraten [78].

Ein multidisziplinärer Ansatz, der RM mit anderen mikroskopischen und spektroskopischen Techniken kombinierte, kann ergänzende Informationen und einen umfas-

senden Überblick über Biofilmen ergeben. Häufig verwendete ergänzende Techniken sind beispielsweise FISH, CLSM, REM, AFM, SIMS und klassische MS-Methoden.

Die erste Kombination von RM mit FISH für eine *in situ*-Identifizierung wurde von Huang *et al.* veröffentlicht. Sie beschrieben die Entwicklung, Kalibrierung und Anwendung von Raman-FISH mit Reinkulturen und veranschaulichten das Potential mit einem *proof-of-principle*-Experiment in naphthalinabbauenden Grundwasserproben [29]. Ein optimierter Ansatz dieser Technik wurde später von Kniggendorf *et al.* veröffentlicht. Durch die Verwendung von getrennten Geräten und Einstellungen für die Raman- und Fluoreszenzanalyse konnten einige Limitierungen überwunden werden. Störender Fluoreszenzhintergrund und üblicherweise anfallende Photobleichschritte konnten vermieden werden, da fluoreszierende Farbstoffe zur Markierung der Zielbakterien nicht notwendig waren.

Sie konnten einen direkten Zellvergleich zwischen konfokaler RM- und FISH-Analysen an derselben Probe mit präziser Zellokalisierung über verschiedene Messungen und Instrumente zeigen. Dadurch war es möglich das Raman-Spektrum und die FISH-Identifikation für jede einzelne mikrobielle Zelle kombiniert zu betrachten [79].

Schwartz *et al.* untersuchten mit Hilfe von RM in Kombination mit molekularbiologischer Taxonomie und einer bildgebenden Umweltrasterelektronenmikroskopie natürliche Biofilme, welche auf Filtermaterialien in einem Wasserwerk gewachsen sind. RM wurde hier verwendet, um die Existenz von Biofilmen nachzuweisen, Informationen über die chemische Zusammensetzung der Biofilmmatrix bereitzustellen und spezifische Kenntnisse über EPS-Strukturen (Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Fettsäuren) zu gewinnen. In Kombination mit den anderen zwei Verfahren konnten Informationen über die räumliche Biofilmstruktur, die bakterielle und chemische Zusammensetzung der Matrix erhalten werden [80].

CLSM und RM wurden kombiniert, um die EPS-Matrix und ihre chemischen Veränderungen während der *in situ* Biofilm-Entwicklung zu untersuchen. Da RM kein Anfärben erfordert, liefert es Informationen über die chemische Zusammensetzung in einer nichtdestruktiven Weise. Somit ist es eine hervorragende Ergänzung zu CLSM, die nur Informationen über die Verteilung von färbbarer EPS und Nukleinsäuren zur Verfügung stellt [81]. Feng *et al.* führten eine *in situ*-Charakterisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen, die in einer mikrofluidischen Plattform kultiviert wurden, durch. Hierbei wurden die chemischen Unterschiede mittels RM analysiert und mit den quantitativen Informationen der CLSM über die Biofilmmasse kombiniert. Sie beobachteten die Verstärkung bestimmter Raman-Banden z. B. von Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten während der Biofilmentwicklung. Sie quantifizierten die Biofilmbildung und konnten daher Biofilme in verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheiden (Anfangsphase, mittlere Phase und Spätphase) und mittels PCA bestätigen [82]. In einer Studie von Masyuko *et al.* wurde die chemische Zusammensetzung eines Biofilms von *P. aeruginosa* mittels RM in Kombination mit MALDI-MS analysiert. Planktonische Zellen unterschieden sich vor allem durch spektroskopische Banden von DNA/RNA, die bei Zellen innerhalb eines Biofilms deutlich schwächer ausgeprägt waren. Stattdessen wurden Spektren gefunden, die sich durch einen höheren Anteil an Lipiden hervor-

heben [83]. In einer zweiten Studie derselben Gruppe wurde ebenfalls RM genutzt, um Informationen über Proteine, Kohlenhydrate und zum ersten Mal auch über Chinolon-Signalmoleküle bereitzustellen. Unterstützt wurde RM mit der Sekundärionen-Massenspektrometrie, um die Molekularverteilungen der verschiedenen Chinolone in *P. aeruginosa* Biofilmen zu visualisieren und die spezifischen Molekulargewichte und Identitäten über *in situ*-Tandem-MS zu bestimmen [84]. Die Verteilung und die chemische Identifizierung der EPS aus jeder Phase des gesamten bakteriellen Lebenszyklus, der Adhäsion, Filament- und Biofilmbildung von *Xylella fastidiosa* wurde *ex vivo* von Janissen *et al.* untersucht. Hierbei wurde ein multidisziplinärer Ansatz mit verschiedenen mikrospektroskopischen Techniken gewählt. Sie kombinierten RM, Epifluoreszenzmikroskopie, *spinning-disk*-Fluoreszenzmikroskopie, CLSM, REM und Rastersondenmikroskopie (*scanning probe microscopy*, SPM), um umfassende Information über die Adhäsion von *X. fastidiosa* und die Biofilmbildung zu gewinnen. Ihre Studie lieferte direkte Beobachtungen und Validierungen über wichtige Phasen der Biofilmbildung von *X. fastidiosa*, unter anderem von der Adhäsion und der Biofilmreifung [85].

RM ist eine geeignete und sehr vielversprechende Technik, die eine zerstörungsfreie Charakterisierung und chemische Bildgebung komplexer Biofilmmatrizes ermöglicht. Die Kombination von RM mit anderen Techniken kann helfen umfassende Informationen über die Biofilmzusammensetzung, -struktur und -funktion zu erhalten. Allerdings bleibt, bedingt durch die begrenzte Nachweisstärke der RM, die Analyse der Biofilmentwicklung, insbesondere des Anfangsstadiums, eine Herausforderung. Allerdings werden die RM-Untersuchungen häufig durch eine (starke) Fluoreszenz erschwert, welche insbesondere bei Umweltproben meist stark ausgeprägt ist. Daher ist eine Optimierung der Messparameter (Anregungslaserwellenlänge, Photobleichung, Vergrößerung des Objektivs, konfokaler Modus, usw.) erforderlich. Da die meisten Bakterien und EPS-Substanzen (Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren, usw.) relativ schwache Raman-Signale bei für Biofilmen relevanten Konzentrationen zeigen, sind lange Analysezeiten zu berücksichtigen. Darüber hinaus sind eine umfassende Interpretation und korrekte Auswertung der Raman-Spektren von großer Wichtigkeit.

2.2.4 Datenanalyse

Die Raman-Spektren von mikrobiellen Proben enthalten Raman-Signale aller Makromoleküle, welche im Fokus des Lasers liegen. Sie sind deswegen üblicherweise sehr komplex. Da die Raman-Spektroskopie auf den Molekularschwingungen der chemischen Bindungen von Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden usw., welche in allen mikrobiologischen Proben vorhanden sind, basiert, haben die Spektren häufig ein (sehr) ähnliches Aussehen. Dies erschwert die Interpretation und Auswertung der Daten enorm [86]. Daher sind statistische oder chemometrische Herangehensweisen nötig, um ein tieferes Verständnis der chemischen Zusammensetzung der Proben zu erhalten [87]. Nebenerscheinungen, wie beispielsweise Fluoreszenz oder Hintergrundrauschen, stören die Anwendung dieser Techniken stark. Deswegen ist es für eine korrekte Anwendung

der Modelle unbedingt nötig störende Signalinformation zu erkennen und zu entfernen. Somit sind eine geeignete Datenvorbehandlung und Chemometrik notwendig, um das einzigartige Potential der Raman-Spektroskopie bei Charakterisierung mikrobieller Proben vollständig auszuschöpfen [88]. Bei der mikrobiologischen Analyse werden zwei grundlegende chemometrische Methoden besonders häufig verwendet. Die erste basiert auf einer nichtüberwachten Klassifikation, bei der keinerlei Kenntnisse über die Probe *a priori* zur Verfügung stehen müssen. Beispiele sind hierbei die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) [89] und die hierarchische Clusteranalyse (*hierarchical cluster analysis*, HCA) [90]. Diese Modelle überzeugen vor allem durch ihre einfache Anwendbarkeit und Effizienz. Allerdings ist es mit diesen nichtüberwachten Modellen schwierig oder sogar unmöglich Klassifikationsprobleme von komplexeren mikrobiellen Systemen, wie beispielsweise Biofilmen, zu lösen. Auch die Zellidentifikation stellt sich als große Herausforderung dar, da nur geringe und subtile Änderungen in den Raman-Spektren für die Unterscheidung der Zellen ausschlaggebend sind. Um diese Problemstellungen zu lösen, kann die zweite Gruppe an chemometrischen Modellen, den überwachten multivariaten Klassifikationsverfahren, genutzt werden. Diese benötigen allerdings einige Kenntnisse *a priori* über die zu untersuchenden Proben. Mit Hilfe einer Reihe an gut charakterisierten Referenzproben können diese Modelle so trainiert werden, dass sie unbekannte mikrobiologische Proben korrekt identifizieren und einordnen können [87]. Gebräuchliche Modelle sind beispielsweise *support vector machines* (SVM) [55] oder die lineare Diskriminanzfunktionsanalyse (*linear discriminant analysis*, LDA) [91]. Eine diagnostische Genauigkeit von bis zu 100 % ist mit diesen Methoden unter kontrollierten Bedingungen möglich.

2.3 Resonanzverstärkte Raman-Streuung

2.3.1 Physikalischer Hintergrund

Der grundlegende Unterschied zwischen normaler Raman-Spektroskopie und Resonanz-Raman-Spektroskopie wird in Abbildung 5 veranschaulicht. Bei der normalen Raman-Spektroskopie wird eine Wellenlänge NR genutzt, die weit von den Absorptionsbanden entfernt liegt [92]. Bei der Resonanz-Raman-Spektroskopie wird die Wellenlänge RR des einfallenden Lasers so gewählt, dass die einfallende Energie innerhalb oder nahe einem elektronischen Übergang einer molekularen Schwingung liegt. Resonanz-Raman tritt nicht ausschließlich in einem klar definierten schmalen Wellenlängenbereich auf. Tatsächlich lassen sich Verstärkungen bereits einige hundert Wellenzahlen unterhalb des elektronischen Übergangs beobachten. Eine solche Anregung mit der Wellenlänge PR führt zu einem Zwischenstadium, auch Präresonanz genannt.

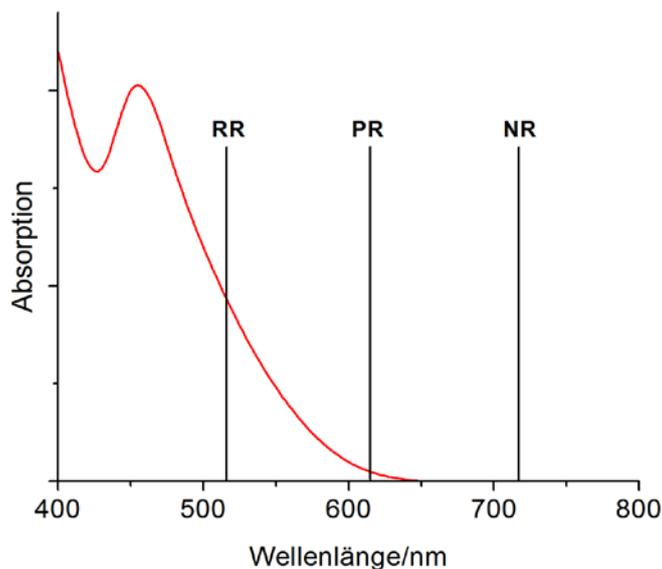


Abbildung 5 Bei Anregung einer Bande mit einer Absorption des sichtbaren Lichts bei 450 nm mit einer Wellenlänge NR, die weit weg von der Absorptionsbande ist, wird ein normales Raman-Spektrum generiert; Anregung mit der Wellenlänge RR erzeugt ein resonanzverstärktes Raman-Spektrum; Anregung mit Wellenlänge PR führt zu einem Zwischenstadium, auch Präresonanz genannt (nach [92]).

Die vereinfachten Streuprozesse bei normaler Raman- und Resonanz-Raman-Spektroskopie sind in Abbildung 6 veranschaulicht. Anstatt die Schwingung auf einen virtuellen Energiezustand anzuregen, wird dieser in der Nähe eines seiner angeregten elektronischen Zustände angeregt. Dies führt, insbesondere bei den beteiligten Molekülschwingungen des elektronischen Übergangs, zu einem erhöhten Raman-Querschnitt und führt wiederum zu einer stark erhöhten Raman-Streuintensität. Die moderne Resonanz-Raman-Theorie basiert hauptsächlich auf der Arbeit von Albrecht *et al.* [93], welche Resonanz-Raman als eine vibronische Spektroskopie (Schwingungs- und Elektro-

nenspektroskopie) betrachteten [94]. Bei normaler Raman-Streuung interagiert die Anregung nicht mit den angeregten elektronischen Zuständen und die Polarisierbarkeiten können als Eigenschaften des elektronischen Grundzustands angesehen werden. Im Gegensatz dazu ist die Resonanz-Raman-Streuung der einfallenden Laserfrequenz in Resonanz mit einem oder mehr der erlaubten elektronischen Übergänge. Die Positionen der Resonanz-Raman-Banden treten bei den elektronischen Schwingungsfrequenzen des Grundzustands auf, die Intensitäten der Resonanz-Raman-Banden enthalten allerdings spezifische Informationen über die Struktur und Dynamik der resonanten elektronischen Zustände. Albrecht *et al.* konnten zeigen, dass die Resonanz-Raman-Intensität aus mehreren Mechanismen besteht, die als A-Term (Franck-Condon-Überlappung), B-term (vibronische Herzberg-Teller Kopplung) usw. bezeichnet werden [93,94]. Der A-Term ist mit dem Franck-Condon-Prinzip (F-C) verknüpft, der auf der adiabatischen Born-Oppenheimer-Näherung basiert, die schlicht deshalb gilt, da ein Kern viel schwerer als ein Elektron ist. Mit dem F-C-Prinzip erfolgt der elektronische Übergang vertikal, d. h. ohne Veränderung der Kernpositionen im Molekül. Quantenmechanisch ist die Intensität eines vibronischen Übergangs proportional zum Quadrat des Überlappungsintegrals zwischen den Schwingungswellenfunktionen der Grundzustände und den angeregten elektronischen Zuständen. Der B-Term und Terme höherer Ordnung sind abhängig von der Wechselwirkung zwischen elektronischen und nuklearen Bewegungen und sind im Allgemeinen deutlich kleiner als der A-Term [94]. Eine detailliertere Beschreibung der Resonanz-Raman-Theorie auf Grundlage einer quantenmechanischen Störungstheorie kann in der Literatur eingesehen werden [95].

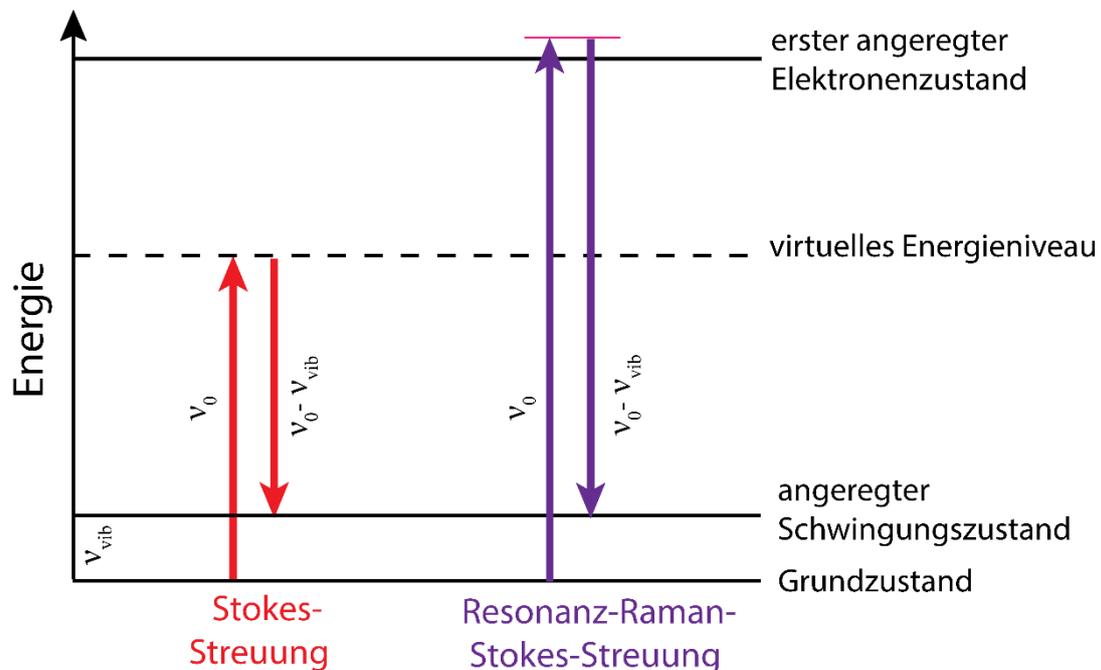


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Streuprozesses bei der Resonanz-Raman-Spektroskopie im Vergleich zu normaler Raman Streuung in einem Jablonski-Diagramm.

2.3.2 Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels Resonanz-RM

Ein Hauptproblem der RM ist die begrenzte Nachweisstärke, verursacht durch die niedrige Quantenausbeute des Raman-Effekts (typischerweise 10^{-6} – 10^{-8}) [96]. Dies führt meist zu langen Aufnahmezeiten, insbesondere bei der Analyse von einzelnen Zellen mit sehr wenig Biomasse. Glücklicherweise gibt es Strategien, um das Raman-Signal zu verstärken und die Aufnahmezeiten zu verkürzen. Eine Möglichkeit ist die Resonanz-Raman-Streuung. In der Resonanz-Raman-Spektroskopie wird die Wellenlänge des einfallenden Lasers so gewählt, dass die einfallende Photonenenergie innerhalb oder in der Nähe eines elektronischen Übergangs einer molekularen Schwingung liegt. Die Probe muss allerdings Resonanz-Raman-aktive Substanzen, wie beispielsweise Chromophore, besitzen. Einige bereits für die Analyse verwendete Substanzen sind beispielsweise Häm [97], Vitamin B12 [98], Chlorophyll [99], Cytochrom *c* [100], Carotinoid [101], Rhodopsin [102] oder Flavin-Nukleotid [103]. Wenn solche Substanzen vorhanden sind, ist eine schnelle Resonanz-Raman-Analyse einfach durch die Wahl einer geeigneten Laserwellenlänge (grüner Spektralfarbbereich) möglich [11]. Wenn keine dieser Substanzen vorhanden oder verwendbar sind, kann ein Ultraviolettlaser ausgewählt werden. Bei dieser Wellenlänge sind dann hauptsächlich aromatische Aminosäuren und Nukleinsäuren in Resonanz [104,105]. Da allerdings Aminosäuren und Nukleinsäuren in jedem Mikroorganismus vorhanden sind, ähneln sich die resultierenden Spektren verschiedener Mikroorganismen stark, was wiederum die Identifizierung und Charakterisierung deutlich erschwert.

Die erste Beschreibung der Resonanz-Raman-Analyse von Biofilmen wurde von Pätzold *et al.* veröffentlicht. Sie zeigten, dass die Identifizierung und räumliche Verteilung des aus dem Abwasser stammenden Mikroorganismus *Brocadia anammoxidans* direkt in seiner natürlichen Umgebung mit Resonanz-Raman möglich ist. Sie verwendeten unter anderem die Resonanz-Raman-Banden von Cytochrom *c* (Raman-Bande bei 748 cm^{-1}) und auch Raman-Banden von kristallinem Calciumphosphat und Lipiden um die laterale Verteilung des Biofilms darzustellen [106]. Eine Folgestudie zeigte das erfolgreiche *in situ*-Mapping mittels Resonanz-RM von nitrifizierenden Bakterien und Anammoxbakterien, welche in Aggregaten gebunden sind. Die erforderliche Aufnahmezeit wurde hierbei durch Resonanz-Raman-Effekt von Cytochrom *c* um den Faktor hundert reduziert. Damit war eine Unterscheidung der Bakterien innerhalb der mikrobiellen Aggregate bis auf die Stammebene möglich [100]. Sandt *et al.* führten eine Resonanz-RM-Studie durch, um die Verteilung einer Carotinoid-enthaltenden Hefezellen in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen zu analysieren. Das Resonanz-Raman-Carotinoidsignal wurde als Marker für die Hefe verwendet, während bestimmte EPS-Pigmentsignale (im Bereich von 1570 – 1605 cm^{-1}) als Marker für *P. aeruginosa*-Biofilme eingesetzt wurden. Eine vollständige visuelle Darstellung der Verteilung der gesamten Biomasse wurde mittels der C–H-Streckbande durchgeführt [107]. Kniggen-dorf und Meinhardt-Wollweber verwendeten Resonanz-RM als Methode zur schnellen *in situ*-Identifizierung von zwei gleichzeitig in einem Biofilm koexistierenden Mikroorganismen, die entweder hauptsächlich Cytochrom *c* oder Carotinoide produzierten. Die

Chromophore in Spektren aus der äußeren Schicht von Granulaten, die aus einem Reaktor ohne Inokulation stammten, wurden als Carotinoide identifiziert. Das hauptsächlich gefundene Chromophor in Granulat aus einem Reaktor mit Inokulation war Cytochrom *c*. Unter Verwendung von HCA wurde der erste bakterielle Fingerabdruck mit einer Bestimmtheit von 94 % als *Nitrosomonas communis* Nm-02 identifiziert. Die beste Übereinstimmung für die viel seltenere zweite Art von Bakterien wurde bei einer Bestimmtheit von ca. 80 % mit Referenzen von *Nitrosomonas europaea* (Nm-50, Nm-53) ermittelt. Zusätzlich wurden mineralische Titandioxid-Mikropartikel (Rutil und Anatas) in der äußeren Schicht des Granulats gefunden. Diese Studie zeigte, dass Resonanz-RM eine Identifizierung der Bakterien auf Speziesebene ermöglicht. [108]. Kürzlich verwendeten Smith-Palmer *et al.* optische Mikroskopie und das relative Verhältnis von Cytochrom *c* zu Phenylalanin (Phe) in Raman-Spektren, um die Entwicklung von *Pseudalteromonas* sp. NCIMB 2021-Biofilmen auf verschiedenen Oberflächen (Glas mit verschiedenen Beschichtungen) in einer Durchflusszelle, zu analysieren. Da jede Strömungszelle unter Verwendung eines Glasdeckglases konstruiert wurde, konnte das Biofilmwachstum oder die Inhibition unter dem Einfluss des Fluidstroms bei vier verschiedenen Oberflächenbehandlungen verglichen werden. Sie berichteten, dass Bakterien in der Lage waren, sich auf allen getesteten Oberflächen anzuheften und zu vermehren. Die Geschwindigkeit der Biofilmentwicklung und die chemischen Zusammensetzungen des Biofilms unterscheiden sich allerdings [109].

Eine hohe Cytochrom *c*-Dichte wird häufig in elektroaktiven Bakterien gefunden, da die Cytochrome hier eine wichtige Rolle in der Erzeugung von Strom oder für Elektronentransferprozesse spielen. Daher ist Resonanz-RM ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung von Biofilmen solcher Mikroorganismen. Viridis *et al.* führten eine Studie über elektrochemisch aktive Biofilme durch. Sie betrachteten die Biofilmentwicklung während verschiedener Wachstumsstadien und nutzten den Resonanz-Raman-Effekt von Cytochrom *c*, um eine nicht invasive Untersuchung der räumlichen Redoxsysteme und der Elektrochemie des Biofilms zu ermöglichen. Sie beobachteten, dass das Resonanz-Raman-Spektrum von Cytochrom *c* vom Redoxzustand des Häm-Proteins abhängt. Dies deutete darauf hin, dass Cytochrom *c* als Stoffwechselindikator für das Redox-Verhalten innerhalb des elektroaktiven Aggregate verwendet werden kann [110]. Eine weitere Studie über die Redoxzustände von Typ-*c*-Cytochromen in elektroaktiven Biofilmen berichtete, dass Cytochrome im Biofilm vor allem im reduzierten Zustand vorlagen [111]. Lebedev *et al.* konnten einen Cytochrom-Redoxgradienten innerhalb der *Geobacter sulfurreducens*-Biofilme beobachten. Dies ließ vermuten, dass die Mehrheit der Typ-*c*-Cytochrome im Biofilm zu negative Oxidationspotentiale haben, um direkt im Elektronentransport zwischen den Zellen und der Anodenoberfläche beteiligt zu sein [112].

Resonanz-RM ist somit eine sehr leistungsfähige Methode, um mikrobielle Proben innerhalb kürzester Zeit zu analysieren. Allerdings kann sie nur für Mikroorganismen, die Chromophore besitzen, angewendet werden, was jedoch ihre Anwendbarkeit einschränkt. Darüber hinaus können die Chromophore durch Photobleichung inaktiviert werden. Auch kann die vorhandene Autofluoreszenz störend auftreten. Dies erschwert

die Analyse zusätzlich. Wenn die Anwendung von Resonanz-RM für eine spezifische Probe deshalb nicht möglich ist, kann die oberflächenverstärkte Raman-Streuung eine geeignete Methode darstellen, um die Intensität der Raman-Streuung zu erhöhen und die Analysezeit zu verkürzen.

2.4 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

2.4.1 Physikalischer Hintergrund

Große Nachteile bei der Anwendung der Raman-Spektroskopie sind die geringe Intensität der Raman-Streuung und die Fluoreszenzüberlagerung mit ihrem etwa um 14 Größenordnungen höheren Streuquerschnitt der Moleküle [6]. Insbesondere biologische Proben zeigen häufig eine ausgeprägte Fluoreszenz sowie eine schwache Intensität der Raman-Banden. Dies führt zu einer schlechten Nachweisstärke bei der Analyse mit normaler Raman-Spektroskopie [113]. Auch weisen klassische Raman-Spektren von Mikroorganismen oft nur wenige Banden auf, was relativ lange Aufnahmezeiten erforderlich macht und somit eine Charakterisierung erschwert. Beispielsweise zeigt Phenylalanin bei 1003 cm^{-1} eine scharfe Bande. Ungesättigte Fettsäuren sind bei 1130 cm^{-1} , Nukleinsäuren (Cytosin, Uracil) bei 780 cm^{-1} , Tyrosin bei 640 cm^{-1} und Amid I-Bande von Proteinen bei 1660 cm^{-1} auffindbar [91,114]. Deswegen war die Entdeckung eines Verstärkungseffekts, hervorgerufen von rauen Silberelektroden bei der Messung von Pyridin, im Jahre 1974 von besonderer Bedeutung [115]. In den Jahren danach konnte nachgewiesen werden, dass es sich tatsächlich um eine echte Verstärkung handelte und nicht nur um eine größere Anzahl an streuenden Molekülen [116,117]. Grundsätzlich wird die Verstärkung durch eine hohe räumliche Nähe zu bestimmten nanostrukturierten Metalloberflächen (Ag und Au) verursacht [117]. Typische Metallsubstrat-Analyt-Kombinationen, wie beispielsweise metallische Oberflächen, Nanopartikel-Arrays oder Metallnanopartikel sind als Übersicht in Abbildung 7 zu finden.

Analyt in direkter Nähe zu einem nanostrukturiertem Metallsubstrat

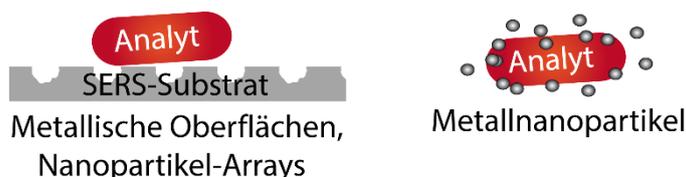


Abbildung 7 Der SERS-Effekt tritt nur in direkter Nähe zu nanostrukturierten Metallsubstraten wie z. B. metallischen Oberflächen, Nanopartikel-Arrays oder Metallnanopartikeln auf.

Diese Verstärkung wurde später in eine elektromagnetische Verstärkung (verursacht durch die Anregung von Oberflächenplasmonen) und eine chemische Verstärkung

(verursacht durch einen Ladungstransfer zwischen Metall und Analyt) unterteilt. Raman wie auch SERS basieren auf der Änderung der Polarisierbarkeit α des Moleküls und der Interaktion des elektromagnetischen Felds mit dem Molekül. SERS wird durch eine Verstärkung dieser beiden Faktoren hervorgerufen. Mit Hilfe der SERS können Verstärkungsfaktoren von $10^3 - 10^6$ gegenüber den Intensitäten bei einer normalen Raman-Analyse erreicht werden. Verstärkungen von bis zu 10^{11} konnten ebenfalls beobachtet werden [5]. Solch eine hohe Verstärkung wird allerdings typischerweise an sogenannten *hot spots* erreicht, bei der der Analyt direkt an einer Stelle mit hoher Feldverstärkung positioniert wird [4,118,119]. Diese Verstärkung erlaubt die Detektion von einzelnen Molekülen, nicht nur für Farbstoffe, bei denen Verstärkungsfaktoren von 10^7-10^8 ausreichen würden, sondern auch für Moleküle mit einem normalen Raman-Streuquerschnitt [120]. Allerdings können solche hohen Verstärkungen grundsätzlich nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit erwartet werden, da schlicht die physikalischen Orte der Verstärkung sehr limitiert sind. Infolgedessen sind solche *hot spots* kaum reproduzierbar [121] und somit analytisch nur schwer verwendbar. Der Streuquerschnitt von SERS kann dabei bis zu 10^{-16} cm^2 pro Molekül erreichen, im Gegensatz zu einem Streuquerschnitt von 10^{-29} cm^2 pro Molekül bei normalem Raman [6,43,51]. Abbildung 8 zeigt schematisch die Unterschiede der Streuung bei Raman und SERS.

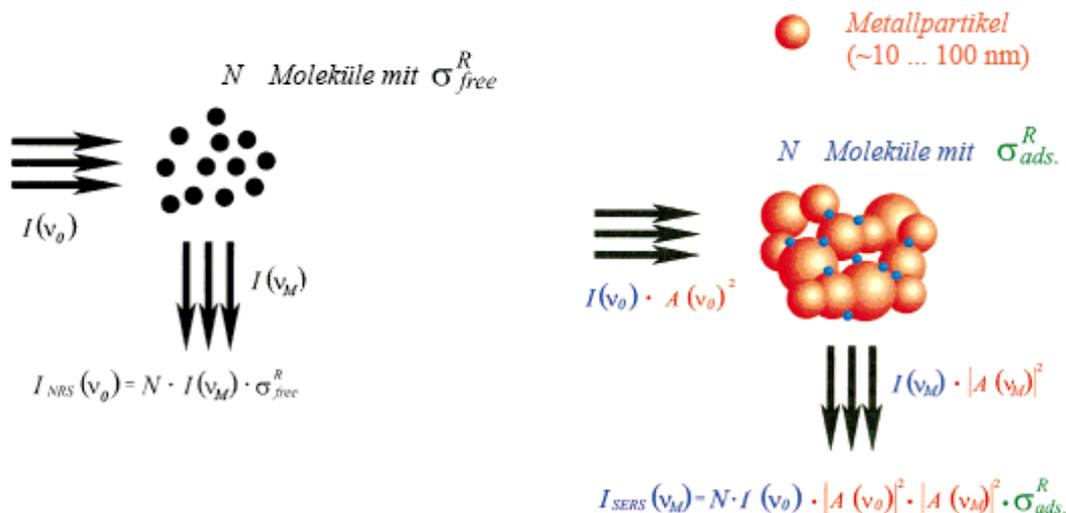


Abbildung 8 Vergleich zwischen „normaler“ (links) und oberflächenverstärkter (rechts) Raman-Streuung (nach [51]).

Die folgenden zwei Gleichungen beschreiben die Abhängigkeiten der Verstärkung durch SERS: [51,122]

$$\sigma_{eff}^{SERS} = \sigma_{ads}^R A(v_0)^2 A(v_M)^2 \quad \text{Gleichung (7)}$$

$$I^{SERS}(v_0) \sim N \cdot I_0 \cdot |A(v_0)|^2 \cdot |A(v_M)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad \text{Gleichung (8)}$$

A Feldverstärkungen für Laser- $A(v_0)$ und Stokesfrequenz $A(v_M)$

I^{SERS}	Intensität des SERS-Signals
N	Anzahl der streuenden Moleküle
σ	SERS-Streuquerschnitt
ν_0	Frequenz des eingestrahlten Lichts
ν_M	Frequenz der Schwingung
I_0	Intensität des eingestrahlten Lichts

Elektromagnetische Verstärkung: Die elektromagnetische Verstärkung der gestreuten Photonen basiert auf dem Oberflächenplasmonenresonanzeffekt, welcher auftritt, wenn Licht auf eine nanostrukturierte Metalloberfläche trifft. Dadurch können starke optische Felder erzeugt werden, wenn die Frequenz des anregenden Lichts mit der Frequenz der Oberflächenplasmonen der Metalloberfläche übereinstimmt. Oberflächenplasmonen sind quantisierte elektromagnetische Oberflächenwellen von Elektronen im Leitungsband der durch Licht angeregten Metalloberfläche [123,124]. Die elektromagnetische Verstärkung tritt dann auf, wenn die Abmessungen der Metallstruktur kleiner sind als die anregende Wellenlänge des Lichts [119]. Dieser Effekt liefert mit Verstärkungsfaktoren von 10^4 und mehr den größten Beitrag bei SERS [125]. Abbildung 9 zeigt die modellierte elektromagnetische Feldverstärkung zwischen zwei Silberpartikeln. Die folgende Gleichung veranschaulicht mathematisch die Feldverstärkung eines perfekt sphärischen Metallpartikels: [6,122]

$$A(\nu) = \frac{E_M(\nu)}{E_0(\nu)} \sim \left(\frac{r}{r+d} \right)^3 \cdot \frac{\varepsilon(\nu) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu) + 2\varepsilon_0} \quad \text{Gleichung (9)}$$

A	Feldverstärkung
E_M	Auf den Analyten wirkenden elektrisches Feld
E_0	Elektrisches Feld der Anregungsquelle
r	Radius des Metallpartikels
d	Abstand zwischen Metall und Analyt
ε_0	Dielektrische Konstante der Umgebung
$\varepsilon(\nu)$	Dielektrische Konstante des Metallpartikels

Angenommen wird hierbei, dass der sphärische Metallpartikel im Vergleich zu der Wellenlänge des anregenden Lichts sehr klein ist. Grundsätzlich hängt die Feldverstärkung von der Oberfläche, der Größe und der dielektrischen Konstante des verwendeten Metalls ab. Analog zur Verstärkung des Feldes wird ebenso die Raman-Streuung, respektive die Stokes- und Anti-Stokes-Streuung, verstärkt, wenn sich diese in Resonanz zu den Oberflächenplasmonen befinden. Der elektromagnetische Verstärkungsfaktor für die Stärke des Stokes-Signals $G_{em}(\nu_S)$ wird folgendermaßen ausgedrückt: [6]

$$G_{em}(\nu) = |A(\nu_0)|^2 |A(\nu_S)|^2 \sim \left| \frac{\varepsilon(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\nu_S) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_S) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left(\frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad \text{Gleichung (10)}$$

Es zeigt sich, dass die Verstärkung mit der vierten Potenz des lokalen Feldes des Metallpartikels skaliert und besonders hoch ist, wenn die Anregung und die Streuung in Resonanz mit den Oberflächenplasmonen sind. Die elektromagnetische Verstärkung benötigt nicht zwingend direkten Kontakt zwischen Metall und Analyt, nimmt allerdings mit der zwölften Potenz des Abstandes ab [6,122,124].

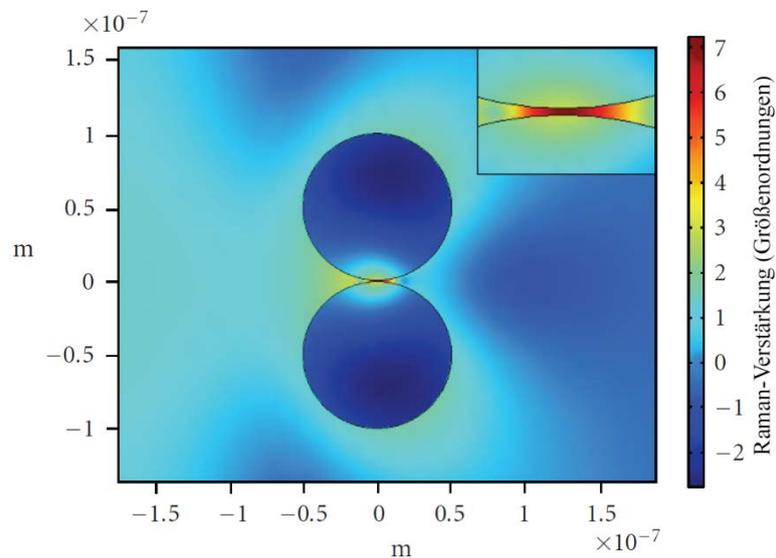


Abbildung 9 Ein Modell der elektromagnetischen Verstärkung zweier Silbermetallpartikel mit einem Radius von 50 nm und einem Abstand von 1 nm bei einer Laserwellenlänge von 514 nm; vergrößert dargestellt ist der Bereich zwischen den beiden Nanopartikeln; die rote Farbe steht hierbei für einen Bereich mit einer hohen Verstärkung (aus [126]).

Chemische Verstärkung: Bei der Bildung einer chemischen Bindung zwischen Analyt und Metall tritt ein Ladungstransfer (*charge transfer*), auch chemische Verstärkung genannt, auf. Es kann ungefähr eine Verstärkung um den Faktor 10^2 beobachtet werden [127]. Die Elektronen des Metalls bewegen sich frei im Leitungsband und überlappen dabei das HOMO des gebundenen Analyten. Ein Transfer von Elektronen ist möglich, wenn sich das Fermi-Niveau des Metalls und das HOMO/LUMO des Analyten nur geringfügig unterscheiden. Dadurch wird die Polarisierbarkeit des Analyten erhöht [128]. Da jedoch die Struktur des Analyten und somit dessen Adsorptionsgeometrie durch diese Art der Verstärkung direkt beeinflusst wird, ändern sich auch Intensitätsverhältnisse von Banden im Vergleich zum normalen Raman-Spektrum [40]. Die Verstärkung ist üblicherweise abhängig vom Analyten und betrifft nur die direkt an der Metalloberfläche chemisorbierten Moleküle [51]. Abbildung 10 verdeutlicht die grundsätzlichen Unterschiede zwischen chemischer und elektromagnetischer Verstärkung bezogen auf die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Analyt.

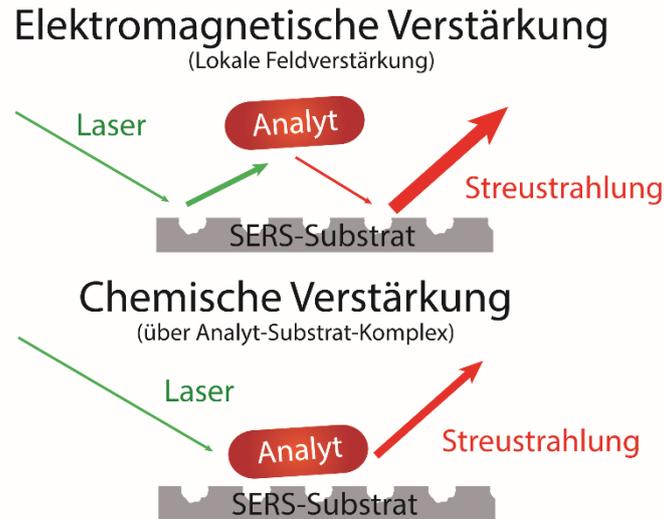


Abbildung 10 Veranschaulichung der Unterschiede zwischen chemischer und elektromagnetischer Verstärkung bezogen auf die Wechselwirkung zwischen Substrat und Analyt (nach [129]).

SERS bei Mikroorganismen und Biomolekülen: In Abbildung 11 wird das Konzept der SERS-Verstärkung an einem mit Metallnanopartikeln bedeckten Bakterium gezeigt. Die Metallpartikel sind teilweise an der Zellwand des Bakteriums chemisorbiert. Dies erlaubt einen Ladungstransfer zwischen Metall und Analyt. Die Verstärkung tritt in der direkten räumlichen Nähe von nanostrukturierten Metalloberflächen auf. Mit dieser Technik können eine Vielzahl an Molekülen analysiert werden. Von Vorteil ist hierbei, dass die Analyse von Biomolekülen in einer wässrigen Phase ohne weiteres möglich ist, da Wasser selbst nur ein sehr schwaches Raman-Signal aufweist. Außerdem ist es durch die Verstärkung möglich, kürzere Belichtungszeiten und geringere Laserleistungen zu verwenden. Als Nachteile müssen allerdings die oft schlechte Reproduzierbarkeit und die zur Analytkonzentration nicht mehr strikt proportionale Signalintensität genannt werden. Die Intensität ist nämlich nun zusätzlich auch abhängig von der Größe der SERS-Nanopartikel und der Entfernung zum Analyten [6,118,120]. Es ist wichtig zu beachten, dass der Abstand d zwischen dem Analyten und den SERS-aktiven Oberfläche von äußerster Bedeutung ist, da die SERS-Intensität I dramatisch mit zunehmender Entfernung ($I \sim d^{-12}$) abnimmt. Daher kann die elektromagnetische Verstärkung bei Abständen größer als 10 nm nicht mehr beobachtet werden. Die chemische Verstärkung erfordert sogar einen direkten Kontakt zwischen der SERS-Oberfläche und Analyt.

