

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Tobias Senkbeil

aus Haan

Tag der mündlichen Prüfung:

25. Juli 2014

**Untersuchung der Klebstoffe mariner
Foulingorganismen mit synchrotronbasierten
Röntgenmethoden**

Gutachter: apl. Prof. Dr. Reiner Dahint

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

Kurzfassung

Die als *Biofouling* bezeichnete Besiedelung fester, von Wasser bedeckter, Oberflächen stellt in vielerlei Hinsicht ein großes Problem dar. Eine Möglichkeit, wirksame und dennoch umweltverträgliche Gegenstrategien zu entwickeln, besteht darin, die Funktionsweise der biologischen Klebstoffe zu verstehen, mithilfe derer die Foulingorganismen auf ihren Substraten adhäreren. Im Idealfall könnten ungiftige Substanzen mit der Adhäsion bzw. Kohäsion der Klebstoffe interferieren und so die Anhaftung verhindern.

Seepocken sind bedeutsame Foulingorganismen, welche mit verschiedenen Arten weltweit in allen Küstenbereichen zu finden sind. Ein entscheidender Schritt ihres Lebenszyklus stellt die permanente Adhäsion der motilen Cyprislarve dar, bevor diese die Metamorphose zur sessilen adulten Form durchläuft. Die Larve sekretiert dazu einen als Cypriszement bezeichneten Klebstoff. Die Analytik dieser Substanz wird unter anderem durch die geringe Materialmenge in Nanogramm-Bereich erschwert, welche von den Larven einmalig sekretiert wird. Aus diesem Grund ist über die Zusammensetzung des Cypriszements im Gegensatz zum Zement der adulten Seepocken bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde erstmals synchrotronbasierte μ -Röntgenfluoreszenzanalyse (μ -RFA) verwendet, um die Elementverteilungen in den Seepockenarten *Elminius modestus*, *Balanus amphitrite* und *Balanus improvisus* sowie deren Cyprislarven *in vivo* zu untersuchen. Die an der Synchrotronstrahlungsquelle ANKA durchgeführten Experimente lieferten erste Hinweise auf erhöhte Konzentrationen einiger Elemente im Cypriszement, allen voran Brom, deren Vorkommen bisher noch nicht beschrieben worden war. Um die Hinweise zu überprüfen, wurden anschließend mit der gleichen Methode Proben der von *B. amphitrite* und *B. improvisus* auf einem Kaptonsubstrat hinterlassenen Adhäsive *in situ* untersucht. Neben Brom wurden dabei auch noch weitere Elemente gefunden, deren Vorkommen in dieser Substanz bisher nicht bekannt war.

Motiviert durch diese Erfolge wurde die Anwendung der μ -RFA auf weitere Foulingorganismen getestet. Erste *In-vivo*-Messungen bei ANKA am Kalkröh-

renwurm *Ficopomatus enigmaticus* verliefen erfolgreich. Auch die vergleichsweise kleine marine Kieselalge *Navicula perminuta* konnte an der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III untersucht werden. Bislang war es jedoch noch nicht möglich, Fluoreszenzsignale der adhäsiven Sekretpuren zu detektieren, die die motile Alge auf Substraten hinterlässt. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die schwache Wechselwirkung der verwendeten harten Röntgenstrahlung mit dem sub- μm -dicken Probenmaterial zurückzuführen. Weiche Röntgenstrahlung zeigt eine deutlich stärkere Wechselwirkung. Um die Möglichkeiten zu untersuchen, die Photonen dieses Energiebereichs für eine Untersuchung mikroskopischer biologischer Proben bieten, wurde ptychographische Röntgenmikroskopie an der Synchrotronstrahlungsquelle BESSY II verwendet, um den Phasen- und Absorptionskontrast verschiedener Probentypen zu charakterisieren. Als Alternative zum Elementkontrast der RFA wurde dabei an einer Testprobe aus Mikrokugeln sowohl ptychographisch als auch mittels Vollfeldmikroskopie das Potential des NEXAFS-Kontrasts demonstriert, welcher in der Lage ist, chemische Bindungszustände zu differenzieren und somit prinzipiell geeignet erscheint, Einblicke in die Zusammensetzung biologischer Klebstoffe zu erhalten.

Abstract

Biofouling, the colonization of submerged surfaces is a great problem for various reasons. The development of efficient, yet environmentally safe counter strategies could be enabled by understanding the working mechanisms of the biological adhesives employed by the fouling organisms to attach to substrates. Ideally nontoxic substances could interfere with the adhesion or cohesion of the glue preventing the attachment.

Acorn barnacles are important fouling organisms. Various species are found in coastal regions all over the world. The permanent adhesion of their motile cypris larva before undergoing metamorphosis into the adult form is a crucial step in their lifecycle. In order to attach to the substrate, the larva secretes an adhesive called cyprid cement. The chemical analysis of this substance is mainly hindered by the minute amounts in the nanogram range that are secreted only once by the cypris larva. Due to this fact less is known of the composition of the cyprid cement compared to the cement secreted by adult barnacles.

In the course of this work synchrotron-based μ -X-ray fluorescence (μ -XRF) was used for the first time to determine the elemental distributions in barnacle species *Elminius modestus*, *Balanus amphitrite* and *Balanus improvisus* and cypris larva *in vivo*. Experiments performed at the synchrotron radiation source ANKA indicated elevated concentrations of various elements in the cyprid cement, among them bromine, which had not been described before. In order to verify the results *in situ* samples of the cyprid cement left on a Kapton substrate were analyzed using the same technique. The results confirmed the previously unknown presence of bromine and various metals in this substance.

Motivated by this success the application of μ -XRF to other fouling organisms was evaluated. First *in vivo* experiments at ANKA with the tube worm *Ficopomatus enigmaticus* proved successful. The comparably small marine diatom alga *Navicula perminuta* could be investigated at the synchrotron radiation source PETRA III. Up to now, however, it was impossible to detect fluorescence signals from the adhesive trails left by the motile alga on substrates. The probable reason for this is the weak interaction of hard X-rays with the

sub- μm thin sample material. Soft X-rays exhibit a much stronger interaction. In order to evaluate the potential of this spectral range for the investigation of microscopic biological samples, ptychographic soft X-ray microscopy was performed at the synchrotron radiation source BESSY II to determine the phase and absorption contrast of different types of samples. As an alternative to the elemental contrast provided by XRF, the potential of the NEXAFS contrast mechanism revealing chemical bonding states was demonstrated using ptychography as well as full field microscopy on a microsphere test sample. This contrast mode appears generally suited to provide insights into the composition of biological adhesives.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theorie und Methoden	3
2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden . . .	4
2.1.1. Röntgenfluoreszenz	4
Röntgenfluoreszenzanalyse	7
2.1.2. NEXAFS	8
2.1.3. Ptychographie	11
2.1.4. Vakuumstreuammer HORST	14
Driftproblematik bei der Ptychographie	15
Entwicklung eines optimierten Ptychographieaufbaus . .	17
2.1.5. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten	20
2.2. Marines Biofouling	22
2.2.1. Seepocken	23
Verwendete Arten	30
Präparation der Seepockenproben	32
2.2.2. Kalkröhrenwurm <i>Ficopomatus enigmaticus</i>	34
2.2.3. Diatomee <i>Navicula perminuta</i>	37
Präparation der Diatomeen-Proben	41
2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen	44
2.3.1. FLUO-Strahlrohr	44
Projektionseffekte bei nicht-konfokaler Messung	45
Konfokale Messungen	47
2.3.2. Strahlrohr P06	48
2.3.3. Auswertung der Fluoreszenzspektren	50

3. Ergebnisse und Diskussion	55
3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern	56
3.1.1. Nicht-konfokale <i>In-vivo</i> -Messungen an juvenilen Seepocken	56
Acht Tage alte Seepocken <i>Balanus improvisus</i>	56
Acht Tage alte Seepocken <i>Elminius modestus</i>	62
Quantitative Abschätzung	66
3.1.2. Konfokale <i>In-vivo</i> -Messungen an Seepockenlarven	68
Quantitative Abschätzung	71
3.1.3. <i>In-situ</i> -Messungen des Seepockenklebstoffs	74
<i>Balanus improvisus</i>	74
<i>Balanus amphitrite</i>	81
Vergleich der Spezies und Diskussion	83
Quantitative Abschätzung	86
3.1.4. Diskussion der Elementverteilungen in Seepocken	87
3.1.5. <i>In-vivo</i> -RFA-Messungen an <i>Ficopomatus enigmaticus</i>	90
Quantitative Abschätzung	92
3.1.6. RFA-Messungen an Diatomeen	93
3.1.7. Quantitative Abschätzung und Diskussion	95
Motivation zur Verwendung weicher Röntgenstrahlung	100
3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung	102
3.2.1. Kontrast biologischer Proben	103
Glatte Gefäßmuskelzellen	103
Dünnschnitt von Hefezellen	107
Dünnschnitt arsenassimilierender Bakterien	110
Freistehende Biphenylthiol-Monoschicht	111
Gewebedünnschnitte von Mäusen	114
Diskussion	114
3.2.2. NEXAFS-Kontrast an der Kohlenstoffkante	116
PMMA-PS-Testproben	116
3.3. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten	123
3.3.1. Abbildungsordnungen	123
3.3.2. Chemischer Kontrast an der Kohlenstoffkante	124

3.3.3. Diskussion und Vergleich mit Ptychographie	126
4. Zusammenfassung und Ausblick	129
A. Anhang	135
A.1. Publikationen	135
A.2. Abkürzungen zur Bezeichnung der Cyprisanatomie	136

1. Einleitung

Die Besiedelung von Wasser bedeckter Oberflächen durch sogenannte Foulingorganismen verursacht große ökonomische und ökologische Schäden. Um wirksame Strategien zur Vermeidung dieser Besiedelung entwickeln zu können, ist es zunächst nötig, die Zusammensetzung und Funktionsweise der daran beteiligten biologischen Klebstoffe zu verstehen. In dieser Arbeit wurde synchrotronbasierte μ -Röntgenfluoreszenzanalyse (μ -RFA) verwendet, um die elementare Zusammensetzung solch biologischer Klebstoffe zu ermitteln. Die Röntgenfluoreszenzanalyse ist eine hochempfindliche und zerstörungsfreie Methode der Multielementanalytik. Während diese Methode sich bereits in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts als ausgereifte Methode zur Untersuchung von geologischen und materialwissenschaftlichen Proben etablieren konnte, ermöglichte erst die technologische Weiterentwicklung der letzten Jahrzehnte auch biologische Anwendungen. Insbesondere die zunehmende Verfügbarkeit von Synchrotronstrahlungsquellen, welche einen Röntgenstrahl mit hohem Photonenfluss und gleichzeitig guter Fokussierbarkeit zur Verfügung stellen, führten zur Weiterentwicklung der RFA zu einer elementsensitiven Mikroskopiemethode, mit der auch kleinste Organismen untersucht werden können. Die Methode wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, den Klebstoff zu untersuchen, den die motilen Cyprislarven der Seepocke verwenden, um sich vor der Metamorphose zur adulten Form permanent auf einem Substrat anzuheften. Zusätzlich zu den Experimenten mit Seepocken wurde auch die Anwendung der μ -RFA auf einen Kalkröhrenwurm und eine Kieselalge als weitere Beispiele für Foulingorganismen getestet. Da die Methode bei der Untersuchung der adhäsiven Sekrete der Kieselalge an ihre Grenzen stieß, wurden die Möglichkeiten untersucht, die die Mikroskopie mit weicher Röntgenstrahlung in dieser Fragestellung bieten

1. Einleitung

kann.

In Kapitel 2.1 werden zunächst die synchrotronbasierten Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Anschließend werden die untersuchten Foulingorganismen (Kap. 2.2) und die mit ihnen durchgeführten Experimente (Kap. 2.3) beschrieben. In Kapitel 3.1 werden die Ergebnisse dieser μ -RFA-Messungen diskutiert. In den Kapiteln 3.2 und 3.3 werden die Möglichkeiten aufgezeigt, die der Einsatz weicher Röntgenstrahlung zur Untersuchung von mikroskopischen biologischen Proben bietet. Kapitel 4 fasst schließlich die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick auf mögliche Fortführungen.

2. Theorie und Methoden

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

2.1.1. Röntgenfluoreszenz

Trifft elektromagnetische Strahlung auf Materie, so sind in Abhängigkeit von der Photonenenergie $E = h \cdot \nu = h \cdot c\lambda^{-1}$ verschiedene Wechselwirkungsprozesse möglich. Dabei bezeichnet ν die Frequenz und λ die Wellenlänge der Strahlung, h ist das Plancksche Wirkungsquantum und c die Vakuumlichtgeschwindigkeit. Für Photonen im Energiebereich der Röntgenstrahlung von ca. 50 eV bis zu ca. 100 keV dominiert der Photoeffekt die Wechselwirkung. Ist die Energie eines Photons $h\nu$ größer als die Bindungsenergie E_B eines Elektrons in einer Atomhülle, so kann das Photon unter Emission des Elektrons absorbiert werden. Die Energiedifferenz geht in die kinetische Energie des Elektrons ein: $E_{kin} = h\nu - E_B$. Das Atom wird dabei ionisiert. Dieser energetische ungünstige Zustand führt alsbald zu einer Relaxation. Die dabei möglichen Prozesse können im Schalenmodell des Atoms erklärt werden und sind in Abb. 2.1 schematisch für ein Atom mit den Schalen K, L, M und N dargestellt.

Wurde durch Absorption eines Photons ein Elektron aus einer inneren Schale entfernt, so wird die entstandene Leerstelle durch Aufrücken eines Elektron einer weiter außen liegenden Schale aufgefüllt. Die dabei freiwerdende Energie kann nun wieder vollständig in Form eines Photons abgestrahlt werden, was als Röntgenfluoreszenz bezeichnet wird. Für die möglichen Übergänge, die zur Emission von Fluoreszenzphotonen führen, werden die folgenden Bezeichnungen verwendet: K_α bezeichnet beispielsweise den Übergang eines Elektrons der L-Schale in eine Leerstelle der K-Schale, K_{β_1} den Übergang von der M-Schale in die K-Schale und K_{β_2} von den von der N-Schale in die K-Schale. Alle Übergänge, die nach Entfernen eines Elektrons aus der K-Schale auftreten können, werden zusammengefasst als K-Serie bezeichnet. Die L-Serie bezeichnet demnach alle Übergänge, die eine Leerstelle in der L-Schale auffüllen usw. Die Bezeichnung der einzelnen Linien einer Serie mit griechischen Buchstaben α , β , γ ,... als Index ist historisch bedingt und wurde gemäß der Intensität der

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

Fluoreszenzlinien vergeben. Mit α wird also die intensivste Linie eines Röntgenfluoreszenzspektrums bezeichnet. Der Subindex wird verwendet, um die am Übergang beteiligten Unterschalen zu unterscheiden. So bezeichnet K_{α_1} den Übergang $2p_{3/2} \rightarrow 1s$ und K_{α_2} den Übergang $2p_{1/2} \rightarrow 1s$.

Die beim Auffüllen einer Leerstelle freiwerdende Energie kann jedoch nicht nur in Form eines Photons abgestrahlt werden. Stattdessen kann sie auch zur Emission eines aus einer äußeren Schale führen. Das wird als Auger-Effekt bezeichnet, das dabei emittierte Elektron als Auger-Elektron. Dieser Prozess konkurriert mit der Röntgenfluoreszenz. Um die relative Häufigkeiten der beiden Prozesse zu quantifizieren, definiert man die Fluoreszenzausbeute als das Verhältnis der emittierten Fluoreszenzphotonen und der Anzahl der erzeugten Leerstellen. Die Fluoreszenzausbeute ist sowohl von der Elektronenkonfiguration als auch von der Wellenlänge der anregenden Strahlung abhängig. Für schwere Elemente liegt sie im Bereich von 70 % bis 90 %, für leichte sinkt sie bis auf 2 % bis 4 % Prozent ab.

Die Energie eines Fluoreszenzphotons ergibt sich als die Differenz der Bindungsenergien des bei der Ionisation entfernten Elektrons und der Bindungsenergie des Elektrons der weiter außen liegenden Schale, dass dessen Platz einnimmt. Dabei hat sich folgende Nomenklatur mit den Bindungsenergien der Elektronen in den jeweiligen Schalen E_K , E_L , E_M , E_N, \dots bzw. Unterschalen $E_{L_{I,II,III}}$, $E_{M_{II,III,IV,V}}$, $E_{N_{II,III,V}}$ etabliert:

$$\begin{aligned}
 E_{K\alpha_{1,2}} &= E_K - E_{L_{III,II}} \\
 E_{K\beta_{1,3}} &= E_K - E_{M_{III,II}} \\
 E_{K\beta_2} &= E_K - E_{N_{II,III}} \\
 E_{L\alpha_{1,2}} &= E_{L_{III}} - E_{M_{V,IV}} \\
 E_{L\beta_{1,3}} &= E_{L_{II,I}} - E_{M_{IV,III}} \\
 E_{L\beta_2} &= E_{L_{III}} - E_{N_V}
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

Abbildung 2.2 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des Röntgenfluoreszenzspektrums von Kupfer sowie ein Schema der elektronischen Übergänge, die

2. Theorie und Methoden

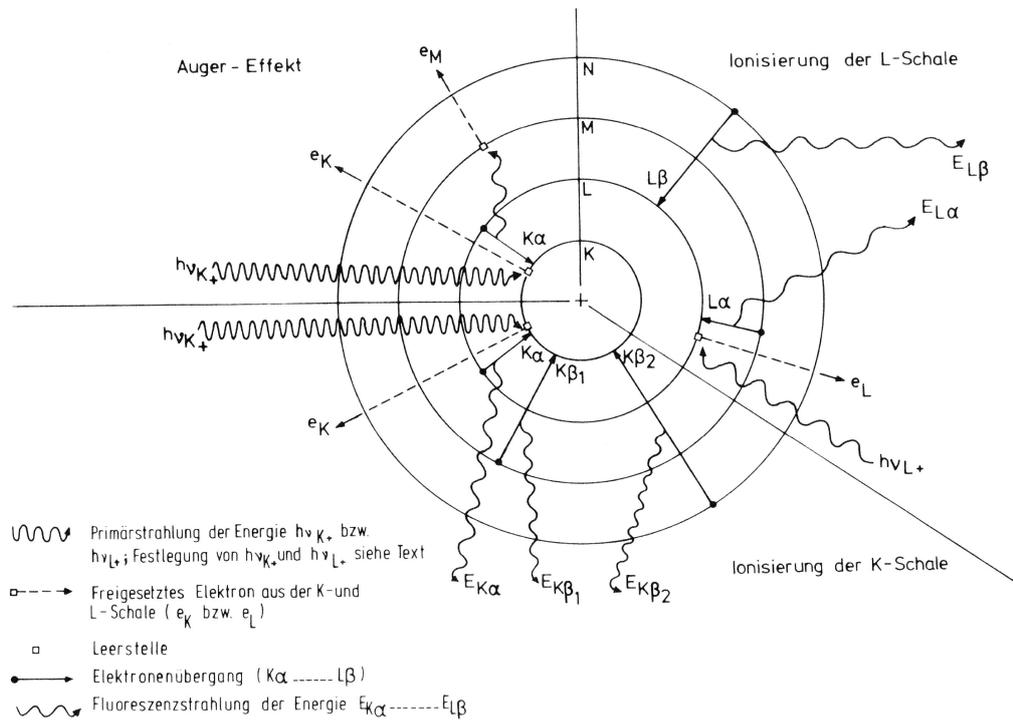


Abbildung 2.1.: Prinzip der Anregung von Röntgenfluoreszenzstrahlung. Aus [Hahn-Weinheimer u. a., 1995].

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

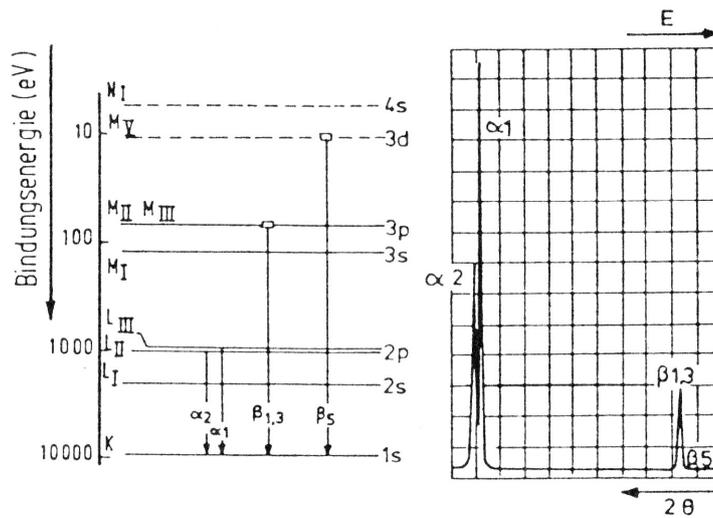


Abbildung 2.2.: K-Serie des Röntgenfluoreszenzspektrums von Kupfer und Schema der elektronischen Übergänge, die die jeweiligen Fluoreszenzlinien hervorrufen. Aus [Hahn-Weinheimer u. a., 1995].

die Linien der K-Serie hervorrufen. Üblicherweise werden die Röntgenfluoreszenzlinien in der Siegbahnnotation mit einer Kombination aus Element- und Liniensymbol bezeichnet. Hier sind also die Linien CuK_{α_1} , CuK_{α_2} , $\text{CuK}_{\beta_{1,3}}$ sowie CuK_{β_5} dargestellt. Ist es apparativ nicht möglich, im Spektrum eng benachbarte Linien wie beispielsweise AuK_{α_1} und AuK_{α_2} aufzulösen, so werden diese ohne Verwendung des Subindex zusammengefasst als AuK_{α} bezeichnet.

Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Energien der Fluoreszenzlinien sind für alle Elemente mindestens bis zur Ordnungszahl 103 tabelliert [Kay, 1995], sodass durch Analyse eines Röntgenfluoreszenzspektrums die elementare Zusammensetzung einer Probe bestimmt werden kann. Abbildung 2.3 zeigt ein Beispiel eines Röntgenfluoreszenzspektrums, das mithilfe eines kommerziellen Röntgenfluoreszenzspektrometers aufgenommen wurde. Eine Quantifizierung ist vor allem für homogene Proben möglich, weshalb das Probenmaterial oft in Form von homogenisierten Pulver- oder Schmelztabletten aufbereitet wird. Dabei müssen die Wirkungsquerschnitte der Ionisation, die Fluoreszenzausbeute sowie die Absorption der

2. Theorie und Methoden

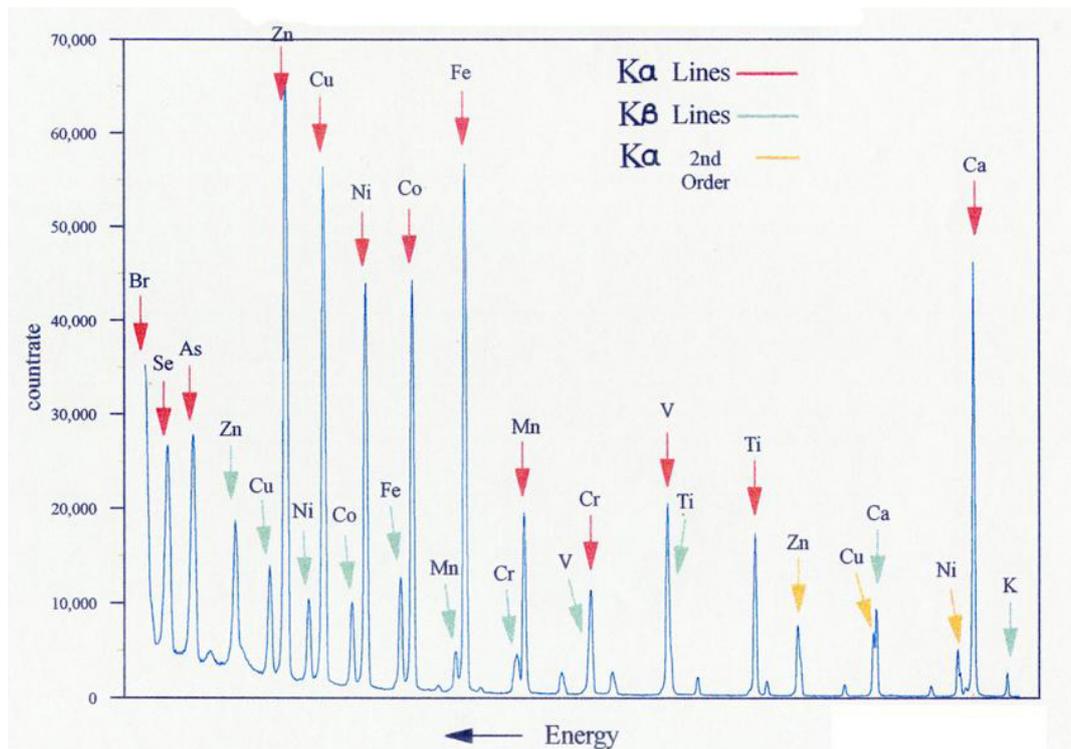


Abbildung 2.3.: Röntgenfluoreszenzspektrums einer Testprobe. Das Spektrum wurde mit einem kommerziellen Röntgenfluoreszenzspektrometer (Siemens MRS404) aufgenommen. Aufgetragen ist die Zählrate des Detektors gegen die Photonenenergie. Rote Pfeile markieren $K\alpha$ -Linien, blaue Pfeile $K\beta$ -Linien.

Fluoreszenzstrahlung auf der gesamten Strecke bis zum Detektor berücksichtigt werden. Die dafür benötigten Parameter liegen ebenfalls tabelliert vor [Thompson, 2009; Henke u. a., 1993].

2.1.2. NEXAFS

Neben der Röntgenfluoreszenzanalyse gibt es noch weitere röntgenbasierte Spektroskopiemethoden. Als NEXAFS (engl. *near-edge x-ray absorption fine structure*) oder auch XANES (engl. *x-ray absorption near-edge structure spectroscopy*) wird eine Absorptionsspektroskopiemethode bezeichnet, die mit hoher Energieauflösung Feinstruktureffekte in der unmittelbaren Umgebung

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

(bis zu einige 10 eV) einer Röntgenabsorptionskante untersucht. Bestimmt wird dabei der lineare Absorptionskoeffizient μ_{lin} in Abhängigkeit von der Photonenenergie, welcher gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$I(x) = I_0 \exp(-\mu\rho x) = I_0 \exp(-\mu_{lin}x) \quad (2.2)$$

aus der Transmission der Probe bestimmt werden kann.

Die Untersuchung des weiteren Verlaufs des Absorptionsspektrums in größeren Abstand zu der Kante bezeichnet man als EXAFS (engl. *extended X-ray absorption fine structure*) oder auch SEXAFS (engl. *surface extended X-ray absorption fine structure*). Während die theoretische Beschreibung von EXAFS-Spektren bereits weit fortgeschritten ist, ist dies für NEXAFS-Spektren nicht der Fall [Stöhr, 1992], sodass bei der Analyse von NEXAFS-Spektren meist auf Referenzspektren bekannter Bindungszustände zurückgegriffen wird [Araki u. a., 2006].

In Abb. 2.4 sind ein EXAFS-Spektrum adsorbierten Sauerstoffs auf einer Kupferoberfläche (a) und ein NEXAFS-Spektrum von adsorbierten NO-Molekülen auf einer Nickeloberfläche dargestellt. Im EXAFS-Bereich schwankt der lineare Absorptionskoeffizient nur schwach als Funktion der Photonenenergie. Die Analyse dieser Modulationen lässt Rückschlüsse auf Anzahl, Art und Entfernung von benachbarten Atomen zu. Ein typisches Anwendungsbeispiel ist die Untersuchung des Komplexzentrums in einem Metalloprotein im Hinblick auf seine Liganden.

Im NEXAFS-Spektrum beobachtet man dagegen starke Fluktuationen im Bereich der Kante. Diese entsprechen hauptsächlich den intramolekularen Übergängen eines 1s-Elektrons in σ - und π -Orbitale. NEXAFS ist also sensitiv für die unbesetzten Elektronenzustände. Man kann mit dieser Methode die chemischen Bindungszustände des Elements bestimmen, dessen K-Absorptionskante man untersucht.

Zur Messung eines NEXAFS-Spektrums wird monochromatische Röntgenstrahlung verwendet, um die benötigte hohe Energieauflösung zu erreichen. Dabei kann die Transmission direkt gemessen werden, wenn die Transmission

2. Theorie und Methoden

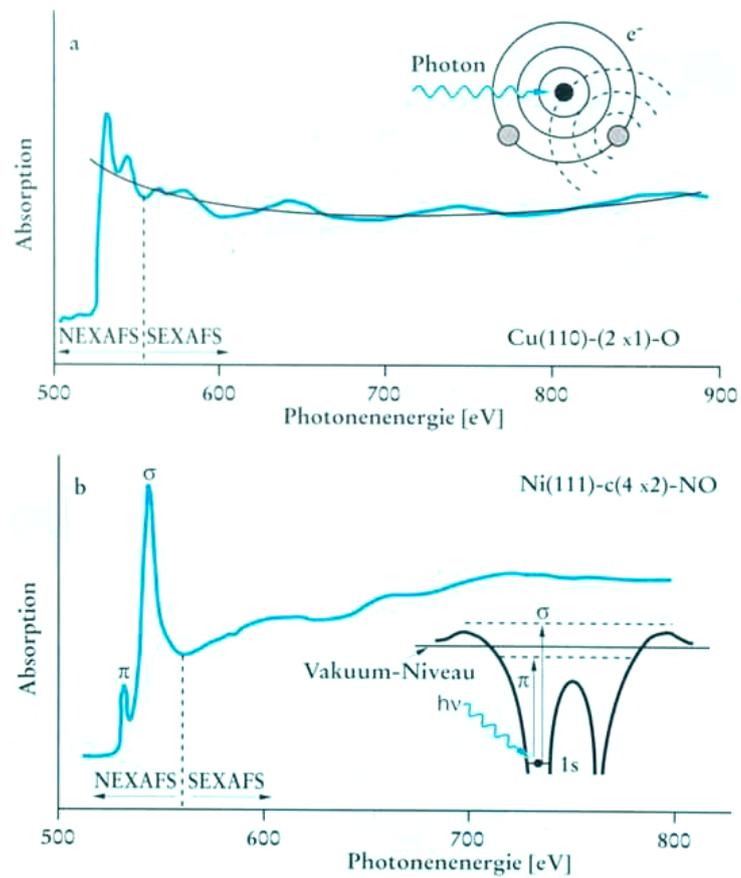


Abbildung 2.4.: EXAFS- (a) und NEXAFS-Spektrum (b) an der K-Kante von Sauerstoff. Während die Modulationen im EXAFS-Spektren von Interferenzeffekten zwischen benachbarten Atomen herrühren, werden sie im NEXAFS-Bereich durch elektronische Übergänge innerhalb eines Atoms verursacht. Abbildung übernommen aus [Haase, 1992].

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

der Probe dies zulässt. Ansonsten können auch die Fluoreszenzphotonen oder Auger-Elektronen analysiert werden, die als Reaktion auf die Anregung mittels Röntgenstrahlung freigesetzt werden. Die beiden letztgenannten Methoden sind universeller einzusetzen und erlauben beispielsweise auch NEXAFS-Messungen an Adsorbaten auf Metalloberflächen [Haase, 1992].

2.1.3. Ptychographie

Röntgenstrahlung lässt sich nicht bloß für spektroskopische Untersuchungen nutzen, sondern auch für verschiedene Mikroskopiemethoden einsetzen. Während die erreichbare Ortsauflösung von Rastermethoden durch die Fokusgröße des Röntgenstrahls bestimmt wird, ist bei Vollfeldmethoden die Fertigungstoleranz der Röntgenlinsen der limitierende Faktor. Linsenlose Mikroskopiemethoden, die auf der Diffraktion monochromatischer Röntgenstrahlung beruhen, sind erfordern entweder *a priori* Annahmen über die Probe oder sind hinsichtlich der maximalen Ausdehnung der Probe eingeschränkt. Es existiert mittlerweile jedoch eine Methode, die die Vorteile der verschiedenen Ansätze zur Röntgenmikroskopie vereint.

Als Ptychographie bezeichnet man eine Methode, die Diffraktionsmikroskopie mit einem Abrastern der Probe kombiniert. Die Idee geht zurück auf ein bereits 1969 von Hoppe entwickeltes Verfahren, um das kristallographische Phasenproblem in der diffraktiven Elektronenmikroskopie zu lösen [Hoppe, 1969a; Hoppe u. Strube, 1969; Hoppe, 1969b]. Verschiedene Aufnahmen der Streubilder bei bekannten lateralen Verschiebungen der Probe werden dabei verwendet, um die nicht direkt detektierbare Phaseninformation aus den redundanten Datensätzen zu bestimmen. Rodenburg und Faulkner griffen diese Idee auf und entwickelten daraus ein linsenloses Transmissionsmikroskopieverfahren, welches in der Lage ist, die komplexwertige Objektfunktion, welche die von der Probe verursachte Absorption und Phasenverschiebung beschreibt, zu rekonstruieren [Faulkner u. Rodenburg, 2004; Rodenburg u. Faulkner, 2004]. Eine erhebliche praktische Einschränkung bestand jedoch darin, dass eine genaue Kenntnis der Beleuchtungsfunktion nötig ist, mit welcher die Probe abgerastert

2. Theorie und Methoden

wird. Dieses Problem wurde gelöst, als es gelang, mithilfe eines iterativen Algorithmus sowohl die komplexwertige Objektfunktion $O(\mathbf{r})$ als auch die komplexwertige Beleuchtungsfunktion $P(\mathbf{r})$ gleichzeitig aus einem psychographischen Datensatz zu rekonstruieren. Unter Verwendung von harter Röntgenstrahlung wurde dieses Verfahren erstmals von Thibault u. a. [2008] demonstriert.

Um bei dieser Methode gleichzeitig $O(\mathbf{r})$ und $P(\mathbf{r})$ zu bestimmen, kommt dabei ein *difference map* genannter Algorithmus zum Einsatz, der die Schnittmenge der Lösungen zweier Randbedingungen sucht: Die Überlappbedingung

$$\psi_j(\mathbf{r}) = O(\mathbf{r})P(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j) \quad (2.3)$$

formuliert, dass an jeder Rasterposition j die Wellenfront nach Passieren des Objektes $\psi_j(\mathbf{r})$ in Objekt- und konstante Beleuchtungsfunktion faktorisiert werden kann. \mathbf{R}_j bezeichnet dabei die laterale Verschiebung zwischen Objekt und Beleuchtung der j -ten Position.

Die Fourierbedingung

$$I_j(\mathbf{k}) = |\mathcal{F}[O(\mathbf{r})P(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j)]|^2 \quad (2.4)$$

fordert, dass die an den jeweiligen Positionen j mit einem zweidimensionalen Detektor im Fernfeld gemessenen Intensitäten $I_j(\mathbf{k})$ der Fouriertransformierten der Wellenfront hinter der Probe entsprechen. Dabei bezeichnet $\mathbf{k} = (k_x, k_y)$ einen zweidimensionalen Vektor im reziproken Raum und \mathcal{F} die Fouriertransformation.

Auf einem euklidischen Raum S mit $S \ni \Psi = (\psi_1, \psi_2, \psi_3, \dots, \psi_n)$ wird nun die Fourierprojektion

$$\Pi_F : \psi_j \rightarrow \psi_j^F = p_F(\psi_j) \quad (2.5)$$

definiert, welche die Phase der Fouriertransformation erhält, jedoch die transformierten Intensitäten durch die gemessenen ersetzt:

$$p_F(\psi) : \psi(\mathbf{k}) \rightarrow \psi^F(\mathbf{k}) = \sqrt{I(\mathbf{k})} \frac{\tilde{\psi}(\mathbf{k})}{|\tilde{\psi}(\mathbf{k})|} \quad (2.6)$$

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

Desweiteren wird noch die Überlappprojektion

$$\Pi_O : \psi_j \rightarrow \psi_O := \tilde{P}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j)\tilde{O}(\mathbf{r}) \quad (2.7)$$

definiert mit den Lösungen \hat{P} und \hat{O} des gekoppelten Gleichungssystems

$$\hat{O}(\mathbf{r}) = \frac{\sum_j \hat{P}^*(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j)\psi_j(\mathbf{r})}{\sum_j |\hat{P}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j)|^2} \quad (2.8)$$

$$\hat{P}(\mathbf{r}) = \frac{\sum_j \hat{O}^*(\mathbf{r} + \mathbf{R}_j)\psi_j(\mathbf{r} + \mathbf{R}_j)}{\sum_j |\hat{O}(\mathbf{r} + \mathbf{R}_j)|^2} \quad (2.9)$$

welche man als Minimum von

$$\|\Psi - \Psi^O\|^2 = \sum_j \sum_{\mathbf{r}} |\psi_j(\mathbf{r}) - \hat{P}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_j)\hat{O}(\mathbf{r})| \quad (2.10)$$

durch Nullsetzen der Ableitung erhält [Thibault u. a., 2009].

Zu Beginn der Rekonstruktion setzt man für die Beleuchtungsfunktion eine geschätzte Amplitudenverteilung und eine flache Phasenverteilung an. Die neue Iteration Ψ_{n+1} erhält man aus der vorherigen Ψ_n nach folgender Formel:

$$\Psi_{n+1} = \Psi_n + B(\Psi_n) - A(\Psi_n) \quad (2.11)$$

mit

$$A(\Psi_n) := \Pi_O(\Psi_n) \quad (2.12)$$

$$B(\Psi_n) := \Pi_F(2\Pi_O(\Psi_n) - \Psi_n) \quad (2.13)$$

Die Konvergenz des Algorithmus kann bei fortschreitender Iteration anhand des abnehmenden Fehlers $\epsilon_{n+1} = \|\Psi_{n+1} - \Psi_n\|$ kontrolliert werden. Hat dieser nach N_{it} Iterationen einen konstanten Wert angenommen, bestimmt man die Lösungen, indem man entweder A oder B ein letztes Mal auf die letzte Iteration $\Psi_{N_{it}}$ anwendet.

2.1.4. Vakuumstreuammer HORST

Alle Experimente mit weicher Röntgenstrahlung wurden in der Vakuumkammer HORST durchgeführt, welche im Rahmen einer früheren Doktorarbeit entwickelt worden war [Staier, 2009]. Wie bereits am Namen HORST (**H**olographische **R**öntgenstreuammer) zu erkennen, war der ursprüngliche Verwendungszweck die In-line-Holographie mit weicher Röntgenstrahlung. Die Kammer ist mit einem Innenvolumen von $75\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 100\text{ cm}$ (Breite \times Höhe \times Länge) verglichen mit anderen an Synchrotronquellen verwendeten Experimentkammern sehr geräumig. Die Auslegung als thermisch stabilisierter optischer Tisch im Vakuum (Abb. 2.5) erlaubt es, den Aufbau für verschiedene Experimente und Methoden anzupassen. Einzelne Komponenten wie der Probenhalter und der Detektor können mit mechanischen Verfahrtschienen mit langem Verfahrweg auch im evakuierten Zustand bewegt werden.



Abbildung 2.5.: Blick ins Innere der Vakuumkammer HORST. Der Boden der Kammer ist ein optischer Tisch, der es erlaubt, die Geometrie des Experimentaufbaus unterschiedlichen Experimenten anzupassen. Dank motorisierter Verfahrtschienen ist es möglich, die verschiedenen Komponenten auch im evakuierten Zustand zu bewegen und so beispielsweise den Abstand und die Ausrichtung des Detektors zu verändern.

Driftproblematik bei der Ptychographie

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tim Salditt (Institut für Röntgenphysik, Universität Göttingen) wurde mit der Kammer erstmals Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung demonstriert [Giewekemeyer u. a., 2011]. Bei diesen Messungen kam ein Aufbau zum Einsatz, bei dem die Probe und die Lochblende, welche die Beleuchtung definiert, auf zwei verschiedenen Verfahrtschienen montiert wurden. Bei der anschließenden Analyse der ptychographischen Datensätze stellte sich heraus, dass diese zum Teil stark durch mechanische Drift zwischen Lochblende und Probe beeinträchtigt wurden. Die Anfälligkeit für Drift erklärt sich durch die langen Aufnahmedauern, welche beim Abrastern ausgedehnter Proben mehrere Stunden erreichen können.

Abb. 2.6(a) zeigt die Beeinträchtigung der Rekonstruktion am Beispiel eines Siemenssterns. Wir konnten ein Verfahren entwickeln, diese Drift nachträglich zu korrigieren [Beckers u. a., 2013]. Die Driftkorrektur basiert auf der Annahme einer mit der Zeit linearen Drift in x - und y -Richtung. Eine eventuelle Drift in Strahlrichtung beeinträchtigt die Rekonstruktion aufgrund der geringen Divergenz der Wellenfront nach Passieren der Lochblende nur unwesentlich und bleibt deshalb unberücksichtigt.

Die Driftgeschwindigkeit in den beiden lateralen Richtungen wird als unabhängig und zeitlich konstant angenommen. Mit $\delta_{\text{lin},x}$ und $\delta_{\text{lin},y}$ wird dabei die inkrementelle Drift zwischen zwei Positionen des Rasters beschrieben. Durch Variation dieser beiden linearen Koeffizienten wird ein zweidimensionaler Raum aufgespannt. Für in einem vorgegebenen Intervall zufällig verteilte Wertepaare der linearen Driftgeschwindigkeiten wird nun jeweils eine Positionskorrektur des driftbehafteten Datensatzes durchgeführt und der so veränderte Datensatz mit ansonsten identischen Parametern rekonstruiert. Nach einer festen Anzahl an Iterationen wird der Parameter

$$\chi = \sqrt{\sum (|\Psi_i| - I_{\text{exp},i})^2} \quad (2.14)$$

ausgewertet, der ein Maß für die Abweichung zwischen dem letzten rekonstruierten Ψ_i und dem tatsächlich gemessenen Detektorbild $I_{\text{exp},i}$, und somit für

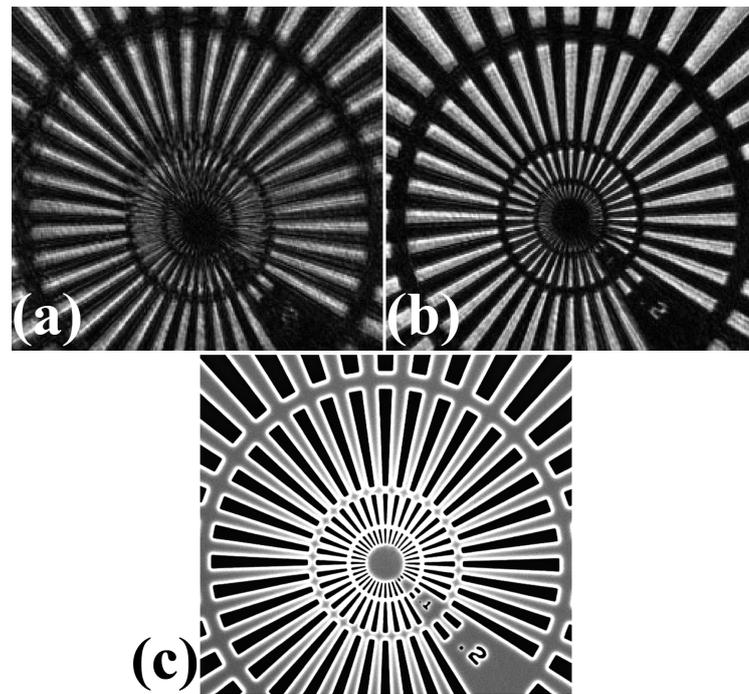


Abbildung 2.6.: Driftkorrektur in einer ptychographischen Aufnahme eines Siemenssterns. Die Qualität der von mechanischem Drift zwischen Lochblende und Probe beeinträchtigten Rekonstruktion (a) kann durch nachträgliche Korrektur der nominalen Positionen deutlich verbessert werden (b). Zum Vergleich wird eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Probe gezeigt (c). Die Linien im innersten Ring haben eine minimale Breite von 50 nm. Aus [Beckers u. a., 2013].

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

die Güte der Rekonstruktion, darstellt. Trägt man nun χ gegen $\delta_{\text{lin},y}$ und $\delta_{\text{lin},x}$ auf, so erkennt man ein Minimum für χ (Abb. 2.7).

Verwendet man die Driftkoeffizienten diese Minimums, um die finale Rekonstruktion des Datensatzes durchzuführen, so erkennt man eine deutliche Verbesserung der Auflösung und eine Beseitigung der zuvor bemerkbaren geometrischen Verzerrung (Abb. 2.6(b)). Wie ein Vergleich mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 2.6(c)) zeigt, können nun auch die innersten Linien mit einer minimalen Breite von 50 nm aufgelöst werden.

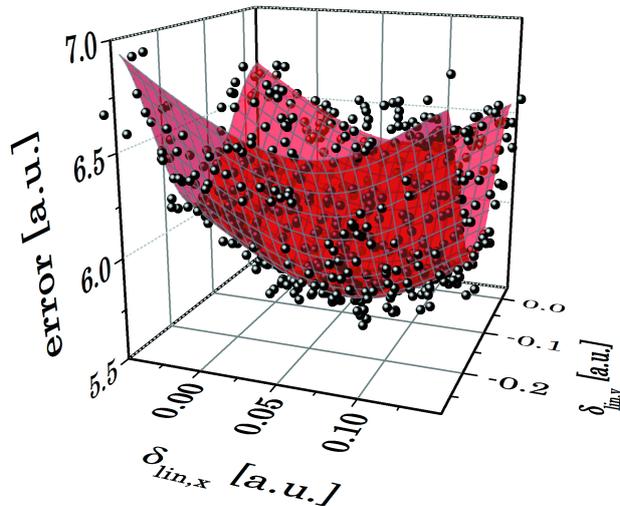


Abbildung 2.7.: Darstellung des Rekonstruktionsfehlers χ für 567 verschiedene, zufällig verteilte Driftkoeffizientenpaare. Die rote Fläche stellt einen zweidimensionalen Polynomfit zur Bestimmung des optimalen Wertepaares der linearen Driftkoeffizienten $\delta_{\text{lin},x}$ und $\delta_{\text{lin},y}$ dar. Aus [Beckers u. a., 2013].

