



# **Raman–Mikrospektroskopie und oberflächenverstärkte Raman–Streuung für die zerstörungsfreie, dreidimensionale Analyse von Mikroorganismen und Biofilmen**

**Wilhelm Ruben Weiß**

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Natural Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Michael Groll

Prüfende der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner

2. Prof. Dr. Nicole Strittmatter

Die Dissertation wurde am 18.07.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Natural Sciences am 11.11.2024 angenommen.



*„Die Quanten sind doch eine hoffnungslose Schweinerei!“*

– Max Born

## Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht:

R. Weiss, M. Palatinszky, M. Wagner, R. Niessner, M. Elsner, M. Seidel, N.P. Ivleva, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of microorganisms: limitations and applicability on the single-cell level*, *Analyst* **2019**, 144, 943-953.

R. Weiß, R. Nießner, M. Seidel, N. P. Ivleva, *Raman-Mikrospektroskopie für zerstörungsfreie, dreidimensionale Analysen von Biofilmen*, *Vom Wasser* **2017**, 115, 111-112.

## Danksagung

Herzlichster Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Nießner. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, diese Arbeit an dem Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC) der Technischen Universität München (TUM) durchzuführen, für das entgegengebrachte Vertrauen und die unermüdliche sowie wissenschaftlich hervorragende Betreuung.

Besonders danke ich PD Dr. habil. Natalia Ivleva für die jahrelange Unterstützung. Die unzähligen, fachlich exzellenten Ratschläge und Gespräche sind von unschätzbarem Wert für diese Arbeit. Als Gruppenleiterin hat sie wesentlichen Anteil an der herzlichen und kollegialen Atmosphäre der Raman- und REM-Gruppe, welche ich immer geschätzt habe, sowie als Mentorin mit bedeutendem Einfluss auf meinen akademischen Werdegang.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Martin Elsner, welcher mir mit fachlicher Expertise und wichtigen Kommentaren am IWC stets weitergeholfen hat.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Institut für die warme Aufnahme, die andauernde positive Stimmung und produktive Zusammenarbeit. Dies gilt im Besonderen für Dr. Patrick Kubryk, Dr. Catharina Kober, Dr. Carolin Hartmann, Dr. Philipp Anger, Dr. Elisabeth von der Esch-Letica, Dr. Christian Schwaferts, Dr. Oleksii Morgaienko, Dr. Lisa Göpfert und Dr. David Bauer. Die gewonnenen Erfahrungen und Erinnerungen sind von nicht zu bemessendem Wert für mich. Herzlicher Dank gilt PD Dr. habil. Michael Seidel für viele konstruktive Unterhaltungen sowie Ideen. Auch gilt spezieller Dank Prof. Dr. Christoph Haisch für hilfreiche Kommentare, Sebastian Wiesemann und Roland Hoppe für die Umsetzung einer Raman-Messkammer, Christine Sternkopf für die tatkräftige Hilfe bei vielen Cryo-REM-Messungen, sowie Christine Beese und Cornelia Popp bei der Überwindung bürokratischer Hindernisse.

Für eine spannende und lehrreiche Zeit an der Division of Microbial Ecology der Universität Wien möchte ich Prof. Dr. Michael Wagner danken. Dieser Dank gilt ebenfalls für Dr. Markus Schmid, welcher wertvolle Hinweise zu Purinen und mikrobiellen Stressreaktionen gegeben hat, Dr. Fátima Pereira und Dr. Márton Palatinszky, welcher mir durch die Kultivierung von *N. inopinata* und *N. gargensis* sehr

geholfen hat. Die gesammelten Eindrücke, Diskussionen und die hochwertigen Beiträge schätze ich sehr.

Ferner gilt mein Dank der Unterstützung von Alfred Rabenbauer und Sina Stocker, deren Studien im Rahmen von Praktika auch in dieser Arbeit aufgenommen wurden. Meine Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) gefördert.

Abschließend danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die andauernde Unterstützung, Liebe und so manch aufbauendes Wort.

## Kurzfassung

Für Umweltstudien und klinische Diagnostik sind der Nachweis und die Charakterisierung von Mikroben unerlässlich. Treten Mikroorganismen innerhalb von Biofilmen oder intrazellulär in Wirtsorganismen auf, ermöglicht die dreidimensionale Raman-Mikrospektroskopie (3DRM) ihre Untersuchung. In dieser Arbeit wurden anhand von artifiziellen Biofilmen gezeigt, dass Strukturen mindestens bis in eine Messtiefe von 500 µm im niedrigen einstelligen Mikrometermaßstab aufgelöst werden können. In einer Realprobe eines mit Legionellen befallenen Kühlturms konnten innerhalb eines als Amöbe eingestuftes Objekts Substrukturen mit charakteristischen Raman-Signalen von Hydroxybutyrat detektiert werden. Auch wird eine mögliche Subtypisierung von *L. pneumophila* mittels Raman-Mikrospektroskopie und Datenauswertung durch Hauptkomponentenanalyse gezeigt. Die Verwendung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*: SERS) zur Detektion und Charakterisierung von Mikroorganismen ist eine leistungsfähige Analysetechnik. Optimierte SERS-Verfahren ermöglichen schnelle Messresultate mit spezifischen molekularen Informationen und geben Einblick in die chemische Zusammensetzung mikrobiologischer Proben. Für zuverlässige SERS-basierte Analysen ist das Wissen über den Ursprung mikrobieller SERS-Signale und deren Parameter, die sich auf Auftreten, Intensität und Reproduzierbarkeit auswirken, von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit werden Anwendbarkeit und Grenzen der SERS-basierten Methode zur Charakterisierung mikrobieller Zellen, Zellsortierung und dreidimensionalen Visualisierung mikrobieller Gemeinschaften untersucht. Analysen von drei gramnegativen Bakterienarten, zwei grampositiven Bakterienarten und eines Archaeons zeigen, dass bei mehreren dieser Organismen unterschiedliche Merkmale in ihren SERS-Spektren fehlen. Als zusätzlicher Störfaktor wurden die physiologischen Bedingungen der Zellen, wie durch Lagerungsbedingungen oder Markierung mit Deuterium, beeinflusst und systematisch untersucht, woraus zu schließen ist, dass das jeweilige SERS-Signal einzeln analysierter Zellen stark von der Stoffwechselaktivität beeinflusst wird. Während dies die Interpretation von SERS-Daten erschwert, kann dieser Befund andererseits die Untersuchung des Stoffwechselzustands einzelner Zellen in Mikrobenpopulationen ermöglichen.

## Abstract

For environmental studies and clinical diagnostics, the detection and characterization of microbes are essential. If microorganisms occur within biofilms or intracellularly in host organisms, three-dimensional Raman microspectroscopy (3DRM) enables them to be examined. This work used artificial biofilms to show that structures can be resolved at least to a measuring depth of 500  $\mu\text{m}$  on a low single-digit micrometer scale. In an actual environmental sample of a cooling tower infected with *Legionella*, substructures with characteristic Raman signals of hydroxybutyrate were detected within an object classified as an amoeba. A possible subtyping of *L. pneumophila* using Raman microspectroscopy and data analysis by principal component analysis is shown. The use of surface-enhanced Raman scattering (SERS) to detect and characterize microorganisms is an emerging analytical technique. Optimized SERS methods enable rapid measurement results with specific molecular information and provide insight into the chemical composition of microbiological samples. For reliable SERS-based analyses, knowledge about the origin of microbial SERS signals and their parameters that affect occurrence, intensity and reproducibility is crucial. This work examines the applicability and limitations of SERS-based method for microbial cell characterization, cell sorting and three-dimensional visualization of microbial communities. Analysis of three gram-negative bacterial species, two gram-positive bacterial species, and an archaeon shows that several of these organisms lack distinct features in their SERS spectra. As an additional confounding factor, the physiological conditions of the cells, such as storage conditions or labeling with deuterium, were systematically examined, from which it can be concluded that the metabolic activity strongly influences the respective SERS signal of individually analyzed cells. This makes the interpretation of SERS data challenging but may prove valuable for insights into the metabolic state of individual cells in microbial populations.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung.....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>15</b>
2.1	Biologische Proben.....	16
2.1.1	Mikroorganismen und Biofilme.....	16
2.1.2	<i>Legionella pneumophila</i> .....	17
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> .....	18
2.1.4	Analytische Methoden zur Detektion von Mikroorganismen.....	19
2.2	Raman-Mikrospektroskopie .....	22
2.2.1	Raman-Effekt .....	22
2.2.2	Dreidimensionales Auflösungsvermögen .....	26
2.3	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung .....	33
2.4	Zellsortierung .....	36
2.4.1	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> .....	36
2.4.2	Zellsortierung basierend auf Raman-Effekt.....	37
<b>3.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>40</b>
3.1	Kultivierung von Mikroorganismen.....	41
3.1.1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> und <i>Pseudomonas putida</i> .....	41
3.1.2	<i>Nitrospira inopinata</i> und <i>Nitrososphaera gargensis</i> .....	42
3.1.3	<i>Legionella pneumophila</i> .....	43
3.1.4	<i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	43
3.2	Lebend/tot-Unterscheidung von <i>E. coli</i> .....	44
3.2.1	Colilert-Test.....	44
3.2.2	Durchflusszytometrie.....	44
3.3	Präparation von artifiziellen Biofilmen.....	44
3.4	Kolloid-Synthese für SERS-Analysen .....	45
3.4.1	Goldnanopartikel.....	45
3.4.2	Silbernanopartikel .....	45
3.5	Rasterelektronenmikroskopie-Analysen .....	46
3.6	Raman-Mikrospektroskopie .....	46
3.7	SERS-Analysen .....	47
3.8	Zellsortierung mittels SERS-Signals .....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussionen .....</b>	<b>50</b>
4.1	Raman-Mikrospektroskopie von Mikroorganismen.....	51
4.1.1	<i>Legionella pneumophila</i> .....	51
4.2.1	<i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	54
4.2	SERS-Analysen.....	56

4.2.1	Mikroorganismen .....	56
4.2.2	Referenzsubstanzen .....	60
4.3	Einfluss auf SERS-Analysen von <i>E. coli</i> .....	64
4.3.1	Waschmedium vor <i>In-situ</i> -Kolloidsynthese .....	64
4.3.2	Lagerung .....	66
4.3.3	Deuterium-Markierung .....	74
4.4	3D-Raman-Mikrospektroskopie von artifiziellen Biofilmen .....	77
4.4.1	Eingebettete Kunststoffpartikel .....	77
4.4.2	Biofilm mit Legionellen .....	79
4.4.3	SERS-Analysen mit <sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C-markierten <i>E. coli</i> -Zellen .....	81
4.5	Zellsortierung .....	84
4.5.1	SERS-Analysen von <sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C-markierten <i>E. coli</i> -Zellen .....	84
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
7.1	Chemikalien .....	109
7.2	Mikroorganismen .....	110
7.3	Materialien .....	111
7.4	Geräte.....	111
7.5	Software .....	112
7.6	Abkürzungsverzeichnis.....	113

# **1. Einleitung und Aufgabenstellung**

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Für viele Felder der Wissenschaft sind spektroskopische Analysemethoden von großer Bedeutung. Durch Wechselwirkungen elektromagnetischer Strahlung und Materie sind vielfältige Informationen von Probe und Analyten zugänglich. Die Raman-Spektroskopie (RS) wurde in den vergangenen Jahrzehnten in einem breiten Anwendungsspektrum eingesetzt. Grundsätzlich sind sowohl feste, als auch flüssige und gasförmige Proben mit der RS analysierbar. Die RS liefert als Methode der Schwingungsspektroskopie umfassende Informationen über die molekulare Struktur von Stoffen und der chemischen Zusammensetzung von Proben. Die Raman-Spektroskopie ist eine nicht-invasive Analysemethode und zeigt wegen des geringen Wirkungsquerschnitts der Raman-Streuung von Wasser im Gegensatz zur Infrarot-Spektroskopie kaum Störeffekte. Neben der Zuordnung von Verbindungen und der Quantifizierung ist auch die räumliche Zuordnung von Analyten bis in den Nanometerbereich möglich. So ist in Kombination mit einem konfokalen Mikroskop die laterale Auflösung und Tiefenauflösung beugungsbegrenzt und ermöglicht beispielsweise die Analyse von einzelnen Bakterienzellen.[1-3] Für transparente Proben können mit dieser dreidimensionalen Raman-Mikrospektroskopie bzw. konfokalen Raman-Mikrospektroskopie (*confocal Raman microspectroscopy*: CRM) dreidimensionale Messungen durchgeführt werden.[4,5] Die Probenvorbereitung der RS ist häufig von begrenztem Aufwand und meist können Proben direkt untersucht werden.

In dieser Arbeit sollen vor allem biologische Proben, wie etwa Mikroorganismen oder Biofilme analysiert werden. Mikroben treten in der Umwelt nahezu ausschließlich in komplexen Gemeinschaften unterschiedlicher Arten und auch in Gemeinschaften mit Arten anderer Domänen der Lebewesen mit den vielseitigsten Interaktionen auf.[6-9] An der Grenzschicht von festen oder wässrigen Systemen bilden sich Biofilme, welche einen hohen Anteil extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) aufweisen, als Lebensraum oder Rückzugsort von Mikroorganismen.[10,11] Für ein besseres Verständnis dieser Organismen und der durch sie hervorgerufenen Effekte, wie Biotransformationsprozesse[12,13] oder Pathogenität[14,15], ist die Charakterisierung von Biofilmen und den in ihnen stattfindenden Vorgänge notwendig. So ist die potentiell humanpathogene Bakterienart *Legionella pneumophila* als Auslöser der Legionärskrankheit dafür bekannt, in und an Biofilmen sowie intrazellulär in Amöben

aufzutreten.[16-19] Treten Legionellen im Biofilm oder in Wirtszellen auf, könnten klassische Detektionsmethoden versagen. Eine dreidimensionale Analyseverfahren, welche nichtinvasiv ist, hat das Potential die Forschung an Biofilmen voranzutreiben. In dieser Arbeit soll die Anwendbarkeit und der Nutzen der dreidimensionalen Raman-Mikrospektroskopie für dieses Forschungsfeld überprüft werden. Hierfür werden künstliche Biofilme auf Grundlage von Agarosegelen angefertigt und untersucht. Vor allem mögliche Messtiefen und Tiefenauflösungen sollen erprobt werden. Da dreidimensional auflösende Messverfahren in irgendeiner Form das zu analysierende Probenvolumen rasterförmig abfahren müssen, werden anstatt eines Messpunktes viele untersucht. Somit vervielfacht sich die notwendige Analysedauer. Deshalb wird ein Fokus auf die Übertragbarkeit der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*: SERS) auf dreidimensionale Analysen gelegt, um durch die Signal-verstärkende Wirkung die Aufnahmezeit zu reduzieren.

In den vergangenen Jahren wurden vielversprechende Studien zur Untersuchung von Mikroorganismen mittels SERS veröffentlicht. So wurde berichtet, dass eine Differenzierung von Mikroorganismen möglich ist[20,21] und die Aufnahme der Stabilisotopen Kohlenstoff-13 oder Stickstoff-15 auf Einzelzellebene (in den mit Stabilisotopen kultivierten *Escherichia coli*-Kulturen) nachgewiesen werden kann.[22] Weiterhin wurde SERS für die Analyse von Umweltproben genutzt.[23] In dieser Arbeit wird erforscht, inwieweit die SERS-Analyse die Differenzierung verschiedener gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie eines Archaeons ermöglicht. Weiterer Schwerpunkt wird in dieser Arbeit auf die Untersuchung der Auswirkungen bisher vernachlässigter Faktoren hinsichtlich der SERS-Analysen von Mikroorganismen gelegt, wie dem physiologischen Zustand von Mikroorganismen. Auch soll überprüft werden, ob der Einbau von Deuterium in Bakterien mittels SERS verfolgt werden kann. Schließlich soll getestet werden, ob SERS als Detektionsmechanismus auf die Sortierung von einzelnen Zellen mittels optischer Pinzette übertragen werden kann. Da der Modellorganismus *Escherichia coli* nachweislich gut mittels SERS detektiert werden kann, dieser schnell wächst und ohnehin gut erforscht ist, wird er im Rahmen dieser Arbeit für weiterführende SERS-Experimenten ausgewählt.

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Ein weiterer Teil der Arbeit soll die Analyse von *Legionella pneumophila* und der als Wirtsorganismus von Legionellen bekannten Amöbe *Vermamoeba vermiformis* umfassen. Ziel ist es, Schritte in Richtung des Nachweises von Legionellen in Amöben zu finden und eine spektroskopische Differenzierung der Serogruppen oder Subtypisierung von *Legionella pneumophila* mittels Raman-Mikrospektroskopie (RM) zu untersuchen. Im optimalen Fall könnte mit der RM eine analytische Referenztechnik zu mikrobiologischen Nachweismethoden gefunden werden. Die Komplementierung langsamer Zellkulturverfahren mittels RM kann zur Entwicklung eines schnelleren Nachweises von Legionellen führen. Darüber hinaus können die Ergebnisse das Verständnis von Legionellen und ihren pathogenen Eigenschaften verbessern.

## **2. Theoretischer Hintergrund**

### 2.1 Biologische Proben

#### 2.1.1 Mikroorganismen und Biofilme

Der Sammelbegriff Mikrobe oder Mikroorganismus umfasst alle Bakterien, Archaeen und auch mikroskopisch kleine, einzellige bzw. kolonienbildende Eukaryoten, wie Protisten und viele Hefepilze. Sie treten in durch umfangreiche Wechselwirkungen gekennzeichneten Gemeinschaften mannigfaltigster Arten aus den drei Domänen der Lebewesen auf. Mikroben sind in nahezu dem gesamten Bereich der Erdoberfläche nachzuweisen. Unter extremen Bedingungen, wie in mehreren Kilometern Tiefe der Lithosphäre,[24] in Antarktika[25] oder in den tiefsten Ozeangraben[26] sind sie zu finden. Selbst in der unteren Stratosphäre (~12 km) wurden luftgetragene, noch lebensfähige Bakterien detektiert.[27] Auf oder innerhalb von höheren Lebewesen werden sie als deren Mikrobiota bezeichnet und sind von essentieller Bedeutung für diese. Als Krankheitsauslöser, entscheidender Träger biotischer Zersetzung und Teil aller biogeochemischen Stoffkreisläufe, wie als Nitrifikant,[28] sind sie sowohl für Umweltstudien als auch in der Krankheitsdiagnostik von besonderem Interesse. In der Zivilisation werden sie in vielen Prozessen genutzt, wie der Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe, der Treibstoff- und Chemikalienproduktion, der Lebensmittelherstellung oder der Wasseraufbereitung.

An Grenzflächen bilden Mikroorganismen Biofilme aus einer wasserhaltigen Biopolymermatrix. Diese Polymere werden im Zusammenhang von Biofilmen extrazelluläre polymere Substanze (EPS) genannt und als Beispiel seien Polysaccharide, Polyhydroxyalkanoate, Lipide, Proteine und Desoxyribonukleinsäure (DNA) genannt. Die Bildung von Biofilmen wird klassisch in 5 Stufen eingeteilt und über die reversible Anlagerung von einzelnen Pionierzellen planktonischen Phänotyps eingeleitet, die nach irreversibler Oberflächenbindung mit der EPS-Produktion beginnen. Dies ermöglicht die Entwicklung einer Multispezies-Gemeinschaft und führt schließlich zum ausgereiften Biofilm mit Ablösungsereignissen.[29] Aufgrund des Auftretens freier multizellulärer Aggregate, die direkt an Oberflächen binden können, wurde ein überarbeitetes Modell entwickelt, das diese Aggregate als Keimkristall der Biofilmbildung vorsieht.[30] Während der Bildung von Biofilmen ändert sich der Phänotyp teils drastisch.[31] Je nach Art der Biofilm-produzierenden Mikroben

variieren nicht nur physikalische und chemische Eigenschaften, sondern auch die Funktion, die sie für diesen Organismus übernimmt. So kann der Biofilm eine bessere Anhaftung an Oberflächen[32], einen Schutz vor Umwelteinflüssen,[11] vor Eindringen einer ausbeutenden Art[33] oder Prädatoren,[34] eine Nährstoffanreicherung[35] und den horizontalen Gentransfer unterstützen.[36] Während Mikroorganismen durch diese Eigenschaften evolutionäre Vorteile erhalten, stellen sie für die Menschheit auch ein Problem dar. Dies gilt beispielsweise für Biokorrosion oder durch Fouling in der Schifffahrt, aber auch für alle Bereichen, in welchen hygienische Standards einzuhalten sind, wie für die Lebensmittelindustrie oder das Gesundheitssystem. Selbst für den menschlichen Körper gehen direkte Gefahren von Biofilmen aus in Form andauernder, schwer zu behandelnder Infektionen.[37] Es wird geschätzt, dass mehr als 60 % aller bakteriellen Infektionen auf Biofilme zurückzuführen sind.[38] Auch das in dieser Arbeit untersuchte Pathogen *Legionella pneumophila* tritt in Biofilmen auf und stellt besonders durch die von Biofilmen hervorgerufene Persistenz im Trinkwassernetz ein Problem dar.[15]

### **2.1.2 *Legionella pneumophila***

*Legionella pneumophila* aus der Klasse der Gammaproteobacteria ist ein obligat aerobes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer Länge von 2 µm bis zu 20 µm. Alle Subspezies von *L. pneumophila* sind potentiell humanpathogen. Es bildet keine Sporen und ist gramnegativ, färbt sich jedoch nur schlecht, da es einen hohen Anteil an Lipopolysacchariden (LPS) an der Zelummantelung besitzt. Es nutzt hauptsächlich Aminosäuren wie Serin zum Wachstum und verwendet Kohlenhydrate wie Glucose nur als untergeordnete Kohlenstoffquelle.[39] Optimales Wachstum erfolgt zwischen 25° C und 45° C mit einer Zellteilung in ca. 4 h, wobei klinisch relevante Stämme ein Optimum um 37° C mit den höchsten Wachstumsraten zeigen.[40] Die LPS-Strukturen machen eine serologische Einteilung innerhalb des Genus *Legionella* in über 70 Serogruppen möglich, mit einer Vielzahl vertreten in der Spezies *L. pneumophila*. [41] Die dabei untersuchte Antikörper-spezifisch bindende Struktur wird als O-Antigen bezeichnet und besteht aus einer endständigen Polysaccharidkette.

*L. pneumophila* ist ein aquatisches Bakterium, das sowohl planktonisch, im Zusammenhang mit Biofilmen oder als Parasit von Protisten in natürlichen Frisch-

## 2. Theoretischer Hintergrund

wasserreservoiren auftritt.[42] Es ist dafür bekannt, in von Menschen geschaffenen Wasserversorgungssystemen oder Kühlanlagen zu überdauern.[43] Eine zusammenfassende Studie aus dem Jahr 2018 berichtet, dass auch Warmwassereinrichtungen der Erholungs- und Freizeitbranche betroffen sind.[44] So wurden über 1000 Fälle von Legionellose aus 42 Großereignissen mit einer Letalität von 6,3 % zusammengetragen, welche im Zusammenhang mit Bädern und Whirlpools standen. Das parasitäre Auftreten in Amöben und Protisten sowie die Voranpassung von *L. pneumophila* vor dem Befall dieser Eukaryoten werden als Hauptgründe für dessen Fähigkeit betrachtet, Säugetiere infizieren zu können.[16] Es wird berichtet, dass Wechselwirkungen von *L. pneumophila* mit anderen Arten in Biofilmen ihre Pathogenität auf Menschen verstärken, und vorgeschlagen, dass mit *L. pneumophila* befallene Mikroorganismen auch als Überträger betrachtet werden können, wenn sie in Wassertröpfchen eingeatmet werden und die Legionellen in konzentrierter Form in die Lunge gelangen.[45] Legionellen können eine Legionellose hervorrufen. Besonders die Legionärskrankheit, eine durch Tröpfcheninfektion hervorgerufene und unbehandelt lebensgefährliche Lungenentzündung (daher das Epitheton pneumophila) ist von Bedeutung. In den USA wurden um die Jahrtausendwende rund 90 % der Infektionen durch Legionellen von der Spezies *Legionella pneumophila* hervorgerufen,[46] in Europa im Zeitraum von 2011 bis 2015 sogar über 95 %.[47] Die Legionärskrankheit ist in Deutschland eine meldepflichtige Pneumonie. Das Robert-Koch-Institut verzeichnet jährlich bis zu 1600 Fälle mit einer Sterblichkeitsrate von etwa 5 %.[48] Aufgrund der Einteilung von *L. pneumophila* in die Risikogruppe 2 nach § 3 der Biostoffverordnung ist ein Arbeiten mit Legionellen im S2-Labor notwendig.

### 2.1.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* aus der Klasse der Gammaproteobacteria ist ein coliformes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer Länge von etwa 2 µm und einem Durchmesser unter 1 µm. Es ist fakultativ anaerob, gramnegativ und bildet keine Sporen. Es kann unter aeroben Bedingungen eine Vielzahl an Substraten, bevorzugt Hexosen wie Glucose, zum Wachstum nutzen und verwendet unter anaeroben Bedingungen die gemischte Säuregärung. Optimales Wachstum erfolgt bei 37° C mit einer Zellteilung in weniger als 30 Minuten. Der in dieser Arbeit eingesetzte nicht pathogene Stamm W

(Risikogruppe 1) ermöglicht ein Arbeiten im S1-Labor. Langjährige Erfahrungen mit ihm zeigen, dass es unwahrscheinlich ist, dass er beim Menschen eine Krankheit hervorrufen kann.

### **2.1.4 Analytische Methoden zur Detektion von Mikroorganismen**

Das Auftreten von Mikroben in allen Lebensbereichen des Menschen und das nahezu ubiquitäre Vorliegen um die Erdoberfläche machen sie zu einem wichtigen Forschungsfeld. Neue Erkenntnisse über Auftreten, Identifizierungsmöglichkeiten und ausführliche physikalische oder chemische Eigenschaften, welche im Zusammenhang mit ihrem Lebenszyklus stehen, ermöglichen, von ihnen hervorgerufenen Problemen entgegentreten zu können, oder mit dem geschaffenen Wissen die Entdeckung neuartiger Lösungen von bestehenden Aufgaben zu fördern. Analysemethoden von Mikroben können auf des ihnen zu Grunde liegenden Messprinzips in 5 Gruppen eingeteilt werden. Sie basieren auf der Kultivierung, Analysen von chemischen Eigenschaften, immunologischen Tests, molekularbiologischen Methoden oder strahlenfokussierenden Techniken, wie mittels rein optischer bzw. mikroskopischer Systeme. Anwendungsspezifisch ist eine Kombination von Verfahren möglich, z. B. Mikroskopie und andere Techniken. Während die Mikroskopie historisch gesehen den Ausgangspunkt der Mikrobiologie gelegt hat, ist heutzutage wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität der Nachweis von Mikroorganismen durch kulturbasierte und molekularbiologische Methoden der anerkannte Standard. Eine häufig für die Analyse von Mikroben genutzte optische Methode ist die Durchflusszytometrie, es zeigen aber auch neuartige Methoden vielversprechendes Potential.[49]

Die Kultivierung von Mikroorganismen ist meist Voraussetzung zur Entwicklung von Analysemethoden mit verbesserten Nachweiseigenschaften. Nachteil der Kulturverfahren ist, dass sie für langsam wachsende Mikroben keine schnelle Detektion gewährleisten können, welche in der klinischen Diagnostik jedoch möglicherweise von überlebenswichtigem Interesse ist. Treten mit den zu untersuchenden Mikroben Arten auf, welche unter den gleichen Kulturbedingungen ebenfalls wachsen, wird das Ergebnis verfälscht. Auch misslingt der Nachweis von Mikroben durch Kultivierung, wenn diese in einen lebensfähigen, aber nicht

## 2. Theoretischer Hintergrund

kultivierbaren Zustand (VBNC) übergehen. Es wird angenommen, dass weniger als 1 % der Mikroorganismenarten auf der Welt bestimmt wurden, während der Großteil der als mikrobiell dunklen Materie (MDM) bestimmten Gruppe, die wohl unter extremen Umweltbedingungen auftritt, bisher aufgrund fehlenden Wissens nicht kultivierbar ist.[50]

Methoden, welche die spezifische Bindung von Antikörpern und Antigenen zum Nachweis eines Analyten nutzen, werden als immunologische Verfahren bezeichnet. Vorteil dieser ist die schnelle, günstige Durchführbarkeit, wobei sie sich häufig auf den qualitativen Nachweis beschränken, welcher in der klinischen Diagnostik zur schnellen Abklärung eines Infektionsgeschehens hinreichend ist.

Auch Tests, welche die biochemische Umsetzung von definierten Substraten anzeigen, werden häufig eingesetzt, um Infektionen mit Pathogenen zu überprüfen. Während Versuche mit nur einer Substratumsetzung, beispielsweise dem Collitert-Test zur Beeinträchtigung der Wasserqualität durch coliforme Bakterien, nur begrenzte Aussagekraft zur Bestimmung von Mikroorganismen liefern, sind auch Tests mit bis zu 20 Substraten vorhanden, wie dem API (Analytischer-Profil-Index), welcher eine umfangreiche Unterscheidung verschiedenster Krankheitserreger ermöglicht. Klassische Verfahren aus der Analytischen Chemie, welche über Analyse der chemischen Zusammensetzung zur Bestimmung von Mikroben herangezogen werden, umfassen die Chromatographie, beispielsweise zur Identifikation der tuberkuloseauslösenden Mykobakterien mittels Gaschromatographie (GC), wobei die charakteristischen Mykolsäuren ausschlaggebend sind.[51] Weiterhin wird die Massenspektrometrie, etwa durch Ionisation von Lösungen mit ganzen Bakterienzellen mittels DESI (Desorptions-Elektrospray-Ionisierung),[52] oder die Schwingungsspektroskopie genutzt.[53]

Molekularbiologische Nachweismethoden nehmen wegen der durch sie möglichen genetischen Einteilung der Lebewesen in Spezies eine Hauptrolle bei der Charakterisierung von Mikroorganismen ein. Grundlegende Eigenschaft ist, dass sie als eigentlichen Analyten Nukleinsäuren, etwa kurze Oligonukleotide bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)[54] oder das gesamte Genom wie bei Methoden, welche die *multiple displacement amplification* (MDA) nutzen, detektieren.[55]

Für die direkte und bildgebende Untersuchung von Biofilmen und in ihnen auftretenden Mikroben sind nahezu alle eingesetzten Methoden auf die Fokussierung

von Strahlen direkt auf die Probe angewiesen. Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT) wird ein dreidimensionales Abbild von Biofilmen durch Interferenzeffekte mit Weißlicht erzeugt, über welche etwa die Dichte an Bakterien und Strukturen innerhalb von Biofilmen bestimmt werden können.[56] Da das maximale Auflösungsvermögen von der zentralen Wellenlänge, der Bandbreite und der Kohärenzlänge abhängt, ist eine Optimierung über die Wahl der Lichtquelle möglich. Es können mit neuartigen Superkontinuum-Lichtquellen ähnliche Werte wie mit klassischen mikroskopischen Systemen im niedrigen Mikrometermaßstab erreicht werden.[57] Die photoakustische Spektroskopie (PAS) ermöglicht tiefenaufgelöste räumliche tomographische Analysen und bietet sich wie von Schmid et al. gezeigt als nichtinvasive on-line-Überwachungsmethode verschiedener Parameter von Biofilmen, etwa Wachstum und Ablösungsereignissen, an.[58]

Höchste Detailauflösungen im Nanometerbereich werden für Analysen von Biofilmen mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) erreicht.[59] Diese beiden Methoden messen die unmittelbare Probenoberfläche mit begrenztem Informationsgehalt über eine dreidimensionale Struktur. Gerade für die REM ist die Wahl der Probenvorbereitungen von Biofilmpräparaten wichtig, um bestmögliche Auflösungen zu erzielen und ein Austrocknen der Probe im Hochvakuum zu vermeiden. Neuentwicklungen wie der Cryo-REM oder Umwelt-REM (ESEM), welche höhere Arbeitsdrücke zulassen, ermöglichen eine direkte Analyse.[59]

Massenspektrometrische Methoden, wie der Laser-Desorption-Ionisierung-MS (LDPI-MS)[60,61], Matrix-assistierten Laser-Desorption-Ionisierung-MS (MALDI-MS)[62,63] und Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie (Nano-SIMS),[64,65] kommen zur chemischen Analyse von Biofilmen zum Einsatz. Während die LDPI-MS nur ein geringeres örtliches Auflösungsvermögen im zweistelligen Mikrometerbereich besitzt und MALDI-Methoden auf die Einbringung des Biofilmmaterials in eine Matrixschicht angewiesen sind, lässt die Nano-SIMS interessante Einblicke, wie etwa dem Einbau von Stabilisotopen, im zweistelligen Nanometerbereich in Biofilmen zu.