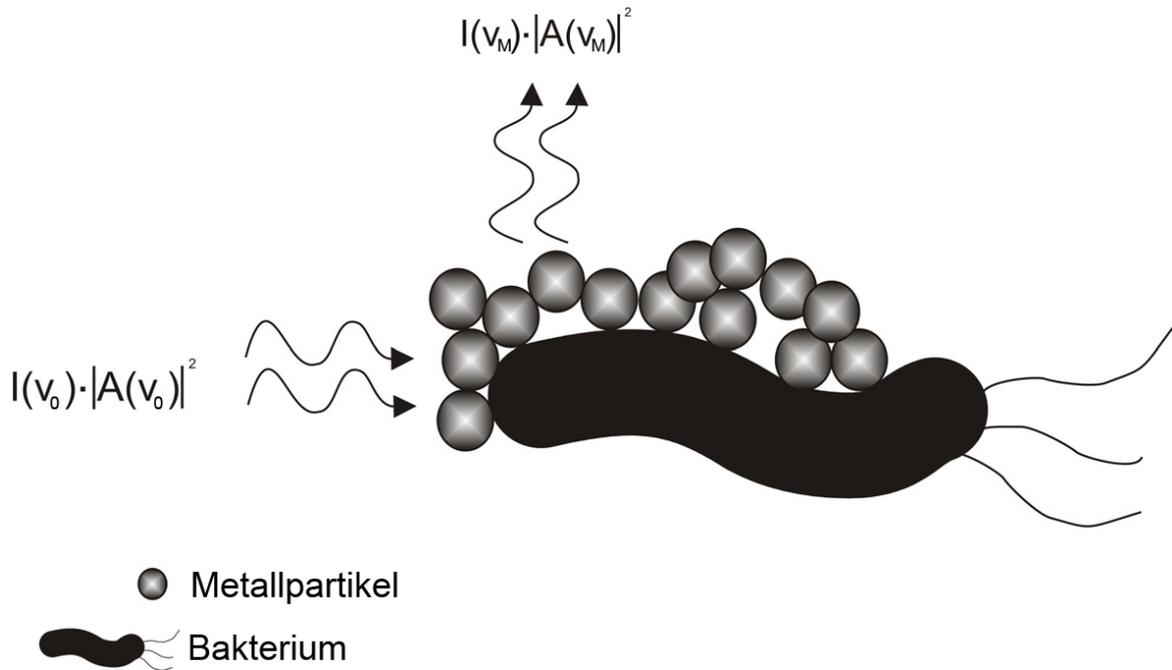


Abbildung 11 Schema der SERS-Verstärkung an einem mit Metallnanopartikeln bedeckten Bakterium (nach [122]).

Zu beachten ist hierbei, dass SERS-Spektren von Mikroorganismen durch Veränderung der Polarisierbarkeit und der Molekülsymmetrien nur zu einem gewissen Grad direkt mit normalen Raman-Spektren vergleichbar sind [122,130,131]. Bei SERS werden nämlich nicht alle Zellkomponenten im gleichen Maße verstärkt [132]. Direkt auffällig ist die üblicherweise relativ schwache oder sogar vollständig fehlende Phenylalanin-Bande im Gegensatz zu normalen Raman-Spektren [9,133-135]. Abseits von einer allgemeinen Schwierigkeit in der Interpretation von SERS-Spektren ist bei der Aufnahme dieser zu beachten, dass Laserlicht besonders in Kombination mit Metallkolloiden Zellen zerstören und graphitisieren kann. Hierbei entstehen die typischen D- und G-Banden von Ruß, welche mit ihrem hohen Raman-Streuquerschnitt das gesamte Spektrum des Mikroorganismus rasch überlagern. Um dieses Problem zu umgehen, kann eine geringere Laserleistung genutzt werden oder der Laser auf der Probe leicht defokussiert werden [113]. Weiterhin ist es wichtig, dass getrocknete Proben von Mikroorganismen nicht zwangsläufig homogen sind. Auch das Messen unterschiedlicher Zellen bringt automatisch leicht unterschiedliche Spektren hervor, da sich nicht alle Bakterien im gleichen metabolischen Zustand befinden und sich daher in ihrer Zellzusammensetzung durchaus unterscheiden können [136].

2.4.2 SERS-Substrate

Zur Erzeugung der SERS-Verstärkung werden eine Vielzahl an unterschiedlichen Metallstrukturen (Ag und Au) benutzt. Diese werden in verschiedenen Formen, z. B. als Metallplatten, Kolloide, Stäbe oder als Beschichtung verwendet. Nach Zugabe des Metalls zum Analyten und anschließender Anregung mit einem Laser tritt eine Feldverstärkung ein. Hierbei ist zu beachten, dass das SERS-Medium die Molekülstruktur stören kann und somit eine Veränderung im Fingerabdruckbereich möglich ist.

Als klassische SERS-Substrate werden heutzutage üblicherweise Ag- oder Au-Substrate verwendet, da deren Oberflächenplasmonenresonanz mit der Anregungsfrequenz des eingestrahnten Lichts aus dem sichtbaren oder nahinfraroten Bereich sehr gut übereinstimmt. Aufgrund der unterschiedlichen optischen Eigenschaften sind unterschiedliche Anregungswellenlängen optimal für diverse Metallnanopartikel oder Metallnanostrukturen. Beispielsweise sind Goldplasmonenresonanzen um etwa 100 nm im Vergleich zu Silberplasmonenschwingungen rotverschoben und zeigen daher im roten und Nahinfrarot-Wellenlängenbereich ($\lambda > 600$ nm) eine stärkere Anregung [137]. Silber zeigt jedoch intensivere Plasmoneneffekte und seine SERS-Verstärkung übertrifft deswegen die von Gold. Daher erlauben Silber-Nanopartikel eine hochempfindliche Analyse und werden häufiger als Gold eingesetzt. Andererseits kann Gold in Anwendungen verwendet werden, bei denen eine höhere (chemische) Stabilität und eine bessere Biokompatibilität wichtiger sind als die maximal zu erreichende Verstärkung [120,138]. Diese Metalle können in einer Vielzahl von Formen verwendet werden, um die jeweils gewünschte Verstärkung zu erhalten [122,130,131]. Für die Untersuchung von biologischen Proben und insbesondere Bakterienzellen eignen sich vor allem kolloidale Lösungen solcher Metallpartikel. Um den bestmöglichen Verstärkungseffekt zu erhalten, liegt die optimale Größe solcher metallischer Nanopartikel zwischen 20 nm und 100 nm [50,51]. Neben der Größe sind auch die Form und die Dielektrizitätskonstante des Metalls von Bedeutung. Form und Größe können durch den Herstellungsprozess beeinflusst werden. Entscheidend hierbei ist die Reaktionstemperatur, das Reaktionsvolumen, das benutzte Reduktionsmittel und die erreichte Konzentration der Metallpartikel [139,140]. Als Reduktionsmittel werden unter anderem Hydroxylaminhydrochlorid [140,141], Natriumcitrat [140], Natriumborhydrid [140], Polysaccharide [142] und Aldehyde [142] verwendet. Besonders stark aktive SERS-Substrate können durch eine Agglomeration des Kolloids erzeugt werden. Hierbei wird z. B. NaCl zur kolloidalen Lösung zugegeben. Die Koagulation selbst ist dabei abhängig von der Konzentration des Salzes und wird Chlorid-Effekt genannt [143]. Von immenser Bedeutung, welche gleichzeitig auch die schwierigste Herausforderung bei SERS ist, ist die reproduzierbare Herstellung des SERS-Mediums, da nur so stabile Bandenpositionen und Bandenintensitäten erreicht werden können. Erst diese stabilen und reproduzierbaren Banden ermöglichen wiederum eine korrekte Unterscheidung verschiedener Bakterien. Häufig sind tatsächlich nur gemittelte SERS-Spektren repräsentativ für eine mikrobielle Probe. Diese Mittelung ermöglicht dann den Vergleich zwischen verschiedenen Proben. In einer Studie von Kahraman *et al.* wurde gezeigt, dass die Versuchsbe-

dingungen für SERS von Bakterienproben sorgfältig kontrolliert werden müssen, um reproduzierbare Spektren erhalten zu können [144]. Für Zellsuspensionen oder getrocknete Zellen kann eine geeignete Reproduzierbarkeit mit niedriger Vergrößerung, sowie der Defokussierung oder der Verteilung des Laserstrahls auf einen größeren Bereich mittels spezieller Techniken erreicht werden [135]. Dadurch können viele Zellen auf einmal analysiert werden und Durchschnittspektren generiert werden. Wenn aber einzelne Zellen das Ziel der Analyse sind, liegt die Herausforderung darin reproduzierbar synthetisierte und stabile SERS-Substrate zu verwenden. Dies erlaubt es, reproduzierbar Spektren der Zellen mit einer guten Verstärkung zu erzeugen. In Abbildung 12 werden beispielhaft drei Techniken dargestellt, die eine geeignete Reproduzierbarkeit erreichen können: (i) die Mittelung der SERS-Signale von vielen Zellen der Probe, während eine geringe Vergrößerung verwendet wird [135], (ii) Spektren von einzelnen Zellen bei denen die SERS Kolloide auf den Zellen konzentriert werden [144], oder (iii) eine *in situ*-Herstellung der SERS-Kolloide auf den Zellen [145], während eine hohe Vergrößerung verwendet wird.

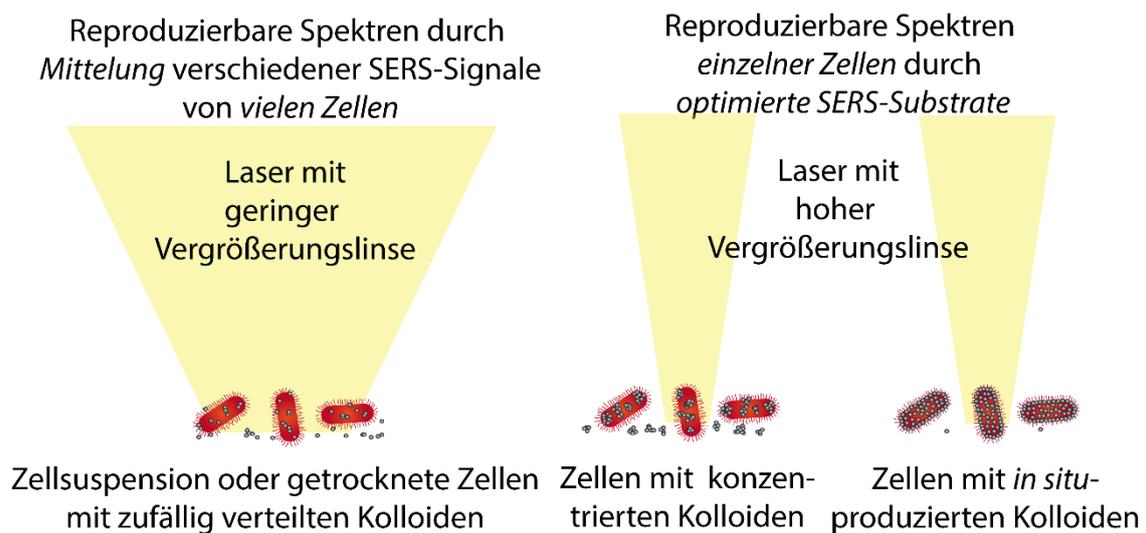


Abbildung 12 Drei verschiedene Techniken um die Reproduzierbarkeit einer Bakterienprobe zu gewährleisten: Zellsuspension mit zufällig verteilten Kolloiden bei niedriger Vergrößerung (links), konzentrierte Kolloide (mittig) und *in situ*-produzierte Kolloide (rechts) bei hoher Vergrößerung.

Für eine hochempfindliche, selektive und reproduzierbare SERS-Analyse von Mikroorganismen konnten bereits Herstellungsmethoden mit einem Substratschichtungsverfahren (*layer-by-layer*) [146], mit konvektiven Montageverfahren [147], mit *in situ*-Synthesen von Nanopartikeln direkt auf die Zellwand [113,132] und mit Antikörpern funktionalisierte Kern-Schale-SERS Tags [148] erfolgreich verwendet werden. Dieser Arbeit vorrausgehend konnte Knauer *et al.* in einem Vergleich von unterschiedlichen Herstellungsmethoden von Silberkolloiden zeigen, dass für die Analyse von Mikroorganismen Kolloide, welche nach der modifizierten Methode von Leopold & Lendl (Hydroxylaminhydrochlorid als Reduktionsmittel bei Raumtemperatur) hergestellt wur-

den, am geeignetsten waren [140,149]. Auch konnte durch Zhou *et al.* darauf aufbauend eine *in situ*-Synthese erfolgreich entwickelt und etabliert werden [145]. Ausgehend von diesen beiden Studien wurden in dieser Arbeit die beiden eben erwähnten und modifizierte Varianten der Kolloidherstellung verwendet. Detaillierte Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Kolloidsynthesen können im experimentellen Teil in Kapitel 3 gefunden werden.

2.4.3 Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels SERS

Die prinzipielle Machbarkeit der Untersuchung von Mikroorganismen mittels SERS wurde zuerst von Picorel *et al.* im Jahre 1988 gezeigt. Sie analysierten die Zellmembran von phototrophen Bakterien, welche auf einer Silberelektrode adsorbiert wurden [150]. Die erste Studie, die SERS ganzer Bakterienzellen zeigt, wurde durch Efrima und Bronk 10 Jahre später veröffentlicht [151]. Von diesem Zeitpunkt an wurden verschiedenste SERS-Substrate und Medien getestet und für die mikrobiologische Forschung verifiziert.

Da die klassische RM ein etabliertes und leistungsfähiges Werkzeug für die Identifizierung, Klassifizierung und Charakterisierung von Bakterien ist, wurde in den letzten Jahrzehnten SERS auch zunehmend als Methode für die Analyse von mikrobiellen Strukturen und Bakterien untersucht. Pearman *et al.* wählten spezielle *quorum sensing* (QS)-Moleküle von Bakterien aus, um die Leistungsfähigkeit von SERS zu analysieren. Sie nutzen dabei Silberkolloide und eine Anregungswellenlänge von 514,5 nm, um diese wichtigen biologischen Moleküle *in situ* zu identifizieren, zu charakterisieren und zu quantifizieren. Sie verwendeten *N*-Acyl-Homoserin-Lactone als Referenzverbindungen und zeigten, dass diese Verbindungen in für Biofilme relevante Konzentrationen von bis zu 10^{-6} M detektiert werden können [152]. Die ersten Messungen von QS-Substanzen direkt in Biofilmen wurden kürzlich von Bodelon *et al.* durchgeführt. Durch die Verwendung von oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS) mit nanostrukturierten Goldsubstraten war es möglich, *in situ* QS in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen zu detektieren. Die Arbeit konzentrierte sich auf Pyocyanin, ein interzelluläres Signalmolekül im QS-Netzwerk von *P. aeruginosa*. Es wurde mit mesostrukturierten Goldsubstraten (Au@TiO₂) und mikrostrukturierten superkristallinen Goldplattformen (Au@SiO₂) demonstriert, dass *P. aeruginosa* nicht nur QS in dicht bevölkerten Biofilmen, sondern auch in frühen Stadien der Biofilmentwicklung nutzt. Eine Pyocyan-Detektion von bis zu 10^{-14} M war möglich [153].

Im Gegensatz dazu stammen SERS-Spektren von ganzen Bakterien in der Regel nur von der Bakterienoberfläche, möglicherweise auch mit Beiträgen von abgelösten biochemischen Strukturen oder Metaboliten des Bakteriums [134]. Es wurde gezeigt, dass die SERS-Verstärkung in Spektren auch besonders empfindlich auf eine bestimmte in der Zellwand enthaltene Komponente sein kann. Beispielsweise wurden Resonanz-SERS-Signale von Flavinadenindinukleotid (FAD) bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm gemessen [132]. Unter bestimmten Bedingungen können Metallkolloide nicht

nur auf, sondern auch innerhalb der Bakterien synthetisiert werden [151]. In einer Studie von Jarvis *et al.* konnten beispielsweise Goldkolloide durch eine enzymatische Reduktion von Goldsalzen im Inneren der Bakterien hergestellt werden [154].

Die erste Studie, die eine Charakterisierung, Identifizierung und Unterscheidung von Bakterien unter Verwendung von Silbernanopartikeln und multivariater statistischer Methode zeigen konnte, wurde von Jarvis und Goodacre im Jahr 2004 veröffentlicht. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 785 nm genutzt. Als SERS-Medium wurden Silberkolloide, welche durch Reduktion von Silbernitrat mit Trinatriumcitrat hergestellt wurden, verwendet. Durch die Verwendung von Clusteranalysen in Kombination mit gemittelten Spektren war eine Unterscheidung zwischen Mikroorganismen bis auf Stammebene möglich [155]. Der Vergleich verschiedener SERS-Studien von Bakterien ist jedoch schwierig. Da die Schwingungssignaturen stark abhängig von der Morphologie, der Art des verwendeten Substrats und der Anregungswellenlänge sind. Somit können sich spezifische spektrale Information von Studie zu Studie stark unterscheiden [133].

Kürzlich veröffentlichten Premasiri *et al.* eine Studie, in denen sie die biochemischen Ursprünge der oberflächenverstärkten Raman-Spektren von Bakterien untersuchten. Sie verwendeten einen 785-nm-Laser und ein mit aggregierten Au-Nanopartikeln bedecktes SiO₂-SERS-Substrat. Sie konzentrierten sich auf eine dominierende molekulare Spezies der Purine in den SERS-Spektren von Bakterien. Durch spezifische Unterschiede in den Stoffwechselwegen der Bakterien konnten die beobachteten SERS-Spektren auf die Reaktionen des aktiven Purin-Stoffwechselwegs und die daraus resultierenden Abbauprodukte bezogen werden. Dies festigte die Hypothese nach der die SERS-Spektren von Bakterienzellen durch reproduzierbare SERS-Banden der freien Purin-Nukleinbasen Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und Guanin, sowie Harnsäure und AMP dominiert werden [156].

Die größte Herausforderung der SERS-Analyse für Bakterien ist es jedoch nach wie vor Standardbedingungen zu definieren (insbesondere für SERS-Substrate) [8]. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche SERS-Analyse sind eine reproduzierbare, einfache und kosteneffiziente Herstellung, chemische Stabilität von SERS-Substraten oder Medien, hohe Verstärkungsfaktoren, reproduzierbare spektrale Eigenschaften und die mikrobiologische Verträglichkeit. Darüber hinaus müssen die Herstellung von mikrobiellen Proben mit SERS-Substraten und die Messbedingungen optimiert werden, um eine zuverlässige SERS-Analyse zu erreichen. Ferner kann es in Zukunft notwendig sein eine Datenbank aufzubauen, in der die SERS-Messungen von Mikroorganismen unter verschiedenen Bedingungen gesammelt werden. Nur so wird es möglich sein, zwischen verschiedenen Mikroorganismen korrekt zu unterscheiden [61,113].

Bald darauf wurden nicht nur mikrobielle Strukturen oder Bakterien, sondern auch ganze Biofilme in SERS-Studien analysiert. Die ersten Untersuchungen zu diesem Thema wurden von Ivleva *et al.* durchgeführt [157]. In dieser Studie wurde eine komplexe Multispezies-Biofilm-Matrix *in situ* analysiert. Kolloidale Silbernanoteilchen, hergestellt durch Reduktion von Silbernitrat mit Hydroxylaminhydrochlorid, wurden als SERS-Medium verwendet. Da eine gute Reproduzierbarkeit und eine Verstärkung von

bis zu zwei Größenordnungen erreicht werden konnte, war es möglich verschiedene Komponenten der Biofilm-Matrix zu charakterisieren. Folgestudien [7,158] berichteten über die Anwendung von bildgebender SERS für die mikrobielle Biofilmanalyse. Besonders die Detektion verschiedenster Bestandteile und deren räumlichen Verteilung in der Anfangsphase des Biofilmwachstums, als auch in der ausgereiften Matrix standen hier im Fokus. Vor allem bei niedrigen Biomassekonzentrationen kann SERS, im Gegensatz zur klassischen RM helfen, detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung der Biofilmmatrix zu gewinnen. Unabhängig davon können mit dieser bildgebenden SERS auch biofilmähnliche Systeme analysiert werden. In einer Studie von Szeghalmi *et al.* wurden beispielsweise Hyphenpilze auf goldbeschichteten nanostrukturierten Substraten mit hoher Nachweisstärke untersucht. Zur Messung wurde eine Laserwellenlänge von 633 nm verwendet. Sie beobachteten erhebliche zeitabhängige Schwankungen in den SERS-Spektren. Einige Banden waren nur für ein paar Sekunden sichtbar, während die meisten Banden konstant blieben. Dieser Effekt wurde der kurzzeitigen thermischen Diffusion von Pilzbestandteilen in den *hot spot* in Kombination mit hoher SERS-Verstärkung zugeschrieben [159].

Ramya *et al.* führten RM-Experimente an Algen und *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen, welche auf Titanoberflächen gewachsen sind, durch, um Informationen über die chemische Zusammensetzung der komplexen EPS im Biofilm zu gewinnen. Zusätzliche SERS-Experimente bei einer Laseranregungswellenlänge von 633 nm wurden, unter Verwendung von metallischen und bimetallischen Kolloiden (Ag und Cu), durchgeführt. Sie stellten fest, dass RM in Kombination mit SERS eine wirksame Methode zur Identifizierung, Differenzierung und Quantifizierung von Algen und Bakterien auf Titanoberflächen ist [160].

Chao und Zhang studierten die chemischen Veränderungen in der Matrix von Biofilmen während unterschiedlicher Wachstumsphasen von gramnegativen und grampositiven Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* und *Bacillus subtilis*). Sie verwendeten eine Laseranregungswellenlänge von 633 nm und Silberkolloide, welche durch Reduktion von Silbernitrat mit Hydroxylaminhydrochlorid hergestellt wurden. Es konnten signifikante chemische Unterschiede in der Zusammensetzung der Makromoleküle in den verschiedenen Phasen des Biofilmwachstums gefunden werden. Der Lipidgehalt, Nukleinsäuregehalt und Proteingehalt des entwickelten Biofilms erhöhte sich während der Kultivierung deutlich. Sie sortierten die Banden der SERS-Spektren in verschiedene charakteristische molekulare Klassen und berechneten Auftrittswahrscheinlichkeiten für die verschiedenen Phasen. Dieser Ansatz scheint robuster zu sein als Studien in denen nur bestimmte Banden betrachtet wurden. Dies gilt insbesondere für die SERS-Analyse, da die Aufnahme von reproduzierbaren Spektren nach wie vor eine große Herausforderung darstellt. Zusätzlich zeigten AFM-Aufnahmen eine gleichmäßige Adhäsion der Zellen auf dem Substrat am Anfang, die Bildung von größeren Kolonien nach 8 Stunden, und eine Schicht aus reifem Biofilm mit einer großen Menge von EPS nach 72 Stunden Wachstum [161]. Eine weitere Methode zur Analyse der molekularen Veränderungen während der Biofilmbildung wurde von Efeoglu und Culha

durchgeführt. Sie verwendeten mit Polyglucosamin beschichtete Silbernanopartikel. Die Silbersubstrate wurden direkt auf den Biofilm während der Bildung aufgetragen und ermöglichten eine *in situ*-Charakterisierung und Unterscheidung von *Escherichia coli* und *Staphylococcus cohnii* [162,163].

In der Wasserindustrie werden zur Verbesserung der Wasserqualität oft Membranen verwendet. Da die Biofilmanlagerung auf Membranen und damit einhergehendes Biofouling ein großes Problem für den Betrieb solcher Membransysteme darstellen, müssen die Biofilmentwicklung und auch Membranreinigungsprozesse untersucht und kontrolliert werden. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Chen *et al.* wurde SERS verwendet, um die Entwicklung eines Biofilms, bestehend aus *Brevundimonas diminuta* und *Staphylococcus aureus*, zu analysieren. Es wurden Goldnanopartikel durch Reduktion von Chlorogoldsäure mit Trinatriumcitrat hergestellt und eine Laserwellenlänge von 633 nm verwendet. Vor allem die Fähigkeit von SERS die dynamische Entwicklung der dominanten Arten in Biofilmen und die Veränderungen in der Biomasse zu überwachen wurde demonstriert. Auch das unterschiedliche Verhalten der Bakterien in Biofilmen, bestehend aus nur einer oder zwei verschiedenen Arten, wurde untersucht und verglichen [164]. Eine weitere Studie der gleichen Gruppe konzentrierte sich auf die chemischen Veränderungen während des Biofoulings und anschließender Reinigungsverfahren unter Verwendung von *layer-by-layer*-SERS. Diese Technik macht es möglich Informationen über die Oberflächenzusammensetzung des Biofilmbewuchses, welcher direkt Reinigungsreagenzien ausgesetzt wurde, zu gewinnen. Detaillierte biochemische Informationen über die Zusammensetzung des Biofilms, insbesondere die Zunahme oder Abnahme bestimmter Raman-Banden (z. B. Proteine, Phenylalanin und Polysacchariden) konnten während der Biofilmbildung und der Reinigungsprozesse gezeigt werden [165]. In einer Studie von Kögler *et al.* wird ein neuartiges Konzept für den Nachweis von Biofouling in der Trinkwasser-Membranfiltration mit einem kompakten Echtzeit-SERS-online-Sensoransatz vorgestellt. Sie entwickelten einen Gold-Nanopartikel-SERS-Sensorbereich auf Filtermembranen, um bereits niedrige Konzentrationen des Biofoulings auf Oberflächen in Echtzeit nachzuweisen. Sie bildeten Querstrom-Membranfiltrationsbedingungen unmittelbar nach der Inokulation nach. Deren Ergebnisse zeigten, dass sich der entwickelte SERS-Sensorbereich in einem Online-Prozess mit hohem Wasserfluss und Druck sehr gut eignet, obwohl der Fluoreszenz-Hintergrund und der Einfluss des SERS-Messbereichs auf die Filtrationseffizienz der Membranen noch weiter untersucht werden müssen [166].

Durch die Kombination von SERS und Resonanzeffekten kann die Intensität von Analyten, z. B. Cytochromen erheblich verbessert werden. Durch Ausnutzung des Resonanzeffektes der äußeren Membran-Cytochrome führten Millo *et al.* eine oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS)-Studie in einem katalytisch aktiven *Geobacter sulfurreducens*-Biofilm durch. Dieser Biofilm wurde auf Silberelektroden kultiviert und mit einer Laserwellenlänge von 413 nm gemessen. Die Autoren konnten zeigen, dass Häm-Cytochrom-Komplexverbindungen beim direkten Elektronentransfer zwischen den Bakterien und der Elektrode beteiligt sind [167].

Somit ist SERS eine leistungsfähige und bewährte Methode, um die Einschränkungen der klassischen Raman-Analyse, besonders bezüglich der Nachweisstärke, zu umgehen. Sie ermöglicht es ebenfalls neue und detailliertere Informationen über die chemische Zusammensetzung von Biofilmen zu erhalten. Nur die recht komplexen Messbedingungen, die komplizierte Optimierung der Messparameter und die Auswahl der passenden SERS-Substrate erschweren eine reproduzierbare Datengewinnung. Bis zum heutigen Tag ist SERS deswegen in der Routineanalyse noch nicht vollständig angekommen.

2.5 Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS)

Die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (*tip-enhanced Raman spectroscopy*, TERS) bringt als spezielle SERS-basierte Technik besondere und einzigartige Vorteile mit sich und sei deswegen hier kurz erwähnt.

Insbesondere, wenn für die Raman-Analyse eine örtliche Auflösung von bis zu 20 nm gewünscht oder erforderlich ist, kann spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie benutzt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass es mit TERS möglich ist Einblicke in die Oberflächenstrukturen und die Dynamik der Polysaccharid- und Peptidkomponenten auf Bakterienzellen zu gewinnen [105,168,169]. TERS leitet sich von der SERS-Technik ab, benutzt aber scharfe Metallspitzen oder metallüberzogene Spitzen, welche im optischen Nahfeld der Probe positioniert werden. Abbildung 13 veranschaulicht das Prinzip der TERS-Verstärkung. Diese Technik ist nicht invasiv, benötigt keine Markierung der Probe und bietet detaillierte chemische Informationen unterhalb des Abbe-Limits. Mit TERS ist es möglich die chemische Zusammensetzung und Eigenschaften von spezifischen biologischen Bindungsstellen zu charakterisieren [168]. Schmid *et al.* führten eine Studie durch, um die Durchführbarkeit von TERS für komplexe biologische Matrices bei einer Laserwellenlänge von 532 nm zu bewerten. Alginate wurden hier als Probe gewählt, da diese biologischen Makromoleküle ein gutes Modell für die Architektur einer EPS-Matrix im Nanometerbereich darstellen. Obwohl die Interpretation der Spektren durch Verunreinigungen auf der Spitze und durch zahlreiche komplexe Wechselwirkungen zwischen Analyt und Spitze kompliziert sein kann, sollte es in Zukunft möglich sein die Verteilung von verschiedenen Biopolymeren in einer Biofilmmatrix zu analysieren [170]. Bisher wurden alle Biofilm-bezogenen TERS-Studien ausschließlich in einer Luftumgebung und somit nicht *in situ* durchgeführt. In Zukunft ist die Verwendung einer wasserhaltigen Matrix bei der Analyse von Biofilmen angestrebt, kann sich aber aufgrund der potentiellen Verunreinigungen der Spitze während der Messungen als äußerst problematisch herausstellen [169]. Die weitverbreitete Anwendung von TERS ist zusätzlich dahingehend limitiert, dass die Produktion von qualitativ hochwertigen und reproduzierbaren Spitzen sich als sehr schwierig darstellt.

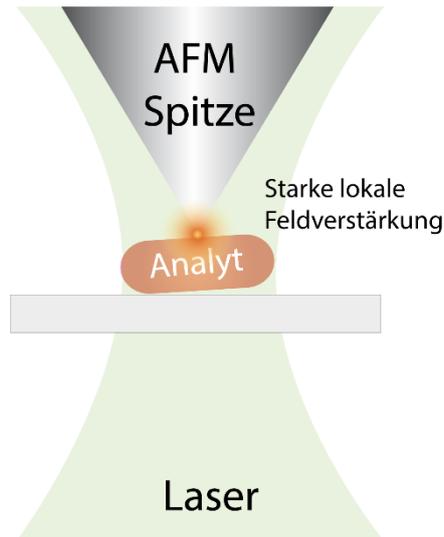


Abbildung 13 Veranschaulichung der TERS-Technik und der starken lokalen Feldverstärkung am Analyten.

2.6 Nichtlineare Raman-Mikrospektroskopie

Der Vollständigkeit halber werden im Folgenden auch nichtlineare Raman-Techniken beschrieben, die bisher für die Analyse von Biofilmen nicht verwendet wurden, aber ein großes Potenzial besitzen.

Zum größten Teil bleibt die stetig wachsende Zahl der nichtlinearen Raman-Techniken den Fachgebieten der physikalischen Chemie oder chemischen Physik vorbehalten [3]. Allerdings machen einige Methoden, beispielsweise kohärente nichtlineare Raman-Spektroskopie (*coherent anti-Stokes Raman spectroscopy*, CARS) und stimulierte Raman-Streuung (*stimulated Raman scattering*, SRS), Fortschritte als analytische Werkzeuge für biologische Proben wie Zellen und lebende Organismen [171]. In der CARS-Mikroskopie werden zwei anregende Laser (Pump- und Stokes-Laser) mit unterschiedlicher Frequenz verwendet. In einem Drei-Photonen-Prozess werden die Moleküle mit dem Pumplaser in einen virtuellen Zustand angehoben, mit dem Stokes-Laser in einen angeregten Schwingungszustand versetzt und nochmals mit dem Pumplaser in einen virtuellen Zustand angehoben. Das Anti-Stokes-Signal kann durch Zurückfallen der Moleküle in den Schwingungsgrundzustand beobachtet werden. Diese grundsätzlichen Prozesse der CARS-Technik sind in Abbildung 14 veranschaulicht. In der SRS-Mikrospektroskopie werden ebenfalls zwei anregende Laser eingesetzt. Wenn die Differenzfrequenz mit einer Molekularschwingung übereinstimmt, tritt der stimulierte Anregungsprozess auf. Dies führt zu messbaren Intensitätsänderungen bei den anregenden Wellenlängen [172]. Typischerweise werden diese beiden Techniken für eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen, wie beispielsweise dem chemischen Bioimaging [173,174], dem Imaging von Nukleinsäuren [175] und dem Imaging von neu synthetisierten Proteinen [176] verwendet. In CARS begrenzt allerdings der nichtresonante Hin-

tergrund die Nachweisstärke und erschwert die Bildinterpretation. Darüber hinaus macht die nichtlineare Skalierung der Signalintensität eine robuste quantitative Interpretation schwierig. Die Spezifität in SRS wird dadurch begrenzt, dass diese Technik meist nur für einen schmalen Spektralbereich nutzbar ist. Dies macht die Unterscheidung von biochemischen Spezies mit ähnlichen Raman-Spektren oft schwierig. Tatsächlich existieren bereits einige Methoden diese Probleme zu verringern, allerdings benötigen diese häufig teure und komplexe Versuchsaufbauten und erschweren die Datenanalyse. Diese beiden Techniken besitzen somit ein großes Potenzial, aber ihre Anwendbarkeit ist vor allem durch die praktische Umsetzung noch stark begrenzt [172].

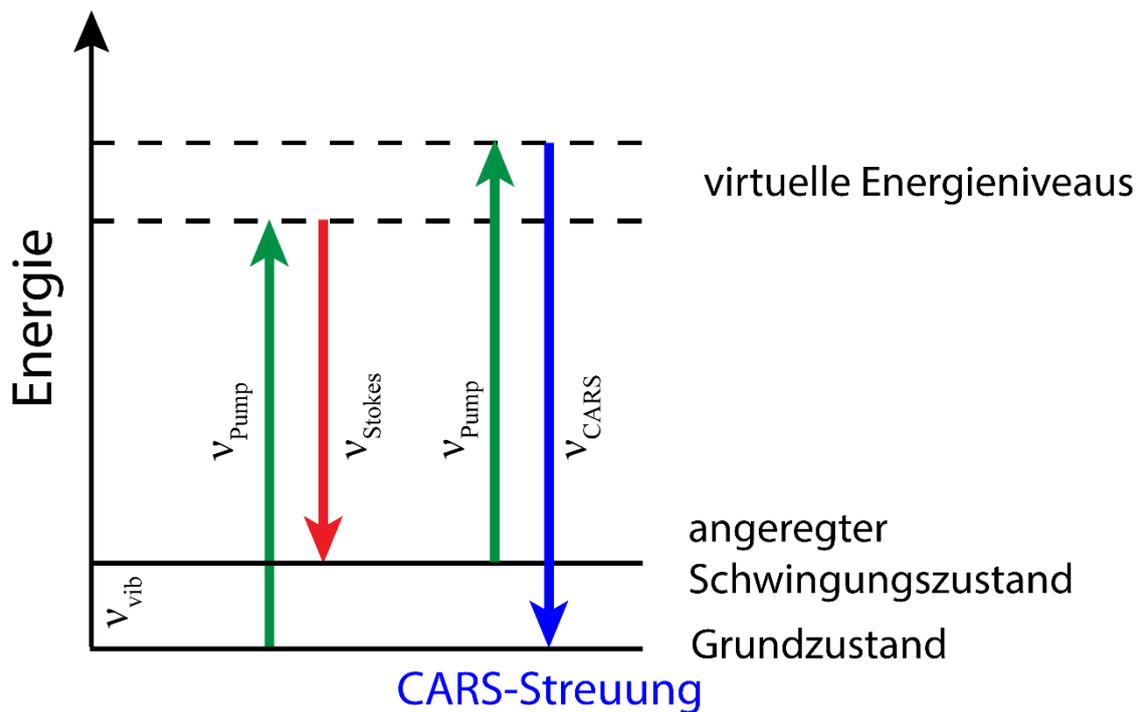


Abbildung 14 Prozesse der CARS-Technik mit zwei Lasern, dem Stokes- und dem Pump-Laser.

2.7 Raman-Mikrospektroskopie mit Stabilisotopen (SIRM)

2.7.1 Physikalischer Hintergrund

Wenn ein Atom eines Moleküls durch ein Isotop desselben Elementes ersetzt wird, kann angenommen werden, dass sich die Struktur des Moleküls nur vernachlässigbar ändert. Die Schwingungsfrequenz jedoch wird durch die veränderte Masse signifikant beeinflusst. Da die Raman-Verschiebung indirekt proportional zur Wurzel der reduzierten Atommasse ist, findet eine Verschiebung der zugehörigen Bande im Raman-Spektrum statt [11,52]. Bei schwereren Isotopen wird die entsprechende Raman-Bande im Spektrum rotverschoben. Der exakte Wert der Rotverschiebung ist abhängig von der genauen Masseänderung. Bei beispielhafter Betrachtung einer Schwingung eines zweiatomigen Moleküls wird die reduzierte Masse μ aus den zwei Atommassen (m_1 und m_2), die durch eine Feder (chemische Bindung) zusammengehalten werden, nach der Formel $\mu = (m_1 m_2)/(m_1 + m_2)$ berechnet. Die Schwingungsfrequenz eines Moleküls wiederum wird dabei klassischerweise durch folgende Gleichung beschrieben: [52,177]

$$\Delta\nu = \left(\frac{1}{2}\pi c\right) \left(\frac{k_q}{\mu}\right)^{0,5} \quad \text{Gleichung (11)}$$

$\Delta\nu$	Raman-Verschiebung (cm^{-1})
k_q	Kraft-Konstante der Bande (N m^{-1})
μ	reduzierte Masse
c	Lichtgeschwindigkeit (m s^{-1})

Verwendet wurden Stabilisotopen beispielsweise bereits als Mittel zu Struktur- aufklärung von Pyridin-Metall-Komplexen [178], zur Aufklärung von optischen Eigenschaften von Diamant [179] sowie von neutralem oder dotiertem Graphen [180]. Insbesondere bei schwingungsspektroskopischen Studien von Proteinen werden deuterierte Moleküle verwendet [181]. Im Bereich der Biowissenschaften wird die Stabilisotopen-Raman-Spektroskopie hauptsächlich bei der Erforschung von Mikroorganismen verwendet. Dabei fokussieren sich heutzutage die meisten Studien auf die Stabilisotopen ^{13}C , ^{15}N und ^2H , um die ursprünglichen Isotope ^{12}C , ^{14}N und ^1H zu ersetzen. Ein Überblick über die wichtigsten Raman-Banden, die bei der Nutzung dieser drei Stabilisotopen erwartet werden können, ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2 Einige ausgewählte und wichtige Raman-Banden und deren Verschiebung in isotopensubstituierten Mikroorganismen; es muss hierbei angemerkt werden, dass nicht jede Verschiebung immer beobachtet werden kann; dies hängt allein davon ab, ob das Isotop in das jeweilige Molekül auch eingebaut wurde (modifiziert nach [182])

Raman-Banden unmarkierter Zel- len (cm^{-1})	Isotop	Raman- Verschiebung (cm^{-1})	Zuordnung
729-733	^{13}C	-13	Ringatmung von Adenin
787	^{13}C	-17	O-P-O-Atmung, Cytosin, Uracil
1001-1003	^{13}C	-37	Symmetrische Ringatmung von Phenylalanin
1247	^{13}C	-14	Amid III
1342	^{13}C	-15	C-H-Streckschwingung von Adenin
1578	^{13}C	-47	Ringtreckschwingung von Guanin und Adenin
1663	^{13}C	-35	C=C ungesättigter Lipide, Amid I
729-733	^{15}N	-14	Ringatmung von Adenin
787	^{15}N	-3	O-P-O-Atmung, Cytosin, Uracil
1174	^{15}N	-10	C-H-Beugeschwingung von Tyrosin oder Phenylalanin
1247	^{15}N	-14	Amid III
1342	^{15}N	-19	C-H-Streckschwingung von Adenin
1480	^{15}N	-10	Purin-Grundschiwingung von Guanin und Adenin
1578	^{15}N	-7	Ringtreckschwingung von Guanin und Adenin
1001-1003	^2H	-42	Symmetrische Ringatmung von Phenylalanin
≈ 2850	^2H	-745	C-H-Streckschwingung von Lipiden
2800-3100	^2H	-800	C-H-Streckschwingung von Lipiden und Proteinen

Isotopen des Sauerstoffs und des Schwefels können prinzipiell auch genutzt werden, allerdings existieren dazu noch keinerlei Studien. Drei wichtige Limitierungen sind bei der Nutzung von Stabilisotopen zur Analyse des Bakterienmetabolismus zu beachten. Viele isotopenmarkierte Substrate sind kommerziell nicht erhältlich oder sehr teuer. Weiterhin kann der Zusatz von solchen markierten Substraten die natürliche Substratzusammensetzung verändern und somit die metabolische Aktivität der Zellen beeinflussen. Allen Stabilisotopen-Raman-Experimenten ist gemein, dass unmarkierte Kontrollgruppen der Bakterien unbedingt notwendig sind, da sich die Identifizierung der verschobenen Banden sonst nicht zweifelsfrei beweisen lässt [182].