Entwicklung eines optimierten Ptychographieaufbaus

Wenngleich dieser Ansatz geeignet ist, die mechanische Drift nachträglich zu korrigieren, so ist es doch erstrebenswert, diese bereits im Vorfeld durch eine Optimierung des Experiments zu vermeiden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Promotion ein neuer Aufbau speziell für die Ptychographie entwickelt und für alle in dieser Arbeit diskutierten ptychographischen Messungen genutzt.

2. Theorie und Methoden

Konstruktiver Ansatzpunkt zur Driftvermeidung war vor allem ein kompakter Aufbau, um lange mechanische Hebelarme zu vermeiden. Zusätzlich wurde für die Basisplatte, auf der die gesamte Einheit (Abb. 2.8) aufbaut, mit Invar ein spezieller Werkstoff ausgewählt. Invar ist eine Eisen-Nickel-Legierung mit sehr niedrigem Wärmeausdehnungskoeffizienten und ist geeignet, die auftretende thermische Drift weiter zu minimieren. Die Basisplatte (A) wird mithilfe von drei Verfahrtischen mit jeweils 150 mm Verfahrweg (M-505.3VG, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Palmbach) relativ zum Strahl positioniert. So kann entweder eine Spektroskopieprobe (D) für die Aufnahme von NEXAFS-Spektren oder aber eine von insgesamt fünf Lochblenden (B) für ptychographische Messungen in die Strahlachse gebracht werden. Der Probenhalter (C) ist dafür ausgelegt, eine Vielzahl an Proben auf quadratischen Siliziumnitridmembranen mit 5 mm Kantenlänge oder auf runden TEM-Netzchen (Transmissionselektronenmikroskopie-Netzchen) mit 3,05 mm Durchmesser aufzunehmen. Die Auswahl der Probe und die grobe Festlegung des zu untersuchenden Bereichs geschieht durch die Positionierung mittels dreier Verfahrtische (blau eingefärbt) mit einem Verfahrweg von 25 mm (M-112.1VG, PI). Zwei Piezostelltische (grün eingefärbt) mit einem maximalen Hub von 250 μm (P-622.ZCD und P-622.1CD, PI) werden verwendet, um die Probe für die ptychographischen Messungen abzurastern.

Die Ptychographieeinheit wurde mithilfe der 3D-Konstruktionssoftware Inventor 2011 (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) konstruiert und in der feinmechanischen Werkstatt des Physikalisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg gefertigt.

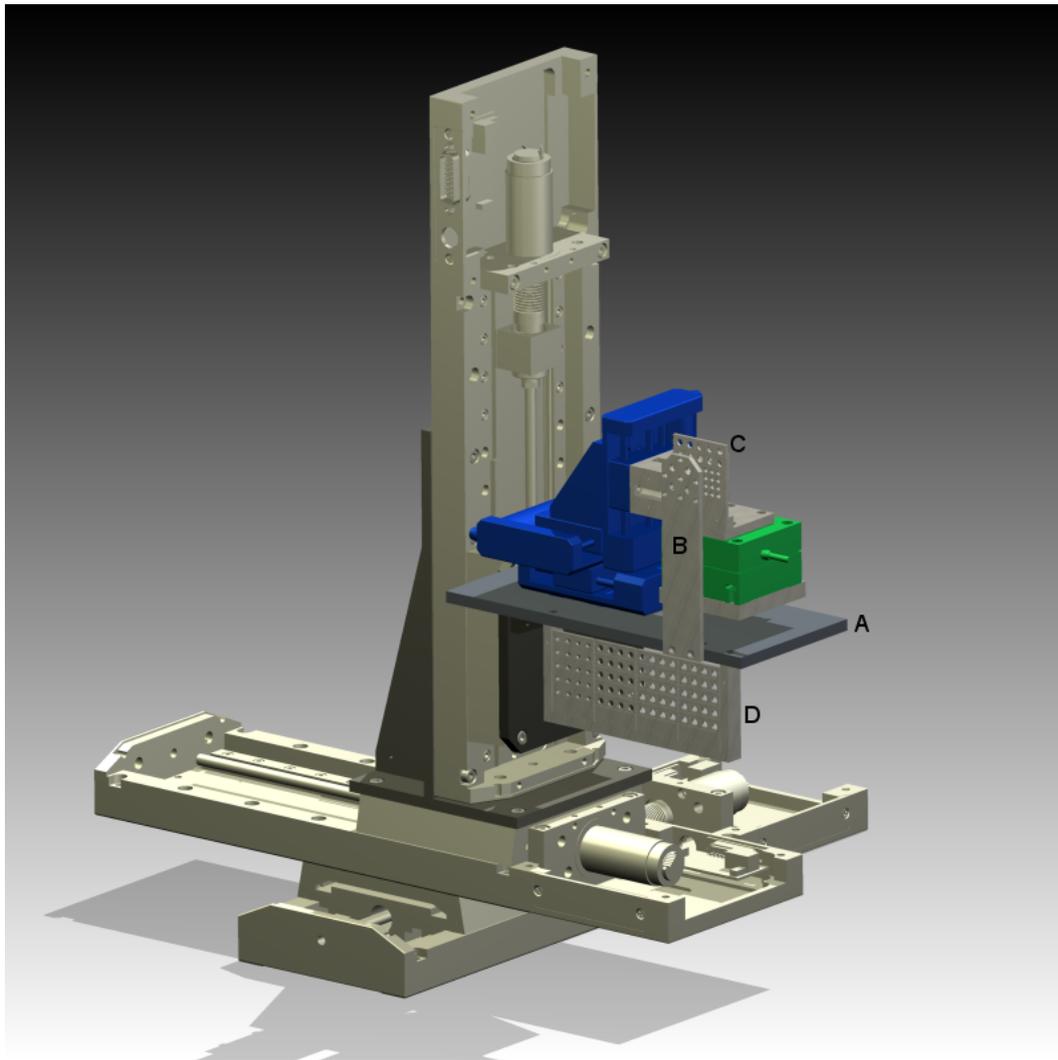


Abbildung 2.8.: Darstellung des optimierten Ptychographieaufbaus für HORST. Die ganze Einheit ist auf einer Basisplatte aus Invar (A) aufgebaut. Daran befestigt ist der Lochblendenhalter (B), welcher fünf verschiedene Lochblenden aufnehmen kann. Mithilfe von drei gestapelten mechanischen Verfahrtschienen mit kleinem Verfahrweg (blau eingefärbt) kann eine Probe auf dem Probenhalter (C) für eine Messung ausgewählt werden. Das zweidimensionale Abrastern des gewünschten Bereichs geschieht mithilfe von Piezostellplatten (grün eingefärbt). Unterhalb der Basisplatte kann ein Rahmen (D) insgesamt vier Probenhalter mit Spektroskopieproben aufnehmen.

2.1.5. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten

Neben der μ -RFA als Beispiel einer Rastermethode und der Ptychographie als Vertreter der Diffraktionsmikroskopie kam im Rahmen dieser Arbeit auch ein Vollfeldmikroskopieverfahren zum Einsatz. Bei der Vollfeldmikroskopie wird das möglichst gleichmäßig ausgeleuchtete Objekt analog zur optischen Mikroskopie mit einer Objektivlinse auf den Flächendetektor abgebildet. Aufgrund der starken Absorption ist es im Bereich weicher Röntgenstrahlung nicht möglich, refraktive Linsen zu verwenden. Stattdessen kommen diffraktive Linsen, sogenannte Fresnel-Zonenplatten zum Einsatz, die konstruktive Interferenz zur Fokussierung nutzen. Im einfachsten Fall ist eine Fresnel-Zonenplatte ein binäres Objekt konzentrischer Ringe, die abwechselnd transmittierend und absorbierend sind (Abb. 2.9).

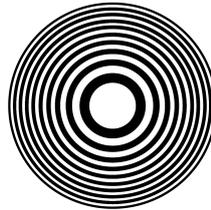


Abbildung 2.9.: Schema einer binären Fresnel-Zonenplatte.

Die Radien r_n der abwechselnd transmittierenden und absorbierenden Ringe sind gegeben durch die folgende Gleichung:

$$r_n = \sqrt{fn\lambda + \frac{n^2\lambda^2}{4}}. \quad (2.15)$$

Dabei steht λ für die Wellenlänge der verwendeten Strahlung, f für die Brennweite der Zonenplatte und n für die Abbildungsordnung. Unter Verwendung des Rayleigh-Kriteriums der Auflösung $\delta_R = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$ mit der numerischen Apertur NA ergibt sich die maximale Auflösung der Zonenplatte zu

$$\delta_R = 1,22\delta r_n. \quad (2.16)$$

Die Auflösung wird also allein durch die Breite der äußersten Zone r_N definiert

2.1. Röntgenbasierte Spektroskopie- und Mikroskopiemethoden

und ist von der verwendeten Wellenlänge unabhängig.

Der prinzipielle Aufbau eines Vollfeldmikroskops mit Zonenplatten ist in Abb. 2.10 gezeigt. Ein fokussierter Röntgenstrahl (A) beleuchtet die Probe (C). Dabei kann der ausgeleuchtete Bereich noch mithilfe einer Lochblende (B) zugeschnitten werden. Die transmittierten Photonen werden nun durch die Objektiv-Zonenplatte (D) auf den Flächendetektor (E) fokussiert und erzeugen dort ein vergrößertes Bild der Probe. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen dabei ausschließlich den Absorptionskontrast der Probe.

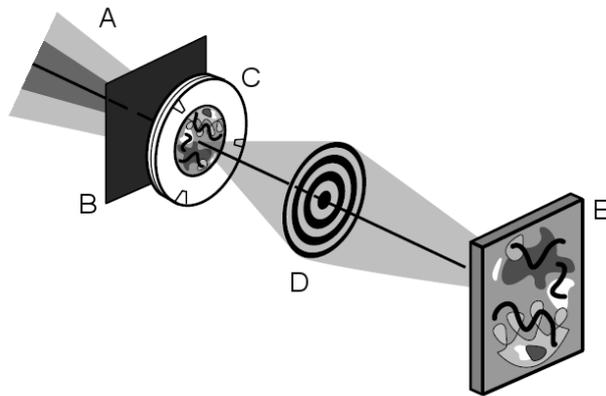


Abbildung 2.10.: Vollfeldmikroskop mit Objektiv-Zonenplatte. Der fokussierte Röntgenstrahl (A) wird gegebenenfalls mit einer Lochblende (B) zugeschnitten, um den gewünschten Bereich der Probe (C) auszuleuchten. Mit einer Fresnel-Zonenplatte (D) wird der ausgeleuchtete Bereich der Probe auf den Detektor (E) abgebildet. Modifiziert aus [Chao u. a., 2005].

Um eine möglichst hohe Photonenflussdichte auf der Probe zu erreichen, werden Fokussierspiegel, Kapillare oder Kondensor-Zonenplatten eingesetzt. Bei den Experimenten, die wir mit unserer Vakuumkammer HORST am Strahlrohr U49/2-PGM1 [Follath u. a., 2004] durchgeführt haben, wurden ausschließlich die Fokussierspiegel des Strahlrohrs genutzt.

2.2. Marines Biofouling

Als *Biofouling* bezeichnet man die Besiedelung von zeitweise oder ständig in Wasser getauchten Oberflächen durch verschiedenste Organismen, allgemein als Fouler bezeichnet. Häufig von Biofouling betroffen sind Hafenanlagen, Schiffsrümpfe, Kühlwassereinlässe von Kraftwerken oder auch Zuchtanlagen der Aquakultur.

Bei den am Biofouling beteiligten Organismen kann man zwischen Mikro-foulern wie z.B. Kieselalgen, Protozoen und Bakterien, welche ihr Substrat mit einem Biofilm überziehen und den Makrofoulern unterscheiden, die hauptsächlich aus mehrzelligen Algen, Muscheln, Röhrenwürmern, Seepocken und Entenmuscheln bestehen.

Das größte Problem stellt Biofouling für die Schifffahrt dar. Schiffsrümpfe müssen regelmäßig in arbeits- und zeitintensiven Verfahren von ihrem Bewuchs befreit werden. Unterlässt man diese kostspieligen Reinigungen, kann sich der Kraftstoffverbrauch eines Schiffes bereits durch die Ausbildung eines Biofilms erhöhen [Schultz u. Swain, 2000]. Unter Beteiligung von Makrofoulern fortgeschrittenes Biofouling kann aufgrund des zusätzlichen Gewichtes und des deutlich erhöhten Strömungswiderstandes den Verbrauch bei gegebener Geschwindigkeit fast verdoppeln [Schultz, 2007]. Der aktuelle jährliche Treibstoffverbrauch der weltweiten Flotte von geschätzt knapp 300 Millionen Tonnen [Corbett u. Koehler, 2003] verdeutlicht die ökonomischen Dimensionen, die der durch Biofouling bedingte Mehrverbrauch erreichen kann [Schultz u. a., 2011]. Zugleich hat dieser zusätzliche Treibstoffverbrauch auch erhebliche ökologische Folgen, da er zu einer erhöhten Emission von CO₂, Stickoxiden und Partikeln führt [Lack u. a., 2009].

Einen Ausweg stellt die Entwicklung von Anstrichen und Oberflächenbeschichtungen dar, die entweder den Bewuchs damit behandelte Oberflächen gänzlich verhindern, oder die Adhäsionsstärke der Fouler so weit herabsetzen, dass sie sich bereits durch die bei normaler Fahrt am Schiffsrumpf auftretenden Scherströmungen ablösen. Eine effektive Vermeidung des Bewuchses konnte bisher ausschließlich durch toxische Beschichtungen auf Basis von Tri-

butylzinnhydrid erreicht werden, dessen Akkumulation im Ökosystem [Clark u. a., 1988] jedoch katastrophale Auswirkungen hatte [Fent, 2013], weshalb sein Einsatz mittlerweile verboten worden ist [Champ, 2003].

Auf der Suche nach ökologisch unbedenklichen Alternativen kommt der Erforschung der von den Foulern eingesetzten Klebstoffen eine besondere Bedeutung zu. Eine Vielzahl unterschiedlichster Klebstoffsysteme wurde bereits identifiziert, deren genaue Zusammensetzung und Funktionsweise noch nicht vollständig bekannt sind [Smith u. Callow, 2007].

Ein umfassenderes Verständnis dieser biologischen Klebstoffe kann jedoch dazu beitragen, wirksame und gleichzeitig nicht-toxische Anstriche und Beschichtungen zu entwickeln, die gezielt mit deren Wirkungsweise interferieren. In dieser Arbeit wurde daher die elementare Zusammensetzung der biologischen Klebstoffe verschiedener Seepocken sowie des Röhrenwurms *Ficopomatus enigmaticus* als Beispiele für Makrofouler sowie die Kieselalge *Navicula perminuta* als Beispiel eines Mikro foulers mithilfe von synchrotronbasierter Röntgenfluoreszenzanalyse untersucht. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über die Spezies.

2.2.1. Seepocken

Seepocken gehören zur Gruppe der Makrofouler. Sie sind fast weltweit in den Gezeitengürteln der Meere und Ozeane auf jeglichem festen Substrat zu finden. Die sessilen Meeresbewohner wurden erst Mitte des 19. Jahrhunderts, nach Entdeckung ihrer motilen Naupliuslarven korrekt dem Stamm Crustacea (Krebstiere) zugeordnet. Eine grundlegende Beschreibung der zur Ordnung Cirripedia (Rankenfußkrebse) gehörigen Tiere erfolgte durch Charles Darwin bereits Mitte des 19. Jahrhunderts in seinen Schriften „A monograph on the subclass Cirripedia“ [Darwin, 1851, 1854]. Mittlerweile sind über 150 Arten bekannt [Luther, 1987]. Die adulte Form nutzt einen als Seepockenzement bezeichneten biologischen Klebstoff, um sich mit ihrer Basalplatte permanent mit dem Substrat zu verbinden.

Seepocken sind, vermutlich als Folge ihrer sessilen Lebensweise, Zwitter

2. Theorie und Methoden

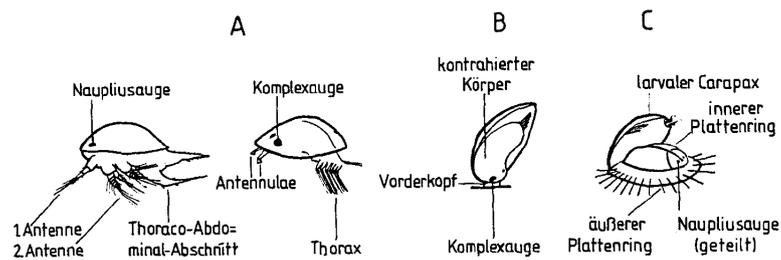


Abbildung 2.11.: Metamorphose der Balanoiden am Beispiel von *Balanus improvisus*. A die freischwimmenden Larvenstadien: Nauplius und Cypris; B die festgesetzte Cypris in Ruhestellung; C die junge Seepocke nach der Metamorphose. Abbildung verändert aus [Luther, 1987].

[Walley u. Rees, 1969]. Nach der gegenseitigen Kopulation wachsen aus den besamten Eizellen Naupliislarven heran (Abb. 2.11A). Diese verlassen die Mantelhöhle und bauen frei schwimmend ein Energiereservoir in Form von Ölkugeln auf. Nach insgesamt sechs Naupliusstadien entwickelt sich daraus die Cyprislarve, welche über zwei Antennulae verfügt, mit denen sie sich stelzenartig über Substrate fortbewegen und diese erkunden kann, bevor sie sich endgültig mithilfe eines Cypriszement genannten Klebers anheftet (Abb. 2.11B). Anschließend findet die Metamorphose zur adulten Form statt, infolgedessen die Carapax genannte Hülle der Larve abgestreift wird (Abb. 2.11C). Unmittelbar danach beginnt die Calcifizierung der Wandplatten [Walley u. Rees, 1969].

Der Cyprislarve kommt die entscheidende Aufgabe zu, einen geeigneten permanenten Standort für das gesamte Leben der adulten Seepocke auszuwählen. Neben physikalischen und chemischen Eigenschaften des Substrates [Bielecki u. a., 2009] lässt sich die Cyprislarve auch von der Nähe zu Artgenossen leiten [Clare u. Matsumura, 2000].

Ihre Anatomie ist für diese Aufgaben entsprechend angepasst (Abb. 2.12 und 2.13). Während der mitunter viele Tage andauernden Suche kann sie von ihrer Energiereserve in Form von Ölkugeln zehren [Holland u. Walker, 1975]. Geschützt wird sie währenddessen durch eine chitinöse Carapax [Holland u. Walker, 1975]. Die nur im Cyprisstadium ausgebildeten Komplexaugen sowie die Antennulae dienen der Orientierung und der Erkundung von Substraten. Ist ein geeigneter Standort gefunden, wird von den paarig angelegten Zement-

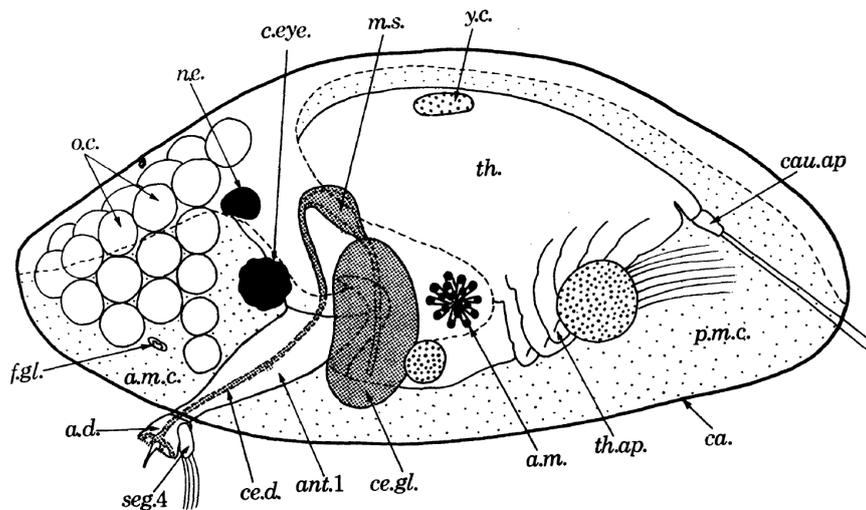


Abbildung 2.12.: Darstellung der wichtigsten anatomischen Strukturen der Cyprislarve: Ölkugeln (o.c.), Naupliusauge (n.e.), Komplexaugen (c.eye) und Antennulae (ant.1) mit Haftscheiben (a.d.) sowie Zementdrüsen (ce.gl.) und -gänge (ce.d.). Sämtliche zur Bezeichnung der Anatomie verwendeten Abkürzungen sind in Tab. A.1, S. 137 erläutert. Muskeln wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Aus Walley u. Rees [1969].

drüse durch den Zementgang der Cypriszeitung ausgestoßen und zementiert die Antennulae mit ihren Haftscheiben auf das Substrat [Okano u. a., 1996; Ödler u. a., 2006].

Abb. 2.14 illustriert die anatomischen Veränderungen der Cyprislarve nach der Siedelung und anschließender Metamorphose zur adulten Form. Der Verdauungstrakt der adulten Seepocke entwickelt sich ebenso wie die Rankenfüße aus bereits in Nauplius und Cypris angelegten Strukturen. Die Platten dagegen werden erst unmittelbar nach der Metamorphose zur adulten Form gebildet. Während die Wandplatten zunächst nur einen niedrigen basalen Ring bilden, werden die Platten des Operculums bereits deutlich größer angelegt [Walley u. Rees, 1969].

Das Gehäuse einer ausgewachsenen balanomorphen Seepocke ist schematisch in Abbildung 2.15 gezeigt. Je nach Art setzt sich dieses aus vier, sechs, oder acht Wandplatten [Palmer, 1982] und dem zweiteiligen Operculum, bestehend

2. Theorie und Methoden

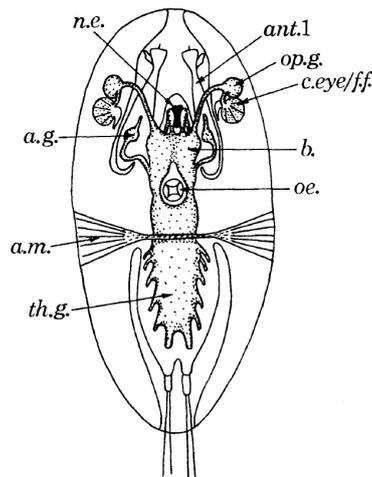


Abbildung 2.13.: Darstellung des zentralen Nervensystems der Cyprislarve im transversalen Schnitt. Man erkennt die paarig angelegten Antennulae (ant.1) und Komplexaugen (c. eye). Sämtliche verwendeten Abkürzungen sind in Tab. A.1, S. 137 erläutert. Modifiziert aus Walley u. Rees [1969].

aus Scutum und Tergum, zusammen. Mit diesem kann die Seepocke ihre Gehäuse verschließen, um sich vor Fressfeinden und Austrocknung zu schützen. Zur filtrierenden Nahrungsaufnahme werden die Cirri durch diese Öffnung ausgestreckt. Die Basalplatte ist nicht bei allen Arten kalzifiziert. Die als Paries bezeichneten Wandplatten überlappen sich gegenseitig. Der außenliegende Teil dieses Überlapps wird als Radius, der innenliegende Teil als Ala bezeichnet.

Abbildung 2.16 zeigt einen Querschnitt einer adulten balanomorphen Seepocke. Tergum und Scutum können mithilfe von Muskeln geöffnet werden, um die Cirri genannten Rankenfüße auszufahren. Rythmisches Schlagen der Cirri dient der filtrierenden Nahrungsaufnahme und sorgt gleichzeitig für eine ständige Durchspülung der Mantelhöhle.

Balanomorphe Seepocken verfügen über ein Gefäßsystem, durch das die Hämolymphe gepumpt wird [Burnett, 1977]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Vertretern der Krebstiere besitzen Seepocken jedoch weder eisenhaltiges Hämoglobin noch kupferhaltiges Hämocyanin [Waite u. Walter, 1988; Terwilliger u. Ryan, 2001]. Dieser Ansicht widerspricht lediglich eine einzige, mitt-

lerweile über 50 Jahre alte Publikation, die das Vorkommen von Hämoglobin in *Balanus perforatus* berichtet [Southward, 1963]. Die große Oberfläche der mit Epithel ausgekleideten Mantelhöhle ermöglicht die direkte Diffusion von Sauerstoff ins Gewebe und stellt eine ausreichende Versorgung des Gewebes sicher, wodurch der Einsatz eines Sauerstofftransporters in der Hämolymphe erübrigt wird [Waite u. Walter, 1988].

Der Zement der Seepocken ist aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften von großem Interesse: Er kombiniert gute Haftung auf einer Vielzahl von Substraten mit mechanischer Belastbarkeit, hoher chemischer Beständigkeit und der bemerkenswerten Fähigkeit, unter Wasser auszuhärten [Wiegemann, 2005; Kamino, 2006, 2013]. Das Streben nach tieferem Verständnis der Zementzusammensetzung und der dahinterstehenden chemischen Reaktionen und Mechanismen wird einerseits motiviert durch die Suche neuartiger Antifouling-Beschichtungen, die gezielt mit der Adhäsion der Seepocken interferieren; andererseits durch die Entwicklung biomimetischer Klebstoffe, die die Kombination diese bisher unerreichten Eigenschaften in einem synthetischen Klebstoff erreichen soll [Kamino, 2008].

In Rahmen dieser Arbeit wurden Proben der Seepockenarten *Balanus amphitrite*, *Balanus improvisus* und *Elminius modestus* untersucht, die im folgenden kurz vorgestellt werden. Alle drei Arten sind bedeutende Foulingorganismen. Entsprechend abweichender Anforderungen bezüglich der Wassertemperatur haben sie unterschiedliche Verbreitungsschwerpunkte, die von tropischen Gewässern bis an die Grenzen der warmgemäßigten Zone reichen. Die beiden zum Genus *Balanus* zugehörigen Arten wurden von Pitombo nach einer morphologischen Studie der Balaniden in die neu errichtete Familie *Amphibalanus* umgruppiert und entsprechend in *Amphibalanus amphitrite* und *Amphibalanus improvisus* umbenannt [Pitombo, 2004]. Diese Umgruppierung und die mit ihr verbundene Änderung der Nomenklatur können sich jedoch nur langsam durchsetzen und sind zudem umstritten [Clare u. Høeg, 2008; Carlton u. Newman, 2009]. Daher wurden in dieser Arbeit durchgehend die bisherigen Bezeichnungen verwendet.

2. Theorie und Methoden

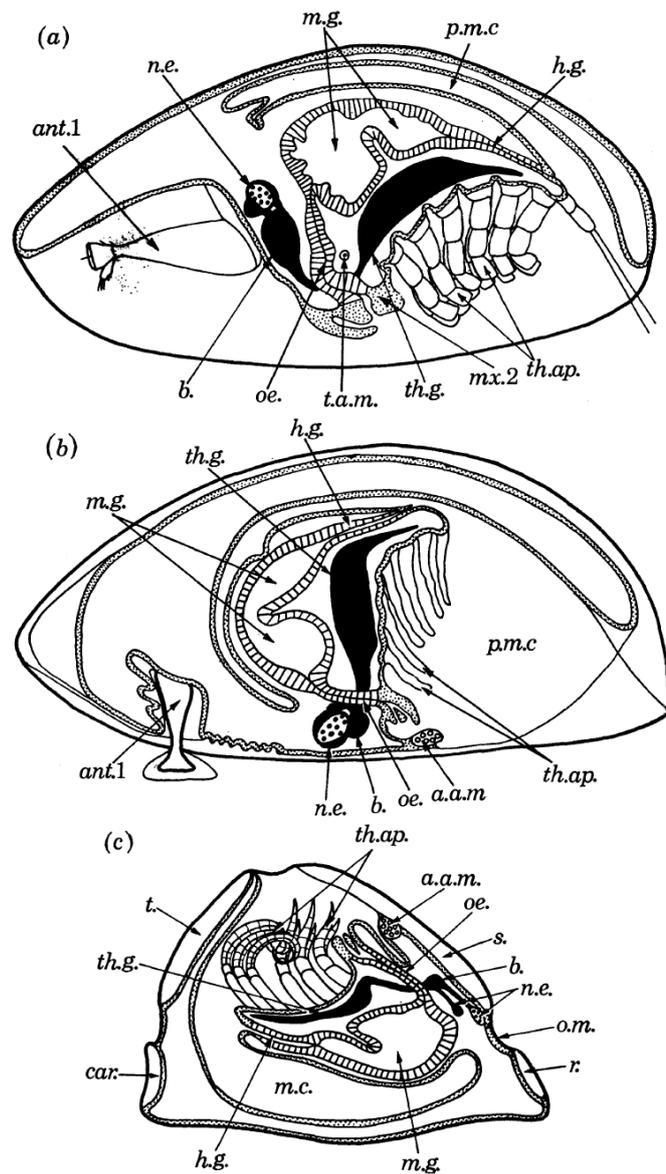


Abbildung 2.14.: Darstellung der anatomischen Veränderungen während der Metamorphose in Cyprislarve (a), gesiedelter Cyprislarve (b) und juveniler Seepocke (c). Man erkennt die Lageveränderungen von Antennulae (ant.1), Naupliusauge (n.e.), Ösophagus (oe.) und Verdauungstrakt bestehend aus Mitteldarm (m.g.) und Enddarm (h.g.). Nach der Metamorphose entwickeln sich die Rankenfüße (th.ap.) und die Platten von Operculum (Scutum (s.), Tergum (t.)) und Mauerkrone (Carina (car.) und Rostrum (r.)) werden angelegt. Sämtliche zur Bezeichnung der Anatomie verwendeten Abkürzungen sind in Tab. A.1, S. 137 erläutert. Modifiziert aus Walley u. Rees [1969].

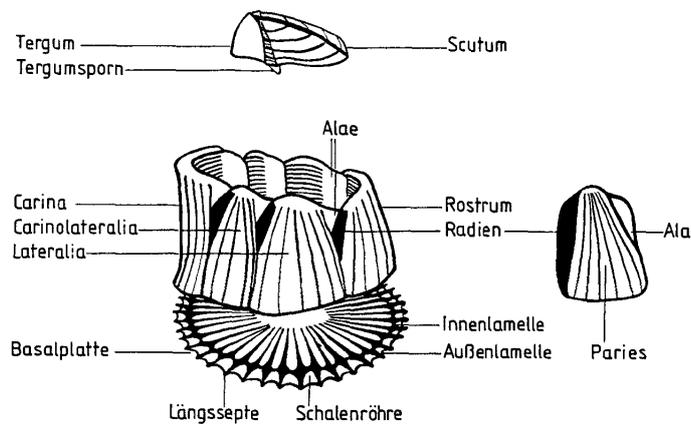


Abbildung 2.15.: Schema eines Balanidengehäuses. Oben ist das Operculum dargestellt, bestehend aus Scutum und Tergum. Darunter die von der Basalplatte abgehobene Mauerkrone, in diesem Fall aus sechs Wandplatten gebildet. Rechts ist eine einzelne Wandplatte (Paries) gezeigt. Die Alae der Wandplatten sind weiß gezeichnet, ihre Radien sowie die Längssepten der Basalplatte schwarz. Abbildung aus [Luther, 1987].

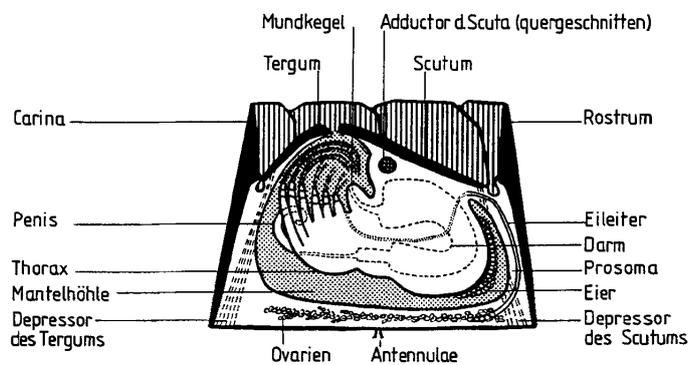


Abbildung 2.16.: Aufbau eines Balaniden (nach Darwin). Skelettelemente und der Vorderkopf sind in der Mittellinie geschnitten. Schnittflächen der Skelettplatten sind schwarz dargestellt, die Innenseite des Gehäuses schraffiert, die Mantelhöhle punktiert, die Organe im nicht geschnittenen Hinterkopf und Rumpf gestrichelt. Abbildung aus [Luther, 1987].

2. Theorie und Methoden

Verwendete Arten

Bei allen drei Arten, die im folgenden kurz vorgestellt werden, handelt es sich um Balaniden. Ihre Entwicklung von den freischwimmenden Naupliusstadien über die Cyprislarve bis zum adulten Tier entspricht der Beschreibung im vorherigen Kapitel. Auch der prinzipielle Aufbau ist identisch. Der markanteste Unterschied zwischen *Elminius modestus* und den *Balanus*-Arten *B. amphitrite* und *B. improvisus* besteht in der Form der Mauerkrone.

Balanus amphitrite

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet von *Balanus amphitrite* lässt sich kaum noch rekonstruieren, da die Art mittlerweile an fast allen Küsten der Tropen anzutreffen ist. In gemäßigten Breiten kann sich die Art nur dort dauerhaft ansiedeln, wo die Wassertemperaturen 12 °C nicht unterschreiten, also beispielsweise im Bereich von Kühlwasserauslässen von Kraftwerken. Das Temperaturoptimum liegt bei 23 °C [Cohen, 2011].

Die meist konische Mauerkrone besteht aus sechs glatten, weißen Wandplatten mit hellen violetten Streifen (Abb. 2.17). Die Radii verzüngen sich nach oben. Die Tiere erreichen üblicherweise einen basalen Durchmesser von 5,5 mm bis 15 mm [Fofonoff u. a., 2003]. Mit dem zweiteiligen Operculum kann die runde oder leicht gezahnte Öffnung der Mauerkrone verschlossen werden. Die Art tritt hauptsächlich in geschützten Küstenbereichen auf und besiedelt dort fast jegliches harte Substrat wie Hafenanlagen, Schiffsrümpfe oder auch Austern Aquakulturen. Dabei toleriert sie moderat schwankende Salinitäten. Aufgrund der Ähnlichkeit wird die Art oft mit *Balanus improvisus* verwechselt [Fofonoff u. a., 2003].

Balanus improvisus

Die Heimat von *Balanus improvisus* sind die Atlantik- und Golfküste Nordamerikas sowie die Atlantikküste Südamerikas. Mittlerweile hat sich die Seepocke jedoch auch entlang der amerikanischen Westküste, in Japan, im Mittelmeer sowie im Schwarzen und im Kaspischen Meer ausgebreitet [Fofonoff u. a., 2003]. Hauptsächlich findet man sie in Brackwasserbereichen von Flussmündungen. Die Art toleriert starke Schwankungen der Salinität und besiedelt eine Viel-



Abbildung 2.17.: Fotografie einer Kolonie der Seepocke *Balanus amphitrite*. Aus Fofonoff u. a. [2003].

zahl harter Substrate. Toleriert werden Wassertemperaturen zwischen -2°C und 38°C [Fofonoff u. a., 2003], die Cirri zeigen ein maximale Aktivität bei Temperaturen um 30°C .

Die konische Mauerkrone besteht aus sechs glatten, fast weißen Wandplatten (Abb. 2.18). Die Platten des Operculums können dicht schließen oder eine rhombische Öffnung freigeben [Luther, 1987]. Die äußere Form ähnelt stark der eng verwandten Spezies *Balanus amphitrite*, weshalb es oft zu Verwechslungen der beiden Arten kommt [Fofonoff u. a., 2003]. *Balanus improvisus* erreicht einen basalen Durchmesser bis zu 15 mm [Luther, 1987].

Elminius modestus

Die ursprünglich in Australien und Ozeanien beheimatete Seepockenspezies *Elminius modestus* (= *Austrominius modestus*) konnte sich mittlerweile aufgrund steigender Wassertemperaturen und begünstigt durch den internationalen Seehandel auch an den europäischen Küsten etablieren und konkurriert nun mit den einheimischen Seepockenarten. Die Art toleriert Wassertemperaturen in einem recht weiten Bereich zwischen 0°C und 35°C , ist aber, verglichen mit anderen Balaniden, frostempfindlich. Sie zeigt ein Aktivitätsmaximum der Cir-

2. Theorie und Methoden



Abbildung 2.18.: Fotografie einer Kolonie der Seepocke *Balanus improvisus*. Aus Fononoff u. a. [2003].

ri bei Wassertemperaturen um 20 °C [Luther, 1987]. Sie bevorzugt ebenfalls vor starker Brandung geschützte Bereiche und besiedelt dort jegliches harte Substrat. Da sie auch geringere Salinitäten toleriert, findet man sie oft im Bereich von Flussmündungen [Avant, 2007].

Im Gegensatz zu den Arten des Genus *Balanus* besteht die konische Mauerkrone von *Elminius modestus* aus lediglich vier hellgrauen Wandplatten (Abb. 2.19), welche gefaltet sind. Es handelt sich um eine relativ kleine Seepocke: Ausgewachsene Individuen erreichen einen basalen Durchmesser von 5 mm bis 10 mm. Die Basalmembran calcifiziert im Gegensatz zu den Arten des Genus *Balanus* nicht [Avant, 2007]. Das Operculum setzt sich ebenfalls aus zwei Platten zusammen.

Präparation der Seepockenproben

Probenmaterial der Seepockenarten *Balanus amphitrite*, *Balanus improvisus* und *Elminius modestus* wurde von Prof. Clare (School of Marine Science & Technology, Newcastle University, UK) bereitgestellt. Die dort kultivierten Cyprislarven wurden gekühlt bei einer Temperatur von ca. 6 °C an das Karlsruher Institut für Technologie geschickt. Um *In-vivo*-Proben zu präparieren, wurden motile Cyprislarven ausgewählt und mithilfe einer Pipette zusammen



Abbildung 2.19.: Fotografie einer Seepocke der Art *Elminius modestus*. Im Unterschied zu Vertretern des Genus *Balanus* besitzt diese Art nur vier statt sechs Wandplatten. Aus Buschbaum u. Reise [2010].

mit ca. 1 ml des Transportmediums auf in 64 mm große Kreise zugeschnittene, 8 μ m dicke Kapton[®]-Folie (SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA) platziert. Mein Dank gilt an dieser Stelle meinem Arbeitskollegen Tawheed Mohamed, der die Seepockenproben präpariert hat. Kapton wurde als Material ausgewählt, da es neben hoher chemischer Inertheit auch hohe Beständigkeit und Transmission für Röntgenstrahlung bietet (Abb. 2.31). Die Proben wurden für definierte Zeiträume in einer dunklen und feuchten Umgebung gelagert. Danach wurden nicht gesiedelte Larven entfernt und die Kapton[®]-Folie mit den adhären Organismen über mit künstlichem Seewasser (ASW, Instant Ocean, Blacksburg, VA, USA) gefüllte, zylinderförmige Polypropylen-Dosen (40 mm disposable closed X-ray cells, SPEX SamplePrep) gespannt und mit einem Schnapping versiegelt. Die *In-vivo*-Proben wurden nun in für diesen Zweck aus Aluminium angefertigte Probenhalter montiert und mit diesem am XYZ-Probenstisch des FLUO-Strahlrohrs befestigt (Abb. 2.20).

Neben diesen *In-vivo*-Proben wurden auch *In-situ*-Proben der isolierten Zementschicht der Seepocken präpariert. Dafür wurden Cyprislarven zunächst wie oben beschrieben auf Kapton gesiedelt. Nach definierten Zeiträumen zwischen einem und acht Tagen wurden die Organismen vorsichtig mit einer Pinzette von der Kapton[®]-Folie abgelöst. Dabei wurde darauf geachtet, die Folie

2. Theorie und Methoden

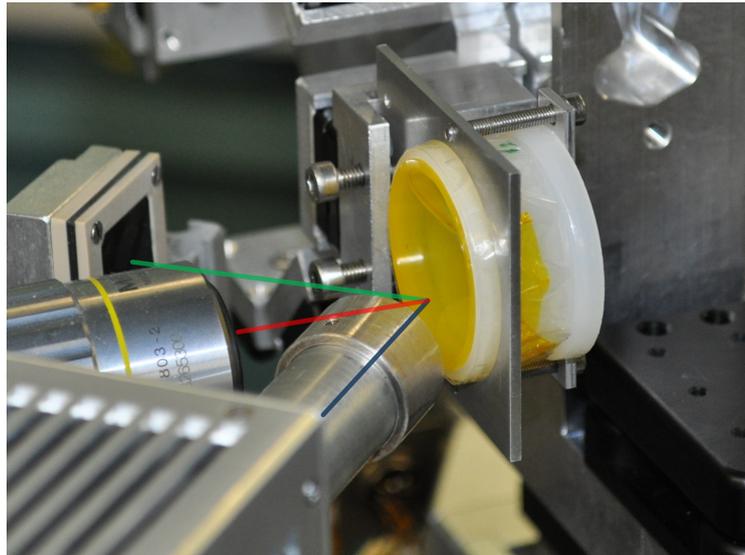


Abbildung 2.20.: Am FLUO-Strahlrohr installierte *In-vivo*-Probe. Die adhärennten Seepocken befinden sich auf der gelben Kapton[®]-Folie. Die grüne Linie kennzeichnet die Achse des Röntgenstrahls, die rote die optische Achse des Strahlrohr-Mikroskops und die blaue die Ausrichtung des RFA-Detektors im rechten Winkel zum Strahl.

nicht mit den Spitzen der Pinzette zu berühren. Die Proben wurden anschließend vorsichtig mit Milli-Q[®]-Wasser (Millipore Corp., Billerica, Ma, USA) gespült. Diese Proben wurden ebenfalls von Tawheed Mohamed präpariert. Da beim Entfernen der Organismen in manchen Fällen auch Teile der Klebstoffschicht entfernt wurden, wurden mithilfe eines Stereomikroskops geeignete Proben mit intakter Klebstoffschicht für die Experimente ausgewählt. Für die RFA-Experimente wurden die Kapton[®]-Folien mit der Klebstoffschichten in einen Aluminium-Rahmen gespannt und am XYZ-Probentisch des FLUO-Strahlrohrs befestigt.

2.2.2. Kalkröhrenwurm *Ficopomatus enigmaticus*

Der Tüten-Kalkröhrenwurm *Ficopomatus enigmaticus*, 1923 von Pierre Fauvel erstmalig als *Mercierella enigmatica* beschrieben, ist ein Vertreter der Vielborster (Polychaeta) aus der Familie der Serpulidae und ein weiteres Beispiel

eines bedeutenden Makrofoulers.



Abbildung 2.21.: Das Foto zeigt eine Kolonie von Röhrenwürmern der Art *Ficopomatrus enigmaticus*. Bild aus Wilson u. Cox [2008].

Der sessile Wurm mit einer Länge von durchschnittlich 2 cm bis maximal 4 cm lebt in einer bis zu 10 cm langen Röhre, in die er sich komplett zurückziehen kann (Abb. 2.21). Diese besteht aus Calciumcarbonatkristallen, die ungeordnet in eine organische Zementmatrix eingebettet sind. Dabei überwiegt der Anteil an Calcit mit über 90% deutlich gegenüber Aragonit (< 10%) [Vinn u. a., 2008].

Die invasive Spezies hat sich, ausgehend vom Indischen Ozean, mittlerweile weltweit entlang der Küsten von Meeren und Ozeanen – vermutlich als Makrofouler an Schiffrümpfen [Cukrov u. a., 2010] – ausgebreitet und toleriert sowohl Salz- als auch Brackwasser. Während die ersten Individuen bei der Erschließung neuer Gebiete auf jeglichem festen Substrat siedeln, setzen sich nachfolgende Larven bevorzugt auf bereits bestehenden Röhren fest und bilden so riffartige Kolonien mit einer Ausdehnung von einigen Zentimetern bis zu mehreren Metern [Dittmann u. a., 2009]. Als Suspensionsfresser ist die Art zwar prinzipiell in der Lage, die Wasserqualität durch Entfernung von organischen Schwebstoffen zu erhöhen, allerdings führt die hohe Fertilität oft zu einem sehr dynamischen Wachstum der Population, welches tiefgreifende Veränderungen

2. *Theorie und Methoden*

in bestehenden Ökosystemen nach sich zieht [McQuaid u. Griffiths, 2014]. Aus diesem Grund ist die Erforschung dieses Makrofoulers auch aus ökologischer Perspektive motiviert, um geeignete Ansätze zu entwickeln, eine weitere Ausbreitung einzudämmen.