Der Einsatz konfokaler Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM) in Kombination mit FISH stellt für die dreidimensionale Abbildung von Biofilmen eine besonders nützliche Analysemethode dar.[66] So konnten beispielsweise Informationen zur Verteilung von 6 Mikroorganismenarten in Biofilmen aus der Mundhöhle[67] oder für Nitrifikanten aus Biofilmen von Wasseraufbereitungsanlagen neuartige Erkenntnisse zu einem durch

## 2. Theoretischer Hintergrund

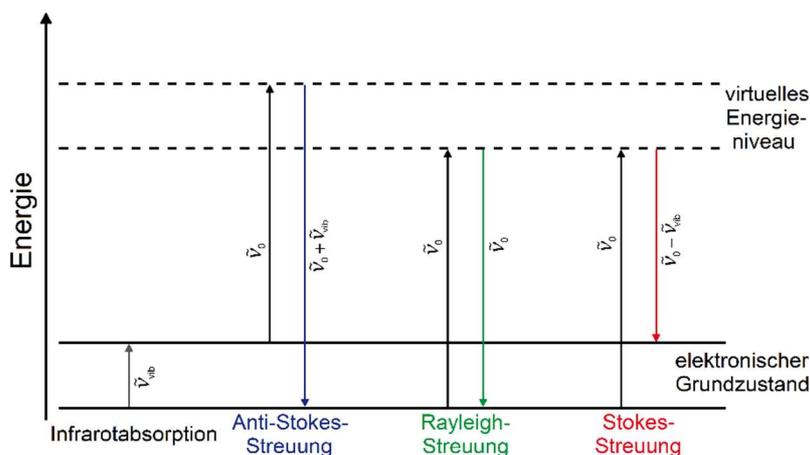
die Nitritkonzentration hervorgerufenen dreidimensionalen Anordnungsmuster gewonnen werden.[68] Nachteilig für diese Methode ist, dass die Entwicklung der FISH-Sonden für neue Zielorganismen aufwendig ist.

Auch Verfahren der Schwingungsspektroskopie, wie die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) und Raman-Spektroskopie (RS) werden zur Untersuchung von Biofilmen eingesetzt und können sich durch teils komplementäre Information ergänzen.[69] Vor allem die RS kann gut durch einen konfokalen mikroskopischen Aufbau als konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRM) zur dreidimensionalen Analyse von Biofilmen genutzt werden.

## 2.2 Raman-Mikrospektroskopie

### 2.2.1 Raman-Effekt

Die inelastische Streuung elektromagnetischer Strahlung an Festkörpern oder Molekülen erzeugt eine energetische Verschiebung zwischen der eingestrahnten und gestreuten Strahlung. Dieses physikalische Phänomen wird als Raman-Effekt bezeichnet.



**Abbildung 1** Jablonski-Diagramm mit Absorption und Streuung von elektromagnetischer Strahlung, wobei der Raman-Effekt als Energiedifferenz zwischen Anti-Stokes- bzw. Stokes-Streuung ( $\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_{\text{vib}}$  bzw.  $\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_{\text{vib}}$ ) und der anregenden Strahlung der Wellenzahl  $\tilde{\nu}_0$  mit der Wellenzahl  $\tilde{\nu}_{\text{vib}}$  eines Schwingungszustandes auftritt.

Der Effekt wurde von Adolf Smekal theoretisch beschrieben[70] und 1928 durch Chandrasekhara Venkata Raman sowie Kariamanikkam Srinivasa Krishnan anhand

spektroskopischer Daten von Pentan, Benzol und Toluol experimentell bestätigt.[71] Die Streuung von Licht kann entweder elastisch durch Abstrahlung unveränderten Lichts erfolgen oder inelastisch. Die elastische Rayleigh-Streuung mit einem Wirkungsquerschnitt von etwa  $10^{-30} \text{ m}^2$  ist der dominierende Effekt, während der Wirkungsquerschnitt der inelastischen Streuung etwa drei Größenordnung darunter liegt. Bei inelastischer Streuung von monochromatischem Licht an einer Raman-aktiven Substanz wie in Abbildung 1 dargestellt, kann die Raman-Verschiebung gut als Differenz der Wellenzahl (proportional zur Frequenz und Energie) zwischen Anti-Stokes- bzw. Stokes-Streuung ( $\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_{\text{vib}}$  bzw.  $\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_{\text{vib}}$ ) und der anregenden Strahlung ( $\tilde{\nu}_0$ ) detektiert werden. In der Raman-Spektroskopie (RS) wird die Verschiebung der gestreuten Strahlung klassischerweise in reziproken Zentimetern angegeben.

In dem Prozess der Interaktion von elektromagnetischer Strahlung und chemischer Verbindung wird diese in ein virtuelles Niveau angeregt, von welchem sie mit der Emission von Strahlung in einen energetisch höheren Schwingungszustand übergeht, als in der die Substanz vor der Wechselwirkung vorlag. Der virtuelle Zustand ist kein Eigenzustand der Verbindung, sondern kann nach quantenmechanischem Verständnis als nichtquantifiziertes Niveau aufgefasst werden, welches über den gesamten Bereich der angeregten Zustände erlaubt ist. Die beschriebene Form der Interaktion und das resultierende gestreute Licht geringerer Energie wird als Stokes-Streuung bezeichnet. Sie ist aufgrund der energieabhängigen Maxwell-Boltzmann-Verteilung und der meist schwächer besetzten angeregten Schwingungszustände sowie der somit höheren Übergangswahrscheinlichkeit intensiver als die Anti-Stokes-Streuung, welche in der RS ebenfalls Anwendung findet. Wird die Intensität der an chemischen Verbindungen gestreuten Strahlung gegen ihre Wellenzahl aufgetragen, erhält man Raman-Spektren, welche besonders im Fingerabdruckbereich unterhalb von  $1500 \text{ cm}^{-1}$  charakteristisch sind.

Die Streuungseffekte eines oszillierenden elektrischen Feldes  $E$  mit einem zweiatomigen Molekül können nach der klassischen Theorie über ein induziertes Dipolmoment  $D$  beschrieben werden (Gleichung 1).[72]

$$D = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 (\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_{\text{vib}})t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})t)$$

(Gleichung 1)

## 2. Theoretischer Hintergrund

$D$	induziertes Dipolmoment
$\alpha_0$	Polarisierbarkeit um die Gleichgewichtsposition
$E_0$	Schwingungsamplitude des elektrischen Feldes
$\nu_0$	Frequenz der Anregungsstrahlung
$\nu_{vib}$	Frequenz der Schwingung
$t$	Zeit
$q_0$	Schwingungsamplitude
$q$	nukleare Auslenkung
$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$	Polarisierbarkeitsänderung um die Gleichgewichtsposition

Die Rayleigh-Streuung wird durch den ersten Term repräsentiert, während die inelastische Streuung und damit der Raman-Effekt im zweiten Term durch die Änderung der Polarisierbarkeit skaliert ist. Für Raman-aktive Schwingungsmoden gilt also die Auswahlregel, dass die Polarisierbarkeit sich ändern muss.

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

(Gleichung 2)

Moleküle besitzen in Abhängigkeit ihres Aufbaus eine unterschiedliche Anzahl an Normalschwingungen, bei welchen die Atome, aus denen ein Molekül gebildet wird, je in der gleichen Frequenz schwingen. Die einzelnen Atome besitzen je 3 Freiheitsgrade für die Bewegung entlang der drei Raumachsen. Diese  $3N$  Freiheitsgrade werden für das gesamte Atom gewahrt, jedoch sind 3 Freiheitsgrade für die Bewegung des gesamten Moleküls entlang der Raumachsen und 3 Freiheitsgrade für die drei Rotationen um diese abzuziehen, von welchen bei linearen Molekülen nur 2 beobachtet werden können. Es ergeben sich somit  $3N - 6$  bzw.  $3N - 5$  Normalschwingungen. Diese werden in Streckschwingungen entlang einer Bindungsachse, welche in Raman-Spektren bis zu einer Verschiebung von  $3700\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden, und Deformationsschwingungen der Bindungswinkel, welche unterhalb von  $1650\text{ cm}^{-1}$  aufgezeichnet werden, eingeteilt.

$$S \propto P \cdot \alpha^2 \cdot \nu^4$$

(Gleichung 3)

$S$	Signalintensität der inelastischen Streuung
$P$	Leistung der Anregungsquelle
$\alpha$	Polarisierbarkeit
$\nu$	Frequenz der Anregungsstrahlung

In Gleichung 3 wird der Zusammenhang von der Signalintensität der inelastischen Streuung mit der einstrahlenden Leistung der elektromagnetischen Strahlung und dessen Frequenz angegeben, welcher auf die Kramers-Heisenberg-Dirac-Formel zurückzuführen ist.[73] Die Konzentration der Raman-aktiven Substanz kann bis auf einige Ausnahmen als proportionaler Term hinzugefügt werden. Die Leistung der Anregungsquelle, es werden neben seltenen Ausnahmen in Form des Masers ausschließlich Laser eingesetzt, ist zum einen gerätespezifisch limitiert, muss jedoch auch der zu untersuchenden Probe angepasst sein, da ansonsten eine thermische Zersetzung dieser droht. Vor allem die Wahl des Lasers und seiner Frequenz ist entscheidend, da diese in der vierten Potenz die Intensität des Signals beeinflusst. Dementsprechend intensiviert sich das Signal, wenn kürzere Wellenlängen zur Anregung genutzt werden. Da es jedoch substanzspezifisch gerade im kürzeren Wellenlängenbereich des visuellen Spektrums zur Fluoreszenz kommen kann, welche aufgrund ihrer deutlich höheren Intensität das Signal des Raman-Effektes verdecken würde, muss eine auf die jeweilige Anwendung optimierte Lösung gefunden werden.

Die Schwingungsfrequenz eines zweiatomigen Moleküls A–B kann durch das Hooke'sche Gesetz zur Rückstellkraft einer Feder und der Annahme eines harmonischen Oszillators beschrieben werden (Gleichung 4). Da das Produkt der Massen im Nenner des Radikanden den Term dominiert, nimmt mit zunehmenden Massen und ähnlichen Differenzen der Elektronegativität die Wellenzahl von Schwingungen ab.

## 2. Theoretischer Hintergrund

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{k \frac{m_A + m_B}{m_A m_B}}$$

(Gleichung 4)

$\tilde{\nu}$	Schwingungswellenzahl
$c$	Lichtgeschwindigkeit
$k$	Kraftkonstante
$m_A$	Masse des Atoms A
$m_B$	Masse des Atoms B

So führt der Austausch eines natürlichen Isotops mit schwereren Stabilisotopen in Molekülen zu einer Rotverschiebung der durch den Einbau betroffenen Schwingungsfrequenzen und es kann mit der RS das Vorhandensein von Stabilisotopen nachgewiesen werden. Das *stable-isotope probing* (SIP) ist beispielsweise für die Untersuchung von Stoffwechselwegen von Interesse. Auch ermöglicht die Platzierung von Stabilisotopen in Schadstoffen die Erforschung ihres Verbleibs und Verhaltens in der Umwelt.[74]

### 2.2.2 Dreidimensionales Auflösungsvermögen

Durch den Einsatz eines Lichtmikroskops im Raman-Mikrospektrometer ist ein laterales Auflösungsvermögen gemäß des beugungslimitierten Rayleigh-Kriteriums erreichbar. Für die kohärente Beleuchtung, diese Annahme ist durch die hohe Kohärenzlänge von vielen Lasern, welche sich aus dem Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit und der spektralen Linienbreite des Lasers bestimmt, meist gerechtfertigt, gilt die Beziehung in Gleichung 5.

$$r = \frac{0,46\lambda}{NA}$$

(Gleichung 5)

$r$	Radius der Airy-Scheibe bzw. laterale Auflösung
$\lambda$	Wellenlänge
$NA$	numerische Apertur des Objektivs

## 2. Theoretischer Hintergrund

Wird eine kohärente Beleuchtung angenommen, ergibt sich für die laterale Auflösung mit einem Objektiv der  $NA$  von 1,0, wie sie Wasserimmersionsobjektive besitzen, sowie einem He-Ne-Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) ein Wert von 291 nm. Da die spektrale Linienbreite eines Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Lasers (Nd:YAG) um ein Vielfaches höher liegt als eines He-Ne-Lasers, ist die Annahme einer kohärenten Beleuchtung jedoch nicht immer zutreffend. Für die inkohärente Beleuchtung gilt die Beziehung in Gleichung 6.

$$r = \frac{0,61\lambda}{NA}$$

(Gleichung 6)

Es ergibt sich für laterale die Auflösung mit einem Objektiv der  $NA$  von 1,0 sowie einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) ein Wert von 325 nm. Diese Abstände spiegeln ein optisches Auflösungsvermögen mit dem Radius der dazugehörigen Airy-Scheiben wider. Spektroskopische Daten würden die Überlagerung zweier Punktobjekte unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung durch Signale der jeweils anderen Substanz im Bereich der Objekte selbst in Form von Mischspektren zeigen. Nach der Definition der numerischen Apertur in Gleichung 7 können Werte von 1 nur mit Immersionsobjektiven erreicht werden. Es wäre ein Öffnungswinkel  $\theta$  von  $180^\circ$  für normale Objektive mit dem Brechungsindex für Luft von 1 notwendig, welcher physikalisch sinnlos ist.

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

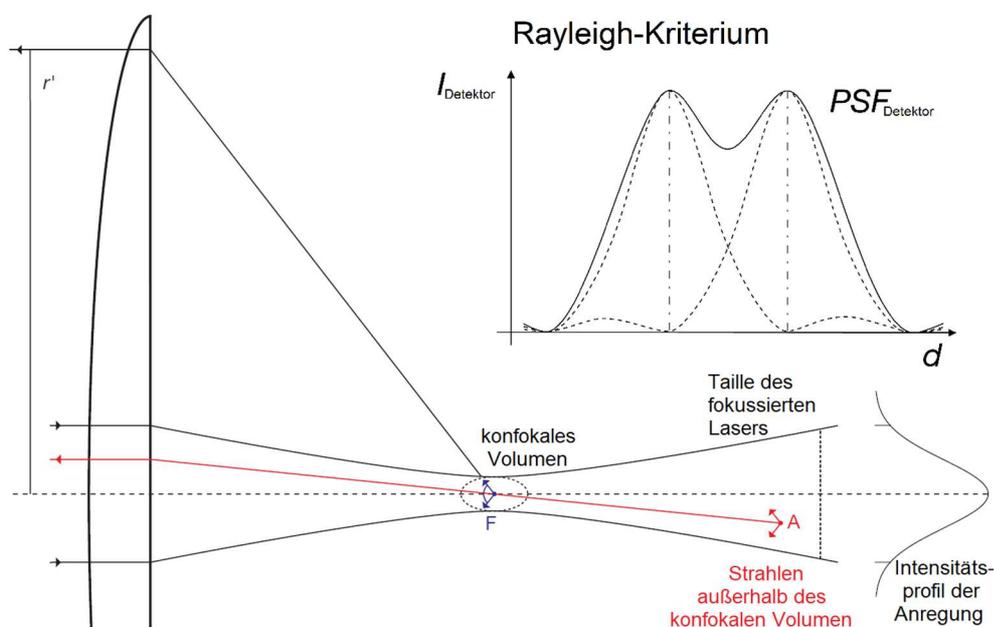
(Gleichung 7)

$NA$	numerische Apertur des Objektivs
$n$	Brechungsindex des Mediums am Objektiv
$\theta$	Öffnungswinkel des Objektivs

Unter idealen Bedingungen wird nach dem Rayleigh-Kriterium mit Objektiven hoher numerischer Apertur und Lichtquellen kurzer Wellenlänge das optimale laterale Auflösungsvermögen erzielt. Dieses ermöglicht mit den beispielhaft gewählten

## 2. Theoretischer Hintergrund

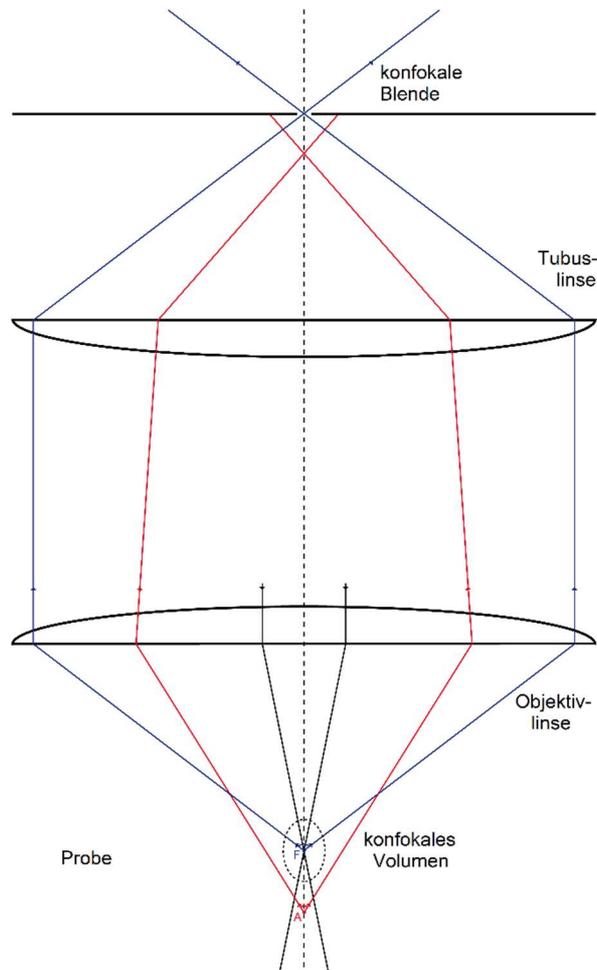
Parametern die Detektion einzelner Bakterienzellen. Meist wird jedoch eine maximal erreichbare laterale Auflösung von etwa  $1\ \mu\text{m}$  angenommen, um sicherzustellen, dass bei den Punktmessungen keine Fremdsignale auftreten. In Abbildung 2 wird das Auflösungsvermögen und Rayleigh-Kriterium graphisch dargestellt, wobei das Beugungsscheibchen durch ein zweidimensionales Profil gezeigt wird und das Problem von Fremdsignalen erklärt. Definiert ist das Rayleigh-Kriterium als Mindestabstand zweier Objekte entsprechend dem Abstand vom Zentrum eines Beugungsmusters zum ersten Minimum.



**Abbildung 2** Strahlengang und Intensitätsprofil des Anregungslasers mit Abbildung eines konfokalen Messvolumens im Brennpunkt  $F$ , Radius  $r'$  der Lichtachse, rot markiertem Störsignal aus Punkt  $A$  und der Darstellung des Rayleigh-Kriteriums durch Überlagerung der lateral beugungslimitierten Signale zweier Punktobjekte als Punktspreizfunktion der Intensität  $I$  am Detektor.

In Abbildung 2 ist ferner ein konfokaler Aufbau mit einem konfokalen Messvolumen angedeutet und ein beispielhaftes Störsignal  $A$  außerhalb der Brennebene markiert. Für eine dreidimensionale Betrachtung des Auflösungsvermögens reicht die oben ausgeführte Schlussfolgerung optimaler Messbedingungen nicht aus, da das Auflösungsvermögen für Analysen von Proben mit Bereichen unterschiedlicher Brechungsindizes durch die Refraktion des Anregungslaser entscheidend beeinflusst

wird. Auch verlangt die Wahl des konfokalen Blendendurchmessers besondere Aufmerksamkeit. In Abbildung 3 wird der konfokale Aufbau eines für die konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRM) eingesetzten Mikroskops gezeigt.

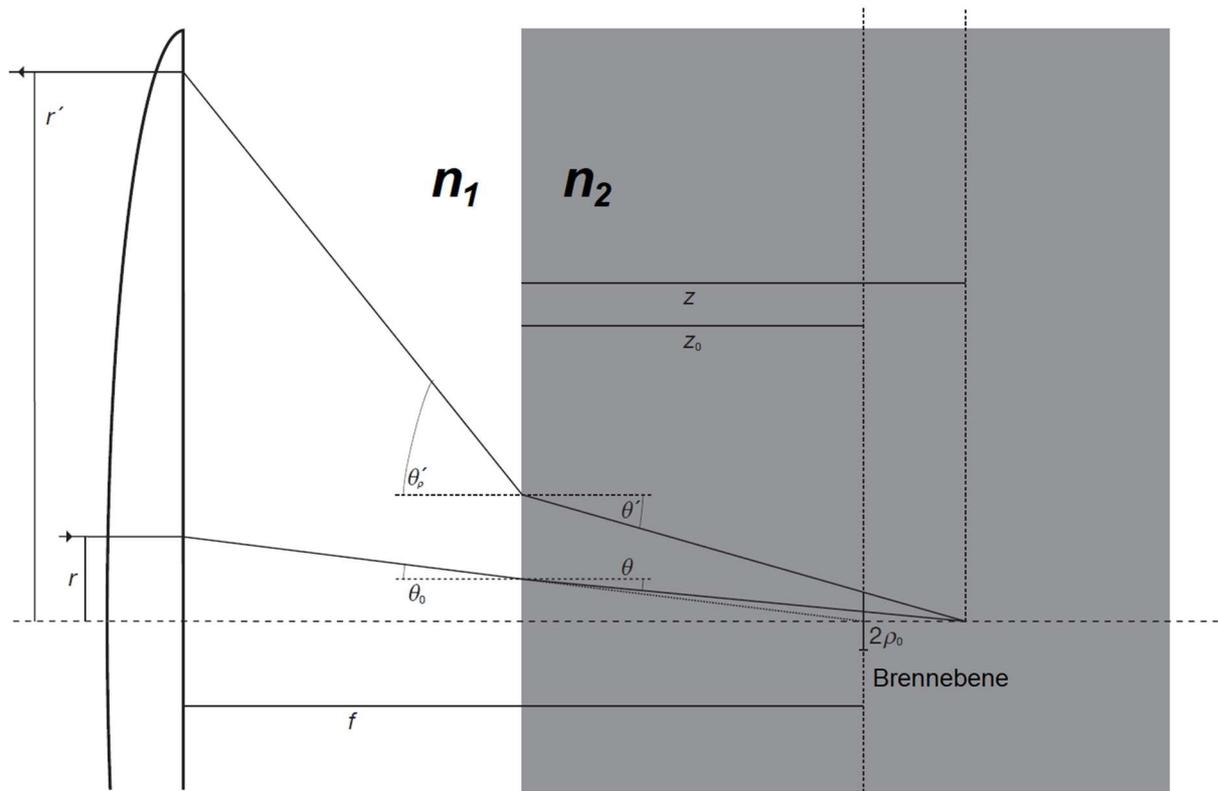


**Abbildung 3** Konfokaler Aufbau eines Mikroskops mit Anregungsstrahlen (schwarz), zu detektierenden Signalen (blau) im konfokalen Volumen um den Brennpunkt F und durch die Blende abgetrennten Signalen aus Punkt A (rot) von außerhalb der fokalen Ebene.

Für eine hohe Tiefenauflösung ist die Wahl des Blendendurchmessers offensichtlich von entscheidender Relevanz. Wird sie zu hoch gewählt, treten vermehrt Signale außerhalb der fokalen Ebene auf. Zu geringe Werte vermindern jedoch die Signalstärke aus dem betrachteten Messvolumen, was durch den niedrigen Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung und der meist niedrigen Signalintensität zu Detektionsproblemen führt. Des Weiteren sind für dreidimensionale Analysen eine Vielzahl an Messungen an den einzelnen Rasterpunkten notwendig, welche für eine niedrige Gesamtdauer einer Analyse möglichst kurzgehalten werden müssen.

## 2. Theoretischer Hintergrund

In Abbildung 4 ist der Effekt der Refraktion für eine Probe mit Bereichen unterschiedlicher Brechungsindizes für  $n_1 < n_2$  nach dem Snellius'schen Gesetz dargestellt.



**Abbildung 4** Vereinfachte Betrachtung der Lichtbrechung vom Randstrahl nach Baldwin und Batchelder mit der Brennweite  $f$ , dem Randradius  $r'$  zur Lichtachse, den Brechungsindizes  $n_1 < n_2$ , der Messtiefe  $z$  und dem Radius  $\rho_0$  des virtuellen Bildes, welches durch die konfokale Blende in der fokalen Ebene ( $z_0$ ) erzeugt wird.

Die grundlegende Tiefenauflösung nach Everall für transparente Proben wird in Gleichung 8 angegeben.[75]

$$d_z = \frac{4\lambda}{NA^2}$$

(Gleichung 8)

$d_z$	Tiefenauflösung
$NA$	numerische Apertur
$\lambda$	Wellenlänge des Anregungslasers

Durch die Refraktion wird dieser Wert jedoch reduziert und nach Everall gilt stattdessen Gleichung 9.

$$d_z = \Delta \left( \sqrt{\frac{NA^2 \left( \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2 - 1 \right)}{1 - NA^2} + \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2} - \frac{n_1}{n_2} \right)$$

(Gleichung 9)

$d_z$	Tiefenauflösung
$\Delta$	vermutete Messtiefe
$NA$	numerische Apertur
$n_1$	Brechungsindex des Immersionsmediums
$n_2$	Brechungsindex der Probe

Für dieses Modell der Tiefenauflösung wird angenommen, dass die beugungslimitierte Auflösung durch die Auswirkung der Lichtbrechung dominiert wird und die Wirkung einer konfokalen Blende zu vernachlässigen ist. Die Näherungen sind für hohe Messtiefen sowie markante Differenzen der Brechungsindices  $n_1$  und  $n_2$  gerechtfertigt. Auch wenn der Nutzen einer konfokalen Blende unterschätzt wird, ist dieses Modell besonders hilfreich für das Verständnis der Abweichung von vermuteter und realer Messtiefe. Diese ist als scheinbare Kompression der Proben in der Tiefenachse wahrnehmbar.

$$z = \Delta \left( \sqrt{\frac{\left( \frac{r'}{r_{max}} \right)^2 NA^2 \left( \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2 - 1 \right)}{1 - NA^2} + \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2} \right)$$

(Gleichung 10)

$z$	Tiefenauflösung
$\Delta$	vermutete Messtiefe
$NA$	numerische Apertur
$r'$	Randradius in der Lichtachse
$r_{max}$	maximaler Radius des Objektivs
$n_1$	Brechungsindex des Immersionsmediums
$n_2$	Brechungsindex der Probe

## 2. Theoretischer Hintergrund

Die reale Messtiefe ist nach Everall proportional zur vermuteten Tiefe und kann somit durch einen konstanten Kompressionsfaktor ausgeglichen werden (Gleichung 10). Die Eliminierung der Störsignale außerhalb der Brennebene durch eine konfokale Blende wird durch das Modell von Baldwin und Batchelder berücksichtigt.[76] Die Tiefauflösung der Beleuchtung wird hierfür getrennt durch eine zur Theorie von Everall äquivalente Strahlverfolgung bestimmt und das Ergebnis mit einem Modell vereint, welcher den Einfluss der konfokalen Blende auf die Sammeleffizienz des Streusignals bestimmt.

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos \theta_P + \cos \theta_Q - \cos \theta')$$

(Gleichung 11)

$\Omega$      Sammelraumwinkel

$\theta_P$     paraxialer Winkel

$\theta_Q$     Öffnungswinkel

$\theta'$      Randwinkel

Der Sammelraumwinkel  $\Omega$  (Gleichung 11) für die Streuung kann in eine durch den paraxialen Öffnungswinkel  $\theta_P$  abgetrennte innere Scheibe und einen zwischen dem Winkel  $\theta_Q$  und dem marginalen Winkel  $\theta'$  äußeren Kreisring eingeteilt werden. Über die Relation zum Radius  $\rho$  ihres Abbilds in der Brennebene werden diese Öffnungswinkel numerisch bestimmt.

$$\rho = \Delta \left( \tan \theta \sqrt{\frac{m^2 NA^2 \left( \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2 - 1 \right)}{1 - NA^2} + \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2} - \frac{\left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2}{\sqrt{\frac{1}{\tan^2 \theta} - \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2 + 1}} \right)$$

(Gleichung 12)

$\rho$      Radius des Bilds in der fokalen Ebene

$\Delta$      vermutete Messtiefe

$\theta$      Öffnungswinkel

$m$      normalisierter Radius

$NA$     numerische Apertur

$n_1$     Brechungsindex des Immersionsmediums

$n_2$     Brechungsindex der Probe

$$d_z = 1,34 \sqrt{\frac{\int_0^1 mI(m)z^2 \frac{\delta z}{\delta m} \delta m}{\int_0^1 mI(m) \frac{\delta z}{\delta m} \delta m} - \left( \frac{\int_0^1 mI(m)z \frac{\delta z}{\delta m} \delta m}{\int_0^1 mI(m) \frac{\delta z}{\delta m} \delta m} \right)^2}$$

(Gleichung 13)

- $d_z$  Tiefenauflösung  
 $m$  normalisierter Radius  
 $I(m)$  Profil der Laserintensität

Der normalisierte Radius in Gleichung 13 wird über den Sammelraumwinkel (Gleichung 11) ermittelt. Die Auswertung der Tiefenauflösung nach Baldwin und Batchelder erfolgt numerisch. Sie konnten zeigen, dass ihre theoretische Vorhersage mit Experimenten zufriedenstellend bestätigt werden. Die berechnete Tiefenauflösung von etwa 30  $\mu\text{m}$  1,5 mm innerhalb eines Diamanten mit Brennweite von 3,6 mm und einer numerischen Apertur von 0,55 konnten sie anhand von experimentellen Daten erfolgreich überprüfen.[76]

Eine vektorielle elektromagnetische Modellierung für hohe numerische Aperturen und kohärente Beleuchtung, die mittels Wolf's Integralformel[77] sphärischen Aberration und Beugungseffekte innerhalb von Proben mit variierendem Brechungsindices beachtet, wurde von Török et al. präsentiert.[78] Das Modell wurde von Sourisseau und Maraval zur Vorhersage der Tiefenauflösung der CRM eingesetzt.[79] Berechnungen und Experimente zeigten, dass mit einer konfokalen Blende von 200  $\mu\text{m}$ , einer Laserwellenlänge von 514,5 nm und einer numerischen Apertur von 0,9 für 20  $\mu\text{m}$  starke Polycarbonatfilme eine Tiefenauflösung von 1  $\mu\text{m}$  möglich ist.

## 2.3 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung

Wegen des geringen Wirkungsquerschnittes der Raman-Streuung, kommen vermehrt verstärkende Techniken wie der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (surface-enhanced Raman scattering: SERS),[80] der spitzenverstärkten Raman-Streuung (tip-enhanced Raman scattering: TERS),[81] der Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS)[82] oder nichtlineare Varianten, wie der kohärenten Raman-Streuung (coherent Raman scattering: CRS),[83] der kohärenten anti-Stokes Raman-Streuung (coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS)[84] sowie der stimulierte

## 2. Theoretischer Hintergrund

Raman-Streuung (SRS),[85] zum Einsatz. Im Folgenden soll auf SERS als verstärkende Technik eingegangen werden.