Ein Austausch des Kohlenstoffs durch sein ^{13}C -Isotop in Zellkulturen ermöglicht die Identifikation und Charakterisierung von einzelnen ^{13}C -markierten Zellen. Viele Biomoleküle enthalten einen hohen Prozentsatz an Kohlenstoff, so dass dies ein optimaler Kandidat für eine Isotopenmarkierung darstellt [183]. Diese Methode wurde in verschiedenen Bereichen der mikrobiologischen Forschung angewandt und half beispielsweise dabei die extrazelluläre Aktivität von *Chlamydiae* [184], die Kohlenstoffdioxidfixierung durch einzelne Zellen [12], den Kohlenstofffluss in einer mikrobiellen Nahrungskette [185] und aktive Stoffwechselwege in Hefe [186] detailliert zu erforschen und aufzuklären. In den Abbildungen 15, 16 und 17a wird die Rotverschiebung bestimmter Banden bei den Mikroorganismen *Pseudomonas fluorescens* und *E. coli* ge-

zeigt. Hervorzuheben ist hier die Rotverschiebung der Phenylalaninbande von 1003 cm^{-1} im ^{12}C -Zellen-Spektrum auf 967 cm^{-1} im ^{13}C -Zellen-Spektrum und die Verschiebung der Protein-Bande von 1660 cm^{-1} auf 1623 cm^{-1} . Besonders erwähnenswert ist hierbei die lineare Korrelation zwischen dem Verhältnis der ^{12}C - und ^{13}C -Phenylalaninbande sowie dem ^{13}C -Glucosegehalt (siehe Abbildung 16). Weiterhin zeigen auch photosynthetische Mikroorganismen nach der Fixierung von $^{13}\text{CO}_2$ eine Rotverschiebung der Resonanz-Raman-Banden des Carotinoids in im Vergleich mit Raman-Spektren von Zellen nach der Fixierung mit $^{12}\text{CO}_2$ [101,187].

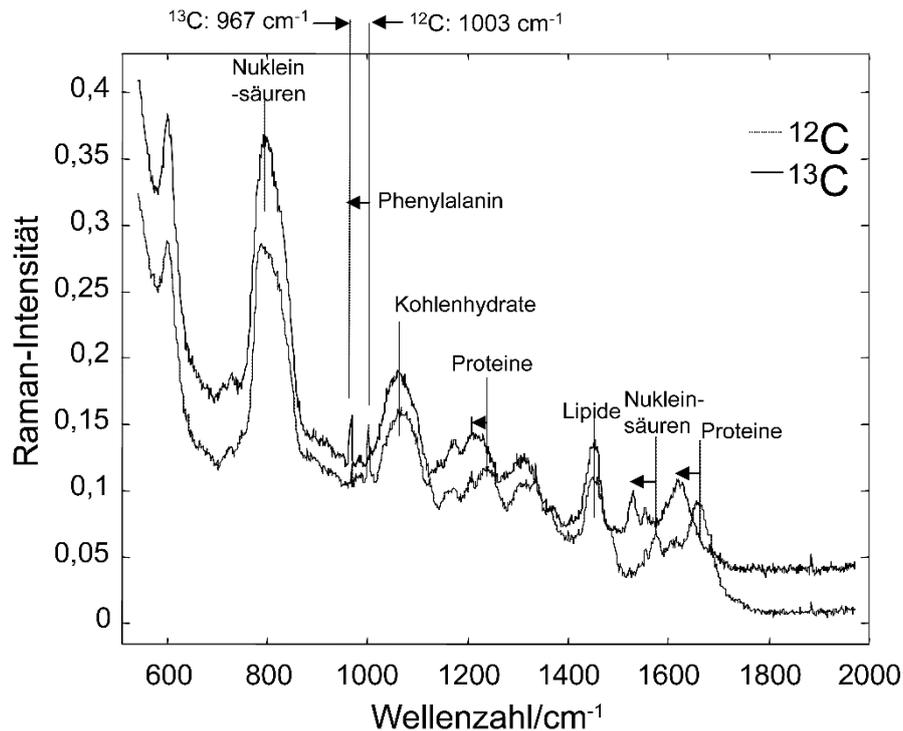


Abbildung 15 Das Raman-Spektrum von *Pseudomonas fluorescens*-Zellen welche mit ^{13}C -Glucose kultiviert wurden zeigen eine deutliche Rotverschiebung in allen Bereichen des Spektrums (aus [29]).

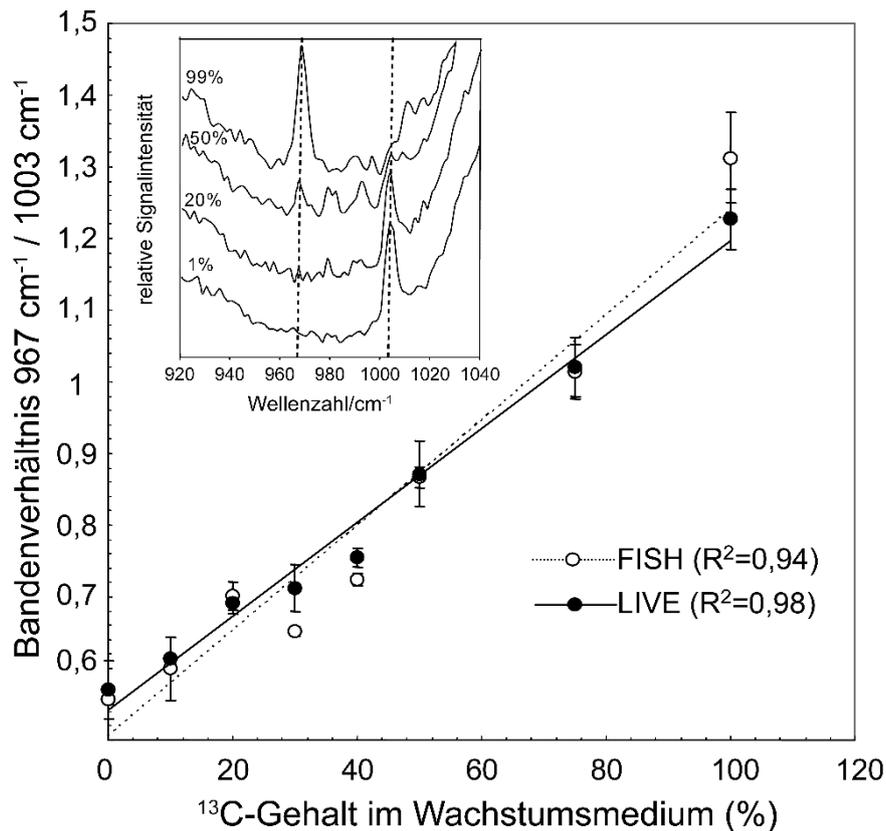


Abbildung 16 Lineare Korrelation zwischen dem Verhältnis der ^{12}C - und ^{13}C -Phenylalaninbande sowie dem ^{13}C -Glucosegehalt in *Pseudomonas fluorescens*-Zellen (aus [29]).

Im Gegensatz zur Markierung mit ^{13}C ist die Charakterisierung von ^{15}N -markierten Zellen deutlich schwieriger, da die Verschiebung der Raman-Banden bei der Nutzung von ^{15}N -Substraten üblicherweise deutlich geringer ist als bei ^{13}C -Substraten. Dies erklärt sich durch die relativ gesehen geringere Erhöhung der Masse beim Austausch des Isotops durch das jeweils schwerere. Auch stammen die meisten ^{15}N -Raman-Banden von Nukleinsäuren ab, die häufig bereits in normalen Raman-Experimenten in den Spektren schwer zu identifizieren sind. Diese Problematik ist auch in Abbildung 17b sehr gut ersichtlich, in der vollständig ^{15}N markierte *E. coli*-Zellen verwendet wurden.

Die Markierung mit ^2H ermöglicht es metabolisch aktive Zellen zu identifizieren und den Metabolismus, insbesondere der Lipide von eukaryotischen Zellen, zu charakterisieren. Diese Art der Markierung erlaubt eine unkomplizierte und schnelle Analyse, da die $\text{C}-^2\text{H}$ Schwingung in einem spektralen Bereich auftritt ($2000 - 2300 \text{ cm}^{-1}$) in dem sonst keine weiteren Signale zu erwarten sind. Auch ist die Verschiebung im Spektrum sehr groß, da beim Austausch mit Deuterium die Masse beinahe verdoppelt wird [182]. Eine kostengünstige Alternative zum Einsatz isotopenmarkierte Substrate stellt hierbei schweres Wasser ($^2\text{H}_2\text{O}$) dar. Dieses kann während der Kultivierung schlicht als Medium eingesetzt werden und ermöglicht eine unkomplizierte Markierung der Biomasse [188]. Ein Beispiel dieser Verschiebung für teilweise markierte *E. coli*-Zellen ist in Abbildung 17c gezeigt.

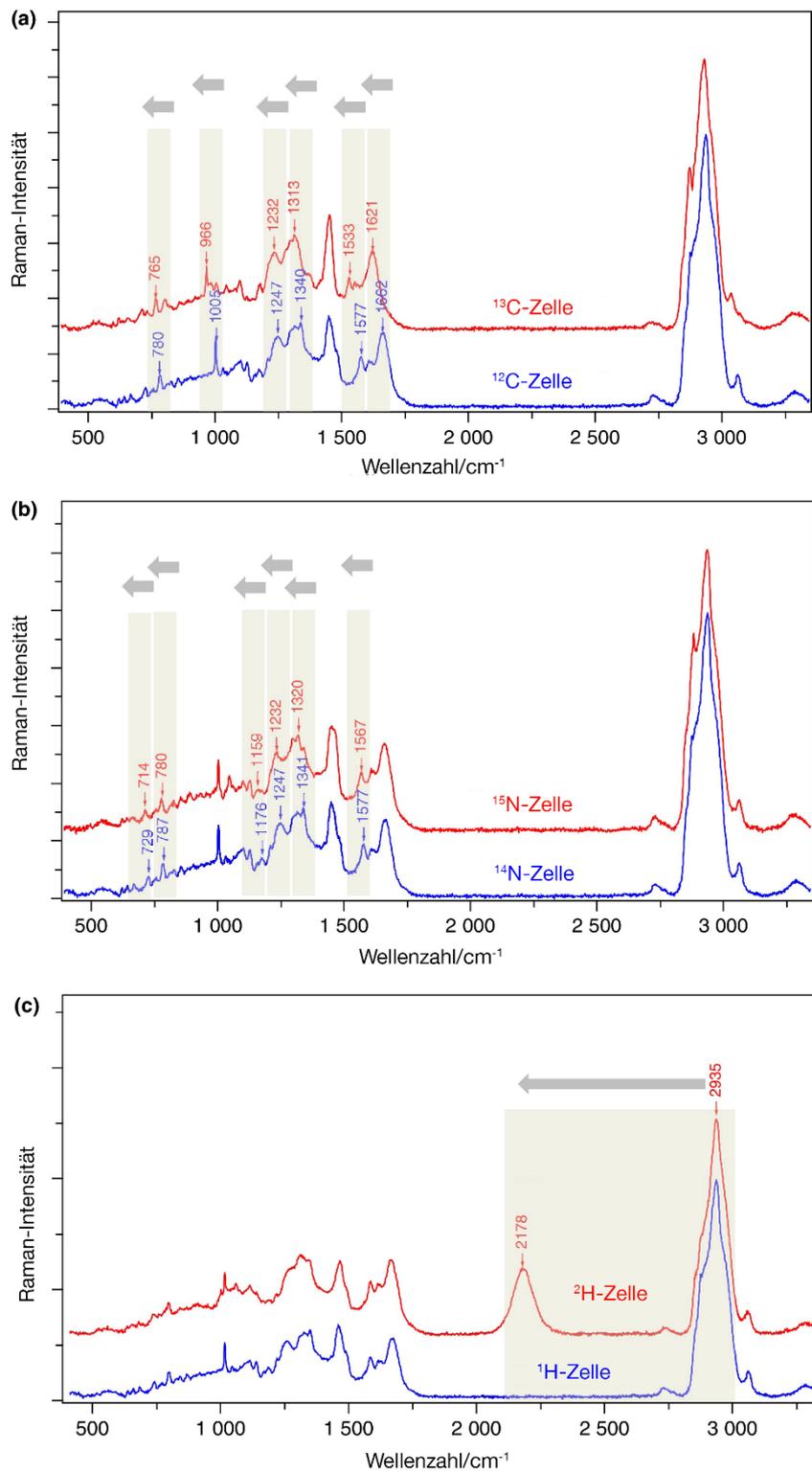


Abbildung 17 Typische Banden in den Raman-Spektren und deren Verschiebung bei der Stabilisotopen-Raman-Spektroskopie; (a) ¹²C- und vollständig markierte ¹³C-Zellen (b) ¹⁴N- und vollständig markierte ¹⁵N-Zellen, (c) ¹H- und teilweise markierte ²H-Zellen (nach [182]).

2.7.2 Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen mittels SIRM

Die meisten molekularen mikrobiologischen Methoden, die der *stable isotope probing* (SIP) Familie angehören, basieren auf der Analyse von isotopenmarkierten Nucleinsäuren, Phospholipiden oder Proteinen. Während diese Ansätze einen umfassenden Einblick in die Funktion und Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft liefern können, führt die Art der Probenahme zu einer Mittelung der tatsächlichen Informationen. Eine große Anzahl von Schlüsselmerkmalen über Mikroorganismen werden hierbei somit nicht aufgezeichnet [183]. Auch ist es in der Umweltmikrobiologie und medizinischen Mikrobiologie oft nicht ausreichend Mikroorganismen nur zu identifizieren oder zu charakterisieren. Es ist dagegen notwendig ihre Ökophysiologie und metabolischen Funktionen *in situ* auf Einzelzellebene zu untersuchen [189]. Obwohl Methoden mit einer sehr nachweisstarken Analyse von Proben wie Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) oder Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS) und Techniken mit einer räumlichen Auflösung von bis zu 50 nm (NanoSIMS) zur Verfügung stehen [190], erfordern diese Verfahren häufig eine komplizierte und zeitaufwendige Probenvorbereitung und sind destruktiv.

Daher wurde in den letzten zehn Jahren RM mit stabilen Isotopen kombiniert, um die Möglichkeiten dieser Technik zu erweitern. Die Pionierstudie, die die Raman-Bandenverschiebungen in isotopenmarkierten Bakterienzellen zeigte, wurde von Huang *et al.* im Jahr 2004 veröffentlicht. Die Autoren verwendeten *Pseudomonas fluorescens*, welche in Medien gezüchtet wurden, denen als einzige Kohlenstoffquelle unterschiedliche Verhältnisse von $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Glucose zur Verfügung standen. Klare Rotverschiebungen vieler verschiedener Banden, die Proteinen, Phenylalanin (Phe) und Nucleinsäuren zugewiesen wurden, konnten in den Spektren der Bakterien gefunden werden. Weiterhin stieg bei zunehmendem Einbau von ^{13}C in die Zellen auch die Intensität der rotverschobenen Banden. Beispielsweise war die Phe-Bande, welche von 1003 cm^{-1} in ^{12}C -Bakterien auf 966 cm^{-1} in ^{13}C -Bakterien verschoben wurde, stärker ausgeprägt [52]. Allerdings verursachen diese Rotverschiebungen Änderungen in den Fingerabdruckspektren der Zellen, was eine Identifizierung der Bakterienzellen *in situ* kompliziert macht, insbesondere in einer Probe mit mehreren Mikroorganismen. Daher war die Kombination von RM mit *in situ*-Identifizierungsverfahren der nächste logische Entwicklungsschritt. Huang *et al.* führten die erste Studie durch, die ein solches System erfolgreich beschrieb. Sie kombinierten RM mit FISH, um Zellen zu identifizieren und gleichzeitig den ^{13}C -Einbau in die Biomasse zu bestimmen. Die Markierungsfarbstoffe für die FISH-Messungen zeigten keine signifikanten Interferenzen mit den Raman-Signalen und es war nur eine kurze Photobleichung erforderlich, um die verbleibenden Farbstoffsignale zu entfernen. Eine fast lineare Korrelation zwischen dem ^{13}C -Gehalt des kultivierten Mikroorganismus und dem Phe-Banden-Verhältnis wurde beschrieben (siehe Abbildung 16). Recht zuverlässig konnte mit Hilfe dieser Korrelation die detektierte Verschiebung des Phe verwendet werden, um den gesamten ^{13}C -Einbau in einer einzigen Zelle zu bestimmen. Nur eine minimale Markierung von 10 % ^{13}C war erforderlich, um zwischen markierten und unmarkierten Zellen zu unterscheiden [29]. An-

stelle einer direkten Identifizierung mit FISH können auch molekulare oder Kulturvie-rungs-basierte Techniken verwendet werden, wenn die Zellen von Interesse vor der Identifizierung isoliert worden sind. Huang *et al.* demonstrierten diesen Ansatz, indem sie *optical trapping* und Stabilisotopen-RM kombinierten. Es wurde eine künstliche Mischung von ^{13}C -markierten und unmarkierten Bakterien hergestellt und die Auftrennung und Isolierung der verschiedenen Zellen untersucht. Während die Zellen durch den Laser festgehalten wurden, wurde ein Raman-Spektrum erzeugt. Ausgewählte Zellen wurden dann zur Trennung in unterschiedliche Kapillarröhrchen verschoben. Diese nun isolierten Zellen wurden durch Inkubation oder Genom-Amplifikation identifiziert. Jedoch konnte nur ein kleiner Teil der sortierten Zellen erfolgreich identifiziert werden, was hauptsächlich auf Zellfehlfunktion, Zelltod oder die physikalische Fehlplatzierung der einzelnen Zellen für den Identifikationsprozess zurückzuführen war [191]. Der Ansatz der Isolierung und Identifizierung wurde durch Wang *et al.* weiter untersucht. Durch laserinduzierten Vorwärtstransfer kombiniert mit RM konnten Auftrennungen unterhalb einer Sekunde erreicht werden. Dieses System ermöglichte die Identifizierung, Unterscheidung, Lokalisierung und Isolierung einzelner ^{13}C - und ^{15}N -markierter Zellen in einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft [192].

In einer Studie von Muhamadali *et al.* wurde eine Kombination von RM und FTIR-Spektroskopie gezeigt, mit der eine quantitative Analyse von *E. coli* mit unterschiedlichen Verhältnissen von sowohl ^{13}C - und ^{15}N auf Gemeinschaftsebene möglich war. Die Datenanalyse wurde mit PCA durchgeführt. Hierbei führten spezifische spektrale Verschiebungen zu einzigartigen Clustering-Mustern, welche abhängig vom Einbau der verschiedenen Isotopen waren. Eine Regression der partiellen kleinsten Quadrate wurde für die quantitative Vorhersage des ^{13}C - und ^{15}N -Anteile in den Zellen verwendet. Darüber hinaus ermöglichte der Einsatz von RM die Analyse von ^{13}C - und ^{15}N -markierten Bakterien auf Einzelzellebene [193].

Des Weiteren wurde RM verwendet, um zu prüfen, ob *Protochlamydia amoebophila* von seinem Amöbenwirt während des intrazellulären Wachstums Phe aufnimmt. Da *P. amoebophila* nicht in der Lage ist, Phe selbst zu synthetisieren, konnte ^{13}C -markiertes Phe direkt als Markierungssubstanz verwendet werden [184]. Eine Studie von Noothalapati und Shigeto demonstrierte die Fähigkeit von Stabilisotopen-RM in Kombination mit einer multivariaten Kurvenauflösung einer Markierungsbande die Biosynthese des Ergosterins in Hefezellen *in vivo* zu untersuchen. Ihr Ansatz offenbarte die wesentlichen Spektren und relativen Häufigkeiten aller möglichen Isotopologen von Ergosterin, deren Kohlenstoffatome in der 5,7-Dien-Einheit des Sterolskeletts entweder teilweise oder vollständig mit ^{13}C substituiert sind [186].

Üblicherweise ist eine reduzierte Analysezeit bei Charakterisierung natürlicher mikrobieller Gemeinschaften sehr sinnvoll und oft sogar notwendig. Deswegen wurde von Li *et al.* Resonanz-RM in Kombination mit Stabilisotopen verwendet, um die Kohlendioxidfixierung einzelner Zellen zu untersuchen. Diese Studie zeigte, dass CO_2 -fixierende Zellen, welche Carotinoide als interne Biomarker besaßen, schnell unterschieden werden konnten. Es war auch möglich die CO_2 -Fixierung der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen auf bis zu 10 % ^{13}C -Gehalt zu quantifizieren [101]. Durch

Verwendung dieser Informationen demonstrierten Li *et al.* in einer weiteren Studie die Zählung von photosynthetisch aktiven Mikroorganismen mit Hilfe der RM. Die Mikroorganismen enthielten Carotinoide und wurden auf einem Mikrofluidikträger analysiert. Eine bekannte Mischung aus ^{12}C - und ^{13}C -kultivierten Mikroorganismen konnte korrekt mit dieser Methode bestimmt werden [12]. Berry *et al.* kultivierten Bakterienzellen mit Anteilen von schwerem Wasser ($^2\text{H}_2\text{O}$), um metabolisch aktive Zellen ohne weitere Probenvorbereitung zu identifizieren und zu sortieren. Hierbei wurden *E. coli*, *B. subtilis* und *B. thuringiensis* untersucht. Zellen, die eine ausgeprägte C- ^2H -Bande zeigten, wurden von den anderen abgetrennt und über Genom-Amplifikation identifiziert. Diese Studie zeigte, dass die Inkubation von Proben mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften mit schwerem Wasser es Mikrobiologen ermöglicht, einzelne metabolisch aktive Bakterien durch Raman-Mikrospektroskopie zu identifizieren [188].

Im Moment existiert nur eine begrenzte Anzahl an Studien, welche hauptsächlich die noch zu erreichenden Möglichkeiten der RM in Kombination mit der Stabilisotopenmarkierung erforschen. In dieser Arbeit werden deswegen das Potential, die Anwendbarkeit und die Grenzen der SIRM zur Charakterisierung einzelner markierter Bakterienzellen untersucht. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Resonanz-SIRM und SIRM in Kombination mit SERS, zu denen nur sehr wenige bzw. keine Arbeiten existierten. Diese zwei Techniken sind besonders für neuartige Ansätze und Anwendungen in Umweltprozessstudien von großer Relevanz. Stabilisotopen-RM kann dementsprechend in Zukunft eine vielversprechende Methode sein, um andere molekularbiologische Techniken zu ergänzen und Abbau- und Anreicherungsprozesse von Substanzen in Mikroorganismen und Biofilmen *in situ* und *in vivo* auf Einzelzellebene zu untersuchen und dazustellen.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Raman-Mikrospektroskopie (RM)

Alle Spektren wurden an einem Raman-Mikroskop LabRAM HR-System (Horiba Scientific, Japan) aufgenommen (Fotografische Aufnahme siehe Abbildung 18; vereinfachter schematischer Aufbau siehe Abbildung 19). Das Raman-Mikroskop besteht aus einem Olympus BXFM-Mikroskop, einem in XY-Richtung motorisiertem Mikroskopiertisch, einem Spektrographen (mit einem 600 Linien/mm und einem 1800 Linien/mm Gitter), einem Kantenfilter und einer Peltier-gekühlten *charged coupled device* (CCD)-Kamera. Es kann aus einer Vielzahl an Objektiven mit verschiedenen Vergrößerungen gewählt werden. In dieser Arbeit wurden nur Objektive mit Vergrößerungen von 4×, 10×, 50×, 100×, sowie ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer Vergrößerung von 100× benutzt. Als Anregungsquellen standen ein frequenzverdoppelter 532-nm-Nd:YAG-Laser (8,4 mW an der Probe), ein 633-nm-He-Ne-Laser (3,7 mW an der Probe) und ein 785-nm-Dioden-Laser (55 mW an der Probe) zur Verfügung. Der einfallende Laserstrahl wird zunächst durch ein Bandpassfilter geleitet, um störende Wellenlängen, kürzer oder länger als die der Anregungswellenlänge, zu entfernen. Danach wird der Laserstrahl durch einen optischen Dichtefilter geführt. Dieser besteht aus einem drehbaren Mechanismus aus mehreren optischen Dichtefiltern mit unterschiedlichen optischen Dichten (0,3; 0,6; 1,0, 2,0, 3,0 und 4,0). Jeder Filter steht hierbei für die Verringerung der initialen Laserleistung auf eine bestimmte Intensität zwischen 100 % und 0,01 %. Über Spiegel wird der Laserstrahl durch das gewählte Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Fokussierung erfolgt dabei durch Bewegung der Probe mittels des motorisierten Mikroskops in Z-Richtung. Die Raman-Streuung passiert das Objektiv in umgekehrter Richtung. Anschließend wird mit Hilfe eines Kantenfilters die Rayleigh-, als auch die Anti-Stokes-Streuung herausgefiltert. Danach wird durch eine verstellbare konfokale Lochblende (100 μm) jene Streuung, welches sich nicht im Brennpunkt befindet, entfernt. Eine kleinere Apertur ermöglicht hierbei das Erfassen einer dünneren Probenschicht auf Kosten der maximalen Intensität. Die einzelnen Wellenlängen werden anschließend durch einen Monochromator (optisches Gitter) isoliert. Durch das optische Gitter wird die spektrale Auflösung des Raman-Spektrums bestimmt. Zur Auswahl stehen optische Gitter mit Strichdichten von 600 und 1800 Linien/mm. Eine höhere Strichdichte erhöht die spektrale Auflösung auf Kosten des analysierbaren spektralen Bereiches. Um trotzdem den gesamten spektralen Bereich zu analysieren, muss im sog. *extended range*-Modus gemessen werden, bei dem das Gitter nach und nach durch den gesamten spektralen Bereich gefahren wird. Dies verlängert allerdings erheblich die Messezeit. Die Detektion erfolgt mittels einer Synapse CCD-Kamera (Horiba Scientific, Japan) mit 1024×256 Pixeln. Durch ein Peltier-Element wird diese auf 201 K gekühlt, um das thermische Hintergrundrauschen zu minimieren.

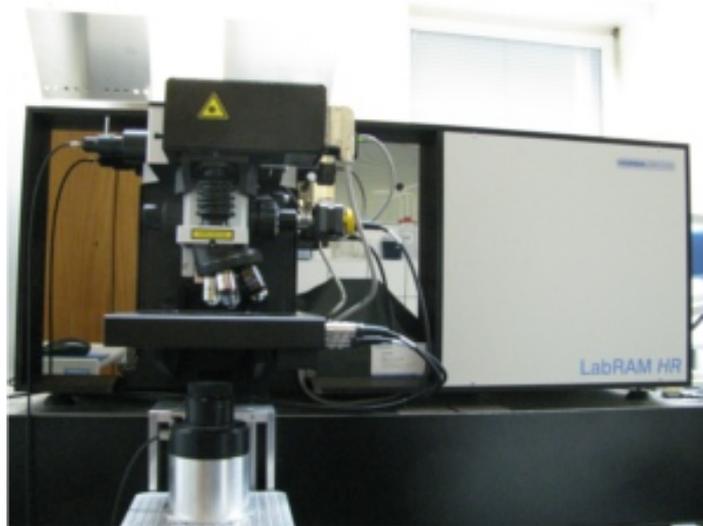


Abbildung 18 Fotografische Aufnahme des verwendeten Raman-Mikroskops (LabRAM HR).

Um zuverlässige und reproduzierbare Spektren zu erhalten, muss das Raman-Mikroskop kalibriert werden. Hierzu wird zuerst die sogenannte *zero order*-Kalibration durchgeführt, indem das Gitter des Spektrographen zur *zero order*-Position (0 nm) gefahren wird. Zusätzlich wird zur Kalibration der Raman-Banden als Referenz die erste Phononenanregungsbande ($520,7 \text{ cm}^{-1}$) von reinem Silizium verwendet. Der Laser wird bei voller Laserleistung und bei Benutzung eines Objektivs mit einer $50\times$ oder $100\times$ Vergrößerung auf einen definierten Silizium-Wafer fokussiert. Als Dauer für die Belichtungszeit zur Aufnahme des Spektrums wird dabei 1 s gewählt. Etwaige auftretende Abweichungen der Phononenbande vom optimalen Wert können mit Hilfe der Software korrigiert werden. Eine klassische lichtmikroskopische Untersuchung ist mit einer eingebauten Videokamera ebenfalls möglich. Zur Beleuchtung wird Weißlicht mittels optischer Faser in das gewählte Objektiv gelenkt.

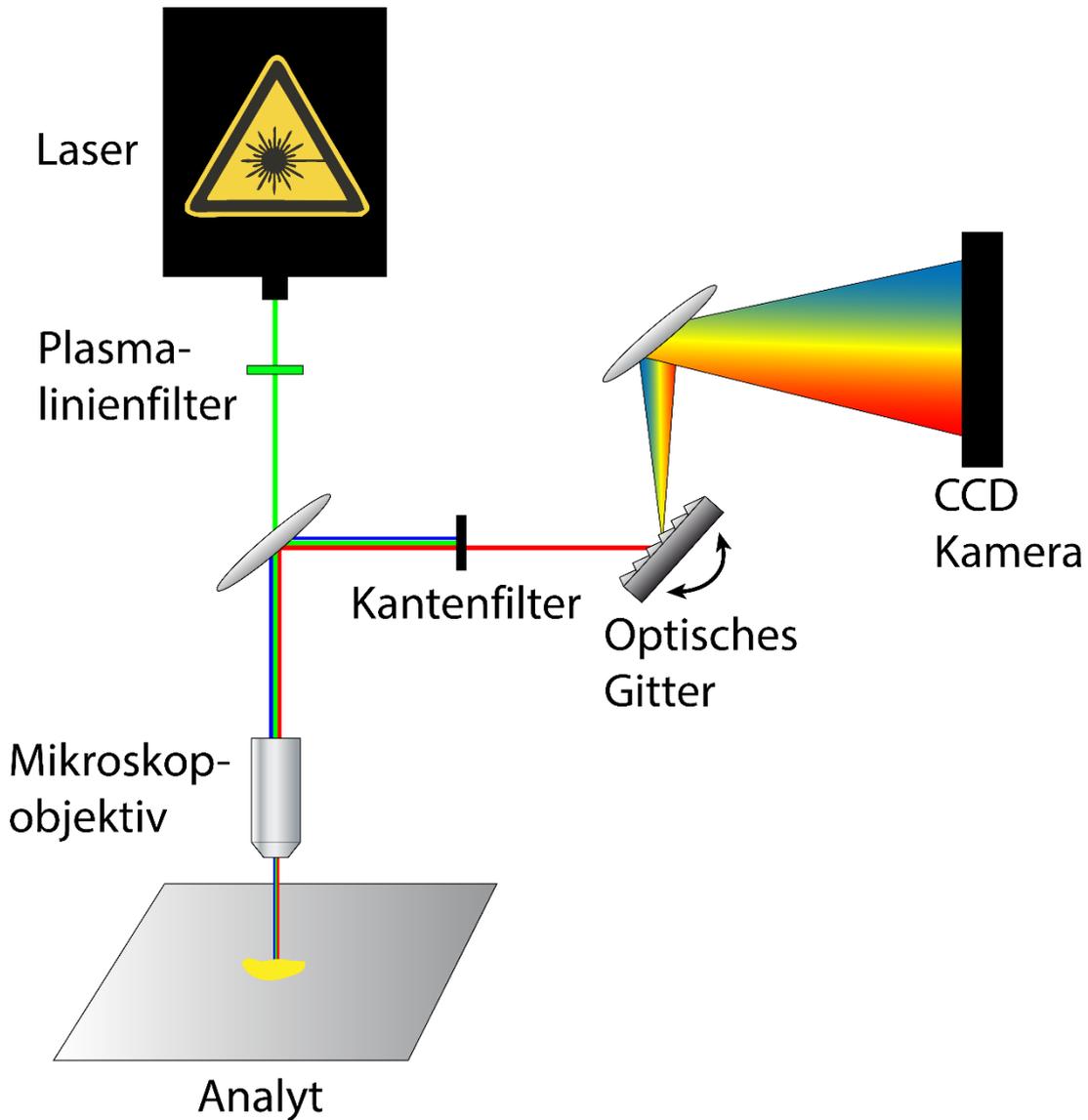


Abbildung 19 Vereinfachter schematischer Aufbau eines Raman-Mikrospektrometers.

3.2 Raman-Analyse der Referenzsubstanzen

Unterschiedliche isotopische Mischungen von $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Glucose (0,1 M) mit einem Gehalt von 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 60, 80 und 100 % ^{13}C -Glucose wurden hergestellt. Um einen homogenen Glucosespot zu erhalten, wurden 10 μL der Probe auf einen CaF_2 -Einkristall aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Analysen wurden mit dem 532-nm-Laser (8,4 mW) und dem 633-nm-Laser (3,7 mW), sowie mit Aufnahmedauern von 50 s bzw. 100 s durchgeführt. Die gleiche Prozedur wurde für die $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Phenylalaninmischungen (0,05 M) mit 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 % ^{13}C -Phenylalanin angewandt. Diese Proben wurden mit dem 633-nm-Laser und einer Aufnahmedauer von 100 s durchgeführt. Der gesamte spektrale Bereich von 50 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} wurde aufgenommen.

3.3 Artificielle Biofilme – 3-D-Raman

Die Gele wurden ausgehend von einer 2 %igen (w/v) wässrigen Agar-Agar-Suspension hergestellt. Die Suspension wurde unter Rückfluss 5 min lang bei 90 °C erhitzt. Zu 4,76 mL der auf 47 °C abgekühlten Mischung wurden 10 mg Plastikpartikel definierter Größe (Melamin-Formaldehyd, Polymethylmethacrylat und Polystyrol) hinzugesetzt. Diese Mischung wurde anschließend für 5 min 47 °C mit 500 rpm gerührt. Danach wurde das Agarose-Plastikpartikelgemisch in vorgewärmte Formen überführt. Die 3-D-Analyse wurde mit einem 100×Wasserimmersionsobjektiv, einem konfokalen Blendendurchmesser von 50 µm und mit Aufnahmezeiten pro Analysepunkt von 0,5 s aufgenommen. Der Messschritt in den drei Raumachsen wurde auf 0,5 µm festgelegt. Ein spektraler Messbereich von 500 bis 2000 cm⁻¹ wurde ausgewählt, da sich dort alle Raman-Signale von Interesse befanden.

3.4 Raman-Analyse der N47-Kultur

Die Sulfat-reduzierende Kultur N47 wurde aus Bodenmaterial von einem kontaminierten Aquifer in der Nähe von Stuttgart angereichert [13]. Der Stamm wurde anaerob in Serumflaschen mit Carbonat-gepuffertem Süßwassermedium (pH 7,3) bei 30 °C unter Verwendung von Naphthalin als Kohlenstoffquelle und Sulfat als Elektronenakzeptor kultiviert [194]. Für die Probe mit 50 % ¹³C-Natriumhydrogencarbonat wurden ¹²C- und ¹³C-Natriumhydrogencarbonat 1:1 verwendet. Die Flaschen wurden mit blauen Butylverschlüssen und Aluminiumkappen versiegelt. ¹²C oder ¹³C₁₀-Naphthalin wurden als 1,5 % (w/v) Lösung in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (1 ml auf 50 ml Kulturvolumen) zugegeben. Die N47-Zellen wurden in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und analysiert. Die Proben wurden mit geringfügigen Änderungen nach Amann *et al.* [195] und Giovannoni *et al.* [196] vorbereitet. 25 mL N47-Kultur wurden mittels Zentrifugation geerntet (3739 g, 35 min) und in 1×Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS, pH 7,4; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen (1700 g, 10 min). Dann wurden die Zellen mit frisch hergestelltem 4 % Paraformaldehyd (PFA, in 1×PBS) fixiert. Ein Volumen PFA wurde auf 3 Volumen der Zellsuspension zugegeben und die Mischung wurde für 12 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1700 g, 10 min, 4 °C) und mit 1×PBS gewaschen, um den Rest PFA zu entfernen. Sie wurden erneut zentrifugiert und mit einer Ethanolserie (50 %, 80 %, 98 %, jeweils 500 µL) behandelt. Die nun fixierten und dehydrierten Zellen wurden in 500 µL Ethanol bei -20 °C gelagert. Für mikroskopische Raman-Untersuchungen wurden 10 µl der Bakteriensuspension auf eine CaF₂-Platte getropft und kurz nach Verdampfen des Ethanols analysiert. Es wurden eine Laserleistung des 633 nm-Lasers von 3,7 mW und eine Aufnahmezeit von 100 s für die Raman-Analyse der N47-Kultur gewählt. Der Spektralbereich wurde auf 50 cm⁻¹ – 4000 cm⁻¹ festgelegt. Alternativ zu dieser Probenvorbereitung wurden in Vorexperimenten auch andere Methoden erprobt: (i) Die Zellen wurden ohne

Fixierung oder Dehydrierung direkt in PBS auf eine CaF₂-Platte getropft und analysiert; (ii) die Zellen wurden ohne vorherige Fixierung ausschließlich mit absolutem Ethanol dehydriert und in 500 µL Ethanol und 250 µL PBS gelagert; (iii) anstatt des Fixierungsmittels Paraformaldehyd wurde 2,5 % Glutaraldehyd (in 1×PBS) verwendet; (iv) die Dehydratation der Zellen wurde anstatt mit einer Ethanolserie in absolutem Ethanol durchgeführt.

3.5 (Resonanz)-Raman-Analyse von *G. metallireducens*

Geobacter metallireducens des Stammes GS-15 (DSM 7210) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Mikroorganismen wurden unter anoxischen Bedingungen in einem Minimalmedium (DSMZ *Geobacter medium* 579) mit DSMZ-Spurenelementlösung SL10 (1 ml/L) und DSMZ 7-Vitaminlösung (0,5 ml/L) kultiviert [197]. Folgende weiteren Substrate wurden hinzugefügt: 5 mM ¹²C-Acetat oder ¹³C-Acetat oder ²H-Acetat. Fe(III)-Citrat (50 mM) wurde als Elektronenakzeptor verwendet. 40 ml Medium wurden in sterile 50-ml-Flaschen gegeben. Die Flaschen wurden mit einer Mischung aus N₂ und CO₂ (80 %:20 %) gespült und mit Butylkautschukstopfen versiegelt. Die Inkubation wurde bei 30 °C im Dunkeln durchgeführt. Bei Anzucht mit isotopenmarkierten Substraten wurden nur Zellen nach dem dritten Transfer der Kultur für die Raman-Analyse verwendet. Die Präparation für die Raman-Mikrospektroskopie wurde wie für den Stamm N47 beschrieben, durchgeführt (PFA, Dehydrierung in einer Ethanolserie; siehe oben). Es wurden eine Laserleistung des 532 nm-Lasers von 4,2 mW auf der Probe und Aufnahmezeiten von 1 s, 6 s oder 100 s für die (Resonanz-)Raman-Analysen der *G. metallireducens*-Zellen gewählt. Der Spektralbereich wurde abhängig von dem verwendeten Isotop auf 50 cm⁻¹–3750 cm⁻¹ (²H) oder 50 cm⁻¹–1750 cm⁻¹ (¹²C/¹³C) festgelegt.

3.6 SERS-Analysen

3.6.1 SERS-Analyse der Referenzsubstanzen

Unterschiedliche isotopische Mischungen von Phenylalanin (0,05 M) mit 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 % ¹³C-Phenylalanin wurden hergestellt. Die Herstellung der Silberkolloidlösung nach Knauer *et al.* [140] erfolgte, indem 9 mL des Reduktionsmittels Hydroxylaminchlorid (1,67 mM), welches Natriumhydroxid (3,3 mM) enthält, mit 1 mL Silbernitratlösung (10 mM) versetzt wurde. Diese Silberkolloide wurden dann nach Kahraman *et al.* [134] mittels Zentrifugation (1700 g, 10 min) auf 4×AgNP konzentriert. Nach Zugabe von 30 µL der SERS-Kolloide zu 10 µL einer Phenylalaninprobe wurden 10 µL der Mischung auf einen CaF₂-Einkristall aufgebracht und

über Nacht bei Raumtemperatur langsam getrocknet. Diese Proben wurden mit dem 633-nm-Laser (3,7 mW) und einer Aufnahmezeit von 100 s analysiert. Der gesamte spektrale Bereich von 50 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} wurde aufgenommen.

3.6.2 SERS-Messung der N47-Kultur

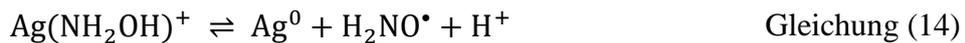
Die fixierten und dehydrierten Zellen (siehe Kapitel 3.4) mussten für die SERS-Analyse in direkten Kontakt mit Silberkolloid gebracht werden. Verschiedene Methoden wurden hierbei erprobt und überprüft.