Die Proben des Röhrenwurms wurden freundlicherweise von Dr. Regina Gabilondo (Newcastle University, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

2.2.3. Diatomee *Navicula perminuta*

Die Diatomeen, auch Kieselalgen genannt, sind eukaryotische, photoautotrophe Organismen. Die einzelligen Algen weisen Größen von einigen Mikrometern bis zu wenigen Millimetern auf [Norton u. a., 1996] und kommen sowohl in Süßwasser- als auch in Salzwasserlebensräumen vor. Die marinen Arten stellen dabei einen Großteil des Phytoplanktons und sind somit wichtigster Primärproduzent. Charakteristisch sind die artspezifischen Zellwände aus amorphem Siliziumdioxid (SiO_2), welche eine beachtliche Formenvielfalt zeigen [Linne von Berg u. a., 2004]. Diese Silikatschalen bieten den Diatomeen Schutz vor Fressfeinden sowie vor chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen [Molino u. Wetherbee, 2008].

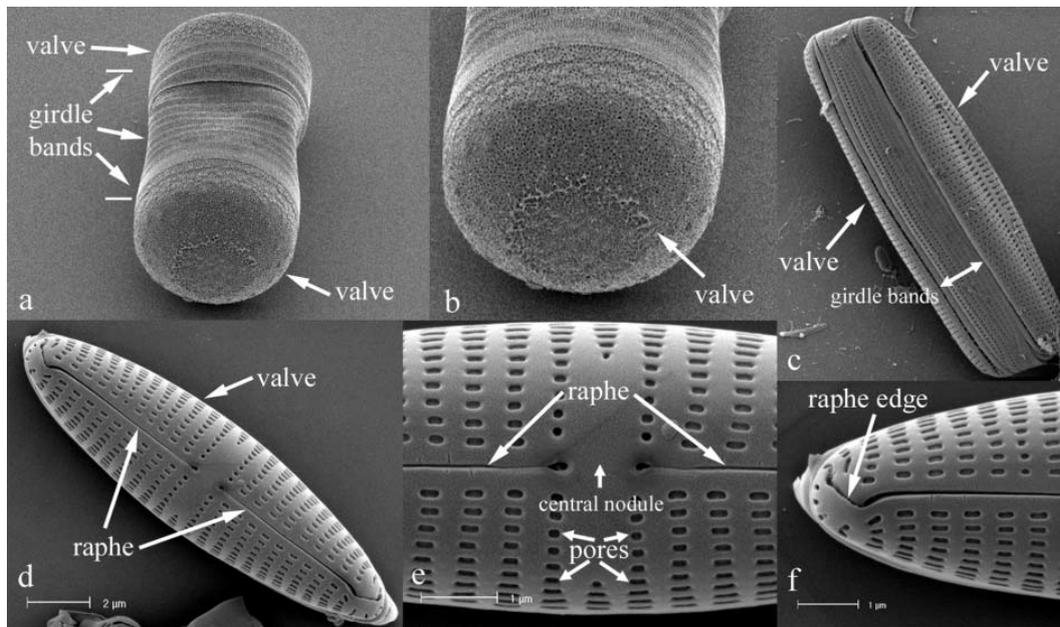


Abbildung 2.22.: REM-Aufnahmen einer zentrischen (*Melosira* sp., a und b) und einer pennaten Diatomee (*Navicula* sp., c-f). Die radialsymmetrische *Melosira* sp. zeigt deutlich zu erkennende Valven (engl. *valves*) und Gürtelbänder (engl. *girdle bands*). *Navicula* sp. ist dagegen bilateral aufgebaut. Zwischen den beiden Valven befindet sich ein Spalt (Raphe), aus dem das viskose Adhäsiv austreten kann. Abbildung aus [Molino u. Wetherbee, 2008].

2. Theorie und Methoden

Man unterscheidet die zentrischen Diatomeen (Abb. 2.22 a,b), welche radialsymmetrisch aufgebaut sind, und die pennaten Diatomeen (Abb. 2.22 c-f), welche eine bilaterale Symmetrie aufweisen. Die Silikathülle besteht aus zwei ähnlichen, übereinandergreifenden Hälften, die als Valven bzw. Theken bezeichnet werden. Die größere Epitheka greift dabei über die kleinere Hypotheka. Beide Valven werden mithilfe der Gürtelbänder (Abb. 2.22 a,c) zusammengehalten. Dieser Aufbau der Schale aus zwei Hälften begünstigt die bei Diatomeen dominierende Vermehrung durch ungeschlechtliche Kern- und Plasmateilung. Jede Alge übernimmt dabei eine Valve als Epitheka und bildet dazu eine etwas kleinere Hypotheka, um die Hülle zu vervollständigen. Aus diesem Grund schrumpft die mittlere Zellgröße der Algen mit jeder Teilung. Bevor eine kritische minimale Zellgröße unterschritten wird, kann es jedoch zur geschlechtlichen Fortpflanzung mit der Ausbildung einer Auxospore kommen. Aus dieser entwickelt sich im Anschluss eine neue Diatomee mit artspezifischer maximaler Größe. Die marine Diatomee *Navicula perminuta* wird etwa 10 µm bis 13 µm lang bei einer Breite von 5 µm bis 6 µm [Linne von Berg u. a., 2004].

Die raphiden pennalen Diatomeen, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchte *Navicula perminuta* gehört, besitzen auf jeder Valve einen als Raphe bezeichneten Spalt entlang der Längsachse (Abb. 2.22 d,e). Aus dieser Raphe kann die Alge sogenannte extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) sekretieren, die ihr neben der Adhäsion auch Motilität auf Substraten ermöglichen [Wetherbee u. a., 1998; Chiovitti u. a., 2006]. Abb. 2.23 demonstriert die Adhäsion und Motilität auf Substraten. Sinkt die im Wasser nicht motile Kieselalge (a) auf eine Oberfläche und berührt diese dabei mit einer Raphe (b), so können direkt EPS-Stränge aus dieser sogenannten Antriebsraphe sekretiert werden, die die Adhäsion zum Substrat sicherstellen. Die Alge kann sich nun in Längsrichtung über die Oberfläche fortbewegen (f), indem sie diese EPS-Stränge entlang der Raphe zieht. Dabei hinterlässt sie eine Sekretpur auf der Oberfläche (j). Berührt die Zelle zunächst mit den Gürtelbändern die Oberfläche (c), so sekretiert sie aus beiden Raphen Klebstoffstränge. Sobald diese sich mit dem Substrat verbunden haben (d), werden sie eingezogen, bis die Verbindung einseitig reißt (e) und die Kieselalge sich aufrichtet (f). Nun wird die Raphe

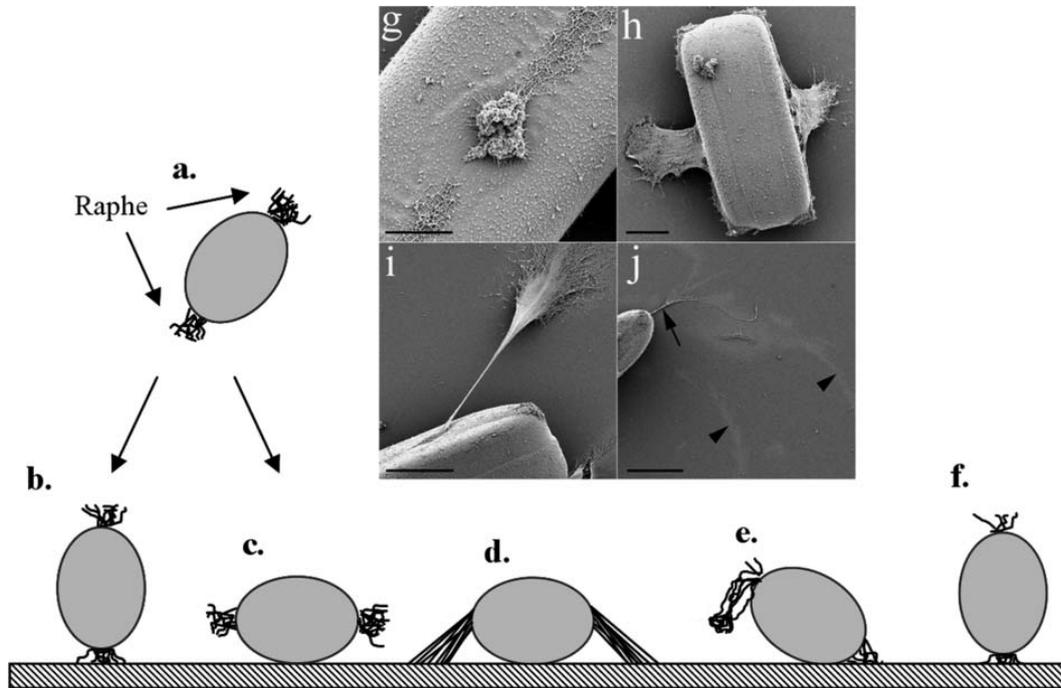


Abbildung 2.23.: Adhäsion raphider Diatomeen. Durch Absinken im Wasser (a) kommt eine Zelle zunächst entweder mit einer Raphe (b) oder einem Gürtelband (c) in Kontakt mit der Oberfläche. Bei direktem Kontakt mit der Raphe (b) sind Adhäsion und Motilität sofort möglich (f). Andernfalls wird aus beiden Raphen viskoses Adhäsiv sekretiert. Nach Erreichen der Oberfläche (d) werden beide Raphen in Richtung der Oberfläche gezogen, bis es zum einseitigen Kontaktverlust kommt (e), und die Alge eine aufrechte Position einnimmt (f), wodurch sie motil wird. Die REM-Aufnahmen (g-j) zeigen die initiale Adhäsion der raphiden Diatomee *Pinnularia viridis* auf Glas. Die Pfeile zeigen die hinterlassene Spur. Modifiziert aus [Molino u. Wetherbee, 2008], (g-j) dort übernommen aus [Higgins u. a., 2003].

2. Theorie und Methoden

mit der Verbindung zum Substrat zur Antriebsraphe und die Zelle wird motil.

Abb. 2.24 zeigt beispielhaft die von Diatomeen der Art *Amphora coffeaeformis* auf einem Glassubstrat hinterlassenen Spuren. Diese wurden zuvor mit Stains-all[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) angefärbt, um sie sichtbar zu machen. Diese Spuren sind äußerst dünn. So ist für *Pinnularia* sp. bekannt, dass sie eine Spur von lediglich 300 nm Dicke bei einer Breite von etwa 3 μm hinterläßt [Higgins u. a., 2000].

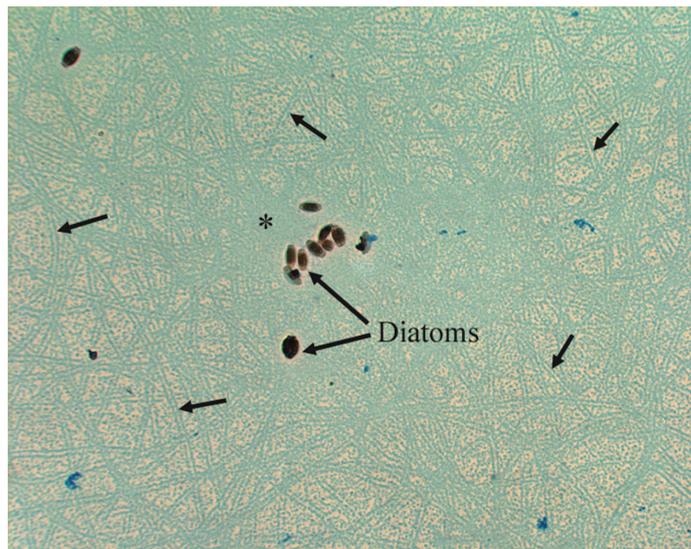


Abbildung 2.24.: Nach 4 h auf Glassubstrat hinterlassene Spuren der Diatomee *Amphora coffeaeformis* (Pfeile), angefärbt mit Stains-all[®]. Die einzelnen Zellen haben eine Länge von 15 μm . Aus [Molino u. Wetherbee, 2008].

Die Untersuchung der Zusammensetzung der sekretierten Substanzen ist auch deshalb von großer Wichtigkeit, da kommerziell erhältliche Antifouling-Beschichtungen bisher nicht in der Lage sind, die Besiedelung durch Diatomeen wirksam zu unterbinden [Briand u. a., 2012; Zargiel u. a., 2011]. Über die adhäsiven Sekrete der Diatomeen weiß man bereits, dass sie Polysaccharide, Proteoglykane und Proteine enthalten [Chiovitti u. a., 2003; Hoagland u. a., 1993; Lind u. a., 1997; Wustman u. a., 1998].

Der Fokus bisheriger Arbeit zur EPS der Diatomeen lag auf der Analyse der organischen Bestandteile. Da beständig neue Beispiele für die Beteiligung an-

organischer Ionen in biologischen Klebstoffsystemen entdeckt werden [Potin u. Leblanc, 2006; Sagert u. a., 2006; Wiegemann, 2005], war es naheliegend, ergänzende Untersuchungen im Hinblick auf mögliche anorganische Komponenten in den Klebstoffen der Kieselalgen anzustellen. Synchrotronbasierte Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) wurde zur Untersuchung von Diatomeenproben ausgewählt, da sie ein gutes räumliches Auflösungsvermögen mit hoher Sensitivität kombiniert.

Präparation der Diatomeen-Proben

Aufgrund der hohen Motilität von *Navicula perminuta* auf Oberflächen sind RFA-Scans mit üblichen Experimentdauern im Bereich von Minuten bis Stunden *in vivo* nicht möglich, da die Algen in einem Bruchteil dieser Zeitspanne den kompletten Scanbereich durchqueren, bzw. neue Organismen in ihn eindringen können. Stattdessen wurden getrocknete Proben präpariert.

Quadratische Membranfenster aus Siliziumnitrid (Si_3N_4 , Kantenlänge Rahmen 5 mm, Membran 1 mm, Membrandicke 100 nm, Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) wurden als Probensubstrat ausgewählt. Aufgrund der geringen Dicke wird der Anteil der während der Experimente am Substrat gestreuten Photonen minimiert, was somit auch den Untergrund des Röntgenfluoreszenzspektrums vermindert. Gleichzeitig bietet das Material neben einer guten mechanischen Stabilität und chemischen Beständigkeit auch eine hohe Reinheit.

Um die Benetzbarkeit der SiN-Membranen zu erhöhen, wurden diese zunächst durch eine 10-minütige Bestrahlung mit einer UV-Lampe aktiviert. Anschließend wurden mit einer Pipette ca. 5 μL große Tropfen der *Navicula perminuta*-Kultur auf die SiN-Membranen gegeben. Anschließend wurden die Proben für etwa 1 h in einer feuchten Umgebung aufbewahrt, um den Algen Zeit zum Adhären zu gewähren und währenddessen ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Membranen vorsichtig in Milli-Q[®]-Wasser (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) getaucht, um das Kulturmedium samt der nicht adhären Zellen zu entfernen. Danach wurden die Proben an der Luft getrocknet. Lufttrocknung ist bei diesem Probenotyp und der Fragestellung nach der elementaren Zusammensetzung der Adhäsive anderen Methoden, wie

2. Theorie und Methoden

z. B. der Kritisch-Punkt-Trocknung überlegen, da sie den Verzicht auf eine Fixierung ermöglicht und damit eine Kontamination des Probenmaterials durch Reagenzien oder Lösemittel ausgeschlossen ist und die sekretierten Adhäsive erhalten bleiben. Die bei Mikroben üblicherweise bei Lufttrocknung auftretende Beeinträchtigung der Ultrastruktur ist hier tolerierbar, da das Silikatgerüst die äußere Form der Zelle, und damit auch die Kontaktfläche zum Substrat erhält [Hill u. Hawkins, 1990; Renberg, 1990].



Abbildung 2.25.: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Probe von *Navicula perminuta*. Die Zellen wurden nach der Adhäsion auf einer SiN-Membran vorsichtig mit Milli-Q[®]-Wasser gespült und anschließend luftgetrocknet. Die Zellen haben eine durchschnittliche Länge von 19 μm .

Mithilfe optischer Mikroskopie wurden die Proben charakterisiert (Abb. 2.25) und geeignete Proben für die RFA-Experimente ausgewählt. Es wurde darauf verzichtet, die auf den SiN-Membranen hinterlassenen Sekretpuren anzufär-

2.2. *Marines Biofouling*

ben, um dabei eine Kontamination des Materials, beispielsweise durch Metallionen, zu vermeiden.

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

2.3.1. FLUO-Strahlrohr

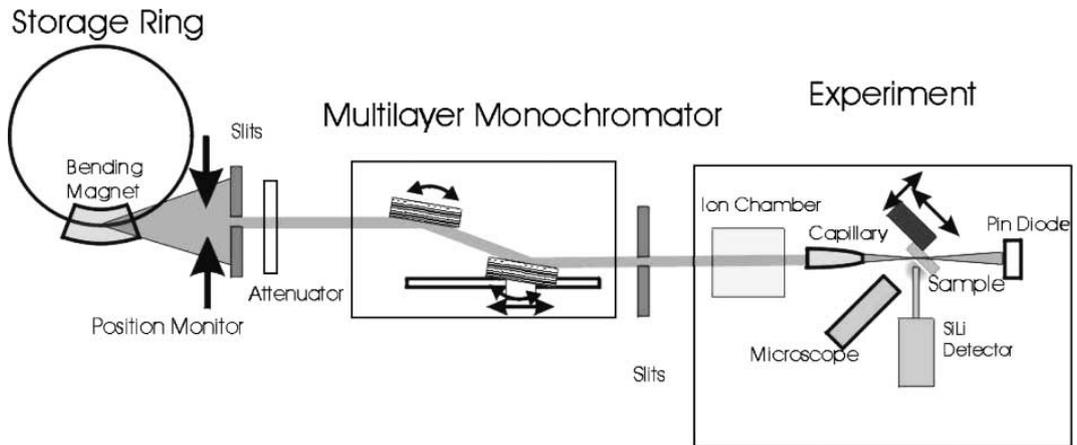


Abbildung 2.26.: Aufbau des FLUO-Strahlrohrs. Abbildung aus [Simon u. a., 2003].

Röntgenfluoreszenz-Messungen wurden an zwei verschiedenen Synchrotronstrahlungsquellen durchgeführt: Experimente mit Seepocken und deren Larven wurden am Strahlrohr FLUO [Simon u. a., 2003] bei ANKA (KIT, Eggenstein-Leopoldshafen) durchgeführt. Der Aufbau des Strahlrohres ist in Abbildung 2.26 dargestellt. ANKA wird im Decay-Modus betrieben. Injektionen finden in der Regel zweimal pro Tag statt. Die im Speicherring mit einer Energie von 2,5 GeV zirkulierenden Elektronen werden mithilfe eines Dipolmagneten umgelenkt (Krümmungsradius 5,559 m) und strahlen dabei Synchrotronstrahlung ab. Anschließend wird der Strahl in einem Multilagen-Monochromator monochromatisiert. In der Experimenthütte passiert der Strahl eine Ionisationskammer, mit deren Hilfe die Konstanz des Photonenflusses überprüft werden kann und wird mithilfe einer maßgefertigten Polykapillare (XOS, East Greenbush, NY, USA) auf $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ (FWHM) fokussiert. Die Probe wird mit einem in allen drei Raumachsen motorisierten Probenhalter im Strahlfokus positioniert. Die Oberfläche der Probe steht dabei unter einem Winkel von 45° zum einfallenden Strahl, der Detektor hingegen ist senkrecht dazu ausgerichtet (Abb. 2.27a). Diese Anordnung minimiert die Anzahl der gestreuten Photonen,

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

die den Detektor erreichen und optimiert somit die Nachweisempfindlichkeit für die Fluoreszenzstrahlung. Während der Messzeiten kam zunächst ein Siliziumdriftdetektor Vortex 90EX[®] (Hitachi High-Technologies Science America, Northridge, CA, USA) zum Einsatz; später wurde dieser aufgrund höherer Empfindlichkeit durch das Modell Vitus SDD 80 mm² (Ketek, München) ersetzt.

Vor Beginn der Messungen wurden die Position des Röntgenstrahls, des Detektors und des optischen Mikroskops durch die Wissenschaftler am FLUO-Strahlrohr Dr. Rolf Simon und Dr. David Batchelor justiert.

Projektionseffekte bei nicht-konfokaler Messung

Für nichtkonfokale Messungen war der Detektor lediglich mit einer kreisförmigen Blende versehen (Abb. 2.27b). Während dies die effizienteste und damit auch schnellste Art der Detektion ist, ergeben sich in Kombination mit ausgedehnten, heterogenen Proben auch einige Nachteile. Wie in der Abbildung zu erkennen, ist das Probenvolumen, aus dem der Detektor Röntgenphotonen registrieren kann, stark ausgedehnt. Gleichzeitig beleuchtet der Anregungsstrahl aufgrund niedriger Divergenz und hoher Eindringtiefe ein großes Volumen. Da die Schnittmenge dieser beiden Volumina das *sichtbare* Volumen definiert, erhält man effektiv eine Projektion der elementaren Konzentrationen unter einem Winkel von 45° zur Oberfläche. Dies führt allgemein zu einer lateralen Verschiebung des sichtbaren Volumens mit zunehmender Tiefe innerhalb der Probe und damit letztendlich zu einer Doppeldeutigkeit sichtbarer Strukturen bezüglich deren lateraler Position und Abstand von der durch die Kapton[®]-Folie definierte Fokusebene.

Bei der Untersuchung adulter Seepocken ergeben sich zusätzliche Artefakte, da die bereits ausgebildeten Wandplatten ebenfalls in einem Winkel von ca. 45° zum Substrat stehen. Das führt dazu, dass auf der linken Seite der Seepocke, also dort wo die Orientierung der Wandplatte mit dem Röntgenstrahl (also der Projektionsachse) übereinstimmt, die gemessenen Intensitäten deutlich erhöht sind, während auf der rechten Seite, wo Wandplatte und Strahl senkrecht aufeinander stehen, dieser Effekt nicht auftritt. Abbildung 2.27c illustriert dies

2. Theorie und Methoden

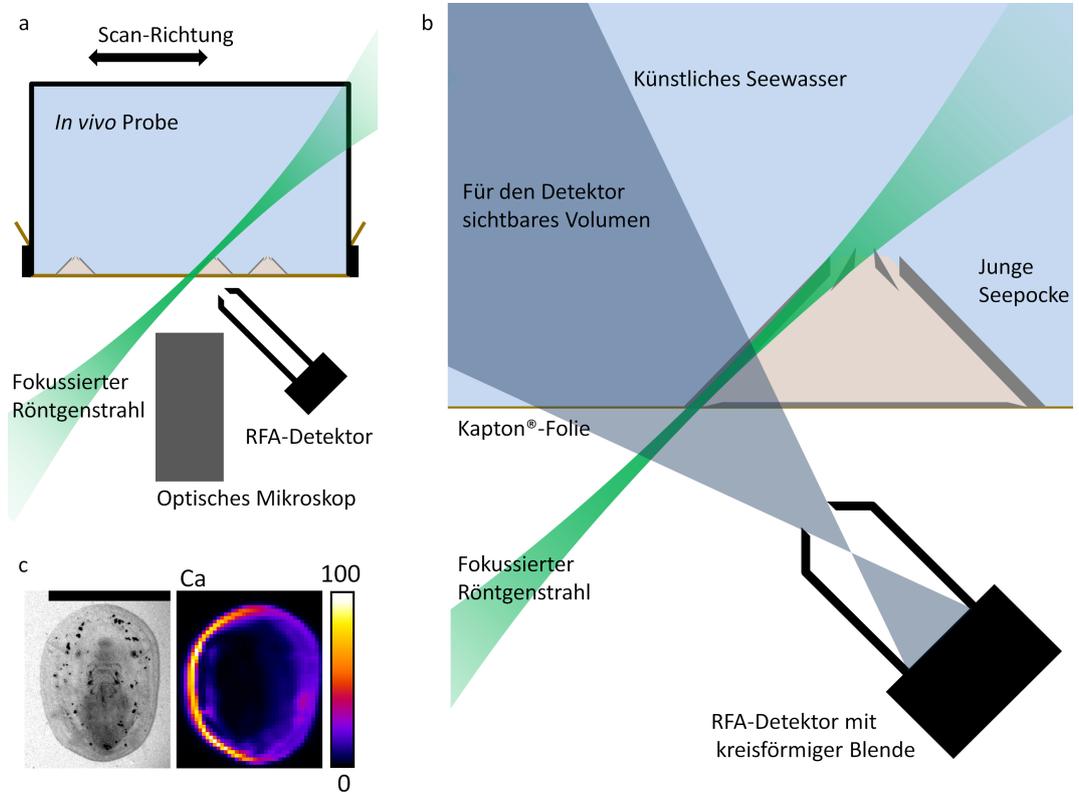


Abbildung 2.27.: Skizze des Experimentaufbaus am FLUO-Strahlrohr mit *In-vivo*-Probe (a). Bei nicht-konfokaler Messung des Röntgenfluoreszenz-Signals wird Strahlung aus einem ausgedehnten Volumen detektiert. Aufgrund der geringen Strahldivergenz werden die Konzentrationen der verschiedenen Elemente in Richtung der Strahlachse, die im 45° -Winkel zur Folienoberfläche verläuft, projiziert (b). Intensitätsverteilung des Calcium-Signals einer acht Tage alten Seepocke (Massstab $500\ \mu\text{m}$). Da die Orientierung der bereits ausgebildeten Wandplatten auf der linken Seite mit der Orientierung des Strahls übereinstimmt, werden dort deutlich höhere Intensitäten als auf der anderen Seite detektiert (c).

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

am Beispiel des gemessenen Calcium-Signals einer sieben Tage alten Seepocke. Diese asymmetrische Intensitätsverteilung tritt bei allen Messungen unter Verwendung des nicht-konfokalen Experimentaufbaus auf.

Konfokale Messungen

Für konfokale Messungen wurde die kreisförmige Blende vor dem Detektor durch eine weitere, ebenfalls von XOS (East Greenbush, NY, USA) maßgefertigte Polykapillare ersetzt (Abb. 2.28). Die hierbei erreichbare Tiefenauflösung betrug, in Abhängigkeit von der detektierten Photonenenergie, 15 μm bis 20 μm (Tab. 2.1).

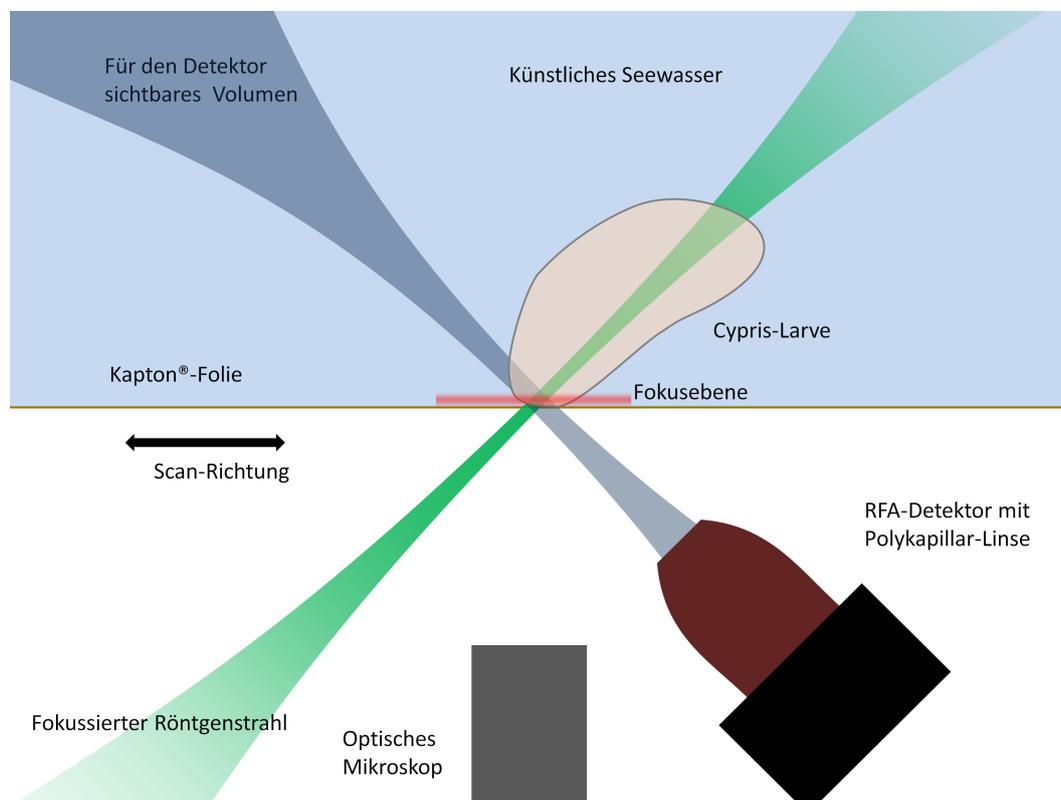


Abbildung 2.28.: Skizze des Experimentaufbaus am FLUO-Strahlrohr bei konfokalen *In-vivo*-Messungen. Der Einsatz einer Polykapillare vor dem Detektor minimiert die Schnittmenge aus mit Röntgenlicht beleuchtetem und für den Detektor sichtbarem Probenvolumen. Dadurch wird eine Tiefenauflösung von 15 μm bis 20 μm möglich.

2. Theorie und Methoden

Photonenenergie [keV]	Tiefenauflösung [μm]
9,8	18,7
11,5	16,6
13,5	15,1

Tabelle 2.1.: Konfokale Tiefenauflösung bei verschiedenen Photonenergien.

Für alle Experimente wurde eine Strahlenergie von 17,2 keV gewählt. Um eine zweidimensionale Elementverteilung der Proben zu erhalten, wurden diese mithilfe eines motorisierten Probenhalters durch den Strahl abgerastert. Die gewählte Schrittweite von 15 μm in beiden Richtungen entspricht der Fokusgröße des Röntgenstrahls. Die Integrationszeit pro Scanpunkt betrug dabei minimal eine Sekunde bei nicht-konfokalen Messungen bis zu maximal 45 s im Falle von konfokalen Messungen. Ein mit einer Digitalkamera ausgestattetes, optisches Mikroskop mit langem Arbeitsabstand, zwischen Röntgenstrahl und Detektor positioniert und senkrecht zur Probenoberfläche ausgerichtet dient der Positionierung und Dokumentation der Proben.

2.3.2. Strahlrohr P06

Zusätzlich zu den Experimenten am FLUO-Strahlrohr bei ANKA wurden Messungen am Strahlrohr P06 (Abb. 2.29) der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III (DESY Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg) durchgeführt. PETRA III wird mit Positronen der Energie $E_{kin} = 6 \text{ GeV}$ bei einem Gesamtstrom von 100 mA betrieben. Als Quelle zur Erzeugung der Synchrotronstrahlung dient ein 2 m langer Undulator mit variablem Spalt. Der feste longitudinale Abstand aufeinanderfolgender Dipolmagnete, die sogenannte Undulatorperiode beträgt $\lambda_U = 31,4 \text{ mm}$. Bei minimalem vertikalen Undulatorspalt erreicht der dimensionslose Undulatorparameter

$$K = 0,934 \cdot \frac{B}{\text{T}} \frac{\lambda_U}{\text{cm}} \quad (2.17)$$

einen Wert von $K_{max} = 2,7$. B bezeichnet dabei die magnetische Flussdichte im Undulatorspalt. Der Undulatorparameter K ermöglicht zum einen die

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

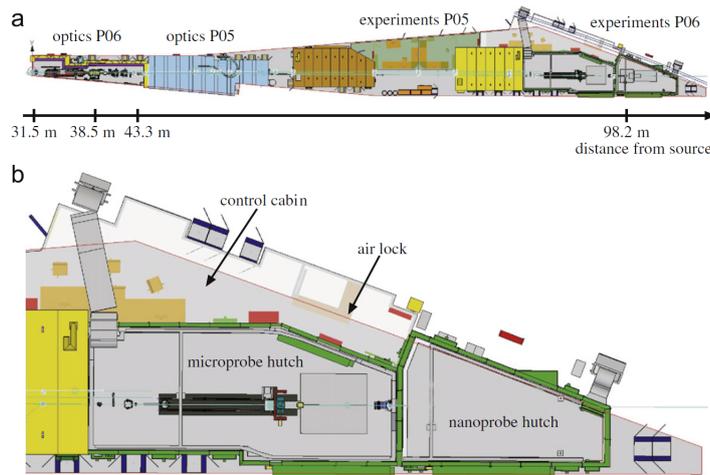


Abbildung 2.29.: Plan des Strahlrohrs P06 mit Entfernungsangaben der optischen Elemente zur Quelle (a). Die Experimenthütten für Mikro- und Nanofokusexperimente sind hintereinander angeordnet (b). Abbildung aus [Schroer u. a., 2010].

Unterscheidung zwischen einem Wiggler ($K > 1$) und Undulator ($K \leq 1$), andererseits bestimmt er gemäß

$$\lambda_n = \frac{\lambda_U}{2n\gamma^2} \left[1 + \frac{K^2}{2} + \gamma^2 \theta^2 \right], n = 1, 2, 3, 4, \dots \quad (2.18)$$

die Wellenlänge λ_n der n-ten Harmonischen auf der durch die Flugrichtung der Positronen definierten Längsachse des Undulators [Brown u. a., 1983]. γ bezeichnet dabei den Lorentzfaktor der Positronen $\gamma = 1 + E_{kin}/E_0$ mit kinetischer Energie E_{kin} und Ruheenergie E_0 . Über eine Veränderung des Undulatorspalts lässt sich die magnetische Feldstärke und somit auch die Wellenlänge der emittierten Strahlung regeln.

In der von P05 und P06 gemeinsam genutzten Optikhütte befindet sich im Abstand von 38,5 m zur Quelle ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Doppelkristall-Monochromator. Dahinter unterdrückt ein Paar planarer, horizontaler Spiegel Strahlung höherer Ordnungen. Das letzte optische Element der Optikhütte sind refraktive Röntgenlinsen zur Vorfokussierung im Abstand von 43,3 m zur Quelle [Schroer u. a., 2010]. Die endgültige Fokussierung geschieht

2. Theorie und Methoden

in den Experimenthütten. Bei den Messungen in der Mikrofokus-Hütte kam dafür ein Spiegelsystem in Kirkpatrick-Baez-Konfiguration zum Einsatz, mit dem der Strahl auf einen Durchmesser von 700 nm (FWHM) fokussiert wurde.

Zur Aufnahme der Röntgenfluoreszenzspektren kam, wie auch am FLUO-Strahlrohr, ein Siliziumdriftdetektor zum Einsatz, in diesem Fall das Modell SII Vortex-EM[®] (Hitachi High-Technologies Science America, Northridge, CA, USA).

2.3.3. Auswertung der Fluoreszenzspektren

Die aufgenommenen Röntgenfluoreszenz-Spektren wurden mit dem an der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle ESRF entwickelten Softwarepaket PyMCA 4.6.2 [Solé u. a., 2007] ausgewertet. Dabei wurden ausschließlich die zur K-Kante zugehörigen Fluoreszenzlinien berücksichtigt. Die gefitteten Intensitäten wurden anschließend als zweidimensionale Verteilungen dargestellt und anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ gegebenenfalls normiert und die Grauwerte zur visuellen Verdeutlichung in eine Falschfarbendarstellung umgewandelt. Bei der Auswertung der erhaltenen Intensitätsverteilungen ist die Eindringtiefe der Röntgenstrahlung zu berücksichtigen (Abb. 2.30). Da der Röntgenstrahl von 17 keV die Probe, welche eine maximale Ausdehnung von etwa einem mm nicht überschreitet, ohne nennenswerten Intensitätsverlust durchdringt, wird die Röntgenfluoreszenz aller Elemente gleichmäßig in jeder Tiefe angeregt. Um dieses Fluoreszenzsignal zu detektieren, müssen die Photonen jedoch die Probe auch wieder verlassen können. Während die Absorption innerhalb der Probe für schwerere Elemente wie z.B. Strontium oder Brom mit ihren höherenergetischen Fluoreszenzlinien noch recht gering ist, sind leichte Elemente wie z.B. Chlor, Kalium und Calcium mit ihren niederenergetischen Fluoreszenzlinien aus größeren Tiefen der Probe nur mit erheblichen Intensitätsverlusten zu detektieren. Die leichten Elemente zeigen also bereits bei nicht-konfokaler Messung eine gesteigerte Oberflächensensitivität, welche jedoch noch keineswegs mit der Tiefenauflösung bei konfokalen Messungen konkurrieren kann.

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

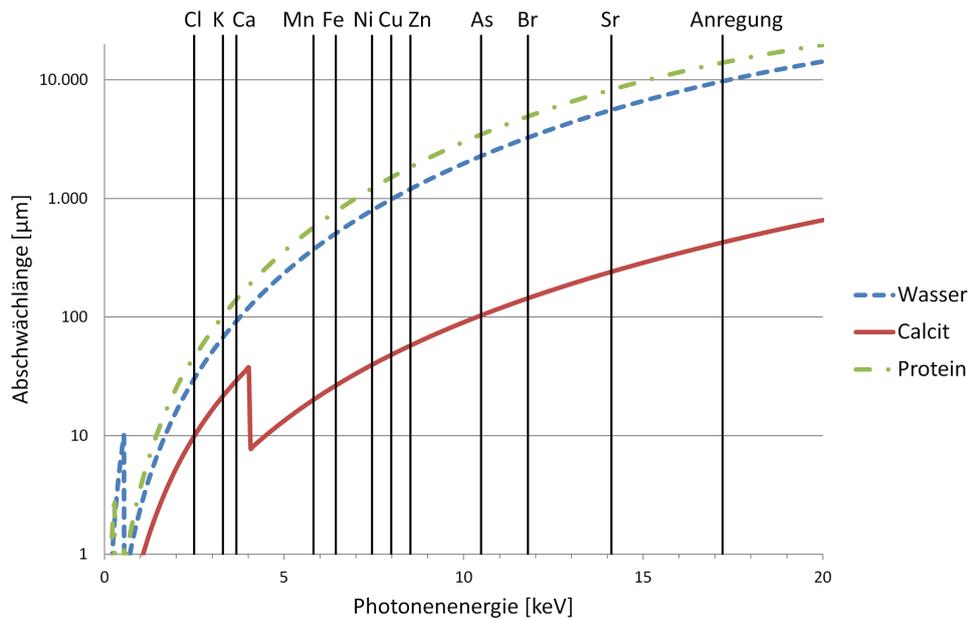


Abbildung 2.30.: Absorptionslängen in Wasser, Calcit und Protein ([Perrett, 2007]) für Photonen bis 20 keV. Während der anregende Röntgenstrahl die Probe noch ohne nennenswerten Intensitätsverlust passiert, werden die Fluoreszenzsignale der leichteren Elemente wie z.B. Chlor, Kalium und Calcium schon innerhalb der Probe deutlich abgeschwächt. Die Absorptionslängen basieren auf Daten aus [Henke u. a., 1993].

2. Theorie und Methoden

Sämtliche RFA-Messungen wurden in Luft durchgeführt. Da die Transmission der 8 μm dicken Kaptonfolie und vor allem der Luftstrecke zwischen Probe und Halbleiterchip des Detektors von ca. 35 mm Länge für niedrige Photonenenergien stark abfällt, können nur Fluoreszenzlinien oberhalb von etwa 2 keV detektiert werden. So ist beispielsweise Silizium gerade noch nachweisbar, sofern es in höheren Konzentrationen auftritt. Alle noch leichteren Elemente, darunter auch biologisch relevante wie z.B. Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff sowie Natrium und Magnesium sind praktisch nicht nachweisbar. Der einzige Ausweg besteht darin, die Luftabsorption zu vermeiden, indem beispielsweise das Experiment im Vakuum durchgeführt wird und Röntgenfluoreszenzdetektoren verwendet werden, die für die Detektion niederenergetischer Photonen optimiert sind. Dafür ist der verwendete Aufbau am FLUO-Strahlrohr jedoch nicht ausgelegt.

2.3. Experimentaufbauten für RFA-Messungen

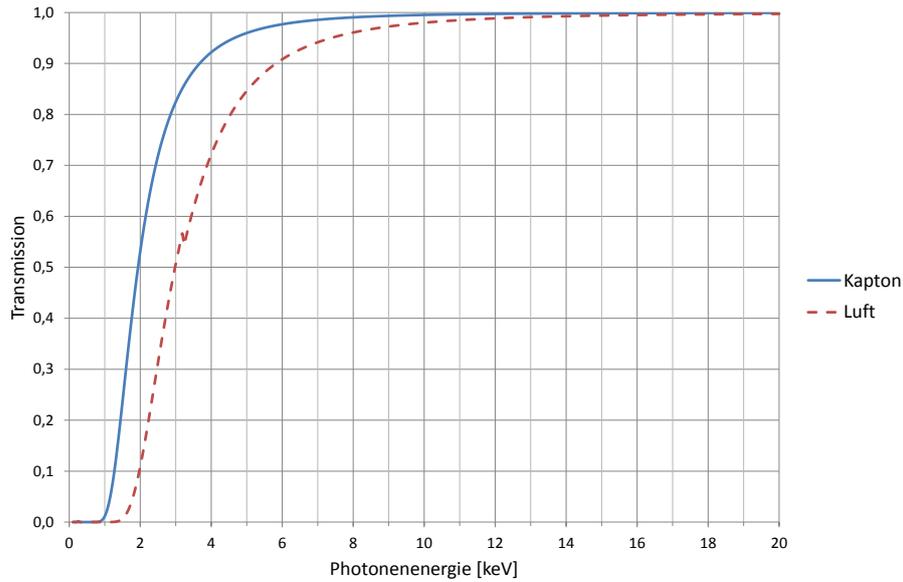


Abbildung 2.31.: Transmissionskoeffizient einer 8 μm dicken Kaptonfolie unter einem Winkel von 45° (blaue, durchgezogene Linie) und einer Luftstrecke von 35 mm bei Standardbedingungen (rot gestrichelte Linie) für Photonen bis 20 keV. Die Strecke entspricht der ungefähren Entfernung zwischen der Probe und dem Halbleiterchip des Detektors. Transmissionskoeffizienten berechnet mit Daten aus [Henke u. a., 1993].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Um die elementare Zusammensetzung der Adhäsive in marinen Fouling-Organismen zu bestimmen, wurden an den Synchrotronstrahlungsquellen ANKA (KIT, Eggenstein-Leopoldshafen) und PETRA III (DESY, Hamburg) Röntgenfluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei wurden unter Verwendung von *In-vivo*- und *In-situ*-Proben (Kap. 2.2.1) die Elementverteilungen in Larven und juvenilen Seepocken der Arten *Balanus amphitrite* und *Balanus improvisus* sowie in Diatomeen der Art *Navicula perminuta* untersucht. Mein Dank gilt an dieser Stelle Tawheed Mohamed, der den Großteil der Seepockenproben für die Experimente vorbereitet hat. In diesem Kapitel werden die gefundenen Elementverteilungen mit optischen Mikroskopiebildern korreliert und anatomischen Strukturen der Organismen zugeordnet. Anschließend wird das Vorkommen verschiedener Elemente anhand der Literatur erläutert und die im Zement der Seepockenlarven zum Teil erstmals nachgewiesenen Elemente diskutiert.

3.1.1. Nicht-konfokale *In-vivo*-Messungen an juvenilen Seepocken

Um die Elementverteilung in juvenilen Seepocken und deren Larven zu bestimmen, wurden *In-vivo*- und *In-situ*-Proben mittels Synchrotron-Röntgenfluoreszenzanalyse untersucht. Erste Experimente wurden bei ANKA mit dem nicht-konfokalen Experimentaufbau am FLUO-Strahlrohr (Kap. 2.3.1) durchgeführt.

Acht Tage alte Seepocken *Balanus improvisus*

In-vivo-Proben von acht Tage alten Seepocken der Art *Balanus improvisus* wurden untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Metamorphose bereits vollständig abgeschlossen und die Seepocke hat bereits die typische juvenile Gestalt angenommen, die Wandplatten sind in diesem Stadium schon angelegt [Maruzzo u. a., 2012]. Die Elementverteilungen zweier gleichaltriger Individuen

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

sind in Abb. 3.1 dargestellt. Zunächst erkennt man eine gute Übereinstimmung des optischen Mikroskopiebilds mit den Elementverteilungen. Die einseitige Intensitätsüberhöhung der Elemente wie z.B. Calcium und Strontium, die in den Wandplatten angereichert sind, ist ein auf die Geometrie des Experimentaufbaus zurückzuführendes Artefakt, wie in Kap. 2.3.1 erklärt.

