

**Schwefel-K-Kanten-Absorptionsspektroskopie
an ausgewählten biologischen Systemen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Henning Lichtenberg

aus Würzburg

Bonn, Juni 2008

**Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. J. Hormes**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. K. Heinloth**

Tag der Promotion: 14.07.2008

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.**

Erscheinungsjahr: 2008

Inhalt

	Seite
1 Einleitung	5
2 Grundlagen	7
2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie	7
2.2 XANES und EXAFS	8
2.3 Analyse von XANES-Spektren	10
2.4 Verwendete Referenzspektren	10
2.4.1 Elementarschwefel	11
2.4.2 Cystein, Methionin und Cystin	14
2.4.3 Reduziertes und oxidiertes Glutathion	15
2.4.4 Verbindungen mit Schwefel-Sauerstoff-Gruppen	15
3 Experimenteller Aufbau	16
3.1 Lichtquelle CAMD (Center For Advanced Microstructures and Devices)	16
3.2 Verwendete Strahlrohre	18
3.2.1 Aufbau der Strahlrohre	18
3.2.2 Doppelkristallmonochromator	19
3.2.3 Detektoren	20
3.3 Experimenteller Aufbau für ortsauflösende Messungen	24
3.3.1 Neue Vakuumkammer	25
3.3.2 Komponenten der Mikrosonde	26
3.3.3 Kirkpatrick- Baez- Spiegeloptik	28
3.4 Experimentelle Charakterisierung der Mikrosonde	31
3.4.1 Ermittlung des Strahlprofils	31
3.4.2 Lochblendenmessungen	33
3.4.3 Testmessungen an Metalldrahtgittern	35
3.4.4 Tests an biologischen Objekten	38

4	Ortsauflösende Messungen an rostpilzbefallenen Weizenblättern	41
4.1	Spezifika des Probensystems und messtechnische Details	41
4.2	Röntgenfluoreszenzanalyse.	43
4.3	Schwefel-K-XANES-Messungen	53
5	Schwefelspeziation in mikrobiellen Matten aus sulfidischen Höhlenquellen	60
5.1	Herkunft und Charakterisierung der Proben	60
5.2	Wissenschaftliche Bedeutung	62
5.3	Probenpräparation.	64
5.4	Ergebnisse und Diskussion	64
6	Einfluss unterschiedlicher Modi der Schwefelernährung auf den Stoffwechsel von <i>Allium cepa</i> L.	71
6.1	Schwefel-Stoffwechsel von <i>Allium cepa</i> L.	71
6.2	Herkunft und Präparation der Proben	73
6.3	Messergebnisse und Diskussion	74
6.3.1	Orientierungsmessungen an Zwiebelknollen	74
6.3.2	Messungen an Wurzeln und Trieben	78
7	Schwefelhaltige Verbindungen in Kaffeebohnen und Einfluss des Röstens auf die Schwefel-Speziation	86
7.1	Kennzeichnung des Probensystems	86
7.2	Probenpräparation	87
7.3	Messergebnisse und Aussagen	89
7.4	Diskussion	96
8	Fazit der Untersuchungen	99
-	Literaturverzeichnis	102
-	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	110
-	Zusammenfassung / Abstract.	112

1 Einleitung

Schwefel kommt in der Natur fast überall in großen Mengen vor, sowohl in Reinform (Elementarschwefel-Lagerstätten unter Gesteinsschichten) als auch anorganisch (in Sulfiden und Sulfaten, etwa als Pyrit oder Gips) oder organisch gebunden. Die chemische Industrie verarbeitet große Mengen dieses Elements, z. B. zur Produktion von Sulfatdünger, zur Herstellung von Schwefelsäure (weltweit meist verwendete Chemikalie) und zum Vulkanisieren von Kautschuk (Fabrikation von Autoreifen) [Wib07]/[Bro07].

Am sog. 'Schwefelkreislauf' (wesentlich durch Bakterien getragen) sind auch die gasförmigen Verbindungen in der Atmosphäre und ihre Quellen, z. B. der Vulkanismus oder die Verbrennung fossiler Stoffe maßgeblich beteiligt [Sie07]. In biologischen Systemen liegt Schwefel in einer Vielzahl von Oxidationsstufen vor. Bei Stoffwechselvorgängen ändert sich die Oxidationsstufe. Pflanzen z. B. nehmen Sulfat über die Wurzeln auf und müssen den Schwefel vor Einbau in organische Schwefelverbindungen reduzieren. Einige Bakterien nutzen Oxidation und Reduktion von Schwefel zur Energiegewinnung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die Bindungsumgebung von Schwefelatomen in ausgewählten biologischen Systemen durch äußere Faktoren, d. h. durch Variation der Umweltbedingungen beeinflusst wird.

Das hier verwendete Messverfahren der Röntgenabsorptions-Nahkantenspektroskopie (X-ray Absorption Near Edge Structure, XANES) ist hinsichtlich dieser Fragestellung anderen analytischen Methoden überlegen.

Das Absorptionsverhalten von Schwefel zeigt eine hohe Sensitivität gegen die atomare Umgebung. Bereits eine rein qualitative Betrachtung des spektralen Verlaufs der Absorption ermöglicht in vielen Fällen unmittelbar Rückschlüsse auf die Oxidationsstufe, in der die Schwefelatome im Untersuchungsmaterial vorliegen. Auch die geometrische Anordnung der Bindungspartner der Absorberatome spiegelt sich im Absorptionsverhalten wieder. Darüber hinaus haben nicht nur die unmittelbaren Nachbaratome signifikanten Einfluss auf den spektralen Verlauf der Absorption, sondern auch höhere Koordinationsschalen. Dabei erfordert das Verfahren keine kristallinen Strukturen. Ein Vergleich mit Spektren bekannter Substanzen liefert häufig bereits charakteristische Informationen ('Fingerprints'). Da die Röntgenabsorptionsspektren additiv sind, ist bei Verwendung geeigneter Referenzspektren eine quantitative Analyse der Messergebnisse möglich.

Ein weiterer Vorteil besteht bei diesem Verfahren darin, dass die Schwefelverbindungen in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können. Es sind keine Extraktionsprozesse nötig, und die Methode ist weitgehend zerstörungsfrei, im Unterschied zu chemischen Analyseverfahren wie der Nasschemie, die i. A. keinen Rückschluss auf Bindungszustände erlauben. Außerdem muss nicht im (Ultra-)Hochvakuum gearbeitet werden, d. h. ein Ausgasen der Proben ist unproblematisch. Bei Einsatz von Fokussieroptiken sind zudem ortsauflösende Messungen möglich.

Für röntgenspektroskopische Untersuchungen bietet ein Synchrotron als Strahlungsquelle in Verbindung mit einem schmalbandigen Monochromator gegenüber einer Röntgenröhre erhebliche Vorteile, da das Spektrum des Synchrotronlichts sich über einen weiten Energiebereich

durch eine nur wenig variierende Photonenflussdichte auszeichnet. Ein Synchrotron mit entsprechenden experimentellen Möglichkeiten steht u. a. am CAMD (Center for Advanced Microstructures and Devices – Louisiana State University) in Baton Rouge / USA zur Verfügung. Seit langem besteht eine rege Zusammenarbeit mit der Synchrotronlicht-Gruppe am Physikalischen Institut der Universität Bonn.

Ein wesentlicher Teil der Arbeit befasst sich mit dem Rostpilzbefall von Weizenblättern, einer landwirtschaftlich relevanten Pflanzenkrankheit. Anhand eines Vergleichs der Absorptionsspektren gesunder und manifest rostpilzbefallener Geweberegionen können Rückschlüsse auf die Wechselwirkung zwischen Pathogen und Wirtspflanze gezogen werden. Über XANES-Messungen an intakten Blättern verschiedener Pflanzen (ohne Pilzbefall) wird in [Jal05] berichtet. Die Rostpilz-Untersuchungen erforderten ortsauflösende Messungen, wofür die Justierung und Inbetriebnahme einer neuen Vakuumkammer nötig waren.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden (ohne Ortsauflösung) Untersuchungen an drei weiteren Probensystemen durchgeführt. Deren Auswahl erfolgte vor allem deshalb, weil in ihnen bestimmte Schwefelverbindungen eine über Standardfunktionen hinausgehende Relevanz haben.

Messungen an mikrobiellen Matten aus sulfidischen Höhlenquellen sind von erheblichem Interesse. Das Probenmaterial kann im Vergleich zu Tiefseeobjekten relativ einfach einer lichtlosen natürlichen Umgebung entnommen werden. Die in diesen Matten enthaltenen Bakterien sind von großer Bedeutung für das Ökosystem, speziell für den Schwefelkreislauf. Untersucht wurde Material aus verschiedenen Schichten der mikrobiellen Matten. In den einzelnen Schichten herrschen unterschiedliche Habitatbedingungen.

Ein weiteres aktuelles Probensystem stellen Zwiebelpflanzen (konkret: *Allium cepa L.*, Speisezwiebel) dar. Hier wurde untersucht, wie sich wurzelseitiger Sulfatmangel bzw. eine Begasung mit H_2S auf schwefelhaltige Inhaltsstoffe (u. a. für Phytopharmazeutika von Bedeutung) in Wurzeln und Trieben auswirkt. Über XANES-Messungen an verschiedenen Pflanzen der Gattung *Allium* hat [Sne04] berichtet.

Um Einblick in die thermische Zersetzung biologischen Materials zu gewinnen, wurde das Rösten von Kaffeebohnen betrachtet. Bei Kaffeebohnen spielen Schwefelverbindungen, die sich vorwiegend während des Röstens bilden, eine entscheidende Rolle als Aromastoffe. Die Röntgenabsorptionsspektren erlauben einen neuartigen Einblick in die wirksamen Prozesse; bisher sind keine XANES-Messungen an diesem Probensystem erfolgt.

In dieser Arbeit werden nach der Erörterung der physikalischen Grundlagen und der Beschreibung des Messaufbaus die biologischen Aspekte ausführlich diskutiert. Wesentliche Impulse und Anregungen hat Prof. Dr. Dr. Alexander Prange (Hochschule Niederrhein, CAMD) als Biologe gegeben. Das Thema greift über die klassischen Disziplinen hinweg. Es erfordert die Zusammenarbeit der Physik mit der Mikrobiologie, der Pflanzenpathologie, der Botanik und der Lebensmittelchemie. Dabei muss die Kollaboration für alle Partner gewinnbringend sein.

2 Grundlagen

2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Der Intensitätsverlust eines monochromatischen Röntgenstrahls mit der Photonenenergie $E = h \cdot \nu$ beim Durchgang durch eine homogene Materieschicht der Dicke d wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$I(E) = I_0 \cdot e^{-\mu(E) \cdot d}$$

$I(E)$: transmittierte Intensität, I_0 : anfängliche Intensität,
 $\mu(E)$: linearer Absorptionskoeffizient

Zur Schwächung des Strahls tragen Rayleigh-Streuung (elastische Streuung), Compton-Streuung (unelastische Streuung), Photoabsorption und Paarbildung bei. Der lineare Absorptionskoeffizient $\mu(E)$, eine materialspezifische Funktion der Photonenenergie, fällt i. A. stetig bei kontinuierlicher Erhöhung der Photonenenergie, näherungsweise proportional zu E^{-3} , steigt jedoch bei Überschreiten bestimmter Energieschwellen sprunghaft an ([Aga79]/[Boo86], siehe Abb. 2.1 - im Folgenden nur Photoabsorption relevant). Solche spektralen Diskontinuitäten werden als 'Absorptionskanten' bezeichnet. An der Absorptionskante reicht die Photonenenergie gerade aus, um Innerschalen-Elektronen der Absorberatome durch Photoabsorption ins Kontinuum zu befördern. Laut Konvention wird die Hauptquantenzahl (1, 2, 3, ..)

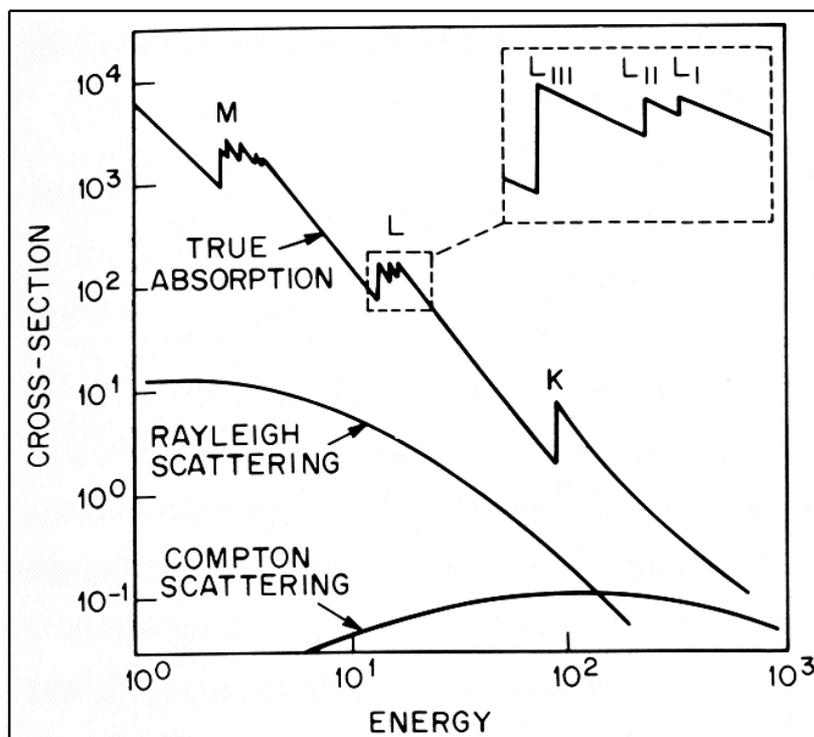


Abb. 2.1: Relative Wirkungsquerschnitte als Funktion der Photonenenergie [Boo86]

der Ursprungsniveaus angeregter Elektronen mit Großbuchstaben (K,L,M...) bezeichnet, die Drehimpulsquantenzahl mit römischen Ziffern (I, II, III...). Abgesehen von einigen Orientierungs- und Testmessungen (siehe Kap. 3 und 4) wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Absorptionsspektren an der Schwefel-K-Kante (2472 eV) aufgenommen. Die Absorptionskanten weisen eine Feinstruktur auf, die sog. 'Röntgenabsorptions-Feinstruktur' (engl. 'X-Ray Absorption Fine Structure' = XAFS), mit deren Analyse sich die Röntgenabsorptionsspektroskopie (engl. 'X-Ray Absorption Spectroscopy' = XAS) befasst.

XAS ermöglicht eine weitgehend zerstörungsfreie, elementspezifische Analyse der unmittelbaren atomaren Umgebung der jeweiligen Absorberatome, d. h. Anzahl, Kernladungszahl und geometrische Anordnung der Nachbaratome, elektronische Struktur. Dabei sind Messungen an Proben in verschiedenen Phasen (kristallin, amorph, flüssig, gasförmig) möglich.

Bei der Messung von Röntgenabsorptionsspektren hat eine Synchrotron-Strahlungsquelle als Lichtquelle im Vergleich zur Röntgenröhre erhebliche Vorteile: Sie liefert über einen weiten Energiebereich ein glattes, kontinuierliches Spektrum mit hoher Intensität. Dies ermöglicht bei Einsatz von schmalbandigen Monochromatoren Messungen mit hoher spektraler Auflösung und gutem Signal-Rausch-Verhältnis. Außerdem sind häufig Merkmale wie die Polarisierung und die definierte Zeitstruktur der Synchrotronstrahlung relevant [Kun79]/[Mar88]. Aufgrund der Kollimation des Synchrotronlichts sind unter Einsatz von Fokussieroptiken auch ortsauflösende XAS-Messungen möglich (Mikrospektroskopie, siehe Kap. 4).

Sehr gering ist die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Beaufschlagung des Probenmaterials mit dem Synchrotronlicht Strahlenschäden verursacht werden, die sich verfälschend auf das Messergebnis auswirken. Wie eine Abschätzung anhand der Photonenflussdichten (hinter dem Monochromator) und der Wirkungsquerschnitte zeigt, wird nur ausnahmsweise ein bereits ionisiertes Atom noch einmal getroffen, so dass es einen erneuten Beitrag zum Absorptionsspektrum liefern kann.

2.2 XANES und EXAFS

In der Umgebung einer Absorptionskante werden zwei Energiebereiche unterschieden (siehe Abb. 2.2): Die Nahkantenstruktur (engl. 'X-Ray Absorption Near Edge Structure', XANES) und die kantenferne Feinstruktur (engl. 'Extended X-Ray Absorption Fine Structure', EXAFS).

Feinstrukturen im EXAFS-Bereich kommen vorwiegend durch Einfachstreuung und Interferenz hochenergetischer Photoelektronen an den Nachbarn des Absorberatoms zustande [Say71]. Falls die de Broglie-Wellenlänge der (auslaufenden) Photoelektronen größer ist als der Abstand zwischen Absorberatom und nächstem Nachbarn, ist die Einfachstreuungstheorie nicht anwendbar [Reh00]. Die Lage der Grenze zwischen XANES- und EXAFS-Bereich, d. h. die Energieschwelle zur Vielfachstreuung relativ zur entsprechenden Absorptionskante, ist somit nicht starr definiert, sondern hängt vom untersuchten Material ab. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit XANES-Spektren befasst, wird auf EXAFS an dieser Stelle nicht ausführlich eingegangen.

Anhand des in Abb. 2.2 skizzierten Beispiel-Spektrums werden im Folgenden einige weitere Grundbegriffe erläutert. Die so genannte Kante (verursacht durch das Einsetzen der Photoionisation infolge Anregung von Innerschalenelektronen) wird in XAS-Spektren häufig von anderen Strukturen überlagert. Die Ionisationsenergie, die benötigt wird, um ein gebundenes Elektron ins Kontinuum zu befördern, definiert die Trennlinie zwischen Vorkanten-Bereich (engl. 'pre-edge') und Nachkanten-Bereich (engl. 'post-edge'). Pre-edge-Strukturen kommen

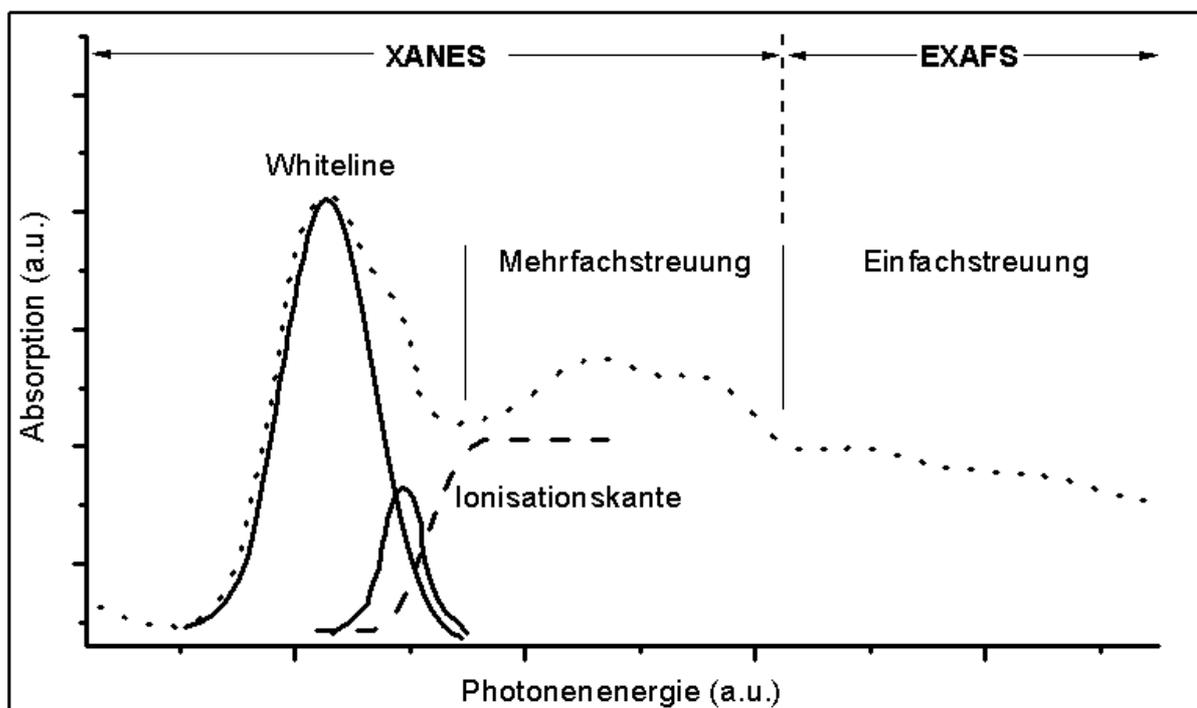


Abb. 2.2: Skizziert XAFS-Beispielspektrum (keine reale Probe)

durch Anregung von Elektronen aus Innerschalenzuständen in die niedrigsten, zumindest teilweise unbesetzten Niveaus zustande. Die Intensität dieser Strukturen hängt von den Übergangswahrscheinlichkeiten ab, und diese u. a. von der Symmetrie der atomaren Umgebung (Koordinationssymmetrie, z. B. tetraedrisch, oktaedrisch). Die Hybridisierung von Bindungszuständen und die geometrische Struktur der Materialien spielt eine wesentliche Rolle. Bei den Übergangsmetallen sind z. B. die niederenergetischsten freien Zustände d-Orbitale. Elektronische Übergänge von der 1s-Schale in diese Zustände würden die Dipol-Auswahlregel $\Delta l = \pm 1$ verletzen. So weisen z. B. unterschiedliche Chromoxide (Rutil-Struktur etc...) spezifische Vorkantenstrukturen auf. Die Hauptursachen dafür sind die zunehmende Verzerrung der Koordinationspolyeder und die Hybridisierung von 3d- mit 4p-Orbitalen sowie die zunehmende Überlappung von Cr-3d-Zuständen und Sauerstoff-2p-Orbitalen (Dipolauswahlregel z. T. erfüllt [Pan04]).

Die erste intensive Resonanz im Absorptionsspektrum wird als 'Whiteline' bezeichnet, da sie auf einer Photoplatte als Registriermedium eine weiße Linie bewirkt. Strukturen im Nachkantenbereich (d. h. oberhalb des Ionisationspotentials) kommen durch Vielfachstreuungsprozesse niederenergetischer Photoelektronen an Nachbaratomen zustande ('Shape-Resonanzen', [Reh00]). Weitere Erläuterungen zu Strukturen in XANES-Spektren und daraus herleitbare Aussagen folgen unten anhand einiger Referenzspektren.

2.3 Analyse von XANES-Spektren

Ab-initio-Berechnungen von XANES-Spektren sind aufwändiger als EXAFS-Analysen, da hierbei Mehrfachstreuprozesse zu berücksichtigen sind. Für derartige Simulationen sind verschiedene Programmpakete wie FEFF8 [Ank98] entwickelt worden. Die XANES-Theorie ist in anderen Arbeiten der Gruppe ausführlich erläutert, siehe z. B. [Mod99].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein einfacheres Verfahren zur Datenanalyse angewendet: Das XANES-Spektrum eines Stoffgemisches lässt sich durch eine Linearkombination der Spektren der einzelnen Komponenten reproduzieren. Die Koeffizienten in der Linearkombination geben die relativen Konzentrationen der entsprechenden Komponenten im Gemisch wieder, d. h. ihre Gehalte bezogen auf den Gesamtgehalt am betrachteten Element. Sie können numerisch mit einem Least-Squares-Fit ermittelt werden. Mit diesem Verfahren sind von der Bonner Synchrotronstrahlungsgruppe unterschiedliche Probensysteme analysiert worden, siehe z. B. [Mod99]/[Bren04]). Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Programmpaket WINXAS97 verwendet [Res98].

Voraussetzung für eine solche Analyse ist die Verfügbarkeit von XANES-Spektren geeigneter Referenzsubstanzen (Referenzspektren). Kontrovers wird in der Literatur die Frage diskutiert, bis zu welcher Koordinationsschale für Referenzzwecke Übereinstimmung anzustreben ist [Cha97]. Eine Abschätzung zur Genauigkeit des Verfahrens und ein Hinweis auf mögliche Fehlerquellen finden sich bei [Mod99]. Bei biologischen Systemen ist mit einer derartigen Vielzahl von Verbindungen zu rechnen, dass nicht für jede stoffliche Komponente eine exakt darauf abgestimmte Referenz verfügbar ist. Außerdem kann ein Fit-Programm nur eine begrenzte Anzahl von Referenzspektren verarbeiten, wenn das Resultat noch aussagekräftig sein soll.

Vor der Anwendung der 'Least Squares'-Routine wurden die Rohdaten wie folgt bearbeitet: Es wurde zunächst eine Gerade subtrahiert, deren Steigung durch den Vorkantenbereich festgelegt wird. Aufgrund der geringen Breite des Messbereichs (≤ 80 eV) kann in guter Näherung von einem linearen Verlauf der Hintergrundabsorption ausgegangen werden (weitere Details zu den Messparametern in Kap. 3). Die Spektren wurden dann bei 2510 eV normiert, weil dort die Strukturierung ausreichend schwach geworden ist. Außerdem wurden die Spektren noch mit einer 'cubic spline'-Routine (in WINXAS97 enthalten) interpoliert, um äquidistante Messpunkte auf der Energieskala zu erhalten. Als Fit-Bereich wurde das Energieintervall 2465-2485 eV gewählt.

2.4 Verwendete Referenzspektren

Um die in den biologischen Probenmaterialien jeweils vorherrschenden atomaren Umgebungen der Schwefelatome zu repräsentieren, wurde ein 'Standardsatz' von 12 Referenzspektren ausgewählt. Bei einigen Proben wurden zusätzliche Referenzspektren verwendet, siehe im entsprechenden Kapitel. Andere Spektren wurden versuchsweise zu quantitativen Analysen mit herangezogen, führten allerdings nicht zu befriedigenden Ergebnissen und werden daher

im Folgenden nicht diskutiert. Grundsätzlich ist bei quantitativen Analysen ein möglichst begrenzter Umfang des Referenzspektrums anzustreben.

Abb. 2.3 gibt Strukturformeln einiger dieser Referenzsubstanzen wieder, Abb. 2.4 die zugehörigen XANES-Spektren. Die Spektren wurden der Übersichtlichkeit halber auf die Whiteline-Intensitäten normiert, die aber von Referenzsubstanz zu Referenzsubstanz erheblich variieren.

Anhand von Abb. 2.4 wird deutlich, dass häufig schon eine qualitative Betrachtung der Spektren einen wichtigen Anhaltspunkt (‘Fingerprint’) liefern kann. Dies betrifft insbesondere die energetische Lage der Whiteline. Aus Abb. 2.4 ist ersichtlich, dass sich mit steigender Oxidationsstufe des Schwefels in einer Verbindung die Whiteline zu höheren Energien verschiebt. Dies ist qualitativ wie folgt zu erklären: Wenn sich die Elektronendichte infolge der höheren Elektronegativität eines Bindungspartners beim Schwefel verringert (d. h. bei höherer Oxidationsstufe des Schwefels), ist die Abschirmung der Innerschalenelektronen des Absorberatoms durch die Valenzelektronen reduziert. Dies führt zu einer stärkeren Bindung der Innerschalenelektronen und somit zu einer Verschiebung des XANES-Spektrums zu höheren Energien (sog. ‘chemische Verschiebung’). Die energetische Lage der Molekülorbitale ist charakteristisch für die atomare Umgebung des betreffenden Absorberatoms; daher lässt sich die XANES-Spektroskopie zur Untersuchung elektronischer Strukturen unbekannter Substanzen anwenden [Jal06]/[Apt82]/ [Geo89]/[Huf91].

Die Positionen der Whiteline-Strukturen (absolute Absorptionsmaxima bzw. Wendepunkte der ansteigenden Flanken) in Abb. 2.4 sind über einen Energiebereich von ca. 10 eV verteilt (in Übereinstimmung mit [Cin06]). Die energetische Zuordnung ist daher bei der gegebenen apparativen Auflösung eindeutig möglich. Näherungsweise besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Oxidationszahl und energetischer Lage der Whiteline ([Fra99], siehe Abb. 2.5; der Ordinatenwert entspricht jeweils der energetischen Lage des Maximums der Whiteline). Für die richtige Zuordnung spielen die bei der Bestimmung der Oxidationsstufe angewandten Regeln eine wichtige Rolle [Vai98].

2.4.1 Elementarschwefel

Als Elementarschwefel-Referenzen wurden die Spektren (a) und (b) in Abb. 2.4 benutzt. Anorganischer Schwefel kommt in der Natur vorwiegend als Sulfid vor, aber auch in großen Mengen in Reinform [Wib07]. Elementarschwefel, d. h. Schwefel mit der Oxidationsstufe Null (S^0) spielt eine zentrale Rolle für Stoffwechselprozesse einiger Bakterien, speziell für deren Energiestoffwechsel. Schwefeloxidierende Bakterien (SOB) oxidieren S^{2-} oder auch S^0 zu Sulfat (SO_4^{2-}). Viele dieser Organismen können Elementarschwefel in Form von Kugeln (engl. ‘globules’) intrazellulär und als Reserve für Perioden knapper Schwefelversorgung einlagern ([Pra01], siehe Kap. 5). Für den Schwefelstoffwechsel spielt bei einigen Bakterien auch Thiosulfat eine wesentliche Rolle (nicht relevant im Rahmen dieser Arbeit).

In seiner thermodynamisch stabilsten Form (S_8) liegt Elementarschwefel als gewellter Ring von 8 Schwefelatomen mit der Wertigkeit Null vor ([Wib07], hierzu in Abb. 2.3 keine Strukturformel). Dazu gehört das Referenzspektrum (a) in Abb. 2.4.

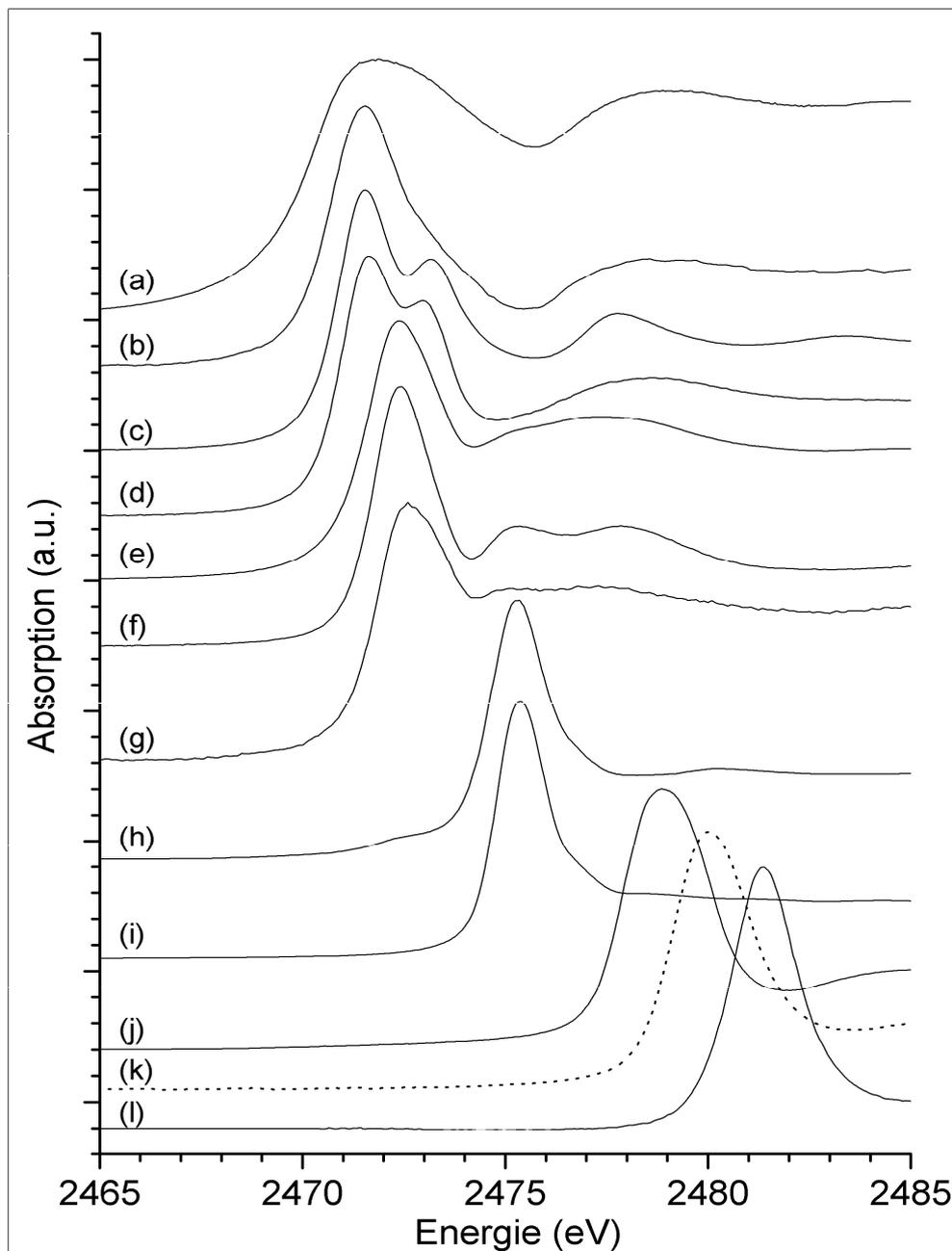


Abb. 2.4: 'Standard'-Referenzspektren: (a) Ringschwefel(S_8), (b) Polymerschwefel (S_μ), (c) Cystin, (d) oxidiertes Glutathion, (e) Cystein, (f) reduziertes Glutathion, (g) Methionin, (h) Methioninsulfoxid, (i) Dimethylsulfoxid, (j) Methioninsulfon, (k) Cysteinsäure, (l) Zinksulfat

Bei der zweiten Elementarschwefel-Referenzsubstanz liegen lange Ketten von Schwefelatomen vor (S_μ = Polymerschwefel, Spektrum (b) in Abb. 2.4, [Ste03]). Obwohl im Falle des Elementarschwefels bei S_8 und S_μ gleiche Bindungspartner beteiligt sind, unterscheiden sich die Absorptionsspektren erheblich, wie aus Abb. 2.4 ersichtlich. Dies zeigt, wie sensitiv die XANES-Spektroskopie gegen die atomare Umgebung ist [Mod99].

Die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Proben mit hohem Elementarschwefelgehalt beinhalten vermutlich ein Gemisch aus Ringen verschiedener Größe und aus Schwefelketten.

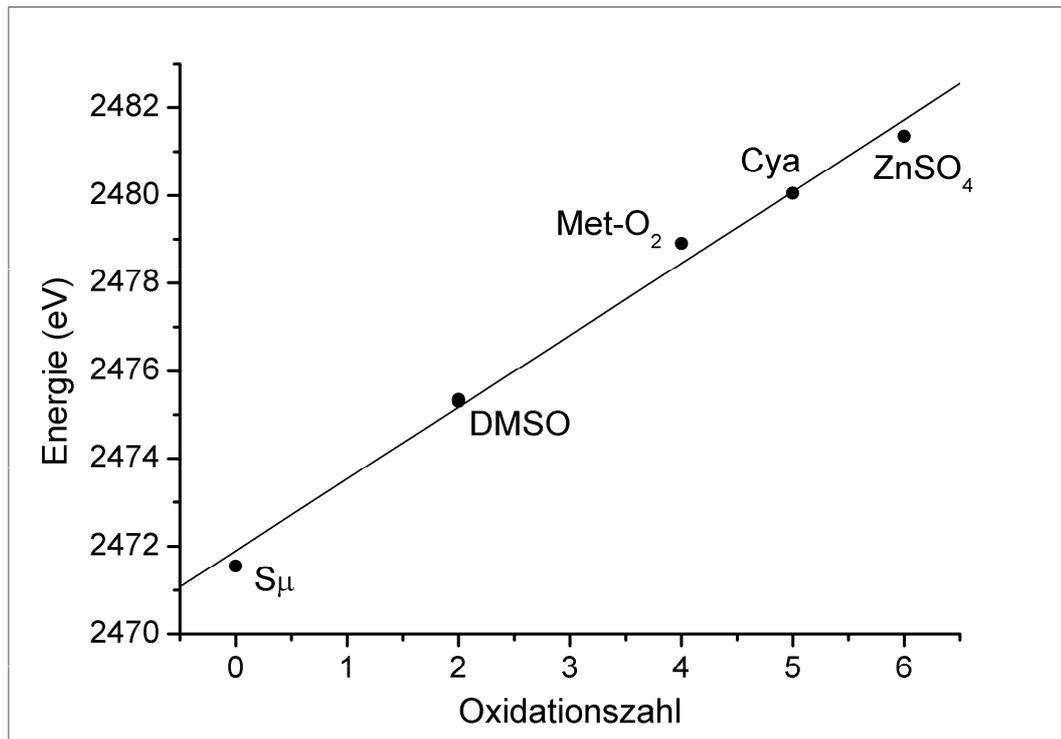


Abb. 2.5: Energetische Lage der Whitelines verschiedener Referenzsubstanzen in Abhängigkeit von der Oxidationszahl des Schwefels. Abkürzungen: S_μ=Polymerschwefel, DMSO=Dimethylsulfoxid, Met-O₂=Methioninsulfon, Cya=Cysteinsäure, ZnSO₄=Zinksulfat

2.4.2 Cystein, Methionin und Cystin

Proteine haben in biologischen Systemen vielfältige Funktionen, u. a. zur Stabilisierung der Zellen (Proteingerüst), als Membranbausteine und als biochemische Katalysatoren (Enzyme). Proteine sind durch Peptidbindungen verbundene Aminosäuren.

Von den 20 proteinogenen Aminosäuren sind zwei schwefelhaltig, nämlich Cystein und Methionin. Beim Cystein ist der Schwefel in der Seitenkette einerseits an Kohlenstoff, andererseits an Wasserstoff gebunden. Beim Methionin liegt das Schwefelatom in der Seitenkette zwischen Kohlenstoffatomen [Lod96]. Trotz der unterschiedlichen Umgebung liegt die Whiteline bei Cystein und Methionin energetisch an der gleichen Stelle. Die Whiteline stellt daher hier kein geeignetes Unterscheidungskriterium dar. Eine Differenzierung ergibt sich erst aus einer detaillierten Betrachtung der Nahkantenspektren [Pra02]. Cystein repräsentiert ganz allgemein die Gruppe der Thiole in den Proben, Methionin steht auch für andere Monosulfane (die vielerorts ungenau als 'Sulfide' bezeichnet werden).

Die SH-Gruppen zweier Cysteinmoleküle können unter Bildung einer Disulfidbrücke miteinander (streng genommen Disulfanbrücke) reagieren. Dadurch entsteht Cystin. Disulfidbrücken sind als Raumstruktur-prägende und stabilisierende Querverbindungen zwischen Aminosäureketten von Bedeutung. Proteine können ihre Wirksamkeit nur in der korrekten dreidimensionalen Konfiguration entfalten [Lod96].

Charakteristisch für Disulfidbindungen ist eine Aufspaltung der Whiteline, d. h. ein Doppelpeak im Absorptionsspektrum (siehe Abb. 2.4). Die niederenergetische Komponente ist typisch für Übergänge in Molekülorbitale, die zu einer Disulfidbindung gehören; die höherenergetische Komponente typisch für Übergänge in Molekülorbitale, die bei einer S-C-Bindung auftreten. Details hierzu hat Chauvistre diskutiert [Cha97].

2.4.3 Reduziertes und oxidiertes Glutathion

Reduziertes Glutathion (GSH) wird aus den Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure und Cystein gebildet. Als Tripeptid stellt GSH vermutlich einen besser geeigneten Repräsentanten für die typische atomare Umgebung einer SH-Gruppe in Proteinen dar als Cystein (obwohl erst höhere Koordinationsschalen Unterschiede aufweisen).

Glutathion ist in hoher Konzentration in (fast allen) Zellen enthalten und hat für Zellen wichtige Funktionen, u. a. fungiert es als Redoxpuffer. Eine Reihe aggressiver Stoffe wird daran gebunden. Es schützt Zellen vor der Oxidation, wirkt also antioxidativ. Außerdem stellt GSH einen 'Schwefelcarrier' [Pra02] dar.

Die antioxidative Wirkung beruht im Wesentlichen auf der Bildung von oxidiertem Glutathion (GSSG) aus zwei GSH-Molekülen (Strukturformel in Abb. 2.3 entbehrlich), analog zur Cystin-Bildung - siehe oben [Ben75]/[Sie89]. Das oxidierte Glutathion repräsentiert die typische Umgebung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Aminosäurenketten.

Die XANES-Spektren von GSH und Cystein einerseits sowie von GSSG und Cystin andererseits sind erwartungsgemäß ähnlich. Auffällig sind allerdings Differenzen im Bereich der 'Shape-Resonanzen', offensichtlich bedingt durch Unterschiede in höheren Koordinationsschalen.

2.4.4 Verbindungen mit Schwefel-Sauerstoff-Gruppen

Die Kurven h) bis l) in Abb. 2.4 sind Spektren von Verbindungen, bei denen ein bis vier Sauerstoffatome (elektronegativer als Schwefel) an Schwefel gebunden sind. Es handelt sich um Dimethylsulfoxid (DMSO), Methioninsulfoxid, Methioninsulfon, Cysteinsäure und Zinksulfat.

Die Sulfoxid-Verbindungen (mit Schwefel in der Oxidationsstufe +II) spielen u. a. eine wichtige Rolle als Inhaltsstoffe der Zwiebelgewächse (siehe Kap. 6). Methioninsulfon (+IV), Cysteinsäure (+V) und Zinksulfat (+VI) repräsentieren Verbindungen, in denen der Schwefel in höheren Oxidationsstufen vorliegt. Sulfatgruppen sind Bestandteil der Sulfolipide in Membranen [Gol61]. Die Schwefelernährung von Pflanzen seitens der Wurzeln erfolgt durch Aufnahme und schrittweise Reduktion von Sulfaten [Dur04]/[Hel02], siehe Kap. 6. Außerdem treten bei Stoffwechselprozessen der meisten schwefeloxidierenden Bakterien als Endprodukt Sulfatverbindungen auf ([Can05], siehe Kapitel 5). Die Whiteline im Spektrum des Zinksulfats wurde zur Kalibrierung des Monochromators verwendet. Der entsprechende Übergang zeichnet sich durch extreme Oszillatorstärke aus. XANES-Spektren von Sulfatverbindungen mit verschiedenen Kationen hat Takahashi untersucht [Tak06].

3 Experimenteller Aufbau

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Synchrotron-Strahlungslabor CAMD (‘J. Bennett Johnston Sr. Center for Advanced Microstructures and Devices’, Louisiana State University, Baton Rouge/USA) durchgeführt. Forschungsschwerpunkte am CAMD sind atomare und molekulare Strukturen sowie die Eigenschaften kondensierter Materie (inkl. Röntgenabsorptionsspektroskopie) und Mikrofabrikation.

Die Messungen erfolgten an den Messplätzen DCM (**D**ouble **C**rystal **M**onochromator) und XMP (**X**-ray **M**icroprobe). Beide Strahlrohre sind weitgehend ähnlich. Die spektrale Zerlegung des polychromatischen Synchrotronlichts (Strahlung im Bereich der Ablenkmagneten) erfolgt durch baugleiche Doppelkristall-Monochromatoren.

Die Röntgenabsorptionsspektren wurden teils im Transmissions-, teils im Fluoreszenzmodus aufgenommen (3.2.3). In beiden Messmodi wurde die einfallende monochromatische Intensität I_0 mit einer Ionisationskammer erfasst, die im Folgenden als ‘Monitorkammer’ bezeichnet wird. Im Transmissionsmodus wird die transmittierte Intensität der monochromatischen Strahlung I_1 mit einer weiteren Ionisationskammer (‘Detektorkammer’) gemessen. Der Absorptionskoeffizient ergibt sich bei homogener Probe unter Berücksichtigung der Probendicke aus dem natürlichen Logarithmus des Quotienten I_0/I_1 (Lambert-Beersches Gesetz, siehe Kap. 2). Bei Messungen im Fluoreszenzmodus wird die Intensität einer ausgewählten Röntgen-Emissionslinie mit einem Halbleiter-Detektor registriert und durch die einfallende Intensität dividiert, um den linearen Absorptionskoeffizienten zu erhalten. Entscheidend für die Wahl des Messmodus ist die Probenkonzentration des Elementes, dessen Absorptionskante betrachtet wird. In der Praxis werden i. d. R. niedrig konzentrierte Proben im Fluoreszenzmodus gemessen, außerdem Proben, die nicht als dünne Schichten präpariert werden können. Bei höheren Konzentrationen sollte (nicht zuletzt wegen der Selbstabsorption der Probe) der Transmissionsmodus gewählt werden.

Für die am Probensystem ‘Pilzbefall von Weizenblättern’ durchgeführten ortsauflösenden Messungen stand am XMP-Strahlrohr ein Messplatz mit einer Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik zum Fokussieren der anregenden monochromatischen Strahlung sowie mit einem motorisierten Probenhalter zur Verfügung (siehe 3.3).

3.1 Lichtquelle (CAMD)

Nach Vorbeschleunigung der Elektronen im Linearbeschleuniger (LINAC) erfolgt die Injektion in den Speicherring und dort die Beschleunigung auf eine Endenergie von 1,3 GeV.

Die Experimente nutzen die tangential zur Bahn abgestrahlte Synchrotronstrahlung der relativistischen Elektronen, die durch insgesamt acht Dipolmagnete radial beschleunigt und dadurch auf einer Kreisbahn gehalten werden. Darüber hinaus ist in eines der geraden Teilstücke des Rings ein supraleitender Wiggler eingebaut. Abb. 3.1 gibt schematisch die Lage der Strahlrohre wieder. Der Speicherring wird durch eine Betonmauer mit Durchlässen für die Strahlrohre abgeschirmt. In Tabelle 3.1 sind die wichtigsten Maschinenparameter zusammengestellt. In Abb. 3.2 ist die spektrale Verteilung des Photonflusses an den Ablenkmagneten bzw. am Wiggler aufgetragen.

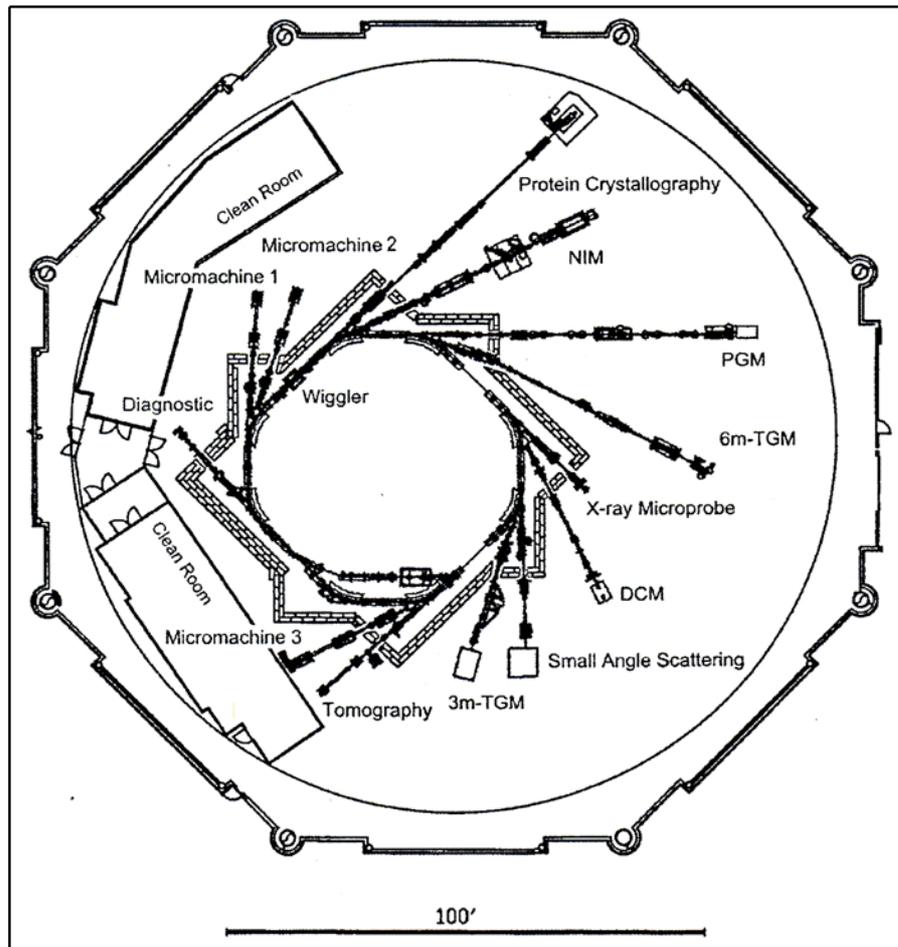


Abb. 3.1: Lageplan der Strahlrohre am CAMD [Mor02]

Beam Energy (GeV)	1.3
Beam current (mA)	200
Bending radius (meters)	2.928
Critical wavelength, bend magnet (Å)	7.45
Critical energy, bend magnet (keV)	1.66
Critical energy, 7 Tesla wiggler (keV)	7.87
Beam lifetime at 200 mA (hours)	10
Harmonic number	92
Radiative (power) mwatts/mrad/mA	0.014
Injection energy (MeV)	200
Natural emittance (m-rad)	3.5×10^{-7}

Tab. 3.1: CAMD Maschinenparameter [CAM05]

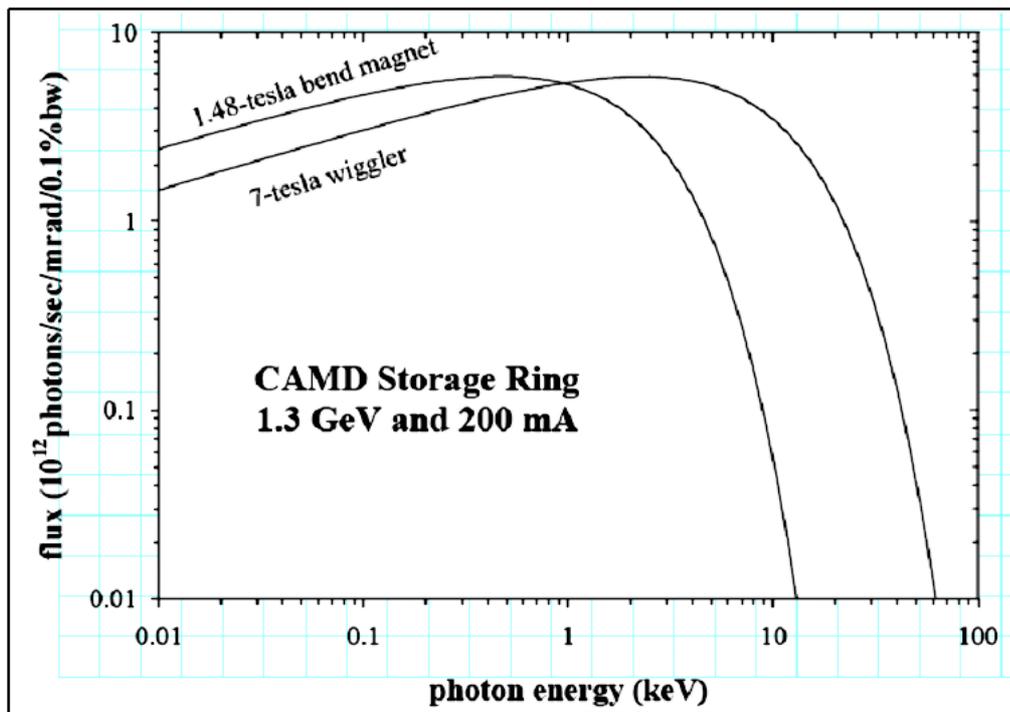


Abb. 3.2: Spektrale Verteilung des Photonenflusses [CAM05]

Aus Abb. 3.2 ist ersichtlich, dass sich das CAMD-Synchrotron als Lichtquelle für Messungen an der Schwefel-K-Kante (2,5 keV) gut eignet, denn die Schwefel-K-Kante liegt dicht am Maximum der Photonendichte der emittierten Synchrotronstrahlung.

3.2 Verwendete Strahlrohre

3.2.1 Aufbau der Strahlrohre

Wie bereits gesagt, sind die Messplätze XMP (Ablenkmagnet 5, Port A) und DCM (Port 5B) in ihrem Aufbau sehr ähnlich, zumindest auf der Eintrittsseite der Monochromatoren. Auf Unterschiede wird unten eingegangen.

Der weiße Röntgenstrahl tritt aus der 'Dipol-Magnet-Kammer' (DMC) des Speicherrings zunächst durch eine wassergekühlte Kupferblende (Kollimator, definiert maximale horizontale Akzeptanz des Strahlrohrs auf 2 mrad). Es folgen ein Strahlverschluss ('Photon Shutter' = PS), ein Vakuumventil ('Gate Valve 1' = GV1) und eine automatische Schnellschlussklappe ('Fast Shutter' = FS). Im Bereich der Betonabschirmung befindet sich ein weiterer Strahlverschluss ('Bremsstrahlung-Shutter' = BS), der aufgrund seiner massiven Ausführung im Gegensatz zum 'Photon Shutter' auch hochenergetische Strahlung fernhält, sowie ein weiteres Vakuumventil (GV2). Unmittelbar vor dem Monochromator ist ein Spaltsystem mit 4 einzeln beweglichen Spaltbacken zur horizontalen und vertikalen Eingrenzung des Strahlprofils montiert. Der Monochromator ist im Messbetrieb, d. h. bei geöffneten Strahlverschlüssen und Vakuumventilen, fensterlos an den Speicherring (Druck: 10^{-10} bis 10^{-9} mbar) angekoppelt. Durch differentielles Pumpen wird das Druckgefälle zwischen Ring und Monochromator (Druck 10^{-6} bis 10^{-5} mbar) aufrechterhalten. Ein Handventil am Eintrittsflansch des Monochromators ver-

hindert beim Öffnen (z. B. bei Kristallwechsel) einen Zusammenbruch des Vakuums im Strahlrohr. Am Strahlrohr kommen unterschiedliche Pumpentypen (Ionengetter-, Turbomolekular- und Vorvakuum pumpen) zum Einsatz.

Außerhalb der Betonmauer umgibt eine Messkabine (‘Experimental Hutch’) das Strahlrohr. Durch Abschirmwände und ein mit den Strahlverschlüssen verbundenes Verriegelungssystem (‘Radiation Interlock System’, RIS) wird während der Messungen ein separater Sperrbereich um das Strahlrohr herum geschaffen. Die pneumatischen Strahlverschlüsse und Vakuumventile sowie die Steuerung des Experiments werden von außen mit einem Touch Screen Terminal (Allen Bradley) und einem Rechner fern bedient.

Im Unterschied zum experimentellen Aufbau am XMP-Strahlrohr verfügt der DCM-Messplatz über einen zusätzlichen Strahlverschluss durch einen zweiten Bremsstrahlung-Shutter zwischen Monochromator und Monitorkammer. Für Detektoren und Probenkammer ist eine zusätzliche Messkabine vorgesehen. Dies ermöglicht den Probenwechsel bei belichtetem Monochromator, wodurch ein zwischenzeitliches Abkühlen der Kristalle verhindert wird. Wie bereits erwähnt, ist der XMP-Messplatz mit einer Spiegeloptik zum Fokussieren der anregenden monochromatischen Strahlung und mit einem motorisierten Probenhalter ausgestattet (siehe 3.3), was ortsauflösende Messungen ermöglicht. Die ohne Ortsauflösung gemessenen Spektren wurden überwiegend am DCM-Strahlrohr aufgenommen.

3.2.2 Doppelkristallmonochromator

Die spektrale Selektion erfolgt an beiden Strahlrohren durch identische Doppelkristallmonochromatoren in modifizierter Lemmonier-Bauweise [Lem78]. Der horizontale Eintrittsspalt des Monochromators ist zum Ausgleich etwaiger Strahlage-Instabilitäten höhenverstellbar. Er begrenzt das Strahlprofil vertikal auf ca. 1 mm. Das polychromatische Synchrotronlicht wird durch Bragg-Reflexion an zwei Kristallen monochromatisiert.