Die Herstellung der Silberkolloidlösung ($1\times\text{AgNP}$) nach Knauer *et al.* [140] erfolgte, indem 9 mL des Reduktionsmittels Hydroxylaminchlorid (1,67 mM), welches Natriumhydroxid (3,3 mM) enthält, mit 1 mL Silbernitratlösung (10 mM) versetzt wurde. Diese Silberkolloide wurden dann nach Kahraman *et al.* [134] mittels Zentrifugation (1700 g, 10 min) auf $4\times\text{AgNP}$ oder $8\times\text{AgNP}$ konzentriert. Anschließend wurden 90 μL der Silberkolloide ($1\times$, $4\times$ oder $8\times$) direkt zu 10 μL der Bakterienzellen gegeben. Diese Mischung konnte dann direkt oder nach Zugabe von 3 μL NaCl (0,1 M) zur SERS-Analyse verwendet werden. Alternativ zu diesem Verfahren wurden die Zellen *in situ* mit Silberkolloid beschichtet. Detaillierte Informationen zu diesem Herstellungsverfahren, das sich an der Methode von Zhou *et al.* orientiert [145], sind im Abschnitt 3.6.3 zu finden. Allen Methoden gemein ist, dass für die mikroskopischen SERS-Untersuchungen jeweils 10 μl der Silberkolloid-Bakteriensuspension auf eine CaF_2 -Platte oder auf hydrophobische Glaträger [145] getropft und 1 h bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Es wurden verschiedenste Laserleistungen des 633 nm-Lasers und Aufnahmezeiten für die SERS-Analyse der N47-Kultur verwendet. Der Spektralbereich wurde auf $50\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ festgelegt.

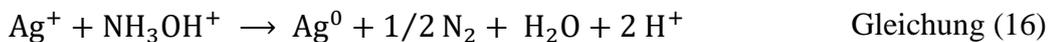
3.6.3 SERS-Messung von *E. coli*

Schockgefrorene *E. coli* des Stammes DSM 1116 wurden von DSM Nutritional Products GmbH (Grenzach, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden in 250-ml-Schüttelflaschen mit 25 ml M9-Minimalmedium (47,7 mM Na_2HPO_4 , 22,0 mM KH_2PO_4 , 8,55 mM NaCl, 18,7 mM NH_4Cl , 40 μM CaCl_2 , 40 μM MgSO_4 , 10 μM $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ohne Zugabe von Spurenelementen kultiviert [198,199]. M9-Minimalmedium wurde als optimales Medium für die Aufzucht ausgewählt, da es ein besonders niedriges Eigensignal mit SERS liefert [200]. Auch ist es hier, durch seine Eigenschaft als Minimalmedium, besonders einfach die spezifischen isotoopenmarkierten Substrate definiert zuzugeben. Für die ^{15}N -Markierung wurde NH_4Cl durch $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ersetzt. Die Flaschen wurden über Nacht bei 100 U/min und $37\text{ }^\circ\text{C}$ mit 0,4 % (w/v) ^{12}C - oder ^{13}C -Glucose als einzige Kohlenstoffquelle inkubiert. Bei Anzucht mit den isotoopenmarkierten Substraten wurden nur Zellen nach dem dritten Transfer der Kultur für die Raman-Analyse verwendet. Die Methode zur *in situ*-Beschichtung von Zellen mit Silberkolloid folgt der Arbeit von Efrima und Zeiri, welche darin besteht, dass die ver-

schiedenen Vorläufersubstanzen (Silbernitrat und Reduktionsmittel, beispielsweise Natriumborhydrid oder Hydroxylaminchlorid) nacheinander zur Probe zugeben wurden [113,132,145]. In dieser Arbeit wurde 1 ml der gewaschenen Zellen pelletiert (1700 g, 10 min) und in 180 μL Hydroxylaminchloridlösung (1,67 mM), welche mit Natriumhydroxid (3,3 mM) versetzt wurde, resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μL Silbernitratlösung (10 mM) und Inkubation für 1 h bei 4 °C wurden 5 μL der Bakterienprobe auf einen Standardglasobjektträger übertragen und 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Abbildung 20 veranschaulicht den Prozess der schrittweisen *in situ*-Kolloidherstellung. Zuerst lagert sich an die negativ geladene Zelloberfläche das positiv geladene Reduktionsmittel an, anschließend bildet sich durch Zugabe des Silbersalzes direkt an der Oberfläche das gewünschte Silberkolloid. Die Reaktionsschritte sind hierbei analog zum Mechanismus der Oxidation von Hydroxylamin durch Fe(III) [201]:



Die Gesamtreaktionsgleichung lautet somit:



Bei der Raman-Analyse wurde eine Laserleistung des 633-nm-Lasers von 0,04 mW auf der Probe und eine Aufnahmezeit von 1 s oder 10 s für die SERS-Analyse der *E. coli*-Zellen gewählt. Der Spektralbereich wurde auf $50 \text{ cm}^{-1} - 4000 \text{ cm}^{-1}$ festgelegt.

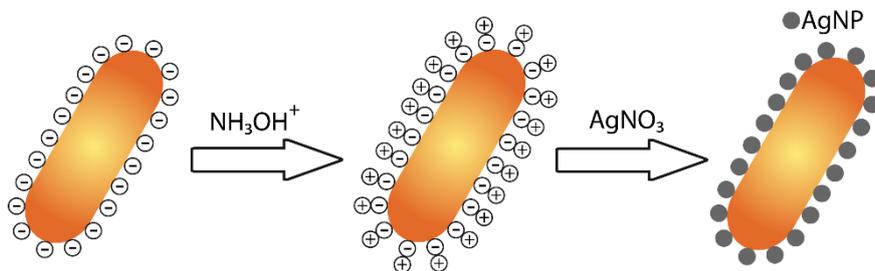


Abbildung 20 Schema der schrittweisen *in situ*-Kolloid-Herstellung, bei der zuerst das Reduktionsmittel und anschließend Silbernitrat zu den *E. coli*-Zellen gegeben werden (nach [145]).

3.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

REM-Aufnahmen der in Ethanol fixierten und auf einem Si-Wafer getrockneten N47-Proben wurden mit einem Feldelektronenmikroskop (AURIGA 60-39-20, Carl Zeiss Microscopy GmbH), welches mit einem Sekundärelektronen-Everhart-Thornley-Detektor ausgestattet war, erzeugt. Die Probe wurde dabei unter einem Vakuum von $1,93 \times 10^{-6}$ mbar, einer Beschleunigungsspannung von 30 kV, einem Sondenstrom von 50 pA und einem Arbeitsabstand von 4,0 mm analysiert.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Raman-Analyse von Referenzsubstanzen

4.1.1 Referenzreinsubstanzen und Mischungen

Die Raman-Spektren von reinem kristallinen L-Phenylalanin und ^{13}C - ^{15}N -L-Phenylalanin sind in Abbildung 21a dargestellt. Die stärkste Bande, die im Spektrum von L-Phenylalanin bei 1001 cm^{-1} beobachtet werden kann, wird der Ringatmung von Benzol zugeordnet [202]. Diese Bande ist in vollständig markiertem ^{13}C - ^{15}N -L-Phenylalanin auf 965 cm^{-1} rotverschoben. Die Raman-Spektren von wässriger D-Glucose und ^{13}C -D-Glucose sind in Abbildung 21b gezeigt. Die auffälligsten Banden von Glucose bei 1159 cm^{-1} und bei 1121 cm^{-1} können der C–O-Streckschwingung bzw. der Biegeschwingung von C–O–H zugeordnet werden. Die Bande bei 2896 cm^{-1} wird den C–H-Streckschwingungen zugeordnet [203]. Diese Banden sind in vollständig markierter ^{13}C -Glucose auf 1030 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} oder 2886 cm^{-1} rotverschoben. Die Raman-Spektren von ^{12}C -Natriumacetat, ^{13}C -Natriumacetat und ^2H -Natriumacetat sind in Abbildung 21c dargestellt. Bei ^{12}C -Natriumacetat kann die Bande bei 930 cm^{-1} der C–C-Streckschwingung zugeordnet werden. Die Deformationsschwingung der Methylgruppe und die Streckschwingung von C=O können bei 1346 cm^{-1} und 1417 cm^{-1} beobachtet werden. Die Bande bei 2934 cm^{-1} wird der C–H-Streckschwingung zugeordnet [204]. Diese Banden sind in vollständig markiertem ^{13}C -Natriumacetat auf 915 cm^{-1} , 1334 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} und 2929 cm^{-1} rotverschoben. Bei ^2H -Natriumacetat sind die meisten Banden gegenüber ^{13}C -Natriumacetat noch weiter verschoben. Besonders hervorzuheben ist die C– ^1H -Streckschwingung mit seiner Verschiebung von 2934 cm^{-1} auf den Bereich um 2111 cm^{-1} (C– ^2H -Streckschwingung). Dies ist auf die relativ gesehen hohe Zunahme der reduzierten Atommasse der Schwingung C– ^2H im Vergleich zu C– ^1H zurückzuführen. Die Bande der C–C-Streckschwingung und die Bande der Methyldeformationsschwingung sind auf 883 cm^{-1} bzw. 1084 cm^{-1} rotverschoben. Für die C–O-Streckschwingung ist eine kleine Rotverschiebung um 7 cm^{-1} auf 1410 cm^{-1} zu beobachten. Weitere spektrale Informationen und eine umfassende Bandenzuordnung der unterschiedlichen ^{12}C -Substanzen kann in der Literatur nachgeschlagen werden [202-204].

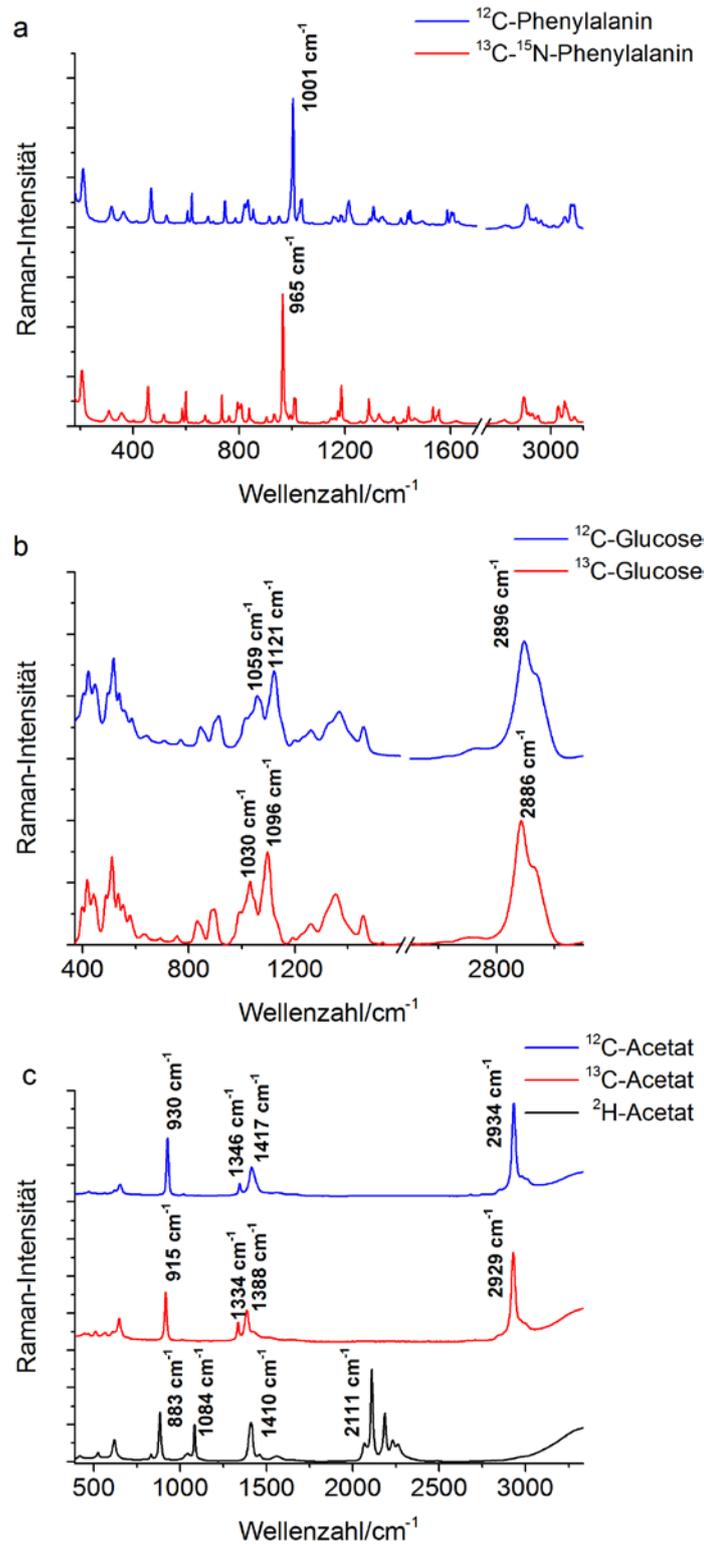


Abbildung 21 Raman-Spektren der Referenzsubstanzen; (a) ¹²C-L-Phenylalanin und ¹³C-¹⁵N-L-Phenylalanin, (b) ¹²C-D-Glucose und ¹³C-D-Glucose und (c) ¹²C-Natriumacetat, ¹³C-Natriumacetat und ²H-Natriumacetat; die Spektren wurden mit 100 s Aufnahmezeit und einer Laserwellenlänge von 633 nm für Phenylalanin und Glucose und einer Laserwellenlänge von 532 nm für Natriumacetat aufgenommen. Einige Banden sind beispielhaft hervorgehoben, um die Rotverschiebung in den Raman-Spektren der isotoopenmarkierten Substanzen zu verdeutlichen.

Es kann folglich also festgehalten werden, dass die Unterscheidung von reinen ^{13}C - oder ^2H -Substanzen von reinen ^{12}C -Substanzen ohne weiteres möglich ist, da die Rotverschiebung deutlich ausgeprägt ist und sich in allen spektralen Bereichen des Spektrums finden lässt.

Um das Potential der Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) bei der quantitativen Analyse der Isotopenmarkierung zu untersuchen, wurden Mischungen der Referenzsubstanzen analysiert. Zuerst wurden Mischungen von ^{12}C -Glucose und ^{13}C -Glucose untersucht. Abbildung 22 zeigt zur besseren Veranschaulichung die vertikal zueinander verschobenen Spektren von reinen ^{12}C -Glucose-, 50 % ^{13}C -Glucose- und reinen ^{13}C -Glucose-Proben im Bereich $1000\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$.

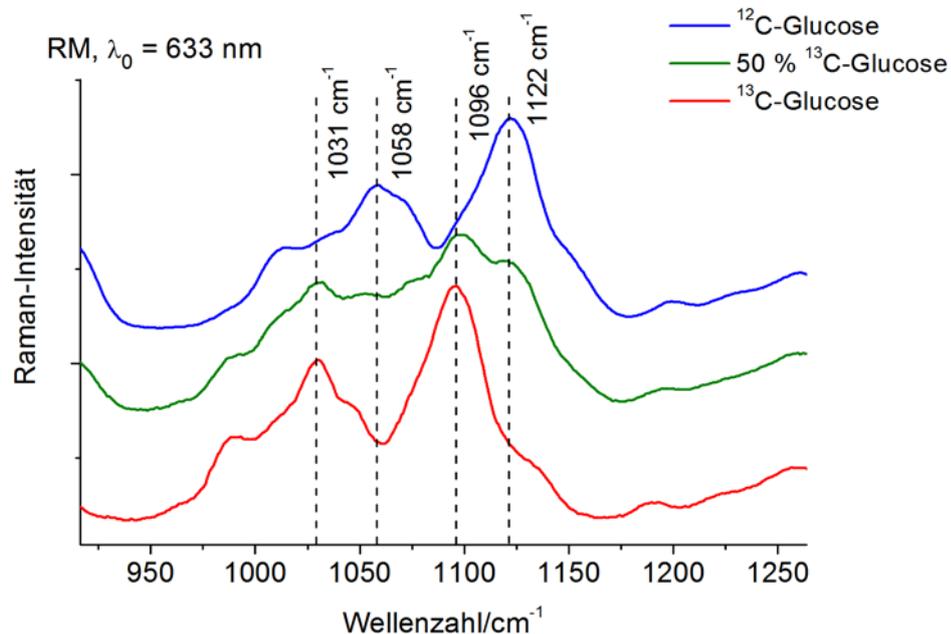


Abbildung 22 Rotverschiebung der Banden im Spektrum von ^{13}C -Glucose im Vergleich zu 50 % ^{13}C -Glucose und ^{12}C -Glucose im Bereich $1000\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$.

Hier lässt sich bereits allein anhand des Aussehens des Spektrums der 50 % ^{13}C -Glucose vermuten, dass diese wohl eine Linearkombination der beiden isotonreinen Spektren ist. Zur Erstellung von Kalibrationsgeraden wurde das Verhältnis der Bandenintensitäten der Banden 1031 cm^{-1} und 1058 cm^{-1} aller 11 Glucose-Mischungen eines Satzes gegen das eingesetzte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis aufgetragen. Die Versuche wurden einmal mit einem 532-nm-Laser als auch mit einem 633-nm-Laser durchgeführt (siehe Abbildung 23a und b). Zur Berechnung der Bandenverhältnisse wurden pro Konzentration jeweils 7 Spektren verwendet. Aus der Auftragung lässt sich ein klares Verhältnis ermitteln, welches sich mit einer linearen Funktion mit einem hohen Korrelationsgrad von $R^2 = 0,98$ bzw. $R^2 = 0,99$ approximieren lässt. Für alle Kalibrationsgeraden wurde ein Konfidenzniveau von 95 % verwendet. Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde mit dem $3\text{-}\sigma$ -Kriterium auf 2,7 % bzw. 4,2 % ^{13}C -Gehalt bestimmt. Abweichungen von den linearen Verhältnissen können auf die Beeinträchtigung bei der

Auswertung durch die sich stark überlappenden Banden in den Spektren der Glucose-Mischungen zurückgeführt werden. Auch wurde hier nur der Bereich von 0 bis 50 % ^{13}C -Gehalt bei der Erstellung der Kalibrationsgeraden verwendet, da die Bandenbreite bei diesen Spektren für dieses Verfahren ein großes Hindernis darstellt. Trotzdem zeigen beide Analysen mit unterschiedlichen Laserwellenlängen einen sehr ähnlichen Graphen mit einer ähnlich niedrigen Nachweisgrenze. Man kann also annehmen, dass eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen gegeben ist.

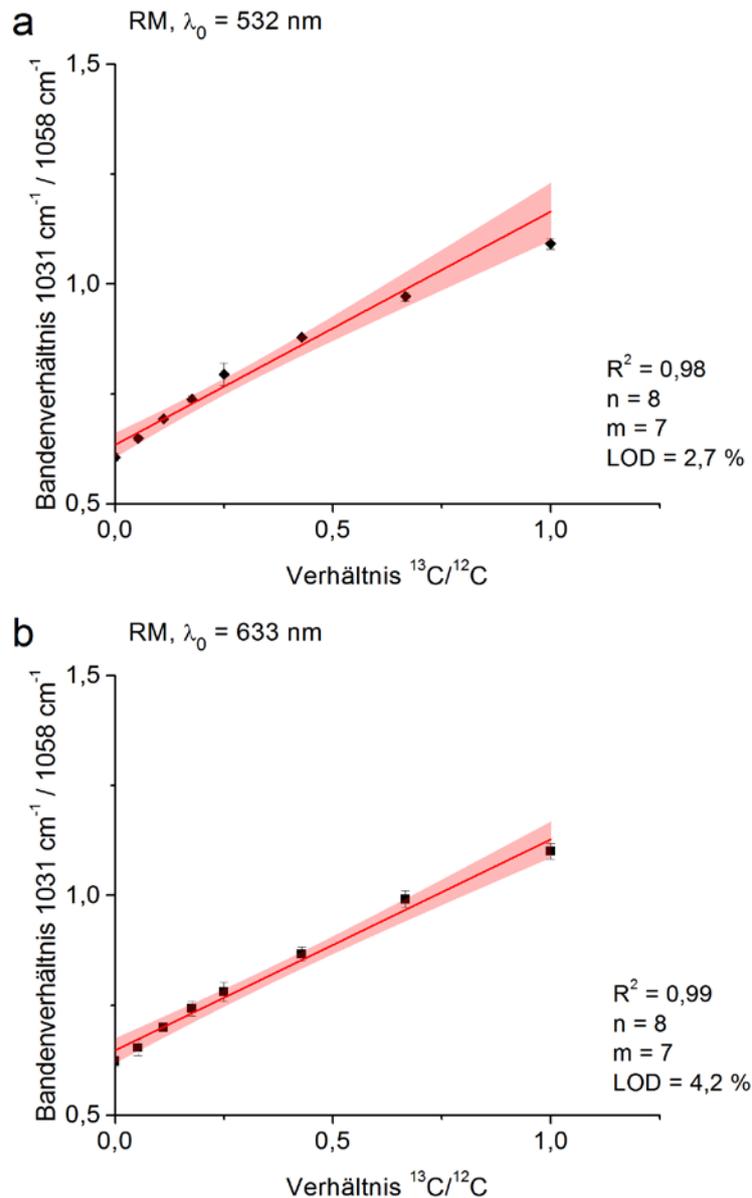


Abbildung 23 Analyse der quantitativen Korrelation von Raman-Spektren und zusammengesetzten Konzentrationen; Korrelation zwischen dem Verhältnis der rotverschobenen und nichtverschobenen Bandenintensitäten ($1031 \text{ cm}^{-1}/1058 \text{ cm}^{-1}$) und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis; jeder der neun Datenpunkte besteht aus sieben gemittelten Messungen; Anregungsquelle und Aufnahmedauer (a): 532-nm-Laser, 50 s, (b) 633-nm-Laser, 100 s.

Die Auswertung kann grundsätzlich auch mit anderen Banden durchgeführt werden, wobei aber darauf zu achten ist, dass die Banden, die zur Berechnung verwendet werden, eine nicht zu niedrige Intensität aufweisen und nicht zu stark von anderen Banden beeinflusst werden. Die Banden 1096 cm^{-1} und 1122 cm^{-1} erfüllen beispielsweise diese Kriterien recht gut. In Abbildung 24 ist der Plot dieses Bandenverhältnisses gegen den ^{13}C -Gehalt abgebildet. Auch mit diesen Banden ergibt sich ein klares Verhältnis, das sich mit einer linearen Funktion ($R^2 = 0,95$; $n = 9$) approximieren lässt. Als Nachweisgrenze wurden 11,5 % ermittelt.

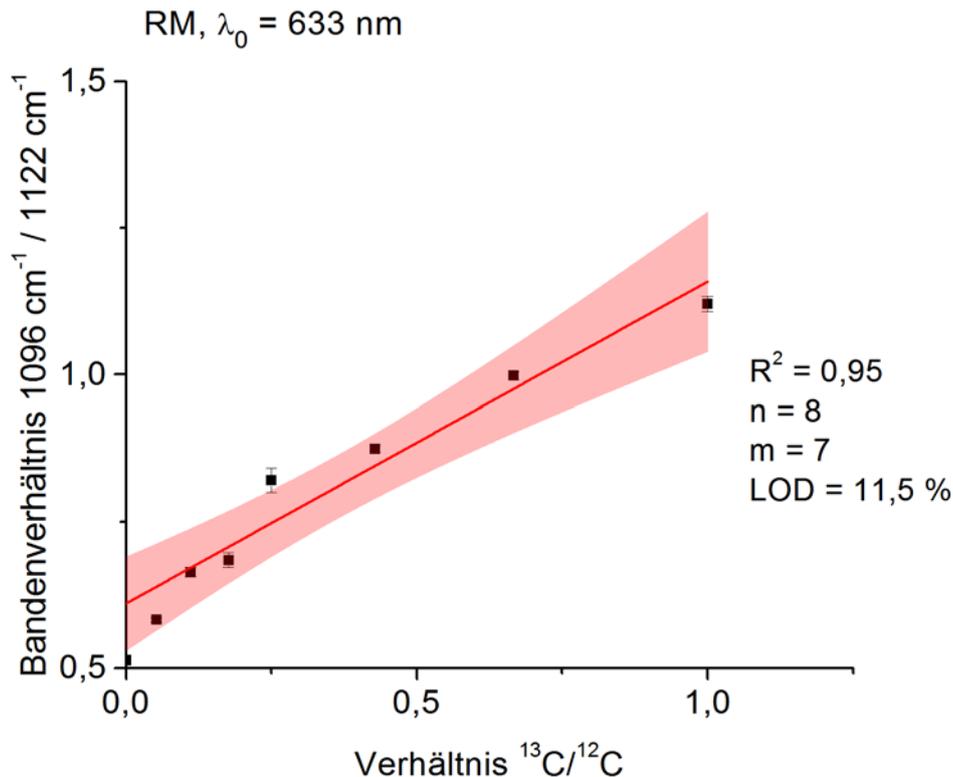


Abbildung 24 Abhängigkeit der Verhältnisse der Rotverschiebung, berechnet aus der Bandenintensität bei 1096 cm^{-1} / Bandenintensität bei 1122 cm^{-1} ; Anregungsquelle: 633-nm-Laser.

Zusätzlich wurde eine zweite Methode zur direkten Bestimmung des ^{13}C -Gehaltes aus den gemessenen Spektren im gesamten spektralen Bereich verwendet. In der Literatur wird häufig ein multivariates Kalibrierverfahren der kleinsten Quadrate benutzt (*direct classical least-squares*, DCLS), um unbekannte Probenkonzentrationen auf der Basis von ganzen Raman-Spektren zu berechnen [205]. Nach einer Basislinienkorrektur wird jedes Spektrum mit einem Zerlegungsalgorithmus (Matrixdivision) in Matlab R2013b (Syntax: $A = \text{GemessenesSpektrum} / \text{Referenzspektrum}$) verarbeitet. Dieses Verfahren berechnet die Linearkombination der Spektren der Referenzverbindungen die mit den Spektren der Proben am besten übereinstimmen [205,206]. Diese Methode kommt mit breiten und sich überlappenden Banden deutlich besser zurecht und ermöglicht bei Glucose eine Auswertung im gesamten Bereich von 0 bis 100 % ^{13}C -Gehalt. Es wurden jeweils 7 Einzelspektren für jede Konzentration verwendet. Zur

Veranschaulicht sind diese Daten in Abbildung 25 gegen den realen ^{13}C -Glucosegehalt aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Abweichung vom optimalen Wert nur gering ist ($R^2 = 0,99$; $n = 11$). Nur bei der Probe mit 5 % ^{13}C -Glucosegehalt stimmt der berechnete Wert mit 0 % nicht überein. Wahrscheinlich kann diese Methode eine solche Menge an ^{13}C -Glucose nicht erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass mittels RM der quantitative Nachweis von ^{13}C in Glucose-Mischungen ab ca. 10 % Stabilsotopen-Gehalt erzielt werden kann.

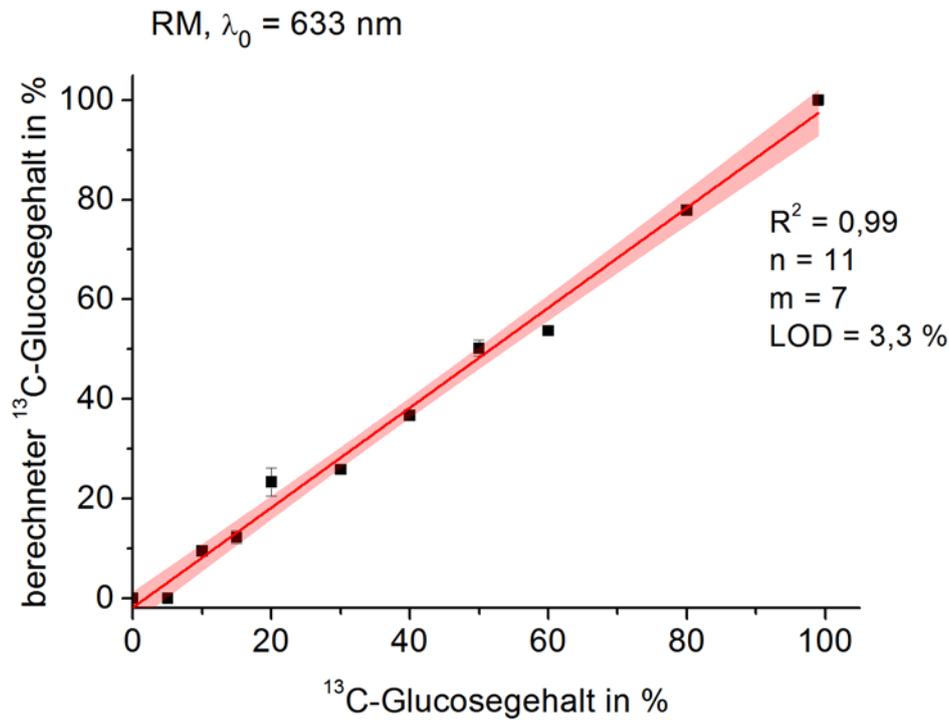


Abbildung 25 Plot des mittels DCLS berechneten ^{13}C -Glucosegehaltes zum eingesetzten ^{13}C -Glucosegehalt

Weiterhin wurden auch Gemische aus ^{12}C -Phenylalanin und ^{13}C -Phenylalanin analysiert. Abbildung 26 zeigt zur besseren Veranschaulichung die Rotverschiebung der Banden im Spektrum von ^{13}C -Phenylalanin im Vergleich zu ^{12}C -Phenylalanin im Bereich von 900 bis 1150 cm^{-1} .

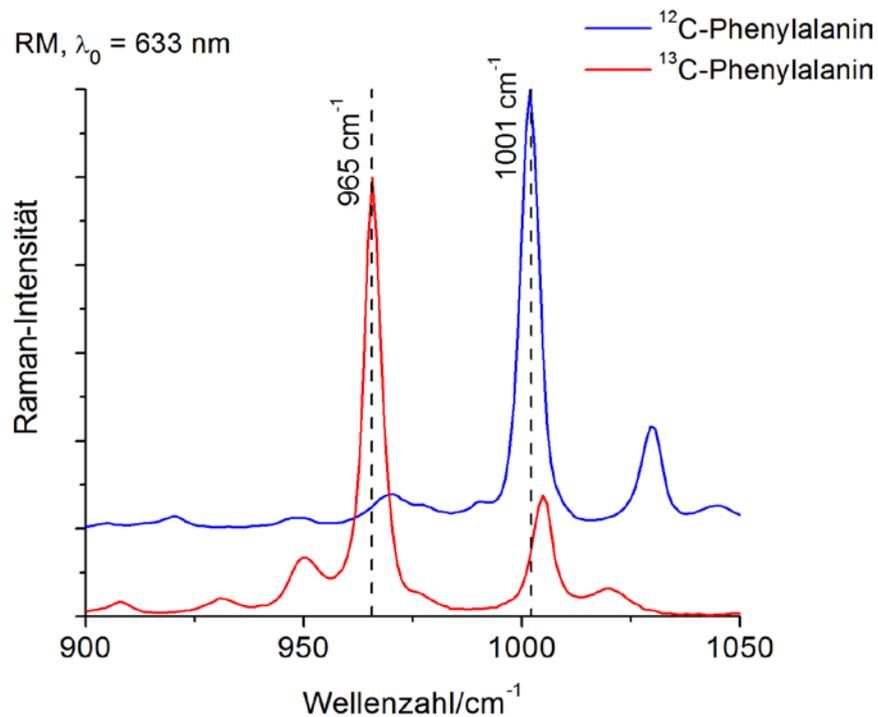


Abbildung 26 Rotverschiebung der Banden im Spektrum von ^{13}C -Phenylalanin im Vergleich zu ^{12}C -Phenylalanin im Bereich 900 – 1150 cm^{-1} .

Aufgrund einer direkten Korrelation zwischen relativer Bandenhöhe und Konzentration verringert sich mit steigendem ^{13}C -Gehalt die Intensität der ^{12}C -Phenylalaninbande (1002 cm^{-1}), während die ^{13}C -Phenylalaninbande bei 965 cm^{-1} ansteigt. Die Korrelation zwischen dem Rotverschiebungsverhältnis und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ist linear mit einem hohen Korrelationsgrad ($R^2 = 0,99$; $n = 10$). Die Nachweisgrenze (LOD) mit dem 3- σ -Kriterium wurde auf 9,5 % ^{13}C -Gehalt für 965 $\text{cm}^{-1}/1002 \text{ cm}^{-1}$ und auf 6,5 % ^{13}C -Gehalt für 1550 $\text{cm}^{-1}/1604 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 27) berechnet. Die Bande im Spektrum des ^{12}C -Phenylalanins bei 970 cm^{-1} interferiert mit der ^{13}C -Phenylalaninbande bei 965 cm^{-1} . Darüber hinaus interferiert die Bande des ^{13}C -Phenylalanins bei 1005 cm^{-1} (rotverschoben von 1030 cm^{-1}) mit der ^{12}C -Phenylalaninbande bei 1002 cm^{-1} . Diese sich teilweise überlappenden Banden führen zu einem störenden Hintergrundsignal, was wiederum zu einem relativ gesehen höheren LOD beim 965 $\text{cm}^{-1}/1002 \text{ cm}^{-1}$ -Verhältnis führt.

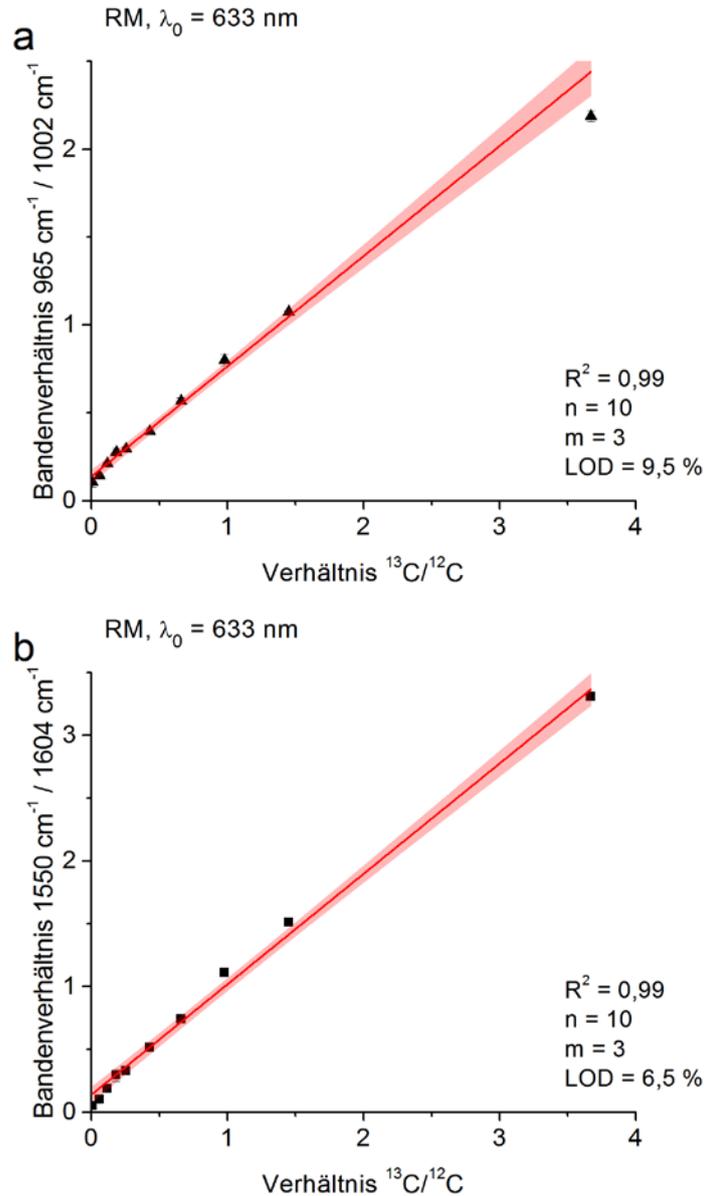


Abbildung 27 Analyse der quantitativen Korrelation von Raman-Spektren und Mischungen; Korrelation zwischen dem Verhältnis der rotverschobenen und nichtverschobenen Bandenintensitäten und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis; verwendetes Bandenverhältnis: (a) $965 \text{ cm}^{-1}/1002 \text{ cm}^{-1}$, (b) $1550 \text{ cm}^{-1}/1604 \text{ cm}^{-1}$; jeder der zehn Datenpunkte besteht aus drei gemittelten Messungen; Anregungsquelle und Aufnahmedauer: 633-nm-Laser, 100 s.

Anschließend wurde hier ebenso das multivariate Kalibrierverfahren der kleinsten Quadrate benutzt, um den ^{13}C -Gehalt der Phenylalaninmischung zu bestimmen, Abbildung 28 zeigt die Kalibration des $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Phenylalanins. Die Beziehung zwischen dem tatsächlichen ^{13}C -Gehalt und dem berechneten ^{13}C -Gehalt ist linear mit einem hohen Korrelationsgrad ($R^2 = 0,99$; $n = 11$). Für dieses Verfahren wurde eine deutlich nachweisstärkere Nachweisgrenze (LOD) von 2,8 % ^{13}C -Gehalt berechnet. Die hier ermittelten Nachweisgrenzen für Reinverbindungen lassen vermuten, dass bei Kultivie-

rungsexperimenten von Mikroorganismen mit stabilisotopenmarkierten Verbindungen bereits sehr geringe Mengen nachweisbar und quantifizierbar sein sollten.

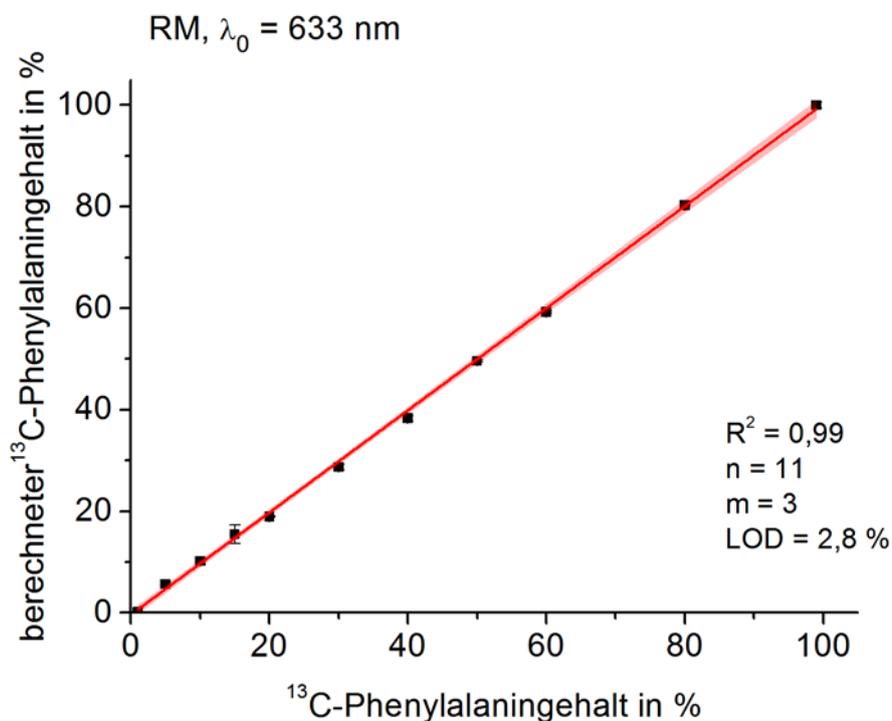


Abbildung 28 Korrelation zwischen dem tatsächlichen ^{13}C -Gehalt und dem berechneten ^{13}C -Gehalt für $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Phenylalanin; zur Berechnung wurde der komplette spektrale Bereich der Raman-Spektren und die DCLS Kalibrationsmethode benutzt; jeder der elf Datenpunkte besteht aus drei Durchschnittsmessungen.

Weiterhin wurden die Gemische aus ^{12}C -Phenylalanin und ^{13}C -Phenylalanin auch mit SERS analysiert. Abbildung 29 zeigt zur besseren Veranschaulichung die Rotverschiebung der Banden im SERS-Spektrum von ^{13}C -Phenylalanin im Vergleich zu ^{12}C -Phenylalanin im Bereich $900 - 1150 \text{ cm}^{-1}$. Eine Verstärkung des Raman-Signals um etwa den Faktor 1.000 kann hierbei für manche Banden erreicht werden. Allerdings nimmt ebenso der Untergrund deutlich zu, was wiederum in diesem Fall zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führt. Auch werden in den verschiedenen Spektren derselben Probe nicht immer die gleichen Verstärkungen erreicht. Dies führt zu großen Unsicherheiten und somit im Vergleich zu RM relativ großen Fehlerbalken. Die Korrelation zwischen dem Rotverschiebungsverhältnis und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ist linear mit einem hohen Korrelationsgrad ($R^2 = 0,99$; $n = 9$). Die Nachweisgrenze (LOD) mit dem $3\text{-}\sigma$ -Kriterium wurde auf $16,6 \%$ ^{13}C -Gehalt für $965 \text{ cm}^{-1}/1002 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 30) berechnet. Abbildung 31 zeigt die Kalibration für den ^{13}C -Phenylalaningehalt mit dem DCLS-Verfahren.