Betrachtet man die Elementverteilungen der zwei Replikate (Abb. 3.1), so erkennt man, dass Brom, Chlor und verschiedene Metalle mit physiologischer Bedeutung in drei verschiedenen Verteilungsmustern kolokalisiert sind, die der Morphologie der Seepocken zugeordnet werden können:

1. Ein ovaler Ring, der das basale Ende der Wandplatten markiert, zeigt hohe Konzentrationen der Elemente Calcium, Strontium, Mangan, Kalium und Chlor sowie Nickel. All diese Elemente zeigen aufgrund der Geometrie des Experimentaufbaus (Kap. 2.3.1) eine asymmetrische Intensitätsverteilung mit einer deutlichen Betonung der linken Seite. Mit Ausnahme von Chlor und Nickel findet man all diese Elemente auch in einem kleineren, im Inneren gelegenen Ring und in sechs damit verbundenen Strukturen, deren Positionen mit denen der Fugen zwischen den sechs Wandplatten übereinstimmen (Abb. 2.15). Obwohl es sich bei den beiden Proben um Replikate handelt, sind diese Strukturen bei der in Abb. 3.1b dargestellten Probe deutlicher ausgeprägt als bei dem in Abb. 3.1a gezeigten Exemplar. Dies ist vermutlich auf eine unterschiedlich schnelle Entwicklung der Organismen zurückzuführen. Im Bereich dieser Fugen zwischen den Wandplatten sind Calcium und Kalium ähnlich stark wie in dem ovalen Ring angereichert, Strontium und Mangan dagegen nur schwächer.
2. Im Bereich des Darms, der sich mittig im Organismus befindet, sind die folgenden (Übergangs-)Metalle zu finden: Kupfer, Eisen, Zink, Nickel und Arsen. Arsen zeigt dabei in deutlich schwächeres Signal als die übrigen Elemente.
3. Ein drittes Verteilungsmuster zeigt sich ausschließlich in der Intensitätsverteilung von Brom. Obwohl einige schwach sichtbare bromhaltige

3. Ergebnisse und Diskussion

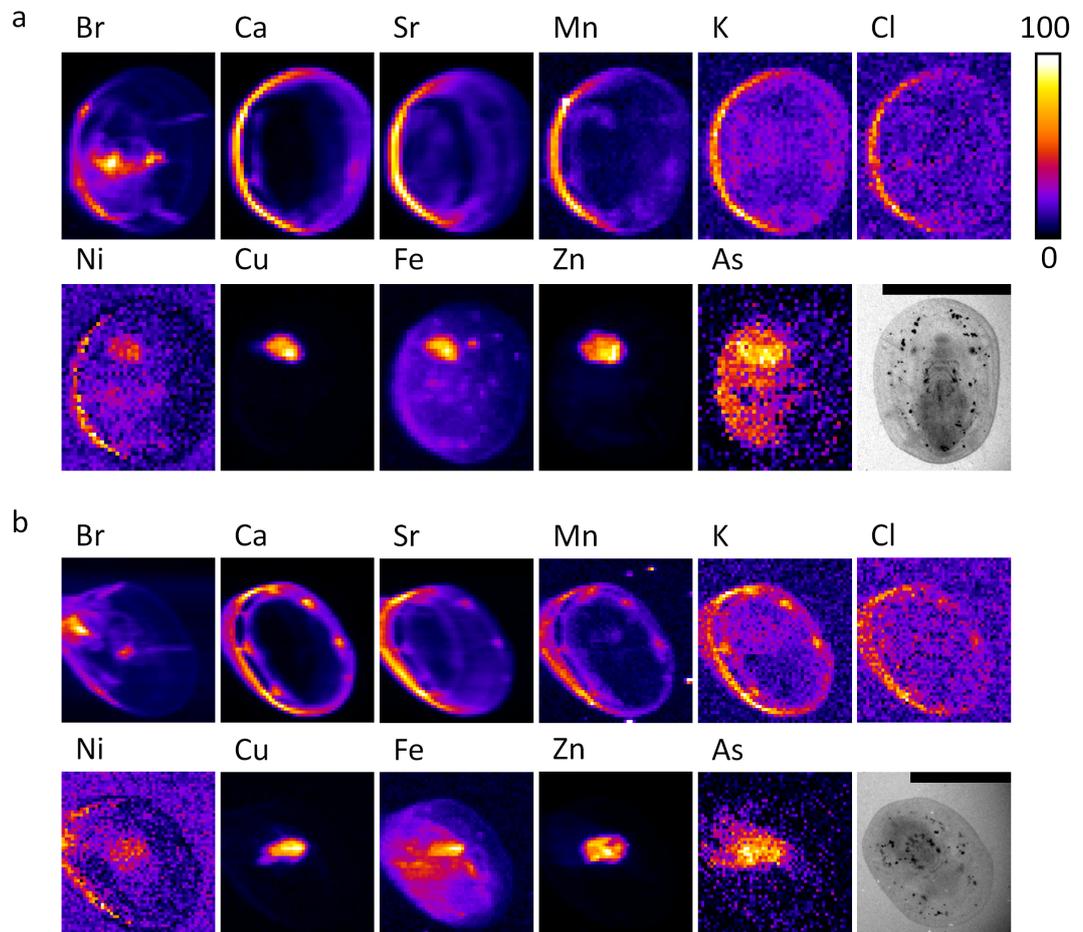


Abbildung 3.1.: Nicht-konfokale *In-vivo*-Messungen zweier acht Tage alter Seepocken der Art *Balanus improvisus* (a und b). Dargestellt sind die Intensitätsverteilungen für alle in der Probe detektierbaren Elemente. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 500 µm.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Strukturen mit den Fugen zwischen den Wandplatten übereinstimmen, die ansonsten vor allem Calcium, Strontium, Mangan, Kalium und Chlor enthalten, entstammen die stärksten Bromsignale einem zusammenhängenden Bereich innerhalb der aus sechs Wandplatten bestehenden Mauerkrone. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Cirri (Rankenfüße), welche zur filtrierenden Nahrungsaufnahme aus dem schützenden Gehäuse ausgestreckt werden. Für diese Annahme spricht die unterschiedliche Lokalisation in den beiden Replikaten, welche für das in Abb. 3.1a dargestellte Replikat dem Zustand eingezogener Cirri und für das in Abb. 3.1b gezeigte Replikat dem Zustand ausgestreckter Cirri entspricht. Aufgrund der Messgeometrie (Kap. 2.3.1) übersetzt sich dieser unterschiedliche Abstand der Strukturen zur Substratebene in eine laterale Verschiebung der zweidimensionalen Intensitätsverteilung (Kap. 2.3.1).

Zusätzlich fällt auf, dass Eisen das einzige Element ist, welches im gesamten Bereich innerhalb der Mauerkrone erhöhte Konzentrationen aufweist. Dies deutet auf eine Lokalisierung in der Basalmembran hin. Des Weiteren weisen beide Replikate zusätzlich erhöhte Bromkonzentrationen in einem kleinen Bereich in der Mitte der Basalmembran auf, also an der Stelle, an der die Cyprislarve permanent adhärirt. Eine Übersicht über die nachgewiesenen Elemente gibt Tabelle 3.1.

Die Wandplatten der Seepocken bestehen hauptsächlich aus in eine chitin-haltige Matrix eingebettetem Calciumcarbonat [Fernández u. a., 2002]. Es ist bekannt, dass Strontium und Mangan ebenfalls in diese Struktur inkorporiert werden [Hockett u. a., 1997]. Dies deckt sich gut mit dem hier beobachteten Auftreten von Calcium, Strontium und Mangan in einem ovalen Ring, der dem äußeren Umfang der Basalplatte entspricht und die Calcifizierung der Wandplatten an dieser Stelle anzeigt. Gohad u. a. [2009] konnten in *Balanus amphitrite* im Gewebe des Mantelepithels neben Chlor- und Calcium-Ionen auch Mitochondrien nachweisen. Sie spekulierten deshalb, dass dieses Gewebe eine Rolle spielt in der Osmoregulation und Bereitstellung von Calcium für die Biomineralisation. Bereits zuvor wurde nach Studien an Balanoiden der Art *Chthamalus fragilis* die Hypothese aufgestellt, dass das innere Mantelepithel

3. Ergebnisse und Diskussion

Element	Wandplatten	Fugen	Verdauungstrakt	Cirri	Basalmembran
Br	+	+	-	++	-
Ca	++	+ bis ++	-	-	-
Sr	++	+	-	-	-
Mn	++	+	-	-	-
K	++	+ bis ++	-	-	-
Cl	++	0	-	-	-
Ni	++	-	+	-	-
Cu	-	-	++	-	-
Fe	-	-	++	-	+
Zn	-	-	++	-	-
As	-	-	++	-	-

Tabelle 3.1.: Elementverteilungen in juvenilen Seepocken der Art *Balanus improvisus* acht Tage nach erfolgreichem Siedeln. Um das Vorkommen in den Wandplatten, in den Fugen zwischen den Wandplatten, im Verdauungstrakt, in den Cirri und in der Basalmembran elementweise zu quantifizieren, wurden diese Kategorien verwendet: Element zeigt in diesem Bereich die höchste Intensität (++), Element zeigt in diesem Bereich eine niedrigere Intensität als in einem anderen (+), Element in Spuren nachweisbar (0), Element hier nicht nachweisbar (-).

Calcium-Ionen aus dem Wasser aufnimmt, um sie zum Zwecke der Biomineralisation, also an den Fugen zwischen den Wandplatten bzw. zwischen Basal- und Wandplatten wieder abzugeben [Nousek, 1984]. Die in der obigen Aufzählung mit 1 bezeichneten Strukturen erhärten diese Hypothesen, aufgrund der nachgewiesenen Elemente (Calcium, Strontium, Mangan, Kalium und Chlor) und deren Lokalisation an den Fugen zwischen den Wandplatten bzw. zwischen Basal- und Wandplatten. Ein nur äußerst schwach zu erkennender kleinerer Ring kann dem Plattenring (engl. *shell ring*) zugeordnet werden, von dem die beiden Platten des Operculums (Abb. 2.15) ausgehen [Costlow u. Bookhout, 1956; Costlow, 1956].

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Der Nachweis verschiedener (Übergangs-)Metalle im Darmbereich kann durch Körnchen (engl. *granules*) erklärt werden, die von Seepocken hier gebildet werden, um Metalle, welche aus der Nahrung und dem umgebenden Seewasser im Überschuß aufgenommen werden, zu entsorgen. Kupferkörnchen wurden sowohl für Cyprislarven [Bernard u. Lane, 1961] als auch für adulte Seepocken [Walker, 1977] beschrieben. Das Kupfer liegt in diesen Körnchen weitestgehend physiologisch inert vor, wahrscheinlich aufgrund von Komplexbildung mit organischen Molekülen [Walker, 1977]. Zink wurde als Zinkphosphat in ähnlichen Körnchen in den den Darm umgebenden Parenchymzellen adulter Seepocken gefunden [Walker u. a., 1975a,b]. Auch Nickelkörnchen sind in vielen Seepockenarten nachgewiesen [Reis u. a., 2011]. Die Anreicherung von Arsen und seine Ausscheidung in Körnchen analog zu den Metallen ist denkbar.

Der Nachweis und das Verteilungsmuster von Brom sind schwieriger zu erklären. Während über eine mögliche physiologische Funktion von Brom in Seepocken bisher nichts bekannt ist, deutet das Verteilungsmuster auf eine Lokalisation in chitinhaltigen Strukturen hin. Chitin bildet das Exoskelett von Cyprislarven und adulten Seepocken und ist deshalb in diesen in großen Mengen nachzuweisen [Holland u. Walker, 1975; Barnes u. a., 1976]. Dieses Biopolymer, aus dem auch die Schalen und Exoskelette vieler weiterer Krustentiere und Insekten bestehen, kann Brom in hohem Maße adsorbieren [Shigeno u. a., 1980; Takahashi, 1987]. Brom hingegen ist in Form von Bromiden im Seewasser allgegenwärtig, sodass seine Aufnahme durch chitinreiche Strukturen wie die Carapax der Cyprislarve oder die Cirri und Wandplatten der adulten Seepocke [Fernández u. a., 2002] möglich ist. Daneben gibt es im Tierreich mit den Hornkieselschwämmen auch ein Beispiel für die aktive Einlagerung von Brom in Chitin. Man vermutet, dass die Bromverbindungen in diesem Fall dazu dienen, das zunächst elastische Chitin durch Förderung der Quervernetzung auszuhärten. Zusätzliche Funktionen in der Biomineralisation des Schwammskeletts, welches aus einer Silica-Chitin-Aragonit-Verbundstruktur besteht, werden ebenfalls diskutiert [Ehrlich u. a., 2010]. Wenngleich Seepocken und Schwämme nicht näher verwandt sind, so ist eine ähnliche Funktion von Bromverbindungen in den Chitinstrukturen der Seepocken aufgrund par-

3. Ergebnisse und Diskussion

allevolutionärer Entwicklungen zumindest denkbar.

Zusätzlich bemerkenswert ist die Existenz einer kleinen Region erhöhter Bromkonzentrationen genau in der Mitte der Basalplatte, also dort, wo die Cyprislarve initial permanenten Kontakt zum Substrat herstellt. Aufgrund der großen Absorptionslängen von Brom in Gewebe im Bereich mehrerer Millimeter (Abb. 2.30) und der fehlenden Oberflächensensitivität des nicht-kofokalen Experimentaufbaus kann jedoch mit diesen Experimenten nicht bestimmt werden, ob das Brom in diesem Bereich tatsächlich direkt an der Oberfläche auftritt, also Bestandteil des Zements der Cyprislarve ist. Deshalb wurden weitere Experimente mit dem konfokalen Aufbau unternommen, um diese Vermutung zu überprüfen.

Acht Tage alte Seepocken *Elminius modestus*

Zwei *In-vivo*-Proben acht Tage alter Seepocken der Art *Elminius modestus* (Kap. 2.2.1, S. 31) wurden an ANKAs FLUO-Strahlrohr untersucht. Die ermittelten Verteilungsmuster der einzelnen Elemente (Abb. 3.2) lassen sich wiederum anatomisch zuordnen und stimmen weitestgehend mit den bereits in *Balanus improvisus* beobachteten Mustern überein.

Die Elemente sind in den folgenden Bereichen kolokalisiert:

- Der ovale Ring, welcher am deutlichsten in den Verteilungen von Calcium, Strontium und Mangan zu erkennen ist, entspricht dem basalen Ende der Wandplatten. Des Weiteren enthalten diese noch Brom, Kalium und Chlor sowie Spuren von Nickel und Arsen. Vergleicht man die Verteilungen von Calcium und Strontium, so bemerkt man den großen Unterschied in der Absorptionslänge der Fluoreszenzsignale der beiden Elemente: Während die Platten des Operculums im Strontiumsignal noch deutlich zu erkennen sind, wird das Calciumsignal aus dieser Struktur schon größtenteils innerhalb der Probe absorbiert. Die bereits in *Balanus improvisus* beobachtete Überhöhung der Intensitäten auf der linken Seite des Ringes tritt auch hier wieder auf.
- Vom basalen Ende der Wandplatten ausgehend erkennt man die vier

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

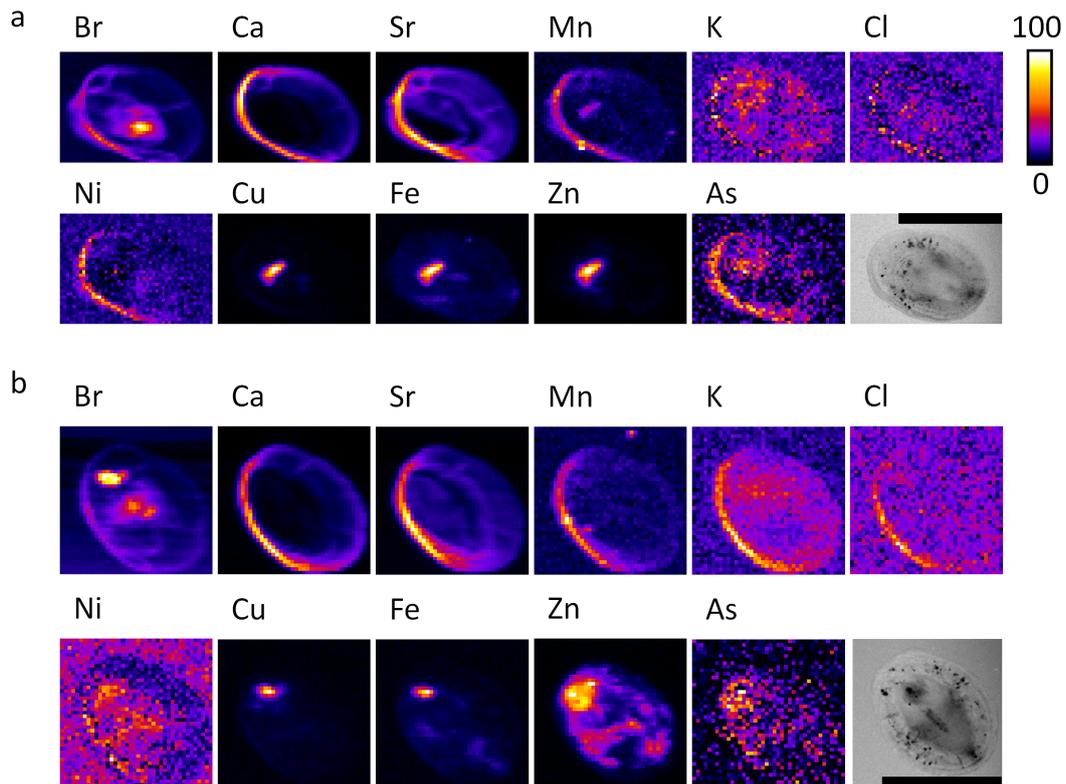


Abbildung 3.2.: Nicht-konfokale *In-vivo*-Messungen zweier acht Tage alter Seepocken der Art *Elminius modestus* (a und b). Dargestellt sind die Intensitätsverteilungen für alle in der Probe detektierbaren Elemente. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 500 µm.

3. Ergebnisse und Diskussion

Fugen zwischen den Wandplatten. Diese zeigen eine Anreicherung von Brom, Calcium und Strontium.

- Im Bereich des Verdauungstraktes sind hauptsächlich Kupfer, Eisen und Zink kolokalisiert, zusätzlich Brom und in Spuren Kalium und Chlor sowie in dem in Abb. 3.2a gezeigten Replikat auch Mangan.
- Eine zentral innerhalb der Mauerkrone lokalisierte Struktur, welche höchstwahrscheinlich den eingezogenen Cirri entspricht, zeigt ausschließlich eine Anreicherung von Brom.
- Die über die gesamte Fläche innerhalb der Mauerkrone relativ konstanten – wenngleich niedrigen – Signallevel von Kupfer, Eisen und Zink deuten daraufhin, dass diese Signale der Basalmembran entstammen. Das in Abb. 3.2b gezeigte Replikat weist hingegen auf einem insgesamt höheren Level auch eine stärkere örtliche Variation auf.

Eine Übersicht über die Verteilungsmuster gibt Tab. 3.2. Das Auftreten der Elemente stimmt in großen Teilen mit den Verteilungsmustern in *Balanus improvisus* (Tab. 3.1) überein, weshalb an dieser Stelle ausschließlich die Abweichungen gegenüber *Balanus improvisus* diskutiert werden sollen.

In den Fugen zwischen den Wandplatten fehlen dagegen die erhöhten Konzentrationen an Mangan, Kalium und Chlor. Diese Unterschiede sind vermutlich auf physiologische Unterschiede zwischen *Elminius modestus* und den *Balanus*-Arten zurückzuführen. Da *Elminius modestus* eher niedrigere Salinitäten bevorzugt [Avant, 2007], ist eine andere Form der Osmoregulation denkbar, die das Ausbleiben erhöhter Chlor- und Kaliumkonzentrationen in diesem Bereich erklären würde.

Im Bereich des Verdauungstraktes kann man in den Proben von *Elminius modestus* zusätzlich Anreicherungen von Brom und Mangan sowie Spuren von Kalium und Chlor detektieren. Nickel fehlt dagegen. Da die Aufnahme dieser Elemente größtenteils über die Nahrung erfolgt, können diese Abweichungen sowohl über einen möglicherweise abweichenden Spurenelementgehalt in der

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Nahrungsgrundlage oder durch physiologische Unterschiede in der Anreicherung der Elemente erklärt werden [Rainbow u. Wang, 2001].

In der Basalmembran sind zusätzlich zu dem bereits in *Balanus improvisus* beobachteten Eisen auch noch Kupfer und Zink nachweisbar. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anatomie der beiden Arten zurückzuführen. Während die Basalmembran im Genus *Balanus* generell calcifiziert, ist das bei *Elminius modestus* nicht der Fall [Avant, 2007].

Element	Wandplatten	Fugen	Verdauungstrakt	Cirri	Basalmembran
Br	+	+	++	+	-
Ca	++	+	-	-	-
Sr	++	+	-	-	-
Mn	++	-	- bis +	-	-
K	++	-	0	-	-
Cl	++	-	0	-	-
Ni	++	-	-	-	-
Cu	-	-	++	-	0
Fe	-	-	++	-	0
Zn	-	-	++	-	0 bis +
As	++	-	++	-	-

Tabelle 3.2.: Elementverteilungen in juvenilen Seepocken der Art *Elminius modestus* acht Tage nach erfolgreichem Siedeln. Um das Vorkommen in den Wandplatten, in den Fugen zwischen den Wandplatten, im Verdauungstrakt, in den Cirri und in der Basalmembran elementweise zu quantifizieren, wurden diese Kategorien verwendet: Element zeigt in diesem Bereich die höchste Intensität (++), Element zeigt in diesem Bereich eine niedrigere Intensität als in einem anderen (+), Element in Spuren nachweisbar (0), Element hier nicht nachweisbar (-).

3. Ergebnisse und Diskussion

Quantitative Abschätzung

Die elementaren Intensitätsverteilungen aller in dieser Arbeit gezeigten Röntgenfluoreszenzmessungen werden bewusst in einer willkürlichen Intensitätsskala dargestellt, da eine genaue Quantifizierung solch inhomogener Proben, wie sie hier untersucht wurden, nicht möglich ist. Um dennoch die detektierten Fluoreszenzsignale in Sinne physikalischer Einheiten zu interpretieren, wurden die Konzentrationen, die den dargestellten Intensitäten entsprechen, abgeschätzt. Dafür sind verschiedene Annahmen notwendig, die zu solch großen Fehlern führen, dass nur die Größenordnung der Konzentrationen abgeschätzt werden kann. Eine genaue Beschreibung der hier verwendeten Quantifizierung basierend auf fundamentalen Parameter geben Solé u. a. [2007].

Für die Abschätzung wurden folgende Parameter zugrundegelegt: Photonfluss im Fokus 10^{11} Photonen/s, Abstand der Probe zum Detektor 35 mm, aktive Fläche des Detektors 50 mm^2 .

Um den systematischen Fehler der Messung abzuschätzen, wurde für den Photonfluss im Fokus eine Unsicherheit von $\pm 3 \times 10^{10}$ Photonen/s zugrundegelegt. Für den Abstand der Probe zum Detektor, welcher die geometrische Detektionseffizienz bestimmt, wurde ein Fehler von 10 mm angenommen sowie eine zehnpromtente Unsicherheit der elektronischen Detektionseffizienz.

Um die Absorption des Fluoreszenzsignals auf dem Weg zum Detektor zu modellieren, wurden folgende Absorberdicken berücksichtigt: $\sqrt{2} \times 8 \mu\text{m}$ Kapton-Folie (entspricht $8 \mu\text{m}$ unter einem Winkel von 45°), 35 mm Luft bei Standardbedingungen, $25 \mu\text{m}$ Berylliumfenster vor dem Detektor.

Unter Annahme einer Wassermatrix mit homogener Verteilung der analysierten Elemente erhält man die folgenden maximalen Konzentrationen ρ_{max} . Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese – offensichtlich nicht erfüllte – Annahme zu den größten Unsicherheiten führt: Die tatsächlichen Konzentrationen der Elemente in der Probe können lokal deutlich höher liegen, insbesondere dann, wenn es sich um leichtere Elemente handelt und diese tiefer in der Probe lokalisiert sind. Beides führt aufgrund der Absorption innerhalb der Probe (Abb. 3.14) dazu, dass Intensitäten deutlich unterschätzt werden.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Eine Quantifizierung der Elementkonzentrationen in inhomogenen Proben ist, wenn überhaupt, nur unter Verwendung eines konfokalen Experimentaufbaus zu erreichen. Nur so können die Mehrdeutigkeiten, die sich bei nicht-konfokalen Messungen aus den Projektionseffekten (Kap. 2.3.1) ergeben aufgelöst und Fluoreszenzsignale aus definierten Volumina detektiert werden. Auch dann bleibt noch das Problem der zu berücksichtigenden Absorption innerhalb der Probe. Um diese entsprechend zu modellieren benötigt man im Grunde bereits eine Kenntnis über die gesuchte dreidimensionale Zusammensetzung der Probe. Bisher konnte deshalb nur für Spezialfälle dieses komplexen Problems – wie beispielsweise für aus mehreren homogenen Schichten aufgebaute Proben – Ansätze zur Quantifizierung präsentiert werden [Mantouvalou u. a., 2012].

Element	ρ_{max} in $\mu\text{g mm}^{-3}$
Br	$0,066 \pm 0,028$
Ca	14 ± 6
Sr	$0,038 \pm 0,016$
Mn	$0,024 \pm 0,010$
K	$0,17 \pm 0,07$
Cl	$0,58 \pm 0,25$
Ni	$(5,1 \pm 2,2) \times 10^{-4}$
Cu	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^{-3}$
Fe	$0,019 \pm 0,008$
Zn	$0,034 \pm 0,015$
As	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^{-4}$

Tabelle 3.3.: Maximale Konzentrationen der Elemente, die in den *In-vivo*-Proben der Seepocken detektiert wurden. Die grobe Abschätzung erfolgte unter Annahme homogener Elementverteilungen in einer Wassermatrix.

3.1.2. Konfokale *In-vivo*-Messungen an Seepockenlarven

In-vivo-Messungen an Seepockenlarven wurden mit dem konfokalen Aufbau am FLUO-Strahlrohr (Kap. 2.3.1) mit dem Ziel durchgeführt, die elementare Zusammensetzung des Zements der Cyprisslarve zu bestimmen. Vorhergehende nicht-konfokale Messungen an juvenilen Seepocken hatten bereits Hinweise auf Brom in diesem Klebstoff geliefert, die jedoch aufgrund fehlender Tiefenaufklärung nicht eindeutig dem Zement zugeordnet werden konnten. Der Einsatz des konfokalen Aufbaus erlaubt es nun, nicht bloß die Projektion der Signale, also letztlich (unter Vernachlässigung von Strahldivergenz und Absorption der Fluoreszenzphotonen innerhalb der Probe) Flächendichten zu bestimmen, sondern Volumendichten in frei wählbaren Ebenen. Diese virtuelle Schnittebene kann also beispielsweise auch unmittelbar oberhalb der Substratebene gelegt werden.

Zwei bereits permanent adhärierte Cyprisslarven der Art *Balanus amphitrite* wurden untersucht und dabei die Konzentrationen in jeweils vier äquidistanten Ebenen parallel zum Substrat bestimmt. Dargestellt sind die Verteilungen der Elemente Brom, Calcium, Kupfer, Eisen, Nickel und Zink. Abb. 3.3 zeigt eine Cyprisslarve wenige Minuten nach der permanenten Adhäsion; der Körper liegt noch relativ flach zum Substrat an, bevor er im Verlauf der Metamorphose aufgerichtet wird [Maruzzo u. a., 2012]. Die Ebenen I bis IV entsprechen virtuellen Schnittebenen im Abstand von jeweils 75 µm, I kennzeichnet dabei die Substratebene. Da in dieser Ebene die Signalintensitäten deutlich niedriger als in den drei übrigen waren, werden diese für alle Elemente außer Calcium überhöht dargestellt und können visuell nicht direkt mit den Intensitäten in den drei übrigen Ebenen verglichen werden. In dieser Substratebene gibt es nur zwei Elemente, die eine gegenüber dem umgebenden Seewassermedium erhöhte Konzentration aufweisen: Brom und Zink sind an der Kontaktstelle der Cyprisslarve zu finden. In den tieferliegenden Schnitten II bis IV erkennt man aufgrund ihres intensiven Brom-Signals deutlich die chitinöse Carapax, welche die Larve in diesem Stadium noch einhüllt. Die zusätzlich in Schnittebene II sichtbaren Strukturen stimmen mit der Lage der Zementdrüsen der Larve

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

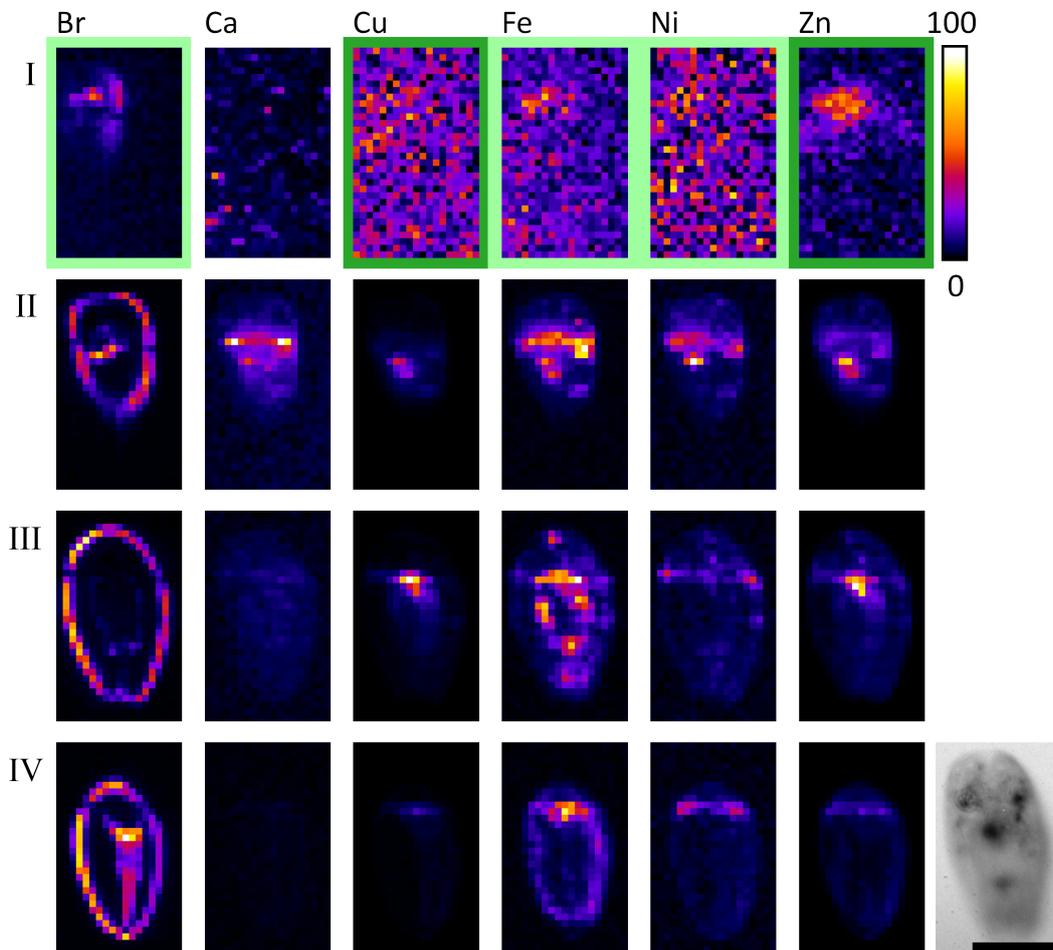


Abbildung 3.3.: Konfokale *In-vivo*-Messungen einer vor wenigen Minuten gesiedelten Cyprislarve der Art *Balanus amphitrite*. Dargestellt sind die Intensitätsverteilungen in vier parallel zur Kapton[®]-Folie liegenden Ebenen. Ebene I entspricht der Folienebene, die nachfolgenden Ebenen haben einen um jeweils 75 µm anwachsenden Abstand dazu. Die Intensitätsskalen für die Ebenen II bis IV sind identisch. Die Intensitäten in Ebene I sind jedoch für Br, Fe und Ni 50-fach überhöht (hellgrüner Rahmen), für Cu und Zn 1000-fach (dunkelgrüner Rahmen), da die hier auftretenden Intensitäten deutlich niedriger sind. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 µm.

3. Ergebnisse und Diskussion

überein, während die Bromkonzentration in Ebene IV an der Stelle der chitinosen Cirri auftritt (vergl. Walley u. Rees [1969] für eine detaillierte Anatomie der balanoiden Cyprislarve).

Die Komplexaugen der Larve (Abb. 2.13), hier zu erkennen als zwei laterale Punkte in Ebene II (75 μm Abstand zum Substrat), weisen erhöhte Konzentrationen an Calcium, Eisen und Nickel auf.

Im Bereich des Mitteldarms, zu sehen in den Ebenen II und III, hat bereits eine Anreicherungen von Kupfer und Zink stattgefunden, wie sie auch in den adulten Seepocken beobachtet wurde. Die in den Ebenen III und IV in den Verteilungen von Eisen und Nickel sichtbaren Strukturen können nicht zweifelsfrei anatomischen Strukturen der Cypris zugeordnet werden.

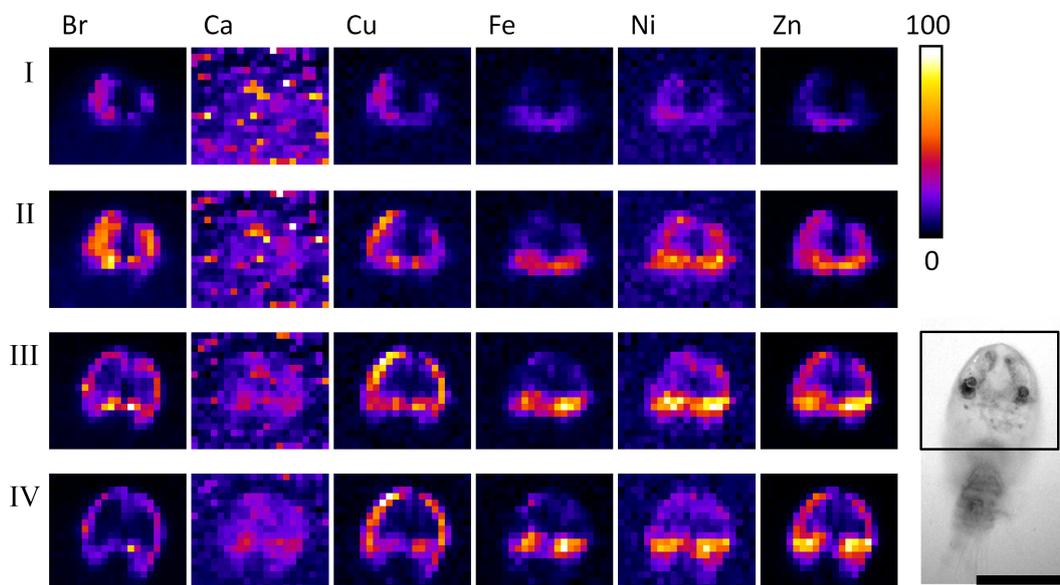


Abbildung 3.4.: Konfokale *In-vivo*-Messungen einer gesiedelten Cyprislarve der Art *Balanus amphitrite* während der Metamorphose. Dargestellt sind die Intensitätsverteilungen in vier parallel zur Kapton[®]-Folie liegenden Ebenen. Ebene I entspricht der Folienebene, die nachfolgenden Ebenen haben einen um jeweils 20 μm anwachsenden Abstand dazu. Die Intensitätsskala ist für alle Ebenen identisch, die Intensitäten können also direkt zwischen den Ebenen verglichen werden. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 μm .

Abbildung 3.4 zeigt eine Cyprislarve während der Metamorphose, zu erken-

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

nen am vom Substrat weggestreckten Körper [Maruzzo u. a., 2012]. Die mit I bis IV bezeichneten Schnittebenen haben jeweils einen Abstand von 20 μm zueinander, wobei Ebene I der Substratebene entspricht. Die Signale sind in allen Ebenen unter Verwendung derselben Intensitätsskala dargestellt, die Konzentrationen können also zwischen verschiedenen Ebenen verglichen werden. Ebenso wie im vorigen Beispiel (Abb. 3.4) eines vorhergehenden Stadiums ist die Kontur der Carapax in der Bromverteilung in allen Ebenen deutlich zu erkennen. Zusätzlich können hier auch noch erhöhte Konzentrationen von Kupfer und Zink beobachtet werden. Im Komplexauge, entsprechend den zwei lateralen Punkten in den Ebenen III und IV, sind neben Calcium und Eisen auch Nickel und Zink angereichert. Im Gegensatz zum vorhergehenden Datensatz einer frisch gesiedelten Larve ist hier keine deutlich erhöhte Konzentration von Brom und Zink im Bereich der permanenten Verbindung mit Cypris zement auszumachen.

Die Daten beider Cyprislarven belegen erhöhte Bromkonzentrationen in chitinösen Strukturen wie der Carapax oder den Cirri. Ein weiteres anatomisches Merkmal, das anhand der Elementverteilungen identifiziert werden kann, sind die Komplexaugen, deren Gewebe sich durch erhöhte Konzentrationen an Calcium, Eisen, Nickel und Zink auszeichnet.

Die Hinweise auf das Vorkommen von Brom und Zink im Cypris zement der frisch gesiedelten Larve konnten durch die Messung eines Exemplars im zeitlich daran anschließenden Metamorphosestadium nicht bestätigt werden. Die an Synchrotronmessplätzen nur stark begrenzt zur Verfügung stehende Messzeit erlaubte jedoch keine Ausdehnung der zeitintensiven konfokalen Messungen auf eine deutlich größere Probenmenge. Diese wäre jedoch nötig gewesen, um die ersten Hinweise auf Brom und Zink im Zement der Cyprislarven zweifelsfrei bestätigen zu können und motivierte einen veränderten experimentellen Ansatz.

Quantitative Abschätzung

In Kap. 3.1.1 wurden bereits die nicht-konfokal in *In-vivo*-Proben acht Tage alter Seepocken gemessenen Konzentrationen der Elemente abgeschätzt, die den

3. Ergebnisse und Diskussion

Maxima in den Intensitätsverteilungen entsprechen. Dort wurden auch bereits die großen Unsicherheiten bei der Quantifizierung von Röntgenfluoreszenzmessungen inhomogener Proben beschrieben.

Aufgrund des jetzt verwendeten konfokalen Experimentaufbaus wurde hier eine stärkere Absorption durch eine längere Luftstrecke zwischen Probe und Detektor von 60 mm berücksichtigt. Zusätzlich wurde für die Polykapillare eine Effizienz von 30 % angenommen [Proost u. a., 2003]. Für die Fluoreszenzlinien aller Elemente wurde eine Tiefenauflösung von 15 μm zugrundegelegt, die hier zusammen mit der lateralen Fokusgröße des Anregungsstrahls die Volumina definiert, denen die Fluoreszenzsignale entstammen. Alle übrigen Parameter entsprechen den Angaben in Kap. 3.1.1.

Element	ρ_{max} in $\mu\text{g mm}^{-3}$
Br	$0,63 \pm 0,49$
Ca	$3,1 \pm 2,5$
Cu	$0,37 \pm 0,29$
Fe	$0,13 \pm 0,10$
Ni	$0,032 \pm 0,025$
Zn	$1,5 \pm 1,2$

Tabelle 3.4.: Abschätzung der maximalen Konzentrationen, die konfokal in *In-vivo*-Proben von Seepocken detektiert wurden. Die Abschätzung erfolgte unter Annahme homogener Elementverteilungen in einer Wassermatrix.

Vergleicht man die konfokal in den Seepockenlarven gemessenen Konzentrationen (Tab. 3.4) mit den nicht-konfokal in acht Tage alten Seepocken detektierten Konzentrationen (Tab. 3.3), so erkennt man, dass die Werte der konfokalen Messungen für alle Elemente mindestens eine Größenordnung höher liegen. Dies kann man dadurch erklären, dass bei nicht-konfokalen Messungen aufgrund der in Strahlrichtung projizierenden Abbildung die Konzentrationen über große Volumina gemittelt werden. Die konfokale Messung dagegen bestimmt Konzentrationen in lokalen Volumina von ungefähr $(15 \mu\text{m})^3$ Ausdehnung und erfasst somit auch lokale Maxima räumlich schwankender Konzentrationen. Das einzige Element, für das die konfokalen Messungen an Seepo-

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

ckenlarven deutlich niedrigere maximale Konzentrationen zeigen, ist Calcium. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das für die Calcifizierung der Wandplatten benötigte Calcium erst nach der Metamorphose aufgenommen wird.

3.1.3. *In-situ*-Messungen des Seepockenklebstoffs

Um erste Hinweise auf erhöhte Konzentrationen an Brom und Zink im Cypris-zement zu überprüfen, wurden, wie in Kap. 2.2.1 beschrieben, *In-situ*-Proben der isolierten Klebstoffschicht präpariert. Da dieser Probentyp keine Tiefenauflösung zur Unterscheidung oberflächennaher Elemente benötigt, konnte der nicht-konfokale Experimentaufbau für die Messungen genutzt werden. Es wurden Proben der adhäsiven Bestandteile juveniler Seepocken der Arten *Balanus improvisus* und *Balanus amphitrite* in verschiedenen Stadien von einem bis zu sieben Tagen nach dem Siedeln präpariert und mit RFA untersucht. Dabei konnten die adhäsiven Überreste morphologisch bis zu drei Strukturen zugeordnet werden: Alle untersuchten Proben beinhalteten den Cypris-zement, den die Larve nutzt, um sich vor der Metamorphose mit den Antennulae permanent an das Substrat zu kleben. Daneben fanden sich in einer Vielzahl der untersuchten Proben zwei weitere Strukturen mit charakteristischer Elementzusammensetzung, die identifiziert und mit optischen Mikroskopieaufnahmen korreliert werden konnten. Es handelt sich dabei um Fragmente der in diesen Stadien noch nicht calcifizierten Basalmembran sowie Fragmente der bereits calcifizierten Wandplatten. Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft die Zuordnung dieser drei Merkmale anhand der Elementverteilungen.

Balanus improvisus

Klebstoffschicht zwei Tage nach dem Siedeln

Proben der Klebstoffschicht zwei Tage nach erfolgreichem Siedeln juveniler Seepocken der Art *Balanus improvisus* wurden untersucht. Dabei lassen sich drei verschiedene Bereiche unterscheiden:

1. Bereits im optischen Mikroskopiebild (Abb. 3.6) erkennt man deutlich die beiden Haftscheiben als dunklere, kreisrunde Scheiben von 30 μm bis 40 μm Durchmesser. Diese bestehen aus dem Zement der Cyprislarve mit darin eingebetteten Überresten der Antennulae [Phang u. a., 2006], welche durch die Zementierung die dauerhafte Adhäsion der Larve sicherstellen. Je nach Stellung der Antennulae während der Sekretion des

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

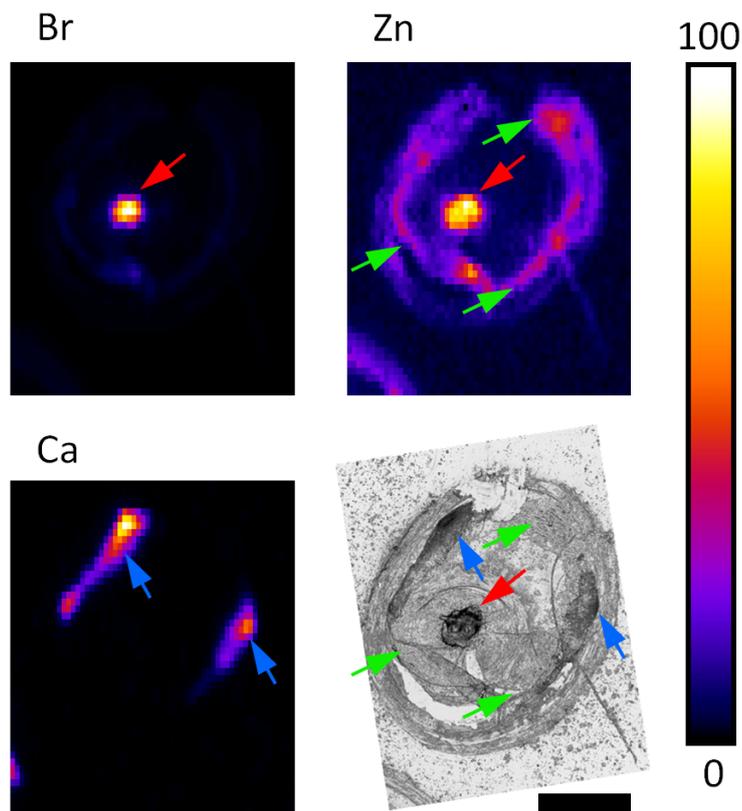


Abbildung 3.5.: Beispielhafter Datensatz der adhäsiven Reste einer Seepocke (*Balanus improvisus*) sieben Tage nach erfolgreichem Siedeln. Die Probe beinhaltet Cypriszement (rote Pfeile, Br und Zn), adhärenzte Fragmente der Wandplatten (blaue Pfeile, Ca) und der Basalmembran (grüne Pfeile, Zn). Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 μm .

Klebstoffs können die beiden Haftscheiben auch überlappen, wie beispielsweise in Abb. 3.6b zu sehen. In diesen Scheiben sind Brom, Chlor, Schwefel und Selen konzentriert. Zusätzlich lassen sich dort auch Eisen und Zink nachweisen, welche jedoch an anderer Stelle höhere Konzentrationen erreichen.

2. Ein ovaler Ring, welcher der äußeren Kontur der in Kontakt mit dem Substrat stehenden Basalmembran entspricht, enthält neben Eisen und Zink auch Spuren von Brom, Chlor und Schwefel.