Die Bragg-Bedingung lautet:

$$E_n = n h c / (2 d \sin\Theta)$$

E_n ist die Photonenenergie des reflektierten Lichts, h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Vakuum-Lichtgeschwindigkeit. Die natürliche Zahl n gibt die Beugungsordnung an, d den Abstand der Gitterebenen, die parallel zur Kristalloberfläche liegen, und Θ den Glanzwinkel. Die beiden Kristalle sind auf einem Drehtisch montiert, der zur Einstellung von Θ durch einen Schrittmotor angetrieben wird.

Die Reflexion am zweiten Kristall - parallel zum ersten auf einen Schlitten gesetzt - gewährleistet, dass der aus dem Monochromator austretende Strahl bei Variation des Glanzwinkels Θ winkelfest parallel zum einfallenden polychromatischen Strahl bleibt. Durch Nachführen des zweiten Kristalls auf einer Zwangskurve wird der Höhenversatz zwischen einfallendem und monochromatischem Strahl und somit dessen Lage fixiert (sog. ‘Fixed Exit Double Crystal Monochromator’). Der Strahldurchlass des zylindrischen Bleikollimators im Austrittsflansch des Monochromators kann um 3 cm (entsprechend dem Versatz zwischen poly- und mono-

chromatischem Strahl) nach oben versetzt werden, indem der Kollimator um 180° gedreht wird, was im Bedarfsfall (bei ausgebautem Kristallhalter) ein Arbeiten mit polychromatischem Licht ermöglicht.

Durch leichtes Verkippen der Kristalle gegeneinander aus der Parallelstellung heraus können höhere Harmonische ($n \geq 2$ in der Bragg-Gleichung) unterdrückt werden, da die Reflexionsprofile der höheren Harmonischen gegenüber denen der ersten Beugungsordnung schmaler und die Maxima zu kleineren Winkeln verschoben sind [Mat80]. Das Verkippen hat jedoch auch Nachteile. Insbesondere kann sich dadurch die spektrale Auflösung des Monochromators gravierend verschlechtern, was eine beträchtliche Dämpfung der 'Whiteline' und z. T. auch höherenergetischer Resonanzen in den Spektren zur Folge haben kann. Insbesondere bei XANES-Messungen ist das Verkippen ('Detuning') nach [Bren04] daher zu vermeiden. Bei den Messungen an der Schwefel-K-Kante war der Monochromator mit InSb(111)-Kristallen bestückt – die in Klammern gesetzten Miller-Indizes geben die Gitterebene an, entlang derer der Kristall geschnitten wurde. Die zweite Harmonische ist dabei ein 'verbotener Reflex' [Kit88]. Im Bereich der dritten Harmonischen ist der vom Dipolmagneten ausgehende Photonenfluss im Vergleich zur ersten Ordnung bereits um etwa eine Größenordnung kleiner (siehe Abb. 3.2). Die Wahl der Kristalle ist auf die zu untersuchende Absorptionskante abzustimmen. Wichtige Kriterien sind hierbei spektrale Auflösung und Reflektivität.

Bei der Messung von Röntgenabsorptionsspektren kann der Glanzwinkel (und damit die Photonenenergie des monochromatisierten Lichts) innerhalb eines Winkelbereichs von 15° bis 65° schrittweise variiert werden.

Im Vorkantenbereich (2440-2468 eV) wurde eine Schrittweite von 0,5 eV gewählt, im Nahkantenbereich (2468-2485 eV) ein Wert von 0,1 eV, und von 2485 bis 2520 eV (Nachkantenbereich) eine Schrittweite von 0,3 eV. Die Integrationszeiten betragen 1 - 2 s pro Messpunkt. Zur Energie-Kalibrierung der Spektren wurde ein Zinksulfat-XANES-Spektrum im Transmissionsmodus aufgenommen und das Maximum der Whiteline auf die Energieposition 2481,44 eV gesetzt. Entsprechend der Einstellung der Schrittweite ist dieser Wert auf $\pm 0,1$ eV reproduzierbar [Cha97].

Ein Fenster aus Kaptonfolie (Dicke ca. 100 μm) am Austrittsflansch des Monochromators trennt das Monochromator-Vakuum (ca. 10^{-6} bis 10^{-5} mbar, Turbomolekularpumpe) vom weit höheren Druck in der Monitorkammer (Grobvakuum bis Atmosphärendruck).

3.2.3 Detektoren

Die Intensität der einfallenden monochromatischen Strahlung wurde in beiden Messmodi (Fluoreszenz, Transmission) mit einer Ionisationskammer als Monitorkammer erfasst, die transmittierte Intensität ebenfalls, und die Fluoreszenz-Intensität mit einem Germanium-Detektor.

Zwischen Monitor-, Proben- und Detektorkammer befinden sich keine Fenster. Art und Druck des Ionisationsgases werden individuell auf die jeweils zu untersuchende Probe abgestimmt [Cha87]. Die Transmissionsexperimente an der Schwefel-K-Kante wurden in atmosphärischer

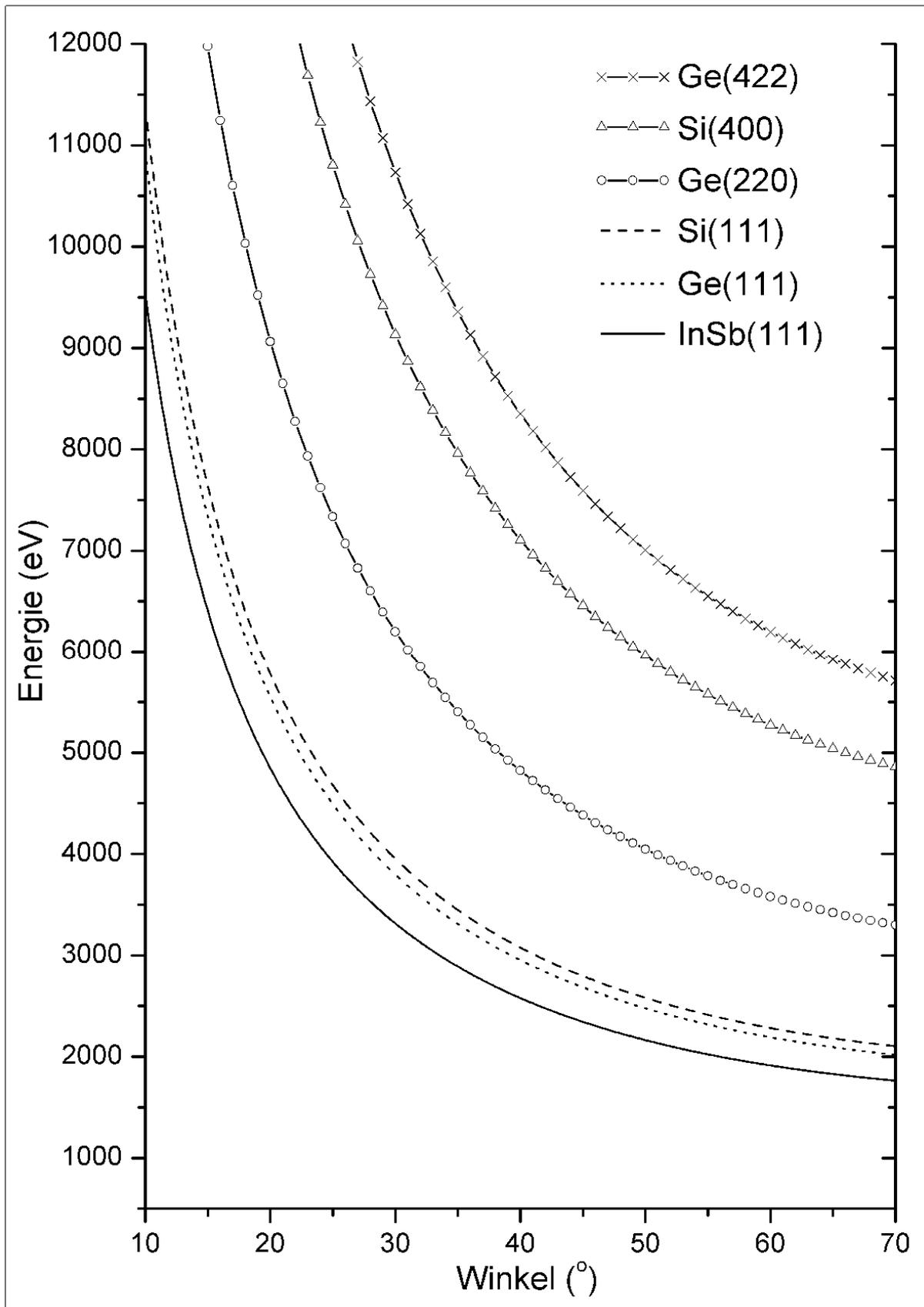


Abb. 3.3: Photonenenergie der monochromatischen Strahlung (erster Ordnung) in Abhängigkeit vom Glanzwinkel Θ für verschiedene Kristalle und Gitterebene-Schnitte

Luft unter einem Druck von 60 mbar durchgeführt. Hierzu wurden die Ionisationskammern und die Probenkammer (fensterlos verbunden) nach Probenwechsel mit einer Vorvakuum-pumpe teilevakuiert.

Die Ionisationskammern enthalten plane Elektroden (Länge 10 cm, Breite 2 cm, Stärke ca. 1 mm, Edelstahl) im Abstand von 15 mm, an die eine Spannung von 216 Volt angelegt wird. Die Ionisationsströme wurden mit Elektrometern (DCM: Keithley 428, XMP: Keithley 617) erfasst. Die gemessenen Ströme lagen je nach Photonenenergie, Füllgas und Druck in der Größenordnung 10^{-9} bis 10^{-7} Ampere (Monitorkammer) bzw. 10^{-11} bis 10^{-9} Ampere (Detektor-kammer, je nach Probe). Die Daten wurden dem Messrechner über einen GPIB- Bus zuge-führt. Das logarithmische Verhältnis der Ströme in den beiden Ionisationskammern liefert wie bereits beschrieben den linearen Absorptionskoeffizienten.

Fluoreszenzmessungen

Beim Auffüllen eines infolge Strahlungsabsorption erzeugten Loches in einer inneren Schale (i. d. R. K-, L- oder M-Schale) wird Energie entweder in Form eines Fluoreszenzphotons ab-gestrahlt oder auf ein weiteres (äußeres) Elektron übertragen, das dann aus dem Atomverband gelöst wird (Augereffekt). Das Elektron kann durch Erfassung des `Total Electron Yield` (= TEY, gesamte Elektronenausbeute) nachgewiesen werden [Guo85]/[Kor84]. Davon wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Gebrauch gemacht.

Am DCM-Strahlrohr stand zu Beginn der Messungen dieser Arbeit ein mit flüssigem Stick-stoff gekühlter, energieauflösender `Ultra Low Energy`-13-Element(Dioden-Array)-Germa-nium-Detektor der Firma Canberra (GUL0110P/S) zur Verfügung; Betriebsspannung 500 V, Beryllium-Fenster, Stärke 25 μm . Aufgrund eines langfristigen Defekts an diesem Detektor mussten die Messungen mit einem Ein-Element-Germanium-Detektor (ebenfalls stickstoffge-kühlt, Canberra GUL0110P, Betriebsspannung 800 V) fortgesetzt werden. Dieser wurde dann auch bei den ortsauflösenden Messungen am XMP-Strahlrohr eingesetzt.

Die Fluoreszenzdetektoren wurden im `Single Photon Counting`-Modus betrieben. Bei Be-strahlung wird im Germanium-Einkristall des Detektors eine der Energie des absorbierten Photons proportionale (freie) Ladung erzeugt. Diese wird durch mehrere Verstärkerstufen in einen Spannungsimpuls umgesetzt, dessen Höhe proportional zur Energie des absorbierten Photons ist. Ein Vielkanalanalysator (`Multi Channel Analyzer` = MCA) registriert das Im-pulshöhenspektrum. Neben der Aufnahme des gesamten MCA-Spektrums (Röntgenemissi-onsspektrum, charakteristische Röntgenstrahlung) kann mit Hilfe des Messrechners soft-waremäßig der Einsatz von Fensterdiskriminatoren simuliert werden. Das Programm regi-striert dann ausschließlich die Spannungsimpulse innerhalb eines vom Benutzer gewählten Pulshöhen- bzw. Energieintervalls (`Region Of Interest` = ROI, eingestellte Breite: 0,2 keV, Energieauflösung der Detektoren: ca. 150 eV). Diese Zählrate geht dann als Fluoreszenz-Intensität I der entsprechenden Röntgenemissionslinie (bei den hier beschriebenen Messun-gen: K_{α} -Linie des untersuchten Elements) in die Berechnung des Absorptionskoeffizienten ein. Da die Intensität der K_{α} -Strahlung proportional zur Wahrscheinlichkeit ist, durch Photo-absorption Löcher in den K-Schalen der Absorberatome zu erzeugen, liefert eine Division von I durch die Intensität in der Monitorkammer den Absorptionskoeffizienten.

Die Proben waren unter einem Winkel von 45° und der Fluoreszenzdetektor rechtwinklig gegen den einfallenden Strahl in der Ebene des Speicherrings eingebaut, um den Streuhintergrund zu minimieren. Rechtwinklig zum einfallenden Strahl ist die vom Probenmaterial ausgehende Streuintensität wegen der Polarisationsrichtung der Synchrotronstrahlung am geringsten.

Die Fluoreszenzdetektoren waren auf Schienen montiert, um den Abstand zwischen Detektor und Probe bei schwacher Fluoreszenzausbeute verringern bzw. bei zu hohen Zählraten (endliche Totzeit des Detektors) vergrößern zu können.

Bei Messungen mit Anregungsenergien unterhalb 5 keV spielt die Absorption des Röntgenlichts durch Atmosphärgase in der Apparatur eine gravierende Rolle. Bei einem Abstand von 50 cm zwischen Kaptonfenster und Probe und einer Absorptionslänge von 3 cm in Luft ist so gut wie keine Intensität am Probenort zu erwarten. In einer Helium-Atmosphäre hingegen wird die Intensität von anregender Strahlung und Fluoreszenzlicht der Probe nur geringfügig abgeschwächt ($1/e$ -Länge in Helium für 2,5 keV –Strahlung ca. 20 m). Bei Messungen unter Helium sind allerdings auch die Ionisationskammerströme so erheblich abgeschwächt, dass es weit günstiger ist, bei niedrigem Druck in atmosphärischer Luft zu messen.

Wegen der Größe des Detektorfensters erfordert der Einsatz des 13-Element-Detektors im Vergleich zu Messungen mit dem Einelement-Detektor eine größere Probenkammer. Diese

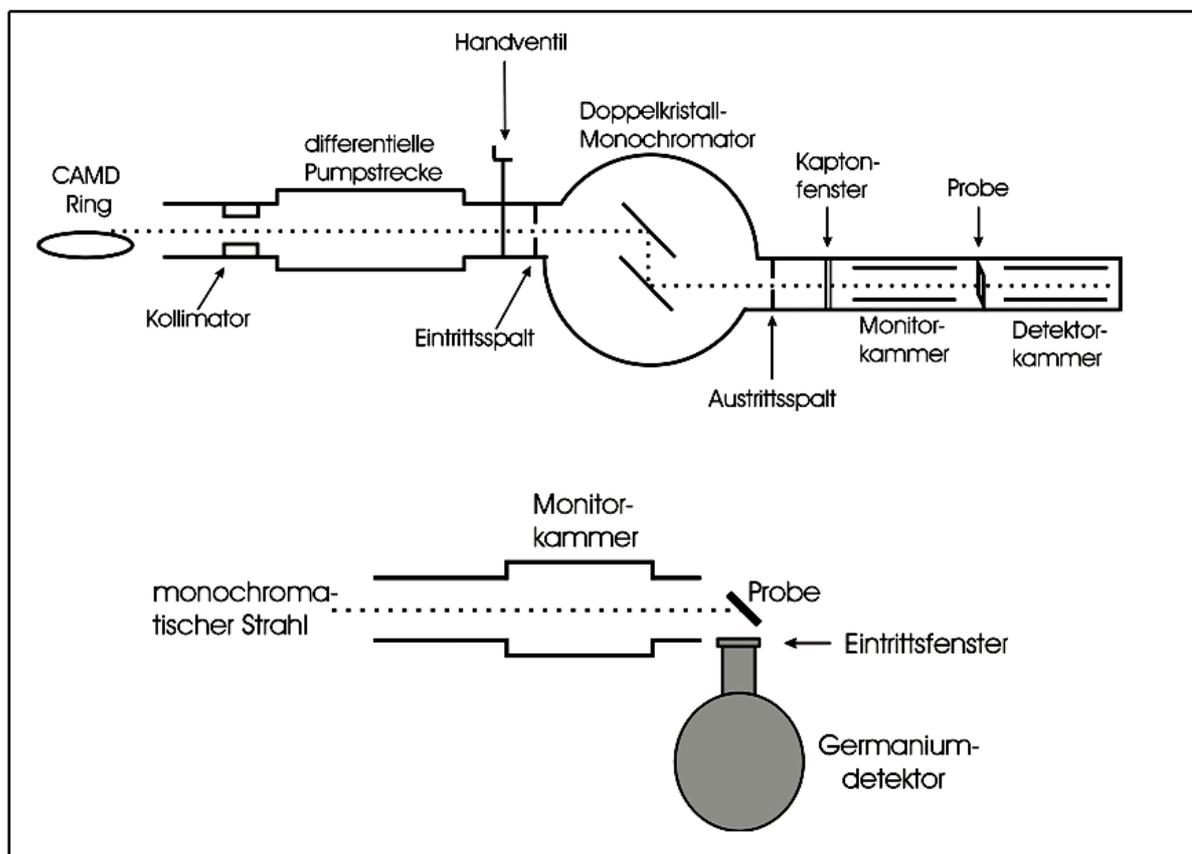


Abb. 3.4: Schematischer experimenteller Aufbau für Messungen im Transmissions- (oben, Seitenansicht) und im Fluoreszenzmodus (unten, Draufsicht)

erwies sich für Messungen bei niedrigen Energien (Schwefel-K-Kante) in Luft als unzureichend vakuumdicht. Ein bei Messungen in diesem Energiebereich sinnvoller Druck (ca. 60 mbar) blieb über die typische Messdauer für ein XANES-Spektrum hinweg nicht ausreichend stabil. Daher wurden Proben- und Ionisationskammern während der Messungen mit Helium gespült.

Probenpräparation

Pulverproben wurden als näherungsweise homogene Schicht auf selbstklebendes schwefelfreies Kaptonband aufgetragen, im Bedarfsfall mit Kaptonband bzw. Polypropylenfolie bedeckt und dann auf dem Probenhalter befestigt. Bei der Präparation sind homogene Probenstärken anzustreben, andernfalls besteht Gefahr, dass ein Teil der Strahlung ungehindert durch feine Löcher (sog. `Pinholes`) hindurchgeht. Dies bewirkt die Messung einer zu niedrigen Absorption sowie eine Dämpfung der Whiteline und weiterer Resonanzen bzw. Oszillationen. Ein vergleichbarer Effekt tritt bei Präparation zu dicker Proben auf: Photonen der ersten Ordnung der Reflexion werden fast vollständig absorbiert, während höhere Harmonische die Probe noch durchdringen. Auch dies bewirkt eine Verfälschung der Messergebnisse (Dickeneffekt, `thickness effect` [Ste81]). Messungen an Proben allzu großer Dicke sind auch wegen der - insbesondere jenseits der Absorptionskante - extrem schwachen Detektorkammerströme nicht sinnvoll.

Flüssigproben wurden unter dem Abzug auf schwefelfreies Filterpapier geträufelt und dann mit zwei Lagen (am Rand auch mehr) von Kapton-Band versiegelt.

3.3 Experimenteller Aufbau für ortsauflösende Messungen

Wesentlicher Teil dieser Arbeit ist die Inbetriebnahme eines experimentellen Aufbaus für ortsauflösende Röntgenabsorptionsspektroskopie am XMP-Strahlrohr des CAMD (im Folgenden als `Mikrosonde` bezeichnet). Herzstück der Mikrosonde ist eine achromatische Spiegeloptik in Kirkpatrick-Baez-Anordnung zum Fokussieren der anregenden monochromatischen Strahlung. In Verbindung mit einem verfahrbaren Probenhalter ist ortsauflösende Röntgenabsorptionsspektroskopie (`Mikrospektroskopie`) möglich. Spiegeloptik und Probenhalter sind in einer im Rahmen dieser Arbeit erstmals in Betrieb genommenen neuartigen Vakuumkammer untergebracht. Diese Vakuumkammer und die übrigen Mikrosonde-Komponenten (Fluoreszenz-Detektor und Mikroskop) befinden sich innerhalb der Messkabine am XMP-Strahlrohr. Die einzelnen Komponenten der Mikrosonde werden in 3.3.2 kurz vorgestellt, eine ausführliche Beschreibung der Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik erfolgt in 3.3.3.

Die Komponenten der Mikrosonde wurden vor der Aufnahme dieser Arbeit von N. Mölders [Möl99] geplant, gebaut und am XMP-Strahlrohr hinsichtlich ihrer charakteristischen Eigenschaften (Ortsauflösung, Photonenfluss etc...) experimentell untersucht. Der Forschungsbericht von N. Mölders beinhaltet neben technischen Details auch Modelle zur theoretisch erzielbaren Ortsauflösung (Simulationsrechnungen: `ray-tracing-calculations`, auch unter Einbezug von Spiegel-Krümmungsfehlern), wogegen in der vorliegenden Arbeit eine rein experimentelle Bewertung erfolgt (u. a. sog. `Knife Edge Scans` und Messungen an diversen Testobjekten, siehe 3.4, [Möl01]/[Möl99]).

Der Aufbau ist auf niedrige Photonenenergien ausgelegt ($< 5 \text{ keV}$) und daher für Schwefel-K-Röntgenabsorptionsspektroskopie gut geeignet. Die erreichte Ortsauflösung (Strahlfleckgrößen ca. $80 \times 80 \mu\text{m}$) ist wesentlich geringer als die von Mölders erreichte, liefert am Probensystem 'Rostpilzbefallene Weizenblätter' (siehe Kap. 4) aber durchaus interessante Erkenntnisse.

3.3.1 Neue Vakuumkammer

Der von N. Mölders verwendete komfortable Positioniertisch stand wegen Verlegung an ein anderes Strahlrohr für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen nicht mehr zur Verfügung und wurde durch ein kostengünstigeres dreibeiniges Gestell ersetzt. Jedes der Beine verfügt über eine motorgetriebene Spindel zum vertikalen Verfahren. Damit kann eine

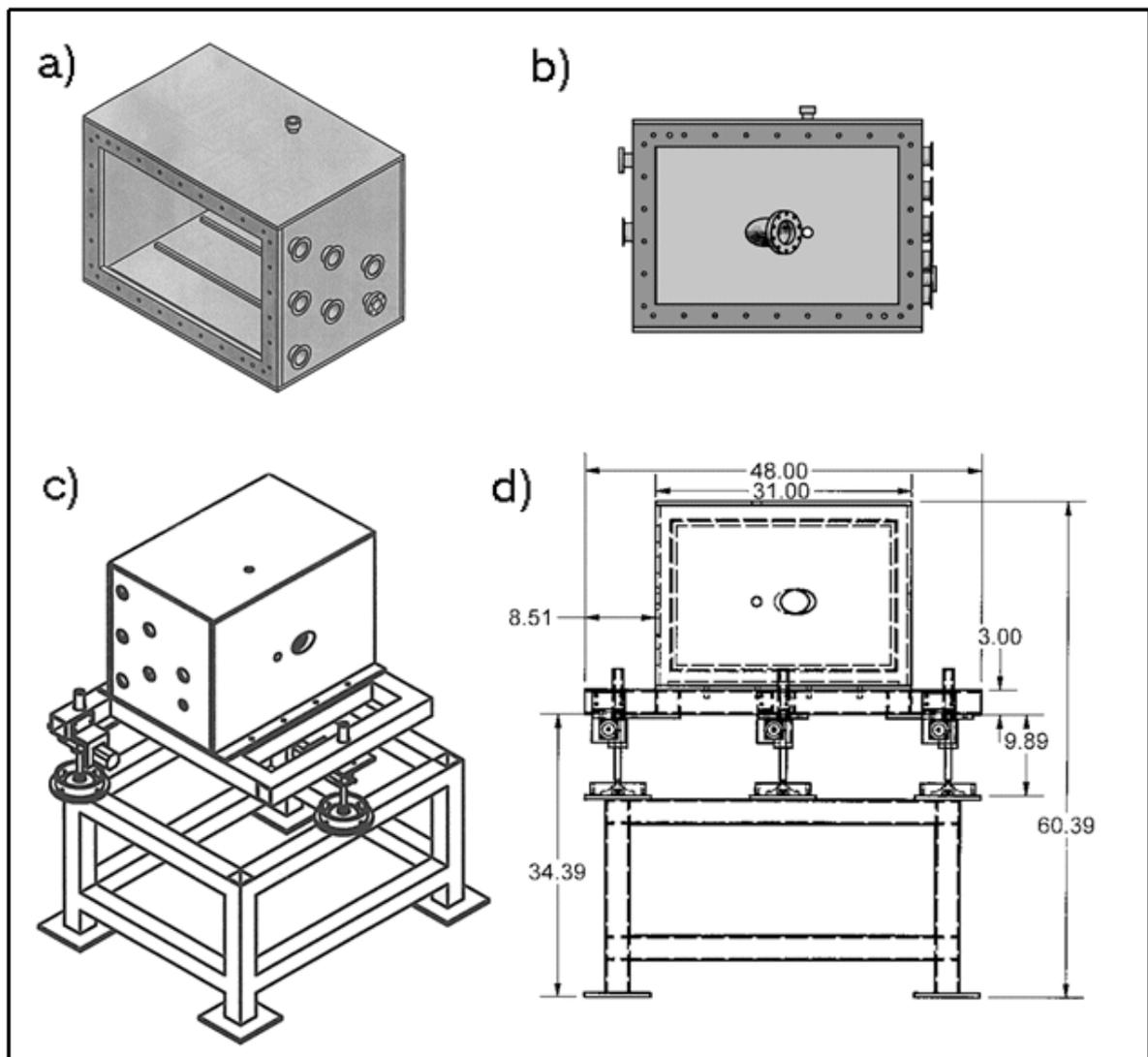


Abb 3.5: Vakuumkammer: a) Deckel abgenommen, b) Ansicht von vorne (Deckel abgenommen), c) Vakuumkammer mit Support (perspektivisch), d) Anordnung der Verstellspindeln

vertikale Translation, eine Änderung des Neigungswinkels (‘pitch’) und ein Drehen des experimentellen Aufbaus um die Strahlachse (‘roll’) erfolgen. Stellschrauben ermöglichen ein horizontales Verschieben des Aufbaus und die Ausführung einer Scherbewegung (‘yaw’).

Wie oben begründet sollten die Messungen unter niedrigem Luftdruck bzw. in Heliumatmosphäre durchgeführt werden. Bisher wurde dazu für Spiegeloptik, Probenhalter und Detektoren eine Kammer (Volumen 120 l) aus ca. 2 cm starken Plexiglasplatten verwendet. Die Dichtigkeit reichte aber nicht aus, eine stabile Atmosphäre (Helium oder Luft unter niedrigem Druck) aufrechtzuerhalten. Daher musste im Messbetrieb kontinuierlich mit Helium gespült werden, und Messungen in Luft (bei niedrigem Druck günstiger) waren nicht möglich - außerdem diffundiert Helium leicht durch das Detektorfenster. Für diese Arbeit wurde deshalb eine Vakuumkammer aus Edelstahl und Aluminium verwendet.

Der Eintrittsflansch (NW50) der Kammer befindet sich im einem Abstand von ca. 170 cm vom Austrittsflansch des Monochromators, dazwischen liegt ein Aufbau für Transmissions-Experimente ohne Ortsauflösung (Ionisations- und Probenkammern, flexible Bälge, keine Fenster). Angesichts der Größe der Kammer (Höhe 58,4 cm, Breite 53,3 cm, Tiefe 78,7 cm) sind eine erhebliche Wandstärke (2 cm) und eine Aussteifung mit Stützrippen (ca. 1,3 x 1,3 cm) erforderlich, um die wirkenden Kräfte aufzunehmen. Die Deckplatte aus Aluminium (Größe 52 x 75 cm, Stärke 1,2 cm) ist mit aus dem Vollen gefrästen Rippen verstärkt, die Abdichtung erfolgt durch einen O-Ring in einer Ringnut. Aus der Rückwand ragt unter einem Winkel von 45° ein Rohrstützen ca. 10 cm weit in die Kammer hinein, der einen Flansch mit einem Plexiglasfenster (Durchmesser 7,5 cm, Stärke 0,9 cm) trägt. Diverse Flansche, u. a. für Vakuumpumpen, Gaseinlass und Auslass, Vakuumdurchführungen (z. B. für Motor-Steuersignale und Betriebsströme, Mess-Signale, Spannungsversorgung der Ionisationskammer) und für Vakuum-Messröhren etc. sind angesetzt. Für die Messungen wurde in der Kammer ein Druck von 40 mbar eingestellt. In der Rückwand und in der Oberseite der Kammer befindet sich noch eine Durchföhrung für den Germanium-Detektor (Durchmesser 2,54 cm, O-Ring).

3.3.2 Komponenten der Mikrosonde

Die Komponenten der Mikrosonde befinden sich größtenteils innerhalb der beschriebenen Vakuumkammer und werden im Folgenden in der Reihenfolge des Strahlverlaufs beschrieben (technische Details – z. B. zu den einzelnen Motoren - finden sich in [Möl99]).

Unmittelbar hinter dem Eintrittsflansch der Vakuumkammer wird das Profil des monochromatischen Strahls durch ein Spaltsystem mit vier motorisierten Spaltbacken eingegrenzt. Horizontale und vertikale Spaltbreite werden der Akzeptanz der Spiegeloptik angepasst (siehe unten). Nach Fokussierung durch die Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik (siehe 3.3.3) durchläuft der Strahl eine Ionisationskammer (Monitorkammer) von 5,08 cm Länge und trifft dann auf die Probe. Der Probenhalter ist unter 45° zum einfallenden Strahl ausgerichtet und auf einer motorisierten Positioniereinheit befestigt, die außer einer Rotationsbewegung (hier nicht genutzt) - vertikale und horizontale Translationsbewegungen (Präzision < 1 µm) und damit ein zweidimensionales Abtasten der Probe ermöglicht. Die Intensität der transmittierten Strahlung kann mit einer Photodiode gemessen werden.

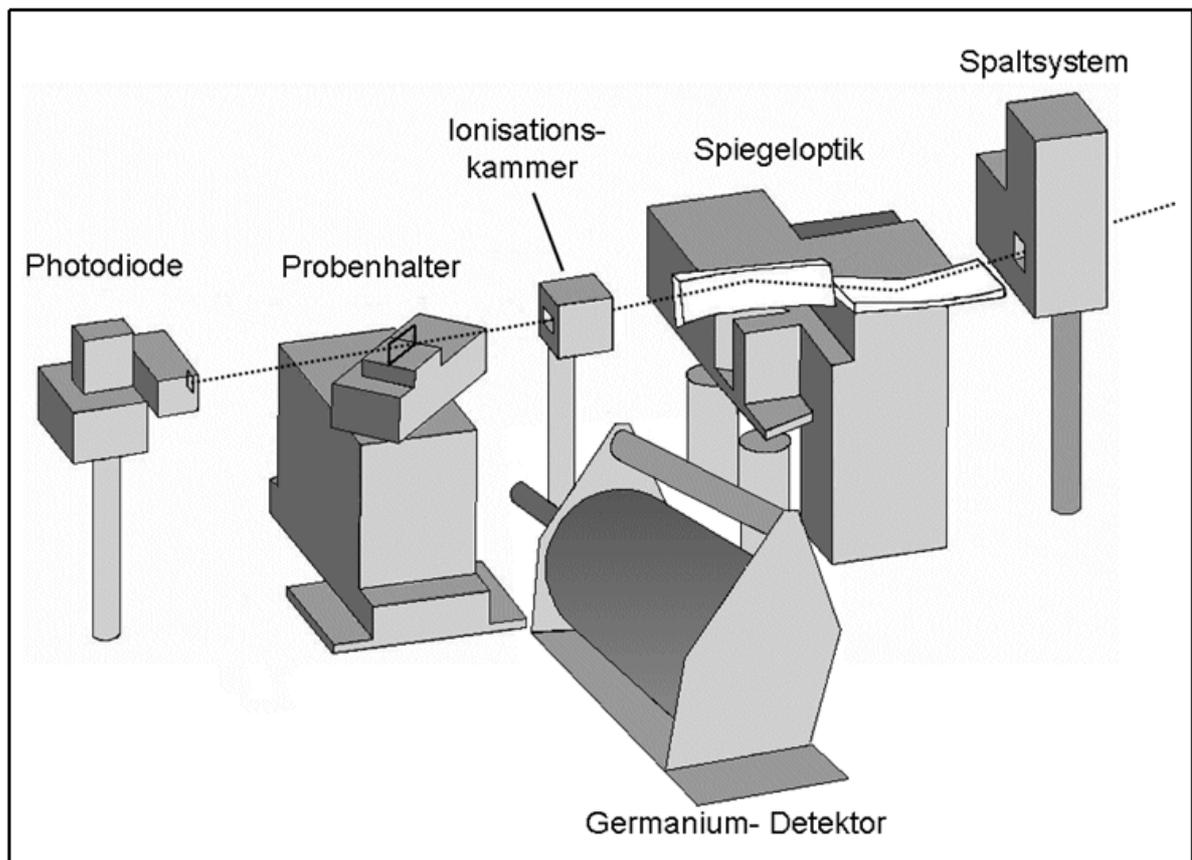


Abb. 3.6: Schemazeichnung der Mikrosonde (Strahleintritt rechts)

Der zur Messung des von der Probe emittierten Fluoreszenzlichts eingesetzte Einelement-Germanium-Detektor (siehe 3.2.3) befindet sich teils innerhalb, teils außerhalb der Vakuumkammer (die Detektor-'Schnauze' ragt durch die in 3.3.1 erwähnte Durchführung in der Kammerückwand). Der Detektor ist rechtwinklig zum einfallenden Strahl in der Ebene des Speicherrings ausgerichtet, um den Streuhintergrund zu minimieren, wie in 3.2.3 erläutert. Mit diesem energieauflösenden Detektor wurden im Rahmen der Arbeit neben XANES-Spektren auch eine Anzahl von Emissionsspektren (charakteristische Röntgenstrahlung) aufgenommen.

Durch ein Plexiglasfenster kann mit einem außerhalb der Vakuumkammer befindlichen Mikroskop im 45° -Winkel zum einfallenden Strahl (d. h. senkrecht zur Probenoberfläche) und mit einer CCD-Kamera (Model-No. N536593, IaI-Corp., CV-S3200, 12 V) die Probe betrachtet werden. Die Kamera ist an einen Monitor außerhalb der Messkabine angeschlossen. Die Probe wird durch eine neben dem Mikroskop eingeführte Lichtquelle beleuchtet. Zur Bestimmung der Strahlposition auf dem Bildschirm wird eine Probe mit Fluoreszenz-Beschichtung (Kodak LANEX REULAR 1545003175CE#9024) durch das Mikroskop betrachtet und der Leuchtfleck auf dem Bildschirm markiert.

3.3.3 Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik

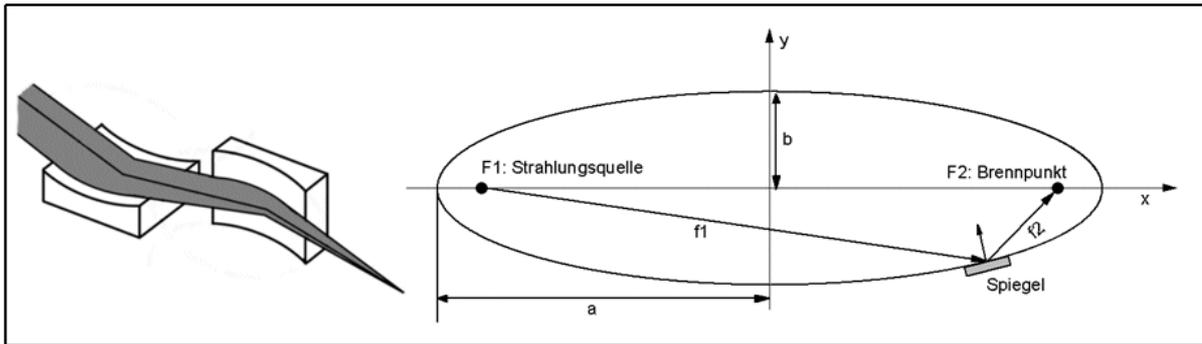


Abb. 3.7: Prinzip der Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik

Zur Fokussierung des Strahls wurde eine achromatische Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik verwendet. Das Prinzip der Kirkpatrick-Baez-Optik beruht auf Totalreflexion an zwei zueinander senkrecht stehenden Flachspiegeln, die durch eine variable Verspannung zu elliptischen Segmenten gebogen werden [Yan94]/[Shv04]. Befindet sich eine Lichtquelle (in diesem Fall der Quellpunkt der Synchrotronstrahlung) in dem einen Brennpunkt einer Ellipse, so werden alle von ihr ausgehenden Strahlen in den zweiten Brennpunkt der Ellipse (in diesem Fall den Probenort) reflektiert. Durch die Verwendung zweier orthogonaler Spiegel wird eine vertikale und horizontale Fokussierung erreicht [Kir48]. Diese Spiegeloptik ermöglicht in Verbindung mit einem verfahrbaren Probenhalter eine Rasterung bei Fluoreszenzmessungen (Fluorescence Mapping [Möl01]) und eine ortsauflösende Röntgenabsorptionsspektroskopie.

Wahl des Einfallswinkels

Das Maximieren der Intensität des fokussierten Röntgenlichts erfordert die Berücksichtigung eines optimalen Kompromisses zwischen der Akzeptanz der Optik und der (winkelabhängigen) Reflektivität des Spiegelmaterials. Grundsätzlich erfolgt Reflexion von Röntgenlicht an Spiegeln ausschließlich über Totalreflexion. Bei Röntgenspiegeln wird ausgenutzt, dass bei streifendem Einfall, d. h. bei Glanzwinkeln jenseits des Grenzwinkels eine Totalreflexion an glatten kristallinen oder amorphen Oberflächen auftritt. Die Reflektivität ist umso größer, je kleiner der Glanzwinkel ist [Shv04].

Bei Spiegelbeschichtungen aus Materialien hoher Dichte bzw. chemischen Elementen hoher Ordnungszahl ist der Grenzwinkel der Totalreflexion bei einer bestimmten (festen) Photonenenergie besonders groß. Die hier verwendeten Spiegel sind mit Gold beschichtet.

Mit wachsendem Glanzwinkel vergrößert sich die Akzeptanz der Spiegeloptik, d. h. die Spiegel fangen mehr Intensität auf, allerdings zu Lasten der Reflektivität der Spiegelbeschichtung [Mar88]. Die Einstellung des Einfallswinkels hat also erheblichen Einfluss auf die Intensität des durch die Spiegeloptik fokussierten Röntgenlichts. Bei der Berechnung des optimalen Einfallswinkels ist zu berücksichtigen, dass der Photonenfluss hinter der Spiegeloptik proportional zum Produkt aus Akzeptanz und dem Quadrat (wegen der zweifachen Reflexion) der Reflektivität ist.

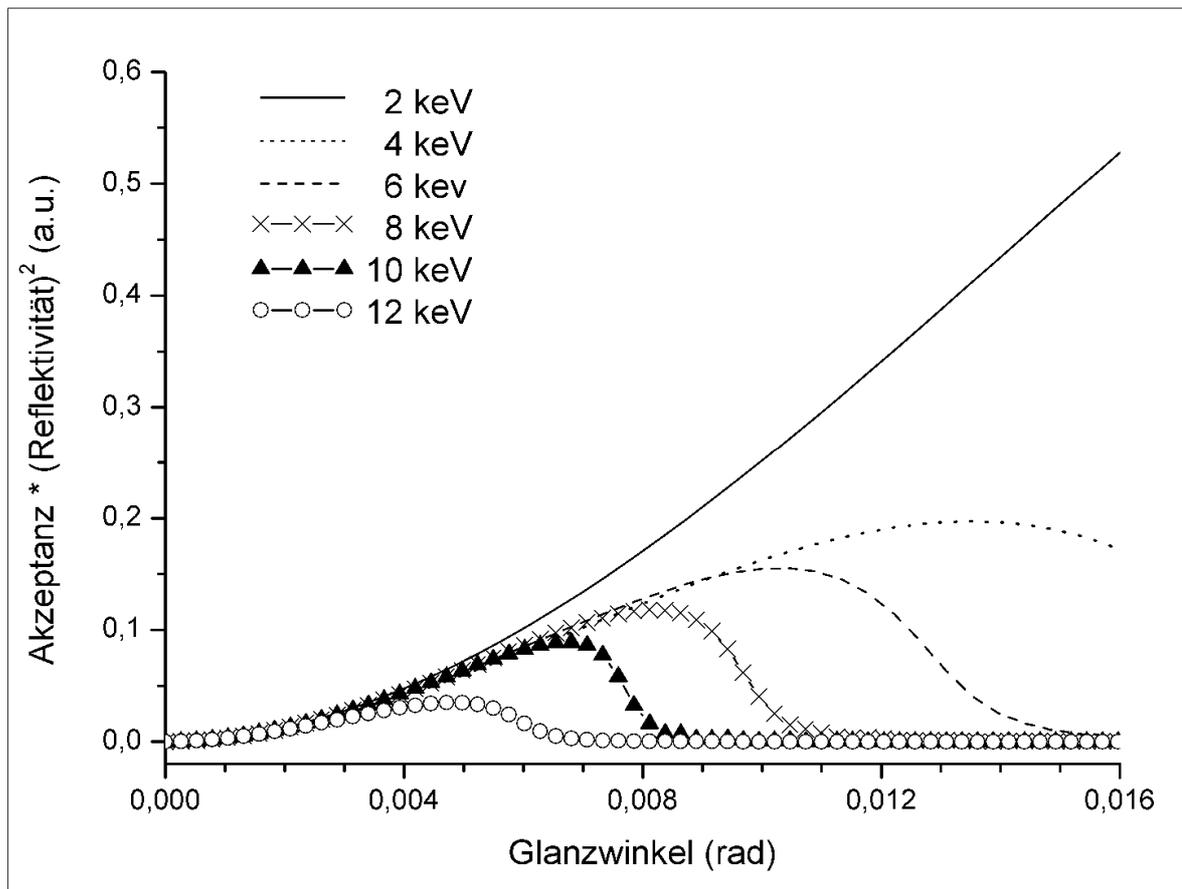


Abb. 3.8: Photonenfluss in Abhängigkeit vom Glanzwinkel (Reflektivität berechnet nach [cxro])

Aus Abb. 3.8 ist ersichtlich, dass bei niedrigen Photonenergien eine Vergrößerung des Glanzwinkels den Photonfluss merklich steigern kann. Die bei niedrigen Photonenergien insbesondere durch Optimierung des Einfallswinkels erzielbaren Intensitätsgewinne machen die Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik für Messungen bei niedrigen Photonenergien attraktiv. Horizontale und vertikale Spaltbreite am Eintrittsflansch der Vakuumkammer (siehe 3.3.2) werden dem jeweiligen Einfallswinkel entsprechend der Akzeptanz der Kirkpatrick-Baez-Anordnung angepasst.

Mechanische Ausführung der Spiegeloptik

Wie erwähnt besteht eine Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik aus zwei zueinander senkrechten Spiegeln, von denen einer das Röntgenlicht vertikal (Spiegel `KBV`, reflektierende Fläche horizontal) und einer horizontal (Spiegel `KBH`, reflektierende Fläche vertikal) fokussiert. Für jeden der beiden Spiegel sind unabhängig voneinander zwei Biegekräfte $F1/F2$ einstellbar (d. h. zwei voneinander unabhängige Biegeparameter), die senkrecht zur Spiegeloberfläche wirken[Yan94].

Mit einer Translationsbewegung senkrecht zur Spiegeloberfläche kann der betreffende Spiegel über einen motorisierten Verfahrsschlitten gezielt in den Strahl bzw. aus dem Strahl herausbewegt werden. Jeder der beiden Spiegel kann außerdem um eine feste Achse verkippt

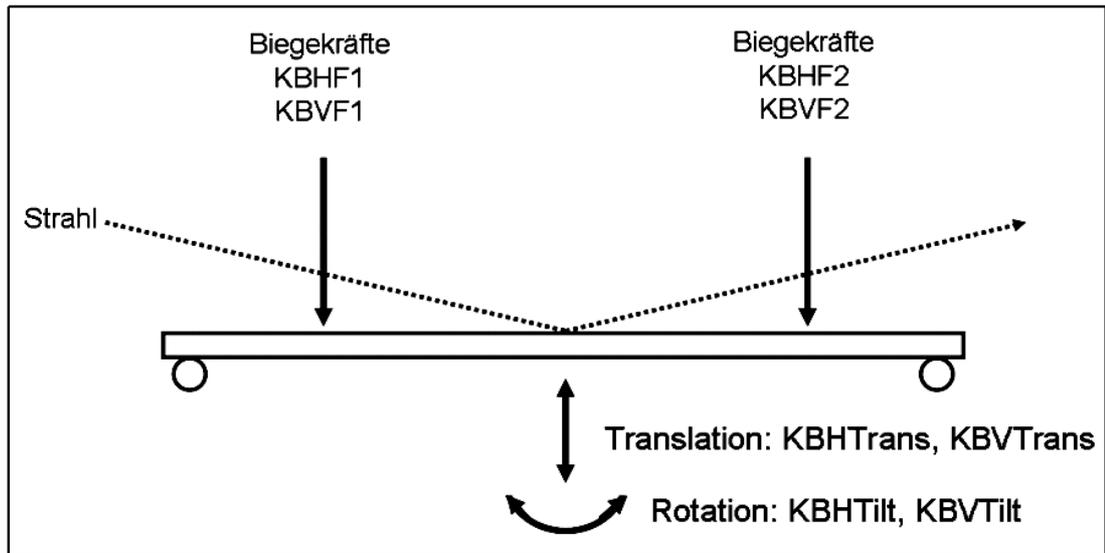


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der einstellbaren Biegekräfte sowie der möglichen Translations- und Rotationsbewegungen

werden, um den Einfallswinkel optimal auf die jeweilige Photonenenergie einstellen zu können. Insgesamt sind also für die beiden Spiegel jeweils 4 Freiheitsgrade der Bewegung gegeben - Rotation, Translation und zwei Biegeparameter. Die Einstellung wird mit insgesamt 8 Motoren vorgenommen. Beide Spiegel inkl. ihrer Biege-, Translations- und Rotations-Antriebe sind auf einem Dreibein in der Kammer montiert.

Im Folgenden wird die mechanische Ausführung des vertikalen Biegemechanismus beschrieben (siehe Abb. 3.10). Die horizontale Fokussierung erfolgt analog. Die trapezförmigen Flachspiegel aus Glas sind jeweils 10 cm lang, 3 mm stark und messen am breiten Ende 5 cm, am schmalen Ende 2 cm. Eine ca. 1 cm breite Beschichtung aus unterchromtem Gold (100 \AA Chrom als Haftvermittler, 400 \AA Gold) verläuft entlang der Mittellinie. An den Enden ruhen die Spiegel auf zwei liegenden Stahlbolzen. Die Biegekräfte werden über zwei Rundmaterial-Traversen eingeleitet, die zwischen den beiden Auflagebolzen in deren Nähe auf die Glasplat-

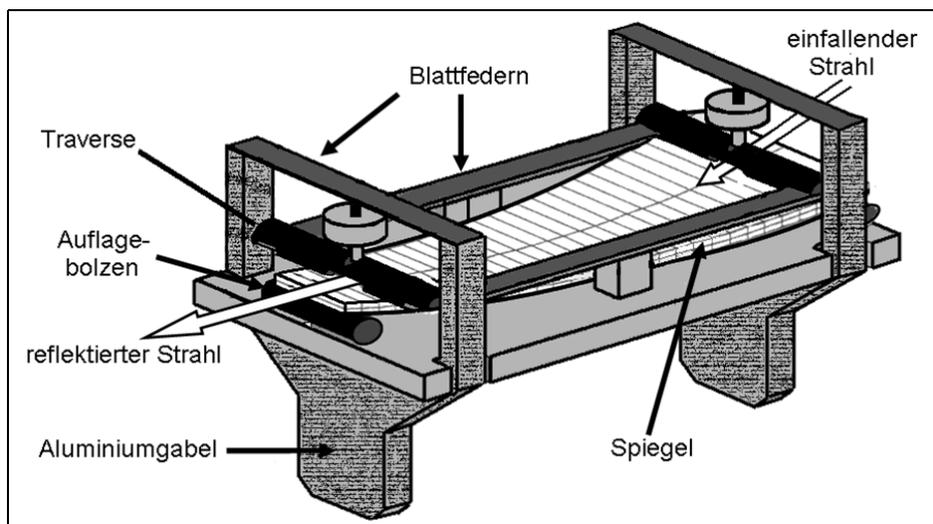


Abb. 3.10: Spiegel-Biegemechanismus - mechanische Ausführung

te gepresst werden. Die Andruckkraft wird von Aluminiumgabeln übertragen, die von Schrittmotoren senkrecht zur Oberfläche der Flachspiegel bewegt werden können. Blattfedern aus Kupfer halten die Traversen selbst und die Spiegel durch leichte Vorspannung der Traversen in ihrer Lage. In die Unterseite der Traversen ist als Durchlass für den Strahl (Pfeil in Abb. 3.10) ein Kanal mit rechteckigem Querschnitt (1,5 x 1 mm) gefräst.

3.4 Experimentelle Charakterisierung der Mikrosonde

3.4.1 Ermittlung des Strahlprofils

Die mit der Mikrosonde erzielbare Ortsauflösung hängt in erster Linie von der Strahlfleckausdehnung am Probenort ab; die Präzision der Probenhalter-Bewegung (bei der hier verwendeten Positioniereinheit: 1 μm) hat vergleichsweise geringen Einfluss. Um eine bestmögliche Fokussierung des Röntgenlichts zu erzielen, wurden für verschiedene Einstellungen der

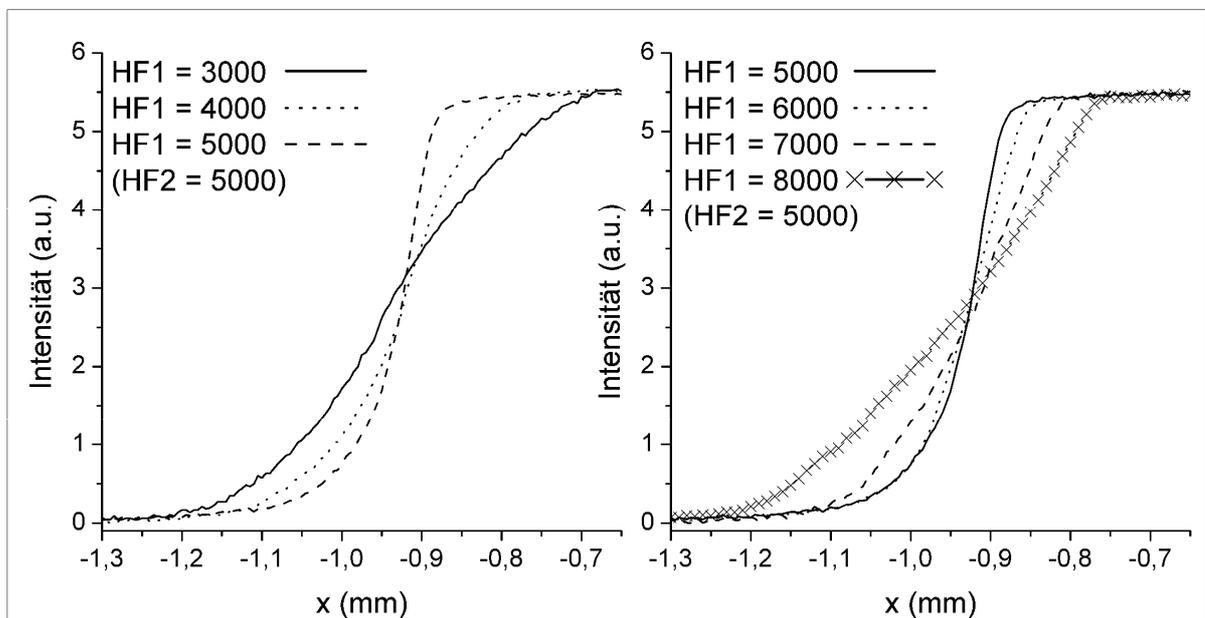


Abb. 3.11: Ergebnisse horizontaler `Knife Edge Scan`-Messungen bei Variation des Biegeparameters $KBHF1$ ($KBHF2$ konstant)

Spiegel-Biegeparameter ($KBHF1$, $KBHF2$, $KBVF1$, $KBVF2$) die horizontale und vertikale Strahlfleckausdehnung am Ort der Probe durch Messung sog. `Knife-Edge-Scan`-Kurven quantifiziert. Hierbei wurde eine auf dem Probenhalter befestigte Edelstahlklinge durch den fokussierten Strahl gefahren und die mit einer Ionisationskammer bzw. Fotodiode gemessene Intensität des Röntgenlichts nach dem Probenhalter als Funktion der Probenhalterposition gemessen. Die so erstellten Kurven weisen zwei Plateaubereiche auf, nämlich bei vollständiger Abschattung des Strahls einerseits und bei keiner messbaren Abschattung des Strahls durch die Klinge andererseits (maximale Intensität). Zwischen diesen Plateaus nimmt die transmittierte Intensität kontinuierlich zu. Ihre Ableitung liefert das horizontale bzw. vertikale Intensitätsprofil des Strahlflecks, und dessen Halbwertsbreite (FWHM, Gaußfit) ist ein Maß für die Strahlfleckausdehnung. Bei der Auswertung horizontaler `Knife-Edge-Scans` ist bei Verfahren des Probenhalters unter 45° zum einfallenden Strahl der Weg noch um den Faktor $\sin 45^\circ$ zu korrigieren.