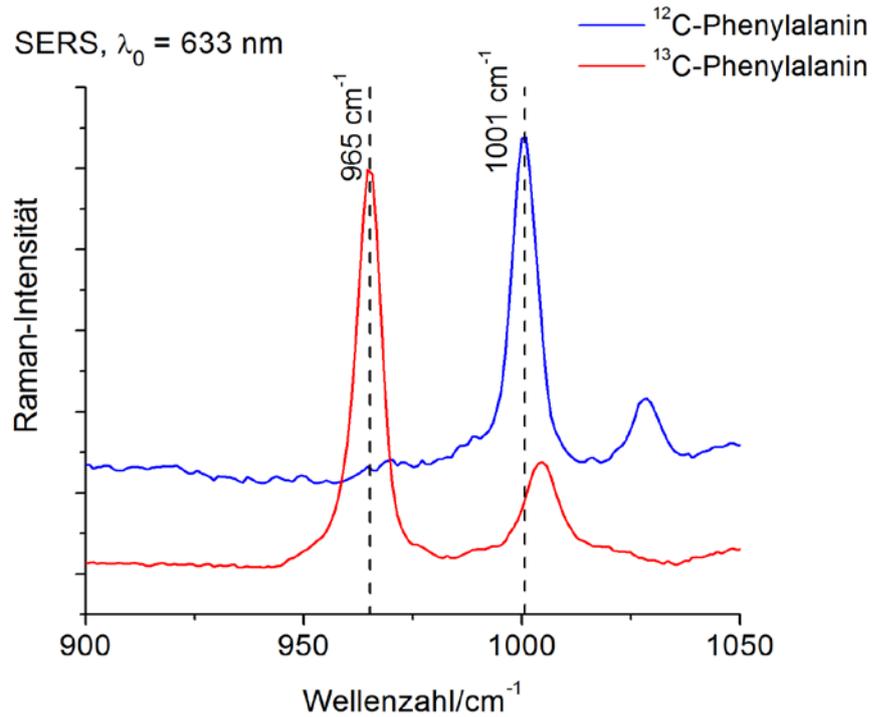


Abbildung 29 Rotverschiebung der Banden im SERS-Spektrum von ^{13}C -Phenylalanin im Vergleich zu ^{12}C -Phenylalanin im Bereich 900 – 1150 cm^{-1} .

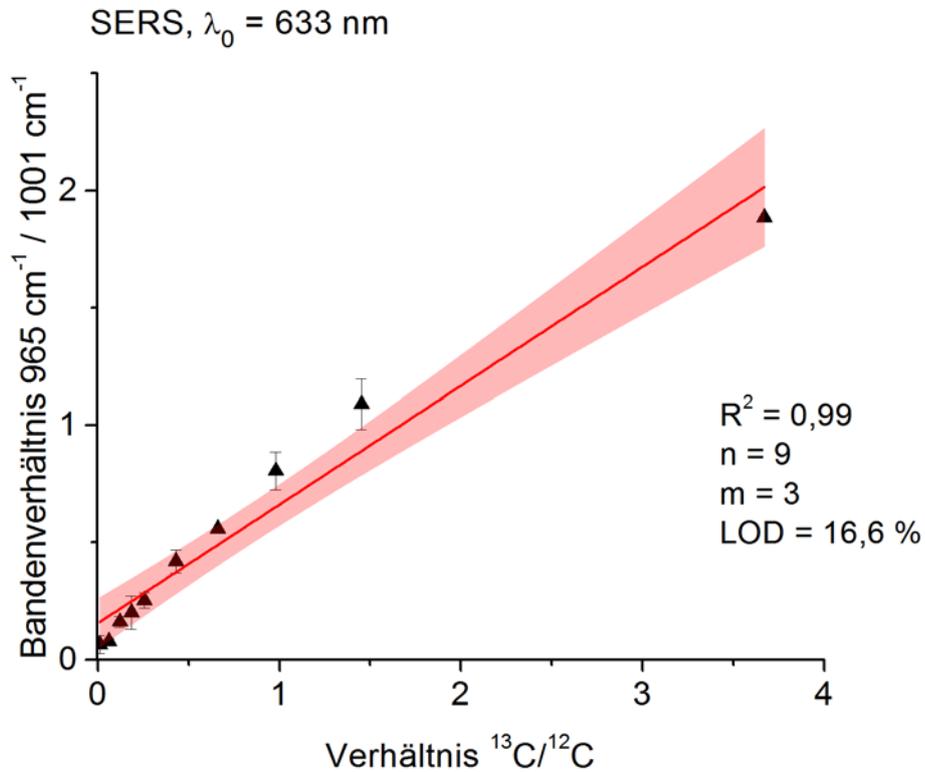


Abbildung 30 Analyse der quantitativen Korrelation von SERS-Spektren und Mischungen; Korrelation zwischen dem Verhältnis der rotverschobenen und nichtverschobenen Bandenintensitäten und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis; verwendetes Bandenverhältnis:

965 cm^{-1} /1002 cm^{-1} ; jeder der zehn Datenpunkte besteht aus drei gemittelten Messungen; Anregungsquelle und Aufnahmedauer: 633-nm-Laser, 100 s.

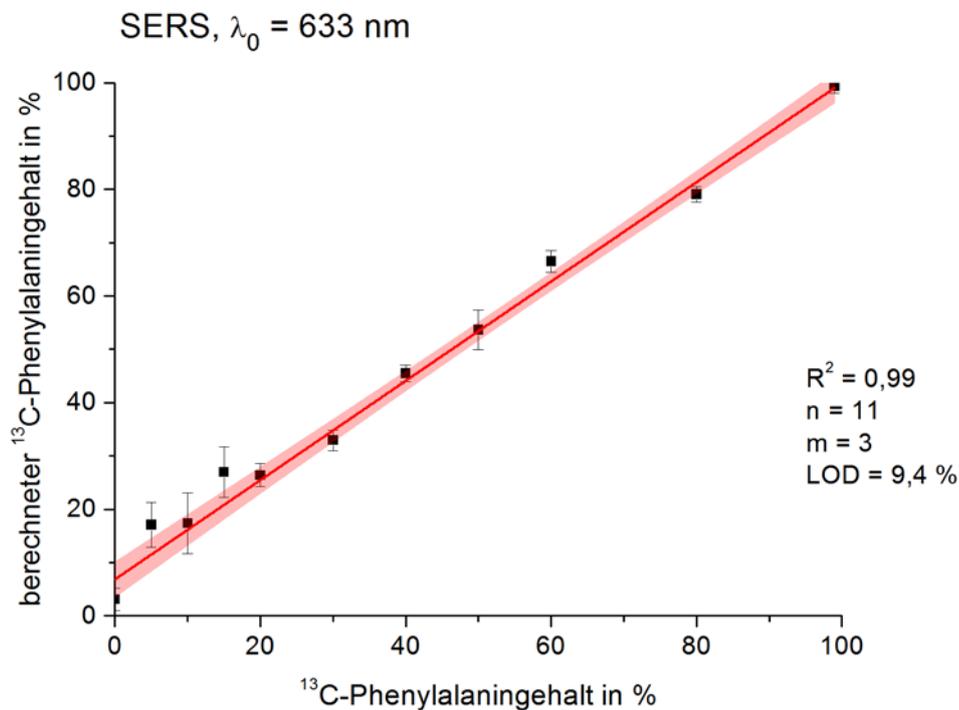


Abbildung 31 Korrelation zwischen dem tatsächlichen ^{13}C -Gehalt und dem berechneten ^{13}C -Gehalt für die SERS-Analyse von $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Phenylalanin, zur Berechnung wurde der komplette spektrale Bereich der Raman-Spektren und die DCLS-Kalibrationsmethode benutzt; jeder der elf Datenpunkte besteht aus drei Durchschnittsmessungen.

Um Aufschluss über die unteren Detektionslimits zu erhalten, wurde die minimale nachweisbare absolute Menge der ^{13}C -Verbindung im Laserfokus bestimmt. Um die absolute Menge zu berechnen, müssen einige Annahmen getroffen werden. Zuerst muss die Fläche des Laserfokus bekannt sein. Der Laserfokusbereich kann mit der Gleichung $d_\lambda = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA}$ beschrieben werden. Die Gleichung steht für den kleinstmöglichen Lichtstrahl der nur durch die Lichtbrechung begrenzt ist (AIRY-Beugungsscheibe, siehe auch Kapitel 2.2.2) [207]. Es wurden hierbei Laserfokusbereiche von 721 nm und 858 nm für die Laser mit $\lambda = 532 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 633 \text{ nm}$, bei Verwendung eines Objektivs mit einer 100×Vergrößerung ($NA = 0,9$), berechnet. Da die Tiefenaufklärung des verwendeten Raman-Mikroskops die Dicke der Analytschicht im Experiment, sogar im konfokalen Modus (1 – 2 μm oder mehr), deutlich übersteigt, wurde nur der Durchmesser des Laserspots berücksichtigt. Zweitens muss der Analyt homogen sein und die Größe der Oberfläche muss bekannt sein. Durch eine kreisförmige Geometrie des Analyten gestaltet sich die Berechnung der Oberfläche mit bekanntem Durchmesser sehr einfach. Für eine reproduzierbare Erzeugung einer kreisförmigen und homogenen Probe haben sich hierbei ein Volumen von 10 μL und eine Konzentration von 0,1 mol/L als

optimal herausgestellt. Ein optisches Bild der Glucoseprobe mit einem Durchmesser von 4,2 mm ist in Abbildung 32 zu finden.

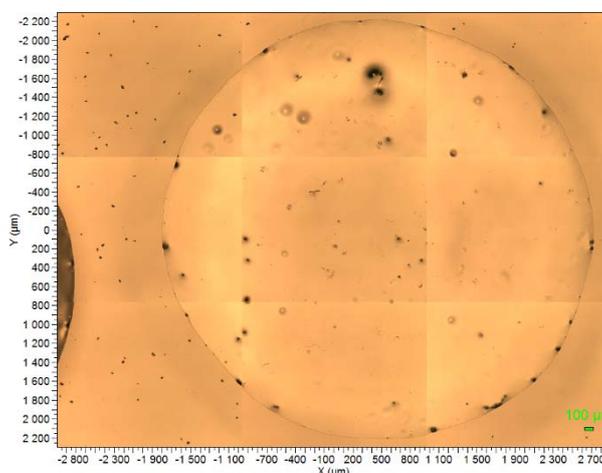


Abbildung 32 Optisches Bild der Glucoseprobe mit einem Durchmesser von 4,2 mm (10 µL, 0,1 mol/L).

Drittens muss der LOD der ^{13}C -Verbindung bei der Berechnung der absoluten Menge berücksichtigt werden (siehe Seite 62). Als Substanz wurde Glucose verwendet, da durch ihre hydrophile Natur eine homogenere Verteilung auf dem CaF_2 -Objektträger im Gegensatz zu Phenylalanin mit seiner kristallinen Natur gewährleistet ist. Das Verhältnis der Laserfläche und der Oberfläche des Analyten bestimmt welcher Prozentsatz der Gesamtmenge an ^{13}C -Substanz nachgewiesen werden kann. Unter Berücksichtigung des LOD konnte die minimale absolute Menge an ^{13}C -Glucosemolekülen, die in einer ^{12}C -Glucosematrix nachweisbar ist, mit $0,148 \pm 0,008$ pg und $0,327 \pm 0,017$ pg ^{13}C -Glucose für den 532-nm-Laser bzw. den 633-nm-Laser berechnet werden (siehe auch Tabelle 3).

Tabelle 3 Die absolute minimal nachweisbare Masse bei der Analyse der Glucoseproben

-Laser	Laserfokus- durchmesser	LOD	^{13}C -Glucose- Moleküle	Berechnete Masse
532-nm	721 nm	2,7 %	$4,8 \cdot 10^8$	$0,148 \pm 0,008$ pg
632-nm	858 nm	4,2 %	$1,1 \cdot 10^9$	$0,327 \pm 0,017$ pg

4.1.2 Artificielle Biofilme – 3-D-Raman-Analyse von Referenzpartikeln

Auf dem Weg zur dreidimensionalen Analyse von natürlichen Biofilmen ist zuerst nötig, eine reproduzierbare und qualitativ aussagekräftige 3-D-Analyse von artifiziellen Biofilmen zu zeigen. Ein einfaches artifizielles Biofilmsystem mit eingebetteten Plastikpartikeln wurde hier als Versuchsmodell genutzt. In Abbildung 33 wird ein Bereich in einem Agarosegel, welcher in $100\ \mu\text{m}$ Tiefe aufgenommen wurde, gezeigt [208]. Die drei verschiedenen eingebrachten Plastikpartikel liegen hier auf engem Raum nebeneinander. Diese besitzen jeweils charakteristische Banden bei $813\ \text{cm}^{-1}$ (Polymethylmethacrylat; rot), $977\ \text{cm}^{-1}$ (Melamin-Formaldehyd-Harz; grün) und $1001\ \text{cm}^{-1}$ (Polystyrol, blau). Die Partikeldurchmesser des Melamin-Formaldehyd-Harz-Partikels ($4,38 \pm 0,06\ \mu\text{m}$) und des Polymethylmethacrylatpartikels ($3,02 \pm 0,07\ \mu\text{m}$) konnten zweifelsfrei verifiziert werden. Auffallend ist der kleine und unförmige Polystyrolpartikel. Die Spektren in diesem Bereich zeigen eindeutig die Bande bei $1001\ \text{cm}^{-1}$ und können auch nicht durch Linearkombination von Referenzspektren des Melamin-Formaldehyd-Harzes und des Polymethylmethacrylats simuliert werden. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich um ein Bruchstück eines Polystyrolpartikels. Dieser Experimentaufbau zeigt, dass sich RM prinzipiell auch zur dreidimensionalen Analyse von Biofilmen und deren Bestandteilen eignet.

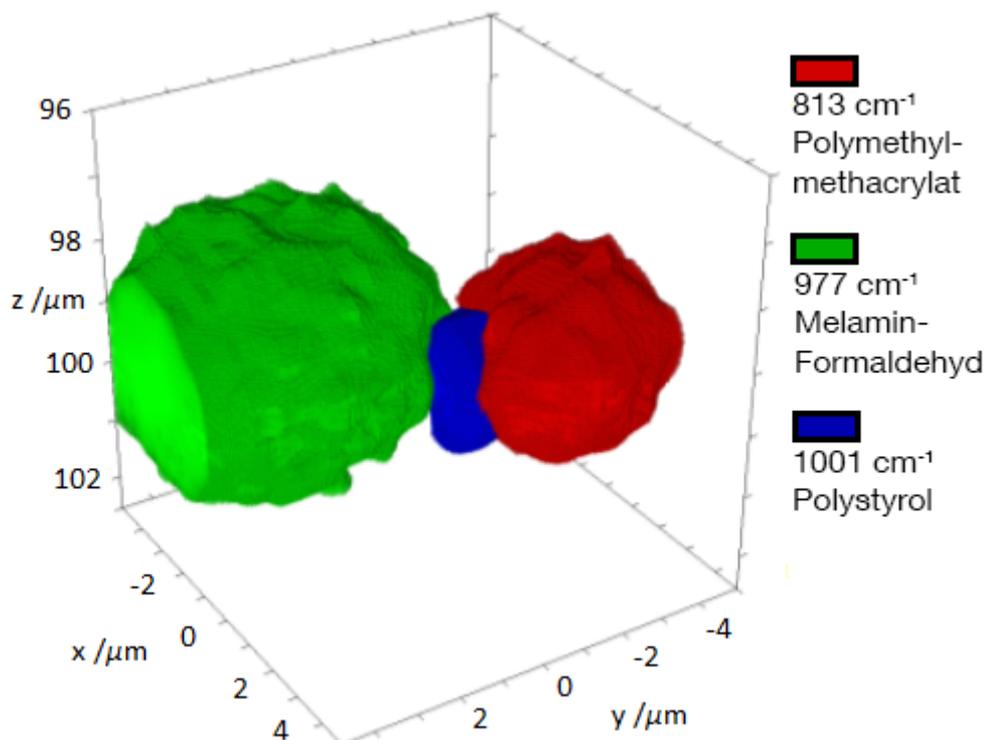


Abbildung 33 3-D-Array der Raman-Signale bei $813\ \text{cm}^{-1}$ (rot), $977\ \text{cm}^{-1}$ (grün) und $1001\ \text{cm}^{-1}$ von drei Plastikpartikeln eingebettet in einem Agarosegel; Tiefe (z-Achse): $100\ \mu\text{m}$, konfokale Blende: $50\ \mu\text{m}$, Aufnahmezeit: $0,5\ \text{s}$ pro Messpunkt (aus [208]).

4.2 Raman- und SERS-Analyse der isotopenmarkierten N47-Zellkultur

Hier wurde SIRM zur Analyse der Kohlenstoffinkorporation in die Biomasse des Naphthalin-abbauenden Stammes N47 eingesetzt. Der Stamm N47 wächst extrem langsam, ist dabei allerdings der am besten untersuchte Mikroorganismus, der in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff Naphthalin abbaut. Der anfängliche Abbauschritt beim anaeroben Naphthalinmetabolismus ist eine Carboxylierung zu 2-Naphthoesäure [209]. Zu Beginn wurde bestimmt, welche Probenvorbereitungsmethode sich am besten für die RM-Analyse eignet. Getestet wurden die Lagermedien PBS und Ethanol, die Fixierungsmittel Paraformaldehyd und Glutaraldehyd, sowie zur Dehydrierung absolutes Ethanol und eine Ethanolkonzentrationsserie (50, 80 und 96 %). Tabelle 4 zeigt diese verschiedenen Methoden in einer Übersicht.

Tabelle 4 Die verschiedenen getesteten Probenvorbereitungsmethoden bei der RM-Analyse.

Lagermedium	Fixierung	Dehydrierung	Eignung für RM
PBS	-	-	+
Ethanol + PBS	-	Ethanol	+
PBS	Paraformaldehyd	-	+
PBS	Glutaraldehyd	-	-
Ethanol	Paraformaldehyd	Ethanol	++
Ethanol	Paraformaldehyd	Ethanolserie	+++

Methoden, in denen PBS als Medium verwendet wurde, sind grundsätzlich geeignet, zeigen aber aufgrund des hohen Salzanteils durch das PBS ein relativ hohes Untergrundsignal und stellenweise störende Banden in den Spektren der Bakterienzellen. Für eine reproduzierbare RM ist es somit besser die Zellen PBS-frei zu waschen. Gleiches gilt für die Fixierung mit Paraformaldehyd und die Dehydrierungsmethoden. Für eine zufriedenstellende RM-Analyse sind diese prinzipiell nicht notwendig. Allerdings konnten durch Anwendung dieser das Hintergrundsignal verringert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Dies ermöglicht eine schnelle Analyse einzelner Zellen, da eine kürzere Messdauer verwendet werden konnte. Insbesondere das bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches hauptsächlich durch Fixierung mit Paraformaldehyd erreicht werden konnte, ist von großer Bedeutung bei der Analyse von teils nur geringen Verschiebungen einzelner Banden im Spektrum. Auch konnte durch die Fixierung und insbesondere durch die Dehydrierung der Zellen eine Lagerbarkeit für mehrere Wochen bei -20 °C garantiert werden, was die Analyse von größeren Probenmengen möglich macht. Die Fixierung mit Glutaraldehyd ist als einzige Methode dagegen völlig ungeeignet, da diese ein starkes Eigensignal in den Raman-Spektren der Bakterienzellen lieferte. Beispielhaft sind in Abbildung 34 Raman-Spektren von zwei Bakterienzellen, welche beide mit Paraformaldehyd, aber auf unterschiedliche Weise dehydriert wurden,

abgebildet. Bei sonst identischen Messbedingungen ist hier der niedrigere Hintergrund im Spektrum der mit der Ethanolserie behandelten Zelle hervorzuheben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in allen nachfolgenden Experimenten ausschließlich Zellen verwendet, die mit Ethanol als Lagermedium, Paraformaldehyd als Fixierungsmittel und der Ethanolserie als Dehydrierungsmethode vorbereitet wurden.

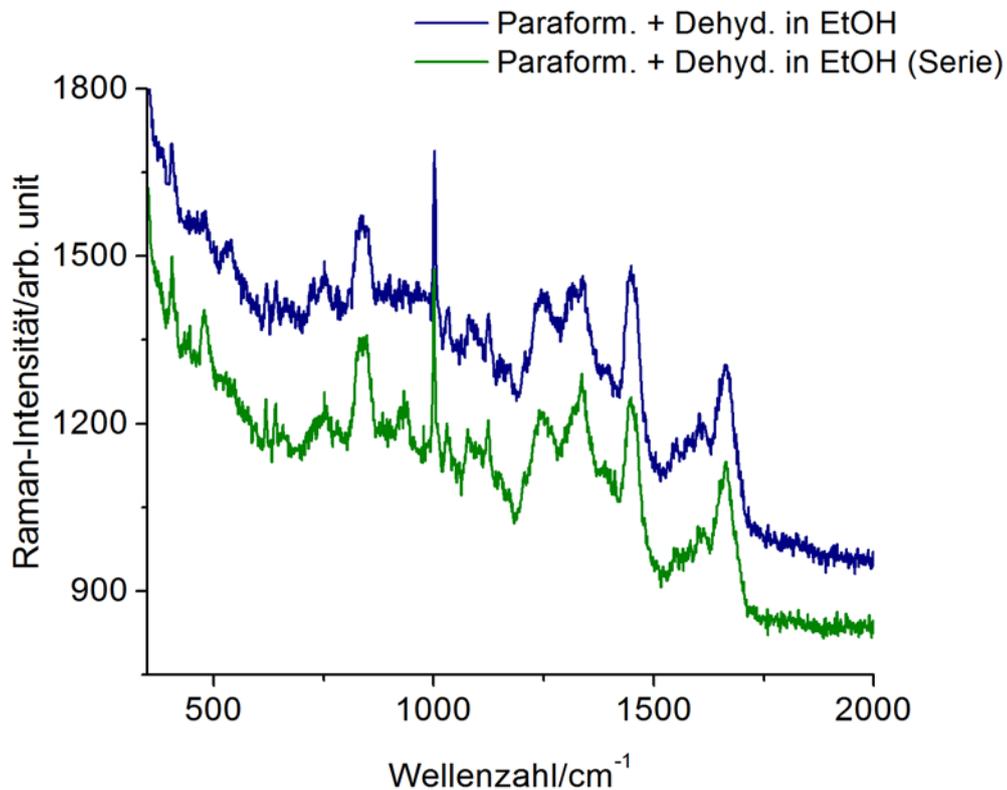


Abbildung 34 Raman-Spektren von zwei unterschiedlich dehydrierten Zellen unter sonst identischen Messbedingungen; das untere Spektrum zeigt hierbei ein geringeres Hintergrundsignal und ist somit für die Analyse besser geeignet.

Im Kulturmedium wurden ¹²C-Naphthalin, ¹³C-Naphthalin und 50 %-Hydrogencarbonat oder vollständig markiertes ¹³C-Naphthalin und nicht-markiertes Hydrogencarbonat verwendet. Optische Mikroskopaufnahmen einzelner N47-Zellen zeigen eine Zelllänge von etwa 1 – 2 μm (siehe Abbildung 35).

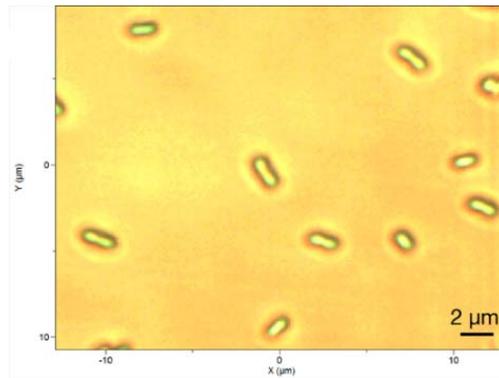


Abbildung 35 Optische Mikroskopaufnahme von Zellen der Kultur N47.

Es wurden geringfügige, aber vernachlässigbare Variationen in den Raman-Spektren einzelner Zellen gefunden. Diese sind höchstwahrscheinlich auf eine leicht unterschiedliche Zellmorphologie oder metabolische Zustände zurückzuführen. Trotzdem wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Raman-Spektren verschiedener N47-Zellen, die mit ^{12}C -Naphthalin kultiviert wurden, gefunden (siehe Abbildung 36).

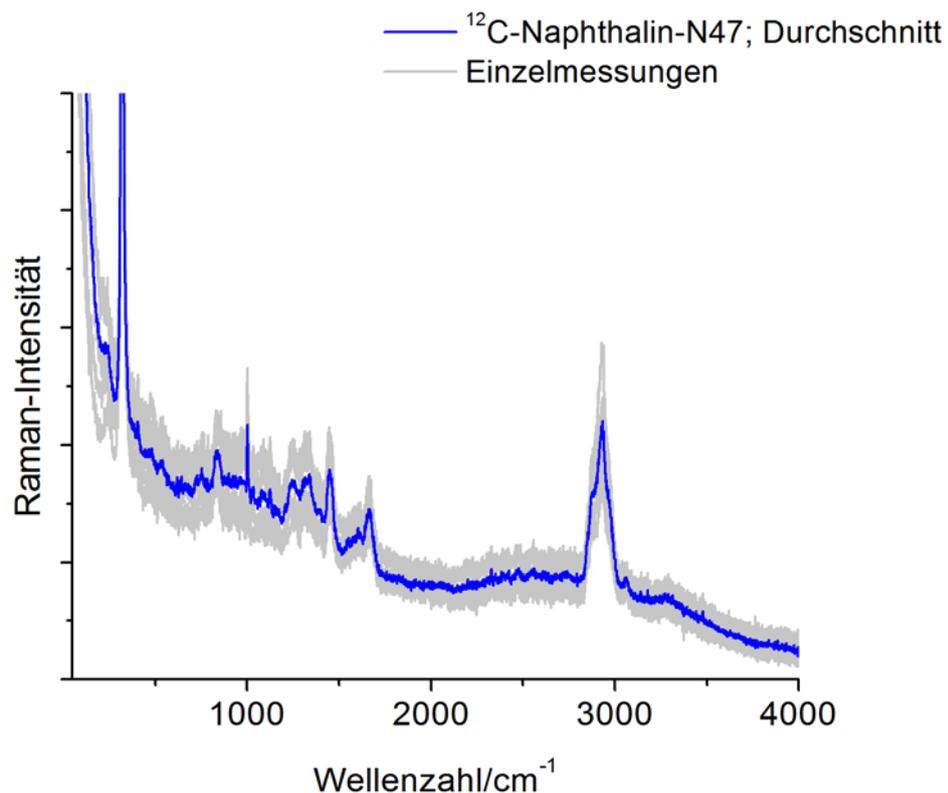


Abbildung 36 Raman-Spektren von einzelnen Zellen der Kultur N47; zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit wurden 6 verschiedene Einzelmessungen von N47-Zellen überlagert.

Spektren von ^{12}C -N47-Zellen und N47-Zellen, die mit vollständig markiertem ^{13}C -Naphthalin kultiviert wurden, zeigen Unterschiede in der Region der Phenylalaninbande bei 1001 cm^{-1} (siehe Abbildung 37). Die vier Banden bei 1001 cm^{-1} , 990 cm^{-1} ,

978 cm^{-1} und 968 cm^{-1} können den verschiedenen Isotopologen des Phenylalanins mit 0, 2, 4 oder 6 ^{13}C -Atomen im aromatischen Ring zugeordnet werden [185] (siehe Abbildung 38). So konnte die Isotopenmarkierung von N47 eindeutig in SIRM-Spektren wiedergefunden werden. Eine vollständige Markierung der Biomasse konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die Analyse von Zellen, die mit ^{12}C -Naphthalin und 50 % ^{13}C -markiertem Hydrogencarbonat kultiviert wurden, ebenfalls eine partielle Rotverschiebung der Phenylalaninbande auf 990 cm^{-1} .

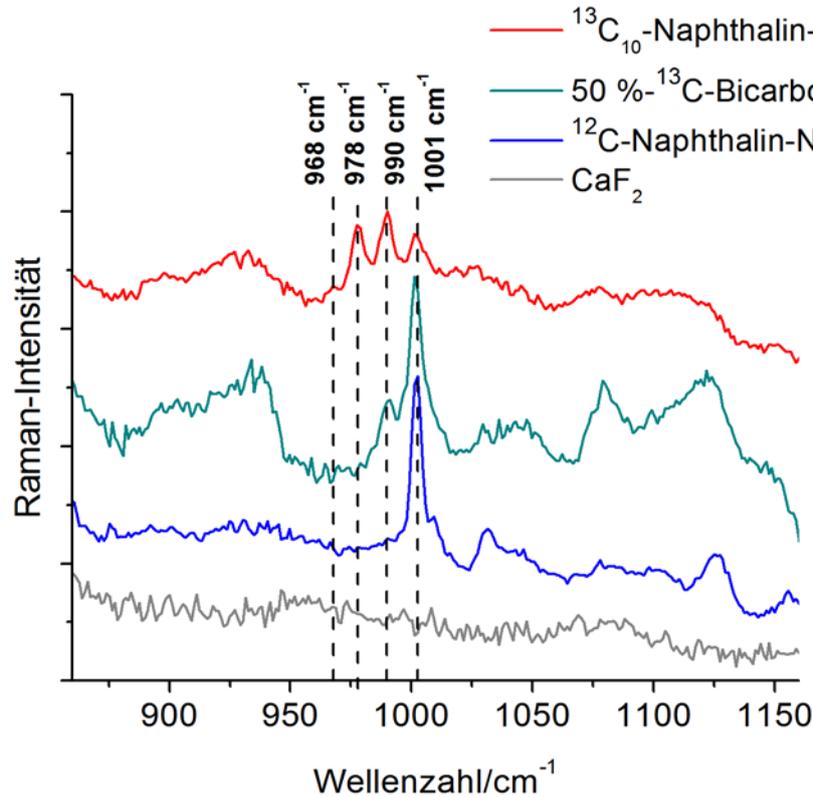


Abbildung 37 Raman-Spektren von Zellen der Kultur N47 die entweder mit ^{12}C -Naphthalin, ^{12}C -Naphthalin und 50 %-Bicarbonat oder ^{13}C -Naphthalin kultiviert wurden; markiert ist die charakteristische Rotverschiebung der Phenylalaninbande; die vier hervorgehobenen Banden konnten zu vier verschiedenen Isotopologen des Phenylalanins zugeordnet werden.

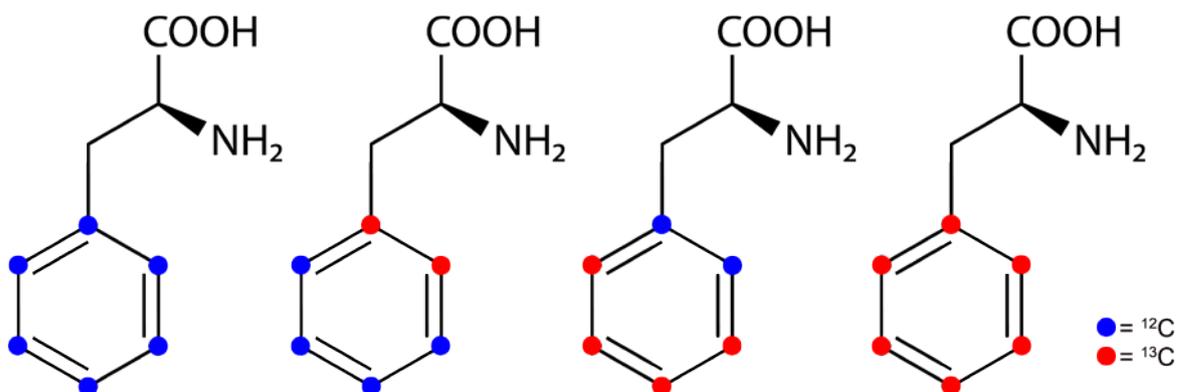


Abbildung 38 Die vier beobachtbaren Isotopologe des Phenylalanins auf Grundlage einer ^{13}C -Markierung in mikrobiologischen Zellen (nach [185]).

Dies deutet darauf hin, dass Hydrogencarbonat beim Aufbau der Biomasse durch den Abbau des Naphthalins im Kulturmedium einen signifikanten Betrag darstellt. Dies steht im Einklang mit dem hohen Verhältnis der heterotrophen CO₂-Fixierung, die bereits für andere anaerobe Aromaten abbauende Mikroorganismen mit Hilfe von *stable isotope probing* (SIP) Methoden nachgewiesen werden konnte [210,211]. Aus Kostengründen wurde die Vorkultur der analysierten Zellen in ¹²C-Naphthalin gezüchtet. Daher kann ein verbleibender Beitrag von ¹²C-Naphthalin oder dessen Zwischenprodukten zum Aufbau von Biomasse nicht ausgeschlossen werden. Die Kulturen wurden jedoch immer mit einem 10 %igen Inokulum gezüchtet. Daher sollte ein Übertrag von Biomasse zu weniger als 10 % an nicht markierten Zellen führen, sofern die Mehrheit der überimpften Zellen nicht gewachsen wäre. Wenn alternativ alle Zellen, die in das ¹³C-Naphthalin enthaltende Medium geimpft wurden, wachsen, könnte der Übertrag von der Vorkultur nur weniger als 10 % der Biomasse jeder Zelle ausmachen. Die Daten, die für den Stamm N47 erhalten wurden, zeigen, dass SIRM ein geeignetes Verfahren zur Analyse von spezifischen durch Isotopenmarkierung verursachten Bandenmustern in Mikroorganismen auf Einzelzellniveau darstellt. Dies gilt auch für solche extrem langsam wachsenden Kulturen mit Inkubationszeiten von länger als 2 Monaten. Wenn das Ausmaß des Isotopeneinbaus in Phenylalanin für die gesamte Biomasse repräsentativ ist, könnte man auch die absolute Menge der Isotopenaufnahme berechnen. Dies würde es beispielsweise ermöglichen das Ausmaß der heterotrophen CO₂-Fixierung oder andere Arten der gemischten Substratausnutzung auf Einzelzellniveau zu analysieren.

Aufgrund der geringen Quantenausbeute des Raman-Effekts (10^{-6} – 10^{-8}) leidet SIRM jedoch an einer begrenzten Nachweisstärke, welche die SIRM-Analyse eher zeitaufwendig gestaltet. Beispielsweise wurde eine Aufnahmezeit von 100 s für die Analyse einzelner N47-Zellen verwendet, was wiederum eine Gesamtanalysezeit von ca. 10 min für ein Spektrum im Bereich 50 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} bedeutet. Deswegen wurde untersucht, ob die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) für diese Mikroorganismen eine schnelle und nachweisstarke Analyse einzelner Bakterienzellen ermöglicht. Unterschiedliche Verfahren, basierend auf der Methode von Knauer *et al.* [140], wurden hierbei untersucht. Einerseits wurden Silberkolloide in verschiedenen Konzentrationen (1×, 4× oder 8×) [134] oder *in situ* Silberkolloide verwendet [145]. Auch wurde untersucht ob die Zugabe von NaCl hilfreich ist. Ebenfalls wurden als Substrate CaF₂ und hydrophobe Glasträger [145] getestet. Alle möglichen Kombinationen aus Silberkolloid (1×, 4×, 8× oder *in situ*), NaCl (ja/nein) und Substrat (CaF₂ oder hydrophobes Glas) wurden analysiert. Beispielhaft ist in Abbildung 39a eine optische Mikroskopaufnahme einzelner *E. coli*-Zellen in Kontakt mit 8×Silbernanopartikeln dargestellt. Es sei hier vorweggenommen, dass keine Methode zufriedenstellende Ergebnisse liefern konnte. Die SERS-Spektren unterschiedlicher Zellen derselben Probe, die mit gleichen Methode analysiert wurden, zeigen enorme Unterschiede und vor allem keinerlei reproduzierbar verstärkte Banden. Die gilt insbesondere für Zellen, die mit der gleichen Methode analysiert wurden, aber aus verschiedenen Batches stammten. Abbildung 40 zeigt hierbei

beispielhaft sieben Spektren einzelner Zellen aus drei verschiedenen Proben, die auf dieselbe Art vorbereitet und analysiert wurden. Extreme Unterschiede in den Spektren, vor allem bezüglich des Untergrundsignals, der verstärkten oder nicht verstärkten Banden und der Anzahl der vorhandenen Banden sind hierbei offensichtlich. Diese Ergebnisse lassen sich auf eine nicht reproduzierbare Anlagerung oder Bildung der Nanopartikel durch störendes kristallisiertes Naphthalin und/oder Pyrit (FeS) und/oder die ölige Trägerphase Heptamethylnonan und/oder Paraformaldehyd auf der Zellwand einzelner Zellen zurückführen. In Abbildung 39b ist deswegen ein SEM-Bild gezeigt, in dem die Ablagerungen auf den Zellen hervorgehoben sind. Da Naphthalin hydrophob ist, lassen sich diese Rückstände am wahrscheinlichsten Naphthalin zuordnen. Da allerdings die Zugabe des Naphthalins für die Kultivierung der Zellen obligatorisch ist, war es schlussendlich aufgrund dieser und weiterer nicht einfach lösbarer Herausforderungen im Rahmen dieser Arbeit schwierig eine optimale SERS-SIRM-Methode für isotonenmarkierte Zellen der Anreicherungskultur N47 zu entwickeln.

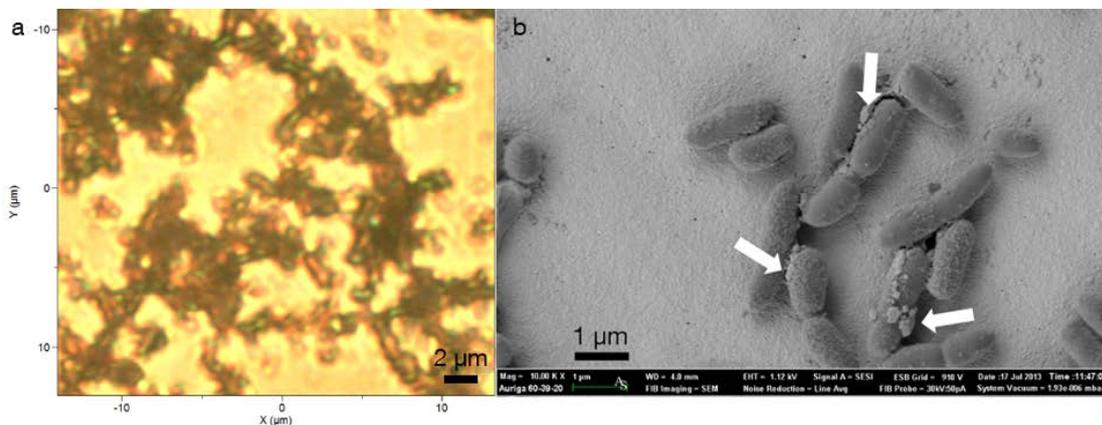


Abbildung 39 (a) Optische Mikroskopaufnahme von Zellen der Kultur N47 in Kontakt mit $8\times\text{AgNP}$; (b) SEM-Bild mit störendem kristallisiertem Naphthalin und/oder der öligen Trägerphase und/oder Paraformaldehyd auf der Zellwand einzelner Zellen der Kultur N47 (angezeigt durch Pfeile)

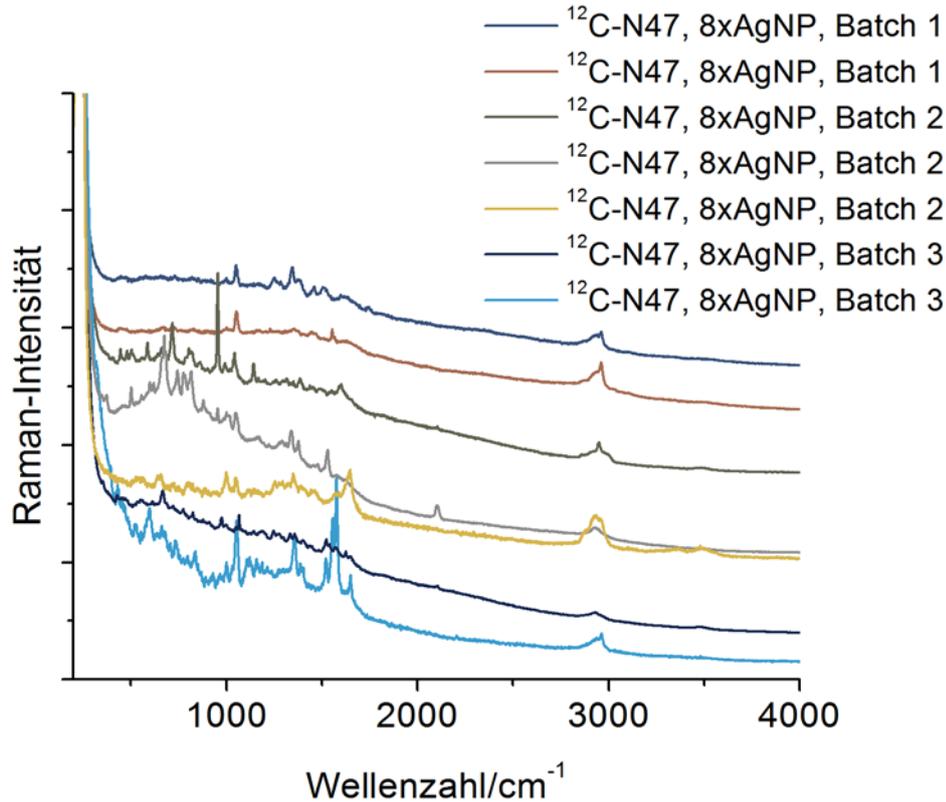


Abbildung 40 Sieben SERS-Spektren einzelner N47-Zellen aus drei verschiedenen Batches, die auf dieselbe Art vorbereitet und analysiert wurden, zeigen extreme Unterschiede in den spektralen Informationen.