3. Ergebnisse und Diskussion

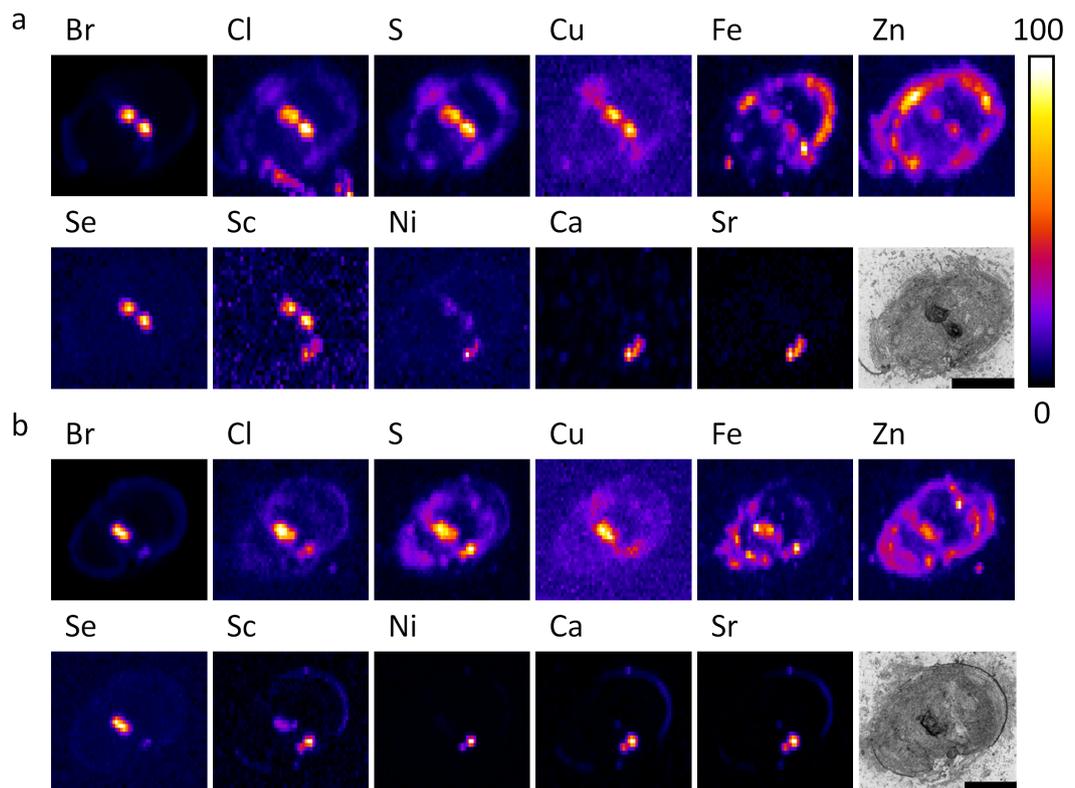


Abbildung 3.6.: Nicht-konfokale *In-situ*-Messungen der auf der Kapton[®]-Folie hinterlassenen Zementschicht zweier Seepocken (a und b) der Art *Balanus improvisus*. Die Seepocken wurden zwei Tage nach dem Siedeln entfernt. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 µm.

3. Einzelne Punkte auf diesem Ring weisen hohe Konzentrationen an Calcium, Strontium, und Nickel auf. Diese Elemente wurden in vorhergehenden Experimenten bereits in den Wandplatten juveniler Seepocken nachgewiesen, sodass man die nun hier auftretenden Strukturen, auch aufgrund ihrer Lage, adhärennten Teilen der Wandplatten zuschreiben kann.

Scandium, welchem allgemein keinerlei biologische Funktion zugewiesen wird [Da Silva u. Williams, 2001], findet man sowohl im Zement der Cyprislarve als auch in den Fragmenten der Wandplatten in ähnlicher Konzentration, was höchstwahrscheinlich auf eine interstitielle Einlagerung in das Kristallgitter des Calcits zurückgeführt werden kann.

Klebstoffschicht vier Tage nach dem Siedeln

Es wurden ebenfalls Proben der Klebstoffschicht juveniler Seepocken der Art *Balanus improvisus* vier Tage nach erfolgreichem Siedeln präpariert. Die ermittelten Elementverteilungen sind für insgesamt drei Organismen in Abb. 3.7 dargestellt. Analog zu den Ergebnissen der Klebstoffschicht zwei Tage nach dem Siedeln lassen sich auch bei der in Abbildung 3.7a dargestellten Probe drei in ihrer Elementzusammensetzung charakteristische Bereiche unterscheiden. Die zwei in Abbildung 3.7b gezeigten Proben (innerhalb eines rechteckigen Bereichs) unterscheiden sich davon, da diese sowohl in der optischen Mikroskopieaufnahme als auch in den Elementverteilungen hauptsächlich den Cypriszement in Form zweier benachbarter Scheibchen aufweisen, jedoch nur wenig bis keine adhärennten Überreste der Basalmembran bzw. der Wandplatten.

1. Im Bereich des Cypriszements wurden Brom, Chlor, Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink, Selen und Scandium detektiert, sowie Spuren von Nickel und Strontium.
2. Adhäsive Überreste der Basalmembran (nur in Abb. 3.7a) weisen hauptsächlich Schwefel, Eisen und Zink sowie Spuren von Chlor und Kupfer auf.

3. Ergebnisse und Diskussion

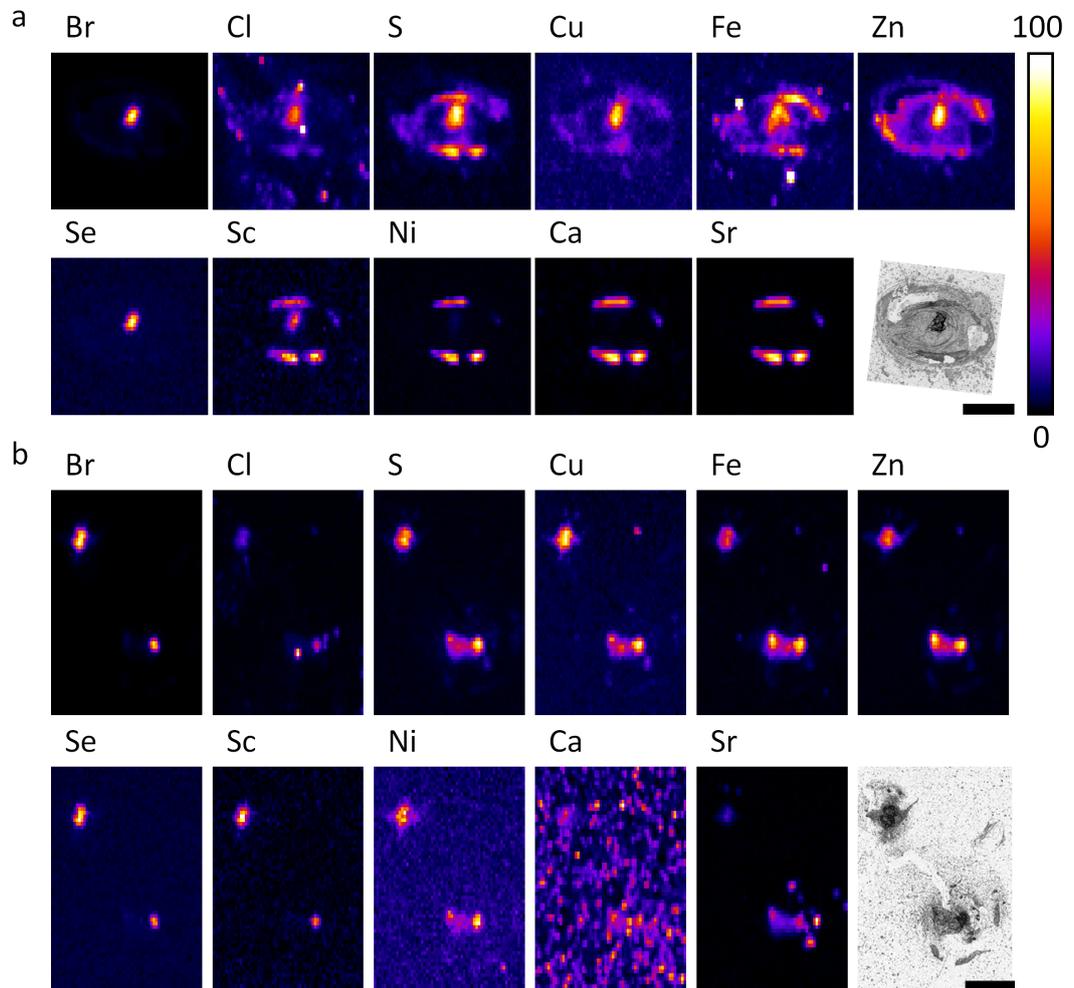


Abbildung 3.7.: Nicht-konfokale *In-situ*-Messungen der auf der Kapton[®]-Folie hinterlassenen Zementschicht von insgesamt drei Seepocken der Art *Balanus improvisus*. Die Seepocken wurden vier Tage nach dem Siedeln entfernt. In dem in (a) gezeigten Bereich hatte eine Larve gesiedelt, in dem in (b) gezeigten Bereich zwei. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 μm .

3. Adhäsive Fragmente der Wandplatten (nur in Abb. 3.7a) zeigen neben hohen Konzentrationen an Calcium und Strontium auch noch niedrigere Konzentrationen an Schwefel, Eisen, Scandium und Nickel.

Klebstoffschicht sieben Tage nach dem Siedeln

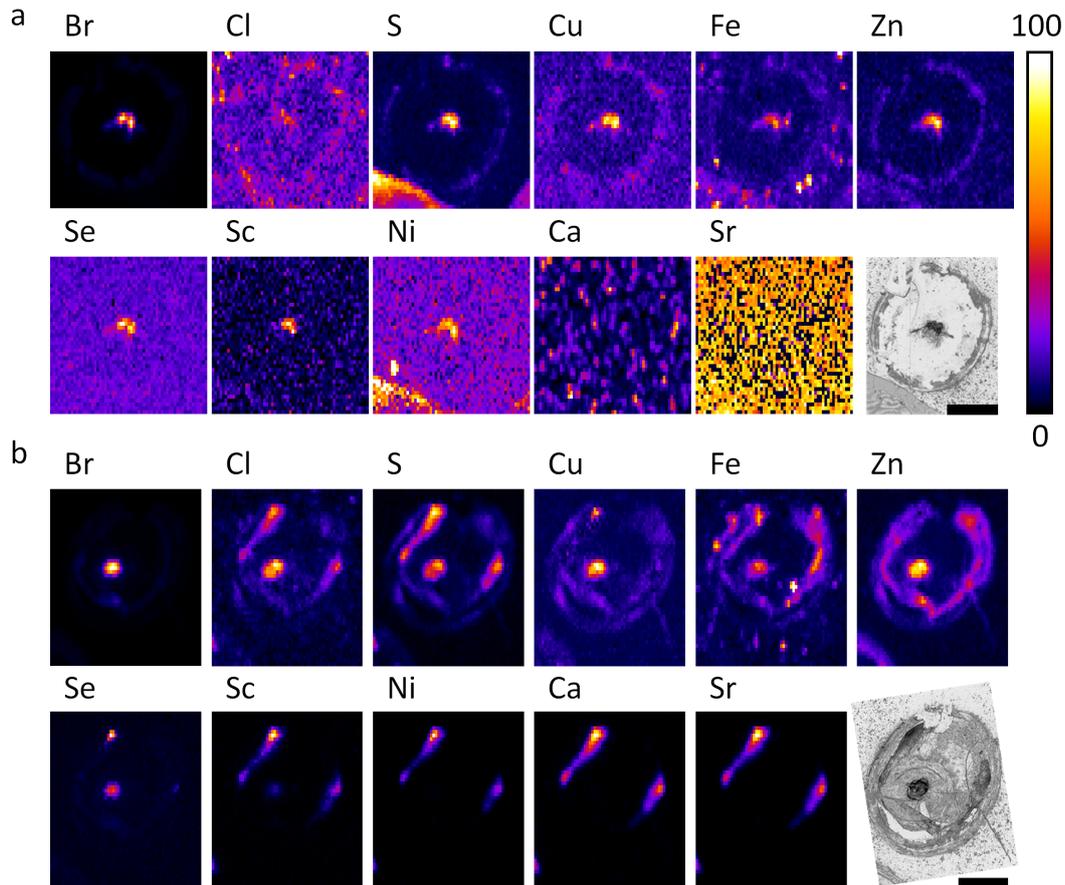


Abbildung 3.8.: Nicht-konfokale *In-situ*-Messungen der auf der Kapton[®]-Folie hinterlassenen Zementschicht zweier Seepocken der Art *Balanus improvisus* (a und b). Die Seepocken wurden sieben Tage nach erfolgreichem Siedeln entfernt. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 µm.

Zwei Proben der Klebstoffschicht sieben Tage nach erfolgreichem Siedeln sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Die in Abbildung 3.8a gezeigte Probe enthält hauptsächlich Cypriszement, in diesem Fall als zwei separierte Scheibchen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die untere, linke Ecke des Bereichs enthält eine Markierung mittels Permanentmarker, erkennbar auch in den Elementverteilungen an ihrem Gehalt an Schwefel, Nickel und Zink. Die zweite Probe (Abb. 3.8b) beinhaltet wieder alle drei Strukturen, die bereits in den Klebstoffschichten jüngerer Seepocken identifiziert wurden:

1. Der Cypriszement enthält Brom, Chlor, Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink, Selen und Scandium sowie Spuren von Nickel.
2. Adhäsive Überreste der Basalmembran (nur in Abb. 3.8b) enthalten Chlor, Schwefel, Kupfer, Eisen und Zink.
3. Fragmente der Wandplatten (ebenfalls nur in Abb. 3.8b) enthalten neben hohen Konzentrationen an Calcium und Strontium auch noch niedrigere Konzentrationen an Chlor, Schwefel, Kupfer, Eisen, Selen, Scandium und Nickel.

Balanus amphitrite

Klebstoffschicht ein und zwei Tage nach dem Siedeln

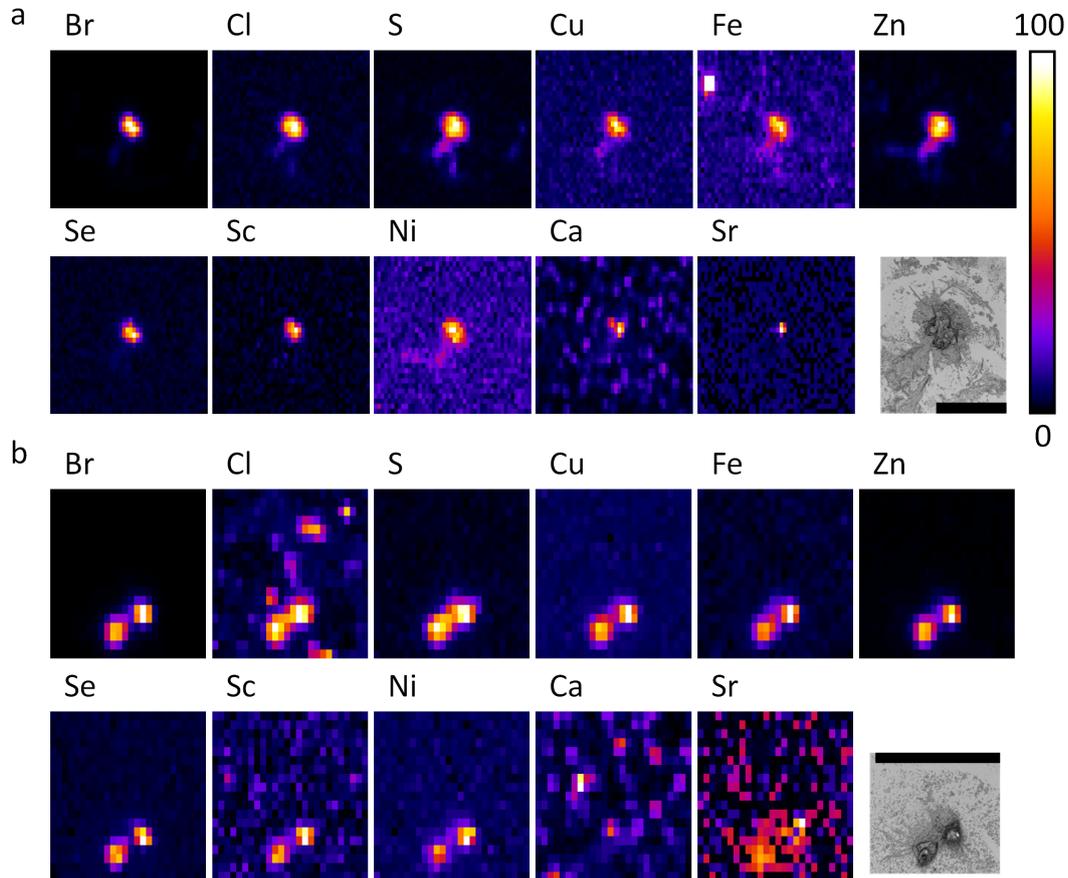


Abbildung 3.9.: Nicht-konfokale *In-situ*-Messungen der auf der Kapton[®]-Folie hinterlassenen Zementschicht zweier Seepocken der Art *Balanus amphitrite*. Die Seepocken wurden zwei (a), bzw. einen Tag (b) nach dem Siedeln entfernt. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 200 μm .

Zwei ebenso präparierte Proben der Klebstoffschicht von Seepocken der Art *Balanus amphitrite* zwei (Abb. 3.9a), bzw. einen Tag (Abb. 3.9b) nach erfolgreichem Siedeln zeigen bereits in der optischen Mikroskopieaufnahme zwei Cypriszementscheiben (überlappend in Abb. 3.9a, separiert in Abb. 3.9b). Diese enthalten neben Brom, Chlor und Schwefel auch die (Übergangs-)Metalle

3. Ergebnisse und Diskussion

Kupfer, Eisen, Zink, Selen, Scandium und Nickel. In der in Abb. 3.9a gezeigten Probe erkennt man zusätzlich einen Punkt, welcher vor allem Calcium und Strontium enthält. Dies weist auf einen adhärennten Überrest einer calcifizierten Struktur hin. Die ovale Struktur, bestehend aus der Verbindung der Basalplatte zum Substrat, die in manchen Vergleichsproben der Art *Balanus improvisus* deutlich zu erkennen war, fehlt hier.

Klebstoffschicht sieben Tage nach dem Siedeln

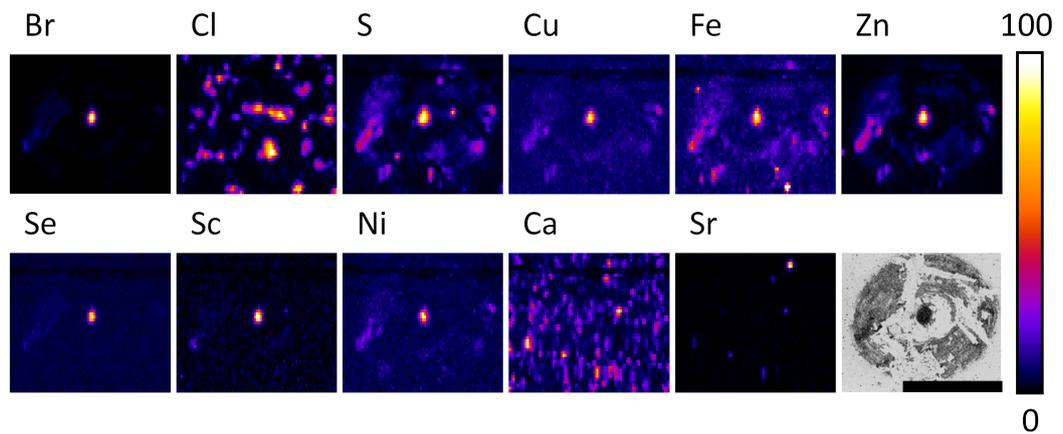


Abbildung 3.10.: Nicht-konfokale *In-situ*-Messungen der auf der Kapton[®]-Folie hinterlassenen Zementschicht einer Seepocke der Art *Balanus amphitrite*. Die Seepocke wurden sieben Tage nach dem Siedeln entfernt. Die Zeilen verminderter Intensität im oberen Bereich der Verteilungen sind durch maschinenseitig bedingte, kurzzeitige Probleme mit der Stabilität der Strahlage verursacht. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 500 μm .

Eine weitere Probe der Klebstoffschicht von *Balanus amphitrite* sieben Tage nach dem Siedeln wurde untersucht und ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die adhärennten Strukturen lassen sich in drei Kategorien einordnen:

1. Zentral im gescannten Ausschnitt erkennt man sowohl in der optischen Mikroskopieaufnahme als auch in den Elementverteilungen den Cypris-zement. Anstelle zweier separater Scheibchen ist er in diesem Fall zu einem runden Bereich zusammengefließen. Er enthält neben Brom auch Chlor, Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink, Selen und Scandium sowie Nickel.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

2. Reste der Basalmembran, die ebenfalls auf dem Kapton[®]-Substrat verblieben sind, enthalten neben Spuren von Brom, Kupfer, Selen und Nickel vor allem Schwefel, Eisen und Zink.
3. Adhärenente Fragmente der Wandplatten, vor allem anhand ihres Gehaltes an Calcium und Strontium zu erkennen, sind im Vergleich zu anderen Proben sehr klein. Daneben finden sich hier noch in Spuren die Metalle Kupfer, Eisen und Zink sowie Nickel und Scandium.

Das Verteilungsmuster für Chlor weicht dabei sowohl von dem aller anderen Elemente dieser Probe als auch dem anderer Proben ab und ist auf eingetrocknete Salzreste des Seewassermediums zurückzuführen.

Die Zeilen verminderter Intensität im oberen Bereich des Scans sind auf maschinenseitige Probleme zurückzuführen, die kurzzeitig die Strahlage beeinflussten und somit die am Experiment zur Verfügung stehende Intensität verminderten. Außerhalb dieser Zeilen wurde die Messung dadurch nicht beeinträchtigt.

Vergleich der Spezies und Diskussion

Vergleicht man die adhärenenten Strukturen der Art *Balanus improvisus*, so erkennt man, dass die drei Bestandteile Cypriszeitung, adhärenente Basalmembran und Wandplattenfragmente prinzipiell schon ab dem zweiten Tag nach erfolgreichem Siedeln auf dem Substrat nachgewiesen werden können. Während der Cypriszeitung aufgrund seiner bekanntermaßen starken Adhäsion in jeder Probe zu finden ist, fehlen die beiden weiteren Bestandteile in manchen Proben vollständig oder teilweise. Es ist davon auszugehen, dass diese bei der Probenpräparation zusammen mit der juvenilen Seepocke entfernt wurden.

In Proben der Art *Balanus amphitrite* wurden, bei insgesamt kleinerer Datenbasis, auf dem Kapton[®]-Substrat neben dem Cypriszeitung nur einmal Reste von Basalmembran und Wandplatten nachgewiesen.

Für Proben beider Arten und aller Entwicklungsstadien gilt, dass die elementare Zusammensetzung der vorhandenen Strukturen identisch ist. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über das Vorkommen der Elemente in den drei adhärenenten

3. Ergebnisse und Diskussion

Bestandteilen. Eine Sonderrolle spielt dabei Chlor, da es, im Gegensatz zu allen übrigen analysierten Elementen, die stets den drei Merkmalen zugeordnet werden konnten, auch scheinbar willkürlich über das Substrat verteilt nachgewiesen wurde, z.B. zu sehen in den Abbildungen 3.6a, 3.9b, 3.7a und 3.10. Dies deutet darauf hin, dass die Proben neben Chlor in Zement und Gewebe der Seepocken auch Chloridrückstände des Seewassermediums enthielten, die beim Trocknen auf dem Kapton-Substrat auskristallisierten.

Element	Cypriszement	Basalmembran	Wandplatten
Br	++	0	- bis 0
Cl	++	+	0 bis ++
S	++	+	+ bis ++
Cu	++	0	- bis 0
Fe	+	++	0 bis +
Zn	+ bis ++	+ bis ++	0
Se	++	0 bis +	- bis 0
Sc	+ bis ++	0	++
Ni	0 bis +	0	++
Ca	-	0	++
Sr	- bis 0	0	++

Tabelle 3.5.: Elemente in den auf Kapton[®]-Folie hinterlassenen adhärennten Rückständen juveniler Seepocken. Um das Vorkommen elementweise zu quantifizieren, wurden diese Kategorien verwendet: Element zeigt in diesem Bereich die höchste Intensität (++), Element zeigt in diesem Bereich eine niedrigere Intensität als in einem anderen (+), Element in Spuren nachweisbar (0), Element hier nicht nachweisbar (-).

Cypriszement Diese Übersicht verdeutlicht, dass die ersten Hinweise auf Brom und Zink im Zement der Cyprislarve aus den konfokalen *In-vivo*-Messungen (Kap. 3.1.2) bestätigt werden konnten. Des Weiteren wurde in allen Proben im

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Zement erhöhte Konzentrationen an Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink, Selen und Scandium nachgewiesen. Nickel wurde dort ebenfalls detektiert, jedoch in einigen Proben nur in Spuren. Strontium konnte, wenn überhaupt, nur in Spuren nachgewiesen werden.

Der Kupfergehalt kann möglicherweise erklärt werden durch die Anwesenheit von kupferhaltigen Enzymen: Walker konnte in den Zementdrüsen der Cyprislarven von *Balanus balanoides* (mittlerweile als *Semibalanus balanoides* klassifiziert) neben Proteinen und Phenolen auch eine kupferhaltige Polyphe-noloxidase nachweisen, was ihn zu der Hypothese führte, dass der Zement aus gegerbten Proteinen besteht [Walker, 1971].

Das Vorkommen von Zink im Zement kann mit einer Zink-Metalloprotease in Verbindung gebracht werden, die im Balanoiden *Chthamalus fragilis* beschrieben [Dougherty, 1996] und später als Zink-Exoprotease mit Präferenz für die Carboxy-Enden einfacher Aminosäuren identifiziert wurde [Dougherty, 1997].

In der Literatur finden sich jedoch keine Hinweise auf Bestandteile des Zements, die die stets vorhandenen Bromkonzentrationen erklären könnten.

Basalmembran In der Basalmembran, wo vorhanden, fanden sich alle Elemente zumindest in Spuren. Chlor, Schwefel, Eisen, Zink und Selen zeigten auch höhere Konzentrationen.

Wandplattenfragmente Neben Schwefel in schwankender Konzentration weisen die Fragmente der Wandplatten im Vergleich stets die höchsten Konzentrationen an Scandium, Nickel, Calcium und Strontium auf. Es ist bereits bekannt, dass Strontium während des Wachstums der Wandplatten in deren Calciumcarbonat-Matrix integriert wird [Wilbur u. LeFurgey, 1995; Hockett u. a., 1997]. Das Vorkommen von Nickel und Scandium in den Wandplatten der Seepocken wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

3. Ergebnisse und Diskussion

Quantitative Abschätzung

Auch für diesen Probenotyp sollen die gemessenen Intensitäten der Röntgenfluoreszenzsignale quantifiziert werden, um so die Materialmengen in den Proben abschätzen zu können. Für die Messungen kam ein Vitus SDD 80 mm² (Ketek, München) als Röntgenfluoreszenzdetektor zum Einsatz. Dessen größere aktive Fläche – gegenüber dem zuvor verwendeten Modell Vortex 90EX[®] (Hitachi High-Technologies Science America, Northridge, CA, USA) – und damit auch dessen höhere Sensitivität wurden bei der Abschätzung berücksichtigt. Die übrigen Parameter stimmen mit den bereits in Kap. 3.1.1 beschriebenen überein. Aufnahmen der untersuchten Proben mit einem konfokalen Mikroskop haben gezeigt, dass die Dicke der adhäsiven Überreste auf dem Kapton stark schwankt, jedoch allgemein $\leq 10 \mu\text{m}$ ist. Aus diesem Grund werden die Fluoreszenzintensitäten für diesen Probenotyp als maximale Flächendichten ρ_{max} abgeschätzt (Tab. 3.6), die somit den maximalen Intensitäten der in diesem Kapitel gezeigten Intensitätsverteilungen entsprechen.

Element	ρ_{max} in ng mm ⁻²
Br	29±12
Cl	15±6
S	73±31
Cu	0,11±0,05
Fe	0,34±0,15
Zn	0,17±0,07
Se	0,11±0,05
Sc	13±6
Ni	1,8±0,8
Ca	1400±600
Sr	7,4±3,2

Tabelle 3.6.: Quantifizierung der Fluoreszenzsignale, die in *In-situ*-Proben der Seepockenklebstoffe detektiert wurden. Da dieser Probenotyp allgemein eine geringe Dicke ($d \leq 10 \mu\text{m}$) aufweist, werden die Intensitäten als Flächendichten angegeben statt als Volumendichten, wie bei den bisher diskutierten Probenotypen.

3.1.4. Diskussion der Elementverteilungen in Seepocken

Im Falle juveniler Seepocken gelang eine Zuordnung aller Elementkonzentrationen zu anatomischen Strukturen. Es konnte die frühere Hypothese der Beteiligung des Mantelepithelgewebes an der Osmoregulation und Bereitstellung von Calciumionen für die Biomineralisation der Wandplatten *in vivo* bestätigt werden. Ebenso wurde die zuvor beobachtete Anreicherung der Metalle Kupfer, Zink und Nickel im Bereich des Verdauungstraktes bestätigt. Zusätzlich konnte dort durch die Experimente eine Anreicherung der Elemente Eisen und Arsen ermittelt werden. In den Wandplatten wurde neben den dort bekannten Metallen Strontium und Mangan auch Nickel nachgewiesen, sowie Kalium und Chlor. Es wurde somit erstmals gezeigt, dass die Anwendung von synchrotronbasierter RFA auf *In-vivo*-Proben von Seepocken geeignet ist, in diesen die Elementverteilung innerhalb verschiedener Strukturen zu ermitteln. Zusätzlich lieferte sie erste Hinweise auf Brom im Zement der Cyprislarve. Diese Methode war jedoch aufgrund der fehlenden Tiefenauflösung nicht geeignet, diese Bromkonzentration zweifelsfrei dem Zement zuzuordnen.

Die anschließenden konfokalen *In-vivo*-Messungen an adhärierten Cyprislarven boten eine Tiefenauflösung von unter 20 µm, und konnten Hinweise auf Brom und Zink im Cypriszement teilweise bestätigen. Desweiteren wurde eine bisher nicht bekannte, starke Bromkonzentration in der chitinösen Carapax der Larve beobachtet. Aufgrund der außerordentlich zeitintensiven Experimente, bedingt durch den konfokalen Aufbau, erlaubte dieser experimentelle Ansatz es jedoch nicht, eine größere Anzahl an Proben zu untersuchen.

Die Untersuchung der auf Kapton[®]-Folien nach Entfernung der juvenilen Seepocken hinterlassenen adhären Strukturen ermöglichte letztendlich, die elementare Zusammensetzung des Cypriszements für eine größere Anzahl an Proben zu ermitteln. Neben Metallen wie Kupfer und Zink, die mit Enzymen in Verbindung gebracht werden können, deren Existenz im Cypriszement bekannt ist, wurden weitere, bisher dort nicht beschriebene Elemente nachgewiesen: Brom, Eisen, Selen und Scandium wiesen im Cypriszement stets deutlich erhöhte Konzentrationen auf.

3. Ergebnisse und Diskussion

Besonders bemerkenswert erscheint der Nachweis von Brom in verschiedenen Strukturen der Seepocke und ihrer Larve, da bisher noch keine bromhaltigen Verbindungen in einem Vertreter der Rankenfüßer beschrieben wurden. Eine Anreicherung dieses Elements konnte hier im Carapax der Cyprislarve und in ihrem Zement nachgewiesen werden, sowie in den Wandplatten und Cirri juveniler Seepocken. In Anbetracht der stetig wachsenden Anzahl bekannter biogener Organohalogene (2003 waren bereits über 3800 bekannt [Gribble, 2003]), deren vielfältige Funktionen erst langsam entschlüsselt werden, liegt die Vermutung nahe, dass auch die in den Seepocken beobachteten Bromanreicherungen auf biogene Organobromide zurückzuführen sind. Je nach Lokalisierung sind verschiedene Funktionen dieser Verbindungen in Anlehnung an bereits bekannte Beispiele denkbar:

- Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen von bromhaltigen Verbindungen im Bereich der Schale geben Buckeridge und Reeves. Die von ihnen in *Chaetolepas calcitergum*, einem weiteren Vertreter der Infraklasse der Rankenfüßer, beobachteten hohen Bromkonzentrationen im Weichteilgewebe unterhalb der Wandplatten deuteten sie als Bestandteil eines Abwehrmechanismus gegenüber Fressfeinden [Buckeridge u. Reeves, 2009].
- Ebenso denkbar ist die Vermeidung des Aufeinander Sitzens, welches bei *Balanus improvisus* tatsächlich nur in Ausnahmefällen vorkommt [Luther, 1987], mittels einer bromierten Verbindung. Eine solche Antifouling-Wirkung gegenüber *Balanus improvisus* ist beispielsweise für das vom Schwamm *Agelas mauritina* zu diesem Zweck sekretierte Mauritamin (Abb. 3.11) belegt [Tsukamoto u. a., 1996].
- In der Carapax der Cyprislarve könnten Bromverbindungen das zunächst elastische Chitin durch Unterstützung der Quervernetzung aushärten. Ein Beispiel hierfür findet man im chitinösen Skelett verschiedener Hornkieselschwämme [Ehrlich u. a., 2010]. Daneben erscheint aber auch die Abwehr von Fressfeinden mit Bromverbindungen durch die Cyprislarve möglich.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

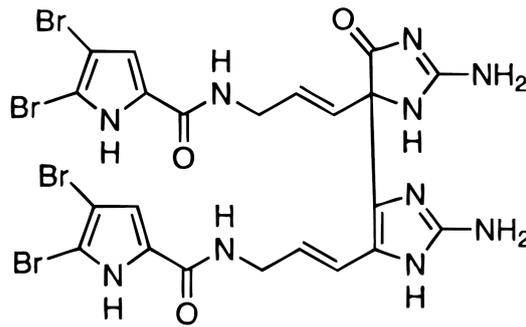


Abbildung 3.11.: Strukturformel des biogenen Mauritiamins. Dieses Organobromid sekretiert der Schwamm *Agelas mauritina*, um eine Besiedelung durch Balaniden abzuwehren. Übernommen aus Gribble [1998].

- Der Nachweis erhöhter Bromkonzentrationen im Cypriszeitung deutet auf eine Beteiligung bromhaltiger Verbindungen beim Aushärten des Zements hin und weist somit den Weg für neue Forschungsansätze in dieser Richtung.

Zusätzlich erscheint neben dem Nachweis von Selen im Cypriszeitung vor Allem die Konzentration von Scandium in dieser Substanz bemerkenswert, da diesem Element bisher generell jegliche biologische Funktion abgesprochen wurde. Insbesondere ist der erstmalige Nachweis der Elemente Brom, Selen und Scandium im Cypriszeitung geeignet, die weitere bio-chemische Erforschung dieses bemerkenswerten Adhäsivs in neue Richtungen zu lenken, um das Verständnis seiner Funktionsweise voranzutreiben.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1.5. *In-vivo*-RFA-Messungen an *Ficopomatus enigmaticus*

Um die Eignung von synchrotronbasierter Röntgenfluoreszenzanalyse zur Untersuchung der elementaren Zusammensetzung von Röhrenwürmern sowie ihrer Röhren und Adhäsive zu testen, wurden *In-vivo*-Proben des Röhrenwurms *Ficopomatus enigmaticus* (Kap. 2.2.2) bei ANKA mit dem nicht-konfokalen Experimentaufbau am FLUO-Strahlrohr (Kap. 2.3.1) untersucht. Die Proben für diese Experimente wurden von Dr. Regina Gabilondo zur Verfügung gestellt. Für die Messungen wurde dieselbe Probenumgebung wie für die Experimente mit Seepocken verwendet (Kap. 2.2.1). Nach dem erfolgreichen Siedeln der pelagischen Larve auf einer 8 μm dicken Kapton[®]-Folie wuchs der Wurm bis zum Zeitpunkt der Messungen auf eine Länge von ungefähr 500 μm heran, während seine Röhre bei einem maximalen Durchmesser von 170 μm bereits eine Länge von knapp 1100 μm erreicht hatte.

Die in einem *In-vivo*-Experiment bestimmten Elementverteilungen, die – unter Vernachlässigung der Absorption innerhalb der Probe – einer Projektion der Volumendichten entsprechen, sind in Abb. 3.12 dargestellt.

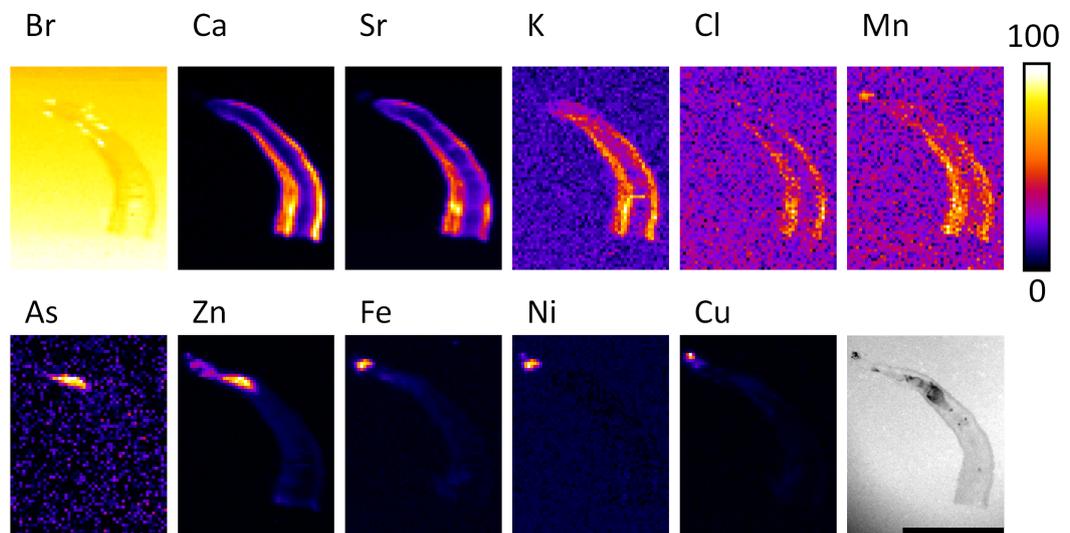


Abbildung 3.12.: *In vivo* gemessene Intensitätsverteilung der Elemente eines Röhrenwurmes der Art *Ficopomatus enigmaticus*. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 500 μm .

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Betrachtet man die Verteilungen der Elemente, so erkennt man in der Röhre neben dem erwartungsgemäß intensiven Calciumsignal auch eine Anreicherung der Elemente Strontium, Kalium, Chlor und Mangan sowie Spuren von Zink, Eisen und Kupfer.

Am spitz zulaufenden Ende der Röhre sind Mangan, Zink, Eisen, Nickel und Kupfer angereichert. Da der Wurm über eine Öffnung der Röhre an diesem Ende seine Exkremeente entsorgt, sind diese vermutlich die Ursache für die erhöhten Konzentration der genannten Metalle an dieser Stelle.

Im Wurm selbst, welcher sich während der Messung an das posteriore Ende seiner Röhre (in Abb. 3.12 oben) zurückgezogen hatte, wurden die stärksten Signale von Zink und Arsen detektiert.

Brom dagegen zeigt ein von allen übrigen Elementen abweichendes Verteilungsmuster. Die im gesamten Bereich konstant hohe Signalstärke ist auf den Bromidgehalt des Seewassermediums zurückzuführen. Man erkennt eine Abschwächung des Signals im Bereich der Röhre, bedingt durch die – verglichen mit dem Medium – stärkere Absorption durch das Calciumcarbonat (Abb. 2.30, S. 51). Auffällig sind jedoch mehrere Bereiche im oberen Drittel der Röhre, die gegenüber der Umgebung deutlich erhöhte Bromkonzentrationen aufweisen. Tanur u. a. [2010] konnten bereits für *Hydroides dianthus*, eine weitere Art aus der Familie der Kalkröhrenwürmer (Serpulidae) nachweisen, dass sich das Adhäsiv, welches der Wurm nutzt, um seine Röhre auf das Substrat zu kleben, von dem Material der Röhre in seiner Zusammensetzung unterscheidet. Die Lokalisierung der hier beobachteten Bromanreicherungen spricht dafür, dass diese ebenfalls diesem Adhäsiv zuzuschreiben sind. Obwohl ein einzelner Datensatz nicht geeignet ist, die Frage nach der elementaren Zusammensetzung des Adhäsivs in *Ficopomatus enigmaticus* zu klären, motivieren die erfolgreiche erstmalige Anwendung synchrotronbasierter Röntgenfluoreszenzanalyse auf *In-vivo*-Proben von Röhrenwürmern und der erste Hinweis auf erhöhte Bromkonzentrationen in ihrem Klebstoff den weiteren Einsatz der Methode in dieser Fragestellung.

3. Ergebnisse und Diskussion

Quantitative Abschätzung

In Tab 3.7 sind die Konzentrationen angegeben, denen die maximalen Intensitäten in Abb. 3.12 entsprechen. Die Parameter, die zur Abschätzung verwendet wurden, findet man in Kap. 3.1.1. Wie dort bereits erklärt, sind die angegebenen Konzentrationen mit großen Fehlern behaftet und dienen hauptsächlich der Abschätzung der auftretenden Größenordnungen.

Element	ρ_{max} in $\mu\text{g mm}^{-3}$
Br	$0,016 \pm 0,007$
Ca	10 ± 5
Sr	$0,027 \pm 0,011$
Mn	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
K	$0,087 \pm 0,037$
Cl	$0,40 \pm 0,17$
Ni	$(2,9 \pm 1,3) \times 10^{-3}$
Cu	$(6,5 \pm 2,8) \times 10^{-4}$
Fe	$0,024 \pm 0,010$
Zn	$0,015 \pm 0,006$
As	$(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-4}$

Tabelle 3.7.: Maximale Konzentrationen, die in einer *In-vivo*-Proben von *Ficopomatus enigmaticus* detektiert wurden. Die Abschätzung erfolgte unter Annahme homogener Elementverteilungen in einer Wassermatrix.

Vergleicht man die maximalen Konzentrationen, die unter Verwendung des nicht-konfokalen Aufbaus *in vivo* in acht Tage alten Seepocken und im Röhrenwurm detektiert wurden, so stimmen diese für viele Elemente bis auf einen Faktor zwei überein. Größere Abweichungen existieren nur in den Konzentrationen von Brom, Mangan und Kupfer, die in den Seepocken deutlich höhere Werte erreichten. Dagegen ist Nickel das einzige Element, das im Vergleich deutlich höhere Konzentrationen in dem Röhrenwurm erreicht.

3.1.6. RFA-Messungen an Diatomeen

Im vorhergehenden Kapitel wurde der erfolgreiche Einsatz von synchrotronbasierter RFA demonstriert, um die elementare Zusammensetzung von anatomischen Strukturen und Klebstoffen der Seepocke als Beispiel eines typischen Makrofoulers zu bestimmen. Ausgehend von diesen erfolgreichen Experimenten wurde diese Methode auch auf die Kieselalge *Navicula perminuta*, einen verbreiteten Vertreter der Mikrofouler, angewendet. Die bei ANKA am FLUO-Strahlrohr unter Verwendung von fokussierenden Polykapillaren zur Verfügung stehende minimale Fokusgröße im Bereich von 12 μm bis 15 μm war hierfür ungeeignet, da dies der maximalen Ausdehnung der einzelligen Organismen entspricht. Deshalb wurde der Einsatz von refraktiven Röntgenlinsen (CRL, engl. *compound refractive lenses*) getestet, mit denen eine Fokusgröße im Bereich weniger Mikrometer erzielt werden konnte. Bedingt durch die geringe Effizienz dieser Optik wurde der Photonenfluss im Fokus verglichen mit dem Polykapillarfokus um etwa zwei Größenordnungen reduziert, sodass, auch bedingt durch die geringe Probendicke, kein auswertbares Signal detektiert werden konnte.

Um dennoch RFA-Experimente an diesem Probenotyp mit einer Auflösung im Sub- μm -Bereich durchführen zu können, wurden die Experimente bei PETRA III am Strahlrohr P06 durchgeführt. Die leistungsfähige Ausstattung mit einem Undulator als Photonenquelle in Kombination mit einem Kirkpatrick-Baez-Spiegelpaar als Fokusoptyk ermöglicht hier kleine Fokusgröße bei gleichzeitig hohem Photonenfluss. Da P06 eine deutlich höhere Überbuchung als FLUO aufweist, waren Experimente dort nur während einer einzigen Strahlzeit möglich.

Während dieser Strahlzeit wurden getrocknete Diatomeen der Art *Navicula perminuta* untersucht. Die Proben wurden wie in Kap. 2.2.3 beschrieben auf einer 100 nm dicken Siliziumnitridmembran präpariert. Abb. 3.13 zeigt die Intensitätsverteilungen aller Elemente, die in der Probe detektiert werden konnten. Im untersuchten Bereich befinden sich drei Organismen. Für die Darstellung wurde in diesem Fall – im Gegensatz zu allen sonstigen in dieser Arbeit gezeigten Elementverteilungen – eine logarithmische Intensitätsskala gewählt,

3. Ergebnisse und Diskussion

um die enorme Schwankung der Signalstärken über mehrere Größenordnungen angemessen zu visualisieren. Die große Dynamik wurde erzielt durch die Verwendung eines, im Vergleich zu den bei ANKA vermessenen Proben, äußerst dünnen Substrates, welches die Streuung und damit auch den Signaluntergrund der Röntgenfluoreszenzmessungen minimiert.