In einer Studie von Fleischmann, Hendra und McQuillan aus dem Jahr 1974, die die Adsorption von Pyridin an einer Silberelektrode mithilfe der RS untersuchten, wurden erste Indizien eines Raman-verstärkenden Effekts gefunden.[86] Wurde ein elektrisches Potential an der Elektrode angelegt, verschob dieses nicht nur die charakteristischen Raman-Signale, sondern variierte auch die relativen Intensitäten dieser. Sie führten dies zunächst auf die Bildung einer Monoschicht von Wassermolekülen zwischen der sorbierten Lage von Pyridin an der Silberelektrode zurück. Albrecht und Creighton bestätigten das Phänomen und berichteten für den Redoxzyklus des adsorbierten Pyridin von einer Verhundertfältigung der Intensitäten im Vergleich zu einer reinen Pyridinlösung, in der  $4 \times 10^5$  mal so viele Pyridinmoleküle das Licht streuten, was einem Verstärkungsfaktor von  $2 \times 10^6$  entspricht.[87] Schon 1975 stellte Philpott eine Verbindung zwischen der verstärkten Raman-Streuung sowie der elektrochemisch aufgerauten Elektrodenoberfläche her und führte die Verstärkung auf Interaktionen zwischen Oberflächenplasmonen und Analytmolekülen zurück.[88] Der Nachweis für den Zusammenhang der Signalvervielfältigung und der rauen Silberelektrode wurde 1978 von Creighton, Evans und Albrecht geliefert.[89] Im selben Jahr wurde von dem Einfluss der Anregungswellenlänge auf die verstärkte Raman-Streuung berichtet.[90] Tsang, Kirtley und Bradley bewiesen 1979, dass die oberflächenverstärkte Raman-Streuung auf Oberflächenplasmonen zurückzuführen ist.[91] Nach dem aktuellen Wissensstand kommt mit dem Prinzip der chemischen Verstärkung ein zweites Phänomen hinzu, wobei diese und die elektromagnetische Verstärkung durch Oberflächenplasmonen sich gegenseitig nicht ausschließen.[73]

$$E_{\text{lokal}} = E_0 \cos \theta \left( 1 + \frac{\varepsilon_{\text{Partikel}} - \varepsilon_{\text{Umgebung}}}{\varepsilon_{\text{Partikel}} + 2\varepsilon_{\text{Umgebung}}} \cdot \left( \frac{r}{d} \right)^3 \right)$$

(Gleichung 14)

$E_{\text{lokal}}$	lokales elektrisches Feld
$E_0$	Schwingungsamplitude des elektrischen Anregungsfeldes
$\varepsilon$	Permittivität
$r$	Radius der Nanostrukturen
$d$	Abstand zur nanostrukturierten Oberfläche

Größtenteils resultiert die oberflächenverstärkte Raman-Streuung aus dem elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus an nanostrukturierten Substraten wie Kolloiden.[92] Der Verstärkungseffekt kann durch den Zusammenhang des lokalen Feldes und dem elektrischen Feld  $E_0$  der Anregungsstrahlung für sphärische Partikel abgeschätzt werden, da die Raman-Streuung proportional zum Betrag des lokalen elektromagnetischen Feldes der vierten Potenz ist.[93] Aus dieser Relation und der Feldstärke des lokalen elektrischen Feldes (Gleichung 14) resultiert, dass die oberflächenverstärkte Raman-Streuung proportional zu  $d^{-12}$  ist und somit mit steigendem Abstand schnell zu vernachlässigen ist. Der Term mit den dielektrischen Leitfähigkeiten repräsentiert die Stärke der Oberflächenplasmonen, welche Plasmaschwingungen freier Elektronen im Leitungsband metallischer Strukturen in Form von Oberflächenwellen darstellen. Maximal ist dieser Term für den in Gleichung 15 angegebenen Fall.

$$\varepsilon_{\text{Partikel}} = -2\varepsilon_{\text{Umgebung}}$$

(Gleichung 15)

Für Nanostrukturen sind auch negative Werte der Permittivität möglich. Außerdem ist die Permittivität von der Frequenz des Anregungslasers abhängig. Stimmen diese und die der Oberflächenplasmonen überein, kommt es zu dem Resonanzeffekt mit den extremen Werten der lokalen Feldstärke. Neben dieser elektromagnetischen Verstärkung kommt es aufgrund eines Ladungstransfers von nanostrukturierten Substraten auf Analytmoleküle durch die Bildung von Charge-Transfer-Komplexen zur chemischen Verstärkung, welche Verstärkungsfaktoren von  $10^3$  bis zu  $10^{11}$  bewirken kann.[94,95] Während Faktoren in der Größenordnung von  $10^{10}$  ausreichend sind, um einzelne Moleküle, und das nicht nur von Stoffen hohen Wirkungsquerschnitts der Raman-Streuung wie Farbstoffen, zu detektieren, treten diese Faktoren meist nur schlecht reproduzierbar an *hot spots* auf.[96]

Ein stetig expandierendes Anwendungsfeld von SERS ist die Untersuchung von Mikroorganismen. Erstmals angewandt wurde SERS zur Analyse von Bakterien 1988 von Picorel et al., um die Verteilung von Carotinoiden in der Zellmembran von *Rhodobacter sphaeroides* zu untersuchen.[97] Efrima und Bronk nutzten SERS 1998 zur Untersuchung der Zelloberfläche und des intrazellulären Raums durch selektive

## 2. Theoretischer Hintergrund

Synthese von Silberkolloiden auf oder innerhalb von *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium*. [98] Jarvis und Goodacre zeigten 2004, dass SERS zur Differenzierung klinisch relevanter Bakterienstämme eingesetzt werden kann. [20] Auch für die Untersuchung von Biofilmen wurde SERS genutzt. So wiesen Ivleva et al. 2007 mittels SERS verschiedene chemische Bestandteile eines komplexen Multispezies-Biofilmes nach und bestätigten den Nutzen durch eine Signalverstärkung von bis zu zwei Größenordnungen und eine hohe Reproduzierbarkeit. Die Aufnahme des Stabilisotops  $^{13}\text{C}$  durch einzelne Bakterienzellen konnte 2015 durch Kubryk et al. mittels SERS detektiert werden. [74] Im Jahr darauf konnte dies durch Premasiri et al. sowie Kubryk et al. auf den Nachweis des Einbaus von  $^{15}\text{N}$  erweitert werden. [22,99] Die Anwendbarkeit von SERS auf Umweltproben wurde von Cui et al. gezeigt, welche die Aufnahme  $^{15}\text{N}$ -markierter Stickstoffquellen in Mikrokosmen aus Oberflächenwasser analysierten.

Hindernis bei der routinemäßigen Verwendung von SERS zur mikrobiellen Analyse ist eine schlechte Vergleichbarkeit von Daten unterschiedlicher Prozeduren [100] sowie in Abhängigkeit unterschiedlicher Mikroorganismen teils erschwerten Übertragbarkeit jener, was den Aufbau einer umfassenden Datenbank mit Daten verschiedener eingesetzter Kolloide oder Anregungslaser notwendig macht. [101]

## 2.4 Zellsortierung

### 2.4.1 *Fluorescence-activated Cell Sorting*

Die Isolierung einzelner Zellen aus einer komplexen mikrobiologischen Gemeinschaft anhand von phänotypischen Eigenschaften wie morphologischem Charakter, Lebensfähigkeit, Größe, molekularen Bestandteilen oder genomischer Information ermöglicht tiefe Einblicke in das Auftreten unbekannter Mikrobenarten oder die Heterogenität innerhalb einer einzelnen Spezies, welche in der Biowissenschaft etwa für klinische Diagnostik und Pharmaforschung, oder Umweltwissenschaft, zu neuen Entdeckungen sowie Entwicklungen führen können. Eingesetzte Isolierungsverfahren umfassen die Durchflusszytometrie, immunomagnetische Techniken, [102] die Anwendung der optischen Pinzette, [103] den Zellauswurf (*cell ejection*), [104]

mikrofluidische Systemen[105], die Dielektrophorese.[106] oder ein auf einem Aktuator basierendes System.[107]

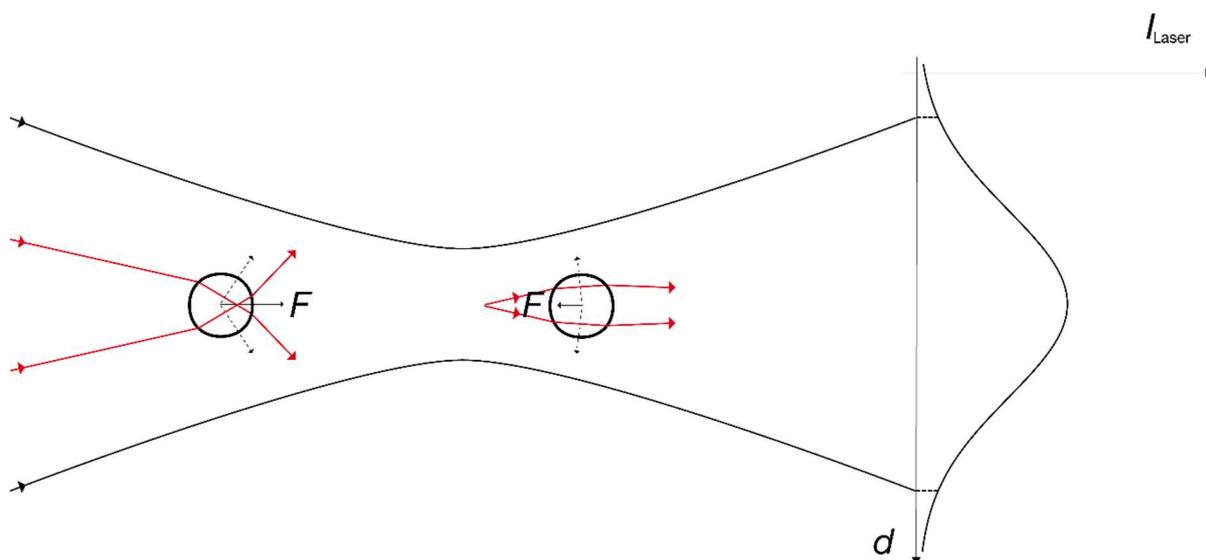
Die dominierende Methode ist das *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), welche eine Form der Durchflusszytometrie darstellt und auf Detektion von Fluoreszenzsignalen basiert. Sie wurde von Herzenberg entwickelt und erstmals 1969 von Hulett et al. zur Trennung von Säugetierzellen eingesetzt.[108] Durch hydrodynamische Fokussierung werden einzelne zu sortierende Zellen, von einem Hüllstrom ummantelt, durch eine Fließzelle geleitet. In dieser passieren sie in schneller Abfolge nacheinander eine Anregungsquelle, heutzutage Laser. Beim Austritt aus der Fließzelle wird der Flüssigkeitsstrom durch eine vibrierende Düse in Tröpfchen mit einem Volumen in etwa der Größe der untersuchten Zellenart zerstäubt, so dass optimalerweise nur eine Zelle pro Tröpfchen vorliegen kann. Hat eine Zelle zuvor beim Passieren des Laserstrahls die vorgegebenen Parameter erfüllt, wird sie beim Verlassen der Düse elektrisch geladen, darauf im elektrischen Feld von den übrigen Zellen abgetrennt und kann somit weiteren Analysen unterzogen werden. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung von Mikroorganismen vor Analysen mittels FACS wirkt sich meist negativ auf die Lebensfähigkeit aus, ermöglicht aber auch eine spezifische Markierung, beispielweise durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), um Mikroben eines bestimmten Genotyps zu isolieren. Batani et al. konnten diesen negativen Effekt durch Optimierung der Hybridisierungsbedingungen abmildern und berichten von einer erfolgreichen Kultivierung nach Sortierung mittels Kombination von FACS und FISH.[109]

### **2.4.2 Zellsortierung basierend auf Raman-Effekt**

Wie in Kapitel 2.4.1 ausgeführt, werden zahlreiche Isolationsverfahren eingesetzt, um einzelne Mikroorganismuszellen zu sortieren. Die Methode zur Detektion der Mikroben während des Sortierschrittes kann der Aufgabenstellung der Zellsortierung ebenfalls angepasst werden. So können durch die Anwendung der konfokalen Raman-Mikrospektroskopie umfangreiche Informationen zur chemischen Zusammensetzung und das phänotypische Profil mit den sortierten Zellen verknüpft werden. Diese Form der Zellsortierung wird als *Raman-activated cell sorting* (RACS) bezeichnet.

## 2. Theoretischer Hintergrund

Da für die CRM ein Laser als Anregungsquelle eingesetzt wird, bietet sich als Isolationsmethode der Mikrobzelle der Einsatz eines Lasers als optische Pinzette an. In Abbildung 5 wird das Prinzip dieser anhand der Strahlenoptik schematisch dargestellt.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips der optischen Pinzette mit rot gekennzeichneten Strahlengängen, welche die Refraktion in Partikeln zeigen, und dem Intensitätsprofil  $I$  des fokussierten Lasers über den Durchmesser  $d$  des Laserstrahls.

Für Objekte die größer als die Wellenlänge des eingesetzten, stark fokussierten Lasers sind, kann die Strahlenoptik die Rückstellkraft in Richtung des Laserfokus erklären. Die Laserstrahlen werden sowohl beim Eintritt in den Partikel gebrochen als auch beim Austreten. Da auch Licht einen Impuls besitzt, wirkt eine Kraft auf das Objekt, die der Ablenkung des Lichts durch die Refraktion an ihm entgegengesetzt ist. Im Falle eines Gauß-Strahls erfährt das Objekt durch eine geringere Lichtintensität am Rand des Laserstrahls eine resultierende Kraft in das Zentrum des Strahls. Im Zentrum des Laserfokus werden alle Strahlen symmetrisch gebrochen und es erfolgt keine Kraftübertragung. Für gering fokussierte Laser würde der Strahlungsdruck den Partikel in Ausbreitungsrichtung des Lichts mitführen. Dielektrische Objekte, die kleiner als die Wellenlänge des eingesetzten Lasers sind, erfahren durch ein induziertes Dipolmoment eine Rückstellkraft in Richtung des Laserfokus. Die Interaktion von Dipol und induziertem Feld bewirkt eine Kraft in Richtung der maximalen Lichtintensität, welche dem elektrischen Feldgradienten folgt.

Unter Verwendung der RACS mit Manipulation von Mikroorganismen durch eine optische Pinzette entdeckten Lee et al. im Darmmikrobiom von Mäusen eine diversifizierte Gemeinschaft von Bakterien mit einigen Mitgliedern der bisher wenig erforschten Familie der Muribaculaceae.[103] Ebenfalls mit der RACS und Mikromanipulation durch optische Pinzette konnten Berry et al. metabolische aktive Mikroben durch Aufnahme von schwerem Wasser und der Detektion der rotverschobenen Kohlenstoff-Wasserstoff-Streckschwingung bestimmen sowie nach Abtrennung genetisch zuordnen.[110] Song et al. fanden mittels *Raman-activated cell ejection* (RACE) neuartige Gene der Carotinoid- und Isoprenoid-Synthese in einem nichtkultivierbaren Cyanobakterium aus dem Toten Meer.[104]

Da die Intensität der Raman-Streuung wegen des niedrigen Wirkungsquerschnittes eine geschwindigkeitslimitierende Eigenschaft beim Sortieren von Zellen darstellt, kann die Durchsatzrate und Effizienz von RACS erhöht werden, wenn SERS erfolgreich auf diese vielversprechende Methode der Zellsortierung übertragen wird.

## **3. Experimenteller Teil**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie und speziell der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) für dreidimensionale Analysen von Mikroorganismen und deren Aggregaten zu erforschen. Aufbauend auf standardmäßigen Raman-spektroskopischen Analysen des medizinisch relevanten Bakteriums *Legionella pneumophila* und der als dessen Wirtsorganismus bekannten Amöbe *Vermamoeba vermiformis* werden umfangreiche Untersuchungen zum Einsatz von SERS zur Detektion von Mikroorganismen durchgeführt. Es kommen grampositive und gramnegative Mikroorganismen einschließlich eines Sporenbildners sowie eines Archaeons zum Einsatz. Charakteristische SERS-Signale mikrobiellen Ursprungs werden anhand von Referenzspektren ausgewertet. Schwerpunkt der SERS-Studien bildet der Einfluss wechselnder physiologischer Bedingungen auf die Resultate, wie dem Einsatz verschiedener Waschmedien, der Alterung von Probenkulturen oder einer Stabilisotopenmarkierung mit Deuterium. Schließlich wird mit Hilfe von Biofilmmodellen, beginnend mit Kunststoffpartikeln als Analyt, die Aussagekraft dreidimensionaler Raman-Messungen erforscht. Besonderes Augenmerk liegt auf der dreidimensionalen Detektion von Mikroorganismen mittels SERS. Des Weiteren kommt der Nachweis eines charakteristischen SERS-Signals bei der Sortierung von einzelnen mit Kohlenstoff-13 markierten und unmarkierten *E. coli*-Zellen zum Einsatz.

## 3.1 Kultivierung von Mikroorganismen

### 3.1.1 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* und *Pseudomonas putida*

*B. subtilis* (DSM 1087), *E. coli* (DSM 1116), *M. luteus* DSM 20030) und *P. putida* (ATCC 12633) wurden sowohl in LB-Medium als auch M9-Medium kultiviert. In einem Liter LB-Medium sind 6.25 g Hefeextrakt, 12.5 g Trypton und 6.25 g NaCl enthalten. Das gemischte Medium wurde anschließend autoklaviert.

Für ein Endvolumen von einem Liter des M9-Mediums wurden 6.78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5 g NaCl, 28.6 mg Borsäure, 15.5 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 19.2 mg Ethylenediaminetetraacetat-Dihydrat, 10.2 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4.5 mg  $\text{CaCl}_2$ , 3.9 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  und

### 3. Experimenteller Teil

0.5 mg  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 200 mL Wasser gelöst und autoklaviert. Separat wurde eine 0.5 M D-Glucoselösung autoklaviert und eine 3 mM Thiaminlösung mit Polyethersulfonspritzenfiltern steril filtriert. 40 ml der Glucoselösung und 1 ml der Thiaminlösung wurden mit 200 ml konzentrierter Salzlösung vermischt, mit autoklaviertem Wasser auf das Endvolumen von einem Liter verdünnt, um eine Glucosekonzentration von 18 mg/L zu erreichen. Für deuterierte Proben wurde die Mediumvorbereitung herunterskaliert und die konzentrierte Lösung mit  $\text{D}_2\text{O}$  eines Volumenanteils von 32.9% verdünnt, um eine finale Volumenkonzentration von 25%  $\text{D}_2\text{O}$  zu erhalten. Für Kultivierungen mit vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose wurde nur ein Bruchteil der genannten Volumina der gleichen Konzentrationen verwendet, um eine finale  $^{13}\text{C}_6$ -Glucosekonzentration von 18.6 mg/L zu erreichen. Für die  $^{15}\text{N}$ -Markierung von *E. coli* wurde lediglich  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  durch  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  in der Vorbereitung der konzentrierten Salzlösung getauscht.

Kulturen wurden abhängig vom Volumen in 50-ml-Kulturröhrchen (5 ml) oder 250-ml-Erlenmeyer-Kolben (25 ml) für 16 h bei 37 °C und 100 U/min bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert.

#### **3.1.2 *Nitrospira inopinata* und *Nitrososphaera gargensis***

Die Kultivierung von *N. inopinata* und *N. gargensis* wurde bei 46 °C und ohne Schütteln durchgeführt. Eine Spurenelementlösung wurde pro Liter mit 34.4 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 70 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 72.6 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 80 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und 2.5 ml 37-prozentige Salzsäure hergestellt. Eine Selen-Wolfram-Lösung enthält pro Liter 0.5 g NaOH, 3 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  und 4 mg  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Das Medium mit 0.5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  enthält pro Liter 50 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 75 mg KCl, 50 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 584 mg NaCl, 4 g  $\text{CaCO}_3$ , 1 ml Spurenelementlösung und 1 ml einer Selen-Wolfram-Lösung. Diese Lösungen wurden dem autoklavierten Medium mittels Sterilfiltration durch 0.2- $\mu\text{m}$ -Celluloseacetatfilter hinzugefügt.

### 3.1.3 *Legionella pneumophila*

Für die Kultivierung von Legionellen wurden GVPC-Agarplatten genutzt. Es wurde eine Pipettenspitze der Kryokultur in 100 µl autoklaviertes Wasser gegeben und dieses mittels Drigalskispatel auf den Platten verteilt. Diese wurden kopfseitig gelagert bei 37° C im Dunkeln für 7 Tage inkubiert. Es wurden je drei Kolonien entnommen, in 1 ml Wasser autoklaviert und mittels Vortexmischer suspendiert.

### 3.1.4 *Vermamoeba vermiformis*

*V. vermiformis* wurde aerob in modifiziertem PYNFH-Medium (ATCC 327-X) kultiviert. Zu dem von LGC Standards erworbenen und für den Einzelgebrauch verpackten Mediapulver wurden 55 ml autoklaviertes Wasser gegeben und geschwenkt bis das gefriergetrocknete Pulver gelöst war. In Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> wurden 15 ml Medium mit 10 µl der Kryokultur gegeben und leicht geschwenkt. Diese wurden bei 30° C im Klimaschrank über 4 Wochen inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass die Kulturen nicht austrocknen. Um *V. vermiformis* mit Kohlenstoff-13 oder Stickstoff-15 zu markieren, wurde *E. coli* wie in Abschnitt 3.1.1 mit <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glucose oder <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl im M9-Medium kultiviert. Ein Volumen von 25 ml dieser <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Kulturen sowie einer nicht markierten, in M9-Medium aufgezogenen Kultur, wurde je durch Zentrifugieren (2250g, 5 min, 20 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und der Zellrückstand in 50 ml einer Salzlösung resuspendiert. Für diese Salzlösung wurden 142 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120 mg NaCl, 3 mg CaCl<sub>2</sub> und 2 mg MgSO<sub>4</sub>·in 1 l Wasser gelöst und danach autoklaviert. Die so hergestellten Nährmedien auf Basis von *E. coli* wurden ebenfalls autoklaviert. Ein Volumen von je 5 ml dieser <sup>12</sup>C/<sup>14</sup>N-, <sup>13</sup>C/<sup>14</sup>N- und <sup>12</sup>C/<sup>15</sup>N-Medien wurde mit 10 µl einer in PYNFH-Medium aufgezogenen *V. vermiformis*-Kultur inokuliert und in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei 30° C im Klimaschrank über 4 Wochen inkubiert. Es ist wiederum darauf zu achten, dass die Kulturen nicht austrocknen.

### 3. Experimenteller Teil

## 3.2 Lebend/tot-Unterscheidung von *E. coli*

### 3.2.1 Colilert-Test

Die Testkulturen wurden um die Faktoren  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  verdünnt und die farbstoffmarkierte Nährstoffmischung aus dem erworbenen Colilert-18-Test (IDEXX, Niederlande) mit den verdünnten Kulturlösungen auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Diese Lösungen wurden in die vorgesehenen Plastiktablets gefüllt, welche wiederum versiegelt und bei 35 °C für 18 h inkubiert wurden. Die Zahl der verfärbten oder fluoreszierenden Vertiefungen wurde anhand der mitgelieferten Wahrscheinlichkeitstafel ausgewertet.

### 3.2.2 Durchflusszytometrie

Für die zytometrische Analyse von Bakterienkulturen wurde der LIVE/DEAD BacLight-Test (Life Technologies GmbH, Deutschland) genutzt. Hierfür wurde 1 ml der Kultur zentrifugiert (5500g, 1 min, 20 °C), der Überstand verworfen und das Zellpaket in 1 ml einer 154 mM Kochsalzlösung resuspendiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Es wurden 1.5 µl einer 3.34 mM SYTO-9-Lösung sowie 1.5 µl einer 20 mM Propidiumiodidlösung in Dimethylsulfoxid zu 996 µl einer 154 mM Kochsalzlösung hinzugefügt und mit 1 µl der gewaschenen *E.-coli*-Kultur gemischt. Die gefärbte Probe wurde im Durchflusszytometer analysiert.

## 3.3 Präparation von artifiziellen Biofilmen

In dieser Arbeit wurde Agarosegel mit einem Massenanteil von 2% als Matrix für künstliche Biofilme genutzt. Die Agarosesuspension wurde unter Rückflusskühlung bei 90 °C für 5 min gerührt. Bei 37 °C wurden 600 µl einer beliebigen Probensuspension zu 8.4 ml der gelösten Agarose hinzugefügt, leicht geschwenkt und 2 ml in vorgewärmte Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm gegeben. The resultierenden Gele wurden mit Wasser bedeckt.

Gele mit Plastikpartikeln wurden durch Zugabe von 3,3 mg Polystyrolpartikeln ( $\varnothing = 5,19 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ), 3,8 mg Polymethylmethacrylatpartikeln ( $\varnothing = 3,02 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) und

4,8 mg Melamin-Formaldehyd-Harz-Partikeln ( $\varnothing = 4,38 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ) in die eingesetzte Lösung hergestellt. Gele für die Analyse von  $^{12}\text{C}$ -/ $^{13}\text{C}$ -markiertem *E. coli* mittels SERS wurden durch Zugabe von je 300  $\mu\text{l}$  Probenlösung hergestellt, wie sie im Abschnitt 3.4.2 für Bakterien mit *in situ* hergestellten Silbernanopartikeln beschrieben ist.

## 3.4 Kolloid-Synthese für SERS-Analysen

### 3.4.1 Goldnanopartikel

Für die Reduktionslösung mit einem Volumen von 100 ml wurden zu 90 ml Wasser 10 ml einer 0,1 M Natronlauge gegeben und 34,8 mg  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  gelöst. Diese Lösung wurde jeweils am Tag der Anwendung hergestellt, um eine verminderte Konzentration durch Zersetzung zu vermeiden. Zu 450  $\mu\text{l}$  dieser Reduktionslösung wurden bei Raumtemperatur langsam 50  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Tetrachlorogoldsäurelösung hinzugefügt und das Reaktionsgefäß dreimal invertiert, um die Goldnanopartikel (AuNP) zu bilden. Für die *In-situ*-Synthese von AuNP auf Bakterien wurde 1 ml einer Bakterienkultur zentrifugiert (5500g, 1 min, 20 °C), der Überstand verworfen und das Zellpaket in 1 ml Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Nach dem dritten Zentrifugieren wurde das Zellpaket mit 450  $\mu\text{l}$  der Reduktionslösung resuspendiert und nun mit 50  $\mu\text{l}$  der Tetrachlorogoldsäurelösung versetzt.

### 3.4.2 Silbernanopartikel

Für die Reduktionslösung mit einem Volumen von 100 ml wurden zu 90 ml Wasser 10 ml einer 0,1 M Natronlauge gegeben und 34,8 mg  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  gelöst. Wiederum wurde diese Lösung jeweils am Tag der Verwendung hergestellt, um eine sinkende Konzentration des Reduktionsmittels zu unterbinden. Zu 450  $\mu\text{l}$  dieser Reduktionslösung wurden bei Raumtemperatur langsam 50  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Silbernitratlösung hinzugefügt und das Reaktionsgefäß dreimal invertiert, um die Silbernanopartikel (AgNP) zu bilden. Zur Analyse von Referenzsubstanzen wurde das entstandene Kolloid zentrifugiert (5500g, 1 min, 20 °C), der Überstand verworfen und die abgesetzten AgNP mit einer  $10^{-6}$  M Referenzlösung resuspendiert. Auch für die *In-situ*-Synthese von AgNP auf Bakterien wurde 1 ml einer Bakterienkultur zentrifugiert (5500g, 1 min, 20 °C), der Überstand verworfen, das Zellpaket in 1 ml Wasser

### 3. Experimenteller Teil

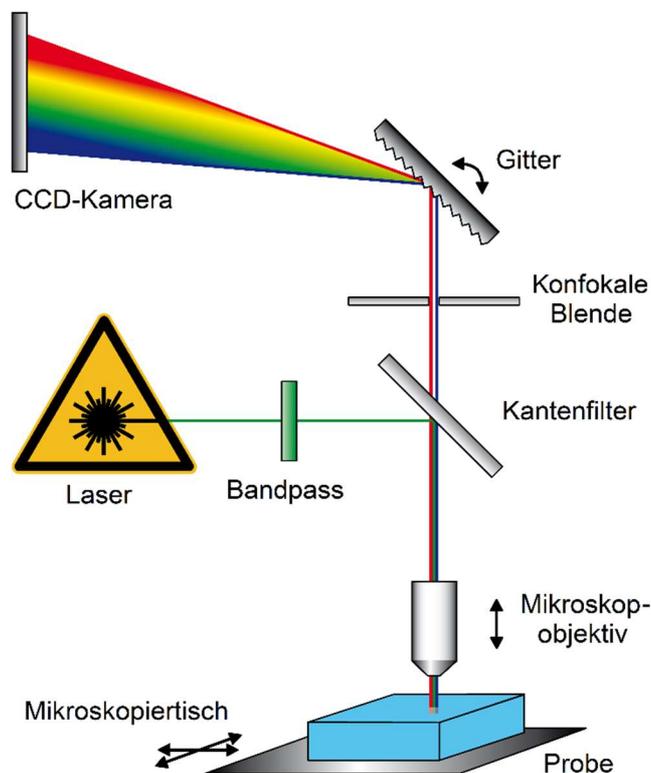
resuspendiert und der Waschschrift wiederholt. Nach dem dritten Zentrifugieren wurde das Zellpaket mit 450  $\mu\text{l}$  der Reduktionslösung resuspendiert und mit 50  $\mu\text{l}$  der Silbernitratlösung versetzt. Wurden kolloidale Präparate für eine Untersuchung bei einer Laser-Anregungswellenlänge von 532 nm vorgesehen, wurden die oben genannten Stoffmengenkonzentrationen der Reagenzien verdoppelt und die Kolloidsynthese bei 5° C durchgeführt.

### **3.5 Rasterelektronenmikroskopie-Analysen**

Probenvolumina von 1  $\mu\text{l}$  wurden direkt auf Aluminiumprobenhalter gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Sigma-300-VP-Rasterelektronenmikroskop von Carl Zeiss wurde eingesetzt. Bilder wurden mit dem In-Lens-Detektor bei einer Beschleunigungsspannung von bis zu 10 kV, einem Arbeitsdruck unter  $2 \times 10^{-5}$  mbar und einem Arbeitsabstand von 2,8-4,6 mm aufgenommen.

### **3.6 Raman-Mikrospektroskopie**

Alle Analysen wurden mit einem LabRAM HR800 Raman-Mikrospektrometer (Horiba Jobin Yvon, Frankreich) durchgeführt. Dieses ist mit einem motorisierten Mikroskopiertisch, einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera, einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (532 nm, 35 mW auf der Probe), einem He-Ne-Laser (633 nm, 13.8 mW auf der Probe), Dioden-Laser (785 nm, 55 mW auf der Probe) und einem Nd:YAG-Laser (1064 nm, 500 mW auf der Probe) sowie den dazugehörigen Banden- sowie Kantenfiltern ausgestattet. Die im Olympus BXFM Mikroskop integrierte Videokamera erlaubt die normale Mikroskopie von Proben. Die konfokale Blende wurde auf einen Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  eingestellt. Es wurde ein Diffraktionsgitter mit 300 und 600 Linien pro Millimeter eingesetzt. Das System wurde auf die Phononenbande erster Ordnung von Silizium bei  $520.7 \text{ cm}^{-1}$  kalibriert. Getrocknete Proben wurden mit Ausnahme von SERS-Analysen auf  $\text{CaF}_2$ -Einkristall-Trägern und alle Messungen von getrockneten Proben mit einem Objektiv der Vergrößerung von 100 $\times$  (Olympus MPlan N, NA = 0.9) durchgeführt. Dreidimensionale Aufnahmen erfolgten mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit Vergrößerung von 100 $\times$  (Olympus LUMPlan FL N, NA = 1.0).



**Abbildung 6** Reduzierte schematische Darstellung des Raman-Mikrospektrometers.

### 3.7 SERS-Analysen

Von den in Abschnitt 3.4 hergestellten Suspensionen wurde 1  $\mu\text{l}$  bei Raumtemperatur auf einem Objektträger getrocknet. Für Analysen von einzelnen Bakterienzellen wurde der Laserstrahl auf eine beliebige Zelle für  $3 \times 1$  s bei einer Laserintensität von 138  $\mu\text{W}$  bis 350  $\mu\text{W}$  fokussiert. Mit Ausnahme von Analysen der Referenzsubstanzen, dreidimensionalen Messungen oder Analysen zum Einfluss gealterter *E. coli*-Kulturen wurde ein Diffraktionsgitter mit 300 Linien pro Millimeter und ein 532-nm-Laser verwendet, wodurch die Raman-Verschiebung im spektralen Bereich von 400-3300  $\text{cm}^{-1}$  in einem Messfenster aufgezeichnet werden konnte. Bei den aufgezählten Ausnahmen wurde ein 633-nm-Laser und ein Gitter mit 600 Linien pro Millimeter verwendet, weshalb die spektrale Auflösung in diesen Fällen erhöht werden konnte. Im Fall von Messungen des spektralen Bereiches von 50-4000  $\text{cm}^{-1}$  sind jedoch vier zusätzliche Messfenster notwendig, wodurch die Messzeit sich verfünffacht. Daher wurde dieser Bereich nur bei Messungen von Referenzsubstanzen und einfachen

### 3. Experimenteller Teil

Analysen von *E. coli* vollständig aufgezeichnet. SERS-Spektren von den Referenzsubstanzen Adenin, Adenosin, Adenosintriphosphat (ATP), Allantoin, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Riboflavin, Guanin, Hypoxanthin, Pyrimidin, Thymin, Uracil, Harnsäure und Xanthin wurden mit einer Messzeit von  $3 \times 1$  s bei einer Laserleistung von  $138 \mu\text{W}$  aufgezeichnet. Für aufwendigere Untersuchungen wie der dreidimensionalen Analyse von artifiziellen Biofilmen mit *E. coli* wurde nur der spektrale Bereich von  $50\text{-}1260 \text{ cm}^{-1}$  bei einer Messzeit von  $2 \times 100$  ms und Laserleistung von  $1,38 \text{ mW}$  aufgezeichnet, jedoch mit örtlichen Messschritten von  $1 \mu\text{m}$ . Eine automatisierte Auswertung von einzelnen SERS-Peaks um  $730 \text{ cm}^{-1}$  erfolgte mit der Software MATLAB. Die Spektren wurden hierfür nicht normalisiert und das Signal im spektralen Fenster von  $700\text{-}760 \text{ cm}^{-1}$  als Lorentzkurve mit linearem Untergrund mittels Ausgleichsrechnung bestimmt. Als Signalwert dient die Amplitude der bestimmten Kurvenfunktion.