4.3 Analyse von isotopenmarkierten *G. metallireducens*-Zellen

Es wurde getestet inwieweit die Verwendung des Resonanz-Raman-Effektes dazu beitragen kann die begrenzte Nachweisstärke der SIRM-Analyse einzelner Zellen zu verbessern. Mit seiner großen Menge an Cytochromen vom Typ *c* [14,15] ist *G. metallireducens* ein optimaler Mikroorganismus, um die Aufnahme stabilisotopenmarkierter Substanzen in mikrobiologische Zellen mit kurzen Analysezeiten zu untersuchen. Für die Bakterienzellen wurde aufgrund der Vorexperimente mit den N47-Zellen die bereits etablierte Probenvorbereitung gewählt (Lagermedium Ethanol, Paraformaldehyd, Ethanolserie; siehe Kapitel 4.2). Um spezifisch Resonanz-Raman-Banden zu erhalten, wurde ein 532-nm-Laser für die Analyse von *G. metallireducens* verwendet. Allerdings begrenzte der rasch eintretende photobleichende Effekt des Lasers auf Cytochrom *c* die maximal nutzbare Aufnahmezeit [212]. Nach 7 – 10 s Laserexpositionszeit wurde das Cytochrom *c* in den Zellen vollständig gebleicht und die Resonanz-Raman-Banden verschwanden. Abbildung 41 veranschaulicht ein Laserexpositionsexperiment, in dem eine Serie von 6 aufeinanderfolgenden Resonanz-Raman-Spektren einer einzelnen *G. metallireducens*-Zelle angefertigt wurde. Als Aufnahmezeit wurde 1 s gewählt. Die Zeitdifferenz zwischen den Messungen betrug 0,3 s. Obwohl für diese Art von Zellen eine Aufnahmezeit von nur 1 s eindeutig möglich war, wurde, um so viel Cyto-

chrom *c*-Signal wie möglich zu sammeln, eine Aufnahmezeit von 6 s gewählt. Dadurch erhält man Resonanz-Raman-Banden mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis. Die stärksten Resonanz-Raman-Banden wurden bei 746 cm^{-1} , 1128 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} und 1583 cm^{-1} gefunden. Sie konnten der Porphyrin-Ringatmung, den C–N-Streckschwingungen, den C–H-Beugeschwingungen und der antisymmetrischen C–C-Streckschwingung zugeordnet werden [212]. Die Reproduzierbarkeit der Resonanz-Raman-Einzelzellmessungen von *G. metallireducens* über 6 s (Resonanz-Raman-Spektren die durch Cytochrom-*c*-Banden dominiert wurden, Abbildung 42a) und 100 s (Raman-Spektren die den gesamten Fingerabdruck der Mikroorganismen zeigen Abbildung 42b) war sehr gut. Es konnten nur geringfügige Unterschiede zwischen den Bakterien beobachtet werden, die sich durch eine leicht unterschiedlich und natürlich vorkommende Abweichung der Zellzusammensetzung erklären lassen. Die Unterschiede in den relativen Intensitäten der Resonanz-Raman-Banden in Abbildung 42a lassen sich auf Änderungen der Oxidationsstufen des Cytochrom *c* zurückführen [213,214].

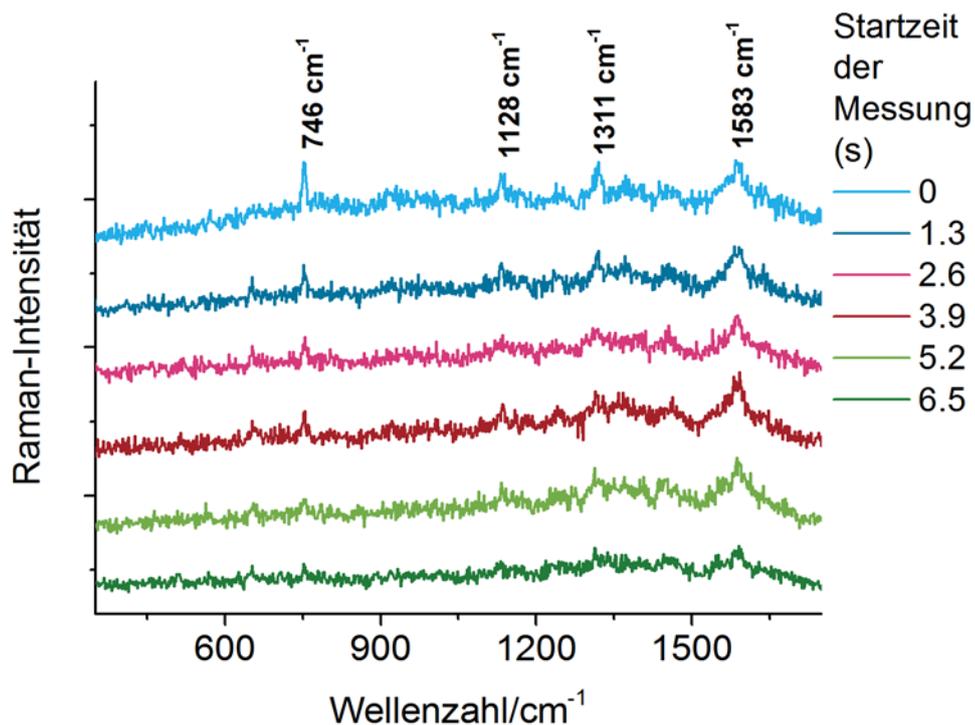


Abbildung 41 Serie von 6 aufeinanderfolgenden Resonanz-Raman-Spektren einer einzelnen *G. metallireducens*-Zelle; als Aufnahmezeit wurden 1 s gewählt, mit einer Zeitdifferenz zwischen den Messungen von 0,3 s und einer Laserleistung von 4,2 mW; die Spektren sind zur besseren Veranschaulichung vertikal zueinander verschoben; der photobleichende Effekt für die Resonanz-Raman-Banden (746 cm^{-1} , 1128 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} und 1583 cm^{-1}) ist von oben nach unten leichthin sichtbar.

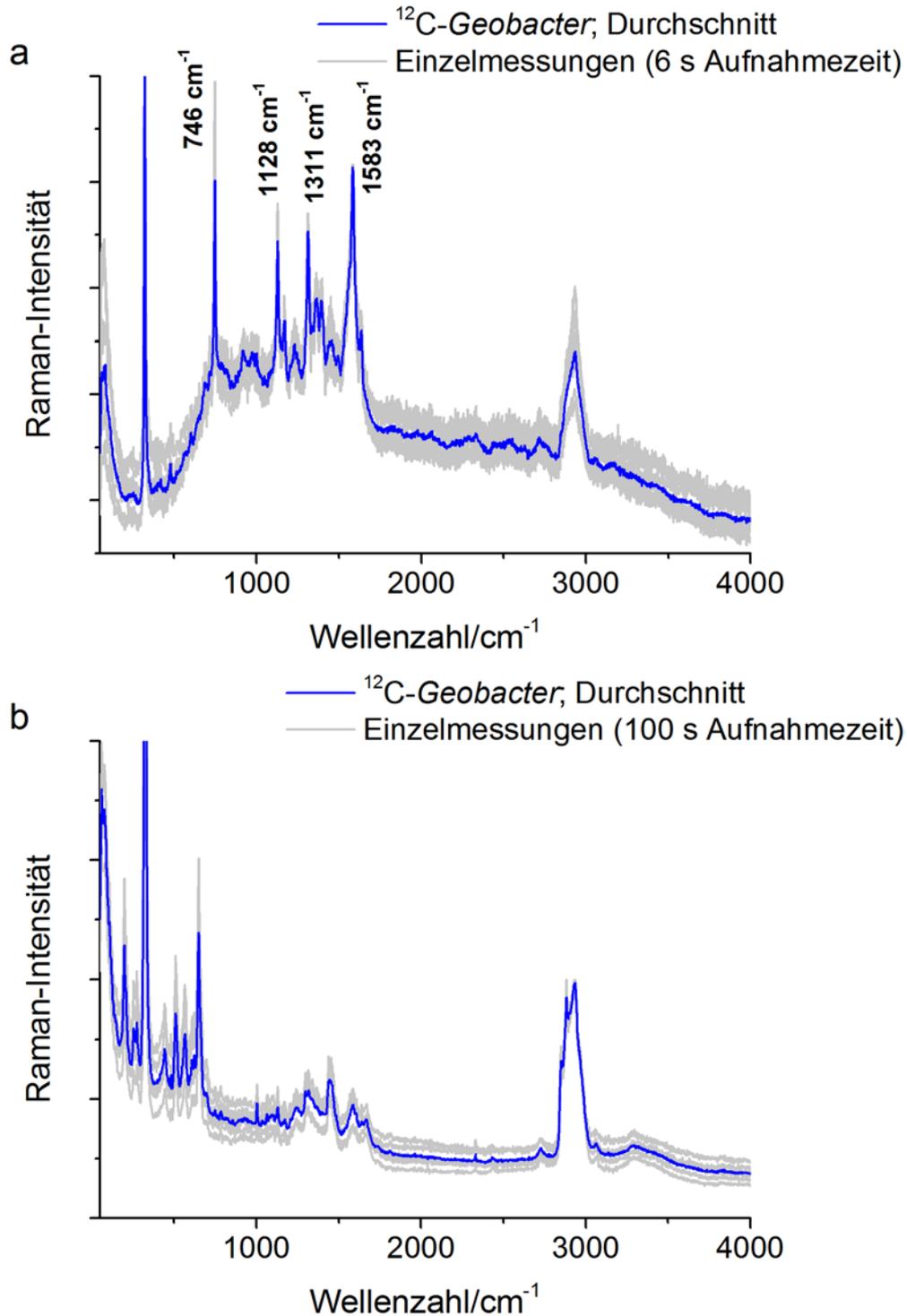


Abbildung 42 Resonanz-Raman-Spektren von einzelnen *G. metallireducens*-Zellen; zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit wurden 6 verschiedene Einzelmessungen von *G. metallireducens*-Zellen mit einer Aufnahmezeit von entweder (a) 6 s oder (b) 100 s überlagert.

Um die Aufnahme von Stabilisotopen in die Zelle zu untersuchen, wurden *G. metallireducens*, die mit ¹²C-Acetat kultiviert wurden, mit *G. metallireducens* verglichen, die mit vollständig markiertem ¹³C-Acetat oder vollständig deuteriertem Acetat

gezüchtet wurden. Eine signifikante Rotverschiebung der Cytochrom *c*-Banden von bis zu 13 cm^{-1} konnte für auf ^{13}C -Acetat gewachsene *G. metallireducens*-Zellen gefunden werden (siehe Abbildung 43). Es wurde keine bemerkenswerte Rotverschiebung (1 cm^{-1}) für die Porphyrinringatmung (745 cm^{-1}) beobachtet. Dies bedeutet, dass in dieser Schwingungsmode keine oder nur sehr wenige ^{13}C -Atome involviert waren. Die Banden bei 1128 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} und 1583 cm^{-1} (in ^{12}C -*G. metallireducens*) zeigen eine klare Rotverschiebung von etwa 5 cm^{-1} auf 1123 cm^{-1} , 1307 cm^{-1} und 1577 cm^{-1} (in ^{13}C -*G. metallireducens*). Die stärkste Rotverschiebung von etwa 13 cm^{-1} konnte für eine antisymmetrische C–C-Streckschwingung [215] mit der Bande bei 1638 cm^{-1} in ^{12}C -*G. metallireducens* gefunden werden. Diese insgesamt relativ geringe Rotverschiebung weist auf einen unvollständigen Austausch von ^{12}C mit ^{13}C während der Kultivierung hin. Um dies zu überprüfen, wurden ^{13}C -markierte *G. metallireducens*-Zellen nach Photobleichung mit einer Aufnahmezeit von 100 s untersucht. Bei dieser Analyse wurden Raman-Spektren, die den gesamten Fingerabdruck der Bakterien zeigen, aufgenommen. Bei vollständig ^{13}C -markierten Zellen sollte der für Phenylalanin spezifische Bereich nur eine Bande bei 968 cm^{-1} zeigen. Aber tatsächlich konnten Banden bei 978 cm^{-1} , 990 cm^{-1} und 1001 cm^{-1} nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44a). Diese Banden stammen von den Isotopologen des Phenylalanins mit weniger als 6 ^{13}C -Atomen in der aromatischen Ringstruktur [185] und zeigen deutlich, dass keine vollständige ^{13}C -Markierung vorhanden ist. Das verbliebene ^{12}C kann wahrscheinlich auf die Aufnahme von $^{12}\text{CO}_2$ aus der Atmosphäre und/oder aus dem NaHCO_3 -Puffer in die Zellbiomasse zurückzuführen sein. Allerdings ist die beobachtete Verschiebung eindeutig reproduzierbar (z.B. mit einer Abweichung von $\pm 0,5\text{ cm}^{-1}$ für die Bande bei 1577 cm^{-1}). Daher war die Detektion und Unterscheidung der ^{13}C -markierten Zellen trotzdem problemlos möglich.

Für die Bakterien, welche mit deuteriertem Acetat kultiviert wurden, sollte eine Verschiebung der Bande bei 1311 cm^{-1} (C–H-Beugungsschwingung des Cytochrom *c*) erwartet werden. Diese konnte aber nicht beobachtet werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ^2H nicht in Cytochrom *c* eingebaut wurde. Um festzustellen, ob Deuterium in andere Bestandteile der Biomasse und insbesondere in Phenylalanin eingebaut wurde, wurde das Fingerabdruckspektrum des ganzen Organismus mit einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgenommen. Eine Aufnahmezeit von 100 s wurde dabei gewählt, um eine vollständige Photobleichung der Resonanz-Raman-Banden zu erreichen. Die C– ^1H -Valenzschwingungsbande bei etwa 2900 cm^{-1} wurde teilweise rotverschoben auf etwa 2200 cm^{-1} (C– ^2H -Streckschwingung; siehe Abbildung 44b). In der Region von $\approx 1800\text{ cm}^{-1}$ bis $\approx 2800\text{ cm}^{-1}$ befinden sich üblicherweise bei bioorganischen Proben sonst keine Raman-Banden [216]. Dieser Bereich ermöglicht beispielsweise einen selektiven Nachweis deuterierter Substanzen in menschlichen Zellen [217]. Der Vergleich der Integrale beider Banden lässt auf einen Deuteriumgehalt von ungefähr 20 % in den analysierten *G. metallireducens*-Proben schließen. Erklären lässt sich dieser niedrige Deuteriumgehalt durch den Austausch von Deuterium mit Protonen aus Wasser. Die Phenylalaninbande zeigt eine teilweise Rotverschiebung von 1001 cm^{-1} auf 988 cm^{-1} , 975 cm^{-1} und 960 cm^{-1} . Die Bande bei 960 cm^{-1} wird hierbei der Ringat-

mung vollständig deuterierten Phenylalanins zugeordnet [218,219] Daher kann angenommen werden, dass, analog zum Bandenmuster beim ^{13}C -Einbau in N47-Zellen (siehe Kapitel 4.2), auch Isotopologe des Phenylalanins mit weniger als 5 Deuteriumatomen für die Banden bei 988 cm^{-1} und 975 cm^{-1} verantwortlich sind. Wahrscheinlich stammt die Bande bei 988 cm^{-1} von Phenylalanin mit nur einem Deuteriumatom im Ring (analog der Rotverschiebung dieser Bande in Toluol von 1004 cm^{-1} auf 987 cm^{-1} in $4\text{-}^2\text{H}_1\text{-Toluol}$ [220]).

Diese Daten zeigen, dass die Resonanz-Raman-Mikrospektroskopie eine schnelle und nachweisstarke Analyse des ^{13}C -Einbaus in Biomasse von chromophorhaltigen Mikroorganismen ermöglicht. Die Anwendung von deuterierten Substraten beeinflusst nicht die Resonanz-Raman-Banden des verwendeten Chromophors, sondern erzeugt vielmehr neue Banden in der Phenylalaninregion und in dem Raman-Bereich zwischen $\approx 1800\text{ cm}^{-1}$ und $\approx 2800\text{ cm}^{-1}$, der sonst keine Raman-Signale aufweist. Daher kann die Markierung mit Deuterium eine attraktive Alternative zur ^{13}C -Markierung darstellen, um den Einbau stabilisotopenmarkierter Substrate in Biomasse auf Einzelzellniveau zu verfolgen. Die Anwendung von SIRM für die Analyse von chromophorehaltigen Bakterien kann komplementäre Informationen über das Chromophor (z. B. Cytochrom *c*) und den Gesamtorganismus-Fingerabdruck eines einzelnen Bakteriums bereitstellen, welche vor bzw. nach dem Photobleichung gemessen wurden.

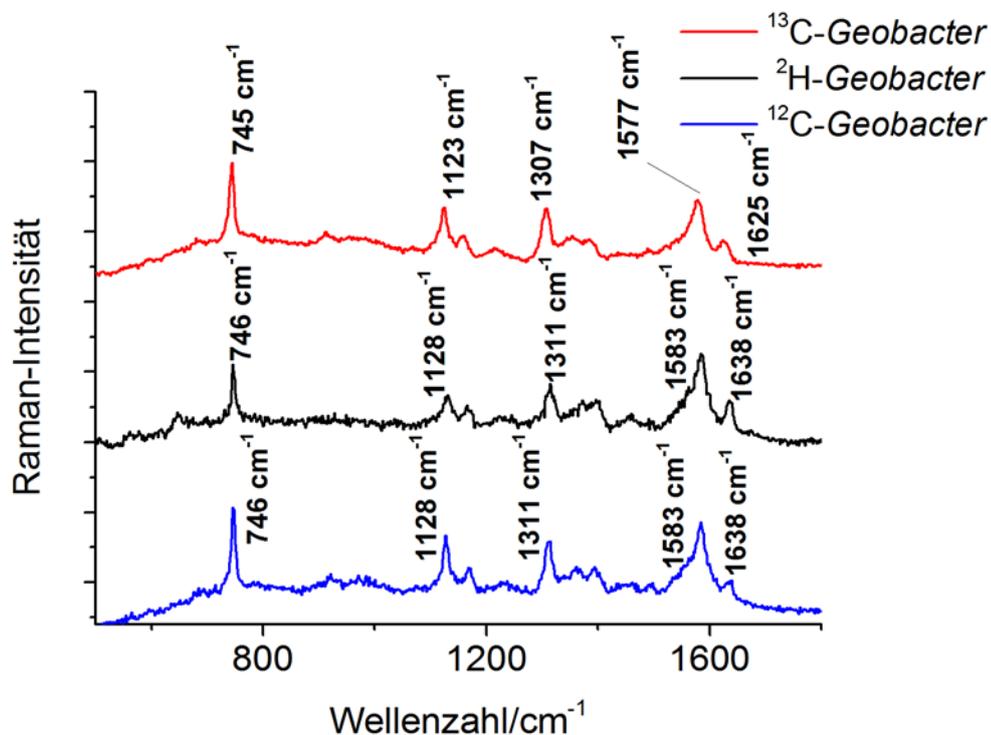


Abbildung 43 Ausschnitt der Resonanz-Raman-Spektren von einzelnen *G. metallireducens*-Zellen, die mit unmarkiertem (^{12}C)-Acetat, deuteriertem (^2H)-Acetat oder ^{13}C -markiertem Acetat kultiviert wurden; für die Spektren wurde eine Aufnahmezeit von 6 s verwendet.

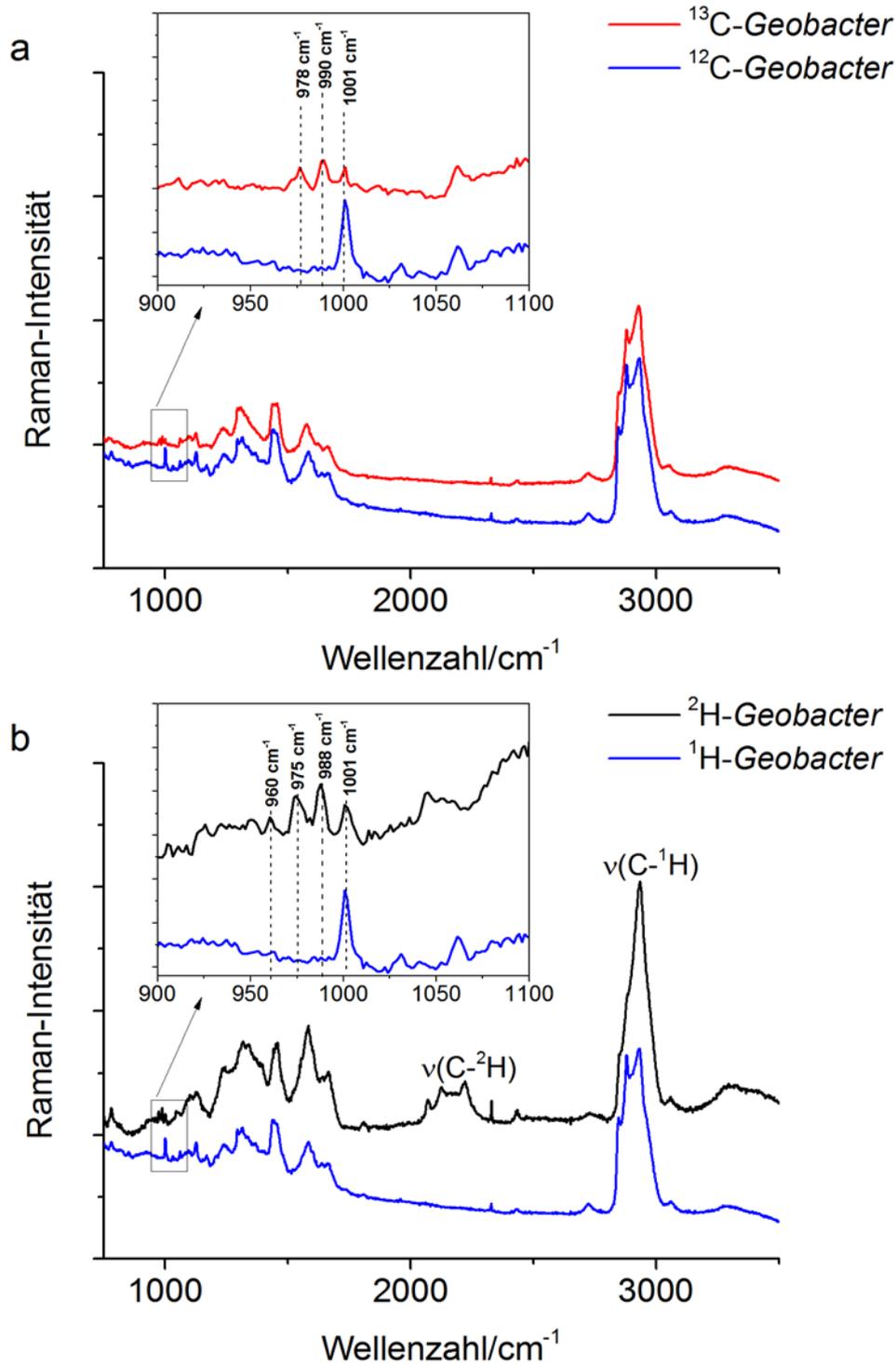


Abbildung 44

Stabilisotopen-Raman-Spektren von Einzelzellen des Mikroorganismus *G. metallireducens*, welche mit ^{12}C -Acetat und (a) ^{13}C -markiertem Acetat oder (b) deuteriertem Acetat kultiviert wurden; vergrößert dargestellt ist die Phenylalaninregion um 1000 cm^{-1} und das Bandenmuster der Isotopologen; die ^2H -Isotopologen befinden sich bei 960 cm^{-1} , 975 cm^{-1} , 988 cm^{-1} und 1001 cm^{-1} ; die ^{13}C -Isotopologen befinden sich bei 978 cm^{-1} , 990 cm^{-1} und 1001 cm^{-1} ; für alle Spektren wurde eine Aufnahmezeit von 100 s verwendet.

4.4 SERS-Analyse des *E. coli*-Stamms DSM 1116

Die Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) wird in Kombination mit RM angewendet, um eine schnelle und nachweisstarke Analyse einzelner Bakterienzellen zu ermöglichen [8-10]. Eine *in situ* SERS-Methode konnte erfolgreich verwendet werden, um die Raman-Signale von unmarkierten (^{12}C), 50 % ^{13}C -markierten ($^{12}\text{C}:^{13}\text{C}$, 1:1) und ^{13}C -markierten *E. coli*-Zellen zu verstärken. Abbildung 45 zeigt eine optische Mikroskopaufnahme einzelner *E. coli*-Zellen in Kontakt mit *in situ* SERS-Nanopartikeln.

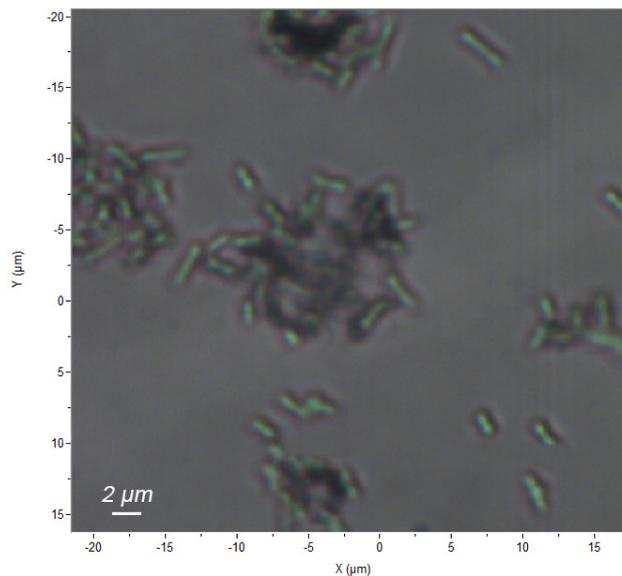


Abbildung 45 Optische Mikroskopaufnahme einzelner *E. coli*-Zellen in Kontakt mit *in situ* SERS-Nanopartikeln.

Eine SERS-Gesamtverstärkung von etwa 10^4 wurde für die C-H-Streckschwingung bei ungefähr 2900 cm^{-1} gefunden. Dazu wurden die Spektren der einzelnen mit ^{12}C - oder ^{13}C -Glucose kultivierten *E. coli*-Zellen verglichen. Die SERS-Spektren von ^{12}C - und ^{13}C -Zellen zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit (siehe Abbildung 46). Insbesondere konnte eine sehr scharfe Bande bei 733 cm^{-1} für ^{12}C -*E. coli* gefunden werden. Sie konnte Adenin oder Adeninderivaten zugeordnet werden [91,134]. Auf die genaue Herkunft dieser Bande wird in Kapitel 4.5 genauer eingegangen. Diese markante Bande weist in Bezug auf den Rest des Spektrums eine hohe Intensität auf. Sogar bei einem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis des gesamten Spektrums konnte diese Bande einfach nachgewiesen werden. Daher ist diese Bande ein sehr guter Kandidat für eine Markerbande für den Isotopeneinbau in Biomasse bei SERS-SIRM. Es konnte eine eindeutige Rotverschiebung (13 cm^{-1}) der SERS-Bande bei 733 cm^{-1} in ^{12}C -*E. coli* auf 720 cm^{-1} in ^{13}C -*E. coli* und eine Rotverschiebung von 7 cm^{-1} auf 726 cm^{-1} in 50 % ^{13}C -*E. coli* in basislinienkorrigierten SERS-Spektren beobachtet werden. Die Bande der 50 % ^{13}C -*E. coli*-Zellen zeigt eine leichte Bandenverbreiterung gegenüber den Banden der komplett (un)markierten Zellen (siehe Abbildung 47). Dies

deutet auf das Vorhandensein verschiedener Isotopologe des Adenins hin. Auch zeigen die Verschiebung und die genaue Lage der Bande in der Mitte zwischen der ^{12}C - und ^{13}C -Bande, dass die Verschiebung ausschließlich auf den Einbau des ^{13}C -Isotops zurückzuführen ist.

Diese Methode ermöglicht somit eine schnelle Erkennung und Unterscheidung von normalen unmarkierten ^{12}C -*E. coli*-Zellen und ^{13}C -stabilisotopenmarkierten *E. coli*-Zellen mittels SERS. Mit dieser erhöhten Nachweisstärke wäre es möglich eine SIRM-Analyse in Kombination mit SERS als Technik zur raschen Charakterisierung der Isotopenmarkierung und Molekülzusammensetzung von Mikroorganismen auf Einzelzellniveau zu verwenden. In der Umweltmikrobiologie kann dieser Ansatz neue Möglichkeiten für eine nachweisstarke Analyse mannigfaltiger mikrobiologischer Prozesse eröffnen, z. B. dem Abbau von Schadstoffen, dem Kohlenstofffluss und der Verfolgung von Stoffwechselwegen. Das folgende Kapitel ist in diesem Zusammenhang eine Konzeptstudie, um die Herkunft einer Bande im SERS-Spektrum mittels Stabilisotopenmarkierung aufzuklären und zu charakterisieren.

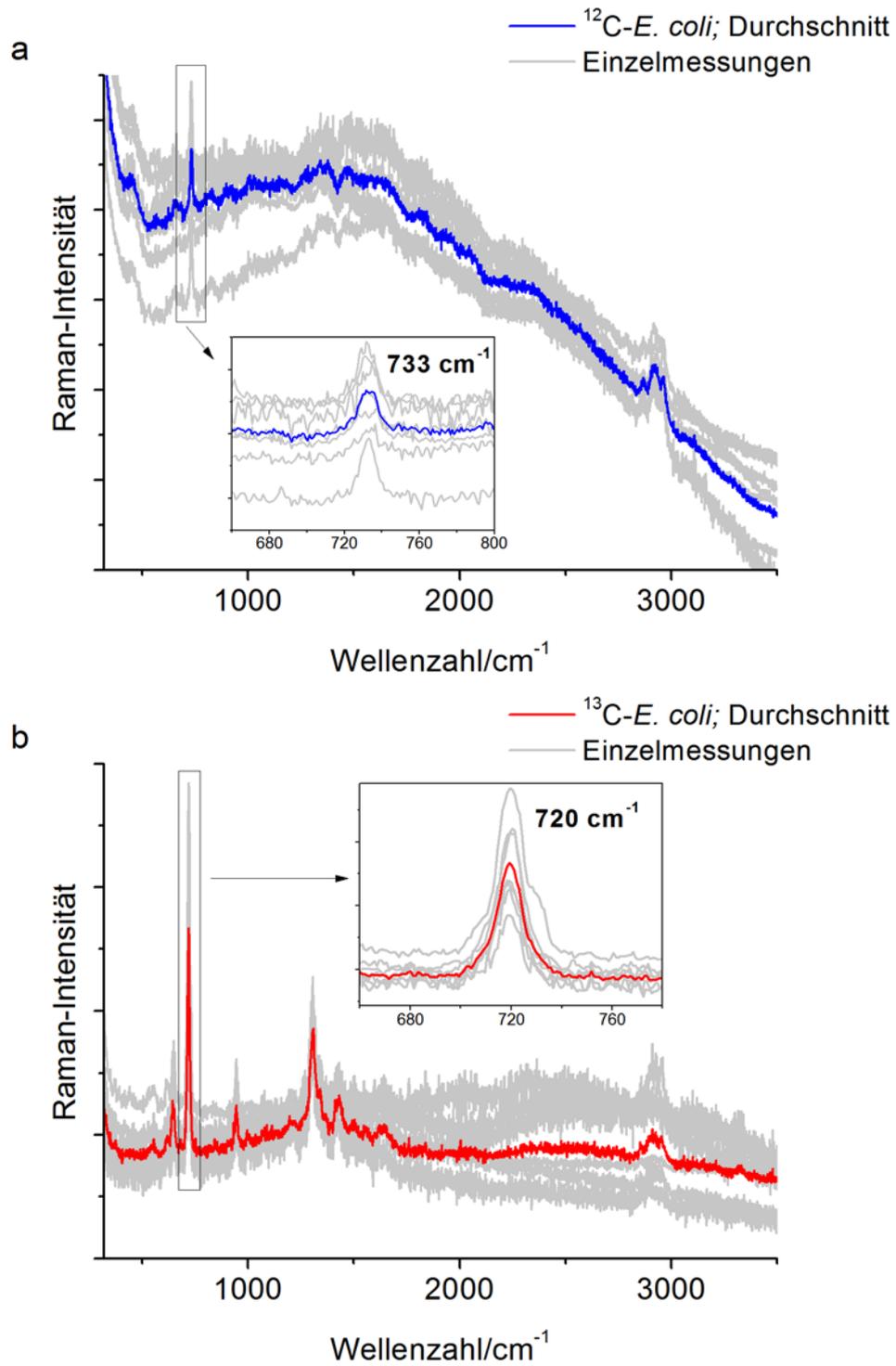


Abbildung 46 SERS-Spektren von einzelnen *E. coli*-Zellen, welche mit (a) ¹²C-Glucose oder (b) ¹³C-Glucose kultiviert wurden; zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit wurden 7 verschiedene Einzelzellmessungen der *E. coli*-Zellen überlagert; vergrößert dargestellt ist der Bereich mit den Banden bei 733 cm⁻¹ und 720 cm⁻¹.

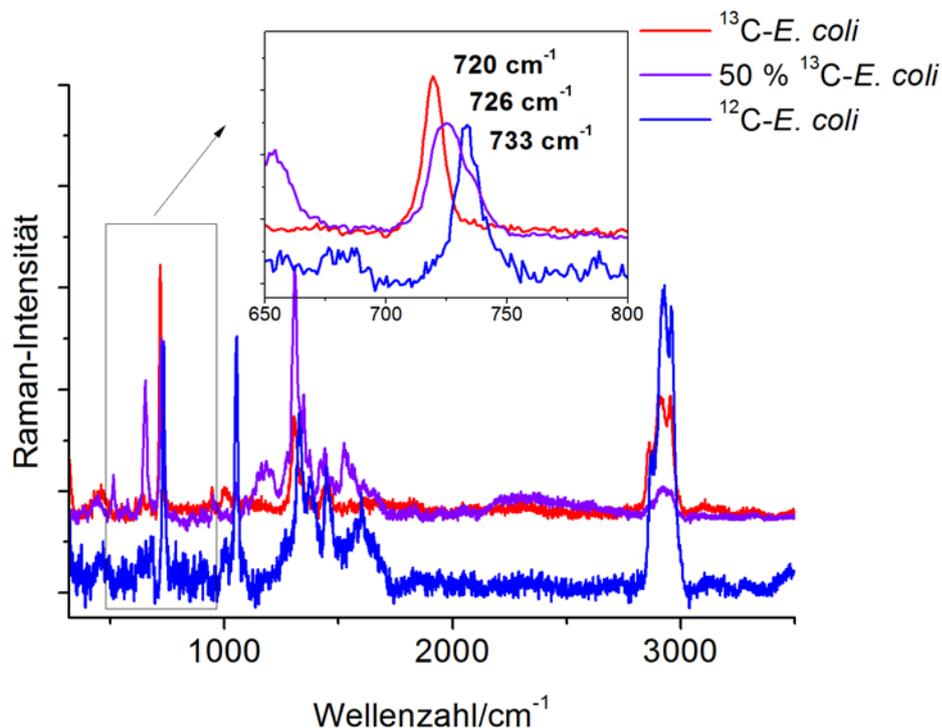


Abbildung 47 SERS-Spektren von einzelnen *E. coli*-Zellen, welche mit ^{12}C -Glucose, 50 % ^{13}C -Glucose oder ^{13}C -Glucose kultiviert wurden; eine Rotverschiebung der SERS-Bande bei 733 cm^{-1} von ^{12}C - $E. coli$ auf 726 cm^{-1} für 50 % ^{13}C - $E. coli$ und auf 720 cm^{-1} für ^{13}C - $E. coli$ konnte in den SERS-Spektren gefunden werden.

4.5 SERS-Analyse zur Zuordnung von SERS-Banden

Das Hauptmerkmal der SERS-Spektren von Bakterien ist oft die scharfe Bande in der Region von $720 - 735 \text{ cm}^{-1}$ [200] (siehe auch Kapitel 4.4). Vorausgegangene SERS-Studien von Bakterien haben für diese Region verschiedenste Zuordnungen vorgeschlagen. In der Regel wurden Referenzverbindungen mit den SERS-Spektren verglichen und auf dieser Basis wurden die Schlussfolgerungen und Bandenzuweisungen vorgenommen. Die hohe Nachweisstärke der SERS-Technik für die äußere bakterielle Zellschicht macht die Zuordnung dieser Bande zu Komponenten der Zellmembran möglich. Diese Bande könnte daher den Polysaccharid-Schwingungsmoden zugeordnet werden, da die Zellwände von Bakterien aus Peptidoglycanen bestehen, welche *N*-Acetyl-D-Glucosamin (NAG) enthalten. Es wurde daher vorgeschlagen, dass diese Bande der glycosidischen Ringschwingung zugewiesen werden kann, da die SERS-Spektren von D-Glucose und NAG ebenfalls eine intensive Bande bei etwa 730 cm^{-1} aufweisen [155]. Substanzen wie Aminosäuren und Phospholipide zeigen in diesem Bereich auch SERS-Banden [155,221,222]. Weiterhin wurde in einer normalen Raman-Analyse von Bakterien die Bande bei 725 cm^{-1} der CH_2 -Wiegenschwingung zugeordnet [223]. Auch die O-P-O-Schwingungsmode einer Phosphatgruppe wurde vorgeschlagen [10]. Da die Zellwand bekanntermaßen für die SERS-Verstärkung äußerst empfindlich ist, wurde die starke Bande bei 735 cm^{-1} solchen Molekülen zugeschrieben, welche die

Adeningruppe in ihrer chemischen Struktur aufweisen und auf oder in der Zellwandstruktur lokalisiert sind [134,222,224]. Die starke Schwingung bei 735 cm^{-1} ist besonders charakteristisch für DNA und dient oft als Marker [6,147,225-228]. Es ist allerdings wenig wahrscheinlich, dass DNA in ihrer nativen Form für diese Adeninbasierten Raman-Banden verantwortlich ist, da die anderen Nukleinbasen ebenfalls beobachtet werden müssten [225]. Daher kann das Auftreten dieser starken Bande bei 735 cm^{-1} für eine etwaige DNA-Denaturierung stehen [6]. Andere wichtige Adeninderivate oder adeninhaltige Moleküle, welche entscheidend für mannigfaltige biochemische Prozesse in bakteriellen Zellen sind, sind RNA, FAD, NAD, NADH, AMP, ADP oder ATP [91,134,147]. Auch wurde das Purinderivat Hypoxanthin vorgeschlagen [229,230]. In diesem Zusammenhang beschreibt eine Arbeit von Guzelian *et al.* einen Vergleich zwischen Molekülen, welche die Adeninfunktionalität enthalten, mit SERS-Spektren von Bakterien [222]. In einer Studie von Kahraman *et al.* wurden verschiedene Bakterienarten, ihre isolierte DNA und ihre isolierte Peptidoglycanschicht analysiert, um Informationen über die Wechselwirkung der Silbernanopartikel mit den Bakterien zu erhalten. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die SERS-Spektren von Bakterien wahrscheinlich von solchen adeninhaltigen Molekülen stammen, die sich in der bakteriellen Zellwand befinden. Auch Beiträge von Molekülen, die von der Zelloberfläche abgelöst sind, wurden diskutiert [134]. Jedoch wird die Anwesenheit von adeninhaltigen Verbindungen auf der äußersten Zelloberfläche der Bakterien nicht schlüssig erklärt [222]. Es ist auch anzumerken, dass alle vorgeschlagenen Bandenzuordnungen bei etwa 730 cm^{-1} auf den SERS-Spektren von Bakterien korrekt sein könnten und sich die Signale der verschiedenen Substanzen auch überlappen könnten [147].

Um die Herkunft dieser SERS-Bande bei etwa 730 cm^{-1} detailliert aufzuklären, wurde hier eine SIRM-Analyse unter Verwendung von *in situ* produzierten Silberkolloiden (SERS) angewendet. Es wurden vier *E. coli*-Proben, die jeweils auf unmarkierten (^{12}C , ^{14}N) und markierten (^{13}C , ^{15}N) Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in verschiedenen Kombinationen kultiviert wurden, analysiert. Die SERS-Spektren der verschiedenen markierten Zellen zeigen hierbei eine hohe Reproduzierbarkeit (siehe Abbildung 46 und 48). Die spektralen Veränderungen für die unterschiedlich markierten *E. coli*-Zellen sind in Abbildung 49a ersichtlich. Besonders die SERS-Bande bei 733 cm^{-1} in ^{12}C - ^{14}N -*E. coli* zeigt eine Rotverschiebung auf 720 cm^{-1} in ^{13}C - ^{14}N -*E. coli*, auf 717 cm^{-1} in ^{12}C - ^{15}N -*E. coli* und sogar auf 707 cm^{-1} in ^{13}C - ^{15}N -*E. coli* in basislinienkorrigierten SERS-Spektren (siehe Abbildung 49b). Eine weitere relativ starke Bande bei 1330 cm^{-1} in ^{12}C - ^{14}N -*E. coli* ist rotverschoben auf 1317 cm^{-1} in ^{12}C - ^{15}N -*E. coli*, auf 1309 cm^{-1} in ^{13}C - ^{14}N -*E. coli* und auf 1293 cm^{-1} in ^{13}C - ^{15}N -*E. coli*.