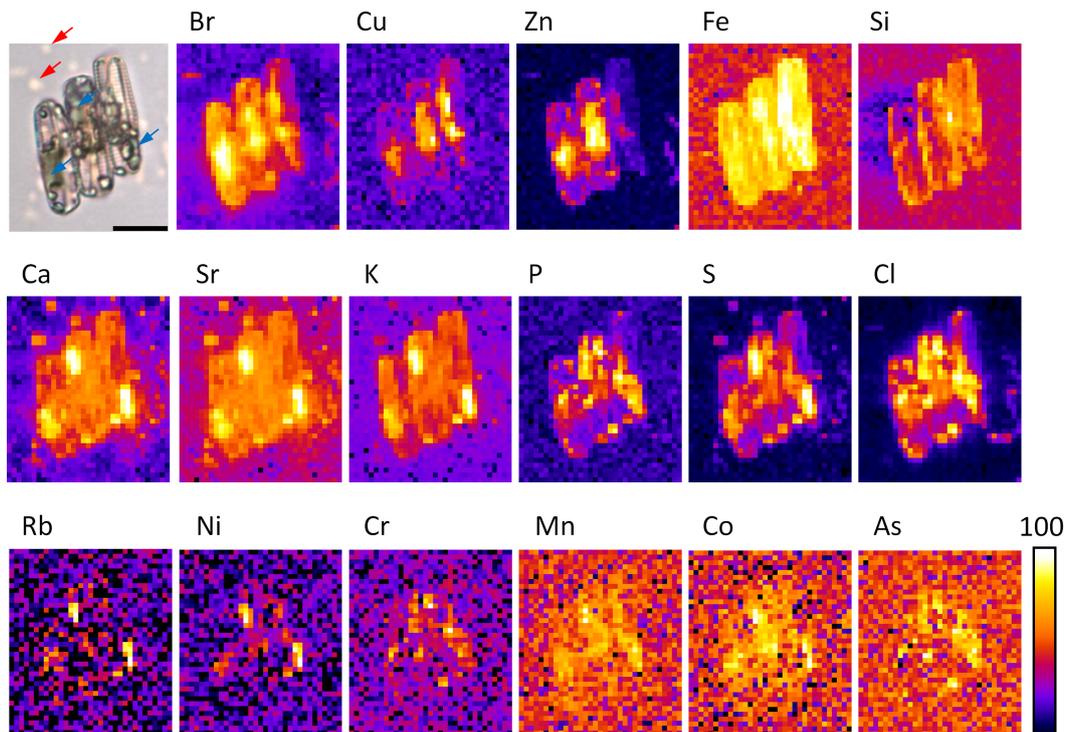


Abbildung 3.13.: RFA-Verteilung: Luftgetrocknete *Navicula perminuta* auf 100 nm dicker Siliziumnitridmembran. Die Intensitätsskala ist logarithmisch. Die roten Pfeile markieren eingetrocknete Rückstände des Kulturmediums auf der Membran, die blauen Pfeile kennzeichnen Rückstände zwischen Alge und Substrat. Der Maßstab im optischen Mikroskopiebild misst 10 μm .

Die Verteilungsmuster zeigen eine deutliche Kolokalisation verschiedener Elemente, welche sich davon ausgehend folgendermaßen gruppieren lassen:

- Brom, Kupfer und Zink zeigen ein Signal im gesamten Bereich der Algen, die höchsten Intensitäten treten jedoch in deren Zentren auf.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

- Eisen und Silizium weisen über die gesamte Projektionsfläche der Zellen eine recht homogene Verteilung auf.
- Calcium, Strontium und Kalium sind ebenfalls in der gesamten Projektionsfläche der Zellen nachweisbar. Zusätzlich sind sie in mehreren punktförmigen Bereichen außerhalb der Algen (rote Pfeile in Abb. 3.13) sowie zwischen Algen und Substrat (blaue Pfeile in Abb. 3.13) nachweisbar. Diese Bereiche enthalten eingetrocknete Rückstände des Kulturmediums.
- Phosphor, Schwefel und Chlor zeigen ein schwaches Signal über die gesamte Projektionsfläche der Zellen und höhere Intensitäten im Bereich der Rückstände des Mediums (rote Pfeile in Abb. 3.13). Nur Schwefel tritt dabei auch in den Rückständen auf der Membran außerhalb der Algen (blaue Pfeile in Abb. 3.13) auf, Phosphor und Chlor jedoch nicht.
- Die Signale von Rubidium, Nickel, Chrom, Mangan, Cobalt und Arsen liegen ausnahmslos nur knapp über der Nachweisgrenze. Intensitäten über dem Signaluntergrund erkennt man nur an den drei Stellen, an denen sich Rückstände des Mediums zwischen Alge und Substrat befinden (blaue Pfeile in Abb. 3.13).

3.1.7. Quantitative Abschätzung und Diskussion

Für die quantitative Abschätzung wurden folgende Parameter zugrundegelegt: Photonenfluss im Fokus $(1,0 \pm 0,3) \times 10^{11}$ Photonen/s, Abstand der Probe zum Detektor (40 ± 10) mm, aktive Fläche des Detektors 100 mm^2 .

Um die Absorption des Fluoreszenzsignals auf dem Weg zum Detektor zu modellieren, wurden neben der Strecke in Luft bei Standardbedingungen auch ein $25 \mu\text{m}$ dickes Berylliumfenster vor dem Detektor berücksichtigt. Da die Probe dem Detektor zugewandt montiert und gemessen wurde, muss keine Absorption des Fluoreszenzsignals aufgrund des Probensubstrats berücksichtigt werden. In Tab. 3.8 sind die maximalen Flächendichten aller in der Probe detektierten Elemente angegeben. Diese entsprechen den maximalen Signalintensitäten der in Abb. 3.13 dargestellten Verteilungen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Element	ρ_{max} in ng mm^{-2}
Br	$1,7 \pm 0,7$
Cu	$0,065 \pm 0,026$
Zn	$0,75 \pm 0,30$
Fe	$0,090 \pm 0,036$
Si	700 ± 280
Ca	140 ± 60
Sr	$3,8 \pm 1,5$
K	39 ± 16
P	130 ± 52
S	360 ± 145
Cl	950 ± 380
Rb	$0,018 \pm 0,007$
Ni	$0,029 \pm 0,012$
Cr	$0,079 \pm 0,032$
Mn	$0,036 \pm 0,015$
Co	$0,018 \pm 0,007$
As	$0,0046 \pm 0,0018$

Tabelle 3.8.: Maximale Flächendichten der Elemente, die in einer dehydrierten Probe von *Navicula perminuta* detektiert wurden. Diese entsprechen den maximalen Signalintensitäten in Abb. 3.13. Elemente unterhalb der horizontalen Trennlinie zeigen ein maximales Signal, welches nur knapp über dem Signalthintergrund liegt.

Die Elementverteilungen sind in Tab. 3.9 zusammengefasst. Das Vorkommen einiger Elemente läßt sich anhand der Literatur erklären: Das Siliziumsignal rührt von der Silikatschale her. Es ist außerdem bekannt, dass auch Eisen und Zink in die Schale eingelagert werden [Ellwood u. Hunter, 2000]. Die Funktion von Eisen in Diatomeen ist nicht vollständig geklärt, man weiß jedoch, dass es für sie essentiell ist. Eisenmangel reduziert die Photosyntheseleistung und hemmt das Wachstum [Marchetti u. Harrison, 2007; Greene u. a., 1991].

Es konnte jedoch kein Signal detektiert werden, welches den Sekreten der Kieselalgen zugeordnet werden kann, obwohl es sich bei DESY um eine der

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

brillantesten Synchrotronstrahlungsquellen weltweit handelt. Betrachtet man den in Abb. 3.13 gezeigten Scan sowie seine Parameter (Tab. 3.10), so wird deutlich, dass die Methode der RFA bei diesem Probenotyp an ihre Grenzen stößt. Während der Nachweis von Spurenelementen wie Chrom und Mangan im Bereich der Algen aufgrund der nur noch knapp oberhalb des Signalhintergrunds liegenden Signalstärken gerade noch möglich ist, gelingt – abgesehen von Rückständen des Mediums – kein Nachweis von Elementen außerhalb der Organismen, also dort, wo die Adhäsive der Alge zu erwarten sind. Um die Sensitivität in nennenswertem Umfang zu erhöhen, wäre eine Verlängerung der Integrationszeiten pro Rasterpunkt um mindestens eine Größenordnung notwendig. Allein für einen einzigen kleinen Scan, wie in diesem Beispiel gezeigt, ergäbe sich bereits eine Gesamtmessdauer von mehr als drei Tagen. Da solche Experimentdauern bei den insgesamt nur sehr begrenzt zur Verfügung stehenden Messzeiten an Synchrotronquellen nahezu ausgeschlossen sind, müssen für diesen Probenotyp andere Methoden gewählt werden, um die Fragestellung zu untersuchen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Element	Zentrum	Volumen	Rückstände
Br	++	+	-
Cu	++	0	-
Zn	++	+	-
Fe	-	++	-
Si	-	++	-
Ca	-	+	++
Sr	-	+	++
K	-	+	++
P	-	0	++*
S	-	0	++
Cl	-	0	++*
Rb	-	-	++
Ni	-	-	++
Cr	-	-	++
Mn	-	-	++
Co	-	-	++
As	-	-	++

Tabelle 3.9.: Elemente in drei Organismen der Diatomeenart *Navicula perminuta*. Um die Verteilung der Elemente in den verschiedenen Bereichen zu quantifizieren, wurden diese Kategorien verwendet: Element zeigt in diesem Bereich die höchste Intensität (++), Element zeigt in diesem Bereich eine niedrigere Intensität als in einem anderen (+), Element in Spuren nachweisbar (0), Element hier nicht nachweisbar (-). Mit * sind Elemente markiert, die nur in den Rückständen des Mediums zwischen Alge und Substrat, nicht jedoch abseits der Zellen auftreten. Die Signalstärken der Elemente unterhalb der horizontalen Trennlinie liegen nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

Fokusgröße (FWHM in x und y)	700 nm
Scanschrittweite (in x und y)	700 nm
Scanbereich	$25\ \mu\text{m} \times 29\ \mu\text{m}$
Rasterpunkte	33×38
Integrationszeit pro Punkt	22 s
Scanzeit	$\approx 8\ \text{h}$

Tabelle 3.10.: Parameter des Scans von *Navicula perminuta* (Abb. 3.13) am Strahlrohr P06 bei DESY.

3. Ergebnisse und Diskussion

Motivation zur Verwendung weicher Röntgenstrahlung

Prinzipiell bietet die Röntgenfluoreszenzanalyse eine hohe Sensitivität. Die Untersuchung der Elementzusammensetzung in den Adhäsiven stellt jedoch auch für diese Methode eine große Herausforderung dar. Grund dafür sind die geringen zu erwartenden Konzentrationen der Spurenelemente in den Adhäsiven in Kombination mit mikroskopischen Probenmengen. So hinterlässt beispielsweise *Pinnularia* sp. eine 3 µm breite Spur von lediglich 300 nm Dicke [Higgins u. a., 2000]. Dies resultiert in minimalen absoluten Mengen, deren Nachweis äußerst schwierig ist.

Jede photonenbasierte analytische Methode setzt eine wie auch immer gear-tete Form der Wechselwirkung der Photonen mit dem Probenmaterial voraus. Die Wahrscheinlichkeit dieser notwendigen Wechselwirkung bestimmt die Ab-sorptionslänge der Photonen in Materie. Betrachtet man die Absorptionslänge in Abhängigkeit der Photonenenergie (Abb. 3.14), so erkennt man, dass diese für die im Rahmen der Röntgenfluoreszenzmessungen genutzten 17 keV sowohl für Wasser als auch für dehydrierte Proteine im Bereich eines Zentimeters liegt. Vergleicht man diese Strecke mit der Probendicke von schätzungsweise 300 nm für die Spur einer Kieselalge, so erkennt man, dass fast alle Photonen die Pro-be durchdringen, ohne absorbiert zu werden. Da die Absorptionslänge jedoch näherungsweise exponentiell mit der Photonenenergie ansteigt, liegt es nahe, niedrigere Energien zu wählen, um die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit der Photonen mit dem Probenmaterial zu erhöhen. Im Bereich weicher Röntgen-strahlung, speziell im sogenannten „Wasserfenster“ zwischen den Absorptions-kanten von Kohlenstoff und Sauerstoff, ist es möglich, den chemischen Kontrast der Probe zu nutzen anstelle des elementaren Kontrastes, der mittels Röntgen-fluoreszenzanalyse zugänglich ist. Gleichzeitig entspricht die Absorptionslänge bei diesen Energien im Bereich eines Mikrometers der Ausdehnung der Probe, sodass die Wechselwirkung eines großen Anteils der Photonen mit der Probe sichergestellt ist. Diese Punkte motivierten die Erkundung des Kontrastverhal-tens biologischer Proben bei Verwendung von weicher Röntgenstrahlung aus dem „Wasserfenster“.

3.1. RFA-Experimente mit marinen Foulern

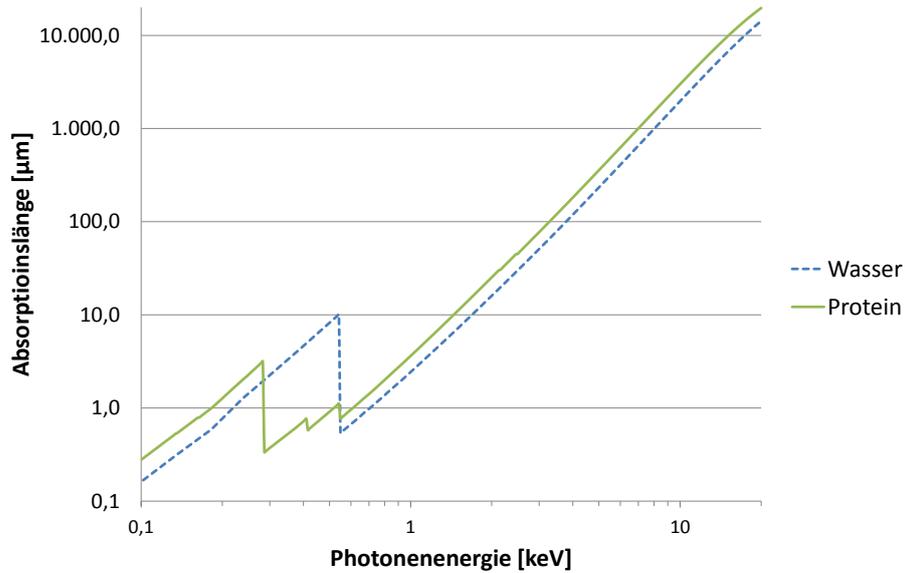


Abbildung 3.14.: Absorptionslängen für Photonen in Protein (grüne Linie)[Perrett, 2007] und Wasser (blau gestrichelte Linie). An den Absorptionskanten von Kohlenstoff (282 eV), Stickstoff (397 eV) und Sauerstoff (533 eV) erkennt man sprunghafte Abfälle der Absorptionslänge in Protein, sobald die Photonenergie die Bindungsenergie eines Elektrons der K-Schale überschreitet. Abbildung erstellt mit Daten aus [Henke u. a., 1993].

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

Um das Kontrastverhalten biologischer Proben bei ptychographischer Röntgenmikroskopie mit weicher Röntgenstrahlung im Bereich des Wasserfensters zu untersuchen, wurden zunächst Experimente mit verschiedenen Probentypen durchgeführt. Dazu gehörten ganze dehydrierte glatte Gefäßmuskelzellen sowie angefärbte Dünnschnitte von Bakterien und Hefezellen sowie ungefärbte Dünnschnitte verschiedener Gewebe der Maus. Zusätzlich wurde eine freistehende Membran auf Basis einer Biphenylthiol-Monoschicht untersucht, um die Eignung als hochtransparentes Probensubstrat zu prüfen. An einer Testprobe aus Polymethylmethacrylat- und Polystyrol-Mikrokugeln wurde chemischer Kontrast zur Unterscheidung verschiedener Bindungszustände des Kohlenstoffs demonstriert.

Die Beleuchtung der Proben wurde durch Lochblenden mit einem Durchmesser von 1 μm oder 2 μm definiert. Die kreisförmigen Blenden wurden unter Verwendung eines FIB (engl. *Focused Ion Beam*) am Institut für Angewandte Materialien am KIT mit Unterstützung von Daniela Exner und Dr. Reiner Mönig hergestellt. Als Substrat wurden mit ca. 2 μm Gold bedampfte Siliziumnitridmembranen (Si_3N_4 , Kantenlänge Rahmen 5 mm, Membran 1 mm, Membrandicke 100 nm, Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) verwendet. Für die ptychographischen Scans wurden die Proben entlang eines rechteckigen Gitters mithilfe von Piezostellischen (P-622.ZCD und P-622.1CD, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Palmbach) abgerastert. Als Schrittweite wurden in den meisten Fällen 40 % des jeweiligen Lochblendendurchmessers gewählt, da ein Überlapp von 60 % einen guten Kompromiss aus Qualität der Rekonstruktionen und Anzahl der benötigten Aufnahmen darstellt [Bunk u. a., 2008]. Die Streubilder wurden mithilfe eines direkt-detektierenden CCD-Detektors (DO/DX-436, Andor Technology Ltd., Belfast, Vereinigtes Königreich, 2048 \times 2048 Pixel, 13,5 μm Pixelabstand, Peltier-gekühlt auf -60°C) aufgenommen.

Für die Rekonstruktion der ptychographischen Datensätze wurde der von Thibault u. a. [2008, 2009] beschriebene Algorithmus verwendet, welcher von

Klaus Giewekemeyer in MATLAB implementiert wurde [Giewekemeyer u. a., 2010].

3.2.1. Kontrast biologischer Proben

Ein entscheidender Vorteil der Röntgenmikroskopie mit weicher Röntgenstrahlung gegenüber der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) besteht in der höheren Eindringtiefe im Bereich mehrerer Mikrometer, die es erlaubt, intakte Zellen zu untersuchen. Dies wurde am Beispiel glatter Gefäßmuskelzellen demonstriert.

Glatte Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (engl. *Vascular Smooth Muscle Cells*, VSMC) sind als Hauptbestandteil der Blutgefäßwände durch gezielte Kontraktion und Relaxation für die Regulierung der Durchblutung und des Blutdrucks verantwortlich. Eine Degeneration dieser Zellen kann zu verschiedenen Erkrankungen wie z.B. der Atherosklerose führen.

Die Proben wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Sophie-Charlotte Gleber, damals am Institut für Röntgenphysik der Universität Göttingen. Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Siliziumnitridmembranen (Si_3N_4 , Kantenlänge Rahmen 5 mm, Membran 1,5 mm, Membrandicke 100 nm, Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) inkubiert. Nach erfolgreichem Aufwachsen wurden diese ohne vorherige Fixierung oder Färbung getrocknet. Eine ausführliche Beschreibung der Probenpräparation findet man in Sedlmair u. a. [2011].

Für die ptychographischen Aufnahmen wurde eine Lochblende von 1 μm Durchmesser verwendet. Die Proben wurde entlang eines rechtwinkligen Gitters mit einer horizontalen Schrittweite von 400 nm und einer vertikalen Schrittweite von 600 nm abgerastert. Die vertikale Schrittweite wurde größer als die horizontale gewählt, um die Anzahl der Scanpunkte und damit die Gesamtdauer der Datenaufnahme zu reduzieren. Wie Bunk u. a. [2008] gezeigt haben, genügt es, einen 60%igen Überlapp in einer Achse zu wählen, um eine stabile Konvergenz des ptychographischen Rekonstruktionsalgorithmus zu erreichen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 193 mm. Für die Rekonstruktion wurden nur die mittleren 512×512 Pixel des Sensors verwendet. Die Nutzung größerer Ausschnitte führte zu einer Verschlechterung der Rekonstruktionen, da die Kamera in den außenliegenden Pixeln aufgrund des begrenzten Dynamikumfangs keine Streusignale der schwach streuenden biologischen Probe detektieren konnte. Zusätzlich wurden die Streubilder vor der Rekonstruktion zweifach gebinnt, um den Rechenaufwand bei der numerischen Rekonstruktion zu reduzieren.

Abb. 3.15 zeigt die ptychographischen Rekonstruktionen zweier unterschiedlicher Bereiche der Probe. Für den in Abb. 3.15a-c gezeigten Bereich wurden Streubilder an 34×17 Positionen bei einer Energie von 517 eV aufgenommen und rekonstruiert. Sowohl in der Darstellung des Absorptions- als auch des Phasenkontrasts erkennt man deutlich verschiedene Bestandteile der Zelle. Zentral im Bildausschnitt erkennt man einen Teil des Zellnucleus mit einer relativ homogenen Transmission von $T_{Nucleus} = 65\%$ und einer Phasenverschiebung gegenüber dem Bereich außerhalb der Zelle von $\Delta\varphi_{Nucleus} = -0,8$ rad. Die Transmission im Bereich außerhalb der Zelle beträgt dagegen $T_{Membran} = 93\%$. Innerhalb des Nucleus erkennt man einen runden Nucleolus mit einem Durchmesser von $1,8 \mu\text{m}$. Er zeigt eine Transmission von $T_{Nucleolus} = 55\%$ und eine relative Phasenverschiebung von $\Delta\varphi_{Nucleolus} = -1,4$ rad. Der Zellkern ist umgeben von einem stark ausgeprägten Cytoskelett aus Aktinfasern. Besonders deutlich erkennt man diese im Phasenkontrast. Links vom Zellkern, wo diese Fasern gebündelt verlaufen, beobachtet man eine minimale Transmission von $T_{Aktinfasern} = 53\%$, was in etwa $T_{Nucleolus}$ entspricht. Der Phasenkontrast ist mit $\Delta\varphi_{Aktinfasern,max} = -2,2$ rad dagegen deutlich stärker. Oberhalb des Zellkerns, wo die Fasern flächig ausgebreitet sind, beträgt der Phasenkontrast noch $\Delta\varphi_{Aktinfasern,min} = -1,3$ rad.

Der in Abb. 3.15d-f dargestellte ptychographische Scan setzt sich aus insgesamt 39×19 Positionen zusammen. Dieser Ausschnitt zeigt ausschließlich ausgebreitete Aktinfasern des Cytoskeletts. Insbesondere im Phasenkontrast erkennt man eine Verstärkung der Fasern an den Rändern und auch dort, wo mehrere Stränge zusammenlaufen, wo also die mechanischen Belastungen ver-

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

mutlich am höchsten sind. Der Phasenkontrast zum Hintergrund erreicht oft Werte von $\Delta\varphi_{Aktinfasern} = -0,6$ rad. Ein Maximum mit $\Delta\varphi_{Aktinfasern,max} = -1,0$ rad wird am rechten Rand erreicht.

3. Ergebnisse und Diskussion

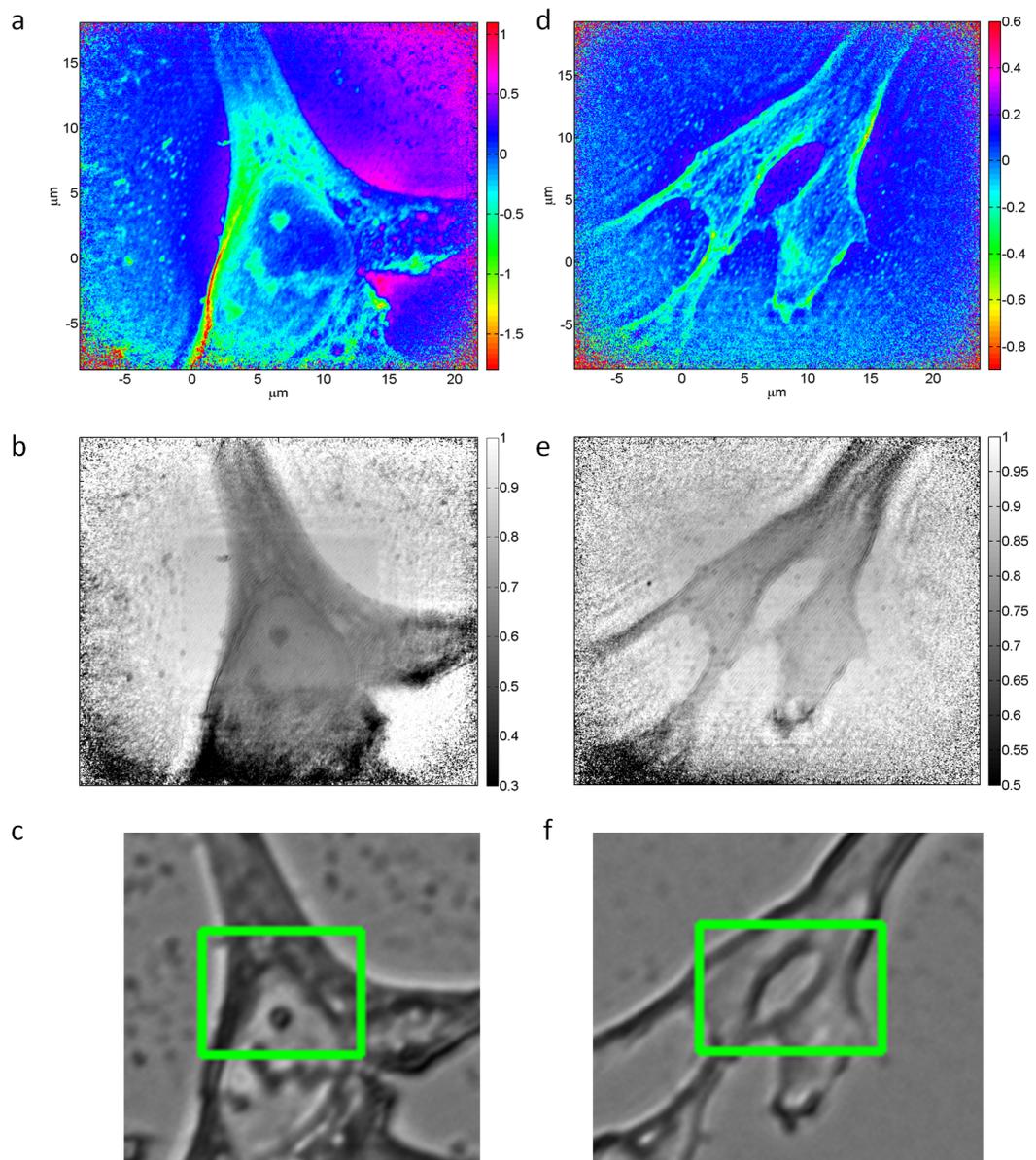


Abbildung 3.15.: Ptychographische Aufnahmen von getrockneten glatten Gefäßmuskulzellen (VCMC) bei einer Energie von 517 eV. Die ptychographischen Rekonstruktionen zeigen die von den Proben verursachte Phasenverschiebung (a,d) und Absorption (b,e). Der abgerasterte Bereich ist in den lichtmikroskopischen Aufnahmen (c,f) grün markiert.

Dünnschnitt von Hefezellen

Die Transmissionselektronenmikroskopie als höchstauflösende Methode in der biologischen Forschung ist auf Proben bis zu einer maximalen Dicke von wenigen hundert Nanometern beschränkt. Da die meisten Zellen diese Dicke überschreiten, existieren etablierte Protokolle zur Anfertigung von Dünnschnitten mit typischen Dicken zwischen 10 nm und 500 nm.

Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ist im Rahmen einer Detoxifikationsstrategie in der Lage, Cadmiumsulfid-Nanopartikel von wenigen Nanometern Größe zu bilden, die durch eine Peptidummantelung stabilisiert werden [Mandal u. a., 2006]. Da sich diese Partikel aufgrund der Halbleitereigenschaften von CdS unter anderem als Quantenpunkte (engl. *quantum dots*, QD) nutzen lassen, versucht man, eine biotechnologische Massenproduktion basierend auf *Schizosaccharomyces pombe* zu entwickeln [Krumov u. a., 2009]. Dr. Frank Kirschhöfer vom Institut für Funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie hat eine Probe dieser Spalthefe in Form eines Dünnschnitts, wie er üblicherweise für TEM verwendet wird, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach der Fixierung mit Uranylacetat und Osmiumtetroxid angefärbt und in ein Epoxidharz (EPONTM, Momentive Specialty Chemicals Inc., Columbus, OH, USA) eingebettet. Anschließend wurden mithilfe eines Ultramikrotoms 200 nm dicke Schnitte der Probe angefertigt und diese auf eine Siliziumnitridmembran (Si₃N₄, Kantenlänge Rahmen 5 mm, Membran 1 mm, Membrandicke 100 nm, Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) transferiert.

Zwei verschiedene Bereiche der Probe wurden mittels ptychographischer Röntgenmikroskopie bei einer Photonenenergie von 517 eV untersucht. Für die in Abb. 3.16a,b gezeigte Aufnahme wurde eine Lochblende von 1 µm Durchmesser verwendet. Der Abstand zwischen Kamera und Probe betrug 182 mm. Die Probe wurde entlang eines kartesischen Gitters mit 18 × 12 Punkten mit einer Schrittweite von 600 nm abgerastert. Für die ptychographische Rekonstruktion wurde ein zentrierter Ausschnitt von 640 × 640 Pixeln verwendet und zweifach gebinnt.

3. Ergebnisse und Diskussion

In der Rekonstruktion der Phasenverschiebung (Abb. 3.16a) der Probe erkennt man keinen Kontrast zwischen dem Cytoplasma, welches den größten Teil der Zellvolumen ausfüllt und dem Epoxidharz, in das die Probe eingebettet ist. Von diesem homogenen Hintergrund heben sich die Zellwand und einzelne Organellen aufgrund der Färbung mit Schwermetallen um $\Delta\varphi_{Zellwand} = 0,1$ rad bis $\Delta\varphi_{Zellwand,max} = 0,22$ rad ab. In der Darstellung des Absorptionskontrasts (Abb. 3.16b) besteht zwischen dem Cytoplasma und dem Einbettungsmedium ebenfalls kein Kontrast, beide weisen eine Transmission von $T_{Hintergrund} = 78\%$ auf. Im Bereich der Zellwand und der bereits im Phasenkontrast sichtbaren Organellen erreicht die Transmission Werte bis $T_{Zellwand} = 83\%$.

Die röntgen- und lichtmikroskopischen Abb. 3.16c-e zeigen einen anderen Bereich derselben Probe, die bereits in Abb. 3.16a,b gezeigt wurde. Bei diesen Aufnahmen kam eine $2\mu\text{m}$ große Lochblende zum Einsatz und es wurde ein kartesisches Gitter mit einer Schrittweite von 800nm , bestehend aus 25×27 Positionen verwendet. Der Abstand zwischen Detektor und Probe betrug 134mm . Von den aufgenommenen Streubildern wurde ein zentrierter Bereich von 640×640 Pixeln verwendet, der vor der Rekonstruktion zweifach gebinnt wurde.

Sowohl in der Darstellung von Phasenkontrast (Abb. 3.16c) als auch Absorptionskontrast (Abb. 3.16d) der Probe erkennt man eine geringere Qualität der Rekonstruktion, verglichen mit dem in Abb. 3.16a,b gezeigten Ausschnitt. Dies ist wahrscheinlich ein Resultat der veränderten Aufnahmebedingungen mit größerer Lochblende und einem größeren Rastergitter. Das Kontrastverhalten ist dennoch ähnlich: Die Zellwände heben sich mit einer maximalen Transmission um $T_{Zellwand} = 93\%$ vom relativ homogenen Niveau für Einbettungsmedium und Cytoplasma $T_{Hintergrund} = 85\%$ ab. Im Phasenkontrast erreichen die Zellwände einen Kontrast gegenüber dem Hintergrund von $\Delta\varphi_{Zellwand} = 0,15$ rad. Bei einem Bereich rechts vom Zentrum handelt es sich wahrscheinlich um einen Einschluss im Epoxidharz, welcher sich durch eine Phasenverschiebung von $\Delta\varphi_{Einschluss} = -0,15$ rad auszeichnet.

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

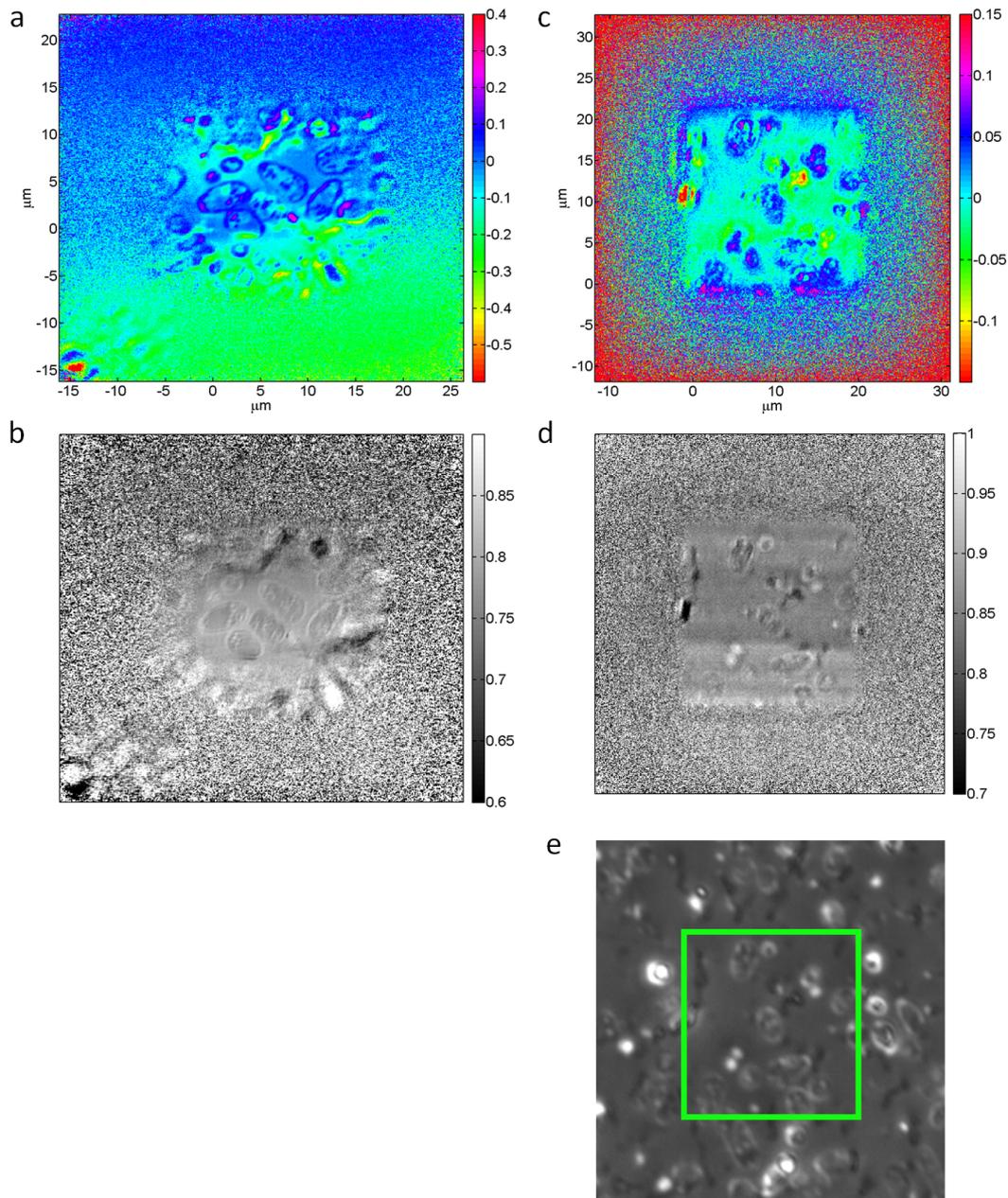


Abbildung 3.16.: Röntgenmikroskopische Aufnahmen bei 517 eV der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* in Form eines 200 nm dicken Dünnschnitts. Die ptychographischen Rekonstruktionen zeigen die von den Proben verursachte Phasenverschiebung (a,c) und Absorption (b,d). Der in (c) und (d) abgerasterte Bereich ist in der lichtmikroskopischen Aufnahme (e) grün markiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Dünnschnitt arsenassimilierender Bakterien

In vielen arsenbelasteten Umgebungen existieren Bakteriengemeinschaften, die die toxische Belastung nicht bloß tolerieren, sondern selbst in den biogeochemischen Arsenkreislauf eingreifen [Stolz u. a., 2006]. Mehrfach wurden bereits arsen-tolerierende Bakterien isoliert, die As(V) zu As(III) reduzieren, so seine Mobilität im Boden erhöhen und eine Gefährdung der Trinkwasserversorgung hervorrufen können [Hamamura u. a., 2012; Wu u. a., 2013]. Andererseits wurden auch aus mongolischen Wüstenböden extrahierte Bakterien beschrieben, welche durch eine Oxidation von As(III) zu As(V) einen gegenteiligen Effekt hervorrufen [Raja u. Omine, 2012], und möglicherweise dazu genutzt werden können, eine Arsenbelastung des Grundwassers zu reduzieren.

Eine Probe einer Bakteriengemeinschaft mit diesen wünschenswerten Eigenschaften wurde von Dr. Frank Kirschhöfer, Institut für funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie zur Verfügung gestellt. Die Probe lag, wie auch die im vorherigen Kapitel beschriebene, in Form eines in Epoxidharz (EPONTM, Momentive Specialty Chemicals Inc., Columbus, OH, USA) eingebetteten Dünnschnitts von 200 nm Dicke vor. Zur Kontrastverstärkung wurde dieser ebenfalls mit Uranylacetat und Osmiumtetroxid angefärbt.

Der Dünnschnitt wurde mit einer 1 μm großen Lochblende entlang eines kartesischen Gitters mit 10×10 Positionen bei einer Schrittweite von 400 nm abgerastert. Der Abstand zwischen Kamera und Detektor betrug 283 mm. Zur Rekonstruktion wurde ein zentrierter Ausschnitt von 512×512 Pixeln verwendet und zweifach gebinnt.

Sowohl im Phasen- (Abb. 3.17a) als auch im Absorptionskontrast (Abb. 3.17b) kann man die Bakterien erkennen. Die durch das Einbettmedium verursachte Phasenverschiebung ist nicht konstant über den abgerasterten Bereich. Die Bakterien heben sich von diesem Hintergrund jedoch gleichmäßig um etwa $\Delta\varphi_{\text{Bakterien}} = 0,15 \text{ rad}$ ab. Sie weisen mit $T_{\text{Bakterien}} = 92 \%$ gegenüber dem Epoxidharz mit $T_{\text{Hintergrund}} = 86 \%$ eine höhere Transparenz auf. Es ist jedoch nicht möglich, innere Strukturen der Organismen aufzulösen.

Freistehende Biphenylthiol-Monoschicht

Aus Biphenylthiol lassen sich auf Oberflächen selbstorganisierende Monoschichten erzeugen, die nach Quervernetzung durch Elektronenbestrahlung als Membran molekularer Dicke vom Substrat abgelöst werden können [Eck u. a., 2005]. Diese Nanomembranen stehen nicht zuletzt deshalb im Fokus der Forschung, da sich aus ihnen durch pyrolytische Zersetzung im Vakuum äußerst dünne oder gar einatomige Graphenlagen herstellen lassen [Turchanin u. a., 2009], für die aufgrund der einzigartigen elektronischen, mechanischen und optischen Eigenschaften Anwendungen in unterschiedlichsten Technologien denkbar sind [Gölzhäuser, 2012].

Um die Eignung als hochtransparentes Probensubstrat für die Röntgenmikroskopie zu testen, wurde eine Probe einer freistehenden Membran auf Basis einer quervernetzten Biphenylthiol-Monoschicht von PD Dr. André Beyer, Institut für Physik supramolekularer Systeme und Oberflächen der Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die Membran wurde über ein hexagonales Kupfer-TEM-Netzchen aufgespannt. Mikrokugeln aus Siliziumdioxid (SiO_2) mit einem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$ wurden aufgebracht, um die Eignung der Monolage als hochtransparentes Probensubstrat zu demonstrieren. Gleichzeitig konnten dank der Mikrokugeln bereits im Voraus die Bereiche des TEM-Netzchens lichtmikroskopisch identifiziert werden, die von der Membran überspannt waren.

Für die Datenaufnahme wurde die Probe mit einer $2\ \mu\text{m}$ großen Lochblende beleuchtet und entlang eines kartesischen Gitters mit 27×26 Positionen und einer Schrittweite von $800\ \text{nm}$ abgerastert. Die Streubilder wurden in einem Abstand von $253\ \text{mm}$ zur Probe detektiert. Zur Rekonstruktion wurden die zentralen 512×512 Pixel der Sensordaten verwendet und zweifach gebinnt.

Abb. 3.17e zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme des abgerasterten Bereichs. Man erkennt, dass das linke, obere Drittel der hexagonalen Wabe nicht von der Membran überspannt ist. Entlang dieser Kante ist die Membran etwa $2\ \mu\text{m}$ weit zurückgeschlagen. In dieser Falte liegen die beiden Mikrokugeln. In der Rekonstruktion der Phasenverschiebung (Abb. 3.17c) erkennt man einen

3. Ergebnisse und Diskussion

Phasenunterschied im Bereich dieser Falte von $\Delta\varphi_{Falte} = -0,15$ rad. Die Monoschicht, die sich rechts davon befindet, verursacht lediglich einen Phasenschub von $\Delta\varphi_{Monoschicht} = -0,05$ rad. Im Absorptionskontrast ((Abb. 3.17d) kann die aufgespannte Monoschicht nicht vom membranfreien Bereich unterschieden werden. Lediglich im Bereich der Falte fällt die Transmission um maximal 4% ab. In der unteren, rechten Ecke wirft die hier intakte Membran eine weitere Falte, die ausschließlich im Phasenkontrast sichtbar wird.

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

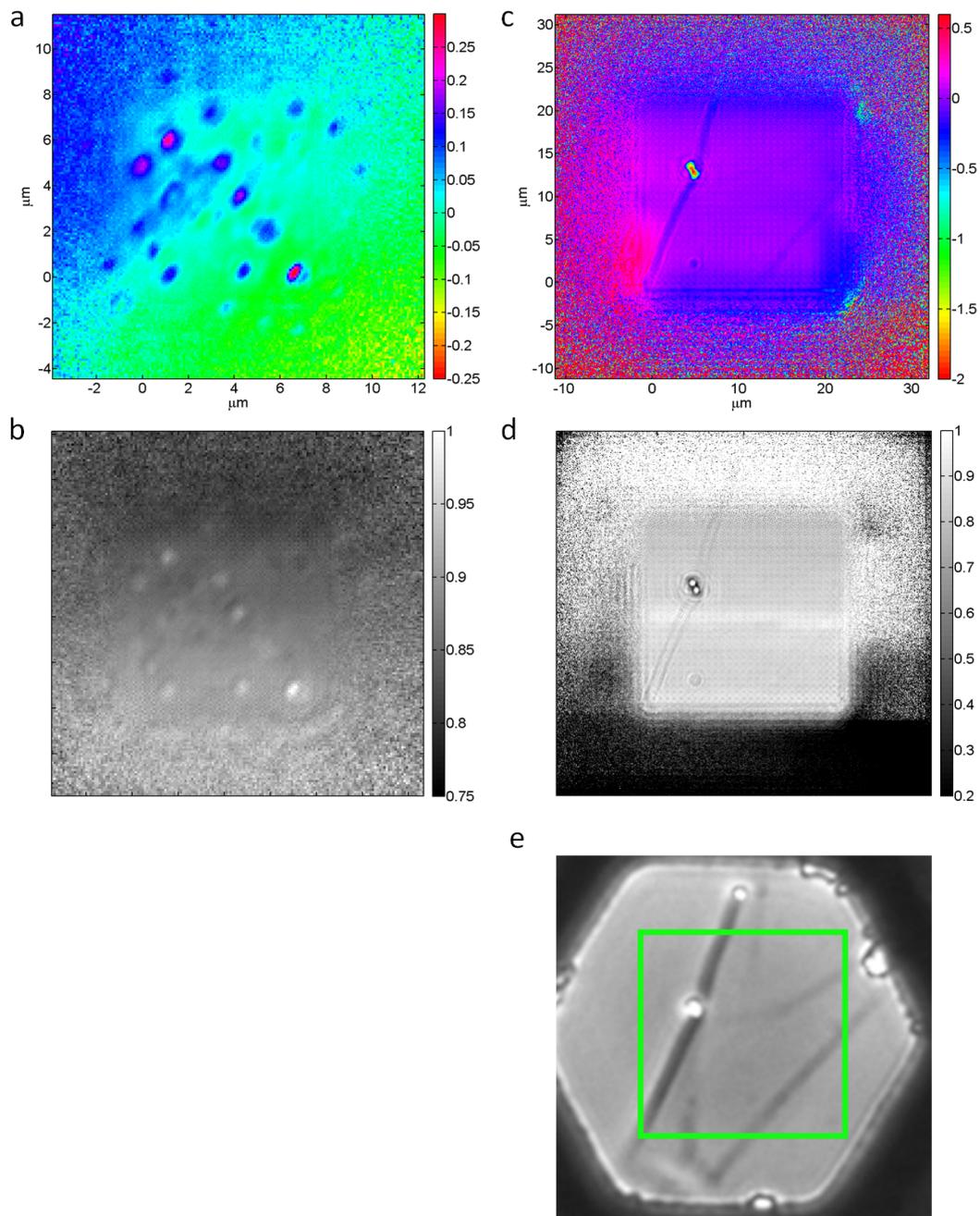


Abbildung 3.17.: Ptychographische Aufnahmen einer Dünnschnittprobe arsenoxidirender Bakterien (a,b) und einer freistehenden Biphenylthiol-Monolage (c-e). Die ptychographischen Rekonstruktionen zeigen die von der Probe verursachte Phasenverschiebung (a,d) und Absorption (b,e). Der abgerasterte Bereich in der lichtmikroskopischen Aufnahme (e) grün markiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Gewebedünnschnitte von Mäusen

Neben den hier gezeigten Probenotypen wurden auch verschiedene Gewebe der Maus untersucht. Die Proben wurden bereitgestellt von Dr. Irene Wacker-Schröder (BioQuant, Universität Heidelberg) als 70 nm und 100 nm dicke Dünnschnitte. Die Proben wurden im Gegensatz zu den hier gezeigten Dünnschnitten nicht mit Schwermetallen angefärbt. In den Rekonstruktionen zeigten diese Proben jedoch weder im Phasen- noch im Absorptionsverhalten einen Kontrast. Diese Art der Probenpräparation für die ptychographische Mikroskopie mit weicher Röntgenstrahlung folglich ungeeignet. Mit Uranylacetat und Osmiumtetroxid angefärbte Dünnschnitte von Hefezellen und Bakterien konnten erfolgreich untersucht werden, allerdings nutzt diese aufwendige Art der Probenpräparation nicht die Vorzüge, die die Röntgenmikroskopie gegenüber der Transmissionselektronenmikroskopie zu bieten hat.