### 3.8 Zellsortierung mittels SERS-Signals

Die Sortierung von Zellen erfolgte an einem modifizierten LabRAM HR800 Raman-Microspektrometer (Horiba Jobin Yvon, Frankreich). Statt eines gleichzeitig aktivierten Lasers konnten zeitgleich ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser ( $532 \text{ nm}$ ,  $30 \text{ mW}$ ) und ein Nd:YAG-Laser ( $1064\text{-nm}$ -Laser,  $500 \text{ mW}$ ) eingesetzt werden. Äquivalent zur *In-situ*-AgNP-Synthese mit *E. coli* in Abschnitt 3.4.2 wurde eine Probe mit vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Bakterienzellen und eine nicht mit Stabilisotopen markierte Bakterienprobe hergestellt. Diese wurden vereinigt und erneut zentrifugiert ( $5500g$ ,  $1 \text{ min}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), um überschüssiges Reagenz zu entfernen, welches bei Bestrahlung mit hoher Laserleistung Blasen bildete. Ein kleines Volumen der in Wasser aufgenommenen Probe wurde in rechteckige Glaskapillaren gezogen, welche zuvor zu drei Vierteln mit einem PBS-Puffer gefüllt wurden, der  $5.6 \text{ mg/l}$  Tween 20 enthielt. Die Öffnungen der Kapillaren wurden mit Petrolatum verschlossen. Partikel konnten durch die sich bildende Grenzschicht in die zellfreie Region transferiert werden, indem die Glaskapillare durch Steuern des motorisierten Mikroskopiertisches bewegt wurde, während der Nd:YAG-Laser als optische Pinzette fungierte. Die SERS-Analysen mit zeitgleicher Zellsortierung wurden mit einem Wasserimmersionsobjektiv eines Vergrößerungsfaktors von  $63$  (Zeiss C-APOCHROMAT,  $\text{NA} = 1.2$ ) bei einer

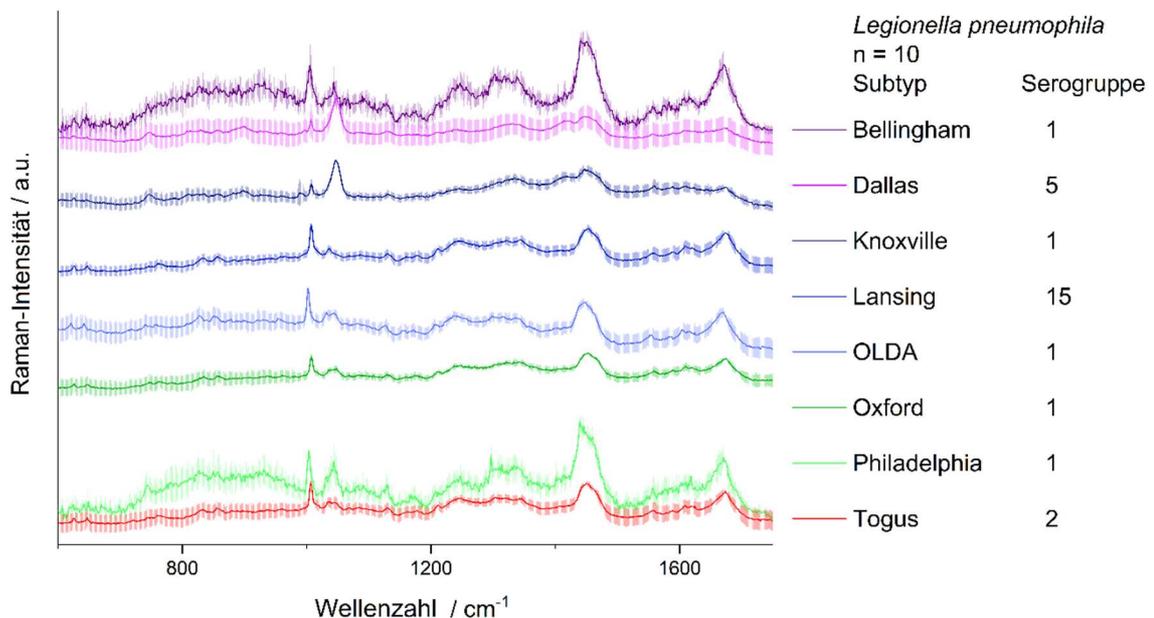
Aufnahmezeit je Spektrum von 100 ms, voller Leistung der optischen Pinzette (1064-nm-Laser, 500 mW) und reduzierter Leistung des Anregungslasers (532 nm, 3 mW) durchgeführt.

## **4. Ergebnisse und Diskussionen**

## 4.1 Raman-Mikrospektroskopie von Mikroorganismen

### 4.1.1 *Legionella pneumophila*

Als Einstieg in diese Arbeit soll die Aussagekraft von Raman-Analysen für die Subtypisierung von dem potentiellen Pathogen *L. pneumophila* untersucht werden. Acht Subtypen verschiedener Serogruppen wurden erstmals mittels RS untersucht. Die Raman-Spektren in Abbildung 7 wurden von einzelnen Bakterienzellen, welche durch Hitze inaktiviert wurden, mit einer Messzeit von  $10 \times 10$  s bei einer Laserleistung von 8,4 mW und einer Anregungswellenlänge von 532 nm aufgezeichnet.

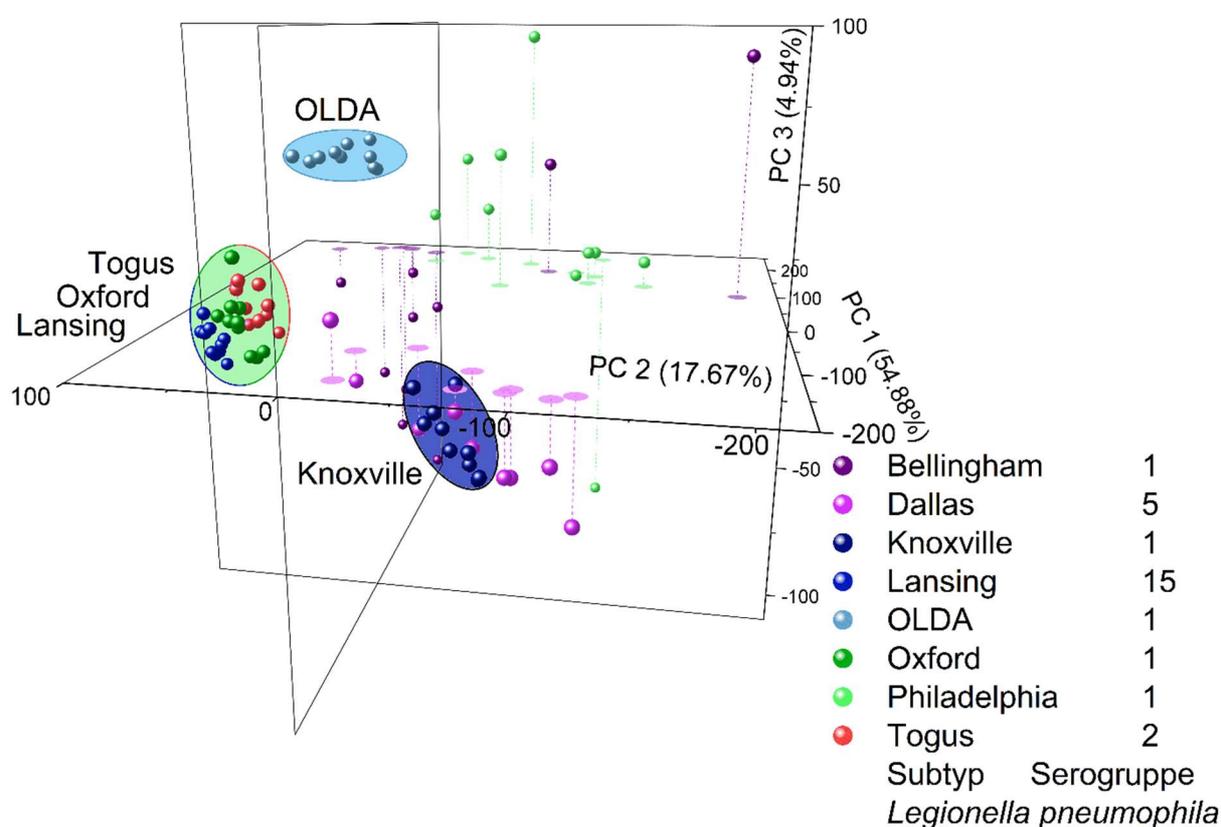


**Abbildung 7** Raman-Spektren von 8 Subtypen des Pathogens *L. pneumophila*.

Die erste Studie, welche über eine Raman-spektroskopische Analyse von Legionellen berichtet, wurde von Hermelink, Brauer, Lasch und Naumann veröffentlicht.[111] Sie berichten von einer Heterogenität der einzelnen Bakterien innerhalb einer Legionellenkultur, welche auf die Bildung der Energiespeicherverbindung Polyhydroxybutyrat zurückgeführt wird. Grundsätzlich gilt jedoch für derart engverwandte Kulturstämme, wie sie in diesem Kapitel untersucht werden, dass die spektralen Unterschiede geringfügig sind. Deshalb sind Verfahren der multivariaten Statistik erforderlich, um die Mikroorganismen schließlich zu

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

identifizieren. Die Differenzierung von 12 Legionellenstämmen von coliformen Bakterien mittels RS und hierarchischer Clusteranalyse wurde erstmalig bereits 2013 von van de Vossenberg et al. beschrieben.[112] Um die Möglichkeit einer automatisierten Unterscheidung der Subtypen anhand des in Abbildung 7 gezeigten spektralen Bereichs der Raman-Verschiebung von 600-1750  $\text{cm}^{-1}$  zu testen, wurde mit diesen Daten eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die Rohspektren wurden zuvor in der LabSpec-Software auf die C-H-Streckschwingungen um 2900  $\text{cm}^{-1}$  normiert und zusätzlich das erste Derivat gebildet. Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit der MATLAB-Software zentriert und mittels Singulärwertzerlegung durchgeführt.



**Abbildung 8** Hauptkomponentenanalyse von 8 Subtypen von *L. pneumophila*.

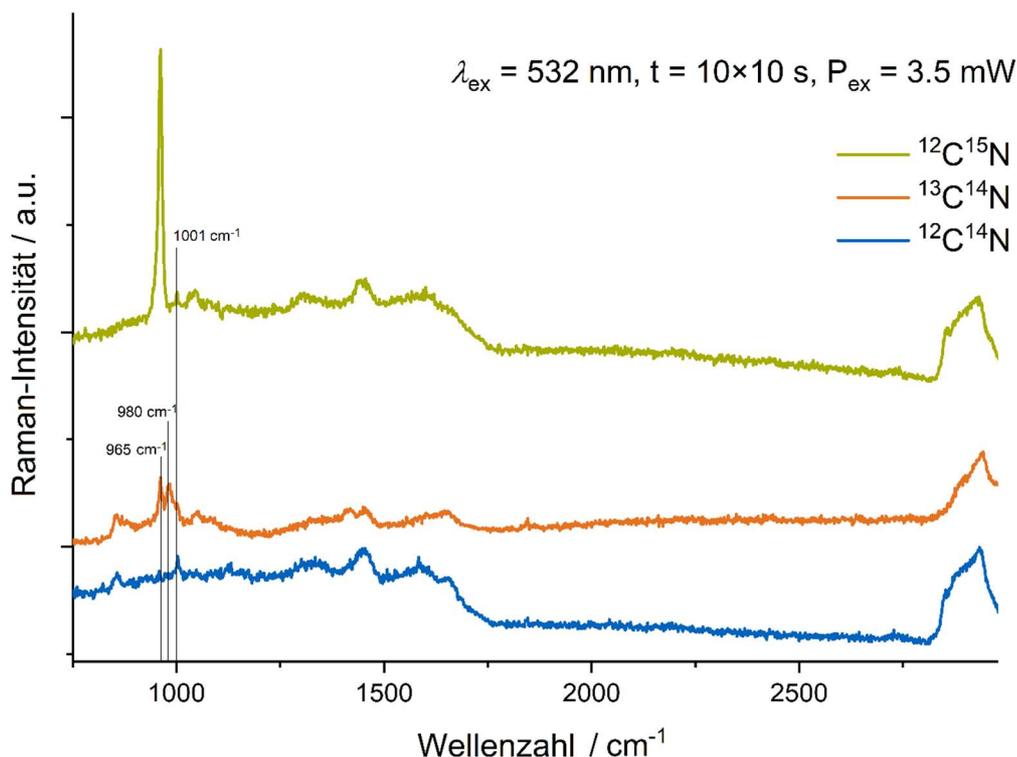
Die ersten drei Hauptkomponenten (PC) in Abbildung 8 erklären nahezu 80% der Varianz und zeigen eine deutliche Trennung von verschiedenen Subtypen. Auffällig ist die prägnante Trennung der Subtypen Lansing, Oxford und Togus von den restlichen Subtypen, obwohl diese drei zu unterschiedlichen Serogruppen zählen. PC 1 und PC 2 lassen auch für diese drei auf eine Unterscheidbarkeit mittels RS schließen,

während die Abgrenzung von den Subtypen OLDA und Knoxville von den anderen besonders auffällig ist. Die PC 3 scheint vor allem eine Differenzierung zwischen den Subtypen Dallas und Philadelphia zu ermöglichen. Diese Daten decken sich mit Erkenntnissen von Kusić, Kampe, Rösch und Popp, welche von der Identifikation einzelner Bakterienzellen mittels RS bis hin zur Subspezies-Ebene im Jahr 2014 berichten.[113] Sie untersuchten 25 verschiedene Spezies einschließlich dreier Subspezies von *L. pneumophila* und zeigten die erfolgreiche Unterscheidbarkeit von *L. pneumophila* ssp. *pneumophila* von *L. pneumophila* ssp. *fraseri* und *L. pneumophila* ssp. *pascullei*. Die in Abbildung 8 gezeigte Separierung der Kulturstämme zeigt, dass eine Identifikation von Legionellen basierend auf der RS prinzipiell auch zur Subtypisierung genutzt werden kann. Da die hier präsentierten Resultate keinen Zusammenhang zum Serotyp widerspiegeln, könnte die Raman-Mikrospektroskopie interessante komplementäre Informationen über den Phänotyp von Legionellen zu serologischen Analysemethoden liefern. Abschließend soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass die hier durchgeführte Raman-Analyse auf unter Laborbedingungen kultivierten Bakterien beruht. Für reale Proben aus Umwelt und klinischer Diagnostik ist von Hindernissen auszugehen oder zumindest dem wegfallenden Vorteil der Raman-Mikrospektroskopie als kulturunabhängige Analysemethode.

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

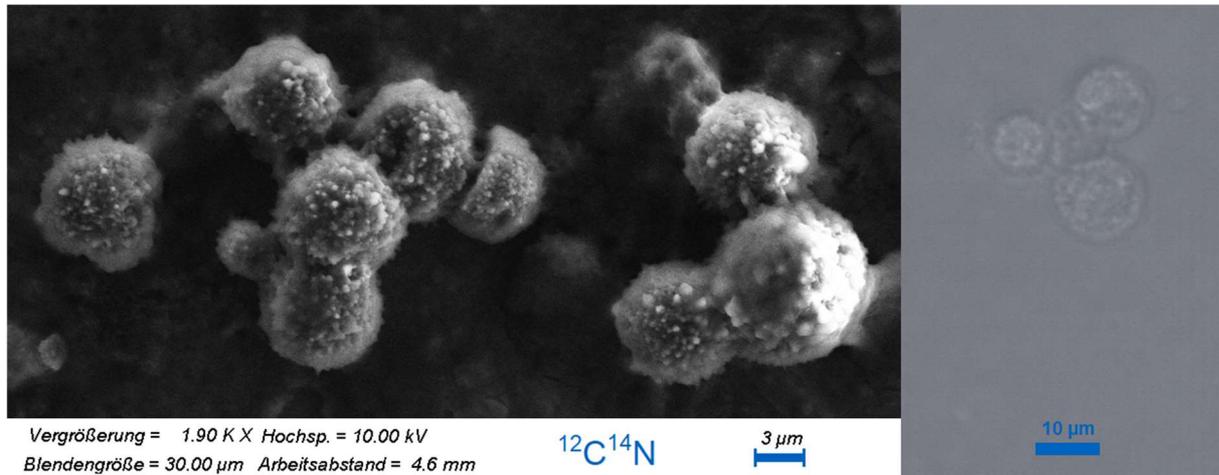
### 4.2.1 *Vermamoeba vermiformis*

Die erstmalige Raman-Analyse der Amöbe *V. vermiformis*, welche mit den Stabilisotopen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert wurde, zeigt, dass der gewählte Ansatz der Kultivierung mit einem Nährmedium basierend auf *E. coli* gravierende Auswirkungen auf die Spektren besitzt (s. Abb.9).



**Abbildung 9** Raman-Spektren von *V. vermiformis* mit und ohne Markierung von Kohlenstoff-13 und Stickstoff-15.

Der Einsatz von Stabilisotopen gekoppelt mit der Untersuchung des Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* durch RS wurde 2004 durch Huang et al. präsentiert.[3] Eine wie von ihnen beschriebene Rotverschiebung von Signalen ist auch für die mit Kohlenstoff-13 markierten Amöben zu beobachten und ist im Fall der Bande bei 1001 cm<sup>-1</sup> der symmetrischen Ringatmungsschwingung von Phenylalanin zuzuordnen. Die hier entstandene Doppelbande bei 965 cm<sup>-1</sup> und 980 cm<sup>-1</sup> kann durch die nicht vollständige Substitution von Kohlenstoff-12 durch die schwerere Variante erklärt werden, wie es auch Kubryk et al. anhand einer Mehrfachbande zweier verschiedener mit  $^{13}\text{C}$  markierten Deltaproteobacteria ausführen.[74]



**Abbildung 10** REM- und Mikroskopieaufnahmen von *V. vermiformis*.

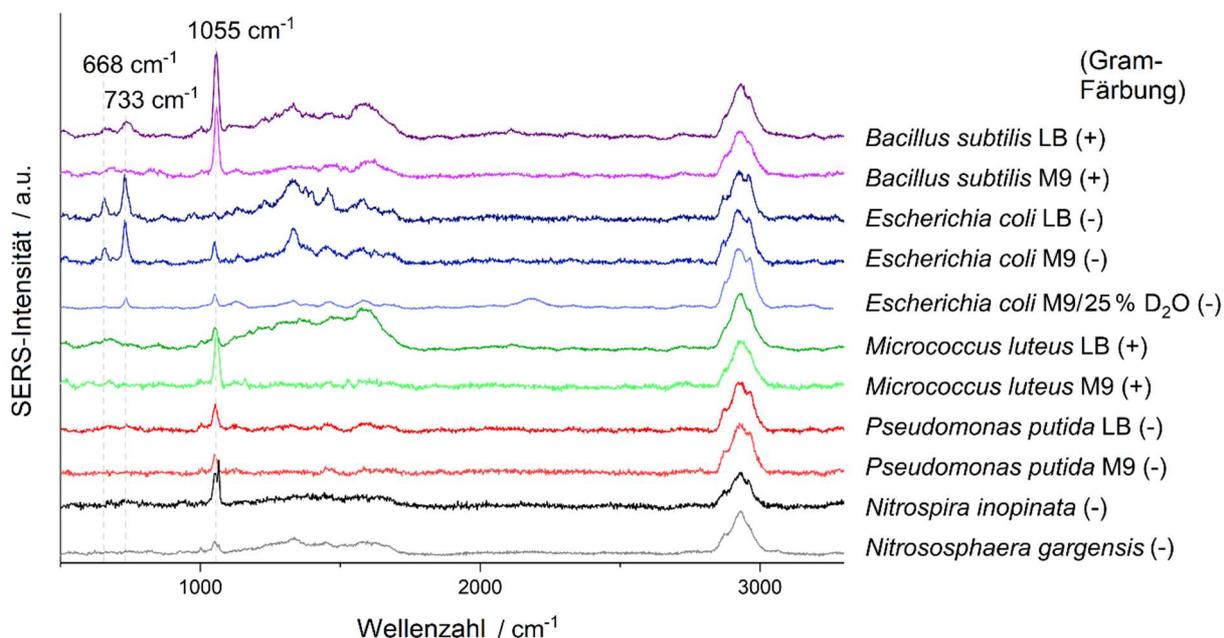
Die starke Änderung der relativen Bandenintensitäten im Falle der  $^{15}\text{N}$ -markierten Amöben verdeutlichen jedoch, dass auch die chemische Zusammensetzung der Amöbenzellen beeinflusst wurde, was in diesem Experiment nicht beabsichtigt war. Die REM- und Mikroskopieaufnahmen in Abbildung 10 zeigen, dass *V. vermiformis* bei der Messung als Zyste, also im Ruhestadium, vorliegt und nicht als aktiver zylindrischer Trophozoit.

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

### 4.2 SERS-Analysen

#### 4.2.1 Mikroorganismen

Aufgrund des geringen Wirkungsquerschnitts der Raman-Streuung und der damit einhergehenden langen Messdauer einzelner Probenpunkte, kamen wie in Kapitel 2.3 ausgeführt vermehrt signalverstärkende Raman-Techniken zur Analyse von mikrobiologischen Proben zum Einsatz. In diesem Kapitel wurde die SERS-Analyse verschiedener Mikroorganismen mit unterschiedlichen Zellhüllen durchgeführt, deren SERS-Spektren in Abbildung 11 gezeigt werden.



**Abbildung 11** Gemittelte SERS-Spektren von 8 Einzelzellen verschiedener Mikroorganismen bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm.

Ein Archaeon, zwei grampositive, einschließlich des Endosporenbildners *Bacillus subtilis*, und drei gramnegative Bakterien, kultiviert bei unterschiedlichen Bedingungen, wurden eingesetzt. So soll untersucht werden, inwiefern sich SERS-Resultate von Mikroorganismen vergleichen lassen, auch wenn sich Wachstumsbedingungen oder Oberflächenstrukturen fundamental unterscheiden, an welchen aufgrund der kleinen Wirkungsreichweite von SERS (Signal ist proportional zu  $d^{-12}$  zwischen Analyten und Nanostrukturen) schließlich das Messsingal entsteht. Die in diesem Abschnitt eingesetzte Synthese von Silbernanopartikeln (AgNP) basiert

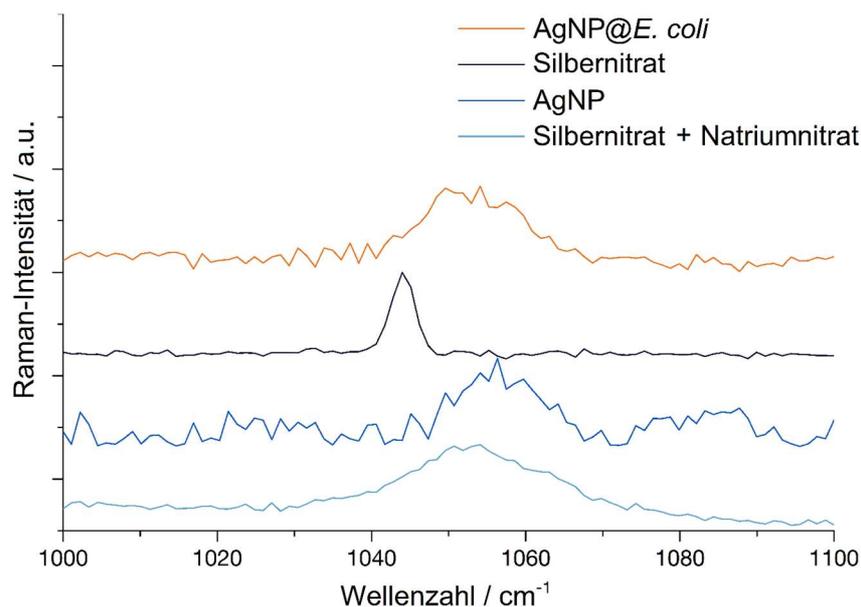
auf einer Methode aus dem Jahr 2003 von Leopold und Lendl.[114] Die Methode wurde 2014 von Zhou et al. für eine *in situ* Herstellung der AgNP auf Bakterienoberflächen weiterentwickelt[115] und 2015 von Kubryk et al. optimiert.[74] Die bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm aufgezeichneten Spektren zeigen für alle Mikroorganismen die ausgeprägte Bande der C-H-Streckschwingung bei  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Auf dieses Signal wurden die aus 8 Einzelzellmessungen gemittelten Spektren aus Abbildung 11 normalisiert.

Im Fall des mit schwerem Wasser versetzten Kulturmediums (Volumenanteil von 25 %) zeigt sich für *E. coli* eine weitere breite Bande bei  $2200\text{ cm}^{-1}$ , die wie von Berry et al.[110] aufgrund der Rotverschiebung der C-D-Streckschwingung auf den teilweisen Austausch von Protium mit Deuterium schließen lässt. Überraschenderweise ist das Signalverhältnis vom Fingerabdruckbereich unterhalb von  $1500\text{ cm}^{-1}$  zur C-H-Streckschwingung kleiner als bei der nicht deuterierten *E. coli*-Probe. Dies wäre aufgrund der Signalaufteilung der Kohlenstoff-Wasserstoff-Streckschwingungen durch den Einbau von Deuterium erklärbar gewesen. Die Signalreduktion lässt darauf schließen, dass das schwere Wasser *E. coli* physiologisch derart beeinflusst, dass dies wiederum den Mechanismus der SERS-Signal-Entstehung von dem Bakterium beeinträchtigt.

Die intensive Bande bei  $1055\text{ cm}^{-1}$  tritt bis auf eine Ausnahme in allen Spektren der Mikroorganismen prägnant auf. Sie kann auf Kohlenhydrate[116], Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)[117] oder mit den AgNP interagierendem Nitrat[118] hinweisen. Mischt man  $\text{AgNO}_3$  mit  $\text{NaNO}_3$  so vereinigen sich die Banden bei  $1044\text{ cm}^{-1}$  und  $1067\text{ cm}^{-1}$  zu einer breiten Bande dazwischen wie in Abbildung 12 zu erkennen ist. Die erhöhte Konzentration an Natrium durch die als Reagenz eingesetzte Natronlauge könnte die Position der Nitratbande somit erklären. Die Referenzspektren anderer Nitrate wie  $\text{KNO}_3$  oder  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  weisen ebenfalls ein ausgeprägtes Signal bei  $1050\text{ cm}^{-1}$  auf. Da diese Bande hauptsächlich auftritt, wenn AgNP mit Hydroxylamin als Reduktionsmittel synthetisiert wurden, könnte diese auf das im Überschuss eingesetzte Hydroxylamin zurückzuführen sein, welches an den AgNP bindet. Nitrat, das in allen Proben aufgrund des Nanopartikelpräkursors  $\text{AgNO}_3$  vorliegt, neigt thermodynamisch dazu, mit Hydroxylamin zu komproportionieren, wodurch die Bande bei  $1055\text{ cm}^{-1}$  mit der Zeit abnimmt. Da die AgNP-Synthese in einer komplexen Probe durchgeführt wird, können Spurenelemente die Zersetzung des Reduktionsmittels

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

katalysieren. Es überrascht jedoch, dass bei *E. coli*, welches in LB-Medium kultiviert wurde, der vermutlich unspezifische Peak bei  $1055\text{ cm}^{-1}$  deutlich schwächer ausfällt. Dies könnte mit neuen ausgeprägten Banden und einer konkurrierenden Bindung von Analyten einer höheren Affinität für AgNP zusammenhängen.



**Abbildung 12** Raman-Spektren von getrockneten Proben mit  $\text{AgNO}_3$ , AgNP,  $\text{NaNO}_3$  und SERS-Spektrum von *E. coli* um  $1050\text{ cm}^{-1}$ .

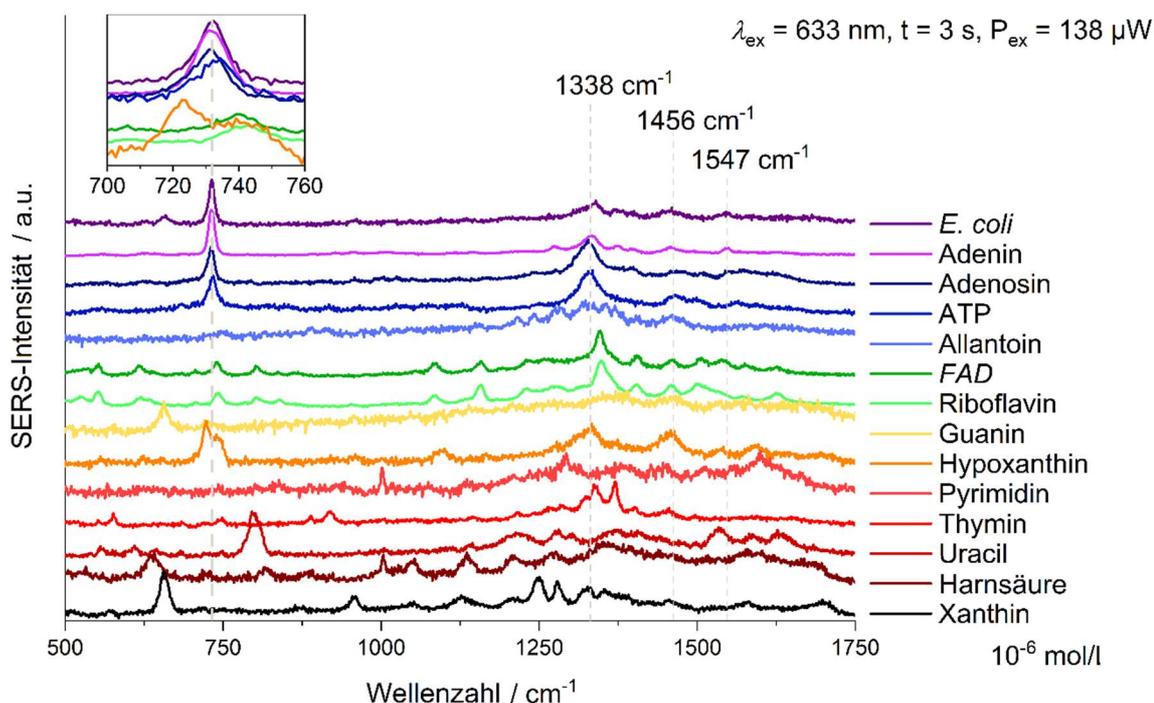
Die für *E. coli* beobachteten intensiven SERS-Signale bei  $668\text{ cm}^{-1}$  und  $733\text{ cm}^{-1}$  zeigen das deutlichste Unterscheidungsmerkmal zu den anderen untersuchten Mikroorganismen. 2016 ordneten Kubryk et al.[22] und Premasiri et al.[99] diese den Purinbasen und biochemisch relevanten Derivaten wie Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin zu. Premasiri et al. zeigte eine genaue Übereinstimmung der SERS-Signale von diesen Substanzen und Bakterien. Zuvor wurde das häufig auftretende SERS-Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$  auch mit *N*-Acetyl-D-glucosamin und dem glykosidischen Ring,[20] Methylen-Schaukelschwingungen[119] und einer Pyrophosphat-Mode[120] zugeschrieben. Es wurde auch angenommen, dass es lose mit Aminosäuren und Phospholipiden zusammenhängt.[121] Bemerkenswerterweise zeigen nicht alle SERS-Studien mit *E. coli* dieses Signal.[117] Unterschiede in den Methoden umfassen z. B. das Reduktionsmittel (Borhydrid statt Hydroxylamin) oder die Lagerung der vorbereiteten Bakterienzellen bei  $-80\text{ °C}$  vor der *In-situ*-AgNP-Synthese.