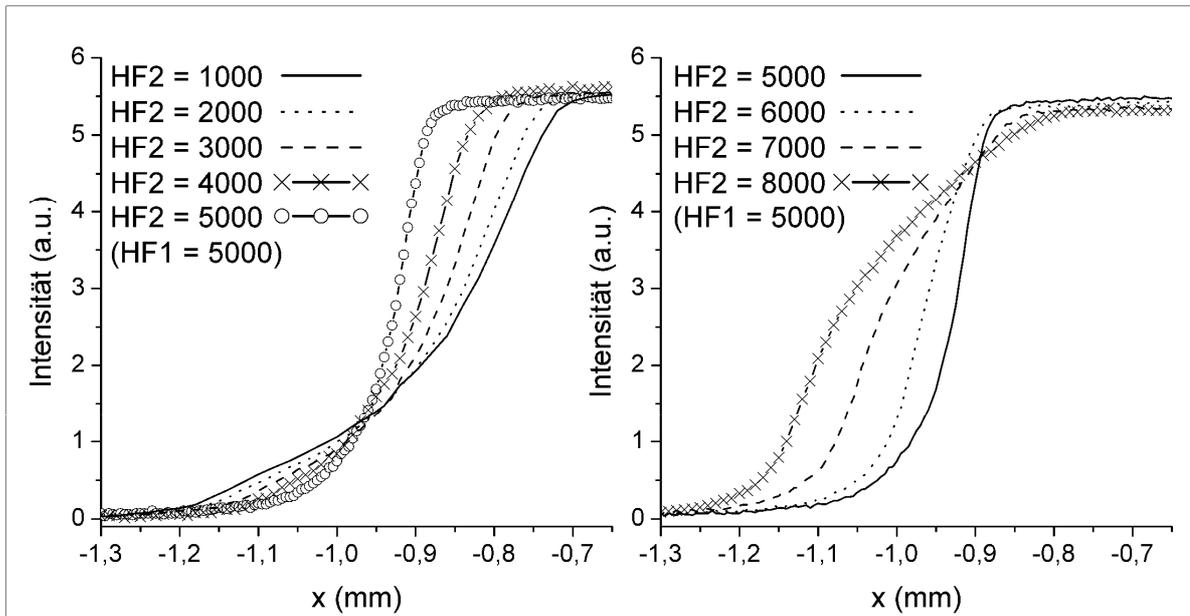


Abb. 3.12: Ergebnisse horizontaler `Knife Edge Scan` Messungen bei Variation des Biegeparameters $KBHF2$ ($KBHF1$ konstant)

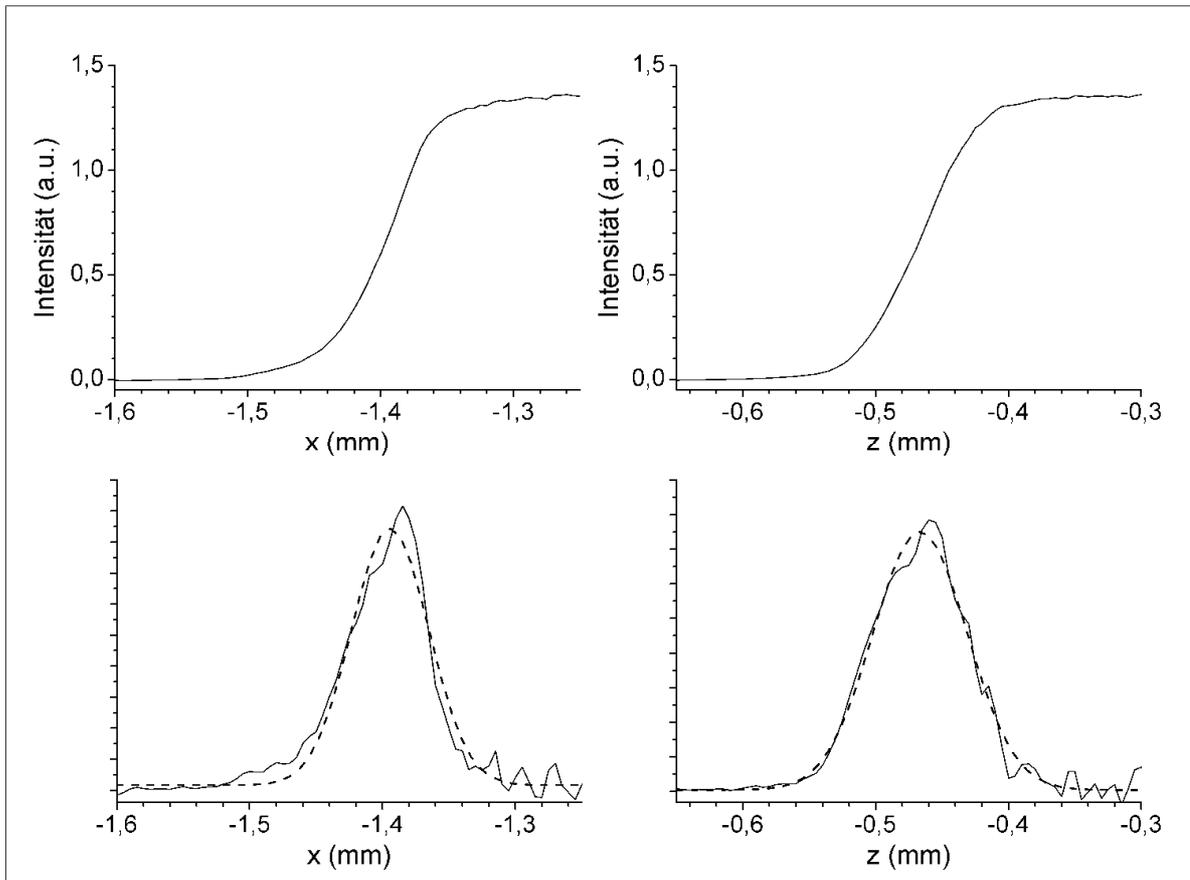


Abb. 3.13: Knife-Edge-Scan-Intensitätsverläufe (oben) und deren Ableitungen (unten) nach Optimierung der Biegeparameter

Abb. 3.11 und Abb. 3.12 zeigen die Ergebnisse von `Knife-Edge-Scan`- Messungen in horizontaler Richtung bei verschiedenen Einstellungen der Biegeparameter für den horizontal fokussierenden Spiegel. Bei den Messungen zu Abb. 3.11 wurde bei konstantem KBHF2 der Biegeparameter KBHF1 variiert, bei den Messungen zu Abb. 3.12 war KBHF1 konstant und KBHF2 wurde variiert. Der Einfluss der Biegeparameter auf die horizontale Strahlfleckausdehnung ist anhand dieser Kurven deutlich zu erkennen. Bei schrittweiser Erhöhung des jeweiligen Parameters verbessert sich die Fokussierung zunächst kontinuierlich. Jenseits der optimalen Einstellung ist jedoch die Andruckkraft zu groß und die Strahlfleckausdehnung am Ort der Probe nimmt wieder zu.

Abb. 3.13 zeigt Intensitätsverläufe von Knife-Edge-Scans in horizontaler und vertikaler Richtung nach sukzessiver Optimierung der Biegeparameter-Einstellung, sowie deren Ableitungen und zugehörige Gauß-Fits. Die Breiten der Gaußkurven betragen $58\ \mu\text{m}$ (horizontal, bei Messungen ggf. noch um $\sin 45^\circ$ zu korrigieren) bzw. $71\ \mu\text{m}$ (vertikal).

Laut N. Mölders [Möl99] ist eine im Vergleich zu theoretisch berechneten Werten größere Strahlfleckausdehnung am Ort der Probe in erster Linie auf Krümmungsfehler der Spiegel zurückzuführen, d. h. auf Abweichungen vom idealen elliptischen Profil. Diese Abweichungen werden u. a. durch Gravitation, thermische Verformung (insbesondere infolge Belichtung mit weißem Röntgenlicht) und Verzerrungen aufgrund unsachgemäßen Verbiegens verursacht. Mölders hat hierzu detaillierte Messungen durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Krümmungsfehler auf das Fokussierungsvermögen der Spiegeloptik nicht abgeschätzt.

Einen merklichen Einfluss auf die Ortsauflösung der Mikrosonde könnte auch die Oberflächenrauigkeit der Spiegelbeschichtung haben, weil die Reflektivität generell von der Oberflächenrauigkeit abhängt [Mar88]. Auch könnte eine Rolle spielen, dass die neue Mikrosondenlagerung nicht schwingungsfrei ist. Grundsätzlich hängt das Fokussierungsvermögen aber nicht nur von der Spiegeloptik ab, sondern auch von den Charakteristika des Speicherrings (Ausdehnung der Lichtquelle, Brillanz etc.). Der für die vorliegende Arbeit benutzte Aufbau unterscheidet sich von N. Mölders' Experiment zudem hinsichtlich der Entfernung zwischen Monochromator und Spiegeloptik.

3.4.2 Lochblendenmessungen

Als Ergänzung zu den `Knife Edge Scan`- Messungen wurde das Intensitätsprofil des fokussierten Strahls mit rechteckigen Blenden (Molybdän-Plättchen) vermessen. In Abb. 3.14 sind die Ergebnisse von Messungen mit $50\ \mu\text{m}$ - bzw. $20\ \mu\text{m}$ - Blenden zusammengefasst. Die Abb. 3.15 und 3.16 zeigen analoge Messkurven bei Änderung des `Upstream`-Biegeparameters `KBHF1` bzw. `KBVF1`. Diese Messungen liefern als Ergänzung zu den `Knife Edge-Scans` einen Beleg dafür, dass eine Verringerung der Strahlfleckausdehnung mit einer merklichen Intensitätserhöhung im Zentrum des Strahlflecks einhergeht, und demnach nicht etwa eine Folge der Abschattung des Strahls durch die Spiegel, sondern einen Effekt der Fokussierung darstellt. Diese Messungen wurden mit der $50\ \mu\text{m}$ -Blende durchgeführt; bei defokussiertem Strahl war die von der $20\ \mu\text{m}$ -Blende durchgelassene Intensität zu gering.

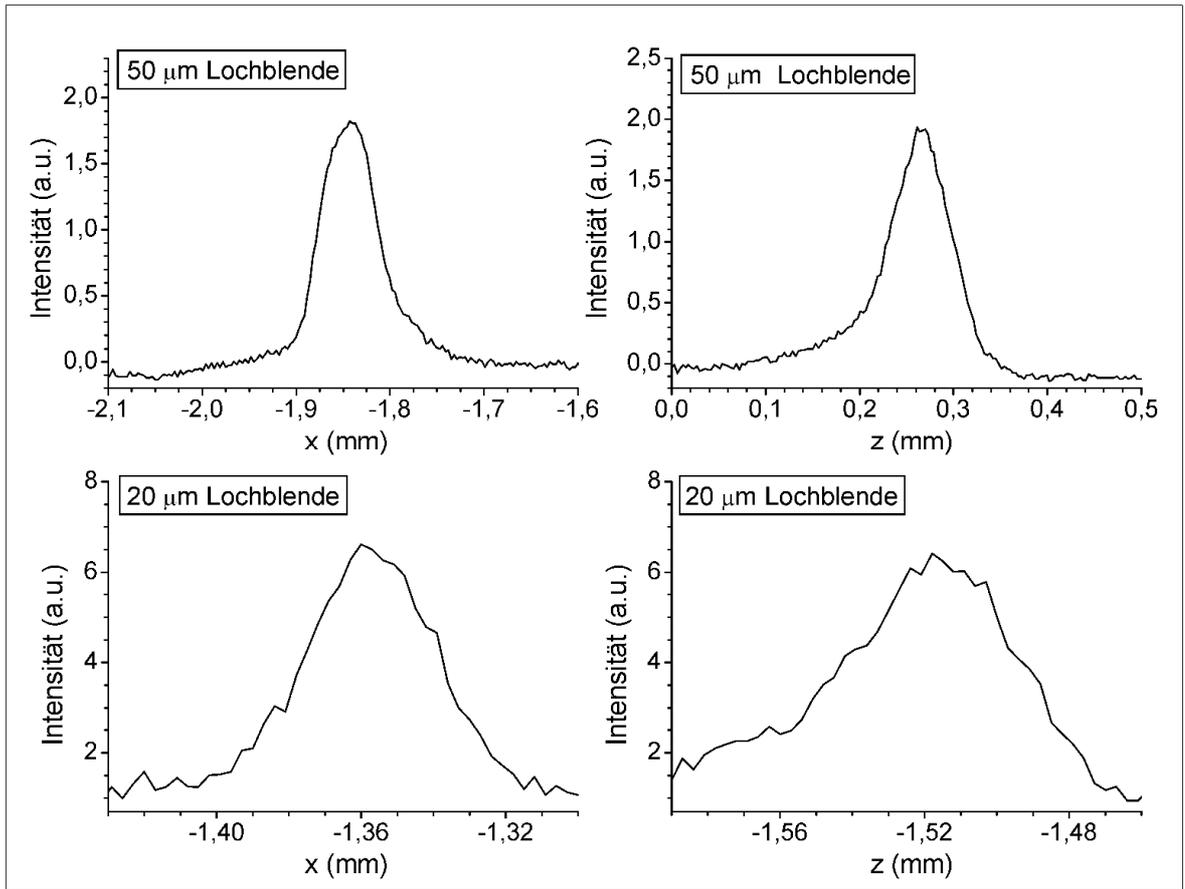


Abb. 3.14: Ergebnisse der Messungen mit Rechteck-Blenden

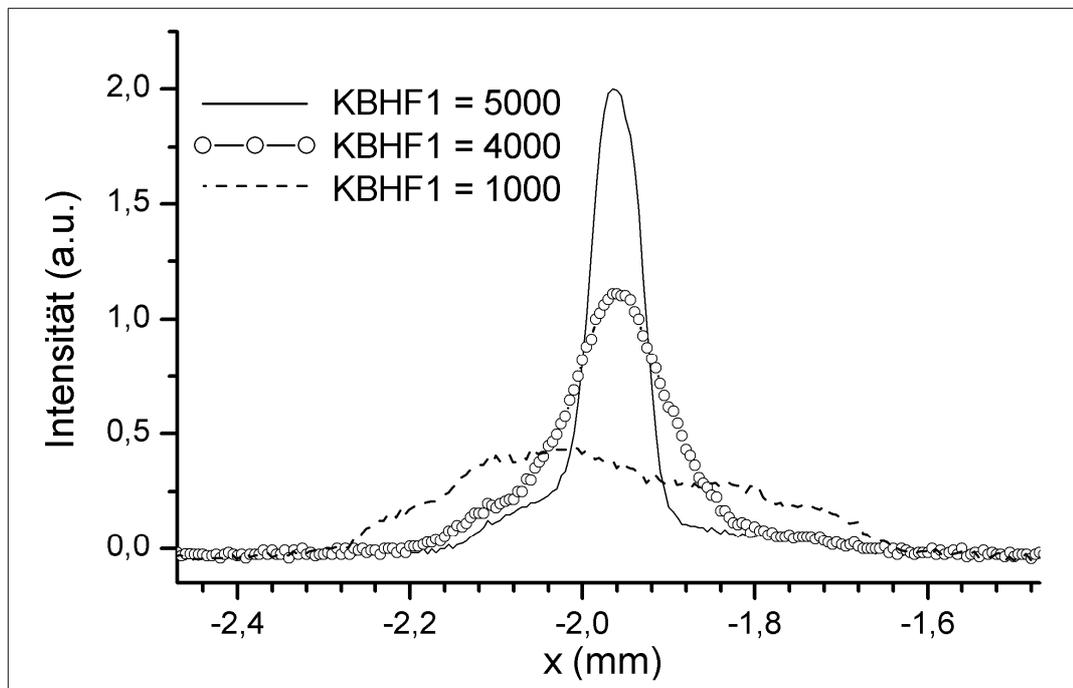


Abb. 3.15: Ergebnisse der Messungen mit 50 μm-Rechteckblenden bei Variation des Biegeparameters $F1$ – hor. Scan (Biegeparameter $KBVF1$, $KBVF2$, $KBHF2$ konstant)

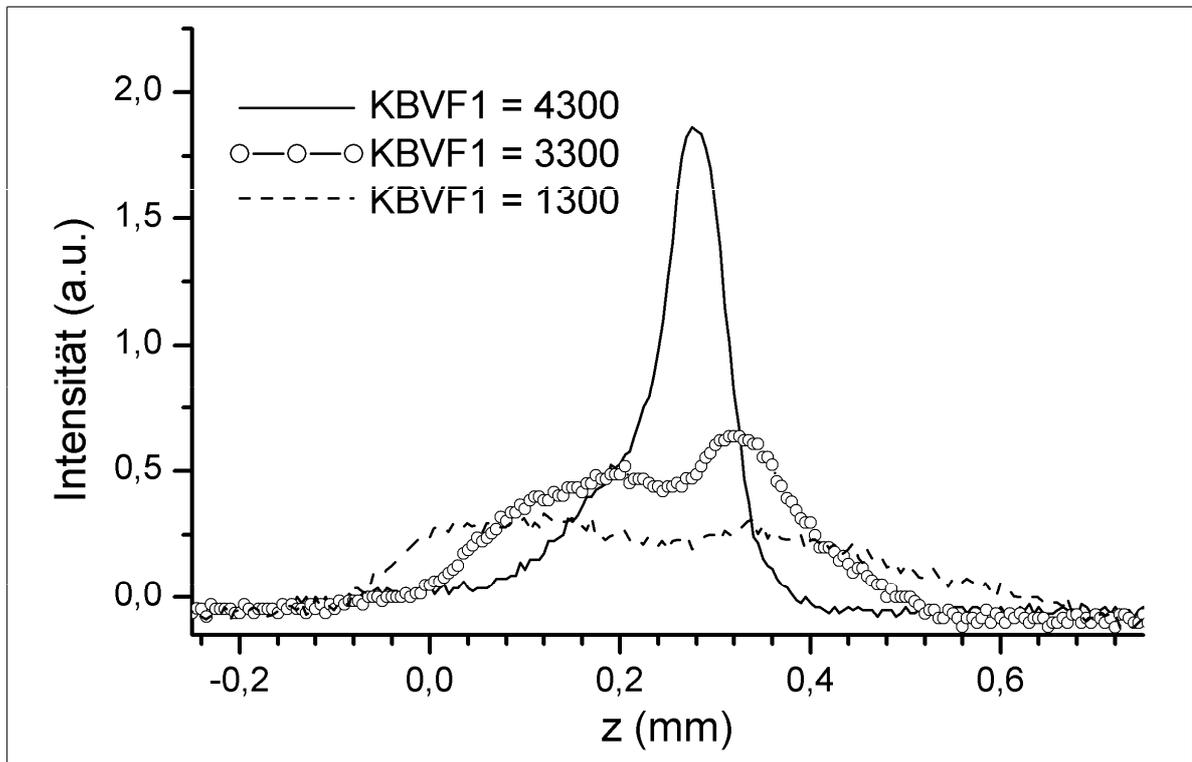


Abb. 3.16: Ergebnisse der Messungen mit 50 μm -Rechteckblenden bei Variation des Biegeparameters $F1$ – vert. Scan (Biegeparameter $KBVF2$, $KBHF1$, $KBHF2$ konstant)

3.4.3 Testmessungen an Metalldrahtgittern

Für die erste ortsauflösende Testmessung wurde ein Eisendrahtnetz (Maschenweite ca. 0,7 mm) auf dem Probenhalter befestigt und zeilenweise mit dem fokussierten Strahl abgetastet, wobei die transmittierte Intensität mit der Photodiode bzw. einer Ionisationskammer gemessen wurde. Abb. 3.17 zeigt den zugehörigen Konturplot, Abb. 3.18 Messkurven beim Verfahren des Probenhalters in horizontaler bzw. vertikaler Richtung.

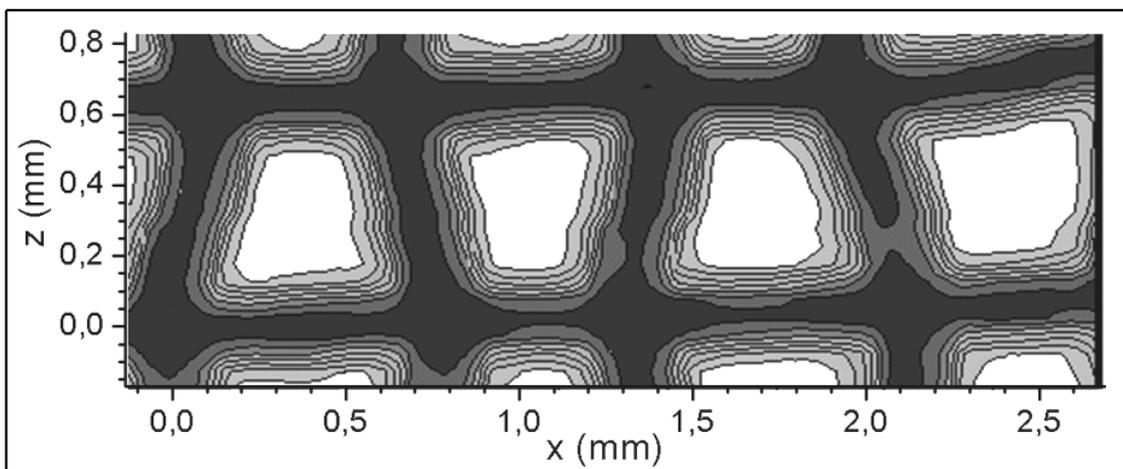


Abb. 3.17: Konturplot - Intensität des fokussierten Strahls hinter einem Eisendrahtgitter bei zeilenweiser Rasterung

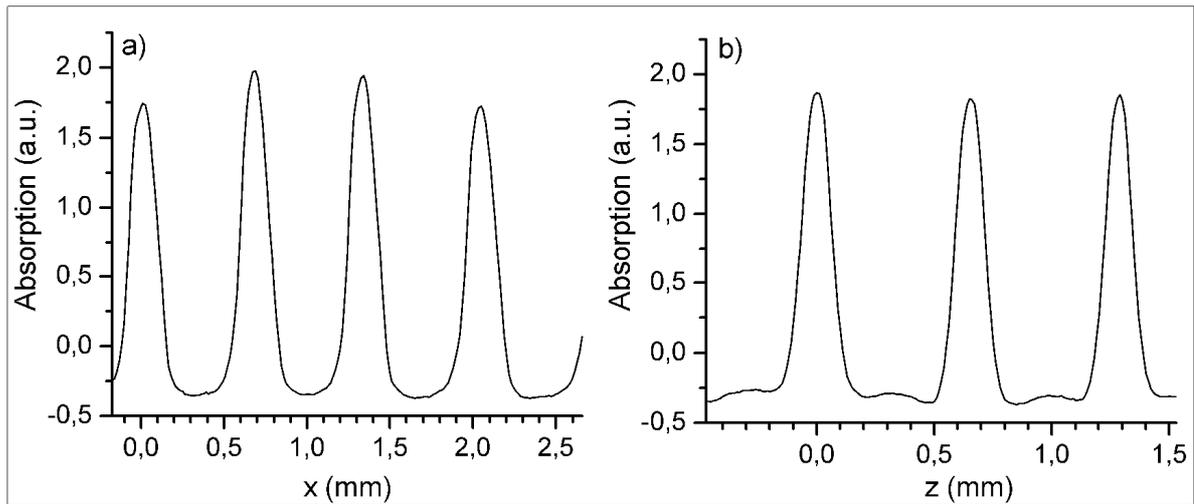


Abb. 3.18: Absorption des fokussierten Strahls bei Verfahren des Probenhalters in
 a) horizontaler (Schrittweite $14\ \mu\text{m}$) Richtung bzw.
 b) vertikaler Richtung (Schrittweite $10\ \mu\text{m}$, $x = -2,17\ \text{mm}$)

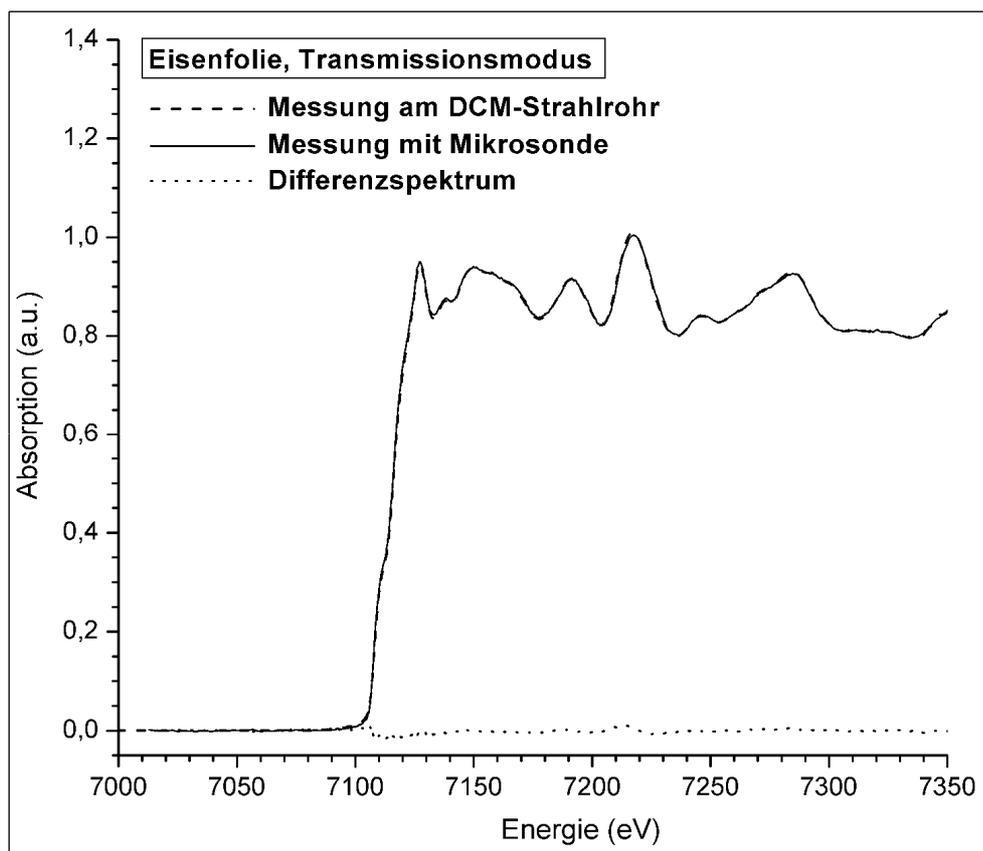


Abb. 3.19: Vergleich eines an der Mikrosonde gemessenen Absorptionsspektrums (fokussierter Strahl) mit einem am DCM-Strahlrohr aufgenommenen Spektrum der gleichen Probe

Um zu prüfen, ob die Fokussierung des Röntgenlichts durch die Spiegeloptik Verzerrungen in Absorptionsspektren verursacht - z. B. aufgrund instabiler Strahlage - wurde das Absorptionsspektrum einer Eisenfolie mit fokussiertem Strahl im Transmissionsmodus (Ionisationskammer) gemessen und mit einem am DCM-Strahlrohr gemessenen Spektrum der gleichen Probe verglichen (Abb. 3.19). Die beiden Spektren sind nahezu deckungsgleich. Das Differenzspektrum ist als gepunktete Kurve eingezeichnet. Lediglich im Bereich der ansteigenden Flanke sind nicht-signifikante Unterschiede zwischen den Spektren erkennbar.

Nach Inbetriebnahme des Germanium-Detektors wurde ein Nickeldraht-Netz mit 70 Maschen pro Zoll (Maschenweite $363\ \mu\text{m}$) horizontal und vertikal in $7\ \mu\text{m}$ - bzw. $10\ \mu\text{m}$ -Schritten durch den fokussierten Strahl bewegt (Anregungsenergie $8,6\ \text{keV}$ und dabei die Intensität der Nickel- K_{α} -Fluoreszenz ($7,5\ \text{keV}$) gemessen (Abb. 3.20a) und 3.20b)). Eine analoge Messung erfolgte an einer Anordnung paralleler Nickel-Drähte (Durchmesser $50\ \mu\text{m}$, Abstand zwischen den Drähten $200\ \mu\text{m}$; Schrittweite hor. und vert. $10\ \mu\text{m}$) auf einem Nickel-Substrat (Abb. 3.21a) und 3.21b)). Da es sich hierbei um ein eindimensionales Gitter handelte, musste zwischen horizontalem und vertikalem Rastern die Probe um 90° gedreht werden.

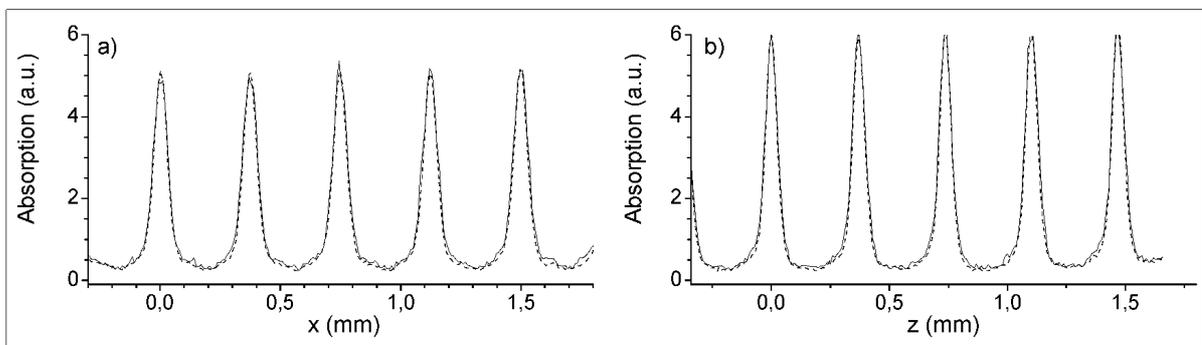


Abb. 3.20: Messungen an Nickeldraht-Netz - (a) horizontaler Scan, (b) vertikaler Scan, jeweils über zwei Einzelmessungen gemittelt; durchgezogene Kurven: Fluoreszenzdaten, gestrichelte Kurven: Transmissionsdaten, auf Fluoreszenzkurven normiert)

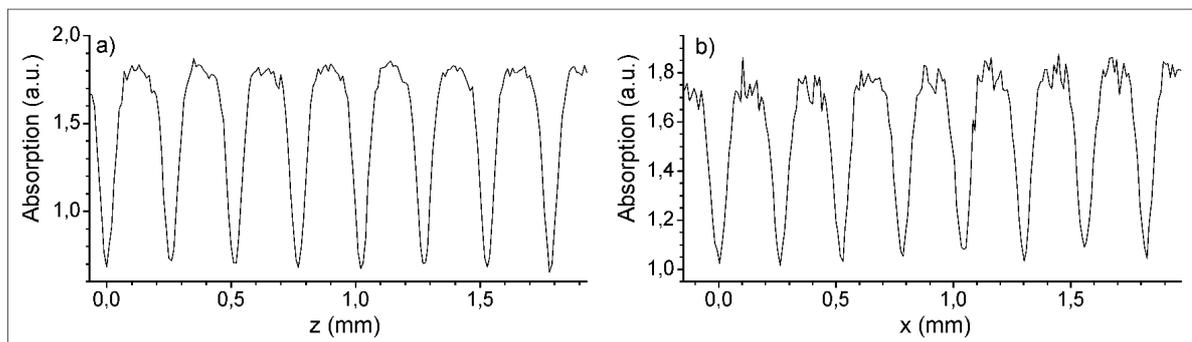


Abb. 3.21: Messungen an Nickeldraht-Array, (a) vertikaler Scan (gemittelt über zwei Einzelmessungen), b) horizontaler Scan (Einzelmessung)

3.4.4 Tests an biologischen Objekten

Als erstes im weitesten Sinne biologisches Testobjekt wurde eine in Chrom-verseuchtem Nährmedium gewachsene Pflanze (Brunnenkresse) herangezogen. Gemessen wurde die Intensität der Chrom- K_{ν} -Emission (5,4 keV) beim zeilenweisen Abtasten eines Ausschnitts der Blattoberfläche. Anhand des Konturplots in Abb. 3.22 ist ersichtlich, dass die höchste Chromkonzentration im Stengel bzw. in den Leitbündeln herrscht [How03]. Abb. 3.23 zeigt Cr-K-XANES-Spektren, die an verschiedenen Stellen auf der Blattoberfläche – zentrales Leitbündel bzw. Oberflächenbereich fernab der Leitbündel - gemessen wurden. Abgesehen vom Signal-Rausch-Verhältnis (wegen unterschiedlicher Chrom-Konzentrationen an den beiden Messpunkten) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spektren bzw. Hinweise auf Unterschiede in der Chrom-Speziation erkennbar.

Die bisher beschriebenen Messungen wurden vor Fertigstellung der neuen Vakuumkammer bei relativ hohen Anregungsenergien durchgeführt (Eisen-, Nickel- und Chrom-K-Kante,

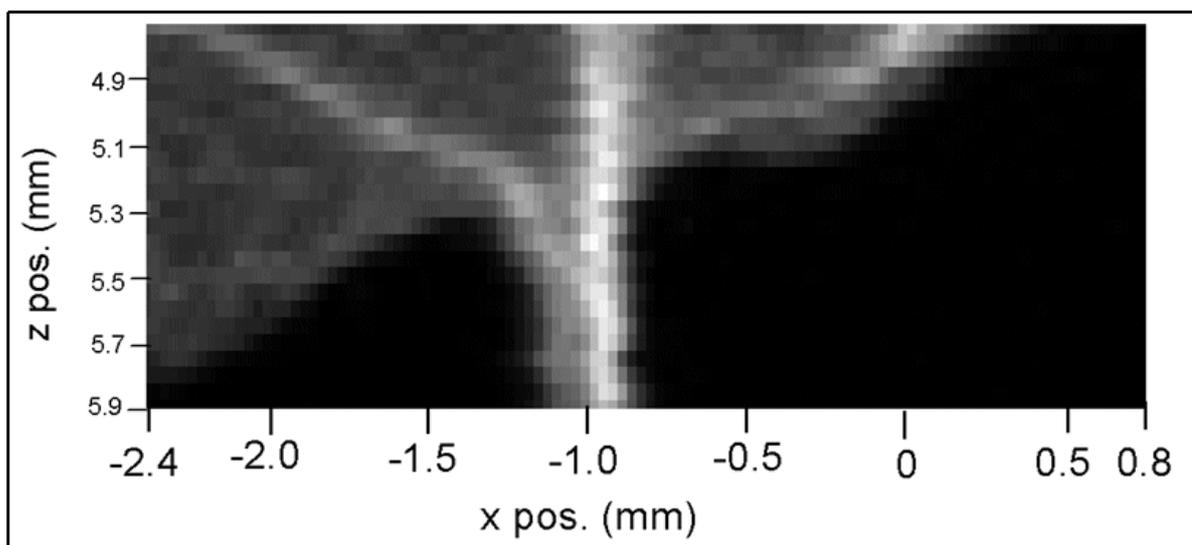


Abb. 3.22: Konturplot der Cr- K_{α} -Intensität bei Rasterung eines Oberflächenausschnitts eines Brunnenkresse-Blattes

Monochromator mit Ge(220)-Kristallen bestückt). Nach Inbetriebnahme der neuen Kammer wurde ein Druck von 60 mbar eingestellt und eine Anregungsenergie knapp oberhalb der Schwefel-K-Kante gewählt (2,6 keV, InSb(111)-Kristalle). Dann wurde ein menschliches Haar durch den fokussierten Strahl gefahren und dabei die Intensität der Schwefel- K_{α} -Fluoreszenz gemessen. Ein Haar eignet sich für derartige Testmessungen aufgrund seines Durchmessers (typischerweise 50 μm , in etwa vergleichbar mit der im Rahmen dieser Arbeit mit der Mikrosonde erzielten Ortsauflösung) und aufgrund seines hohen Schwefelgehalts [Zah89]. Es besteht durchaus industrielles Interesse an entsprechenden Messungen [Hor07]. Die Halbwertsbreite der Messkurve (Abb. 3.24) beträgt 114 μm , was ungefähr der Summe aus der Halbwertsbreite des Strahlprofils und dem Durchmesser des abgetasteten Objekts entspricht. Abb. 3.25 zeigt ein Schwefel-K-XANES-Spektrum dieser Probe (Fluoreszenzmodus) und die zugehörige Fitkurve.

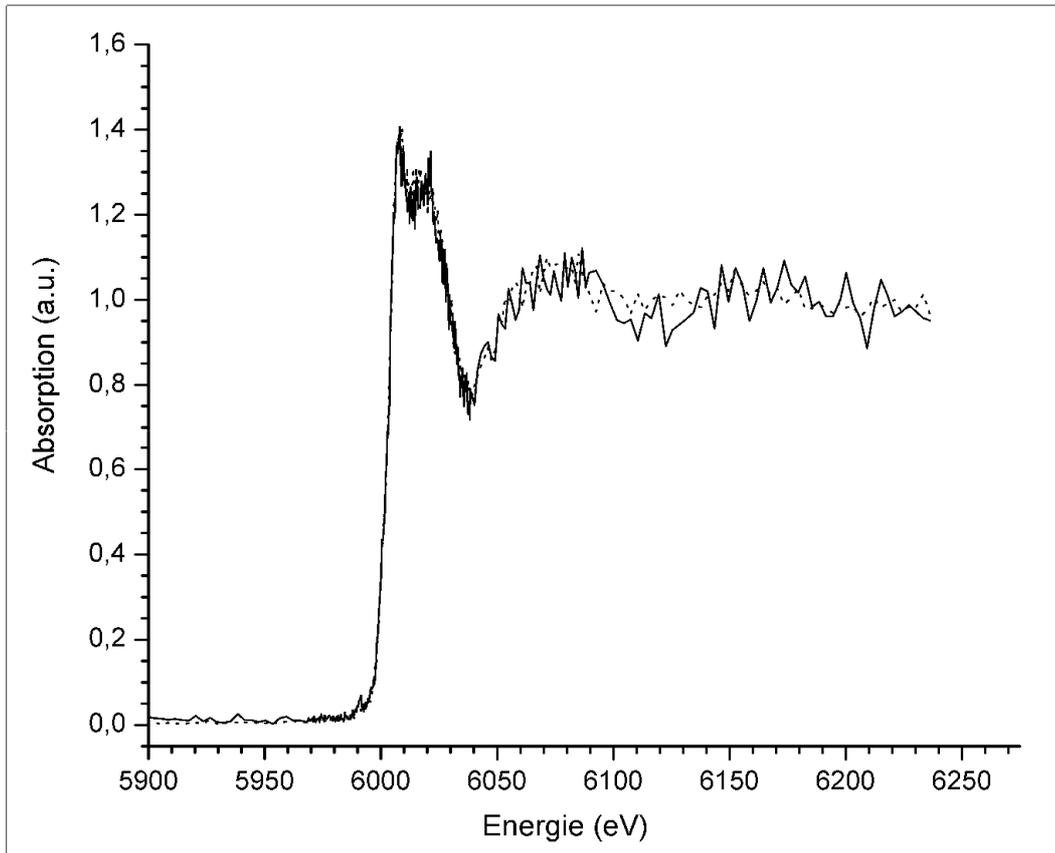


Abb. 3.23: Cr-K-XANES-Spektren (K_{α} -Fluoreszenz) verschiedener Bereiche der Blattoberfläche (Brunnenkresse): a) zentrales Leitbündel (Pos.: $x = -0,97$ mm, $z = 5,20$ mm, gestrichelt), b) Punkt fern der Leitbündel (Pos.: $x = -1,95$ mm, $z = 5,40$ mm, durchgezogen)

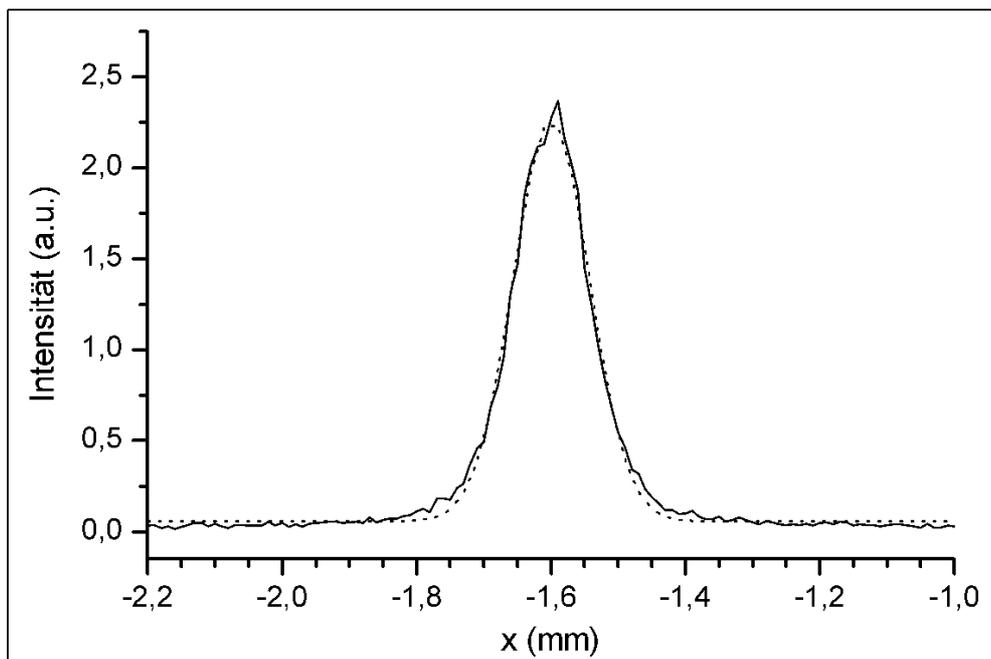


Abb. 3.24: Intensität der Schwefel- K_{α} -Linie bei Verfahren eines Haars senkrecht zum fokussierten Strahl (durchgezogene Kurve) und zugehöriger Gauß-Fit (gepunktet)

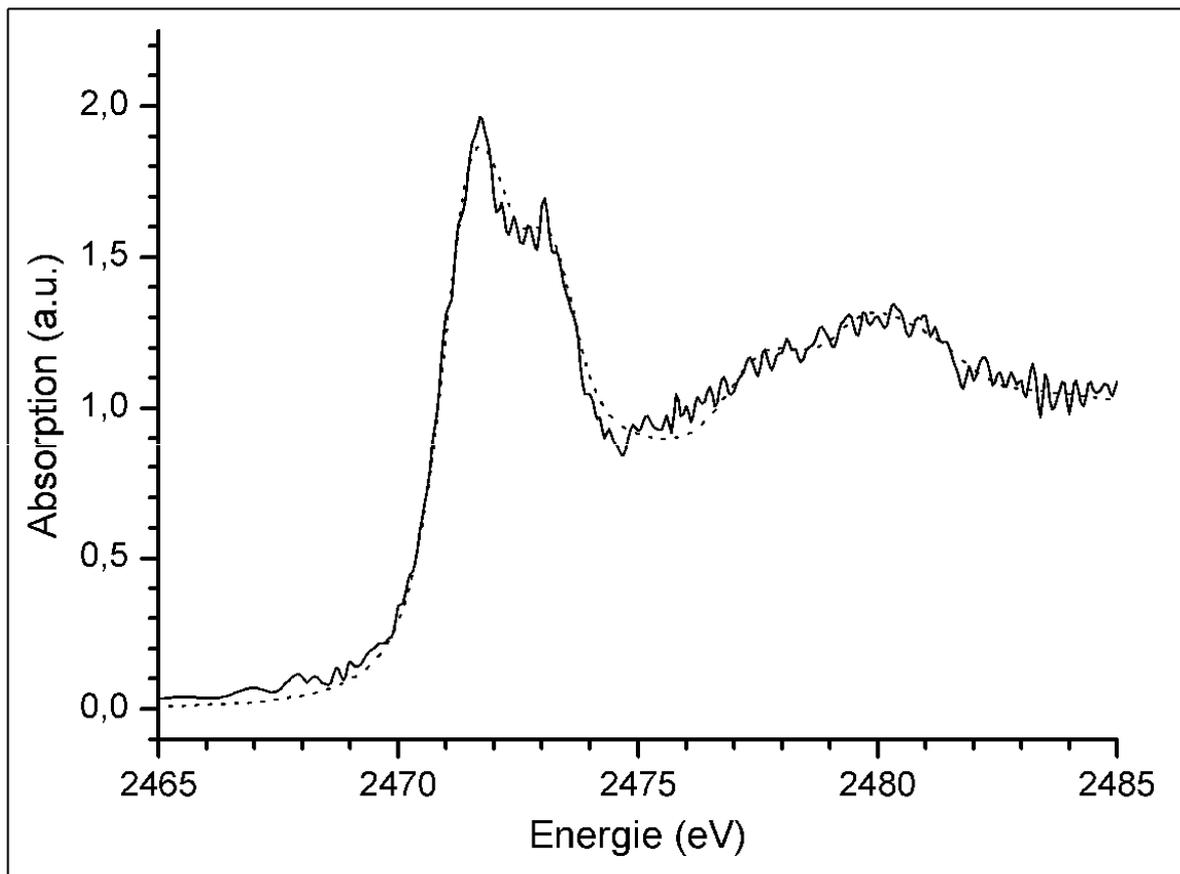


Abb. 3.25: Schwefel-K-XANES-Spektrum eines Haares (Fluoreszenzmodus, Mittelung über zwei Einzelmessungen, durchgezogene Kurve) und zugehörige Fitkurve (gepunktet)

Die quantitative Analyse lieferte das folgende Ergebnis: 1 % Zinksulfat, 9 % Cysteinsäure, 32 % Cystein und 57 % Cystin. Die Haarproteine (Keratine) weisen demzufolge - in Übereinstimmung mit [Zah89] – einen hohen Gehalt an Cystin auf. Die Festigkeit des Materials beruht zu einem großen Teil auf Disulfidbrücken.

4 Ortsauflösende Messungen an rostpilzbefallenen Weizenblättern

Pilze sind von Nutzen für Zersetzungsprozesse in der Biosphäre, für symbiotische Gemeinschaften und außerdem für die Herstellung von Lebensmitteln und Medikamenten. Andererseits können sie nahezu alle erdenklichen Gebrauchsmaterialien angreifen, Nahrungsmittel verderben und bei Menschen, Tieren und Pflanzen Krankheiten erregen. Die sog. Rostpilze (Uredinales, Klasse: Urediniomyceten, Abteilung: Basidiomycota) verursachen als Pflanzenpathogene große wirtschaftliche Schäden [Rav06]. Der Befall von Getreide mit Rostpilzen hat erhebliche Ernteausfälle zur Folge [Oer06]/[McI95]. Weizen ist die wichtigste Nutzpflanze der nördlichen Hemisphäre. Im Folgenden wird der Befall von Weizenblättern mit Braunrost (*Puccinia triticina* [Obe05]) hinsichtlich der Stoffwechselfvorgänge untersucht. Anhand dieses biologischen Systems sollen Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen biotrophen Pflanzenpathogenen und dem Wirtsgewebe gewonnen werden. Als obligater biotropher Parasit ist Braunrost wegen seiner Ernährungsbedürfnisse auf lebende Wirtspflanzen angewiesen [Tha03]. Ziel der Untersuchungen war es insbesondere, die Veränderungen im Schwefelstoffwechsel der Wirtspflanze nachzuweisen, die durch den Pilzbefall hervorgerufen werden. Die Kenntnis der komplexen Wechselbeziehung zwischen Pathogen und Wirt kann zum besseren Verständnis des Stoffwechsels und seiner Regulierung bei den befallenen Pflanzen beitragen. Einige Studien haben sich mit den Auswirkungen von Rostpilzen und Mehltau auf Photosynthese und Respiration der Wirtspflanzen befasst. Die Aufnahme von Nährstoffen, insbesondere von Aminosäuren und Kohlenhydraten, unterliegt ausschließlich der Wechselwirkung zwischen Wirt und Pathogen [Pra05].

4.1 Spezifika des Probensystems und messtechnische Details

Die Hauptfunktionen des Blattes sind Photosynthese und Transpiration. Die Photosynthese findet in chloroplastenreichen Zellen des Assimilationsgewebes (Mesophyll) statt. Dieses Zwischenblattgewebe wird von einem einlagigen Abschlussgewebe (Epidermis) umschlossen, das mit einem wachsartigen, nahezu wasserundurchlässigen Überzug (Cuticula) bedeckt ist. Der Gasaustausch mit der Umgebung (kontrollierte Wasserverdunstung, Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid bei der Photosynthese etc.) wird durch Spaltöffnungen (Stomata) geregelt, deren Schließzellen auf Veränderungen der Umweltbedingungen reagieren, vor allem auf Helligkeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Ein weiteres wichtiges Element der Blattanatomie sind Leitbündel, die das Mesophyll durchziehen und als Transportkanäle für Wasser, gelöste Stoffe (Mineralien) sowie organische Substanzen - hauptsächlich Photosyntheseprodukte – dienen [Rav06]/[Kut02].

Symptome eines Befalls mit *Puccinia triticina* sind ovale rostbraune Pusteln, im Folgenden als 'Rostpusteln' bezeichnet [McI95]. Sie erhalten ihre Farbe durch die Sporen des Rostpilzes (Uredosporen), die hier heranreifen. Rostpilze bilden keine Fruchtkörper. Ihre Basidiosporen entstehen als Agglomerate, die Sori genannt werden, und sorgen für die Verbreitung und Vermehrung des Pilzes. Durch Luftströmung kann eine Spore über weite Strecken transportiert werden, auf einem frischen Weizenblatt landen und dort unter geeigneten Umweltbedingungen auskeimen, vor allem bei Verfügbarkeit von Wärme und Feuchtigkeit, wobei sich eine sog. Keimhype (Keimfaden) bildet [Men73]/[Rav06].

Hyphen sind pilzliche Zellfäden, die der Ernährung bzw. Fortpflanzung des Pilzes dienen. Das Blatt der Wirtspflanze wird durch eine Spaltöffnung infiziert. Aus der Infektionshypho entsteht dann zwischen den Pflanzenzellen ein verzweigtes Hyphengeflecht (Myzel). Unter der später aufreißenden Epidermis wird ein Sporenlager gebildet [Bör90]. Durch den Riss in der Epidermis werden die Sporen dann herausgedrückt. Spezielle Hyphen, sog. Haustorien, ermöglichen dem biotrophen Pilz das Eindringen in lebende Wirtszellen, denen er Nährstoffe entzieht [Men00]/[Men02]/[Voe03]. Der vollständige Entwicklungszyklus von *Puccinia triticina* schließt Wirtswechsel und die Bildung weiterer Sporenformen ein [Rav06]. Die obige Erläuterung beschränkt sich auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Stadien.

Bei den hier betrachteten Proben war nur ein Teil des Pflanzengewebes von den Pathogenen befallen. Die genaue Untersuchung erfordert eine Abgrenzung, die nicht nur nach Rostpusteln und grünen Bereichen auf der Blattoberfläche differenziert, sondern die grünen Bereiche darüber hinaus in gänzlich unversehrte und 'symptomfrei befallene' Geweberegionen unterteilt. Diese Zonen grenzen unmittelbar an die Sori an und werden mit großer Wahrscheinlichkeit vom Pilz beeinflusst, wenngleich sie bei Betrachtung mit bloßem Auge symptomfrei erscheinen. Zu einer stichhaltigen Beschreibung der Situation ist eine Analyse der Aufnahme und Metabolisierung von Nährstoffen durch das Pathogen anhand der räumlichen Nährstoffverteilung innerhalb des Blattes erforderlich. Angesichts der Schlüsselrolle der Ernährung des Pilzes in der Wirt-Pathogen-Beziehung ist über die Mikronährstoffe Schwefel, Phosphor und Eisen erstaunlich wenig bekannt [Sol03].

Die Anzucht der Pflanzen und die Inokulation mit *P. triticina*-Sporen wurde vom Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn (INRES, Abteilung Phytomedizin) geleistet. Zwölf Tage nach der Inokulation hatte *P. triticina* Uredosporen gebildet, die (lokal) eine Zerstörung der Epidermis bewirkten. Die Blätter wurden dann vakuumverpackt im Kühlschrank gelagert.

Vor Beginn der XANES-Messungen wurden zunächst Röntgenfluoreszenzspektren (**X-Ray Fluorescence**, XRF [Hah95]) aufgenommen, um einen Eindruck von der Elementverteilung in den Blättern zu gewinnen. Die ersten XRF-Messungen erfolgten vor Inbetriebnahme der neuen Vakuumkammer am XMP-Strahlrohr des CAMD (siehe Kap. 3.3.1) unter Atmosphärendruck bei einer Anregungsenergie von 7,4 keV (Ge(220)-Kristalle). In 4.2 werden Röntgenfluoreszenzspektren der Rostpusteln mit denen grüner Blattregionen verglichen. Auch die Ortsabhängigkeit der Intensität einiger ausgewählter Röntgen-Emissionslinien bei schrittweisem Abtasten der Probe mit dem fokussierten Röntgenstrahl wurde aufgezeichnet. Die Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Konzentration von Nährelementen bei den Rostpusteln hin, wobei jedoch auch die dort vorliegende größere Probendicke zu berücksichtigen ist. Einige Strukturen in den gemessenen Kurven lassen sich auf die Blattanatomie zurückführen.

Unmittelbar nach Inbetriebnahme (und Auspumpen) der neuen Vakuumkammer erfolgten analoge XRF-Messungen bei einer Anregungsenergie von 5,5 keV (Si(111)-Kristalle).

Röntgenfluoreszenzexperimente bei fester Anregungsenergie sind auch ohne Synchrotron-Strahlungsquelle möglich, z. B. wird in [Pih92] über EDX-Messungen an Roggenblättern berichtet. Schwerpunkt sind bei den vorliegenden Untersuchungen demgegenüber die ortsauflösenden XANES-Messungen an der Schwefel-K-Kante und die anhand der Spektren ersichtlichen (räumlichen) Inhomogenitäten in der Schwefelspeziation der Proben. Die Absorptionsspektren der Rostpusteln unterscheiden sich deutlich von denen gesunder Bereiche auf der

Blattoberfläche (in Übereinstimmung mit [Pra05]). In verschiedenen Abständen von einer ausgewählten Rostpustel gemessene Schwefel-K-XANES-Spektren vermitteln einen Eindruck von der Ausdehnung der Einflussosphäre des Pilzes über manifest infizierte Geweberegionen hinaus. Alle XANES-Messungen wurden im Fluoreszenz-Modus durchgeführt.

Die abschließend an der Kalium- und Phosphor-K-Kante aufgenommenen Spektren dienen nur der weiteren Orientierung, zumal sie keine Unterschiede zwischen infizierten und unversehrten Blattregionen offenbaren. Sie belegen jedoch zumindest, dass bei rostbefallenen Weizenblättern prinzipiell XANES-Spektren dieser Elemente in akzeptabler Qualität mit der Mikrosonde am XMP-Strahlrohr messbar sind.

4.2 Röntgenfluoreszenzanalyse

Abb. 4.1 zeigt typische Röntgenemissionsspektren von Weizenblättern bei Anregungsenergien von 7,4 keV bzw. 5,5 keV. Die Argon- K_{α} -Emission ist nicht auf das Probenmaterial, sondern auf Argon-Atome in der Luft zurückzuführen. Die übrigen Linien in Abb. 4.1 sind den 'essentiellen Nährelementen der höheren Pflanzen' [Kut02] mit K_{α} / K_{β} -Emissionen im Energiebereich zwischen 1,7 keV (Si- K_{α}) bis 6,5 keV (Mn- K_{β}) bzw. Ordnungszahlen zwischen 14 und 25 zuzuordnen, nämlich Silizium (Zugehörigkeit zu den essentiellen Nährelementen laut [Kut02] strittig), Phosphor, Schwefel, Chlor, Kalium, Kalzium und Mangan.

Möglicherweise verbirgt sich unter der Mn- K_{β} -Linie noch eine intensitätsschwache Eisen- K_{α} -Linie. Die obere Grenze des Energiebereichs ist durch die Anregungsenergie gegeben. Emissionen der Elemente Silizium, Phosphor und Schwefel waren erst nach Inbetriebnahme und Auspumpen der neuen Vakuumkammer messbar (vorher offensichtlich durch Luftabsorption unterdrückt). Die Linienbreiten in den Spektren sind durch die natürlichen Linienbreiten und das begrenzte spektrale Auflösungsvermögen des Fluoreszenzdetektors bedingt. In Übereinstimmung mit Tabellenwerten der Konzentration von Nährelementen in Pflanzen leistet Kalium den größten Beitrag zur Röntgenfluoreszenz der Probe [Kut02]. Überraschend intensitätsschwach fällt hingegen die einer Überlagerung von Mn- K_{β} - und etwaiger Fe- K_{α} -Fluoreszenz entsprechende Struktur bei 6,4 keV aus, zumal die bei dieser Probe zu erwartenden Eisen-K-Linien bei einer spektralen Detektorauflösung von 0,2 keV noch deutlich vom Streulicht unterscheidbar sein sollten.

Auch die Intensitäten der Phosphor- und Schwefel-Emissionen bleiben hinter der Theorie [Kut02] zurück, und zwar nicht apparaturbedingt, wie eine Kontrollmessung an einer Probe mit hoher Schwefelkonzentration zeigte. Die in Abb. 4.1 abgelesenen Intensitäts- bzw. Zählraten-Verhältnisse entsprechen nicht unmittelbar den Konzentrationsverhältnissen der chemischen Elemente am Ort des fokussierten Strahls. Eine quantitative Betrachtung ist nicht ohne Vorbehalt möglich, weil dabei eine ganze Reihe von Effekten wie die Quanteneffizienz des Detektors und die Absorption des Fluoreszenzlichts durch Atmosphärgase im Detail zu berücksichtigen wäre. Relativmessungen erlauben jedoch Aussagen über Änderungen der Konzentrationsverhältnisse beim Übergang von gesunden zu rostbefallenen Blattregionen.