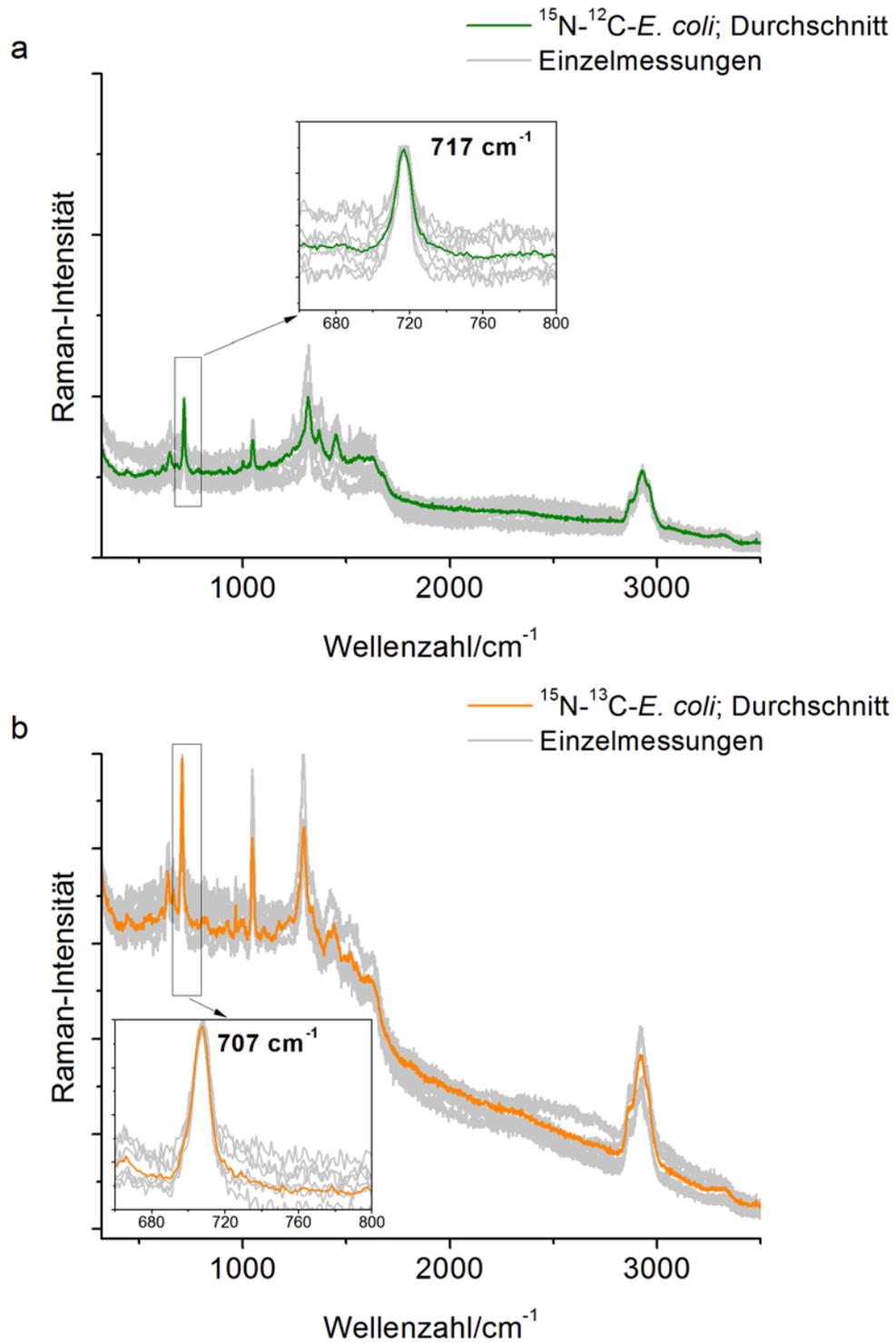


Abbildung 48 SERS-Spektren von einzelnen *E. coli*-Zellen, welche mit (a) ^{15}N -Ammoniumchlorid oder (b) ^{13}C -Glucose und ^{15}N -Ammoniumchlorid kultiviert wurden; zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit wurden 7 verschiedene Einzelzellmessungen der *E. coli*-Zellen überlagert; vergrößert dargestellt ist der Bereich mit den Banden bei 717 cm^{-1} und 707 cm^{-1} .

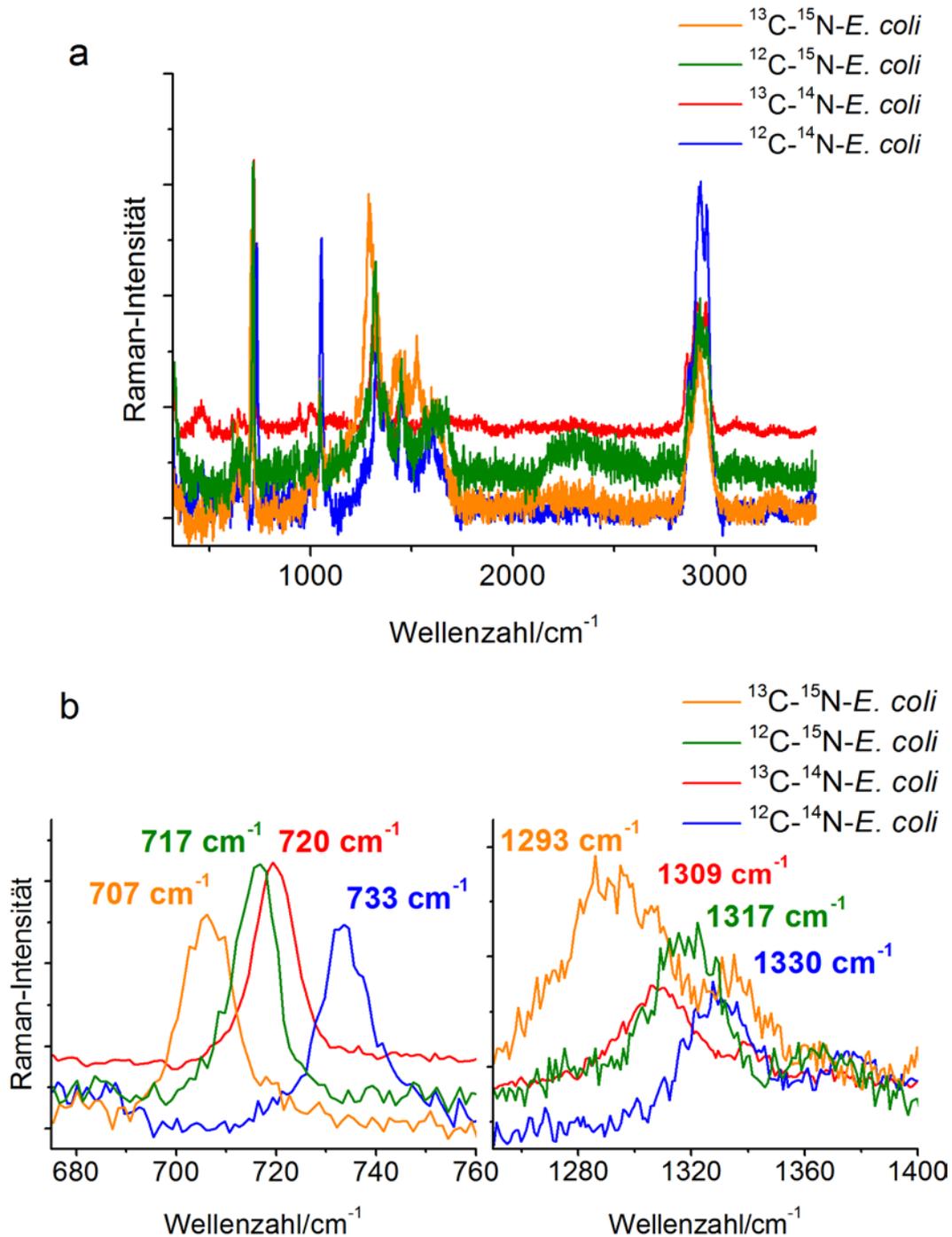


Abbildung 49 (a) SERS-Spektren von einzelnen *E. coli*-Zellen, welche mit ^{12}C -Glucose/ ^{14}N -Ammoniumchlorid, ^{13}C -Glucose/ ^{14}N -Ammoniumchlorid, ^{12}C -Glucose/ ^{15}N -Ammoniumchlorid oder ^{13}C -Glucose/ ^{15}N -Ammoniumchlorid kultiviert wurden; (b) Rotverschiebung der SERS-Bande bei 733 cm^{-1} von ^{12}C - ^{14}N -*E. coli* auf 720 cm^{-1} in ^{13}C - ^{14}N -*E. coli*, auf 717 cm^{-1} in ^{12}C - ^{15}N -*E. coli* und auf 707 cm^{-1} in ^{13}C - ^{15}N -*E. coli* konnte in den SERS-Spektren gefunden werden; die Bande bei 1330 cm^{-1} von ^{12}C - ^{14}N -*E. coli* ist rotverschoben auf 1317 cm^{-1} in ^{12}C - ^{15}N -*E. coli*, auf 1309 cm^{-1} in ^{13}C - ^{14}N -*E. coli* und auf 1293 cm^{-1} in ^{13}C - ^{15}N -*E. coli*.

Um die beobachteten Bandenverschiebungen zu bestätigen und die Reproduzierbarkeit der Einzelzellsignaturen der verschiedenen markierten *E. coli*-Proben zu demonstrieren, wurden die erhaltenen Spektren einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) unter Verwendung von MATLAB R2013b unterzogen. Die Spektren wurden zuerst mit der integrierten Entrauschungsmethode von LabSpec 6.3 zur Verbesserung der spektralen Qualität entrauscht. Nach Berechnung der ersten Ableitung, welche störendes Hintergrundsignal eliminiert, konnten diese Datensätze für die PCA verwendet werden.

Für die erste PCA wurde der Wellenzahlbereich von $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$ verwendet, um die beobachtete Rotverschiebung der Bande bei 733 cm^{-1} zu bestätigen. Abbildung 50a zeigt, dass beide Hauptkomponenten PC1 und PC2 eine nahezu ähnliche absolut aufgeklärte Varianz (*total explained variance*, TEV) mit 46,57 % bzw. 41,61 % aufweisen. Die ersten vier Hauptkomponenten erklärten 94,3 % der gesamten Datenvarianz. PC1 spiegelt die Verschiebung der ^{12}C - ^{14}N - und ^{13}C - ^{15}N -Proben aus einem kombinierten ^{13}C - ^{14}N - und ^{12}C - ^{15}N -Cluster wider. Dieses Clustering trennt die nicht- (^{12}C - ^{14}N), partiell (^{13}C - ^{14}N , ^{12}C - ^{15}N) und vollständig markierten (^{13}C - ^{15}N)-Proben problemlos, versagt jedoch die teilweise markierten Proben voneinander zu trennen. Während das Clustering auf der Basis von PC2 direkt die Rotverschiebung der Bande der verschiedenen Proben widerspiegelt und somit jede Probe voneinander trennt. Beide Hauptkomponenten in der Kombination zeigen daher ein geeignetes Clustering der verschiedenen markierten *E. coli*-Zellen.

Für das zweite PCA-Diagramm (Abbildung 50b) wurde der Fingerabdruckbereich von $600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ verwendet, um eine direkte Unterscheidung der verschiedenen markierten *E. coli*-Proben zu demonstrieren. Die ersten vier Hauptkomponenten erklärten 80 % der TEV. Der *score plot* für PC1 versus PC3 ergibt die beste Unterscheidung für alle verschiedenen markierten *E. coli*-Proben. PC1 spiegelt hauptsächlich die Änderungen in den Spektren aufgrund des ^{15}N -Einbaus wider und trennt daher die ^{12}C - $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -markierten Proben. PC1 ist jedoch nicht in der Lage die Proben, die mit ^{13}C markiert sind, unabhängig von der Stickstoffmarkierung zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu trennt PC3 problemlos die ^{13}C -markierten und unmarkierten Proben, aber nur, wenn kein ^{15}N eingebaut ist. Die Kombination von PC1 und PC3 zeigt daher eine sehr gute und korrekte Clusterbildung der unterschiedlich markierten *E. coli*-Zellen, welcher direkt mit dem Einbau der verschiedenen Isotope korreliert.

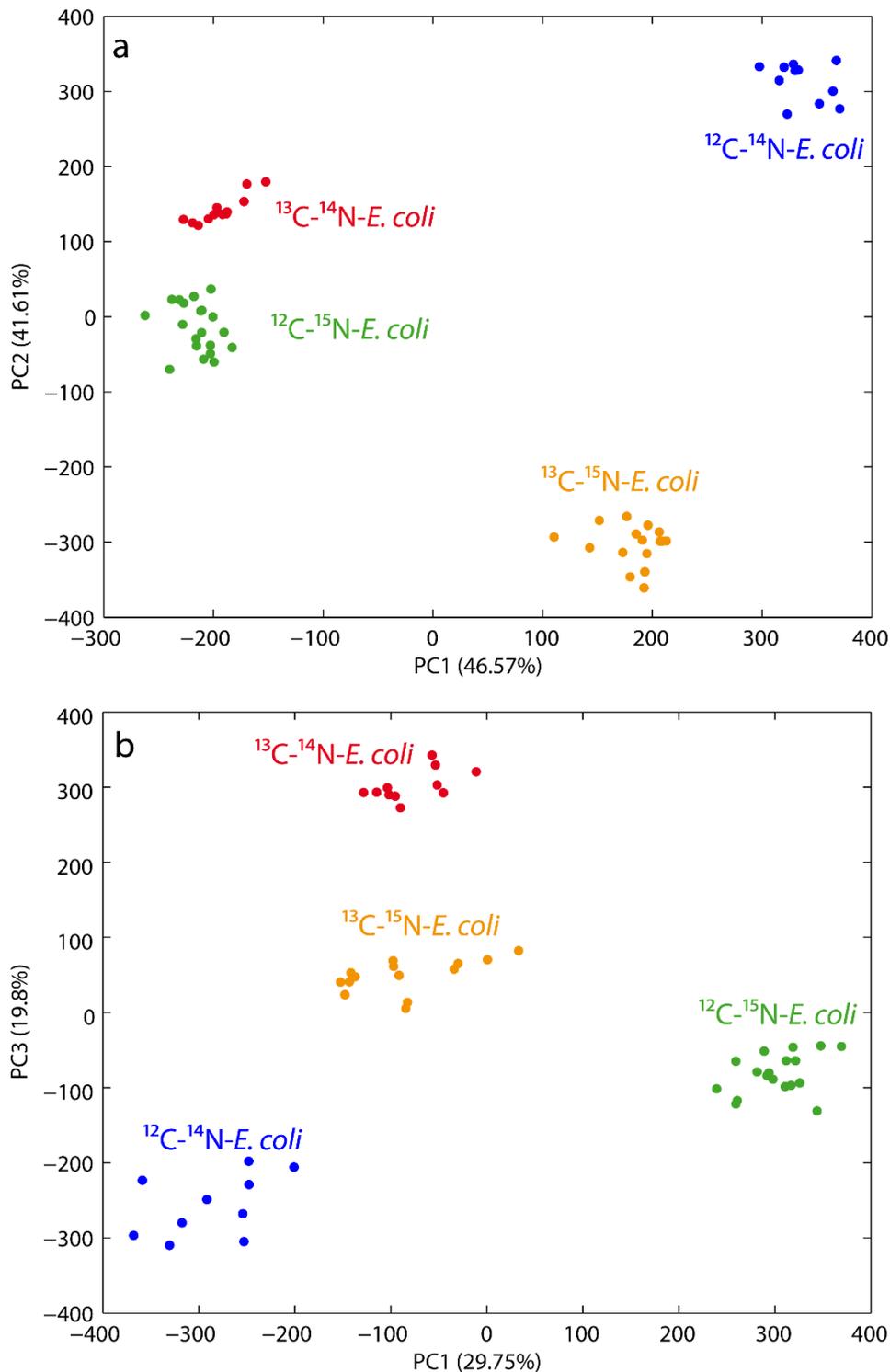


Abbildung 50 (a) Die Hauptkomponentenanalyse (PC1 versus PC2) zeigt vier klar aufgelöste Cluster für *E. coli*-Zellen mit jeweils unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung ($^{12}\text{C}-^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}-^{14}\text{N}$, $^{12}\text{C}-^{15}\text{N}$ und $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$); für diese Analyse wurde der Wellenzahlbereich der SERS-Spektren von $600 - 800 \text{ cm}^{-1}$ verwendet; (b) der PCA score plot (PC1 versus PC3) zeigt vier klar aufgelöste Cluster für *E. coli*, jeweils mit den gleichen Isotopenzusammensetzung wie oben erwähnt, für diese Analyse wurde der Fingerabdruckbereich der SERS-Spektren von $600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

Die charakteristische Bande bei 733 cm^{-1} ist scharf und zeigt eine vollständige Rotverschiebung ohne Restintensität an der ursprünglichen Position für alle vier verschiedenen Stabilisotopenmarkierungen. Auch keine Bandenverbreiterung oder Bandenaufspaltung, die auf das Vorhandensein verschiedener Substanzen oder Isotopologen hinweisen würden, konnte nachgewiesen werden. Im vorherigen Kapitel wurde auch festgestellt, dass die Rotverschiebung dieser SERS-Bande ausschließlich durch den Einbau der Stabilisotopen verursacht wird. Diese Bande kann daher nur einer einzigen Schwingungsmode zugeordnet werden. Darüber hinaus sind aufgrund der Rotverschiebung bei Verwendung der ^{15}N -Markierung nur Vibrationsmoden mit Stickstoff möglich. Daher können Verbindungen ohne Stickstoff nicht zu dieser Bande beitragen. Deswegen können C–H-, C–C- und O–P–O-Schwingungsmoden und viele Polysaccharide (glykosidische Ringatmung) und Kohlenhydrate ausgeschlossen werden. Die hohe Rotverschiebung von 16 cm^{-1} erfordert auch eine Schwingungsmode, bei der Stickstoff direkt beteiligt ist. Der Stickstoff in *N*-Acetyl-D-Glucosamin befindet sich nicht in der Ringstruktur, weshalb der Einfluss der ^{15}N -Markierung auf die glykosidische Ringatmung und damit die Rotverschiebung nur sehr gering ist. Daher kann diese Bande nicht der glykosidischen Ringatmung von *N*-Acetyl-D-Glucosamin zugeordnet werden. Phospholipide und Aminosäuren hingegen würden in diesem Bereich nur eine C–N-Streckschwingung zeigen. Dieser Mode sollte der einfachen Regel folgen, dass der genaue Wert der Rotverschiebung von der relativen Massenänderung der beteiligten Atome abhängig ist. Die relative Massenveränderung bei der Substitution von ^{12}C mit ^{13}C ist etwas höher als bei der Substitution von ^{14}N mit ^{15}N . Daher sollte die Position der ^{13}C - ^{14}N -Bande in den Spektren bei einer niedrigeren Wellenzahl liegen als die Bande von ^{12}C - ^{14}N . Tatsächlich aber liegt die Bande von ^{13}C - ^{14}N -*E. coli* bei 720 cm^{-1} , während die Bande von ^{12}C - ^{15}N -*E. coli* bei 717 cm^{-1} gefunden werden kann. Dies führt zu dem Schluss, dass eine einfache C–N-Streckschwingung nicht für dieses offensichtlich komplexere spektrale Merkmal in den Spektren verantwortlich ist. In den SERS-Spektren von Adenin oder Adenin-ähnlichen Substanzen wie Adenosin oder ATP kann eine sehr starke Bande im Bereich von $730 - 735\text{ cm}^{-1}$ und eine zweite relativ starke Bande bei ca. 1330 cm^{-1} gefunden werden [225,231]. Die genaue Übereinstimmung dieser Schwingungen zu den Banden in den SERS-Spektren von *E. coli* ist bemerkenswert. Die Bande um 730 cm^{-1} wird der ebenflächigen Ringatmung von Pyrimidin und Imidazol zugeordnet [232,233]. Es ist bekannt, dass Ringatmungsmoden in der SERS-Analyse von organischen Verbindungen besonders stark verstärkt werden. Weiterhin besitzt das Molekül vier in der Ringstruktur befindliche Stickstoffatome und ein Stickstoffatom in der Seitenkette, was die hohe Rotverschiebung von 733 cm^{-1} in ^{12}C - ^{14}N -*E. coli* auf 717 cm^{-1} in ^{12}C - ^{15}N -*E. coli* in den SERS-Spektren von ^{15}N -markierten *E. coli* erklärt. Zusätzlich zeigt die Bande bei etwa 1330 cm^{-1} eine Rotverschiebung auf 1293 cm^{-1} in ^{15}N markierten *E. coli*-Zellen. Daher ist sicher davon auszugehen, dass Stickstoff auch an dieser Schwingung beteiligt ist. Es kann somit gefolgert werden, dass die Bande bei etwa 730 cm^{-1} Adenin und genauer gesagt der ebenflächigen Ringatmung von Adenin zugeordnet werden kann. Es ist anzumerken, dass eine Reihe von adeninhaltigen Verbindungen (FAD, NAD, usw.), sowie verschiedene Produkte des Purinab-

bauweges (z. B. Hypoxanthin [229]) einen Purinanteil enthalten und zu dieser Bande beitragen können. Daher ist für die eindeutige Bandenzuordnung eine weitere detaillierte Analyse unmarkierter und stabilisotopenmarkierter Referenzverbindungen mit dem Purinanteil erforderlich. An dieser Stelle sei angemerkt, dass diese Ergebnisse kürzlich von Premasiri *et al.* bestätigt wurden. Die Autoren analysierten verschiedene Mikroorganismen mittels SERS, welche sich auf spezifische Weise im Purinmetabolismus unterscheiden [156].

Die hier gezeigten Resultate unterstreichen die einzigartige Fähigkeit dieser Stabilisotopenmarkierungsmethode, bestimmte spektrale Merkmale von SERS-Spektren in Mikroorganismen zu verstehen. Mit Hilfe der ^{15}N -Markierung konnte die häufig verwendete SERS-Bande bei 733cm^{-1} erfolgreich adeninhaltigen Verbindungen zugordnet werden. Darüber hinaus konnte erstmals die Unterscheidung von *E. coli*-Bakterien mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}/^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) auf Grundlage von Einzelzell-SERS-Spektren gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden durch eine Hauptkomponentenanalyse des Fingerabdruckbereichs der SERS-Spektren bestätigt. Dies beweist eindeutig, dass SERS-Fingerabdruckspektren von stabilisotopenmarkierten Bakterien dazu beitragen können, spezifische Bakterien auf Einzelzellebene zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies sind die ersten reproduzierbaren SERS-Daten von ^{15}N - und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -stabilisotopenmarkierten Mikroorganismen. Obwohl diese Arbeit mit den SERS-Spektren von *E. coli* vor allem auf die Bande bei 733cm^{-1} fokussiert war, sollte diese Technik auch zur Untersuchung komplexerer spektraler Merkmale in anderen Mikroorganismen verwendet werden können. Sie kann daher als mikrobiologische Technik verwendet werden, um letztendlich verschiedenste metabolische Wege zu verstehen und Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse in mikrobiellen Gemeinschaften darzustellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde das Potential der Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie für die zerstörungsfreie quantitative und räumlich aufgelöste Analyse des Einbaus stabilisotopenmarkierter Verbindungen in mikrobielle Biomasse untersucht. Abbildung 51 veranschaulicht die verschiedenen genutzten Verfahren zur Analyse von ^{13}C -, ^{15}N - und ^2H -isotopenmarkierter mikrobieller Biomasse und deren wichtigsten Ergebnisse. Unter Verwendung von $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Glucose und $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Phenylalanin als Referenzverbindungen wurden Kalibrationsmessungen angefertigt, um die Limitierungen für die Analyse von Mikroorganismen abzuschätzen. Es wurde eine lineare Beziehung zwischen dem Verhältnis einer ausgewählten Bande bei ihren ^{13}C - und ^{12}C -Maxima und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis für $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Mischungen von Referenzsubstanzen mit hohem Korrelationsgrad gefunden. Das multivariate Kalibrierverfahren der kleinsten Quadrate wurde benutzt, um den ^{13}C -Gehalt der Referenzmischungen zu bestimmen. Es konnte hierbei ein linearer Trend mit Nachweisgrenzen von bis zu 3 % ^{13}C -Isotopengehalt gefunden werden. Dabei zeigte sich auch, dass die minimale absolute Menge an ^{13}C -Glucose, die in einer ^{12}C -Glucose-Matrix über SIRM ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) mit einem Laserspotdurchmesser von 721 nm nachgewiesen werden konnte, etwa 0,1 pg beträgt. Im Vergleich zu anderen Verfahren, wie beispielsweise einem auf Nukleinsäuren basierenden *stable isotope probing*, ermöglicht eine solche hohe Nachweisgrenze eine sehr empfindliche und quantitative Analyse der Stabilisotopenmarkierung von Mikroorganismen.

Die SIRM-Charakterisierung von ^{13}C -markierten N47-Zellen bestätigte das Bandenmuster der Isotopologe des Phenylalanins, welches von Li *et al.* für *E. coli*-Zellen, die mit $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Glucose-Mischungen kultiviert wurden, beschrieben wurde [185]. Im Gegensatz dazu wurden die N47-Zellen in dieser Arbeit strikt anaerob auf ^{13}C -Naphthalin kultiviert. Darüber hinaus legen die Ergebnisse einen Einbau von Hydrogencarbonat aus dem Medium in die Biomasse während des Zellwachstums des Stammes N47 auf Naphthalin nahe. Die Resonanz-SIRM von Cytochrom *c* enthaltenden *G. metallireducens* konnte mit Aufnahmezeiten von 6 s erfolgreich genutzt werden, um die ^{13}C -Aufnahme von einzelnen Bakterienzellen zu analysieren. Sogar Aufnahmezeiten von bis zu 1 s waren möglich, was eine schnelle Unterscheidung zwischen ^{12}C - und ^{13}C -markierten Bakterien ermöglichte. Die durch Resonanz-SIRM gewonnenen spektralen Informationen über die Chromophore konnten erfolgreich mit den Fingerabdruckspektren ergänzt werden, welche nach erfolgreicher Photobleichung erhalten werden konnten. Bei den ^2H -markierten Zellen ermöglichte die $\text{C}-^2\text{H}$ -Schwingungsbande bei $\approx 2200 \text{ cm}^{-1}$ eine optimale Unterscheidung zwischen normalen ^{12}C -Zellen und ^2H -markierten Bakterien. Obwohl der Deuteriumgehalt in den Zellen recht niedrig war ($\approx 20 \%$), wurde ein deutliches Bandenmuster aus verschiedenen deuterierten Isotopologen von Phenylalanin für ^2H -markierte Zellen gefunden. Die Deuteriummarkierung stellt somit eine gute Alternative zur ^{13}C -Markierung von Biomasse dar. Schlussendlich wurden SERS-Studien an *E. coli* durchgeführt, welche mit ^{13}C - und ^{15}N -Substraten kultiviert wurden. Mit einem Verstärkungsfaktor von etwa 10^4 war ein schneller Nachweis von stabilisotopenmarkierten *E. coli* mittels SERS möglich. Eine sehr scharfe Bande bei

733 cm^{-1} konnte für ^{12}C -*E. coli* gefunden werden. Sie war deutlich rotverschoben auf 720 cm^{-1} in ^{13}C -*E. coli*-Zellen, auf 717 cm^{-1} in ^{15}N -*E. coli*-Zellen und auf 707 cm^{-1} in ^{13}C - ^{15}N -*E. coli*-Zellen. Mit Hilfe der ^{15}N -Markierung konnte diese häufig verwendete SERS-Bande erfolgreich Verbindungen, welche die Adeninstruktur besitzen, zugeordnet werden. Dies demonstriert die einzigartige Fähigkeit des Stabilisotopenmarkierungsansatzes bestimmte spektrale Merkmale der SERS-Spektren von Mikroorganismen zu verstehen und zuzuordnen. Diese Ergebnisse konnten durch eine Hauptkomponentenanalyse des Fingerabdruckbereichs der SERS-Spektren bestätigt werden.

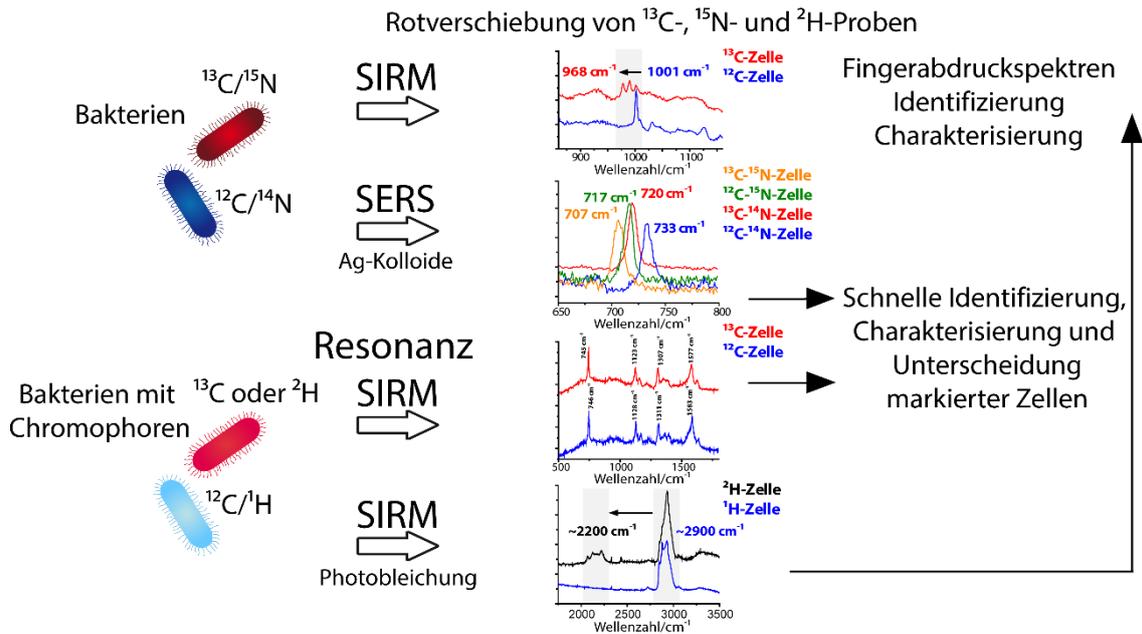


Abbildung 51 Verschiedene Verfahren, das heißt Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM), SERS und Resonanz-SIRM zur zerstörungsfreien quantitativen und räumlich aufgelösten Analyse der Inkorporation von ^{13}C -, ^{15}N - und ^2H isotope markierten Verbindungen in die mikrobielle Biomasse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass RM ein hohes Potential für die Charakterisierung von Mikroorganismen und Biofilmen in der Medizin und Umweltmikrobiologie besitzt. Insbesondere die Erhöhung der Raman-Nachweisstärke durch den Resonanzeffekt oder SERS, sowie die Kombination von RM mit der Stabilisotopenmarkierungen ermöglicht eine detaillierte Analyse komplexer Mikroorganismen und Biofilme und erweitert das Verständnis über die diversen Eigenschaften von mikrobiologischen Systemen. Insbesondere die Isotopenmarkierung kann in der Umweltmikrobiologie neue Möglichkeiten für eine nachweisstarke Analyse mannigfaltiger mikrobiologischer Fragestellungen eröffnen, z. B. dem Abbau von Schadstoffen, dem Kohlenstofffluss und der Verfolgung von Stoffwechselwegen. Die Anwendung der Stabilisotopentechnik zur direkten Detektion und Quantifizierung der Isotopenmarkierung (für ein oder mehrere Isotope) auf Einzelzellebene und damit die Analyse der metabolischen Aktivität und der metabolischen Funktionen von Mikroorganismen *in situ* und *in vivo* ist schnell wachsendes Themengebiet. Um diese analytischen Methoden in Zukunft zu verbessern, müs-

sen einige Anforderungen und Herausforderungen gemeistert werden: (i) Erhöhung des Verständnisses über die gewonnenen Daten; (ii) Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Analyse (insbesondere für SERS); (iii) Erstellung, Verbesserung und Erweiterung der Datenbanken für spektrale Signaturen; (iv) erhöhte Nachweisstärke aufgrund technischer Entwicklungen (z. B. empfindlichere CCD-Kamera) (v) Optimierung der Analyse für einen erhöhten Durchsatz; (vi) Verringerung der Analysezeit und -kosten. Erst aber die Kombination mit anderen Methoden zur Visualisierung und zur physikochemischen Charakterisierung führt zu einem umfassenden Verständnis komplexer und heterogener mikrobiologischer Systeme, wie z. B. Biofilmen, mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Beispielsweise sind signifikante Variationen der Biomassezusammensetzung abhängig von: (i) den vorliegenden Mikroorganismen und ihrer metabolischen Aktivität; (ii) den verfügbaren Nährstoffen und den Umweltbedingungen; (iii) der Entwicklungsphase des Biofilms. Für eine zuverlässige Analyse sind diese Parameter zu berücksichtigen. Mit diesem Wissen kann eine direkte Verbindung zu Biofilmfunktionen erreicht werden, welche wiederum zu einem besseren Verständnis dieser sehr komplexen und anspruchsvollen Systeme führt.

6. ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AFM	<i>engl. atomic force microscopy</i>
AgNP	Silbernanopartikel
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>engl. attenuated total reflection</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CARS	<i>engl. coherent anti-Stokes Raman spectroscopy</i>
CCD	<i>engl. charge-coupled device</i>
CLSM	<i>engl. confocal laser scanning microscopy</i>
Cryo-REM	Niedrigtemperaturrasterelektronenmikroskopie
DCLS	<i>engl. direct least-squares calibration</i>
DESI	<i>engl. desorption electrospray ionization</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESEM	<i>engl. environmental scanning electron microscopy</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
<i>G. metallireducens</i>	<i>Geobacter metallireducens</i>
HCA	<i>engl. hierarchical cluster analysis</i>
He-Ne	Helium-Neon
HOMO	<i>engl. highest occupied molecular orbital</i>
IDMS	Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LDA	<i>engl. linear discriminant analysis</i>
LOD	<i>engl. limit of detection</i>
LUMO	<i>engl. lowest unoccupied molecular orbital</i>
MALDI	<i>engl. matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Massenspektroskopie
NA	Numerische Apertur
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAG	<i>N</i> -Acetyl-D-Glucosamin
NanoSIMS	<i>engl. nanoscale secondary ion mass spectrometry</i>

Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NR	Normales Raman
OCT	<i>engl. optical coherence tomography</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. amoebophila</i>	<i>Protochlamydia amoebophila</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PAS	<i>engl. photoacoustic spectroscopy</i>
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i>
PC1/2/3	<i>engl. principal component score 1/2/3</i>
PCA	<i>engl. principal component analysis</i>
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PR	Präresonanz
QS	<i>engl. quorum sensing</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RM	Raman-Mikrospektroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Resonanz-Raman
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RS	Raman-Spektroskopie
SERRS	Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie
SIMS	<i>engl. secondary ion mass spectrometry</i>
SIP	<i>engl. stable isotope probing</i>
SIRM	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie
SPM	<i>engl. scanning probe microscopy</i>
SRS	<i>engl. stimulated Raman scattering</i>
ssNMR	<i>engl. solid state nuclear magnetic resonance</i>
SVM	<i>engl. support vector machine</i>
TERS	Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie
TEV	<i>engl. total explained variance</i>
<i>X. fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>

6.2 Chemikalien

¹³C₁₀-Naphthalin 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
¹³C₂-Natriumacetat 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
¹³C₆-D-Glucose 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
¹³C₉-¹⁵N-L-Phenylalanin 95 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
¹³C-Natriumhydrogencarbonat ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
¹⁵N-Ammoniumchlorid 98 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
²H₃-Natriumacetat 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Agar-Agar, Kobe I pulv. (Carl Roth, Deutschland)
Ammoniumchlorid ≥ 99.8 % (Merck KGaA, Deutschland)
Calciumchlorid ≥ 98 % (Merck, Deutschland)
D-Glucose Monohydrat ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ≥ 98.0 % (Merck KGaA, Deutschland)
DSMZ 7 Vitaminlösung (Leibniz-Institut DSMZ, Deutschland)
DSMZ *Geobacter* Medium 579 (Leibniz-Institut DSMZ, Deutschland)
DSMZ Spurenelementlösung SL10 (Leibniz-Institut DSMZ, Deutschland)
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat (Merck KGaA, Deutschland)
Eisen(III)-citrat 98 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Ethanol absolut (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Hydroxylaminhydrochlorid ≥ 99 % (822334, Merck, Deutschland)
Kaliumchlorid ≥ 99.5 % (Merck KGaA, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99.0 % (Merck KGaA, Deutschland)
Kupfersulfat Pentahydrat ≥ 99 % (Merck KGaA, Deutschland)
L-Phenylalanin ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Magnesiumsulfat Heptahydrat ≥ 99.5 % (Merck KGaA, Deutschland)
Melamin-Formaldehyd-Harz-Partikel (ø = 4,38±0,06 µm)
Naphthalin 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Natriumacetat ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Natriumchlorid ≥ 99 % (Merck KGaA, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat ≥ 99.5 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Natronlauge 0,1 mol/L (K0201, Carl Roth, Deutschland)
Polymethylmethacrylatpartikel (ø = 3,02±0,07 µm)
Polystyrolpartikel (ø = 5,19±0,07 µm)
Silbernitrat 99 % reinst. (9370.4, Carl Roth, Deutschland)

6.3 Material

Blaue Butylverschlüsse (Glasgerätebau Ochs, Deutschland)
CaF₂-Einkristall-Träger (22 mm × 5 mm, CRYSTAL GmbH, Deutschland).
CELLSTAR-Zentrifugenröhrchen (Carl Roth, Deutschland)
Einmal-Kanülen Sterican (Carl Roth, Deutschland)
Kalk-Natron-Objektträger (76 mm × 26 mm, 1 mm, Carl Roth, Deutschland)
Pipettenspitzen Multi Universal (Carl Roth, Deutschland)
Rotilabo-Reaktionsgefäße (Carl Roth, Deutschland)

6.4 Instrumente

Raman-Mikroskop LabRAM HR System (Horiba Scientific, Japan)
Rasterelektronenmikroskop AURIGA 60-39-20 (Carl Zeiss Microscopy GmbH)
Reinstwasseranlage Millipore Milli-Q Plus 185 (Merck Millipore, USA)
Laborwaage AT 261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Deutschland)
Vortexer TopMix FB15024 (Fisher Scientific, USA)
Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Deutschland)

6.5 Software

ImageJ 1.45s (National Institute of Health, USA)
Labspec 5.74.29 (Horiba Scientific, Japan)
Labspec 6.3.40 (Horiba Scientific, Japan)
MatLAB R2013b (The MathWorks, USA)
Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA)
OriginPro 2016G (OriginLab Corporation, USA)

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. S. Branda, A. Vik, L. Friedman, R. Kolter, *Biofilms: the matrix revisited*, Trends in Microbiology, **2005**, *13*, 20-26.
- [2] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Was Biofilme zusammenhält*, Chemie in unserer Zeit, **2002**, *36*, 30-42.
- [3] L. A. Lyon, C. D. Keating, A. P. Fox, B. E. Baker, L. He, S. R. Nicewarner, S. P. Mulvaney, M. J. Natan, *Raman spectroscopy*, Analytical Chemistry, **1998**, *70*, 341R-361R.
- [4] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, *Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy*, Annual Review of Physical Chemistry, **2012**, *63*, 65-87.
- [5] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, *A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges*, Physical Chemistry Chemical Physics, **2008**, *10*, 6079-6089.
- [6] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Surface-enhanced Raman scattering and biophysics*, Journal of Physics: Condensed Matter, **2002**, *14*, R597-R624.
- [7] 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*, Journal of Biophotonics, **2010**, *3*, 548-556.
- [8] R. M. Jarvis, R. Goodacre, *Characterisation and identification of bacteria using SERS*, Chemical Society Reviews, **2008**, *37*, 931-936.
- [9] A. Sengupta, M. Mujacic, E. J. Davis, *Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2006**, *386*, 1379-1386.
- [10] Y. Liu, Y.-R. Chen, X. Nou, K. Chao, *Potential of surface-enhanced Raman spectroscopy for the rapid identification of Escherichia coli and Listeria monocytogenes cultures on silver colloidal nanoparticles*, Applied Spectroscopy, **2007**, *61*, 824-831.

- [11] A. F. Palonpon, J. Ando, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, S. Kawata, K. Fujita, *Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells*, Nature Protocols, **2013**, 8, 677-692.
- [12] M. Li, P. C. Ashok, K. Dholakia, W. E. Huang, *Raman-activated cell counting for profiling carbon dioxide fixing microorganisms*, The Journal of Physical Chemistry A, **2012**, 116, 6560-6563.
- [13] R. U. Meckenstock, E. Annweiler, W. Michaelis, H. H. Richnow, B. Schink, *Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture*, Applied and Environmental Microbiology, **2000**, 66, 2743-2747.
- [14] J. Butler, N. Young, D. Lovley, *Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six Geobacter genomes*, BMC Genomics, **2010**, 11, 40.
- [15] M. Aklujkar, J. Krushkal, G. DiBartolo, A. Lapidus, M. Land, D. Lovley, *The genome sequence of Geobacter metallireducens: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to Geobacter sulfurreducens*, BMC Microbiology, **2009**, 9, 109.
- [16] H.-C. Flemming, J. Wingender, *The biofilm matrix*, Nat Rev Micro, **2010**, 8, 623-633.
- [17] D. An, M. R. Parsek, *The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities*, Current Opinion in Microbiology, **2007**, 10, 292-296.
- [18] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*, Science, **1999**, 284, 1318-1322.
- [19] A. H. Rickard, P. Gilbert, N. J. High, P. E. Kolenbrander, P. S. Handley, *Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms*, Trends in Microbiology, **2003**, 11, 94-100.
- [20] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien*, Biologie in unserer Zeit, **2001**, 31, 169-180.