In dieser Arbeit wurde das Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$  sowohl bei einer Anregungswellenlänge von  $532\text{ nm}$  als auch  $633\text{ nm}$  mit vergleichbaren Eigenschaften beobachtet, wie sie von Premasiri et al.[99] gezeigt werden, welche mit Goldnanostruktur-bedeckte Substrate, eine Anregungswellenlänge von  $785\text{ nm}$  sowie Kulturen aus der exponentiellen Phase verwendeten. In jener Publikation wiesen Premasiri et al. darauf hin, dass die Interaktionszeit von metallischen Nanostrukturen und Bakterienzellen eine wichtige Rolle für das Auftreten von SERS-Signalen einnimmt und brachte dies mit dem verzögerten enzymatischen Abbau und der anschließenden Sekretion von Metaboliten (Purinen) in Zusammenhang. Für vier der untersuchten Mikroorganismen fehlten ausgeprägte Signale bei  $668\text{ cm}^{-1}$  und  $733\text{ cm}^{-1}$ . Entweder setzen diese Organismen die Moleküle, welche diese SERS-Signale verursachen, nicht im gleichen Ausmaß frei oder andere Eigenschaften beeinträchtigen das angewandte Präparationsprotokoll. Die Signale bei  $668\text{ cm}^{-1}$  und  $733\text{ cm}^{-1}$  sind daher nicht als universelles Untersuchungsmerkmal heranzuziehen. Des Weiteren ist die Anwendbarkeit des verwendeten SERS-Protokolls zur Differenzierung von Mikroorganismen wegen einer hohen Varianz zwischen Einzelzellmessungen bei einem Teil der untersuchten Mikroben eingeschränkt.

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

### 4.2.2 Referenzsubstanzen

Es wurden SERS-Referenzspektren gemessen, um die spektrale Zusammensetzung der *E. coli*-Spektren genauer zu bestimmen. Verschiedene Nucleobasen, Derivate von Adenin und deren Abbauprodukte einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  wurden in der Probenvorbereitung eingesetzt. Die Menge der detektierten Referenzmoleküle ergibt sich aus dem Verhältnis der Probenfläche und der Fläche vom Fokus des Lasers. Das eingesetzte Probenvolumen von 1  $\mu\text{l}$  (entspricht 1 pmol Referenzsubstanz) erzeugt in getrocknetem Zustand kreisförmige Flächen mit einem Durchmesser von ca. 1,6 mm. Nach Gleichung 6 aus Kapitel 2.2.2 ergibt sich ein Laserfokusbereich von 858 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 633 nm;  $NA$ : 0,9). Die in Abbildung 13 gezeigten Referenzspektren zeigen somit ein Signal von ca.  $3 \times 10^{-19}$  mol bzw. 0,023 fg Pyrimidin oder 0,225 fg Flavin-Adenin-Dinucleotid im Laserfokus von  $0,6 \mu\text{m}^2$ .



**Abbildung 13** SERS-Spektren von Referenzsubstanzen einer ursprünglichen Konzentration von  $10^{-6} \text{ mol/l}$  sowie eines ursprünglichen Volumens von  $1 \mu\text{l}$  und ca.  $3 \times 10^{-19} \text{ mol}$  pro  $0,6 \mu\text{m}^2$  Laserfokus der getrockneten Probe.

Die Vorbereitungen und Messbedingungen, der in Abbildung 13 gezeigten Spektren, sind äquivalent zu Analysen von *E. coli*. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die in Kapitel 4.2.1 gezeigten Daten bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm

aufgezeichnet wurden. Spektren von Adenin zeigen besonders intensive Signale, während das Signal-Rausch-Verhältnis der übrigen Spektren geringer ist. Dies weist bei einem ähnlichen Verstärkungsfaktor durch SERS auf einen höheren Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung an Adenin oder auch eine stärkere Adsorption von Adenin auf der Oberfläche der Silbernanopartikel hin. Um den Anteil der Referenzsubstanzen in *E. coli*-Spektren zu bestimmen, wurde eine Linearkombination der auf das stärkste Signal normalisierten Referenzspektren als Ausgleichsrechnung mittels Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Einzelzellenspektren von *E. coli* aus biologischen Triplikaten verwendet.

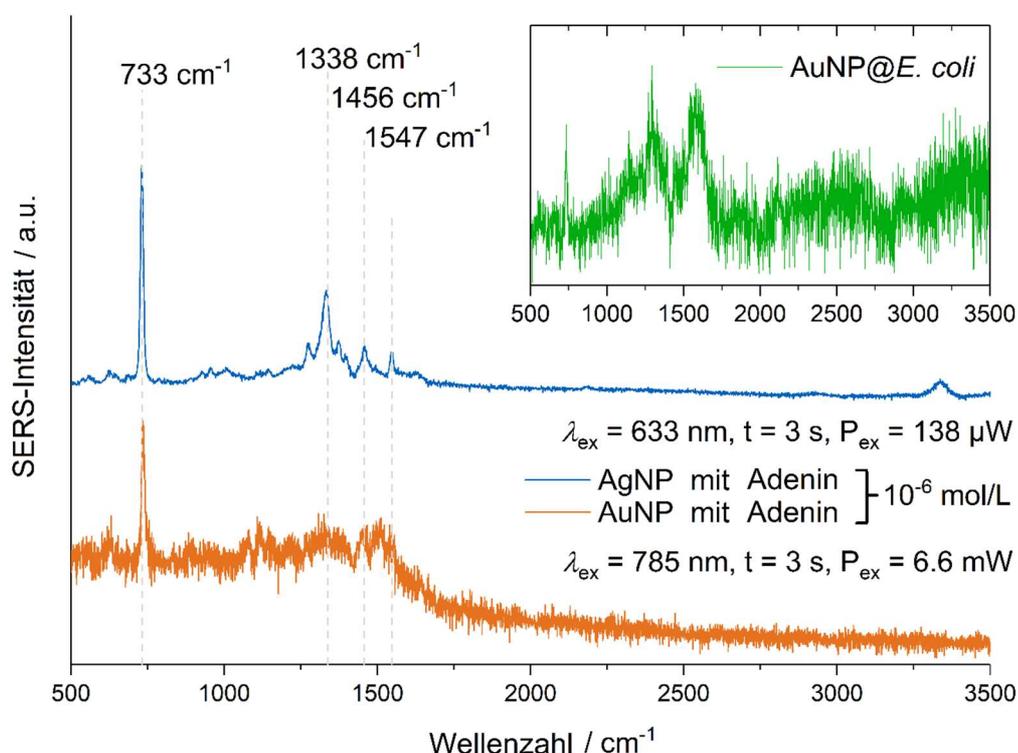
**Tabelle 1** Experimentell bestimmter Anteil von Referenzsubstanzen an SERS-Spektren von *E. coli* kultiviert mit M9- oder LB-Medium und mit zusätzlichem Waschschrift für mit M9-Medium kultiviertem *E. coli*.

n = 30	Anteil der Referenzspektren an <i>E. coli</i> -Spektren / %		
Metabolit	M9-Medium	LB-Medium	Waschen 0,9%(w/w) NaCl
<b>Adenin</b>	<b>69,5 ± 7,8</b>	<b>63,6 ± 11,7</b>	<b>64,9 ± 11,1</b>
Allantoin	0,0 ± 0,0	1,5 ± 3,1	2,5 ± 7,0
FAD	3,8 ± 4,2	1,2 ± 2,6	1,7 ± 5,3
Riboflavin	2,4 ± 3,1	0,3 ± 0,5	1,5 ± 3,4
Guanin	0,7 ± 1,4	0,8 ± 1,6	1,3 ± 3,2
Hypoxanthin	6,3 ± 3,7	19,2 ± 6,4	4,7 ± 2,8
Pyrimidin	5,7 ± 4,6	1,2 ± 2,5	0,1 ± 0,3
Thymin	1,1 ± 2,1	0,0 ± 0,0	3,5 ± 8,6
Uracil	1,2 ± 5,1	0,5 ± 1,0	1,3 ± 4,0
Harnsäure	4,8 ± 5,1	5,2 ± 5,2	6,5 ± 5,7
Xanthin	4,7 ± 3,0	6,7 ± 5,1	12,1 ± 11,2

Es zeigt sich, dass alle *E. coli*-Spektren von den Adeninsignalen dominiert werden. Premasiri et al. führen an, dass dies vor allem an dessen höherem Raman-Wirkungsquerschnitt liegt.[99] Lediglich Hypoxanthin fügt bei mit LB-Medium kultivierten Zellen einen wesentlichen spektralen Beitrag hinzu. Bei vereinzelt Zellen, der mit einer Kochsalzlösung gewaschenen Kulturen, trägt auch Xanthin einen nennenswerten Anteil am Spektrum bei. Dies kann auf den geringeren osmotischen Schock und somit auf die schonendere Wirkung der Kochsalzlösung im Waschschrift hindeuten, wodurch die Bakterienzellen potentiell in der Lage sind, den weiteren Abbauprozess von Adenin über Hypoxanthin bis hin zu Xanthin durchzuführen.

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

Grundsätzlich stimmen die hier gewonnen Erkenntnisse mit Resultaten von Premasiri et al. überein, welche mit einem Tryptose-Soja-Medium resp. LB-Medium und Goldnanostrukturen arbeiteten.[99] Sie konnten anhand von Mutanten, denen Enzyme vom Purinabbau fehlten, zeigen, dass die relativen SERS-Intensitäten im Einklang mit den Stoffwechselprozessen stehen. Auch Chiu et al. berichten, welche ein Hirn-Herz-Medium, aber ebenfalls Silbernanopartikel einsetzten, dass die SERS-Signale von *E. coli* nahezu ausschließlich auf die Freisetzung von Purinen zurückzuführen sind.[122] Sie beobachten jedoch einen nahezu verschwindenden spektralen Anteil von Adenin, während Guanin, Hypoxanthin und Xanthin im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen den entscheidenden Einfluss ausübten.



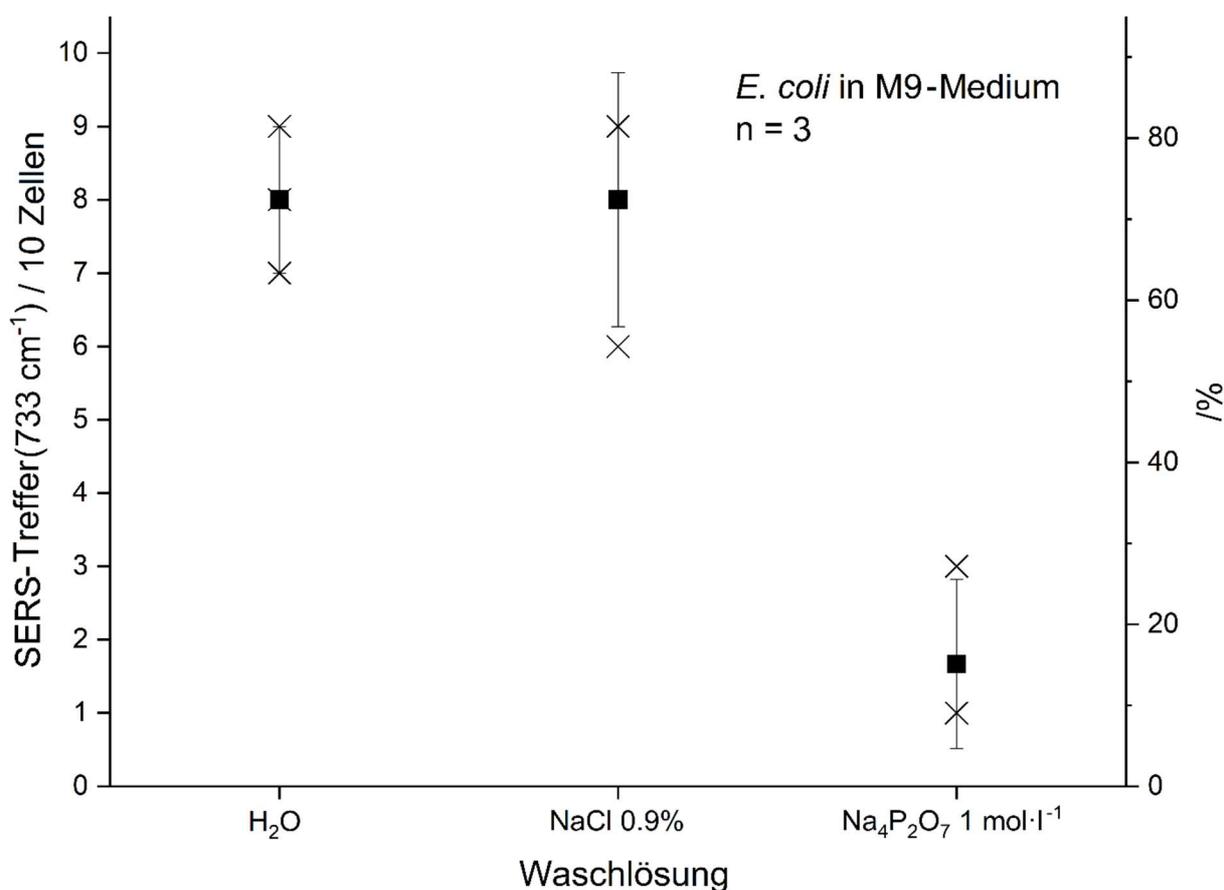
**Abbildung 14** SERS-Spektren von Adenin und *E. coli* mit *in situ* synthetisierten Goldnanopartikeln (AuNP:  $\lambda_{\text{ex}} = 785 \text{ nm}$ ) sowie von Adenin mit *in situ* synthetisierten AgNP ( $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ ).

Da in den bisher aufgeführten Daten lediglich AgNP für SERS-Analysen zum Einsatz kamen, wurden auch Goldkolloide und eine Anregungswellenlänge von 785 nm verwendet. Abbildung 14 zeigt die SERS-Spektren von Adenin und *E. coli* mit AuNP bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm sowie das Referenzspektrum von Adenin

mit AgNP bei einer Laserwellenlänge von 633 nm. In den Versuchen zeigten sich jedoch trotz fast 50× höherer Laserleistung für die AuNP niedrigere Signal-Rausch-Verhältnisse sowohl für einzelne *E. coli*-Zellen als auch für Adenin. Dies ist zumindest im Fall der Referenzmessung mit Adenin unerwartet, da hier lediglich das Kolloid selbst oder die Interaktion mit dem Analyten Adenin als Ursache für das geringere Signal in Betracht kommen.



biologischen Triplikaten mit jeweils 10 Einzelzellmessungen durchgeführt. Als Signalwert einzelner Bakterienzellen in Abbildung 15 wird die Amplitude einer Lorentzkurve der in Kapitel 3.7 beschriebenen automatisierten Spektrenauswertung herangezogen. Die höchsten Signalwerte wurden wie in Abbildung 15 zu erkennen ist mit Reinstwasser als Waschmedium gemessen, die niedrigsten mit einer 1 mM Pyrophosphatlösung. Spektren wurden als positives SERS-Resultat in Abbildung 16 gewertet, wenn dieser Wert das Rauschen im Raman-stillen spektralen Bereich von  $2500\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$  um mehr als das Dreifache ( $3s$ ) überschritt.



**Abbildung 16** Anteil positiver SERS-Treffer von *E. coli* mit Reinstwasser, einer Kochsalz- bzw. Pyrophosphatlösung als Waschlösung.

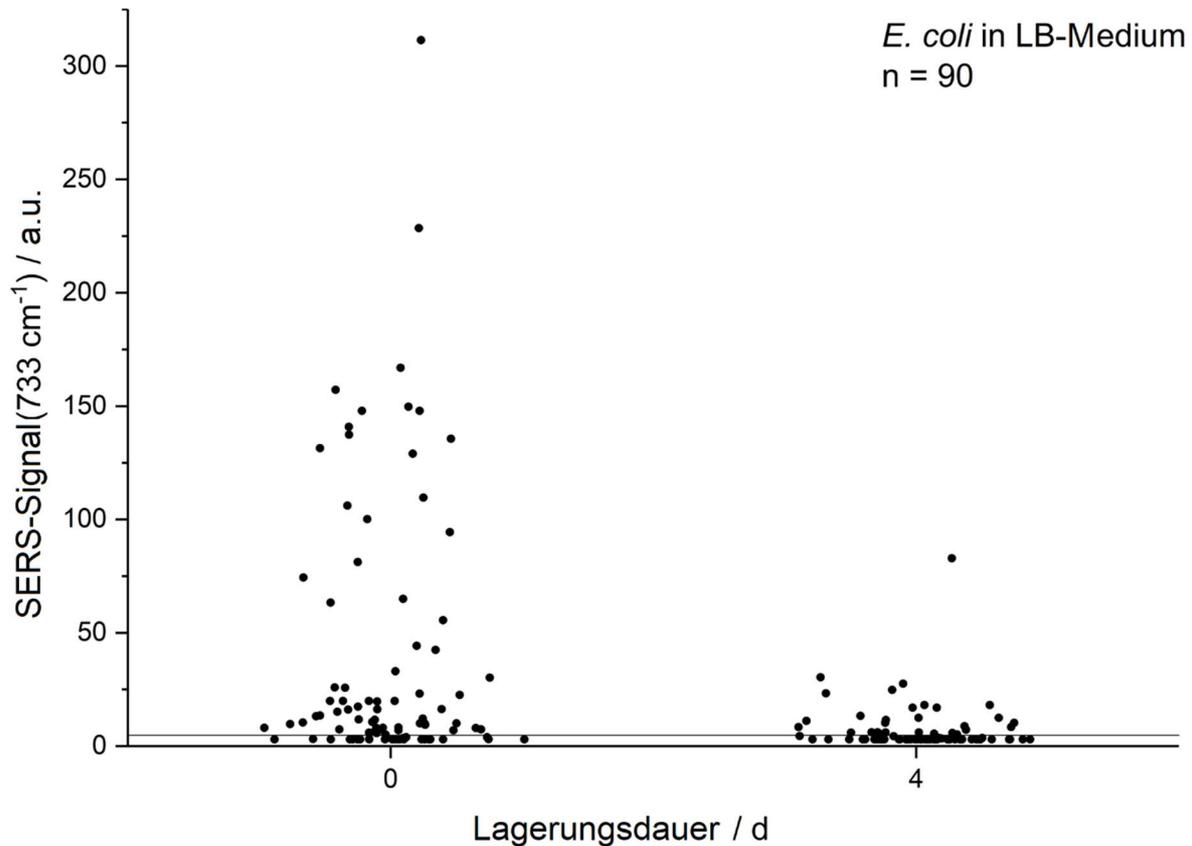
Bei 30 Messungen in der Messreihe wurde mit der Kochsalzlösung wie in Abbildung 16 gezeigt nur ein positiver Treffer weniger bestimmt. Der Einsatz der Pyrophosphatlösung zum Waschen unterstreicht jedoch eindeutig den Einfluss der Probenvorbereitung auf die SERS-Analyse. In dieser Messreihe zeigen nur 17 % der Einzelzellmessungen ein belastbares SERS-Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$ . Der maximale

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

Signalwert fällt für diese Waschlösung auf 5 % des maximalen Wertes im Vergleich zur Verwendung von Reinstwasser respektive 12 % von der Kochsalzlösung. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Resultaten von Premasiri et al., welche Pyrophosphat gezielt zur Probenvorbereitung von SERS-Analysen mit *Staphylococcus aureus* einsetzen, um ein verzögert auftretendes SERS-Signal bei  $736\text{ cm}^{-1}$  sofort zu erzielen.[99] Sie erklären diese Beschleunigung mit dem Abbau von Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenin durch Adeninphosphoribosyltransferase, welches Pyrophosphat benötigt. Die entgegengesetzte Wirkung von Pyrophosphat in den hier präsentierten Ergebnissen kann durch die unterschiedlichen Zellwände der beiden Bakterienarten erklärt werden. Während *S. aureus* grampositiv reagiert, ist *E. coli* gramnegativ. Die Probenvorbereitung mit *E. coli* könnte schlicht zum schnellen Verlust des gebildeten Adenins führen. Auch Chiu et al. berichten, dass SERS-Signale untersuchter Bakterien auf freigesetzte Purinabbauprodukte zurückzuführen sind, welche wiederum mit dem plötzlich einsetzenden Nahrungsmangel während des Waschschrattes mit Wasser im Zusammenhang stehen.[122] Deutlich wird somit der unmittelbare Einfluss physiologischer Bedingungen auf SERS-Analysen von Mikroorganismen.

### 4.3.2 Lagerung

In Abschnitt 4.3.1 wurde ein erster Einfluss des physiologischen Zustandes von Mikroorganismen auf Auftreten und Intensität von SERS-Signalen gezeigt. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, wie die Lagerung von *E. coli*-Kulturen im Dunkeln bei  $5^\circ\text{ C}$  die SERS-Analyse beeinflusst. Die im Kapitel 4.3 bis hierher beschriebenen Zusammenhänge von SERS-Signal und freigesetzten Verbindungen der Mikroorganismen sowie die mehrfach zitierten Studien von Premasiri et al.[99] oder Chiu et al.[122] sollen besondere Beachtung finden. Wie im vorherigen Abschnitt werden die SERS-Signale sowie die Anzahl belastbarer SERS-Signale bei  $733\text{ cm}^{-1}$  einzelner *E. coli*-Zellen bestimmt. Zunächst wurden frisch geerntete *E. coli*-Kulturen, die mit LB-Medium bis zur stationären Phase kultiviert wurden, und Kulturen in der stationären Phase, die 4 Tage bei  $5^\circ\text{ C}$  vor der SERS-Analyse gelagert wurden, untersucht.



**Abbildung 17** Vergleich der SERS-Signale bei  $733\text{ cm}^{-1}$  einzelner *E. coli*-Zellen kultiviert mit LB-Medium bis zur stationären Phase und mit oder ohne Lagerung von 4 Tagen vor der *In-Situ*-AgNP-Synthese. Das Nachweiskriterium wurde als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis eingetragen.

Nach der Lagerung sank die durchschnittliche SERS-Intensität deutlich von 39 a.u. auf 7 a.u., was einem Rückgang um über 80 % entspricht. Dieser Rückgang der Signalintensität spiegelt sich auch in der Anzahl der tatsächlichen SERS-Treffer wider, die in Tabelle 2 aufgeführt werden. Der Prozentsatz der Treffer sank deutlich von 72 % auf 32 % (p-Wert von 0,054 für den ungepaarten, heteroskedastischen *t*-Test). Dieser Befund steht im Einklang mit dem in 4.2.1 erwähnten fehlendem Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$  in einer Studie von Chisanga et al. aus dem Jahr 2017, in welcher *E. coli*-Kulturen vor der Nanopartikelsynthese bei  $-80\text{ °C}$  gelagert wurden.[117] Die große Varianz der Signalintensität einzelner *E. coli*-Zellen aus frischen Kulturen ist erwähnenswert, die wahrscheinlich physiologische Variationen zwischen einzelnen Zellen widerspiegelt, wie sie typischerweise in Kulturen in der stationären Phase vorkommen. Während 28 % der gemessenen Bakterien kein Signal zeigten, variierten die SERS-Treffer ab

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

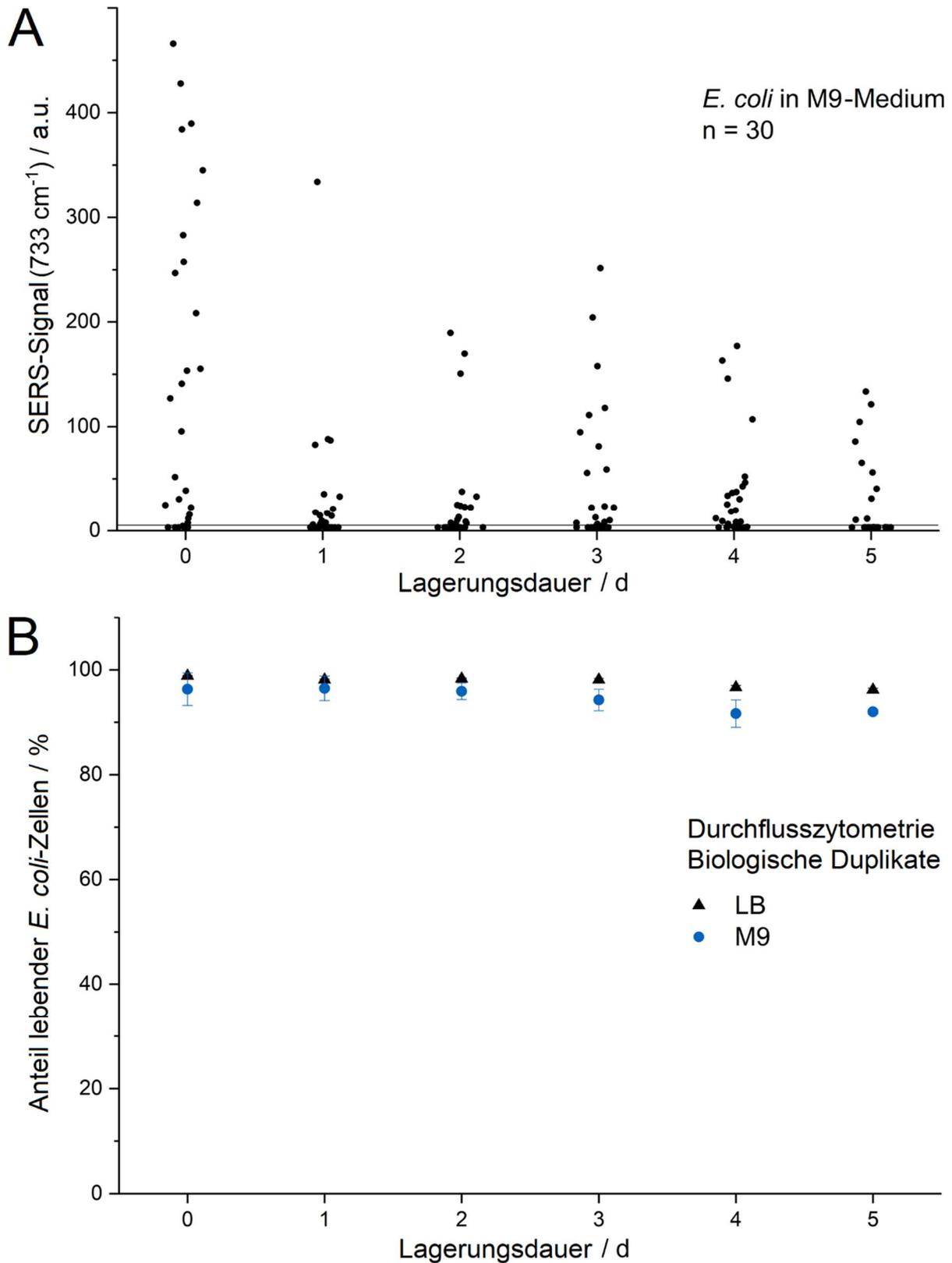
der 3s-Nachweisgrenze von 5 a.u. bis zum stärksten Signal von etwa 300 a.u. unter gleichen Messbedingungen.

**Tabelle 2** Anteil von belastbaren SERS-Signalen einzelner *E. coli*-Zellen kultiviert mit M9- und LB-Medium in biologischen Triplikaten bei unterschiedlicher Lagerungsdauer vor *In-situ*-Silberkolloidsynthese.

Lagerungsdauer / d	Anteil SERS-Treffer $\pm s$ / %	
	M9-Medium	LB-Medium
0	80,0 $\pm$ 10,0	72,2 $\pm$ 8,4
1	46,7 $\pm$ 23,1	46,7 $\pm$ 11,5
2	50,0 $\pm$ 10,0	30,0 $\pm$ 34,6
3	56,7 $\pm$ 35,1	40,0 $\pm$ 26,5
4	63,3 $\pm$ 15,3	50,0 $\pm$ 17,3
5	33,3 $\pm$ 20,8	32,2 $\pm$ 19,5

Der Einfluss der Lagerung von *E. coli* auf das SERS-Signal wurde auch im M9-Minimalmedium untersucht, wobei abnehmende Signalstärke und Streuung der Trefferzahl mit den Ergebnissen der LB-Kulturen übereinstimmen. Dies zeigt sich auch in der stetigen Abnahme der maximal detektierten Signalstärke bei längerer Lagerungsdauer. Der deutlichste Rückgang von SERS-Signalen, die die Nachweisgrenze überschreiten, tritt bereits nach einem Tag Lagerung von 80 % auf 47 % auf.

Es sind zwei Ursachen für das abnehmende SERS-Signal denkbar. Entweder befinden sich die AgNP nach der Probenvorbereitung nicht unmittelbar an den *E. coli*-Zellen oder die Analyten selbst sind in der gleichen Konzentration direkt an der Zelloberfläche vorhanden. Die erste Annahme wurde bereits von Zhou et al. für tote Bakterien in Betracht gezogen.[123] Sie berichten, dass das Signal bei 735  $\text{cm}^{-1}$  über die Zeit zügig abnahm, wenn *E. coli* Antibiotika ausgesetzt wurden und wenn unterschiedliche Prozentsätze autoklavierter Zellen hinzugefügt wurden. Dieser Befund wurde mit der verschwindenden Oberflächenladung der Bakterien in Verbindung erklärt.

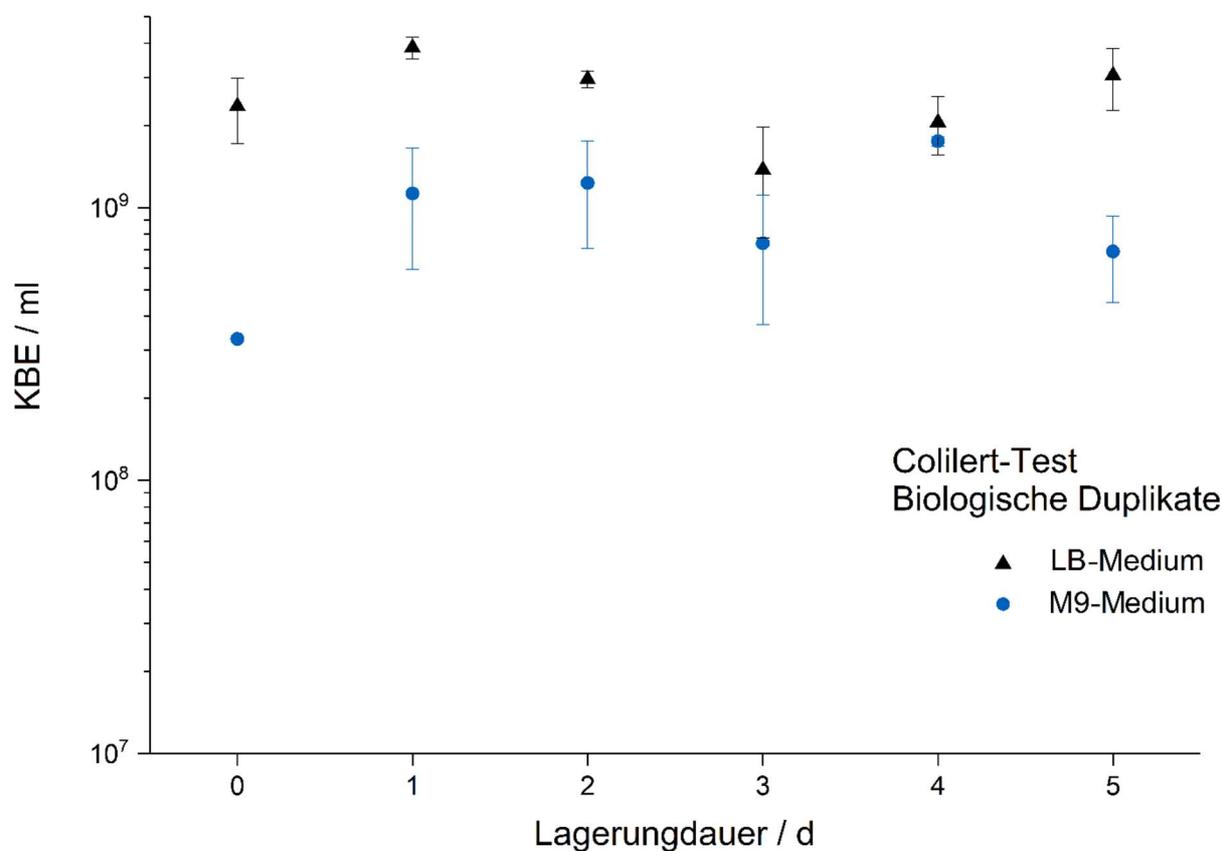


**Abbildung 18 A:** SERS-Signal bei  $733 \text{ cm}^{-1}$  einzelner *E. coli*-Zellen kultiviert bis zur stationären Phase und entweder direkt oder nach bis zu 5 Tagen in der *In-Situ*-Silberkolloidsynthese eingesetzt.