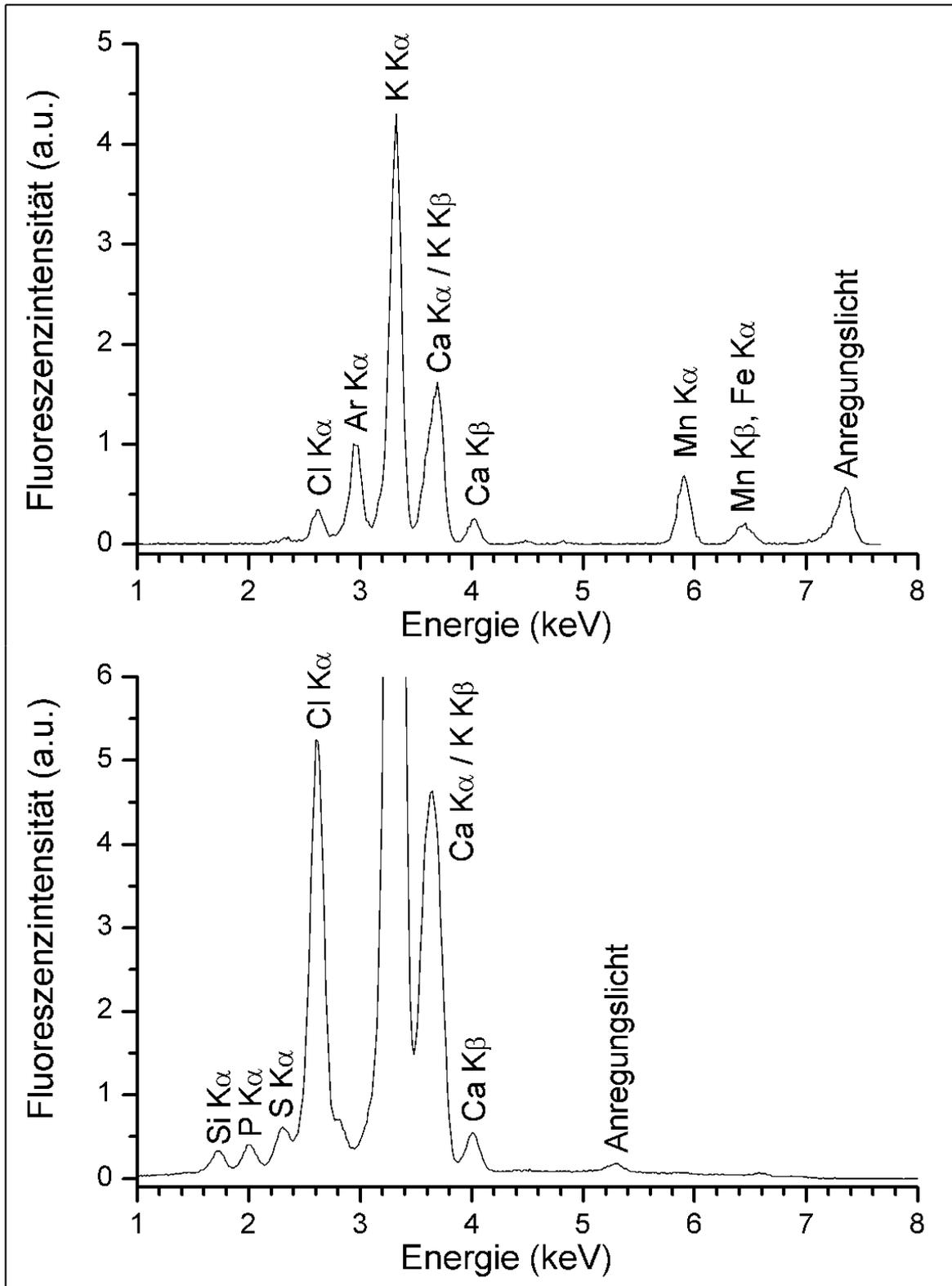


Abb. 4.1: Typische Emissionsspektren von rostpilzbefallenen Weizenblättern bei Anregungsenergien von 7,4 keV (Atmosphärendruck, oben) bzw 5,5 keV (Vakuum, unten)

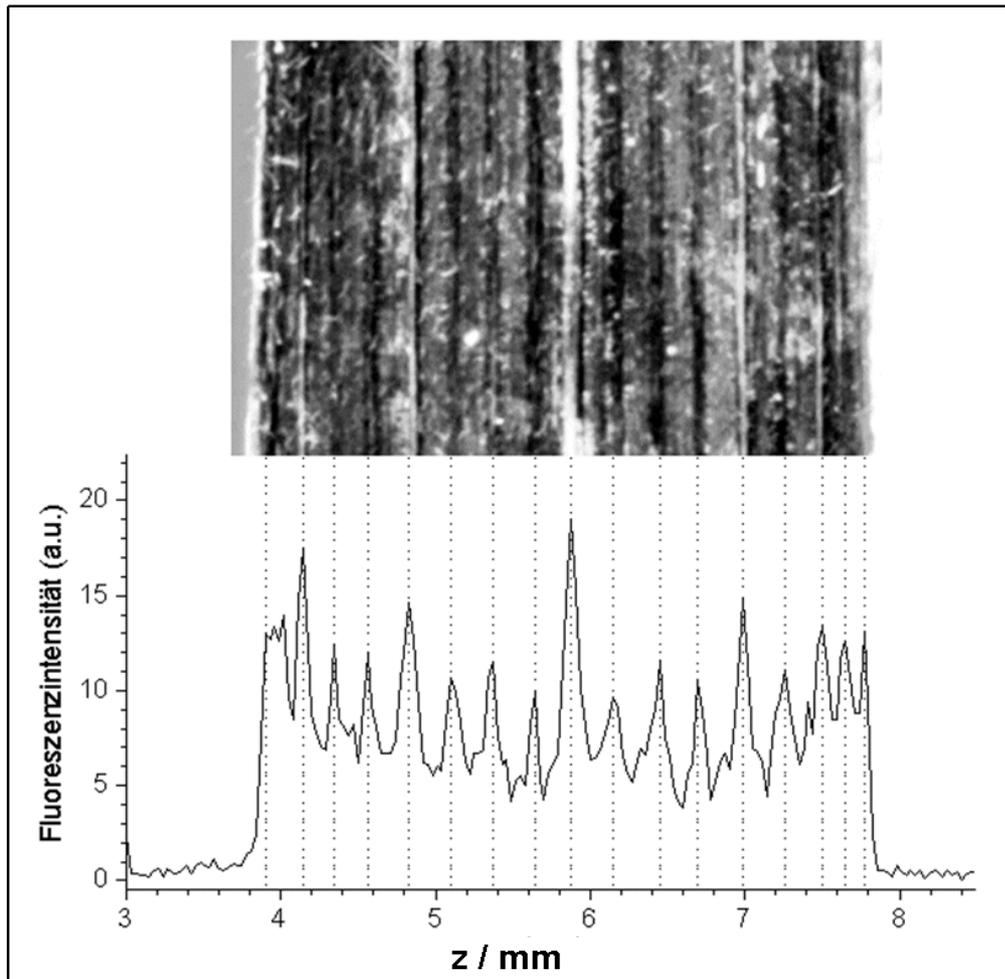


Abb. 4.2: Intensitätsverlauf der Kalium- K_{α} -Linie bei Abtasten eines gesunden Weizenblattes

In Abb. 4.2 ist die Fluoreszenzintensität innerhalb eines auf die Kalium- K_{α} -Linie zentrierten Fensters (Breite 0,2 keV) aufgetragen, die beim Verfahren des Probenhalters senkrecht zur Längsachse eines gesunden Weizenblattes gemessen wird (Mittelung über drei Einzelmessungen, Schrittweite 30 μm , Integrationszeit pro Punkt 2 s). Erwartungsgemäß geht ein Überstreichen des Blattrandes durch den Fokus je nach Bewegungsrichtung des Probenhalters mit einem abrupten Anstieg bzw. Abfall der Fluoreszenzintensität einher. Die Messung wirkt auf den ersten Blick verrauscht. Bei Vergleich mit dem Foto der Probe wird jedoch deutlich, dass sich die lokalen Maxima in der gemessenen Kurve mit den Leitbündeln des Blattes decken und demnach nicht durch Rauschen zustande kommen, sondern durch die Parallelnervatur des Weizenblattes [Rav06]/[Rot01]/[Uen06]. Dies wird auch durch die Symmetrie der Kurve um das absolute Maximum (entsprechend dem zentralen Leitbündel) deutlich. Außerdem ergab sich anhand der Fluoreszenz-Zählraten, dass die Modulation in den Messkurven den statistischen Rauschpegel (prop. \sqrt{N} , N = Zählrate) deutlich überschreitet.

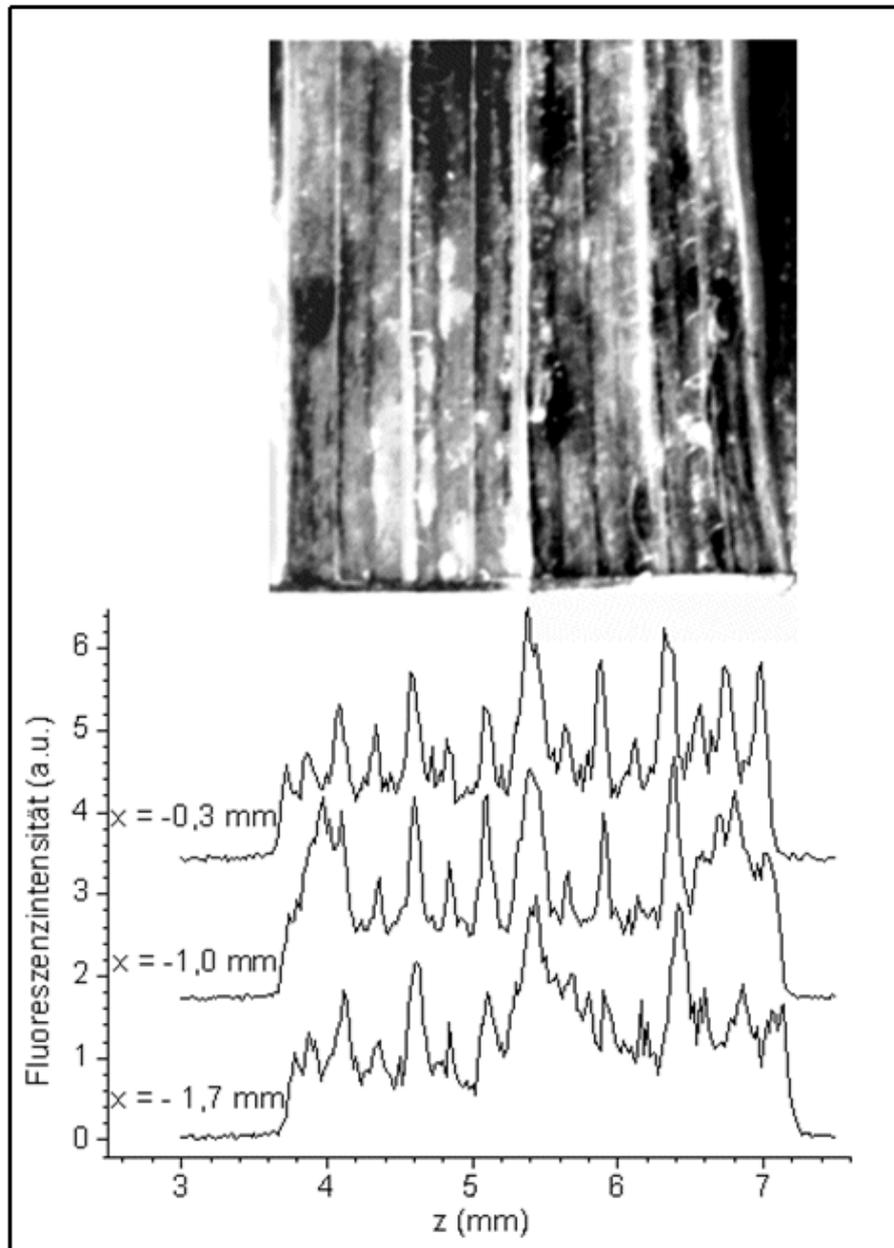


Abb. 4.3: Intensitätsverlauf der Kalium- K_{α} -Linie bei Abtasten eines infizierten Blattes

Drei analoge Messungen der Kalium-Fluoreszenzintensität wurden - erneut senkrecht zur Längsachse des Blattes - an einer pilzbefallenen Probe durchgeführt (Abb. 4.3). Eine der Messungen erfolgte entlang einer Linie ($x = -1$ mm) durch eine am Blattrand gebildete Rostpustel (Position $x = -1$ mm, $z = 4$ mm, linker Blattrand), die beiden übrigen seitlich versetzt ($x = -0,3$ mm und $x = -1,7$ mm). Die Unterschiede zwischen den aufgenommenen Kurven (Abb. 4.3) sind bei der Probenhalterposition $z = 4$ mm am stärksten ausgeprägt und könnten demnach auf eine erhöhte Kalium-Konzentration im Bereich der Rostpusteln hinweisen. Zur Absicherung dieser Aussage ist jedoch eine Schichtdickenänderung zu berücksichtigen, die im Bereich der Rostpusteln zu erwarten ist.

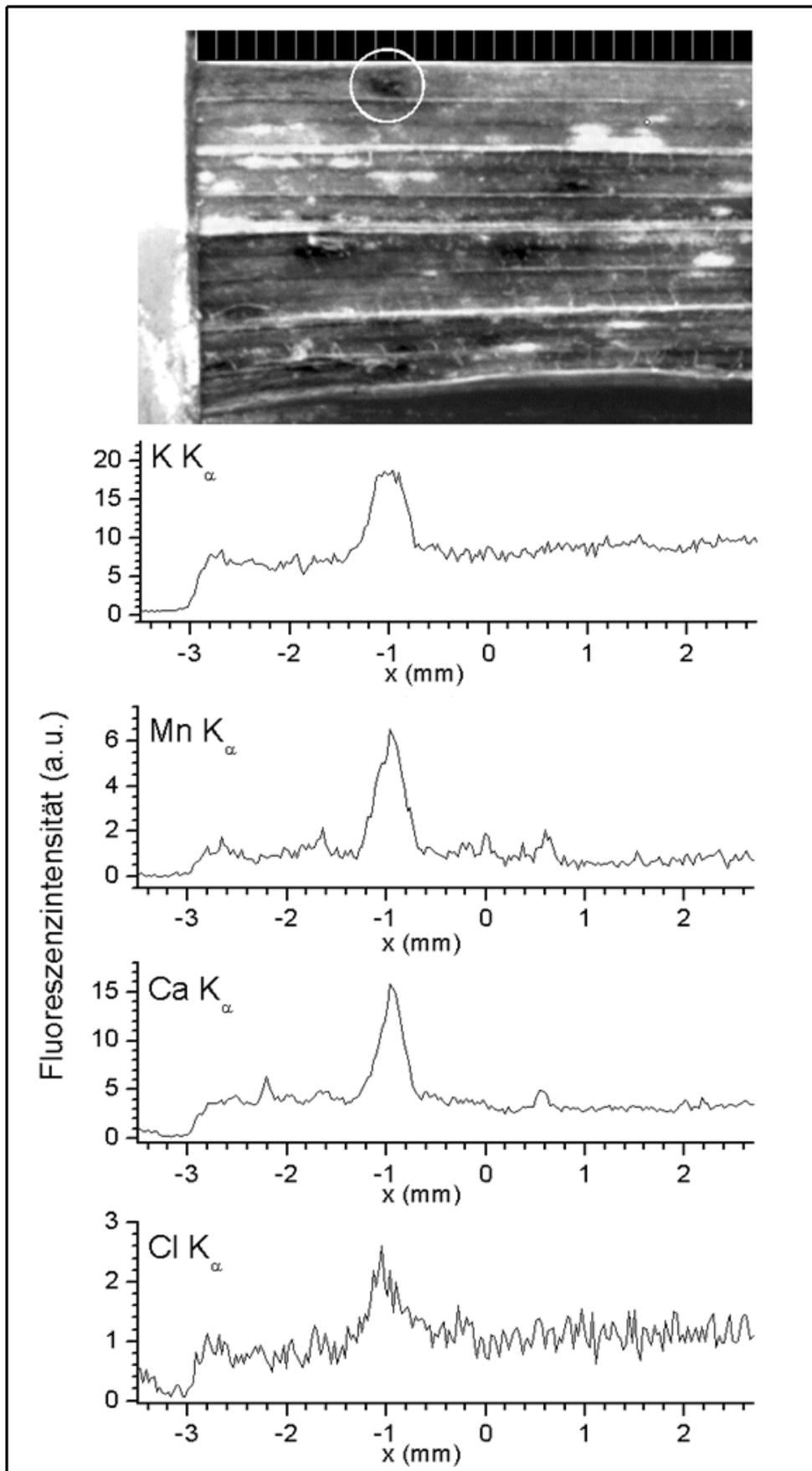


Abb. 4.4: Intensitätsverlauf der K_{α} -Linien von Kalium, Mangan, Kalzium und Chlor

Aufgrund der Leitbündelstrukturen ist es schwierig, die Kurvenverläufe in Abb. 4.3 mit der Position der Rostpusteln auf der Blattoberfläche zu korrelieren. Daher wurde die gleiche Rostpustel anschließend noch parallel zur Längsachse des Blattes (zwischen den Leitbündeln) abgetastet (untersuchte Rostpustel in Abb. 4.4 mit Kreis markiert). Anstiege bzw. Einbrüche der Fluoreszenzintensität beim Überstreichen des Blattrandes mit dem Fokus konnten nun nicht mehr zur Orientierung genutzt werden. Ersatzweise wurde ein Streifen Bleiklebeband verwendet. Die Messergebnisse sind in Abb. 4.4 zusammengefasst. Gegenstand der Analyse (0,2 keV breites Fenster auf die jeweilige Linie zentriert) waren neben der Kalium-Fluoreszenz diesmal auch K_{α} -Emissionen der Elemente Kalzium, Mangan und Chlor.

Abgesehen von dem zu erwartenden abrupten Intensitätsabfall beim Übergang von der Blattoberfläche auf das zur Markierung des Probenbereichs dienende Bleiklebeband weist jede der vier Emissionslinien im Abstand von ca. 2 mm vom Bleiklebeband (entsprechend dem Abstand von der Rostpustel) ein Maximum der Fluoreszenzintensität auf. Beim Übergang vom grünen in den manifest infizierten Probenbereich werden die Fluoreszenzlinien der verschiedenen Elemente individuell verstärkt. Das Verhältnis der K_{α} -Intensitäten im Maximum (Zentrum der Rostpustel) und im Plateaubereich (grünes Umgebungsgewebe) beträgt 2,4:1 für Kalium, etwa 4,6:1 für Kalzium, ca. 7,2:1 für Mangan und für Chlor geschätzt 2:1.

Die horizontale Ausdehnung des sichtbar infizierten Bereichs (Rostpustel) liegt bei 340 μm , die vollen Halbwertsbreiten (FWHM) in Abb. 4.4 betragen 250 bis 400 μm – die Breite der Chlor-Kurve ist wegen des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht einbezogen. Mit der derzeitigen Ortsauflösung der Apparatur (ca. 80 μm) ist folglich eine signifikante Ausdehnung des Bereichs erhöhter Nährelemente-Konzentration über den manifest infizierten Bereich hinaus nicht nachweisbar. Auch liefern die Ergebnisse keine Hinweise auf Nährstoff-Verarmungszonen in der weiteren Umgebung der Rostpustel. Dort treten auch keine merklichen Nebenmaxima der Fluoreszenz auf, die durch eine erhöhte biologische Aktivität an der Grenze zwischen infiziertem und nicht-infiziertem Gewebe erklärbar wären. Zu erwarten wären diese an der Peripherie des Myzels, wo sein Wachstum aufgrund des hohen Nährstoffgehalts im noch nicht besiedelten Gewebe vermutlich am stärksten ist.

Schwache lokale Intensitätsmaxima im Plateaubereich der Kurven sind wahrscheinlich auf Rauschen zurückführbar (niedrige Fluoreszenzzählraten, daher auch Mittelung über je 10 Einzelmessungen). In Betracht kommen auch durch die Blattanatomie bedingte Substrat-Inhomogenitäten, etwa Stomata bzw. dünne transversale Leitbündel, mit denen die longitudinalen Leitbündel quer verbunden sind [Rot01]. Sollte der Beitrag der Sporen zur Fluoreszenz der Rostpustel mit dem des Wirtsgewebes bzw. des Myzels selbst vergleichbar sein oder sollte er gar dominieren, so könnte die Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten auch einfach durch Überlagerung von Sporen- und Wirtsgewebe-Emission erklärbar sein. Die Beantwortung dieser Frage würde XRF-Messungen an isolierten Rostpilzsporen erfordern. Davon abgesehen können auch bei dieser Messreihe die Kurvenmaxima sowohl auf eine erhöhte Konzentration der entsprechenden Elemente als auch auf eine größere Probendicke am Ort der Rostpustel zurückzuführen sein. Sofern die Eindringtiefe der anregenden Strahlung unter den vorliegenden Schichtdicken bleibt, ist dieser Effekt untergeordnet; die simultan mit der Fotodiode aufgenommene Transmissionskurve in Abb. 4.5 spricht allerdings dagegen, dass die Probendicke keine Rolle spielt.

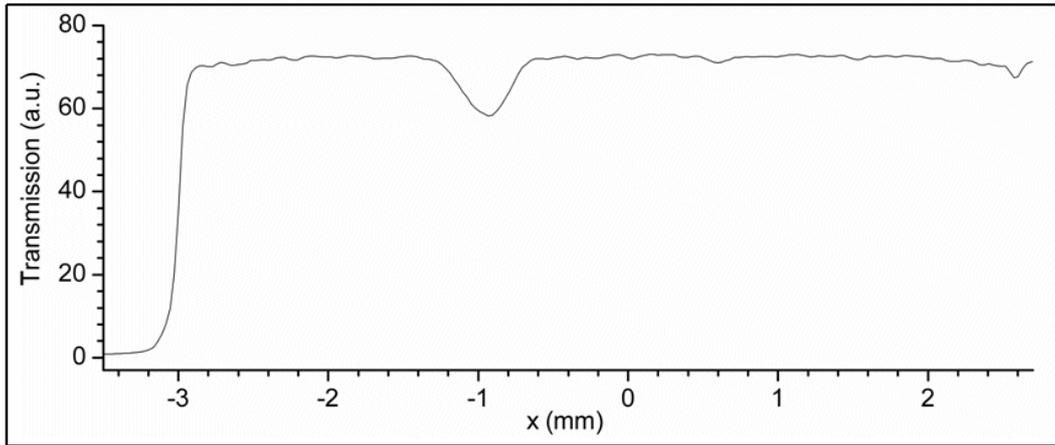


Abb. 4.5: Transmittierte Intensität bei Abtasten der Probe aus Abb. 4.4

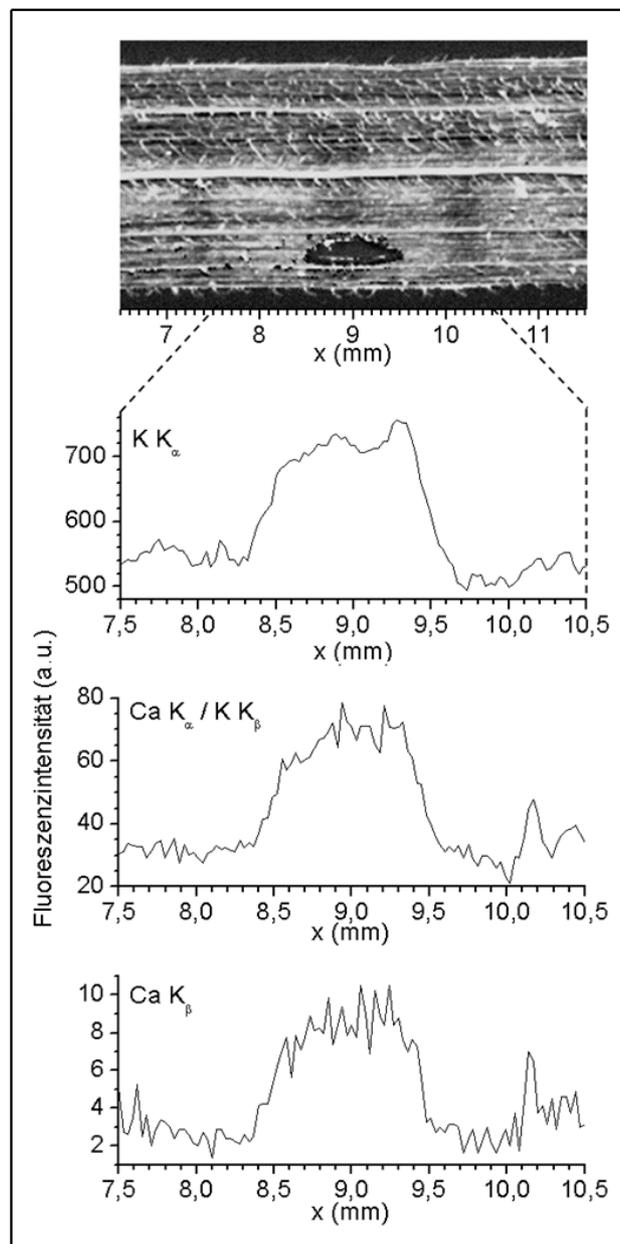


Abb. 4.6: XRF-Messungen bei einer Anregungsenergie von 5,5 keV

Abb. 4.6 zeigt Ergebnisse analoger XRF-Messungen, die nach Inbetriebnahme der neuen Vakuumkammer an einem anderen rostpilzbefallenen Weizenblatt in der unmittelbaren Umgebung einer Rostpustel durchgeführt wurden. Da die Kalzium- K_{α} -Linie mit der Kalium- K_{β} -Linie überlappt, wurde diesmal auch eine Messung mit einem auf die Kalzium- K_{β} -Linie zentrierten Fenster durchgeführt.

Zwei Serien von Emissionsspektren, gemessen bei Anregungsenergien von 6,8 keV (Abb. 4.7 bis 4.9, Probe aus Abb. 4.4) bzw. 5,5 keV (Abb. 4.10, Probe aus Abb. 4.6) sind mit den bisher diskutierten Befunden im Einklang: Bei den Rostpusteln sind die K_{α} -Emissionen der Elemente Kalium (in geringerem Maße), Kalzium (in weit stärkerem Maße) und Mangan deutlich intensiver als in der unmittelbaren Nachbarschaft (grüne Bereiche), während die Chlor-Fluoreszenz (zumindest in den Spektren in Abb. 4.10) konstant bleibt - entgegen den Ergebnissen der Messkurven aus Abb. 4.4, die aber auch sehr verrauscht sind. Die Spektren in den Abb. 4.7 bis 4.9 wurden auf die Argon- K_{α} -Linie normiert. Die Spektren in Abb. 4.10 wurden mangels Argon-Emission (leergepumpte Kammer, um Fluoreszenzintensität zu maximieren) auf den Ringstrom normiert.

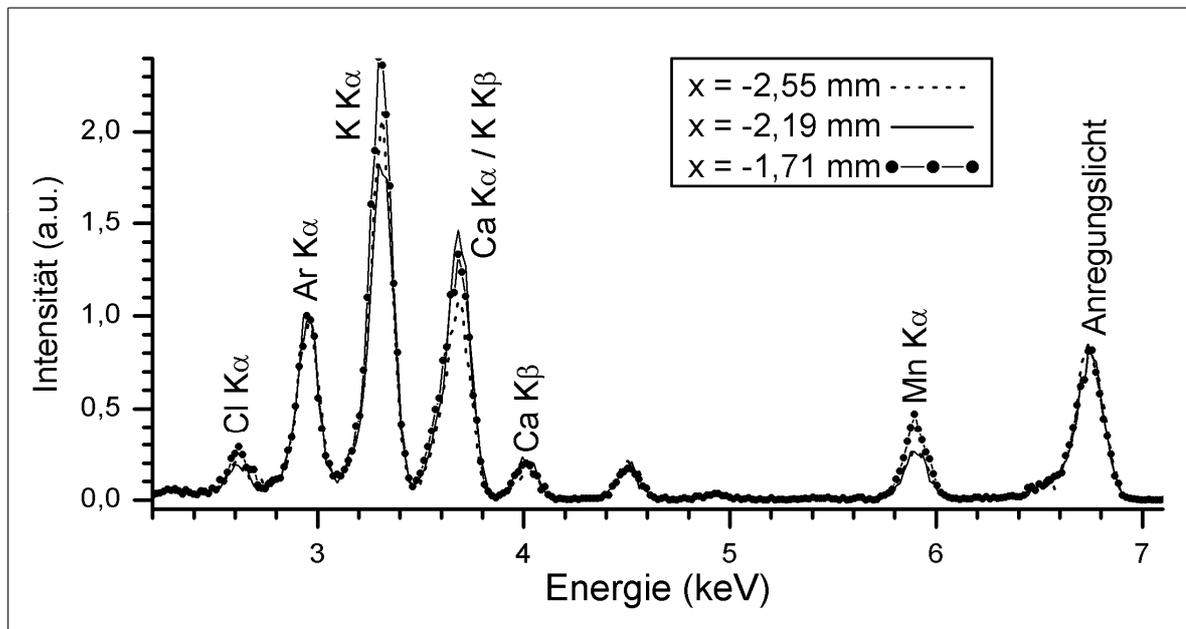


Abb. 4.7: Lokale Emissionsspektren I bei einer Anregungsenergie von 6,8 keV

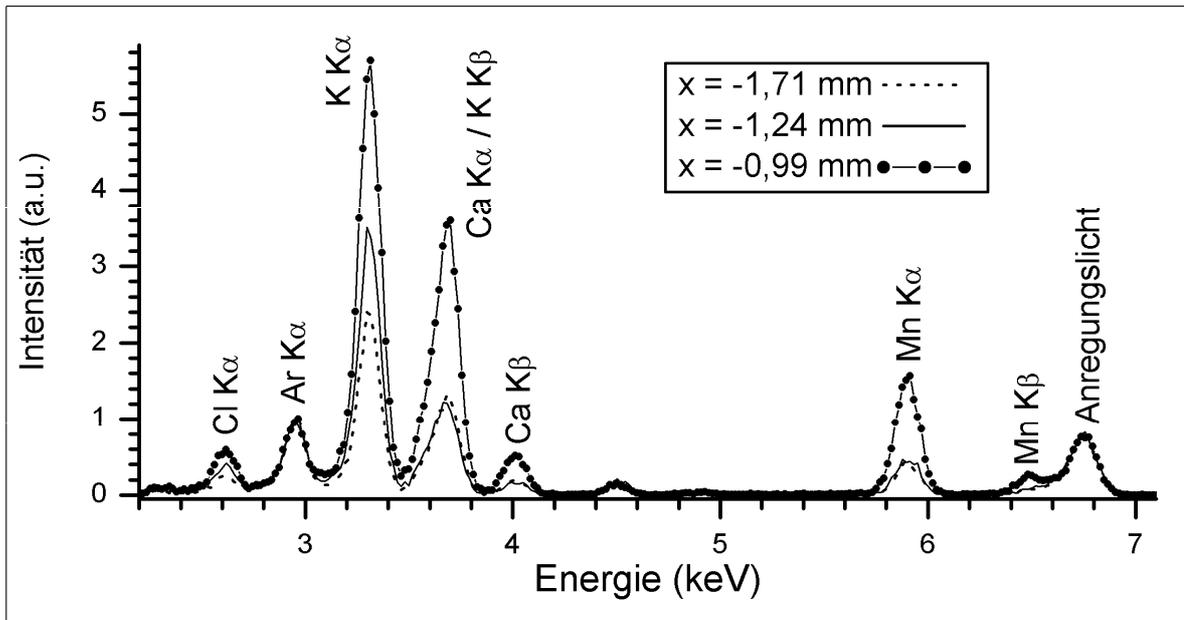


Abb. 4.8: Lokale Emissionsspektren II bei einer Anregungsenergie von 6,8 keV

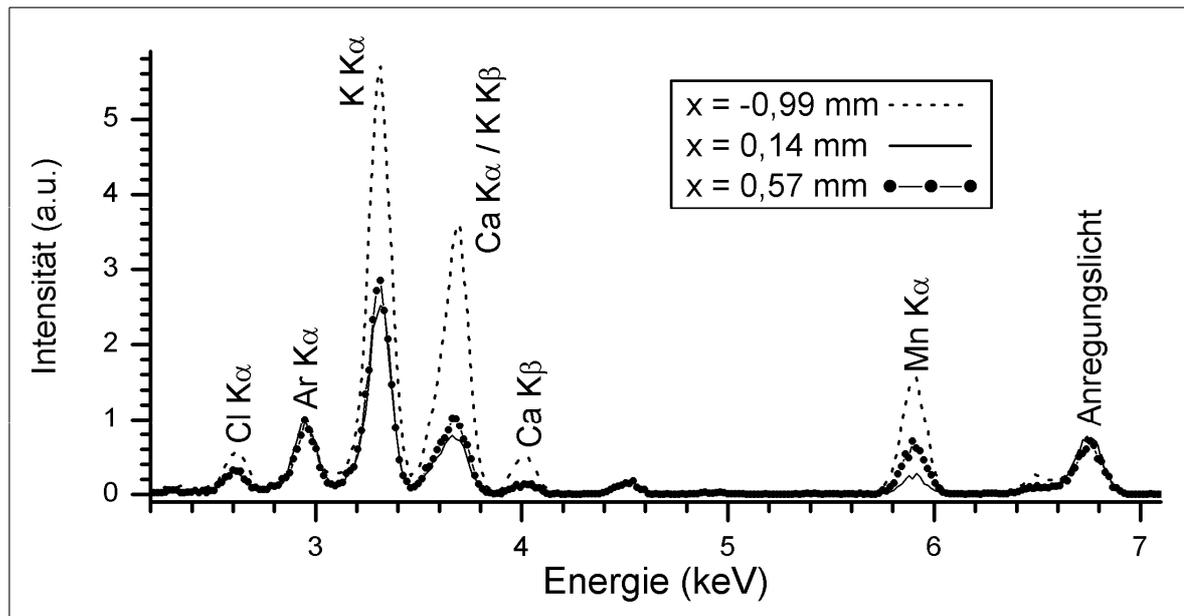


Abb. 4.9: Lokale Emissionsspektren III bei einer Anregungsenergie von 6,8 keV

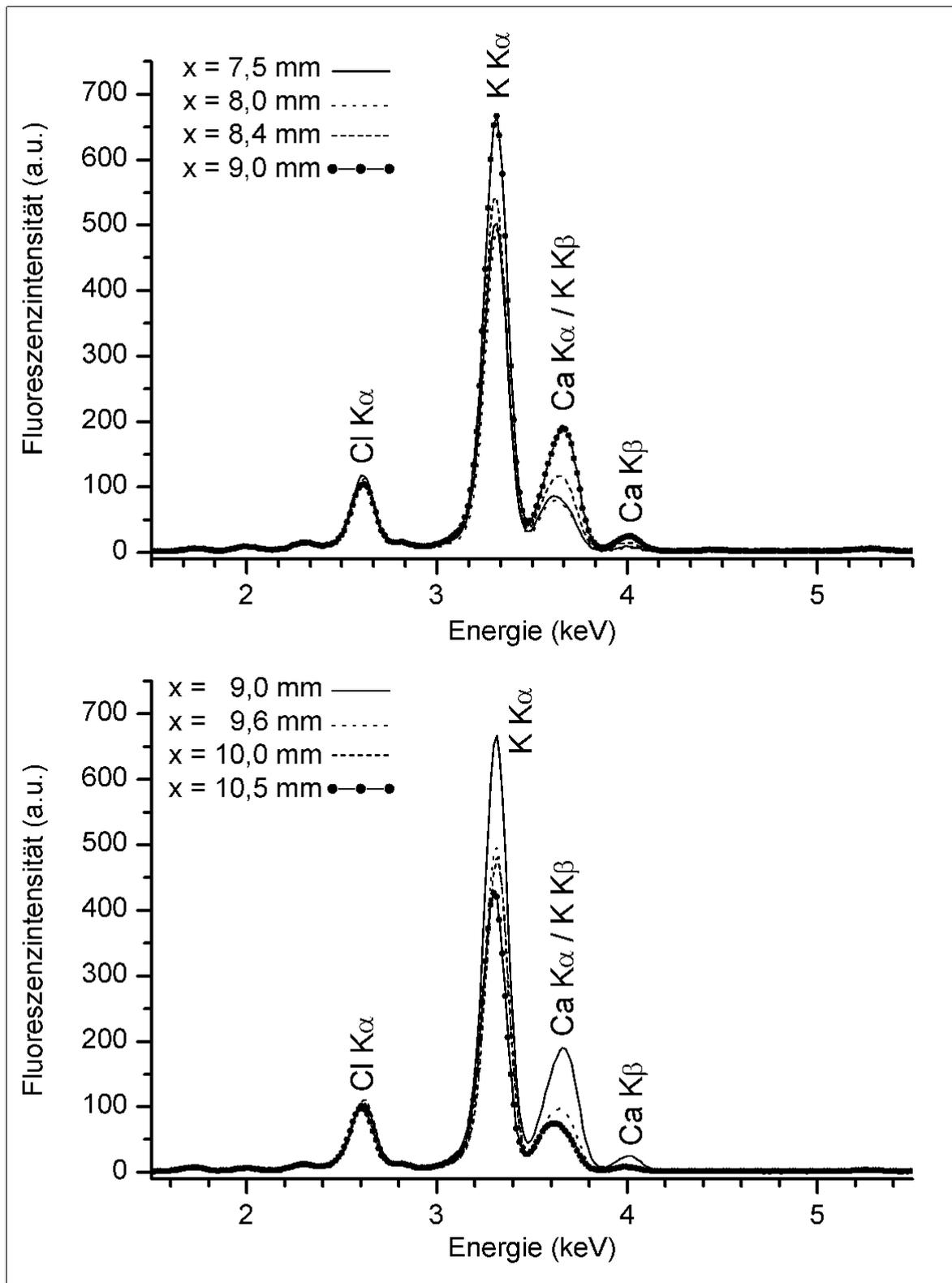


Abb. 4.10: Serie von Emissionsspektren bei einer Anregungsenergie von 5,5 keV (Probe: siehe Abb. 4.6, Rostpustel bei Position $x = 9$ mm)

4.3 Schwefel-K-XANES-Messungen

Abb. 4.11 zeigt zwei Oberflächenausschnitte eines rostpilzbefallenen Weizenblattes. Die während der XANES-Messungen mit dem fokussierten Strahl belichteten Stellen sind durch Kreise markiert. Innerhalb des ersten Ausschnitts wurde an vier Stellen gemessen (je zweimal im Zentrum einer Rostpustel und in einem grünen Bereich), innerhalb des zweiten Ausschnitts an zwei Stellen.

Alle Spektren dieser Messreihe (Abb. 4.12) weisen drei lokale Absorptionsmaxima auf: Eine Whiteline bei 2472 eV (zurückzuführen auf Cystein- bzw. Methionin-Reste, C-S-H, C-S-C in Proteinen), eine Sulfoxidstruktur bei 2475 eV und ein lokales Maximum bei 2481 eV, das sulfathaltigen Verbindungen zugeordnet werden kann. In den Spektren der Rostpusteln ist die Sulfat-Struktur intensiver als die Whiteline, in den Spektren der nicht sichtbar infizierten Regionen ist das Gegenteil der Fall. Die schwächere Whiteline im Spektrum der Sori weist auf eine Verringerung der Konzentration 'nullwertiger' Schwefelspezies in diesem Bereich hin. Die Struktur mit Maximum bei 2481 eV fällt in den Spektren der gesunden Blattregionen breiter aus, was auf einen höheren Cysteinsäure-Beitrag hinweisen könnte.

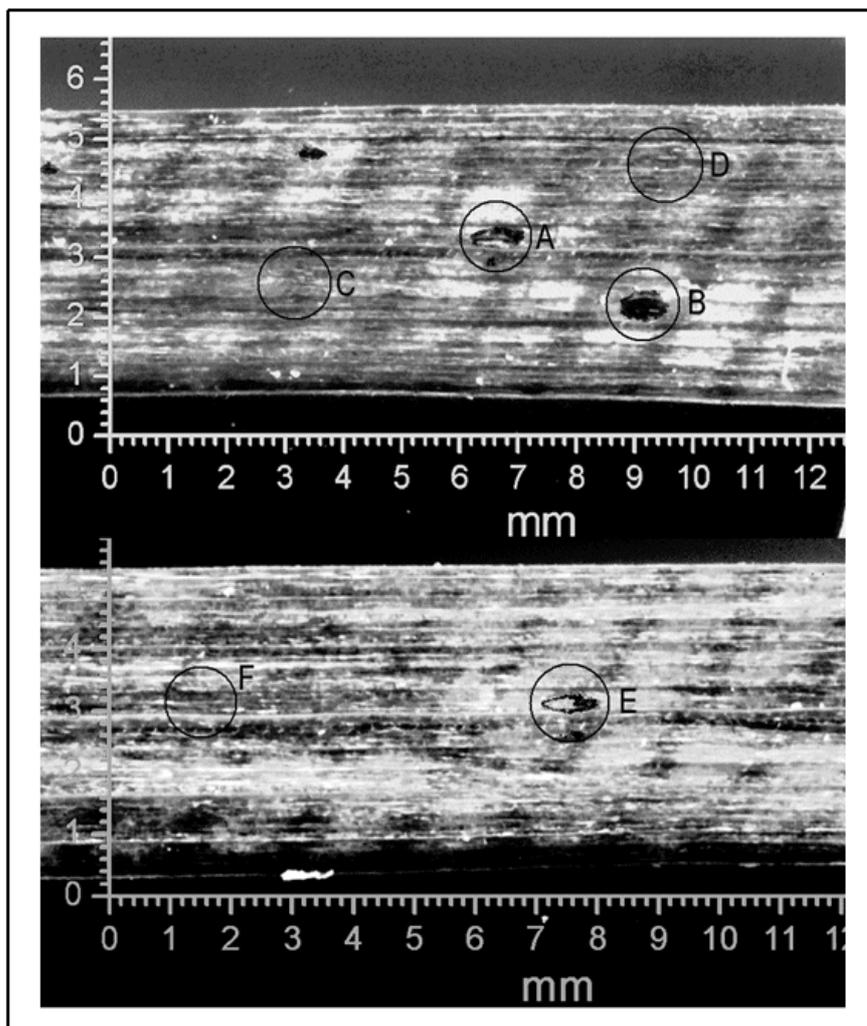


Abb. 4.11: Rostpilzbefallenes Weizenblatt. Punkte, an denen XANES-Spektren gemessen wurden, sind durch Kreise markiert (A/B/E: Rostpusteln, C/D/F: grüne Blattregionen)

Diese Beobachtungen werden durch eine quantitative Analyse bestätigt, deren Ergebnisse in Tab. 4.1 zusammengefasst sind. Als Referenzspektren wurden XANES-Spektren von reduziertem Glutathion, Methionin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Cysteinsäure und Zinksulfat verwendet. Hinsichtlich der Konzentration an Cysteinsäure sind anhand der Ergebnisse in Tab. 4.1 deutliche Unterschiede zwischen Rostpusteln und gesunden Blattregionen erkennbar. Die einzelnen Differenzen sind zwar für sich genommen nicht signifikant (da unter 10 %), zeigen jedoch abgesehen von Punkt D die gleiche Tendenz. Der wichtigste Tabellenbefund besteht jedoch darin, dass innerhalb manifest infizierter Bereiche die Konzentration an Sulfatverbindungen rund doppelt so hoch wie in grünen Blattregionen ist. Bei den sporulierenden Sori treten demnach signifikante Sulfat-Akkumulationen auf.

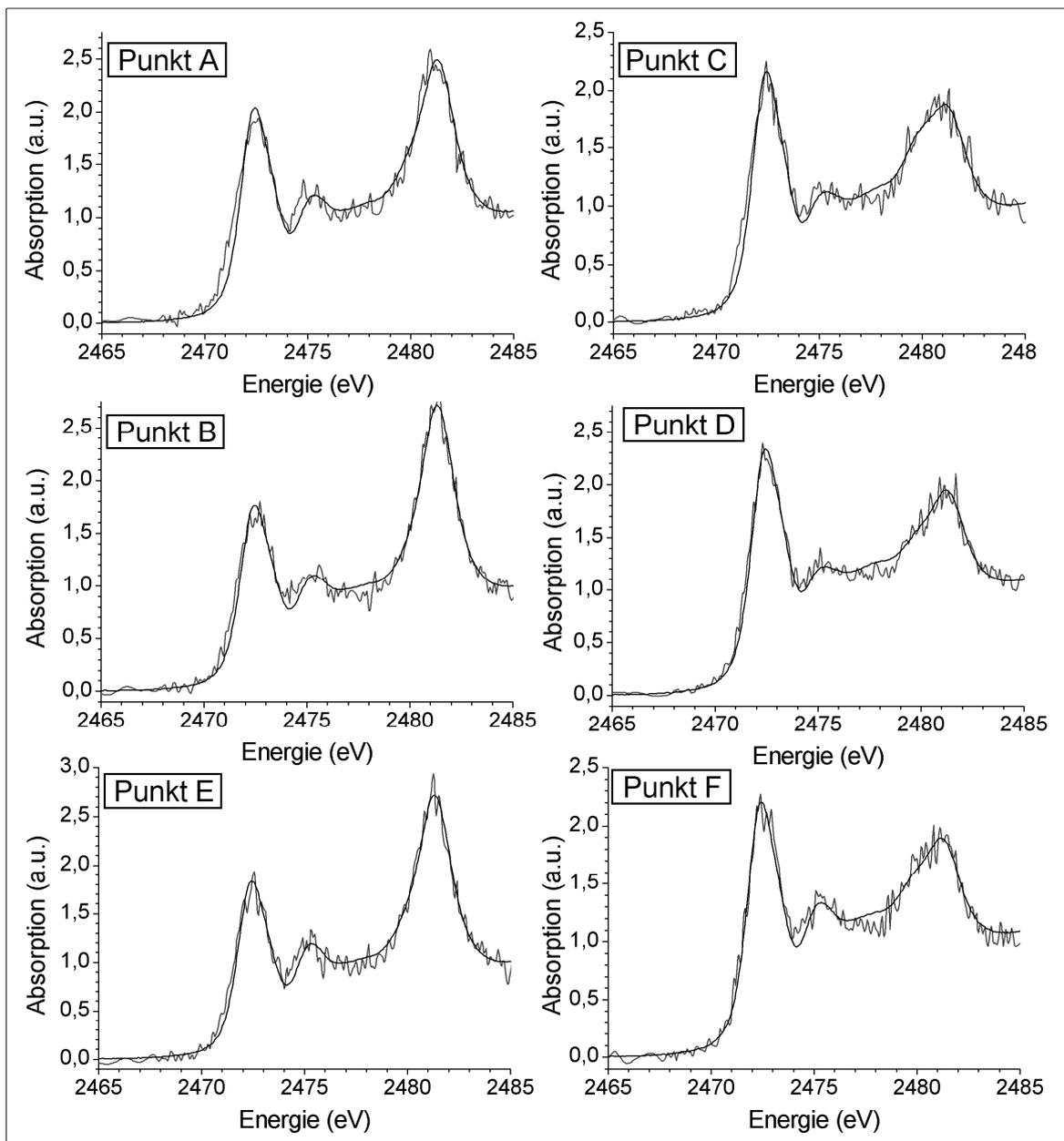


Abb. 4.12: Graue Kurven: Schwefel-K-XANES-Spektren verschiedener Blattregionen (Punkte A/B/E: Rostpusteln; Punkte C/D/F: grüne Bereiche – siehe Abb. 4.11 - schwarze Kurven: Linearkombination von Referenzspektren)

Tab. 4.1: Ergebnisse einer quantitativen Analyse der gemessenen Spektren (siehe Abb. 4.12)
(Koeffizienten der Linearkombinationen – Zahlenangaben in Prozent)

Pos.	red. Glutathion	Methionin	DMSO	Cysteinsäure	Sulfat
B	38	32	3	7	20
E	45	22	5	10	19
A	45	26	3	11	15
F	45	33	3	12	8
C	51	24	0	17	8
D	47	35	0	10	8

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass ein 2,4 keV-Photonen-Strahl in einer 20 µm dicken Wasserschicht auf etwa die Hälfte seiner ursprünglichen Intensität abgeschwächt wird [cxro], woraus die Eindringtiefe in biologischen Proben abgeschätzt werden kann. Im vorliegenden Fall leisten Schwefelatome aus epidermischen Zellen und Mesophyll-Zellen (bis zu einer Tiefe von ca. 50 µm) den größten Beitrag zur Absorption.

Spektrum isolierter Sporen

Die Unterschiede zwischen den Spektren der Rostpusteln und denen der grünen Bereiche könnten durchaus auf biochemische Wechselwirkungen zwischen Pilz und Wirtsgewebe zurück zu führen sein. Solche Unterschiede wären jedoch auch zu beobachten, wenn das Fluoreszenzsignal des manifest infizierten Blattgewebes zu einem beträchtlichen Teil von den

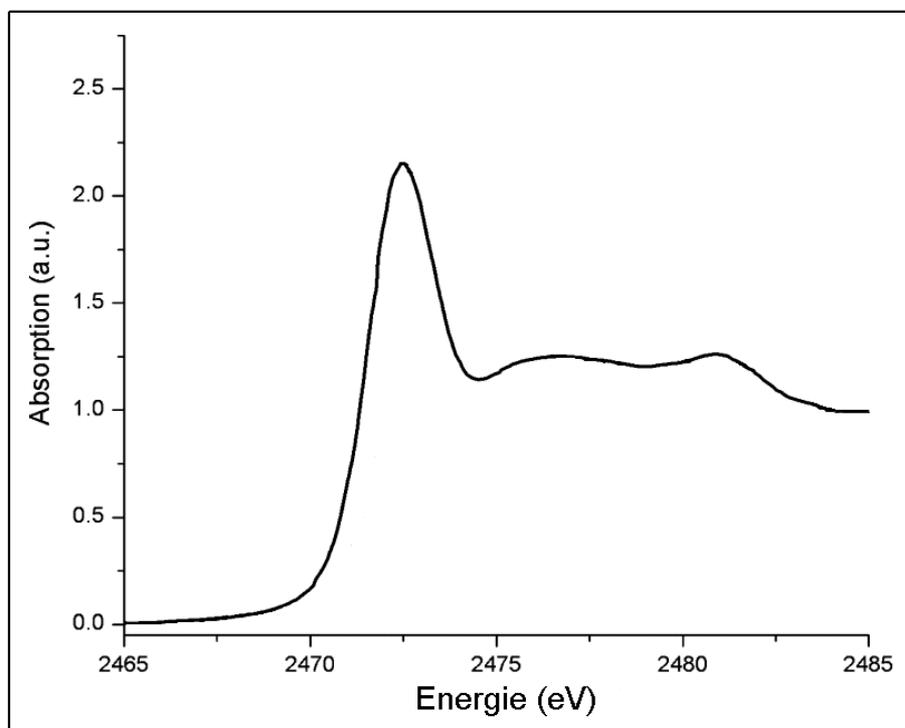


Abb. 4.13: Spektrum isolierter Uredosporen, modifiziert aus [Pra05]

Pilzsporen selbst herrührt und Sulfat als Schwefel-Spezies in den Sporen dominiert. Eine Interpretation der Unterschiede zwischen den Spektren von grünen Blattregionen und von Rostpusteln (bzw. auch Pilzstrukturen im Wirtsgewebe) wird also durch etwaige Beiträge isolierter Sporen auf der intakten Blattoberfläche erschwert. Sollten die Sporen selbst eine hohe Konzentration an Sulfat aufweisen, so könnte eine Überlagerung von Signalen des gesunden Blattes und der Sporen für die Sulfat-Struktur im Spektrum an der infizierten Stelle ursächlich sein.

Gegen diese Folgerung spricht das Schwefel-K-XANES-Spektrum der isolierten Uredosporen des Pilzes in Abb. 4.13 (aus [Pra05] übernommen, modifiziert), das allenfalls geringfügige Sulfat-Beiträge aufweist. Das Spektrum isolierter Uredosporen unterscheidet sich sowohl von dem gesunder Blattregionen als auch von dem der Sori erheblich. Die im Vergleich zum grünen Umgebungsgewebe deutlich höhere Sulfatkonzentration im Bereich der Rostpusteln rührt also von einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Pilz und Wirt her. Es ist von einem signifikanten Einfluss des biotrophen Pathogens auf den Schwefelmetabolismus der Pflanze auszugehen.

Die Messungen an isolierten Sporen konnten im Rahmen dieser Arbeit wegen des problematischen Probenmaterial-Transports in den USA nicht noch einmal wiederholt werden.

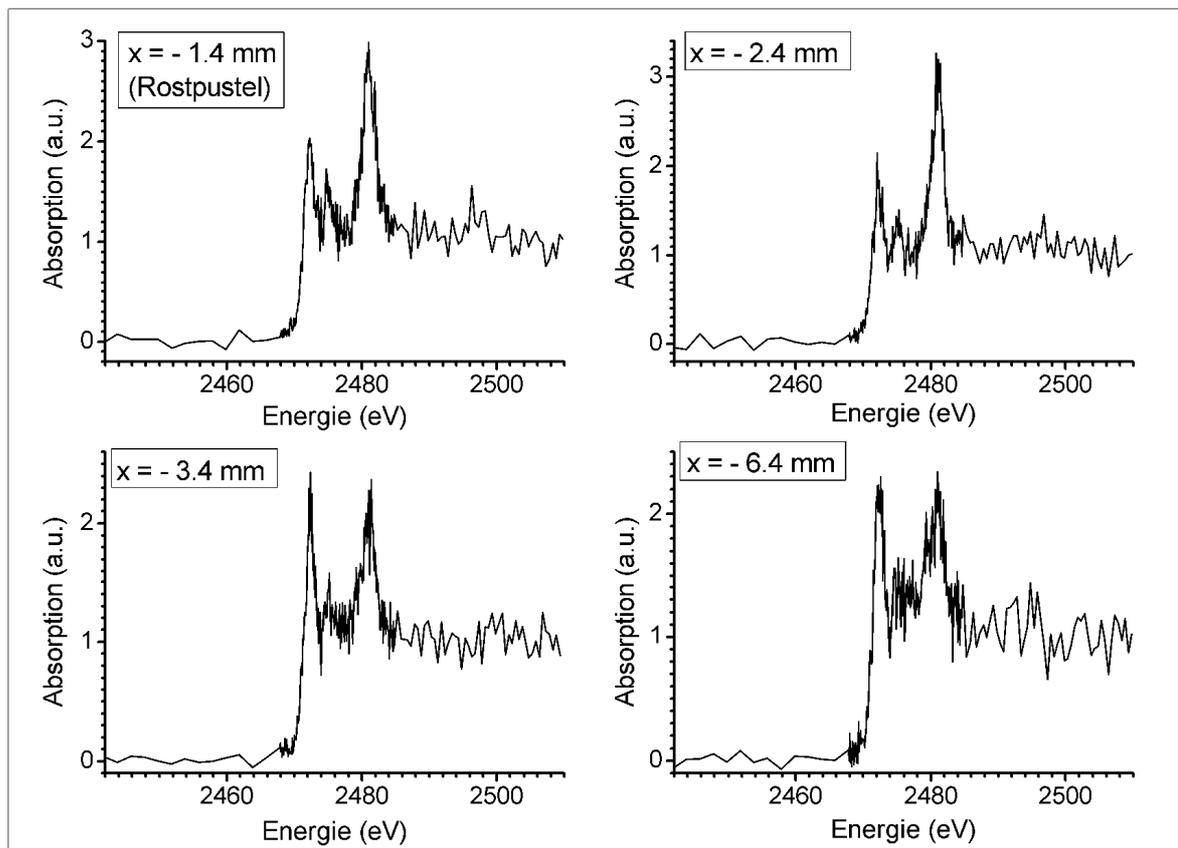


Abb. 4.14: XANES-Spektren bei verschiedenen Abständen zu Rostpustel E (in Abb. 4.11)

Räumliche Ausdehnung der Pilzkolonie

Prange et al. [Pra05] haben die Ausdehnung einer Rostpilzkolonie auf einem Weizenblatt anhand von Mikroskopaufnahmen untersucht. Die Fläche der Sori variierte zwischen $100\ \mu\text{m} \times 350\ \mu\text{m}$ und $180\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$. Mikroskopische Untersuchungen zeigten weiter, dass die Blätter in der Umgebung der makroskopisch sichtbaren Pusteln von intrazellulären Hyphen des Pilzes durchsetzt waren, die Mesophyll- und Epidermis-Zellen mit Haustorien befielen. Dieser Bereich hatte einen Durchmesser von $800\text{-}1500\ \mu\text{m}$, d. h. die räumliche Ausdehnung der Pilzkolonie im Blattgewebe war in allen Richtungen um $400\text{-}500\ \mu\text{m}$ größer als die der sichtbaren Sori. Auch im symptomfrei befallenen Bereich waren in den epidermischen Zellen bzw. im Mesophyll Pilzstrukturen mit Haustorien vorhanden [Pra05].