- [21] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, *Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases*, Nature Reviews Microbiology, **2004**, *2*, 95-108.
- [22] D. Selesi, N. Jehmlich, M. von Bergen, F. Schmidt, T. Rattei, P. Tischler, T. Lueders, R. U. Meckenstock, *Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47*, Journal of Bacteriology, **2010**, *192*, 295-306.
- [23] D. R. Lovley, J. F. Stolz, G. L. Nord, E. J. Phillips, *Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism*, Nature, **1987**, *330*, 252-254.
- [24] D. R. Lovley, T. Ueki, T. Zhang, N. S. Malvankar, P. M. Shrestha, K. A. Flanagan, M. Aklujkar, J. E. Butler, L. Giloteaux, A.-E. Rotaru, D. E. Holmes, A. E. Franks, R. Orellana, C. Risso, K. P. Nevin, in *Advances in microbial physiology, Vol. 59* (Ed.: K. P. Robert), Academic Press, **2011**, pp. 1-100.
- [25] C. T. Archer, J. F. Kim, H. Jeong, J. H. Park, C. E. Vickers, S. Y. Lee, L. K. Nielsen, *The genome sequence of E. coli W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of E. coli*, BMC Genomics, **2011**, *12*, 9-9.
- [26] A. Vertes, V. Hitchins, K. S. Phillips, *Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices*, Analytical Chemistry, **2012**, *84*, 3858-3866.
- [27] D. Cam, K. Keseroglu, M. Kahraman, F. Sahin, M. Culha, *Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering*, Journal of Raman Spectroscopy, **2010**, *41*, 484-489.
- [28] T. Thurnheer, R. Gmür, B. Guggenheim, *Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm*, Journal of Microbiological Methods, **2004**, *56*, 37-47.
- [29] W. E. Huang, K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A. S. Whiteley, M. Wagner, *Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function*, Environmental Microbiology, **2007**, *9*, 1878-1889.

- [30] T. R. Neu, J. R. Lawrence, *In situ characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems*, Microbial Extracellular Polymeric Substances, **1999**, 21-47.
- [31] J. R. Lawrence, T. R. Neu, G. D. W. Swerhone, *Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms*, Journal of Microbiological Methods, **1998**, 32, 253-261.
- [32] M. Alhede, K. Qvortrup, R. Liebrechts, N. Hoiby, M. Givskov, T. Bjarnsholt, *Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition*, FEMS Immunology and Medical Microbiology, **2012**, 65, 335-342.
- [33] C. Haisch, R. Niessner, *Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography*, Water Research, **2007**, 41, 2467-2472.
- [34] C. Li, S. Felz, M. Wagner, S. Lackner, H. Horn, *Investigating biofilm structure developing on carriers from lab-scale moving bed biofilm reactors based on light microscopy and optical coherence tomography*, Bioresource Technology, **2016**, 200, 128-136.
- [35] C. J. Wright, M. K. Shah, L. C. Powell, I. Armstrong, *Application of AFM from microbial cell to biofilm*, Scanning, **2010**, 32, 134-149.
- [36] T. Schmid, U. Panne, C. Haisch, M. Hausner, R. Niessner, *A photoacoustic technique for depth-resolved in situ monitoring of biofilms*, Environmental Science & Technology, **2002**, 36, 4135-4141.
- [37] C. Reichhardt, J. C. N. Fong, F. Yildiz, L. Cegelski, *Characterization of the Vibrio cholerae extracellular matrix: A top-down solid-state NMR approach*, Biochimica et Biophysica Acta, **2015**, 1848, 378-383.
- [38] S. Garima, P. Alka, *Combined use of Fourier transform infrared and Raman spectroscopy to study planktonic and biofilm cells of Cronobacter sakazakii*, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, **2014**, 3, 310-314.

- [39] H. N. Noothalapati Venkata, N. Nomura, S. Shigeto, *Leucine pools in Escherichia coli biofilm discovered by Raman imaging*, Journal of Raman Spectroscopy, **2011**, *42*, 1913-1915.
- [40] C. L. Haynes, A. D. McFarland, R. P. Van Duyne, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*, Analytical Chemistry, **2005**, *77*, 338A-346A.
- [41] A. Smekal, *Zur Quantentheorie der Dispersion*, Naturwissenschaften, **1923**, *11*, 873-875.
- [42] C. V. Raman, K. S. Krishnan, *A new type of secondary radiation*, Nature, **1928**, *121*, 501-502.
- [43] A. Kudelski, *Analytical applications of Raman spectroscopy*, Talanta, **2008**, *76*, 1-8.
- [44] D. A. Long, *The Raman effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2002**.
- [45] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley VCH, Weinheim, **2003**.
- [46] R. Pätzold, *Dissertation: Laser-based online analysis of environmentally relevant substances: Use and comparison of two methods; laser induced fluorescence analysis for the identification of DDT-containing old wood; confocal Raman microscopy for the noninvasive analysis of biofilms*, Universität Hannover, **2004**.
- [47] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [48] L. H. Gade, *Koordinationschemie*, Wiley VCH, Weinheim, **2010**.
- [49] R. L. McCreery, in *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., **2005**, pp. 15-33.
- [50] K. A. Willets, *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2009**, *394*, 85-94.

- [51] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy*, Chemical Reviews (Washington, D. C.), **1999**, 99, 2957-2975.
- [52] W. E. Huang, R. I. Griffiths, I. P. Thompson, M. J. Bailey, A. S. Whiteley, *Raman microscopic analysis of single microbial cells*, Analytical Chemistry, **2004**, 76, 4452-4458.
- [53] N. J. Everall, *Confocal Raman microscopy: common errors and artefacts*, Analyst, **2010**, 135, 2512-2522.
- [54] 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*, Journal of Microbiological Methods, **2000**, 42, 29-38.
- [55] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, H.-W. Motzkus, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele, J. Popp, *Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations*, Applied and Environmental Microbiology, **2005**, 71, 1626-1637.
- [56] V. Kumar, B. Kampe, P. Rösch, J. Popp, *Classification and identification of pigmented cocci bacteria relevant to the soil environment via Raman spectroscopy*, Environmental Science and Pollution Research, **2015**, 1-9.
- [57] U. Münchberg, P. Rösch, M. Bauer, J. Popp, *Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2014**, 406, 3041-3050.
- [58] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, *Vibrational spectroscopy - a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level*, Cytometry, Part A, **2009**, 75A, 104-113.
- [59] K. Maquelin, C. Kirschner, L.-P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stämmeler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann, G. J. Puppels, *Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid*

- identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures*, Journal of Clinical Microbiology, **2003**, *41*, 324-329.
- [60] K. Maquelin, L.-P. Choo-Smith, H. P. Endtz, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Rapid identification of Candida species by confocal Raman microspectroscopy*, Journal of Clinical Microbiology, **2002**, *40*, 594-600.
- [61] S. Pahlow, S. Meisel, D. Cialla-May, K. Weber, P. Rösch, J. Popp, *Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy*, Advanced Drug Delivery Reviews, **2015**, *89*, 105-120.
- [62] P. A. Suci, G. G. Geesey, B. J. Tyler, *Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in Candida albicans biofilms*, Journal of Microbiological Methods, **2001**, *46*, 193-208.
- [63] L. Marcotte, J. Barbeau, M. Lafleur, *Characterization of the diffusion of polyethylene glycol in Streptococcus mutans biofilms by Raman microspectroscopy*, Applied Spectroscopy, **2004**, *58*, 1295-1301.
- [64] L. P. Choo-Smith, K. Maquelin, T. Van Vreeswijk, H. A. Bruining, G. J. Puppels, N. A. N. Thi, C. Kirschner, D. Naumann, D. Ami, A. M. Villa, F. Orsini, S. M. Doglia, H. Lamfarraj, G. D. Sockalingum, M. Manfait, P. Allouch, H. P. Endtz, *Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy*, Applied and Environmental Microbiology, **2001**, *67*, 1461-1469.
- [65] 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*, Journal of Applied Microbiology, **2007**, *103*, 1808-1820.
- [66] C. Sandt, T. Smith-Palmer, J. Comeau, D. Pink, *Quantification of water and biomass in small colony variant PAO1 biofilms by confocal Raman microspectroscopy*, Applied Microbiology and Biotechnology, **2009**, *83*, 1171-1182.

- [67] O. Samek, J. F. M. Al-Marashi, H. H. Telle, *The potential of Raman spectroscopy for the identification of biofilm formation by Staphylococcus epidermidis*, Laser Physics Letters, **2010**, 7, 378-383.
- [68] B. Beier, R. Quivey, A. Berger, *Raman microspectroscopy for species identification and mapping within bacterial biofilms*, AMB Express, **2012**, 2, 1-6.
- [69] W. E. Huang, M. J. Bailey, I. P. Thompson, A. S. Whiteley, A. J. Spiers, *Single-cell Raman spectral profiles of Pseudomonas fluorescens SBW25 reflects in vitro and in planta metabolic history*, Microbial Ecology, **2007**, 53, 414-425.
- [70] W. E. Huang, S. Ude, A. J. Spiers, *Pseudomonas fluorescens SBW25 biofilm and planktonic cells have differentiable Raman spectral profiles*, Microbial Ecology, **2007**, 53, 471-474.
- [71] D. Kusić, B. Kampe, A. Ramoji, U. Neugebauer, P. Rösch, J. Popp, *Raman spectroscopic differentiation of planktonic bacteria and biofilms*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2015**, 1-11.
- [72] H. Liu, Q. Xu, L. Huo, X. Wei, J. Ling, *Chemical composition of Enterococcus faecalis in biofilm cells initiated from different physiologic states*, Folia Microbiologica, **2014**, 59, 447-453.
- [73] N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2009**, 393, 197-206.
- [74] J. S. Andrews, S. A. Rolfe, W. E. Huang, J. D. Scholes, S. A. Banwart, *Biofilm formation in environmental bacteria is influenced by different macromolecules depending on genus and species*, Environmental Microbiology, **2010**, 12, 2496-2507.
- [75] Y.-P. Chen, P. Zhang, J.-S. Guo, F. Fang, X. Gao, C. Li, *Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers*, Chemosphere, **2013**, 92, 633-638.

- [76] X. Lu, D. R. Samuelson, B. A. Rasco, M. E. Konkel, *Antimicrobial effect of diallyl sulphide on Campylobacter jejuni biofilms*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2012**, 67, 1915-1926.
- [77] G. B. Jung, S. W. Nam, S. Choi, G.-J. Lee, H.-K. Park, *Evaluation of antibiotic effects on Pseudomonas aeruginosa biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis*, Biomedical Optics Express, **2014**, 5, 3238-3251.
- [78] V. Prabhawathi, T. Boobalan, P. M. Sivakumar, M. Doble, *Functionalized polycaprolactam as an active food package for antibiofilm activity and extended shelf life*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2014**, 123, 461-468.
- [79] A.-K. Kniggendorf, R. Nogueira, C. Kelb, P. Schadzek, M. Meinhardt-Wollweber, A. Ngezahayo, B. Roth, *Confocal Raman microscopy and fluorescent in situ hybridization – a complementary approach for biofilm analysis*, Chemosphere, **2016**, 161, 112-118.
- [80] T. Schwartz, C. Jungfer, S. Heißler, F. Friedrich, W. Faubel, U. Obst, *Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks*, Chemosphere, **2009**, 77, 249-257.
- [81] 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 Research, **2009**, 43, 63-76.
- [82] J. Feng, C. de la Fuente-Nunez, M. J. Trimble, J. Xu, R. E. W. Hancock, X. Lu, *An in situ Raman spectroscopy-based microfluidic "lab-on-a-chip" platform for non-destructive and continuous characterization of Pseudomonas aeruginosa biofilms*, Chemical Communications, **2015**, 51, 8966-8969.
- [83] R. N. Masyuko, E. J. Lanni, C. M. Driscoll, J. D. Shrout, J. V. Sweedler, P. W. Bohn, *Spatial organization of Pseudomonas aeruginosa biofilms probed by combined matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and confocal Raman microscopy*, Analyst, **2014**, 139, 5700-5708.
- [84] E. J. Lanni, R. N. Masyuko, C. M. Driscoll, S. J. B. Dunham, J. D. Shrout, P. W. Bohn, J. V. Sweedler, *Correlated imaging with C(60)-SIMS and confocal*

- Raman microscopy: Visualization of cell-scale molecular distributions in bacterial biofilms*, *Analytical Chemistry*, **2014**, *86*, 10885-10891.
- [85] R. Janissen, D. M. Murillo, B. Niza, P. K. Sahoo, M. M. Nobrega, C. L. Cesar, M. L. A. Temperini, H. F. Carvalho, A. A. de Souza, M. A. Cotta, *Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate Xylella fastidiosa adhesion and biofilm formation*, *Scientific Reports*, **2015**, *5*.
- [86] W. E. Huang, M. Li, R. M. Jarvis, R. Goodacre, S. A. Banwart, in *Advances in Applied Microbiology, Vol. Volume 70*, Academic Press, **2010**, pp. 153-186.
- [87] T. Bocklitz, M. Putsche, C. Stüber, J. Käs, A. Niendorf, P. Rösch, J. Popp, *A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis*, *Journal of Raman Spectroscopy*, **2009**, *40*, 1759-1765.
- [88] T. Bocklitz, A. Walter, K. Hartmann, P. Rösch, J. Popp, *How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models?*, *Analytica Chimica Acta*, **2011**, *704*, 47-56.
- [89] S. Stöckel, A. S. Stanca, J. Helbig, P. Rösch, J. Popp, *Raman spectroscopic monitoring of the growth of pigmented and non-pigmented mycobacteria*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2015**, *407*, 8919-8923.
- [90] M. Harz, P. Rosch, K. D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, J. Popp, *Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions*, *Analyst*, **2005**, *130*, 1543-1550.
- [91] K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, G. J. Puppels, *Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy*, *Journal of Microbiological Methods*, **2002**, *51*, 255-271.
- [92] J. R. Wright, W. A. Hendrickson, S. Osaki, G. T. James, in *Physical Methods for Inorganic Biochemistry*, Springer US, Boston, MA, **1986**, pp. 285-310.

- [93] A. C. Albrecht, *On the theory of Raman intensities*, The Journal of Chemical Physics, **1961**, 34, 1476-1484.
- [94] H. Kim, K. M. Kosuda, R. P. Van Duyne, P. C. Stair, *Resonance Raman and surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy methods to study solid catalysts and heterogeneous catalytic reactions*, Chemical Society Reviews, **2010**, 39, 4820-4844.
- [95] D. A. Long, in *The Raman Effect*, John Wiley & Sons, Ltd, **2002**, pp. 221-270.
- [96] B. Schrader, H. H. Klump, K. Schenzel, H. Schulz, *Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants*, Journal of Molecular Structure, **1999**, 509, 201-212.
- [97] T. G. Spiro, T. C. Streckas, *Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state*, Journal of the American Chemical Society, **1974**, 96, 338-345.
- [98] S. Salama, T. G. Spiro, *Visible and near-ultraviolet resonance Raman spectra of photolabile vitamin B12 derivatives with a rapid-flow technique*, Journal of Raman Spectroscopy, **1977**, 6, 57-60.
- [99] M. Lutz, *Resonance Raman spectra of chlorophyll in solution*, Journal of Raman Spectroscopy, **1974**, 2, 497-516.
- [100] R. Pätzold, M. Keuntje, K. Theophile, J. Mueller, 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*, Journal of Microbiological Methods, **2008**, 72, 241-248.
- [101] M. Li, D. P. Canniffe, P. J. Jackson, P. A. Davison, S. FitzGerald, M. J. Dickman, J. G. Burgess, C. N. Hunter, W. E. Huang, *Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities*, International Society for Microbial Ecology Journal, **2012**, 6, 875-885.
- [102] I. Palings, J. A. Pardoen, E. Van den Berg, C. Winkel, J. Lugtenburg, R. A. Mathies, *Assignment of fingerprint vibrations in the resonance Raman spectra of*

- rhodopsin, isorhodopsin, and bathorhodopsin: implications for chromophore structure and environment*, *Biochemistry*, **1987**, 26, 2544-2556.
- [103] R. A. Copeland, T. G. Spiro, *Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide*, *The Journal of Physical Chemistry*, **1986**, 90, 6648-6654.
- [104] E. C. López-Díez, R. Goodacre, *Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics*, *Analytical Chemistry*, **2003**, 76, 585-591.
- [105] U. Neugebauer, U. Schmid, K. Baumann, W. Ziebuhr, S. Kozitskaya, V. Deckert, M. Schmitt, J. Popp, *Towards a detailed understanding of bacterial metabolism: spectroscopic characterization of Staphylococcus epidermidis*, *ChemPhysChem*, **2007**, 8, 124-137.
- [106] R. Pätzold, M. Keuntje, A. Anders-von Ahlften, *A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386, 286-292.
- [107] C. Sandt, T. Smith-Palmer, J. Pink, D. Pink, *A confocal Raman microscopy study of the distribution of a carotene-containing yeast in a living Pseudomonas aeruginosa biofilm*, *Applied Spectroscopy*, **2008**, 62, 975-983.
- [108] A.-K. Kniggendorf, M. Meinhardt-Wollweber, *Of microparticles and bacteria identification – (resonance) Raman micro-spectroscopy as a tool for biofilm analysis*, *Water Research*, **2011**, 45, 4571-4582.
- [109] T. Smith-Palmer, S. Lin, I. Oguejiofor, T. Leng, A. Pustam, J. Yang, L. L. Graham, R. C. Wyeth, C. D. Bishop, M. E. DeMont, D. Pink, *In situ confocal Raman microscopy of hydrated early stages of nacterial biofilm formation on barious surfaces in a flow cell*, *Applied Spectroscopy*, **2016**, 70, 289-301.
- [110] B. Virdis, F. Harnisch, D. J. Batstone, K. Rabaey, B. C. Donose, *Non-invasive characterization of electrochemically active microbial biofilms using confocal Raman microscopy*, *Energy & Environmental Science*, **2012**, 5, 7017-7024.

- [111] B. Viridis, D. Millo, B. C. Donose, D. J. Batstone, *Real-time measurements of the redox states of c-type cytochromes in electroactive biofilms: a confocal resonance Raman microscopy study*, PLoS ONE, **2014**, 9, e89918.
- [112] N. Lebedev, S. M. Strycharz-Glaven, L. M. Tender, *Spatially resolved confocal resonant Raman microscopic analysis of anode-grown Geobacter sulfurreducens biofilms*, ChemPhysChem, **2014**, 15, 320-327.
- [113] S. Efrima, L. Zeiri, *Understanding SERS of bacteria*, Journal of Raman Spectroscopy, **2009**, 40, 277-288.
- [114] K. C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J. R. Gapes, B. Lendl, *Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy*, Analytical Chemistry, **2000**, 72, 5529-5534.
- [115] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*, Chemical Physics Letters, **1974**, 26, 163-166.
- [116] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*, Journal of the American Chemical Society, **1977**, 99, 5215-5217.
- [117] M. Moskovits, *Surface-enhanced spectroscopy*, Reviews of Modern Physics, **1985**, 57, 783-826.
- [118] 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)*, Physical Review Letters, **1997**, 78, 1667-1670.
- [119] M. Moskovits, *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective*, Journal of Raman Spectroscopy, **2005**, 36, 485-496.
- [120] S. Schlücker, *Surface-enhanced Raman spectroscopy: Concepts and chemical applications*, Angewandte Chemie International Edition, **2014**, 53, 4756-4795.
- [121] A. Otto, *On the significance of Shalaev's 'hot spots' in ensemble and single-molecule SERS by adsorbates on metallic films at the percolation threshold*, Journal of Raman Spectroscopy, **2006**, 37, 937-947.

- [122] M. Knauer, *Dissertation: SERS-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms*, Technische Universität München, **2012**.
- [123] M. Fox, *Optische Eigenschaften von Festkörpern*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, **2012**.
- [124] K. Hering, D. Cialla, K. Ackermann, T. Doerfer, R. Moeller, H. Schneidewind, R. Mattheis, W. Fritzsche, P. Roesch, J. Popp, *SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 390, 113-124.
- [125] Y. Luo, A. Aubry, J. B. Pendry, *Electromagnetic contribution to surface-enhanced Raman scattering from rough metal surfaces: a transformation optics approach*, *Physical Review B*, **2011**, 83, 155422.
- [126] 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*, *Journal of Nanomaterials*, **2007**, Article ID 12086.
- [127] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*, *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2008**, 1, 601-626.
- [128] J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. Lu, J. Xu, *Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg-Teller contributions*, *The Journal of Chemical Physics*, **1986**, 84, 4174-4180.
- [129] L. Guerrini, D. Graham, *Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy applications*, *Chemical Society Reviews*, **2012**, 41, 7085-7107.
- [130] D. A. Stuart, J. M. Yuen, N. Shah, O. Lyandres, C. R. Yonzon, M. R. Glucksberg, J. T. Walsh, R. P. Van Duyne, *In vivo glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy*, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, 7211-7215.
- [131] J. D. Driskell, S. Shanmukh, L. Yong-jun, S. Hennigan, L. Jones, Z. Yi-Ping, R. A. Dluhy, D. C. Krause, R. A. Tripp, *Infectious agent detection with SERS-*

- active silver nanorod arrays prepared by oblique angle deposition*, Sensors Journal, IEEE, **2008**, 8, 863-870.
- [132] L. Zeiri, B. V. Bronk, Y. Shabtai, J. Czege, S. Efrima, *Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria*, Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2002**, 208, 357-362.
- [133] W. R. Premasiri, D. T. Moir, M. S. Klempner, N. Krieger, G. Jones, II, L. D. Ziegler, *Characterization of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria*, Journal of Physical Chemistry B, **2005**, 109, 312-320.
- [134] M. Kahraman, K. Keseroglu, M. Culha, *On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra*, Applied Spectroscopy, **2011**, 65, 500-506.
- [135] R. M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre, *Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface*, Analytical Chemistry, **2004**, 76, 5198-5202.
- [136] E. K. Hall, G. A. Singer, M. Polzl, I. Hammerle, C. Schwarz, H. Daims, F. Maixner, T. J. Battin, *Looking inside the box: using Raman microspectroscopy to deconstruct microbial biomass stoichiometry one cell at a time*, International Society for Microbial Ecology Journal, **2011**, 5, 196-208.
- [137] L. Zeiri, S. Efrima, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu*, Journal of Raman Spectroscopy, **2005**, 36, 667-675.
- [138] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, in *Surface enhanced Raman spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**, pp. 1-37.
- [139] R. F. Aroca, R. A. Alvarez-Puebla, N. Pieczonka, S. Sanchez-Cortez, J. V. Garcia-Ramos, *Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures*, Advances in Colloid and Interface Science, **2005**, 116, 45-61.
- [140] M. Knauer, N. P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch, *Optimized SERS colloids for the characterization of microorganisms*, Analytical Sciences, **2010**, 26, 761-766.

- [141] 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*, Journal of Physical Chemistry B, **2003**, *107*, 5723-5727.
- [142] V. K. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin, *Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities*, Advances in Colloid and Interface Science, **2009**, *145*, 83-96.
- [143] Y.-S. Li, J. Cheng, Y. Wang, *Surface-enhanced Raman spectra of dyes and organic acids in silver solutions: chloride ion effect*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **2000**, *56*, 2067-2072.
- [144] M. Kahraman, M. M. Yazici, F. Sahin, O. F. Bayrak, M. Culha, *Reproducible surface-enhanced Raman scattering spectra of bacteria on aggregated silver nanoparticles*, Applied Spectroscopy, **2007**, *61*, 479-485.
- [145] 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*, Analytical Chemistry, **2014**, *86*, 1525-1533.
- [146] M. Kahraman, A. I. Zamaleeva, R. F. Fakhrullin, M. Culha, *Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2009**, *395*, 2559-2567.
- [147] M. Kahraman, M. M. Yazici, F. Sahin, M. Culha, *Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering*, Langmuir, **2008**, *24*, 894-901.
- [148] X. Liu, M. Knauer, N. Ivleva, P., R. Niessner, C. Haisch, *Synthesis of core-shell surface-enhanced Raman tags for bioimaging*, Analytical Chemistry, **2010**, *82*, 441-446.
- [149] 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*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2011**, 2663-2667.
- [150] R. Picorel, R. E. Holt, T. M. Cotton, M. Seibert, *Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of bacterial photosynthetic membranes. The*

- carotenoid of Rhodospirillum rubrum*, Journal of Biological Chemistry, **1988**, 263, 4374-4380.
- [151] S. Efrima, B. V. Bronk, *Silver colloids impregnating or coating bacteria*, The Journal of Physical Chemistry B, **1998**, 102, 5947-5950.
- [152] 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*, Applied Spectroscopy, **2007**, 61, 1295-1300.
- [153] G. Bodelon, V. Montes-Garcia, V. Lopez-Puente, E. H. Hill, C. Hamon, M. N. Sanz-Ortiz, S. Rodal-Cedeira, C. Costas, S. Celiksoy, I. Perez-Juste, L. Scarabelli, A. La Porta, J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, *Detection and imaging of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering*, Nature Materials, **2016**, 15, 1203-1211.
- [154] R. M. Jarvis, N. Law, I. T. Shadi, P. O'Brien, J. R. Lloyd, R. Goodacre, *Surface-enhanced Raman scattering from intracellular and extracellular bacterial locations*, Analytical Chemistry, **2008**, 80, 6741-6746.
- [155] R. M. Jarvis, R. Goodacre, *Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy*, Analytical Chemistry, **2004**, 76, 40-47.
- [156] W. R. Premasiri, J. C. Lee, A. Sauer-Budge, R. Théberge, C. E. Costello, L. D. Ziegler, *The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2016**, 408, 4631-4647.
- [157] N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *In situ surface-enhanced Raman scattering analysis of biofilm*, Analytical Chemistry, **2008**, 80, 8538-8544.
- [158] N. P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Label-free in situ SERS imaging of biofilms*, Journal of Physical Chemistry B, **2010**, 114, 10184-10194.

- [159] A. Szeghalmi, S. Kaminskyj, P. Roesch, J. Popp, K. M. Gough, *Time fluctuations and imaging in the SERS spectra of fungal hypha grown on nanostructured substrates*, Journal of Physical Chemistry B, **2007**, *111*, 12916-12924.
- [160] S. Ramya, R. P. George, R. V. S. Rao, R. K. Dayal, *Detection of algae and bacterial biofilms formed on titanium surfaces using micro-Raman analysis*, Applied Surface Science, **2010**, *256*, 5108-5115.
- [161] Y. Chao, T. Zhang, *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2012**, *404*, 1465-1475.
- [162] E. Efeoglu, M. Culha, *In situ monitoring of biofilm formation by using surface-enhanced Raman scattering*, Applied Spectroscopy, **2013**, *67*, 498-505.
- [163] E. Efeoglu, M. Culha, *Surface-enhanced Raman scattering for biofilm characterization*, Spectroscopy, **2013**, *28*, 36-41.
- [164] P. Chen, L. Cui, K. Zhang, *Surface-enhanced Raman spectroscopy monitoring the development of dual-species biofouling on membrane surfaces*, Journal of Membrane Science, **2015**, *473*, 36-44.
- [165] L. Cui, P. Chen, B. Zhang, D. Zhang, J. Li, F. L. Martin, K. Zhang, *Interrogating chemical variation via layer-by-layer SERS during biofouling and cleaning of nanofiltration membranes with further investigations into cleaning efficiency*, Water Research, **2015**, *87*, 282-291.
- [166] M. Kögler, B. Zhang, L. Cui, Y. Shi, M. Yliperttula, T. Laaksonen, T. Viitala, K. Zhang, *Real-time Raman based approach for identification of biofouling*, Sensors and Actuators B: Chemical, **2016**, *230*, 411-421.
- [167] D. Millo, F. Harnisch, S. A. Patil, H. K. Ly, U. Schröder, P. Hildebrandt, *In situ spectroelectrochemical investigation of electrocatalytic microbial biofilms by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy*, Angewandte Chemie International Edition, **2011**, *50*, 2625-2627.

- [168] U. Neugebauer, P. Roesch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, V. Deckert, *On the way to nanometer-sized information of the bacterial surface by tip-enhanced Raman spectroscopy*, ChemPhysChem, **2006**, 7, 1428-1430.
- [169] S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, J. Popp, *Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy*, Engineering in Life Sciences, **2012**, 12, 131-143.
- [170] T. Schmid, A. Messmer, B.-S. Yeo, W. Zhang, R. Zenobi, *Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms II: tip-enhanced Raman spectroscopy of alginates*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2008**, 391, 1907-1916.
- [171] H. Kano, H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, *Hyperspectral coherent Raman imaging – principle, theory, instrumentation, and applications to life sciences*, Journal of Raman Spectroscopy, **2016**, 47, 116-123.
- [172] A. Rae, R. Stosch, P. Klapetek, A. R. Hight Walker, D. Roy, *State of the art Raman techniques for biological applications*, Methods, **2014**, 68, 338-347.
- [173] C. Krafft, J. Popp, *The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2014**, 407, 699-717.
- [174] C. H. Camp Jr, M. T. Cicerone, *Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering*, Nat Photon, **2015**, 9, 295-305.
- [175] X. Zhang, M. B. J. Roeffaers, S. Basu, J. R. Daniele, D. Fu, C. W. Freudiger, G. R. Holtom, X. S. Xie, *Label-free live-cell Imaging of nucleic acids using stimulated Raman scattering microscopy*, ChemPhysChem, **2012**, 13, 1054-1059.
- [176] L. Wei, Y. Yu, Y. Shen, M. C. Wang, W. Min, *Vibrational imaging of newly synthesized proteins in live cells by stimulated Raman scattering microscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **2013**, 110, 11226-11231.
- [177] P. W. Atkins, J. d. Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley VCH, Weinheim, **2006**.

- [178] D. A. Thornton, *Metal complexes of pyridine: infrared and Raman spectra with particular reference to isotopic labelling studies*, Coordination Chemistry Reviews, **1990**, *104*, 251-295.
- [179] R. M. Chrenko, *¹³C-doped diamond: Raman spectra*, Journal of Applied Physics, **1988**, *63*, 5873-5875.
- [180] M. Kalbac, J. Kong, L. Kavan, M. S. Dresselhaus, *Raman spectroscopy of isotopically labeled two-layer graphene*, physica status solidi B, **2012**, *249*, 2500-2502.
- [181] J. Mink, L. Hajba, J. Mihály, C. Németh, M. Pálmai, M. Sandström, *Vibrational spectroscopic studies of molecules with biochemical interest: the cysteine zwitterion*, Applied Spectroscopy Reviews, **2012**, *47*, 415-483.
- [182] Y. Wang, W. E. Huang, L. Cui, M. Wagner, *Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy*, Current Opinion in Biotechnology, **2016**, *41*, 34-42.
- [183] J. C. Murrell, A. S. Whiteley, *Stable isotope probing and related technologies*, American Society of Microbiology, **2011**.
- [184] S. Haider, M. Wagner, M. C. Schmid, B. S. Sixt, J. G. Christian, G. Häcker, P. Pichler, K. Mechtler, A. Müller, C. Baranyi, E. R. Toenshoff, J. Montanaro, M. Horn, *Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of chlamydiae*, Molecular Microbiology, **2010**, *77*, 687-700.
- [185] M. Li, W. E. Huang, C. M. Gibson, P. W. Fowler, A. Jousset, *Stable isotope probing and Raman spectroscopy for monitoring carbon flow in a food chain and revealing metabolic pathway*, Analytical Chemistry, **2012**, *85*, 1642-1649.
- [186] H. Noothalapati, S. Shigeto, *Exploring metabolic pathways in vivo by a combined approach of mixed stable isotope-labeled Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis*, Analytical Chemistry, **2014**, *86*, 7828-7834.

- [187] M. Li, P. C. Ashok, K. Dholakia, W. E. Huang, *Raman-activated cell counting for profiling carbon dioxide fixing microorganisms*, Journal of Physical Chemistry A, **2012**, *116*, 6560-6563.
- [188] D. Berry, E. Mader, T. K. Lee, D. Woebken, Y. Wang, D. Zhu, M. Palatinszky, A. Schintlmeister, M. C. Schmid, B. T. Hanson, N. Shterzer, I. Mizrahi, I. Rauch, T. Decker, T. Bocklitz, J. Popp, C. M. Gibson, P. W. Fowler, W. E. Huang, M. Wagner, *Tracking heavy water (D(2)O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2015**, *112*, E194-E203.
- [189] M. Wagner, *Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging*, Annual Review of Microbiology, **2009**, *63*, 411-429.
- [190] J. D. Watrous, P. C. Dorrestein, *Imaging mass spectrometry in microbiology*, Nature Reviews Microbiology, **2011**, *9*, 683-694.
- [191] W. E. Huang, A. D. Ward, A. S. Whiteley, *Raman tweezers sorting of single microbial cells*, Environmental Microbiology Reports, **2009**, *1*, 44-49.
- [192] Y. Wang, Y. Ji, E. S. Wharfe, R. S. Meadows, P. March, R. Goodacre, J. Xu, W. E. Huang, *Raman activated cell ejection for isolation of single cells*, Analytical Chemistry, **2013**, *85*, 10697-10701.
- [193] H. Muhamadali, M. Chisanga, A. Subaihi, R. Goodacre, *Combining Raman and FT-IR spectroscopy with quantitative isotopic labeling for differentiation of E. coli cells at community and single cell levels*, Analytical Chemistry, **2015**, *87*, 4578-4586.
- [194] E. Annweiler, W. Michaelis, R. U. Meckenstock, *Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway*, Applied and Environmental Microbiology, **2002**, *68*, 852-858.
- [195] R. I. Amann, B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, D. A. Stahl, *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow*

- cytometry for analyzing mixed microbial populations*, Applied and Environmental Microbiology, **1990**, 56, 1919-1925.
- [196] S. J. Giovannoni, E. F. DeLong, G. J. Olsen, N. R. Pace, *Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells*, Journal of Bacteriology, **1988**, 170, 720-726.
- [197] S. Marozava, W. F. M. Röling, J. Seifert, R. Küffner, M. von Bergen, R. U. Meckenstock, *Physiology of Geobacter metallireducens under excess and limitation of electron donors. Part I. Batch cultivation with excess of carbon sources*, Systematic and Applied Microbiology, **2014**, 37, 277-286.
- [198] S. Sabri, L. K. Nielsen, C. E. Vickers, *Molecular control of sucrose utilization in Escherichia coli W, an efficient sucrose-utilizing strain*, Applied and Environmental Microbiology, **2013**, 79, 478-487.
- [199] M. R. Green, J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, **2012**.
- [200] W. R. Premasiri, Y. Gebregziabher, L. D. Ziegler, *On the difference between surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of cell growth media and whole bacterial cells*, Applied Spectroscopy, **2011**, 65, 493-499.
- [201] G. Bengtsson, S. Fronaeus, L. Bengtsson-Kloo, *The kinetics and mechanism of oxidation of hydroxylamine by iron(III)*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, **2002**, 2548-2552.
- [202] B. Ravikumar, R. K. Rajaram, V. Ramakrishnan, *Raman and IR spectral studies of L-phenylalanine L-phenylalaninium dihydrogenphosphate and DL-phenylalaninium dihydrogenphosphate*, Journal of Raman Spectroscopy, **2006**, 37, 597-605.
- [203] M. Mathlouthi, D. Vinh Luu, *Laser-Raman spectra of d-glucose and sucrose in aqueous solution*, Carbohydrate Research, **1980**, 81, 203-212.
- [204] R. L. Frost, J. T. Klopogge, *Raman spectroscopy of the acetates of sodium, potassium and magnesium at liquid nitrogen temperature*, Journal of Molecular Structure, **2000**, 526, 131-141.

- [205] P.-G. Yin, L. Jiang, X.-F. Lang, L. Guo, S. Yang, *Quantitative analysis of mononucleotides by isotopic labeling surface-enhanced Raman scattering spectroscopy*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 26, 4828-4831.
- [206] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2001**, 58, 109-130.
- [207] D. A. Skoog, D. M. West, *Principles of instrumental analysis, Vol. 158*, Saunders College Philadelphia, **1980**.
- [208] R. Weiß, *Masterarbeit: Raman microspectroscopy for non-invasive, three-dimensional analysis*, Fakultät für Chemie, Technische Universität München, **2015**.
- [209] H. Mouttaki, J. Johannes, R. U. Meckenstock, *Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons*, *Environmental Microbiology*, **2012**, 14, 2770-2774.
- [210] C. Winderl, H. Penning, F. v. Netzer, R. U. Meckenstock, T. Lueders, *DNA-SIP identifies sulfate-reducing Clostridia as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment*, *The ISME Journal*, **2010**, 4, 1314-1325.
- [211] M. Taubert, C. Vogt, T. Wubet, S. Kleinstüber, M. T. Tarkka, H. Harms, F. Buscot, H.-H. Richnow, M. von Bergen, J. Seifert, *Protein-SIP enables time-resolved analysis of the carbon flux in a sulfate-reducing, benzene-degrading microbial consortium*, *The ISME Journal*, **2012**, 6, 2291-2301.
- [212] R. Paetzold, M. Keuntje, K. Theophile, J. Mueller, 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*, *Journal of Microbiological Methods*, **2008**, 72, 241-248.
- [213] T. G. Spiro, T. C. Streckas, *Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c: Inverse polarization and vibronic scattering*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1972**, 69, 2622-2626.

- [214] B. Cartling, *Intermediate and stable redox states of cytochrome c studied by low temperature resonance Raman spectroscopy*, *Biophysical Journal*, **1983**, 43, 191-205.
- [215] X. Y. Li, R. S. Czernuszewicz, J. R. Kincaid, Y. O. Su, T. G. Spiro, *Consistent porphyrin force field. 1. Normal-mode analysis for nickel porphine and nickel tetraphenylporphine from resonance Raman and infrared spectra and isotope shifts*, *The Journal of Physical Chemistry*, **1990**, 94, 31-47.
- [216] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, M. Meyer, *Evidence of natural isotopic distribution from single-molecule SERS*, *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, 131, 2713-2716.
- [217] H.-J. van Manen, A. Lenferink, C. Otto, *Noninvasive Imaging of Protein Metabolic Labeling in Single Human Cells Using Stable Isotopes and Raman Microscopy*, *Analytical Chemistry*, **2008**, 80, 9576-9582.
- [218] S. A. Overman, G. J. Thomas, *Raman spectroscopy of the filamentous virus Ff (fd, fl, M13): structural interpretation for coat protein aromatics*, *Biochemistry*, **1995**, 34, 5440-5451.
- [219] S. A. Overman, G. J. Thomas, *Structural studies of viruses by Raman spectroscopy. Novel vibrational assignments for proteins from Raman spectra of viruses*, *Journal of Raman Spectroscopy*, **1998**, 29, 23-29.
- [220] J. K. Wilmschurst, H. J. Bernstein, *The infrared and Raman spectra of toluene, toluene- α -d₃, m-xylene, and m-xylene- $\alpha\alpha'$ -d₆*, *Canadian Journal of Chemistry*, **1957**, 35, 911-925.
- [221] K. J. Rothschild, J. R. Andrew, W. J. De Grip, H. E. Stanley, *Opsin structure probed by Raman spectroscopy of photoreceptor membranes*, *Science*, **1976**, 191, 1176-1178.
- [222] A. A. Guzelian, J. M. Sylvia, J. A. Janni, S. L. Clauson, K. M. Spencer, *SERS of whole-cell bacteria and trace levels of biological molecules*, *Proceedings of SPIE*, **2002**, 4577, 182-192.

- [223] K. Maquelin, L.-P. Choo-Smith, T. Van Vreeswijk, H. P. Endtz, B. Smith, R. Bennett, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium*, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 12-19.
- [224] S. Farquharson, W. W. Smith, V. Y. Lee, S. Elliott, J. F. Sperry, *Detection of bioagent signatures: a comparison of electrolytic and metal-doped sol-gel surface-enhanced Raman media*, *Proceedings of SPIE*, **2002**, 4575, 62-72.
- [225] 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*, *Applied Spectroscopy*, **2004**, 58, 33-40.
- [226] K. Kneipp, A. S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, J. T. Motz, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles*, *Applied Spectroscopy*, **2002**, 56, 150-154.
- [227] L. A. Gearheart, H. J. Ploehn, C. J. Murphy, *Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: A surface-enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA*, *Journal of Physical Chemistry B*, **2001**, 105, 12609-12615.
- [228] G. D. Chumanov, T. M. Cotton, *Surface-enhanced Raman scattering for discovering and scoring single-base differences in DNA*, *Proceedings of SPIE*, **1999**, 3608, 204-210.
- [229] W. Ranjith Premasiri, P. Lemler, Y. Chen, Y. Gebregziabher, L. D. Ziegler, in *Frontiers of surface-enhanced Raman scattering*, John Wiley & Sons, Ltd, **2014**, pp. 257-283.
- [230] L. Cui, P. Chen, S. Chen, Z. Yuan, C. Yu, B. Ren, K. Zhang, *In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy*, *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 5436-5443.
- [231] A. Walter, A. Marz, W. Schumacher, P. Rosch, 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*, **2011**, 11, 1013-1021.

- [232] A. Toyama, N. Hanada, Y. Abe, H. Takeuchi, I. Harada, *Assignment of adenine ring in-plane vibrations in adenosine on the basis of ^{15}N and ^{13}C isotopic frequency shifts and TUV resonance Raman enhancement*, Journal of Raman Spectroscopy, **1994**, 25, 623-630.
- [233] B. Giese, D. McNaughton, *Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces*, The Journal of Physical Chemistry B, **2002**, 106, 101-112.