**B:** Anteil lebender *E. coli*-Zellen gemessen mittels Durchflusszytometrie mit zwei DNA-interkalierenden Farbstoffen (Propidiumiodid: tot, SYTO 9: lebend) nach bis zu 5 Tagen Lagerung.

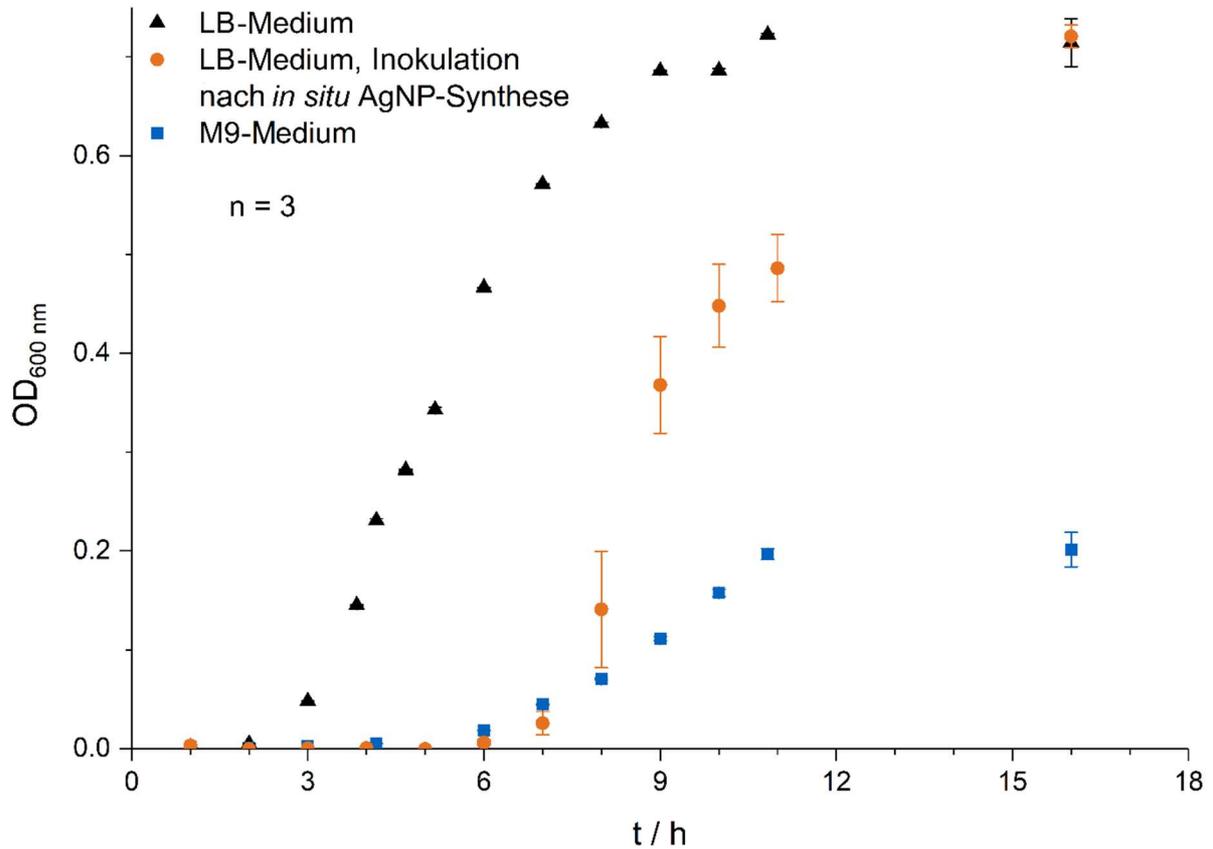
#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

Um die Hypothese von Zhou et al. aus dem Jahr 2014 zu testen, dass das verschwindende SERS-Signal (siehe Abbildung 18) auf den Zelltod während der Lagerung zurückzuführen sein könnte, wurde der Anteil lebender *E. coli*-Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung der Farbstoffe Propidiumiodid, welches tote Zellen färbt, und SYTO 9, welches alle Zellen färbt, bestimmt. Der Versuch beweist, dass die gelagerten *E. coli*-Kulturen weniger als 5 % der lebenden Zellen verloren. Dies widerlegt die Hypothese, dass der Rückgang des SERS-Signals in diesem Lagerungsexperiment durch tote Bakterien verursacht wird.



**Abbildung 19** Anzahl koloniebildender Einheiten pro ml von *E. coli* nach bis zu 5 Tagen Lagerung, detektiert mittels Colilert-Tests.

Dieses Ergebnis der durchflusszytometrischen Tests stimmt mit Resultaten des Colilert-Tests (s. Abb. 19) überein, die keinen messbaren Verlust an lebenden *E. coli*-Zellen durch die Lagerung zeigten. Es fanden sich mehr als  $10^9$  koloniebildene Einheiten pro ml (KBE, engl.: CFU) in allen im LB-Medium kultivierten Proben und  $2 \cdot 10^8$  KBE/ml in allen im M9-Medium kultivierten Proben.

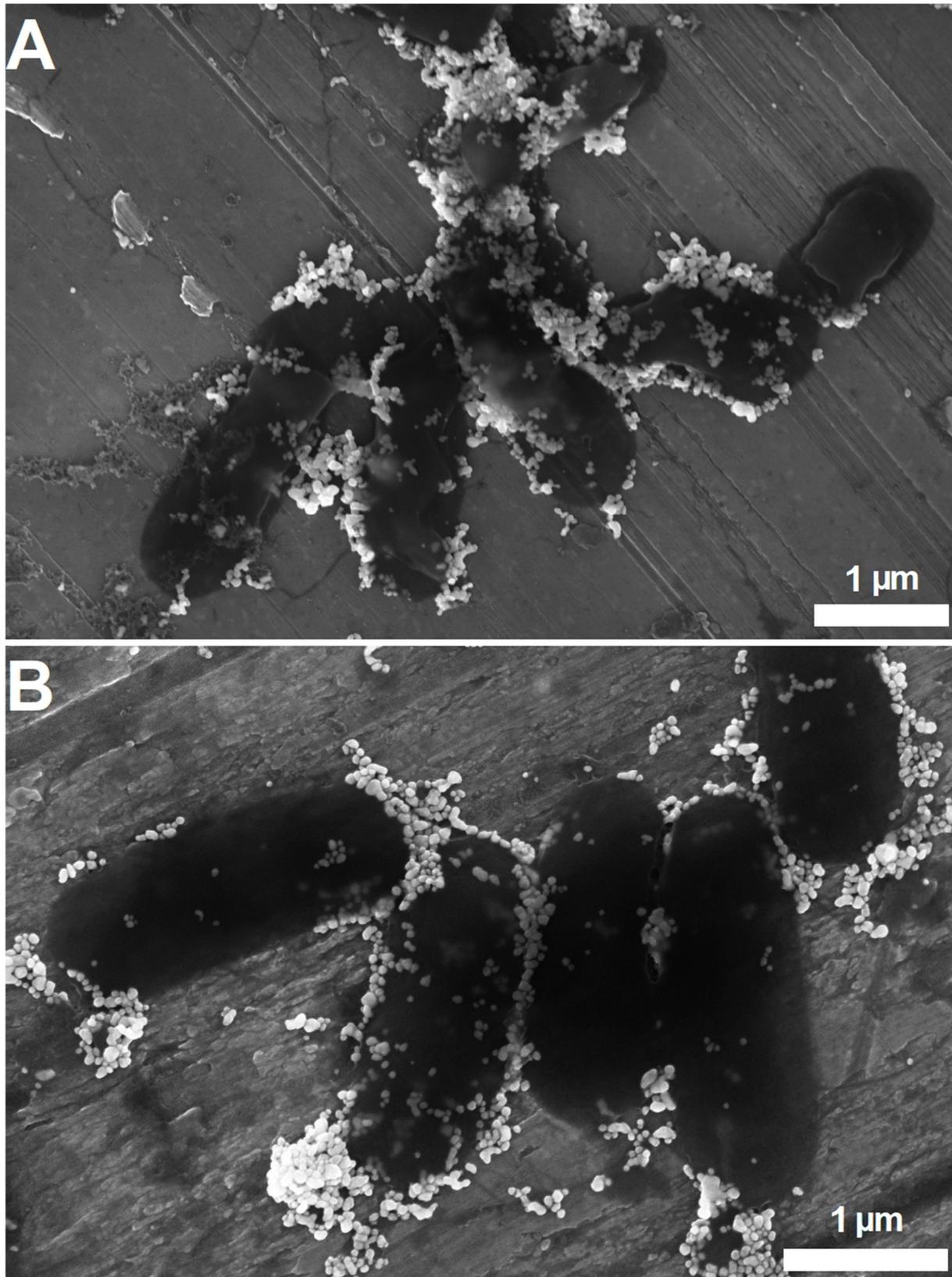


**Abbildung 20** Wachstumskurven von *E. coli* in LB- und M9-Medium sowie Inokulation nach durchgeführter *In-Situ*-AgNP-Synthese, aufgezeichnet mittels UV-VIS-Spektroskopie.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, lagen die für die SERS-Analysen verwendeten Kulturen nach 16 h sowohl für das LB- als auch das M9-Medium im stationären Bereich vor. Auch zeigen Kultivierungsexperimente von Bakterienproben nach *In-situ*-AgNP-Synthese, dass die Kulturen noch wachstumsfähig sind.

Um zu überprüfen, ob fehlende AgNP der Grund für die Abnahme der SERS-Signale waren, wurden REM-Aufnahmen von *E. coli*-Kulturen nach 12 Tagen Lagerung und darauffolgender *In-situ*-Silberkolloidynthese angefertigt. Abbildung 21 zeigt, dass es keinen offensichtlichen Unterschied für Kulturen gibt, die entweder direkt der *In-situ*-AgNP-Synthese unterzogen wurden oder zunächst gelagert wurden. Es wird daraus geschlossen, dass es sich um die von SERS erkannten Analyten handeln muss, die im Laufe der Lagerung verschwinden oder von gelagerten *E. coli*-Zellen nicht mehr freigesetzt werden. So berichten Chiu et al. von einer schnellen, aber mit der Zeit abnehmenden Freisetzung von Purinen durch Bakterien, wenn sie von einer nährstoffreichen in eine nährstoffarme Umgebung übertragen werden.[122]

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen



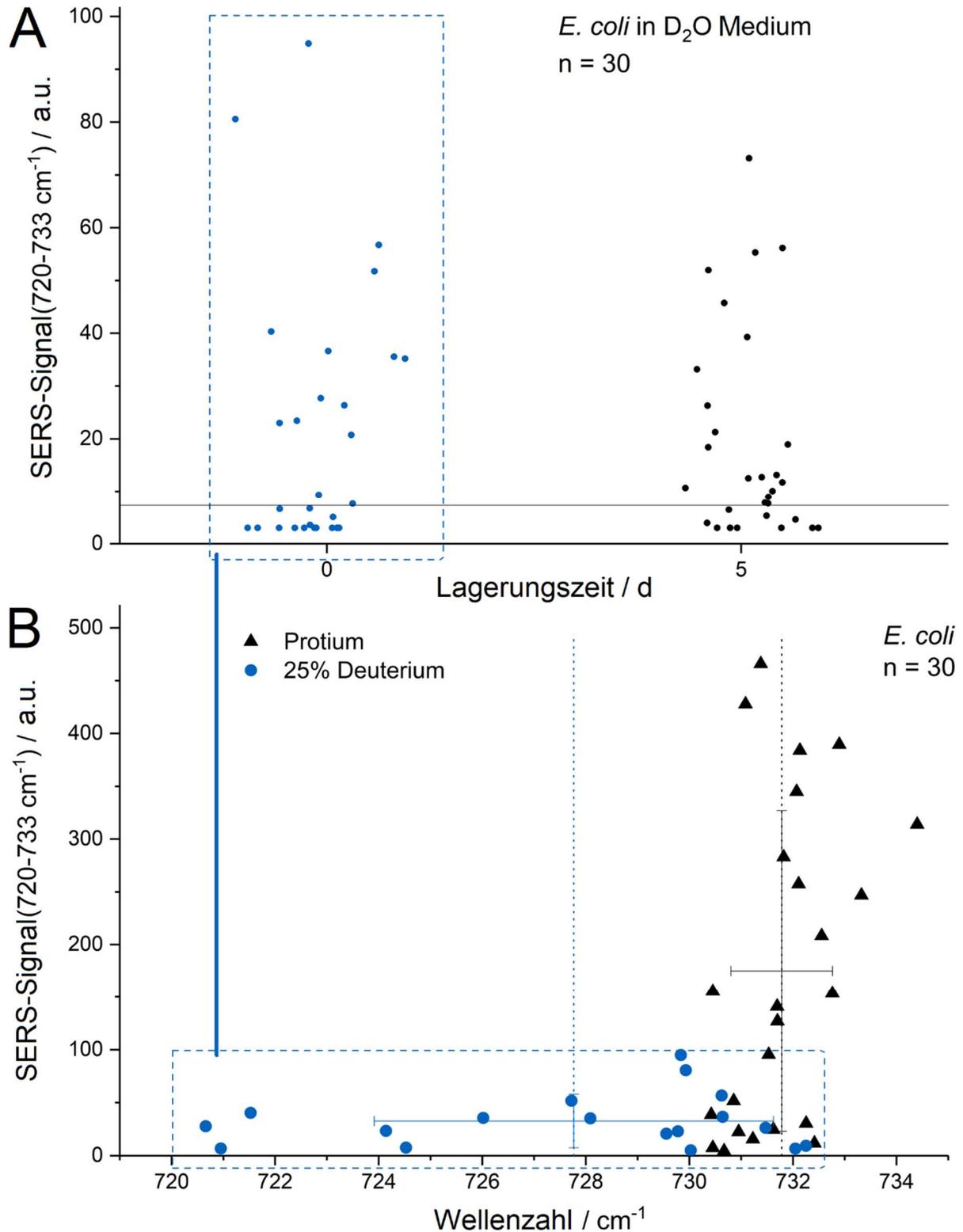
**Abbildung 21** REM-Aufnahmen von *E. coli* kultiviert mit M9-Medium nach 0 Tagen (A) und 12 Tagen (B) Lagerung und anschließender *In-Situ*-Silberkolloidynthese.

Im Jahr 1956 gaben Borek et al. an, dass sich in einem Mutanten von *E. coli* große Mengen an RNA ansammelten.[124] Wade und Morgan erweiterten dies ein Jahr später auf 12 Prokaryoten, darunter *B. cereus*, *E. coli* und *Staphylococcus aureus* mit höheren Konzentrationen in sich teilenden Zellen.[125] Dagley und Sykes berichten, dass sich die makromolekulare Untereinheit von Ribosomen mit dem größeren Sedimentationskoeffizienten (50 S) von *E. coli*-Kulturen bei Nährstoffmangel auflöst.[126] In der folgenden Zeit wurden zahlreiche Berichte über die Akkumulation von Nukleotiden und deren zumindest teilweisen Freisetzung vor allem bei Hunger und osmotischem Schock veröffentlicht.[127-137] Kaplan und Apirion stellten 1975 fest, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen bei Nährstoffmangel mit der Fähigkeit zum Abbau ribosomaler RNA (rRNA) zusammenhängt.[138] Dieser durch Hungerstress verursachte Abbau und die anschließende Freisetzung von Nukleotiden oder deren Abbauprodukten mit niedrigem Molekulargewicht könnte das charakteristische SERS-Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$  erklären, das mit dem metabolischen oder physiologischen Zustand von Mikroorganismen und nicht allein mit Oberflächenstrukturen der Zellhülle in Zusammenhang steht. Mikroorganismen, die mit diesem Mechanismus auf Hunger oder physiologischen Stress reagieren, wären mittels SERS nachweisbar, wenn sie bis zu diesem Zeitpunkt metabolisch aktiv waren. Stoffwechselinaktive und ruhende Zellen werden ihre Ribosomenzahl nicht weiter reduzieren. Solange die Zellen nicht vollständig lysiert werden, würden daher Zellen in der Ruhephase die Abbauprodukte der rRNA nicht freisetzen und keine oder nur schwache SERS-Signale zeigen. Wie in einer im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit veröffentlichten Studie beschrieben, endet mit Erreichen der stationären Phase nicht nur der Verbrauch von Purin aufgrund Synthese von Makromolekülen, sondern es erhöht sich die Konzentration von Purin durch Abbau von mRNA, tRNA und vor allem rRNA. Dies führt durch den von der Mikroorganismenart abhängigen metabolischen Abbauweg bei *E. coli* zur Ansammlung und Ausscheidung von Adenin, Xanthin und Hypoxanthin.[139] In jener Studie wird weiter ausgeführt, dass durch hypoosmotischen Schock reversible Risse in der Zellhülle entstehen und somit leicht durch Verlust von Purinen das SERS-Signal erklärt werden kann. Im Falle von Mikroorganismen, welche langsamer auf Nährstoffmangel und Schock reagieren, wie z. B. den Nitrifikanten *N. inopinata* und *N. gargensis*, tritt das beschriebene Phänomen weniger ausgeprägt oder gar nicht auf und somit werden keine von Purinen hervorgerufenen SERS-Signale beobachtet.

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

### 4.3.3 Deuterium-Markierung

Neben der Lagerung besitzen auch die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Ergebnisse der SERS-Analyse von *E. coli*. In diesem Abschnitt werden die SERS-Spektren von *E. coli*, welches jeweils 16 Stunden in M9-Medium mit und ohne schweres Wasser bei einem Volumenanteil von 25 % kultiviert wurden, verglichen (s. Abb. 22). Die Rotverschiebung des SERS-Signals bei  $733\text{ cm}^{-1}$  bis zu  $720\text{ cm}^{-1}$  mit einem Mittelwert von  $728\text{ cm}^{-1}$  kann durch den teilweisen Austausch von Protium durch Deuterium in Adenin erklärt werden. Die Intensität des SERS-Signals um  $728\text{ cm}^{-1}$  ist in den deuterierten Zellen deutlich verringert. Es ist nicht zu erwarten, dass die eingesetzte Konzentration von schwerem Wasser einen direkten Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* hat, da sich die Wachstumskurve von *E. coli* nicht ändert.[110] Die Position der SERS-Bande um  $728\text{ cm}^{-1}$  der deuterierten Zellen streut mehr um den Mittelwert als bei unmarkierten Zellen. Die Varianz resultiert entweder aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl in Adenin eingebauten Deuteriumatomen, wegen variierenden Positionen in Adenin eingebauten Deuteriums oder wegen eines Einflusses von schwerem Wasser auf den SERS-verursachenden Mechanismus, wie der Zusammensetzung der freigesetzten Verbindungen. Im Vergleich zu den Stabilisotopen  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  sind Schlussfolgerungen zum Anteil des von bestimmten Mikrobenarten aufgenommenen Deuteriums mit Hilfe dieses SERS-Signals somit schwieriger zu treffen.[23] Bemerkenswerterweise ist die Abnahme der Intensität des SERS-Signals um  $730\text{ cm}^{-1}$  deuterierter Zellen durch Lagerung über 5 Tage im Gegensatz zu den beschriebenen Experimenten mit unmarkierten *E. coli*-Zellen vernachlässigbar. Entweder ist die Bildung oder die Freisetzung von Adenin aufgrund des eingebauten Deuteriums verringert, etwa durch eine höhere Resistenz zu Schockereignissen oder eine verringerte metabolische Aktivität nahe der stationären Phase. Die geringere Signalintensität und fehlende weitere Signalreduktion durch eine Lagerung zwischen SERS-Spektren deuterierter und unmarkierter *E. coli*-Kulturen heben den Einfluss des physiologischen Zustands von Mikroorganismen auf die Ergebnisse von SERS-Analysen hervor. Es sind weiterer Studien notwendig, um zu untersuchen, wie Umweltfaktoren und Wachstumsbedingungen SERS-Signale von Mikroben Arten-spezifisch beeinflussen. Die aufgezeigten Einflüsse lassen jedoch vermuten, dass SERS-Analysen genutzt werden können, um physiologische Eigenschaften von *E. coli* auf Einzellzebene zu untersuchen.



**Abbildung 22 A:** SERS-Signal von  $E. coli$  kultiviert mit 25 %  $D_2O$  im M9-Medium nach 0 und 5 Tagen Lagerung mit eingetragener Nachweisgrenze (der blaue Datensatz in den blauen Rechtecken in **A** und **B** ist identisch).

**B:** SERS-Signal um  $733\text{ cm}^{-1}$  von  $E. coli$  mit und ohne 25 %  $D_2O$ -Zugabe, aufgetragen gegen die Raman-Verschiebung. Die Balken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

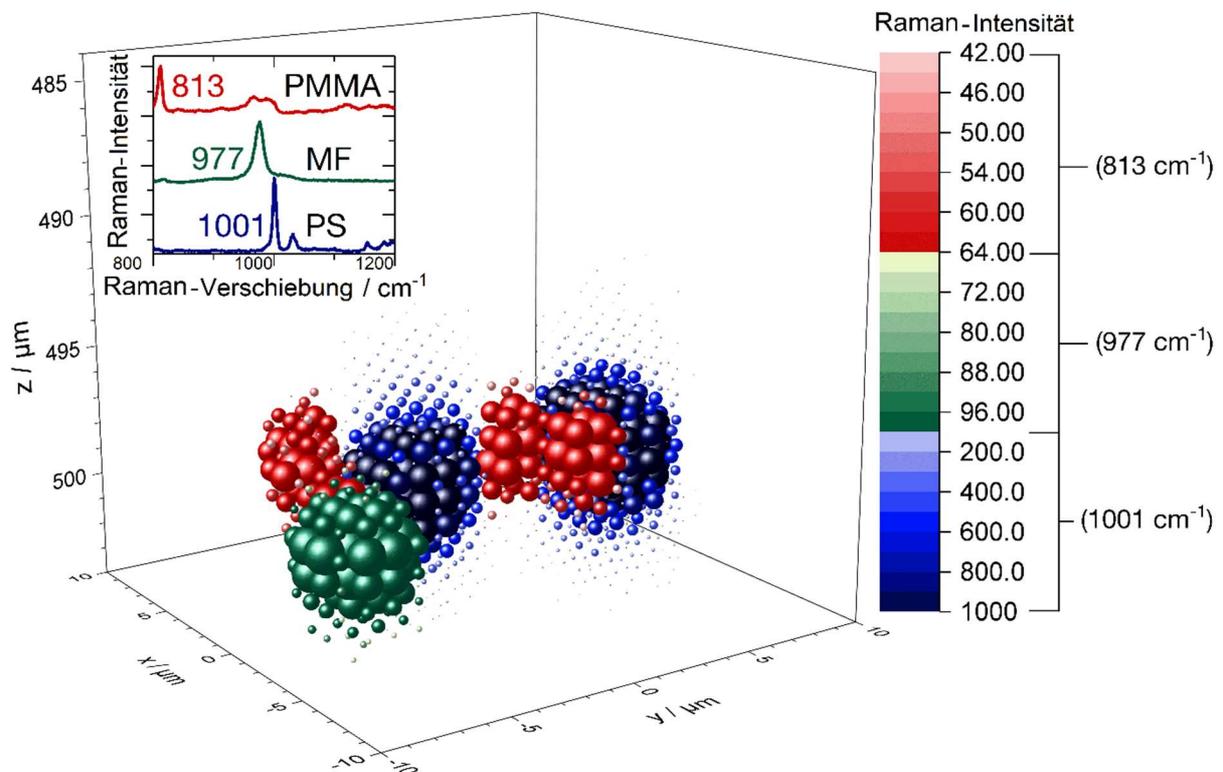
#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

So könnte auf Grundlage von SERS-Analysen auf Aktivität oder Verhalten auf Stressbedingungen einzelner Zellen geschlossen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit Ergebnissen von Avetisyan et al., die zeigten, dass die Raman-Spektroskopie zur Bestimmung aktiver Stoffwechselwege oder zur Differenzierung physiologischer Zustände genutzt werden kann.[140] Auch über die Detektion enzymatischer Reaktionen mittels SERS wurde bereits von Stevenson et al. berichtet.[141]

## 4.4 3D-Raman-Mikrospektroskopie von artifiziellen Biofilmen

### 4.4.1 Eingebettete Kunststoffpartikel

Als Einstieg in die dreidimensionalen Messungen mittels Raman-Mikrospektroskopie wurde ein Agarosegel mit eingebetteten Mikropartikeln dreier Kunststoffsorten untersucht. In dieser Studie wurden Agarosegele verwendet, da diese als geeignetes künstliches Modell für die Biofilmforschung gelten.[142]



**Abbildung 23** 3D-Ramanabbildung eines Agarosegels mit drei Polymethylmethacrylatpartikeln ( $\varnothing = 3.8 \mu\text{m}$ ), einem Melamin-Formaldehyd-Harz-Partikel ( $\varnothing = 4.4 \mu\text{m}$ ) und zwei Polystyrolpartikeln ( $\varnothing = 5.2 \mu\text{m}$ ).

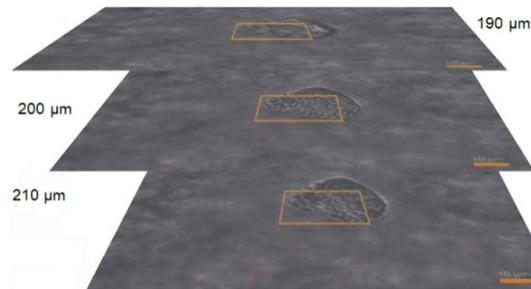
Der Nachweis der unterschiedlichen Polymere erfolgt anhand der charakteristischen Signale bei  $813 \text{ cm}^{-1}$  (Polymethylmethacrylat),  $977 \text{ cm}^{-1}$  (Melamin-Formaldehyd-Harz) bzw.  $1001 \text{ cm}^{-1}$  (Polystyrol). Die Intensität dieser drei Signale an jedem gemessenen Gitterpunkt wird in der graphischen Auswertung durch sphärische Platzhalter mit den Farben Rot, Grün bzw. Blau dargestellt. Die Größe dieser und die Sättigung ihrer Farbe

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

wurde in Abhängigkeit der Intensität des entsprechenden Raman-Signals eingestellt. Die Raman-Analyse wurde mit der Anregungswellenlänge von 532 nm, einer Laserleistung von 8,4 mW, einer Aufnahmezeit pro Rasterpunkt von 200 ms und einer Rasterung in alle drei Dimensionen von 1  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Um die Gesamtdauer der dreidimensionalen Untersuchung möglichst kurz zu halten, wurde nur ein spektrales Messfenster von 500  $\text{cm}^{-1}$  bis 2000  $\text{cm}^{-1}$  aufgezeichnet. Zusammengenommen zeigen die Signalkugeln an den Rasterpunkten des gesamten gescannten Volumens in Abbildung 23 drei PMMA-, ein MF- und zwei PS-Partikel. Da die drei eingesetzten Partikelarten jeweils einen sehr definierten Durchmesser besitzen (MF:  $4,38 \pm 0,06 \mu\text{m}$ , PMMA:  $3,02 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , PS:  $5,19 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ), kann auf das Auflösungsvermögen in der Messtiefe von bis zu 500  $\mu\text{m}$  geschlossen werden. Die Tiefenauflösung ist der lateralen Auflösung unterlegen, reicht jedoch aus, um die Partikel anhand des Raman-Signals mit einem Durchmesser im einstelligen Mikrometerbereich abzubilden. Aufgrund der ähnlichen räumlichen Dimensionen lässt dies vermuten, dass Mikroorganismen wie Amöben mindestens bis zu einer Messtiefe von 500  $\mu\text{m}$  mit guter örtlicher Auflösung abgebildet werden könnten. Da Objektive mit hoher numerischer Apertur nur begrenzte maximale Arbeitsabstände aufweisen, werden Messungen mit bestmöglicher Auflösung nicht viel tiefer durchgeführt werden. Dies gilt vor allem, wenn Proben aus Gesundheitsgründen in hermetisch isolierten Messkammern durch Messfenster untersucht werden. Selbst Bakterienzellen sollten im begrenzten Rahmen darstellbar sein, auch wenn die Signale benachbarter Zellen, vor allem durch die geringere Tiefenauflösung übereinanderliegende Bakterien, nicht mehr klar separierbar sind. Grundlegende Voraussetzung für ein dreidimensionale Analyse ist selbstverständlich die hinreichende Transparenz der Probe für den Wellenlängenbereich des Anregungslasers und der Stokes-Streuung.

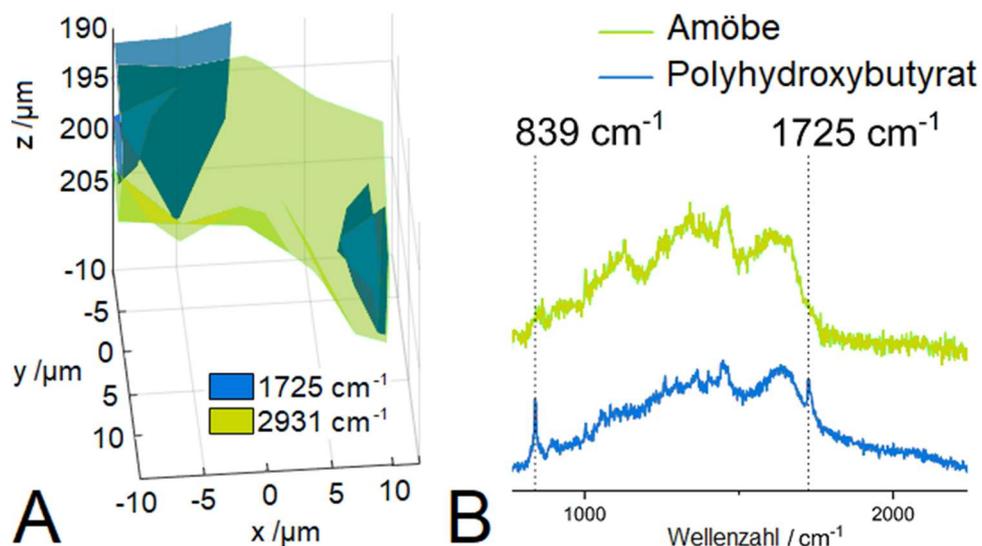
#### 4.4.2 Biofilm mit Legionellen

Vergleichbar zum Agarosegel mit Plastikpartikeln, wurde eine Realprobe aus einem mit Legionellen befallenen Kühlturm in ein Agarosegel aufgenommen. Abbildung 24 zeigt die Mikroskopieaufnahmen dreier fokaler Ebenen eines visuell als Amöbe eingestuftes Objekts in diesem Agarosegel.



**Abbildung 24** Mikroskopie-Aufnahme eines Biofilms mit Legionellen und Amöben aus einer Probe eines mit Legionellen befallenen Kühlturms.

Die dreidimensionale Raman-Analyse von diesem Objekt wurde bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm, einer Laserleistung von 8,4 mW, einer Aufnahmezeit pro Rasterpunkt von  $3 \times 3$  s und einer Rasterung in alle drei Dimensionen von 5  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Sie ist in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25** **A:** 3D-Raman-Abbildung des in Abb. 24 orange markierten Bereichs. **B:** Raman-Spektren innerhalb des in Abb. 24 orange markierten Bereichs.