Abb. 4.14 zeigt in verschiedenen Abständen von der Rostpustel E (siehe Abb. 4.11) gemessene Schwefel-K-XANES-Spektren. Die Spektren wurden, um die Messzeit zu verkürzen, mit modifizierten Messparametern aufgenommen (größere Schrittweiten, kürzere Integrationszeiten, kleineres Messintervall). Bei der Probenhalterposition $x = -1,4\ \text{mm}$ war der fokussierte Strahl auf die Mitte der Rostpustel zentriert. In den Spektren, die bei den Probenhalterpositionen $x = -4,4\ \text{mm}$ und $x = -5,4\ \text{mm}$ registriert wurden (nicht mehrfach gemessen – daher sind die Kurven verrauscht und deshalb nicht in Abb. 4.14 aufgenommen), waren die Intensitätsverhältnisse zwischen Sulfat-Maximum und Whiteline vergleichbar mit denen bei den Probenhalterpositionen $x = -3,4\ \text{mm}$ und $x = -6,4\ \text{mm}$. Bis zu einer Entfernung von $1\ \text{mm}$ zur Rostpustel dominiert eindeutig noch die Sulfat-Struktur. Der Übergang zu typischen Spektren gesunder Blattregionen vollzieht sich demzufolge in 1 bis $2\ \text{mm}$ Abstand vom Zentrum der Rostpustel (Durchmesser ca. $1\ \text{mm}$). Diese Messreihe verdeutlicht die Ausdehnung des Pilzeinflusses über den sichtbar infizierten Bereich hinaus. Ein im Vergleich zu gesunden Blattregionen höherer Sulfat-Gehalt ist also auch im symptomfrei infizierten Bereich messbar und wie schon erläutert wahrscheinlich auf Pilzstrukturen im Mesophyll (bzw. auf Haustorien in epidermischen Zellen) zurückzuführen.

Abb. 4.15 gibt die Ergebnisse von Messungen an der Phosphor- und Kalium-K-Kante wieder (Rostpustel B in Abb. 4.11). Diese Messungen dienten lediglich der Orientierung. Es wird aber deutlich, dass mit der Mikrosonde am XMP-Strahlrohr durchaus Spektren an den Absorptionskanten dieser Elemente in akzeptabler Qualität messbar sind.

Die Ergebnisse der Messungen an der Schwefel-K-Kante zeigen am biologischen System 'rostpilzbefallene Weizenblätter', dass Veränderungen im Schwefelmetabolismus aufgrund der Reaktion der Wirtspflanze auf das Pathogen mittels ortsauflösender XANES-Spektroskopie lokalisiert und charakterisiert werden können. Durch die Experimente konnten signifikante Modifikationen in der Schwefel-Speziation infolge der Wechselwirkung zwischen *P. triticina* und Weizenblättern nachgewiesen werden. Die (aus den Messungen hervorgehende) lokale Anreicherung von Sulfat in der vom Rostpilz befallenen Region ist nicht durch schlichte Überlagerung der Spektren von Pilzsporen und Blatt erklärbar.

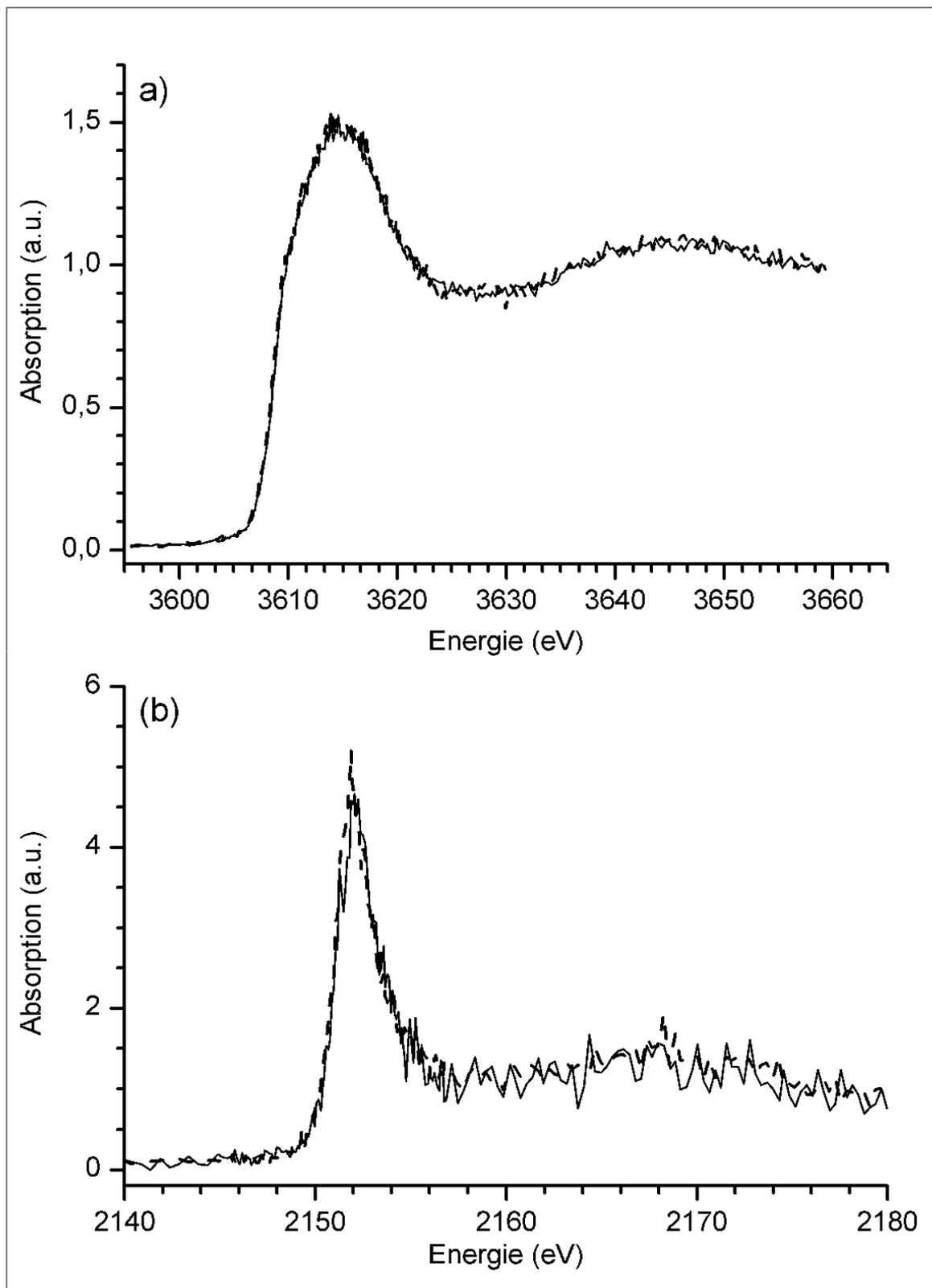


Abb. 4.15: XANES-Spektren eines Weizenblattes (Probe: s. Abb. 4.11)
 a) Kalium-K-Kante (durchgezogene Linie: Rostpustel B, gepunktet: grüner Bereich)
 b) Phosphor-K-Kante (durchgezogene Linie: Rostpustel B, gepunktet: grüner Bereich)

Anhand dieser Messungen wird ein erheblicher Einfluss des biotrophen Pilzes auf den Schwefelmetabolismus der Wirtspflanze und die 'sink activity' (Saugwirkung, d. h. gerichteter Nährstofftransport von Pflanzenzellen in den Pilz) der Haustorien-bildenden Pathogene deutlich.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der hier verwendeten Apparatur eine zerstörungsfreie Untersuchung ('in situ') von durch Pilz-Pathogenese hervorgerufenen Inhomogenitäten der räumlichen Verteilung unterschiedlicher Schwefelspeziationen in den Pflanzenblättern möglich ist. Anhand der Messergebnisse wird das Potential ortsauflösender XANES-Spektroskopie für Fragestellungen aus dem Bereich der Phytopathologie bzw. für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen biotrophen Organismen und Wirtspflanzen deutlich.

Da es sich um reale Proben mit individueller Variation handelt und nicht um Modellsubstanzen, wie sie sonst häufig in der Physik verwendet werden, ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse begrenzt. Dies betrifft sowohl die Konzentrationsverhältnisse als auch die räumliche Ausdehnung der vom Pilz beeinflussten Blattregionen. Erschwerend bei der Interpretation der Messergebnisse wirken sich die durch die Blattanatomie (insbesondere die Spaltöffnungen und Leitbündel) gegebenen Substrat-Inhomogenitäten aus.

Es ist davon auszugehen, dass das Myzel einen Beitrag zu den Ergebnissen liefert, der mit dem des Wirtsgewebes vergleichbar ist. Dies ist allerdings experimentell nicht zu überprüfen, da Rostpilze nicht isoliert, sondern ausschließlich im Wirtsgewebe wachsen.

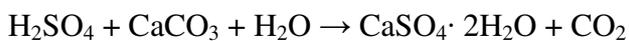
Die Klärung des genauen Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Wirtspflanze und Pathogen kann hier nicht erfolgen, da es sich um eine tiefer gehende nicht-physikalische Fragestellung handelt. Sie lässt sich nur unter Nutzung biochemischer und molekularbiologischer Techniken interpretieren.

5 Schwefelspeziation in mikrobiellen Matten aus sulfidischen Höhlenquellen

5.1 Herkunft und Charakterisierung der Proben

Die hier untersuchten Proben stammen aus den 'Lower Kane Caves' (LKC) im US-Bundesstaat Wyoming und den Frasassi-Höhlen in Italien ('Frasassi Caves', FC). In beide Höhlensysteme strömt H₂S-reiches Grundwasser aus verschiedenen Quellen [Ben05]/[Vla00]. In Abb. 5.1 und 5.2 sind die Höhlenabschnitte markiert, aus denen die hier untersuchten mikrobiellen Matten stammen (Kürzel für LKC-Proben: FS='Fissure Spring', US='Upper Spring'; für FC-Proben: RS='Ramo Sulfureo', PC='Pozzo di Cristalli', GB='Grotta Bella').

Als hauptverantwortlich für die fortdauernde Vergrößerung beider Höhlensysteme gilt Schwefelsäure, die den Kalkstein (CaCO₃) angreift:



Der dabei gebildete Gips (CaSO₄) löst sich in den Höhlengewässern und wird abtransportiert. Für die Schwefelsäurebildung aus H₂S im Quellwasser werden hauptsächlich schwefeloxidierende Bakterien verantwortlich gemacht [Ben05]/[Vla00]. Summers-Engel et al. zeigten, dass in den Gewässern der 'Lower Kane Caves' der H₂S-Gehalt stromabwärts in einem nicht allein durch H₂S-Verflüchtigung bzw. Autooxidation erklärbaren Maß abnimmt [Eng04b].

In den Höhlen dient im Wasser gelöstes H₂S als Energiequelle für Mikroorganismen in zusammenhängenden geschichteten Bakteriengesellschaften auf festem Untergrund, sog. mikrobiellen Matten [Ben05]/[Fri02].

Die Oxidation reduzierter anorganischer Schwefelverbindungen wie H₂S wird von phylogenetisch (d. h. vom genetischen Stamm her) unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt, hier als 'Schwefeloxidierer' bezeichnet (engl. 'Sulfur-Oxidizing Bacteria' = SOB). Bei der überwiegenden Mehrheit dieser Bakterien entsteht Sulfat als Endprodukt. Andere Bakterien bilden Zwischenprodukte wie Thiosulfat, Tetrathionat und Elementarschwefel in Schwefelkugeln (engl. 'sulfur globules') [Eng07]/[Can05]/[Pra01]. Die Bildung von Schwefelkugeln und die Assimilation von Schwefel in Biomolekülen (u. a. Proteinen) führen zu einer Speicherung von Schwefel innerhalb der Mikroorganismen, die möglicherweise in Gesteinsaufschlüssen nachweisbar ist. In beiden hier betrachteten Höhlensystemen sind Organismen mit der Fähigkeit zum Metabolisieren von Schwefelkomponenten nachgewiesen worden, sei es als SOB (zahlenmäßig dominierend) oder als Sulfat-Reduzierer (engl. 'Sulfate-Reducing Bacteria' = SRB) [Eng04a]/[Eng03]/[Mac06]/[Reg06], für die insbesondere im anaeroben Milieu des Matteninneren günstige Bedingungen zu erwarten sind. Die Geochemie der Gewässer und die räumliche Verteilung aerober und anaerober Gruppen ermöglichen die Stoffwechsel-Umwandlung von Schwefel im geschlossenen Kreislauf [Ben05].

Die Probennahme sowie ergänzende Untersuchungen an Teilproben (Bestimmung der Gesamtschwefel-Gehalte und Charakterisierung der Bakterien) sowie eine Analyse der Habitat-Bedingungen - in den Höhlengewässern gelöste Stoffe, Temperaturen, pH-Werte - wurden von Prof. Dr. A. Summers-Engel (Department of Geology and Geophysics, Louisiana State University) durchgeführt.

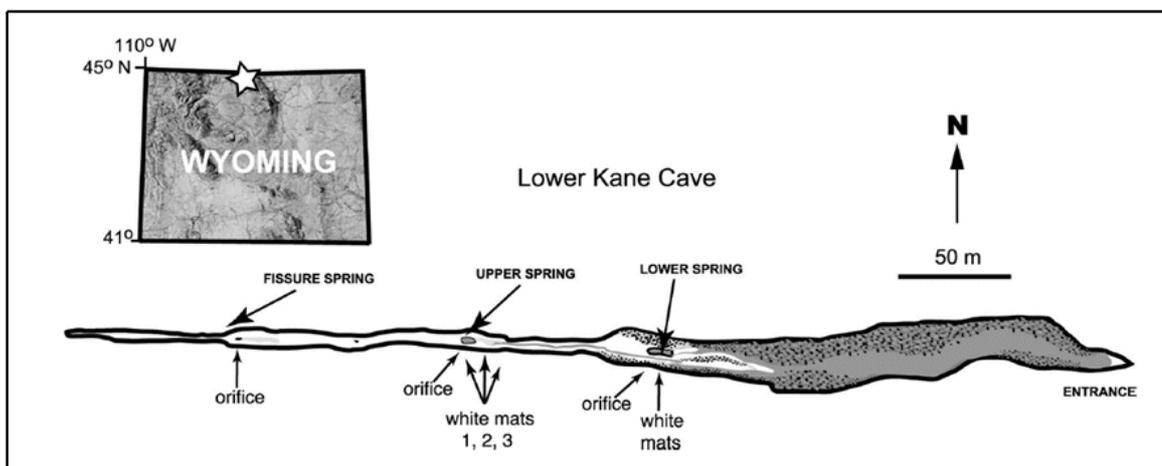


Abb. 5.1: Höhlensystem 'Lower Kane Cave' [Eng03]

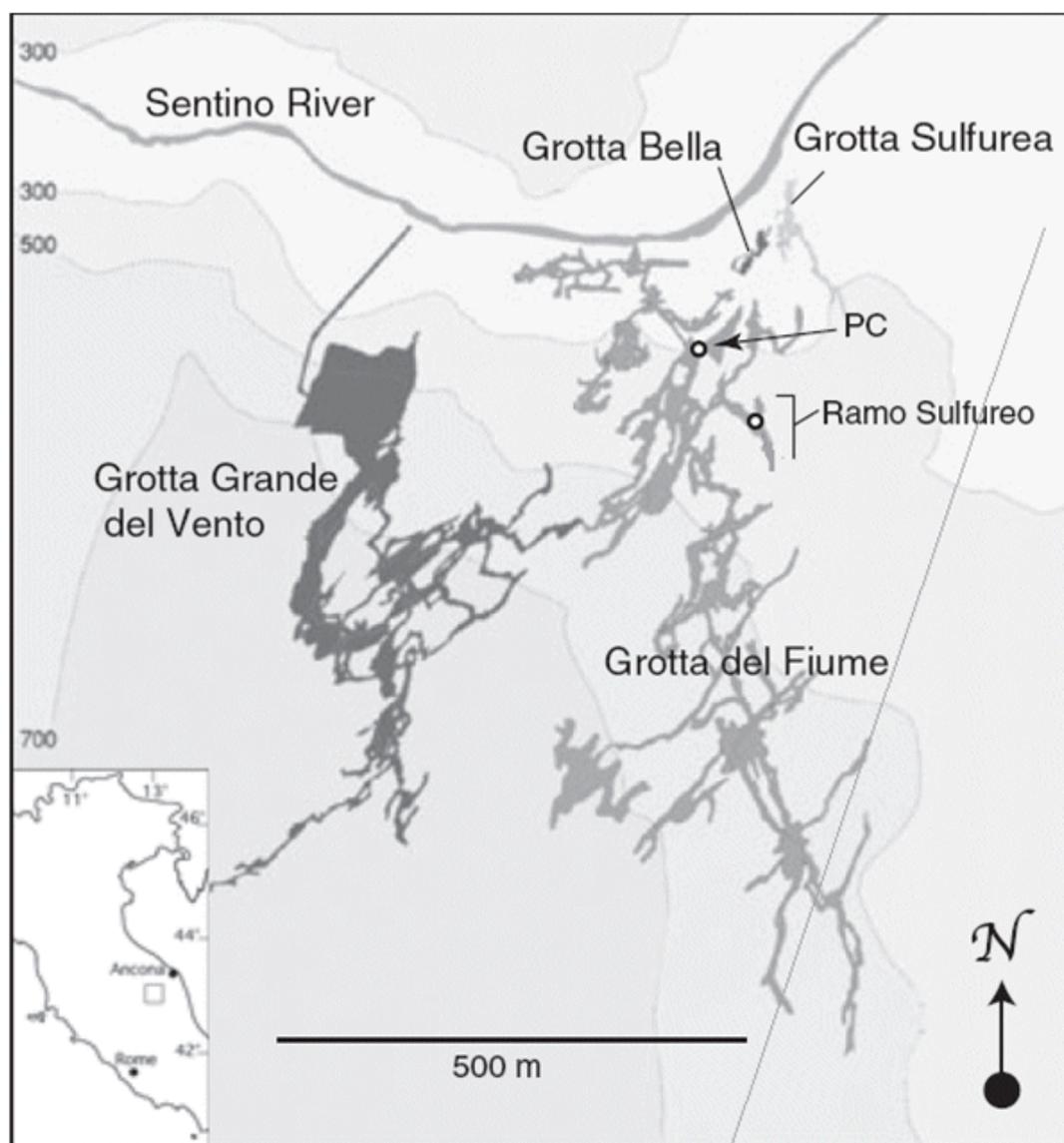


Abb. 5.2: Frasassi-Höhlensystem (PC='Pozzo di Cristalli'), modifiziert aus [Mac07]

Zur Analyse der gelösten Stoffe (gemäß [Eng04a]/[Eng04b]) wurden Wasserproben gezogen. In beiden Höhlen weisen Quell- und Fließwasser geringe Gehalte an gelöstem Sauerstoff auf. Es dominieren Kalzium-, Bikarbonat und Sulfat-Ionen. Die Höhlengewässer sind annähernd pH-neutral (gepuffert durch ständige Lösung von Karbonat [Gal95] [Eng04a]).

Im Probenmaterial wurden Mikroorganismen nachgewiesen, die mit dem Schwefelstoffwechsel in Verbindung stehen, einschließlich Epsilonproteobakterien und Gammaproteobakterien. Diese Gruppen sind bislang noch nicht mittels Schwefel-K-XANES-Spektroskopie untersucht worden. Die phylogenetische Diversität der mikrobiellen Matten ist bereits charakterisiert worden [Eng03]/[Eng04a]/[Mei05]/ [Mac06]/[Reg06].

Die mikrobiellen Lebensgemeinschaften nahe Oberfläche der Matten aus den 'Lower Kane Caves' bestehen aus weißen Faserbündeln, in denen nicht-kultivierte Epsilon-(ϵ)-Proteobakterien, Gamma-(γ)-Proteobakterien (namentlich *Thiothrix spp.*), Beta-(β)-Proteobakterien (einschließlich verschiedener Thiobacilli) dominieren, außerdem aus Delta-(δ)-Proteobakterien-Klassen sowie geringen Vorkommen an Acidobakterien und Bacteroides/Chlorobi.

Die 'grauen' Matten aus den 'Lower Kane Caves' (in den meisten Fällen mit der weißen Mattenkomponente bedeckt) weisen eine vergleichsweise höhere mikrobielle Diversität auf, mit sulfatreduzierenden Bakterien aus der Gruppe der δ -Proteobakterien und Angehörigen des *Chloroflexi*-Stammes.

Ca. 70 % des Biovolumens (vorwiegend aus Bereichen geringen Sauerstoffgehalts) wird von ϵ -Proteobakterien dominiert. Faserbündel aus stromabwärts gelegenen Höhlenabschnitten, in denen eine höhere Konzentration gelösten Sauerstoffs vorliegt, weisen einen niedrigeren Gehalt an ϵ -Proteobakterien auf, aber einen höheren an *Thiothrix spp.* (bis zu etwa 90 % des Biovolumens der Matten).

In den 'weißen' Matten aus den Frasassi-Höhlen sind ebenfalls ϵ -Proteobakterien nachgewiesen worden, außerdem δ -Proteobakterien, 'Bacteroides/Chlorobi', 'Verrucomimicrobia', γ -Proteobakterien (*Thiothrix* und *Beggiatoa spp.*) β -Proteobakterien, *Chloroflexi*, *Plancomycetes* und andere [Reg06]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Untersuchung von Matten aus der Grotta Sulfurea, einem System nahe den RS, PC und GB-Höhlen [Mac06]. Dabei wurde außerdem herausgefunden, dass γ -Proteobakterien, die *Beggiatoa* und/oder *Thiothrix spp.* angehören, in den Proben dominierten, bei niedrigem relativem Gehalt (<15 %) an ϵ -Proteobakterien.

5.2 Wissenschaftliche Bedeutung

Mikrobielle Matten aus sulfidischen Höhlenquellen sind aus den verschiedensten Gründen für die Forschung von Interesse. Die meisten am Schwefelkreislauf beteiligten Umwandlungsprozesse sind entscheidend durch Vorgänge in der Biosphäre bestimmt, insbesondere durch spezielle Stoffwechselprozesse in Mikroorganismen [Sie07]. Das Entschlüsseln der abiotischen (leblosen) und biotischen Umsetzung des Schwefels ist entscheidend für das Verständnis der geochemischen und ökologischen Veränderungen in der Erdgeschichte. Anreicherungen schwefelhaltigen organischen Materials und Gesteins sind zur Interpretation früherer Ver-

änderungen auf der Erde herangezogen worden [Can04]. Untersuchungen mikrobieller Gemeinschaften in sulfidischen Höhlenquellen könnten sich sogar für ein Verständnis der Entwicklungsgeschichte des Mars als hilfreich erweisen [Bos06].

Sulfidische Höhlen sind für Menschen leicht zugängliche, gegenüber Umwelteinflüssen weitgehend abgeschirmte unterirdische Lebensräume, in denen im Vergleich zur Außenwelt seit langer Zeit konstante Habitatbedingungen (Wasser- und Lufttemperaturen etc.) herrschen. Die dort vorherrschenden Bakterien metabolisieren Schwefel unter extremen Umweltbedingungen: Lichtlosigkeit, allenfalls karge Versorgung mit organischen Nährstoffen, insbesondere mit photosynthetisch produzierter organischer Materie, seitens der Außenwelt (z. B. durch Wind, Sickerwasser...), z. T. hohe Pegel toxischer Gase, niedrige Sauerstoffkonzentration und hohe Luftfeuchtigkeit [Eng07]. Diesen Mikroorganismen wird eine große ökologische Bedeutung zugeschrieben [Eng03]. Weiterreichende Kenntnisse hinsichtlich ihres Stoffwechsels könnten hilfreich für künftige Bemühungen sein, diese Bakterien in Kulturen zu züchten.

Mikrobielle Matten aus sulfidischen Höhlenquellen gelten als die einzigen nicht-marinen natürlichen Systeme, in denen die Aktivität von Epsilonproteobakterien erwiesenermaßen die Lebensgrundlage für die lokalen Lebensgemeinschaften ist (quasi als 'erstes Glied der Nahrungskette', Stichwort 'Primärproduktion') [Ben05]. Größere Vorkommen an Epsilonproteobakterien in marinen Umgebungen – einschließlich heißer Tiefseequellen – sind bereits eingehend untersucht worden [Mir04]. Wegen der relativ leichten Zugänglichkeit können in sulfidischen Höhlen diese chemolithotrophen Organismen (ohne Konkurrenz durch photosynthetische Organismen) mit vergleichsweise geringem Aufwand direkt in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden.

Mikrobielle Gemeinschaften in sulfidischen Höhlenquellen haben aufgrund ihres chemolithotrophen Stoffwechsels und ihrer geologischen Bedeutung (Säurebildung, [Vla00]) Aufmerksamkeit erregt. Untersuchungen der Einflüsse mikrobieller Vorgänge auf geologische Prozesse können zu einem besseren Verständnis der Ursachen von zunehmender Porosität bzw. Gesteinsverwitterung in sulfidischen Grundwasser-Systemen verhelfen.

Unterirdische Lebensräume werden zunehmend durch die Außenwelt (Umwelteinflüsse und anthropogene Belastungen) beeinflusst. Ein besseres Verständnis kann ggf. zum Schutz und Erhalt dieser einzigartigen Ökosysteme beitragen [Eng07].

Bakteriengemeinschaften können nicht nur als Biofilme bzw. Mikrobenmatten an Gesteinsoberflächen auftreten und (wie eingangs erwähnt) für eine fortdauernde Vergrößerung von Höhlen und zunehmende Gesteinsporosität verantwortlich sein, sondern auch künstliche Oberflächen wie die Wandungen von Flüssigkeitsbehältern, Schiffsrümpfe und Abwasserkanäle besiedeln und schädigen (siehe z. B. [Die91], Schwefelsäure-Korrosion in Abwassersystemen, verursacht durch Thiobacilli).

Durch die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen an natürlichen mikrobiellen Matten werden die Aktivitäten zur Auswertung mikrobieller Schwefel-‘Fingerprints’ mittels XANES-Spektroskopie (z. B. [Pra99]) ausgeweitet. Zur Charakterisierung und Differenzierung von Schwefelspeichern in reinen Bakterienkulturen sind verschiedene Methoden angewandt worden [Pra99]/[Pra02b]/[Pas01]/[Pic01]. Weitere bereits mittels Schwefel-K-XANES-Spektroskopie untersuchte Systeme sind Huminstoffe aus natürlichen Meeressedimenten

[Vai97] und Proben aus einer hydrothermalen Quelle am Grund der Tiefsee [Lop03]. Verfügbar sind aber lediglich eingeschränkte Analysen der Schwefelspeziation bei in der Natur vorkommenden mikrobiellen Matten, in denen keine 'Monokultur' vorliegt. Aufgrund der in den Höhlen herrschenden Dunkelheit sind keine Überschneidungen mit phototrophen Schwefel-Signaturen zu erwarten.

5.3 Probenpräparation

Die hier untersuchten Proben stammen von ca. 3-10 cm dicken mikrobiellen Matten aus weißen, durch dünne, gewebeartige Biofilme miteinander verbundenen Faserbündeln, die ein gallertartiges weiß-braunes Matteninneres bedecken.

Die Proben wurden in sterilen, nicht-reaktiven, versiegelten Polystyren- oder Polypropylen-Röhrchen aufbewahrt, die unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen bis zu sieben Monate vor Beginn der Untersuchungen bei 4 °C gelagert wurden.

Unmittelbar vor den XANES-Messungen wurde das Nassmaterial jeweils gleichmäßig auf schwefelfreiem Kapton-Klebeband bzw. schwefelfreiem Filterpapier verstrichen. Aufgrund von Erfahrungen mit anderen mikrobiellen Proben [Pra99]/[Pra02b] einschließlich anaerober photosynthetischer Schwefelbakterien sind keine Oxidations-Artefakte infolge Proben-Lagerung oder -Präparation zu erwarten, weil nullwertiger Schwefel über lange Zeiträume relativ stabil bleibt (was bei Polysulfiden nicht zwingend der Fall ist). Im Rahmen einer früheren Messreihe wurde eine natürliche Probe sowohl unter Raumluft als auch in einer 'Glovebox' unter Argon-Atmosphäre präpariert. Die an den beiden Teilproben in Helium-Atmosphäre gemessenen XANES-Spektren unterschieden sich nicht. Die meisten Proben wurden im Transmissionsmodus gemessen, Proben mit niedriger Schwefelkonzentration im Fluoreszenzmodus (unter Helium, siehe Kap. 3).

5.4 Ergebnisse und Diskussion

Für eine quantitative Analyse wurde ein Satz von 5 Referenzspektren verwendet (Ringschwefel = S_8 , Polymerschwefel = S_n , Methioninsulfon = Met- O_2 , Cysteinsäure = Cya und Zinksulfat = SO_4^{2-}), um die atomare Umgebung der Schwefelatome zu repräsentieren, stellvertretend für Elementarschwefel (Ring- und Polymerschwefel) und für Verbindungen mit Schwefel-Sauerstoff-Gruppen.

Abb. 5.3 und 5.4 zeigen die gemessenen XANES-Spektren und zugehörige Fit-Kurven, in Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse (prozentuale Beiträge) zusammengefasst.

Obwohl die Konzentration an gelöstem Eisen in den betreffenden Höhlengewässern laut Analysen von Prof. Dr. A. Summers-Engel unter 0,01 mmol/l betrug, war bei der Analyse der Spektren ein möglicherweise hoher Gehalt an Mineralien (z. B. an Pyrit) in den grauen Matten zu berücksichtigen. Die letztlich verwendeten nicht-sulfidischen Referenzsubstanzen lieferten jedoch bessere XANES-Fitergebnisse für die grauen Matten (zugehörige Kurven hier

nicht gezeigt) als diverse versuchsweise eingesetzte Sulfid-Referenzspektren. In den XANES-Spektren schwefelhaltiger Mineralien wie Pyrit findet sich die Schwefel-K-Whiteline bei wesentlich niedrigeren Energien als in den Spektren der hier untersuchten Proben [Kat98].

In den meisten Fällen, insbesondere bei den weißen Matten, konnte die Güte des Fits durch Einbeziehen eines Methionin-Referenzspektrums - als Repräsentant für Monosulfane (Verbindungen mit C-S-C-Bindungen) - verbessert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Hierbei verschob sich das $S_8:S_\mu$ -Verhältnis geringfügig zugunsten des S_μ -Gehalts. Frühere Untersuchungen an reinen Kulturen (z. B. [Pra99]) legen die Vermutung nahe, dass Monosulfan-Beiträge zur Absorption auf Schwefelatome in Proteinen zurückzuführen sind. Da jedoch in Proteinen die Schwefelatome in geringerer Dichte vorliegen als in bakteriellen Elementarschwefel-Speichern, sollten diese Beiträge eine untergeordnete Rolle spielen. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einigen der hier untersuchten Proben nennenswerte Konzentrationen (ca. 10 %) an Monosulfan-Verbindungen vorliegen, jedoch ist deren Ursprung nicht geklärt.

Bei der Wahl von Referenzspektren für quantitative Analysen wird stets von Annahmen bzgl. der voraussichtlichen chemischen Zusammensetzung der Proben ausgegangen. Grundsätzlich können bei quantitativen Analysen auch Sätze von Referenzspektren, deren Anwendung auf das betreffende Probensystem nicht gerechtfertigt ist, akzeptable Ergebnisse liefern (d. h. niedrige χ^2 -Werte), z. B. dann, wenn es als extrem unwahrscheinlich gilt, dass diese Referenzsubstanzen im Probenmaterial enthalten sind oder wenn die aus der quantitativen Analyse erhaltenen Konzentrationsverhältnisse keinen Sinn ergeben.

Die auffälligsten Defizite treten bei der Anpassung der 'Whiteline'-Strukturen (speziell auf deren abfallender Flanke) in den Spektren in Abb. 5.4 auf. Die Wahl des Referenzspektrumsatzes ist insofern gerechtfertigt, als dieser sich bei der Anpassung der sechs anderen Spektren durchaus bewährt und alle zehn Probenspektren mit einem einheitlichen Referenzspektrumsatz analysiert werden sollten. Gegen das Einbeziehen zusätzlicher Referenzspektren spricht, dass mit umfangreichen Referenzspektrumsätzen im Prinzip nahezu beliebige Spektren angepasst werden können und die Analyse an Aussagekraft verliert.

Alle Matten weisen hohe Elementarschwefelgehalte (S_8+S_μ im Vergleich zu den übrigen Referenzen) auf, bei über der Hälfte der Spektren mehr als 95 %.

Die gemessenen Spektren wurden nach grober Betrachtung der Kurvenverläufe in zwei Gruppen eingeteilt und auf zwei Abbildungen verteilt: Bei den sechs Spektren in Abb. 5.3 ist die Whiteline (ca. 2472 eV) das absolute Maximum, und es treten keine Sulfatkonzentrationen über 3 % auf. Bei den vier Spektren in Abb. 5.4 ist die Sulfat-Whiteline (2481 eV) das absolute Maximum, und die Sulfatkonzentrationen sind größer als 10 % (d. h. niedrigere Konzentration als S_8 , absolutes Absorptionsmaximum wegen Oszillatorstärke des Übergangs). Innerhalb dieser Gruppe wiesen die Proben aus den Frasassi-Höhlen höhere Sulfatgehalte auf als die Lower-Kane-Cave-Proben. Cysteinsäure leistete nur bei den letzten vier Proben überhaupt einen Beitrag, und selbst dort nur in einem Fall ((i) FC) von mehr als 10 %. Die Methioninsulfon-Beiträge waren bei keiner der Proben größer als 3 %.

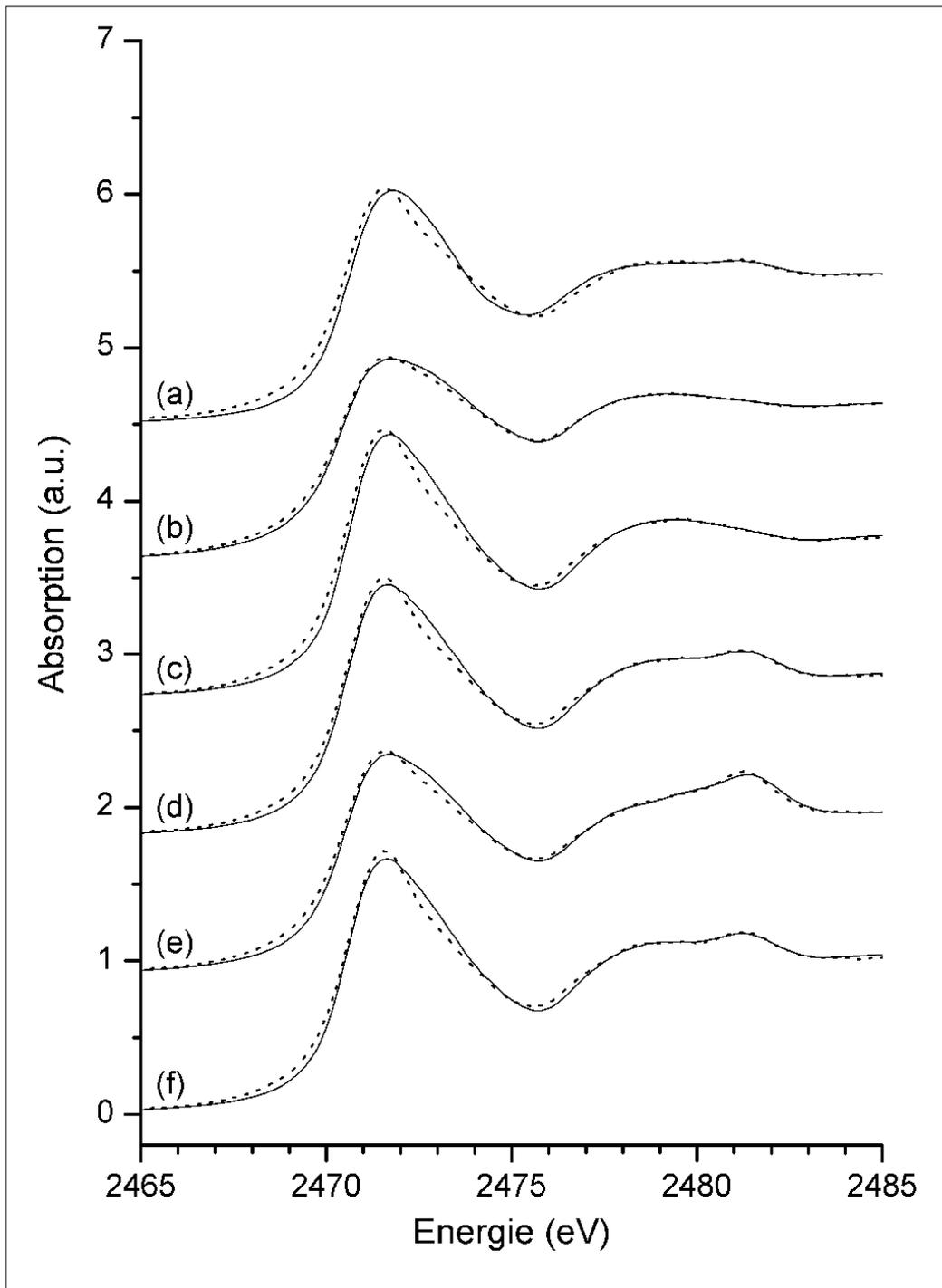


Abb 5.3: Messspektren (durchgezogene Kurven) und Fits (gestrichelt) Teil I

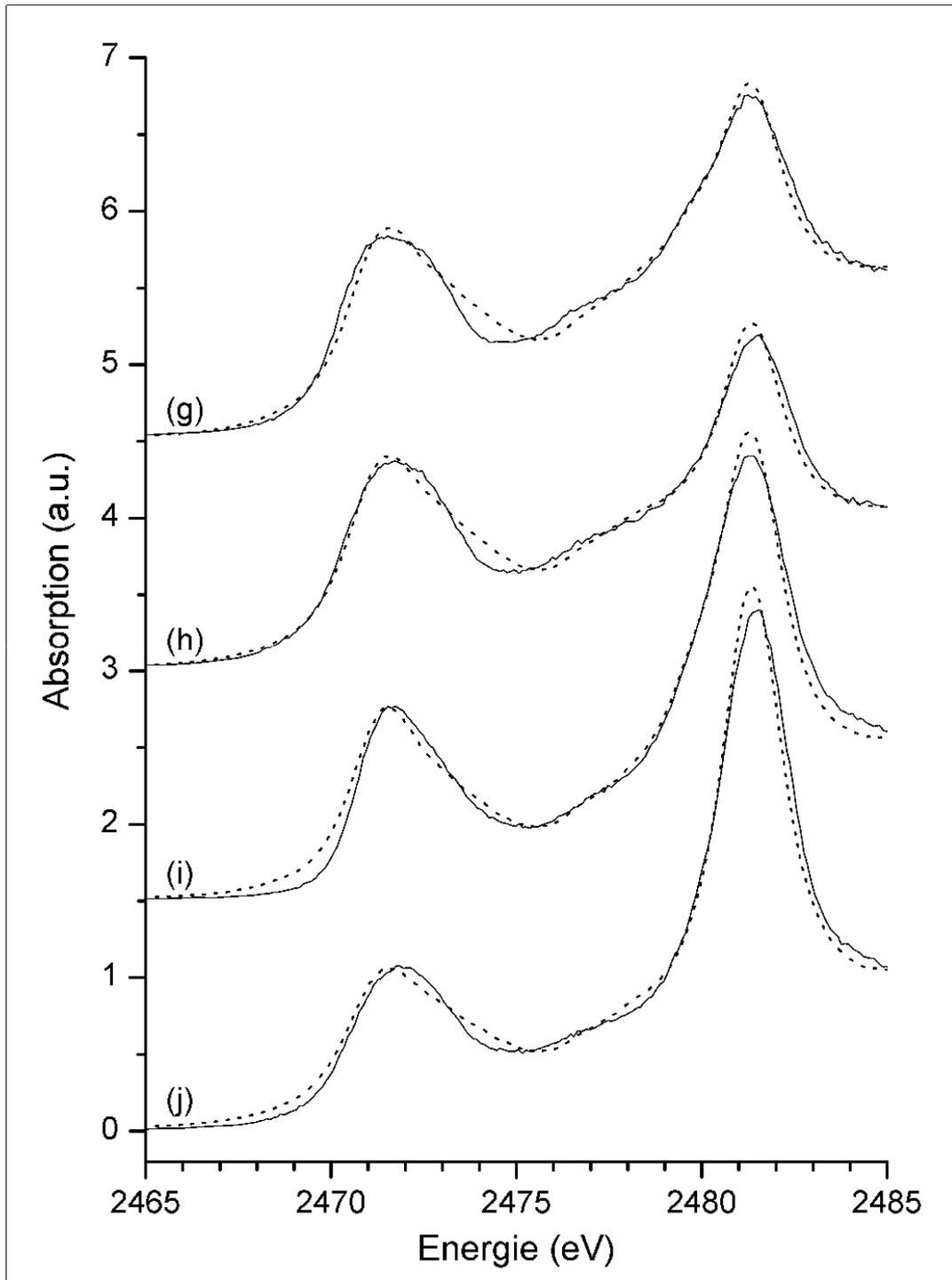


Abb 5.4: Messspektren (durchgezogene Kurven) und Fits (gestrichelt) Teil II

Im Falle der Proben aus den 'Lower-Kane'-Höhlen ist durchaus ein Zusammenhang zwischen Probenfarbe und spektralem Verlauf der Absorption erkennbar. Bei den grauen bzw. weiß-grauen Proben ist die Sulfatkonzentration höher als 10 %, bei den weißen Proben hingegen geringer als 1 %. Bei den vier 'Upper-Spring'-Proben fällt auf, dass die weißen Fasern mit jeweils 50 % wesentlich höhere Gesamt-Schwefelgehalte aufweisen als die beiden grauen

Proben (26 % bzw. <2 %). Aus dem Rahmen fällt in diesem Zusammenhang die Probe (c) LKC, die trotz weißer Farbe nur einen Gesamtschwefelgehalt von 18 % aufweist. Es ist jedoch zu beachten dass diese Probe aus einem anderen Höhlenabschnitt stammt (‘Fissure Spring’) und im Vergleich zu den beiden anderen weißen LKC-Proben eine weniger faserige Struktur aufweist (‘dünne Gewebe’).

Ähnlich wie bei den ‘Upper Spring’-Proben (siehe oben) ist bei den Proben aus dem ‘Ramo Sulfureo’-Höhlenabschnitt im Frasassi-System ein Zusammenhang zwischen spektralem Verlauf der Absorption und Probenfarbe bzw. Gesamtschwefelgehalt erkennbar: Bei den grauen Fasern ist verglichen mit den weißen Fasern der Sulfat-Beitrag höher und der Gesamtschwefelgehalt wesentlich niedriger. Die beiden ‘Pozzo di Cristalli’-Proben unterscheiden sich hinsichtlich der Entfernung zwischen Ort der Probennahme und Quelle, nicht aber in ihrer Farbe. Auch hier geht eine niedrige Sulfatkonzentration mit einem hohen Gesamt-Schwefelgehalt einher. Die Probe (d) FC fällt bei dieser Betrachtung aus dem Rahmen, wobei jedoch zu beachten ist, dass diese Probe als einzige aus dem ‘Grotta Bella’-Höhlenabschnitt stammt und außerdem eine andere Struktur (dünner Film statt Faser) als die anderen Proben aufweist (ähnlich wie (c) LKC aus der ‘Lower Kane’-Höhle, siehe oben).

Bei allen Proben leistet S_8 (Ringschwefel) von allen verwendeten Referenzen die größten Beiträge zu den Spektren. Lediglich bei einem Spektrum ((i) FC) ist der S_8 -Gehalt kleiner als 50%. Das Überwiegen von S_8 gegenüber S_μ in der Elementarschwefelfraktion der Proben könnte als biologischer ‘Fingerprint’ bestimmter Bakterien aufgefasst werden. Diese Signatur weist möglicherweise auf eine bevorzugte Oxidation von S_μ und Akkumulation von S_8 hin.

Tab. 5.1: Ergebnisse der quantitativen Analyse (* = Gesamtschwefelgehalte, von A. S. Engel bestimmt)

Probe	Herkunft / Beschreibung	S_8	S_μ	Met-O ₂	Cya	SO ₄ ^{-II}	% S*
(a) LKC	US / weiße Fasern; dicke Matten	71	27	-	-	-	50
(b) LKC	US / weiße Fasern	91	8	-	-	-	50
(c)LKC	FS / weiße, dünne Gewebe	63	34	-	-	-	18
(d) FC	GB / weiß-graue, dünne Filme	66	31	-	-	-	ND
(e) FC	RS / weiße Fasern	78	17	2	-	3	>90
(f) FC	PC / weiß-graue dicke Matten	60	36	3	-	2	>90
(g) LKC	US / weiß-graue dicke Matten und Biofilme	58	20	2	8	11	26
(h) LKC	US / graue ‘orifice’- Sedimente	62	21	2	2	13	<2
(i) FC	RS / graue Fasern	35	28	2	15	20	<5
(j) FC	PC / weiß-graue dicke Matte, 5 m stromabwärts	53	14	2	4	28	<5

Bei den Proben gehen signifikante Sulfat- und Cysteinsäure-Gehalte (über 10 %) mit geringen Elementarschwefel(S_8+S_μ)-Gehalten einher, was jedoch allein aufgrund der Normierung der Spektren (und der durchweg geringfügigen Beiträge von Methioninsulfon) zu erwarten ist. Außerdem ist ein gewisser Trend dahingehend zu erkennen, dass hohe S_8 -Gehalte mit hohen (S_8+S_μ)-Werten bzw. - zumindest bei separater Betrachtung beider Höhlensysteme und Ausklammern der ‘FS’- und ‘GB’-Proben - mit hohen Gesamtschwefelgehalten einhergehen. Bei

separater Betrachtung beider Höhlensysteme treten die höchsten S_8 -Gehalte bei den Proben mit einem Sulfatgehalt $\leq 3\%$ auf.

Interessanter sind jedoch weniger die Absolutwerte für die S_8 -Konzentrationen als das Verhältnis $S_8:S_\mu$ in Abhängigkeit vom Gesamt-Schwefelgehalt (S_8+S_μ) und vom Sulfatgehalt. Hierbei sind jedoch bei keinem der beiden Höhlensysteme eindeutige Trends erkennbar. Zudem ist bei derlei Betrachtungen die bereits erwähnte Problematik bei der Whiteline-Anpassung einiger Spektren (insbesondere in Abb. 5.4) zu berücksichtigen.

Schwefel-K-XANES-Spektren von *Thiothrix spp.* oder natürlichen ϵ -Proteobakterien sind bislang nicht gemessen worden. *Thiothrix* und *Beggiatoa* speichern erwiesenermaßen Elementarschwefel in intrazellulären Kugeln [Dah06]. Ob die aus den Höhlen stammenden ϵ -Proteobakterien intrazellulär Schwefel akkumulieren, ist jedoch unklar.

Da es sich bei den mikrobiellen Matten aus den Höhlen keinesfalls um Monokulturen handelt, geben die ermittelten Konzentrationsverhältnisse der Schwefelverbindungen möglicherweise nicht den Metabolismus bzw. eine 'Biosignatur' der in den Matten vorherrschenden mikrobiellen Gruppen wieder. Vielmehr ist davon auszugehen, dass miteinander konkurrierende Prozesse parallel ablaufen. Zwar deutet ein hoher S_8 -Gehalt auf ein Vorherrschen von Mikroorganismen hin, die Schwefelkugeln bilden (z. B. *Thiothrix* und/oder *Beggiatoa spp.*). Einem geringen S_8+S_μ -Gehalt ist aber nicht zwingend die Abwesenheit dieser Organismen zu entnehmen.

Möglicherweise findet verstärkt eine mikrobielle Oxidation (durch nicht-schwefelakkumulierende Schwefel-Oxidierer) statt bzw. eine Reduktion von S_8+S_μ . Letztere wäre allerdings mit der hier durchgeführten XANES-Analyse nicht nachzuweisen, da keine 'reduzierten' Schwefel-Referenzspektren eingesetzt wurden. T. Urich vermutet, dass S_8 im Vergleich zu Schwefelketten für eine Oxidation biologisch nicht verfügbar ist, weil der Ringschwefel (S_8) strukturell neu geordnet werden müsste, um an Zentren aktiver Oxidation zu gelangen [Uri06]. Im Falle des phototrophen Schwefelbakteriums *Allochromatium vinosum* sind diese Ergebnisse durch XANES-Messungen bestätigt worden: *Allochromatium vinosum* verwendet offensichtlich überwiegend polymere Ketten (S_μ), wenn Elementarschwefel (S_8+S_μ -Mischung) als alleinige Schwefelquelle zur Verfügung gestellt wird [Fra07].

Die Sulfatbeiträge in den XANES-Spektren könnten auf Gips ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) zurückzuführen sein. Summers-Engel et al. zeigten durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen, dass in von ϵ -Proteobakterien dominierten Biofilmen Gips akkumuliert wurde, obwohl die Gewässer nicht Gips-gesättigt waren [Eng04b]. Der jetzige Erkenntnisstand erlaubt jedoch keine schlüssige Aussage darüber, ob Sulfat in Form von Gips oder anderweitig vorliegt. Hilfreich könnten in diesem Zusammenhang XANES-Messungen an anderen Absorptionskanten (z. B. Kalzium) sein.

Die hier beschriebenen Untersuchungen liefern mithin erste Anhaltspunkte bzgl. unterschiedlicher Beiträge von Schwefel-Spezies zum Schwefelgehalt natürlicher Materialien. Die Proben lassen sich grob nach ihrem - unmittelbar anhand der spektralen Verläufe der Absorption bzw. deren quantitativer Analyse erkennbaren - Sulfatgehalt in zwei Gruppen mit Sulfatgehalt $>10\%$ bzw. $\leq 3\%$ einteilen. Diese Einteilung korreliert mit der Farbe der Proben, d. h. mit der jeweiligen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft.

Das Vorliegen von Sulfat könnte mit der Anwesenheit schwefeloxidierender Bakterien zusammenhängen, die reduzierte Schwefelverbindungen vollständig zu Sulfat oxidieren. Möglicherweise ist im Falle der schwefeloxidierenden Bakterien, die intrazellulär vorwiegend aus Ringschwefel bestehenden Schwefel akkumulieren, ein biologischer Fingerprint erkennbar. Diese Signatur könnte jedoch auch auf eine bevorzugte Oxidation von Polymerschwefel und eine Akkumulation von Ringschwefel zurückzuführen sein.

Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um zwischen parallel ablaufenden biogeochemischen Reaktionen und der Art des mikrobiellen Milieus zu unterscheiden, wodurch die Schwefelspeziation beeinflusst wird. Gegenstand künftiger Forschungsaktivitäten unter Verwendung von Kulturen sollte ein Differenzieren zwischen diesen Schwefelspezies sein. Die derzeitigen experimentellen Befunde zeigen, dass XANES neue Einblicke in die Komplexität biogeochemischer Prozesse ermöglicht.

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben lediglich 'explorativen' Charakter. Für künftige systematische Analysen sollte ein 'einheitlicherer' Probenatz verwendet werden (z. B. lediglich aus einem statt weltweit aus unterschiedlichen Höhlenabschnitten).

6 Einfluss unterschiedlicher Modi der Schwefelernährung auf den Stoffwechsel von *Allium cepa* L.

6.1 Schwefel-Stoffwechsel von *Allium cepa* L.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen befassen sich mit dem assimilatorischen Schwefelstoffwechsel in Pflanzen, konkret mit der Wechselwirkung zwischen der Schwefelernährung über die Blätter (‘atmosphärisch’, H₂S-Begasung) und über die Wurzeln (‘pedosphärisch’) am Beispiel der Pflanzenart *Allium cepa* L. (Speisezwiebel).

Bei Pflanzen liegt der größte Teil des Schwefels in Form von Cystein- und Methionin-Resten in den Proteinen vor [DeK05]. Schwefel wird jedoch auch für die Synthese von weiteren Verbindungen wie Thiolen (u. a. Glutathion) und Sulfolipiden sowie von Sekundären Inhaltsstoffen benötigt [Dur05]. Im Unterschied zu den am Primärstoffwechsel beteiligten Stoffen, die für das Wachstum und das Überleben einzelner Zellen der Pflanze notwendig sind (u. a. für die Photosynthese, den Energiestoffwechsel, die Synthese hochmolekularer Kohlenhydrate und den Abbau biologischer Moleküle) sind Sekundäre Inhaltsstoffe für die gesamte Pflanze von Bedeutung. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenphysiologie, wirken u. a. als Abwehrstoffe gegen Pflanzenkrankheiten und Schädlinge, als Farb- und Lockstoffe oder schützen vor Umwelteinflüssen [Swa77]. Ihre Biosynthese erfolgt nur in speziellen Zelltypen bzw. bestimmten Entwicklungsstadien. In Pflanzen der Gattung *Allium* (Zwiebeln, Knoblauch, Lauch und Schnittlauch) findet sich eine Vielzahl schwefelhaltiger Sekundärer Pflanzenstoffe wie γ -Glutamyl-Peptide und Alliine (S-alk(en)yl-Cystein-Sulfoxide) [Dur04]. Der Gehalt an schwefelhaltigen Sekundären Inhaltsstoffen hängt maßgeblich vom Entwicklungsstadium der Pflanze sowie von der Temperatur, der Wasserverfügbarkeit und dem Ernährungsstatus der Pflanze hinsichtlich Stickstoff und Schwefel ab [Coo03]/[Coo03b]/[Ran93]. Offensichtlich werden die Alliine vorwiegend in den Blättern synthetisiert und von dort dann in die Knollen transferiert [Lanc90].

Alliine und γ -Glutamyl-Peptide sind wegen ihrer therapeutischen Qualitäten bekannt und möglicherweise als Inhaltsstoffe pflanzlicher Arzneimittel nutzbar [Gri02]. Ferner sind die Alliine und ihre Abbauprodukte (z. B. Allicin) als Präkursoren (Vorstufen) für Aroma- und Geschmackstoffe von Bedeutung. Aroma wird nur bei mechanischer Verletzung von Pflanzenzellen freigesetzt, wobei das Enzym Alliinase aus der Vakuole die Alliine zersetzen kann [Keu02]. Dabei entsteht eine Vielzahl an flüchtigen Schwefelverbindungen [Blo92]/[Jon04]. Die γ -Glutamyl-Peptide und Alliine können für die chemische Abwehr von Insekten und Pathogenen sowie für die Speicherung von Stickstoff und Schwefel von Bedeutung sein [Hel02]/[Lanc90].

Im Allgemeinen nutzen Pflanzen über die Wurzeln aufgenommenes Sulfat als Schwefelquelle für ihr Wachstum. Das Sulfat wird schrittweise zu Sulfid reduziert, bevor der Einbau in organische Schwefelverbindungen (Assimilation) erfolgt [Dur04]/[Hel02]. Pflanzen verfügen über diverse Sulfat-Transporter mit speziellen Funktionen hinsichtlich der Sulfat-Aufnahme durch die Wurzeln und der Weitergabe an die Triebe [Haw00]/[Haw03]/[Buc04]/[Tak00]. Die Wurzeln enthalten alle Enzyme, die benötigt werden um Sulfat zu Sulfid zu reduzieren, obwohl dies - und der darauf folgende Einbau des Sulfids in Cystein - nach dem derzeitigen Forschungsstand vorwiegend in den Chloroplasten stattfindet [Ste00]/[DeK05]. Cystein fungiert

als Schwefel-Donator für die meisten anderen organischen Schwefelverbindungen in Pflanzen. Folgen von Schwefelmangel sind Vitalitätsverlust und eingeschränkte Widerstandsfähigkeit gegenüber Belastungen durch Umwelt und Pflanzenpathogene [Ran95]/[DeK05]. Unter Normalbedingungen sind Schwefel-Aufnahmerate und Schwefel-Assimilationsrate der Bedarfsrate für das Pflanzenwachstum angepasst. Der Bedarf hängt vom Entwicklungsstadium der Pflanze und von der Pflanzenart ab [Dur04].