Diskussion

In diesem Kapitel wurden unterschiedliche Arten biologischer Proben beschrieben, die ptychographisch unter Verwendung weicher Röntgenstrahlung untersucht wurden. Um die Eignung der Methode für die verschiedenen Probenotypen zu diskutieren, sind in Tabelle 3.11 der in den jeweiligen Proben beobachtete maximale Phasenkontrast $\Delta\varphi_{\max}$ sowie der über die maximale und minimale Transmission der Probe definierte Michelson-Kontrast $K_M = (T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\max} + T_{\min})$ angeführt. Ungefärbte Gewebedünnschnitt von 70 nm Dicke sind ohne Zweifel ungeeignet, ptychographisch untersucht zu werden, da sie weder Phasen- noch Absorptionskontrast zeigten. Dickere Dünnschnitte mit einer Dicke von 200 nm, die mit Uranylacetat und Osmiumtetroxid angefärbt wurden, konnten hingegen erfolgreich untersucht werden. Sowohl Bakterien als auch Hefezellen zeigten dabei einen ähnlichen Kontrast. Während es bei den Hefezellen möglich war, innere Strukturen aufzulösen, gelang dies bei den Bakterien aufgrund der geringeren Größe nicht. Die Hefezellen zeigten in den Dünnschnitten jedoch keinen Kontrast zwischen dem Zellplasma und dem umgebenden Einbettmedium. Lediglich die Zellwände sowie einzel-

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

ne Organellen konnten, vermutlich aufgrund der Färbung mit Schwermetallen, differenziert werden.

Den mit Abstand stärksten Kontrast aller hier verglichenen Proben zeigten ganze, dehydrierte Zellen. In den Proben der glatten Gefäßmuskelzellen wurde ein maximaler Michelson-Kontrast K_M von 0,274 sowie ein maximaler Phasenkontrast von $\Delta\varphi_{\max}$ von 2,2 rad beobachtet. Auch bei vergleichsweise einfacher Präparation war es möglich, sowohl den Zellnucleus und Zellnucleoli sowie die weit verzweigten Aktinfasern des Cytoskeletts darzustellen.

Probentyp	$\Delta\varphi_{\max}$	K_M
ganze, dehydrierte, glatte Gefäßmuskelzellen	2,2 rad	0,274
ungefärbte Gewebedünnschnitte (70 nm) der Maus	0 rad	0
angefärbte Dünnschnitte (200 nm) einer Spaltheife	0,22 rad	0,045
angefärbte Dünnschnitte (200 nm) einer Bakterienmischung	0,15 rad	0,034

Tabelle 3.11.: Eignung verschiedener Probentypen für die ptychographische Untersuchung. Angegeben sind der maximale, in dem jeweiligen Probentyp beobachtete Phasenkontrast $\Delta\varphi_{\max}$ und Michelson-Kontrast K_M .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dünnschnitte weniger für die ptychographische Untersuchung geeignet sind. Intakte Zellen zeigen dagegen auch ohne eine Anfärbung deutlichen Kontrast sowohl in der Phase als auch in der Absorption. Gleichzeitig ist ihre Präparation, verglichen mit Dünnschnittproben, deutlich einfacher, sodass dieser Probentyp zu bevorzugen ist.

Die Untersuchung einer freistehenden Membran aus einer quervernetzten Biphenylthiol-Monoschicht konnte die Eignung als Probensubstrat bestätigen. Bei einer Energie von 517 eV verursacht eine einfache Monoschicht keinerlei Intensitätsverlust. Gleichzeitig überspannte die Membran zuverlässig die 30 μm großen Waben des TEM-Netzchens.

3.2.2. NEXAFS-Kontrast an der Kohlenstoffkante

Betreibt man Röntgenmikroskopie an monochromatisierten Strahlrohren, so ist es möglich, den NEXAFS-Kontrast der Probe (Kap. 2.1.2) für die Bildgebung zu nutzen, indem man mithilfe des Monochromators die Photonenenergie im Bereich der Absorptionskante variiert. Die lokalen Änderungen der Absorption bei Variation der Energie lassen nun Rückschlüsse auf den chemischen Bindungszustand zu, da dieser die Lage und Ausprägung der Absorptionskante moduliert. Kombiniert man diesen Ansatz mit der Ptychographie, so ist es zusätzlich möglich, den Phasenschub zu rekonstruieren, den die Photonen beim Passieren der Probe erfahren.

Nachdem wir die Nutzung des chemischen Kontrasts in Kombination mit Ptychographie bereits an der Absorptionskante von Sauerstoff (533 eV) demonstriert hatten [Beckers u. a., 2011], wurden ähnliche Experimente nun erstmalig an der Absorptionskante von Kohlenstoff (282 eV) durchgeführt. Messungen im Bereich dieser Absorptionskante sind häufig problematisch, da die optischen Elemente eines Strahlrohrs während des Betriebs durch Kohlenstoffablagerungen kontaminiert werden. Die hohe Absorption durch diese Ablagerungen führt dazu, dass der Photonenfluss an der Kohlenstoffkante stark einbricht [Eggenstein u. a., 2001]. Abhilfe schaffen hier nur regelmäßige Reinigungen der optischen Elemente. Erfreulicherweise fanden wir bei BESSY II am Strahlrohr U49/2-PGM1 [Follath u. a., 2004] einen Zustand vor, der es erlaubte, Experimente an der Kohlenstoffkante durchzuführen.

PMMA-PS-Testproben

Als Testproben wurden zwei verschiedene Arten von Mikrokugeln aus unterschiedlichem Material bei gleicher Größe verwendet. Ein Durchmesser von 2 μm wurde gewählt, da Kugeln dieser Größe einerseits mit dem verwendeten ptychographischen Mikroskopieaufbau gut aufgelöst werden können. Andererseits sind 2 μm eine biologisch relevante Größenskala, da sie der Ausdehnung vieler Zellorganellen entspricht.

Die Mikrokugeln bestanden aus Polymethylmethacrylat (PMMA) (micro-

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

Particles GmbH, Berlin) und Polystyrol (PS) (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim). Es handelt sich hierbei also um zwei Verbindungen, die beide überwiegend aus Kohlenstoff bestehen. Dabei unterscheiden sie sich jedoch hinsichtlich des Bindungszustands des Kohlenstoffs (Abb. 3.18). Während dieser im PMMA nur Einfach- und Doppelbindungen eingeht, liegen im PS neben Kohlenstoffeinfachbindungen auch aromatische Ringe vor. Dieser Unterschied sollte als „chemischer Kontrast“ der Probe dargestellt werden, um so die Mikrokugeln gleicher Abmessungen allein anhand ihrer Zusammensetzung zu unterscheiden.

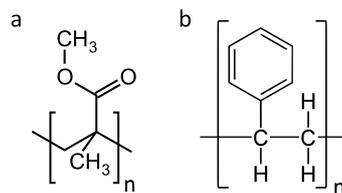


Abbildung 3.18.: Strukturformeln der Monomere von PMMA (a) und PS (b). Die Kohlenstoffatome im PMMA bilden Einfach- und Doppelbindungen aus. Im PS kommt der Kohlenstoff in Einfachbindungen und in aromatischen Benzolringen vor.

Zur Präparation der Proben wurden beide Arten von Mikrokugeln zunächst unter Verwendung eines Ultraschallbades resuspendiert und die beiden Suspensionen mit einem Vortexmischer jeweils gründlich durchmischt. Anschließend wurden jeweils 10 μ L aus beiden Suspensionen entnommen, mit Milli-Q[®]-Wasser etwa 100-fach auf dieselbe Konzentration an Mikrokugeln verdünnt und gemischt. 10 μ L dieser Suspension wurden auf Siliziumnitridmembranen (Si₃N₄, Kantenlänge Rahmen 5 mm, Membran 1 mm, Membrandicke 100 nm, Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Das gewählte Probensubstrat ist sehr homogen und bieten auch bei niedrigen Photonenenergien noch eine akzeptable Transmission von beispielsweise 45 % an der Kohlenstoffkante (berechnet unter Verwendung der Daten aus Henke u. a. [1993]).

Zuletzt wurden die Proben mithilfe eines optischen Mikroskops charakterisiert und Bereiche für die Experimente ausgewählt (Abb. 3.19). Geeignet sind

3. Ergebnisse und Diskussion

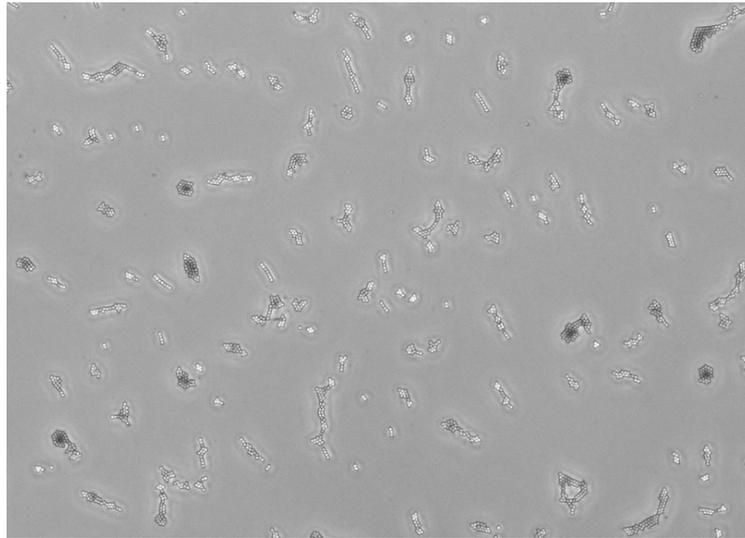


Abbildung 3.19.: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Mischung aus PMMA- und PS-Mikrokugeln mit 2 μm Durchmesser. Während der Trocknung haben sich die Mikrokugeln in Ansammlungen unterschiedlicher Größe abgelagert. In größeren Gruppen, die in dieser Aufnahme dunkler erscheinen, liegen die Kugeln in mehreren Lagen übereinander. Diese Bereiche sind nicht für die Experimente geeignet, da in einer Projektion, wie sie aus den ptychographischen Datensätzen rekonstruiert werden kann, die übereinandergeschichteten Lagen nicht separieren kann.

Bereiche, die beide Arten von Mikrokugeln enthalten und in denen sich die Mikrokugeln nicht in mehreren Lagen übereinander abgelagert haben.

Die ptychographischen Scans (Abb. 3.20a) wurden unter Verwendung eines kartesischen Gitters mit 10×12 Positionen durchgeführt bei einer Schrittweite von 800 nm in jeder Achse. Die Beleuchtung wurde durch eine Lochblende von 2 μm Durchmesser definiert. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 400 mm. Die Photonenenergien der Messungen wurden ausgehend von zuvor mit einer Photodiode gemessenen Transmissionsspektren (Abb. 3.20b) ausgewählt. Aufgrund der geringen Größe der Mikrokugeln konnten diese nicht selbst als Spektroskopieproben verwendet werden. Stattdessen wurden ein 25 μm dicker Polystyrolfilm (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) sowie ein mittels Spin-Coating erzeugter 1 μm dicker PMMA-Film (ALLRESIST GmbH,

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

Strausberg) auf einer 50 nm dicken Siliziumnitridmembran (Silson Ltd., Northampton, Großbritannien) verwendet. Die Spektren der beiden Proben wurden anschließend durch ein Referenzspektrum des Strahlrohrs dividiert, um NEXAFS-Spektren der beiden Proben zu erhalten.

3. Ergebnisse und Diskussion

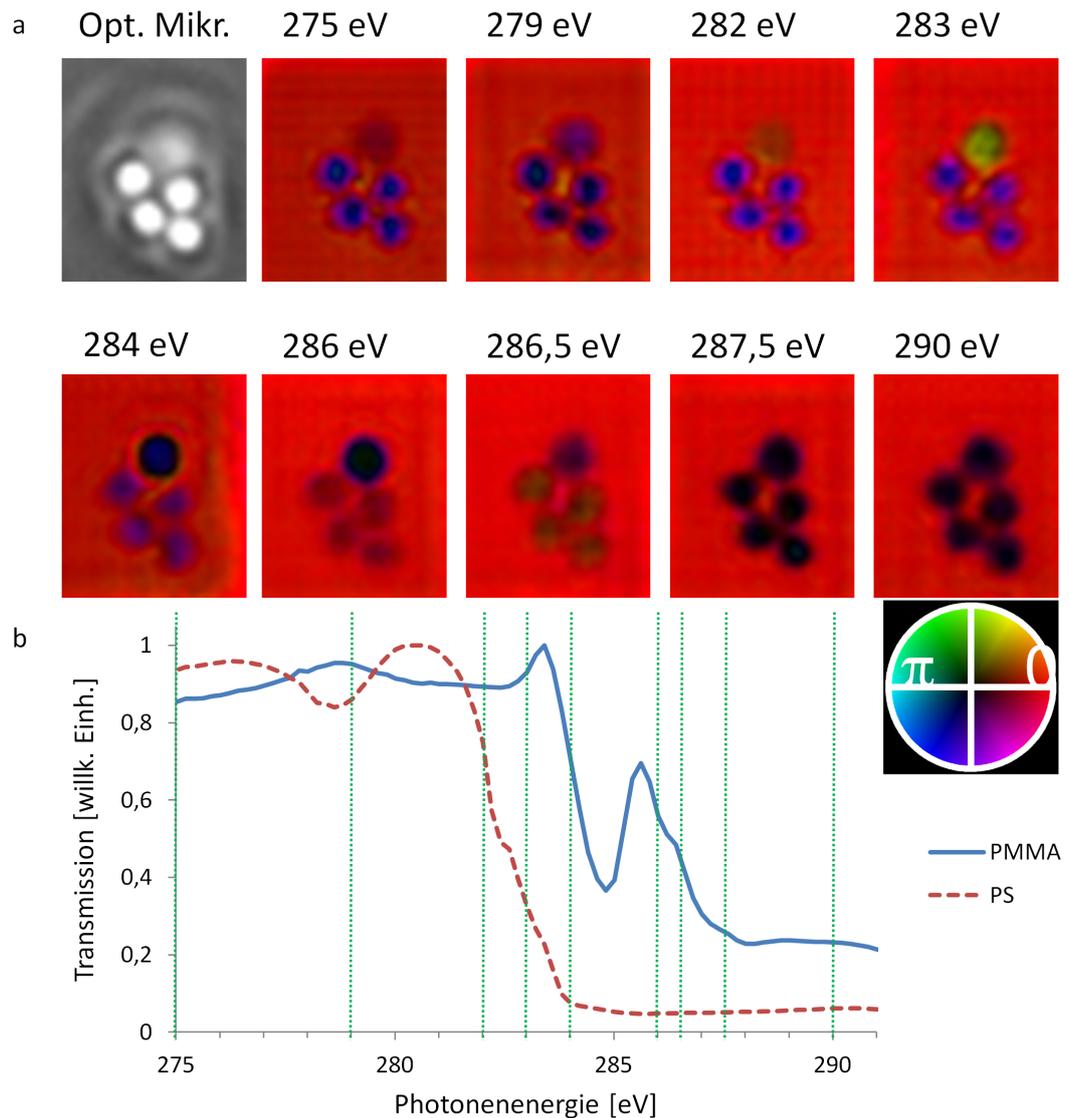


Abbildung 3.20.: Chemischer Kontrast bei ptychographischer Röntgenmikroskopie. Lichtmikroskopisches Bild der Testprobe, bestehend aus einer PS- und vier PMMA-Mikrokugel von $2\ \mu\text{m}$ Durchmesser sowie Rekonstruktionen der bei verschiedenen Photonenergien aufgenommenen ptychographischen Datensätze (a). Die Absorption der Probe ist über die Helligkeit kodiert, die Phasenverschiebung farblich. Am deutlichsten unterscheiden sich die beiden Substanzen als Phasenobjekte. In den Transmissionsspektren der beiden Substanzen (b) sind die Energien markiert, bei denen die in (a) gezeigten Aufnahmen gemacht wurden.

3.2. Ptychographie mit weicher Röntgenstrahlung

Vergleicht man die beiden Spektren, so erkennt man, dass die Position der Kohlenstoffabsorptionskante für PS zu niedrigeren Energien – relativ zu PMMA – verschoben ist. NEXAFS ist sensitiv für unbesetzte Elektronenzustände. Im Spektrum von PS wird die Lage der Absorptionskante deshalb durch den Übergang im Phenylring $C1s \rightarrow \pi_{C=C}^*$ dominiert, im Falle von PMMA ist es der Übergang $C1s \rightarrow \pi_{C=O}^*$ in der Carbonylgruppe. Araki u. a. [2006] geben eine Energie von 285,2 eV für den Übergang in PS sowie 288,4 eV für den Übergang in PMMA an (Abb. 3.21). Im in Abb. 3.20b gezeigten Spektrum sind beide Absorptionskanten um knapp 2 eV zu niedrigeren Energien verschoben. Diese Abweichung ist auf eine fehlerhafte Energiekalibrierung des Strahlrohrs zurückzuführen. Um trotz dieser unsicheren Kalibrierung Photonenenergien im Bereich um die Absorptionskante auszuwählen, wurden die Photonenenergien für die ptychographischen Messungen aus den unmittelbar zuvor am selben Strahlrohr gemessenen Spektren bestimmt.

Abb. 3.20a zeigt die ptychographischen Rekonstruktionen bei ansteigenden Photonenergien. Man erkennt, dass unterhalb der jeweiligen Absorptionskante die Transmission der Mikrokugeln deutlich niedriger ist als oberhalb. So fällt sie für PS von $T_{PS}(283 \text{ eV}) = 0,5$ auf $T_{PS}(284 \text{ eV}) = 0,3$, für PMMA von $T_{PMMA}(286,5 \text{ eV}) = 0,45$ auf $T_{PMMA}(287,5 \text{ eV}) = 0,1$. Gleichzeitig ändert sich das Vorzeichen der Phasenverschiebung. Im Fall der PS-Mikrokugel fällt sie von $\varphi_{PS}(283 \text{ eV}) = +1,9 \text{ rad}$ auf $\varphi_{PS}(284 \text{ eV}) = -1,2 \text{ rad}$, während bei den PMMA-Mikrokugeln ein Sprung von $\varphi_{PMMA}(286,5 \text{ eV}) = +1,1 \text{ rad}$ auf $\varphi_{PMMA}(287,5 \text{ eV}) = -1,4 \text{ rad}$ vorliegt.

Der Vorzeichenwechsel der Phasenverschiebung bei Überschreiten der Absorptionskante wird durch den Verlauf des dispersiven Anteils δ (Abb. 3.21b) des komplexen Brechungsindex $n = 1 - \delta - i\beta$ verursacht. Dieser ändert an der Absorptionskante ebenfalls sprunghaft das Vorzeichen gemäß den Kramers-Kronig-Beziehungen [Kronig, 1926], da dort der absorptive Anteil β ein Maximum aufweist.

Wenngleich man bei dieser Probe PS- und PMMA-Mikrokugeln auch allein anhand der Transmissionsunterschiede bei Überschreiten der Absorptionskante identifizieren könnte, so zeigt die zusätzlich verfügbare Phaseninformation doch

3. Ergebnisse und Diskussion

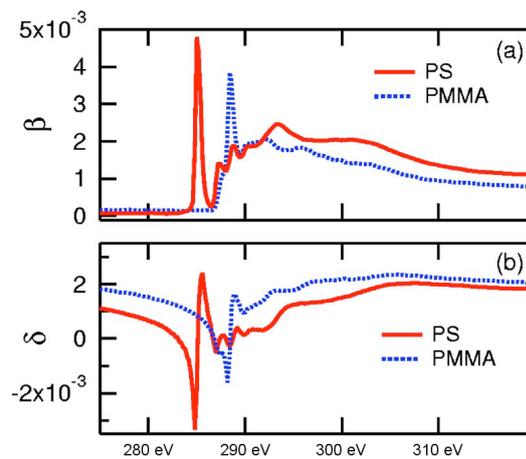


Abbildung 3.21.: Verlauf des imaginären (a) und reellen Anteils (b) des komplexen Brechungsindex $n = 1 - \delta - i\beta$ von PS und PMMA im Bereich der Absorptionskante von Kohlenstoff. Modifiziert aus Araki u. a. [2006].

einen stärkeren Kontrast.

3.3. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten

Röntgenmikroskopie mit Zonenplatten ist im Gegensatz zu linsenlosen Methoden prinzipiell in der Auflösung beschränkt aufgrund der zu maximal zu erreichenden Präzision bei der Herstellung der Zonenplatten, welche direkt die Auflösung bestimmen. Zusätzlich ist die in der Probe deponierte Strahlendosis aufgrund der niedrigen Effizienz der Abbildung hoch, verglichen mit linsenlosen Verfahren wie beispielsweise der In-line-Holographie [Rosenhahn u. a., 2009; Gorniak u. a., 2011]. Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung von Zonenplatten ist dagegen der Verzicht auf rechenintensive Rekonstruktionsalgorithmen und damit auch die Möglichkeit der direkten Beurteilung der Qualität der Aufnahmen, wodurch Experimente durch Reaktionen auf erste Ergebnisse insgesamt effizienter durchgeführt werden können.

Erste Experimente mit unserer Streukammer HORST [Staier, 2009] zur Röntgenmikroskopie mit Objektivzonenplatten wurden deshalb am Strahlrohr U49/2-PGM1 [Follath u. a., 2004] der Synchrotronstrahlungsquelle BESSY II durchgeführt.

3.3.1. Abbildungsordnungen

Durch die Variation des Abstands zwischen Probe und Objektiv-Zonenplatte ist es möglich, die in unterschiedlichen Abbildungsordnungen erzeugten Bilder zu fokussieren (Abb. 3.22). Man erkennt, dass mit steigender Abbildungsordnung die Vergrößerung wächst. Gleichzeitig sinkt die Effizienz der Abbildung, sodass die abfallende Helligkeit durch längere Belichtungszeiten ausgeglichen werden muss.

Die Verwendung höherer Ordnungen ist geeignet, die mit einer gegebenen Zonenplatte erreichbare Auflösung zu erhöhen [Rehbein u. a., 2009]. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass das Strahlrohr eine ausreichende Energieauflösung bietet, da Zonenplatten, ähnlich wie einfache optische Linsen, eine starke chromatische Aberration aufweisen. Ist die verwendete Strahlung zu breitbandig, so unterscheiden sich die Brennweiten für Komponenten unterschiedlicher Wellenlängen, was zu Unschärfe in der Abbildung führt.

3. Ergebnisse und Diskussion

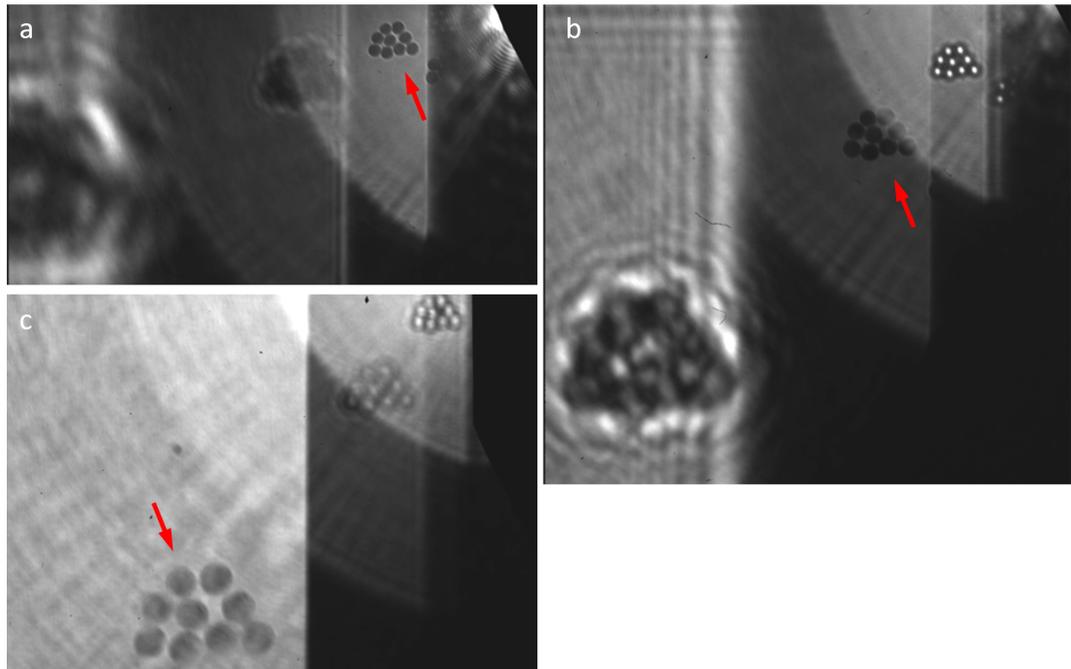


Abbildung 3.22.: Abbildungsordnungen bei der Zonenplatten-Mikroskopie. Die Testprobe aus Polystyrol-Mikrokugeln mit einem Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ wurde mit monochromatischer Röntgenstrahlung der Energie $517\ \text{eV}$ beleuchtet. Durch Variation des Abstands zwischen Probe und Objektiv-Zonenplatte lassen sich das Bild der 1. (a), 2. (b) und 3. (c) Abbildungsordnung fokussieren. Während die Vergrößerung mit steigender Ordnung wächst, sinkt die Helligkeit des Bildes.

3.3.2. Chemischer Kontrast an der Kohlenstoffkante

Analog zu den resonanten ptychographischen Messungen wurde eine gleichartige Testprobe (Kap. 3.2.2), bestehend aus PMMA- und PS-Mikrokugeln von $2\ \mu\text{m}$ Durchmesser mithilfe von Zonenplatten-Röntgenmikroskopie untersucht. Die Aufnahmen zeigen nur den Absorptionskontrast der Proben (Abb. 3.23a), die Phasenverschiebung lässt sich nicht bestimmen.

Aus den mikroskopischen Aufnahmen wurde die Transmission für beide Materialien in Abhängigkeit der Photonenenergie bestimmt (Tab. 3.12). Die Identifizierung erfolgt anhand der Lage der Absorptionskante: Diese ist für PS – verglichen mit PMMA – zu niedrigeren Energien verschoben.

3.3. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten

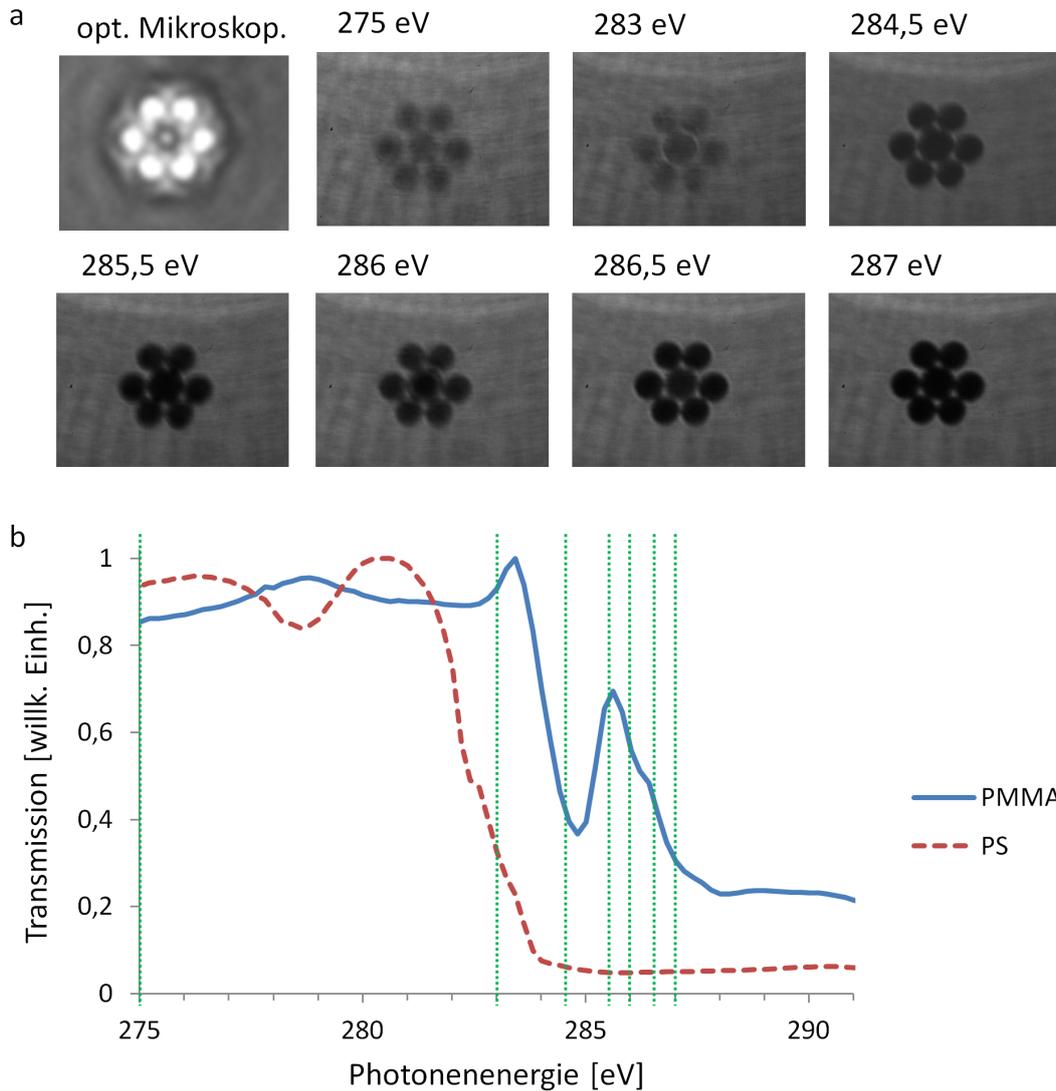


Abbildung 3.23.: Chemischer Kontrast bei Röntgenmikroskopie mit Zonenplatten. Lichtmikroskopisches Bild der Testprobe, bestehend aus einer PS- und sechs PMMA-Mikrokugeln sowie röntgenmikroskopische Aufnahmen bei verschiedenen Photonenergien (a). Die Mikrokugeln haben einen Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$. In den Aufnahmen kann man die beiden Substanzen anhand ihres Absorptionsverhaltens bei verschiedenen Energien deutlich unterscheiden. In den Transmissionspektren der beiden Substanzen (b) sind die Energien markiert, bei denen die in (a) gezeigten Aufnahmen gemacht wurden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Energie in eV	T _{PS}	T _{PMMA}
275,0	0,79	0,77
283,0	0,77	0,89
284,5	0,16	0,20
285,5	0,09	0,21
286,0	0,18	0,37
286,5	0,27	0,17
287,0	0,07	0,09

Tabelle 3.12.: Transmission der PMMA- und PS-Mikrokugeln an der Kohlenstoffkante. Die Transmission wurde aus den vollfeldmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.23) bestimmt.

3.3.3. Diskussion und Vergleich mit Ptychographie

Aus der ptychographischen Rekonstruktion der PMMA-PS-Testprobe wurde der Verlauf der Transmission und der Phasenverschiebung in Abhängigkeit der Photonenenergie bestimmt und der aus vollfeldmikroskopischen Aufnahmen derselben Testprobe bestimmten Transmission in Abb. 3.24 gegenübergestellt. Die ptychographisch bestimmten Transmissionen (a) unterhalb der Absorptionskante liegen deutlich niedriger als die Werte der Vollfeldmikroskopie (c). Die ptychographischen Daten lassen eine sichere Bestimmung der Mikrokugeln zu. Insbesondere der charakteristische Verlauf der Phasenverschiebung (b) erlaubt eine eindeutige Identifizierung von PMMA- bzw. PS-Mikrokugeln. Er entspricht, bis auf ein Vorzeichen, dass der Konvention bezüglich der Orientierung der Phasenverschiebung geschuldet ist, dem Verlauf des dispersiven Anteils des Brechungsindex (Abb. 3.21b). Doch auch im Verlauf der ptychographisch bestimmten Transmission (Abb. 3.24a) sind die Absorptionskanten von PMMA und PS deutlich zu unterscheiden. Schwieriger ist dies im Fall der Vollfeldmikroskopie (Abb. 3.24c).

Die Vollfeldmikroskopie hat gegenüber der Ptychographie den Vorteil, dass sie keine aufwändige Rekonstruktion der Bilder erfordert. Diese stehen unmittelbar nach der Aufnahme zur Verfügung, und können so direkt beurteilt werden, um den weiteren Verlauf der Experimente entsprechend zu steuern.

3.3. Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten

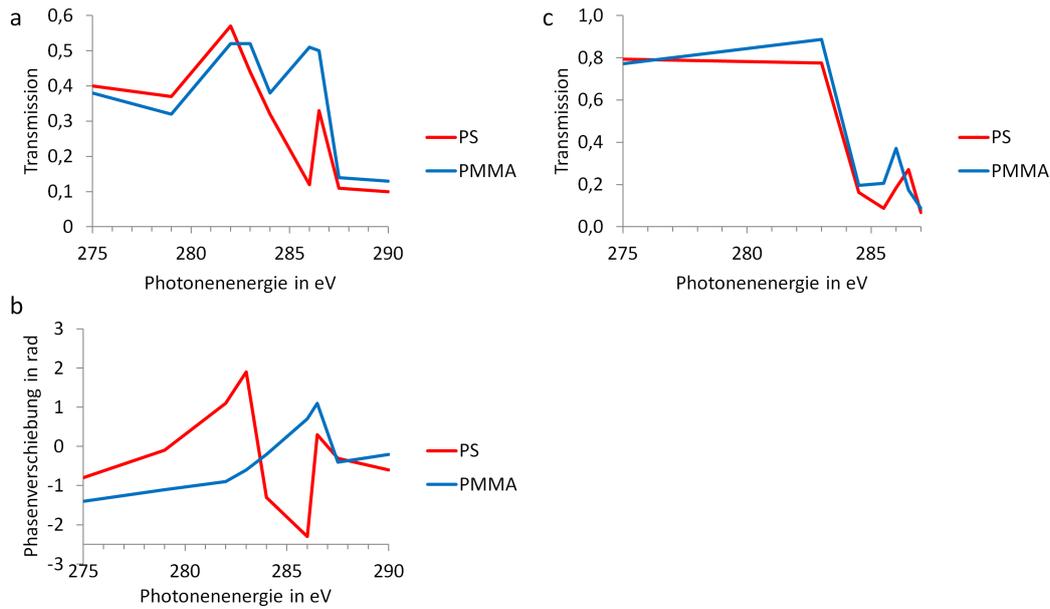


Abbildung 3.24.: Chemischer Kontrast bei Röntgenmikroskopie. Aus den ptychographischen Aufnahmen der PMMA-PS-Testprobe (Abb. 3.20) wurden die Transmission (a) und die Phasenverschiebung (b) bestimmt, die die 2 μm großen Kugeln in Abhängigkeit von der Photonenergie hervorrufen. Gegenübergestellt ist die Transmission, die aus den Aufnahmen derselben Probe mittels Vollfeldmikroskopie (Abb. 3.23) bestimmt wurde (c).

3. Ergebnisse und Diskussion

NEXAFS-Kontrast lässt sich ebenfalls mit der Vollfeldmikroskopie kombinieren. Dabei steht jedoch ausschließlich der Absorptionskontrast zur Verfügung. Ptychographie hingegen ist sowohl experimentell als auch in der Rekonstruktion der Aufnahmen aufwändiger. Bei der Kombination mit NEXAFS-Kontrast steht zusätzlich zum Absorptionskontrast auch der Phasenkontrast zur Verfügung, welcher, wie das Beispiel der PMMA-PS-Testprobe belegt, wertvolle zusätzliche Informationen liefert. Ptychographie ist der Vollfeldmikroskopie also insbesondere dann vorzuziehen, wenn der NEXAFS-Kontrastmechanismus mikroskopisch ausgenutzt werden soll.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Biofouling, die Besiedelung zeitweise oder ständig von Wasser bedeckter Oberflächen wie beispielsweise Schiffsrümpfen oder Hafenanlagen durch Organismen, hat enorme ökonomische und ökologische Auswirkungen. Foulingorganismen nutzen verschiedene biologische Adhäsive, von denen einige die Klebkraft synthetischer Produkte bei einer Anwendung unter Wasser übertreffen. Die Kenntnis der Zusammensetzung und der Funktionsweise dieser biologischen Klebstoffe ist noch unvollständig. Die Analytik der beteiligten Substanzen wird durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise schwache Löslichkeit oder geringe Probenmengen erschwert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die elementare Zusammensetzung verschiedener mariner Foulingorganismen und ihrer Adhäsive mithilfe von synchrotronbasierter μ -Röntgenfluoreszenzanalyse (μ -RFA) untersucht. Neben Seepocken, auf denen der Fokus dieser Arbeit lag, wurden auch ein Kalkröhrenwurm und eine marine Kieselalge untersucht.

Für die Experimente mit Seepocken wurden Cyprislarven der Arten *Balanus amphitrite*, *Balanus improvisus* und *Elminius modestus* von Prof. Clare (Newcastle University, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Für die Messungen wurden die etwa 500 μm langen Larven zunächst auf einer 8 μm dicken Kapton-Folie gesiedelt. Mit der Folie wurde anschließend eine mit künstlichem Seewasser-Medium gefüllte Polypropylen-dose verschlossen. An diesen Proben wurde die Elementverteilung in den Seepocken *in vivo* durch das Kaptonsubstrat hindurch gemessen. Die Experimente wurden am Strahlrohr FLUO der Synchrotronstrahlungsquelle ANKA (KIT, Eggenstein-Leopoldshafen) mit einer Anregungsenergie von 17 keV durchgeführt.

Zunächst wurden Seepocken der Arten *Balanus improvisus* und *Elminius modestus* acht Tage nach dem Siedeln untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist

4. Zusammenfassung und Ausblick

die Metamorphose der Cyprislarve bereits vollständig abgeschlossen und die Seepocken haben bereits ihre adulte Form angenommen. Mit diesen Experimenten wurde erstmals die Anwendung synchrotronbasierter μ -RFA auf *In-vivo*-Proben mariner Organismen demonstriert. Durch Abrastern der Proben konnten zweidimensionale Elementverteilungen mit einer lateralen Auflösung von 15 μm bestimmt werden. Dabei kam ein nicht-konfokaler Versuchsaufbau zum Einsatz, sodass die Intensitätsverteilungen als Projektion der Elementkonzentrationen in Richtung der Strahlachse zu interpretieren sind. Die beobachteten Verteilungsmuster von Chlor und Calcium untermauern die bereits hypothetisierte Beteiligung des Mantelepithels an der Osmoregulation und Bereitstellung von Calciumionen für die Biomineralisation der Wandplatten [Noušek, 1984; Gohad u. a., 2009]. Desweiteren wurde eine bisher nicht beschriebene Anreicherung von Brom in chitinösen Strukturen wie den Cirri (Rankenfüßen) der Seepocken beobachtet. Es war mit diesem experimentellen Ansatz jedoch nicht möglich, Fluoreszenzsignale der Adhäsive zu bestimmen. Diese wurden durch stärkere Signale aus dahinterliegenden Organen, vor allem aus dem Bereich des Verdauungstrakts, in dem verschiedene Metalle angereichert werden, überlagert.

Von besonderem Interesse sind die als Cypriszement bezeichneten Adhäsive, die die motilen Cyprislarven der Seepocken nutzen, um sich vor der Metamorphose permanent an ein Substrat anzuheften. Dieser einmalig ausgestoßene Klebstoff bildet auf dem Substrat zwei Scheibchen von etwa 50 μm Durchmesser. Um die Überlagerung der Fluoreszenzsignale der oberflächennahen Adhäsive durch Beiträge aus dahinterliegenden Geweben zu vermeiden, wurde der Aufbau um eine Polykapillarlinse vor dem Röntgenfluoreszenzdetektor ergänzt. Damit waren nun konfokale Messungen mit einer energieabhängigen Tiefenauflösung im Bereich zwischen 15 μm und 20 μm möglich. In Cyprislarven der Art *Balanus amphitrite* wurden wenige Minuten nach der permanenten Adhäsion mit diesem Aufbau Elementverteilungen in äquidistanten Ebenen parallel zum Kaptonsubstrat bestimmt. Auffällig war hierbei vor Allem eine bisher nicht bekannte starke Anreicherung von Brom in der Carapax, der chitinösen Schutzhülle der Larve. Die Signale in der dem Substrat nächsten Ebene lieferten

erste Hinweise auf erhöhte Konzentrationen an Brom und Zink im Cypriszement. Ein gravierender Nachteil der konfokalen Messmethode ist die durch die verminderte Detektionseffizienz um mehr als eine Größenordnung verlängerte Messzeit. Aufgrund der an Synchrotronstrahlungsquellen nur begrenzt zur Verfügung stehenden Strahlzeit erschien daher ein weiteres Verfolgen dieses Ansatzes wenig aussichtsreich.

Um die elementare Zusammensetzung des Cypriszements auch ohne die Verwendung eines konfokalen Experimentaufbaus zu bestimmen, wurde ein veränderter experimenteller Ansatz verfolgt. Dafür wurden Cyprislarven von *Balanus improvisus* und *Balanus amphitrite* zunächst wieder auf Kaptonsubstraten gesiedelt. Nach definierten Zeiträumen von zwei bis sieben Tagen wurden die Organismen vorsichtig von den Substraten entfernt. Dabei verblieb der Cypriszement auf dem Substrat. Vor allem in den älteren Proben hinterließen die Seepocken auch adhärenzte Teile ihrer Basalmembran sowie Fragmente der calcifizierten Wandplatten. In μ -RFA-Messungen dieser *In-situ*-Proben zeigten die drei Komponenten eine charakteristische Kollokalisierung der Elemente und konnten mit lichtmikroskopischen Abbildungen der Proben korreliert werden. Die Messungen konnten eine Anreicherung von Brom und Zink im Cypriszement bestätigen. Desweiteren konnten in Zement erhöhte Konzentrationen an Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink, Selen und Scandium nachgewiesen werden. Während die Anwesenheit von Kupfer und Zink auf entsprechende Metalloproteine zurückgeführt werden könnte, die bereits im Cypriszement beschrieben wurden [Walker, 1971; Dougherty, 1996], erscheint insbesondere die bisher noch nicht beschriebene Anreicherung von Brom bemerkenswert. Eine quantitative Abschätzung der Intensitäten ergibt für Brom im Cypriszement maximale Flächendichten von knapp 30 ng mm^{-2} . Zwischen den beiden untersuchten Spezies konnten keine Unterschiede hinsichtlich der im Cypriszement detektierten Elemente nachgewiesen werden.

Die erfolgreiche Anwendung der μ -RFA zur Analyse der Zusammensetzung biologischer Klebstoffe in Seepocken motivierte die Anwendung der Methode auch auf andere Foulingorganismen zu testen. Erste *In-vivo*-Messungen am Tüten-Kalkröhrenwurm *Ficopomatus enigmaticus* wurden durchgeführt. Auch

4. Zusammenfassung und Ausblick

hier ergab sich ein erster Hinweis auf erhöhte Bromkonzentrationen in dem Klebstoff, mit dem der Wurm seine calcifizierte Röhre mit dem Substrat verbindet.

Ebenfalls untersucht wurde die raphide marine Kieselalge *Navicula perminuta*, welche mit einer Länge von maximal 13 μm der Gruppe der Mikrofouler zugeordnet wird. Raphide Kieselalgen können auf Oberflächen adhäreren und sind auf diesen auch motil. Bei der gleitenden Fortbewegung hinterlassen sie eine wenige Mikrometer breite Spur ihrer Sekrete. Von *Pinnularia* sp. ist die Dicke dieser Spur von etwa 300 nm bekannt [Higgins u. a., 2000]. Um diese Größenskalen auflösen zu können, wurden die Messungen an *Navicula perminuta* am Strahlrohr P06 der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III (DESY, Hamburg) durchgeführt. Für die Experimente stand ein auf 700 nm fokussierter Strahl zur Verfügung. Hier wurde ebenfalls eine Anregungsenergie von 17 keV verwendet, um die dehydrierten Proben auf einer 100 nm dicken Siliziumnitridmembran zu untersuchen. Die elementare Zusammensetzung der Algen konnte so erfolgreich bestimmt werden. Es war jedoch nicht möglich, ein Fluoreszenzsignal außerhalb der Organismen zu detektieren, dass der Sekretpur zugeordnet werden könnte. Bei diesen extrem dünnen Proben stößt die μ -RFA an ihre Grenzen, da die zur Anregungen verwendete harte Röntgenstrahlung für organisches Material Absorptionslängen im Bereich von Zentimetern aufweist. Die Wechselwirkung mit sub- μm -dicken Proben ist also äußerst gering. Weiche Röntgenstrahlung weist hingegen für biologisches Material Absorptionslängen im Mikrometerbereich auf und erscheint damit geeigneter, weshalb das Kontrastverhalten biologischer Proben in diesem Wellenlängenbereich untersucht wurde.