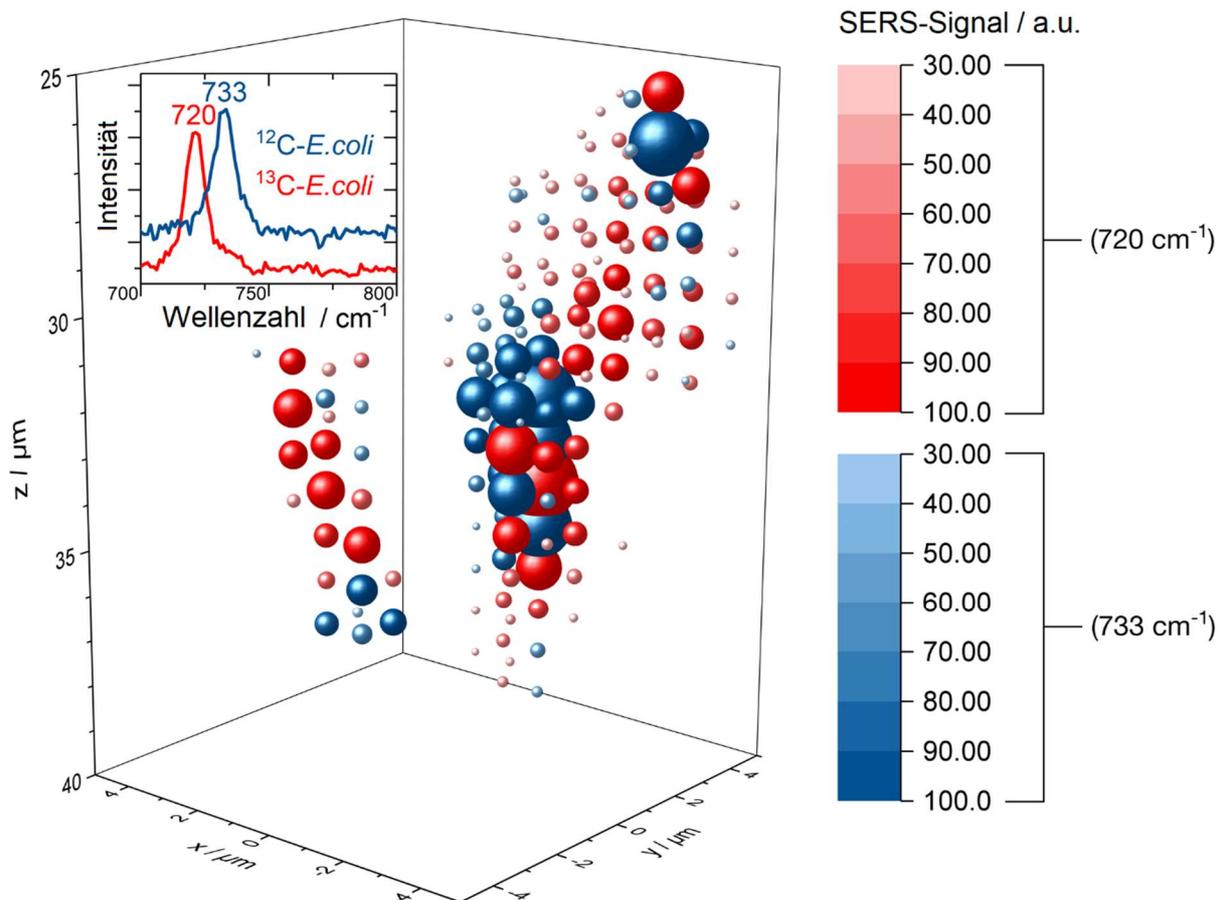
#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

Die Isofläche bei einem geringen Wert des Raman-Signals der C-H-Streckschwingung bei  $2931\text{ cm}^{-1}$  spiegelt gut die in der Mikroskopieaufnahme gezeigte Oberflächenkontur des als Amöbe klassifizierten Objekts wider. Innerhalb dieser belegen die höheren Raman-Intensitäten eine dichtere organische Zusammensetzung. Die Wahl einer weiteren Isofläche für das Raman-Signal von  $1725\text{ cm}^{-1}$  legt das Vorhandensein von Kompartimenten innerhalb der Amöben-ähnlichen Struktur offen. Dieses Signal sowie die gleichzeitig auftretende scharfe Bande bei  $839\text{ cm}^{-1}$  deuten auf eine hohe Konzentration von Polyhydroxybutyrat.[143] Da Legionellen für das Auftreten innerhalb von Wirtszellen wie Amöben bekannt sind und auch für die verstärkte Bildung von Polyhydroxybutyrat als Energiereserve,[144] könnte es sich bei dem untersuchten Objekt um eine mit Legionellen befallene Amöbe handeln.

Moreno et al. zeigten 2019, dass lebensfähige Legionellen mittels *DVC-FISH* (*direct viable count-fluorescence in situ hybridization*) innerhalb aquatischer Amöben nachgewiesen werden können.[145] Ebenso ist die Analyse von eukaryotischen Einzellern wie Amöben oder Protozoen mittels RS bekannt. So wurde etwa 2015 von Lin et al. die Zystenbildung von *Acanthamoeba polyphaga* durch RM untersucht.[146] Der Nachweis mittels RS von lebenden Legionellen, welche als dicht gepackte Zellpakete von dem Protozoon *Tetrahymena thermophila* ausgestoßen wurden, gelang Kusić et al 2016.[147] Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen die Aussagekraft der Raman-Streuung zur Analyse von Mikroorganismen wie Amöben und dem intrazellulären Auftreten von Legionellen. Insbesondere die hier gezeigte Fähigkeit der 3DRM, Strukturen innerhalb von Volumina weniger Kubikmikrometer spektroskopisch darzustellen, beweist für mikrobiologische Proben ein vielversprechendes Potential, welches bisher nicht ausreichend erforscht wurde.

### 4.4.3 SERS-Analysen mit $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen

Die in Kapitel 4.3 beschriebene Freisetzung von SERS-aktiven Substanzen legt Einschränkungen für den Einsatz des verwendeten SERS-Protokolls zur orts aufgelösten Abbildung von Mikroorganismen nahe. Um die Anwendung der *In-situ*-AgNP-Synthese für eine dreidimensionale Analyse zu testen, wurden mit Kohlenstoff-13 markierte *E. coli*- und unmarkierte *E. coli*-Zellen nach *In-situ*-Kolloidsynthese in ein Agarosegel eingebettet.

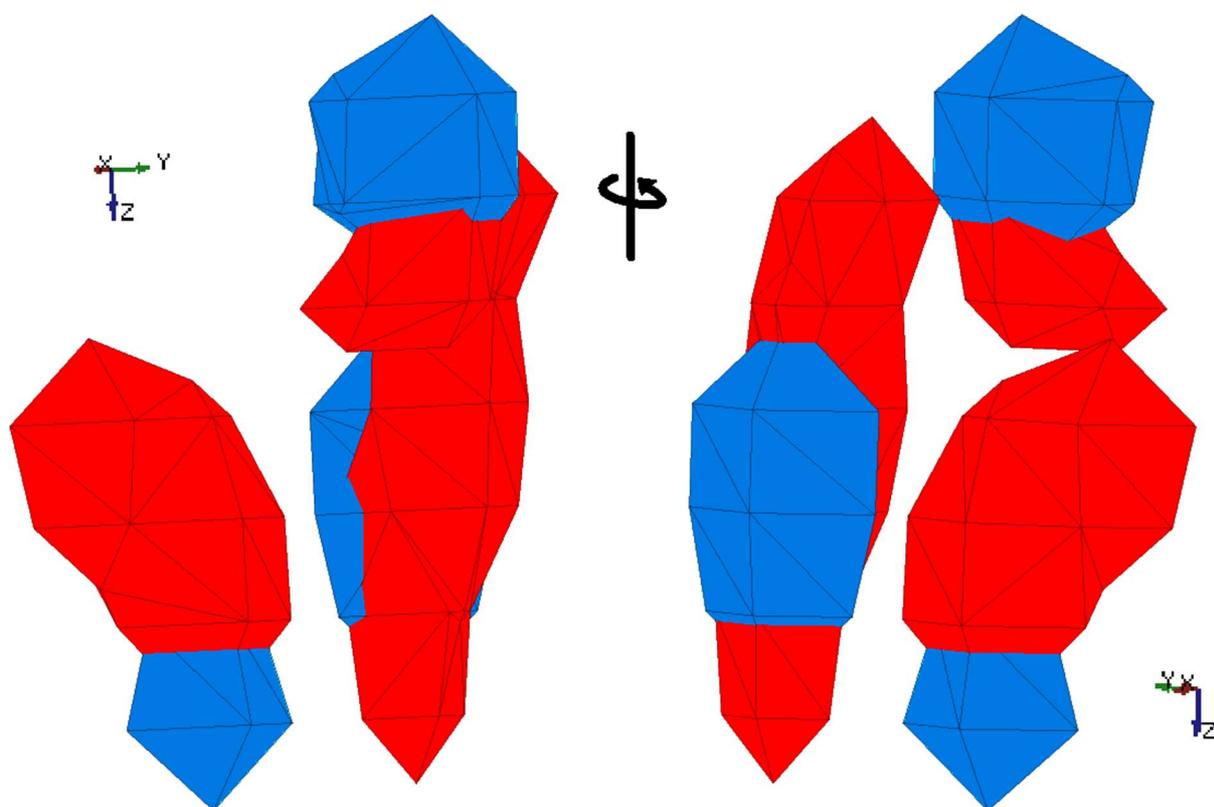


**Abbildung 26** 3D-SERS-Analyse von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen, eingebettet in eine Agarosematrix. Rotverschobene und nicht verschobene SERS-Signale um  $730\text{ cm}^{-1}$  werden an jeder Gitterposition als rote bzw. blaue Kugeln dargestellt, deren Größe und Sättigung die Intensität darstellen.

Es ist zu erwähnen, dass die in Abbildung 26 und 27 gezeigten Daten, die erste 3D-SERS-Analyse eines Stabilisotopen-markierten Biofilmmodells zeigt. Die dreidimensionale Messung wurde mit einer Anregungswellenlänge von  $633\text{ nm}$ , einer

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

Laserleistung von 1,3 mW, einer Aufnahmezeit pro Rasterpunkt von  $2 \times 100$  ms und mit Rasterschritten in alle drei Dimensionen von  $1 \mu\text{m}$  durchgeführt. Die geringe Aufnahmezeit bei einzelnen Rasterpunkten ermöglicht das Abfahren des Analysevolumens von  $1500 \mu\text{m}^3$  in etwa 30 Minuten. Um wässrige biologische Proben präzise abzubilden, sind kurze Messungen erforderlich, da diese mit der Zeit zu Fehlansichtungen neigen. Die Unterscheidung zwischen markierten und unmarkierten Zellen wird durch das deutliche Signal bei etwa  $730 \text{ cm}^{-1}$  ermöglicht.



**Abbildung 27** Isoflächendarstellung anhand des SERS-Signals um  $730 \text{ cm}^{-1}$  der oben gezeigten dreidimensionalen Raman-Analyse von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen eingebettet in eine Agarosematrix aus zwei Blickwinkeln.

Die Isoflächen bei geringer Intensität des normalen SERS-Signals unmarkierter Bakterien und des rotverschobenen SERS-Signals der mit Kohlenstoff-13 markierten Zellen aus Abbildung 26 werden in Abbildung 27 gezeigt. Auch wenn das SERS-Signal hauptsächlich durch Substanzen verursacht wird, die von *E. coli*-Zellen freigesetzt werden, konnte keine Ausbreitung des SERS-Signals auf ein großes Volumen beobachtet werden. Es zeigt sich, dass das Signal sich um die mikroskopisch

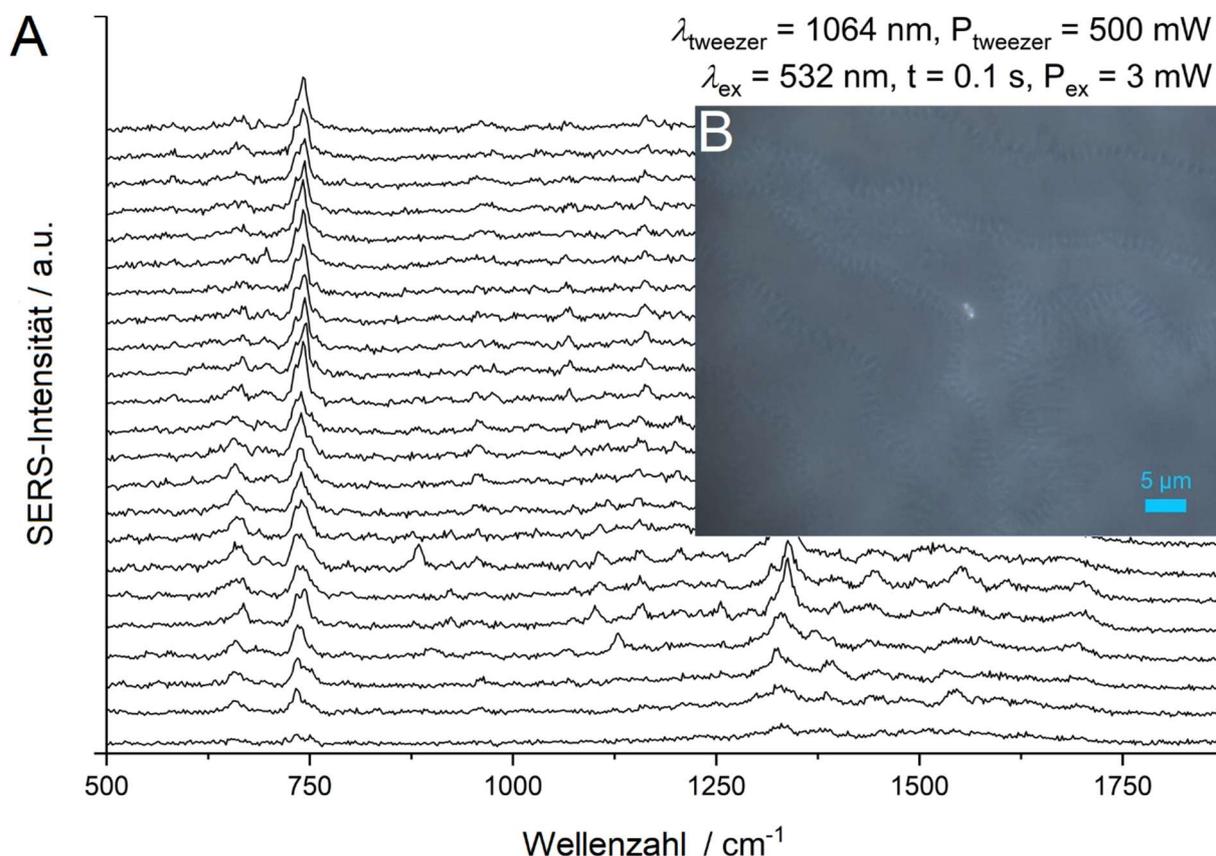
#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

erkennbaren Zellen konzentrierte. Auch die in diesem Abschnitt gefundenen Ergebnisse beweisen, dass die Tiefenauflösung ausreicht, um Objekte im niedrigen Mikrometermaßstab abzubilden. Das Gitterintervall von einem Mikrometer ist ausreichend, um mit einem minimalen ellipsoiden konfokalen Volumen von etwa  $1 \mu\text{m}^3$  das Probevolumen auf der Suche nach SERS-Signalen von *E. coli*-Zellen abzufahren, die ähnliche Abmessungen besitzen.

## 4.5 Zellsortierung

### 4.5.1 SERS-Analysen von $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Zellen

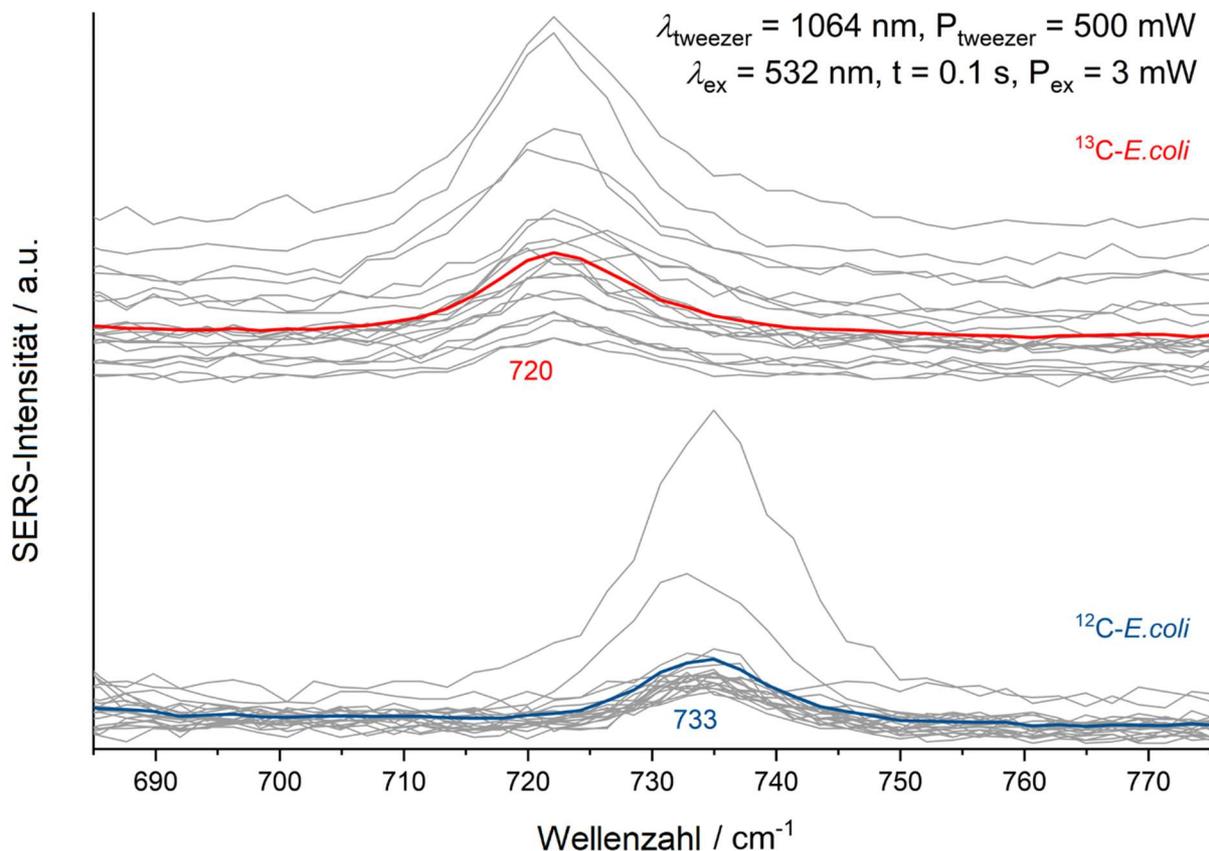
Die SERS-Analyse von *E. coli* wurde als Detektionsmethode zur Zellsortierung mittels optischer Pinzette eingesetzt. Die durch *In-situ*-Kolloidsynthese hergestellten *E. coli*-AgNP-Aggregate wurden erfolgreich in der optischen Falle festgehalten, während SERS-Spektren aufgezeichnet wurden (s. Abb. 28).



**Abbildung 28** **A:** Kontinuierlich aufgenommene SERS-Spektren einer *E. Coli*-Zelle mit AgNP im Laserfokus der optischen Pinzette (1064 nm, 500 mW) und des Anregungslasers (532 nm, 3 mW) mit einer Aufnahmezeit von 100 ms. **B:** Mikroskopie-Aufnahme des *E. coli*-AgNP-Aggregates.

*E. coli*-Zellen wurden mit einer Laserleistung von 500 mW in der optischen Falle festgehalten werden, während zeitgleich SERS-Spektren aufgezeichnet oder die festgehaltenen Bakterien innerhalb der Messkapillare von der Probenlösung in eine PBS-Pufferlösung durch Justieren des Mikroskopiertisches vom Raman-Spektrometer bewegt wurden. Es musste jedoch ein zusätzlicher Reinigungsschritt in der

Probenvorbereitung durchgeführt werden, da die ursprüngliche Probensuspension auch ohne sichtbare Partikel im Laserfokus SERS-Signale aufwies und überschüssiges Reagenz zur Blasenbildung führte. Nach Zentrifugation wurden die *E. coli*-AgNP-Aggregate in Wasser resuspendiert. Die SERS-Spektren zeigten die für *E. coli* charakteristischen Merkmale bei einer Aufnahmezeit von nur 100 ms. Da hier in einer Flüssigkeit (3 mW) gearbeitet wird, kann im Gegensatz zu getrockneten SERS-Proben (138  $\mu$ W) für Analysen von Mikroorganismen die Leistung des Anregungslasers gesteigert werden, was sonst zu einer schlagartigen thermischen Zersetzung der Zellen führt. Die Lösung um die sichtbaren Bakterien-AgNP-Aggregate zeigte kein SERS-Signal. Dies weist darauf hin, dass sich keine AgNP mit gebundenem Analyten von *E. coli* lösen.



**Abbildung 29** Aufeinanderfolgende SERS-Spektren von  $^{13}\text{C-E. coli}$  (rotes Mittelwertspektrum) und  $^{12}\text{C-E. coli}$  (blaues Mittelwertspektrum) innerhalb derselben Probe mit aktivierter optischer Pinzette (die zusammengehörenden Spektren sind zur besseren Ansicht auf der Ordinate verschoben).

#### 4. Ergebnisse und Diskussionen

Experimente, die mit einer Mischung aus unmarkierten und vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli* durchgeführt wurden, bewiesen, dass der Einbau von Kohlenstoff-13 in Bakterienzellen durch SERS gemessen werden kann, während diese von der optischen Pinzette festgehalten werden (s. Abb. 29). Das normale SERS-Signal bei  $733\text{ cm}^{-1}$  für unmarkierte *E. coli*-Zellen und das rotverschobene Signal bei  $720\text{ cm}^{-1}$  für markierte Zellen konnte bei unabhängigen Messereignissen innerhalb derselben Proben beobachtet werden. Es wurde erstmalig das SERS-basierte Sortieren von Stabilisotopen-markierten Mikroorganismen gezeigt.

Dass ein zusätzlicher Probenvorbereitungsschritt nach der *In-situ*-Silberkolloidsynthese notwendig ist, stellt einen nicht zu unterschätzenden Nachteil dieser experimentellen Durchführung dar. Die Übertragbarkeit der beschriebenen Versuchsdurchführung auf komplexere Proben wird durch den aufgrund der notwendigen Entfernung überschüssigen Reagenz eingesetzten Reinigungsschritt behindert. Durch Zentrifugieren gebildete größerer Aggregate machen eine zukünftige Optimierung des Protokolls notwendig. Sollen ferner bisher unbekannte Mikroorganismenarten sortiert werden, stößt eine Zellsortierung auf Grundlage von SERS wegen des artenabhängigen Fehlens von Signalen an die Grenze des Möglichen. Nichtsdestotrotz kann die Anwendbarkeit von SERS als Detektionsmethode für das Sortieren auf Einzelzellebene durch Nachweis von SERS-Signalen entweder vollständig markierter oder unmarkierter Zellen in einer gemischten Probe in Kombination mit dem optischen Nachweis getrennter Zellen bestätigt werden. Gerade der gezeigte Einsatz von Stabilisotopen zur Differenzierung von Zellen und die geringen Messzeiten zeigen vielversprechende Stärken der Zellsortierung mittels SERS. So wäre eine Umsetzung dieser Technik in der Medizinforschung oder Umweltwissenschaften denkbar, um den Verbleib stabilisotopenmarkierter Substanzen und Prozesse auf Ebene einzelner Zellen zu erforschen.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die RM-Analyse von 8 Subtypen des potentiellen Pathogen *L. pneumophila* zeigte, dass unter bestimmten Bedingungen eine Subtypisierung möglich ist. Die eingesetzte Hauptkomponentenanalyse trennt die verschiedenen Subtypen jedoch nicht nach Serogruppen auf. Es wird geschlussfolgert, dass durch die RM komplementäre Aussagen zu serologischen Analysemethoden zugänglich sind, welche von Nutzen für eine Charakterisierung sind. Jedoch wurden in dieser Arbeit sehr definierte Kulturbedingungen zur Aufzucht der Legionellen verwendet und eine Übertragbarkeit auf komplexe Realbedingungen von Probennahmen sowie eine direkte Analyse unter Verzicht einer langwierigen Kultivierung müssen in einer weiteren Studie untersucht werden. Dreidimensionale Analysen von Legionellen-infizierten Realproben geben aber einen Einblick in das Potential der RM zur Analyse ohne aufwendige Probenvorbereitung. Das dreidimensionale Auflösungsvermögen wurde hierfür mit Biofilmen und eingebetteten monodispersen Plastikpartikeln untersucht. An Experimenten bis zu einer Messtiefe von über einem halben Millimeter konnte eine laterale Auflösung und Tiefenauflösung im niedrigen einstelligen Mikrometermaßstab gezeigt werden. Wichtige Voraussetzung bleibt eine ausreichende Probentransparenz im Wellenlängenbereich des Anregungslasers und der Raman-Streuung.

Experimente mit *V. vermiformis* zum Einbau und der Detektion von Stabilisotopen (Kohlenstoff-13, Stickstoff-15) in Amöben mittels SIRM zeigten, dass dies zumindest für die <sup>13</sup>C-Markierungen mit einer hier vorgeschlagenen Route über den Einsatz von Stabilisotopen-markierten *E. coli*-Kulturen als Nährstoffbasis für Amöben möglich ist. Aufgrund des parasitären Auftretens von Legionellen können mit Stabilisotopen markierte Amöbenzellen ein Fenster zur tiefergehenden Analyse von Interaktionen zwischen Legionellen und Wirtsorganismen öffnen.

Für sechs Mikroorganismenarten, darunter ein Archaeon, zwei grampositive und drei gramnegative Bakterien, kultiviert in unterschiedlichen Medien, wurden die SERS-Spektren mit identischen Messparametern analysiert. SERS-Spektren von *E. coli* zeigten scharfe Banden, während die Spektren der anderen Arten weniger deutliche SERS-Signale besitzen. Es wurde der Einfluss dreier Waschlösungen auf das verwendete mikrobielle SERS-Protokoll verglichen. Anstatt des sonst verwendeten Reinstwassers, führte der Einsatz einer Kochsalzlösung zu einer wesentlich

verringerten Signalintensität, während eine Pyrophosphatlösung das SERS-Signal von *E. coli* nahezu verschwinden lässt. Dies beweist, dass der physiologische Zustand von Mikroorganismen einen entscheidenden Einfluss auf SERS-Analysen besitzt. Der systematische Vergleich von frischen und gelagerten *E. coli*-Kulturen zeigte einen raschen Rückgang des SERS-Signals und der tatsächlichen Anzahl gefundener SERS-Signale für Einzelzellmessungen der gelagerten Kulturen. Dies galt sowohl für Bakterien, die mit einem Minimalmedium als auch mit einem Vollmedium kultiviert wurden. Der Effekt kann nicht auf das Absterben von Zellen zurückgeführt werden, da Viabilitätsuntersuchungen bewiesen, dass nach der Lagerung noch fast der gleiche Anteil an Zellen lebensfähig war. REM-Aufnahmen wiesen nach, dass auch bei gelagerten Kulturen mit geringerem SERS-Signal AgNP auf der Zelloberfläche vorhanden sind, was ein Fehlen dieser als weiteren möglichen Grund des sich reduzierenden Signals ausschließt. Es kann daraus geschlossen werden, dass die abnehmende Signalintensität mit der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen zusammenhängt und die SERS-Signale mit der Freisetzung von Nukleotiden oder deren Abbauprodukten, welche von einem eintretenden Nährstoffmangel oder osmotischen Schock in der Probenvorbereitung hervorgerufen wird. Für *E. coli* sind vor allem Adenin, Xanthin und Hypoxanthin von Bedeutung. Referenzmessungen verschiedener Nukleobasen und Derivate sowie Abbauprodukten von Adenin bestätigten dies. Berechnungen belegten den hohen Anteil Adenins am SERS-Spektrum der eingesetzten *E. coli*-Stämme. Es wurden Experimente mit einer *In-situ*-Goldnanopartikelsynthese auf *E. coli* durchgeführt, um AgNP als verfälschenden Faktor bei dem Vergleich von mikrobiellen SERS-Analysen unterschiedlicher Kolloidsysteme auszuschließen. Aufgrund geringer Signalintensitäten führten diese jedoch zu keinem präsentierbaren Resultat.

Die charakteristische SERS-Bande bei  $733\text{ cm}^{-1}$  zeigte bei teilweise deuterierten Bakterien (< 25 %) eine Rotverschiebung zu  $728\text{ cm}^{-1}$  und im Gegensatz zu nicht deuterierten *E. coli*-Zellen eine überraschend große Varianz der Bandenposition und eine stabile Intensität bei den bis zu 5 Tage gelagerten Kulturen. Es ist somit zwingend erforderlich, die Auswirkung des physiologischen Zustands von Mikroorganismen auf deren SERS-Signal zu berücksichtigen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, da andernfalls ein unvollständiges Verständnis zu Fehlinterpretationen sowie Irrtümern

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

bei der Charakterisierung und Bewertung führen kann. Darüber hinaus muss die Bedeutung von Metaboliten als mögliche Ursache für SERS-Signale betont werden. So kann das örtliche Auflösungsvermögen unter der Freisetzung und Verteilung der Substanzen leiden, die ursächlich für das SERS-Signal sind. Der Waschschrift vor der *In-situ*-Silberkolloidsynthese unterband in dieser Arbeit Einflüsse der Metaboliten, welche bereits in das Kulturmedium abgegeben wurden, auf die SERS-Spektren. Diese Schlussfolgerung wurde durch dreidimensionale Analysen bestätigt, die keine gleichmäßige Verteilung der SERS-Signale zeigten, wie es für Metaboliten in wässriger Lösung zu erwarten wäre. Ein Biofilmmodell mit  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -markierten *E. coli*-Bakterien lieferte im Gegenteil eine aussagekräftige Visualisierung, dass SERS-Ereignisse ausschließlich auf zelluläre Strukturen beschränkt waren.

Die gefundene Relation physiologischer Bedingungen von *E. coli* und den SERS-Signalen kann helfen die hohe Varianz der Resultate unterschiedlicher SERS-Protokolle für den Nachweis von Mikroorganismen zu erklären. Eine Berücksichtigung der hier untersuchten Einflüsse ist generell empfehlenswert und kann zu einer Weiterentwicklung der mikrobiellen Untersuchung mittels SERS beitragen.

Die Zellsortierung von *E. coli*-Zellen durch eine optische Pinzette mittels SERS-basierter Detektion belegte dies weiter. Durch einen Reinigungsschritt nach der *In-situ*-Silbernanopartikelsynthese konnten Bakterienzellen mit den Nanopartikeln abgetrennt werden, ohne dass SERS-Signale dauerhaft als störender Hintergrund auftraten. Trotz der beobachteten Variabilität der SERS-Signale, die jedenfalls weitere Untersuchungen erforderlich macht, ermöglicht der Einsatz von SERS auf Einzelzellebene die Erkennung, Charakterisierung und Sortierung metabolisch aktiver Mikroorganismen. Eine Anwendung von SERS zur Detektion und Sortierung von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -markierten Zellen kann vor allem für Biowissenschaften und Umweltforschung neue Möglichkeiten der Verfolgung von Stoffwechselprozessen oder der Untersuchung von Pathogenen heterogener Phänotypen schaffen.

## **6. Literaturverzeichnis**

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] 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.
- [2] 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, 5529-34.
- [3] 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, 4452-58.
- [4] T. E. Bridges, R. H. Uibel, J. M. Harris, Measuring diffusion of molecules into individual polymer particles by confocal Raman microscopy, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 2121-29.
- [5] N. Overall, Optimising image quality in 2D and 3D confocal Raman mapping, *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, 45, 133-38.
- [6] R. M. Stubbendieck, C. Vargas-Bautista, P. D. Straight, Bacterial communities: interactions to scale, *Frontiers in Microbiology* **2016**, 7, 1234 (19 Seiten).
- [7] W. Liu, H. L. Roder, J. S. Madsen, T. Bjarnsholt, S. J. Sorensen, M. Burmolle, Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization, *Frontiers in Microbiology* **2016**, 7, 1366 (8 Seiten).
- [8] S. Widder, R. J. Allen, T. Pfeiffer, T. P. Curtis, C. Wiuf, W. T. Sloan, O. X. Cordero, S. P. Brown, B. Momeni, W. Shou, H. Kettle, H. J. Flint, A. F. Haas, B. Laroche, J. U. Kreft, P. B. Rainey, S. Freilich, S. Schuster, K. Milferstedt, J. R. van der Meer, et al., Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics, *The ISME Journal* **2016**, 10, 2557-68.
- [9] M. K. Cheung, C. K. Wong, K. H. Chu, H. S. Kwan, Community structure, dynamics and interactions of bacteria, archaea and fungi in subtropical coastal wetland sediments, *Scientific Reports* **2018**, 8, 14397 (14 Seiten).