Trotz ihrer grundsätzlich phytotoxischen Wirkung (abhängig von Dosis und Pflanzenart) können SO_2 und H_2S als Schwefelquelle für Pflanzenwachstum dienen [Stu01]/[Tau03]/[Wes01]. Die Aufnahme dieser Gase erfolgt durch die Spaltöffnungen (Stomata) der Blätter. Die Aufnahme rate hängt von der Durchlässigkeit der Blattoberfläche und des Mesophylls (siehe Kap. 4) für diese Gase ab [Amb06]. Offensichtlich wird die H_2S -Aufnahme im Übrigen weitgehend von physiologischen Faktoren bestimmt, u. a. von der Einbaurate des gelagerten Sulfids in Cystein durch O-acetyl(thiol)lyase und (anschliessend) in andere organische Schwefelmetabolite [Dur04]. Die physiologischen Hintergründe der Phytotoxizität und die unterschiedliche H_2S -Empfindlichkeit verschiedener Pflanzenarten sind immer noch weitgehend ungeklärt. *Allium cepa L.* gilt als relativ unempfindlich hinsichtlich der Toxizität einer H_2S -Begasung. In [Dur02] wird von einer zweiwöchigen Begasung ohne merkliche Beeinträchtigung des Pflanzenwachstums berichtet (Biomasse-Produktion der Pflanzen, Trieb-Wurzel-Verhältnis und Trockensubstanzgehalt von Wurzeln und Trieben), wobei der H_2S -Pegel mit $0,3 \mu\text{l/l}$ noch deutlich höher eingestellt war als zur Deckung des Schwefelbedarfs für das Wachstum der meisten Pflanzen (inkl. *Allium cepa L.*) erforderlich. Aufgrund von Berechnungen des Bedarfs der Pflanze und der Blattaufnahme sowie anhand von Experimenten im Labor wird dieser Wert auf $0,1 \mu\text{l/l}$ geschätzt [DeK00].

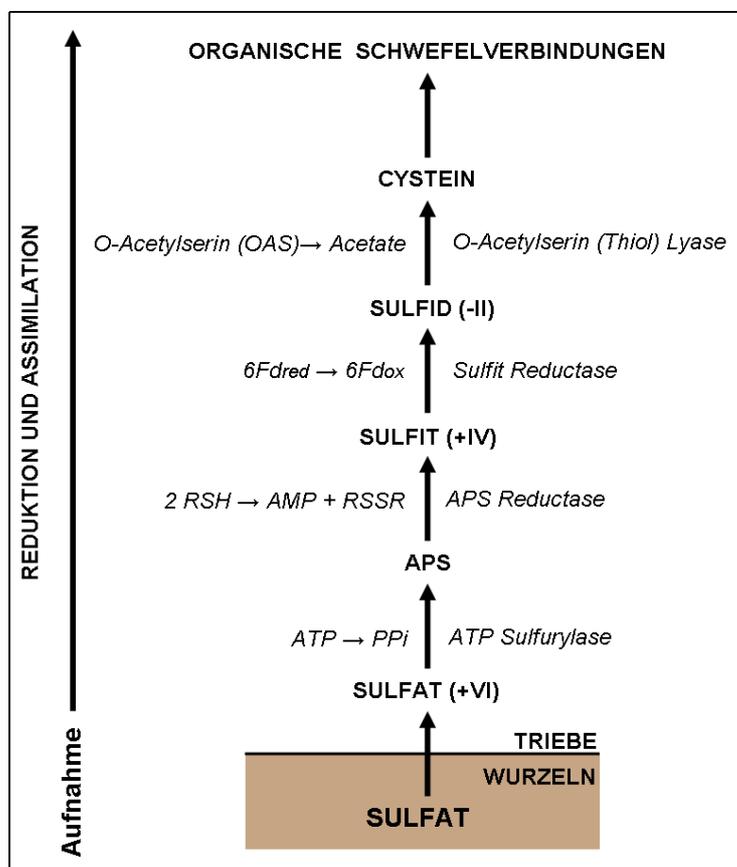


Abb. 6.1: Assimilatorischer Schwefelstoffwechsel in Pflanzen (nach[DeK05])

Verglichen mit den meisten anderen Pflanzenarten verfügt *Allium cepa L.* über eine relativ hohe H₂S-Aufnahmekapazität [Dur02] bei unter Normalbedingungen recht geringem Schwefelbedarf für das Wachstum.

Durch eine Begasung mit Schwefelwasserstoff kann die Regulierung der Sulfat-Aufnahme durch die Wurzeln umgangen und Schwefel in reduzierter bzw. oxidiert Form dem Blattgewebe unmittelbar zugänglich gemacht werden. Die Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen atmosphärischer und pedosphärischer Schwefelernährung kann Einblicke in die Regulierung von Sulfat-Aufnahme und Schwefel-Assimilation ermöglichen.

6.2 Herkunft und Präparation der Proben

Den Schwerpunkt der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen bilden XANES-Messungen an Pflanzen, die unterschiedlichen Modi der Schwefelernährung ausgesetzt waren. *Allium cepa L.* kann Schwefelwasserstoff-Gas aus der Umgebungsatmosphäre als alleinige Schwefelquelle für das Pflanzenwachstum nutzen [Dur04]. Wurzeln und Triebe der Pflanzen wurden getrennt untersucht, und zwar für folgende Modi der Schwefelernährung:

- Sulfathaltige Nährlösung, keine H₂S –Begasung
- Sulfathaltige Nährlösung, zusätzlich H₂S-Begasung
- wurzelseitiger Sulfatmangel, keine H₂S-Begasung
- H₂S-Begasung bei wurzelseitigem Sulfatmangel

Die Anzucht der Pflanzen sowie deren siebentägige Begasung mit H₂S, die Gefriertrocknung und die Verarbeitung zu Pulver wurden vom 'Laboratory of Plant Physiology' der Universität Groningen geleistet. Die Pflanzenanzucht ist bei [Dur04] beschrieben. Bei der Anzucht von Sulfatmangel-Pflanzen wurden das MgSO₄ in der Hoagland-Nährlösung durch MgCl₂ und alle Mikronährstoff-Sulfatsalze durch Chloridsalze ersetzt. Zur H₂S-Begasung wurden die Pflanzen in Edelstahlbehälter mit 25 % Hoagland-Nährlösung [Kut02] umgesetzt, die wiederum in 150 l - Edelstahlzellen mit Polycarbonat-Deckeln untergebracht waren [Dur02], und unter definierter künstlicher Beleuchtung und Atmosphäre gehalten. Die Wurzeln und Triebe wurden gefriergetrocknet und zu Pulver verarbeitet. Unmittelbar vor den XANES-Messungen wurden die Pulverproben auf selbstklebendem schwefelfreiem Kapton-Klebeband verstrichen und mit Polypropylenfolie bedeckt. Die Spektren dieser Proben wurden im Transmissionsmodus gemessen.

Zunächst wurden einige Orientierungsmessungen an Zwiebelknollen (aus dem Handel) durchgeführt. In den Knollen ist ein hoher Gehalt an schwefelhaltigen Sekundären Inhaltsstoffen zu erwarten (laut [Sch93] bis zu 80 % der organischen Schwefelfraktion). Bei einer Zerkleinerung der Knollen (Gewebeverletzung) tritt eine enzymatische Zersetzung von Inhaltsstoffen auf. Die beteiligten chemischen Reaktionen sind bekannt [Keu02]/[Kro06]. Diese Messungen wurden im Fluoreszenzmodus durchgeführt – die Präparation gleichmäßig dünner Schichten ist in diesem Fall schwierig, außerdem sollten Verletzungen des Gewebes weitgehend vermieden werden.

6.3 Messergebnisse und Diskussion

6.3.1 Orientierungsmessungen an Zwiebelknollen

Die Abb. 6.2 zeigt das Schwefel-K-XANES-Spektrum eines Zwiebelknollenstücks. Zum Vergleich wurde das Spektrum einer Knoblauchknolle (*Allium sativum* L.) hinzugefügt. Beide Spektren werden eindeutig von einer Sulfoxid-Komponente (Maximum bei 2475 eV) dominiert, bei niedrigeren Energien unterscheiden sie sich allenfalls geringfügig. Im Spektrum der Zwiebelknolle ist deutlich eine im Spektrum der Knoblauchknolle nicht vorhandene 'Absatz'-Struktur zu erkennen (asymmetrisch, auf der abfallenden Flanke des Sulfoxid-Maximums bei 2475 eV), die im Spektrum der Standard-Referenzsubstanz Dimethylsulfoxid (siehe Kap. 2) nicht vorhanden ist. Die Beiträge höherer Oxidationsstufen (Sulfon, Cysteinsäure und Sulfat, Maxima bei ca. 2480 eV) sind im Spektrum der Zwiebelknolle bei weitem ausgeprägter als beim Knoblauch, in Übereinstimmung mit [Sne04].

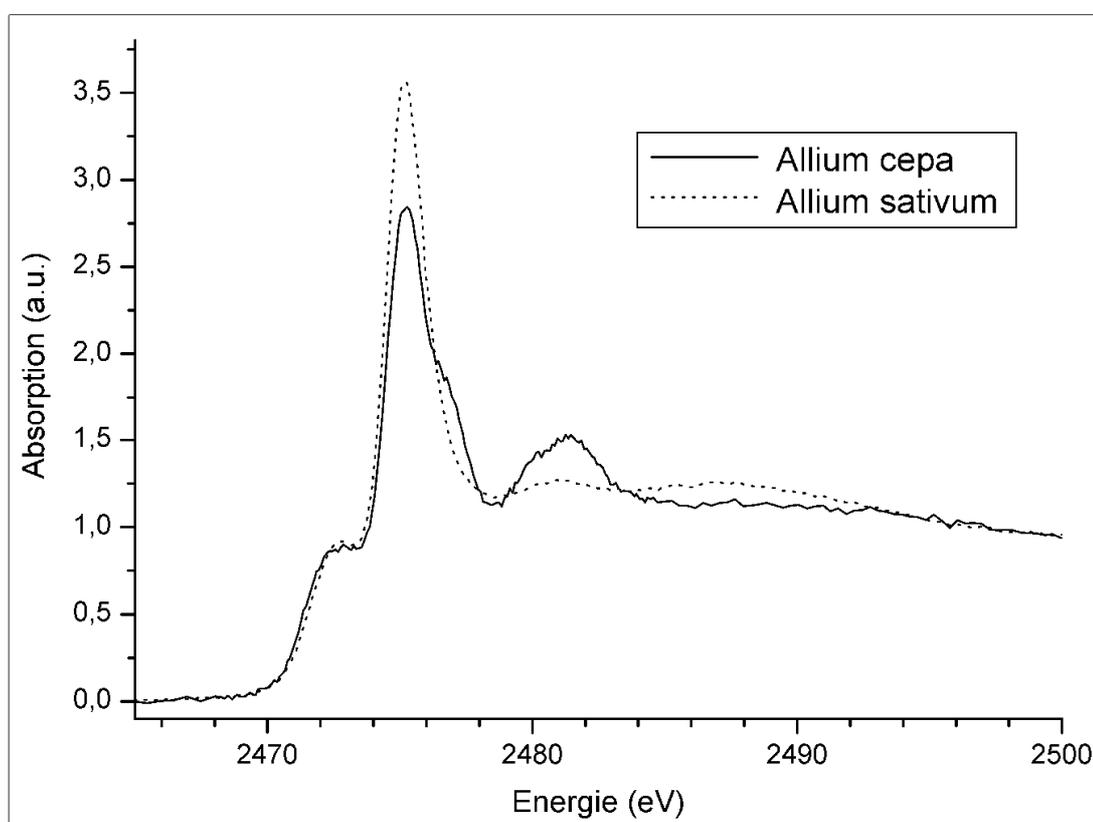


Abb. 6.2: Schwefel-K-XANES-Spektren der Knollen von *Allium cepa* L. (Speisezwiebel) und *Allium sativum* (Knoblauch)

Abb. 6.3 zeigt XANES-Spektren eines Zwiebelknollenstücks, das in einer Glovebox unter N_2 -Atmosphäre herausgeschnitten wurde (Größe ca. 1 cm x 2 cm, Stärke ca. 2 mm). Die äußerste trockene Schale wurde entfernt. Das Zwiebelknollenstück wurde mit Kaptonband und Polypropylenfolie verpackt, in einem luftdichten Behälter zum Strahlrohr transportiert und dort unverzüglich in die Probenkammer eingebracht, die bei Messungen im Fluoreszenzmodus mit Helium gespült wurde. Die Innenseite des Knollenstücks war dem einfallenden monochromatischen Synchrotronlicht zugewandt.

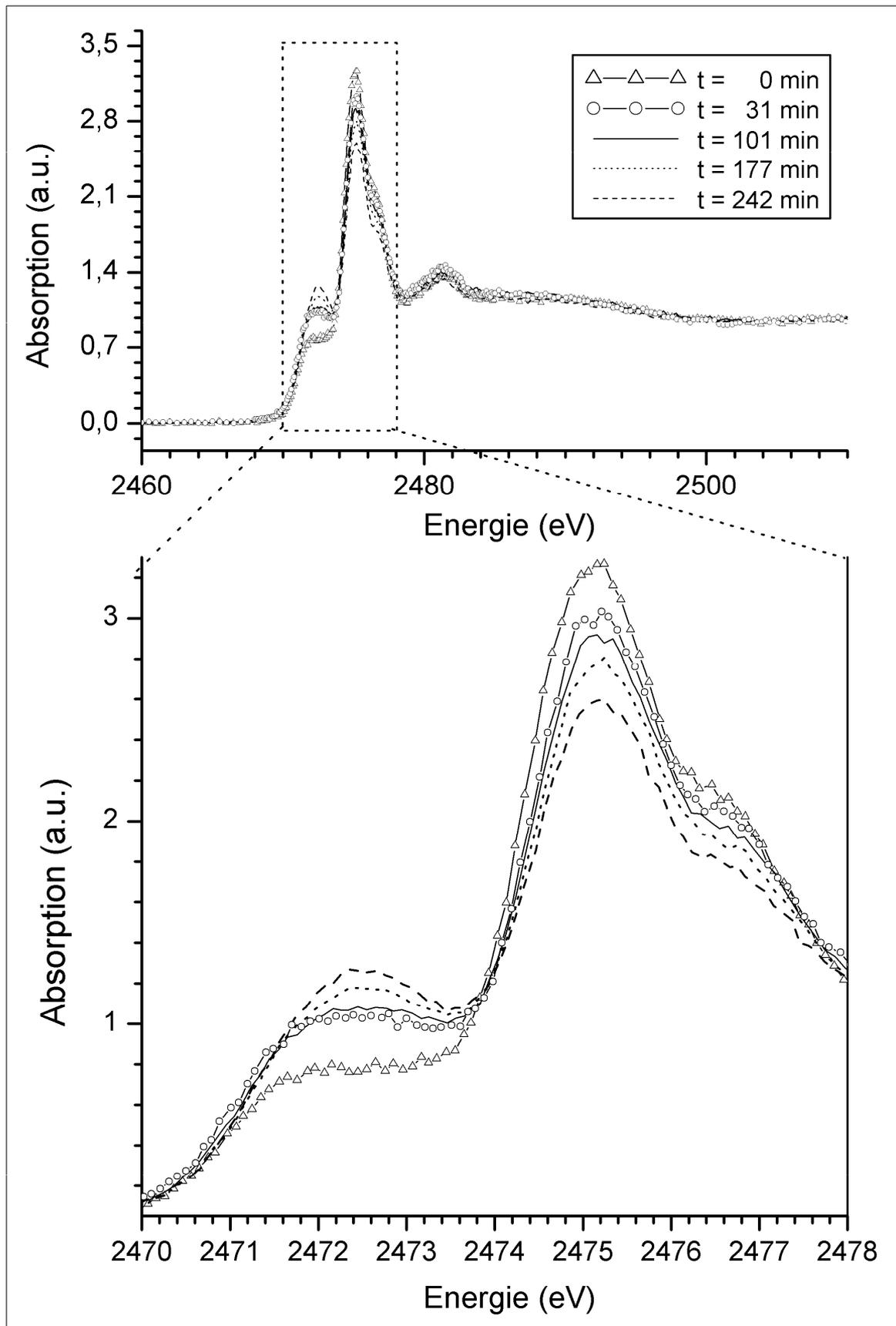


Abb. 6.3: Serie von XANES-Spektren eines Zwiebelknollenstücks

Ursprünglich waren zwei XANES-Messungen an dieser Probe geplant, über die dann gemittelt werden sollte. Es zeigte sich jedoch, dass die Spektren von Einzelmessung zu Einzelmessung eine kontinuierliche zeitliche Variation aufweisen. Dabei nimmt die Intensität der Sulfoxidstruktur gleichsinnig ab, während die bei niedrigeren Energien auftretenden Strukturen verstärkt werden. Bei den höherenergetischen Strukturen (Sulfone, Sulfonate, Sulfate) ist kein einheitlicher Trend feststellbar. Es ist nahe liegend, als Ursache für diese Veränderungen eine Zersetzung der Alline infolge der Gewebeverletzung beim Herausschneiden des Knollenstücks anzunehmen, auch in Abwesenheit von Luftsauerstoff.

Über den gesamten Zeitraum bleibt jedoch das Verhältnis der Höhe des Sulfoxid-Maximums zur Höhe des Absatzes (Wendepunkthöhe) nahezu konstant. Daraus ist zu folgern, dass Maximum und Absatz entweder zusammengehören (‘Doppelpeak’) oder dass es sich um eine Überlagerung von ‘Whitelines’ verschiedener Substanzen mit Schwefel in unterschiedlichen Oxidationsstufen handelt, die während des Zersetzungsprozesses zu gleichen Teilen abgebaut werden. In letztgenanntem Fall müssten neben den sulfoxidischen Verbindungen noch Substanzen mit Schwefel einer formalen Wertigkeit zwischen II (Sulfoxid) und IV vorliegen – die Whiteline von Sulfid tritt erst weit jenseits der Absatzstruktur auf. Ein anschließendes Belüften der Probe hatte keinen nennenswerten Einfluss auf den spektralen Verlauf der Absorption.

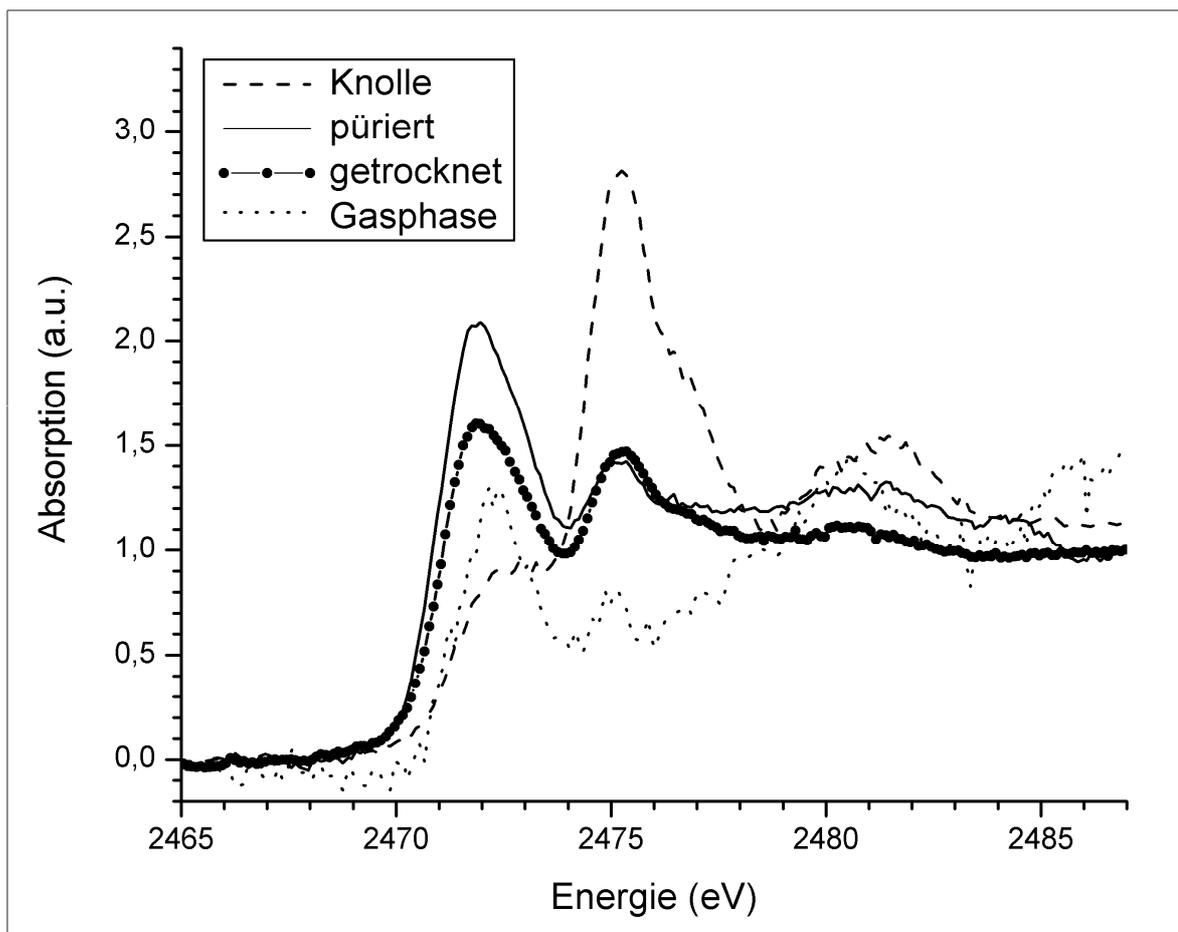


Abb. 6.4: Spektrum des pürierten Materials und Dampfphasenmessung (nach [Hor07])

Die Veränderungen in den XANES-Spektren fallen weit drastischer aus, wenn das Gewebe der Knollen nicht lediglich durch wenige Schnitte verletzt sondern püriert wird, wie anhand des Spektrums in Abb. 6.4 ersichtlich. Ein Spektrum aus Abb. 6.3 wurde zum Vergleich hinzugefügt. Der Beitrag der Sulfoxid-Komponente zur Absorption ist bei der pürierten Probe erheblich reduziert, während die bei niedrigeren Energien auftretenden Strukturen im Spektrum dominieren (in Übereinstimmung mit [Sne04]). Anschließendes Trocknen des pürierten Materials hat wiederum eine Verstärkung der Sulfoxid-Komponente zur Folge, während die Strukturen bei niedrigeren Energien abnehmen. Es ist zu beachten, dass hier flüchtige Verbindungen beteiligt sind.

Abb. 6.4 zeigt zusätzlich zum pürierten Material (‘frisch’ und getrocknet) noch ein im Transmissionsmodus aufgenommenes Dampfphasen-Spektrum. Hierzu wurde das pürierte Material in einem Glaskolben verdampft, der an die Probenkammer (hier ein NW40-Rohrstück, beidseitig mit Kaptonfolie zu den Ionisationskammern hin abgeschlossen) angeflanscht war. Es ist dabei schwierig, die Messparameter - insbesondere den Druck und damit den Kantenhub in den Spektren - optimal einzustellen und konstant zu halten. Dies wird insbesondere am ansteigenden Verlauf der Hintergrundabsorption deutlich. Es ist jedoch gut zu erkennen, dass in diesem Stoffgemisch ähnlich wie beim pürierten Material Verbindungen mit SH-, SC- und Disulfidbindungen gegenüber den Substanzen überwiegen, in denen Schwefel höherer Oxidationsstufe vorliegt. Dies könnte prinzipiell die Veränderungen im XANES-Spektrum des pürierten Materials beim Trocknen erklären. Es ist jedoch zu beachten, dass hier nicht lediglich ein teilweises Verdampfen eines Stoffgemisches stattfindet, sondern dass aufgrund der Vielzahl unterschiedlich reaktiver, z. T. instabiler Substanzen auch diverse chemische Reaktionen während des Verdampfens bzw. Trocknens ablaufen. Die Abnahme des Gehalts an Sulfoxiden in den Zwiebelknollen infolge einer Gewebeerletzung tritt keinesfalls unerwartet ein – die beteiligten chemischen Reaktionen sind bekannt (siehe Abb. 6.5).

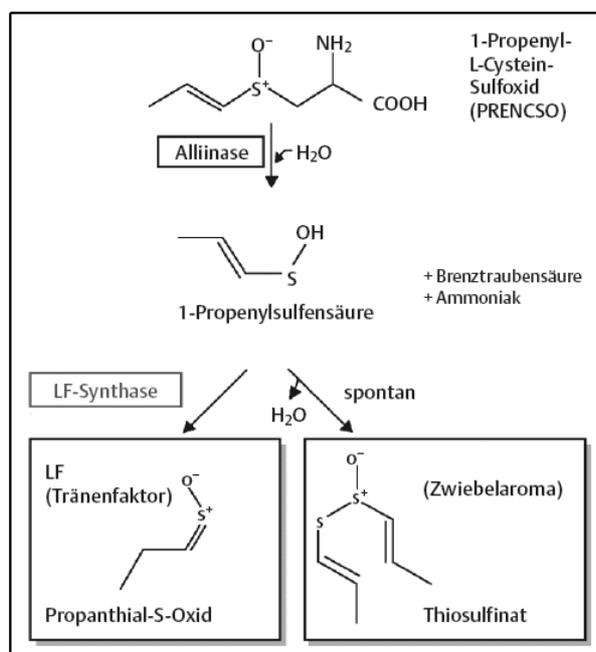


Abb. 6.5: Chemische Reaktionen infolge Gewebeerletzung bei *Allium Cepa* [Kro06]

Die Knollen der verschiedenen Allium-Arten enthalten diverse S-alk(en)yl-Cystein-Sulfoxide (Alliine), die sich hinsichtlich der jeweiligen Alk(en)yl-Reste unterscheiden. In Zwiebelknollen liegt meist S-1-Propenyl-Cystein-Sulfoxid (siehe Abb. 6.5) in der höchsten Konzentration vor, in den Knollen von *Allium sativum* (Knoblauch) dagegen S-2-Propenyl-Cystein-Sulfoxid. Dieses ist in Zwiebelknollen nicht in messbaren Mengen vorhanden [Ran97].

Bei einer Verletzung des Zwiebelgewebes wird das im Cytoplasma vorliegende S-1-Propenyl-Cystein-Sulfoxid durch das aus der Zellvakuole stammende Enzym Alliinase zersetzt. Die dabei entstehende 1-Propenylsulfensäure zerfällt z. T. in Thiosulfinat. In Anwesenheit von LF-Synthase, eines weiteren (in Knoblauchknollen nicht vorhandenen) Enzyms, wird außerdem das als Abwehrstoff dienende Propanthial-S-Oxid gebildet (‘Tränenfaktor’, engl. ‘Lachrymatory Factor’ = LF) [Kro06]. Die (instabilen) Thiosulfinate sind hauptverantwortlich für Zwiebel-Geschmack und -Aroma. Sie fungieren als Vorstufen für die Vielzahl von Schwefelverbindungen, die letztlich durch das Zerkleinern der Knolle entstehen [Ran97], im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht näher untersucht werden können.

6.3.2 Messungen an Wurzeln und Trieben

Die Abb. 6.6 und 6.7 zeigen je ein Schwefel-K-XANES-Spektrum von *Allium Cepa*-Wurzeln und -Trieben für folgende Fälle:

- sulfathaltige Nährlösung, keine H₂S-Begasung (durchgezogene Kurven in Abb. 6.6 (a) und 6.7 (a))
- sulfathaltige Nährlösung, zusätzlich H₂S-Begasung (gestrichelte Kurven in Abb. 6.6 (a) und 6.7 (a))
- wurzelseitiger Sulfatmangel, keine H₂S-Begasung (Abb. 6.6 (b), durchgezogene Kurve, und Abb. 6.7 (c))
- H₂S-Begasung bei wurzelseitigem Sulfatmangel (Abb. 6.6 (b), gestrichelte Kurve, und Abb. 6.7 (b))

Der gesamte Probensatz ist umfangreicher: Für jeden der oben genannten vier Fälle wurden Wurzeln und Triebe von je drei einzelnen Pflanzen untersucht, d. h. insgesamt 24 Proben. Der Übersicht halber sind in Abb. 6.6 und Abb. 6.7 nicht alle gemessenen Spektren dargestellt. Sie wurden jedoch alle einer quantitativen Analyse unterzogen.

In allen Spektren in Abb. 6.6 und 6.7 sind drei lokale Maxima erkennbar. Die erste starke Resonanz (Maximum bei ca. 2472,4 eV, ‘White Line’) kommt mit großer Wahrscheinlichkeit zustande durch eine Überlagerung von C-S-/S-H- (Cystein- und Methionin-Reste, Thiole wie Glutathion) und Disulfid-Bindungen (z. B. intra- und inter-Protein-Querverbindungen). Das lokale Absorptionsmaximum bei 2475 eV kann Verbindungen mit einer Sulfoxid-Gruppe zugeordnet werden, z. B. Alliinen (S-alk(en)yl-Cystein-Sulfoxiden). Der Kurvenverlauf bei 2481,4 eV entspricht einer typischen Sulfat-Struktur.

Deutliche Unterschiede zeigen sich zwischen den Spektren der Wurzeln aus sulfathaltiger Nährlösung (Abb. 6.6 (a)) und den Wurzeln der Sulfatmangel-Proben (Abb. 6.6(b)). Bei diesen ist der Sulfat-Anteil weit geringer. Vergleichsweise geringen Einfluss auf die Spektren der Wurzeln hat die Begasung mit H₂S.

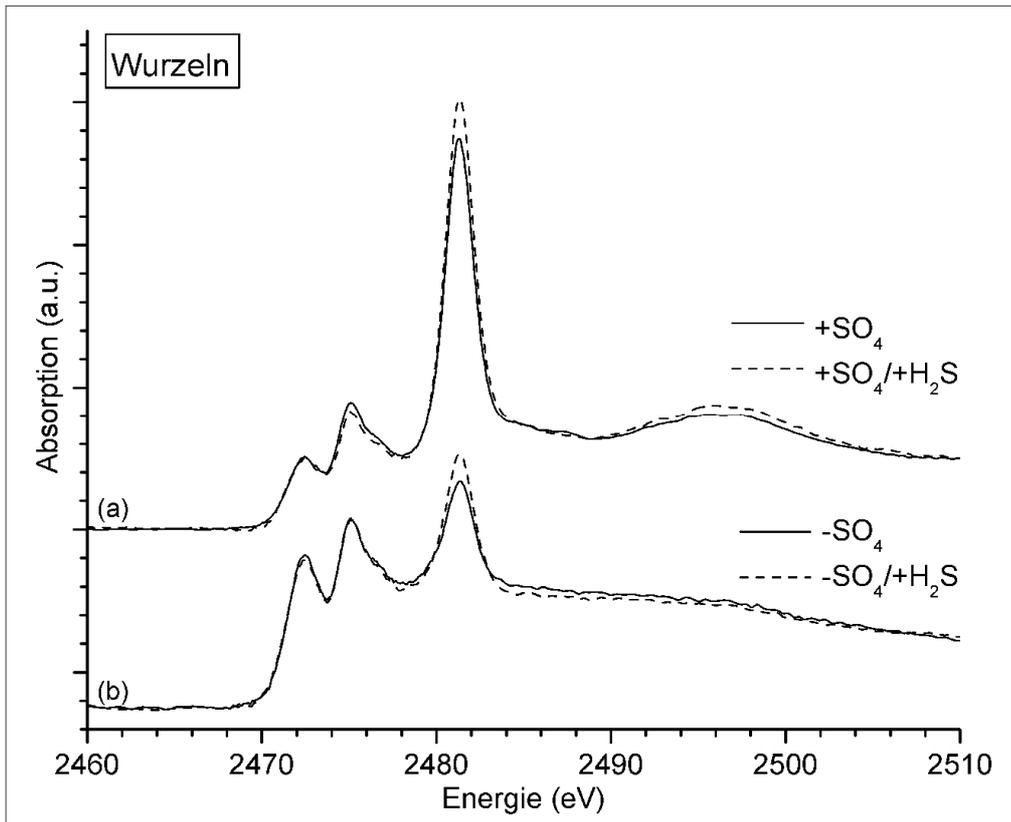


Abb. 6.6: Schwefel-K-XANES-Spektren der Wurzeln

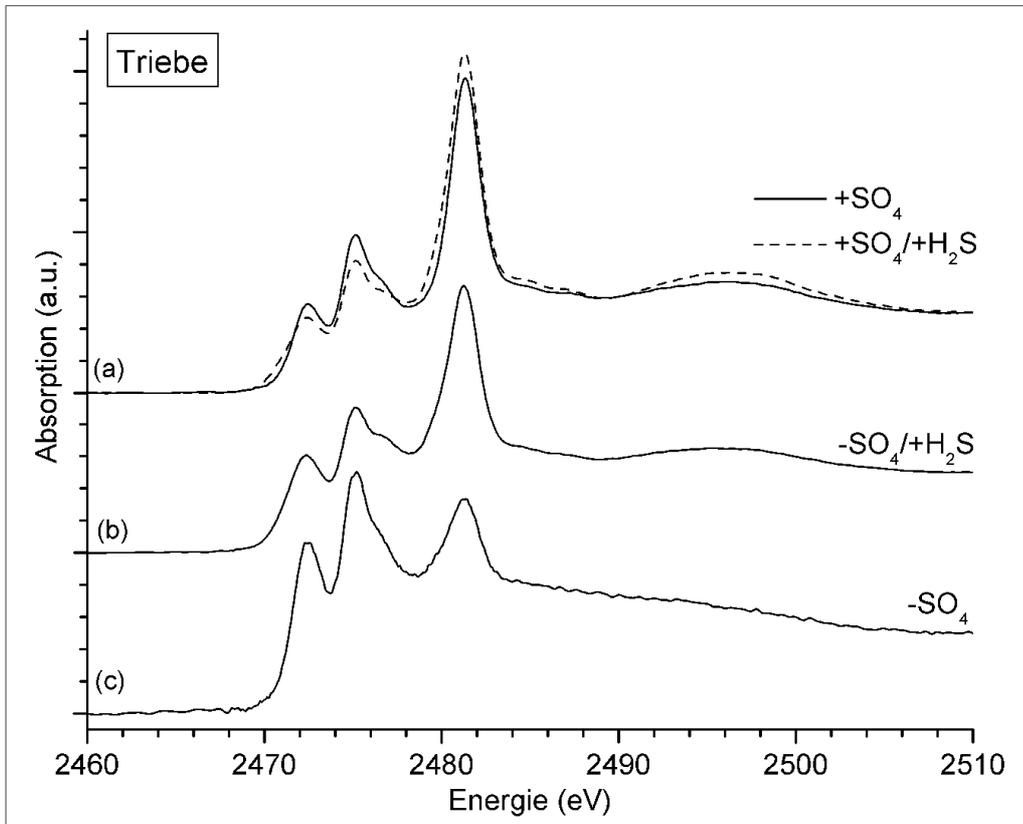


Abb. 6.7: Schwefel-K-XANES-Spektren der Triebe

In den Spektren der Triebe dominieren deutlich die Sulfat-Beiträge, abgesehen von der Pflanze, bei der Sulfatmangel vorlag und keine H₂S-Begasung stattgefunden hatte (Abb. 6.7(c)). Die Begasung hat demzufolge auf die Spektren der Triebe erheblichen Einfluss, im Unterschied zu denen der Wurzeln.

Wie in den Spektren der Zwiebelknollen (Abb. 6.2, 6.3 und 6.4) ist auf der abfallenden Flanke des Sulfoxid-Maximums bei 2475 eV eine 'Absatz'-Struktur vorhanden (besonders deutlich zu erkennen im Spektrum der Triebe bei Sulfatmangel und zusätzlicher Begasung). Dieser Absatz ist im Spektrum der 'Standard'-Referenzsubstanz Dimethylsulfoxid (siehe Kap. 2) nicht vorhanden. Durch diese Struktur wird eine quantitative Analyse der Spektren erheblich erschwert. Es ist nahe liegend, dass die Sulfoxid-Beiträge zu den Spektren in Abb. 6.6 und 6.7 nicht zuletzt von Sekundären Schwefel-Inhaltsstoffen wie Alliinen (S-alk(en)yl-Cystein-Sulfoxiden) herrühren, deren Gehalt nach [Sch93] in Zwiebelknollen bis zu 80 % der organischen Schwefelfraktion beträgt. Da Referenzsubstanzen für Zwiebelinhaltsstoffe in reiner Form kommerziell nicht verfügbar waren, wurde für eine quantitative Analyse der Spektren dieses Probensatzes ein Zwiebelknollen-Spektrum verwendet (konkret: Spektrum aus Abb. 6.3, Zeitpunkt 0 min, geglättet), zusätzlich zu den Spektren von oxidiertem und reduziertem Glutathion, Methionin, Methioninsulfon, Cysteinsäure und Zinksulfat. Mit dem dadurch erweiterten Referenzspektren-Satz lässt sich eine quantitative Analyse eher bewerkstelligen. Gemessene Spektren und Fit-Kurven sind in Abb. 6.8 und 6.9 dargestellt.

In Abb. 6.10 sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammengefasst. Da es sich bei der hier verwendeten Sulfoxid-Referenz nicht um das Spektrum eines in Reinform vorliegenden Stoffes handelt, weichen die aufgetragenen Prozentwerte wahrscheinlich von den tatsächlichen Konzentrationen der entsprechenden Komponenten in den Proben ab (stets bezogen auf den Gesamt-Schwefelgehalt). Sie geben jedoch zumindest qualitativ den Einfluss unterschiedlicher Modi der Schwefelernährung auf die Konzentrationsverhältnisse wieder. Laut [Pra02b] sind die Ergebnisse des hier angewandten Auswertungsverfahrens mit einer Unsicherheit bis zu 10 % behaftet. Trotzdem sind in Abb. 6.10 auch anhand geringerer Konzentrationsunterschiede einige deutliche Trends erkennbar, die offensichtlich die Ungenauigkeit der Analyse und die individuelle Variation der Proben überwiegen.

Erwartungsgemäß und bereits aus den repräsentativen Spektren in Abb. 6.6 und 6.7 unmittelbar ersichtlich hat der Sulfatgehalt der Nährlösung erheblichen Einfluss auf die Sulfatkonzentration in den Wurzeln. Diese ist bei Sulfatmangel deutlich herabgesetzt - sollten zum Zeitpunkt des Gefriertrocknens noch Nährlösungsreste an den Wurzeln haften, ist diese Aussage natürlich trivial. Demgegenüber hat die Begasung mit H₂S vergleichsweise geringen Einfluss, in Übereinstimmung mit [Dur04]. Sie führt offensichtlich nicht zu einer Minderung ('down regulation') der Sulfat-Aufnahme durch die Wurzeln, d. h. es findet keine Wechselwirkung zwischen Spross und Wurzeln statt, oder zu einer herabgesetzten Metabolisierung des über die Wurzeln aufgenommenen Sulfats. Die Aufnahme von Sulfat durch die Wurzeln und der Sulfat-Transport zu den Trieben gelten als die wirksamsten Parameter für die Regelung der Schwefelassimilation. Sie sind i. A. dem Schwefelbedarf der Pflanze für ihr Wachstum angepasst [Hel02]/[Buc04]/[Leu00].

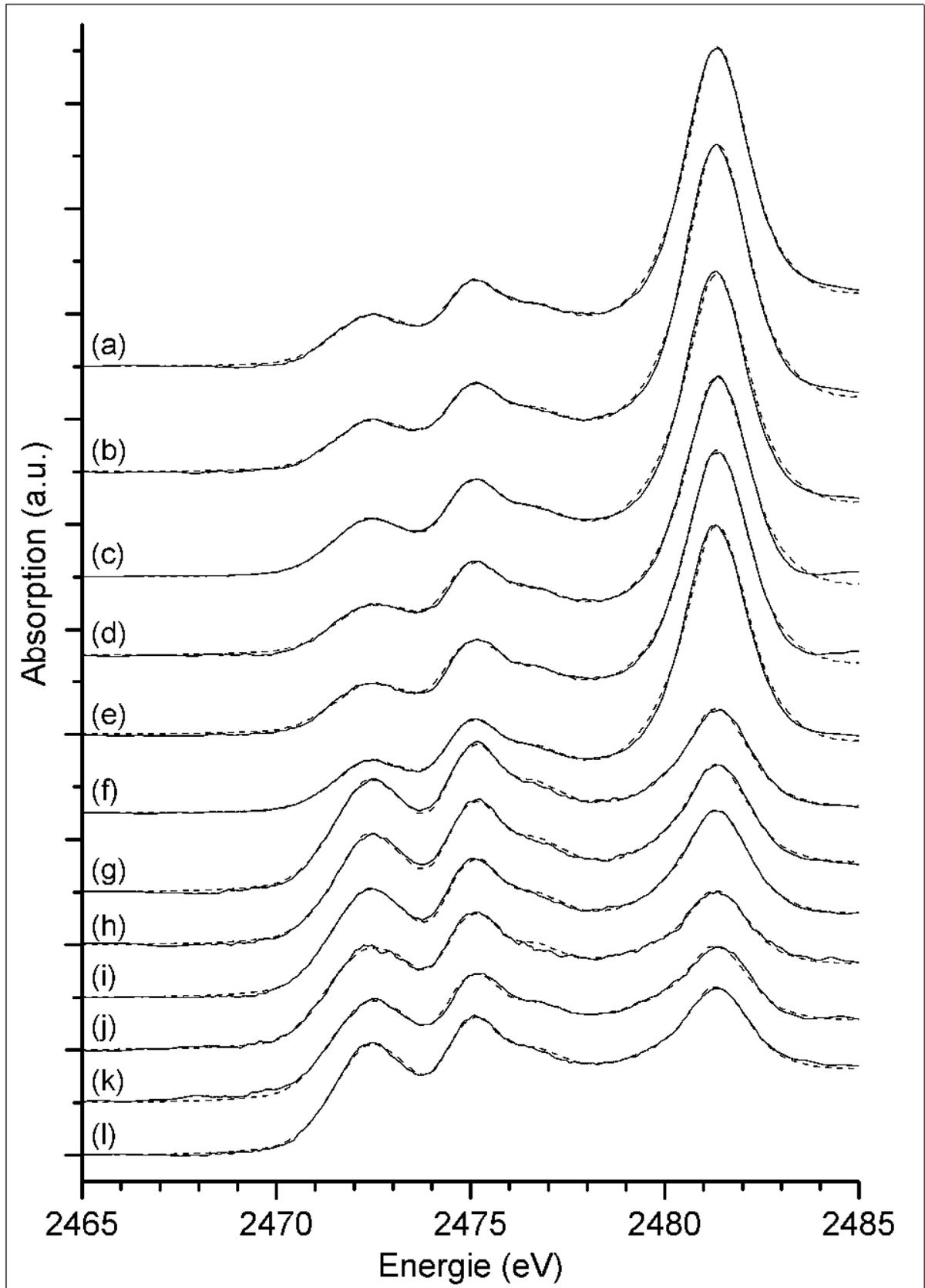


Abb. 6.8: Spektren der Wurzeln (durchgezogen) und Fit-Ergebnisse (gestrichelt)

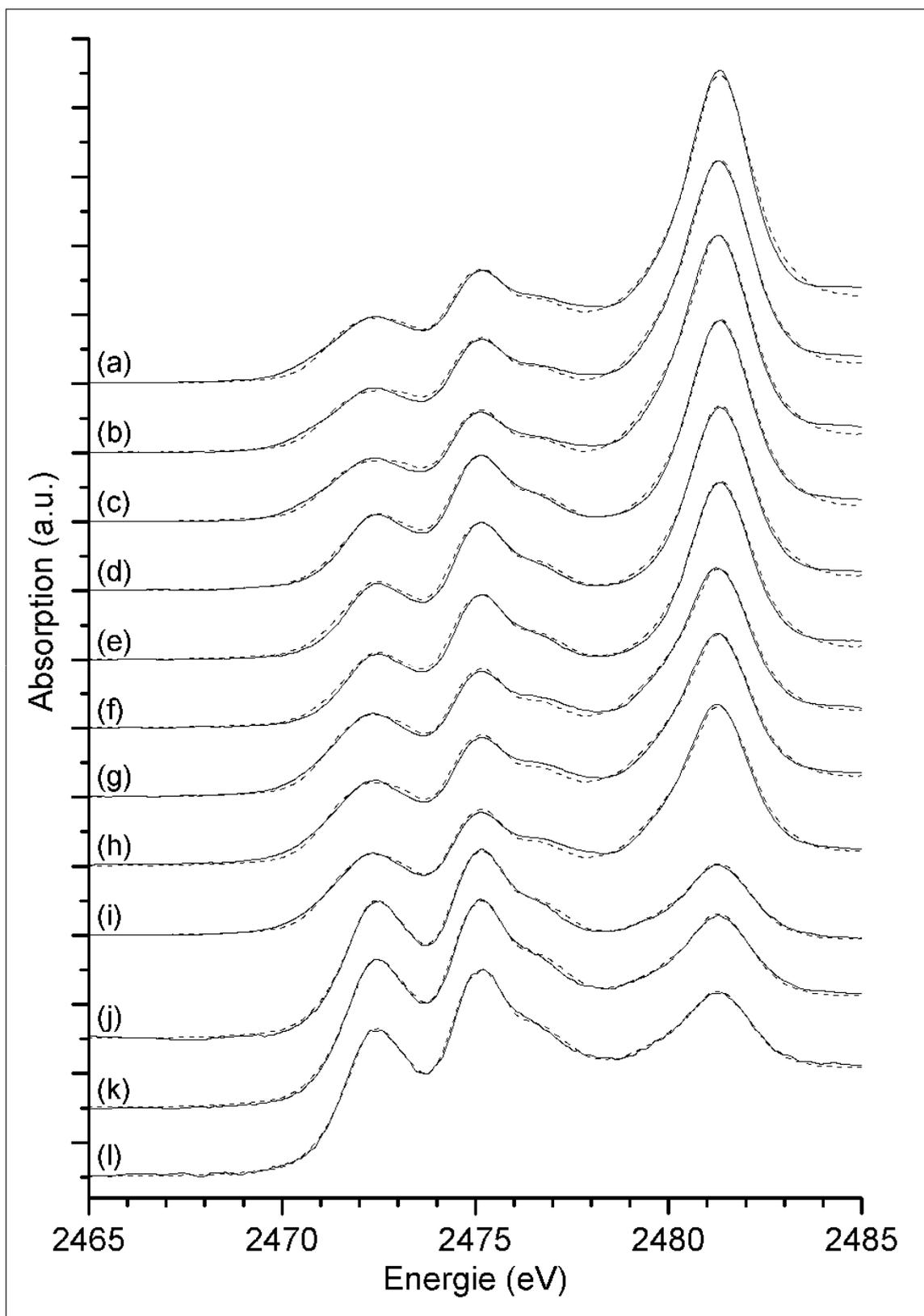


Abb. 6.9: Spektren der Triebe (durchgezogen) und Fit-Ergebnisse (gestrichelt)

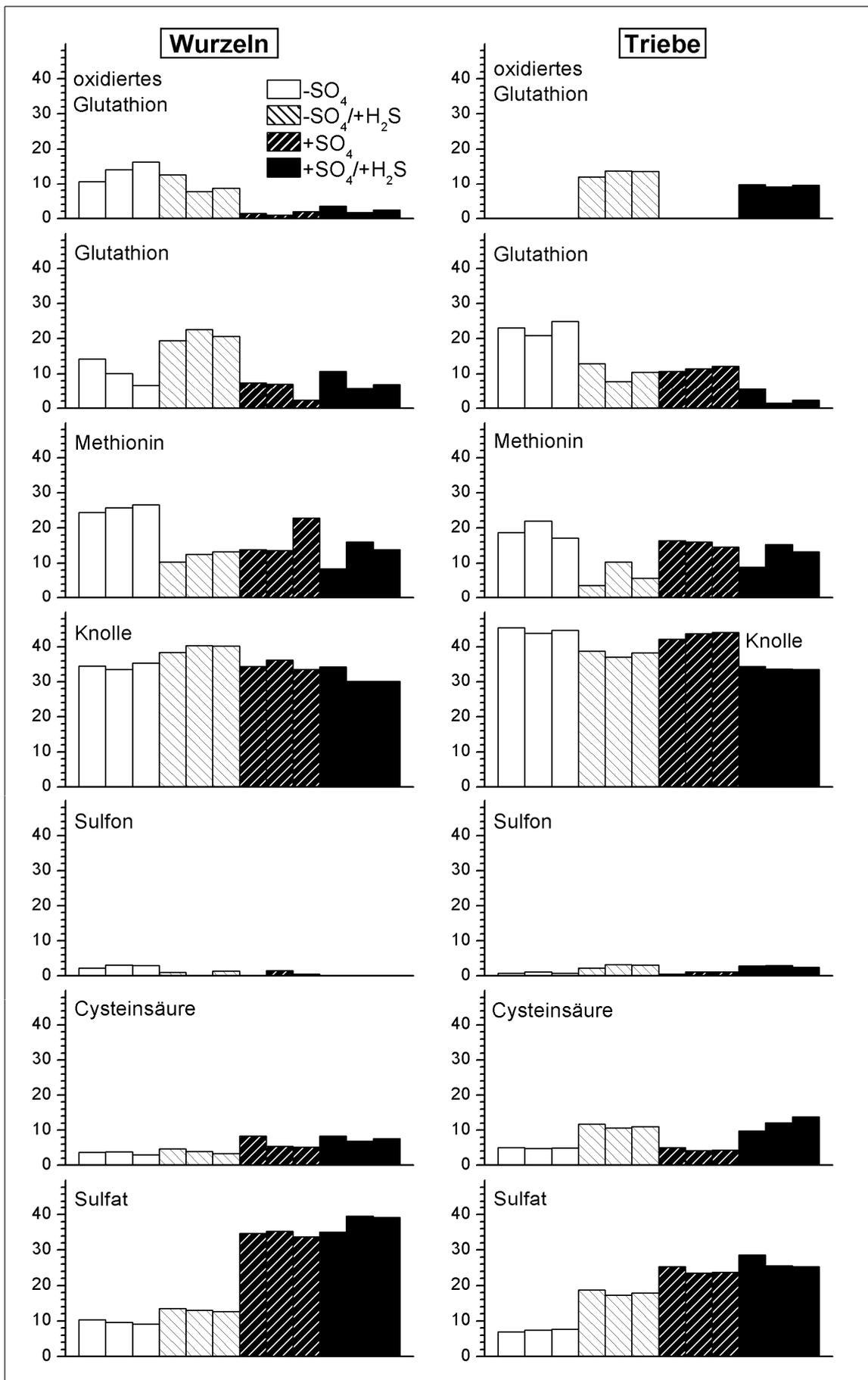


Abb. 6.10: Ergebnisse der quantitativen Analyse – Beiträge der einzelnen Referenzspektren in Prozent

Auch in den Trieben führt Sulfat-Mangel zu einer Verringerung der Sulfatkonzentration. Es ist nach [Dur04] anzunehmen, dass die Schwefelmenge (auf die gesamte Pflanze bezogen) bei Sulfatmangel konstant bleibt, der Sulfatgehalt sich jedoch aufgrund der Assimilation in organische Verbindungen verringert, was sich in einem abnehmenden Sulfat : Gesamtschwefel - Verhältnis widerspiegelt. Im Unterschied zu den Wurzeln weisen jedoch die Triebe der Sulfatmangel-Pflanzen nach Begasung mit H_2S eine deutlich erhöhte Sulfatkonzentration auf.

Die Sulfatkonzentration in den Trieben begaster Sulfatmangel-Pflanzen ist allerdings geringer als bei ausreichender Sulfat-Versorgung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Sulfatmangel-Pflanzen nach H_2S -Begasung weniger Schwefel in der Sulfat-Fraktion akkumulieren, sondern ihn vorwiegend in die organische Schwefelfraktion einbauen. In [Dur04] wird berichtet, dass auch bei ausreichender Sulfat-Versorgung die Begasung mit H_2S zu einer signifikanten Erhöhung der Sulfat-Konzentration in den Trieben führt. Dafür werden folgende mögliche Ursachen angeführt:

- Anreicherung aus der Nährlösung stammenden Sulfats in den Trieben, d. h. dort weitgehende Umstellung von Sulfatzufuhr über die Wurzeln auf H_2S als Schwefelquelle, ohne Minderung der Sulfat-Aufnahme durch die Wurzeln und des Transports zu den Trieben
- Oxidation von absorbiertem Sulfid aus der umgebenden Atmosphäre
- Zersetzung akkumulierter (sekundärer) Schwefelverbindungen (bzw. ihrer Präkursoren)

Eine derartige Anreicherung von Sulfat ist anhand der vorliegenden Messungen nicht eindeutig feststellbar, sondern allenfalls als schwacher Trend auszumachen.

Im Hinblick auf die Beiträge der Referenzsubstanzen mit SH-, SC- und Disulfidbindungen (reduziertes Glutathion, oxidiertes Glutathion und Methionin) zur Anpassung der Whiteline-Strukturen in den Spektren der Triebe fällt auf, dass ausschließlich bei den begasten Proben oxidiertes Glutathion (GSSG) einen Beitrag leistet - sowohl bei Sulfatmangel als auch bei ausreichender Sulfat-Versorgung. Dies ist auch unmittelbar anhand des spektralen Verlaufs der Absorption erkennbar (Abb. 6.11): In den Spektren der Triebe begaster Pflanzen ist die Whiteline zu niedrigeren Energien hin verschoben. Dies deutet auf einen höheren Gehalt an Substanzen mit Disulfidbindungen hin. Grundsätzlich könnte die Whiteline-Verschiebung auch von einer Verringerung des Gehalts an Verbindungen mit SH-Gruppen (Thiolen) infolge H_2S -Begasung herrühren. In [Dur04] ist jedoch vom gegenteiligen Effekt die Rede (zumindest was Nicht-Protein-Thiole betrifft), nämlich von einer Erhöhung des Thiol-Gehalts in den Trieben als Folge der direkten Verwertung von H_2S -Gas im Stoffwechsel. Welche Rolle Verbindungen mit SC-Bindungen (repräsentiert durch Methionin) im Hinblick auf die Whiteline-Verschiebung spielen, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse schwer einzuschätzen. In Abb. 6.10 sind diesbezüglich keine eindeutigen Trends erkennbar. Vermeintlich besonders hohe Methionin-Gehalte in den Sulfatmangelpflanzen sind auf die Normierung der Spektren (Nicht-Berücksichtigung des Gesamt-Schwefelgehalts) in Verbindung mit niedrigen Sulfat-Gehalten zurückzuführen. Anhand der Beiträge von Methioninsulfon und Cysteinsäure zu den Fitkurven ist bei den Trieben ein schwacher Trend zu entsprechenden Konzentrationserhöhungen bei Begasung erkennbar.