Mittels ptychographischer Röntgenmikroskopie wurden am monochromatisierten Strahlrohr U-49/2-PGM-1 der Synchrotronstrahlungsquelle BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin) dehydrierte glatte Gefäßmuskelzellen untersucht. Diese zeigten bei einer Energie von 517 eV sowohl einen guten Absorptions- als auch Phasenkontrast. Dünnschnitte verschiedener Gewebe und Mikroorganismen konnten mit der Methode dagegen nur erfolgreich dargestellt werden, wenn die Proben zuvor mit Schwermetallen angefärbt wurden, da sich

die optischen Eigenschaften der Probe und des Einbettungsmediums ansonsten nur ungenügend voneinander unterschieden. Um die Möglichkeiten zu demonstrieren, die die Kombination aus ptychographischer Röntgenmikroskopie und NEXAFS-Kontrast bietet, wurde eine Testprobe bestehend aus einer monodispersen Mischung von Polymethylmethacrylat- und Polystyrol-Mikrokugeln mit 2 μm Durchmesser bei verschiedenen Photonenenergien im Bereich der Kohlenstoff-Absorptionskante abgebildet. Die unterschiedliche Modulation von Phasen- und Absorptionskontrast der beiden Substanzen in Abhängigkeit von der Energie erlaubte die eindeutige Unterscheidung und Identifizierung der beiden Substanzen anhand der Bindungszustände des Kohlenstoffs. Abschließend wurde dieser chemische Kontrastmechanismus an der gleichen Probe unter Verwendung von Vollfeldmikroskopie mit einer Objektivzonenplatte wiederholt. Diese Methode ist experimentell deutlich schneller und erfordert keine iterative Rekonstruktion. Dafür kann jedoch nur der Absorptionskontrast ausgewertet werden.

Die erfolgreiche Anwendung von synchrotronbasierter μ -RFA zur Untersuchung des Cyprislements von Seepockenlarven motiviert den weiteren Einsatz dieser Methode in erweiterten Fragestellungen. Um eine aktive Anreicherung von Brom im Cyprislement durch die Cyprislarve zu untersuchen, wäre es denkbar, die Larven in Medien mit unterschiedlichen Bromidkonzentrationen zu kultivieren und anschließend die Korrelation der Konzentrationen in den Medien mit den Bromkonzentrationen im Zement zu bestimmen. Eine weitere Ausdehnung der Fragestellung könnte die Zusammensetzung des Cyprislements auf verschiedenen Substraten untersuchen, um zu entscheiden, ob die Larve in der Lage ist, die Eigenschaften des Adhäsivs äußeren Erfordernissen anzupassen. Eine Korrelation zwischen der Konzentration eines Elements im Cyprislement mit einem bestimmten Parametern der Substratoberfläche könnte Hinweise liefern, welche Rolle das Element in dem Klebstoff spielt. Eine andere Möglichkeit, an die Arbeit anzuknüpfen, besteht in der Ausdehnung der μ -RFA auf weitere Makrofauna. Erste Versuche mit dem Kalkröhrenwurm *Ficopomatus enigmaticus* waren bereits erfolgreich und es ist zu erwarten, dass auch die elementaren Adhäsivzusammensetzungen anderer Organismen mit

4. Zusammenfassung und Ausblick

dieser Methode erfolgreich bestimmt werden können. Je nach Aufbau des Organismus sowie Lokalisierung und Menge seiner Adhäsive muss entschieden werden, ob *In-vivo*-Proben des kompletten Organismus oder isolierte Proben seiner Adhäsive besser zur Untersuchung geeignet sind. Für Mikrofoouler haben die Methoden zurzeit eine noch unzureichende Empfindlichkeit, sodass für die Untersuchung solcher Organismen und ihrer Klebstoffe Röntgenmikroskopie unter Verwendung weicher Röntgenstrahlung eine Alternative ist. Statt des Elementkontrasts, den die RFA bietet, kann dabei chemischer Kontrast beispielsweise an den Absorptionskanten von Sauerstoff oder Kohlenstoff genutzt werden. Auch wenn die Vollfeldmikroskopie sowohl experimentell als auch in der Datenauswertung unkomplizierter ist, kann der bei der Ptychographie zusätzlich verfügbare Phasenkontrast wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Es ist jedoch auch denkbar, dass Weiterentwicklungen an μ -RFA-Strahlrohren in Zukunft doch eine Untersuchung der Adhäsive in Mikrofooulern erlauben. An P06 steht die Kommissionierung eines neuen Multilagen-Monochromators an, der den verfügbaren Photonenfluss um ein bis zwei Größenordnungen steigern soll. Gleichzeitig schreitet die Entwicklung der Detektoren voran. So deckt der am Australian Synchrotron entwickelte MAYA-Detektor einen Raumwinkel von annähernd 2π ab und erreicht damit eine beeindruckende Sensitivität. Erste Vorserienmodelle dieses Röntgenfluoreszenzdetektors sind bereits erhältlich, sodass davon auszugehen ist, dass er in Zukunft an verschiedenen Synchrotronstrahlungsquellen zum Einsatz kommen wird.

A. Anhang

A.1. Publikationen

- Beckers, Mike ; Senkbeil, Tobias ; Gorniak, Thomas ; Reese, Michael ; Giewekemeyer, Klaus ; Gleber, Sophie-Charlotte ; Salditt, Tim ; Rosenhahn, Axel: Chemical contrast in soft x-ray ptychography. In: *Physical review letters* 107 (2011), Nr. 20, S. 208101
- Beckers, Mike ; Senkbeil, Tobias ; Gorniak, Thomas ; Giewekemeyer, Klaus ; Salditt, Tim ; Rosenhahn, Axel: Drift correction in ptychographic diffractive imaging. In: *Ultramicroscopy* 126 (2013), S. 44–47
- Senkbeil, Tobias ; Mohamed, Tawheed ; Simon, Rolf ; Batchelor, David ; Di Fino, Alessio ; Aldred, Nick ; Clare, Anthony S. ; Rosenhahn, Axel: *In vivo* and *in situ* synchrotron μ -XRF reveals elemental distributions during the early attachment phase of barnacle larvae and juvenile barnacles. In Vorbereitung

A. Anhang

A.2. Abkürzungen zur Bezeichnung der Cyprisanatomie

A.2. Abkürzungen zur Bezeichnung der Cyprisanatomie

a.a.m.	adulter Adduktormuskel
a.d.	Haftscheibe
a.m.	Adduktormuskel der Cypris
a.m.c.	anteriore Mantelhöhle
ant.1	Antennula
b.	Gehirn
ca.	Carapax
car.	Carina
cau.ap.	Caudalstachel
ce.d.	Zementgang
ce.gl.	Zementdrüse
c.eye	Komplexauge
f.f.	frontales Filament
f.gl.	frontaler Drüsenausgang
h.g.	Enddarm
m.c.	adulte Mantelhöhle
m.g.	Mitteldarm
m.s.	muskuläre Ausstülpung
mx.2	zweite Maxilla
n.e.	Naupliusauge
o.c.	Ölkugeln
oe.	Oesophagus
o.m.	Membran des Operculums
op.g.	optisches Ganglion
p.m.c.	posteriore Mantelhöhle
r.	Rostrum
s.	Scutum
seg.4	viertes Segment der Antennula
t.	Tergum
t.a.m.	Sehne des Adduktormuskels der Cypris
th.	Thorax
th.ap.	Thoraxfortsatz
th.g.	Thoraxganglion
y.c.	gelbe Zellen

Tabelle A.1.: Abkürzungen zur Bezeichnung der Cyprisanatomie.

Literaturverzeichnis

- [Kay 1995] ; The National Physical Laboratory (Veranst.): *Tables of Physical & Chemical Constants*. <http://www.kayelaby.npl.co.uk/>. Version: 1995. – 16th edition
- [Araki u. a. 2006] ARAKI, Tohru ; ADE, Harald ; STUBBS, Jeffrey M. ; SUNDBERG, Donald C. ; MITCHELL, Gary E. ; KORTRIGHT, Jeffrey B. ; KILCOYNE, ALD: Resonant soft x-ray scattering from structured polymer nanoparticles. In: *Applied physics letters* 89 (2006), Nr. 12, S. 124106
- [Avant 2007] AVANT, Penny: *Elminius modestus*. An acorn barnacle. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]*. <http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=3252>. Version: 2007. – Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme
- [Barnes u. a. 1976] BARNES, H ; KLEPAL, Waltraud ; MITCHELL, BD: The organic and inorganic composition of some cirripede shells. In: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 21 (1976), Nr. 2, S. 119–127
- [Beckers u. a. 2013] BECKERS, Mike ; SENKBEIL, Tobias ; GORNIAC, Thomas ; GIEWEKEMEYER, Klaus ; SALDITT, Tim ; ROSENHAHN, Axel: Drift correction in ptychographic diffractive imaging. In: *Ultramicroscopy* 126 (2013), S. 44–47
- [Beckers u. a. 2011] BECKERS, Mike ; SENKBEIL, Tobias ; GORNIAC, Thomas ; REESE, Michael ; GIEWEKEMEYER, Klaus ; GLEBER, Sophie-Charlotte ; SALDITT, Tim ; ROSENHAHN, Axel: Chemical contrast in soft x-ray ptychography. In: *Physical review letters* 107 (2011), Nr. 20, S. 208101

- [Bernard u. Lane 1961] BERNARD, Francis J. ; LANE, Charles E.: Absorption and excretion of copper ion during settlement and metamorphosis of the barnacle *Balanus amphitrite niveus*. In: *The Biological Bulletin* 121 (1961), Nr. 3, S. 438–448
- [Bielecki u. a. 2009] BIELECKI, Jan ; CHAN, Benny K. ; HOEG, Jens T. ; SARI, Alireza: Antennular sensory organs in cyprids of balanomorphan cirripedes: standardizing terminology using *Megabalanus rosa*. In: *Biofouling* 25 (2009), Nr. 3, S. 203–214
- [Briand u. a. 2012] BRIAND, Jean-François ; DJERIDI, Ikram ; JAMET, Dominique ; COUPÉ, Stéphane ; BRESSY, Christine ; MOLMERET, Maëlle ; LE BERRE, Brigitte ; RIMET, Frédéric ; BOUCHEZ, Agnès ; BLACHE, Yves: Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. In: *Biofouling* 28 (2012), Nr. 5, S. 453–463
- [Brown u. a. 1983] BROWN, George ; HALBACH, K ; HARRIS, John ; WINICK, Herman: Wiggler and undulator magnets – A review. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 208 (1983), Nr. 1, S. 65–77
- [Buckeridge u. Reeves 2009] BUCKERIDGE, John S. ; REEVES, Jessica M.: Some insights into how barnacles survive as sessile organisms. In: *Integrative Zoology* 4 (2009), Nr. 4, S. 395–401
- [Bunk u. a. 2008] BUNK, Oliver ; DIEROLF, Martin ; KYNDE, Søren ; JOHNSON, Ian ; MARTI, Othmar ; PFEIFFER, Franz: Influence of the overlap parameter on the convergence of the ptychographical iterative engine. In: *Ultramicroscopy* 108 (2008), Nr. 5, S. 481–487. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.08.003>. – DOI 10.1016/j.ultramic.2007.08.003. – ISSN 0304–3991
- [Burnett 1977] BURNETT, Bryan R.: Blood circulation in the balanomorph barnacle, *Megabalanus californicus* (Pilsbry). In: *Journal of Morphology* 153 (1977), Nr. 2, S. 299–306

- [Buschbaum u. Reise 2010] BUSCHBAUM, Christian ; REISE, Karsten: Neues Leben im Weltnaturerbe Wattenmeer. Globalisierung unter Wasser. In: *Biologie in unserer Zeit* 40 (2010), Nr. 3, S. 202–210
- [Carlton u. Newman 2009] CARLTON, James T. ; NEWMAN, William A.: Reply to Clare and Høeg 2008. *Balanus amphitrite* or *Amphibalanus amphitrite*? A note on barnacle nomenclature. In: *Biofouling* 25 (2009), Nr. 1, S. 77–80
- [Champ 2003] CHAMP, Michael A.: Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. In: *Marine Pollution Bulletin* 46 (2003), Nr. 8, S. 935–940
- [Chao u. a. 2005] CHAO, Weilun ; HARTENECK, Bruce D. ; LIDDLE, J. A. ; ANDERSON, Erik H. ; ATTWOOD, David T.: Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. In: *Nature* 435 (2005), Nr. 7046, S. 1210–1213
- [Chiovitti u. a. 2006] CHIOVITTI, Anthony ; DUGDALE, Tony M. ; WETHERBEE, Richard: Diatom adhesives: molecular and mechanical properties. In: *Biological adhesives*. Springer, 2006, S. 79–103
- [Chiovitti u. a. 2003] CHIOVITTI, Anthony ; HIGGINS, Michael J. ; HARPER, Ruth E. ; WETHERBEE, Richard ; BACIC, Antony: The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). In: *Journal of phycology* 39 (2003), Nr. 3, S. 543–554
- [Clare u. Høeg 2008] CLARE, Anthony S. ; HØEG, Jens T.: *Balanus amphitrite* or *Amphibalanus amphitrite*? A note on barnacle nomenclature. In: *Biofouling* 24 (2008), Nr. 1, S. 55–57
- [Clare u. Matsumura 2000] CLARE, Anthony S. ; MATSUMURA, Kiyotaka: Nature and perception of barnacle settlement pheromones. In: *Biofouling* 15 (2000), Nr. 1-3, S. 57–71
- [Clark u. a. 1988] CLARK, Elizabeth A. ; STERRITT, Robert M. ; LESTER,

- John N.: The fate of tributyltin in the aquatic environment. In: *Environmental science & technology* 22 (1988), Nr. 6, S. 600–604
- [Cohen 2011] COHEN, Andrew N.: *The Exotics Guide: Non-native Marine Species of the North American Pacific Coast*. <http://www.exoticsguide.org>. Version: September 2011. – Aufgerufen am 4.6.2014
- [Corbett u. Koehler 2003] CORBETT, James J. ; KOEHLER, Horst W.: Updated emissions from ocean shipping. In: *Journal of Geophysical Research: Atmospheres (1984–2012)* 108 (2003), Nr. D20
- [Costlow 1956] COSTLOW, John D.: Shell development in *Balanus improvisus* Darwin. In: *Journal of Morphology* 99 (1956), Nr. 2, S. 359–415
- [Costlow u. Bookhout 1956] COSTLOW, John D. ; BOOKHOUT, CG: Molting and shell growth in *Balanus amphitrite niveus*. In: *Biological Bulletin* (1956), S. 107–116
- [Cukrov u. a. 2010] CUKROV, Marijana ; DESPALATOVIĆ, Marija ; ŽULJEVIĆ, Ante ; CUKROV, Neven: First record of the introduced fouling tubeworm *Ficopomatus enigmaticus* (Fauvel, 1923) in the Eastern Adriatic Sea, Croatia. In: *39th CIESM Congress, Venice, 10-14 May 2010*, 2010, S. 483–483
- [Da Silva u. Williams 2001] DA SILVA, JJR F. ; WILLIAMS, Robert Joseph P.: *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Oxford University Press, 2001
- [Darwin 1851] DARWIN, Charles: *A Monograph on the Sub-class Cirripedia: The Lepadidæ; or, pedunculated cirripedes*. Bd. 1. Ray society, 1851
- [Darwin 1854] DARWIN, Charles: *A Monograph on the Sub-class Cirripedia: The Balanidæ (or sessile cirripedes); the Verrucidæ, Etc..* Bd. 2. Ray Society, 1854
- [Dittmann u. a. 2009] DITTMANN, Sabine ; ROLSTON, AN ; BENDER, Simon N. ; KUPRIYANOVA, Elena K.: Habitat requirements, distribution and colonisation of the tubeworm *Ficopomatus enigmaticus* in the Lower Lakes and

- Coorong / South Australian Murray-Darling Basin Natural Resources Management Board, Adelaide. 2009. – Forschungsbericht
- [Dougherty 1997] DOUGHERTY, William J.: Carboxypeptidase Activity of the Zinc Metalloprotease in the Cement Precursor Secretion of the Barnacle *Chthamalus fragilis* (Darwin). In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 117 (1997), Nr. 4, S. 565–570
- [Dougherty 1996] DOUGHERTY, WJ: Zinc metalloprotease activity in the cement precursor secretion of the barnacle *Chthamalus fragilis* (Darwin). In: *Tissue and Cell* 28 (1996), Nr. 4, S. 439–447
- [Eck u. a. 2005] ECK, Wolfgang ; KÜLLER, Alexander ; GRUNZE, Michael ; VÖLKEL, Berthold ; GÖLZHÄUSER, Armin: Freestanding Nanosheets from Crosslinked Biphenyl Self-Assembled Monolayers. In: *Advanced Materials* 17 (2005), Nr. 21, S. 2583–2587
- [Eggenstein u. a. 2001] EGGENSTEIN, F ; SENF, F ; ZESCHKE, T ; GUDAT, W: Cleaning of contaminated XUV-optics at BESSY II. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 467 (2001), S. 325–328
- [Ehrlich u. a. 2010] EHRLICH, Hermann ; SIMON, Paul ; CARRILLO-CABRERA, Wilder ; BAZHENOV, Vasily V. ; BOTTING, Joseph P. ; ILAN, Micha ; ERESKOVSKY, Alexander V. ; MURICY, Guilherme ; WORCH, Hartmut ; MENSCH, Axel u. a.: Insights into chemistry of biological materials: newly discovered silica-aragonite-chitin biocomposites in demosponges. In: *Chemistry of Materials* 22 (2010), Nr. 4, S. 1462–1471
- [Ellwood u. Hunter 2000] ELLWOOD, Michael J. ; HUNTER, Keith A.: The incorporation of zinc and iron into the frustule of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. In: *Limnology and oceanography* 45 (2000), Nr. 7, S. 1517–1524

- [Faulkner u. Rodenburg 2004] FAULKNER, HML ; RODENBURG, JM: Movable aperture lensless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm. In: *Physical review letters* 93 (2004), Nr. 2, S. 23903
- [Fent 2013] FENT, Karl: *Ökotoxikologie: Umweltchemie-Toxikologie-Ökologie*. Georg Thieme Verlag, 2013
- [Fernández u. a. 2002] FERNÁNDEZ, María S ; VERGARA, Italo ; OYARZUN, Alejandro ; ARIAS, José I ; RODRIGUEZ, Renato ; WIFF, Juan P. ; FUENZALIDA, Víctor M ; ARIAS, José L: Extracellular matrix molecules involved in barnacle shell mineralization. In: *MRS Proceedings* Bd. 724 Cambridge Univ Press, 2002
- [Fofonoff u. a. 2003] FOFONOFF, P.W. ; RUIZ, G.M. ; STEVES, B. ; CARLTON, J.T.: *National Exotic Marine and Estuarine Species Information System*. <http://invasions.si.edu/nemesis/>. Version: 2003. – Aufgerufen am 12.5.2014
- [Follath u. a. 2004] FOLLATH, R ; SCHMIDT, JS ; SIEWERT, F ; HOLLACK, K ; ZESCHKE, T ; FRENTRUP, W ; SCHMITZ, D ; SAWHNEY, KJS: Commissioning of the U49/2-PGM1 beamline. In: *SYNCHROTRON RADIATION INSTRUMENTATION: Eighth International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation* American Institute of Physics, 2004, S. 348–351
- [Giewekemeyer u. a. 2011] GIEWEKEMEYER, K. ; BECKERS, M. ; GORNIAK, T. ; GRUNZE, M. ; SALDITT, T. ; ROSENHAHN, A.: Ptychographic coherent x-ray diffractive imaging in the water window. In: *Optics express* 19 (2011), Nr. 2, S. 1037–1050
- [Giewekemeyer u. a. 2010] GIEWEKEMEYER, Klaus ; THIBAUT, Pierre ; KALBFLEISCH, Sebastian ; BEERLINK, André ; KEWISH, Cameron M. ; DIEROLF, Martin ; PFEIFFER, Franz ; SALDITT, Tim: Quantitative biological imaging by ptychographic x-ray diffraction microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010), Nr. 2, S. 529–534

- [Gohad u. a. 2009] GOHAD, NV ; DICKINSON, GH ; ORIHUELA, B ; RITTSCHOF, D ; MOUNT, AS: Visualization of putative ion-transporting epithelia in *Amphibalanus amphitrite* using correlative microscopy: Potential function in osmoregulation and biomineralization. In: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 380 (2009), Nr. 1, S. 88–98
- [Göhlhäuser 2012] GÖLZHÄUSER, Armin: Graphen aus Molekülen. In: *Angewandte Chemie* 124 (2012), Nr. 44, S. 11095–11096
- [Gorniak u. a. 2011] GORNIK, T. ; HEINE, R. ; MANCUSO, AP ; STAIER, F. ; CHRISTOPHIS, C. ; PETTITT, ME ; SAKDINAWAT, A. ; TREUSCH, R. ; GUERASSIMOVA, N. ; FELDHAUS, J. u. a.: X-ray holographic microscopy with zone plates applied to biological samples in the water window using 3rd harmonic radiation from the free-electron laser FLASH. In: *Optics Express* 19 (2011), Nr. 12, S. 11059–11070
- [Greene u. a. 1991] GREENE, Richard M. ; GEIDER, Richard J. ; FALKOWSKI, Paul G.: Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. In: *Limnology and Oceanography* 36 (1991), Nr. 8, S. 1772–1782
- [Gribble 1998] GRIBBLE, Gordon W.: Naturally occurring organohalogen compounds. In: *Accounts of Chemical Research* 31 (1998), Nr. 3, S. 141–152
- [Gribble 2003] GRIBBLE, Gordon W.: The diversity of naturally produced organohalogens. In: *Chemosphere* 52 (2003), Nr. 2, S. 289–297
- [Haase 1992] HAASE, Jochen: SEXAFS und NEXAFS. Röntgen-Absorptionsspektroskopie an Adsorbat-bedeckten Oberflächen. In: *Chemie in unserer Zeit* 26 (1992), Nr. 5, S. 219–231
- [Hahn-Weinheimer u. a. 1995] HAHN-WEINHEIMER, Paula (Hrsg.) ; HIRNER, Alfred (Hrsg.) ; WEBER-DIEFENBACH, Klaus (Hrsg.): *Röntgenfluoreszenz-analytische Methoden: Grundlagen und praktische Anwendungen in den Geo-, Material-, und Umweltwissenschaften*. Braunschweig; Wiesbaden: Vieweg, 1995

- [Hamamura u. a. 2012] HAMAMURA, Natsuko ; ITAI, Takaaki ; LIU, Yitai ; REYSENBACH, Anna-Louise ; DAMDINSUREN, Narantuya ; INSKEEP, William P.: Identification of anaerobic arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with an alkaline saline lake in Khovsgol, Mongolia. In: *Environmental Microbiology Reports* 1 (2012), S. 99–107
- [Henke u. a. 1993] HENKE, Burton L. ; GULLIKSON, Eric M. ; DAVIS, John C.: X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at $E = 50\text{--}30,000$ eV, $Z = 1\text{--}92$. In: *Atomic data and nuclear data tables* 54 (1993), Nr. 2, S. 181–342
- [Higgins u. a. 2000] HIGGINS, Michael J. ; CRAWFORD, Simon A. ; MULVANEY, Paul ; WETHERBEE, Richard: The topography of soft, adhesive diatom “trails” as observed by atomic force microscopy. In: *Biofouling* 16 (2000), Nr. 2-4, S. 133–139
- [Higgins u. a. 2003] HIGGINS, Michael J. ; MOLINO, Paul ; MULVANEY, Paul ; WETHERBEE, Richard: The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility. In: *Journal of Phycology* 39 (2003), Nr. 6, S. 1181–1193
- [Hill u. Hawkins 1990] HILL, AS ; HAWKINS, SJ: An investigation of methods for sampling microbial films on rocky shores. In: *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70 (1990), Nr. 01, S. 77–88
- [Hoagland u. a. 1993] HOAGLAND, Kyle D. ; ROSOWSKI, James R. ; GRETZ, Michael R. ; ROEMER, Stephen C.: Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. In: *Journal of Phycology* 29 (1993), Nr. 5, S. 537–566
- [Hockett u. a. 1997] HOCKETT, Daniel ; INGRAM, Peter ; LEFURGEY, Ann: Strontium and manganese uptake in the barnacle shell: electron probe microanalysis imaging to attain fine temporal resolution of biomineralization activity. In: *Marine environmental research* 43 (1997), Nr. 3, S. 131–143

- [Holland u. Walker 1975] HOLLAND, DL ; WALKER, G: The biochemical composition of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides* L. In: *Journal du Conseil* 36 (1975), Nr. 2, S. 162–165
- [Hoppe 1969a] HOPPE, W: Diffraction in inhomogeneous primary wave fields. 1. Principle of phase determination from electron diffraction interference. In: *Acta Crystallographica Section A* (1969), S. 495
- [Hoppe 1969b] HOPPE, W: Diffraction in inhomogeneous primary wave fields. 3. Amplitude and phase determination for nonperiodic objects. In: *Acta Crystallographica Section A* (1969), S. 508
- [Hoppe u. Strube 1969] HOPPE, W ; STRUBE, G: Diffraction in inhomogeneous primary wave fields. 2. Optical experiments for phasedetermination of lattice interferences. In: *Acta Crystallographica Section A* (1969), S. 502
- [Kamino 2006] KAMINO, Kei: Barnacle underwater attachment. In: *Biological adhesives*. Springer, 2006, S. 145–166
- [Kamino 2008] KAMINO, Kei: Underwater adhesive of marine organisms as the vital link between biological science and material science. In: *Marine Biotechnology* 10 (2008), Nr. 2, S. 111–121
- [Kamino 2013] KAMINO, Kei: Mini-review: barnacle adhesives and adhesion. In: *Biofouling* 29 (2013), Nr. 6, S. 735–749
- [Kronig 1926] KRONIG, R d.: On the theory of dispersion of X-rays. In: *JOSA* 12 (1926), Nr. 6, S. 547–556
- [Krumov u. a. 2009] KRUMOV, N ; KIRSCHHÖFER, F ; PERNER-NOCHTA, I ; BRENNER-WEISS, G ; OBST, U ; POSTEN, C: Biosynthese von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln mit Hefen in einem Fed-Batch-Prozess. In: *Chemie Ingenieur Technik* 81 (2009), Nr. 8, S. 1291–1292
- [Lack u. a. 2009] LACK, Daniel A. ; CORBETT, James J. ; ONASCH, Timothy ; LERNER, Brian ; MASSOLI, Paola ; QUINN, Patricia K. ; BATES, Timothy S.

- ; COVERT, David S. ; COFFMAN, Derek ; SIERAU, Berko u. a.: Particulate emissions from commercial shipping: Chemical, physical, and optical properties. In: *Journal of Geophysical Research: Atmospheres (1984–2012)* 114 (2009), Nr. D7
- [Lind u. a. 1997] LIND, Jan L. ; HEIMANN, Kirsten ; MILLER, Elizabeth A. ; VLIET, Catherine van ; HOOGENRAAD, Nicholas J. ; WETHERBEE, Richard: Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. In: *Planta* 203 (1997), Nr. 2, S. 213–221
- [Linne von Berg u. a. 2004] LINNE VON BERG, Karl-Heinz ; HOEF-EMDEN, Kerstin ; MELKONIAN, Michael: *Der Kosmos-Algenführer*. Kosmos, 2004
- [Luther 1987] LUTHER, Gertraud: Seepocken der deutschen Küstengewässer. In: *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 41 (1987), Nr. 1, S. 1–43
- [Mandal u. a. 2006] MANDAL, Deendayal ; BOLANDER, Mark E. ; MUKHOPADHYAY, Debabrata ; SARKAR, Gobinda ; MUKHERJEE, Priyabrata: The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (2006), Nr. 5, S. 485–492
- [Mantouvalou u. a. 2012] MANTOUVALOU, Ioanna ; MALZER, Wolfgang ; KANNGIESSER, Birgit: Quantification for 3D micro X-ray fluorescence. In: *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 77 (2012), S. 9–18
- [Marchetti u. Harrison 2007] MARCHETTI, Adrian ; HARRISON, Paul J.: Coupled changes in the cell morphology and the elemental (C, N, and Si) composition of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia* due to iron deficiency. In: *Limnology and Oceanography* 52 (2007), Nr. 5, S. 2270–2284
- [Maruzzo u. a. 2012] MARUZZO, Diego ; ALDRED, Nick ; CLARE, Anthony S. ; HØEG, Jens T.: Metamorphosis in the cirripede crustacean *Balanus amphitrite*. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 5, S. e37408

- [McQuaid u. Griffiths 2014] MCQUAID, KA ; GRIFFITHS, CL: Alien reef-building polychaete drives long-term changes in invertebrate biomass and diversity in a small, urban estuary. In: *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 138 (2014), S. 101–106
- [Molino u. Wetherbee 2008] MOLINO, Paul J. ; WETHERBEE, Richard: The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. In: *Biofouling* 24 (2008), Nr. 5, S. 365–379
- [Norton u. a. 1996] NORTON, Trevor A. ; MELKONIAN, Michael ; ANDERSEN, Robert A.: Algal biodiversity. In: *Phycologia* 35 (1996), Nr. 4, S. 308–326
- [Nousek 1984] NOUSEK, Nancy A.: Shell formation and calcium transport in the barnacle *Chthamalus fragilis*. In: *Tissue and Cell* 16 (1984), Nr. 3, S. 433–442
- [Ödling u. a. 2006] ÖDLING, Kristin ; ALBERTSSON, Christian ; RUSSELL, James T. ; MÅRTENSSON, Lena G.: An in vivo study of exocytosis of cement proteins from barnacle *Balanus improvisus* (D.) cyprid larva. In: *Journal of experimental biology* 209 (2006), Nr. 5, S. 956–964
- [Okano u. a. 1996] OKANO, KEIJU ; SHIMIZU, KATSUHIKO ; SATUITO, C ; FUSEYANI, NOBUHIRO: Visualization of cement exocytosis in the cypris cement gland of the barnacle *Megabalanus rosa*. In: *The Journal of Experimental Biology* 199 (1996), Nr. 10, S. 2131–2137
- [Palmer 1982] PALMER, A R.: Predation and parallel evolution: recurrent parietal plate reduction in balanomorph barnacles. In: *Paleobiology* (1982), S. 31–44
- [Perrett 2007] PERRETT, David: From ‘protein’ to the beginnings of clinical proteomics. In: *Proteomics-Clinical Applications* 1 (2007), Nr. 8, S. 720–738
- [Phang u. a. 2006] PHANG, In Y. ; ALDRED, Nick ; CLARE, Anthony S. ; CALLOW, James A. ; VANCOSO, G J.: An *in situ* study of the nanomechanical

- properties of barnacle *Balanus amphitrite* cyprid cement using atomic force microscopy (AFM). In: *Biofouling* 22 (2006), Nr. 4, S. 245–250
- [Pitombo 2004] PITOMBO, FB: Phylogenetic analysis of the balanidae (Cirripedia, Balanomorpha). In: *Zoologica Scripta* 33 (2004), Nr. 3, S. 261–276
- [Potin u. Leblanc 2006] POTIN, Philippe ; LEBLANC, Catherine: Phenolic-based adhesives of marine brown algae. In: *Biological adhesives*. Springer, 2006, S. 105–124
- [Proost u. a. 2003] PROOST, K ; VINCZE, Laszlo ; JANSSENS, K ; GAO, N ; BULSKA, E ; SCHREINER, M ; FALKENBERG, G: Characterization of a polycapillary lens for use in micro-XANES experiments. In: *X-Ray Spectrometry* 32 (2003), Nr. 3, S. 215–222
- [Rainbow u. Wang 2001] RAINBOW, Philip S. ; WANG, Wen-Xiong: Comparative assimilation of Cd, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. In: *Marine ecology. Progress series* 218 (2001), S. 239–248
- [Raja u. Omine 2012] RAJA, Chellaiah E. ; OMINE, Kiyoshi: Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS 11 isolated from Mongolia desert soil. In: *African Journal of Biotechnology* 11 (2012), Nr. 9, S. 2267–2275
- [Rehbein u. a. 2009] REHBEIN, S ; HEIM, S ; GUTTMANN, P ; WERNER, S ; SCHNEIDER, G: Ultrahigh-resolution soft-X-ray microscopy with zone plates in high orders of diffraction. In: *Physical review letters* 103 (2009), Nr. 11, S. 110801
- [Reis u. a. 2011] REIS, Pedro A. ; SALGADO, Maria A. ; VASCONCELOS, Victor: Barnacles as biomonitors of metal contamination in coastal waters. In: *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 93 (2011), Nr. 4, S. 269–278
- [Renberg 1990] RENBERG, Ingemar: A procedure for preparing large sets of diatom slides from sediment cores. In: *Journal of Paleolimnology* 4 (1990), Nr. 1, S. 87–90

- [Rodenburg u. Faulkner 2004] RODENBURG, JM ; FAULKNER, HML: A phase retrieval algorithm for shifting illumination. In: *Applied Physics Letters* 85 (2004), S. 4795
- [Rosenhahn u. a. 2009] ROSENHAHN, A. ; STAIER, F. ; NISIUS, T. ; SCHÄFER, D. ; BARTH, R. ; CHRISTOPHIS, C. ; STADLER, L.M. ; STREIT-NIEROBISCH, S. ; GUTT, C. ; MANCUSO, A. u. a.: Digital In-line Holography with femtosecond VUV radiation provided by the free-electron laser FLASH. In: *Optics Express* 17 (2009), Nr. 10, S. 8220–8228
- [Sagert u. a. 2006] SAGERT, Jason ; SUN, Chengjun u. a.: Chemical subtleties of mussel and polychaete holdfasts. In: *Biological adhesives*. Springer, 2006, S. 125–143
- [Schroer u. a. 2010] SCHROER, Christian G. ; BOYE, Pit ; FELDKAMP, Jan M. ; PATOMMEL, Jens ; SAMBERG, Dirk ; SCHROPP, Andreas ; SCHWAB, Andreas ; STEPHAN, Sandra ; FALKENBERG, Gerald ; WELLENREUTHER, Gerd u. a.: Hard X-ray nanoprobe at beamline P06 at PETRA III. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 616 (2010), Nr. 2, S. 93–97
- [Schultz 2007] SCHULTZ, Michael P.: Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. In: *Biofouling* 23 (2007), Nr. 5, S. 331–341
- [Schultz u. Swain 2000] SCHULTZ, Michael P. ; SWAIN, Geoffrey W.: The influence of biofilms on skin friction drag. In: *Biofouling* 15 (2000), Nr. 1-3, S. 129–139
- [Schultz u. a. 2011] SCHULTZ, MP ; BENDICK, JA ; HOLM, ER ; HERTEL, WM: Economic impact of biofouling on a naval surface ship. In: *Biofouling* 27 (2011), Nr. 1, S. 87–98
- [Sedlmair u. a. 2011] SEDLMAIR, Julia ; GLEBER, Sophie-Charlotte ; MERT, Semra Öztürk ; BERTILSON, Michael ; VON HOFSTEN, Olov ; THIEME,

- Jürgen ; PFOHL, Thomas: Imaging of Vascular Smooth Muscle Cells with Soft X-Ray Spectromicroscopy. In: *Microscopy and Microanalysis* 17 (2011), Nr. 06, S. 991–1001
- [Shigeno u. a. 1980] SHIGENO, Yasuhiro ; KONDO, Koichi ; TAKEMOTO, Kiichi: Functional monomers and polymers, 85. On the adsorption of bromine onto chitosan. In: *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 90 (1980), Nr. 1, S. 211–215
- [Simon u. a. 2003] SIMON, R. ; BUTH, G. ; HAGELSTEIN, M.: The X-ray-fluorescence facility at ANKA, Karlsruhe: Minimum detection limits and micro probe capabilities. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 199 (2003), S. 554–558
- [Smith u. Callow 2007] SMITH, Andrew M. ; CALLOW, James A.: *Biological adhesives*. Springer, 2007
- [Solé u. a. 2007] SOLÉ, VA ; PAPILLON, E. ; COTTE, M. ; WALTER, P. ; SUSINI, J.: A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. In: *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007), Nr. 1, S. 63–68
- [Southward 1963] SOUTHWARD, Eve C.: Haemoglobin in barnacles. In: *Nature* 200 (1963), S. 798–799
- [Staiier 2009] STAIER, Florian: *Entwicklung, Bau und Test einer UHV Röntgenstreu kammer für die digitale in-line Holographie*, Universität Heidelberg, Diss., 2009
- [Stöhr 1992] STÖHR, Joachim: *NEXAFS spectroscopy*. Bd. 25. Springer, 1992
- [Stolz u. a. 2006] STOLZ, John F. ; BASU, Partha ; SANTINI, Joanne M. ; OREMLAND, Ronald S.: Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism*. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 60 (2006), S. 107–130

- [Takahashi 1987] TAKAHASHI, Yasuko: Binding properties of alginic acid and chitin. In: *Journal of inclusion phenomena* 5 (1987), Nr. 4, S. 525–534
- [Tanur u. a. 2010] TANUR, Adrienne E. ; GUNARI, Nikhil ; SULLAN, Ruby May A. ; KAVANAGH, Christopher J. ; WALKER, Gilbert C.: Insights into the composition, morphology, and formation of the calcareous shell of the serpulid *Hydroides dianthus*. In: *Journal of structural biology* 169 (2010), Nr. 2, S. 145–160
- [Terwilliger u. Ryan 2001] TERWILLIGER, Nora B. ; RYAN, Margaret: Ontogeny of crustacean respiratory proteins. In: *American zoologist* 41 (2001), Nr. 5, S. 1057–1067
- [Thibault u. a. 2009] THIBAUT, P. ; DIEROLF, M. ; BUNK, O. ; MENZEL, A. ; PFEIFFER, F.: Probe retrieval in ptychographic coherent diffractive imaging. In: *Ultramicroscopy* 109 (2009), Nr. 4, S. 338–343
- [Thibault u. a. 2008] THIBAUT, P. ; DIEROLF, M. ; MENZEL, A. ; BUNK, O. ; DAVID, C. ; PFEIFFER, F.: High-resolution scanning x-ray diffraction microscopy. In: *Science* 321 (2008), Nr. 5887, S. 379
- [Thompson 2009] THOMPSON, Albert C.: *X-ray data booklet*. Version: 2009. <http://xdb.lbl.gov>
- [Tsukamoto u. a. 1996] TSUKAMOTO, Sachiko ; KATO, Haruko ; HIROTA, Hiroshi ; FUSEYANI, Nobuhiro: Mauritamine, a new antifouling oroidin dimer from the marine sponge *Agelas mauritiana*. In: *Journal of natural products* 59 (1996), Nr. 5, S. 501–503
- [Turchanin u. a. 2009] TURCHANIN, Andrey ; BEYER, André ; NOTTBOHM, Christoph T. ; ZHANG, Xianghui ; STOSCH, Rainer ; SOLOGUBENKO, Alla ; MAYER, Joachim ; HINZE, Peter ; WEIMANN, Thomas ; GÖLZHÄUSER, Armin: One nanometer thin carbon nanosheets with tunable conductivity and stiffness. In: *Advanced Materials* 21 (2009), Nr. 12, S. 1233–1237

- [Vinn u. a. 2008] VINN, Olev ; TEN HOVE, Harry A. ; MUTVEI, Harry ; KIR-SIMAE, Kalle: Ultrastructure and mineral composition of serpulid tubes (Polychaeta, Annelida). In: *Zoological Journal of the Linnean Society* 154 (2008), Nr. 4, S. 633–650
- [Waite u. Walter 1988] WAITE, ME ; WALTER, G: An investigation aimed at establishing the presence or absence of respiratory (crustacea: Cirripedia). In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 91 (1988), Nr. 4, S. 849–853
- [Walker 1971] WALKER, G: A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. In: *Marine Biology* 9 (1971), Nr. 3, S. 205–212
- [Walker 1977] WALKER, G: “Copper” granules in the barnacle *Balanus balanoides*. In: *Marine biology* 39 (1977), Nr. 4, S. 343–349
- [Walker u. a. 1975a] WALKER, G ; RAINBOW, PS ; FOSTER, P ; CRISP, DJ: Barnacles: possible indicators of zinc pollution? In: *Marine Biology* 30 (1975), Nr. 1, S. 57–65
- [Walker u. a. 1975b] WALKER, G ; RAINBOW, PS ; FOSTER, P ; HOLLAND, DL: Zinc phosphate granules in tissue surrounding the midgut of the barnacle *Balanus balanoides*. In: *Marine biology* 33 (1975), Nr. 2, S. 161–166
- [Walley u. Rees 1969] WALLEY, L J. ; REES, EIS: Studies on the larval structure and metamorphosis of *Balanus balanoides* (L.). In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (1969), S. 237–280
- [Wetherbee u. a. 1998] WETHERBEE, Richard ; LIND, Jan L. ; BURKE, Jo ; QUATRANO, Ralph S.: Minireview – The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. In: *Journal of Phycology* 34 (1998), Nr. 1, S. 9–15

- [Wiegemann 2005] WIEGEMANN, Maja: Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): mechanisms and technical applications. In: *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries* 67 (2005), Nr. 2, S. 166–176
- [Wilbur u. LeFurgey 1995] WILBUR, Karl M. ; LEFURGEY, Ann: Calcium Carbonate Mineralization. / DTIC Document. 1995 (0704-0188). – Forschungsbericht. – DTIC Report
- [Wilson u. Cox 2008] WILSON, R. ; COX, D.: *Encrusting tube worm (Ficopomatus enigmaticus)*. <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136513#>. Version: 24. April 2008. – nach Hutchings et al 2003
- [Wu u. a. 2013] WU, Q ; DU, J ; ZHUANG, G ; JING, C: *Bacillus* sp. SXB and *Pantoea* sp. IMH, aerobic As (V)-reducing bacteria isolated from arsenic-contaminated soil. In: *Journal of applied microbiology* 114 (2013), Nr. 3, S. 713–721
- [Wustman u. a. 1998] WUSTMAN, Brandon A. ; LIND, Jan ; WETHERBEE, Richard ; GRETZ, Michael R.: Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) III. Organization of fucoglucuronogalactans within the adhesive stalks of *Achnanthes longipes*. In: *Plant physiology* 116 (1998), Nr. 4, S. 1431–1441
- [Zargiel u. a. 2011] ZARGIEL, Kelli A. ; COOGAN, Jeffrey S. ; SWAIN, Geoffrey W.: Diatom community structure on commercially available ship hull coatings. In: *Biofouling* 27 (2011), Nr. 9, S. 955–965

Danksagung

Ich möchte Prof. Grunze vielmals danken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Prof. Dahint danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank an Prof. Rosenhahn für die innovativen Ideen und Anregungen, die meine Arbeit vorangebracht haben, für die vielen inspirierenden Kooperationen und Konferenzen, an denen ich teilnehmen konnte und für die konstruktiven Korrekturen. Herzlichen Dank auch an Prof. Cremer für das Interesse an meiner Arbeit und die Begutachtung.

Ich danke Dr. Rolf Simon und Dr. David Batchelor, die die Messungen am FLUO-Strahlrohr erst ermöglicht haben sowie Dr. Gerald Falkenberg und Dr. Ulrike Bösenberg für die Unterstützung der Messungen an P06. Mein ganz besonderer Dank gilt hier Jan Garrevoet, der die Experimente auch zu weit fortgeschrittener Stunde begleitet hat.

Dr. Thomas Gorniak, Andreas Buck und Mike Beckers für alle gemeinsam bewältigten Strahlzeiten inklusive tageszeitenunabhängigem Feierabendbier. Danke auch, Thomas und Andreas, für das Korrekturlesen vieler Kapitel dieser Arbeit.

I would like to thank Dr. Regina Gabilondo for the tubeworm samples and Dr. Alessio di Fino and Dr. Nick Aldred for all the cyprids they sent. Thank you, Tawheed Mohamed, for preparing the samples, dead or alive. Dr. Maria Alles danke ich für alle Algen, die sie mit mir geteilt hat.

Dr. Klaus Giewekemeyer danke ich für alle Diskussionen über die Ptychographie und den Rekonstruktionsalgorithmus.

Peter Jeschka und Günter Meinus danke ich für das Bezwingen aller Software-Bugs und Kabelbrüche, mit denen HORST uns regelmäßig konfrontiert hat.

Literaturverzeichnis

Klaus Schmitt und der gesamten feinmechanischen Werkstatt des Physikalisch-Chemischen Instituts danke ich für die präzise Ausführung aller möglichen und unmöglichen Aufträge sowie für die Bierzeltgarnituren, die im Sommer so manche Grillfeier vor dem Institut ermöglicht haben.

Ich danke Svetlana Duchnay, Karin Jordan und Benjamin Scherke für die Bewältigung aller bürokratischen und organisatorischen Hürden.

Danke auch an alle Helfer bei BESSY II, die durch ihre großen und kleinen Beiträge den Erfolg der Strahlzeiten ermöglicht haben.

Dr. Irene Wacker-Schröder, Dr. Sophie-Charlotte Gleber, Dr. Frank Kirschhöfer und PD Dr. André Beyer bin ich dankbar für die diversen Proben, die sie zur Verfügung gestellt haben.

Georg Albert danke ich für das fleißige Bedampfen vieler Siliziumnitridmembranen. Danke auch an Dr. Reiner Mönig und Daniela Exner für das FIBen perfekter Lochblenden.

Ich möchte der ganzen Arbeitsgruppe für alle vergnüglichen Stunden danken, die wir in den letzten Jahren miteinander verbracht haben.

Danke, Familie, für die gesamte Unterstützung y gracias a mis papis de Zaragoza.

Piluca, gracias para todo. Tú eres lo más importante en mi vida.