- [10] D. P. Lloyd, R. J. Allen, Competition for space during bacterial colonization of a surface, *Journal of the Royal Society Interface* **2015**, 12, 0608 (15 Seiten).
- [11] W. Yin, Y. Wang, L. Liu, J. He, Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, 20, 3424 (18 Seiten).
- [12] D. R. Johnson, D. E. Helbling, T. K. Lee, J. Park, K. Fenner, H. P. Kohler, M. Ackermann, Association of biodiversity with the rates of micropollutant biotransformations among full-scale wastewater treatment plant communities, *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, 81, 666-75.
- [13] E. L. Madsen, Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles, *Current Opinion in Biotechnology* **2011**, 22, 456-64.
- [14] P. Van Baarlen, A. Van Belkum, R. C. Summerbell, P. W. Crous, B. P. H. J. Thomma, Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?, *FEMS Microbiology Reviews* **2007**, 31, 239-77.
- [15] Y. Shen, G. L. Monroy, N. Derlon, D. Janjaroen, C. Huang, E. Morgenroth, S. A. Boppart, N. J. Ashbolt, W. T. Liu, T. H. Nguyen, Role of biofilm roughness and hydrodynamic conditions in *Legionella pneumophila* adhesion to and detachment from simulated drinking water biofilms, *Environmental Science & Technology* **2015**, 49, 4274-82.
- [16] L. Y. Gao, O. S. Harb, Y. Abu Kwaik, Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa, *Infection and Immunity* **1997**, 65, 4738-46.
- [17] R. A. Garduno, E. Garduno, M. Hiltz, P. S. Hoffman, Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms, *Infection and Immunity* **2002**, 70, 6273-83.
- [18] P. Declerck, Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environmental Microbiology* **2010**, 12, 557-66.

## 6. Literaturverzeichnis

- [19] S. Pecastaings, M. Berge, K. M. Dubourg, C. Roques, Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms, *Biofouling* **2010**, 26, 809-19.
- [20] R. M. Jarvis, R. Goodacre, Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 40-47.
- [21] P. Mobili, A. Londero, G. De Antoni, A. Gómez-Zavaglia, C. Araujo-Andrade, H. Ávila-Donoso, R. Ivanov-Tzonchev, I. Moreno, C. Frausto-Reyes, Multivariate analysis of Raman spectra applied to microbiology: discrimination of microorganisms at the species level, *Revista mexicana de Física* **2010**, 56, 378-85.
- [22] P. Kubryk, R. Niessner, N. P. Ivleva, The origin of the band at around 730 cm<sup>-1</sup> in the SERS spectra of bacteria: a stable isotope approach, *Analyst* **2016**, 141, 2874-8.
- [23] L. Cui, K. Yang, G. Zhou, W. E. Huang, Y. G. Zhu, Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level, *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 5793-800.
- [24] L. Purkamo, R. Kietavainen, M. Nuppenen-Puputti, M. Bomberg, C. Cousins, Ultradeep microbial communities at 4.4 km within crystalline bedrock: implications for habitability in a planetary context, *Life (Basel)* **2020**, 10, 2 (22 Seiten).
- [25] S. C. Cary, I. R. McDonald, J. E. Barrett, D. A. Cowan, On the rocks: the microbiology of antarctic dry valley soils, *Nature Reviews Microbiology* **2010**, 8, 129-38.
- [26] Y. L. Zhou, P. Mara, G. J. Cui, V. P. Edgcomb, Y. Wang, Microbiomes in the Challenger Deep slope and bottom-axis sediments, *Nature Communications* **2022**, 13, 1515 (13 Seiten).
- [27] D. J. Smith, J. D. Ravichandar, S. Jain, D. W. Griffin, H. Yu, Q. Tan, J. Thissen, T. Lusby, P. Nicoll, S. Shedler, P. Martinez, A. Osorio, J. Lechniak, S. Choi, K. Sabino, K. Iverson, L. Chan, C. Jaing, J. McGrath, Airborne bacteria in Earth's lower stratosphere resemble taxa detected in the troposphere: results from a

- new NASA aircraft bioaerosol collector (ABC), *Frontiers in Microbiology* **2018**, 9, 1752 (20 Seiten).
- [28] M. Palatinszky, C. Herbold, N. Jehmlich, M. Pogoda, P. Han, M. von Bergen, I. Lagkouvardos, S. M. Karst, A. Galushko, H. Koch, D. Berry, H. Daims, M. Wagner, Cyanate as an energy source for nitrifiers, *Nature* **2015**, 524, 105-8.
- [29] D. Monroe, Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms, *PLoS Biology* **2007**, 5, 2458-61.
- [30] K. N. Kragh, J. B. Hutchison, G. Melaugh, C. Rodesney, A. E. Roberts, Y. Irie, P. Jensen, S. P. Diggle, R. J. Allen, V. Gordon, T. Bjarnsholt, Role of multicellular aggregates in biofilm formation, *mBio* **2016**, 7, e00237 (11 Seiten).
- [31] M. Beitelshes, A. Hill, C. H. Jones, B. A. Pfeifer, Phenotypic variation during biofilm formation: implications for anti-biofilm therapeutic design, *Materials (Basel)* **2018**, 11, 1086 (18 Seiten).
- [32] G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm formation as microbial development, *Annual Review of Microbiology* **2000**, 54, 49-79.
- [33] S. Pande, F. Kaftan, S. Lang, A. Svatos, S. Germerodt, C. Kost, Privatization of cooperative benefits stabilizes mutualistic cross-feeding interactions in spatially structured environments, *The ISME Journal* **2016**, 10, 1413-23.
- [34] S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegelski, S. J. Hultgren, Morphological plasticity as a bacterial survival strategy, *Nature Reviews Microbiology* **2008**, 6, 162-68.
- [35] H. Dang, C. R. Lovell, Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2016**, 80, 91-138.
- [36] J. S. Madsen, M. Burmolle, L. H. Hansen, S. J. Sorensen, The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **2012**, 65, 183-95.

## 6. Literaturverzeichnis

- [37] V. Niranjan, A. Malini, Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients, *Indian Journal of Medical Research* **2014**, 139, 945-8.
- [38] K. Lewis, Riddle of biofilm resistance, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **2001**, 45, 999-1007.
- [39] F. S. Nolte, G. E. Hollick, R. G. Robertson, Enzymatic activities of *Legionella pneumophila* and *Legionella*-like organisms, *Journal of Clinical Microbiology* **1982**, 15, 175-77.
- [40] Y. Sharaby, S. Rodríguez-Martínez, O. Oks, M. Pecellin, H. Mizrahi, A. Peretz, I. Brettar, M. G. Höfle, M. Halpern, Temperature-dependent growth modeling of environmental and clinical *Legionella pneumophila* multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) genotypes, *Applied and Environmental Microbiology* **2017**, 83, e03295-16 (13 Seiten).
- [41] H. K. Lee, J. I. Shim, H. E. Kim, J. Y. Yu, Y. H. Kang, Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea, *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, 76, 6547-54.
- [42] M. Steinert, U. Hentschel, J. Hacker, K. L. Dooling, K.-A. Toews, L. A. Hicks, L. E. Garrison, B. Bachaus, S. Zansky, L. R. Carpenter, B. Schaffner, E. Parker, S. Petit, A. Thomas, S. Thomas, R. Mansmann, C. Morin, B. White, G. E. Langley, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. Active bacterial core surveillance for Legionellosis - United States, 2011-2013, *FEMS Microbiology Reviews* **2002**, 26, 149-62.
- [43] A. Wunderlich, C. Torggler, D. Elsasser, C. Luck, R. Niessner, M. Seidel, Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408, 2203-13.
- [44] E. Leoni, F. Catalani, S. Marini, L. Dallolio, Legionellosis associated with recreational waters: a systematic review of cases and outbreaks in swimming pools, spa pools, and similar environments, *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2018**, 15, 1612 (19 Seiten).

- [45] M. R. Parsek, P. K. Singh, Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis, *Annual Review of Microbiology* **2003**, 57, 677-701.
- [46] B. S. Fields, R. F. Benson, R. E. Besser, Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, 15, 506-26.
- [47] J. Beute, T. E. L. d. s. network, Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015, *Euro Surveillance* **2017**, 22, 27 (8 Seiten).
- [48] Robert-Koch-Institut, Haben sich reiseassoziierte Fälle von Legionärskrankheit wirklich während der Reise infiziert?, *Epidemiologisches Bulletin* **2023**, 23, 1-30.
- [49] A. Locke, S. Fitzgerald, A. Mahadevan-Jansen, Advances in optical detection of human-associated pathogenic bacteria, *Molecules* **2020**, 25, 5256 (33 Seiten).
- [50] J. Schultz, F. Modolon, R. S. Peixoto, A. S. Rosado, Shedding light on the composition of extreme microbial dark matter: alternative approaches for culturing extremophiles, *Frontiers in Microbiology* **2023**, 14, 1167718 (17 Seiten).
- [51] D. F. Welch, Applications of cellular fatty acid analysis, *Clinical Microbiology Reviews* **1991**, 4, 422-38.
- [52] Y. P. Ho, P. M. Reddy, Identification of pathogens by mass spectrometry, *Clinical Chemistry* **2010**, 56, 525-36.
- [53] J. P. Harrison, D. Berry, Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples, *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 675 (7 Seiten).
- [54] M. Wagner, R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, K.-H. Schleifer, Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge, *Systematic and Applied Microbiology* **1994**, 17, 405-17.
- [55] T. Woyke, D. F. R. Doud, F. Schulz, The trajectory of microbial single-cell sequencing, *Nature Methods* **2017**, 14, 1045-54.

## 6. Literaturverzeichnis

- [56] J. Hou, C. Wang, R. T. Rozenbaum, N. Gusnaniar, E. D. de Jong, W. Woudstra, G. I. Geertsema-Doornbusch, J. Atema-Smit, J. Sjollema, Y. Ren, H. J. Busscher, H. C. van der Mei, Bacterial density and biofilm structure determined by optical coherence tomography, *Scientific Reports* **2019**, 9, 9794 (12 Seiten).
- [57] X. Shu, L. Beckmann, H. Zhang, Visible-light optical coherence tomography: a review, *Journal of Biomedical Optics* **2017**, 22, 1-14.
- [58] T. Schmid, U. Panne, C. Haisch, R. Niessner, Biofilm monitoring by photoacoustic spectroscopy, *Water Science and Technology* **2003**, 47, 25-29.
- [59] M. Relucenti, G. Familiari, O. Donfrancesco, M. Taurino, X. Li, R. Chen, M. Artini, R. Papa, L. Selan, Microscopy methods for biofilm imaging: focus on SEM and VP-SEM pros and cons, *Biology (Basel)* **2021**, 10, 51 (17 Seiten).
- [60] Y. Cui, C. Bhardwaj, S. Milasinovic, R. P. Carlson, R. J. Gordon, L. Hanley, Molecular imaging and depth profiling of biomaterials interfaces by femtosecond laser desorption postionization mass spectrometry, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, 5, 9269-75.
- [61] A. Akhmetov, J. F. Moore, G. L. Gasper, P. J. Koin, L. Hanley, Laser desorption postionization for imaging MS of biological material, *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 45, 137-45.
- [62] T. Santos, L. Théron, C. Chambon, D. Viala, D. Centeno, J. Esbelin, M. Hébraud, MALDI mass spectrometry imaging and in situ microproteomics of *Listeria monocytogenes* biofilms, *Journal of Proteomics* **2018**, 187, 152-60.
- [63] E. S. Rivera, A. Weiss, L. G. Migas, J. A. Freiberg, K. V. Djambazova, E. K. Neumann, R. Van de Plas, J. M. Spraggins, E. P. Skaar, R. M. Caprioli, Imaging mass spectrometry reveals complex lipid distributions across *Staphylococcus aureus* biofilm layers, *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab* **2022**, 26, 36-46.
- [64] J. W. Moreau, P. K. Weber, M. C. Martin, B. Gilbert, I. D. Hutcheon, J. F. Banfield, Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles, *Science* **2007**, 316, 1600-03.

- [65] S. Behrens, T. Losekann, J. Pett-Ridge, P. K. Weber, W. O. Ng, B. S. Stevenson, I. D. Hutcheon, D. A. Relman, A. M. Spormann, Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS, *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, 74, 3143-50.
- [66] R. Amann, B. M. Fuchs, Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques, *Nature Reviews: Microbiology* **2008**, 6, 339-48.
- [67] T. Thurnheer, R. Gmür, B. Guggenheim, Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm, *Journal of Microbiological Methods* **2004**, 56, 37-47.
- [68] F. Maixner, D. R. Noguera, B. Anneser, K. Stoecker, G. Wegl, M. Wagner, H. Daims, Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospirilla-like bacteria, *Environmental Microbiology* **2006**, 8, 1487-95.
- [69] B. Gieroba, M. Krysa, K. Wojtowicz, A. Wiater, M. Pleszczynska, M. Tomczyk, A. Sroka-Bartnicka, The FT-IR and Raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 3811 (20 Seiten).
- [70] A. Smekal, Zur Quantentheorie der Dispersion, *Naturwissenschaften* **1923**, 11, 873-75.
- [71] C. V. Raman, K. S. Krishnan, A new type of secondary radiation, *Nature* **1928**, 121, 501-02.
- [72] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown. In: *Introductory Raman spectroscopy (second edition)*; Academic Press, San Diego, **2003**, S. 1-94.
- [73] E. Smith, G. Dent. In: *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2005**.
- [74] P. Kubryk, J. S. Kolschbach, S. Marozava, T. Lueders, R. U. Meckenstock, R. Niessner, N. P. Ivleva, Exploring the potential of stable isotope (resonance) Raman microspectroscopy and surface-enhanced Raman scattering for the

## 6. Literaturverzeichnis

- analysis of microorganisms at single cell level, *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 6622-30.
- [75] N. J. Overall, Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of confocal Raman microscopy, *Applied Spectroscopy* **2000**, 54, 773-82.
- [76] K. J. Baldwin, D. N. Batchelder, Confocal Raman microspectroscopy through a planar interface, *Applied Spectroscopy* **2001**, 55, 517-24.
- [77] E. Wolf, Electromagnetic diffraction in optical systems. I. An integral representation of the image field, *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1959**, 253, 349-57.
- [78] P. Török, P. Varga, Z. Laczik, G. R. Booker, Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation, *Journal of the Optical Society of America A* **1995**, 12, 325-32.
- [79] C. Sourisseau, P. Maraval, Confocal Raman microspectrometry: a vectorial electromagnetic treatment of the light focused and collected through a planar interface and its application to the study of a thin coating, *Applied Spectroscopy* **2003**, 57, 1324-32.
- [80] E. Witkowska, D. Korsak, A. Kowalska, M. Ksiezopolska-Gocalska, J. Niedziolka-Jonsson, E. Rozniecka, W. Michalowicz, P. Albrycht, M. Podrazka, R. Holyst, J. Waluk, A. Kaminska, Surface-enhanced Raman spectroscopy introduced into the International Standard Organization (ISO) regulations as an alternative method for detection and identification of pathogens in the food industry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, 409, 1555-67.
- [81] T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, Tip-enhanced Raman scattering (TERS) and high-resolution bio nano-analysis—a comparison, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12, 12040-49.
- [82] 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, 320-7.

- [83] C. Zhang, D. Zhang, J. X. Cheng, Coherent Raman scattering microscopy in biology and medicine, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2015**, 17, 415-45.
- [84] S. Li, Y. Li, R. Yi, L. Liu, J. Qu, Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and its applications, *Frontiers in Physics* **2020**, 8, 598420 (9 Seiten).
- [85] F. Hu, L. Shi, W. Min, Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy, *Nature Methods* **2019**, 16, 830-42.
- [86] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* **1974**, 26, 163-66.
- [87] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99, 5215-17.
- [88] M. R. Philpott, Effect of surface plasmons on transitions in molecules, *The Journal of Chemical Physics* **1975**, 62, 1812-17.
- [89] M. G. Albrecht, J. F. Evans, J. A. Creighton, The nature of an electrochemically roughened silver surface and its role in promoting anomalous Raman scattering intensity, *Surface Science* **1978**, 75, L777-L80.
- [90] J. A. Creighton, M. G. Albrecht, R. E. Hester, J. A. D. Matthew, The dependence of the intensity of Raman bands of pyridine at a silver electrode on the wavelength of excitation, *Chemical Physics Letters* **1978**, 55, 55-58.
- [91] J. C. Tsang, J. R. Kirtley, J. A. Bradley, Surface-enhanced Raman spectroscopy and surface plasmons, *Physical Review Letters* **1979**, 43, 772-75.
- [92] J. L. Payton, S. M. Morton, J. E. Moore, L. Jensen, A hybrid atomistic electrodynamic quantum mechanical approach for simulating surface-enhanced Raman scattering, *Accounts of Chemical Research* **2014**, 47, 88-99.

## 6. Literaturverzeichnis

- [93] J. Gersten, A. Nitzan, Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces, *The Journal of Chemical Physics* **1980**, 73, 3023-37.
- [94] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, 10, 6079-89.
- [95] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, Phenomenological local field enhancement factor distributions around electromagnetic hot spots, *Journal of Chemical Physics* **2009**, 130, 181101 (5 Seiten).
- [96] S. Schlücker, Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications, *Angewandte Chemie, International Edition in English* **2014**, 53, 4756-95.
- [97] 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, 4374-80.
- [98] S. Efrima, B. V. Bronk, Silver colloids impregnating or coating bacteria, *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102, 5947-50.
- [99] W. R. Premasiri, J. C. Lee, A. Sauer-Budge, R. Theberge, 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, 4631-47.
- [100] R. M. Jarvis, R. Goodacre, Characterisation and identification of bacteria using SERS, *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, 931-6.
- [101] S. Efrima, L. Zeiri, Understanding SERS of bacteria, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, 40, 277-88.
- [102] G. Cai, S. Wang, L. Zheng, J. Lin, A fluidic device for immunomagnetic separation of foodborne bacteria using self-assembled magnetic nanoparticle chains, *Micromachines (Basel)* **2018**, 9, 624 (11 Seiten).

- [103] K. S. Lee, M. Palatinszky, F. C. Pereira, J. Nguyen, V. I. Fernandez, A. J. Mueller, F. Menolascina, H. Daims, D. Berry, M. Wagner, R. Stocker, An automated Raman-based platform for the sorting of live cells by functional properties, *Nature Microbiology* **2019**, 4, 1035-48.
- [104] Y. Song, A.-K. Kaster, J. Vollmers, Y. Song, P. A. Davison, M. Frentrup, G. M. Preston, I. P. Thompson, J. C. Murrell, H. Yin, C. N. Hunter, W. E. Huang, Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea, *Microbial Biotechnology* **2017**, 10, 125-37.
- [105] Y. Lyu, X. Yuan, A. Glidle, Y. Fu, H. Furusho, T. Yang, H. Yin, Automated Raman based cell sorting with 3D microfluidics, *Lab Chip* **2020**, 20, 4235-45.
- [106] J. J. Agresti, E. Antipov, A. R. Abate, K. Ahn, A. C. Rowat, J. C. Baret, M. Marquez, A. M. Klibanov, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 4004-9.
- [107] L. Ren, Y. Chen, P. Li, Z. Mao, P. H. Huang, J. Rufo, F. Guo, L. Wang, J. P. McCoy, S. J. Levine, T. J. Huang, A high-throughput acoustic cell sorter, *Lab Chip* **2015**, 15, 3870-79.
- [108] H. R. Hulett, W. A. Bonner, J. Barrett, L. A. Herzenberg, Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence, *Science* **1969**, 166, 747-49.
- [109] G. Batani, K. Bayer, J. Boge, U. Hentschel, T. Thomas, Fluorescence in situ hybridization (FISH) and cell sorting of living bacteria, *Scientific Reports* **2019**, 9, 18618 (13 Seiten).
- [110] 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<sub>2</sub>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.

## 6. Literaturverzeichnis

- [111] A. Hermelink, A. Brauer, P. Lasch, D. Naumann, Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy, *Analyst* **2009**, 134, 1149-53.
- [112] J. van de Vossenberg, H. Tervahauta, K. Maquelin, C. H. W. Blokker-Koopmans, M. Uytewaal-Aarts, D. van der Kooij, A. P. van Wezel, B. van der Gaag, Identification of bacteria in drinking water with Raman spectroscopy, *Analytical Methods* **2013**, 5, 2679-87.
- [113] D. Kusic, B. Kampe, P. Rosch, J. Popp, Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy, *Water Research* **2014**, 48, 179-89.
- [114] N. Leopold, B. Lendl, A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *Journal of Physical Chemistry. B* **2003**, 107, 5723-27.
- [115] 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, 1525-33.
- [116] A. Colnita, N. E. Dina, N. Leopold, D. C. Vodnar, D. Bogdan, S. A. Porav, L. David, Characterization and discrimination of gram-positive bacteria using Raman spectroscopy with the aid of principal component analysis, *Nanomaterials (Basel)* **2017**, 7, 248 (16 Seiten).
- [117] M. Chisanga, H. Muhamadali, R. Kimber, R. Goodacre, Quantitative detection of isotopically enriched *E. coli* cells by SERS, *Faraday Discussions* **2017**, 205, 331-43.
- [118] H. Wetzel, B. Pettinger, U. Wenning, Surface-enhanced Raman scattering from ethylenediaminetetraacetic-disodium salt and nitrate ions on silver electrodes, *Chemical Physics Letters* **1980**, 75, 173-78.
- [119] 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, 5198-202.

- [120] 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, 824-31.
- [121] 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, *SPIE* **2001**, 4577, 182-92.
- [122] S. W. Chiu, H. W. Cheng, Z. X. Chen, H. H. Wang, M. Y. Lai, J. K. Wang, Y. L. Wang, Quantification of biomolecules responsible for biomarkers in the surface-enhanced Raman spectra of bacteria using liquid chromatography-mass spectrometry, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, 20, 8032-41.
- [123] H. Zhou, D. Yang, N. P. Ivleva, N. E. Mircescu, S. Schubert, R. Niessner, A. Wieser, C. Haisch, Label-free in situ discrimination of live and dead bacteria by surface-enhanced Raman scattering, *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 6553-61.
- [124] E. Borek, J. Rockenbach, A. Ryan, Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis, *Journal of Bacteriology* **1956**, 71, 318-23.
- [125] H. E. Wade, D. M. Morgan, The nature of the fluctuating ribonucleic acid in *Escherichia coli*, *Biochemical Journal* **1957**, 65, 321-31.
- [126] S. Dagley, J. Sykes, Effect of starvation upon the constitution of bacteria, *Nature* **1957**, 179, 1249-50.
- [127] J. T. Holden, Degradation of intracellular nucleic acid and leakage of fragments by *Lactobacillus arabinosus*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1958**, 29, 667-68.
- [128] B. Rotman, Regulation of enzymatic activity in the intact cell: the  $\beta$ -d-Galactosidase of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **1958**, 76, 1-14.
- [129] J. Mandelstam, The intracellular turnover of protein and nucleic acids and its role in biochemical differentiation, *Bacteriological Reviews* **1960**, 24, 289-308.

## 6. Literaturverzeichnis

- [130] R. E. Strange, H. E. Wade, A. G. Ness, The catabolism of proteins and nucleic acids in starved *Aerobacter aerogenes*, *Biochemical Journal* **1963**, 86, 197-203.
- [131] R. S. Makman, E. W. Sutherland, Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **1965**, 240, 1309-14.
- [132] F. Ben-Hamida, D. Schlessinger, A. Peterkofsky, C. Gazdar, Synthesis and breakdown of ribonucleic acid in *Escherichia coli* starving for nitrogen Glucose and the Metabolism of Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate in *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1966**, 119, 183-91.
- [133] A. Peterkofsky, C. Gazdar, Glucose and the metabolism of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, 2794-98.
- [134] M. J. Buettner, E. Spitz, H. V. Rickenberg, Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **1973**, 114, 1068-73.
- [135] R. Kaplan, D. Apirion, Decay of ribosomal ribonucleic acid in *Escherichia coli* cells starved for various nutrients, *Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250, 3174-78.
- [136] I. Pastan, S. Adhya, Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*, *Bacteriological Reviews* **1976**, 40, 527-51.
- [137] L. Cohen, R. Kaplan, Accumulation of nucleotides by starved *Escherichia coli* cells as a probe for the involvement of ribonucleases in ribonucleic acid degradation, *Journal of Bacteriology* **1977**, 129, 651-57.
- [138] R. Kaplan, D. Apirion, The fate of ribosomes in *Escherichia coli* cells starved for a carbon source, *Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250, 1854-63.
- [139] R. Weiss, M. Palatinszky, M. Wagner, R. Niessner, M. Elsner, M. Seidel, N. P. Ivleva, Surface-enhanced Raman spectroscopy of microorganisms: limitations and applicability on the single-cell level, *Analyst* **2019**, 144, 943-53.

- [140] A. Avetisyan, J. B. Jensen, T. Huser, Monitoring trehalose uptake and conversion by single bacteria using laser tweezers Raman spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 7264-70.
- [141] R. Stevenson, S. McAughtrie, L. Senior, R. J. Stokes, H. McGachy, L. Tetley, P. Nativo, J. M. Brewer, J. Alexander, K. Faulds, D. Graham, Analysis of intracellular enzyme activity by surface enhanced Raman scattering, *Analyst* **2013**, 138, 6331-6.
- [142] M. Strathmann, T. Griebe, H. C. Flemming, Artificial biofilm model – a useful tool for biofilm research, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, 54, 231-37.
- [143] B. Lorenz, C. Wichmann, S. Stockel, P. Rosch, J. Popp, Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria, *Trends in Microbiology* **2017**, 25, 413-24.
- [144] N. Gillmaier, E. Schunder, E. Kutzner, H. Tlapak, K. Rydzewski, V. Herrmann, M. Stammler, P. Lasch, W. Eisenreich, K. Heuner, Growth-related metabolism of the carbon storage poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, *Journal of Biological Chemistry* **2016**, 291, 6471-82.
- [145] Y. Moreno, L. Moreno-Mesonero, J. García-Hernández, DVC-FISH to identify potentially pathogenic *Legionella* inside free-living amoebae from water sources, *Environmental Research* **2019**, 176, 108521 (7 Seiten).
- [146] Y. C. Lin, E. Perevedentseva, C. L. Cheng, Raman spectroscopic study on the excystation process in a single unicellular organism amoeba (*Acanthamoeba polyphaga*), *Journal of Biomedical Optics* **2015**, 20, 51042 (8 Seiten).
- [147] D. Kusic, A. Ramoji, U. Neugebauer, P. Rosch, J. Popp, Raman spectroscopic characterization of packaged *L. pneumophila* strains expelled by *T. thermophila*, *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 2533-7.

## **7. Anhang**

## 7.1 Chemikalien

$^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose (Sigma-Aldrich, Deutschland)

$^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Agar-Agar, Kobe I (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland)

Ammoniumchlorid (Merck KGaA, Deutschland)

Borsäure (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Calciumchlorid (Merck, Deutschland)

Calciumcarbonat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

D-Glucose-Monohydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Deuteriumoxid (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Dinatriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Deutschland)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Deutschland)

Dinatriummolybdat-Dihydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat (Merck KGaA, Deutschland)

Eisen(III)-citrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Ethylendiamintetraacetat-Dihydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Hydroxylaminhydrochlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland)

Kaliumchlorid (Merck KGaA, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck KGaA, Deutschland)

Kupfersulfat-Pentahydrat (Merck KGaA, Deutschland)

Kupferchlorid-Dihydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

LB-Medium (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland)

Magnesiumsulfat (Merck KGaA, Deutschland)

Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck KGaA, Deutschland)

Mangan(II)-sulfat-Hydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Melamin-Formaldehyd-Harz-Partikel ( $\varnothing = 4,38 \pm 0,06 \mu\text{m}$ )

Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Deutschland)

## 7. Anhang

Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natriumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natriumselenit-Pentahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natriumwolframat-Dihydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Natronlauge 0,1 M (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland)  
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Polymethylmethacrylatpartikel ( $\varnothing = 3,02 \pm 0,07 \mu\text{m}$ )  
Polystyrolpartikel ( $\varnothing = 5,19 \pm 0,08 \mu\text{m}$ )  
PYNFH-Medium ATCC 327-X (LGC Standards GmbH, Deutschland)  
Salzsäure 37% (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Silbernitrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland)  
Spurenelementlösung A5 (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Tetrachlorogoldsäure-Trihydrat (Merck KGaA, Deutschland)  
Thiaminhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Zinksulfat-Heptahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Zinkchlorid (Sigma-Aldrich, Deutschland)

## 7.2 Mikroorganismen

*Bacillus subtilis*, DSM 1087 (DSMZ, Deutschland)  
*Escherichia coli* DSM 498, DSM 1116 (DSMZ, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Bellingham 1, ATCC 43111 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Dallas 1E, ATCC 33216 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Knoxville 1, ATCC 33153 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Lansing 3, ATCC 35251 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* OLDA, ATCC 43109 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Oxford 4032 E, ATCC 43110 (TU Dresden, Deutschland)  
*Legionella pneumophila* Philadelphia 1, ATCC 33152 (TU Dresden, Deutschland)

*Legionella pneumophila* Togus 1, ATCC 33154 (TU Dresden, Deutschland)

*Micrococcus luteus* DSM 20030 (DSMZ, Deutschland)

*Nitrospira inopinata* DSM 105286 (Universität Wien, Österreich)

*Nitrososphaera gargensis* DSM 103042 (Universität Wien, Österreich)

*Pseudomonas putida* ATCC 12633 (LGC Standards GmbH, Deutschland)

*Vermamoeba vermiformis* ATCC 50237 (LGC Standards GmbH, Deutschland)

### 7.3 Materialien

CaF<sub>2</sub>-Einkristall-Träger (CRYSTAL GmbH, Deutschland).

CELLSTAR-Zentrifugenröhrchen (Carl Roth, Deutschland)

Celluloseacetatspritzenfilter mit 0,2-µm-Poren (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Colilert-18-Test (IDEXX Europe B.V., Niederlande)

Drigalskispatel

Glaskapillare (0,1×1×50) mm<sup>3</sup> Stärke 70 µm (CM Scientific, Vereinigtes Königreich)

GVPC-Agarplatten (Merck Millipore, Deutschland)

Kulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> (Carl Roth, Deutschland)

Kulturröhrchen 50 ml (Carl Roth, Deutschland)

LIVE/DEAD BacLight-Test (Life Technologies GmbH, Deutschland)

Objektträger (76×26×1) mm<sup>3</sup> (Carl Roth, Deutschland)

Pipettenspitzen epT.I.P.S. (Eppendorf, Deutschland)

Polyethersulfonspritzenfilter mit 0,22-µm-Poren (Carl Roth, Deutschland)

Rotilabo-Reaktionsgefäße (Carl Roth, Deutschland)

### 7.4 Geräte

Durchflusszytometer CyFlow Cube 6 (Sysmex Partec GmbH, Deutschland)

Klimakammer HCP 108 (Mettler, Deutschland)

Laborwaage AT 261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Deutschland)

Raman-Mikroskop LabRAM HR800 System (Horiba Jobin Yvon, Frankreich)

## 7. Anhang

Rasterelektronenmikroskop Sigma 300 VP (Carl Zeiss AG, Deutschland)

Reinstwasseranlage Millipore Milli-Q Plus 185 (Merck Millipore, USA)

UV/VIS-Spektrometer SPECORD PLUS 250 (Analytik Jena AG, Deutschland)

Vortexmischer RS-VF1b (Phoenix Instrument GmbH, Deutschland)

Zentrifuge Universal 5804R (Eppendorf AG, Deutschland)

### **7.5 Software**

Labspec 6.4.3 (Horiba Jobin Yvon, Frankreich)

MATLAB R2016a (The MathWorks, USA)

Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA)

Origin 2017 (OriginLab Corporation, USA)

## 7.6 Abkürzungsverzeichnis

3DRM	Dreidimensionale Raman-Mikrospektroskopie
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop
AgNP	Silbernanopartikel
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>Arbitrary unit</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil
CLSM	Konfokalmikroskopie
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CRM	Konfokale Raman-Mikrospektroskopie
DESI	Desorptions-Elektrospray-Ionisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVC-FISH	<i>Direct viable count - fluorescence in situ hybridization</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESEM	Umwelt-Rasterelektronenmikroskopie
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
He-Ne	Helium-Neon
KBE	Koloniebildene Einheit
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LDPI	Laser-Desorption-Postionisierung
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MDA	<i>Multiple displacement amplification</i>

## 7. Anhang

MF	Melamin-Formaldehyd
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
<i>N. inopinata</i>	<i>Nitrospira inopinata</i>
<i>N. gargensis</i>	<i>Nitrososphaera gargensis</i>
NA	Numerische Apertur
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NanoSIMS	Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
OCT	Optische Kohärenztomographie
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PAS	Photoakustische Spektroskopie
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
RACE	<i>Raman-activated cell ejection</i>
RACS	<i>Raman-activated cell sorting</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RM	Raman-Mikrospektroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RS	Raman-Spektroskopie
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie
SIP	<i>Stable isotope probing</i>
SIRM	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
VBNC	<i>Viable but nonculturable</i>
<i>V. vermiformis</i>	<i>Vermamoeba vermiformis</i>