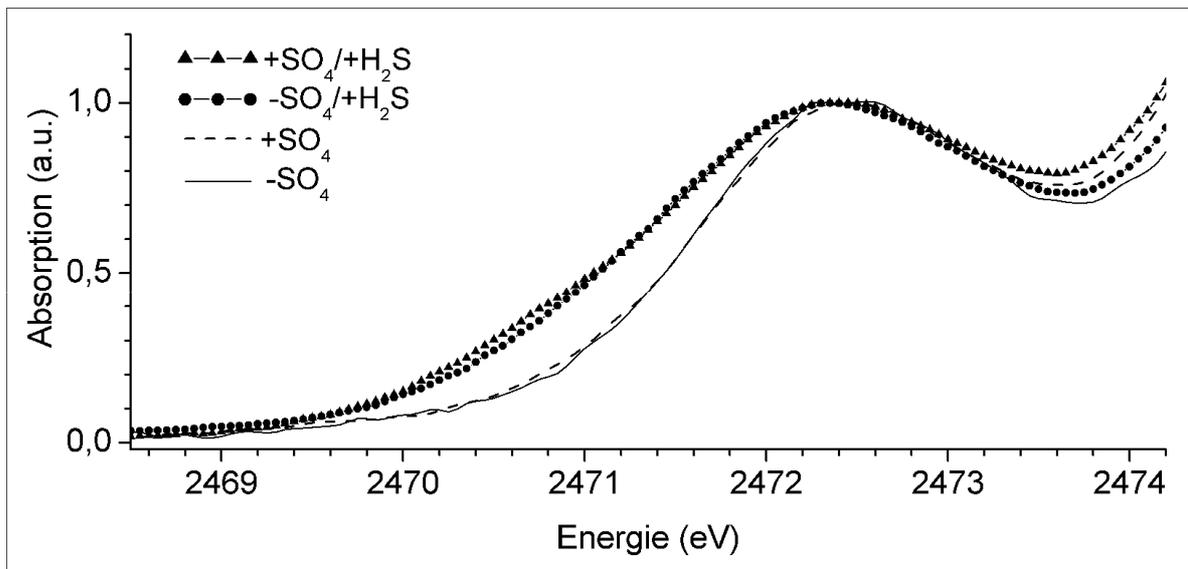


Abb. 6.11: Vergrößerter Ausschnitt der Spektren aus Abb. 6.7; die Spektren wurden jeweils auf die Intensität der Whiteline normiert.

Hinsichtlich der Beiträge von Sulfoxid-Verbindungen, bei denen es sich wahrscheinlich zu einem großen Teil um Alliine handelt, lassen die vorliegenden Ergebnisse keine Rückschlüsse auf eine signifikante Erhöhung der Konzentration an Alliinen in den Trieben zu. Allerdings ist zu bedenken, dass bei der hier zusammengefassten Auswertung der Gesamt-Schwefelgehalt der Proben nicht berücksichtigt wurde.

In [Dur04] wird von einer durch H_2S -Begasung hervorgerufenen Erhöhung des Gesamt-Schwefelgehalts der Triebe sowohl bei ausreichender Sulfat-Versorgung als auch (in geringem Umfang) bei Sulfat-Mangel berichtet. Diese Schwefel-Akkumulation infolge H_2S -Begasung wird zu einem erheblichen Teil auf eine Erhöhung des Gehalts an γ -Glutamyl-Peptiden und/oder Alliinen zurückgeführt (Stoffwechsel-Umwandlung des absorbierten H_2S in sekundäre Schwefelverbindungen wie γ -Glutamyl-Peptide, Alliine). Schwefelhaltige Sekundäre Inhaltsstoffe bilden demzufolge eine Senke für durch die Blätter absorbiertes Sulfid.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Messungen weisen darauf hin, dass sich die Sulfoxid-Konzentration (bezogen auf den Gesamt-Schwefel-Gehalt) bei Begasung weder in großem Umfang erhöht noch dramatisch abnimmt. Unter der Annahme einer zumindest bei ausreichender Sulfat-Versorgung beträchtlichen Zunahme des Gesamt-Schwefelgehalts in den Trieben infolge H_2S -Begasung (wie in [Dur04] beschrieben) folgt daraus, dass sich der Gehalt an diesen Sulfoxid-Verbindungen bei H_2S -Begasung durchaus erhöht.

7 Schwefelhaltige Verbindungen in Kaffeebohnen und Einfluss des Röstens auf die Schwefel-Speziation

7.1 Kennzeichnung des Probensystems

Seitens der Wirtschaft besteht ein großes Interesse an der Charakterisierung von (u. a. herkunftsbedingten) Qualitätsmerkmalen des Kaffees [Mai84], der chemischen Zusammensetzung und der Identifizierung von Inhaltsstoffen, insbesondere von aromarelevanten Substanzen - die sich größtenteils während des Röstens bilden - und an Möglichkeiten der Prozessoptimierung bei der Verarbeitung (Rohkaffee-Aufarbeitung [Teu04], Röstverfahren [Sch02]/[Bel08], Entkoffeinierung[Bal07]/[Mai84]). Daraus resultiert eine Vielzahl an wissenschaftlichen Publikationen, vorwiegend im Bereich der Lebensmittelchemie (z. B. [Cze00]/[Mun03]). Die medizinische Forschung befasst sich intensiv mit den physiologischen Wirkungen und den gesundheitlichen Konsequenzen des Kaffeekonsums [Hig06].

Als 'Kaffeebohnen' werden die vom Fruchtfleisch befreiten Samen der Steinfrüchte (Kaffeekirschen) des Kaffeebaumes bezeichnet - eine Pflanze der Gattung *Coffea* (Familie der Rubiaceae). Die *Coffea*-Art '*Coffea arabica*' liefert rund 75 %, die Sorte '*C. canephora*' (insbesondere var. *robusta*) etwa 25 % der Welterzeugung [Bel08]/[Bal07]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Arabica-Bohnen untersucht. Bei der 'trockenen Verarbeitung' wird das Fruchtfleisch der Kaffeekirschen nach dem Trocknen entfernt, während bei der 'nassen' Verarbeitung ein Großteil des Fruchtfleisches ohne vorheriges Trocknen maschinell abgequetscht und der Rest mittels Fermentation in Gärbassins durch Enzyme und ggf. auch Mikroorganismen gelockert und dann mit Wasser entfernt wird [Teu04].

Die mengenmäßig vorherrschenden Inhaltsstoffe von Rohkaffee sind Kohlenhydrate (Oligo- und Polysaccharide, Zellulosen), Fettstoffe, Wasser, Proteine, pflanzliche Säuren (z. B. Chlorogensäure), Alkaloide (u. a. Koffein) und Mineralstoffe. Außerdem enthalten Kaffeebohnen eine Vielzahl an Aromastoffen, allerdings in vergleichsweise geringen Konzentrationen (vor allem bei Rohkaffee [Bel08]/[Mai84]). Die genaue chemische Zusammensetzung des Rohkaffees hängt entscheidend von Sorte und Herkunft ab [Teu04].

Beim Rösten der Rohkaffeebohnen verändern sich Struktur (Konsistenz) und Farbe der Bohnen (Braunfärbung durch thermische Zersetzung der organischen Substanz, die Bohnen werden spröde) infolge pyrolytischer und nichtenzymatischer Bräunungsreaktionen, von denen die Maillardreaktion die bedeutendste ist, und in deren Verlauf zahlreiche Aroma- und Geschmacksstoffe (laut [Bal07] kennt man bisher über 600) gebildet werden, die in ihrer Gesamtheit das Kaffeearoma ausmachen [Bel08]/[Mai84]. Das Rösten führt außerdem zu einer drastischen Abnahme des Gehalts an Wasser (Abnahme auf 2-3 %) und an verwertbaren Kohlenhydrate (Abnahme auf 1,5%) [Teu04]. Laut [Fra96] sind bisher im Röstkaffee über 800 flüchtige Aromastoffe nachgewiesen worden, die aber nur 0,1 % (!) der Gesamtsubstanz des Kaffees ausmachen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Schwefel-K-XANES-Spektren an (überwiegend gemahlenden) grünen und gerösteten Kaffeebohnen gemessen. Laut [Tre81] sind in geröstetem Kaffee über 100 Schwefelverbindungen nachgewiesen worden. Schwefelhaltige Substanzen spielen eine wichtige Rolle für Kaffee-Geschmack und Aroma [Teu04].

Im Vergleich zu anderen Methoden handelt es sich bei der Röntgenabsorptionsspektroskopie insofern im eingeschränkten Sinn um ein 'in situ' –Messverfahren, als die Analyse der Proben keine Extraktionsprozesse bzw. nasschemische Verfahren beinhaltet.

Bislang liegen noch keine Veröffentlichungen über XANES-Messungen an diesem Proben-system vor. Messungen an der Schwefel–K–Absorptionskante erfassen naturgemäß ausschließlich schwefelhaltige Verbindungen, wodurch die Komplexität des Probensystems re-duziert wird.

7.2 Probenpräparation

Rohe und nach einem traditionellen Verfahren handgeröstete äthiopische Wildkaffee-Bohnen wurden vom Institut für Pflanzenkrankheiten (INRES, Abteilung Phytomedizin) der Universi-tät Bonn zur Verfügung gestellt. Die aus der Chiapas-Region in Mexiko stammenden Rohkaf-fee-Bohnen wurden Beständen der Abteilung 'Rohkaffee-Einkauf' (green bean supply) der 'Community-Coffee'-Rösterei in Baton Rouge entnommen. Die übrigen fünf Rohkaffee-Proben wurden per Versand ('Sweet Maria's Home Coffee Roasting Supplies', Oakland / USA) bezogen. Es handelte sich um äthiopische 'Harrar'-, 'Yirgacheffe'- und 'Sidamo'-Bohnen (letztere je einmal aus trockener und nasser Aufbereitung) sowie um einen Satz ko-lumbianischer 'Huila'-Bohnen (alles 'single origin'). Abgesehen von den handgerösteten äthi-opischen Wildkaffee-Bohnen wurden alle grünen Kaffeebohnen in einem Teströster mit verti-kal rotierender Trommel über offener Flamme bei ca. 190 °C geröstet. Des Weiteren wurden noch sieben Röstkaffee-Produkte als ganze Bohnen im Einzelhandel erworben.

Während Rohkaffee mindestens ein Jahr gelagert werden kann ([Bal07]/[Bel08]), durchlaufen Röstkaffee-Bohnen bei Lagerung an Luft und bei Zimmertemperatur innerhalb weniger Tage einen merklichen Alterungsprozess, der insbesondere mit Aromaverlust einhergeht [Fra96]. Daher wurden die gerösteten Bohnen unmittelbar nach dem Rösten und dem anschließenden Abkühlen auf einem Sieb in Kunststoffbeutel vakuumverpackt und im Kühlschrank gelagert. Das Mahlen der Kaffeebohnen zu feinem Pulver verkürzt bekanntermaßen die Haltbarkeit zusätzlich und erfolgte daher erst unmittelbar vor Beginn der Messungen am Strahlrohr. Das Pulver wurde als homogene Schicht auf selbstklebendem, schwefelfreiem Kaptonband ver-teilt, mit Polypropylenfolie bedeckt und im Fluoreszenzmodus unter Spülen mit Helium (sie-he Kap. 3) gemessen. Lediglich bei einer Messung wurden unzerkleinerte geröstete Kaffee-bohnen mit der flachen Seite auf schwefelfreies Kaptonband geklebt und ebenfalls mit Po-lypropylenfolie bedeckt, siehe unten.

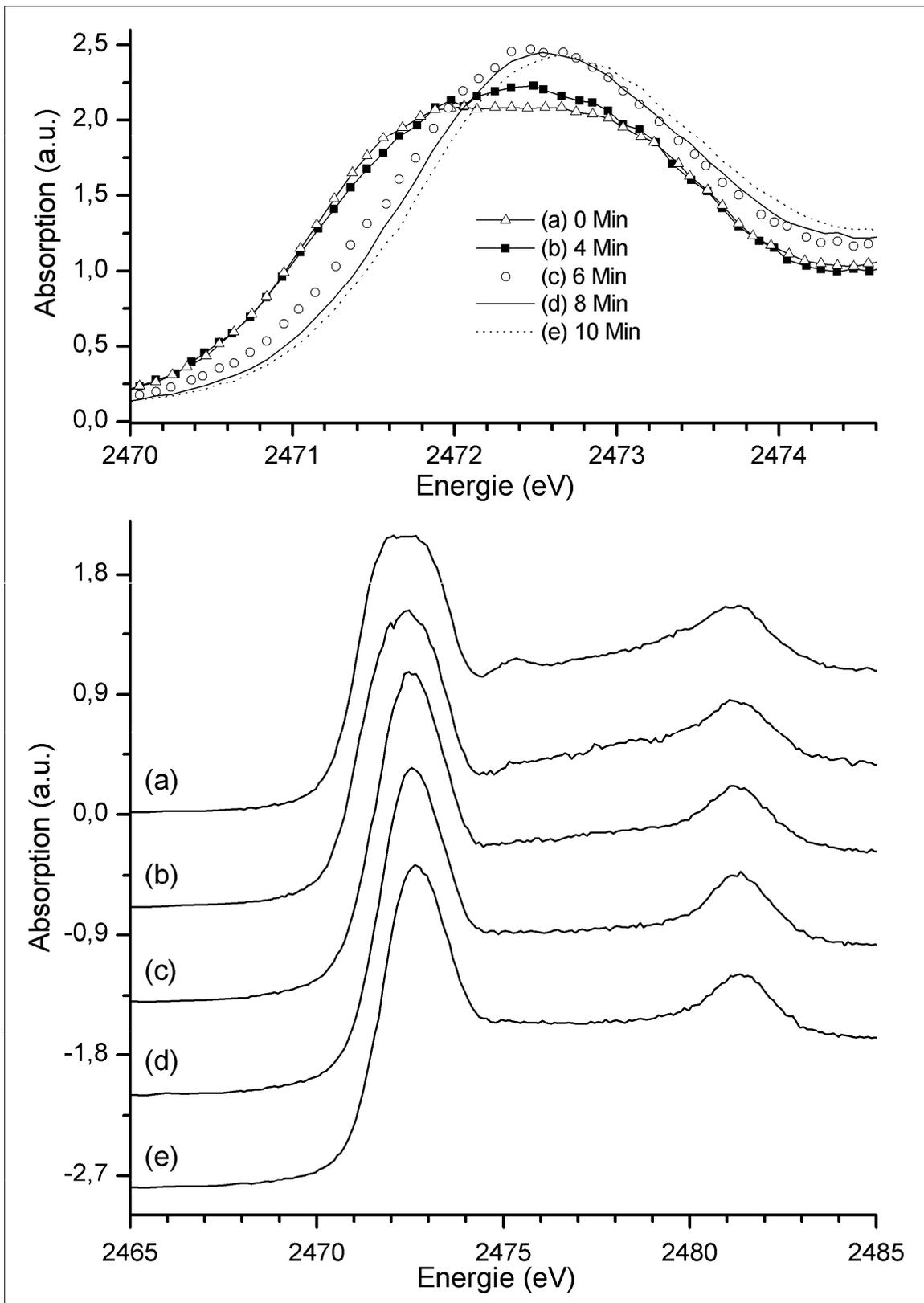


Abb. 7.1: Schwefel-K-XANES-Spektren mexikanischer Kaffeebohnen:
 (a) Rohkaffee, (b) Röstdauer 4 min, (c) Röstdauer 6 min,
 (d) Röstdauer 8 min, (e) Röstdauer 10 min

7.3 Messergebnisse und Aussagen

Einige Unterschiede zwischen den XANES-Spektren mexikanischer Kaffeebohnen verschiedener Röstgrade (aus dem Teströster) sind in Abb. 7.1 zu erkennen. Um auch Auswirkungen extremen Überröstens einzubeziehen, wurde die maximale Röstdauer mit 10 Minuten bewusst jenseits des Punktes gewählt, an dem der Röstvorgang üblicherweise spätestens beendet wird (pechschwarze Bohnen).

Das Spektrum der Rohkaffee-Bohnen (Abb. 7.1(a)) weist eine Whiteline mit einem Maximum bei 2472,4 eV auf, die höchstwahrscheinlich einer Überlagerung von C-S-/S-H-(Cystein, Methionin, Glutathion) und Disulfid(oxidiertes Glutathion)-Bindungen entstammt, was der typischen atomaren Umgebung von Schwefelatomen in biologischen Systemen entspricht, z. B. in der Protein-Matrix aufgrund der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Mit steigender Röstdauer wird die 'Whiteline' intensiver sowie schmaler und verschiebt sich zu höheren Energien, was auf eine Oxidation bzw. ein Aufbrechen (und damit eine Abnahme) von Disulfidbindungen hinweist. Vergleichbare Änderungen der Whiteline sind in den Spektren von Weizenkleber-Proben beobachtet worden [Pra01b].

Abgesehen von der Whiteline weisen alle Spektren in Abb. 7.1 eine mehr oder weniger ausgeprägte Struktur bei 2481,4 eV auf, die ein Beleg für das Vorhandensein von Sulfatverbindungen in der Probe ist. Dieser Befund überrascht nicht, da Sulfatverbindungen in den meisten Pflanzen vorhanden sind [Mar95] - nicht zuletzt, weil der Schwefelbedarf für das Pflanzenwachstum hauptsächlich durch Aufnahme von Sulfatverbindungen gedeckt wird (siehe Kap. 6). Die Sulfatkonzentration in den Kaffeebohnen wird bei diesem Probenatz offensichtlich nicht signifikant vom Röstprozess beeinflusst.

In den Spektren der grünen Bohnen ist ein schwaches lokales Maximum bei 2475,3 eV erkennbar, das jedoch während des Röstens verschwindet. Diese Struktur kann einem Rydberg-Zustand zugeordnet werden, der auf S-H-Bindungen hinweist [Pra02] oder Verbindungen mit einer Sulfoxid-Gruppe.

Abb. 7.2 zeigt Schwefel-K-XANES-Spektren grüner und handgerösteter äthiopischer Wildkaffee-Bohnen. Prinzipiell tauchen in den Spektren die gleichen Strukturen wie beim mexikanischen Kaffee auf: Eine 'Whiteline' bei 2472,4 eV, ein von Sulfatverbindungen herrührendes lokales Maximum bei 2481,2 eV und ein weiteres lokales Maximum bei 2475,3 eV, das auf Verbindungen mit einer Sulfoxid-Gruppe hinweist. Diese Resonanz wird im Folgenden als 'sulfoxidische Struktur' bezeichnet.

Offensichtlich hat das Rösten bei diesen Proben einen ähnlichen Einfluss auf die Whiteline wie im Falle der zuvor untersuchten mexikanischen Kaffeebohnen: Die Whiteline wird verstärkt, schmaler und zu höheren Energien (2472,6 eV) hin verschoben. Dies könnte auf ein Aufbrechen von Disulfid-Bindungen bzw. die Bildung neuer Schwefelverbindungen zurückzuführen sein. Wie im Falle der Kaffeebohnen aus der Chiapas-Region ändert sich offensichtlich der Sulfatgehalt der äthiopischen Wildkaffee-Bohnen infolge des Röstens nicht (der Sulfatpeak wird schmaler, aber nicht intensiver). Im Unterschied zum mexikanischen Kaffee bleibt jedoch im Spektrum des äthiopischen Wildkaffees das lokale Maximum bei ca. 2475,3 eV auch nach dem Rösten erhalten - es wird sogar verstärkt.

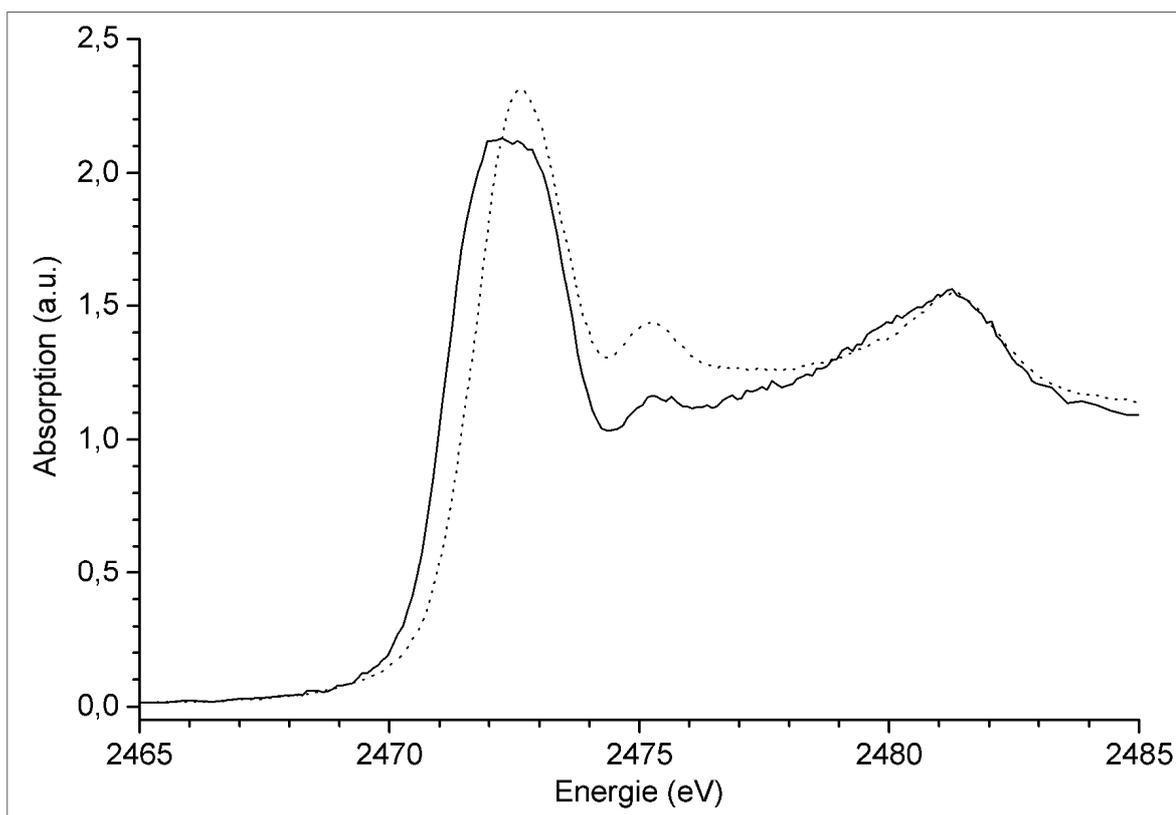


Abb. 7.2: Schwefel-K-XANES-Spektren grüner (durchgezogene Kurve) und handgerösteter (gepunktete Kurve) äthiopischer Wildkaffee-Bohnen

Abb. 7.3 zeigt Spektren einiger im Handel als ungemahlene Bohnen erhältlicher Arabica-Röstkaffeeprodukte. Handelsüblicher Röstkaffee ist eine Mischung unterschiedlicher Provenienzen, die meist getrennt geröstet werden. Die genaue Zusammensetzung dieser Mischungen, die Herkunftsländer und die Röstverfahren sind bei diesen Produkten nicht bekannt und werden vom Hersteller unter Verschluss gehalten. Trotzdem können solche Proben für Orientierungsmessungen nützlich sein.

Im Wesentlichen weisen die Spektren dieser Messreihe die gleichen Strukturen auf wie die der bisher untersuchten Proben. Die Spektren der Sorten 'Louisiana Dark Roast Blend' und 'Louisiana Dark Roast Blend Decaffeinated' (Abb. 7.3(d)) sind praktisch deckungsgleich. Die Entkoffeinierung hat demnach keinen Einfluss auf die Schwefelspeziation, was insofern Sinn ergibt, als Koffein keine schwefelhaltige Verbindung ist. Mit Ausnahme der Sorte 'Colombia Dark Roast' (Abb. 7.3(f)) sind die Spektren dieser Röstkaffeeprodukte dem Spektrum der im Teströster präparierten mexikanischen Kaffeebohnen (zum Vergleich noch einmal in Abb. 7.3 eingefügt) weit ähnlicher als dem der handgerösteten äthiopischen Bohnen (ebenfalls noch einmal in Abb. 7.3 eingefügt), abgesehen von geringfügigen Unterschieden in den Whiteline-Intensitäten und Sulfat-Beiträgen.

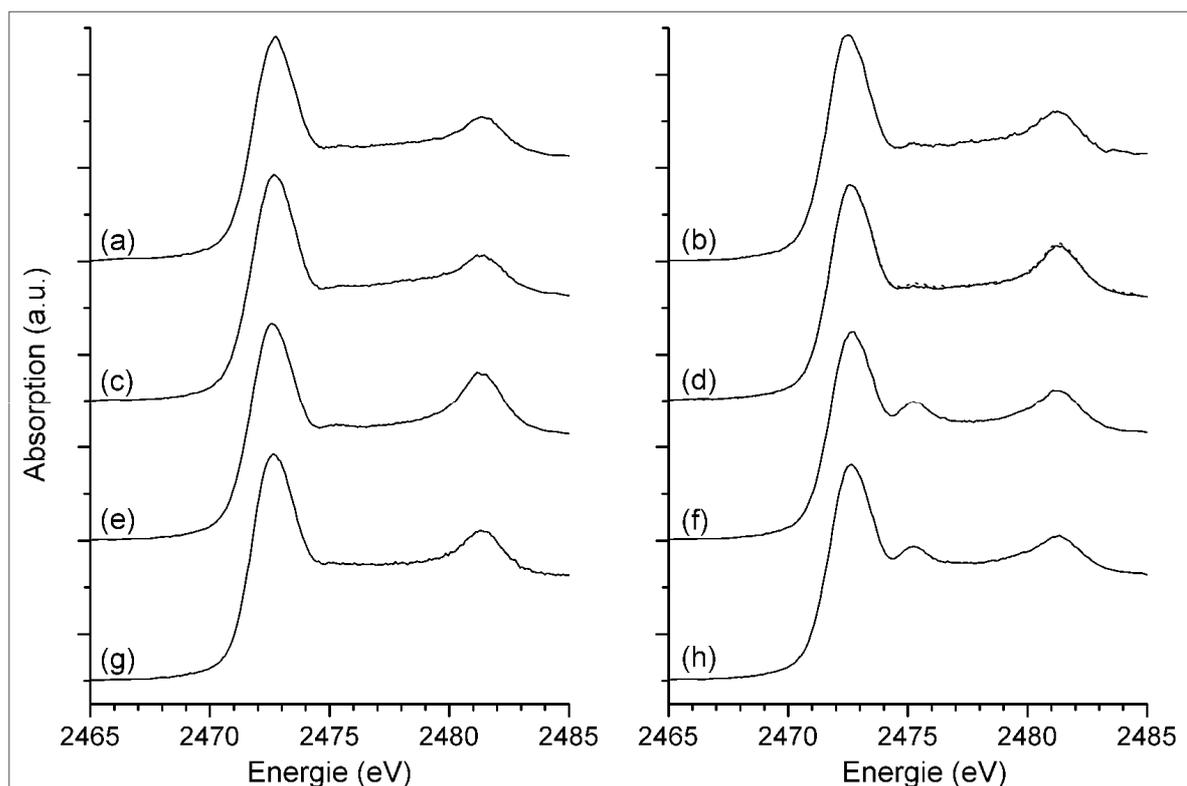


Abb. 7.3: Spektren einiger als ungemahlene Bohnen im Handel erhältlicher Röstkaffee-Produkte: a) 'Guatemala Antigua', b) 'Kenya', c) 'French Quarter Fusion', d) 'Louisiana Dark Roast blend'- koffeinhaltig (durchgezogene Linie) und entkoffeiniert (gestrichelte Linie), e) 'Colombia Medium Dark', f) 'Colombia Dark Roast Decaffeinated' g) mexikanische Kaffeebohnen h) handgerösteter äthiopischer Wildkaffee (g, h aus Abb. 7.1 bzw. 7.2)

Ein lokales 'sulfoxidisches' Maximum bei ca. 2475 eV ist lediglich bei der Sorte 'Colombia Dark Roast Decaffeinated' (Abb. 7.3(f)) deutlich auszumachen. Unter der vorsichtigen Annahme, dass sich die Sorten 'Colombia Medium Roast' und 'Colombia Dark Roast Decaffeinated' hinsichtlich der Zusammensetzung aus Bohnen unterschiedlicher Provenienz und der Mischungsverhältnisse nur unwesentlich unterscheiden (anhand der Produktbezeichnung nahe liegend), und dass die Entkoffeinierung keinen Einfluss auf die Schwefelspeziation hat (anhand der 'Louisiana Dark Roast'-Proben wahrscheinlich), ergibt sich - aber nur bei dieser Probe - eine Parallele zum Einfluss des Röstens auf die Spektren des äthiopischen Wildkaffees: Beim Rösten nimmt der relative Gehalt an Verbindungen mit Sulfoxid-Gruppen zu.

Um zu untersuchen, ob die Verstärkung der 'sulfoxidischen' Struktur in den XANES-Spektren infolge Röstens in erster Linie auf die Herkunft oder auf die spezielle Rösttechnik zurückzuführen ist, wurde für die folgende Messreihe äthiopischer Wildkaffee im Teströster präpariert. Ferner wurden drei der bekanntesten äthiopischen Kaffeesorten ('Sidamo' aus trockener und nasser Aufarbeitung, 'Harrar' und 'Yirgacheffe') als 'Single Origin'-Rohkaffeebohnen über den Handel bezogen. Es handelt sich hierbei mit Sicherheit nicht um Wildkaffee, der auf dem freien Markt äußerst schwer erhältlich ist. Nachdem sich

unter den handelsüblichen Röstkaffee-Produkten ein kolumbianischer Kaffee befand, in dessen Spektrum - wie bei den handgerösteten äthiopischen Wildkaffee-Bohnen (siehe Abb. 7.3) – nach dem Rösten die Sulfoxidstruktur nicht völlig verschwand, wurden außerdem noch kolumbianische Rohkaffee-Bohnen (‘Huila’) eingekauft und im Teströster behandelt.

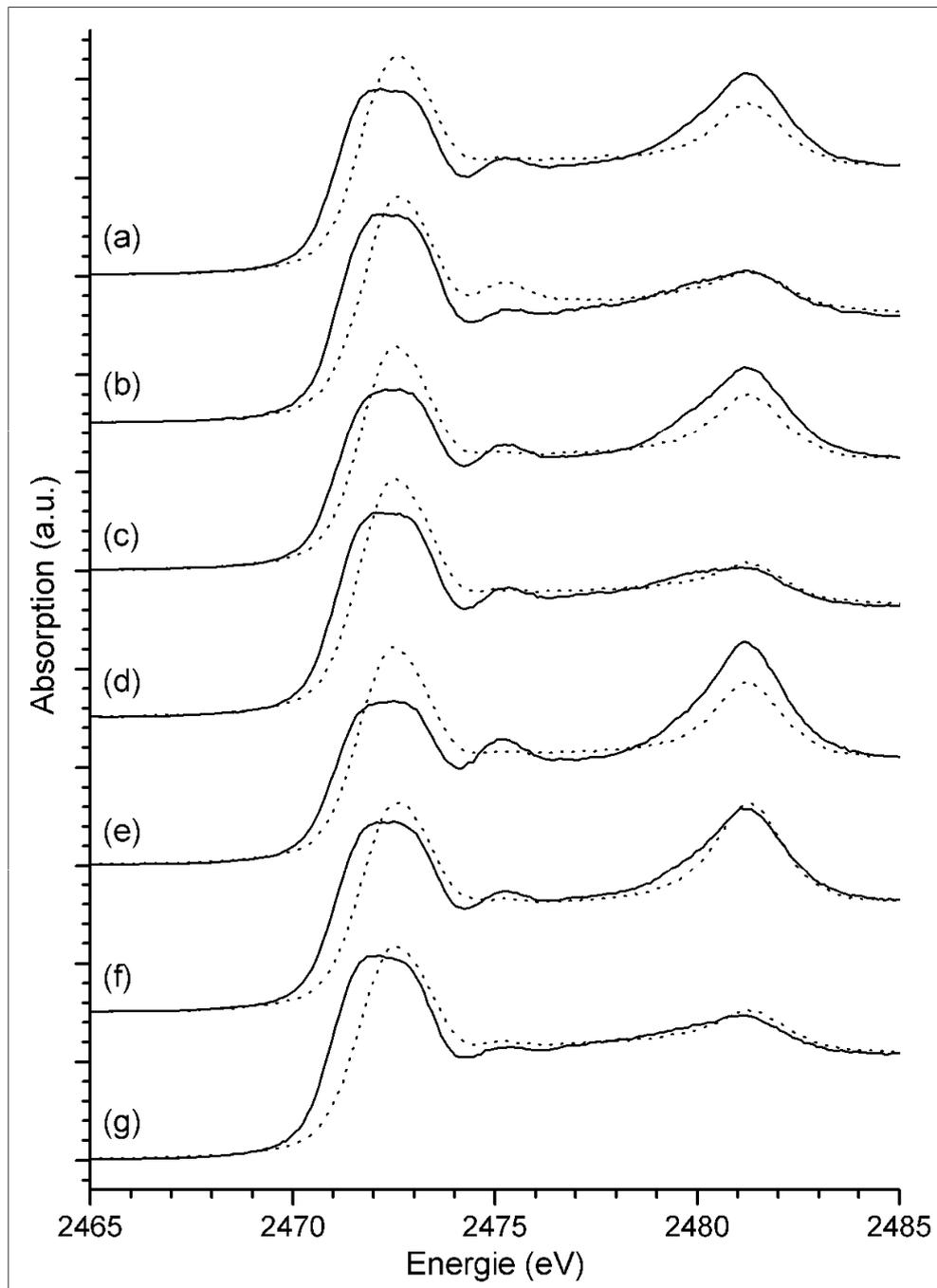


Abb. 7.4: Schwefel-K-XANES-Spektren grüner (durchgezogene Kurven) und gerösteter (gestrichelte Kurven) Kaffeebohnen:
 (a) äthiopischer Wildkaffee, (b) grüne und handgeröstete äthiopische Wildkaffee-Bohnen, (c) äthiopische ‘Sidamo’-Bohnen aus trockener Aufarbeitung, (d) äthiopische ‘Sidamo’-Bohnen aus nasser Aufarbeitung, (e) äthiopische ‘Harrar’-Bohnen, f) äthiopische ‘Yirgacheffe’-Bohnen (g) kolumbianische ‘Huila’-Bohnen
 (Daten für Kurve (b) aus Abb. 7.2 übernommen)

Da der Röstgrad entscheidend von der Beschaffenheit der jeweiligen Kaffeebohnen (insbesondere deren Größe) abhängt, wurde für jede Kaffeesorte eine individuelle Röstdauer gewählt, um innerhalb dieser Messreihe Kaffeebohnen vergleichbaren Röstgrades zu erhalten.

In Abb. 7.4 sind die XANES-Spektren aller im Teströster präparierten Kaffeebohnen vor und nach dem Rösten zusammengefasst. Zum Vergleich wurden die Spektren der grünen und handgerösteten äthiopischen Kaffeebohnen, die bereits in Abb. 7.2 gezeigt wurden, ebenfalls hinzugefügt. Innerhalb dieser Messreihe sind – wie bei den bereits gezeigten Spektren - drei lokale Absorptionsmaxima zu erkennen: Whiteline, Sulfat und (zumindest bei den Rohkaffee-Proben) eine 'Sulfoxid-Struktur'.

Bei jedem der in Abb. 7.4 zusammengefassten Spektren führt das Rösten offensichtlich zu einer Verstärkung der Whiteline und einer Verschiebung zu höheren Energien. Die Beiträge sechswertigen Schwefels zur Absorption werden durch das Rösten entweder verringert (Abb. 7.4 (a), (c), (e)) oder sie bleiben konstant (Abb. 7.4(b), (d), (f), (g)).

In allen Rohkaffee-Spektren in Abb. 7.4 ist ein mehr oder weniger ausgeprägtes lokales Maximum bei einer Energie von 2475,3 eV vorhanden. In den Spektren der im Teströster präparierten Proben verschwindet diese Struktur beim Rösten. Lediglich im Spektrum der gerösteten kolumbianischen 'Huila'-Bohnen bleibt ein – wenn auch extrem schwaches – lokales Maximum erhalten (in Abb. 7.4 ohne Vergrößerung kaum zu erkennen). Stattdessen wird der Spektralbereich zwischen Whiteline und Sulfat gleichmäßig aufgefüllt. Einzig im Spektrum der handgerösteten äthiopischen Wildkaffee-Bohnen ist diese Struktur auch nach dem Rösten deutlich erkennbar, was zu der Annahme führt, dass Unterschiede hinsichtlich der Röstverfahren einen größeren Einfluss auf die XANES-Spektren haben als die Herkunft der Rohkaffee-Bohnen.

'Sidamo'-Kaffeebohnen aus trockener bzw. nasser Verarbeitung unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich der Intensitätsverhältnisse zwischen Whiteline und Sulfat-Maximum. In den beiden Spektren der grünen 'Sidamo'-Bohnen ist die Sulfoxid-Struktur ungefähr gleich intensiv.

Um den Effekt des Mahlens auf die Schwefelspeziation zu untersuchen, wurden weitere Messungen durchgeführt. Bei den bisherigen Experimenten wurden die Kaffeebohnen unmittelbar vor der jeweiligen Messung zu feinem Pulver zermahlen. Beim Mahlen ist jedoch neben der Zerkleinerung auch eine Erwärmung und bei Anwesenheit von Sauerstoff damit einhergehend eine thermische Oxidation des Probenmaterials zu erwarten. Abb. 7.5(a) zeigt einen Vergleich der XANES-Spektren ganzer und an Luft gemahlener 'Huila'-Röstkaffee-Bohnen (Daten aus Abb. 7.4). Die Spektren unterscheiden sich erheblich. Möglicherweise liefert die Messung an der ganzen Bohne im Wesentlichen die Absorptionscharakteristika des Probenmaterials im oberflächennahen Bereich, während bei einer Messung des Pulvers quasi über das gesamte Volumen der Kaffeebohnen gemittelt wird. Die Eindringtiefe der anregenden Strahlung ist in diesem Fall schwer abzuschätzen (bei biologischen Proben wird häufig die Eindringtiefe in Wasser betrachtet, bei Kaffeebohnen nimmt der Wassergehalt beim Rösten drastisch ab [Teu04]).

In Abb. 7.5(b) werden Spektren von 'Huila'-Röstkaffee-Bohnen verglichen, die einerseits an Luft, andererseits unter Stickstoff in einer Glovebox gemahlen wurden. Die Unterschiede zwischen den Spektren sind minimal: Bei den an Luft zerkleinerten Bohnen ist die Whiteline geringfügig intensiver und der Beitrag des sechswertigen Schwefels etwas geringer als beim unter Stickstoff gemahlenden Material. Ein direkter oxidativer Einfluss des Mahlens auf die Schwefelspeziation ist nicht zu erkennen.

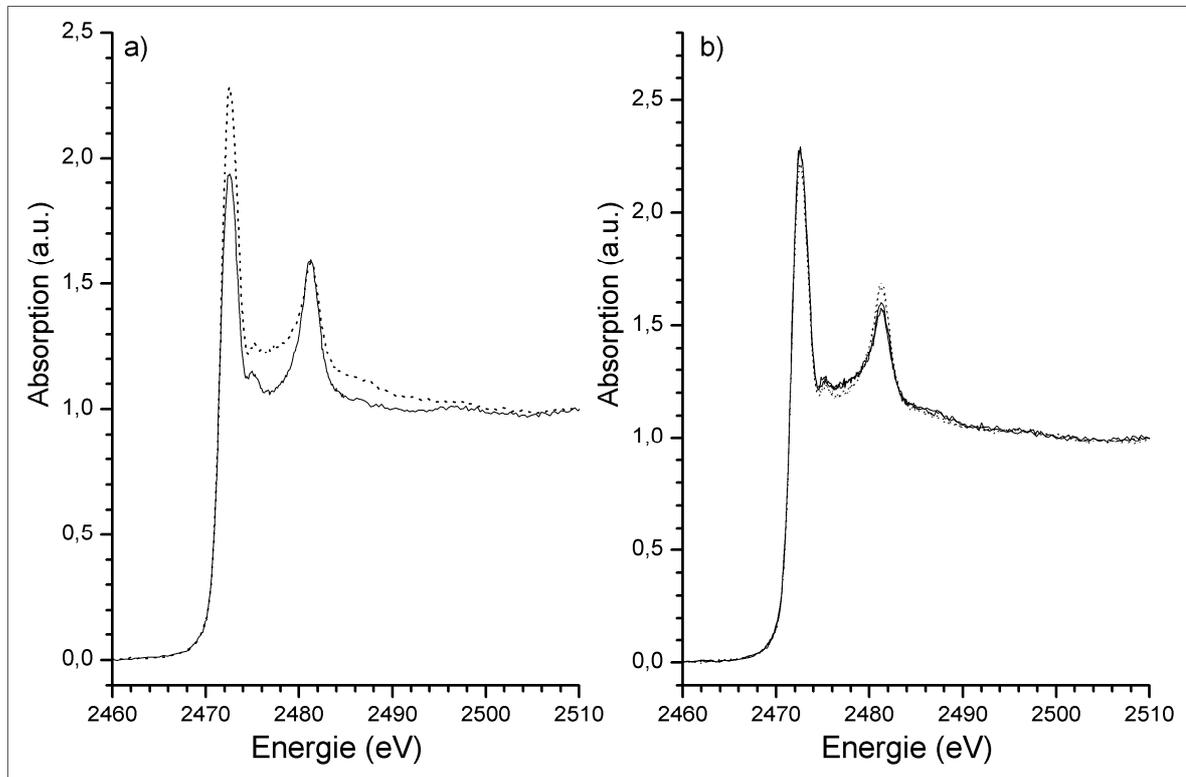


Abb. 7.5: Kolumbianischer 'Huila'-Röstkaffee: a) Vergleich der Spektren ganzer (durchgezogene Kurve) und an Luft gemahlener (gepunktete Kurve) Kaffeebohnen, b) Vergleich der Spektren an Luft (durchgezogene Kurve, aus Abb. 7.4 übernommen) bzw. unter Stickstoff gemahlener Bohnen (gepunktet)

Schließlich war noch zu untersuchen, welche Verbindungen bei Extraktion des Kaffeegetränks mit heißem Wasser aus dem Röstkaffeepulver gelöst werden. Abb. 7.6(a) zeigt Spektren gemahlener 'Huila'-Röstkaffee-Bohnen nach Extraktion des Kaffeegetränks durch 'sofortiges' Hand-Filtern bzw. durch fünfminütiges Aufkochen und anschließendes Filtern (Messungen an dem Filter entnommenen Rückständen). Zum Vergleich wurde in diese Abbildung noch einmal das Spektrum der gemahlenden 'Huila'-Röstkaffee-Bohnen vor der Extraktion aus Abb. 7.4 übernommen.

Bei den Rückständen im Filter war die Signalstärke (Schwefel- K_{α} -Fluoreszenzausbeute) vergleichsweise gering. Dies könnte - falls nicht auf die Feuchtigkeit der Probe - darauf zurückgeführt werden, dass der größte Teil der im Röstkaffeepulver enthaltenen Schwefelverbindungen in Lösung geht, d. h. ins Filtrat. Im Vergleich zum trockenen Pulver ist im Spektrum des handfiltrierten Pulvers die Whiteline geringfügig gedämpft. Im Spektrum des nach fünfminütigem Aufkochen und anschließender Filtration dem Filter entnommenen Rückstandes

ist die Whiteline-Intensität mit der im Spektrum des trockenen Pulvers identisch. Für beide Rückstände fällt der Sulfat-Peak schwächer und das 'sulfoxidische' lokale Absorptionsmaximum bei 2475 eV deutlich stärker aus als beim trockenen Pulver. Abb. 7.6(b) zeigt das XANES-Spektrum eines im Handel erhältlichen 'Dark Roast'-Röstkaffee-Pulvers und das Spektrum dieses Pulvers einige Zeit nach Zubereitung eines Kaffeegetränks in der Kaffeemaschine (dem Filter entnommen). Auch hier zeigen sich zwischen dem Spektrum des trockenen Pulvers und dem des Filter-Rückstandes erhebliche Unterschiede, die sowohl von Löslichkeitsdifferenzen der im Pulver enthaltenen Schwefelverbindungen als auch von Reaktionen des Kaffeepulvers mit dem heißen Wasser herrühren können.

Einige der bei Interpretation dieser Ergebnisse offenen Fragen sollten durch (künftige) Messungen an der extrahierten Flüssigkeit ('Getränk') geklärt werden.

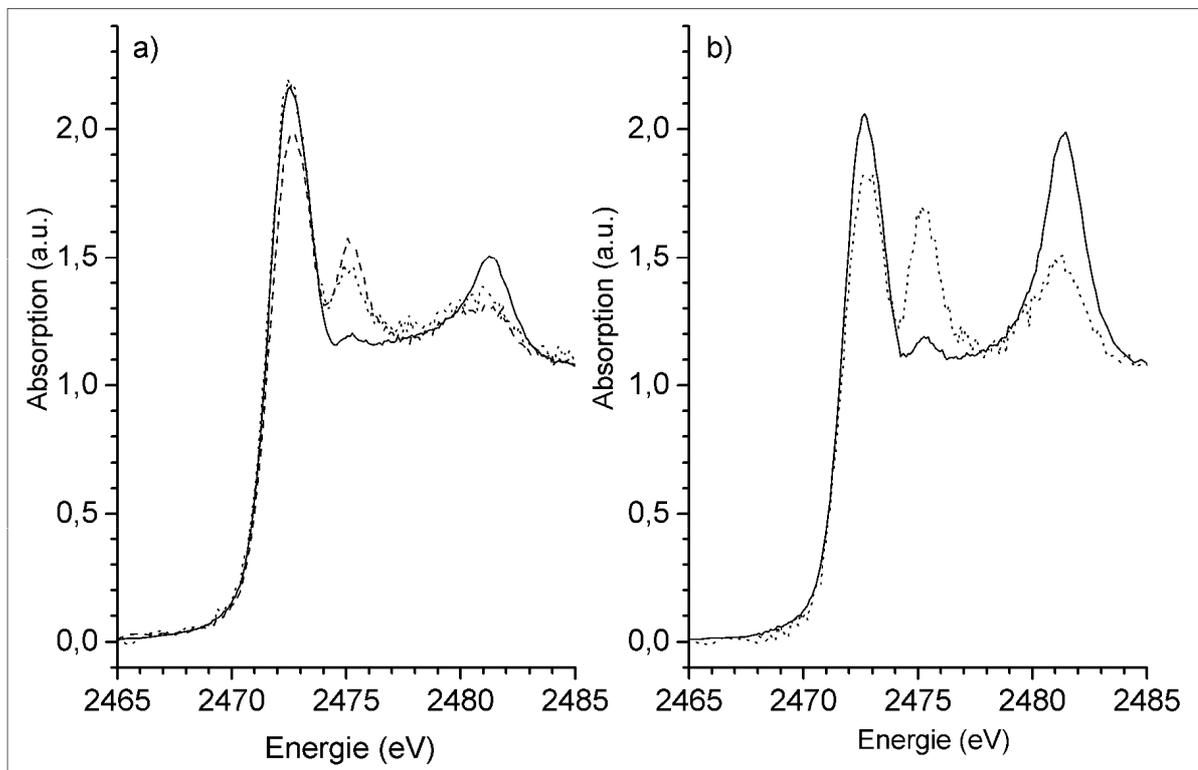


Abb. 7.6: a) Spektren gemahlener 'Huila'-Röstkaffee-Bohnen vor (durchgezogene Linie, gleiche Daten wie in Abb. 7.4(g)) und nach Extraktion des Kaffeegetränks mit heißem Wasser nach 'Hand-Filtern' (gestrichelte Linie) bzw. fünfminütigem Aufkochen (gepunktete Linie)
 b) Spektren des 'Dark Roast'-Kaffeepulvers (durchgezogene Linie) und des entsprechenden Rückstands im Filter der Kaffeemaschine nach erfolgter Filtration (gepunktete Linie)

7.4 Diskussion

Laut Literatur handelt es sich bei der überwiegenden Mehrheit schwefelhaltiger Moleküle in Rohkaffee um Proteine [Teu04]/[Fel69]/[Bal07]/[Bel08]. Eine Vielzahl unterschiedlicher schwefelhaltiger Aromastoffe, die größtenteils während des Röstprozesses gebildet werden, sind identifiziert worden [Tre81]. Sie kommen jedoch in vergleichsweise geringen Konzentrationen vor [Teu04]. Daher sollte es möglich sein, zumindest die XANES-Spektren von Rohkaffee-Proben an eine Linearkombination geeigneter Referenzspektren anzupassen. In diesem Fall wurden reduziertes Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG), Methionin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Cysteinsäure und Zinksulfat als Referenzsubstanzen verwendet. Spektren von Ringschwefel (S_8), Polymerschwefel, Cystein und Cystin wurden ebenfalls in die Fitversuche einbezogen, jedoch vom Fit-Programm nicht einbezogen.

Abb. 7.7 zeigt die Ergebnisse von Fit-Versuchen an den Spektren der mexikanischen Kaffeebohnen unterschiedlicher Röstgrade. Im Falle der grünen und leicht gerösteten Kaffeebohnen (Abb. 7.7(a) und (b)) stimmen die Fitkurven relativ gut mit den gemessenen Spektren überein. Die Fit-Prozedur lieferte die folgenden Ergebnisse für Rohkaffee (Abb. 7.7(a): 18 % GSH, 57% GSSG, 16 % Methionin, 1 % DMSO, 3 % Cysteinsäure und 5 % Sulfat. Für leicht geröstete Bohnen resultieren innerhalb der Fehlergrenzen vergleichbare Ergebnisse, wogegen bei höheren Röstgraden eine massive Diskrepanz zwischen den gemessenen Spektren und den zugehörigen Fitkurven auftritt (siehe Abb. 7.7(c), stellvertretend für höhere Röstgrade). Offensichtlich ist der bisher verwendete Satz von Referenzspektren für eine quantitative Analyse von Röstkaffeeproben unbrauchbar und muss in geeigneter Weise erweitert werden.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in Übereinstimmung mit der Literatur [Teu04]/[Fel69]/[Bal07]/[Bel08] Proteine die überwiegende Mehrheit schwefelhaltiger Moleküle in grünen und leicht gerösteten Kaffeebohnen stellen (aufgrund der akzeptablen Fitgüten). Dagegen werden im Verlauf des Röstprozesses infolge thermischen Abbaus der Proteine und durch Reaktion von Proteinen (bzw. Proteinfragmenten) mit weiteren Kaffee-Inhaltsstoffen - insbesondere Kohlenhydraten - beträchtliche Mengen an zusätzlichen Schwefelverbindungen gebildet [Fra96]/[Mai84]. Dies zeigt sich an Verschiebungen der Whiteline in den Spektren und an einer Verschlechterung der Fitgüten.

Die während des Röstens ablaufenden chemischen Prozesse sind aufgrund der oben dargelegten Reaktionen außerordentlich komplex – es wird eine Vielzahl zusätzlicher Schwefelverbindungen gebildet (insbesondere zyklische Thiole, z. B. Furfurylthiol [Tre81]). Eine quantitative Analyse der gemessenen Spektren durch Anpassen an eine Linearkombination von Referenzspektren ist dementsprechend schwierig.

Zusätzliche (flüssige/flüchtige) Referenzproben für Kaffee-Inhaltsstoffe wurden von Fa. Sigma-Aldrich / USA bezogen, unmittelbar vor Beginn der Messung dem Kühlschrank entnommen und mit einer Pipette unter einem Abzug auf schwefelfreies Filterpapier geträufelt. Das Filterpapier wurde anschließend beidseitig mit selbstklebendem schwefelfreiem Kaptonband versiegelt, um ein Ausgasen der Referenzsubstanzen während der Messung zu minimieren. Alle Referenzproben wurden im Transmissionsmodus (60 mbar Luft) gemessen. Allerdings wurden mit dem dadurch erweiterten Referenzspektrensatz keine akzeptablen Fitgüten erreicht. Die XANES-Spektren dieser Substanzen finden sich in Abb. 7.8.

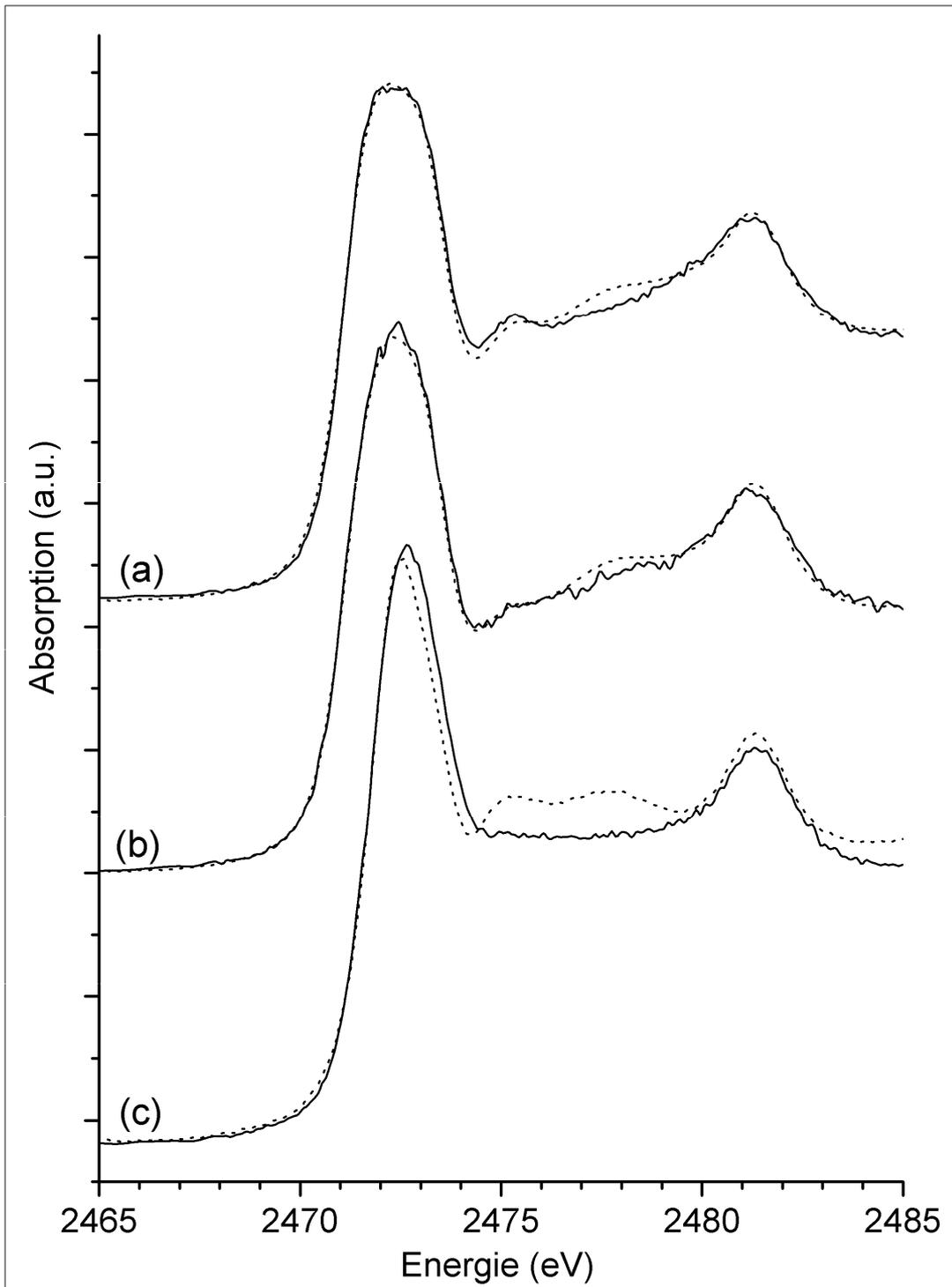


Abb. 7.7: XANES-Spektren grüner (a), leicht angerösteter (Röstzeit 4 min, (b)) und überroästeter (Röstzeit 10 min, (c)) mexikanischer Kaffeebohnen (durchgezogene Kurven) und zugehörige Fitkurven (gepunktet)

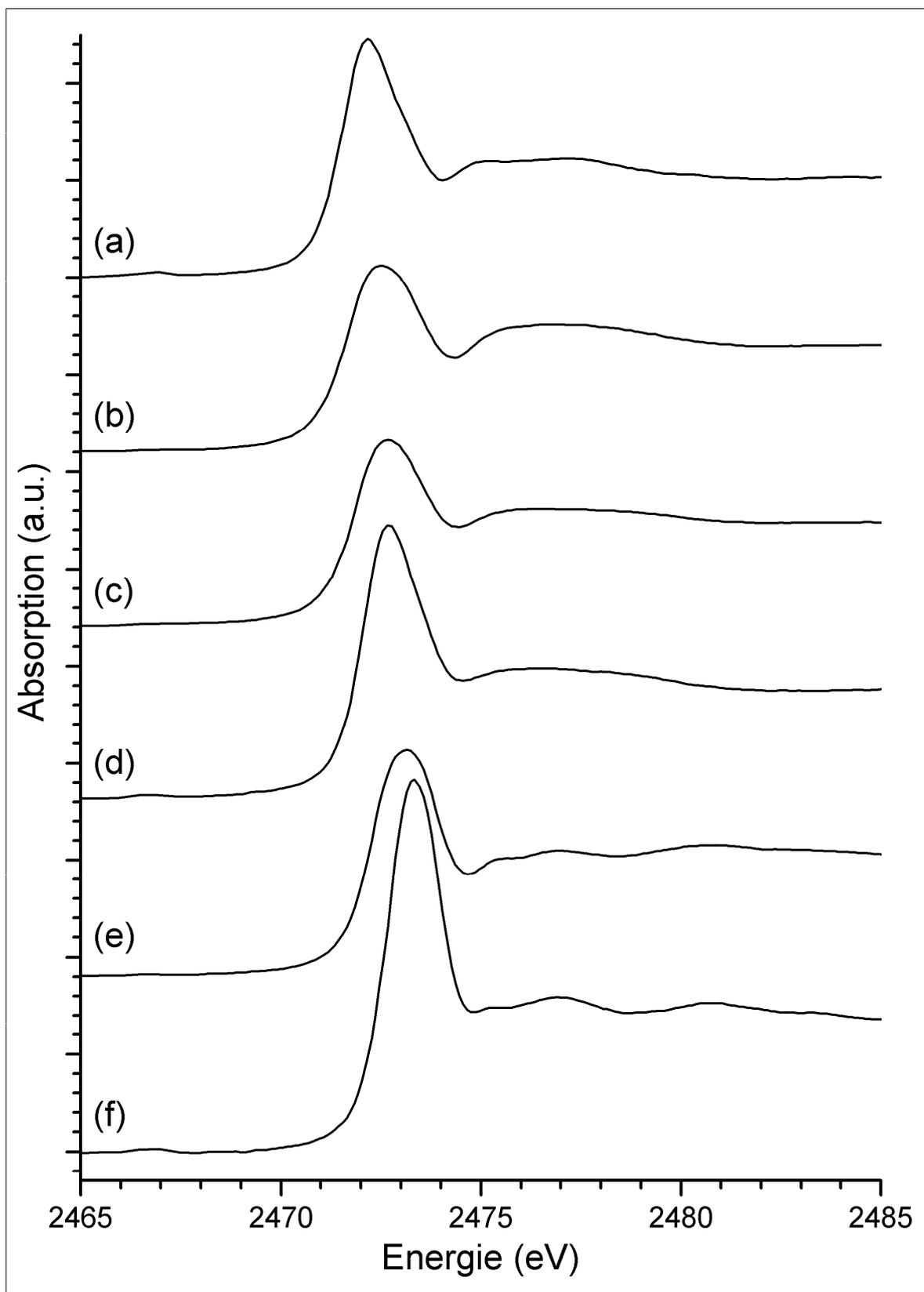


Abb. 7.8: Spektren zusätzlicher Referenzsubstanzen
(a) 2-methyl-2-propanthiol, (b) Furfurylthiol, (c) Furfuryl-methyl-sulfid,
(d) 3-(Methylthio)-Propionaldehyd, (e) Thiazol, (f) Thiophen

8 Fazit der Untersuchungen

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, stellt Schwefel in biologischen Systemen ein besonders interessantes Element dar, und zwar wesentlich aufgrund der Vielzahl von Oxidationsstufen, in denen er auftreten kann, und aufgrund der zahlreichen Reaktionen, an denen er beteiligt ist. Bei allen vier Probensystemen war eine Beeinflussung der Bindungsumgebung des Schwefels durch äußere Faktoren, d. h. durch Variation der Umgebungsbedingungen, anhand der gemessenen XANES-Spektren deutlich erkennbar.

Bei den rostpilzbefallenen Weizenblättern werden die Veränderungen der Schwefelverbindungen durch die Einwirkung des pathogenen Pilzmycels verursacht. Anhand eines Vergleichs von Schwefel-K-XANES-Spektren verschiedener Bereiche auf der Blattoberfläche zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen sichtbar infizierten und grünen Geweberegionen hinsichtlich ihrer Schwefelspeziation. Ortsauflösende Schwefel-K-XANES-Messungen ermöglichen darüber hinaus eine Abklärung der Reichweite der Veränderungen. Dies führt zu der Erkenntnis, dass sich die Erkrankungssymptome wesentlich über den Bereich der optisch abgehobenen Befallszone hinaus erstrecken. Es zeigt sich, dass mit der realisierten Fokussierung bereits eine ausreichende Ortsauflösung gewährleistet ist, um differenzierte Aussagen über die Ausdehnung des befallenen Bereichs zu gewinnen.

Röntgenfluoreszenzmessungen an diesem Probensystem zeigen, dass innerhalb der manifest infizierten Geweberegionen (Rostpusteln, d. h. Sporenlager) die Fluoreszenz der Elemente Kalium, Kalzium und Mangan deutlich erhöht ist. Allerdings erstreckt sich der Bereich erhöhter Fluoreszenz nicht über die Rostpusteln hinaus. Die Intensität der entsprechenden Fluoreszenzlinien erscheint ausreichend für künftige XANES-Messungen an den Absorptionskanten dieser Elemente. Erste Orientierungsmessungen belegen, dass bei diesem Probensystem sowohl an der Kalium-K-Kante als auch an der Phosphor-K-Kante mit der verwendeten Apparatur XANES-Spektren akzeptabler Qualität messbar sind.

Nachdem das Untersuchungsverfahren speziell für die Weizenblatt-Erkrankungen erfolgreich etabliert ist, lässt sich damit auch ein Schädlingsbefall anderer Pflanzen analysieren, der von wirtschaftlicher Bedeutung ist und dem möglicherweise durch entsprechende Maßnahmen gezielt entgegengewirkt werden kann (z. B. 'Soja-Rost').

Die Untersuchungen an mikrobiellen Matten aus den Lower Kane- und Frasassi-Höhlen liefern erste Anhaltspunkte hinsichtlich der Schwefelspeziation natürlicher mikrobieller Gemeinschaften, die Schwefelquellen zur Energiebereitstellung in einer lichtlosen, nährstoffarmen Umgebung nutzen. Im Vergleich zu Tiefseequellen sind diese Lebensräume leicht zugänglich. Die Proben lassen sich nach ihrer Sulfatkonzentration, die aus den Spektren hervorgeht, in zwei Gruppen (Sulfatkonzentration $>10\%$ bzw. $\leq 3\%$) einteilen. Diese Einteilung korreliert mit der Farbe der Proben, d. h. mit der jeweiligen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft. Das Vorliegen von Sulfat könnte mit der Anwesenheit schwefeloxidierender Bakterien zusammenhängen, die reduzierte Schwefelverbindungen zu Sulfat oxidieren.

Die Proben enthalten z. T. große Mengen an Elementarschwefel, der von den Mikroorganismen offensichtlich gespeichert wird, und zwar durchgehend mehr Ringschwefel (S_8) als Poly-

merschwefel (S_{μ}). Diese Signatur könnte auf eine bevorzugte Oxidation von Polymerschwefel und eine Akkumulation des Ringschwefels zurückzuführen sein. Bei den gegenwärtig vorliegenden Proben ist ein Unterscheiden zwischen den einzelnen Bakteriengruppen mit ihrem spezifischen Schwefelstoffwechsel schwierig, weil eine komplexe Artenvielfalt beteiligt ist und viele chemische Reaktionen parallel ablaufen. Für eine Interpretation der Ergebnisse wäre es hilfreich, wenn die in den Matten vorliegenden Mikroorganismen auch als Monokulturen verfügbar wären.

Die derzeitigen experimentellen Befunde zeigen, dass XANES potentiell neue Einblicke in die Komplexität biogeochemischer Prozesse ermöglicht. Für eine künftige systematische Analyse sollte ein einheitlicher Probensatz aus der gleichen Umgebung verwendet werden, z. B. aus lediglich einem Höhlenabschnitt und nicht aus verschiedenen Habitaten in weit voneinander entfernten Regionen wie den italienischen Marche und Wyoming.

Die am Probensystem *Allium cepa* L. gemessenen Spektren liefern zunächst einen wichtigen praxisrelevanten Befund: Eine Begasung mit H_2S als Alternative zur herkömmlichen Schwefelernährung (Sulfat-Aufnahme über die Wurzeln) führt offensichtlich nicht zur Bildung zusätzlicher, womöglich gesundheitsschädlicher Schwefelinhaltstoffe. Die Sulfat-Beiträge in den Spektren der Wurzeln werden durch den Sulfatgehalt der Nährlösung erheblich beeinflusst, während eine Begasung mit H_2S allenfalls geringfügige Auswirkungen hat. Demzufolge führt die Begasung nicht zu einer Minderung ('down regulation') der Sulfat-Aufnahme durch die Wurzeln. Auf die Spektren der Triebe hat sie jedoch erheblichen Einfluss, insbesondere bei Sulfatmangel in der Nährlösung. In den Trieben tritt nach Begasung mit H_2S eine deutlich erhöhte Sulfatkonzentration auf.

Beim Vergleich der Spektren der Triebe fällt auf, dass unabhängig vom Sulfatgehalt der Nährlösung eine Begasung mit H_2S eine Verschiebung der Whiteline zu niedrigeren Energien hin nach sich zieht. Dies resultiert in einer Erhöhung des Gehalts an Substanzen mit Disulfidbindungen, was durch die Ergebnisse der quantitativen Analyse bestätigt wird.

Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass die Konzentration an Sulfoxid-Verbindungen bezogen auf den Gesamt-Schwefelgehalt bei Begasung nahezu konstant bleibt. Dies zeigt eine Anreicherung Sekundärer Pflanzenstoffe in den Trieben durch die Begasung unter der Annahme, dass sich der Gesamtschwefelgehalt in den Trieben bei Begasung erhöht (wie von M. Durenkamp berichtet [Dur04]).

In den Schwefel-K-XANES-Spektren unterschiedlicher Kaffeesorten (überwiegend äthiopischer Herkunft) wird durch Rösten eine Intensivierung und Verschiebung der Whiteline zu höheren Energien hin bewirkt, was zunächst auf eine Abnahme von Disulfidbindungen zurückgeführt wurde. Versuchsweise wurden die Spektren einer Kaffeesorte in fünf verschiedenen Röstgraden einer quantitativen Analyse unter Verwendung eines Standard-Satzes von Referenzspektren für biologische Systeme unterzogen. Die Spektren grüner und leicht angerösteter Bohnen können damit durchaus analysiert werden, die entsprechenden Röstkaffee-Spektren hingegen nicht. Dies wird auf eine während des Röstens stattfindende thermische Zersetzung von Proteinen unter Bildung zusätzlicher Schwefelverbindungen zurückgeführt (durch Reaktion von Proteinen bzw. Proteinfragmenten mit weiteren Inhaltsstoffen des Kaffees, insbesondere mit Kohlenhydraten).

In allen Rohkaffee-Spektren ist zwischen der Whiteline und dem Sulfat-Maximum ein weiteres, je nach Kaffeesorte mehr oder weniger stark ausgeprägtes lokales Maximum erkennbar, das auf eine Sulfoxid-Verbindung hinweist. Bei der überwiegenden Mehrheit gerösteter Bohnen ist diese Struktur in den Spektren nicht mehr bzw. nur noch ansatzweise vorhanden. Lediglich bei zwei Kaffeesorten zeigt sie sich auch in den Spektren der gerösteten Bohnen. Es ist noch nicht geklärt, ob die differierenden Auswirkungen des Röstens auf das Absorptionsverhalten in diesem Spektralbereich hauptsächlich auf unterschiedliche Röstverfahren oder aber auf die Herkunft der Bohnen zurückzuführen sind.

Im Hinblick auf weitere Messungen an pilzbefallenen Blättern sollte angestrebt werden, die Ortsauflösung der Mikrosonde zu steigern (u. a. denkbar durch Einsatz besserer Spiegel, schwingungsgedämpfte Lagerung der Fokussieroptik...). Des weiteren wäre ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bei den ortsauflösenden Messungen wünschenswert, da aufgrund der langen Messdauern innerhalb des begrenzten Zeitrahmens nur wenige Bereiche auf der Blattoberfläche untersucht werden konnten und Veränderungen an den Blättern während der Messungen – u. a. durch Austrocknen in der Vakuumkammer – so klein wie möglich bleiben sollten. Die Intensität der anregenden Strahlung am Ort der Probe könnte u. a. durch weitere Optimierung der Spiegeloptik-Justierung erhöht werden. Auch könnte eine intensivere Lichtquelle in Betracht gezogen werden, z. B. ein Wiggler. Bei zu hohen Intensitäten sind jedoch Strahlenschäden am Probensystem nicht auszuschließen. Insbesondere bei der Untersuchung von Prozessen, an denen flüchtige Verbindungen beteiligt sind (speziell beim Rösten von Kaffeebohnen), wären außerdem Gasphasenmessungen hilfreich.

Schwierigkeiten bei der quantitativen Analyse der gemessenen Spektren hängen häufig mit den verwendeten Referenzspektren zusammen. Abhilfe könnten XANES-Spektren einiger für das betreffende Probensystem spezifischer Referenzsubstanzen schaffen. Häufig sind spezielle Referenzsubstanzen jedoch nicht kommerziell erhältlich oder chemisch instabil. Bei der quantitativen Analyse der *Allium cepa* L-Proben wurde durch behelfsmäßige Verwendung des Spektrums einer Zwiebelknolle als Referenz eine akzeptable Fitgüte erzielt. Da es sich hierbei nicht um eine Substanz in Reinform handelt, geben die Ergebnisse der quantitativen Analyse als Absolutwerte zwar nicht die Konzentrationsverhältnisse der Schwefelverbindungen in den Proben wieder – trotzdem erlauben die Ergebnisse Rückschlüsse auf den Einfluss verschiedener Modi der Schwefelernährung.

Naturgemäß leisten in den Spektren biologischer Systeme schwefelhaltige Moleküle, die keine für das jeweilige Probensystem spezifischen Funktionen erfüllen oder die aus sonstigen Gründen nicht von besonderem Interesse sind (z. B. das Proteingerüst der Zellen), hohe Beiträge zur Absorption. Dies macht quantitative Analysen z. T. recht kompliziert. Derartige 'Hintergrundsignale der organischen Grundsubstanz' sind bei XANES-Messungen an den Absorptionskanten von Elementen, die in biologischen Systemen üblicherweise allenfalls in Spuren vorliegen, nicht zu erwarten. Trotz dieser komplexen Situation lassen sich aus den hier beschriebenen Messungen relevante Aussagen zu den speziellen Fragestellungen bei den untersuchten Probensystemen herleiten. Die Methode hat relativ differenzierte und z. T. quantitative Aussagen über die Schwefelspeziation geliefert und damit die Erwartungen weitgehend erfüllt.

Literaturverzeichnis

- [Aga79]: B. K. Agarwal - X-Ray Spectroscopy – An Introduction, Springer (1979)
- [Amb06]: A. H. Ambrosio de Castro – Atmospheric NH₃ Deposition, S and N metabolism in curly kale, Dissertation, Universität Groningen (2006)
- [Ank98]: A. L. Ankudinov, B. Ravel, J. J. Rehr, S.D. Conradson - Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure. *Physical Review B* 58, No. 12, 7565-7575 (1998)
- [Apt82]: M. Y. Apte, C. Mande - Chemical effects on the main peak in the K absorption spectrum of manganese in some compounds, *J. Phys. C: Solid State Phys.* 15, 607–613 (1982)
- [Bal07]: Werner Baltes – Lebensmittelchemie, 6. Auflage, Springer (2007)
- [Bel08]: H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle – Lehrbuch der Lebensmittelchemie- 6. Auflage, Springer (2008)
- [Ben05]: P. C. Bennett, A. S. Engel - Role of micro-organisms in karstification, Cambridge University Press, SGM symposium 65: Micro-organisms and Earth systems - advances in geomicrobiology, Cambridge University Press (2005)
- [Ben75]: H. Chr. Benöhr, H. D. Waller - Übersichten Glutathion (Bedeutung in Biologie und Medizin), Springer, *Klin. Wschr.* 53 789 -802 (1975)
- [Blo92]: E. Block - the organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulphur, *Angewandte Chemie International Edition English* 31, 1135-1178 (1992)
- [Bör90]: H. Börner – Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 6. Auflage, Ulmer (1990)
- [Boo86]: Boon. K. Teo – EXAFS: Basic Principles and Data Analysis, Springer (1986)
- [Bos06]: P. J. Boston, L. D. Hose, D. E. Northup, M. N. Spilde - The microbial communities of sulfur caves: A newly appreciated geologically driven system on Earth and potential model for Mars, *Geological Society of America Special Paper* 404 (2006)
- [Bren04]: B. Brendebach – Röntgenabsorptionsspektroskopie an Phosphorsalzperlen: Bestimmung der geometrischen und elektronischen Struktur von metalloxid-dotierten Natriumphosphatgläsern, Dissertation, Universität Bonn (2004)
- [Bro07]: T. L. Brown, E. H. LeMay, B. E. Bursten – Chemie – Die zentrale Wissenschaft, 10. Auflage, Pearson (2007)
- [Buc04]: P. Buchner, H. Takahashi, M. J. Hawkesford – Plant Sulphate Transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long –distance transport, *Journal of Experimental Botany* 55, 404, 1765-1773 (2004)
- [CAM05]: CAMD Jahresbericht 2005
- [Can04]: D. E. Canfield – the evolution of the earth surface sulfur reservoir, *American journal of science*, 304, 839-861 (2004)
- [Can05]: D. E. Canfield, B. Thamdrup, E. Kristensen - Aquatic Geomicrobiology, Amsterdam, Elsevier (2005) 640
- [Cha97]: R. Chauvistre, J. Hormes, E. Hartmann, N. Etzenbach, R. Hosch, J. Hahn, Sulfur K-shell photoabsorption spectroscopy of the sulfanes R-S_n-R, n = 2-4, *Chemical Physics* 223, 293- 302 (1997)
- [Cha87]: R. Chauvistre – Absorptionsspektroskopie an Atomen und kleinen Molekülen im weichen Röntgengebiet, Diplomarbeit, Universität Bonn (1987)

- [Chr99]: M. Chrispeels, N. M. Crawford, J. I. Schroeder - Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells, *The Plant Cell* 11, 661-675 (1999)
- [Cin06]: G. Cinque, G. Bellisola, M. Colombatti, E. Burattini, X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy of Sulfur in Biomolecules: Two Examples from Glutathione and Insulin, *Acta Physica Polonica A* 109, No. 3 (2006) 335–340
- [Coo03]: T. W. Coolong, W. M. Randle - Ammonium nitrate fertility levels influence flavour development in hydroponically grown 'Granex 33' onion, *J. Sci. Food and Agric.* 83, 477-482 (2003)
- [Coo03b]: T. W. Coolong, W. M. Randle - Sulfur and Nitrogen Availability interact to affect the flavour biosynthetic pathway in onion, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(5), 776-783 (2003)
- [cxro]: <http://www-cxro.lbl.gov/> (Lawrence Berkeley National Laboratory)
- [Cze00]: M. Czerny, W. Grosch – Potent Odorants of Raw Arabica Coffee. Their Changes during roasting, *J. Agric. Food. Chem.* 48, 868-872 (2000)
- [Dah06]: C. Dahl, A. Prange – Bacterial sulfur globules: occurrence, structure and metabolism, *Microbiol. Monogr.* (1), Springer (2006)
- [DeK00]: L. J. De Kok, S. Westerman, C. E. E. Stuiver – Atmospheric H₂S as plant sulphur source: interaction with pedospheric sulfur nutrition, *Haupt/Bern*, 41-56 (2000)
- [DeK05]: L. J. De Kok, A. Castro, M. Durenkamp, A. Koralewska, F. S. Posthumus. C. E. E. Stuiver, L. Yang, I. Stulen - Pathways of plant sulfur uptake and metabolism – an overview, *Landbauforschung Völkenrode, Special Issue* 283, 5-13 (2005)
- [Die91]: M. Diercks, W. Sand, E. Bock - microbial corrosion of concrete, *Experientia* 47 (1991)
- [Dur02]: M. Durenkamp, L. J. De Kok – The impact of atmospheric H₂S on growth and sulphur metabolism of *Allium cepa* L., *Phyton* 42, 55-63 (2002)
- [Dur04]: M. Durenkamp, L. J. De Kok - Impact of pedospheric and atmospheric sulphur nutrition on sulphur metabolism of *Allium cepa* L., a species with a potential sink capacity for secondary sulphur compounds, *Journal of Experimental Botany* 55, 404, 1821-1830 (2004)
- [Dur05]: M. Durenkamp – Metabolism of atmospheric hydrogen sulfide in onion, *Dissertation, Universität Groningen* (2005)
- [Eng03]: A. S. Engel, N. Lee, M. L. Porter, L. A. Stern, P. C. Bennett, M. Wagner – Filamentous Epsilonproteobacteria dominate microbial mats from sulfidic cave springs, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 9, 5503-5511 (2003)
- [Eng04a]: A. S. Engel, M. L. Porter, L. A. Stern, S. Quinlan, P. C. Bennett - Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria", *FEMS Microbiology Ecology* 51, 31-35 (2004)
- [Eng04b]: A. S. Engel, L. A. Stern, P. C. Bennett - Microbial contributions to cave formation: New insights into sulphuric acid speleogenesis, *Geology* 32, 5, 369-372 (2004)
- [Eng07]: A. S. Engel - Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats, *Journal of Cave and Karst Studies* 69, 1 (2007) 187-206
- [Fel69]: J. R. Feldman, W. S. Ryder and J. T. Kung – Importance of Nonvolatile compounds to the flavor of coffee, *J. Agric. Food Chem.* 17, no. 4, 733-739 (1969)
- [Fra96]: C. Franzke – *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 3. Auflage, Behr (1996)

- [Fra07]: B. Franz, H. Lichtenberg, J. Hormes, H. Modrow, C. Dahl und A. Prange – Utilization of solid 'elemental' sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study, *Microbiology* 153, 1268-1274 (2007)
- [Fra99]: P. Frank, B. Hedman, K. O. Hodgson - Sulfur Allocation and Vanadium-Sulfate Interactions in Whole Blood Cells from the Tunicate *Ascidia ceratodes* Investigated Using X-ray Absorption Spectroscopy, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 260 -270
- [Fri02]: W. Fritsche – *Mikrobiologie*, 3. Auflage, Spektrum (2002)
- [Gal95]: S. Galdenzi, M. Menichetti – occurrence of hypogenic caves in a karst region: examples from central Italy, *Environmental Geology* 26, 39-47 (1995)
- [Geo89]: G. N. George, M. L. Gorbaty - Sulfur K-Edge X-ray Absorption Spectroscopy of Petroleum Asphaltene and Model Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3182-3186 (1989)
- [Gol61]: I. H. Goldberg - The sulfolipids, *J. Lipid Research* 2, 103-109 (1961)
- [Gri02]: G. Griffiths, L. Trueman, T. Crowther, B. Thomas, B. Smith - Onions - A Global Benefit to Health, *Phytotherapy Research* 16, 603-615 (2002)
- [Guo85]: T. Guo, M. L. denBoer - Extended x-ray-absorption fine structure: Direct comparison of absorption and electron yield. *Physical Review B* 31, No. 10 (1985) 6233 –6237
- [Hah95]: P. Hahn-Weinheimer, A. Hirner, K. Weber-Diefenbach – Röntgenfluoreszenz-analytische Methoden, Vieweg (1995)
- [Haw00]: M. J. Hawkesford – Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency, *Journal of Experimental Botany* 51, 342, 131-138 (2000)
- [Haw03]: M. J. Hawkesford – Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family – redundancy or specialization?, *Physiologia Plantarum* 117, 155-163 (2003)
- [Hel02]: R. Hell – Der assimilatorische Schwefelstoffwechsel in Pflanzen, *BIOspektrum* 3/01, 8. Jahrgang (2002)
- [Hig06]: J. V. Higdon and B. Frei - Coffee and Health: A Review of Recent Human Research, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 101-123 (2006)
- [Hor07]: Prof. Dr. J. Hormes – private Mitteilung
- [How03]: J. A. Howe, R. H. Loeppert, V. J. Deroose, D. B. Hunter, P. M. Bertsch – Localization and Speciation of Chromium in Subterranean Clover Using XRF, XANES and EPR Spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 37, No. 18, 4091-4097 (2003)
- [Huf91]: G. P. Huffman, S. Mitra, F. E. Huggins, N. Shah, S. Vaidya and F. Lu - Quantitative Analysis of All Major Forms of Sulfur in Coal by X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy, *Energy and Fuels* 5 (1991) 574 – 581
- [Jal05]: F. Jalilehvand - Sulfur Speciation in intact plant leaves, Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the postgenomic era, 53-57 (2005)
- [Jal06]: F. Jalilehvand- Sulfur: not a "silent" element any more, *Chemical Society Reviews* 35, 1256-1268 (2006)
- [Jon04]: M. Jones, J. Hughes, A. Tregova, J. Milne, A. B. Tomsett, H. A. Collin – Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 404 (2004)

- [Kat98]: G. Kataby, Yu. Kolytyn, J. Rothe, J. Hormes, I. Felner, X. Cao, A. Gedanken – the adsorption of monolayer coatings on iron nanoparticles: Mössbauer spectroscopy and XANES results, *Thin Solid Films* 333, 41-49 (1998)
- [Keu02]: M. Keusgen, H. Schulz, J. Glodek, I. Krest, H. Krüger, N. Herchert, J. Keller – Characterization of some allium hybrids by aroma precursors, aroma profiles and Alliinase activity, *J. Agric. Food Chem.* 50, 2884-2890 (2002)
- [Kir48]: P. Kirkpatrick, A. V. Baez - Formation of Optical Images by X-Rays, *Journal of the optical society of America* 38, No. 9 (1948) 766-774
- [Kit88]: C. Kittel - Einführung in die Festkörperphysik, 7. Auflage, Oldenbourg (1988)
- [Kor84]: M. E. Kordesch, R. W. Hoffman - Electron-yield extended x-ray absorption fine structure with the use of a gas-flow electron detector, *Physical Review B* 29, No. 1 491-492 (1984)
- [Kro06]: I. Kronberg – Pflanzenzucht - Zwiebeln ohne Tränen (2006), *Biol. Unserer Zeit* 36 (2006)
- [Kun79]: C.Kuntz – Synchrotron Radiation – Techniques and Applications, Springer (1979)
- [Kut02]: U. Kutschera - Prinzipien der Pflanzenphysiologie, 2. Auflage, Spektrum (2002)
- [Lanc90]: J. E. Lancaster, M. J. Boland – flavour biochemistry, in : J. L. Brewster, H.D. Rabinowitsch: onions and allied crops III. Biochemistry, food science and minor crops, Boca Raton , CRC Press, 33-72 (1990)
- [Lem78]: M. Lemonnier, O. Collet, C. Depautex, J.-M. Esteva, D. Raoux - High vacuum two crystal soft X-ray monochromator, *Nuclear instruments and methods* 152, 109-111 (1978)
- [Leu00]: T. Leustek, M. N. Martin, J.-A. Bick, J. P. Davies – Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51,141-65 (2000)
- [Lod96]: H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell – Molekulare Zellbiologie, 2. Auflage, deGruyter (1996)
- [Lop03]: P. Lopez-García, S. Duperron, P. Philippot, J. Foriel, J. Susini, D. Moreira - Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge, *Environmental Microbiology* 5 (10) , 961–976 (2003)
- [Mac06]: J. L. Macalady, E. H. Lyon, B. Koffman, L. K. Albertson, K. Meyer, S. Galdenzi, S. Mariani - Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 8, 5596-5609 (2006)
- [Mac07]: J. Macalady, D. S. Jones, E. H. Lyon – Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy, *Environmental Microbiology* (2007)
- [Mai84]: H.G. Maier – Chemische Aspekte des Kaffees, *Chemie in unserer Zeit* 18, 1 (1984)
- [Mar88]: G. Margaritondo- Introduction to Synchrotron Radiation, Oxford University Press (1988)
- [Mar95]: H. Marschner - Mineral nutrition of higher plants, 2. Auflage, Academic Press, London, UK (1995)
- [Mat80]: G. Materlik, V. O. Kostroun – Monolithic crystal monochromators for synchrotron radiation with order sorting an polarization properties, *Rev. Sci. Instrum.* 51, 1 (1980)

- [McI95]: R. A. McIntosh, C. R. Wellings, R. F. Park – Wheat Rusts – An Atlas of resistance genes, Kluwer Academic Publishers (1995)
- [Mei05]: D. Meisinger, A. S. Engel, N. Lee, M. L. Porter, L. A. Stern, P. C. Bennet – Molecular and Functional diversity of anaerobic metabolic guilds in aphotic, redox-stratified microbial mats from Lower Kane Cave, Wyoming, pp. 120, ASM, Jackson, WY (2005)
- [Men73]: K. Mendgen - Feinbau der Infektionsstrukturen von *Uromyces phaseoli*, Phytopathologische Zeitschrift 78, 109-120 (1973)
- [Men00]: K. Mendgen, C. Struck, R. T. Voegelé, M. Hahn - Biotrophy and rust haustoria, Physiological and Molecular Plant Pathology 56, 141-145 (2000)
- [Men02]: K. Mendgen, M. Hahn - Plant infection and the establishment of fungal biotrophy, Trends in Plant Science 02 (2002) 1360-1365
- [Mir04]: M. L. Miroshnichenko, S. L'Haridon, P. Schumann, S. Spring, E. A. Bonch-Osmolovskaya, C. Jeanthon, E. Stackebrandt – *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales or. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 41-45 (2004)
- [Mod99]: H. Modrow – Möglichkeiten und Grenzen der quantitativen Analyse von Röntgenabsorptionsspektren und ihre Anwendung auf Vulkanisation und thermo-oxidative Alterung von Kautschuken, Dissertation, Universität Bonn (1999)
- [Möl99]: N. Mölders, H. O. Moser, V. Saile, P. J. Schilling - Spatially-Resolved X-Ray Spectroscopy at CAMD, Wissenschaftlicher Bericht, Forschungszentrum Karlsruhe, FZKA 6314 (1999)
- [Möl01]: N. Mölders, P. J. Schilling, J. Wong, J. W. Roos and I. L. Smith - X-ray Fluorescence Mapping and Micro-XANES Spectroscopic Characterization of Exhaust Particulates Emitted from Auto Engines Burning MMT-Added Gasoline, Environ. Sci. Technol. 35, No. 15 (2001) 3122-3129
- [Mor02]: E. Morikawa, J. D. Scott, J. Goettert, G. Aigeldinger, Ch. S. S. R. Kumar, B. C. Craft, P. T. Sprunger, R. C. Tittsworth, F. J. Hormes - Status of the Center for Advanced Microstructures and Devices (CAMD)-2001, Review of Scientific Instruments 73, No. 3 (2002) 1680-1683
- [Mun03]: L. J. Munro, A. Curioni, W. Andreoni - The elusiveness of coffee aroma: new insights from a non-empirical approach, J. Agric. Food Chem. 51, 3092-3096 (2003)
- [Obe05]: D. E. Obert, A. K. Fritz, J. L. Moran, S. Singh, J. C. Rudd, M. A. Menz - Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat, Theor. Appl. Genet 110 (2005) 1439-1444
- [Oer06]: E.-C. Oerke – Crop losses to pests, Journal of Agricultural Science 144, 31-43 (2006)
- [Pan04]: A. Pantelouris, H. Modrow, M. Pantelouris, J. Hormes, D. Reinen - The influence of coordination geometry and valency on the K-edge absorption near edge spectra of selected chromium compounds, Chemical Physics 300 (2004) 13-22
- [Pas01]: J. D. Pasteris, J. J. Freeman, S. K. Goffredi, K. R. Buck – Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria, Chemical Geology 180, 3-18 (2001)
- [Pic01]: I. J. Pickering, G. N. George, E. Y. Yu, D. C. Brune, C. Tuschak, J. Overmann, J. T. Beatty, R. C. Prince – Analysis of sulfur biochemistry of sulfur bacteria using x-ray absorption spectroscopy, Biochemistry 40, 8138-8145 (2001)

- [Pih92]: K. Pihakaski-Maunsbach, D. M. R. Harvey - X-ray microanalytical (EDX) investigation of potassium distributions in mesophyll cells of non-acclimated and cold-acclimated rye leaves, *Plant, Cell and Environment* 15, 585-591 (1992)
- [Pra99]: A. Prange, I. Arzberger, C. Engemann, H. Modrow, O. Schumann, H.G. Trüper, R. Steudel, C. Dahl, J. Hormes – in situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy, *Biochem. Biophys. Acta* 1428; 446-454 (1999)
- [Pra01]: A. Prange – Molekulargenetische und physikalisch-chemische Untersuchungen an den Schwefelkugeln photo- und chemotropher Schwefelbakterien, Dissertation, Universität Bonn (2001)
- [Pra01b]: A. Prange, N. Kühlsen, B. Birzele, I. Arzberger, J. Hormes, S. Antes, P. Köhler - Sulfur in wheat gluten: In situ analysis by x-ray absorption near edge structure (XANES) Spectroscopy, *Eur. Food Res Technol* 212, 570-575 (2001)
- [Pra02]: A. Prange, C. Dahl, H. G. Trüper, M. Behnke, J. Hahn, H. Modrow, J. Hormes - Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy, *Eur. Phys. J. D* 20, 589-596 (2002)
- [Pra02b]: A. Prange, R. Chauvistre, H. Modrow, J. Hormes, H. G. Trüper, C. Dahl - Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur, *Microbiology* 148, 267-276 (2002)
- [Pra05]: A. Prange, E.-Ch. Oerke, U. Steiner, Ch. M. Bianchetti, J. Hormes, H. Modrow - Spatially Resolved Sulphur K-edge XANES Spectroscopy for in situ Characterization of the Fungus-plant Interaction *Puccinia triticina* and Wheat Leaves, *J. Phytopathology* 153, 627-632 (2005)
- [Ran93]: W. M. Randle, M. L. Bussard, D. F. Warnock - Ontogeny and sulfur fertility affect leaf sulfur in short-day onions, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118(6), 762-765 (1993)
- [Ran95]: W. M. Randle, J. E. Lancaster, M. L. Shaw, K. H. Sutton, R. L. Hay - Quantifying Onion flavour Compounds Responding to Sulfur Fertility – Sulfur Increases levels of Alk(en)yl Cysteine Sulfoxides and Biosynthetic Intermediates, *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 120(6), 1075-1081 (1995)
- [Ran97]: W. M. Randle - Onion flavour chemistry and factors influencing flavour intensity, S. 41-52 in S. J. Risch u. C. Ho (Her.) 'Spices: flavour chemistry and antioxidant properties', Amer. Chem. Soc., Washington DC (USA)
- [Rav06]: P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn - *Biologie der Pflanzen*, 4. Auflage, de Gruyter (2006)
- [Reg06]: R. L. Reger, M. L. Porter, M. Menichetti, A. S. Engel – Diversity comparisons between microbial mats and endosymbiont gut communities associated with the cave-dwelling *Androniscus Dentiger* (Isopoda; Oniscidae) from the Frasassi Caves, Italy, National Speleological Society Meeting, Bellingham, Washington
- [Reh00]: J. J. Rehr, R. C. Albers - Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure, *Reviews of Modern Physics* 72, 3 (2000) 621-654
- [Res98]: T. Ressler - WinXAS: a Program for X-ray Absorption Spectroscopy Data Analysis under MS-Windows, *Journal of Synchrotron Radiation* 5, 118-122 (1998)
- [Rot01]: A. Roth-Nebelsick, D. Uhl, V. Mosbrugger, H. Kerp - Evolution and Function of Leaf Venation Architecture: A Review, *Annals of Botany* 87, 553-566 (2001)

- [Say71]: D. E. Sayers and E. A. Stern and F. W. Lytle - New Technique for Investigating Noncrystalline Structures: Fourier Analysis of the Extended X-Ray - Absorption Fine Structure, *Physical Review Letters* 27, No. 18 (1971) 1204-1207
- [Sch93]: E. Schnug – physiological functions and environmental relevance of sulfur-containing secondary metabolites, in: L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold, W. E. Rauser (Her.): 'Sulphur nutrition and assimilation in higher plants – regulatory, agricultural and environmental aspects', SPB Academic Publishing, 179-190 (1993)
- [Sch02]: S. Schenker, C. Heinemann, M. Huber, M. Pompizzi, R. Perren, F. Escher - Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans, *Journal of food science* 67, 1 (2002)
- [Shv04]: Yu. Shvyd'ko – X-ray Optics – High-Energy-Resolution Applications, Springer (2004)
- [Sie89]: H. Sies – Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions, *Naturwissenschaften* 76, 57-64, Springer (1989)
- [Sie07]: S. M. Sievert, R. P. Kiene, H. N. Schulz-Vogt – The Sulfur Cycle, *Oceanography*, (2007) 117-123
- [Sne04]: E. Y. Sneed, H. H. Harris, I. J. Pickering, R. C. Prince, S. Johnson, X. Li, E. Block, G. N. George – The Sulfur Chemistry of Shiitake Mushroom, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 458-459 (2004)
- [Sol03]: P. S. Solomon, K.-C. Tan, R. P. Oliver - The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study, *Molecular Plant Pathology* 4, No. 3 (2003) 203-210
- [Ste81]: E. A. Stern, K. Kim - Thickness effect on the extended-x-ray-absorption-fine-structure amplitude, *Physical Review B* 23, 8, 3781-3787 (1981)
- [Ste00]: J. Stefels – physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants, *Journal of Sea Research* 43, 183-197 (2000)
- [Ste03]: R. Steudel, B. Eckert - Solid Sulfur Allotropes, *Top Curr Chem* 230, 1-79(2003)
- [Ste06]: J. M. Stein, M. Schubert-Zsilavec, D. Steinhilber, H. Stark, O. Werz – Wie Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe uns vor Krankheiten schützen, *Forschung Frankfurt* 4/2006
- [Stu01]: C. E. E. Stuiver, L. J. De Kok – Atmospheric H₂S as sulfur source for Brassica oleracea: kinetics of H₂S uptake and activity of O-acetylserine (thiol)lyase as affected by sulfur nutrition, *Environmental and Experimental Botany* 46, 29-36 (2001)
- [Swa77]: T. Swain – Secondary compounds as protective agents, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 479-501 (1977)
- [Tak06]: Y. Takahashi, Y. Kanai, H. Kamioka, A. Ohta, H. Maruyama, Z. Song, H. Shimizu, Speciation of Sulfate in Size-Fractionated Aerosol Particles Using Sulfur K-Edge X-ray Absorption Near-Edge Structure, *Environ. Sci. Technol.* 40, 5052-5057 (2006)
- [Tak00]: H. Takahashi, A. Watanabe-Takahashi, F. W. Smith, M. Blake-Kalff, M. J. Hawkesford, K. Saito – the roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana, *The Plant Journal* 23(2), 171-182 (2000)
- [Tau03]: M. Tausz, W. Weidner, A. Wonisch, L. J. de Kok, D. Grill – Uptake and distribution of ³⁵S-sulfate in needles and roots of spruce seedlings as affected by exposure to SO₂ and H₂S, *Environmental and Experimental Botany* 50, 211-220 (2003)

- [Teu04]: I. A. Teutsch – Einfluss der Rohkaffeeverarbeitung auf Aromastoffveränderungen in gerösteten Kaffeebohnen sowie im Kaffeegetränk, Dissertation, Technische Universität München (2004)
- [Tha03]: V. K. Thara, J. P. Fellers, Jian-Min Zhou - In planta induced genes of *Puccinia triticina*, *Molecular Plant Pathology* 4, No. 1 (2003) 51-56
- [Tre81]: R. Tressl, R. Silwar - Investigation of Sulfur-Containing Components in Roasted Coffee, *J. Agric. Food Chem.* 29 (1981) 1078-1082
- [Uen06]: O. Ueno, Y. Kawano, M. Wakayama, T. Takeda - Leaf Vascular Systems in C3 and C4 Grasses: A Two-dimensional Analysis, *Annals of Botany* 97, 611-621 (2006)
- [Uri06]: T. Urich, C. M. Gomes, A. Kletzin, C. Frazao – x-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme, *Science* 311, 996-1000 (2006)
- [Vai97]: M. A. Vairavamurthy, D. Maletic, S. Wang, B. Manowitz, T. Eglinton, T. Lyons – Characterization of sulfur-containing functional groups in sedimentary humic substances by x-ray absorption near-edge structure spectroscopy, *Energy & Fuels* 11, 546-553 (1997)
- [Vai98]: A. Vairavamurthy - Using X-ray absorption to probe sulfur oxidation states in complex molecules, *Spectrochimica Acta Part A* 54, 2009-2017 (1998)
- [Vla00]: L. Vlasceanu, S. M. Sarbu, A. S. Engel and B. K. Kinkle - Acidic Cave-Wall Biofilms Located in the Frasassi Gorge, Italy, *Geomicrobiology Journal* 17, 125-139 (2000)
- [Voe03]: R. T. Voegelé, K. Mendgen - Rust haustoria: nutrient uptake and beyond, *New Phytologist* 159, 93-100 (2003)
- [Wes01]: S. Westerman, I. Stulen, M. Suter, C. Brunold, L. J. de Kok – Atmospheric H₂S as sulphur source for *Brassica oleracea*: consequences for the activity of the enzymes of the assimilatory sulphate reduction pathway, *Plant Physiol. Biochem.* 39, 425-432 (2001)
- [Wib07]: A. F. Holleman, N. Wiberg – *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 102. Auflage, de Gruyter (2007)
- [Yan94]: B. X. Yang, M. Rivers, W. Schildkamp, P. J. Eng - GeoCARS microfocusing Kirkpatrick-Baez mirror bender development, *Rev. Sci. Instrum.* 66, 2, 2278-2280 (1994)
- [Zah89]: H. Zahn – Das Haar aus der Sicht des Chemikers, *Chemie in unserer Zeit* 5 (1989)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis (Titel gekürzt)

Abbildungen	Seite
2.1: Relative Wirkungsquerschnitte als Funktion der Photonenenergie	7
2.2: Skizziertes XAFS-Beispielspektrum (keine reale Probe)	9
2.3: Strukturformeln der verwendeten 'Standard'-Referenzsubstanzen	12
2.4: 'Standard'-Referenzspektren	13
2.5: Energetische Lage der Whiteline in Abhängigkeit von der Oxidationszahl	14
3.1: Lageplan der Strahlrohre am CAMD	17
3.2: Spektrale Verteilung des Photonenflusses	18
3.3: Photonenenergie in Abhängigkeit vom Glanzwinkel Θ	21
3.4: Aufbau für Messungen im Transmissions- und im Fluoreszenzmodus	23
3.5: Vakuunkammer	25
3.6: Schemazeichnung der Mikrosonde	27
3.7: Prinzip der Kirkpatrick-Baez-Spiegeloptik	28
3.8: Photonenfluss in Abhängigkeit vom Glanzwinkel	29
3.9: Spiegel-Biegekräfte sowie mögliche Bewegungen	30
3.10: Spiegel-Biegemechanismus - mechanische Ausführung	30
3.11: Ergebnisse horizontaler 'Knife Edge Scans' (KBHF2 konstant)	31
3.12: Ergebnisse horizontaler 'Knife Edge Scans' (KBHF1 konstant)	32
3.13: Knife-Edge-Scan-Intensitätsverläufe und Ableitungen	32
3.14: Ergebnisse der Messungen mit Rechteckblenden	34
3.15: Messungen bei Variation des Biegeparameters F1 – hor. Scan	34
3.16: Messungen bei Variation des Biegeparameters F1 – vert. Scan	35
3.17: Intensität des fokussierten Strahls hinter einem Eisendrahtgitter	35
3.18: Transmission bei Verfahren des Probenhalters	36
3.19: Mikrosonden-Absorptionsspektrum und DCM- Strahlrohr-Spektrum	36
3.20: Messungen an Nickeldraht-Netz	37
3.21: Messungen an Nickeldraht-Array	37
3.22: Rastermessungen (Cr-K _V -Intensität) an einem Brunnenkresseblatt	38
3.23: Cr-K-XANES-Spektren (K _V -Fluoreszenz) eines Brunnenkresseblatts	39
3.24: Schwefel-K _V -Linienintensität eines Haares und zugehöriger Fit	39
3.25: Schwefel-K-XANES-Spektrum eines Haares (Fluoreszenzmodus) und Fit	40
4.1: Typische Emissionsspektren von rostpilzbefallenen Weizenblättern	44
4.2: Intensitätsverlauf der Kalium-K _α -Linie (gesundes Weizenblatt)	45
4.3: Intensitätsverlauf der Kalium-K _α -Linie (infiziertes Blatt)	46
4.4: Intensitätsverlauf der K _α -Linien von Kalium, Mangan, Kalzium und Chlor	47
4.5: Transmittierte Intensität bei Abtasten der Probe aus Abb. 4.4	49
4.6: XRF-Messungen bei einer Anregungsenergie von 5,5 keV	49
4.7: Lokale Emissionsspektren I (Anregung mit 6,8 keV)	50
4.8: Lokale Emissionsspektren II (Anregung mit 6,8 keV)	51
4.9: Lokale Emissionsspektren III (Anregung mit 6,8 keV)	51
4.10: Serie von Emissionsspektren (Anregung mit 5,5 keV)	52

4.11:	Rostpilzbefallenes Weizenblatt mit Messpunkten	53
4.12:	Schwefel-K-XANES-Spektren verschiedener Blattregionen und Fitkurven	54
4.13:	Spektrum isolierter Uredosporen	55
4.14:	XANES-Spektren bei unterschiedlicher Rostpusteldistanz	56
4.15:	Weizenblatt-XANES-Spektren an Kalium- und Phosphor-K-Kante	58
5.1:	Höhlensystem 'Lower Kane Cave'	61
5.2:	Frasassi-Höhlensystem (PC='Pozzo di Cristalli')	61
5.3:	Messspektren und Fits Teil I	66
5.4:	Messspektren und Fits Teil II	67
6.1:	Assimilatorischer Schwefelstoffwechsel in Pflanzen	72
6.2:	Schwefel-K-XANES-Spektren von <i>Allium cepa L.</i> und <i>Allium sativum</i>	74
6.3:	Serie von XANES-Spektren eines Zwiebelknollenstücks	75
6.4:	Spektrum des pürierten Materials und Dampfphasenmessung	76
6.5:	Chemische Reaktionen infolge Gewebeverletzung bei <i>Allium Cepa</i>	77
6.6:	Schwefel-K-XANES-Spektren von Zwiebelwurzeln	79
6.7:	Schwefel-K-XANES-Spektren von Zwiebeltrieben	79
6.8:	Messspektren von Wurzeln und Fit-Ergebnisse	81
6.9:	Messspektren von Trieben und Fit-Ergebnisse	82
6.10:	Ergebnisse der quantitativen Analyse	83
6.11:	Vergrößerter Ausschnitt der Spektren aus Abb. 6.7 (normiert)	85
7.1:	Schwefel-K-XANES-Spektren mexikanischer Kaffeebohnen	88
7.2:	Schwefel-K-XANES-Spektren äthiopischer Wildkaffee-Bohnen	90
7.3:	Spektren handelsüblicher Röstkaffees	91
7.4:	Schwefel-K-XANES-Spektren grüner und gerösteter Kaffeebohnen	92
7.5:	Mahleffekt bei kolumbianischem 'Huila'- Röstkaffee	94
7.6:	Filtrationseffekte bei 'Huila'-Röstkaffee und 'Dark Roast'-Pulver	95
7.7:	Rösteffekt in den XANES-Spektren mexikanischer Kaffeebohnen und Fits	97
7.8:	Spektren zusätzlicher Referenzsubstanzen	98

Tabellen

3.1:	CAMD-Maschinenparameter	17
4.1:	Quantitative Analyse der Messspektren aus Abb. 4.12	55
5.1:	Ergebnisse der quantitativen Analyse	68

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung der Schwefel-XANES-Spektroskopie auf biologische Probensysteme. Nach einer kurzen Begründung der besonderen Eignung des Verfahrens werden die physikalischen Grundlagen der Messmethodik dargelegt. Ausführlich ist der experimentelle Aufbau unter Nutzung eines Synchrotrons als Lichtquelle beschrieben. Die Messungen wurden in Baton Rouge / Louisiana am Synchrotron des Center for Advanced Microstructures and Devices (CAMD) durchgeführt. Für die Experimente wurde ein Doppelkristall-Monochromator verwendet. Die Spektren wurden sowohl im Transmissions- wie auch im Fluoreszenzmodus erfasst.

Außerdem wurde eine sog. Mikrosonde für ortsauflösende Messungen in Betrieb genommen. Dazu war eine neue Vakuumkammer erforderlich, vor allem zur Unterbringung der speziellen Spiegeloptik. Diese Optik kann zur Minimierung des Sondenfokus mit Hilfe einer Biegeeinrichtung justiert werden. Das resultierende Strahlprofil wurde anhand von Abschattungsmessungen (sog. knife edge scans) ermittelt. Die Funktionstüchtigkeit des Mikrosonden-Aufbaus wurde durch Testmessungen an Metalldrahtgittern und biologischen Objekten sichergestellt.

Ortsauflösende Messungen dienten zur Untersuchung des Rostpilzbefalls von Weizenblättern, einer landwirtschaftlich relevanten Pflanzenkrankheit. Die Ergebnisse erwiesen sich als aufschlussreich für die Klärung der Wechselwirkung zwischen Parasit und Wirt. Insbesondere liefern die Experimente Informationen über die Ausdehnung des Befalls optisch gesunder Bereiche. Die Pflanzenanzucht und die Inokulation mit dem Pathogen erfolgten durch das Institut für Pflanzenkrankheiten (INRES) der Universität Bonn.

Des Weiteren wurden Messungen an mikrobiellen Matten aus sulfidischen Höhlenquellen durchgeführt. Dieses System ist von großem Interesse, weil das Material verglichen mit Tiefseeobjekten relativ einfach einer lichtlosen natürlichen Umgebung entnommen werden kann. Die in den Matten enthaltenen Bakterien sind von großer Bedeutung für das Ökosystem, speziell für den Schwefelkreislauf. Untersucht wurden verschiedene Schichten der Matten (Zusammenarbeit mit Fr. Prof. Summers-Engel / Louisiana State Univ.).

Ein aktuelles Probensystem stellt die Speisezwiebel (*Allium cepa* L.) dar. Mit Hilfe der XANES-Spektroskopie wurde untersucht, wie sich wurzelseitiger Sulfatmangel und eine Begasung mit H₂S auf schwefelhaltige Inhaltsstoffe (u. a. für Phytopharmazeutika von Bedeutung) auswirken (Zusammenarbeit mit dem Lab. of Plant Physiology der Univ. Groningen).

Um Einblick in die thermische Zersetzung biologischen Materials zu gewinnen, wurde das Rösten von Kaffeebohnen untersucht. Die Röntgenabsorptionsspektren erlauben einen neuen Einblick in die wirksamen Prozesse (Zusammenarbeit u. a. mit 'Community Coffee' in Baton Rouge / Louisiana).

Insgesamt zeigt die Arbeit, dass die Schwefel-XANES-Spektroskopie ein effizientes Werkzeug zur Analyse biologischer Systeme darstellt. Das Verfahren ermöglicht den 'in situ' Einblick in Vorgänge, die auf andere Weise kaum experimentell zugänglich sind, dient relevant der wissenschaftlichen Erkenntnis und eröffnet aussichtsreiche Anwendungen.

Abstract

In this thesis investigations of sulfur compounds in biological samples by K-XANES-spectroscopy are reported. After a short elucidation of the special advantages of this method the physical basis of the technique is presented. The experimental setup including the synchrotron light source is described in detail. The measurements were carried out in Baton Rouge / Louisiana at the Center for Advanced Microstructures and Devices (CAMD). A double crystal monochromator was employed for the experiments. The spectra were recorded both in transmission and fluorescence mode.

In addition, a so-called microprobe was put into operation for spatially resolved measurements. For the microprobe a new vacuum chamber was required to accommodate the specific mirror optics. Focussing was achieved by means of a mirror bending mechanism. The resulting beam profile was determined by knife edge scans. The operational reliability of the microprobe was assured by tests on metal wire grids and biological objects.

Spatially resolved measurements turned out to be helpful in investigating the infection of wheat leaves by rust fungi – a plant disease of considerable economic relevance. The results are instructive for clarifying the parasite host interaction. In particular the experiments provide information about the extension of the infection into visibly intact areas. The plants were grown and inoculated by the Institut für Pflanzenkrankheiten (INRES, Bonn University).

Furthermore, microbial mats from sulfidic caves were investigated. This system is of special interest, because samples may be extracted rather easily (compared to deep sea objects) from an aphotic natural environment. The bacteria in these mats are of great importance for the ecosystem, particularly for the sulfur cycle. Different layers of the mats were investigated (collaboration with Prof. Dr. Annette Summers-Engel / Louisiana State University).

Other objects of research are onions (*Allium cepa* L.). By means of XANES spectroscopy the influence of sulfate deprivation and H₂S exposure on sulfur compounds in onion (having potential value as phytopharmaceuticals) was investigated (collaboration with the Laboratory of Plant Physiology, Groningen Univ.).

To gain an insight into the thermal degradation of organic material the influence of roasting on sulfur compounds in coffee beans was studied. The x-ray absorption spectra reveal the implications in a novel way (collaboration with 'Community Coffee', Baton Rouge /Louisiana).

Altogether this thesis shows that sulfur XANES spectroscopy is an efficient tool for the analysis of biological systems. The technique enables 'in situ' insight into processes experimentally almost inaccessible by other methods, and thus scientific understanding is improved and promising applications are opened.

Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Arbeit habe ich an der Universität Bonn und am CAMD in Baton Rouge / USA mit sehr vielen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern zusammenarbeiten können.

Zunächst möchte ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. J. Hormes herzlich für die Stellung des Themas, die kontinuierliche Begleitung der Arbeit, die Förderung ihres Zustandekommens und für viele anregende Diskussionen danken. Sehr hilfreich war auch die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Dr. A. Prange, der mir vor allem die Sichtweise des Biologen vermittelt hat. Herrn Prof. Dr. K. Heinloth bin ich für die Übernahme des Korreferats sehr verbunden.

Mein Dank ergeht weiter an eine Reihe von aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Bonner Synchrotronlicht-Gruppe: Dr. Natalie Palina, Dr. Boris Brendebach, Khusniddin Olimov, Hubert Blank, Dr. Svetlana Zinoveva, Dr. Tonya Vitova, Simone Weyler, Nils Hoffmann, Jana Puschra, Timna-Josua Kühn, Gudrun Lisa Bovenkamp, Danqing Liu und insbesondere an Herrn PD Dr. Hartwig Modrow.

Für die Bereitstellung von Proben danke ich den Damen und Herren PD Dr. U. Steiner, PD Dr. E. Oerke, Dr. M. Durenkamp, Prof. Dr. L. J. de Kok, Prof. Dr. A. Summers-Engel, Dr. H. Hindorf und Carl Leonard (Community Coffee Baton Rouge).

Für die Bereitstellung von Strahlzeit am CAMD danke ich Herrn Prof. Dr. J. Scott und Herrn Prof. Dr. D. Ederer. Außerdem habe ich den Mitgliedern der X-Ray Group zu danken: Prof. Dr. R. Tittsworth (+), Prof. Dr. A. Roy, Dr. V. Palshin, Chris Bianchetti, Russell Louis, David Alley und Gregory Merchan, außerdem der CAMD-Maschinengruppe, der CAMD-Vakuumgruppe (insbesondere Alden Bordelon und Kevin Morris) sowie Frau Dr. L. Day, Frau Caryl Boyet, Herrn Prof. Dr. J. Göttert, Herrn Dr. O. Kizilkaya und Herrn Craig Stevens.

Mein Dank gilt außerdem den Mitgliedern des Physikalischen Instituts und der ELSA-Maschinengruppe der Universität Bonn.